

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08218

研究課題名(和文) 肥満関連・糖尿病性腎症の病態生理の解明 - 腎臓3次元イメージング法による組織可視化

研究課題名(英文) Pathophysiology of obesity related glomerulopathy

研究代表者

徳山 博文 (TOKUYAMA, HIROBUMI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：50276250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肥満関連腎症の近位尿細管において、近位尿細管細胞肥大・空胞化より早期からリン脂質を含有した多量のライソゾームの蓄積がみられ、同時にオートファジー関連遺伝子mTOR、ATGなどの動態異常がみられた。肥満関連腎症早期において近位尿細管細胞肥大・空胞化が観察されること、肥満患者の近位尿細管細胞にリン脂質が貯留した多量のライソゾームの蓄積が観察されること、PHD2/HIF経路はオートファジー関連遺伝子を制御していること、以上から肥満関連腎症の病態生理として、早期からのオートファジー制御異常の存在があり、それに引き続いて組織低酸素状態、尿細管細胞肥大化・空胞化が引き起こされると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要な末期腎不全原因疾患である糖尿病性腎症への治療介入として、これまで食事療法、レニン・アンジオテンシン系抑制を中心とした降圧療法、血糖管理など多面的治療が行われてきた。しかし、腎症の進行・新規透析導入を抑制しきれておらず、病勢の進行阻止は喫緊の課題である。本研究は、糖尿病性腎症の前段階である肥満関連腎症の病態生理を明らかにするものであり、特に肥満関連腎症の超早期におけるオートファジー制御異常を初めて明らかにし、PHD/HIF経路とオートファジー制御異常の相関を明確にした。この新知見を応用し、PHD/HIF経路への治療介入による肥満関連腎症、糖尿病性腎症の進行抑止を目指すものである。

研究成果の概要(英文)：High fat diet (HFD)-fed mice became obese with tubular enlargement, glomerulomegaly and peritubular capillary rarefaction, and exhibited both tubular and glomerular damages. In addition, lysosomal storage disorders were observed in the early stage and autophagy related genes were changed. We created tamoxifen-inducible proximal tubules (PT)-specific Phd2 knockout (Phd2-cKO) mice and fed HFD or LFD. HFD-fed knockout mice (Phd2-cKO HFD) had increased peritubular capillaries and the increased expressions of hypoxia responsive genes compared to Control HFD mice. Phd2-cKO HFD also exhibited the mitigation of lysosomal storage disorders in proximal tubules, proximal tubular damages, albuminuria and glomerulomegaly. Thus, aberrant hypoxic responses due to dysfunction of PHD2 caused both lysosomal storage disorders and tubular damages in HFD-induced obese mice. An early intervention targeting PHD2 may represent a novel therapeutic strategy against obesity-induced kidney injury.

研究分野：肥満関連腎症

キーワード：肥満関連腎症 オートファジー 腎虚血 低酸素 ライソゾーム リン脂質 尿細管 phd

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病 (CKD) の発症進展に対する早期治療介入の重要性が指摘されている。基礎研究において、各種 CKD モデルに対するレニン・アンジテンシン系の抑制、抗炎症・線維化抑制薬が有効だとされ、実臨床においても CKD の進行阻止手段として減塩、低蛋白食、降圧療法、血糖管理など様々な治療が試みられているが、糖尿病性腎症の進行・新規透析導入を抑制しきれていない。CKD に対する早期治療介入、およびそれを可能にする超早期の診断指標の確立が求められ、CKD の治療戦略における全く新しいパラダイムが求められている。

