

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <概要>

所 属	東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科
氏 名	川浪大治
研究テーマ	Rho-kinase による糖尿病腎症進展制御機構の解明

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを1ページにまとめてください。(図表、写真などの貼付を含む)

【研究目的】

糖尿病腎症は末期腎不全の原因であるのみならず心血管疾患の危険因子であり、成因の解明が急務の課題である。糖尿病腎症の成因は複合的であり、様々な細胞内シグナルが関与する。初期にはポドサイト異常がみられ、これが糸球体硬化の引き金となることが知られている。これまでの研究結果から、ポドサイトのアポトーシスには Notch シグナルの活性化が関与することが明らかになっている。しかし、Notch シグナルを制御する因子の詳細は明らかになっていない。我々はこの経路における Rho-kinase の役割を明らかにするため、検討を行った。

【方法と結果】

TGF- β で培養ポドサイトを刺激したところ Rho および Rho-kinase が活性化および Notch リガンドである Jag1 mRNA の発現が上昇した。Rho-kinase 阻害薬である Y-27632 は TGF- β による Jag1 の発現誘導を抑制することを real-time PCR および Western blot で確認した。Rho-kinase には ROCK1 と ROCK2 の2つのアイソフォームが存在する。siRNA を用いて検討を行ったところ、ROCK2 をノックダウンした場合に Jag1 の発現が抑制された。このことから、TGF- β は ROCK2 依存性に Jag1 の発現を誘導することが明らかになった。我々は細胞内シグナルの検討を詳細に進めたところ、Smad、ERK1/2、JNK および p38MAPK が TGF- β による Jag1 の発現を制御していることが分かった。このうち、Y-27632 は Smad3 のリン酸化を抑制しないことから、ROCK は Smad 非依存性の経路で Jag1 発現を誘導することが明らかになった。また、Y-27632 は ERK1/2 と JNK のリン酸化を抑制したことから、ROCK は TGF- β による ERK1/2 および JNK、そして Notch シグナルの活性化を媒介し、ポドサイトのアポトーシスを誘導することが示された。続いて in vivo での検討を行った。db/db マウス(5週齢)に Rho-kinase 阻害薬ファスジルを 100 mg/kg にて 3週間投与した。その結果、ファスジルの投与によってアルブミン尿が抑制された。またポドサイトのマーカーである nephrin の尿中への排泄がファスジル投与群では抑制されており、ポドサイトの喪失が抑制されていることが示唆された。病理組織学的検討では、ポドサイトの effacement やアポトーシスがファスジルによって抑制されていることを確認した。db/db マウス由来のポドサイトでは Jag1 mRNA の発現レベルが亢進していたが、ファスジル投与群では抑制されていることが明らかになった。また Bax や CDKN1A といったアポトーシス関連マーカーについても db/db マウス由来のポドサイトでは発現が上昇していたが、ファスジル投与によってこれらの発現が抑制されていた。

【結論】

以上の結果から、Rho-kinase は Notch シグナルを介してポドサイトの機能調節を行い、糖尿病腎症の発症・進展に重要な役割を持つことが明らかになった。

※受賞時テーマ「ROCK によるマクロファージ機能調節機構と動脈硬化・糖尿病腎症における治療学的意義の解明」として研究を進めたが上記内容に進捗が生じたため表記のテーマに変更した

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—

研究成果報告書(追加助成) <詳細>

所 属	東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科
氏 名	川浪大治
研究テーマ	Rho-kinase による糖尿病腎症進展制御機構の解明

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【背景】

本邦において糖尿病患者数は増加の一途を辿っている。糖尿病腎症(以下、腎症)は末期腎不全のみならず心血管疾患の危険因子であり、発症機序の解明と新規治療戦略の確立が急務の課題となっている。腎症の発症・進展を制御する因子の同定とその機能解析はこの課題に新たな選択肢をもたらす可能性がある。我々は低分子量 G タンパク Rho とそのエフェクターである Rho-kinase(ROCK)が高血糖やインスリン抵抗性によって腎組織で活性化し、メサンギウム細胞において炎症や酸化ストレスを増大させ、糸球体硬化の形成を促進することを明らかにしてきた。メサンギウム細胞に加え、ポドサイトの機能異常が腎症の発症・進展に重要な役割を果たすがこのプロセスにおける ROCK の関与は解明されていない。本研究では、ROCK によるポドサイト調節機構に着目し、検討を行った。

