

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22590900

研究課題名（和文） 糖尿病性腎症発症機転における Rho/ROCK 系シグナル制御機構の検討

研究課題名（英文） Role of Rh/Rho-kinase pathway in the pathogenesis of diabetic nephropathy

研究代表者

宇都宮一典 (Utsunomiya Kazunori)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50185047

研究成果の概要（和文）：

Rho/ROCK シグナルは、アクチンストレスファイバーの形成や諸種の遺伝子発現など、重要な細胞機能の制御に関与することが判明している。本研究では、2型糖尿病モデル db/db マウスの腎皮質では Rho/ROCK 活性が過剰に亢進しており、このことが糸球体硬化に関与すること、また、培養メサンギウム細胞にて本シグナルが炎症性サイトカインの発現を増強させることを見出し、Rho/ROCK シグナルが糖尿病腎症の発症進展に関与することを証明した。

研究成果の概要（英文）：

Rho/ROCK pathway regulates various cellular functions. In this study, we found that Rho/ROCK pathway is activated in renal cortex of db/db mouse and involved in upregulation of pro-inflammatory cytokines in cultured mesangial cells, suggesting critical role of Rho/ROCK pathway played in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：糖尿病、糖尿病腎症、Rho,

Rho キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病腎症は、数の増加と不良な予後から治療法の確立が喫緊の課題となっている。糖尿病性腎症の成因は、従来、糸球体障害を中心に検討がなされており、高血糖状態における様々な細胞内シグナルの異常が報告されているが、近年、腎障害が心血管疾患のリスクのなることが判明し、慢性腎臓病(CKD)の概念が提唱され、両者を結ぶ心腎連関のメカニズムが注目されている。糖尿病は CKD の最大の原因であり、多くの血管病変を伴うこ

とは古くから知られている。すなわち、糖尿病における心腎連関の解明は、糖尿病のみならず、CKD に基本病態の理解ならびにその包括的血管治療に関して、多大の寄与をもたらすと考えられるのである。

低分子量 G 蛋白 Rho は、Rho キナーゼ (ROCK) をエフェクターとして、細胞形態や諸種の遺伝子発現を制御することが判明している。Rho は GTP と結合することによって活性化となり、ROCK と結合してこれを活性化することから、Rho/ROCK シグナルと呼

称されている。Rho/ROCK シグナルは、既に動脈硬化病変の形成に関与することが報告されており、我々は糖尿病状態では腎臓における本シグナルが亢進することを見出している。これらの知見は、Rho/ROCK シグナルは、糖尿病における血管病態の共通基盤を担う可能性を示唆している。Rho/ROCK シグナルが制御する細胞機能は、アクチンストレスファイバーを中心とする細胞骨格の形成から細胞形態の維持あるいは分化誘導など多岐にわたっており、近年、各分野から精力的な研究が進んでいるが、腎病変に対する本シグナルの関与について、検討例は稀である。糖尿病性腎症の発症機転における本シグナルの意義を解明することができれば、本シグナルを治療標的とし、包括的な血管治療を目指した新たな創薬へと道を拓くものと期待できる。また、本シグナルは、高脂血症治療薬スタチンの多面的作用にも関わることが知られており、実臨床の面でも、現行治療薬の効果に付加的な価値をもたらすものと予想される。

## 2. 研究の目的

このような背景から、本研究では糖尿病性腎症発症機転における Rho/ROCK シグナルの意義を、*in vitro* ならびに *in vivo* の実験系を用いて検討することを目的とした。特に、本研究は、Rho/ROCK シグナルが血管病態の共通基盤を担う可能性に注目し、炎症ならびに繊維化に関わる機構、転写因子への関与を明らかにすることとした。また、血管内皮細胞を用いて同様の検討を行い、本シグナルの血管系細胞における役割の普遍性について、あわせて検討することとした。

## 3. 研究の方法

*In vitro* の実験系としては、培養メサンギウム細胞ならびに血管内皮細胞を用い、糖尿病あるいはメタボリックシンドロームの状況を再現し、Rho/ROCK シグナルの動態を検討する。培養メサンギウム細胞に、インスリン抵抗性分子としてその意義が確立されている TNF- $\alpha$  を添加し、Rho/ROCK シグナルの動態と炎症性サイトカイン MCP-1 ならびに TGF- $\beta$  を中心とする繊維化惹起性サイトカイン発現との関係を明らかにする。また、腎症の発症機転との関係が注目されている転写因子、低酸素誘導因子 HIF-1 の動態および Rho/ROCK シグナルとの関係を明らかにする。

