

第 37 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

シンポジウム

疾患モデル動物：病態解明と創薬研究における有用性と限界を知る

糖尿病性腎症

Diabetic nephropathy

仲川 孝彦

Takahiko NAKAGAWA

糖尿病性腎症モデル動物の現状とその問題点

1. はじめに

糖尿病性腎症の病態解明や新規創薬探索のためには、良い動物モデルが必要とされる。一般的には、ストレプトゾトシン誘導糖尿病マウスや db/db マウスなどの糖尿病を有する動物を用いて糖尿病性腎症の病態解明が試みられている。しかし、これらのモデルにおける腎病変は軽微であり、われわれが臨床的に経験する糖尿病性腎症のモデルとしては満足できるものではない。ではどのようなモデルが良いモデルなのだろうか。やはりメサンギウム融解や結節性病変などの糖尿病性腎症に特徴的な腎組織病変を有し、高度蛋白尿を呈する動物が理想とされるモデルであろう。そのようなモデルにおける病態解析により糖尿病性腎症の病態に対する理解が進み、そしてその先にある新規創薬につながることを期待されている。しかしながら、そのような典型的なパターンを呈するモデルのみで糖尿病性腎症を理解できると考えてよいのだろうか。今回はそのことを少し考えてみたい。

2. 糖尿病性腎症の臨床的診断について

そもそも糖尿病性腎症とはどのような疾患なのであろうか。糖尿病の発症後に病的アルブミン尿が出現すれば、概して糖尿病誘導性に腎臓が障害されたと考えられる。特に、ほかの腎疾患の存在が否定され、網膜症などの糖尿病

性合併症が存在すれば、臨床的には糖尿病性腎症と診断される。つまり、現在の臨床では、入り口(糖尿病)と出口(アルブミン尿)のみで糖尿病性腎症とされているのが現状である。現在の慣習では、糖尿病性腎症に対して積極的に腎生検は施行されないのが現状である。実際にはどのような組織病変が進行しているのかは不明である。したがってこの時点でわれわれにできることは、腎組織のなかで糖尿病誘導性の病態や病変が進行していると信じることのみである。具体的には、メサンギウム融解や結節性病変などの糖尿病性腎症に特徴的な病変が、腎組織のなかで起こっているとわれわれは想像しているのである。しかしながら、実際にそのような想像通りのことが腎臓内部で起こっているのだろうか。あるいは、すべての糖尿病性腎症はこの典型的なパターンの組織障害で説明されるのであろうか。

3. 臨床的糖尿病性腎症の多様性を考える

糖尿病性腎症の多様な臨床像を考えるうえで、まずは REENAL study を取り上げてみたい。これは顕性糖尿病性腎症に対するロサルタンの治療効果を検討した有名なスタディである。このスタディにおいて結論づけられたことは、ロサルタンが顕性糖尿病性腎症の進展を抑制しうる、ということであった¹⁾。つまり、顕性糖尿病性腎症の進展にレニン・アンジオテンシン系が関与しているということを示している。しかしながら、その結果を注意深くみると、統計学的有意差をもって示されたその保護効果は、残念ながら印象的であるとは言い難い。具体的にはロサルタンの腎臓保護効果は、プラセボ群に比し蛋白尿を 35% 減少させたにすぎず、また末期腎不全への移行を 28% 減少さ

せたにすぎないのである^{2,3)}。一方、臨床現場においてはレニン・アンジオテンシン阻害薬が有効な患者とそうでない患者にしばしば遭遇する。つまり、糖尿病性腎症にもレニン・アンジオテンシン依存性の病態とそうでない病態が存在すると考えられるのではないだろうか。そしてこれらの病態では、同じ腎組織病変が関与するとは考えにくいのではないだろうか。

次に、アルブミン尿と腎機能との関連に関する多様性を示した報告を見てみよう。2010年のKidney Internationalの報告によるとPerkinsらは、I型糖尿病で微量アルブミン尿を発症した79例を対象として、彼らのその後の腎機能(GFR)とアルブミン尿を12年間追跡した⁴⁾。GFR 60mL/分/1.73m²以下に低下した23例の臨床経過を観察すると、少なくとも2つの経過パターンが認められたとしている。1つめは、腎機能が低下すると主に尿アルブミン排泄量も増加するというもので、比較的典型的な臨床経過をたどるものであった。一方、もう1つのパターンはGFRの低下とともに尿アルブミンの排泄量も低下するというものである。つまり、後者は腎機能の悪化にもかかわらずアルブミン尿が改善するというパターンを示すものであり、既存の概念に沿わない興味深い臨床経過を呈するものであった。さらに、同様の検討結果がMacIsaacらにより報告された。彼らはII型糖尿病患者で、かつGFR<60mL/分/1.73m²の患者の39%が正常アルブミン尿であり、微量および顕性アルブミン尿を呈する患者の割合がそれぞれ35%、26%であったことを明らかにした⁵⁾。したがってこれらの検討は、CKDステージ3以上の腎機能障害を有する糖尿病患者にはアルブミン尿を呈する症例とそうでない症例が存在し、糖尿病性腎症を一つの典型的なパターンとして考えることに無理があることを示唆するものであると考えられる。

