

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08439

研究課題名(和文) 上皮間葉転換に着目した新規バイオマーカー探索による脳、腎糖尿病疾患の治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarkers for therapeutic treatment of brain and renal diabetic diseases by focusing on epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

齊藤 成 (Saitoh, Sei)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：10456444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1. 2型糖尿病早期発症マウス(High Fat Induced Obesity C57BL/6J mouse) SGLT阻害剤(Phlorizin)投与モデルによる新規治療バイオマーカーの検索を行った結果、スフィンゴミエリンのC22からC24の長鎖脂肪酸が候補に上げられた。
2. 社会的敗北ストレスモデルによりうつ症状を生じるC57BL6マウスの脳梁では、ミクログリアの活性化を伴い、有髄軸索の脱髄が起きる。ミクログリア活性を抑えるIL-1bの阻害剤投与により、うつ様症状が改善された。
3. 糸球体ネフロンと集合管での原尿の流量および流速を算定する数理モデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病性腎障害がSGLT阻害剤により改善されることは知られているが、今まで治療に対する反応性を正確に把握する治療バイオマーカーが十分に分かったいなかった。尿中のスフィンゴミエリンは比較的安定であり、脂肪酸伸長と脂質代謝の長期的な変化を負うことができると考える。SGLT阻害剤投与により尿中に排泄されることが明らかになったため、腎臓組織の脂肪酸代謝と腎機能保護作用について詳細に検討できる。また、社会的なストレスにより脳のミクログリアが活性化し、脳梁の脱髄を引き起こすことが分かり、ミクログリアをIL-1b阻害剤がうつ病の新規治療薬として検討される。

研究成果の概要(英文)：1. A search for novel therapeutic biomarkers in a model of SGLT inhibitor (Phlorizin) treatment for early onset of type 2 diabetes in mice(High Fat Induced Obesity C57BL/6J mouse) resulted in the C22 to C24 long-chain fatty acids of sphingomyelin as candidates. 2. Social defeat stress model produces depressive symptoms in the corpus callosum of C57BL6 mice. Demyelination of myelinated axons occurs with activation of microglia. Administration of an inhibitor of IL-1b, which suppresses microglial activity, improved depression-like symptoms. 3. A mathematical model was developed to calculate the flow rate and velocity of the original urine at the glomerular nephron and collecting ducts.

研究分野：解剖学

キーワード：新規バイオマーカー 脳、腎糖尿病疾患 上皮間葉転換 新規治療法開発

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SGLT 阻害剤の臨床適応は、糖尿病代謝疾患を中心とする内科的疾患から高次脳機能障害である認知症や精神疾患の予防へと治療適応の範囲の広がりを期待されていた。メタボリック症候群は慢性腎障害(CKD)の発症に深く関与している。それに伴う腎機能低下は糖脂質代謝や高血圧を増悪するなどの悪循環を形成し、心・脳血管疾患のリスクを増強すると考えられる。上皮細胞に発現する Na⁺/グルコース共輸送体(SGLT)の阻害剤は、細胞内へのグルコースと Na⁺流入を押さえる働きをもつ。SGLT 阻害剤の血糖値抑制以外にも膵糖のグルカゴン分泌向上や脂肪肝による慢性炎症候群(NASH)の改善、酸化脂肪酸の解除、炎症性マクロファージの M1/M2 バランスの改善など新規薬理作用の発見や、2型糖尿病を有する心血管系イベントリスクの高い患者への SGLT2 阻害剤投与により、複合的な心血管アウトカムと総死亡率抑制がみられたが、これらの病態を説明できるバイオマーカーが存在していなかった。その際に起きる上皮間葉転換に着目し、新規バイオマーカー探索を行い、SGLT 阻害剤による脳、腎糖尿病疾患の治療法開発という着想に至った。

2. 研究の目的

上皮間葉転換に着目した新規バイオマーカー探索による脳、腎糖尿病疾患の治療法開発。

- ・行動解析評価に基づき、精神疾患と認知機能障害の新規バイオマーカーを探索する
- ・SGLT 阻害剤による、2型糖尿病性上皮性機能障害の上皮保護作用機序を明らかにする

3. 研究の方法

分子解剖によるイメージングとそれに基づく定量化とマクロ評価スケールとの相関因子を解析し、病態因子を明らかにする。本研究では、分子解剖によるイメージングには、TEM、SBF-SEM、STEM-EDX、ラマン分光顕微鏡などの用いて、糖尿病代謝疾患の腎臓の3次元超微細構造とその内部の分子分布を明らかにし、組織・尿・血清などを質量分析の手法を用いて、新規治療バイオマーカー候補を探索した。また、脳、腎糖尿病疾患と関連が深い社会的なストレスによる鬱を引き起こすマウスモデルを用いて、脳組織の脱髄症状を TEM を用いて、明らかにした上で、炎症性マクロファージの M1/M2 バランスの改善を M1 ミクログリアの活性を抑える IL-1b の阻害剤を治療薬候補として、検討を行った。また、新規バイオマーカーとは異なるが、腎臓バイオプシー試料から腎機能を推測するための数理モデルの構築を行なった。