*In vivo* の実験系としては、2 型糖尿病のモデル db/db マウスを用い、糖尿病を発症した後の腎皮質における Rho/ROCK シグナルの動態を検討する。同時に尿中アルブミン、血圧の変化、摘出腎における糸球体の病理形態学的変化を観察する。また、繊維化惹起性サイ

トカインの変化、転写因子 HIF-1 $\alpha$  の変化を検討する。糖尿病マウスに ROCK 阻害薬を投与し、同様の検討を行い、Rho/ROCK シグナルの役割を検証し、糖尿病性腎症発症機転における Rho/ROCK シグナルの意義を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) TNF- $\alpha$  刺激による Rho/ROCK シグナルの活性化と MCP-1 の転写制御の関係 (メサンギウム細胞における検討)

TNF- $\alpha$  は、内臓脂肪型肥満では脂肪組織から生成・分泌され、インスリンの全身作用を抑制すると考えられており、インスリン抵抗性状態ならびにインスリン抵抗性を背景とする血管病変の成因に重要な役割を演じる。特に、動脈硬化病変の成立過程において、マクロファージの浸潤を中心とする炎症機転を促すものと考えられている。そこで、TNF- $\alpha$  刺激下における Rho/ROCK シグナルの動態を検討し、その下流に位置する分子機構の解明を試みた。特に、マクロファージの浸潤を促進するとされる MCP-1 の発現機構に注目し、継代化された培養メサンギウム細胞を用い、培養液中に TNF- $\alpha$  を添加して、以下の検討を行った。尚、Rho 活性は、GTP 結合型 Rho を immunoblot して分離・同定し、ROCK 活性は、リン酸型 MYPT-1 を immunoblot によって検出して、活性化の指標とした。

### ① TNF- $\alpha$ 刺激による Rho/ROCK の活性化

培養メサンギウム細胞に TNF- $\alpha$  を添加したところ、時間依存的、用量依存的に Rho ならびに ROCK の活性化をもたらすことを確認した。ROCK 特異的阻害薬 Y-27632 を用いて前処置したところ、TNF- $\alpha$  による ROCK 活性の亢進は、完全に抑制されることを確認した。

### ② TNF- $\alpha$ 刺激による MCP-1 の発現増強

培養メサンギウム細胞に TNF- $\alpha$  を添加し、MCP-1 の発現を検討した。TNF- $\alpha$  は、時間依存的ならびに用量依存的に MCP-1 の mRNA の発現を増強することを見出した。同時に、培養液中の MCP-1 濃度を測定したところ、mRNA の増強とともに培養液中の MCP-1 濃度が上昇しており、MCP-1 の生合成が促進していることを確認した。

### ③ MCP-1 によるマクロファージ遊走能亢進

培養液中の MCP-1 が、マクロファージの遊走亢進に関与することを確認するために、ボイデンチャンバーを用い、上層にマクロファージ由来 THP-1 細胞を培養し、下層に TNF- $\alpha$  処理したメサンギウム細胞の培養液を置き、チャンバーを遊走する細胞数をカウントし、遊走能を評価した。その結果、TNF- $\alpha$  処理後の培養液は、遊走した THP-1 細胞数を増加させることを観察し、本実験系において、MCP-1 のマクロファージ遊走能に与える影響を観察できることを確認した。

#### ④ MCP-1 の発現増強における Rho/ROCK シグナルの関与

MCP-1 の産生調節における Rho/ROCK シグナルの関与を明らかにする目的で、TNF- $\alpha$  添加前に細胞を ROCK 特異的阻害薬 Y-27632 で処理し、MCP-1 の産生ならびに THP-1 細胞の遊走能に及ぼす変化を検討した。Y-27632 を前処置することによって、TNF- $\alpha$  によって誘導される MCP-1 mRNA 発現増強ならびに培養液中の MCP-1 濃度の増加は、完全に抑制された。また、ボイデンチャンバーによる THP-1 細胞の遊走能亢進は、Y-27632 前処置によって有意に抑制されることを確認した。

