

# ROCK シグナルによる腎糸球体システム障害の統合的理解

東京慈恵会医科大学内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科

的場 圭一郎

## [I] 背景

糖尿病性腎症から慢性透析に移行した患者の生命予後は著しく不良である。レニン・アンジオテンシン系阻害薬やナトリウム・グルコース共役輸送体2 (SGLT2) 阻害薬を用いても、糖尿病性腎症の進行や透析導入を完全に抑制することは未だ不可能であり、政府の「経済財政運営と改革の基本方針」においても、糖尿病と慢性腎臓病の重症化予防に重点的に取り組む方針が明示されている。

低分子量GTP結合蛋白Rhoの標的分子であるRho-kinase (ROCK) は、細胞形態や伸縮性を制御するセリン・スレオニンキナーゼである。我々は、糖尿病のマウスとヒト腎組織で活性化されるROCKシグナルに着目し、遺伝子欠損や薬剤によるROCKシグナルの阻害が糖尿病性腎症の進展を抑制することを世界に先がけて報告した (Matoba K. *Kidney Int.* 2013)。さらに、ROCKアイソフォームに対する治療的アプローチが、腎構成細胞のエネルギー代謝改善に有効であることを見出した (Nagai Y, Matoba K. *Kidney Int.* 2022; Matoba K. *Commun Biol.* 2022)。

一方、糖尿病性腎症の病態首座である腎糸球体は多種多様な細胞種で構成されているが、技術的な問題から、糸球体を一つの機能単位として捉えた際にROCKの果たす役割は不明であった。本研究ではROCK1、ROCK2両アイソフォームを腎特異的に欠損させたマウスを独自に作製し、以下の目的を達成する。本研究は、ROCKを標的とした糖尿病性腎症の新たな治療法確立につながるものである。

【目的1】 ROCKシグナルが腎糸球体構成細胞の形態的・分子的特徴に及ぼす影響を明らかにする。

【目的2】 患者尿サンプルの解析から、種を超えて保存性のあるROCKエフェクター分子を同定する。

## [II] 結果

### ① 腎糸球体上皮細胞特異的ROCK1/ROCK2ダブル欠損 (PRDK0) マウスの表現型解析

ROCKは全身に分布するため、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解析が不可欠である。我々は本学関連委員会の承認を得て、糸球体上皮細胞特異的にCre recombinaseを発現するPodocin-CreとROCK2 floxマウスを交配し、糸球体上皮細胞特異的ROCK2欠損マウスをまず作製した。同マウスでは、高脂肪食やストレプトゾトシン投与、dbモデルマウスとの交配によって作製した糖尿病性腎症の進展が有意に抑制された (*Commun Biol.* 2022)。さらに、アドリアマイシン投与によって誘導される巣状糸球体硬化症モデルにおいても、尿アルブミン値増加や腎組織の線維化が軽度に留まることを見出した (*Commun Biol.* 2024)。次に、英国MRC Harwell社と試料提供契約を締結し、国内へROCK1 floxマウスの凍結精子を導入した。熊本大学生命資源研究・支援センターでROCK1 floxマウスの個体を復元し、本学へ搬入した。既に安定的に維持していた糸球体上皮細胞特異的ROCK2欠損マウスとROCK1 floxマウスを交配し、ROCK1/ROCK2ダブル欠損 (PRDK0) マウスの作製に成功した。PRDK0はメンデルの法則に従って出生し、成長や発達に異常を認めない。現在、高脂肪食やストレプトゾトシン投与によって、糖尿病性腎症モデルを作製

している。腎組織形態と尿アルブミン値から、糖尿病性腎症に対するROCK1、2完全遮断の効果を評価する。糸球体において、ROCK1はAMPK経路を介したミトコンドリア呼吸を制御し (Nagai Y, Matoba K. *Kidney Int.* 2022)、ROCK2はPPAR $\alpha$ と下流の脂質代謝を制御する (Matoba K. *Commun Biol.* 2022)。そのため、両ROCKアイソフォームの欠損は、エネルギー代謝経路に顕著な変化を起こすと推測される。

## ② 糖尿病性腎症の患者尿サンプルを用いたscRNA-seq

ROCK阻害薬である塩酸ファスジルは、脳出血後の血管攣縮を予防する注射製剤として最大14日間の投与が認められている。我々はこれまでに、塩酸ファスジルを投与された糖尿病を有する患者で有意な尿蛋白減少効果が認められることを報告した (Matoba K. *Front Pharmacol.* 2021)。

