

令和2年10月30日

報道機関 各位

熊本大学

電気と温熱の組み合わせが腎病態を改善する —ネフローゼ症候群に対する温故知新たなアプローチ—

【ポイント】

- ・ 最適化した物理刺激（低周波微弱パルス電流と温熱の併用処置（MES+HS））が、ネフローゼ症候群（NS）の腎病態を改善することを発見しました。
- ・ 本物理刺激（MES+HS）は、腎臓の尿濾過機能を担う糸球体の足細胞（ポドサイト）の減少や硬化病変を改善するとともに、炎症や線維化をも抑制することが示されました。
- ・ 本物理刺激（MES+HS）は、他の臨床試験から、ヒトに対して安全性の高い医療機器となりうることが明らかとなっており、今後、NS に関わる複数因子を同時に標的化する刺激として、臨床応用することが期待されます。

【概要】

熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系）遺伝子機能応用学研究室の 寺本啓祐 大学院生、甲斐広文 教授らは、生物活性を指標に最適化した微弱パルス電流（MES）と温熱（HS）の併用処置（MES+HS）が、腎臓において抗炎症作用や抗線維化作用を発揮するとともに、腎臓細胞のアポトーシス（細胞死）を抑制することでネフローゼ症候群（NS）に対し保護的に働くことを発見しました。

MES+HS は、細胞内シグナルを制御することで多様な疾患に対し有効性を示すことが基礎研究で明らかになっています。特に、2型糖尿病に関しては、ヒト患者を対象とした臨床研究においても、副作用なく病態改善効果を発揮することが知られていました。今回の発見では、MES+HS が細胞の生存に関わる Akt-Bad 経路を制御し、NS の原因となる糸球体障害を抑制することを見出しました。また、MES+HS が腎臓の炎症や線維化も同時に抑制し、NS の発症から進行に関わる複数の因子を標的にすることが示されました。既存薬と作用様式が異なることから、MES+HS が NS における新たな治療手段となることが期待されます。また、他の臨床試験から、ヒトに対して安

全性の高い医療機器となりうる事が明らかとなっており、今後、NS に関わる複数因子を同時に標的化する刺激として、臨床応用することが期待されます。本研究の成果は、Nature Press の「Scientific Reports」に令和 2 年 10 月 30 日 19 時(日本時間)に公開されました。

【研究の背景】

NS は、腎臓の尿濾過機能を担う糸球体の障害が生じた結果、大量の血中タンパク質が尿中へと漏出し、低アルブミン血症や浮腫などを併発する腎疾患の総称です。NS の治療には、ステロイドが第一選択薬として用いられており、一定の効果を示しています。しかしながら、ステロイドにより病態が寛解した後、再発を繰り返す頻回再発型 NS や、ステロイドに対し治療抵抗性を示すステロイド抵抗性 NS が存在します。これらは難治性 NS と呼ばれ、治療応答性の低さや予後の悪さが問題になっています。また、NS は、その性質上、長期にわたる疾患コントロールを要することが多く、既存薬の長期間服用による副作用の出現も危惧されています。このような背景から、有効かつ安全な新規治療法の開発が望まれています。

電気や温熱などの物理刺激は古来より医療目的に用いられており、経験的に病態改善効果を有することが知られています。甲斐教授らは、生物活性に着目し最適化した微弱パルス電流(Mild electrical stimulation: MES)と、電流作用の増強を目的とした温熱(Heat shock: HS)との併用に着目し、MES+HS の有用性を検討してきました。その中で、MES+HS が 2 型糖尿病や乾癬を始めとする様々な疾患において病態改善効果を発揮することが明らかになりました。さらに、2 型糖尿病に関してはヒト患者を対象とした臨床研究も行われており、副作用なく糖代謝パラメーターの異常を是正することが示されています。これらの知見から、MES+HS は多様な作用標的を有する安全性の高い処置として、様々な疾患の新規治療法となることが期待されています。上記の基礎的知見をもとに、本研究では、新規治療法の開発が望まれる NS に対する MES+HS の有効性を検討しました。

【研究の内容】

本研究では、アドリアマイシン(ADR)誘導性 NS モデルマウスを用いました。本モデルマウスは難治性 NS を模擬することが知られています。ADR 投与前日から、MES+HS ([MES 条件:パルス幅 0.1 milli second、55 pps、12 V]、[HS 条件:42°C])を 1 回 10 分、週に 2 回の頻度で処置し、病態の変化を 4 週間経時的に観察しました。

まず、腎機能に関して検討を行ったところ、病態モデルマウスの尿中に漏出するアルブミン量が病態誘導後 7 日目から増加し 10 日目にピークを迎えた一方、MES+HS 処置群では、尿中アルブミン量が 7 日目には 50%、10 日目には 75%減少しました(図

