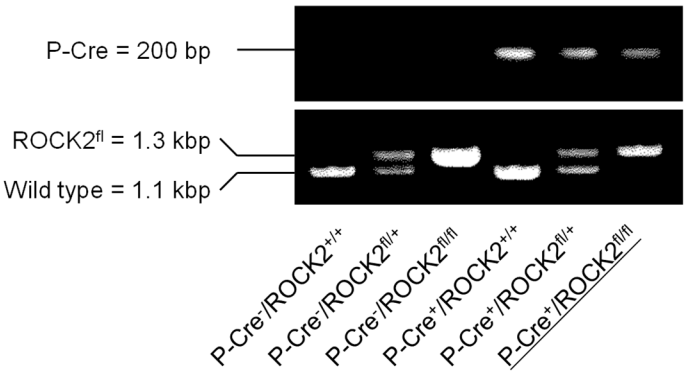
207　糖尿病腎症の病態における糸球体上皮細胞ROCK2の意義	的場　圭一郎

【目的】糖尿病腎症の病態解明は、腎不全への進展を阻止する新たな治療戦略の構築につながり、学究的な側面のみならず、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。細胞の形態や伸縮性の調整を担う Rho-kinase（ROCK）にはROCK1、ROCK2 という二種類のアイソフォームが存在する。ROCK は糖尿病腎症の発症進展に関与することが報告されているが、ROCK1 に比較して ROCK2 の意義は不明な点が多い。本研究では、腎組織 ROCK2 の糖尿病腎症における役割を明らかにする。

【方法】本研究では、分子生物学的手法を用いて腎糸球体上皮細胞における ROCK2 のアイソフォーム特異的な役割を明らかにする。ROCK2 は全身に発現し多くの作用を担っているため、腎組織での役割を解明するには臓器特異的遺伝子改変動物の入手が不可欠であり、その作製から研究を開始した。

【結果】我々が独自に樹立した ROCK2 flox マウスと、糸球体上皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する Podocin-Cre マウス（P-Cre）を交配し、糸球体上皮細胞特異的 *ROCK2* 欠損マウス（P-Cre^{+}/ROCK2$^{fl/fl}$）を新たに作出した（図）。今後、P-Cre^{+}/ROCK2$^{fl/fl}$ を用いて糖尿病腎症モデルを作製し、糸球体上皮細胞の尿中への挙動を観察する。さらに、腎組織から糸球体上皮細胞を分取し、ROCK2 のアイソフォーム特異的な機能解析を実施する。これを通して腎症の未だ解明されていない病態が明らかになり、ROCK2 阻害薬の腎症への適応拡大に向けた基盤的知見を得ることができる。

糸球体上皮細胞特異的 *ROCK2* 欠損マウスの genotyping



207. 糖尿病腎症の病態における糸球体上皮細胞 ROCK2 の意義

的場　圭一郎

東京慈恵会医科大学 内科学講座 糖尿病・代謝・内分泌内科

Key words：糖尿病腎症，Rho-kinase，ROCK2，糸球体上皮細胞

緒　言

肥満や糖尿病罹患者の増加とともに、糖尿病腎症（以下、腎症）を有する患者数は世界的規模で増加の一途を辿っている。腎症から慢性透析に移行した患者の生存率は、他の病態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（UK Prospective Diabetes Study）のサブ解析によると、腎症を有する糖尿病患者の死亡率は腎機能低下にともなって増加し、腎不全期では年間に 20%近い患者が主に心血管疾患によって死亡している［1］。腎症の病態解明は、腎不全への進展を阻止する新たな治療戦略の構築につながり、学究的な側面のみならず、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。

腎症の発症初期には、腎糸球体の過剰濾過と肥大が起こる。その後、アポトーシスによって細胞数は減少し、最終的に糸球体硬化と間質の線維化によって腎不全に至る。この血行動態変化や線維化の過程にはレニン・アンジオテンシン系が関与しており、腎症における最も重要な治療標的とされた。しかし、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬といった薬剤を用いても、腎不全への進行を阻止することは困難である。一方、細胞内 Rho-kinase（ROCK）シグナル経路が糖尿病をはじめとする生活習慣病の病態に関与していると言われている［2〜4］。

