

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17731

研究課題名（和文）糖尿病性腎臓病における近位尿細管PHD-HIF経路の役割を解明する

研究課題名（英文）The role of PHD-HIF pathway in renal proximal tubules in the development of DKD

研究代表者

菅原 真衣（Sugahara, Mai）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80837005

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）：低酸素誘導因子（hypoxia-inducible factor：HIF）は多面的な作用を持ち、腎臓の構成細胞それぞれにおいて特異的なはたらきをする可能性がある。近位尿細管特異的にHIFを活性化したマウスに糖尿病を発症させたところ、アルブミン尿の増加が抑制され、糸球体肥大が抑制される傾向にあった。また、このマウスは対照群と比較して血圧が有意に低下することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病（CKD）には未だ効果的な治療法がなく、新たな治療戦略が必要である。低酸素誘導因子（HIF）はCKDの進展に重要な役割をはたすと考えられているが、HIFの長期的な活性化が腎保護作用をもたらすかどうかについては、一定の見解が得られていない。その理由のひとつとして、HIFが多面的な作用を持ち、腎臓の構成細胞それぞれにおいて特異的なはたらきをしている可能性が考えられる。本研究は、近位尿細管特異的にHIFを活性化すると、糖尿病発症時のアルブミン尿の増加が抑制されることを明らかにした。また、近位尿細管におけるHIFが血圧調節に影響を与える可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to examine the role of PHD-HIF pathway in renal proximal tubules in the development of diabetic kidney disease (DKD). We administered streptozotocin to proximal tubule-specific HIF-PH knockout mice. Unlike wild-type mice, these mice did not develop albuminuria even though they had the same level of hyperglycemia. Furthermore, the blood pressure of proximal tubule-specific HIF-PH knockout mice was lower compared to wild-type mice.

研究分野：慢性腎臓病

キーワード：糖尿病性腎臓病 hypoxia-inducible factor HIF-PH阻害薬

1. 研究開始当初の背景

Hypoxia-inducible factor (HIF) は低酸素応答の要となる転写因子である。HIF は通常酸素濃度下では、HIF-prolyl hydroxylase (HIF-PH、1~3の3つのアイソフォームが存在する) によって水酸化され、von Hippel-Lindau 蛋白 (VHL) に認識された後、ユビキチン化を受けてプロテアソームで分解される。HIF-PH による水酸化には酸素が必要なため、低酸素状態になると HIF は分解を免れ、核内に移行してターゲット遺伝子の転写を促進することができるようになる。

2019年に腎性貧血の新たな治療薬として、HIF-PH 阻害薬が発売開始となった。この薬は HIF を活性化してエリスロポエチンの発現を亢進させるものだが、HIF によって制御される遺伝子は多岐にわたるため、腎性貧血改善以外の効果を併せ持つ可能性が指摘されていた。一つの可能性として腎保護作用が期待されており、動物実験では HIF 活性化が急性腎障害を改善するという報告がなされている。一方、慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) において、HIF の長期的な活性化が腎保護につながり、新たな治療戦略となりうるかどうかについては、一定の見解が得られていない。

申請者は以前の研究において、肥満・2型糖尿病モデルマウスに HIF-PH 阻害薬を投与すると、糖尿病性腎臓病 (diabetic kidney disease : DKD) が軽減することを見出した。しかし、HIF-PH 阻害薬は全身に影響を与え、上記モデルでは薬剤による肥満や血糖・脂質代謝改善も見られたため、DKD の軽減は副次的な効果に過ぎない可能性も考えられた。そこで、近位尿細管特異的に HIF-PH を欠損したマウスに糖尿病を誘発させ、DKD の進展に与える影響を調べる研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、腎臓の中で最も低酸素の影響を受けやすく、HIF の作用が重要と考えられている近位尿細管に着目し、同部位の HIF が DKD の進展に関与しているか検証した。

3. 研究の方法

本研究では、タモキシフェン誘導型 CreER システムを用いた近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウス ($Ndr\text{g}1^{\text{CreERT2/+}}; \text{Phd}1\text{-}2\text{-}3^{\text{flox/flox}}$) を使用した。対照群には $Ndr\text{g}1^{+/+}; \text{Phd}1\text{-}2\text{-}3^{\text{flox/flox}}$ マウスを用い、ノックアウトマウスと同様にタモキシフェンを投与した。

(1) 近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスの表現型の確認

11週齢の時点でタモキシフェンを5日間連続で腹腔内投与し、2~4週間毎に体重測定と畜尿検査を行った。23週齢で血圧測定を行った後、腎臓の採材を行った。近位尿細管における HIF-PH1・2・3 それぞれの発現低下率や、同部位で HIF が十分に活性化することを、免疫染色および real-time PCR 法でのターゲット遺伝子発現評価により確認した。

(2) 近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスを使用した DKD モデルの作成

10週齢のマウスにストレプトゾトシンを投与し、3日後の空腹時血糖が 250 mg/dl を超えた個体を実験に使用した。11週齢でタモキシフェンを5日間連続で腹腔内投与し、2~4週間毎に体重と血糖値を測定し、畜尿検査を行った。23週齢で血圧測定を行った後、腎臓の採材を行った。DKD の評価として、アルブミン尿と尿中 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、腎組織における糸球体肥大、間質線維化、マクロファージ浸潤を定量評価した。