1 左上)。また、タンパク尿スコアについても、MES+HS は経時的に抑制効果を発揮しました(図 1 左下)。さらに、MES+HS 処置群は病態誘導によって増加する血清中のクレアチニン値を 36%、血中尿素窒素(BUN)値を 24%減少させました(図 1 右)。これらの結果から、MES+HS が ADR によって低下する腎機能を改善することが明らかとなりました。

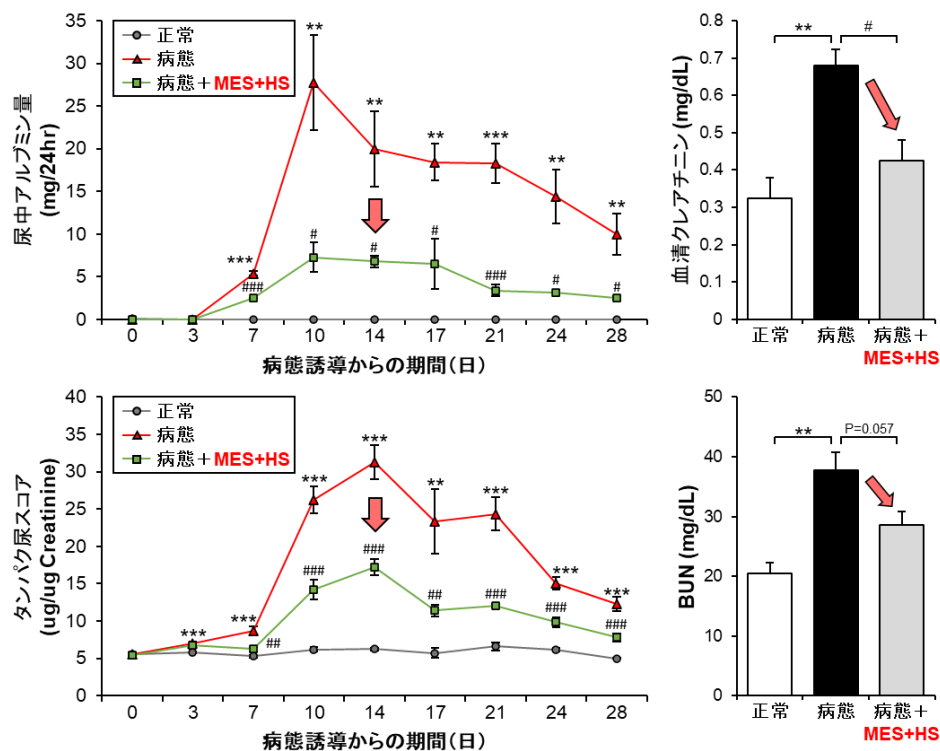


図 1 MES+HS は ADR 誘導性 NS の尿中および血中腎機能パラメーターの異常を改善する (Scientific Reports より一部改変)

次に、腎組織学的な障害について検討を行いました。ADR 投与により病態モデルでは腎臓の尿濾過機能を担う糸球体の硬化病変が認められましたが、MES+HS 処置群では ADR による硬化病変が抑制され、特に、重度の硬化病変(糸球体面積の 75%以上が硬化領域)を呈する糸球体の割合については 59%の抑制効果を示しました(図 2 上段)。また、病態に伴い尿細管障害を反映するタンパク円柱領域の増大が確認されましたが、MES+HS 処置群ではタンパク円柱領域の減少が見られ(図 2 中段)、MES+HS が糸球体のみならず尿細管に対しても保護作用を発揮することが示唆されました。さらに、FSGS^{*1}の起点となる糸球体上皮細胞(ポドサイト)数の減少について、免疫染色により評価したところ、病態時に認められるポドサイト数の減少が MES+HS によって改善しました(図 3 下段)。上記の結果から、MES+HS が ADR 投

