

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16171

研究課題名（和文）腎炎・ネフローゼ症候群に対する新規治療戦略の探求：脂質異常症からのアプローチ

研究課題名（英文）Exploration of novel therapeutic Strategies for Nephritis and nephrotic syndrome: approaching through the regulation of dyslipidemia

研究代表者

鈴木 泰平（Suzuki, Taihei）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10749948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：エボロクマブは抗ヒトPCSK9モノクロナル抗体であり、現在難治性の脂質異常症に使用されているが、ネフローゼ症候群に合併する脂質異常症への効果は未知であった。我々はアドリアマイシンを使用し、マウスにネフローゼ症候群を誘導しエボロクマブによる治療効果を検討した。エボロクマブの投与により蛋白尿や脂質異常症は改善を認めた。治療メカニズムとしてCD36の制御を介したNLRP3インフラマソームやパイロトシスの抑制が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネフローゼ症候群は治療抵抗性である症例も散見され、有効で安全な治療法が求められている。エボロクマブは抗ヒトPCSK9モノクロナル抗体製剤であり、現在家族性高コレステロール血症やスタチンによる治療に抵抗性を示す脂質異常症に対し使用されている。ネフローゼ症候群は脂質異常症を高率に合併するがその治療の意義や治療法については一定の見解を得られていない。今回のマウスネフローゼモデルを用いた実験から、エボロクマブによるネフローゼ症候群改善効果が示された。ヒトネフローゼ症候群に対して同様の治療効果が見込めるかどうか今後更に検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Evolocumab is a monoclonal antibody targeting human PCSK9 and is currently used for the treatment of refractory dyslipidemia. However, its efficacy in dyslipidemia complicated with nephrotic syndrome has not been unknown. We induced nephrotic syndrome in mice using adriamycin and investigated the therapeutic effects of evolocumab. Administration of evolocumab improved proteinuria and dyslipidemia. The potential involvement of NLRP3 inflammasome and pyroptosis inhibition mediated through the regulation of CD36 was suggested as a possible treatment mechanism.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ネフローゼ症候群 脂質異常症 エボロクマブ

1 . 研究開始当初の背景

現在本邦では 30 万人以上の患者が透析治療を受けており、毎年 5,000 人以上が新たに透析導入となっている。また、透析関連医療費は推計で年間 1.6 兆円以上と考えられており、医療経済面からも腎臓病の予防および治療方法の探求が急務であることに疑念の余地はない。糸球体腎炎・ネフローゼ症候群は、透析導入となる患者の原疾患として糖尿病性腎症に次ぐ第 3 位である。これらのことから、慢性糸球体腎炎・ネフローゼ症候群の病態解明ならびに治療方法を追究することは本邦の腎臓病診療に取り組む上で重要な意義がある。近年糸球体腎炎・ネフローゼ症候群において血中 proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 濃度が著明に上昇すると報告されている。PCSK9 は肝臓で合成される蛋白質であり、LDL コレステロール受容体と結合することで受容体のエンドサイトーシスを促し脂質異常症を増悪させることが知られている。腎疾患において異常上昇した PCSK9 がどのような影響を与え得るのかについてはこれまで十分に検討されていない。糸球体腎炎・ネフローゼ症候群の病態進展に蛋白尿量が大きく影響することが知られているが、蛋白尿漏出防止機構の要である糸球体上皮細胞に対する PCSK9 上昇による障害作用が明らかになれば、その抑制は腎疾患治療の標的となる得る。また、2016 年に我が国で承認された PCSK9 阻害薬である evolocumab (EVO) は PCSK9 に対するモノクローナル抗体製剤である。現在 EVO は家族性高コレステロール血症患者やスタチン抵抗性の難治性脂質異常症に使用され、心血管イベントの抑制効果が報告されている。EVO をネフローゼ症候群に対し使用した症例報告は散見されるが、治療効果や作用のメカニズムに関しては一定の見解が得られておらず検討すべき課題である。

