

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461233

研究課題名(和文) アセタゾラミドおよびカナグリフロジンによる糖尿病性腎症発症抑制効果の検討

研究課題名(英文) Renoprotecion of acetazolamide and canagliflozin

研究代表者

中山 裕史 (NAKAYAMA, YUSHI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00363531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病マウスでは著明な血糖値の上昇およびクレアチニクレアランス(Ccr)が増加しており、蛋白尿も大量に認められていた。糖尿病マウスでは、アセタゾラミド投与によりアルブミン尿抑制効果が認められた。またレニン活性の上昇の抑制とCcrの低下が認められ、tubuloglomerular feedbackの抑制解除を介した早期糖尿病性腎症の発症抑制効果が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In KK-Ay/TaJcl mouse, diabetes mellitus was developed significantly. Creatinine clearance and urinary protein excretion were also increased in KK-Ay/TaJcl mouse compared to control mouse (BALB/cAJcl). Administration of acetazolamide in food admixture reduced the urinary protein excretion. Increased renin activity observed in DM mouse was reduced by acetazolamid. Creatinine clearance was also decreased in DM mouse. These results indicated the renoprotective action of acetazolamid via tubuloglomerular feedback in diabetic nephropathy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：acetazolamide diabetic nephropathy

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は現在透析導入原因疾患の第一位であり、腎不全の危険因子であるだけでなく、生命予後が不良であること、また医療経済圧迫の面からも注目されている疾患である。現在の糖尿病性腎症に対する薬物治療はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAS) 系の抑制による腎症進展抑制が中心であり、直接的に腎症発症を抑制する薬物療法は確立されていない。我々は糖尿病性腎症発症抑制のための新たな手段として、高血糖時における尿細管腔内ナトリウム (Na) /クロール (Cl) 濃度低下と TGF の不活性化およびレニン活性化に着目している。高血糖時には尿細管腔内ブドウ糖濃度が上昇する。これにより浸透圧利尿が生じ、尿細管腔内 Na/Cl 濃度が低下する。このため tubuloglomerular feedback (TGF) の不活性化およびレニン活性亢進が起こり、病的な糸球体過剰濾過が惹起されると考えられている。申請者はこの尿細管腔内 Na/Cl 濃度低下による糸球体過剰濾過の持続が糖尿病性腎症の発症に重要であると考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病による腎尿細管腔内 Na/Cl の濃度変化と糸球体過剰濾過出現の関連を解明し、近位尿細管での Na 再吸収を抑制するアセタゾラミドに (ACZ) および Sodium-glucose transporter2 (SGLT2) 阻害薬による糖尿病性腎症の発症抑制効果を検討する。

尿細管腔内 Na/Cl 濃度が低下すると、TGF が抑制され輸入細動脈が拡張する。一方、レニン活性亢進による輸出細動脈収縮が生じ糸球体濾過量 (GFR) は増加する。糖尿病では遠位尿細管 Na/Cl 低下による糸球体過剰濾過が生じるとされており、近位尿細管での Na/Cl 再吸収を阻害することで腎症発症が抑制される可能性がある。本研究により、直接的な糖尿病性腎症治療が開拓されるだけでなく、腎症発症の新たな危険因子の解明も期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では、ACZ による糖尿病性腎症発症抑制効果を中心に検討を行った。

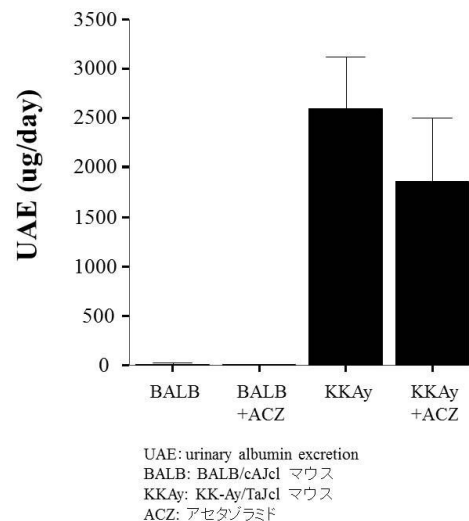
- (1) ACZ による糖尿病性腎症発症抑制の検討。  
2 型糖尿病モデルマウス (KK-Ay) を用いて、ACZ を持続的に投与し腎症発症への影響について検討した。
- (2) 作用点の異なる利尿薬による検討。  
ループ利尿薬、サイアザイド系利尿薬を用いて、ACZ との効果と比較検討した。理論上サイアザイド系利尿薬は緻密斑への Na/Cl 濃度は変化させないため、薬剤間の比較をすることにより、薬剤特異的な効果であるかを検討。
- (3) SGLT2 阻害薬による検討。  
SGLT2 阻害薬が糸球体過剰濾過抑制を介し