【方法と結果】

<in vitro での検討>

はじめに、培養ポドサイトを用いて ROCK と Notch シグナルの関係を検討した。糸球体硬化の形成には増殖因子である TGF- β が重要な役割を担っている。TGF- β の下流には Notch シグナルが存在する。哺乳類では Notch には複数のリガンドが存在することが知られているが、このうち Jag1 が腎症における糸球体硬化に重要な役割を果たす。TGF- β でポドサイトを刺激したところ Rho および ROCK の活性化に伴い Notch リガンドである Jag1 の mRNA 発現レベルが上昇した。ROCK 阻害薬である Y-27632 は TGF- β による Jag1 の発現誘導を抑制した。ROCK には ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームが存在するが、Y-27632 は両方を阻害する。そこで siRNA を用いて検討を行ったところ、ROCK2 をノックダウンした場合に Jag1 の発現が抑制された。このことから、TGF- β は ROCK2 依存性に Jag1 の発現を誘導することが明らかになった。さらに ROCK を阻害することにより TGF- β で誘導されるポドサイトのアポトーシスが抑制されることを確認した。我々は細胞内シグナルの検討を詳細に進めた。各種シグナルの阻害剤を用いたところ、Smad、ERK1/2、JNK および p38MAPK が TGF- β による Jag1 の発現を制御することが分かった。その結果、ROCK は Smad 非依存性の経路で Jag1 発現を誘導することが明らかになった。また、Y-27632 は ERK1/2 と JNK のリン酸化を抑制したことから、ROCK は TGF- β による ERK1/2 および JNK、そして Notch シグナルの活性化を介し、ポドサイトのアポトーシスを誘導することが示された。

<in vivo および ex vivo での検討>

次に、糖尿病モデルを用いた検討を行った。2 型糖尿病モデルである db/db マウス(5 週齢)に ROCK 阻害薬ファスジルを 100 mg/kg にて 3 週間投与を行った。その結果、ファスジルの投与によってアルブミン尿が抑制された。またポドサイトのマーカーである nephrin の尿中への排泄がファスジル投与群では減少しており、ポドサイトの喪失がファスジルによって

抑制されていることが示唆された。病理組織学的な検討を行ったところ、ポドサイトの effacement やアポトーシスといった腎症に特徴的な所見がファスジルによって抑制されていることを確認した。db/db マウスでは糸球体での Jag1 の発現が亢進しており Notch シグナルの活性化が考えられた。しかしながら、ファスジルは Jag1 の発現亢進を抑制していた。最後に、マウスからポドサイトの初代培養を行った。db/db マウス由来のポドサイトでは Jag1 mRNA の発現レベルが亢進していたが、ファスジル投与群では抑制されていることが明らかになった。また Bax や CDKN1A といったアポトーシス関連マーカーについても db/db マウス由来のポドサイトでは発現が上昇していたが、ファスジル投与によってこれらの発現が抑制されていることが示された(図 1)。

【考察と今後の課題】

ポドサイトの機能障害は腎症の発症早期にみられる。しかしながら、ポドサイトにおける ROCK の機能についてはほとんど明らかにされていなかった。本研究では、ポドサイトにおける Notch シグナリングの活性化とそれに伴うアポトーシスに ROCK2 が関与することを明らかにした。まず、我々は TGF- β によって ROCK の活性化を介してポドサイトの Jag1 mRNA 発現が上昇することが確認した。さらに db/db マウスでも糸球体での Jag1 発現が亢進しており、ROCK 阻害薬ファスジルの投与によって抑制されることを確認した。TGF- β は Smad 依存性および Smad 非依存性の経路で下流シグナルを活性化させることが明らかにされている。今回の検討では、ROCK は Smad 非依存性に ERK と JNK が活性化させることが明らかになった。