本研究では、塩酸ファスジルの投与を受けた腎症患者から尿サンプルを回収し、糸球体構成細胞を分取してscRNA-seqを行うことを計画している。塩酸ファスジル非投与患者と比較した、糸球体構成細胞集団の異質性を評価する。現在、糖尿病の教育入院症例を対象に検討を進めており、患者の尿サンプルから回収した沈査を用いて、高品質のRNAが十分量得られることを確認した。また、RNAの逆転写によって作製したcDNAを用いてROCK1、ROCK2の発現量を確認し、糖尿病性腎症ではこれらの発現レベルが上昇傾向にあることを見出した。

## [III] 考察

糖尿病性腎症は糖尿病を有する患者の予後を規定する血管併発症であり、生活の質を維持するためにもステージの進行抑制が求められる。これまで、レニン・アンジオテンシン系の活性化や糸球体過剰濾過の病態関与が明らかにされ、レニン・アンジオテンシン系阻害薬やSGLT2阻害薬の有効性が大規模臨床試験で示されてきた (Perkovic V. *N Engl J Med.* 2019)。しかし、腎症の進行を完全に抑制することは未だ解決困難な臨床課題として残されている。

これまで我々は、新たな腎症治療標的としてのROCK活性化に着目し、ROCKの上流を抑制するHMG還元酵素阻害薬(スタチン系薬剤)やROCK阻害薬である塩酸ファスジルの腎症抑制効果を*in vivo* (Matoba K. *Kidney Int.* 2013)及び*in vitro* (Matoba K. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014)の検討において示してきた。齧歯類に対する同様の効果は他の研究者によっても確認されており (Peng F. *Diabetes.* 2008) ROCK活性化が、少なくとも動物モデルにおける糖尿病性腎症の進展に関与することは明らかである。

現在臨床の場では、脳出血後血管攣縮を抑制する注射製剤として塩酸ファスジル、緑内障治療薬として点眼薬リパスジル塩酸塩が使用されている。しかし、全身長期投与可能な経口ROCK阻害薬の開発には至っていない。ROCKを間接的に阻害する経口薬としてスタチン系薬剤があるが、同剤が作用する細胞内シグナルは広範であり、腎構成細胞の形態維持や糸球体基底膜の選択的濾過機能に重要な低分子量G蛋白Cdc42、Rac1をも抑制してしまう。糸球体上皮細胞におけるCdc42欠損は細胞間結合の破壊と尿蛋白漏出を引き起こし、Cdc42欠損マウスは生後間もなく腎不全で死亡する (Scott RP. *J Am Soc Nephrol.* 2012)。Rac1も糸球体上皮細胞保護的に働くことが示されており、Rac1欠損マウスでは塩分負荷によって惹起される糸球体硬化が悪化する (Blattner SM. *Kidney Int.* 2013)。臨床試験におけるスタチン系薬剤の腎保護効果についても、定まった見解が得られていない。そこで、我々は低分子量GTP結合蛋白の下流シグナルであるROCKに着目した。今後の検討では、糸球体構成細胞群の疑似時間軸、位置情報を伴う遺伝子発現ネットワークとROCKの関連性を明らかにする新たな検討に取り組み、ROCKによる糖尿病腎症の進展機構を解明することで、経口ROCK阻害薬の開発へ向けた基礎的分子基盤を確立する。

ROCKシグナルは、悪性腫瘍や代謝疾患、中枢神経疾患など、様々な疾病の病態に関与することから (Nam GH. *Nat Commun.* 2018)、本研究によるROCKの機能解明は基礎生命科学の進歩のみならず、人類福祉の観点からも新たな創薬基盤・治療戦略構築を創成する上で本質的な研究課題であると考えられる。また、本研究をさらに発展させ

る方策として、申請者が主導する研究班における学術論文数の増加、質の向上を目指す。部局や分野を超えた基礎・臨床講座との研究連携を強化し、本学の病院機能を活用した臨床研究やROCK阻害薬開発企業との研究拠点形成によるイノベーション創出を試みる。

## 経口ROCK阻害薬開発と糖尿病腎症の進展抑制を目指す