た腎保護作用を有するかを検討するため、KK-Ay マウスに SGLT2 阻害薬カナグリフロジン投与し、腎症発症への影響を検討した。

### 4. 研究成果

DM マウス (KK-Ay/TaJcl: 型糖尿病モデル) で 12 週齢まで観察すると、コントロールマウス (BALB/cAJcl) と比較して著明な血糖値の上昇がみられた。また尿糖および尿量も著明に増加した。またコントロールマウスと比較してクレアチンクレアランス (Ccr) も増加しており、アルブミン尿も大量に認められていた。さらに長期に観察を続けたところ、14 週での DM マウスでさらに著明なアルブミン尿の増加が認められた。

DM マウスにアセタゾラミドを餌中に混ぜて持続投与した群では 12 週までのアルブミン尿抑制効果 (図 1) および DM マウスで認められていたレニン活性の上昇が抑制されており、tubuloglomerular feedback (TGF) の抑制解除による早期糖尿病性腎症の発症抑制効果が示唆された。



(図1)アセタゾラミドによるアルブミン尿抑制効果

ループ利尿薬、サイアザイド系利尿薬では同様の効果が認められず、アセタゾラミドに特異的な効果であることが示唆された。長期観察では 14 週齢で体重はコントロール群と比較して差はなかったものの、尿量の低下や Ccr の低下が認められた。長期観察ではアセタゾラミド長期投与で脱水傾向になった可能性も考えられた。薬剤の濃度調整も含め、さらなる検討が必要と考えられた。

またカナグリフロジン投与による糖尿病性腎症における腎保護効果の検討については薬剤を特殊飼料として作成し、KK-Ay/TaJcl マウスと BALB/cAJcl マウスに 1

2週齢まで投与した。メタボリックケージを用いて尿サンプルを保存し、また12週齢時に血液および腎組織のサンプルを抽出した。今後詳細を検討予定である。最近 SGLT-2 阻害薬の糸球体過剰濾過抑制効果がアセタゾラミドと同様の機序で得られるという報告も出ており、今後の本研究での成果が期待される。

#### 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)

1. Mukoyama M, Nakayama Y, Adachi M. Renal angioplasty for atherosclerotic renal artery stenosis revisited - efficacy and safety of renal artery stenting in the J-RAS study. *Circ J*. 79(2):295-296, 2015 doi: 10.1253/circj.CJ-14-1361. 査読有

2. Izumi Y, Nakayama Y, Onoue T, Inoue H, Mukoyama M. Renal tubular acidosis complicated with hyponatremia due to cortisol insufficiency. *Oxf Med Case Reports*. 2015 (11):360-363, 2015. 査読有 doi: 10.1093/omcr/omv063.

3. Shiraishi N, Kitamura K, Hayata M, Ogata T, Tajiri-Okamura K, Nakayama Y, Kohda Y, Tomita K, Mukoyama M. Low-density lipoprotein apheresis for proteinuria in lupus nephritis with intraglomerular foam cells containing cholesterol crystals. *Am J Kidney Dis*. 65(3):490-300, 2015. 査読有 doi: 10.1053/j.ajkd.2014.09.028.

4. Itoh K, Izumi Y, Inoue T, Inoue H, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Yasuoka Y, Makino T, Nagaba Y, Tomita K, Kobayashi N, Kawahara K, Mukoyama M, Nonoguchi H. Expression of three isoforms of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) in the kidney and regulation by dehydration. *Biochem Biophys Res Commun*. 453(3):356-361, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.089.

5. Nagai T, Yasuoka Y, Izumi Y, Horikawa K, Kimura M, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Kohda Y, Hasuike Y, Nanami M, Kuragano T, Kobayashi N, Obinata M, Tomita K, Tanoue A, Nakanishi T, Kawahara K, Nonoguchi H. Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. *Biochem Biophys Res Commun*. 449(2):222-228, 2014. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.014.