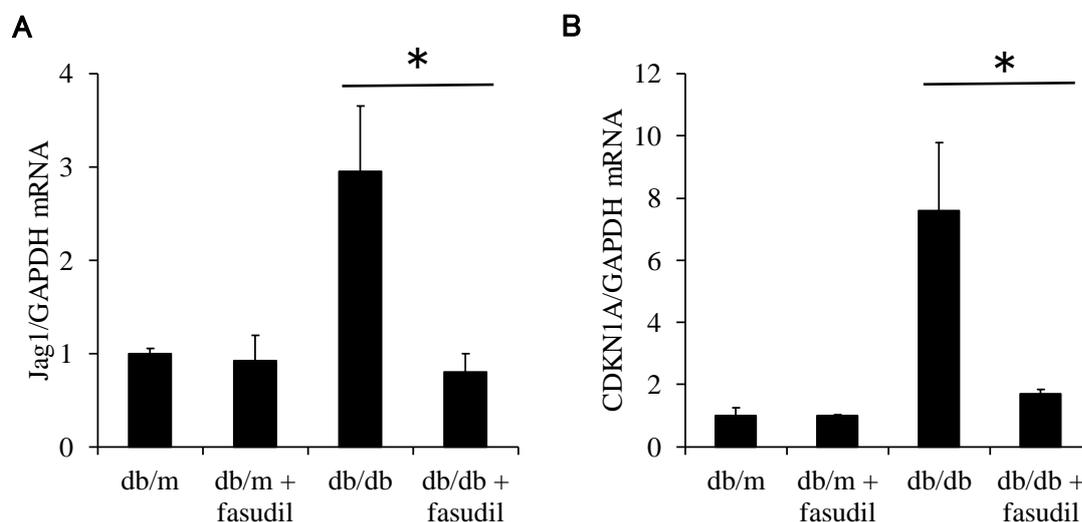


図1. db/dbマウス由来のポドサイトではJag1 (A)およびCDKN1A (B)の発現が上昇していたがファスジルによっていずれも抑制されていた。* p<0.01

メサンギウム細胞や乳がん細胞において ROCK は Smad のリン酸を制御しないことが示されており、今回の結果もこれらに矛盾しない。我々はこれまでに、メサンギウム細胞では TNF- α 刺激に伴う p38MAPK の活性化に ROCK が関与することを示してきたが、TGF- β 刺激下では ROCK は p38MAPK を制御しないことが明らかになった。これは細胞種の違いや刺激によって活性化されるシグナルが異なることに起因していると考えられた。ポドサイトにおける ERK の活性化が酸化ストレスや NF- κ B を介してアポトーシスを惹起することが知られている。JNK はアンジオテンシン II によるポドサイトのアポトーシスに重要な役割を果たす。JNK が TGF- β によって誘導されるアポトーシスにも関与することが今回、明らかになった。我々はこれまでに糖尿病ラットの腎皮質における TGF- β の発現レベルをファスジルが抑制することを示している。このことは ROCK が TGF- β と Notch シグナルのループを制御する因子であると考えられる。我々は、メサンギウム細胞においては ROCK1 と ROCK2 は明確な機能分担を示さないことを過去に報告した。しかしながら、本研究では ROCK1 ではなく ROCK2 がポドサイト機能の制御を行っていることが明らかとなった。糸球体構成細胞ごとに ROCK アイソフォームが異なる機能を有する可能性が示され、ROCK2 がポドサイトの機能調節を行い、糖尿病腎症の発症・進展に重要な役割を持つことが示された。これらの知見に基づき、ROCK2 の腎症への関与をさらに詳細に検討するため我々は ROCK2 コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った(図 2)。今後は、ポドサイト特異的に ROCK2 をノックアウトしたマウスの作製作業に着手し、腎症の発症・進展における ROCK2 機能の全容解明につとめる。