#### ⑤ Rho/ROCK シグナルの下流に P38MAPK が介在する。

ROCK の下流に存在する分子機構を解明するために、MAP キナーゼファミリーの阻害薬の影響を検討した。TNF- $\alpha$  刺激下に発現亢進する MCP-1 は、P38MAPK の阻害薬によってのみ著明に抑制された。そこで、TNF- $\alpha$  刺激下で P38MAPK の活性化が生じており、この活性化は ROCK 阻害薬 Y-27632 によって抑制されることを確認した。このことから、ROCK の下流に P38MAPK が介在することが明らかになった。

以上の実験結果から、培養メサンギウム細胞において、Rho/ROCK シグナルは TNF- $\alpha$  による MCP-1 の産生調節を行い、その作用は P38MAPK が介在することが証明された。

#### (2) 血管内皮細胞における Rho/ROCK シグナルの活性化と MCP-1 の転写制御の関係

血管系細胞における Rho/ROCK シグナルの MCP-1 発現制御への関与の普遍性を検証する目的で、血管内皮細胞を用いて同様の検討を行った。

ヒト臍帯由来血管内皮細胞 (HUVEC) を培養し、培地に TNF- $\alpha$  を添加すると、Rho ならびに ROCK が有意に活性化され、ROCK 特異的阻害薬 Y-27632 は ROCK の活性化を完全に抑制した。MCP-1 の mRNA の発現ならびに培地の MCP-1 濃度は、TNF- $\alpha$  によって上昇していた。また、MCP-1 のマクロファージ遊走活性をボイデンチャンバーにて評価し、培地の MMCP-1 が THP-1 細胞の遊走を促進することを確認した。Y-27632 は、MCP-1 の発現増強ならびに細胞遊走能亢進を抑制した。また、TNF- $\alpha$  による MCP-1 の発現増強ならびに細胞遊走能亢進は、P38MAPK 阻害薬によって抑制された。実際に、TNF- $\alpha$  は血管内皮細胞における P38MAPK の活性化をもたらし、この活性化は ROCK 特異的阻害薬によって抑制されることを確認した。

以上の結果から、血管内皮細胞においても、メサンギウム細胞と同様に、Rho/ROCK シグナルが、炎症性サイトカイン MCP-1 の発現制御に関与し、マクロファージ浸潤を主体とする

炎症機転を惹起する可能性が示された。

#### (3) Rho/ROCK シグナルの HIF-1 を介する腎線維化促進機構

糖尿病性腎症の主病態である腎線維化機構への関与とその分子機序を明らかにする目的で、以下の検討を行った。

#### ① 2型糖尿病モデル db/db マウスにおける Rho/ROCK シグナルの動態

2型糖尿病のモデルとして一般的に使われている db/db マウスを対象として、糖尿病発症後のマウス、発症前から ROCK 特異的阻害薬 Fasudil を投与したマウス、糖尿病を発症しない db/m マウスの3群に分け、腎皮質を摘出後し、Rho ならびに ROCK 活性を検討し、糖尿病マウスでは Rho および ROCK が、対照群に比べて有意に上昇していることを確認した。Fasudil の投与によって、腎皮質の ROCK 活性は抑制されていた。

#### ② Fasudil の投与によって糖尿病性腎症の進展が抑制される。

この際、糖尿病群では 400mg/dl と著明な高血糖状態にあり、血圧も軽度の上昇していたが、fasudil 投与によって血糖、血圧の変化はなかった。尿中アルブミンは、非糖尿病対照群に比べ、糖尿病群では血糖の上昇とともに増加し、糖尿病性腎症の発症を示していた。一方、Fasudil 投与によって糖尿病マウスの尿中アルブミンは有意に抑制されていた。

32 週間の観察後、腎を摘出して病理組織学的検討を行った。対照群に比較して、糖尿病群では、糸球体の肥大、メサンギウム領域の拡大、マクロファージの浸潤を認め、糖尿病における糸球体病変に一致した変化を認めた。一方、これらの形態学的変化は、Fasudil 投与群では有意に改善していた。

