

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09255

研究課題名(和文)慢性腎臓病・高血圧におけるフルクトース代謝の役割と分子機構の解明

研究課題名(英文)The role of fructose metabolism in the development of chronic kidney disease and hypertension.

研究代表者

石本 卓嗣 (ISHIMOTO, TAKUJI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00534835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、フルクトース代謝酵素ケトヘキソキナーゼ(KHK)によるフルクトース代謝と食塩感受性高血圧との関連を解明、およびフルクトースの長期・多量摂取による高血圧・慢性腎臓病の発症・進展機構を解明することである。本研究において、フルクトースと食塩の同時摂取は血圧を上昇させるが、KHK欠損マウスではその上昇が抑制されること、フルクトース代謝はKHK依存的に腎近位尿細管でのNHE3活性の亢進し、腎臓でのナトリウム再吸収を増加させることを見出した。フルクトース代謝はKHK依存的に腎近位尿細管でのNHE3活性の亢進し、ナトリウム再吸収を増加させる事で血圧を上昇することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the role of fructose metabolism by the primary enzyme of fructose, ketohexokinase (KHK) in hypertension. In this study, by using KHK knockout mice (KHK-KO), we found that the combination of fructose and high salt induced the elevation of blood pressure with decrease of sodium excretion and increase of mRNA expression of NHE3 in kidney in wild type mice (WT), but not in KHK-KO mice, and that fructose stimulation increased NHE activity accompanied by a decrease in intracellular cAMP that is dependent on KHK. These results suggest that fructose metabolism by KHK is involved in the development of salt-sensitive hypertension through increases of renal sodium reabsorption by NHE3.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：塩分感受性高血圧 フルクトース ケトヘキソキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

砂糖(フルクトースとグルコースの二糖)の消費量は同様に増加が続いており、特に果糖ブドウ糖液糖(55%フルクトース)が導入されて以降、消費量は飛躍的に増加している。これらの加糖食品・飲料に多量に含まれるフルクトース摂取量の増加と、肥満・高血圧・2型糖尿病・脂質異常症・心血管疾患・非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)との相関が疫学的に示されている。また、メタボリックシンドローム(MetS)の診断基準項目(肥満、血圧、血糖、高中性脂肪血症、低HDL血症)は個々が独立して慢性腎臓病(CKD)と相関し、該当する項目数の増加は腎機能低下との相関を強くする。

フルクトースは主にケトヘキソキナーゼ(KHK)によるリン酸化にて代謝される。その過程でATPを消費し、最終的に尿酸を産生する。KHKにはKHK-CとKHK-Aの2つのアイソフォームがあり(図1)、KHK-Cはフルクトースを急速に代謝し、脂肪酸合成・蓄積・ATP枯渇・尿酸産生・酸化ストレス・ミトコンドリア機能障害を惹起する。一方、ユビキタスに発現するKHK-Aは発現量も少なく、フルクトースへの結合力も弱いことからその役割は不明であった。我々はこれまでにフルクトース誘導性の肥満・高インスリン血症・脂質異常症・脂肪肝はKHK完全欠損マウス(KHK-A/C KO; KHK-null)においては認めず、一方KHK-A欠損マウス(KHK-A KO)においては増悪することを報告した(図2、Ishimoto T. PNAS 2012)。これらの結果は、フルクトースを急速に代謝し、発現量多いKHK-CはMetSを誘導し、ユビキタスに発現し緩徐にフルクトースを代謝するKHK-AはMetSの進展を抑制することを示唆するが、合併するCKD・高血圧におけるメカニズム及びKHK-C・KHK-Aの役割は解明されていない。

また、フルクトースの長期多量摂取とメタボリック症候群との関連に加え、これまでにフルクトース摂取は腎臓でのナトリウム再吸収・小腸でのナトリウム吸収を増強することが報告されており(Singh AK. Kidney Int 2008, Cabral PD.

Hypertension 2014)、フルクトース摂取と食塩感受性高血圧との関連が指摘されている。しかし、その機序及びフルクトースの代謝酵素であるKHKの役割は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では現在までの知見を更に進め、「慢性腎臓病及び高血圧におけるフルクトース代謝及びフルクトキナーゼ KHK-C・KHK-A の役割の解明」を目的とする。

3. 研究の方法

(1) フルクトース・食塩負荷モデルの検討

①野生型(WT)及びKHK欠損(KHK-A、KHK-C両方の欠損、KO)マウスに通常食(CD)・4%塩分負荷食(HSD)、それぞれに水・10%フルクトース水(Fr)を5週間与え、計8群を作成した。血圧測定・腎組織採取を行った。

