

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06003

研究課題名(和文) 糖尿病において特徴の異なる尿細管障害が生じる機序の解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of the tubular injury with different characteristics in diabetes mellitus

研究代表者

片山 健太郎 (Katayama, Kentaro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50508869

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)：DEKラットが呈する糖尿病の病期依存的な尿細管の拡張を伴う腎の増大は腎保護効果を有するSglt2阻害剤投与によって抑制されない。本研究から、DEKラットが呈する腎病態には嚢胞腎の発生に関わる遺伝子発現の変化、およびAMPKを介したシグナル伝達経路の変化が関わっている可能性が示唆された。また、本腎病態を反映していると考えられる複数の尿中miRNAが同定でき、これらのmiRNAがバイオマーカーとして用いることが出来ると考えられた。DEKラットが呈する腎病態には第12番染色体上のDAO遺伝子の欠損に加えて、第19番染色体上の遺伝子も関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎障害の発症と進行には尿細管障害が大きく関わっているが、Sglt2阻害剤などの腎保護効果がある糖尿病治療薬によっても抑制できない糖尿病による尿細管障害がヒトにおいても存在している。本研究から、DEKラットが呈する腎病態にはこれまで報告されている糖尿病性腎障害の発症機構とは異なり、AMPKおよびmTORのシグナル経路の抑制が関わっている可能性が示唆され、既報の糖尿病性腎障害の治療標的とは異なる治療標的を探索することが重要であることが示された。また、本腎病態のバイオマーカーとして利用可能な尿中miRNAが同定され、将来的に診断に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The renal enlargement with tubular dilation in diabetic DEK rat is not suppressed by administration of Sglt2 inhibitors, which have a renoprotective effect. The present study suggests that the renal pathology exhibited by DEK rats may involve altered gene expression involved in the development of cystic kidney disease and altered signaling pathways mediated by AMPK. In addition, several urinary miRNAs were identified that may reflect this renal pathology, and these miRNAs could be used as biomarkers of the renal pathological changes in DEK. In addition to the deficiency of the DAO gene on chromosome 12, gene(s) on chromosome 19 was suggested to be involved in the renal enlargement exhibited by DEK rats.

研究分野：動遺伝学、実験動物学

キーワード：糖尿病 糖尿病性腎障害 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎障害は末期腎不全を導く主たる原因の一つであることから、その克服が強く望まれている。糖尿病性腎障害の発症と進行には、ナトリウム/グルコース共輸送体(Sglt2)を介した尿細管での糖の再吸収亢進に起因する尿細管障害が大きく関与していることが明らかになってきている。Sglt2 阻害剤には腎保護作用があり、Sglt2 阻害剤投与によって糖尿病性腎障害が抑制されることがヒトのコホート研究から示されている一方、Sglt2 阻害剤が奏功しない糖尿病性腎障害の症例も多く報告されている。このことから、糖尿病性腎障害の大きな要因の一つである尿細管障害には、Sglt2 を介した糖の再吸収亢進とは異なる発生機序が存在していることが示唆される。しかし、Sglt2 阻害剤が尿細管の障害を軽減することによって糖尿病性腎症を抑制することが明らかにされたのは最近のことであり、また、尿細管の障害を糖尿病性腎症の主体として捉える考え方は、ようやく認識されるようになってきた段階であることから、糖尿病において尿細管障害が生じる機序についての知見は未だ限定的である。

2. 研究の目的

日本では糖尿病性腎障害に起因する末期腎不全のために、毎年1万5千人以上が新規の透析導入を余儀なくされている。腎臓は再生能が非常に低い臓器であり、機能が失われた腎臓を回復させる方法は現時点では無い。腎不全に対する最も効果的な対処方法は腎障害を悪化させない予防であることから、末期腎不全を導く大きな要因の一つである糖尿病性腎障害の抑制は達成すべき大きな課題となっている。本研究では、糖尿病に伴い顕著な尿細管障害を呈する新規の遺伝的糖尿病モデルラット(DEK)を用い、糖尿病により生じるSglt2 阻害剤が奏功しない尿細管障害の発症機序の解明と早期診断のためのバイオマーカーの同定を行い、糖尿病性腎障害に対する早期診断と個別化医療の実現に繋がる成果を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

糖尿病発症直後のDEKにSglt2 阻害剤配合飼料を4週間給餌して投与したのち深麻酔下で安楽死を行い、腎臓を摘出して腎重量を測定した。その後腎臓を組織学的解析、腎臓の網羅的遺伝子発現解析、および糖尿病性腎障害もしくは腎増大に関わるタンパク質のウェスタンブロット解析に供した。また、麻酔下の動物の膀胱から尿を採取した後、cell free RNA(cfRNA)を精製し、マイクロRNAアレイ解析を行なった。

組織学的解析および尿中cfRNAの解析では、正常対象として糖尿病を発症していないDEKのサンプルを用い、発症対象として糖尿病発症後も通常飼料(Sglt2 阻害剤非添加飼料)で4週間飼育したDEKのサンプルを用いた。腎臓の網羅的遺伝子発現解析および腎増大に関わるタンパク質のウェスタンブロット解析では、正常対象としてDEKの始祖系統であるPETラットのサンプルおよび糖尿病を発症していないDEKのサンプルを用い、発症対象として無処置の糖尿病発症DEK(糖尿病発症後もSglt2 阻害剤非添加飼料を4週間給与)のサンプルを用いた。

腎増大に関わる遺伝学的解析ではDEKの糖尿病発症個体とWistarラットとの交配から得られた産仔をDEKの糖尿病発症個体と交配して得た戻し交配個体のDNAを用い、マイクロサテライトマーカーを利用して腎重量が重い個体においてDEKの染色体がホモとなっている領域を探索した。

4. 研究成果

Sglt2 阻害剤配合飼料を4週間給餌した糖尿病発症DEKラットの腎重量は無処置の糖尿病発症DEKの腎重量と有意差がないことが確認された。腎臓組織のPAS染色の結果、無処置のDEKの尿細管細胞では核の糖化はほとんど認められなかった。糖尿病性腎障害において尿細管で発現が増加することが報告されている、低酸素応答タンパク質であるHif-1およびミトコンドリアの機能異常を反映するFis1の発現上昇も糖尿病発症DEKでは認められなかった。また、糖尿病性腎障害ならびに腎臓の増大にはmTORシグナルの活性化が関与していることが報告されているが、糖尿病発症DEKの腎臓では正常対象と比較してmTORシグナルは減弱していることが示された。これらの結果はDEKが呈する尿細管障害は既報の機構とは異なる機序で生じていると考えられた。糖尿病では細胞内の栄養センサーとして働くAMPKの活性が低下し、Sglt2 阻害剤の投与によりAMPKの活性化が生じることが報告されている。DEKにおいてもAMPKの活性低下が生じていたが、Sglt2 阻害剤投与によってもAMPKの活性は回復しなかった。したがって、DEKで認められたAMPKの活性低下は他の糖尿病モデルとは異なる機序によって生じている可能性が考えられた。

DEKの腎病態に関わる遺伝的解析では、第12番染色体上のD-アミノ酸化酵素の欠失が生じている染色体領域に加えて、第19番染色体上の染色体領域も関わっている可能性が示唆された。

網羅的RNA発現解析から、糖尿病発症DEKでは嚢胞腎発症に関わる遺伝子の発現量の変化が同定され、この遺伝子の発現量が変化する傾向はSglt2 阻害剤の投与によって血糖値を低下させても変わらずに認められた。また、尿中miRNAの網羅的解析およびクラスタリング分析から、尿中

miRNA に基づき、DEK の腎肥大を伴う糖尿病病態を識別できる可能性が示された。正常対象個体と比較して糖尿病発症 DEK において2倍以上の発現量の違いが認められた尿中 miRNA の中には、既存の糖尿病モデルにおいて報告されている miRNA の変化も認められる一方、嚢胞腎の症状を悪化させることが報告されている miRNA の 20 倍以上の発現量の増加、および機能不明の miRNA が 5%以下の発現量に減少しているなど特徴的な miRNA の変動が同定された。

本研究から、DEK が呈する糖尿病に伴って生じる顕著な尿細管の拡張と尿細管の障害、腎臓の増大には嚢胞腎の形成・進行に関わる遺伝子の発現変化によって生じている可能性が示され、本病態の治療になり得ると考えられた。また、尿中 miRNA をバイオマーカーとして本病態を診断できる可能性が示された。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Domon A, Katayama K, Yamada T, Tochigi Y, Suzuki H. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Characterization of Enlarged Kidneys and Their Potential for Inducing Diabetes in DEK Rats | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biology(Basel) | 6. 最初と最後の頁 1-16 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10070633. | 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 Domon A, Katayama K, Sato T, Tochigi Y, Tazaki H, Suzuki H. | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Empagliflozin ameliorates symptoms of diabetes and renal tubular dysfunction in a rat model of diabetes with enlarged kidney (DEK) | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 1-16 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251135. eCollection 2021. | 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 Mahmud MAA, Noguchi M, Domon A, Tochigi Y, Katayama K, Suzuki H. | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Cellular Expression and Subcellular Localization of Wwox Protein During Testicular Development and Spermatogenesis in Rats | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Histochem Cytochem | 6. 最初と最後の頁 257-270 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155421991629. | 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 Katayama K, Ito J, Murakami R, Yamashita A, Sasajima H, Narahashi S, Chiba J, Yamamoto I, Fujii W, Tochigi Y, Suzuki H. | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Mutation of the Thap4 gene causes dwarfism and testicular anomalies in rats and mice | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Mamm Genome | 6. 最初と最後の頁 149-159 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00335-024-10041-8. | 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 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 下園 優子、土門 綾華、丸山 純果、永江 周平、栃木裕貴、片山健太郎、鈴木浩悦 |
| 2. 発表標題 腎臓の増大を伴う糖尿病モデルラット (DEK) へのインスリン投与が腎臓に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 永江周平, 丸山純果, 横山滝, 藤森柚実, 土門綾華, 栃木裕貴, 片山健太郎, 鈴木浩悦 |
| 2. 発表標題 腎臓の増大を伴う新規糖尿病モデルラット (DEK) 系統の遺伝学的解析とバイオマーカーの探索 |
| 3. 学会等名 第24回日本動物遺伝育種学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 丸山純果, 永江周平, 土門綾華, 栃木裕貴, 片山健太郎, 鈴木浩悦 |
| 2. 発表標題 腎実質の増加を伴う非肥満型糖尿病ラット (DEK) において、若齢期の片側腎摘出は糖尿病発症率を増加させる |
| 3. 学会等名 第37回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2024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 |
|---------|---------|
|---------|---------|