ROCK には ROCK1、ROCK2 という二つのアイソフォームが存在し、全身に広く発現している。これらのアイソフォームは全体として 65%の同一性があるが、活性化に至る分子機序は異なっており、ROCK1 は caspase-3、ROCK2 は granzyme B による切断で活性化される。全身の遺伝子欠損マウスでもそれぞれ異なる表現型を呈し、各アイソフォームは独自の機能を有することが想定される。これまでに、ROCK1 は糸球体上皮細胞のミトコンドリア機能や、糸球体内皮細胞の間葉移行を介した構造的障害に関与すると報告されている。一方、ROCK2 は特発性肺線維症や乾癬への病態関与が明らかになり、現在世界的規模で ROCK2 阻害薬 KD 025（別名 SLx-2119）の臨床試験が腎症以外の疾患を対象に進められている。しかし、腎組織 ROCK2 の生理的機能や、腎症の進展過程における病態的意義は未だ明らかにされていない。

本研究では、腎組織 ROCK2 の役割を明らかにする目的で、腎糸球体上皮細胞特異的 *ROCK2* 欠損マウスを新たに作製するとともに、糖尿病の主要な病型である 1 型および 2 型糖尿病モデルマウスにおける糸球体上皮細胞の尿中への挙動を観察する。さらに、腎組織から糸球体上皮細胞を分取し、ROCK2 のアイソフォーム特異的な機能解析を実施する。これを通して腎症の未だ解明されていない病態を明らかにし、ROCK2 阻害薬の腎症への適応拡大に向けた基盤的知見を得ることを目的とする。

方法および結果

ROCK2 は全身に発現し多くの作用を担っているため、腎組織での役割を解明するには臓器特異的遺伝子改変動物の入手が不可欠であり、その作製から研究を開始した。

我々が独自に樹立した ROCK2 flox マウスと、糸球体上皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する Podocin-Cre マウス（P-Cre）を交配し、糸球体上皮細胞特異的 *ROCK2* 欠損マウス（P-Cre^{+}/ROCK2$^{fl/fl}$）を新たに作出した（図 1）。今後、P-Cre^{+}/ROCK2$^{fl/fl}$ を用いて 1 型および 2 型糖尿病腎症モデルを作製し、糸球体上皮細胞の尿中への挙動を観察する。さらに、腎組織から糸球体上皮細胞を分取し、ROCK2 のアイソフォーム特異的な機能解析を実施する。

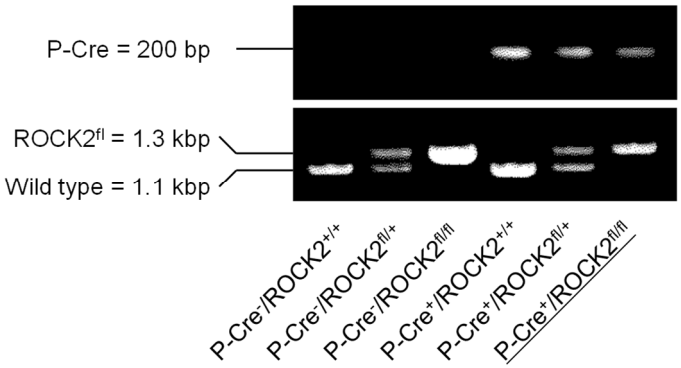


図 1. 糸球体上皮細胞特異的 *ROCK2* 欠損マウスの作製

P-Cre マウスと ROCK2$^{fl/fl}$ マウスの交配から糸球体上皮細胞特異的 *ROCK2* 欠損マウス（P-Cre^{+}/ROCK2$^{fl/fl}$）を作製した。マウス尾から調整した DNA 抽出液を用いて genotyping PCR を行った。

