

糖尿病性腎症における糸球体内皮細胞-上皮細胞連関の機序解明

長洲 一

川崎医科大学 腎臓・高血圧内科学

【研究の背景】

糖尿病性腎症を代表とする生活習慣病関連 CKD では、共通して血管内皮機能障害 (Endothelial cell dysfunction: ECD) が付随する。糖尿病細小血管障害(腎症も含む)及び心血管病発症の最早期病態が ECD であることは既に確立されており、アルブミン尿出現が CVD 発症と関連することからも内皮障害によってアルブミン尿が出現する蓋然性は高い。事実、申請者らはアルブミン尿出現に糸球体 ECD が関与することを明らかにしてきた¹⁻²⁾。

しかしながら多くの基礎研究から糸球体上皮細胞障害が腎不全に至る糸球体硬化病変の形成に重要であることが判明している。糸球体上皮細胞障害(特にミトコンドリアストレス、apoptosis)の結果、上皮細胞が脱落し、糸球体上皮細胞が非分裂細胞であるが故に、糸球体硬化が進行する。これらの事実から糖尿病性腎症はその進展とともに病態形成の主座が変わっていく。つまり最早期病態(アルブミン尿)には糸球体内皮障害が関与し、その後の腎不全に至る過程には、糸球体上皮障害が深く関与することが想定される。このため糸球体内皮細胞から上皮細胞への障害機序伝搬・クロストーク機序(内皮-上皮連関)が想定されるが、実態は不明である。

【目 的】

①正常状態では糸球体内皮細胞は一酸化窒素(NO)産生を介して上皮細胞内での NLRP3 Inflammasome 活性化を抑制的に制御することを証明する。②糸球体上皮細胞におけるミトコンドリア障害に Inflammasome 活性化が重要であることを証明する。③Inflammasome 活性化に糸球体上皮細胞内 Ca 濃度上昇が重要であることを In vivo で証明する。④糸球体上皮細胞内の Inflammasome 活性化抑制が糖尿病性腎症の進展を抑制しうることを証明する。上記、作業仮説の証明を目的とする。

【方 法】

In vivo 実験 1): 使用動物は WT (C57BL/6) 及び eNOS 欠損マウス (eNOSKO) を用いた。両マウスにストレプトゾトシン (STZ) を投与行い、糖尿病を誘導した。WT-Con, WT-STZ, eNOSKO-Con, eNOSKO-STZ の 4 群を作成し、腎症発症(アルブミン尿)と上皮細胞障害(糸球体病変)を検討した。さらに糸球体を単離し、糸球体内の NLRP3 inflammasome 活性化を検討した。また、single nephron GFR (SNGFR) を in vivo imaging を用いて生体内で測定した。

Ex-vivo 実験: WT より糸球体を単離し、Ex-vivo で分子機序を検討した。単離糸球体に高糖刺激を行い、NLRP3 inflammasome 関連遺伝子発現を評価した。また NOS 阻害薬である L-NAME を投与し一酸化窒素(NO)の役割を検討した。

In vivo 実験 2): eNOSKO に ASC 欠損マウスを交配させ eNOS-ASC 二重欠損マウス (eNOS-ASC-DKO) を作成した。eNOSKO および eNOS-ASC-DKO に STZ を投与した。eNOSKO-Con, eNOSKO-STZ, eNOS-ASC-DKO-Con, eNOS-ASC-DKO-STZ の 4 群を作成し、In vivo 実験 1) 同様に検討した。

【結 果】

In vivo 実験 1): 高血糖確認後、4 週の蓄尿で WT-STZ では軽微なアルブミン尿のみであったが、eNOSKO-STZ では著明に増加した。光学顕微鏡評価においては WT-STZ では硬化糸球体を認めないのに対して、eNOS-STZ は硬化糸球体が散見された。SNGFR は WT-STZ に比較し eNOS-STZ で増加していた。以上のことから、eNOSKO-STZ では残存糸球体の過剰ろ過が早期から起こることがわかった。糸球体内の NLRP3 inflammasome 関連遺伝子発現は、興味深いことに eNOS-STZ でのみ上昇を認めた。Inflammasome 活性化の責任細胞を検討するため蛍光二重染色 (ASC と Podocalyxin) を行ったところ糸球体上皮細胞で Inflammasome 活性化が起こることが示された。

Ex-vivo 実験: 単離糸球体において高糖刺激のみでは NLRP3 inflammasome 関連遺伝子の発現変化は認めなかったが、L-NAME 投与によりこれらの遺伝子発現は有意に上昇した。これらの事実から eNOS-NO 経路の破綻が上皮細胞内での Inflammasome 活性化を促すことが示された。

In vivo 実験 2): eNOS-ASC-DKO-STZ は eNOSKO-STZ に比較し有意にアルブミン尿の減少を認め、上皮細胞障害 (硬化糸球体数) は改善した。

【考 察】

本検討結果から糖尿病性腎症の進展において内皮機能障害は糸球体上皮細胞障害を促進させることがわかった。またその機序として NO による直接的な Inflammasome 活性制御機構の破綻が関与していることが Ex-vivo 実験などから想定された。しかしながら、Inflammasome 活性化部位などまだ不明な点も多くさらなる検討が必要で、現在 ASC-flox マウスを搬入し Pdocin-Cre マウスと交配により糸球体上皮細胞特異的 ASC 欠損マウスを作成している。今後は本マウスを用いてさらなる機序解明を検討予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

糖尿病性腎症の進展機序に microinflammation が関与していると考えられて久しい。本研究でその本体が Inflammasome 活性化であることが解明された。今後は治療介入のためその上流および本体をターゲットとした戦略を提示するべく検討を行なっている。特に Inflammasome 活性化に重要な因子となるミトコンドリア活性酸素を対象に抗酸化ストレス遺伝子発現の master regulator である Nrf2 活性化薬の着目しその治療介入意義に関して研究を継続している³⁻⁴⁾。これら新規治療薬は現在糖尿病性腎症に対して積極的な治療介入ができない現状を打破するものでありその意義は大きい。

【参考・引用文献】

- 1) [Nagasu H](#), Satoh M, Kidokoro K, Nishi Y, Channon KM, Sasaki T, Kashihara N. Endothelial dysfunction promotes the transition from compensatory renal hypertrophy to kidney injury after unilateral nephrectomy in mice. **Am J Physiol Renal Physiol.** 1;302:F1402-8 2012.
- 2) [Nagasu H](#), Satoh M, Kiyokage E, Kidokoro K, Toida K, Channon KM, Kanwar YS, Sasaki T, Kashihara N. Activation of endothelial NAD(P)H oxidase accelerates early glomerular injury in diabetic mice. **Lab Invest.** 96:25-36 2016.
- 3) Sogawa Y, Nagasu H, Iwase S, Ihoriya C, Itano S, Uchida A, Kidokoro K, Taniguchi S, Takahashi M, Satoh M, Sasaki T, Suzuki T, Yamamoto M, Horng T, Kashihara N. *Sci Rep.* 2017 Aug 18;7(1):8801. doi: 10.1038/s41598-017-08054-2.
- 4) Sogawa Y, Nagasu H, Itano S, Kidokoro K, Taniguchi S, Takahashi M, Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N. *PLoS One.* 2018 Oct 3;13(10):e0203823.