

糖尿病モデルブタの腎組織評価及び
プロレニンワクチンの有効性の検証(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系腎臓内科学専攻

小熊 秀隆

修了年 2022 年

指導教員 阿部 雅紀

【緒言】

1. 背景

糖尿病性腎症と透析療法

2019年に行われた日本透析医学会での統計調査において、透析療法を受けている患者の原疾患で糖尿病性腎症が39.1%と最多である¹。透析療法に年間1兆6000億円の医療費がかかっていると推計されており、原疾患最多である糖尿病性腎症の治療法の確立は、学術的意義はもとより医療経済的意義としても重要である。

糖尿病性腎症の成り立ち

糖尿病性腎症の発症には多岐にわたる因子が関与しているが、高血糖に伴う代謝性因子と腎内血行動態異常を引き起こす内分泌性・血管作動性因子が大きい。高血糖に伴う代謝異常としては、ポリオール代謝異常や糖化最終産物(Advanced glycation end products: AGEs)の蓄積などが腎組織を形成している血管内皮細胞やメサンギウム細胞、糸球体上皮細胞、尿細管上皮細胞に影響し、炎症性サイトカインの産生亢進、酸化ストレスの増大を引き起こし、線維化や硬化が進む。また、糖尿病性腎症における糸球体では内分泌性・血管作動性因子としてのレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(Renin-angiotensin-aldosterone system: RAS)やカテコラミン、プロスタグランディンなどの作用で、輸入細動脈の拡張と輸出細動脈の収縮が起こり、糸球体高血圧となり過剰濾過(hyperfiltration)が起こる。そのため、血管内皮細胞障害が惹起され、マクロファージなどの細胞が浸潤し、IGF-1(Insulin-like growth factor-1)などの増殖因子が放出され、糸球体の支持組織であるメサンギウム細胞増殖やメサンギウム基質増加が引き起こされ、糸球体肥大ののち、硬化に至る²。形態学的な変化はこの糸球体における過剰濾過を反映した糸球体肥大から始まる。過剰濾過のため、クレアチニンの尿中への排泄が増加するため、血清クレアチニン値が一時的に低下する。また、尿中蛋白排泄量は増加する³。

糖尿病性腎症の腎組織像

糖尿病性腎症における糸球体病変では、硬化性病変と滲出性病変の所見を認め、硬化性病変はびまん性変化と結節性病変に分けられる⁴が、いずれもメサンギウム基質の蓄積によって起こる。また、糸球体内圧の上昇を反映した糸球体肥大(糸球体毛細血管腔の増加や糸球体径の拡大)を認める。結節性病変は、Kimmelstiel-Wilson 結節とも呼ばれ、糖尿病性腎症に最も特徴的で診断的価値が高い⁵。

HnF1 α 遺伝子改変糖尿病モデルブタ

若年発症成人型糖尿病 3 型(Maturity-onset diabetes of the young3: MODY3)の原因遺伝子である変異型ヒト *HnF1 α P291fsinsC* 遺伝子を導入した遺伝子組換え糖尿病モデルブタ(DM ブタ)が作成されている。このブタは恒常的な高血糖(>200 mg/dl)を維持し、経口糖負荷試験でも 2 時間値で血糖値 400mg/dl 程度まで上昇しており、糖尿病の特徴を示している⁶。

プロレニン

プロレニンはレニンの前駆体で、(pro)renin receptor[(P)RR]に結合し作用する。(P)RR は腎臓においては、特に緻密斑細胞⁷、メサンギウム細胞⁸、糸球体上皮細胞⁹、などに存在する。(P)RR は、RAS の調節や上皮細胞におけるオートファジーの調節に関与し、腎保護的に働いているとされる¹⁰。しかしながら、糖尿病ラットの腎臓¹¹や高血糖に暴露された腎メサンギウム細胞¹²においては、(P)RR の発現が増加することが報告されており、本来腎保護を目的としたオートファジーの強化のための発現増加であるが、一方で RAS の亢進を起し、この過剰な反応が糸球体過剰濾過や炎症、繊維化を誘発し、腎症の進行に関与していることが示唆されている。

