

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860691

研究課題名(和文) 糖尿病腎症の進展過程におけるROCK2の意義

研究課題名(英文) The role of ROCK2 in the progression of diabetic nephropathy

研究代表者

的場 圭一郎(Matoba, Keiichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20459647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病腎症で観察されるNotchシグナルを介した糸球体上皮細胞の細胞死とRho-kinase(ROCK)の関連性を検討した。糸球体上皮細胞培養株と2型糖尿病モデルマウスを用いた実験から、ROCKの作用を薬剤やsiRNAを用いて抑制することによって、Notchシグナルの過剰な活性化や糸球体細胞死、尿中への脱落を抑制できることが明らかになった。また、この作用にはROCKアイソフォームのうちROCK2が主に関与していた。ROCK阻害薬は既に心血管領域で臨床応用が進められているが、腎症に対してはROCK2選択薬な阻害薬がより有効である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The small GTPase Rho and its downstream effector Rho-kinase, regulate a number of cellular processes, including organization of the actin cytoskeleton, cell adhesion and migration. Studies from our laboratory and others have shown that pharmacological inhibition of Rho-kinase in experimental diabetic models results in a significant reduction in albuminuria and glomerulosclerosis. In this project, we investigated the role of Rho-kinase in the Notch pathway and glomerular podocyte loss under diabetic conditions. The activated Notch signaling and podocyte apoptosis were inhibited by the pharmacological or genetic blockade of Rho-kinase. Moreover, we found that ROCK2 isoform made dominant contribution to the regulation of Notch pathway. Collectively, these findings identify ROCK2 as a critical regulator of podocyte injury and the progression of diabetic nephropathy.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病腎症 Rho-kinase ROCK2 糸球体上皮細胞 Notch

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病患者の増加とともに、糖尿病血管合併症を有する患者数も増加の一途を辿っている。日本透析医学会による慢性透析患者に関する基礎集計によると、代表的な血管合併症である糖尿病腎症（以下、腎症と記す）は1998年以降、透析導入に至る原疾患として第一位を占めている。

腎症から慢性透析に移行した患者の生存率は、他の腎疾患に起因する透析患者と比べて著しく不良である。英国で行われた大規模臨床試験 United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)のサブ解析によると、腎症を有する2型糖尿病患者の死亡率は腎機能低下とともに増加し、腎不全期では年間実に20%近い患者が死亡している。

腎症の病態解明は末期腎不全への進展を阻止する新たな治療戦略の構築や生命予後改善につながる可能性があり、学術的側面のみならず、透析医療を取り巻く経済的側面からも喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、低分子量 GTP 結合蛋白 Rho の標的分子である Rho-kinase (ROCK)に着目し、腎症の発症進展過程における意義を明らかにすることを目的とする。

そのため、糖尿病における ROCK を介した糸球体上皮細胞障害の分子機序を解明する。また、ROCK の活性化を抑制することで糸球体上皮細胞の脱落や尿中アルブミン排泄量増加を抑制できるか否かを検討する。

3. 研究の方法

ROCK はアクチンストレスファイバーの脱重合やミオシン軽鎖のリン酸化による細胞形態や伸縮性の調節をはじめ、様々な細胞機能を制御している。特に血管平滑筋の伸展収縮を調節することから、冠攣縮性狭心症や肺高血圧症に代表される心血管疾患の病態形成において重要な役割を担っている(図1)。現在臨床試験が進められている ROCK 阻害薬は、これらの疾患に対する新たな治療薬として有用性が期待されている。

Rho/Rho-kinase signaling

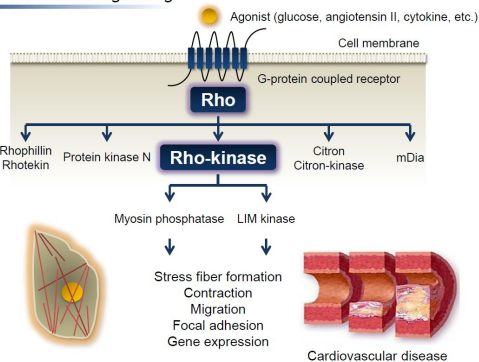


図1. Rho/Rho-kinase (ROCK)経路の概要: ROCK はブドウ糖等の細胞外刺激によって活性化され、細胞の多彩な機能を制御する。

申請者らは、この Rho/ROCK 経路が腎症をはじめとする糖尿病血管合併症の進展過程で重要な意義を有することを示してきた。糖尿病モデル動物の腎皮質では1型・2型の病型を問わず ROCK が活性化されており、ROCK の特異的阻害薬は尿中アルブミン排泄量の増加や糸球体硬化の進展を抑制する。一方、ROCK には ROCK1 と ROCK2 という二つのアイソフォームが存在するが、その機能分担の詳細は十分に理解されていない。