WT及びKOマウスにCD及びFrを5週間与え、生理食塩水1.5mlの腹腔内投与後6時間まで採尿を行った。Study3; LLC PK1細胞に対してKHK siRNAを用い、フルクトース刺激におけるNHE(Na/H交換輸送体)の活性を比較した。

(2) フルクトース長期・多量摂取モデルの検討

野生型(C57BL6J)(WT)・KHK-A/C KO(KHK-A、KHK-C両方の欠損)・KHK-A KOマウスに通常食(CD)・60%フルクトース食を与え、体重・血圧を経時的に評価した。また、WT・KHK-A/C KO・KHK-A KOマウスに通常食(CD)・30%フルクトース食を与え、体重・血圧を経時的に評価した。血清Cr・尿酸、腎組織での定量的PCR、血液・尿・腎・肝・小腸組織を用いたメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

(1) フルクトース・食塩負荷モデルの検討

①WT HSD+Fr群において腎NHE3発現の

上昇を伴う有意な血圧上昇を認めましたが KO では認めず(図 1)、KO HSD+Fr 群において尿中 Na 排泄の有意な増加を認めた(図 2)、腎 NHE3 mRNA の発現は、WT において HSD+Wa 群および WT HSF+Fr 群にて有意に上昇していたが、KHK-KO では認めなかった。

	0 week	5 week
WT CD+Wa	106.8 ± 2.9	108.5 ± 2.1
WT CD+Fr	109.1 ± 3.7	106.8 ± 0.5
WT Sa+Wa	105.7 ± 2.7	108.5 ± 0.7
WT Sa+Fr	104.7 ± 3.7	116 ± 1.7 *
KO CD+Wa	107.1 ± 1.9	106.8 ± 2.4
KO CD+Fr	108.8 ± 2.2	107.5 ± 1.3
KO Sa+Wa	110.2 ± 0.5	105.8 ± 1.9
KO Sa+Fr	106.4 ± 1.9	106.1 ± 1.4

*. P < 0.05 vs KO Sa+Fr

図 1

図 2

WT において尿中 Na 排泄の有意な低下を認めた(図 3)。

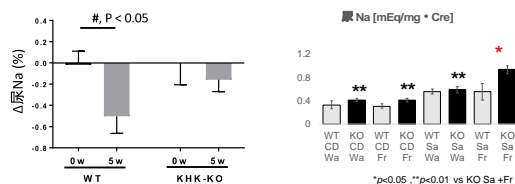


図 3

フルクトース濃度依存的に NHE 活性の有意な上昇を認め、細胞内 cAMP の有意な低下・リン酸化 NHE の低下傾向を伴っていた。一方、KHK のノックダウンにより NHE 活性の上昇は有意に抑制された。以上の結果より、フルクトース代謝は KHK 依存的に腎近位尿管での NHE3 活性の亢進し、ナトリウム再吸収を増加させる事で血圧を上昇することが示唆された。

(2) フルクトース長期・多量摂取モデルの検討
60%フルクトース食モデルにおいて、KHK-A/C KO マウスは著明な体重減少を認めたため、血圧・腎機能の評価に適さないと考えられたため、3ヶ月時点で終了とした。

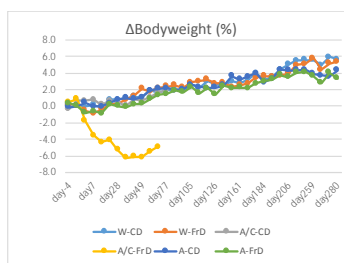


図 4

WT および KHK-A KO マウスにおいては、更に長期間の観察を行った。過去の報告と異なり、WT 含めた全群で明らかな血清 Cr の上昇は認めなかった。長期観察が可能であった WT・KHK-A KO マウスにおいて、WT でフルクトース負荷にて有意な収縮期血圧の上昇を認めたが、KHK-A KO では血圧の上昇を認めなかった (WT 121.2 ± 1.7, KHK-A KO 107.5 ± 1.4, P < 0.05)。しかし、腎組織の解析では、Na 再吸収に関連する分子(NHE3、レニン、ACE 等)および eNOS・iNOS・nNOS・HO-1 の mRNA 発現に有意な変化を認めなかった。また、30%フルクトース食モデルにおいては、全群で有意な血圧および腎機能の変化を認めなかった。また、血液・尿・腎・肝・小腸組織を用いたメタローム解析結果より、血圧変化と相関のある代謝物を探索している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

すべて査読あり

1. Doke T, Ishimoto T, Hayasaki T, Ikeda S, Hasebe M, Hirayama A, Soga T, Kato N, Kosugi T, Tsuboi N, Johnson RJ, and Lanaspas MA, Kadomatsu K, and Maruyama S, et al. Lacking Ketohexokinase-A Exacerbates Renal Injury in Streptozotocin-induced Diabetic Mice. *Metabolism*. 2018.
2. Lanaspas MA, Kuwabara M, Andres-Hernando A, Li N, Cicerchi C, Jensen T, Orlicky DJ, Roncal-Jimenez