2 . 研究の目的

糸球体腎炎・ネフローゼ症候群の患者において PCSK9 濃度が著明に上昇することが明らかになっている。PCSK9 は脂質代謝において重要な蛋白質と考えられているが、その過剰な上昇が腎臓に対しどのように影響するかは明らかになっていない。糸球体腎炎・ネフローゼ症候群を発症した際に上昇する PCSK9 そのものが腎臓に対して及ぼす作用について解析し、PCSK9 の抑制が治療目標となり得るかは現時点では不明であり検討の余地がある。また、PCSK9 阻害薬である EVO が糸球体腎炎・ネフローゼ症候に対する治療効果を示したとする症例報告は少数存在するが、臨床研究および基礎研究いずれも EVO の有する糸球体腎炎・ネフローゼ症候群改善効果に関しては十分検討されておらず、EVO が腎疾患の新たな治療戦略となり得るのかは未知である追究すべき課題である。本研究は蛋白尿漏出防止に重要な役割を果たす糸球体上皮細胞を用いて PCSK9 による腎臓への障害作用を明らかにするとともに、PCSK9 阻害薬である EVO が有する糸球体腎炎・ネフローゼ症候群に対する治療効果を検討することを目的とする。

3 . 研究の方法

第 8-12 週齢雄 BALB/c マウスに糸球体上皮細胞障害により多量の尿蛋白をきたすアドリアマイシン (ADR) 腎症を誘導し、EVO (30mg/kg) を ADR の投与直前もしくは ADR 投与から 7 日目に皮

下注射し、いずれのマウスも Day14 で屠殺、血液、尿および腎臓を回収し ADR 腎症に対する予防効果および治療効果を検討した。

また、マウス系球体上皮細胞株 (MPC) を PCSK9 で刺激し発現蛋白の定量評価と酸化コレステロールの取り込みを解析した。

4. 研究成果

コントロール群と比べ、ADR 群で血中 PCSK9 濃度および LDL 濃度は有意な上昇を認めた。また、尿中アルブミン濃度も上昇を認めた。ADR 群と比べ、EVO+ADR 群では尿中アルブミン量、BUN 値、血中 PCSK9 値ならびに LDL コレステロール値の有意な低下を認めた。

病理学的検討では、p57 陽性ポドサイト数は ADR 投与により有意に減少しており、EVO 投与によりポドサイト数の上昇を認めた。ADR 群に比べ ADR + EVO 群で糸球体における synaptopodin (Syn) 陽性面積およびポドサイト数は有意に保たれていた。

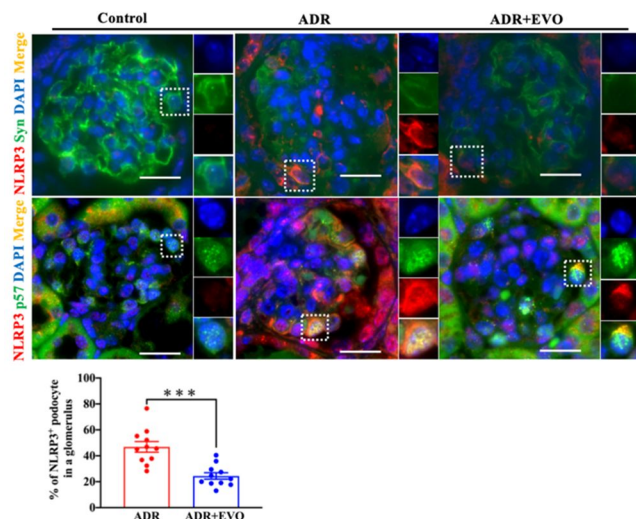
これらの結果から、EVO 投与によりポドサイト保護効果が発揮されネフローゼ症候群の改善がもたらされたと考察した。EVO 投与により ADR によるポドサイト数減少を抑制する効果が示唆されたため ADR 投与によるポドサイト細胞死についての検討を行った。腎皮質から mRNA を抽出し、アポトーシス関連遺伝子である *Caspase3* の発現を qPCR で確認したところ ADR 群と ADR+EVO 群に有意差は認めなかった。そこでパイロトーシス関連遺伝子である *Caspase1* および *NLRP3* の遺伝子発現を確認したところ、EVO+ADR 群において有意な発現低下がみられた。このことから EVO によるパイロトーシス抑制作用が腎保護に寄与した可能性が示唆された。ポドサイトにおける

NLRP3 インフラマソーム/パイロトーシスの活性化を検討するために蛍光抗体法で NLRP3 およびポドサイトマーカーである Syn もしくは p57 で二重染色を行い、糸球体横断面におけるポドサイト 1 つあたりの陽性面積を判定量評価した。コントロール群に比べ ADR 群でポドサイトにおける NLRP3 の発現は有意に上昇していた。ADR+EVO 群では ADR 群に比べポドサイトにおける NLRP3 の発現は有意に減少していた (図 1)。

マクロファージなどを用いた検討では、酸化コレステロールや遊離脂肪酸が脂質

の受容体を経由し細胞内に流入した際に様々な細胞ストレスを誘導し、NLRP3 インフラマソーム/パイロトーシスを活性化することが報告されていたため、MPC を PCSK9 および ADR で刺激したところ、酸化コレステロールのスカベンジャー受容体である CD36 の遺伝子発現亢進を認めた。マウスの腎臓を用いて脂肪滴の構成成分である ADRP とポドサイトマーカーを用いて蛍光抗体法による二重染色で検討を行ったところ、ADR 群でポドサイトにおける ADRP 発現は亢進し、EVO 投与により ADRP 陽性ポドサイト数は減少していた。このことから ADR により脂質異常症が発症し、ポドサイト内に脂質が流入している可能性が示唆された。また本検討においてポドサイトにお

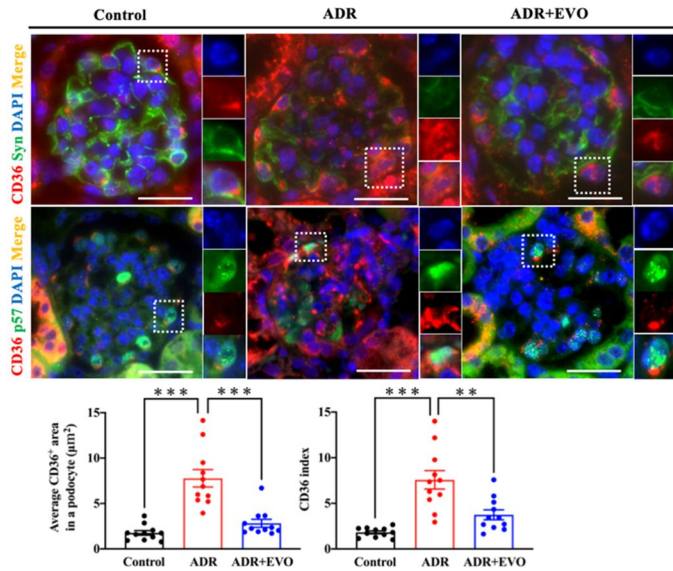
【図 1】 蛍光抗体法によるポドサイトにおける NLRP3 発現解析



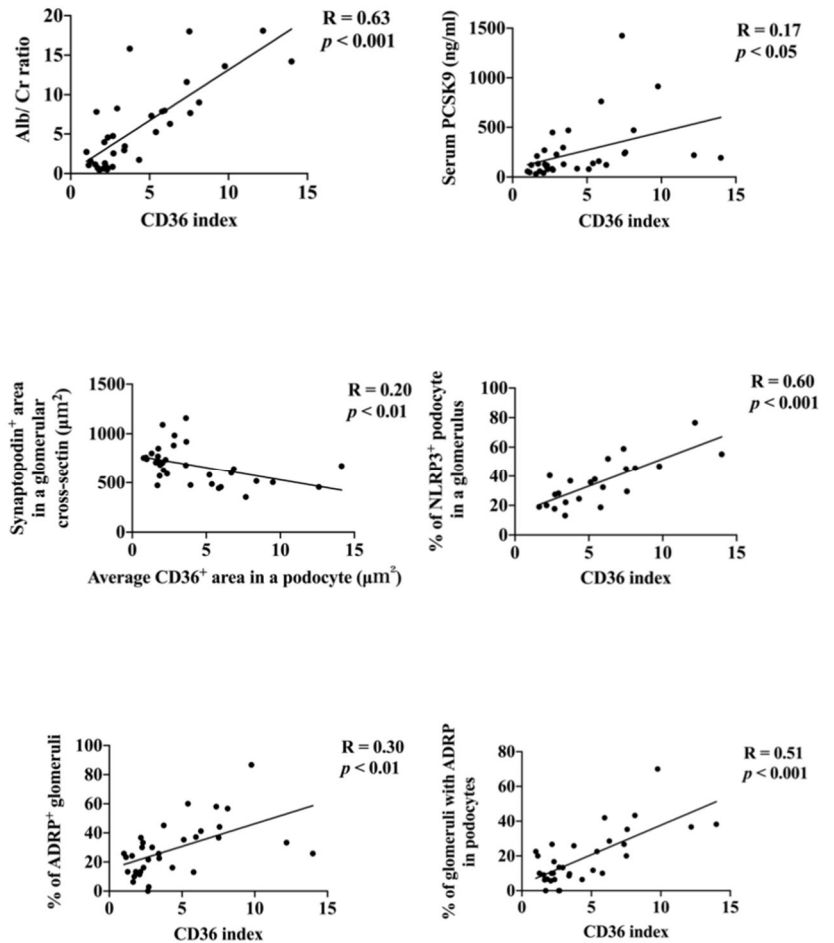
けるCD36の動態を検討するためCD36およびポドサイトマーカーであるSynもしくはp57を蛍光抗体法でそれぞれ二重染色し、発現面積を半定量評価した。コントロール群と比べADR群でポドサイトにおけるCD36の発現が亢進していた。ADR+EVO群ではポドサイトにおけるCD36の発現は有意に低下していた(図2)。

興味深いことに、CD36発現面積と血清PCSK9濃度、尿アルブミン量、ポドサイト数、NLRP3発現ポドサイト数と統計学的に有意な相関が確認された(図3)。このことからポドサイトにおけるCD36の発現はポドサイト障害やネフローゼの重症度を反映している可能性が考えられた。更に、ADR腎症マウスでは糸球体内においてCD36および一部のPCSK9の局在が一致していた。MPCを用いた*in vitro*の検討ではPCSK9による刺激でCD36の発現が亢進しEVOにより発現は有意に低下した。DiI標識を行った酸化コレステロールによりMPCを培養したところPCSK9存在下で酸化コレステロールの取り込みが有意に増加しEVO投与により取り込みは減弱した。本研究から、EVOはPCSK9によるCD36を介したNLRP3 inflammasome活性化を抑制することでポドサイト保護作用を発揮し、マウスネフローゼ症候群治療効果をもたらす可能性が示唆された。

【図2】 蛍光抗体法によるポドサイトにおけるCD36発現解析



【図3】 ポドサイトにおけるCD36発現と各種臨床・病理パラメータとの相関



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 0件）

1. 著者名 Suzuki Taihei, Iyoda Masayuki, Kanazawa Nobuhiro, Tachibana Shohei, Honda Hirokazu	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effect of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition on podocytes in mouse nephrotic syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 100199 ~ 100199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.labinv.2023.100199	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 泰平, 伊與田 雅之, 橘 翔平, 和田 幸寛, 本田 浩一
2. 発表標題 マウスFSGSモデルを用いたevolocumabによるNLRP3 inflammasome制御を介した新規治療法の検討
3. 学会等名 第64回 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 泰平, 本田 浩一
2. 発表標題 Evolocumabによるネフローゼ症候群治療の可能性 .
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会（シンポジウム30 「脂質と糸球体疾患の最新知見」）
4. 発表年 2023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
---------	---------