

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09710

研究課題名（和文）マスイメージングによる腎代謝産物の解析に基づくSGLT2阻害薬の腎保護効果の解明

研究課題名（英文）Elucidation of renoprotective effects of an SGLT2 inhibitor through analysis of renal energy metabolism by an imaging mass spectrometry

研究代表者

萩原 あいか（HAGIWARA, Aika）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：00627052

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：マスイメージングによる腎代謝産物の可視化解析を行った結果、SGLT2阻害薬による尿糖増加に伴う腎糖低下が腎臓全体のエネルギー代謝を変容させ、解糖系中間代謝産物、アセチルCoAおよびTCA回路の低下、ATP低下およびアデノシン上昇をきたし、腎自律神経求心路を介して全身のエネルギー代謝にも影響を与える可能性が示唆された。またキサンチンオキシダーゼ阻害薬は腎血流不足に伴うATP低下をアデニル酸再合成の促進によって緩和し、腎保護効果を発揮する可能性が示唆された。以上の結果をふまえ、慢性腎臓病において、代謝変容の観点からの新規腎保護戦略の提案を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、申請者らは世界で初めて腎マスイメージングによるエネルギー代謝産物の可視化に成功し、その手法を用いてSGLT2阻害薬の腎保護効果を代謝変容の是正に着想した点に学術的意義があると考えます。また、今回検討したアデニル酸代謝、またそれら経路の代謝酵素を標的とした腎保護戦略は、全ての腎不全において最終共通経路である慢性腎虚血に対して有効となる可能性が考えられ、成因が多岐にわたる腎不全において非常に広い患者層での臨床応用が期待され、その社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：Metabolome analysis revealed a decrease in ATP level in the kidneys of tofogliflozin-treated mice and an increase in ATP degradation products, including adenosine. Direct injection of adenosine in the renal artery induced activation of HSL in the white and brown adipose tissues. These results indicate that the renal afferent nerves mediate the lipolytic effect of an SGLT2 inhibitor in obese mice. The alterations to the renal energy metabolism can play significant roles in the lipolysis through the renal afferent nerves and body weight reduction by tofogliflozin. An xanthine oxidase inhibitor, febuxostat, which blocks the degradation pathway of adenine nucleotides, promoted ATP recovery and exerted renoprotective effects in the postischemic kidney. These findings suggest a novel therapeutic approach for the chronic kidney disease through modification of renal metabolism.

研究分野：腎臓内分泌代謝内科学

キーワード：SGLT2阻害薬 アデニル酸代謝 腎保護効果

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、腎臓における代謝産物の解析はその手法が限定されており正確に把握することは困難であった。最近、新たに開発された手法であるマスイメージング (MALDI-IMS) にて、臓器内の低分子量エネルギー代謝産物 (以下、代謝産物と記す) を1ピクセル当たり50  $\mu\text{m}$  四方の解像度で可視化することが可能となった[1]。申請者らは慶應義塾大学医学部医化学教室との共同研究で、腎臓のマスイメージング手法の開発に挑戦し、腎臓における代謝産物の分布を可視化することに世界で初めて成功した。

(2) 慢性腎臓病 (CKD) は患者数1300万人に及ぶ国民病であり、その原因は糖尿病性腎症、高血圧性腎硬化症、糸球体腎炎など多岐に渡るが、尿細管間質の慢性虚血による尿細管細胞のアポトーシスがCKD進行の最終共通経路となることが報告されている[2]。ATP分解産物として知られるアデニンヌクレオシドであるアデノシンは、主に虚血部位で産生が亢進し[3]、腎虚血においては血管径調節、レニン分泌制御等を介して腎血流維持に働き、CKD進展の腎保護因子としての意義を果たすと考えられている。しかし、アデノシンそのものは非常に不安定な物質であり、腎臓における詳細な局在は知られていない。

