

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11667

研究課題名(和文)腎糖新生におけるNrf2の役割とその制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Role of Nrf2 in renal gluconeogenesis and clarification of the control mechanism

研究代表者

小川 晋(Ogawa, Susumu)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・准教授

研究者番号：20323016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SD ratを正常、STZ糖尿病、STZ糖尿病+tempol、STZ糖尿病+bardoxolone methyl、STZ糖尿病+halofuginoneの5群に分け、腎動脈、腎静脈の血糖と腎臓内糖新生関連物質を測定。で血糖動静脈比は上昇。腎臓内クエン酸、リンゴ酸はで増大、で抑制、PEPCKはで増大、phosphoenolpyruvic acid (PEP)は、で抑制、G-6-Pはとで増大しで減少。酸化ストレスはPEPからG-6-P、ブドウ糖の経路を増大させ腎糖放出を増大、Nrf2はPEPからの乳酸合成・尿酸合成を増大させブドウ糖合成を抑制する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：腎臓は血液中ブドウ糖の10%以上を供給する臓器であるが、その制御メカニズムは不明であった。本研究によりそのブドウ糖供給は腎酸化ストレス増大により増大し、酸化ストレス増大により誘導される転写因子Nrf2により抑制されることが解明された。さらにNrf2は酸化ストレスを抑制することでブドウ糖産生を抑制しているのではなく、糖新生経路における酸化ストレスの作用部位とは異なる部位を変化させることで糖新生を抑制することが明らかにされた。この学術的意義は大きい。  
社会的意義：腎糖新生制御メカニズムの解明は、新しい糖尿病治療薬の開発につながる可能性があり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We divided SD rats into the following five groups: (1) normal, (2) Streptozocin (STZ) diabetes, (3) STZ diabetes + tempol, (4) STZ diabetes + bardoxolone methyl, and (5) STZ diabetes + halofuginone. We measured changes in blood glucose level in the renal arteries and veins, as well as gluconeogenesis-related substances. Our results found the artery/vein ratio to be higher in the (2) than in the (1), but lower in the (3) and (4), which showed levels similar to that of the (1). Renal citrate and malic acid were higher in the (3) but were below (1) in the (4). PEPCK was significantly higher in the (3), while phosphoenolpyruvic acid (PEP) was below (1) in the (3) and (4), particularly so in the (4). G-6-P was higher in the (2) and (3), and significantly lower in the (4).  
Our results show oxidative stress to have expanded the pathway from PEP to G-6-P and ultimately to glucose. Nrf2 inhibited glucose synthesis by increasing the synthesis of lactic acid and uric acid from PEP.

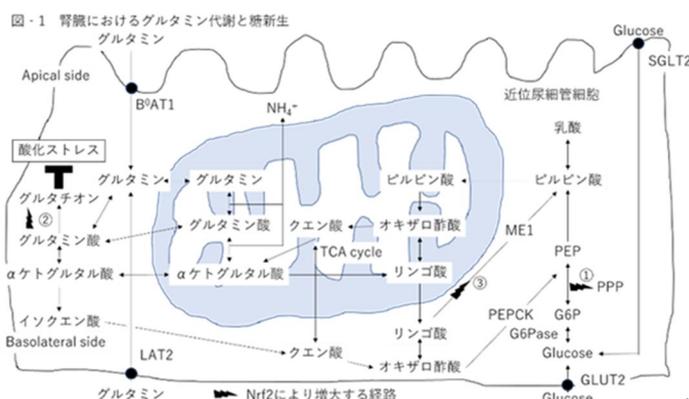
研究分野：腎臓生理学、糖尿病・代謝学

キーワード：oxidative stress Nrf2 renal gluconeogenesis PEPCK Glutamate G6Pase lactate

1. 研究開始当初の背景

(1) 血糖が低下した時、生体は糖新生を行って血糖を維持する。しかし糖尿病では血糖が高いにも関わらず糖新生が亢進し血糖上昇をさらに増悪している。生体には、この糖新生亢進に対する制御メカニズムが備わっているはずであるが、詳細な説明はなされていない。この糖新生制御メカニズムの解明は糖尿病発症予防・新規治療の開発上重要である。糖新生臓器は肝臓が有名であるが、腎臓も糖新生の 10~40% を供給している。我々はこの腎糖新生制御メカニズムに注目した。腎臓の主要糖新生基質はグルタミンと乳酸である。我々は、「高血糖による腎酸化ストレスの増大が糖新生を増大させるが、やがて酸化ストレスにより誘導される抗酸化ストレス転写因子: Nuclear-factor-(erythroid-derived 2)-like related factor 2 (Nrf2) がグルタミン・乳酸からの糖新生を抑制する」と考えた。本研究では、コントロール (SD ラット)、糖尿病ラット (STZ+SD ラット)、糖尿病ラット + Nrf2 inhibitor、糖尿病ラット + Nrf2 activator、の腎臓内の糖新生経路の変化を検証し、腎臓におけるグルコース産生を比較することで上記仮説を検証する。

(2) 通常、糖新生によるグルコース供給は肝臓が 90%、腎臓が 10% を担っているが、絶食時には腎糖新生の割合は 40% まで増加し、肝臓とほぼ等量のグルコースを産生する。<sup>1),2)</sup> 肝臓の糖新生では筋由来の乳酸、アラニン、フルクトース、グリセロールが基質であり、腎臓ではグルタミンと乳酸が糖新生の主要基質である。グルタミンと乳酸からの糖新生経路を図 1 に示す。



腎臓ではグルタミンは、尿中からの再吸収と血中からの取り込みの二つの経路で細胞内に取り込まれ、以下の 2 経路で細胞質内オキサロ酢酸を合成する。ミトコンドリアに入り 2 分子のアンモニア産生の後、ケトグルタル酸になる。このケトグルタル酸は TCA サイクルでリンゴ酸となりミトコンドリアを出て、細胞質オキサロ酢酸となる。ミトコンドリアに入らず細胞質内でグルタミン、グルタミン酸、ケトグルタル酸、イソクエン酸、クエン酸、オキサロ酢酸となる。糖新生を行う場合

は、このオキサロ酢酸が cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) によりホスホエノールピルビン酸 (PEP) となり、最終的にグルコース-6-リン酸 (G6P) が小胞内の glucose-6-phosphatase (G6Pase) によりグルコースが作られ、基底膜の GLUT2 により血中に放出される。腎臓では、糖新生に必須の PEPCK や G6Pase が近位尿細管のみに存在するため、糖新生は近位尿細管のみで行われていると考えられている。また細胞質内リンゴ酸から malic enzyme 1 (ME1) によりピルビン酸を経由して乳酸を合成する経路 (図 1 の ) もあり PEP 合成経路と拮抗するものと考えられる。しかしこの腎糖新生の増減を制御するメカニズムは解明されていない。

Streptozotocin (STZ) 糖尿病モデルでは、腎臓の糖新生酵素 PEPCK と G6Pase が増加しており、腎ホモジネートの G6P、グルコースがコントロールより増加し糖新生が亢進している<sup>3)</sup>。またアンジオテンシン II も糖新生酵素を増加させ ARB 治療で腎糖新生が抑制される<sup>3)</sup>。グルコースもアンジオテンシン II も酸化ストレスを増大させることから、我々は酸化ストレスが key になる PEPCK や G6Pase を活性化し腎糖新生を増大させ、酸化ストレスにより起動する抗酸化ストレス因子 Nrf2 がこれら key 酵素を抑制することでグルタミン・乳酸からの腎糖新生を抑制すると考えた。

(3) Nrf2 が糖新生を抑制すると考えた理由を以下に記す。Nrf2 の起動により、⑦ペントースリン酸経路 (PPP) の活性化による尿酸産生の増大、④グルタチオン合成の増大、⑤Glutaminolysis (グルタミンからの乳酸合成) の増大、が起こる。<sup>4)</sup> ⑦により G6P が代謝されるためグルコース放出量が減少し、④のグルタチオン合成増大によりグルタミン酸が消費されてしまうため PEP 合成が減少、⑤では細胞質内リンゴ酸が ME1 によりピルビン酸 (乳酸) 合成に消費されるため PEPCK による PEP 合成が減少する、と考えたからである。これらのことから酸化ストレスが腎糖新生を増大し、酸化ストレスにより誘導された Nrf2 は酸化ストレスを抑制するのみならず腎糖新生をも抑制するのではないかと推測されるが明らかにされていない。そこで我々は、糖尿病モデルラット (STZ rat) において、酸化ストレスを抑制した場合、Nrf2 を活性化した場合、Nrf2 を抑制した場合で、腎臓からの糖の放出、PEPCK、G6Pase などがどの様に変化するかを検証した。

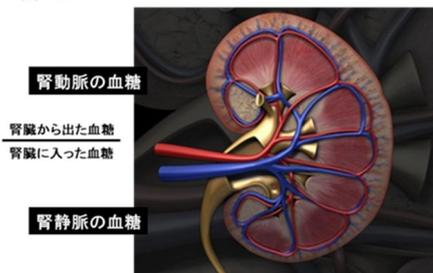
2. 研究の目的

糖尿病状態における腎糖放出増大のメカニズムを明らかにし、そのメカニズムにおける酸化ストレスと Nrf2 の役割を解明する。

3. 研究の方法

SD rat に STZ を腹腔内投与し糖尿病モデルラット(STZ 群)を作成する。この STZ rat に、酸化ストレス消去薬(tempol)を投与した群(Tm 群)、Nrf2 activator である bardoxolone methyl を 10 μmol/kg BW・腹腔内投与した群(BM 群)、Nrf2 inhibitor である halofuginone を 0.25mg/kg BW・腹腔内投与した群(Hal 群)を作成した。これらラットの腎糖放出、グルタミン、乳酸の腎からの放出、腎臓内の乳酸、グルタミン、Nrf2 発現、オキサロ酢酸、リンゴ酸、クエン酸、PEPCK、phosphoenolpyruvic acid (PEP)、G6Paseなどを測定した。

図-2



腎糖・グルタミン・乳酸放出の評価方法  
腎動脈と腎静脈それぞれの血液中のグルコース濃度、グルタミン濃度、乳酸濃度を測定し、腎静脈濃度/腎動脈濃度の比で評価し比較した。(図 2)Nrf2 は、RNA を抽出の後 real-time PCR を用いて NQO1 を評価した。PEPCK は、PEPCK の細胞質型アイソタイプ遺伝子 Pck1、G6Pase の触媒サブユニット遺伝子 G6pc について qPCR を行い、いずれも アクチン遺伝子 Actb を内部標準として、Ct 法にて補正した。

#### 4. 研究成果

図 3 に各群のグルコースの腎動静脈比の比較を示す。図のごとく STZ 群では N 群よりも動静脈比が増大しており腎糖放出が増大していることが確認された。Tm 群と BM 群ではグルコースの動静脈比は N 群のそれと同じレベルにまで抑制され腎糖放出が減少していた。Hal 群では STZ 群と同レベルにまで動静脈比が上昇し腎糖放出が増大していた。これらのことから酸化ストレスが腎糖放出を増大させていること、Nrf2 が腎糖放出を抑制することが考えられるが、Nrf2 が酸化ストレスを抑制したためか、直接糖新生経路に作用したかは不明であった。この結果より糖尿病では高血糖であるにも関わらず腎糖放出が増大しており高血糖を悪化させている一因であることが明らかになった。乳酸の腎動静脈比は N 群と比較して STZ 群で低下していたが他の 3 群では差が認められなかった。腎臓内の乳酸濃度は N 群に比較して 4 群すべてで増大していた。グルタミンの腎動静脈比は N 群と比較して STZ 群で低下し、Tm 群でさらに低下していたが、BM 群と Hal 群は N 群と差がなかった。腎臓内グルタミン濃度は N 群に比較して STZ 群と Hal 群で低下したが Tm 群と BM 群では増減が認められなかった。

図-3 グルコースの腎動・静脈比の比較

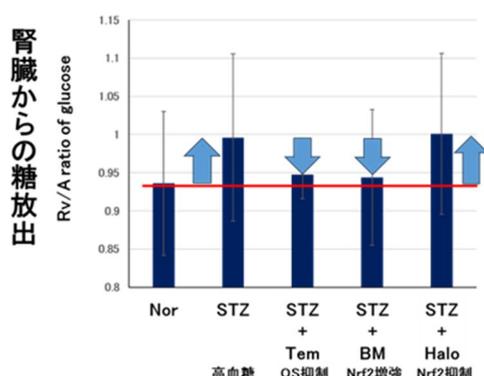
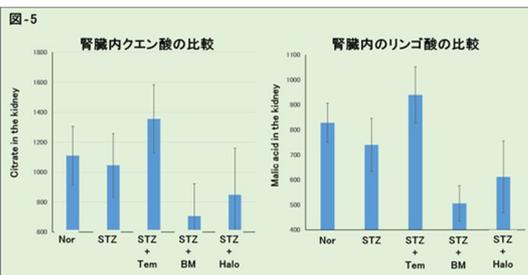
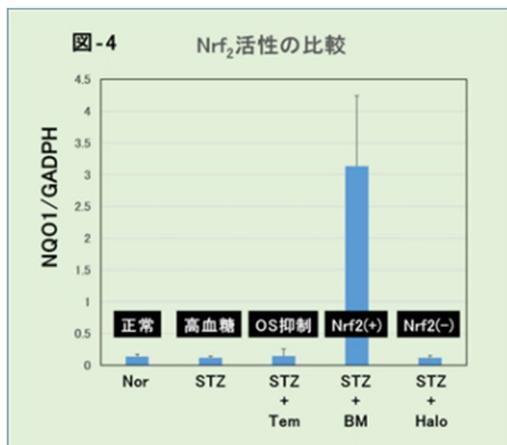
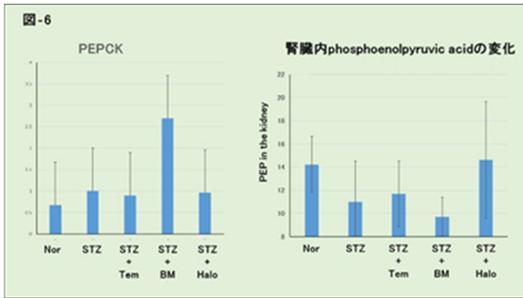


図 4 に各群の Nrf2 活性の比較結果を示す。図の様に BM 群でのみ強く Nrf2 活性が発現しているが、それ以外の群では N 群との差は認められなかった。下の図は図 1 に今回評価した物質が解かり易い様に色を付けたものである。酸化ストレス亢進状態ではグルコースの基質であるリンゴ酸、クエン酸、PEP、G6P は消費されて減少していると予測されるが、酸化ストレスを抑制した時(Tm 群)と Nrf2 を亢進させた時、それぞれがどのように変化するか評価した。

図-4 Nrf2活性の比較



群で差がなく低値であったことから、合成抑制と素早く PEP に代謝されている可能性の両方が考えられた。



そこで腎臓内の PEPCK と PEP を評価したのが図 6 である。PEPCK は N 群に比べて STZ 群でやや増加傾向にあったが有意差はなかった。BM 群では著明に増大していた。また PEP は N 群に比べて STZ 群、Tm 群、BM 群で減少し Halo 群で N 群と同じレベルまで上昇した。BM 群では STZ 群や Tm 群の約 1/2 にまで減少していた。STZ 群では腎糖新生が増大していることを考慮すると酸化ストレスはグルタミンや乳酸から作られたクエン酸やリンゴ酸を代謝しオキサロ酢酸から PEP への代謝を促進し、さらに

PEP からのグルコース合成を促進しているものと考えられた。BM 群では PEPCK が増大し PEP 合成が増大しているにも関わらず腎臓内 PEP は減少していること、BM 群では腎糖新生が抑制されていることから、BM 群では PEP のグルコース以外の物質への代謝が強く亢進していると考えられた。

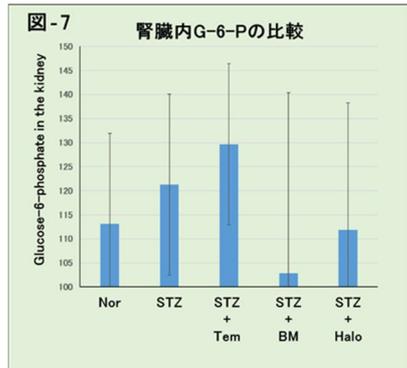
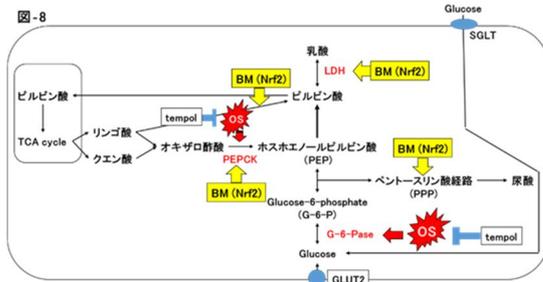


図 7 は腎臓内の G6P を評価したものである。N 群に比べて STZ 群でやや増大し Tm 群でさらに増大していた。BM 群では著明に減少しており Halo 群で N 群と同レベルに上昇していた。STZ 群ではグルコース合成が増大し Tm 群ではグルコース合成が抑制されたことを考慮すると酸化ストレスは G6Pase 活性を増大させ G6P グルコース反応を促進するが、酸化ストレス増大時の PEP 合成の速度より遅いため STZ 群においても G6P が蓄積しているものと思われた。酸化ストレスは G6Pase 活性を亢進させているため Tm 群では G6Pase 活性が低下して G6P がさらに蓄積したと考えられた。BM 群では G6P は著明に減少していた。BM 群では、グルコース合成が抑制されていたこと、PEP も減少していたこと、などから

PEP は G6P に代謝されず、ピルビン酸 乳酸経路やペントースリン酸経路 尿酸を介して乳酸合成や尿酸合成に利用されたものと考えられる。

図 8 に糖新生経路における酸化ストレスの作用点と Nrf2 の作用点をまとめた。酸化ストレスは、PEPCK を活性化し PEP 合成を増大させるが、



G6Pase 活性も増大させて G6P をどんどんグルコースへ変えていくので腎糖放出は増大する。Nrf2 は PEPCK を活性化し大量の PEP を合成するが、この PEP は G6P にはならず乳酸もしくは尿酸合成に利用されるためグルコース合成が減少し腎糖放出は減少する。

高血糖・飢餓・脱水などにより腎臓内(近位尿管)の酸化ストレスが増大すると腎臓はグルタミンからの糖新生を増大させ腎臓からのグルコース

放出を増大させる。酸化ストレスは糖新生の律速酵素である PEPCK 活性を増大し PEP 合成を増大、G-6-Pase の活性化により G6P 合成を増大させて糖新生を増加する。酸化ストレスの増大は Nrf2 を活性化し酸化ストレスを抑制することでこの糖新生を抑制すると考えられるが、その他にもグルタミン グルタミン酸 グルタチオン合成の促進により糖新生基質であるグルタミンを糖新生以外に消費することで糖新生を抑制する<sup>5)6)</sup>。加えて Nrf2 は PEP 合成を増大させその PEP を乳酸合成や尿酸合成に利用することで糖新生を抑制している。

#### Reference

- 1). Bennett FI, Alexander JE, Roobol A, Alleyne GA. Effect of starvation on renal metabolism in the rat. *Kidney Int* 1975 ; 7 (6): 380-384.
- 2). Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill GF Jr. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 1969 ; 48 (3): 574-583.
- 3). Tojo A, Hatakeyama S, Kinugasa S, Nangaku M. Angiotensin receptor blocker telmisartan suppresses renal gluconeogenesis during starvation. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2015 ; 8 : 103-113.
- 4). Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 2012 Jul 10;22(1):66-79. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.016.
- 5). Ogawa S, Takiguchi J, Shimizu M, Nako K, Okamura M, Kinouchi Y, Ito S. The Reduction in Urinary Glutamate Excretion Is Responsible for Lowering Urinary pH in Pink Urine Syndrome. *Tohoku J Exp Med* 239(2):103-110, 2016
- 6). Ogawa S, Shimizu M, Nako K, Okamura M, Ito S. Decreased Glycaemia with Renal Failure in Diabetes Betides in Relation to the Change in Renal Glutamate Metabolism. *Journal*



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	本橋 ほづみ  (Motohashi Hozumi)  (00282351)	東北大学・加齢医学研究所・教授   (11301)	
研究 分 担 者	西山 成  (Nishiyama Akira)  (10325334)	香川大学・医学部・教授   (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関