〔学会発表〕(計 37 件)

アメリカ腎臓学会 Renal Week 2016

シカゴ, 米国 (2016年11月15日~20日)

1. Hiroshi Nonoguchi, Yuichiro Izumi, Yukiko Yasuoka, Yushi Nakayama, Takanori Nagai, Masayoshi Nanami, Takeshi Nakanishi, Masashi Mukoyama, Katsumasa Kawahara. Aldosterone and vasopressin are erythropoietic hormones.

2. Yushi Nakayama, Masataka Adachi, Hideki Inoue, Takashige Kuwabara, Yuichiro Izumi, Yutaka Kakizoe, Masashi Mukoyama. The impact of the Kumamoto earthquake on renal parameters in CKD patients.

3. Yuichiro Izumi, Koji Eguchi, Naomi Matsuo, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Hiroshi Nonoguchi, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Masashi Mukoyama. In silico and in vitro characterization of low pH-induced genes in intercalated cells of the collecting ducts.

4. Koji Eguchi, Yuichiro Izumi, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Naomi Matsuo, Terumasa Nakagawa, Masashi Mukoyama. Involvement of aldosterone and the ubiquitin-proteasome system in the regulation of expression of an ammonia transporter, rhesus blood group C glycoprotein, in the intercalated cells.

5. Daisuke Fujimoto, Masataka Adachi, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Yuichiro Izumi, Teruhiko Mizumoto, Masashi Mukoyama. Efficacy of continuous erythropoietin receptor activator (CERA) on end-stage renal disease patients with renal anemia before and after peritoneal dialysis (PD) initiation.

第26回国際高血圧学会総会

ソウル, 韓国 (2016年9月24日~29日)

6. Yuichiro Izumi, Koji Eguchi, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Hiroshi Nonoguchi, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Masashi Mukoyama. Computational analysis of the effects of aldosterone and metabolic acidosis on gene expressions in renal tubules.

7. Koji Eguchi, Yuichiro Izumi, Terumasa

Nakagawa, Shuro, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Masashi Mukoyama. Aldosterone modulates expression of an acid-secreting ammonia transporter Rhcg in intercalated cells of the collecting ducts.

第 59 回日本腎臓学会学術総会

パシフィコ横浜, 神奈川 (2016 年 6 月 17 日 ~ 19 日)

8. 江口剛人, 泉裕一郎, 中川輝彦, 中山裕史, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 向山政志. 集合尿細管間細胞におけるアルドステロンを介した Rhcg 調節機序についての検討
9. 泉裕一郎, 江口剛人, 中山裕史, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 野々口博史, 向山政志. 低 pH 刺激による間細胞内遺伝子発現変動の TSS-Seq を用いた網羅的解析

第 46 回日本腎臓学会西部学術大会

シーガイアコンベンションセンター, 宮崎 (2016 年 10 月 14 日 ~ 15 日)

10. 秦雄介, 藤本大介, 中川輝政, 井上秀樹, 實吉拓, 安達政隆, 中山裕史, 向山政志. 糖尿病性腎症様の糸球体結節性病変を呈し、喫煙の関与が疑われた 1 例
11. 井上秀樹, 松尾尚美, 石田秀太, 栗原孝成, 柿添豊, 安達政隆, 中山裕史, 江田幸政, 向山政志. 膜性腎症と診断した後に、ホジキンリンパ腫を発症した一例

第 61 回 日本透析医学会学術総会

大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル, 大阪 (2016 年 6 月 9 日 ~ 12 日)

12. 深川三希子, 山崎朋子, 井上秀樹, 小田晶, 柿添豊, 栗原孝成, 安達政隆, 中山裕史, 向山政志. 当院における腹膜透析関連腹膜炎の起因菌検出率に関する検討
13. 山本紗友梨, 岡村景子, 井上秀樹, 濱崎剛, 小田晶, 柿添豊, 栗原孝成, 實吉拓, 安達政隆, 江田幸政, 西一彦, 中山裕史, 向山政志. 早期の血漿交換併用療法により腎死を回避し得た抗 GBM 抗体型糸球体腎炎の一例
14. 西口佳彦, 岡村景子, 柿添豊, 栗原孝成, 井上秀樹, 實吉拓, 安達政隆, 中山裕史, 向山政志. 透析導入後に原発性アルドステロン症と診断し副腎摘出術を施行した一例