4. 典型的糖尿病性腎症病変の発症頻度

そもそも糖尿病性腎症に特徴的とされる病変、例えば結節性病変、メサンギウム融解、糸球体毛細血管瘤に関して、過去の論文ではどのように報告されているのだろうか。Saitoらは日本人で顕性糖尿病性腎症患者(I型42例、II型285例)の腎生検結果を報告し、上記の糖尿病性腎症に特徴的病変を有する患者の割合が約2割であったことを明らかにした⁶⁾。また、Stoutらも74例のII型糖尿病で顕性腎症を有する患者の腎組織を検討し、4割に満たない患者のみがそれらの病変を呈していたと報告している⁷⁾。さらに、イタリア人II型糖尿病の早期腎症においては約3割の患者に典型的腎病変を認めたことが報告されている⁸⁾。これらの報告を見ると、たしかに結節性病変などが糖尿病性腎症患

者で認められることが確認されるが、注目すべきはその頻度であろう。それは、たかだか4割に満たない糖尿病性腎症患者のみにその病変が認められるという事実であり、別の言い方をすれば、半数以上の患者ではそれらの病変が認められないということであろう。今後は、典型的な病変以外にどのような障害が糖尿病性腎症で進行しているのかといった情報を収集し、それに合致した動物モデルの作製が望まれる。

5. まとめ

糖尿病性腎症の良いモデル動物は病態解明に必要である。現在では、糖尿病性腎症に特徴的な病変、例えば結節性病変やメサンギウム融解などを発症するモデル動物の作製に労力が注がれている。たしかにそのようなモデルが利用可能となれば糖尿病性腎症の病態解明が進むことは想像に難くない。しかし、そのモデルだけが糖尿病性腎症動物であろうか。実際の臨床現場では、糖尿病性腎症の臨床経過は単一のパターンを呈するものではなく、むしろ多様性を含んでいる。したがって、腎病変も特徴的な腎病変だけではなく多様性を呈してしかるべきであろう。今後は、典型的な組織障害を呈する糖尿病性腎症モデルに加えて、別の新たなモデル作製が必要になってくるであろう。そのためには、非典型的な糖尿病性腎症腎病変がどのようなものであるのかを詳細に調べ、臨床経過を参考にしながらそれらの情報を蓄積する必要があると思われる(図)。

疾患モデルを用いた病態解析：糖尿病 eNOS ノックアウトマウスと、ポドサイトにおけるエネルギー代謝

1. はじめに

われわれは、“糖尿病性腎症の発症・進行において内皮細胞機能障害が重要な役割を担う”という仮説を立て、それを証明するために糖尿病 eNOS ノックアウト(KO)マウスを作製した⁹⁾。このマウスは高度アルブミン尿に加え、糸球体において結節性病変、メサンギウム融解、糸球体毛細血管瘤といったヒト糖尿病性腎症に特徴的な腎病変を呈する。今回、このマウスにおけるポドサイト障害と一酸化窒素(NO)との関連を解明するため、まずは培養ポドサイトのエネルギー代謝におけるNOの役割を検討した。

2. ポドサイトにおけるエネルギー代謝

1)野生型マウスのポドサイト内でのミトコンドリア分布 エネルギー代謝といえば、まずはミトコンドリアであろう。そこでマウスポドサイト内のミトコンドリア分布を検

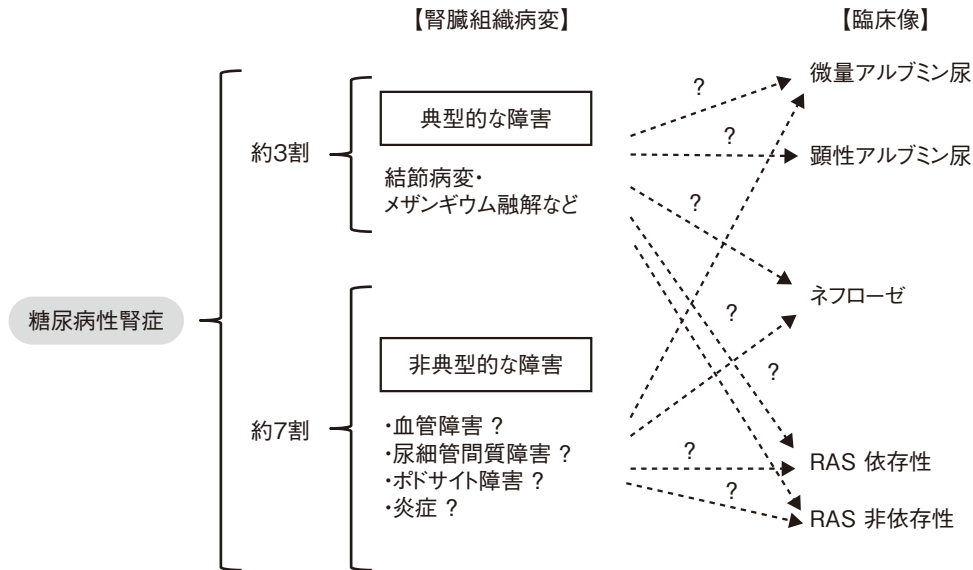


図 糖尿病性腎症の多様性
RAS：レニン・アンジオテンシン系

討した。電子顕微鏡的には、ポドサイトの細胞体や第一突起においてミトコンドリアの存在が確認されたが、足突起にはそれが認められなかった。足突起へのATP供給はどのようにされるのであろうか。ミトコンドリアで産生されたATPが何らかの機序により足突起末端まで運ばれるのか、あるいは別のエネルギー産生システムが足突起に存在するのか、現時点では不明である。

2) 培養ポドサイト：ミトコンドリアと解糖系のそれぞれの役割

そこで、培養ポドサイトにおけるミトコンドリアと解糖系のそれぞれの役割を検討した。オリゴマイシンなどでミトコンドリア呼吸を抑制しても細胞の形態には影響を認めなかったが、解糖系を抑制するとポドサイトの皮質部分に存在するlamellipodiaの消失が認められた。次に、細胞内のATPレベルを可視化できるAteamシステムを利用してポドサイトにおける細胞内ATP分布を検討した。その結果、lamellipodiaのATPはミトコンドリアではなく解糖系に依存していることが判明した。

3) ポドサイトエネルギー代謝におけるNOの効果

NOは主に内皮細胞のeNOSが活性化することにより産生される因子である。また、ポドサイト近傍には糸球体内皮細胞が位置し、それで産生されるNOがポドサイトに何らかの影響を及ぼすであろうと考えられる。そこで、ポドサイトエネルギー代謝におけるNOの影響を培養細胞系で検討した。その結果、NOはミトコンドリア呼吸をむしろ

抑制し、解糖系を活性化することが明らかとなった。

3. まとめ

マウスポドサイトにおいて、ミトコンドリアの存在は細胞体や第一突起では認められたが、足突起には確認されなかった。今後、足突起でのエネルギー供給源の探索が必要である。一方、培養ポドサイトのエネルギー代謝は解糖系とミトコンドリアの2つのシステムにより制御されており、特に皮質部のlamellipodiaは解糖系で制御されていることが明らかとなった。NOはポドサイトでの解糖系を活性化させることにより、lamellipodiaの制御に関与することが明らかとなった。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001; 345: 861-869.
2. Vilayur E, Harris DC. Emerging therapies for chronic kidney disease: what is their role? *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 375-383.
3. Nakagawa T. Diabetic nephropathy: Aldosterone breakthrough in patients on an ACEI. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 194-196.
4. Perkins BA, Ficociello LH, Roshan B, Warram JH, Krolewski AS. In patients with type 1 diabetes and new-onset microalbuminuria the development of advanced chronic kidney disease may not

- require progression to proteinuria. *Kidney Int* 2010 ; 77 : 57-64.
5. MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Panagiotopoulos S, Smith TJ, McNeil KJ, Jerums G. Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004 ; 27 : 195-200.
 6. Saito Y, Kida H, Takeda S, Yoshimura M, Yokoyama H, Koshino Y, Hattori N. Mesangiolytic lesions in diabetic glomeruli : its role in the formation of nodular lesions. *Kidney Int* 1988 ; 34 : 389-396.
 7. Stout LC, Kumar S, Whorton EB. Focal mesangiolytic lesions and the pathogenesis of the Kimmelstiel-Wilson nodule. *Hum Pathol* 1993 ; 24 : 77-89.
 8. Fioretto P, Mauer M, Brocco E, Velussi M, Frigato F, Muollo B, Sambataro M, Abaterusso C, Baggio B, Crepaldi G, Nosadini R. Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetologia* 1996 ; 39 : 1569-1576.
 9. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Campbell-Thompson M, Yuzawa Y, Atkinson M, Johnson RJ, Croker B. Diabetic eNOS knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007 ; 18 : 539-550.