- CA, Ishimoto T, Nakagawa T, et al. High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018.
3. Andres-Hernando A, Li N, Cicerchi C, Inaba S, Chen W, Roncal-Jimenez C, Le MT, Wempe MF, Milagres T, Ishimoto T, Fini M, Nakagawa T, Johnson RJ, and Lanaspas MA. Protective role of fructokinase blockade in the pathogenesis of acute kidney injury in mice. *Nat Commun*. 2017;8(14181).
 4. Song Z, Roncal-Jimenez CA, Lanaspas-Garcia MA, Oppelt SA, Kuwabara M, Jensen T, Milagres T, Andres-Hernando A, Ishimoto T, Garcia GE, Johnson G, MacLean PS, Sanchez-Lozada LG, Tolan DR, and Johnson RJ. Role of fructose and fructokinase in acute dehydration-induced vasopressin gene expression and secretion in mice. *J Neurophysiol*. 2017;117(2):646-54.
 5. Roncal-Jimenez CA, Ishimoto T, Lanaspas MA, Milagres T, Hernando AA, Jensen T, Miyazaki M, Doke T, Hayasaki T, Nakagawa T, Marumaya S, Long DA, Garcia GE, Kuwabara M, Sanchez-Lozada LG, Kang DH, and Johnson RJ. Aging-associated renal disease in mice is fructokinase dependent. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(4):F722-F30.
 6. Bjornstad P, Lanaspas MA, Ishimoto T, Kosugi T, Kume S, Jalal D, Maahs DM, Snell-Bergeon JK, Johnson RJ, and Nakagawa T. Fructose and uric acid in diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2015.
 7. Lanaspas MA, Epperson LE, Li N, Cicerchi C, Garcia GE, Roncal-Jimenez CA, Trostel J, Jain S, Mant CT, Rivard CJ, Ishimoto T, Shimada M, Sanchez-Lozada LG, Nakagawa T, Jani A, Stenvinkel P, Martin SL, and Johnson RJ. Opposing activity changes in AMP deaminase and AMP-activated protein kinase in the hibernating ground squirrel. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123509.
 8. Marek G, Pannu V, Shanmugham P, Pancione B, Mascia D, Crosson S, Ishimoto T, and Sautin YY. Adiponectin resistance and proinflammatory changes in the visceral adipose tissue induced by fructose consumption via ketohexokinase-dependent pathway. *Diabetes*. 2015;64(2):508-18.
- [学会発表](計 5 件)
1. Novel Role of Ketohexokinase-A in Experimental Diabetic Kidney Disease. T. Hayasaki, T. Ishimoto, T. Doke, T. Kosugi, M. A. Lanaspas, N. Tsuboi, R.J. Johnson, S. Maruyama ISN Frontiers Meeting 2018 (Tokyo)
 2. Combination of High Fructose and High Salt Increases Renal Sodium Reabsorption and Blood Pressure That Is Dependent on Ketohexokinase. T. Hayasaki, T. Ishimoto, T. Doke, T. Kosugi, M. A. Lanaspas, N. Tsuboi, R.J. Johnson, S. Maruyama. ISN Frontiers Meeting 2018 (Tokyo)
 3. Deficiency of Ketohexokinase-A Exacerbates Renal Tubular Injury in

Streptozotocin-Induced Diabetic Mice.
T. Doke, T. Ishimoto, T. Hayasaki, M.
A. Lanasp, R. J. Johnson, S.
Maruyama. Annual Kidney Week
Meeting of The American Society of
Nephrology (2017)

4. Endothelial Dysfunction in High Fat
Diet Fed Diabetic Mice Is Dependent
on Ketohexokinase. T. Doke, T.
Ishimoto, T. Hayasaki, M. Kawabe, M.
A. Lanasp, R. J. Johnson, S.
Maruyama. 50th Annual Kidney Week
Meeting of The American Society of
Nephrology (2017)

5. Combination of high fructose and high
salt affects sodium absorption and
induce the elevation of blood pressure
that is dependent on ketohexokinase. T.
Hayasaki, T. Ishimoto, T. Doke, T.
Kosugi, N. Tsuboi, R.J. Johnson, K.
Kadomatsu, S. Matsuo, S. Maruyama.
53nd Congress of the
European-Renal-Association/Europea
n-Dialysis-and-Transplant-Association
(ERA-EDTA) (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石本 卓嗣 (ISHIMOTO, Takuji)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 00534835

(2)研究分担者

丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 10362253

小杉 智規 (KOSUGI, Tomoki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 90584681