15. 藤本大介, 秦雄介, 安達政隆, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 實吉拓, 中山裕史, 向山政志. 腹膜透析導入期の腎性貧血管理における CERA (持続型赤血球造血刺激因子製剤) の有用性の検討

16. 秦雄介, 藤本大介, 安達政隆, 柿添豊, 栗原孝成, 井上秀樹, 實吉拓, 中山裕史, 向山政志. 保存期腎不全から血液透析導入期の腎性貧血管理における CERA (持続型赤血球造血刺激因子製剤) の有用性

17. 平松晶子, 藤本大介, 井上秀樹, 實吉拓, 安達政隆, 中山裕史, 加藤秀樹, 宮田敏行, 南学正臣, 向山政志. 出産後非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) を発症し、血漿交換にて改善を認めた一例

第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会  
東京コンベンションホール, 東京 (2016 年 12 月 16 日 ~ 17 日)

18. 江口剛人, 泉裕一郎, 中山裕史, 井上秀樹, 松尾尚美, 柿添豊, 栗原孝成, 中川輝政, 向山政志. 腎集合尿細管間細胞におけるアルドステロンとユビキチン - プロテアソーム系を介した Rhcg 調節機序についての検討

第 39 回日本高血圧学会総会

仙台国際センター・新展示施設, 宮城 (2016 年 9 月 30 日 ~ 10 月 2 日)

19. 江口剛人, 泉裕一郎, 中川輝政, 中山裕史, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 向山政志. アルドステロンによる腎集合尿細管間細胞における Rhcg の調節機序の検討

アメリカ腎臓学会 Renal Week 2015

サンディエゴ, 米国 (2015 年 11 月 3 日 ~ 8 日)

20. Yoshihiko Nishiguchi, Hideki Inoue, Tomoaki Onoue, Yutaka Kakizoe, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, Taku Miyoshi, Masataka Adachi, Yushi Nakayama, Yukimasa Koda, Masashi Mukoyama. A case of proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits exhibiting marked nephrotic syndrome who responded well to the renin-angiotensin system blockade alone.

21. Yuichiro Izumi, Yukiko Yasuoka, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Masashi Mukoyama, Katsumasa Kawahara, Hiroshi Nonoguchi. HIF1a and HIF2-Induced Erythropoietin Production Along the Nephron.

22. Yuichiro Izumi, Koji Eguchi, Terumasa Nakagawa, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Hiroshi Nonoguchi, Masashi Mukoyama. TSS-Seq Analysis of Low pH-Induced Gene Transcripts in the Intercalated Cells of the Collecting Ducts.

23. Koji Eguchi, Yuichiro Izumi, Terumasa Nakagawa, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Masashi Mukoyama. Regulation of Rhcg by Aldosterone in Intercalated Cells of the Collecting Ducts.

国際腎臓学会 World Congress of Nephrology 2015  
ケープタウン, 南アフリカ共和国 (2015年3月14日~17日)

24. Takashige Kuwabara, Kiyoshi Mori, Hideki Yokoi, Masato Kasahara, Kazuwa Nakao, Motoko Yanagita, Masashi Mukoyama. Kidney Myeloid-related Protein 8 Expression predicts renal prognosis in obese or type 2 diabetic patients.

25. Manabu Hayata, Teruhiko Mizumoto, Yoshikazu Miyasato, Kohei Uchimura, Yutaka Kakizoe, Sakai Yoshiki, Masashi Mukoyama, Kenichiro Kitamura. Role of serine protease in podocyte injury and apoptosis in a rat model of metabolic syndrome.

第58回日本腎臓学会学術総会  
名古屋国際会議場, 愛知 (2015年6月5日~7日)

26. 泉裕一郎, 安岡有紀子, 中山裕史, 井上秀樹, 向山政志, 河原克雅, 野々口博史. 腎尿細管における hypoxia-inducible factor 2 の発現の検討

27. 泉裕一郎, 黒木菜見人, 中山裕史, 井上秀樹, 尾上友朗, 中川輝政, 水本輝彦, 早田学, 柿添豊, 桑原孝成, 向山政志. 間在細胞における酸塩基平衡関連遺伝子群の発現に対するアルドステロンと pH 変化の効果

第45回日本腎臓学会西部学術大会  
金沢歌劇座・石川県社会福祉会館, 金沢 (2015年10月23日~24日)