4. 研究成果

1. 2型糖尿病早期発症マウス(High Fat Induced Obesity C57BL/6J mouse) SGLT 阻害剤(Phlorizin)投与モデルによる新規治療バイオマーカーの探索を行った結果、スフィンゴミエリンの C22 から C24 の長鎖脂肪酸が候補に上げられた。20W HFD 群で、体重増加と高血糖、高インスリン血症及び高脂血症(HDL・TG)を認めた。近位尿細管(PCT)障害マーカー(尿中 KIM1 と L-FABP)が上昇した。HFD 群に SGLT 阻害剤を投与することにより、尿糖の排泄増加に伴う血糖値低下を認め、TG が上昇し、クレアチンが減少を伴う尿排泄増加が認められた。同時に、尿中 L-FABP/クレアチンが上昇し、尿中 KIM1/クレアチン変化は認められず、TGF-beta/クレアチン排泄が上昇した。また、尿中 TGF-beta の変化に伴い、HFD 群の近位尿細管(PCT)で Ki67(Mitotic marker)が上昇し、SGLT 阻害剤の投与により、PCT の Ki67 は減少し、PCT 近傍の支持組織細胞で上昇した。

LC-MS による腎臓皮質のリン脂質解析を行った。SBF-SEM と STEM-EDX 解析で、HFD 群の PCT-foot process (FP) の形態異常と、PCT (S1~S3) の mitochondria の断片化と、S2 を中心に巨大なオートファゴソーム様 (At) にリン脂質の集積を認められた。HFD 群に SGLT 阻害剤を投与すると、At は減少し、Lysosome と癒合する空胞形成が認められた。顕微ラマン分光解析で、At に sphingomyelin が認められた。SGLT 阻害剤により PCT の上皮細胞内膜の再編成し、酸化脂肪酸結合蛋白である L-FABP と共に除去される機構が示唆された。顕微ラマン分光解析で、At に sphingomyelin が認められた。

SGLT 阻害剤により PCT の上皮細胞内膜の再編成し、酸化脂肪酸結合蛋白である L-FABP と共に除去される機構が示唆されたため、LC-MS を用いて、SGLT 阻害剤投与により尿中に排泄されるスフィンゴリン脂質(スフィンゴミエリンとセラミド)を同定を行った。SGLT 阻害剤投与により、腎臓よりスフィンゴミエリンが尿排泄された。スフィンゴミエリンにつく長鎖脂肪酸に着目すると、C22 から C24 の長鎖脂肪酸が多かった。SGLT 阻害剤反応性の新規治療バイオマーカーとして、これらの長鎖脂肪酸を持つスフィンゴミエリンが候補として上がった。

2. 社会的敗北ストレスモデルによりうつ症状を生じる C57BL/6 マウスの脳梁では、ミクログリアの活性化を伴い、有髄軸索の脱髄が起きる。ミクログリア活性を抑える IL-1b の阻害剤投与により、うつ様症状が改善された。

3. 糸球体ネフロンと集合管での原尿の流量および流速を算定する数理モデルを構築した。糸球体ネフロンと集合管での原尿の流量および流速を算定する、管腔径と一次繊毛の長さおよび彎曲を考慮した数理モデルの構築を行った。従来のレイノルズ流の数理モデル計算式を改変した。集合管の一次繊毛長は SBF-SEM と一次繊毛の免疫染色法(アセチル化チューブリンなど)とレーザー共焦点顕微鏡により一次繊毛長の画像取得を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Saitoh S, Ohno N, Saitoh Y, Terada N, Shimo S, Aida K, Fujii H, Kobayashi T, Ohno S.	4. 巻 51
2. 論文標題 Improved Serial Sectioning Techniques for Correlative Light-Electron Microscopy Mapping of Human Langerhans Islets.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem.	6. 最初と最後の頁 9-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.17020.	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Sei Saitoh
2. 発表標題 "In vivo cryotechnique" is useful sampling for short time-dependent analysis of phospho-arg-directed protein kinase-substrate in hypoxic kidneys
3. 学会等名 BIT's 9th World Gene Convention-2018 (WGC-2018) Holiday Inn Singapore Atrium (シンガポール) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Yurika Saitoh, Nobuo Terada, Satoshi Shimo, Kaoru Aida, Hideki Fujii, Tetsuro Kobayashi and Shinichi Ohno
2. 発表標題 Correlative Light-electron Microscopy Mapping of Human Langerhans Islets
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第74回学術講演会（久留米シティプラザ 福岡県）（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 齊藤 成、高木 孝士、志茂 聡、大野 伸彦
2. 発表標題 SGLT inhibitor and Impaired Phospholipid Metabolism of Proximal Tubular Epithelium in Diet-Induced Obesity (DIO) Mouse Kidney
3. 学会等名 第78回日本解剖学会中部支部学術集会（富山県）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Yurika Saitoh, Nobuo Terada, Satoshi Shimo, Kaoru Aida, Hideki Fujii, Tetsuro Kobayashi and Shinichi Ohno.
2. 発表標題 Improved Serial Sectioning Techniques for Correlative Light-Electron Microscopy Mapping of Human Langerhans Islets.
3. 学会等名 第12回日中合同組織細胞化学セミナー (2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saitoh Sei, Takaki Takashi, Satoshi Shimo, Truc Quynh Thai, Huy Bang Nguyen, Ohno Nobuhiko.
2. 発表標題 Microscopic and LC-MS Analyses of Lipid Metabolism Abnormality in Proximal Renal Tubule of Diet Induced Obesity Mice.
3. 学会等名 ABiS 1st meeting (2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤 成 , 高木 孝士 , 志茂 聡 , タイ トラック クエン , 寺嶋 博 , 大野 伸彦 。
2. 発表標題 2型糖尿病性近位腎尿細管障害における脂質代謝異常の顕微鏡解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第72回学術講演会.
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Sei Saitoh, Takashi Takaki, Satoshi Shimo, Truc Quynh Thai, Huy Bang Nguyen, Nobuhiko Ohno.
2. 発表標題 Microscopic and LC-MS Analyses of Lipid Metabolism Abnormality in Proximal Renal Tubule of Diet Induced Obesity Mice.
3. 学会等名 The 1st ABiS Symposium- Towards the Future of Advanced Bioimaging for Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齊藤 成、高木 孝士、志茂 聡、Truc Quynh Thai、Huy Bang Nguyen、大野 伸彦
2. 発表標題 Microscopy and LC-MS analyses of lipid metabolism abnormality in proximal convoluted tubules on type 2 diabetes
3. 学会等名 生体ボリュームイメージング研究会&生理研研究会合同ワークショップ
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Sei Saitoh, Kanako Kumamoto, Nobuhiko Ohno, and Shizuko Nagao
2. 発表標題 Voxel-based Morphometry of Images Acquired Through SBF-SEM of Primary Cilia from a Rat Kidney Collecting Duct
3. 学会等名 第13回日中組織細胞化学セミナー(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤 成, 熊本 海生航, 大野 伸彦, 高橋 和男, 長尾 静子
2. 発表標題 3D architectures of primary cilia of collecting duct cells in rat kidney revealed by SBF-SEM
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤 成, 熊本 海生航, 大野 伸彦, 高橋 和男, 長尾 静子
2. 発表標題 SBF-SEM画像によるラット腎臓組織集合管主細胞一次繊毛長のボクセル計測法
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Sei Saitoh, Takashi Takaki, Kazuki Nakajima, Satoshi Shimo, Naotake Tsuboi, Kazuo Takahashi, Nobuhiko Ohno
2. 発表標題	Sodium-glucose transporters (SGLTs) inhibitor-induced excretion of sphingomyelin via urine in the kidneys of Western diet-fed mice
3. 学会等名	第63回日本腎臓学会学術集会
4. 発表年	2019年～2020年

1. 発表者名	Satoshi Shimo, Sei Saitoh, Huy Bang Nguyen, Truc Quynh Thai, Masako Ikutomo, Ken Muramatsu, and Nobuhiko Ohno
2. 発表標題	Sodium-glucose co-transporter (SGLT) inhibitor restores lost axonal varicosities of the myenteric plexus in a mouse model of high-fat diet-induced obesity
3. 学会等名	第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	志茂聡、齊藤成、Huy Bang Nguyen、Truc Quynh Thai、生友聖子、村松憲、大野伸彦
2. 発表標題	高脂肪食摂取下でのフロリジン投与がアウエルバッハ神経叢に与える影響
3. 学会等名	第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Tsubasa Iida, Kazuo Kunisawa, Sei Saitoh, Aika Kosuge, Bolati Wulaer, Willy Jaya Suento, Yasuko Yamamoto, Akihiro Mouri, Kuniaki Saito and Toshitaka Nabeshima
2. 発表標題	Repeated social defeat stress induces microglial activation and myelin abnormality in the corpus callosum: a potential link to depression-like behavior
3. 学会等名	2019AsCNP (国際学会)
4. 発表年	2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sei Saitoh	4. 発行年 2018年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 24
3. 書名 Electron Microscopy - Novel Microscopy Trends. Correlative Light-Electron Microscopy (CLEM) and 3D Volume Imaging of Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) of Langerhans Islets.	

〔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	丹生谷 正史 (Nibuya Masashi) (00228256)	東北医科薬科大学・医学部・講師 (31305)	
研究 分担者	大野 伸彦 (Ohno Nobuhiko) (10432155)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
連携 研究者	高木 孝士 (Takagi Takashi) (10774820)	昭和大学・電子顕微鏡室・講師 (32622)	
連携 研究者	志茂 聡 (Shimo Satoshi) (80734607)	健康科学大学・健康科学部・准教授 (33504)	