腎組織における ROCK2 の役割を検討するにあたり、12 週齢の雄性野生型マウスにおける ROCK2 の発現分布を蛍光免疫染色で確認した（図 2）。腎組織構成細胞の内、ROCK2 は糸球体と尿細管、血管壁に染色性を認めた。染色性は特に核内で強く認められた。ROCK2 は Nephrin と重なる染色性を認め、糸球体上皮細胞での発現が確認された。

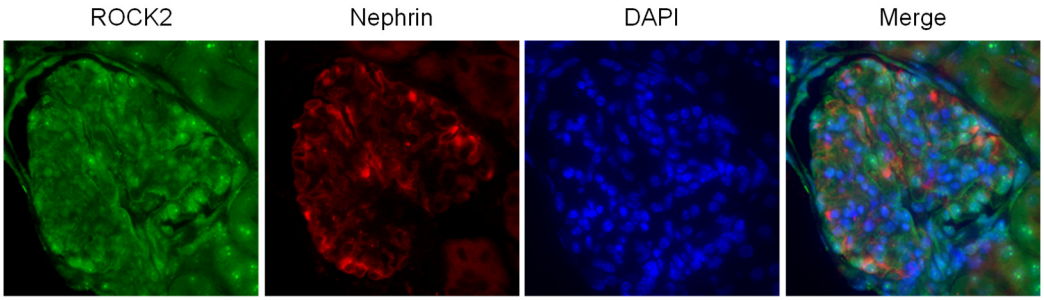


図 2. 正常腎組織での ROCK2 発現分布

12 週齢の雄性野生型マウス（C57/BL6）腎臓における ROCK2 と上皮細胞のマーカーNepherin の二重染色。ROCK2 は腎構成細胞の中で糸球体上皮細胞に強く発現が認められる。

考　察

本研究では、腎糸球体上皮細胞特異的 *ROCK2* 遺伝子改変マウスの作製に成功した。今後、マウス腎組織から単離する糸球体上皮細胞を用いた *ex vivo* 解析、および糸球体上皮細胞株を用いた *in vitro* における実験を行い、腎組織における ROCK アイソフォームの生理学的および病理学的機能分担の解明を目指す。正常マウス腎組織においては、糸球体上皮細胞に一致して ROCK2 の染色性が認められた。培養糸球体上皮細胞を用いた我々の検討では、ROCK2 が Notch シグナルを介した細胞死に関与することを報告しており［5］、糖尿病腎症の病態への関与が強く示唆される。今後の検討を通して腎症の未だ解明されていない病態が明らかになり、ROCK2 阻害薬の腎症への適応拡大に向けた基盤的知見を得ることができると考えている。以上のことから、次のような臨床へのフィードバックと発展性が期待される。

糖尿病腎症から慢性透析に至る患者数は世界的規模で増加しているが、現在病態にアプローチする有効な治療法は存在せず、高血糖や高血圧、脂質異常などのリスクファクター管理のみが行われている。本研究によって ROCK2 が腎症のカギを握る因子であることが明らかになれば、今後 ROCK2 を標的とした新たな治療戦略の構築につながる可能性がある。

ROCK2 は特発性肺線維症や乾癬、移植片対宿主病といった腎症以外の疾患への病態関与が示されており［6，7］、経口 ROCK2 阻害薬 KD 025（別名 SLx-2119）の Phase Ⅱ臨床試験が現在進行している。本研究から得られる成果は、今後 ROCK2 阻害薬の腎症への臨床応用・適応拡大へ向けた有力な基礎的知見となる。ROCK1 と ROCK2 の両者を同等に阻害する塩酸ファスジルは、クモ膜下出血後の脳血管攣縮を抑制する注射薬剤として、日本と中国においてすでに臨床応用されている。同薬剤は長らく臨床の場で用いられているが、重篤な副作用は認められていない。これまで ROCK 阻害薬がヒトに対して安全に使用されてきた実績からも、ROCK2 は腎症への臨床応用を視野に入れた際に、現実的な分子標的であると考えられる。腎組織 ROCK2 の意義を明らかにする本研究は、腎症のこれまでの治療指針にブレイクスルーを起こし、糖尿病患者の生命予後改善や QOL 拡大に多大な貢献をもたらす可能性がある。

また、本研究が完遂されることで腎糸球体構成細胞における ROCK2 を介した新たなシグナル伝達経路が明らかになる。その結果、腎症のみならず膜性腎症や微小変化型ネフローゼ症候群など、他の腎疾患に対する病態理解や創薬に新たな道を拓く可能性も期待できる。Rho／ROCK シグナルは腎症以外にも、糖尿病網膜症［8］や糖尿病神経障害［9］、動脈硬化症［10］といった他の糖尿病血管合併症の進展や、これら合併症の進展を左右する肥満の病態にも関与している。本実験の成果は、肥満やインスリン抵抗性を基盤病態として発症する他の生活習慣病についても、その疾患研究の推進に大きな足掛かりとなる。

共同研究者・謝辞

本研究にご支援をいただきました上原記念生命科学財団に感謝申し上げます。

文　献

1） Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR; UKPDS GROUP. Kidney Int. 2003; 63: 225-32. PMID: 12472787 DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00712.x

2） 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-κB RelA/p65 and M-CSF expression via p38 MAPK in mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2014; 307: F571-80. PMID: 25007875 DOI: 10.1152/ajprenal.00113.2014

3） 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 1α. Kidney Int. 2013; 84: 545-54. PMID: 23615507 DOI: 10.1038/ki.2013.130

4） Matoba K, Kawanami D, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K. Rho-kinase mediates TNF-α-induced MCP-1 expression via p38 MAPK signaling pathway in mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 402: 725-30. PMID: 20977889 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.10.093

5） Matoba K, Kawanami D, Nagai Y, Takeda Y, Akamine T, Ishizawa S, Kanazawa Y, Yokota T, Utsunomiya K. Rho-Kinase Blockade Attenuates Podocyte Apoptosis by Inhibiting the Notch Signaling Pathway in Diabetic Nephropathy. Int J Mol Sci. 2017; 18. pii: E1795. PMID: 28820432 DOI: 10.3390/ijms18081795

6） Zanin-Zhorov A, Weiss JM, Trzeciak A, Chen W, Zhang J, Nyuydzefe MS, Arencibia C, Polimera S, Schueller O, Fuentes-Duculan J, Bonifacio KM, Kunjravia N, Cueto I, Soung J, Fleischmann RM, Kivitz A, Lebwohl M, Nunez M, Woodson J, Smith SL, West RF, Berger M, Krueger JG, Ryan JL, Waksal SD. Cutting Edge: Selective Oral ROCK2 Inhibitor Reduces Clinical Scores in Patients with Psoriasis Vulgaris and Normalizes Skin Pathology via Concurrent Regulation of IL-17 and IL-10. J Immunol. 2017; 198: 3809-3814. PMID: 28389592 DOI: 10.4049/jimmunol.1602142

7) Flynn R, Paz K, Du J, Reichenbach DK, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Vulic A, Luznik L, MacDonald KK, Hill GR, Nyuydzefe MS, Weiss JM, Chen W, Trzeciak A, Serody JS, Aguilar EG, Murphy WJ, Maillard I, Munn D, Koreth J, Cutler CS, Antin JH, Ritz J, Waksal SD, Zanin-Zhorov A, Blazar BR. Targeted Rho-associated kinase 2 inhibition suppresses murine and human chronic GVHD through a Stat3-dependent mechanism. Blood. 2016; 127: 2144-54. PMID: 26983850 DOI: 10.1182/blood-2015-10-678706

8) Yokota T, Utsunomiya K, Taniguchi K, Gojo A, Kurata H, Tajima N. Involvement of the Rho/Rho kinase signaling pathway in platelet-derived growth factor BB-induced vascular endothelial growth factor expression in diabetic rat retina. Jpn J Ophthalmol. 2007; 51: 424-30. PMID: 18158592 DOI: 10.1007/s10384-007-0471-0

9) 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. PMID: 23337773 DOI: 10.1016/j.expneurol.2013.01.012

10) 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. PMID: 23665024 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.091