プロレニンワクチン

科学研究費助成事業データベースでの報告¹³によると、プロレニンワクチンは、プロレニンからレニンになる際に切断される領域(prosegment 配列)に抗原性を示すワクチンで、プロレニンの作用を低下させる。2 型糖尿病モデルマウス(db/db マウス)に皮下投与したところ、糖尿病網膜症で早期に観察される神経機能低下が抑制されたとしており、糖尿病網膜症での新しい治療薬として期待されるものであるが、糖尿病性腎症に関しては十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究においては、DM ブタの腎組織の評価、血液検査や尿検査から糖尿病性腎症のモデルとして適切かを検討した。また、DM ブタを用いて、糖尿病性腎症に対してプロレニンワクチンが有効かを検討した。

【対象と方法】

研究 1：糖尿病モデルブタの腎組織学的検討

実験動物

動物実験は、全て日本大学医学部動物実験委員会の指針に従って行った(日本大学動物実験計画承認番号：AP19MED003-6)。遺伝子組み換え実験計画書の承認を得ている(2018 医 29)。

糖尿病モデルとして DM ブタを使用し、DM ブタの評価を行う正常コントロールとして正常ブタ(LWD: Landrace 種(L)、Large yorkshire 種(W)、Duroc 種(D)の三元交雑種)を用いた。

腎生検

DM ブタ(計 7 頭)を約 1 ヶ月毎に腎生検、正常ブタ (計 6 頭)にも腎生検を施行した。

腎生検は超音波ガイド下針生検で施行し、腎下極から採取した。得られた検体は光学顕微鏡(HE 染色、PAS 染色、PAM 染色、Masson Trichrome 染色)、電子顕微鏡を用いて観察した。

研究 2：糖尿病モデルブタに対するプロレニンワクチンの効果と安全性の検討

実験動物

研究 1 同様に DM ブタを使用した。

プロレニンワクチン

DM ブタは、コントロール群 (4 頭)、プロレニンワクチン群 (4 頭)の 2 群に分けて観察を行った。プロレニンワクチン群の DM ブタに対して、プロレニンワクチンを 3 回(初回、2 週後、10 週後)にわたって皮下注射で各 100 μ g 投与した。

腎生検

コントロール群(4 頭)、プロレニンワクチン群 (4 頭)に対して腎生検を約 1 か月毎に施行した。

糸球体径の計測

それぞれの群の糸球体径を比較した。糸球体径は最も径の長い部分で測定した。

研究 1・2 で共通する方法

腎組織の評価

HE 染色、PAS 染色、PAM 染色、Masson Trichrome 染色を行い、糖尿病性変化の有無を評価した。評価の際には、「糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き」¹⁴を基準にし、びまん性変化、滲出性病変、結節性病変、門部小血管増生、メサンギウム融解の項目でスコア化した。異常所見が全くなければ最小で 0 点、最大 10 点

となる。また、Sabbatini らの報告¹⁵を基に、尿細管間質傷害の定量化のために 20 領域をランダムに選び、線維化の度合いを下記の通りスコア化(尿細管間質障害指数 Tubulointerstitial injury score: TIS)した。TIS は、 $[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] \div 20$ で計算した。

0: normal appearance、1: involvement of less than 10% of the area、2: involvement of 10 to 30% of the area、3: involvement of 30 to 50% of the area、4: involvement of more than 50% of the area

統計解析

結果は平均値±標準誤差(Standard error: SE)として表記し、群内比較は Paired-t test、2 群間の比較は Mann-Whitney's U test を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。データ解析には EZR¹⁶を用いた。

【結果】

研究 1：糖尿病モデルブタの腎組織学的検討

正常ブタの腎組織は、糸球体において特記すべき異常所見は認められなかったが、DM ブタにおいては、結節性病変、びまん性変化を認め、DM ブタ、正常ブタの腎組織を「糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き」を基準とした腎組織スコアを用いて評価(図 1)したところ、正常ブタが 0 ± 0 点であるのに対し、DM ブタが 4.4 ± 0.2 点と DM ブタでのスコアが有意に高値であった($P < 0.0001$)。

電子顕微鏡では、基底膜(緻密層)の肥厚、メサンギウム細胞増殖、メサンギウム基質拡大、結節性病変を認め、糖尿病性腎症に矛盾しない所見を得た。

血清クレアチニン値の比較においては、正常ブタに比して DM ブタで有意に低値であった(1.2 ± 0.1 mg/dL vs. 0.52 ± 0.07 mg/dL, $P = 0.0002$)。尿蛋白排泄量では正常ブタと比して有意に DM ブタが高値であった(0.07 ± 0.01 g/gCr vs. 0.96 ± 0.36 g/gCr, $P = 0.049$)。

	0点	1点	2点	3点
びまん性病変	殆どない	メサンギウム拡大<毛細血管腔	=毛細血管腔	>毛細血管腔
基底膜二重化、 内膜下腔拡大	10%未満	10-25%	25-50%	50%以上
滲出性病変	なし	あり		
結節性病変	なし	あり		
門部小血管増生	なし	あり		
メサンギウム融解	なし	あり		

図 1：糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引きでの糖尿病性腎症の評価項目から引用した上記表を用いてスコア化した。

研究 2：糖尿病モデルブタに対するプロレニンワクチンの効果の検討

1. プロレニンに対する抗体価

プロレニンワクチン投与で免疫し、血中のプロレニンに対する抗体価を測定したところ、投与後速やかに抗体は産生された。

2. 腎組織スコア

プロレニンワクチン群において腎組織スコアは 4~5 点で推移しており、コントロール群と同様に、腎組織スコアは経時的な変化は認められなかった。

3. 糸球体径

コントロール群では、有意差なく経過したのに対し、プロレニンワクチン群は、1ヶ月(プロレニンワクチン投与直前)で平均 $116 \pm 4.1 \mu\text{m}$ 、2ヶ月で平均 $101.2 \pm 4 \mu\text{m}$ 、3ヶ月で平均 $107.1 \pm 2.7 \mu\text{m}$ 、4ヶ月で平均 $93.5 \pm 5.4 \mu\text{m}$ 、5ヶ月で平均 $95.6 \pm 5 \mu\text{m}$ と推移し、2ヶ月 (P=0.04)、4ヶ月(P=0.02)、5ヶ月(P=0.02)においてプロレニンワクチン投与直前のベースラインの1ヵ月と比較して糸球体径の有意な減少を認めた。

4. 尿検査・血液検査

観察期間 5ヶ月目で得られた尿蛋白排泄量の比較を行った。コントロール群では $1.0 \pm 0.4 \text{ g/gCr}$ 、プロレニンワクチン群では $0.76 \pm 0.21 \text{ g/gCr}$ で有意差はなかった(P=0.6)。

血清クレアチニン値は、1ヶ月と5ヶ月時の血清クレアチニン値の平均の比較では、プロレニンワクチン群では有意差は認めなかった(P=0.3)が、コントロール群では1ヶ

月の平均クレアチニン値が 0.65 ± 0.04 mg/dl で 5 ヶ月の平均クレアチニン値が 0.37 ± 0.07 mg/dl であり、有意に低下していた ($P=0.017$)。

5. 電子顕微鏡での比較

基底膜の観察において、5 ヶ月のコントロール群で新規に内皮下浮腫を認め、基底膜肥厚も増悪した所見を得た。プロレニンワクチン群においては、特に 1 ヶ月と 5 ヶ月で基底膜肥厚、足突起の癒合は認めるが、増悪はなかった。

6. TIS

TIS の平均値はコントロール群が 0.14 ± 0.01 でプロレニンワクチン群が 0.1 ± 0.03 であり有意差を認めなかった ($P=0.34$)。

【考察】

研究 1：糖尿病モデルブタの腎組織学的検討

正常ブタと比較して血清クレアチニン値は低値であり、尿蛋白排泄量は高値であった。血清クレアチニンが正常ブタと比して低値を示したのは、糸球体内圧が上昇し、過剰な糸球体濾過がかかっているためと考えられた。次に腎組織の評価だが、光学顕微鏡による観察では DM ブタの全ての個体でびまん性変化(メサンギウム領域の拡大)を認めた。結節性病変は全ての個体ではないが確認され、腎組織スコアも正常ブタの腎組織スコアと比較し高値を示し、糖尿病性腎症として矛盾しない所見であった。

電子顕微鏡の観察では、基底膜の肥厚が観察され、足突起の癒合も散見された。蛋白尿を認めている状況と矛盾しないと思われる。以上より、糖尿病性腎症モデルとしてこの DM ブタを使用することは可能と思われた。