与による腎組織障害を抑制すること、ポドサイト数の減少を制御する何らかのメカニズムが存在することが示唆されました。

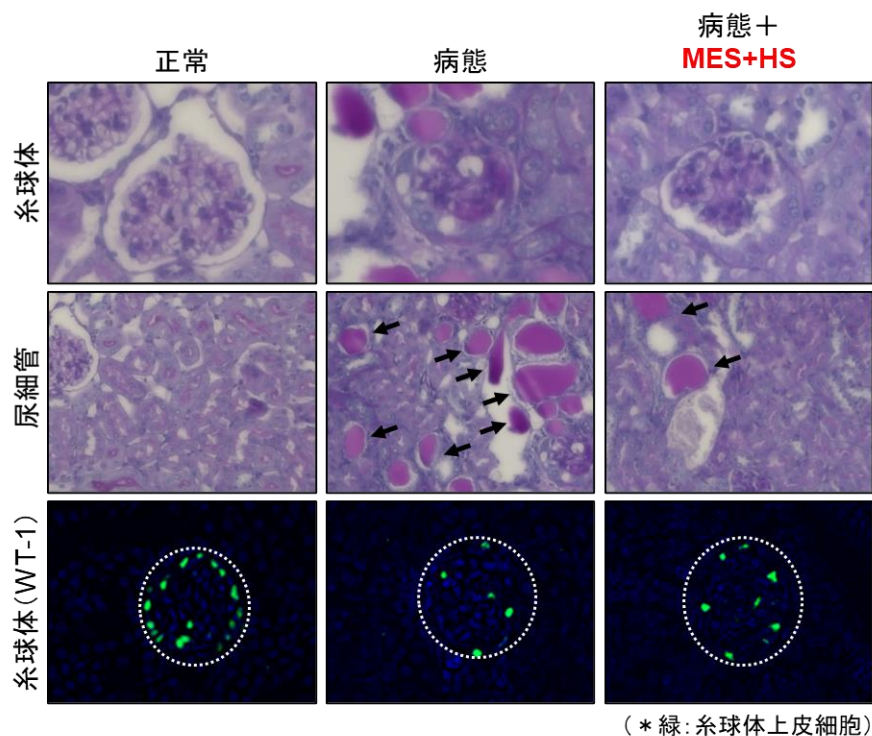


図 2 MES+HS は ADP 誘導性 NS の糸球体障害および尿細管障害を改善するとともに、ポドサイト数の減少を抑制する (Scientific Reports より一部改変)

続いて、ポドサイト数の減少を抑制するメカニズム探索を企図し、MES+HS が腎組織の細胞死に与える影響を検討しました。腎組織内のアポトーシス細胞を TUNEL 染色により評価したところ、ADR によって増加するアポトーシス細胞数を MES+HS が減少させました(図 3 上)。この結果と一致するように、アポトーシスの実行因子である活性化 Caspase3 (CC3) のタンパク質発現量の増加も MES+HS によって抑制されたことから、MES+HS が抗アポトーシス作用を有することが示されました(図 3 下)。さらに、そのメカニズムとして細胞内の生存シグナル分子として知られる Akt に着目したところ、MES+HS が Akt をリン酸化し活性化するとともに、その下流のアポトーシス促進因子 Bad を不活性化することが見出されました(図 3 下)。この結果は、細胞を用いた in vitro 実験系においても確認され、Akt のリン酸化阻害剤 LY294002 を処置することで MES+HS の抗アポトーシス作用が消失することから、MES+HS の作用に Akt-Bad 経路が深く関わるということが明らかとなりました。

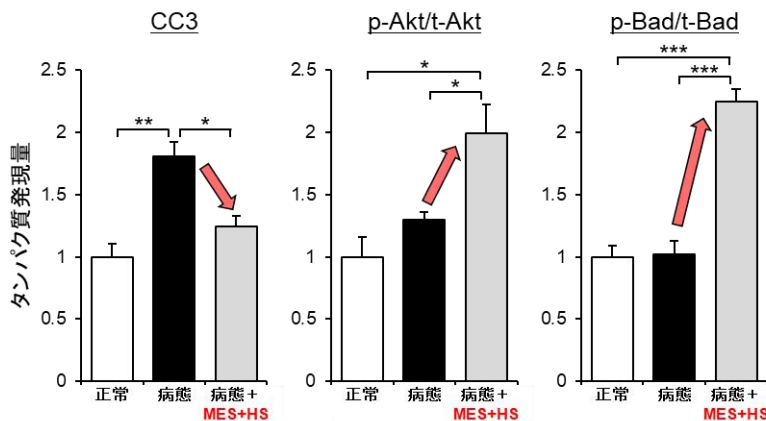
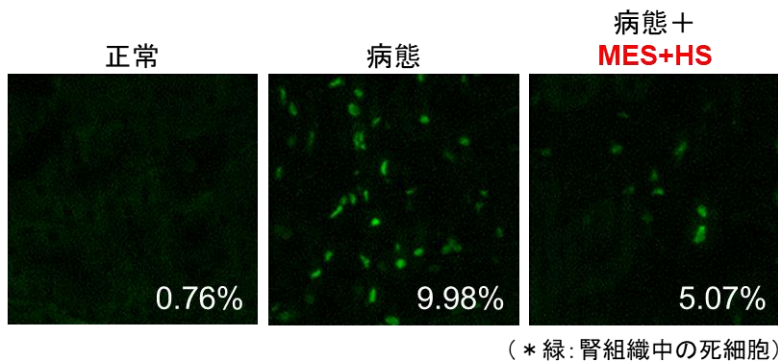


