

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08602

研究課題名(和文)系球体内皮細胞-上皮細胞連関におけるsGC活性化の意義と治療戦略

研究課題名(英文)sGC activation on the interaction between glomerular endothelial cells and podocyte.

研究代表者

長洲 一 (Nagasu, Hajime)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40412176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：系球体内皮細胞から産生されるNitric Oxideが系球体上皮細胞におけるsGC活性化を介して細胞保護的に働くことを想定して研究を行う。sGC fl/fl マウスを用いて系球体上皮細胞特異的sGC欠損マウスを作成し検討を行なった。結果として糖尿病モデルを作成すると通常起こってくる代償性系球体肥大とGFR上昇が起きるが、系球体上皮細胞特異的sGC欠損マウスでは認めなかった。本結果から系球体上皮細胞におけるsGC活性化が系球体の代償起点に関与することが示された。またsGC活性化薬でこの代償起点が回復することがわかってきた。今後は更なる検討を行い治療意義について検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)患者は増加傾向にあり、重要な医療問題としてその解決が望まれる。早期のCKD発症には内皮機能障害が重要であることを報告してきたが、多くの基礎研究から系球体上皮細胞障害が腎不全に至る系球体硬化病変の形成に重要であることが判明している。この移行機序は不明であり本研究では、「内皮機能障害によるeNOS-NO機能不全が系球体上皮細胞のsGC活性化低下を介して、系球体硬化病変を形成を促進させる」との仮説を証明するべく検討を行う。病態下では系球体上皮細胞におけるsGC-PKG経路の活性化が減弱することが想定される。本研究の解明が新たな治療ターゲットの創出を目指す。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that Nitric Oxide produced by glomerular endothelial cells may act cytoprotectively via sGC activation in glomerular epithelial cells. sGC fl/fl mice were used to generate glomerular epithelial cell-specific sGC-deficient mice. The results showed that the diabetic model of diabetes mellitus, which normally results in compensatory glomerular hypertrophy and increased GFR, was not observed in the glomerular epithelial cell-specific sGC-deficient mice. These results indicate that sGC activation in glomerular epithelial cells is involved in the compensatory origin of glomeruli. It has also been shown that sGC activating drugs restore this compensatory origin. Further studies will be conducted to determine the significance of treatment.

研究分野：腎臓

キーワード：慢性腎臓病 内皮機能障害 sGC

1. 研究開始当初の背景

本研究の学術的背景、研究課題の確信をなす学術的「問い」

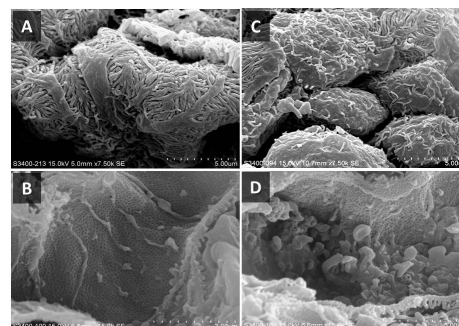
本邦における慢性腎臓病 (CKD) 患者は増加傾向にあり、死因の第 8 位を占め、重要な医療問題としてその解決が望まれる。このため透析に至る原因疾患は糖尿病が第一位でありその治療介入は必須の命題である。また糖尿病性腎臓病の初期に出現するアルブミン尿は脳卒中、虚血性心疾患等の心血管病 (Cardiovascular Disease: CVD)、認知症発症と強く関連していることも判明している。これらの事実から生活習慣病関連 CKD では、共通して血管内皮機能障害 (Endothelial cell dysfunction: ECD) が付随する。心血管病発症の最早期病態が ECD であることは既に確立されており、アルブミン尿出現が CVD 発症と関連することからも内皮障害によってアルブミン尿が出現する蓋然性は高い。事実、私共は 2 光子レーザー顕微鏡を活用し、腎内微小血流・透過性変化を可視化・解析しうる新規 in vivo live imaging 技術 (Microcirculation 2010,2014) を確立し、アルブミン尿出現に糸球体 ECD が関与することを明らかにしてきた (Diabetologia 2010、JASN2013)。

このように早期の CKD 発症には内皮機能障害が重要であることを報告してきたが、多くの基礎研究から糸球体上皮細胞障害が腎不全に至る糸球体硬化病変の形成に重要であることが判明している。糸球体上皮細胞障害 (特にミトコンドリアストレス、apoptosis) の結果、上皮細胞が脱落し、糸球体上皮細胞が非分裂細胞であるが故に、糸球体硬化が進行する。

CKD の最早期病態 (アルブミン尿) には糸球体内皮障害が関与し、その後の腎不全に至る過程には、糸球体上皮障害が深く関与する。このため糸球体内皮細胞から上皮細胞への障害機序伝搬・クロストーク機序 (内皮 上皮連関) が想定されるが、実態は不明である。

