

令和元年6月1日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07203

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の局所インビボメタボロミクス解析及び代謝変容をターゲットとした治療

研究課題名(英文) In vivo metabolomic analysis and metabolic alteration-targeted treatment on diabetic nephropathy model .

研究代表者

久保 亜紀子 (KUBO, Akiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：50455573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は糖尿病性腎症の発症過程を組織レベルでのエネルギー代謝の面から評価し、代謝介入による治療法を見いだすことにある。我々はマウスモデルを用いて、キャピラリー電気泳動質量分析による定量とイメージング質量分析を組み合わせた方法でエネルギー代謝を可視化する方法を確立し、モデル動物と正常動物の比較を行った。この方法で部位別のエネルギー代謝を比較したところ、エネルギー代謝が分解方向にシフトしていると皮質のATPは減少し、分解産物であるヒポキサンチンが増加していた。このとき、キサンチンオキシダーゼ阻害剤を経口投与することで、ヒポキサンチンの分解が抑えられ、ATP量が回復することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症の実態をエネルギー代謝の面で評価することは、臨床研究では難しく、腎障害に至る過程の解明が望まれている。この研究では、マウスモデルを用いて、腎臓の領域ごとのエネルギー代謝の可視化解析法を開発し、エネルギー代謝とROSの発生が密接に関係することを明らかにした。エネルギー代謝が分解方向に傾いたときに、痛風の治療に用いられる経口薬を投与することで、腎保護につながるということがわかった。今後、心停止からの回復時、腎移植などの際にキサンチンオキシダーゼ阻害剤を投与することで、腎保護効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to find out how the diabetic nephropathy starts by analyzing local energy metabolism in situ. At first, we develop the method to visualize energy metabolism with healthy mice. The quantitative analyses with capillary-electrophoresis mass spectrometry combined with MALDI imaging mass spectrometry allowed us to know local metabolite contents of a frozen section. Then we compared the local energy metabolism between healthy mouse group and model disease mouse group.

When the energy metabolism status is low, ATP decreases and catabolic products such as hypoxanthine and xanthine increases. Hypoxanthine is converted into uric acid by xanthine oxidase which uses O₂ molecule and produces reactive oxygen species (ROS). We tried to prevent ROS production in murine kidney by adding xanthine oxidase inhibitor, and analyzed murine energy metabolism. Successfully xanthine oxidase inhibitor blocked hypoxanthine catabolism and promoted ATP production via salvage pathway.

研究分野：分析化学

キーワード：イメージング質量分析

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症により透析を行っている患者数は国内でも10万人を超えており、深刻な問題となっている。糖尿病から腎症に至る原因は高血糖による毛細血管の障害とメサンギウム細胞の変質と言われているが、高血糖がどのような形で糸球体を機能不全に至らせているのかは諸説があり、直接治療に結びつく知見は報告されていない。そのため、現在は血糖値をコントロールすると同時に降圧剤を用いて血圧を下げることで腎症発症を遅らせる治療が主流である。高血糖になると近位尿細管でSGLT2を介してナトリウムイオンと一緒に再吸収されるグルコースの量が増えるため、細胞内に流入したナトリウムを細胞外に汲み出すためのATPが多量に消費される。一方、近位尿細管には糖代謝の酵素はほとんど発現していないため、エネルギー産生は糖に依存していない事が知られている。血糖値を下げつつ、尿細管でのエネルギー産生の基質を与え、細胞にダメージを与えないような代謝を維持できれば高濃度の糖による細胞のダメージが軽減できるものと考えられる。本研究では、病態モデル動物を用いて、糖尿病性腎症発症過程における尿細管や糸球体でのエネルギー代謝変容の実態を*in vivo*メタボロミクス解析により把握する。次に、同位体標識化合物を投与し、TCAサイクルに取り込まれた同位体含有代謝物を定量する事により、糸球体や尿細管でエネルギー産生に利用される代謝基質の解明を試みる。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症の進展に伴う局所のエネルギー代謝の変化を基質供給、すなわち糖やアミノ酸、脂質などを出発点とするエネルギー代謝に注目して解析する。糖尿病を発症している生きた動物モデルを用いて定量的質量イメージングによる*in vivo*メタボロミクス解析を行うことで、エネルギー代謝のスイッチングの結果生じる代謝変化を時空間的に明らかにする。組織全体を対象とした従来の代謝研究と異なり、質量分析イメージング法を用いる事で、糸球体、尿細管、血管など、臓器を構成する細胞レベルで起きている代謝変化を可視化する事が可能になる。病態時の局所代謝を明らかにすることで、糖尿病性腎症発症機序の解明及び、代謝をターゲットとした治療法につながる基礎的知見を生み出すことが大いに期待される。

