

研究助成 2022 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（最終） <概要>

現 所 属	日本大学医学部 内科学系 腎臓高血圧内分泌内科学分野
氏 名	小林 洋輝
研 究 テーマ	糖尿病性腎症の進展における新規 BMP 拮抗分子の機能解析
<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。 ● 構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果等 1 ページにまとめること。 (図表、写真等の貼付を含む) 	
<p>「研究目的」</p> <p>筆者は糖尿病性腎症患者を対象に血漿中蛋白の網羅的測定を行い、neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) が将来の ESRD を強力に予測するバイオマーカーであることを明らかにした。NBL1 は腎保護作用を持つ bone morphogenetic protein (BMP)-7 の拮抗因子であることが知られている。また、NBL1 は慢性腎臓病患者の近位尿細管細胞で高発現していた。これらの結果から、NBL1 が糖尿病性腎症の進行に関与している可能性が示唆された。本研究では、NBL1 が BMP-7 の作用を抑制することで糖尿病性腎症の進行に寄与しているとの仮説を立て、ヒト尿細管培養細胞および NBL1 ノックアウト(KO)マウスを用いた糖尿病モデルを作成し、糖尿病性腎症における NBL1 の役割を詳細に検討した。また、非糖尿病性の急性腎障害や慢性腎臓病に対しても NBL1 が関与するかについても動物実験で評価を行った。</p> <p>「実験方法」</p> <p>1. 培養細胞における NBL1 の役割についての検討</p> <p>ヒト近位尿細管細胞株(HK-2)を用いて、培地に高グルコース(33mM)や TGF-β 1 (5ng/ml)を添加して NBL1 の発現をリアルタイム PCR と Western blot で評価した。また、リコンビナント NBL1 (500ng/ml)を添加し、EMT(上皮間葉転換)に関与する遺伝子および蛋白発現の変化を同様に評価した。さらに、NBL1 の siRNA を導入してノックダウンした HK-2 細胞を TGF-β 1 で刺激し、EMT 関連マーカー(α SMA、Fibronectin、Vimentin、E-cadherin)についてリアルタイム PCR および Western blot で定量解析を行った。</p> <p>2. NBL1 ノックアウトマウスを用いた糖尿病性腎症モデル、急性腎障害モデルおよび慢性腎臓病モデルにおける NBL1 の役割の検討</p> <p>8 週齢の NBL1 ノックアウト(NBL1:-/-)および野生型(WT, NBL1:+/+)マウスを用いた。イソフルラン麻酔下で右腎臓を摘出後、飼料を普通食から高脂肪食に変更し、2 週間の回復期間を与えた後、ストレプトゾトシン(STZ, 40mg/kg, 5 日間連続)を腹腔内投与し、血糖値が 300mg/dL 以上となった個体を糖尿病群とした。また 8 週齢の NBL1 KO および WT マウスにシスプラチン(20mg/kg)を腹腔内投与し、3 日間飼育して急性腎障害(AKI)モデルを作成した。また、尿管結紮(UUO)手術を施行し、2 週間飼育して慢性腎臓病(CKD)モデルを作成した。腎臓および心臓の組織を採取し、線維化マーカー(α SMA、Fibronectin、Collagen IV)および NBL1 の mRNA や蛋白発現をリアルタイム PCR および Western blot で評価した。</p> <p>「結果」</p> <p>1. 培養細胞における NBL1 の役割についての検討</p> <p>HK-2 細胞を高グルコース培地で 24 時間培養した結果、コントロール群と比較して NBL1 の mRNA 発現が有意に増加した。また、HK-2 細胞に NBL1 を添加した培養すると、TGF-β 1 の発現上昇が確認され、EMT 関連遺伝子(α SMA、Fibronectin、Vimentin)の mRNA および蛋白発現の増加が認められた。一方、NBL1 の siRNA を導入した細胞では、TGF-β 1 刺激後の EMT 関連遺伝子の発現増加が control siRNA と比較して抑制された。</p> <p>2. NBL1 ノックアウトマウスを用いた糖尿病性腎症モデル、急性腎障害モデルおよび慢性腎臓病モデルにおける NBL1 の役割の検討</p> <p>NBL1 ノックアウト(KO)マウスと野生型(WT)マウスを用いて、糖尿病性腎症モデルの実験を行った。コントロール群および糖尿病群における WT マウスの血中 NBL1 濃度を測定すると、糖尿病群ではコントロール群と比較して、血中 NBL1 濃度が有意に上昇していた。糖尿病群の腎臓において、KO マウスでは WT マウスに比べて一部の線維化マーカーの mRNA および蛋白発現の抑制が見られた。また、急性腎障害および慢性腎臓病モデルにおいても、WT マウスのシスプラチン投与群および UUO 群のマウスはコントロール群と比較して、腎臓での NBL1 mRNA の発現や線維化マーカーの増加が認められたが、これらの障害モデルにおいて、NBL1 KO マウスでは、WT マウスと比較して腎臓の線維化マーカーの発現が抑制され、組織障害が軽減されたことが確認された。</p>	

研究助成 2022 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

現 所 属	日本大学医学部 内科学系 腎臓高血圧内分泌内科学分野
氏 名	小林 洋輝
<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。 ● 欄が足りない場合は増やして記入すること。 	
1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入すること。なお、著者名は省略せず全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引くこと。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入し、投稿中の論文および学会のアブストラクトは含めない。 	
1	<u>Kobayashi H</u> , Satake E, Murata Y, Otsuka H, Tsunemi A, Azuma M, Nakamura Y, Saito T, Abe M. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is associated with the severity of interstitial fibrosis and kidney function decline in IgA nephropathy. Journal of Nephrology, 36(8):2245-2256, 2023.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入すること。 ● 国内外を問わない。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2024年11月	第35回日本糖尿病性腎症研究会 小林洋輝 , 村田悠輔, 常見明子, 阿部雅紀 新規 BMP 拮抗分子に着目した腎線維化機構の解明.
2	2024年10月	The 56th Annual Meeting of the American Society of Nephrology Kidney Week Hiroki Kobayashi , Yusuke Murata Y, Masanori Abe. Investigating Circulating Inflammatory Proteins in Immunoglobulin A Nephropathy: Implications for Disease Progression.
3	2024年10月	第39回日本糖尿病合併症学会 小林洋輝 . 糖尿病関連腎臓病の早期治療介入を目指したバイオマーカーの開発. 第39回日本糖尿病合併症学会
4	2024年5月	The 61st European Renal Association (ERA), invited lecture, Stockholm. Hiroki Kobayashi . Learning from the Proteomic Approach in Patients with Diabetes: From Biomarkers to Therapeutic Targets.
5	2024年1月	The 12th Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research. 小林洋輝 . 糖尿病性腎臓病における血中プロテオーム解析による新規バイオマーカー、及び治療標的候補の同定.
6	2023年11月	The 55th Annual Meeting of the American Society of Nephrology Kidney Week. Hiroki Kobayashi , Eiichiro Satake, Masanori Abe. Association of Neuroblastoma Suppressor of Tumorigenicity 1 (NBL1) with Interstitial Fibrosis Severity and Kidney Function Decline in IgA Nephropathy.
7	2023年9月	第53回日本腎臓学会東部学術大会 小林洋輝 , Zaipul I. Md Do, 佐竹栄一郎, Andzej. Krolewski, 阿部雅紀. IgA 腎症における Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1)と腎機能の低下、および尿管間質障害との関連.
8	2023年9月	第53回日本腎臓学会東部学術大会、仙台 小林洋輝 , Zaipul I. Md Do, 佐竹栄一郎, Andzej. Krolewski, 阿部雅紀. 糖尿病性腎症における NBL1 の腎線維化に対する役割について.
9	2023年6月	第68回日本透析医学会学術集会・総会 小林洋輝 , Zaipul I. Md Dom, 佐竹栄一郎, 阿部雅紀, Andrzej. Krolewski. NBL1は糖尿病性腎症において末期腎不全の予測因子になるだけでなく腎線維化の原因になる.
10	2023年6月	第66回日本腎臓学会学術総会 Hiroki Kobayashi . Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) and risk of progression to end-stage kidney disease in diabetes.
11	2023年6月	第66回日本腎臓学会学術総会、横浜 小林洋輝 , Zaipul I. Md Dom, 佐竹栄一郎, 阿部雅紀, Andrzej. Krolewski. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1)は糖尿病性腎症において末期腎不全の予測因子になるだけでなく、腎線維化の原因になる.
12	2023年5月	第6回日本 Uremic Toxin 研究会学術集会 小林洋輝 , Zaipul I Md Dom, 佐竹栄一郎, 阿部雅紀, Andrzej. Krolewski. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1)は糖尿病性腎臓病において末期腎不全の予測因子になるだけでなく、腎線維化の原因になる.

13	2023年2月	第2回日本腎不全合併症医学会 学術集会・総会, シンポジウム 小林洋輝 . DKDの早期診断と予後予測のためのバイオマーカーの開発.
14	2023年2月	The 12th Chronic Kidney Disease Frontier Award. Hiroki Kobayashi . Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) and risk of progression to end-stage kidney disease in diabetes.
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		
5		
6		