(A) Wild allele

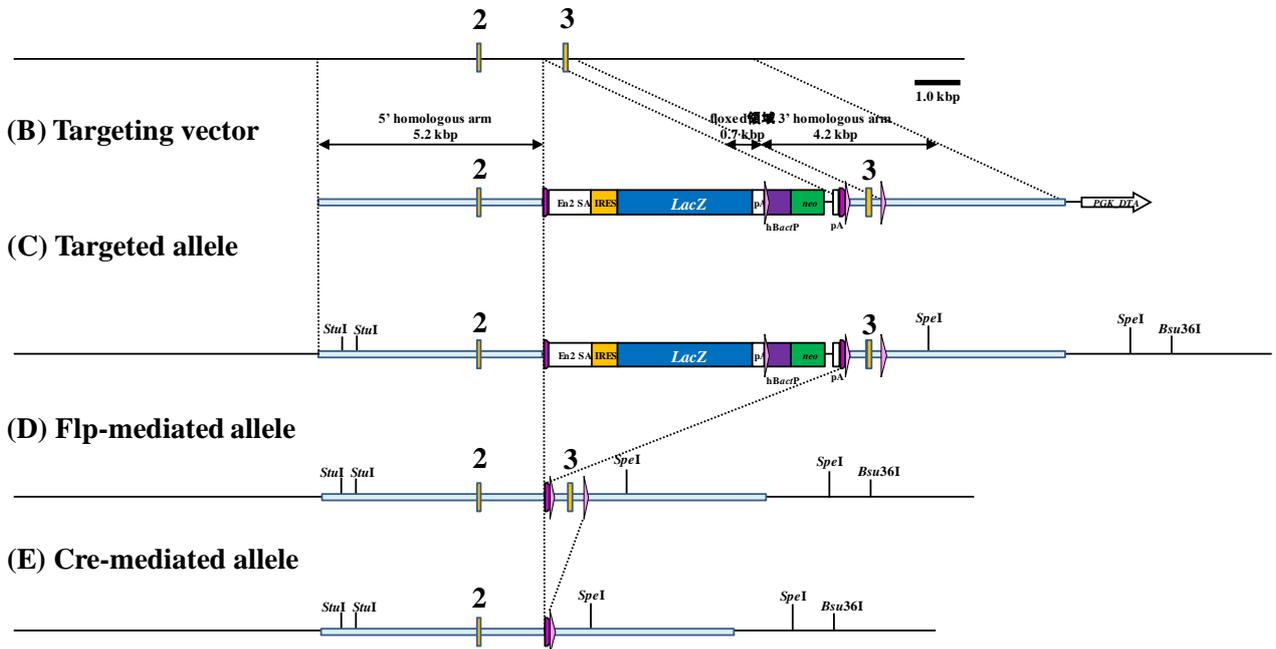


図2. ROCK2遺伝子targeting strategy
ROCK2遺伝子のexon3をCre-loxPシステムにより欠損させる。

Banyu Foundation Research Grant 2014—生活習慣病領域—
研究成果報告書(追加助成) <発表実績/予定一覧>

所	属	東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科
氏	名	川浪大治

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	<u>Daiji Kawanami</u> , Keiichiro Matoba, Kazunori Sango, Kazunori Utsunomiya. Incretin-based Therapies for Diabetic Complications: Basic Mechanisms and Clinical Evidence. <i>Int J Mol Sci</i> . 2016. 17:1223. 査読有
2	<u>Daiji Kawanami</u> , Keiichiro Matoba, Kazunori Utsunomiya. Signaling pathways in diabetic nephropathy. <i>Histol Histopathol</i> . 2016. 31:1059-1067. 査読有
3	<u>Daiji Kawanami</u> , Keiichiro Matoba, Kazunori Utsunomiya. Dyslipidemia in diabetic nephropathy. <i>Ren Replacement Ther</i> . 2016. 2:16. 査読有
4	
② <論文 PDF 添付なし>	
1	川浪大治, 宇都宮一典. 糖尿病腎症の疫学. 日本臨牀 2016; 74: 153-157. 査読なし
2	川浪大治, 宇都宮一典. Rho/Rho-kinase. 日本臨牀 2016; 74: 77-83. 査読なし
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2016 年 6 月	第 6 回米国糖尿病学会、Daiji Kawanami、Rho-kinase blockade attenuates podocyte apoptosis by inhibiting Notch signaling pathway in diabetic nephropathy
2		
3		
4		
3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	投稿準備中	Rho-kinase blockade attenuates podocyte apoptosis by inhibiting Notch signaling pathway in diabetic nephropathy
2		
3		
4		