そこで、申請者はマウスの糸球体上皮細胞を用いて、糖尿病環境下における ROCK2 の役割を検討した。また肥満2型糖尿病モデルである db/db マウスに特異的 ROCK 阻害薬を経口投与し、生体における糸球体上皮細胞障害の抑制効果とその分子機序を解析した。

4. 研究成果

肥満2型糖尿病モデル動物である db/db マウスでは、体重増加や糖代謝の悪化と並行して腎症の合併、腎皮質での ROCK 活性化が認められる。ROCK 阻害薬である塩酸ファスジルを db/db マウスに経口投与すると、尿中アルブミン排泄量の増加や糸球体上皮細胞脱落、アポトーシスが抑制された(図2)。

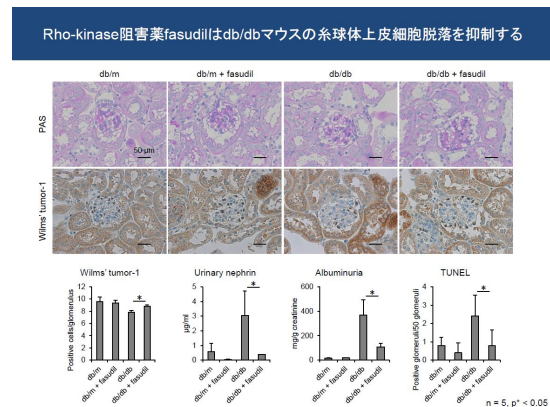


図2. 腎症の糸球体上皮細胞障害に対する ROCK 阻害薬の効果: 糸球体上皮細胞マーカーである Wilms' tumor の免疫染色では、PAS 染色で糸球体硬化が認められる病期よりも早期に糸球体上皮細胞の脱落が観察される。ROCK 阻害薬は上皮細胞脱落や尿中アルブミン排泄量の増加、アポトーシスを抑制する。

腎症の糸球体上皮細胞障害では、TGF-β による Notch シグナル活性化が重要な機序として知られている。マウスの糸球体上皮細胞株を TGF-β で刺激すると、ROCK の活性化と同時に Notch シグナルのリガンドである Jagged1 が誘導され、細胞のアポトーシスが認められた。ROCK の機能を薬剤や siRNA を用いて抑制すると、Notch シグナルの活性化や細胞死が抑制され、この機構には主に ROCK2 アイソフォームが関与していることが明らかになった。ROCK 阻害薬は既に心血管領域を中心に臨床応用が進められているが、腎症に対しては ROCK2 選択薬な阻害薬がより効果的である可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件、すべて査読有り)

1. Matoba K, Kawanami D, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Murai N, Matsufuji S, Utsunomiya K. Rho-kinase regulation of TNF- α -induced nuclear translocation of NF- κ B RelA/p65 and M-CSF expression via p38 MAPK in mesangial cells. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2014; 307: F571-80. DOI: 10.1152/ajprenal.00113.2014.
2. Ishizawa S, Takahashi-Fujigasaki J, Kanazawa Y, Matoba K, Kawanami D, Yokota T, Iwamoto T, Tajima N, Manome Y, Utsunomiya K. Sphingosine-1-phosphate induces differentiation of cultured renal tubular epithelial cells under Rho kinase activation via the S1P2 receptor. **Clin Exp Nephrol**. 2014; 18: 844-52. DOI: 10.1007/s10157-014-0933-x.
3. Kawanami D, Matoba K, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K. Fasudil inhibits ER stress-induced VCAM-1 expression by modulating unfolded protein response in endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2013; 435: 171-5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.091.
4. Matoba K, Kawanami D, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Murai N, Matsufuji S, Takahashi-Fujigasaki J, Utsunomiya K. Rho-kinase inhibition prevents the progression of diabetic nephropathy by downregulating hypoxia-inducible factor 1 α . **Kidney Int**. 2013; 84: 545-54. DOI: 10.1038/ki.2013.130.
5. Kanazawa Y, Takahashi-Fujigasaki J, Ishizawa S, Takabayashi N, Ishibashi K, Matoba K, Kawanami D, Yokota T, Tajima N, Utsunomiya K. The Rho-kinase inhibitor fasudil restores normal motor nerve conduction velocity in diabetic rats by assuring the proper localization of adhesion-related molecules in myelinating Schwann cells. **Exp Neurol**. 2013; 247: 438-46. DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.01.012.