28. 西口佳彦, 尾上友朗, 桑原孝成, 井上秀樹, 實吉拓, 安達政隆, 中山裕史, 江田幸政, 向山政志. ネフローゼ症候群を呈し腎生検により proliferative

glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits (PGNMID) と診断した一例

第60回日本透析医学会学術総会  
パシフィコ横浜, 神奈川 (2015年6月26日~28日)

29. 泉裕一郎, 小野真, 山口春奈, 松永愛子, 井上秀樹, 中山裕史, 向山政志. ガリウムシンチグラフィがニューモシスチス肺炎の診断と治療効果判定に有用であった血液透析患者の一例

第88回日本内分泌学会学術総会  
ホテルニューオータニ東京, 東京 (2015年4月23日~25日)

30. 泉裕一郎, 中山裕史, 尾上友朗, 井上秀樹, 桑原孝成, 野々口博史, 北村健一郎, 向山政志. 低コルチゾール血症により SIADH 様の低 Na 血症を呈し腎尿細管性アシドーシスを合併した一例

アメリカ腎臓学会 Renal Week 2014  
フィラデルフィア, 米国 (2014年11月11日~16日)

31. Yuichiro Izumi, Yukiko Yasuoka, Takanori Nagai, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Takeshi Nakanishi, Masashi Mukoyama, Katsumasa Kawahara, Hiroshi Nonoguchi. Erythropoietin Production by the Nephron.

32. Yuichiro Izumi, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Tomoaki Onoue, Hiroshi Nonoguchi, Masashi Mukoyama. Computational Analysis of the Effect of Aldosterone and Low pH on Gene Expression and Cell Function.

33. Tomoaki Onoue, Hideki Inoue, Yuichiro Izumi, Yushi Nakayama, Kenichiro Kitamura, Masashi Mukoyama. Successful Chemotherapy against Invasive Hydatidiform Mole in a Patient with ESRD.

34. Yushi Nakayama, Yuichiro Izumi, Hideki Inoue, Tomoaki Onoue, Hiroshi Nonoguchi, Masashi Mukoyama. New Index Adjusted U-Pro1.0 Is Useful to Estimate Urinary Protein by Eliminating the Effect of Protein Intake.

第57回日本腎臓学会学術総会  
パシフィコ横浜, 神奈川 (2014年7月4日~6日)

35. 桑原孝成, 森潔, 笠原正登, 中尾一和, 柳田素子, 向山政志. 生活習慣病とCKDの相互関連 糖尿病性腎症進展に果たす自然炎症の役割とその活性化機序 脂

日本腎臓学会西部  
第44回日本腎臓学会西部学術大会  
神戸国際会議場・神戸商工会議所，神奈川  
(2014年10月3日～4日)

36. 橋本美悠紀，中川輝政，柿添豊，井上  
秀樹，實吉拓，安達政隆，中山裕史，  
北村健一郎，向山政志。30年後に再発し  
た微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)  
の一例

第18回日本心血管内分泌代謝学会学術総会  
横浜市開港記念会館，神奈川 (2014年11月  
21日～22日)

37. 泉裕一郎，安岡有紀子，永井孝憲，中  
山裕史，井上秀樹，中西健，向山政志，  
河原克雅，野々口博史。腎尿細管にお  
けるエリスロポエチンの産生

〔図書〕(計 3 件)

1. 中山裕史 他，腎・高血圧の最新治療，CKD  
におけるインクレチン関連薬の可能性  
，p114-119，フジメディカル出版，2016年

2. 中山裕史 他(加藤明彦編著)，いまさら訊  
けない！透析患者薬剤の考えかた、使い方  
Q&A、糖尿病・代謝・栄養、透析患者にお  
ける経口血糖降下薬の適応と使いかたを教  
えてください。p202-207，中外医学社，2015年

3. 中山裕史、向山政志，臨床高血圧，2型糖尿  
病患者における降圧療法と血糖管理療法後  
の観察研究，p62-64，メディカルレビュー社，  
2015年

〔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

熊本大学大学院生命科学研究部 腎臓内科学  
分野/熊本大学医学部附属病院 腎臓内科

<http://www.kumadai-nephrology.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 裕史 (NAKAYAMA Yushi)

熊本大学・医学部附属病院腎臓内科・講師  
研究者番号：00363531

### (2) 研究分担者

北村 健一郎 (KITAMURA Kenichiro)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：10304990

向山 政志 (MUKOYAMA Masashi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし