

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16199

研究課題名（和文）糖尿病性腎臓病における糸球体内皮Glycocalyxの恒常性破綻の分子機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Molecular Mechanisms of Glomerular Endothelial Glycocalyx Homeostasis Disruption in Diabetic Kidney Disease

研究代表者

角谷 裕之（Kadoya, Hiroyuki）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70509265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎臓病(DKD)は国民の健康寿命延伸の阻害要因であり、その基盤病態の解明と有効な予防・治療法開発が喫緊の課題である。本研究で、DKDの病態進展において腎糸球体内皮表層のglycocalyxの質的・量的破綻が、アルブミン尿出現の一機序である可能性が示唆された。また、その病態には、CD44陽性leukocyteが重要な役割を担っている可能性があることを生体in vivo imaging技術を用いて検証した。DKD発症・進展においてglycocalyxの恒常性破綻と炎症細胞浸潤との関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内皮機能障害はCKDの基盤病態であり、内皮機能障害がDKDの病態進展に重要な役割を果たしている。内皮細胞はGlycocalyx層で被覆されており、同構造をtargetとした研究が報告されている。多くの研究は、プロテオグリカンやグリコプロテインを標的に検討されているが、有効な創薬開発には結びついていない。本研究は、糸球体内皮表層の構成要素の1つであるヒアルロン酸に注目し、同構造の質的・量的変化がDKD進展に関与しているかどうかを検討した。

本研究は、DKDの腎病変の新規病態の解明のみならず、糖尿病状態の全身諸臓器における病態解明につながるため同研究成果の学術的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Diabetic kidney disease (DKD) is an obstacle to extending the healthy life expectancy of the population, and the elucidation of its underlying pathology and the development of effective prevention and treatment methods are urgent issues. The present study suggests that qualitative and quantitative disruption of glycocalyx in the surface layer of the renal glomerular endothelium may be a mechanism for the appearance of albuminuria in the pathogenesis of DKD. The possible role of CD44-positive leukocytes in the pathogenesis of DKD was also verified using in vivo imaging techniques, suggesting a link between disruption of glycocalyx homeostasis and inflammatory cell infiltration in the onset and progression of DKD.

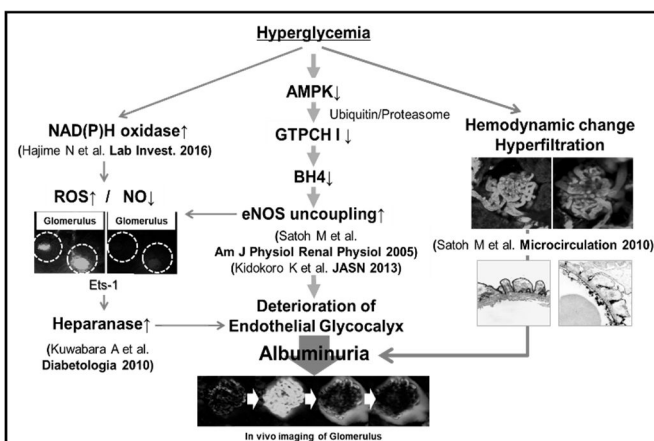
研究分野：腎臓病学

キーワード：glycocalyx 内皮機能障害 ヒアルロン酸 糖尿病関連腎臓病

### 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) 及び糖尿病性腎臓病 (DKD) は国民の健康寿命延伸の阻害要因であり、その基盤病態の解明と有効な予防・治療法開発が喫緊の課題である。私共は、これまでに糖尿病、高血圧、加齢等には共通して内皮障害が随伴し、腎障害の発症・進展に關与することを明らかにした。さらに内皮表層に存在する Glycocalyx が透過性制御に重要な役割を果たしており、その恒常性の破綻 (質的・量的異常) がアルブミン尿の出現に關与することを解明した。一方、糸球体内における慢性炎症 (炎症細胞浸潤、炎症性サイトカイン発現亢進) が DKD 進展に關与することも示されている。しかしながら、DKD において糸球体への炎症細胞浸潤の分子機序、内皮障害との関連は不明である。DKD 発症・進展における Glycocalyx の恒常性破綻とその機序、炎症細胞浸潤との関連を明らかにし、治療法開発に資することが重要であると考えます。

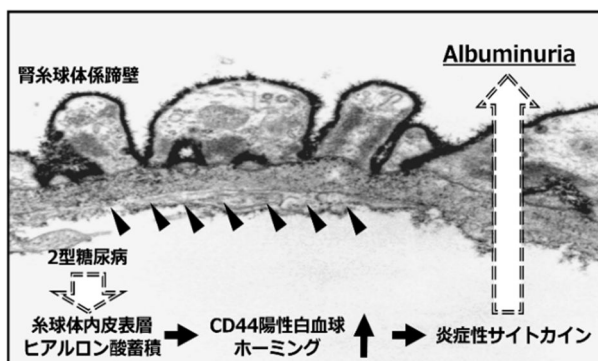
CKD は末期腎不全患者数の増加のみならず、脳卒中、心血管病、認知機能障害の独立した、かつ強力なリスク因子であり国民の健康寿命延伸を阻んでいる。特に DKD は透析導入の主要な原疾患であり、有効な治療法開発が喫緊の課題である。私共は、これまでに糖尿病、高血圧、加齢などに共通して随伴する内皮障害が糸球体障害の発症・進展に關与することを明らかにしてきた (右図参照)。特に腎糸球体内皮細胞表層に存在する Glycocalyx がアルブミン尿の出現に深く關与し、その機序として活性酸素種 (ROS) の關与を報告してきた。そのため、腎糸球体内皮細胞保護、特に Glycocalyx の恒常性維持により DKD 進展を抑制できることが期待できる。



Glycocalyx は、プロテオグリカン (PG) やグリコプロテイン等から構成される。さらに PG は膜結合コアタンパクに糖側鎖を有するもの以外に、直接細胞膜に結合しないヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) 等で構成されている。従来の研究は、プロテオグリカンやグリコプロテインを対象にしており、有効な治療法開発には至っていない。細胞外マトリックスの構造上の複雑性、構造体としての脆弱性が治療標的の同定の障壁となってきた。私共は、Glycocalyx の重要な構成要素の一つである HA に注目した。 HA は、白血球表面蛋白である CD44 のリガンドであり、HA-CD44 の相互作用は、炎症部位の内皮細胞へのリンパ球の一次接着に關係している。糖尿病糸球体における Glycocalyx の恒常性破綻の機序、HA-CD44 陽性白血球の相互作用の分子機序を解明することができれば、臨床的意義は非常に高いと考えられる。

### 2. 研究の目的

アルブミン尿が DKD の早期病態であり、糸球体内皮 glycocalyx の恒常性の破綻がアルブミン尿出現に關与している。「DKD では、糸球体内皮 Glycocalyx の恒常性の破綻 (質的・量的異常) により、CD44 陽性白血球の糸球体内皮へのホーミングが増加し局所に炎症を惹起し腎症が進展する」との仮説証明を通して、DKD における糸球体内皮 HA-CD44 陽性白血球の相互作用を検討し、DKD 治療戦略立案に資することを目的とする。

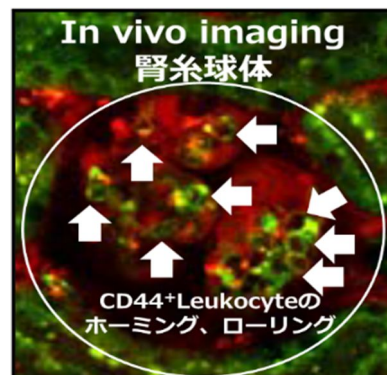


### 3. 研究の方法

1) 生体マウスにおいて腎糸球体を可視化し、ヒアルロン酸-CD44 陽性細胞の相互作用を in vivo imaging 技術を用いて評価する

共焦点レーザー顕微鏡を用いると、励起波長が短く光毒性が低いため、深部まで低侵襲にて長時間観察可能である。時間・空間分解能が高く、蛍光標識した小分子の生体内挙動が3次元的に動画で記録可能である。野生型マウス (WT; C57BL/6J) 内皮障害モデルマウスとして eNOS 欠

損マウス (eNOSKO) を使用する。糖尿病モデルを作成するため eNOSKO マウスおよび WT マウスに Streptozocin (STZ) の投与を行い、糖尿病を発症させ腎症の進展時期 (初期、中期、末期) に応じて in vivo imaging にて腎系球体への CD44 陽性 Leukocyte のホーミング数、ローリング、遊走、接着について評価する。Alexa594 で蛍光標識した bovine serum albumin (BSA) を同マウスに経動脈的投与することで血管を赤色にリアルタイムに可視化し、次に FITC (Fluorescein isothiocyanate) 488 でラベリングした anti-mouse CD44 antibody を経動脈的投与することで循環血中の CD44 陽性 Leukocyte を緑色で可視化している (右図は、Kadoya H et al. JCI Insight. 2020 より引用)。



## 2) 糖尿病状態における系球体内皮細胞表層ヒアルロン酸蓄積について検討する

ヒアルロン酸のコアタンパクに接する G2 domain に特異的に結合する peptide を Alexa594 で蛍光標識し、糖尿病状態の腎系球体にヒアルロン酸が蓄積しているかどうかを検討する。

## 3) ヒアルロン酸の蓄積もしくは、CD44 陽性 Leukocyte に対する治療介入意義を検討する

In vivo 実験でヒアルロン酸の分解酵素である hyaluronidase を WT-STZ、eNOSKO-STZ に慢性投薬 (4 週間) することで腎症進展を抑制できるかどうかを検討する。もしくは、CD44 をターゲットにした阻害薬を投与することで、腎症進展を抑制できるかどうかを検討する。適宜、畜尿、血圧等の評価を行う。Sacrifice 時に腎臓を採取し、系球体変化を PAS 染色で評価する。同時にアルブミン尿、腎機能 (血清クレアチニン、血清尿素窒素)、炎症性サイトカインの発現量をタンパクレベルで評価する。

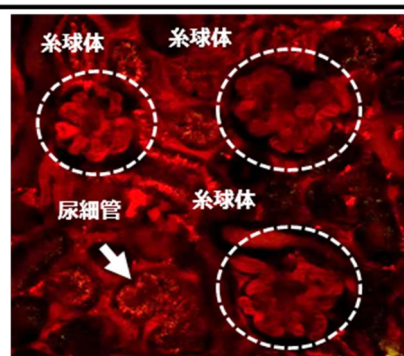
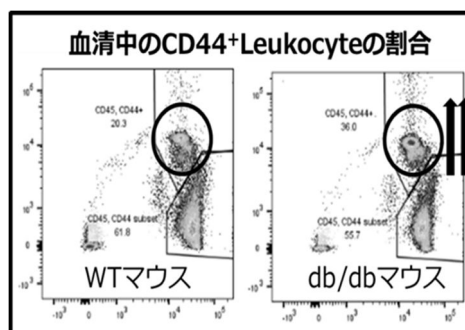
## 4) 系球体内皮細胞における高血糖条件下でのヒアルロン酸の蓄積機序について検討する

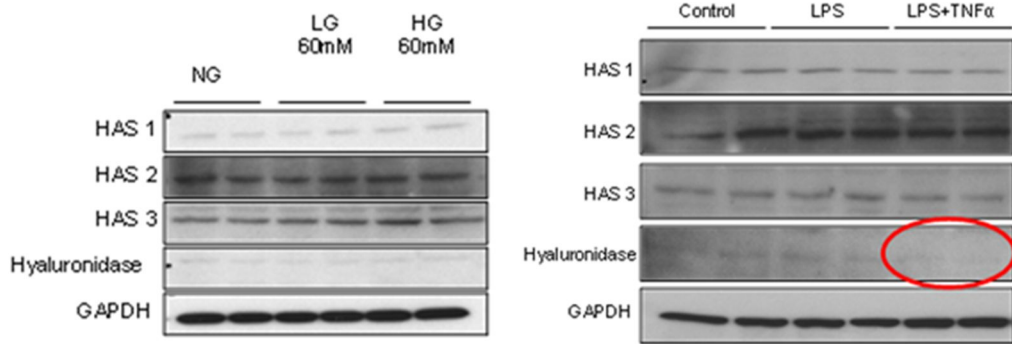
In vitro でヒト系球体内皮細胞を使用する。ヒアルロン酸の合成酵素である、hyaluronic acid synthase (HAS1, 2, 3) が高糖濃度条件下で増加するかどうかをタンパクレベルで評価する。同時に、高糖濃度条件下でヒアルロン酸の分解酵素である hyaluronidase が減少しているかどうかをも検討する。さらにそれらの分子機序について詳細に検討する。

## 4. 研究成果

循環血中の CD44 陽性 Leukocyte 数が糖尿病進展に伴い増加しているのどうかを検討した。WT マウス、db/db マウス、eNOSKO-db/db マウスの 5 週齢、10 週齢、15 週齢における血清を採取してフローサイトメリーで評価した。結果、WT マウスと比較して db/db マウス、eNOSKO-db/db マウスで顕著に増加していた (右上図参照、WT マウス v.s db/db マウス)。次に腎系球体における CD44 陽性 Leukocyte のホーミングについて評価した。まず生体マウスの腎系球体を可視化した (右中図参照)。腎系球体を可視化後、抗 CD44 抗体を経動脈投与した。結果、系球体への同 Leukocyte のホーミング数は、WT マウスと比較して eNOS<sup>-/-</sup>-STZ および eNOS<sup>-/-</sup>-db/db マウスで顕著に増加していた (右下図参照)。CD44 陽性 Leukocyte の一部は、内皮細胞上をローリングしており、time lapse imaging で動画を撮影することに成功している。また、CD44 と相互作用を有するヒアルロン酸のリアルタイムな可視化については、その生体イメージング法での検出に難渋し、評価が困難であった。

In vitro 実験については、ヒト系球体内皮の培養細胞 (human glomerular endothelial cell; hGEC) を使用した。まず、High glucose (30mM、60mM) 刺激でヒアルロン酸の合成酵素の発現量を評価した。結果、同刺激のみでは変化を認めなかった (左下図参照)。そのため、刺激条件を変更した。炎症を誘導する LPS+TNF $\alpha$  刺激を行い再度、検討を行った。結果、ヒアルロン酸の合成酵素は同刺激で蛋白レベルでの発現量に変化を認めなかった。しかし、ヒアルロン酸の分解酵素である hyaluronidase については、LPS+TNF $\alpha$  刺激で蛋白レベルの発現量が低下していた (次ページの上図参照)。





内皮機能障害は CKD の基盤病態であり、私共は内皮機能障害が DKD の病態進展に重要な役割を果たしていることを報告している。とりわけ糸球体内皮細胞は有窓性であり、アルブミン等の macromolecule の透過性制御への関与は少ないと見なされてきた。しかし、近年、内皮細胞は glycocalyx 層で被覆されていることがわかり、同構造を target とした研究が報告されている。多くの研究は、プロテオグリカンやグリコプロテインを標的に検討されているが、有効な創薬開発には結びついてない。

本研究は、糸球体内皮表層の Glycocalyx の重要な構成要素である HA に注目し、最先端の *in vivo* imaging 技術を応用し、同構造の質的・量的変化が DKD 進展に関与しているかどうかを検討した。糖尿病の進展に伴い循環血中の CD44 陽性 Leukocyte が増加傾向にあった。その原因については現時点でははっきりしないが、少なくとも同 Leukocyte が DKD 進展に関与している可能性はあると考えられた。また、同 CD44 陽性 Leukocyte が実際に糖尿病状態の腎糸球体にホーミングしている状態を評価することができた。また、WT マウスと比較してそのホーミング数は顕著に増加していた。この結果より、腎糸球体局所にホーミングした CD44 陽性 Leukocyte が炎症性サイトカインを放出し、炎症を惹起している可能性が考えられた。実際、マウスの糸球体を単離し、炎症性サイトカインの発現量を WT マウス、db/db マウス、eNOS $^{-/-}$ -db/db マウスで評価した結果、WT マウスと比較して eNOS $^{-/-}$ -db/db マウスの糸球体内における炎症性サイトカインの発現量は増加していた。なぜ、CD44 陽性 Leukocyte がホーミングしているのかどうかについては、仮説としては、glycocalyx の重要な構成因子の一つであるヒアルロン酸が蓄積している可能性を考えたが、同構造を実際に *in vivo* imaging 法でリアルタイムに可視化することは技術的に困難であった。ヒアルロン酸の合成酵素、分解酵素の発現量の変化については、*in vitro* で検討を行った。当初は、糖尿病状態においてヒアルロン酸の合成酵素の発現量が増加しているのではないかと考えたが、実際には合成酵素の発現量には変化を認めず、ヒアルロン酸の分解酵素である hyaluronidase の発現量が低下していた。なぜヒアルロン酸の分解酵素が減少したのかどうかについては、今後さらなる検討が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroyuki Kadoya, Akira Hirano, Reina Umeno, Eriko Kajimoto, Tsukasa Iwakura, Megumi Kondo, Yoshihisa Wada, Kengo Kidokoro, Seiji Kishi, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Shun'ichiro Taniguchi, Masafumi Takahashi, Naoki Kashihara	4. 巻 37(9)
2. 論文標題 Activation of the inflammasome drives peritoneal deterioration in a mouse model of peritoneal fibrosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e23129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.20220177RRR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 角谷 裕之	4. 巻 286巻5号
2. 論文標題 生体イメージングを用いた腎疾患の病態解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 Page446-454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角谷 裕之, 長洲 一
2. 発表標題 可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬による腎保護作用の可能性
3. 学会等名 第53回日本腎臓学会西部学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 腎臓・高血圧内科学 ホームページ  
<http://www.kawasaki-jinzo.net/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------