以上の結果から、糖尿病では腎皮質における Rho/ROCK シグナルの活性化亢進を生じており、糖尿病性腎症の発症・進展に関与すること、ROCK の阻害によって腎症の発症が抑制されることが証明された。

#### ③ Rho/ROCK シグナルは、繊維化惹起性サイトカイン発現増強に関わる。

Rho/ROCK シグナルが糖尿病性腎症の発症・進展に関与する分子機構を明らかにするために、腎線維化を促進するサイトカインの発現を検討した。摘出腎における TGF- $\beta$ 、CTGF、PAI-1 の mRNA は、対照群に比較して糖尿病群で有意に増加していた。また、1型、4型コラーゲン、ファイブロネクチンの mRNA も糖尿病群で増加していたが、これらの変化は Fasudil の投与によってほぼ完全に抑制された。この結果から、Rho/ROCK シグナルは腎線維化を促進することが示された。

#### ④ Rho/ROCK シグナルは HIF-1 $\alpha$ を増加させる。

近年、各種腎障害モデルにおいて低酸素誘導因子 HIF-1 の関与が注目されている。そこで、HIF-1 $\alpha$  の蛋白発現と Rho/ROCK シグナルとの関係を検討した。摘出腎を用いて HIF-1 $\alpha$  の蛋白量を immunoblot で評価したところ、対照群に比較して、糖尿病群では細胞質ならびに核分画において HIF-1 $\alpha$  が増加していることを見出した。また、HIF-1 によって誘導される VEGF などの遺伝子群の発現も増強しており、HIF-1 $\alpha$  の増加は直接病態に関与するものと考えられた。大変興味深いことに、HIF-1 $\alpha$  ならびにその下流の遺伝子発現は、Fasudil の投与によって有意に抑制されていた。

⑤ Rho/ROCK シグナルは HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化を阻害し、分解を抑制する。

HIF-1 $\alpha$  蛋白の調節は、合成と分解のバランスによってなされている。特に、ユビキチン化とその後のプロテアソームにおける分解が、蛋白調節において大きな役割を果たしている。そこで、Rho/ROCK シグナルが HIF-1 $\alpha$  増強に関わるメカニズムを明らかにするために、Rho/ROCK シグナルと HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化との関係を、培養メサンギウム細胞を用いて検討した。

細胞を低酸素状態に置くと、Rho ならびに ROCK の活性化が起きること、そして HIF-1 $\alpha$  の蛋白発現量が増加することを確認した。ROCK 特異的阻害薬および ROCKsiRNA は、低酸素で誘導される HIF-1 蛋白の増加を抑制した。この際、mRNA には変化のなかったことから、HIF-1 $\alpha$  蛋白変化は、合成・分解にバランスに起因すると考えられた。HIF-1 $\alpha$  を抗ユビキチン抗体で免疫沈降し、電気泳動にかけると広い分子領域にバンドを認め、HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化を確認することができたが、ROCK 阻害薬は HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化を増強することを見出した。

ユビキチン化の律速段階は、標的蛋白の水酸化によっており、これは水酸化酵素 PDH2 の活性が担うとされている。メサンギウム細胞に ROCK 阻害薬を添加すると、PDH2 の活性上昇を認めた。すなわち、Rho/ROCK シグナルは、HIF-1 $\alpha$  のユビキチン化を阻害し、プロテアソームにおける分解を抑制することによって、HIF-1 $\alpha$  の転写活性を高めることが示された。

以上の研究結果から、Rho/ROCK シグナルは糖尿病性腎症の発症機転において、炎症ならびに繊維化を促進する重要な意義を有し、その作用は腎臓のみならず、血管系細胞にあまねく作動する可能性が示された。本研究とは別の実験研究において、申請者は糖尿病性神経障害にも関与することを見出している。すなわち、本シグナルは糖尿病における包括的な血管治療を目指す新たな分子標的となる可能性を示唆しており、かかる知見は国際的