研究 2：糖尿病モデルブタに対するプロレニンワクチンの効果の検討

糸球体径の比較で、コントロール群では緩徐に糸球体肥大進行による糸球体径の拡大傾向を認めた(有意差はなし)が、プロレニンワクチン群では糸球体径は有意に ($P=0.02$) 減少した。プロレニンワクチン投与により、プロレニン作用が低減し糸球体内圧が低下することで糸球体肥大が改善されたと思われる。

血清クレアチニン値の比較では、プロレニンワクチン群では有意な変化は認めなかったが、コントロール群では有意に低下した。これは、コントロール群においては、糸球体過剰濾過が解除されない状態を示唆する所見である。

電子顕微鏡の比較においても、コントロール群では新規に内皮下浮腫を認め、基底膜肥厚が増悪していたが、プロレニンワクチン群においては所見の増悪なく経過しており、これも糸球体過剰濾過の改善によるものと思われる。

プロレニンワクチン群が今回の観察中に死亡の転機をたどることはなく、体重減少などの異常を呈することで人道的エンドポイントとして安楽死を要する状況にもならなかった。また、尿蛋白の増悪は認めず、TISの評価においても増悪はなく、有害事象は認めなかった。今回観察された範囲でプロレニンワクチンによる有害事象は確認されなかったが、実臨床応用に向けてさらなる安全性の確認は必要である。

今後、プロレニンワクチンの有効性が証明され、実際の臨床で使用されるようになれば、ワクチンを半年から1年に一度皮下投与することで腎保護効果を維持することが可能になるかもしれない。これは、服薬アドヒアランスやポリファーマシーの観点からも有用と思われる。

【結語】

本研究において、DMブタは、糖尿病性腎症に矛盾しない腎病理所見が得られることがわかった。

大型動物であるブタは小型動物とは違い、針生検にて同個体で経時的な変化が観察できる。これは、介入研究を行う上で大きな意義があると思われる。

また、新しく開発されたプロレニンワクチンの有効性を検討したが、腎組織の比較において糸球体肥大の改善を認め、過剰濾過軽減による腎保護効果が期待できる可能性が示唆された。今後、さらに研究が進み、臨床に応用されることが望まれる。

【引用文献】

1. 日本透析医学会統計調査委員会. わが国の慢性透析療法の現況(2019年12月31日現在).透析会誌.2020; 12:579-632.
2. Lervang H, Jensen S, Ditzel J. Originals early glomerular hyperfiltration and the development of late nephropathy in type 1 (insulin-dependent) Diabetes Mellitus. *Diabetologia*.1988;31:723-729.
3. Abe M, Soma M. Multifunctional L/N- and L/T-type calcium channel blockers for kidney protection. *Hypertens Res*. 2015;38(12):804-806.
4. 日本人病理協会/日本腎臓学会. 腎生検病理アトラス 改訂版. 東京医学社; 2017.
5. Kimmelstiel P, Wilson C. Inter-capillary Lesions in the Glomeruli of the Kidney. *Am J Pathol*. 1936;12(1):83-98.
6. Umeyama K, Nakajima M, Yokoo T, et al. Diabetic phenotype of transgenic pigs introduced by dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1 α . *J Diabetes Complications*. 2017;31(5):796-803.
7. Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney Int*. 2006;70:641-646.
8. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109(11):1417-1427.
9. Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, et al. The (pro)renin receptor and the kidney. *Semin Nephrol*. 2007;27(5):524-528.
10. Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, et al. Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:2203-2212.
11. Siragy HM, Huang J. Renal (pro)renin receptor upregulation in diabetic rats through enhanced angiotensin AT 1 receptor and NADPH oxidase activity. *Exp Physiol*. 2008;93(5):709-714.
12. Huang J, Siragy HM. Glucose promotes the production of interleukine-1 β and cyclooxygenase-2 in mesangial cells via enhanced (pro)renin receptor expression. *Endocrinology*. 2009;150(12):5557-5565.
13. <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-19K21358/>.
14. 研究班糖尿病性腎症ならびに腎硬化症の診療水準向上と重症化防止にむけた調査・研究研究班. 糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き. (東京医学社; 2015)
15. Sabbatini M, Vitaioli L, Baldoni E, Amenta F. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;294(3):948-954.
16. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(3):452-458.