3. 研究の方法

近年の網羅的解析技術により病態時の分子代謝特性に関するメタボロミクス研究は大きな展開を迎えているが、その多くは摘出臓器や血清を用いた知見である。摘出臓器を用いる場合、臓器を構成している細胞を分取することは難しく、糸球体や尿細管などの微細な組織の代謝を計測することは不可能であった。一方、血清は入手が容易ではあるが、病変部でどのような代謝変化が起きているのか直接知ることが出来ない。糖尿病モデル動物を用い、糖尿病性腎症を発症している状態の腎臓を独自に開発した急速凍結法でサンプリングし、研究代表者らが開発した定量的質量分析イメージング法を用いた*in vivo*メタボロミクス解析を行う。実際には、キャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-TOF/MS)を用いた水溶性代謝物のメタボローム解析を行うのと並行して、顕微質量分析イメージングを行う。CE-TOF/MSは、非常に理論段数の大きな分離法であり、300種類以上の代謝物のライブラリが利用できるため、水溶性代謝物の分離分析には最適の方法である。マトリクス支援レーザー蒸散イオン化法(MALDI)を用いる質量分析イメージングでは、検量線による定量比較は難しいが、計測した視野内に存在する多数の代謝物由来のピークを同時に収集し、すべてのピークに関して測定視野内でのシグナル強度の分布を二次元的に出力する事が出来る。このような方法で、組織の形態を保った状態で、腎臓組織の代謝解析を行い、病態時の代謝、特にエネルギー代謝に関連する分子の動態を把握し、病態につながる代謝回路を特定する。さらに、可能であれば薬物投与による代謝介入で治療法を解明することを目的とする。

4. 研究成果

まず、糖尿病性腎症の発症過程をエネルギー代謝の面から評価するため、正常動物と病態モデル動物を用いて、CE-MSと質量分析イメージングを融合させた*in vivo*メタボロミクス解析を行い、皮質、髄質、皮髄境界でのエネルギー代謝関連代謝物の動態を評価した。具体的には、正常動物及び病態モデル動物から麻酔下で腎臓をサンプリングし、代謝物の分解を極力防ぐために1秒以内に液体窒素で凍結後、凍結切片を作製してイメージング質量分析を行った。イメージング質量分析用の検体は、腎臓の層状構造が全て含まれる切断面で切り出しを行い、測定後に染色された組織標本と比較しながら皮質、髄質、皮髄境界部それぞれ測定点からのシグナルを抽出した。イメージング質量分析では、組織切片中の物質含量の検量線の作製が出来ないため、別の方法で絶対定量を行う必要がある。そのため、イメージング質量分析と同様に、代謝物の分解を極力避ける方法でサンプリングした臓器全体から水溶性代謝物の抽出を行い、CE-MSによる定量解析を並行して行った。当初の計画では、左右にある腎臓のうち片方をイメージング質量分析に、他方を定量解析に用いる予定であったが、1秒以内に両腎を適切に回収する事が技術的に非常に難しい事が分かった。そのため、定量解析は1匹の動物あたり1個の腎臓だけをサンプリングし、5匹の定量値の平均を元にイメージング質量分析で得られたシグナル強度を半定量値に換算する方法に変更した。