[学会発表](計11件、すべて査読有り)

1. 的場 圭一郎, 川浪 大治, 塚本 雅美, 木下 淳, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. Rho/Rho-kinase シグナルは Notch を介した糸球体上皮細胞の細胞死を制御する. 第 57 回日本腎臓学会学術総会. 横浜,

2014 年 7 月.

2. 川浪 大治, 的場 圭一郎, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. 糖尿病合併症治療の新たな展開 糖尿病治療薬の多面的効果を巡って Rho キナーゼ阻害薬の合併症抑制効果. 第 18 回日本適応医学学会学術集会. 東京, 2014 年 6 月.
3. 的場 圭一郎, 川浪 大治, 塚本 雅美, 木下 淳, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. Rho-kinase は糸球体上皮細胞における Notch シグナル活性化を制御する. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 大阪, 2014 年 5 月.
4. 川浪 大治, 的場 圭一郎, 塚本 雅美, 木下 淳, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. mDia1 は lysophosphatidic acid による血管内皮機能障害を制御する. 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会. 大阪, 2014 年 5 月.
5. 川浪 大治, 的場 圭一郎, 岡田 梨奈, 塚本 雅美, 木下 淳, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. Rho/Rho-kinase は血管内皮において小胞体ストレスによる VCAM-1 発現誘導を制御する. 第 28 回日本糖尿病合併症学会. 旭川, 2013 年 9 月.
6. 的場 圭一郎, 川浪 大治, 塚本 雅美, 木下 淳, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. Rho-kinase による低酸素応答制御を介した糖尿病腎症の進展機構. 第 17 回日本適応医学学会学術集会. 東京, 2013 年 6 月.
7. 的場 圭一郎, 川浪 大治, 塚本 雅美, 木下 淳, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. Rho-kinase による低酸素応答制御を介した糖尿病腎症の進展調節機構. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 熊本, 2013 年 5 月.
8. 川浪 大治, 的場 圭一郎, 岡田 梨奈, 塚本 雅美, 木下 淳, 石澤 将, 金澤 康, 横田 太持, 宇都宮 一典. Rho-kinase の活性化は ER stress に伴う血管内皮機能障害に関与する. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 熊本, 2013 年 5 月.
9. 石澤 将, 藤ヶ崎 純子, 金澤 康, 的場 圭一郎, 川浪 大治, 横田 太持, 宇都宮 一典. Sphingosine 1-phosphate 刺激に伴う腎尿細管細胞での Rho/Rho-kinase を介した α SMA, E-cadherin への影響. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 熊本, 2013 年 5 月.
10. 金澤 康, 藤ヶ崎 純子, 石澤 将, 高林 奈緒子, 石橋 久美子, 的場 圭一郎, 川浪 大治, 横田 太持, 宇都宮 一典. 糖尿病性神経障害に対する Rho-kinase 阻害薬の治療効果. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 熊本, 2013 年 5 月.
11. Matoba K, Kawanami D, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K. Rho-kinase Activation Promotes Diabetic Glomerulosclerosis via Stabilization of Hypoxia-inducible Factor 1 α . The 73rd

American Diabetes Association's Scientific Sessions, 109-OR, Chicago, USA (June 2013).

〔図書〕(計2件)

1. 的場 圭一郎, 川浪 大治, 宇都宮 一典 . Rho-kinase による低酸素応答制御を介した糖尿病腎症の進展機構 . 適応医学 . 2013 年 . 17 巻 2 号 . P16-21 .
2. 的場 圭一郎, 川浪 大治, 横田 太持, 宇都宮 一典 . 合併症の基盤病態 その共通項を巡って Rho-kinase による転写因子制御 . 糖尿病合併症 . 2013 年 . 27 巻 1 号 . P68-71 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://diabendo.jp/study/complication.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

的場 圭一郎 (MATOBA, Keiichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20459647

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし