

令和元年6月8日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06767

研究課題名(和文)mTORC1抑制を標的とした難治性糖尿病性腎症治療の可能性

研究課題名(英文)Possible role of mTORC1 in diabetic nephropathy

研究代表者

大澤 紀之(Osawa, Norihisa)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80805820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：「糖尿病における動脈硬化に起因する腎病変に対しSGLT2阻害薬を介した血中ケトン体上昇が腎保護効果を発揮する」との仮説を検証した。SGLT2阻害薬およびケトン体前駆物質1,3-ブタンジオールは動脈硬化モデルマウスの腎病変を改善した。ケトン体合成律速酵素であるHmgcs2とApoEのダブルノックアウトマウスでは、SGLT2阻害薬による腎保護効果は消失した。ケトン体による腎保護効果にmTORC1シグナルの抑制が関与した。本研究により、ケトン体による腎エネルギー供給およびmTORC1抑制が、糖尿病に伴う動脈硬化に起因した腎機能低下に対する治療戦略となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腎症における現在未解決の課題に対して、基礎研究からのアプローチにより、現行の治療では難治性の腎症に対する新規治療標的の探索を目指したものである。現在、腎症からの透析導入数は横ばいになっているが、今後、糖尿病患者の爆発的増加が起こることも予想されている。現在の治療に甘んじることは、現時点で治療指針を示せていない難治性腎症からの透析導入数の増加を招く可能性を残すことになる。よって本研究により、腎症におけるmTORC1過剰亢進の意義、そして、その抑制機構としてのケトン体の可能性が示されたことは、今後の腎症予後改善に大きな貢献をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to verify our hypothesis that plasma ketone body levels increased by SGLT2 inhibitor should be involved in its renoprotective action against atherosclerosis-related kidney injury. Treatment with either an SGLT2 inhibitor or 1,3-butandiol (a ketone body precursor) ameliorated kidney injury in atherosclerosis mouse model. The renoprotective effect of SGLT2 was canceled in mice lacking Hmgcs2, a rate-limiting enzyme for endogenous ketogenesis. Furthermore, mTORC1 inhibition was involved in the mechanism behind ketone body-mediated renoprotection. Collectively, ketone body increase is involved in SGLT2 inhibitors-mediated renoprotection. Energy supply with ketone body into kidneys and subsequent mTORC1 inhibition may be a novel therapeutic target for atherosclerogenic kidney injury in diabetes.

研究分野：腎臓内科

キーワード：糖尿病性腎症 ケトン体 mTORC1 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

<腎症における新規研究課題>

腎症は Unmet medical needs の最たる疾患に位置付けられ、腎症の克服なしに透析患者数減少を達成することは困難となっている。

腎症は微量アルブミン尿の出現に始まり、顕性蛋白尿への進行、尿細管病変の悪化を経て、末期腎不全に至る進行性の疾患と考えられている。これまでの研究から、腎症に対する集学的治療の有効性が示され、増加の一途を辿っていた腎症からの透析導入数が緩やかになりつつある。この事実は、これまでの腎症研究ならびに治療戦略が正しかったことを示すと共に、今が腎症克服に向けた新規課題を提示すべき時期であることも示唆している。

新規腎症研究課題探索の為、当科外来における腎症病期の経年的変化を検討した。結果、蛋白尿の有病率は減少し、また腎症からの透析導入も減少していることから、これまでの蛋白尿軽減を主眼とした腎症治療が有効であったことがわかる。一方で予想外に、糖尿病症例で eGFR<60 となる症例数は逆に増加している。この腎機能低下に関連する因子を検討するために、蛋白尿期別に腎機能低下症例を検討した所、顕性蛋白尿期での腎機能低下症例は 20 年間変わらず多く存在していることが確認された。一方、正常・微量アルブミン尿期の中に腎機能低下症例が新たに増加していること、この背景には動脈硬化や加齢が関与していることが示された。このことは、蛋白尿が減少できない症例の腎予後が過去と変わらず悪いという事実、また新しく、蛋白尿は改善し透析導入は減少するものの、蛋白尿を呈さない腎機能低下症例が増加するという事実が明らかとなった。

この現象は米国からの報告にも合致しており、世界共通の課題であると考えられる。以上より、腎症研究の新規課題として、難治性顕性蛋白尿の病態解明、難治性顕性蛋白尿から腎機能低下に至る病態解明、非蛋白尿期に生じる腎機能低下の病態解明が挙げられ、これら難治性腎症に対する治療法を提言していくことが腎症克服に不可欠であると考えられる。

<mTORC1 と難治性腎症との関わり>

あらゆる生物の細胞内には、細胞外の栄養状態の変化を感知し、その変化に応じた細胞機能制御を行うための細胞内栄養感知シグナルを発達させている。その一つである The mammalian target of rapamycin (mTORC1)はインスリン、グルコース、アミノ酸によって活性化されるリン酸化酵素であり、豊富な栄養状態を感知し、オートファジーの抑制、蛋白合成の活性化、細胞増殖、細胞肥大をもたらす重要なシグナルである。その重要性は、各臓器における mTORC1 欠損がその臓器における機能障害をもたらすことから明らかである。しかし一方で、この mTORC1 の過剰亢進が腎症を含む糖尿病合併症や膵β細胞の機能異常に関与することを、我々の教室を含む多くのグループが報告している。特に、腎症における mTORC1 過剰亢進は高度蛋白尿の発症に関連するポドサイト障害の惹起、蛋白尿に伴う近位尿細管障害の悪化、並びに蛋白尿に依存しない尿細管障害の悪化といった、前述の新規腎症研究課題のすべての病態に関与していることを示してきた。このことから、糖尿病に伴う mTORC1 過剰亢進の抑制が、難治性腎症に対する新規治療標的になると期待している。

<ケトン体による臓器保護作用の報告並びに新規腎症治療標的としての可能性>

血中ケトン体上昇は 1 型糖尿病発症期におけるインスリン欠乏に起因したケトアシドーシスなどの原因となることから、身体に害を及ぼす物質と認識されやすいが、本来ケトン体は、絶食や飢餓時に肝臓で産生され、全身へ供給される重要なエネルギー(ATP)産生源である。近年、アシドーシスにならない程度の適度な血中ケトン体上昇が多くの臓器において臓器保護効果を示すという興味深い知見が得られている。また、新規糖尿病治療薬である SGLT2 阻害薬における心筋保護効果には同薬剤投与時に見られる血中ケトン上昇が不可欠であるとの仮説も提唱されており、現在、糖尿病合併症領域におけるケトン体の役割には多くの期待が持たれている。飢餓時、腎臓でもケトン体をエネルギー産生源として用いているが、ケトン体上昇と腎症改善に関する検討はなされていない。興味深いことに、培養細胞を用いた検討において、培養近位尿細管細胞に対する糖尿病関連刺激(高血糖、高脂肪酸血症、低酸素)による mTORC1 過剰亢進に伴う細胞死をケトン体である β ヒドロキシ酪酸(β-OHB)が有意に抑制するという新規の生物学的知見をすでに得ている。このことはケトン体上昇が mTORC1 抑制を介して腎症に対しても保護的な役割をする可能性を示している。そこで本研究では、主に動物モデルを用いて、ケトン体による mTORC1 抑制を介した新規腎症治療標的としての可能性を探索する。

2. 研究の目的

- 1) 糖尿病性腎症モデルマウスを用い、β-OHB の上昇が腎症改善効果を示すか否かを検討する。
- 3) β-OHB が mTORC1 過剰に伴う腎障害に対し抑制的に働きうるかを遺伝子改変による mTORC1 過剰マウスを用いて検討する。
- 4) SGLT2 阻害薬投与による β-OHB の上昇と腎症改善効果との関連を解析する。

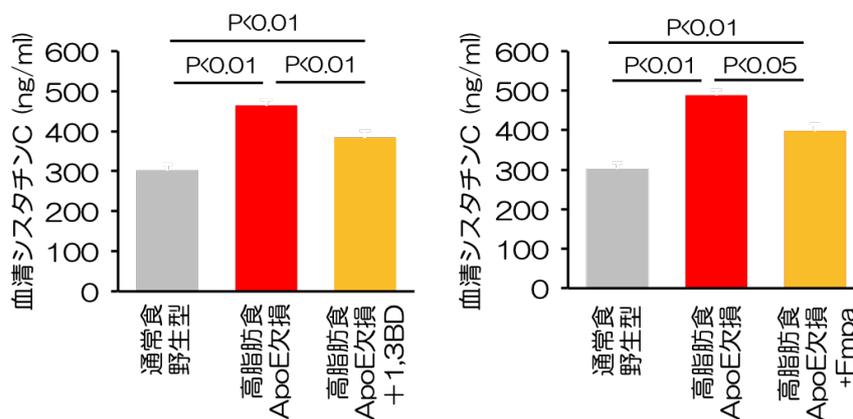
3. 研究の方法

- 1) β -OHB 上昇による糖尿病性腎症モデルマウスにおける腎症改善効果の検証。
- 2) 腎特異的 TSC1 欠損マウス(mTORC1 過剰亢進モデルマウス)を用いた mTORC1 過剰亢進に伴う腎障害に対する β -OHB による腎保護効果の検証。
- 3) SGLT2 阻害薬による腎症改善効果における β -OHB 上昇の役割の検証。

4. 研究成果

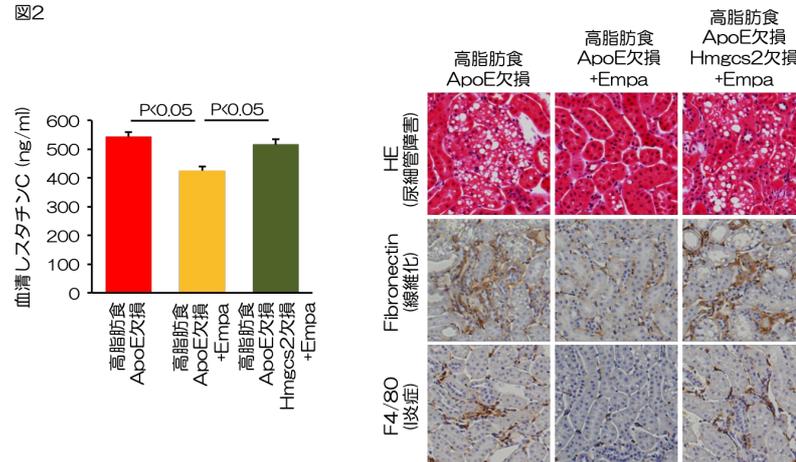
1) 本研究では、ApoE 欠損マウスに高脂肪食負荷を加えた動脈硬化+肥満 2 型糖尿病モデル (HFD-ApoE-KO) を作成し、エンパグリフロジン経口投与および肝臓で β -ヒドロキシ酪酸に変換されるケトン体前駆物質である 1,3-ブタンジオール(1,3-BD)経口投与による腎保護効果を検証した。通常食飼育の野生型マウスに比し、HFD-ApoE-KO マウスは、腎機能を示す血清シスタチン C の上昇および腎組織学的増悪を認めたが、エンパグリフロジンならびに 1,3-BD 治療は血中ケトン体濃度上昇を伴い、HFD-ApoE-KO マウスの腎機能および腎組織病変を改善させた (図 1)。

図 1



2) エンパグリフロジンの腎保護効果がケトン体上昇に付随するかどうかを検証するために、ケトン体合成律速酵素である Hmgcs2 と ApoE のダブルノックアウトマウス (ApoE/Hmgcs2-DKO) を作成し、高脂肪食負荷後、エンパグリフロジン治療を行った。HFD-ApoE/Hmgcs2-DKO マウスでは、エンパグリフロジン投与による血中ケトン体濃度上昇はなく、腎機能および腎組織病変の改善は認められなかった (図 2)。

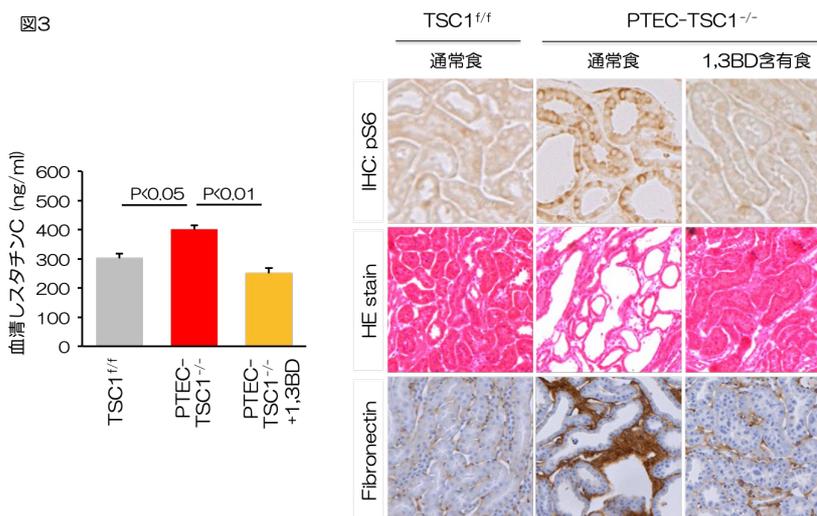
図 2



これらの実験より、血中ケトン体濃度上昇に依存した腎保護効果が確認されたことから、我々は、ケトン体によるエネルギー代謝のシフトに注目した。細胞の生命活動は ATP 産生に大きく依存し、哺乳類では、グルコース、脂肪酸、ケトン体が ATP 産生の主な基質となる。腎臓の近位尿細管細胞は特殊な細胞であり、ATP 産生の大部分を脂肪酸酸化という単一の基質代謝に依存していると考えられている。動脈硬化や低酸素などの障害が加わる状況下では、近位尿細管の脂肪酸酸化が低下することが想定され、ケトン体のミトコンドリアへの流入が ATP 産生の上昇をもたらしたことが示唆された。

3) 近年, The mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1)の過剰亢進が糖尿病に伴う各種臓器障害の進展に関わることが報告されており, 我々のグループでも糖尿病に伴う動脈硬化病変のような病態(低酸素・高血糖・高脂肪酸血症)において mTORC1 が亢進することを報告してきた。

HFD-ApoE-KO マウスの近位尿細管では mTORC1 活性を示す pS6 の免疫組織染色およびタンパク質レベルでの増大を認めましたが, エンパグリフロジン・1,3-BD 治療により改善が認められ, ケトン体による mTORC1 抑制が腎保護効果に寄与した可能性が示唆された。そこで, mTORC1 を負に抑制する上流蛋白である Tuberous sclerosis complex 1 (TSC1)を近位尿細管細胞特異的に欠損させたマウス(PTEC-TSC1-KO)を作成し, ケトン体の mTORC1 抑制効果を検証した。PTEC-TSC1-KO マウスでは, TSC1-f/f マウスに比し, 腎組織学的増悪と血清シスタチン C 上昇が認められたが, 1,3-BD 治療により全て改善した(図 3)。



本研究により, ケトン体による腎へのエネルギー供給および mTORC1 抑制が, 糖尿病に伴う動脈硬化に起因した腎機能低下に対する治療戦略となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 富田 一聖, 久米 真司, 武田 尚子, 大澤 紀之, 金崎 雅美, Eric Mayoux, 金子 達朗, 荒木 信一, 前川 聡. 経口ケトン体前駆物質投与は高脂肪食負荷肥満 ApoE 欠損マウスの腎障害を改善する. 第 61 回日本腎臓学会学術集会 (2018 年 6 月 8 日~10 日 新潟)

2) Tomita I, Kume S, Osawa N, Yamahara K, Yamahara M, Takeda N, Kanasaki M, Mayoux E, Kaneko T, Araki S, Maegawa H. Possible Role of Ketone Body Metabolism in SGLT2 Inhibitor-Mediated Renoprotection in High Fat Diet-Fed ApoE-Knockout Mice. Kidney Week 2018 (2018. San Diego, USA, American Society of Nephrology)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：富田一聖

ローマ字氏名：Issei Tomita

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。