次に、正常動物と病態モデル動物、さらに薬物を投与した病態モデル動物から腎臓のサンプリングを行い、CE-MSと質量分析イメージングを融合させたin vivoメタボロミクス解析を行った。それぞれのモデル動物群について、臓器のサンプリングを行う前に尿を採取して腎機能の評価を行い、腎障害の程度と、薬物による治療効果を皮質、髄質、皮髄境界でのエネルギー代謝関連代謝物の変化を元に評価した。

当初の計画では、2017年度には安定同位体で標識した化合物を病態モデルマウスに投与し、腎臓でのエネルギー代謝関連基質の代謝経路を特定する実験を予定していたが、2016年度に行ったIn vivoメタボロミクス解析の結果を検証すると、病態モデル動物の腎臓では核酸全体が分解されて減少しており、エネルギー代謝に必要な核酸の総量に大きな変化が認められた。すなわち、この病態においては核酸の喪失を防止することで、エネルギー代謝を回復させることが重要であることが示唆された。

そこで、病態モデル動物と正常動物に核酸の分解を抑制する代謝拮抗薬を投与し、腎臓のエネルギー代謝、および腎機能が薬物投与によって回復するかどうかを検討した。

当初の予想とは異なる方向からの治療アプローチではあるが、病態モデルマウスにおいて、代謝拮抗薬の投与が効果的である可能性が示唆された。

この研究の最終目標は糖尿病性腎症の発症過程を組織レベルでのエネルギー代謝の面から評価し、代謝介入による治療法を見いだすことであった。最初に、正常動物を用いて、CE-MSと質量分析イメージングを融合させたin vivoメタボロミクス解析を行うための実験法を開発し、腎皮質、髄質、皮髄境界でのエネルギー代謝関連代謝物の動態を評価した。次に、正常動物と病態モデル動物、さらに薬物を投与した病態モデル動物から腎臓のサンプリングを行い、開発した方法で、組織中のエネルギー代謝の半定量を行い、代謝動態を解析した。それぞれのモデル動物群について、臓器のサンプリングを行う前に尿を採取して腎機能の評価を行い、腎障害の程度と、薬物による治療効果を皮質、髄質、皮髄境界でのエネルギー代謝関連代謝物の変化を元に評価した。

マウス腎臓では、エネルギー代謝関連代謝物が最終排泄形である尿酸に代謝される過程で、キサンチンオキシダーゼ(XO)による代謝を受けるが、組織中のXOが酸化型になっている場合は、分子状酸素を基質とした反応が起き、活性酸素による酸化ストレス(ROS)が発生する。今回用いたモデル動物でも、XOによるROSが発生していると考えられる代謝動態が観察されたので、XO阻害薬を動物に投与し、腎機能と代謝動態を検討したところ、XO阻害薬投与によって、腎機能とエネルギー代謝の両方が改善していることがわかった。これらの動物実験の結果より、糖尿病性腎症に限らず、腎臓のアデニル酸代謝が分解方向にシフトし、XOによる酸化ストレス発生を伴う代謝反応が生じている場合には、XO阻害薬の投与によって、腎機能の改善とエネルギー代謝の改善が期待され、腎保護につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Oyaizu-Toramaru Tomoko, Suhara Tomohiro, Hayakawa Noriyo, Nakamura Takashi, **Kubo Akiko**, Minamishima Shizuka, Yamaguchi Kyoji, Hishiki Takako, Morisaki Hiroshi, Suematsu Makoto, Minamishima Yoji Andrew
Targeting Oxygen-Sensing Prolyl Hydroxylase for Metformin-Associated Lactic Acidosis Treatment. *Molecular and Cellular Biology* 2017年 e00248~17 査読あり
DOI: 10.1128/MCB.00248-17

(2) **久保亜紀子** 「質量分析イメージング」 *Medical Science Digest* 43巻 647-648 2017年 査読なし DOIコードなし

〔学会発表〕(計11件)

- (1) 藤井健太郎, 宮下和季, **久保亜紀子**, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 竜崎正毅, 末松誠, 伊藤裕 急性虚血性腎障害におけるフェブキスソタットによるATPブーストを介した腎保護メカニズムのマスイメージングを用いた可視化解析 第41回日本高血圧学会総会 2018年
- (2) 藤井健太郎, 宮下和季, **久保亜紀子**, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 竜崎正毅, 末松誠, 伊藤裕 A semi-quantitative mass imaging technique revealed region-specific alteration of adenylates in the murine kidney after transient ischemia and reno-protective effect of febuxostat by ameliorating ATP levels in the cortex. 第61回日本腎臓学会総会 2018年
- (3) 藤井健太郎, 宮下和季, **久保亜紀子**, 佐藤正明, 萩原あいか, 井上博之, 竜崎正毅, 末松誠, 伊藤裕 キサンチンオキシダーゼ阻害による虚血腎保護メカニズムのマスイメージングを用いた可視化解析 第91回日本内分泌学会総会 2018年
- (4) K. Miyashita, K. Fujii, **A. Kubo**, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh

Febuxostat exerted reno-protective effects after transient ischemia by promoting ATP recovery in the cortex: visualization of renal adenine nucleotides by an imaging mass-spectrometry technique 27th Scientific Meeting of International Society of Hypertension. 2018

- (5) K. Miyashita, K. Fujii, **A. Kubo**, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
A mass imaging technique revealed a reno-protective effect of the xanthine oxidase inhibitor febuxostat in the ischemic kidney by promoting ATP recovery in the cortex
28th Scientific Meeting of European Society of Hypertension. 2018
- (6) K. Fujii, K. Miyashita, **A. Kubo**, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
A semi-quantitative Imaging Mass Spectrometry revealed the reno-protective effect of febuxostat in the ischemic kidney by promoting ATP recovery in the cortex. 55th ERA-EDTA congress. 2018
- (7) **久保亜紀子**, 藤井健太郎, 宮下和季, 菱木貴子, 伊藤 裕, 末松 誠
MALDI 質量分析イメージング法によるマウス急性腎虚血におけるアデニル酸代謝解析
第 89 回日本生化学会年会 2016 年
- (8) **久保亜紀子**, 藤井健太郎, 宮下和季, 菱木貴子, 伊藤 裕, 末松 誠
Dense accumulation of adenosine in the outer stripes of outer medulla in murine kidney identified by microscopic MALDI-imaging mass spectrometry
21st International Mass Spectrometry Conference Toronto, 2016
- (9) **久保亜紀子**・藤井健太郎・中西 豪・宮下和季・伊藤 裕・末松 誠
質量分析イメージングが解く腎アデニル酸代謝のパラドクス
64回質量分析総合討論会 2016
- (10) 藤井 健太郎, 宮下 和季, **久保 亜紀子**, 佐藤 正明, 萩原 あいか, 井上 博之, 末松 誠, 伊藤 裕
質量分析イメージングによる腎皮髄境界におけるアデノシン集積の発見とアデノシン集積機構の解析 第59回 日本腎臓学会学術総会 2016年
- (11) K. Fujii, K. Miyashita, **A. Kubo**, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
Accumulation of adenosine in the outer stripes of outer medulla in murine kidney Identified by Matrix-Assisted laser Desorption/Ionization Imaging Mass spectrometry.
26th Scientific Meeting of International Society of Hypertension 2016年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮下 和季

ローマ字氏名：MIYASHITA, Kazutoshi

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：特任准教授

研究者番号(8桁): 50378759

(2)研究協力者

研究協力者氏名：藤井 健太郎

ローマ字氏名：FUJII, Kentaro

研究協力者氏名：佐藤 正明

ローマ字氏名：SATO, Masaaki

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。