図 3 MES+HS は Akt-Bad 経路の制御を介して ADR 誘導性 NS のアポトーシスを抑制する (Scientific Reports より一部改変)

上記の結果に加え、NS の進行に関わる炎症や線維化について遺伝子発現量解析を行ったところ、MES+HS が炎症性サイトカイン (*Il1-beta* や *Il6* 等) や線維化因子 (*Tgf-beta* や *Colla1* 等) の発現量を減少させることが見出されました。これは、MES+HS が炎症や線維化に対し抑制的に作用し得ることを示唆しています。

以上の検討から、微弱な電気刺激と温熱刺激を組み合わせた MES+HS が、Akt-Bad 経路を制御し抗アポトーシス作用を発揮するとともに、炎症や線維化を抑制することで ADR 誘導性 NS の腎病態を改善することが明らかになりました (図 4)。

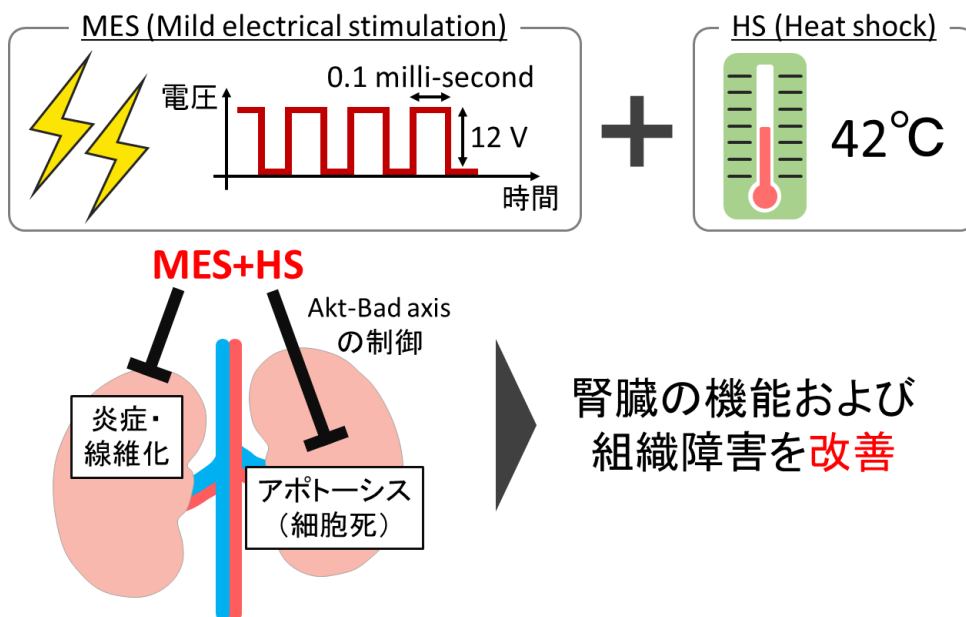


図 4 MES+HS は Akt-Bad 経路を介した抗アポトーシス作用とともに炎症・線維化を抑制することで腎保護作用を発揮する

本物理刺激 (MES+HS) は、他の臨床試験から、ヒトに対して安全性の高い医療機器となりうるということが明らかとなっています。本研究の成果により、今後、NS に関わる複数因子を同時に標的化する刺激として、臨床応用することが期待されます。

本研究は、文部科学省科研費 (JP26460098、JP17K08309)、熊本大学リーディング大学院 HIGO プログラムの支援を受けて行われました。

【用語解説】

※1 FSGS (Focal Segmental Glomerulosclerosis): 巣状分節性糸球体硬化症のこと。難治性 NS の原疾患の1つ。

【論文名】

Mild electrical stimulation with heat shock attenuates renal pathology in adriamycin-induced nephrotic syndrome mouse model

【著者名・所属】

Keisuke Teramoto, Yu Tsurekawa, Mary Ann Suico, Shota Kaseda, Kohei Omachi, Tsubasa Yokota, Misato Kamura, Mariam Piruzyan, Tatsuya Kondo, Tsuyoshi Shuto, Eiichi Araki, Hirofumi Kai* (*責任著者)

【掲載雑誌】

Scientific Reports

【doi】

doi: 10.1038/s41598-020-75761-8

【URL】

<https://www.nature.com/articles/s41598-020-75761-8>

【お問い合わせ先】

熊本大学大学院生命科学研究部附属
グローバル天然物科学研究センター
大学院薬学教育部 遺伝子機能応用学研究室
担当：甲斐広文（教授）
電話： 096-371-4405
e-mail： hirokai@gpo.kumamoto-u.ac.jp