(3) 近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスでの血圧評価

上記(1)(2)の実験において、近位尿細管特異的HIF-PHノックアウトマウスでは対照群と比較して血圧が低下することが判明した。近位尿細管におけるHIFが血圧調節に与える影響についてさらに調べるため、11週齢でタモキシフェンを投与した後、19週齢まで2週間毎にtail-cuff法で血圧を測定した。

4. 研究成果

(1) 近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスの表現型

近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスでは、腎臓における HIF-PH1,2,3 の発現がいずれも対照群と比較して 70~80%低下することを real-time PCR 法で確認した。また、免疫染色法により、近位尿細管で HIF-1 の発現が増加していることを示した。Vascular endothelial growth factor (VEGF) や BCL2 interacting protein 3 (BNIP3) など、HIF の代表的なターゲット遺伝子の発現も上昇していた。近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスと HIF-PH 阻害薬の最も重要な違いは、ノックアウトマウスでは腎間質の線維芽細胞における HIF 活性化が起こらず、エリスロポエチンやヘマトクリット上昇を来さないことであり、その点も確認した。

近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスには、対照群と明らかな外観上の差異はなかった。腎形態に異常はなく、腎機能(血清クレアチニン値)も同等だった。しかし、後述するように、近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスは対照群と比較して血圧が低くなっていた。

(2) 近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトが DKD に与える影響について

血糖値は両群で同等だったが、対照群ではアルブミン尿が増加するのに対し、ノックアウトマウスではアルブミン尿が増加しないことが明らかとなった。これは以前行った HIF-PH 阻害薬の実験とも合致する結果であり、全身もしくは近位尿細管における HIF 活性化が、血糖とは独立してアルブミン尿減少作用を持つことが示唆される。一方、HIF-PH 阻害薬投与時に見られた尿中 MCP-1 低下やマクロファージ浸潤の減少は、近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスでは観察されなかった。また、ノックアウトマウスでは糸球体肥大が抑制される傾向にあった。血清クレアチニン値および腎線維化は対照群とノックアウトマウスで同等だった。

(3) 近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスでの血圧評価

(1)(2)の検討中、近位尿細管特異的 HIF-PH ノックアウトマウスでは対照群と比較して血圧が低下することが判明し、この点をさらに検証することにした。マウスに11週齢でタモキシフェンを投与した後、2週間毎に血圧を測定したところ、13週齢でノックアウトマウスにおいて血圧は低下傾向となり、15週齢では有意に低下していた。この現象は当初予期していなかったが、近位尿細管のHIFが血圧調節機構に重要な役割を持つ可能性を示唆しており、今後はこのメカニズムについて検討したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugahara Mai、Tanaka Tetsuhiro、Nangaku Masaomi	4. 巻 1
2. 論文標題 Hypoxia-Inducible Factor and Oxygen Biology in the Kidney	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34067/KID.0001302020	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 Sugahara Mai、Pak Wai Lun Will、Tanaka Tetsuhiro、Tang Sydney C. W.、Nangaku Masaomi	4. 巻 26
2. 論文標題 Update on diagnosis, pathophysiology, and management of diabetic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 491 ~ 500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nep.13860	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 該当する
1. 著者名 Mai Sugahara、Shinji Tanaka、Tetsuhiro Tanaka、Hisako Saito、Yu Ishimoto、Takeshi Wakashima、Masatoshi Ueda、Kenji Fukui、Akira Shimizu、Reiko Inagi、Toshimasa Yamauchi、Takashi Kadowaki、Masaomi Nangaku	4. 巻 31
2. 論文標題 Prolyl Hydroxylase Domain Inhibitor Protects against Metabolic Disorders and Associated Kidney Disease in Obese Type 2 Diabetic Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 560 ~ 577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2019060582	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 Sugahara Mai、Tanaka Tetsuhiro、Nangaku Masaomi	4. 巻 239
2. 論文標題 Future perspectives of anemia management in chronic kidney disease using hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108272 ~ 108272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2022.108272	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 菅原 真衣
2. 発表標題 慢性腎臓病（CKD）における低酸素シグナルの役割
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sugahara Mai
2. 発表標題 Hypoxia-inducible factor and energy metabolism
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原真衣、田中真司、齊藤久さこ、石本遊、若島健志、福井健人、清水章、稲城玲子、田中哲洋、南学正臣
2. 発表標題 PHD阻害薬による肥満・2型糖尿病マウスのアルブミン尿減少に関する分子メカニズムの検討
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mai Sugahara, Shinji Tanaka, Yu Ishimoto, Kenji Fukui, Akira Shimizu, Reiko Inagi, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki, Masaomi Nangaku, Tetsuhiro Tanaka
2. 発表標題 Prolyl Hydroxylase Domain Inhibitor Protects Against Metabolic Disorder-Related Kidney Disease by Suppressing Monocyte Chemoattractant Protein 1 Expression in Mesangial Cells
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mai Sugahara
2. 発表標題 Anemia Conference Report
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022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

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