にみても、本研究を嚆矢とするものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Matoba K, Kawanami D, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota Y, Murai N, Matsufuji S, Utsunomiya K. Rho-kinase inhibition prevents the progression of diabetic nephropathy by downregulating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Kidney Int* in press 2013 (doi:10.1038/ki.2013.130) (査読有)
2. Utsunomiya K. treatment strategy for type 2 diabetes from the perspective of systemic vascular protection and insulin resistance. *Vasc Health Risk Manag* 8:429-436, 2012 (査読有)
3. 宇都宮一典. 脳・心血管イベントを抑制するための New Diabetes Strategy. *Ther Res* 33:457-461, 2012 (査読無)
4. 宇都宮一典. 糖尿病合併症治療標的としての Rho キナーゼの意義. *糖尿病合併症* 26:80-84, 2012 (査読無)
5. 宇都宮一典. Microalbuminuria. *日本臨床* 70:451-454, 2012 (査読無)
6. Kawanami D, Matoba K, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K. Utsunomiya K. Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway activation in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 411: 798-803, 2011 (doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.031) (査読有)
7. 宇都宮一典. 糖尿病性腎症進展機構と脂質代謝異常. *糖尿病合併症*. 25:44-47, 2011 (査読無)
8. 宇都宮一典. 全身血管保護を考慮した治療戦略. *Ther Res* 32:1201-1206, 2011 (査読無)
9. Matoba K, Kawanami D, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K. Rho-kinase mediates TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 expression via p38 MAPK signaling pathway in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 402:725-730, 2010. (doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.093) (査読有)
10. 川浪大治, 宇都宮一典. 耐糖能異常への早期介入の臨床的意義. *日本臨床* 68:797-802, 2010 (査読無)
11. 伊藤朝子, 宇都宮一典. CKD と糖尿病性腎症. *肥満と糖尿病*. 10:32-33, 2010 (査

読無)

12. 石澤将、宇都宮一典、糖尿病における心腎連関と病態. 腎と透析. 69:482-486、2010 (査読無)

13. 宇都宮一典、脂質異常と糖尿病性腎症. Medical View Point 32:1-3, 2010(査読無)

[学会発表] (計 22 件)

1. 宇都宮一典、糖尿病と動脈硬化・高血圧. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2012 年 5 月 19 日、横浜市.

2. 川浪大治、宇都宮一典、Rho-kinase による HIF-1 $\alpha$  および NF- $\kappa$ B 活性調節と糖尿病性腎症への関与. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2012 年 5 月 18 日、横浜市.

3. 宇都宮一典、糖尿病性腎症と食事療法. 第 10 回日本機能性食品医用学会. 2012 年 12 月 15 日、東京.

4. 宇都宮一典、糖尿病の食事療法. 第 16 回日本病態栄養学会年次学術集会. 2012 年 1 月 13 日、京都.

5. 宇都宮一典、糖尿病性血管障害の成立機転における Rho/Rho-kinase シグナルの意義. 第 12 回 Atherosclerosis and Biolipid Conference 2011 年 8 月 6 日、神戸市.

6. 宇都宮一典、糖尿病合併症治療標的としての Rho キナーゼの意義. 第 26 回日本糖尿病合併症学会. 2011 年 10 月 14 日、さいたま市.

7. 宇都宮一典、糖尿病性腎症の食事療法の意義と課題. 第 32 回日本臨床栄養学会. 2011 年 10 月 29 日、東京.

8. 宇都宮一典、糖尿病性腎症の管理. 第 14 回日本病態栄養学会年次学術集会. 2011 年 1 月 15 日、京都.

9. 川浪大治、宇都宮一典、Thrombin induces MCP-1 expression through Rho/Rho-kinase activation in endothelial cells. 第 42 回日本動脈硬化学会. 2010 年 7 月 5 日、岐阜市.

10. 的場圭一郎、宇都宮一典、Rho-kinase はメサングウム細胞において TNF $\alpha$  による MCP-1 の発現と機能を調節する. 第 42 回日本動脈硬化学会. 2010 年 7 月 5 日、岐阜市.

11. 宇都宮一典、糖尿病性腎症の進展機構と脂質代謝障害. 第 25 回日本合併症学会. 2010 年 10 月 22 日、大津市.

12. 宇都宮一典、糖尿病性腎症の治療戦略. 第 47 回日本臨床生理学会. 2010 年 11 月 20 日、前橋市.

[図書] (計 1 件)

宇都宮一典、糖尿病性腎症の安心レシピ 103、弘文堂、東京、2010 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

東京慈恵会医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科 <http://diabendo.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇都宮一典 (UTSUNOMIYA KAZUNORI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50185047

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: