

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08730

研究課題名(和文) 糖尿病性腎臓病・慢性腎臓病における新規血管新生因子の病態生理学的意義の検討

研究課題名(英文) A pathophysiological significance of a novel angiogenesis factor in diabetic kidney disease and chronic kidney disease

研究代表者

金岡 知彦 (KANAOKA, Tomohiko)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：70551258

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)：糖尿病患者では、健常人に比べて、尿中LRG1排泄量の増加を認めた。さらに、糖尿病患者の尿中LRG1は、アルブミン尿と正の相関、腎機能(eGFR)と負の相関を認めた。糖尿病モデルdb/dbマウスでは対照マウスに比べて、糖尿病性腎症の進行とともに糸球体内皮でのLRG1発現の増加を認めた。さらに、高齢マウスや片側尿管結紮マウスでは、若齢マウスや対照マウスに比べて、腎線維化の亢進とともに、腎LRG1発現の増加を認めた。また、LRG1ノックアウトマウスの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症モデルマウスの腎におけるmRNA発現トランスクリプトーム解析で明らかになった新規血管新生・増殖系因子、ロイシンリッチ 2 糖蛋白質1(LRG1)について、糖尿病性腎臓病や腎線維化の進展とともにその発現が変化することが明らかにされ、腎臓病の病態形成に関与する可能性が示唆された。今後、LRG1ノックアウトマウスを用い、腎臓病の発症・進展におけるLRG1の機能的意義の解明が期待される。また、尿中LRG1は糖尿病性腎臓病患者の診断・予後予測のバイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Patients with type 2 diabetes mellitus showed increased urinary LRG1 excretion compared to healthy subjects. Furthermore, urinary LRG was positively correlated with albuminuria and negatively correlated with kidney function (eGFR) in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetic model of db/db mice showed increased LRG1 expression in glomerular endothelium compared with control mice, concomitant with the development of diabetic nephropathy. In addition, kidney LRG1 expression was significantly increased in aged mice compared with young mice along with the progression of kidney fibrosis. Similarly, unilateral ureteral obstruction significantly provoked kidney fibrosis and increase in kidney LRG1 expression. Furthermore, we succeeded to generate LRG1 knockout mice.

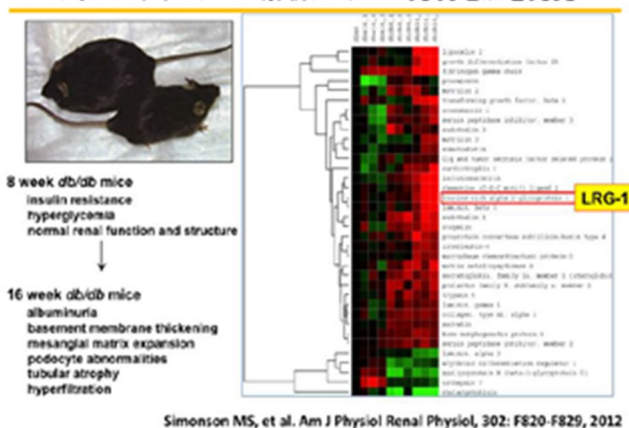
研究分野：糖尿病性腎臓病、慢性腎臓病

キーワード：糖尿病性腎臓病 慢性腎臓病 血管新生因子

1. 研究開始当初の背景

透析導入に至る原疾患として未だ糖尿病性腎症が最多であり、その進展制御法の確立は急務である。本研究の研究協力者の Case Western Reserve University、内科学 Michael S. Simonson 博士らは、糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の腎臓で発現している分泌型蛋白のトランスクリプトーム解析をマイクロアレイで行い、糖尿病性腎症の発症・進展との関連性が示唆される因子のスクリーニングを行った (Simonson MS, et al. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302: F820-F829, 2012, 図1)。LRG1 (leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1) は、その結果得られた蛋白のひとつである。LRG1 は、LRR (Leucine-rich repeat) ファミリーの一つで、312 個のアミノ酸から成る約 45kDa の糖蛋白質であり、血管内皮細胞で TGF- β シグナル系への調節作用を介して血管新生・増殖を促進する作用をもつ新規血管新生・増殖系因子であることが報告されている (Wang X, et al. *Nature*, 499: 306-311, 2013)。また、LRG1 は肝、肺、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、骨髄 (血球系) 腎臓、甲状腺など諸組織に発現することが報告されている。しかしながら、諸臓器における機能については未解明の部分が多く、研究開始当初、腎における LRG1 の発現調節や機能解析はほとんど解明されていなかった。

図1: 糖尿病モデルマウス (db/db マウス) の腎での mRNA トランスクリプトーム解析にて LRG1 発現増加を発見



2. 研究の目的

本研究では腎臓での LRG1 の発現と機能を明らかにすることを目的とし、以下の3点を課題とした。LRG1 の発現あるいは活性化は、糖尿病性腎臓病を含む慢性腎臓病 (CKD) の発症・進展に関与するか、LRG1 の発現制御により糖尿病性腎臓病・CKD を制御できるか。LRG1 は糖尿病性腎臓病・CKD の診断・予後予測マーカーとなり得るか

3. 研究の方法

糖尿病モデル動物、CKD モデル動物での腎組織の LRG1 発現調節の検討

db/db マウス (BKS.Cg-m+/+Leprdb/db) と週齢を一致させた雄の db/m マウスを日本クレアより購入し、糖尿病性腎症の進展にともなう腎組織 LRG1 発現を検討した。若齢 (16 週齢) および高齢 (80 週齢) の雄 C57BL/6 マウスをサクリフェイスし、加齢性腎障害の進展に伴う腎組織 LRG1 発現を検討した。12 - 20 週齢の雄 C57BL/6 マウスに 5/6 腎臓摘出術を施行し、4 週間後、腎機能の低下に伴う残存腎での LRG1 発現を検討した。具体的な実験方法については以下のとおり行った。

< 実験動物と飼育法 >

実験は、横浜市立大学における動物実験の実施に関する規定に基づく実験計画書の承認を得て、ガイドラインを遵守して行った。db/db マウス (BKS.Cg-m+/+Leprdb/db) と週齢を一致させた雄の db/m マウスは日本クレアより購入し、C57BL/6 マウスはチャールズリバーより購入した。マウスの飼育環境として、12 時間の照明・消灯サイクルと 25 °C の室温を保ち、食餌・飲水制限を設けず自由に摂取可能とした。マウスは標準食 (0.3% NaCl, 3.6kcal/g, 13.3% 脂質エネルギー; オリエンタル酵母株式会社) にて飼育した。

< 代謝ケージ解析 >

マウスの採尿には、単独飼育用代謝ケージを用いた。採尿にあたって 3 日間馴化させた。代謝ケージで飼育中、マウスは自由行動下で食餌・飲水可能とした。

< 組織学的解析 >

マウスより採取した腎臓を 10% パラホルムアルデヒドに一晩浸して固定処理した後、パラフィンに包埋した。組織切片は 4 μ m の厚さに切断し、多糖類染色法 (PAS: periodic acid Schiff 染色)、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソントリクローム染色、免疫染色法を施行した。免疫組織染色法はパラフィン包埋組織切片を脱パラフィン、脱水処理をし、クエン酸緩衝液に浸してマイクロウェーブで加熱して抗原賦活化を行った。次に Vector Laboratories 社のア

ビジン/ピオチン ブロッキングキットを用いて、10%ヤギ正常血清のリン酸緩衝生理食塩水に60分間浸し、内在性のピオチン活性のブロッキングを行った。一次抗体として、抗LRG1抗体については、100倍希釈にて4℃で一晩反応させた。その後0.3%過酸化水素水加メタノールに20分、ストレプトアビジン、ペルオキシダーゼピオチン標識2次抗体で30分間処理後、ヘマトキシリン染色し脱水封入した。全ての組織イメージはBZ-9000顕微鏡(キーエンス社)を用いて撮影した。

<生化学分析>

マウスの血糖値は尾静脈より血液を採取し測定した。その他のマウス血液サンプルは非絶食状態で麻酔下に心臓穿刺により採取した。全血液サンプルは4℃において600gで15分間遠心分離を行い、血漿を分離した。得られた血漿は解析に使用するまで-80℃で保存した。血漿グルコースは酵素分析法により測定した(和光純薬工業株式会社)。血清クレアチニンと尿中クレアチニンはautoanalyzerを用いて測定した(日立)。尿中アルブミンはELISAキット(富士フィルム和光シバヤギ)を用いて測定し、尿中クレアチニンで補正した。

<リアルタイムPCR法による解析>

腎臓からRNA抽出を行い(ISOGEN, ニッポンジーン株式会社) cDNAを合成した(スーパースクリプトファーストストランドシステム, Invitrogen社)。リアルタイム定量RT-PCRは、逆転写産物をTaqMan PCR Master MixおよびTaqmanプローブ(Applied Biosystems)とともにインキュベートし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systemを用いて行った。内在性コントロールとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) または18SリボソームRNAを用いた。

<レーザーマイクロダイセクション法とRT-qPCR法による解析>

Leica社のLaser capture microdissection: LMDシステム(LMD 6000)を用いてレーザーマイクロダイセクションを行った(Wakui et al.2013)。ホルマリン固定の後、パラフィン包埋した腎臓組織を10µmの厚さに薄切し、ポリエチレンテレフサレートメンブレンスライドに載せ、HE染色を行った。LMD 6000レーザーマイクロダイセクション顕微鏡を用いて腎臓組織より糸球体を切り出した。1検体あたり350個の糸球体を切り出した。それらの糸球体組織より、RNeasy FFPE Kit(キアゲン)を用いてRNAを抽出し、スーパースクリプトファーストストランドシステム(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。

LRG1 ノックアウトマウスの作製

Guide RNAをCas9タンパク質と共にC57BL/6マウスの受精卵へインジェクションした。インジェクションした受精卵を仮親マウスに移植してF0マウスを作製した。生まれたF0マウスにジェノタイピングを実施した。ジェノタイピング陽性のF0マウスを野生型マウスと交配させ、ジャームラインを確認した。生まれたF1マウスにジェノタイピングを実施した。ジェノタイピング陽性を確認したF1マウスを当教室で継続飼育、繁殖を行った。

糖尿病患者の尿中LRG1の測定と臨床指標との関連性の検討

56人の2型糖尿病患者と12人の健常人を対象として、尿中LRG1を測定し、臨床パラメータとの関連性を検討した。血圧は診察室で坐位にて自動血圧計を用いて3回測定し平均値を採用した。血圧140/90mmHg、あるいは降圧薬内服中の患者は高血圧を有すると定義した。また、尿中LRG1の具体的な測定方法は以下のとおりである。

<尿中LRG1の測定>

尿検体は簡便法(Multistix 8 SG, Bayer, Tarrytown, NY)にて検査後1500gで10分間遠心分離し、上清を10000gで4℃にて15分遠心分離し微粒子を除去し、解析に使用するまで-80℃で保存した。タンパク質の凝集を防ぐため、溶解後LRG1の測定を行う前に1MのTris bufferを用いてpH 8.0に調整した。尿中LRG1は測定キット(IBL International)を用いてELISA法にて測定し、尿中クレアチニンで補正した。

4. 研究成果

糖尿病モデル動物、CKDモデル動物での腎組織のLRG1発現調節の検討

免疫組織学的検討の結果、正常対照マウスにおいて、腎血管の糸球体内皮細胞や血管内皮細胞、尿細管上皮細胞においてLRG1の発現を認めた。糖尿病モデルマウスにおいてはLRG1発現強度の亢進を認めた(図2)。また、80週齢の高齢マウスでは、16週齢の若年マウスに比べて、尿細管間質での線維化の亢進とともに、LRG1発現量の増加を認めた(図3)。さらに、5/6腎摘を施行したマウスでは対照Sham手術マウスに比べて、腎機能の低下とともに、腎LRG1発現量の増加を認めた(図3)。

図2 db/dbマウスではLRG1発現量の亢進を認める
24週齢のdb/m、db/dbマウス腎LRG1免疫染色での検討

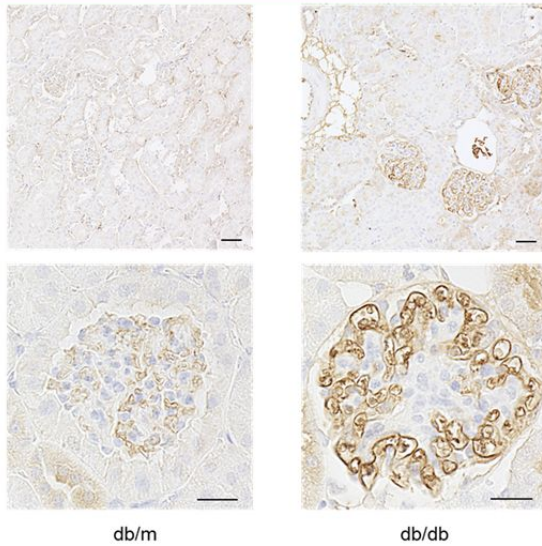
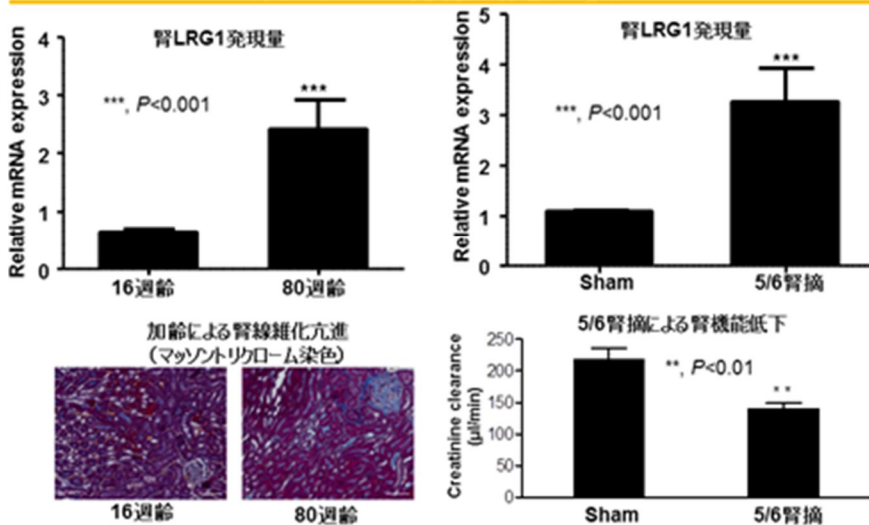


図3: 加齢性腎線維化モデル、5/6腎摘CKDモデルにおいて、
腎LRG1 mRNA発現が有意に増加



LRG1 ノックアウトマウスの作製

CRISPR/Cas 技術により LRG1 ノックアウトマウスの作製に成功した。今後、LRG1 ノックアウトマウスを用いて糖尿病性腎臓病を含む腎疾患における LRG1 の機能的意義を検討する予定である。なお、本研究計画当初は報告されていなかったが、現在までにいくつかの研究グループより、LRG1 遺伝子改変マウスを用いた複数の腎障害モデルでの検討が行われている。Quan H らは、LRG1 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、片側腎摘出とストレプトゾトシン投与による糖尿病性腎障害において、足細胞突起消失の減少や糸球体内皮細胞の血管新生の抑制が認められ、糖尿病性腎症が軽減されることを報告した (Quan H, et al. J Am Soc Nephrol, 30: 546-562, 2019)。また、LRG1 ノックアウトマウスでは野生型と比べて片側尿管閉塞 (UUO) 誘発性腎線維化やアリストキア酸誘発性腎線維化が抑制されることが報告された (Hong Q, et al. Kidney Int, 101: 299-314, 2021)。しかしながら、UUO モデルに関しては、LRG1 が線維化促進性サイトカインの分泌を阻害し、血管新生を促進することにより腎線維化を予防する可能性も示され (Liu TT, et al. Am J Nephrol. 52:228-238, 2021)。LRG1 の機能的意義に関してさらなる研究が求

められている。

糖尿病患者の尿中 LRG1 の測定と臨床指標との関連性の検討

2 型糖尿病患者と健常人の患者背景は以下の通りであった。

表：2 型糖尿病患者と健常者の臨床的背景

因子	健常者 (n=12)	2 型糖尿病 (n=56)	P
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	120.2 ± 9.1	80.3 ± 29.6	< 0.001
年齢 (才)	48 ± 7	55 ± 10	0.037
性別 (女性, %)	33	55	0.182
尿中アルブミン (μg/mgCr)	12.3 ± 6.4	171.5 ± 385.0	0.009
糖尿病罹患期間 (年)	0	7 ± 6	
HbA1C (%)	4.9 ± 0.4	7.6 ± 1.6	<0.001
高血圧 (%)	8	84	< 0.001
Body Mass Index (kg/m ²)	21.6 ± 2.2	29.0 ± 3.2	<0.001

平均値 ± 標準誤差 . 2 型糖尿病 vs 健常者における t 検定.

56 人の 2 型糖尿病患者と 12 人の健常者の尿中に LRG1 蛋白が排泄されるかどうかについて検証した結果、LRG1 は健常者においても尿中への排泄を認めたが、2 型糖尿病患者において有意に増加することが検証された (3.3 ± 1.0 vs 13.3 ± 1.7 ng/mgCr, $P < 0.01$)。次にわれわれは、56 名の 2 型糖尿病患者において尿中 LRG1 と eGFR との関係について調べた。2 型糖尿病患者の eGFR と尿中 LRG1 は有意な負の相関を認めた (ピアソン相関係数 $r = -0.546$, $P < 0.0001$)。また、2 型糖尿病患者の尿中 LRG1 は尿中アルブミンと有意な相関を認めた ($r = 0.283$, $P = 0.034$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohki Kohji, Wakui Hiromichi, Uneda Kazushi, Azushima Kengo, Haruhara Kotaro, Kinguchi Sho, Urate Shingo, Yamada Takayuki, Yamaji Takahiro, Kobayashi Ryu, Kanaoka Tomohiko, Minegishi Shintaro, Ishigami Tomoaki, Fujikawa Tetsuya, Toya Yoshiyuki, Tamura Kouichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Effects of Erythropoietin-Stimulating Agents on Blood Pressure in Patients with Non-Dialysis CKD and Renal Anemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney Diseases	6. 最初と最後の頁 299 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000507396	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 Kobayashi Kazuo, Toyoda Masao, Hatori Nobuo, Saito Nobumichi, Kanaoka Tomohiko, et al	4. 巻 23
2. 論文標題 Retrospective Analysis of the Renoprotective Effects of Long-Term Use of Six Types of Sodium/Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Kidney Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes Technology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 110 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/dia.2020.0165	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 Horigome Mari, Kobayashi Ryu, Hanaoka Masaaki, Kinguchi Sho, Kanaoka Tomohiko, Toya Yoshiyuki, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of minimal change nephrotic syndrome with pregnancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 315 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-020-00568-5	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 Wakui Hiromichi, Yamaji Takahiro, Azushima Kengo, Uneda Kazushi, Haruhara Kotaro, Nakamura Akiko, Ohki Kohji, Kinguchi Sho, Kobayashi Ryu, Urate Shingo, Suzuki Toru, Kamimura Daisuke, Minegishi Shintaro, Ishigami Tomoaki, Kanaoka Tomohiko, et al	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Rikkunshito treatment on renal fibrosis/inflammation and body weight reduction in a unilateral ureteral obstruction model in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58214-0	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 Urate Shingo, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Tsukamoto Shunichiro, Kinguchi Sho, Uneda Kazushi, Kanaoka Tomohiko, Atohe Yoshitoshi, Funakoshi Kengo, Yamashita Akio, Tamura Kouichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Aristolochic Acid Induces Renal Fibrosis and Senescence in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12432 ~ 12432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212432	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 Kawai Yuki, Uneda Kazushi, Yamada Takayuki, Kinguchi Sho, Kobayashi Kazuo, Azushima Kengo, Kanaoka Tomohiko, Toya Yoshiyuki, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 183
2. 論文標題 Comparison of effects of SGLT-2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists on cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes mellitus patients with/without albuminuria: A systematic review and network meta-analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Research and Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 109146 ~ 109146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diabres.2021.109146	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 Tsukamoto Shunichiro, Okami Naohito, Yamada Takayuki, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Kinguchi Sho, Uneda Kazushi, Kanaoka Tomohiko, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 41
2. 論文標題 Prevention of kidney function decline using uric acid-lowering therapy in chronic kidney disease patients: a systematic review and network meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 911 ~ 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-021-05956-5	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 Uneda Kazushi, Kawai Yuki, Yamada Takayuki, Kinguchi Sho, Azushima Kengo, Kanaoka Tomohiko, Toya Yoshiyuki, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Systematic review and meta-analysis for prevention of cardiovascular complications using GLP-1 receptor agonists and SGLT-2 inhibitors in obese diabetic patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89620-7	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 Kobayashi Kazuo, Kanaoka Tomohiko, et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 Comparison of renal outcomes between sodium glucose co-transporter 2 inhibitors and glucagon-like peptide 1 receptor agonists	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Research and Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 109231 ~ 109231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diabres.2022.109231	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiromichi Wakui, Tomohiko Kanaoka, Shingo Urate, Sho Kinguchi, Takahiro Yamaji, Kazushi Uneda, Takayuki Yamada, Sona Haku, Kotaro Haruhara, Kohji Ohki, Ryu Kobayashi, Kengo Azushima, Shohei Tanaka, Eriko Abe, Yoshiyuki Toya, Kouichi Tamura
2. 発表標題 Intrarenal enhancement of leucine-rich -2-glycoprotein-1 in the early stage of diabetic nephropathy
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	涌井 広道 (WAKUI HIROMICHI) (10587330)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	田村 功一 (TAMURA KOUICHI) (40285143)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

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
---------	---------