内皮特異的 NADPH oxidase (tie2-NOX2 Tg) マウスと糖尿病 Akita マウスを交配し、糖尿病モデルを作成した。糸球体内皮に酸化ストレスを発生させると本来アルブミン尿が検出される以前の超早期段階でアルブミン尿が出現した (Lab Invest 2016)。興味深いことに、この段階から糸球体上皮細胞にも障害が惹起された。

右図：6 週齢 Akita 糖尿病マウスの上皮細胞 (A)、糸球体内皮細胞 (B) に形態変化を認めず。Tie2-NOX-Tg × Akita 糖尿病モデルでは、同時点で、内皮障害 (fenestrae 減少)・活性化 (D) に続いて上皮細胞形態変化 (足突起膨化、融合傾向) を認める (C)。



学術的問いとして「腎症初期に認められる糸球体内皮細胞障害が腎症進行に重要な糸球体上皮細胞障害を惹起するメカニズムは何か？」を解明することを本研究の命題としたい。

そのメカニズムとして糸球体内皮細胞における eNOS-NO 経路活性化に着目した。糸球体内皮障害では eNOS 活性化不全 (eNOS uncoupling) により bioavailable NO の低下が起きる。その結果糸球体上皮細胞における sGC-PKG 経路の活性化が減弱することが想定される。本研究の解明が新たな治療ターゲットの創出となり国民の健康延伸に寄与したい。

2. 研究の目的

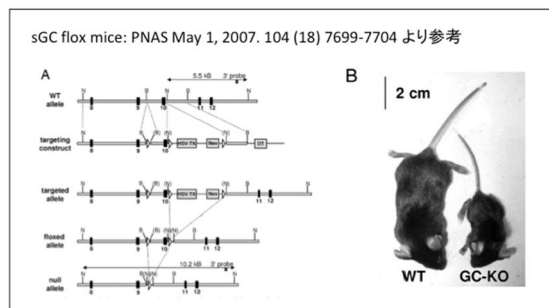
先述した本研究の命題を満たすため以下の目的のもと研究を行う。

1) 糸球体内皮機能障害が腎障害を進行させるか検討する。

本目的を達成するため透析導入の主要な原疾患である糖尿病性腎臓病、腎硬化症 (高血圧性腎硬化症及び加齢腎) における糸球体内皮細胞障害の意義について検討を行う。

2) 糸球体上皮細胞における sGC 活性化の意義を検討する。

糸球体内皮細胞から産生される Nitric Oxide が糸球体上皮細胞における sGC 活性化を介して細胞保護的に働くことを想定して研究を行う。sGC^{fl/fl} マウスを用いて臓器・細胞特異的な効果・影響を検討する。右図の写真は sGC の $\beta 1$ サブユニットの general knockout (GC-KO) のものであり、GC-KO は出生直後 60% の個体が死亡する。このため本研究では cre-loxp system を用いて臓器特異的・細胞種特異的 sGC 欠損マウス (sGC-CKO) を作成し、その意義を検討する。現在、podocin-cre マウスを取得しており糸球体上皮細胞における sGC 活性化の意義を検討することができる。



3) sGC 活性化制御による治療介入意義を検討するため薬剤介入を行う。

eNOS-NO-sGC 経路をターゲットとした治療戦略として PDE 阻害薬と sGC 活性化薬、また下流の PKG 活性化薬を使用する。

これらの目的を達成することは糖尿病性腎臓病及び腎硬化症における病態の移行機序を解明することになる。臨床的事実から腎臓病の最早期病変である微量アルブミン尿では内皮機能障害が重要な因子であることが想定され、申請者らの基礎的検討結果もそれを支持

するものである。これらまで腎臓病の研究はそれぞれの細胞を主体に研究が行われてきたが、本研究では細胞連関にターゲットを当てたものであり独創性に富んだものである。

3. 研究の方法

1) 糸球体内皮機能障害が腎障害を進行させるか検討する。

eNOS 欠損マウス (eNOSKO) を用いて検討を行う。モデルは Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病モデルを作成し野生型マウス (WT) と eNOSKO とを比較検討を行う。また、2 型糖尿病モデルとして C57BLKS/J *lar* ^{-/+}Lepr^{db}/^{db} と eNOSKO を交配させ eNOSKO-db/db マウスを作成し進行性腎障害モデルとして検討を行う。また腎硬化症モデル (加齢腎モデル) として 6 ヶ月齢、15 ヶ月齢まで飼育し組織の検討を行う。検討項目としては糸球体障害を組織解析を行う。具体的には PAS 染色による組織障害評価、透過電子顕微鏡 (TEM) による糸球体上皮細胞の微細構造変化及びミトコンドリア障害の評価を行う。

既に糖尿病モデル及び加齢モデルともに PAS 染色による糸球体硬化病変評価は終わっている。STZ 投与後、高血糖確認後、4 週間で屠殺・組織を評価行った。WT-STZ に比較し eNOS-STZ では糸球体硬化数が増加しており、db/db に比較し eNOSKO-db/db では同様に糸球体硬化病変の増加のみならず間質の線維化が進行していた。また、eNOS-STZ では糸球体上皮細胞におけるミトコンドリアの数が減少し一部クリステの構造破壊が起こっておりミトコンドリア障害が進行していることを見出している。加齢モデルにおいても WT-15M では組織障害は軽微であるが eNOSKO-15M では糸球体硬化病変が散見されることを確認している。同様に TEM で観察したミトコンドリア形態変化は eNOS-15M で顕著に認められた。

今後は単離糸球体を行い各群の RNA を抽出後、NGS 解析を行い eNOS-NO 経路の破綻が及ぼす糸球体内遺伝子変化を網羅的に解析する。

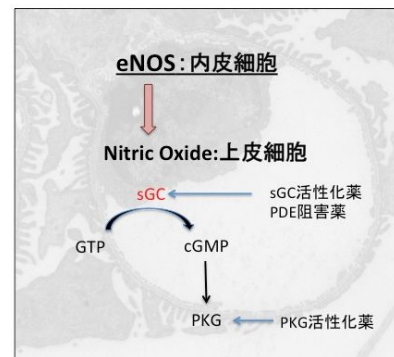
2) 糸球体上皮細胞における sGC 活性化の意義を検討する。

eNOS-NO 経路の破綻によって認められる現象が糸球体上皮細胞における sGC 活性化の低下の影響を検討するため糸球体上皮細胞特異的 sGC 欠損マウス (podo-sGC-KO) を用いて研究を行う。sGC 欠損マウスは現在作製中で 2019 年内には搬入する予定である。podocin-cre マウスは取得済みで現在繁殖中である。podo-sGC-KO に STZ 投与を行い糸球体病変の評価を行う。また、1) 同様に単離糸球体における sGC 活性化の及ぼす影響を検討するため RNA-seq を行い比較行う。

これらの結果から得た知見を元に in vitro 実験を行う。primary podocyte を WT 及び podo-sGC-KO から採取し検討を行う。sGC 活性化薬による incubation で遺伝子発現の変化を検討する。in vivo で認められた遺伝子発現制御が再現されればその制御機構を明らかにするため ATAC-seq を行い、遺伝子発現における Epigenetic 制御機構を解明する。

3) sGC 活性化制御による治療介入意義を検討するため薬剤介入を行う。

eNOS-NO 経路は右図のようなシグナル伝達経路となる。特に申請者は sGC 活性化に着目した。eNOS-STZ に対して sGC 活性化薬、PDE5 阻害薬及び PKG 活性化薬を投与を行いその効果を組織評価を行う。また podo-sGC-KO-STZ に対しても同様に投薬を行い sGC 活性化薬が効果が減弱されることを確認することで sGC 活性化薬の腎保護作用が糸球体上皮細胞における sGC 活性化を介していることを証明する。



4. 研究成果

1) 糸球体内皮機能障害が腎障害を進行させるか検討する。

eNOS 欠損マウスに STZ 投与モデルを作成したところ糸球体上皮細胞とミトコンドリア障害が進行した。また糸球体病変の進行と高度アルブミン尿を認めた。また糸球体上皮細胞で sGC の顕著なタンパク発現上昇を認めた。また尿管細胞にもタンパク発現上昇を認めており病態下で何らかの発現制御を受けている可能性が示唆される結果である。

2) 糸球体上皮細胞における sGC 活性化の意義を検討する。

sGC 発現上昇の意義を検討するため糸球体上皮細胞特異的 sGC 欠損 (podo-sGC-KO) マウスを作成した。podo-sGC-KO-STZ では糸球体上皮細胞における sGC 発現は消失しているのを確認した。糖尿病発症に伴う糸球体代償性肥大が抑制されており、経皮的 GFR 上昇も抑制されていた。以上の結果から糸球体上皮細胞における sGC 活性化は高血糖による代償性 GFR 上昇に関与することがわかってきた。

3) sGC 活性化制御による治療介入意義を検討するため薬剤介入を行う。

eNOS-STZ マウスに sGC 活性化薬の投与実験を行なった。糖尿病発症後に認めるアルブミン尿の増加が sGC 活性化薬で抑制されることがわかった。現在、podo-sGC-KO-STZ への投薬実験を行っており、薬剤の効果が糸球体上皮細胞由来か検討している。

今後さらなる検討を行い、糸球体内皮 上皮細胞連環の解明を目指す。

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 Wada Y, Umeno R, Nagasu H, Kondo M, Tokuyama A, Kadoya H, Kidokoro K, Taniguchi S, Takahashi M, Sasaki T, Kashiwara N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Endothelial Dysfunction Accelerates Impairment of Mitochondrial Function in Ageing Kidneys via Inflammasome Activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 9269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22179269.	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0件

〔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	柏原 直樹 (Kashiwara Naoki) (10233701)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	城所 研吾 (Kidokoro Kengo) (50435020)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

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