2. 研究の目的

これまで、肥満関連腎症・糖尿病性腎症の病態生理の解明と治療法の確立を目指し研究してきた。これまでの認識と異なり、糖尿病性腎症に至る前段階の肥満関連腎症において、すでに尿細管細胞肥大、空胞化など組織障害が始まることを明らかにしてきた。また、微量アルブミン尿より早期に尿細管障害マーカーが上昇し、その病態生理に様々な分子 (Rho/Rho キナーゼ、Rho/mDia 経路など) が関連することを報告してきた。今後さらに、「腎臓透明化」という新規技術を応用し、3 次元的立体イメージング法を確立し、これまで明らかにしてきた腎臓形態学的変化、病態生理関連分子の発現を 3 次元的可視化・定量化することを実現する。そして、肥満関連腎症、糖尿病性腎症全段階に渡って、その病態生理を明らかにし、微量アルブミン尿に代わる早期診断指標、早期治療介入の確立を目指す。

3. 研究の方法

肥満関連腎症モデルマウスでは、組織学的に糸球体のみならず尿細管が肥大し、尿細管周囲毛細血管 (peri tubular capillary: PTC) は尿細管に対し密度が低下し、ピモニダゾール陽性を示し、相対的虚血状態であることを見出した。近位尿細管特異的に Cre recombinase が発現する Tamoxifen 誘導型 NDRG Cre マウスと、Flox PHD2 マウスを交配し、近位尿細管特異的 PHD2 KO マウスを作成し検討したところ、腎組織 vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現上昇、血管新生による PTC の密度改善がみられ、尿細管障害を抑制した。肥満関連腎症では、PHD2/HIF1 /VEGF 経路の dysregulation による低酸素応答不良がみられ、遊離脂肪酸がこの dysregulation を引き起こすことが明らかとなった。脂質異常と CKD 進行の関連を説明する重要な知見と考えられた。PHD2/HIF1 /VEGF 経路の dysregulation に対し、どの時点で治療介入すべきかの Critical point の探索、および PHD2/HIF1 経路を治療ターゲットとした早期治療介入の実現が必要である。しかし、これまでは腎疾患における糸球体、尿細管、PTC の形態異常、および病態生理関連分子の発現は、全て腎臓組織 2 次元平面的・断片的観察に留まっていたため、肥満関連腎症の超早期における尿細管、PTC、関連分子の発現の微細な変化の観察、相対的立体構造 (尿細管・PTC の相対的位置関係) の観察、経時的評価には限界があった。また、病態生理関連分子をターゲットとした治療介入時、糸球体、尿細管、PTC がそれぞれどのように変化するのか腎臓組織の改善過程、および病態生理関連分子の動態変化を経時的に観察することも困難であった。肥満関連腎症超早期から微細な組織学的変化がみられ、病態生理関

連分子がすでに誘導されていることを考えると、これら変化を確実に感知し、以降の観察を経時的に行い、組織学的変化と関連分子の連関を明らかにするためには、2次元の観察に留まらず、3次元立体的イメージングによる詳細な観察が不可欠である。全身・全脳イメージングと解析技術 CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis) の技術を用い、肥満関連腎症の超早期から、近位尿細管細胞肥大、空胞化の形態変化、および尿細管・PTCの相対的立体構造を1個の細胞ごとに経時的に観察することを試みた。

4. 研究成果

糖尿病性腎症の前段階である肥満関連腎症ですでに近位尿細管細胞肥大、空胞化、およびミトコンドリア形態異常が観察され、尿アルブミンのみならず尿細管障害マーカーの上昇がみられた。その病態生理に近位尿細管における低分子G蛋白Rho/Rhoキナーゼ経路の誘導、炎症性ケモカインの誘導が重要であった。また、肥満関連腎症早期から近位尿細管細胞の肥大、空胞化がみられ、mDiaはそれら組織学的変化が観察される前から誘導されていた。後期においては、mDiaの誘導に代わりRhoキナーゼが誘導されるとともに、Cell Cycle制御因子のp27が抑制され、尿細管におけるCell Cycleはhyperplasticとなり、hypoplasticなcell cycleを呈する糖尿病性腎症と全く逆になることを見出した(論文投稿中)。さらに、肥満関連腎症モデルマウスでは、組織学的に糸球体のみならず尿細管が肥大し、尿細管周囲毛細血管は尿細管に対し密度が低下し、相対的低酸素状態であることを見出した。さらに興味深いことに、肥満関連腎症の近位尿細管において、近位尿細管細胞肥大・空胞化より早期からリン脂質を含有した多量のライソゾームの蓄積がみられ、同時にオートファジー関連遺伝子mTOR、AMPKなどの動態異常がみられた。肥満関連腎症早期において近位尿細管細胞肥大・空胞化が観察されること、肥満患者の近位尿細管細胞にリン脂質が貯留した多量のライソゾームの蓄積が観察されること、PHD2/HIF経路はオートファジー関連遺伝子を制御していること、以上から肥満関連腎症の病態生理として、早期からのオートファジー制御異常の存在があり、それに引き続いて組織低酸素状態、尿細管細胞肥大化・空胞化が引き起こされると考えられた。肥満関連腎症超早期から後期における上記組織学的変化を腎臓透明化、三次元的観察を試みた。腎臓透明化には成功しているものの、免疫組織化学による3次元観察では不鮮明な画像にとどまっており、詳細な観察が十分に行えていない。今後、三次元的観察の最適化を引き続き行っていく。また、肥満関連腎症発症早期の病態生理にオートファジー制御機構異常が深く関わっていると考えられるが、この点については今後さらに検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Tajima T, Yoshifuji A, Matsui A, Itoh T, Uchiyama K, Kanda T, Tokuyama H, Wakino S, Itoh H. | 4. 巻 95(5) |
| 2. 論文標題 -hydroxybutyrate attenuates renal ischemia-reperfusion injury through its anti-pyroptotic effects. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Kidney Int. | 6. 最初と最後の頁 1120-1137 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2018.11.034. | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Muraoka H, Hasegawa K, Sakamaki Y, Minakuchi H, Kawaguchi T, Yasuda I, Kanda T, Tokuyama H, Wakino S, Itoh H. | 4. 巻 27(1) |
| 2. 論文標題 Role of Nampt-Sirt6 Axis in Renal Proximal Tubules in Extracellular Matrix Deposition in Diabetic Nephropathy. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell Rep. | 6. 最初と最後の頁 199-212 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.03.024. | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Umino H, Hasegawa K, Minakuchi H, Muraoka H, Kawaguchi T, Kanda T, Tokuyama H, Wakino S, Itoh H | 4. 巻 8 (1) |
| 2. 論文標題 High Basolateral Glucose Increases Sodium-Glucose Cotransporter 2 and Reduces Sirtuin-1 in Renal Tubules through Glucose Transporter-2 Detection | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25054-y | 査読の有無 有 |
| 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3件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 内藤真規子、徳山博文、脇野修、伊藤裕 |
| 2. 発表標題 肥満に伴う腎障害におけるRhoA下流蛋白のスイッチングの意義 |
| 3. 学会等名 第22回心血管内分泌代謝学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 徳山博文 |
| 2. 発表標題 腎臓移植後高血圧 |
| 3. 学会等名 第54回日本移植学会イブニングセミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 徳山博文 |
| 2. 発表標題 CKDにおける糖尿病、高血圧管理 |
| 3. 学会等名 第14回しみず生活習慣病フォーラム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 徳山博文 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 東京医学社 | 5. 総ページ数 520 |
| 3. 書名 肥満症・腎臓専門医の視点より 肥満関連腎症の病態生理、腎と透析増刊号 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 徳山博文、二木功治、林晃一 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 352 |
| 3. 書名 肥満関連腎症の一例．腎臓病診療で押さえておきたいCases 36 | |

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 徳山博文、二木功治、林晃一 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 340 |
| 3. 書名 腎臓病診療で押さえておきたいCases 36 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-----------|--|--|----|
| 研究 分担者 | 脇野 修 (Wakino Shu) (50265823) | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612) | |

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 |
|---------|---------|