(3) Sodium-glucose cotransporter (SGLT) 2阻害薬は、近位尿細管における糖輸送体であるSGLT2の阻害により尿糖排泄を亢進させ、血糖降下作用を示す薬剤である。大規模臨床研究EMPA-REG OUTCOME試験[4]において、SGLT2阻害薬であるエンパグリフロジン投与にて、アルブミン尿への進行を38%抑制し、血中クレアチニンの倍化を44%減少させることが報告された。この結果より、SGLT2阻害薬は血糖降下薬から“腎保護薬”としてのパラダイムシフトを起こしたが、その作用メカニズムは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、マスイメージングを用いてマウス腎臓のエネルギー代謝産物を可視化することで、EMPA-REG OUTCOME試験にて糖尿病性腎症の抑制効果が示された血糖降下薬であるSGLT2阻害薬の腎保護効果を解明する。また、虚血性腎障害のモデルマウスについて同様の解析を行い、SGLT2阻害薬の腎保護効果に腎血流維持を介したメカニズムの関与を検討する。それらの結果を踏まえ、代謝変容の観点からの新規腎保護戦略の提案と実現を目指す。

## 3. 研究の方法

(1)- これまで我々は、SGLT2阻害薬が腎自律神経求心路を介して脂肪交感神経を活性化し、体重減少作用を有する可能性を見出した。この知見を踏まえ申請者は、SGLT2 阻害薬による腎代謝産物の変容が腎保護作用を発揮する可能性を着想した。すなわち、SGLT2阻害薬による近位尿細管での糖分再吸収阻害が腎代謝産物を変容させ、それが腎自律神経求心路に影響を及ぼすとの仮説のもと、その腎自律神経求心路の活性化因子を探索した。我々は、高脂肪負荷(60% kcal)肥満マウスにSGLT2阻害薬であるトホグリフロジンを12週間投与し、マウス腎組織内の代謝小分子をキャピラリー電気泳動質量分析法を用いたメタボロームにて解析し、解糖系、TCA回

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

路、アデニル酸に関連した代謝産物を定量した。またマスイメージングを用いて、アデニル酸に関連した代謝産物のなかで虚血腎に対して腎保護分子として知られるアデノシンの解析を行った。

(1)- 次に我々は、腎代謝産物のうち、アデノシンが腎交感神経求心路の活性化因子である可能性を考え、肥満ラットの腎動脈にアデノシンを急性投与し、脂肪組織の活性化を評価した。高脂肪食負荷(60%kcal fat)肥満ラット(ウイスターラット)をコントロール群および腎除神経術(RDN)を施行した群に分け、腎動脈よりアデノシン(3 $\mu$ g)を注入し、脂肪組織(褐色脂肪、褐色脂肪組織周囲の白色脂肪、精巣上体周囲脂肪、皮下脂肪)における HSL 活性をウェスタンブロット法の p-HSL/HSL 比にて評価した。

(2)- 腎虚血に伴う急性腎障害(AKI)では、活性酸素種(ROS)産生の亢進に加え、糖質・脂質から ATP 産生に至る、腎臓のエネルギー代謝経路の変容が腎障害を惹起すると考えられている。そこで我々は、マスイメージングを用いて、マウス腎動脈クリッピングでの 10 分間の短時間虚血による AKI における腎エネルギー代謝変容を検討した。また、10 分虚血 24 時間再灌流(10mIR)の経過における、腎アデニル酸に関連した代謝産物の局在をマスイメージングにて腎臓の部位別に可視化して解析した。

(2)- アデニル酸に関連した代謝産物は肝臓や腎臓で分解され、尿酸に変換されて尿中に排泄される。フェブキソスタット(Feb)は、アデニル酸代謝経路のヒポキサンチンを尿酸に分解する経路の代謝酵素であるキサンチンオキシダーゼ(XO)を阻害する薬剤で、尿酸産生を抑える尿酸降下薬のひとつである。XO 阻害薬はヒポキサンチンからアデニル酸を再合成する代謝経路である、プリンサルベージ経路を促進する可能性が指摘されている。そこで我々は、10mIR を施行した AKI マウスの再灌流のタイミングにあわせて Feb を持続投与し、その腎保護効果を検討した。

## 4. 研究成果

(1)- 高脂肪食負荷マウスにトホグリフロジンを投与し、メタボロームおよびマスイメージング解析を行った。その結果、解糖系の中間代謝産物はトホグリフロジン投与で低下傾向がみられたが、ピルビン酸、乳酸は有意な変化を認めなかった。TCA 回路では、回路起点のアセチル CoA が有意に低下し、それに伴いクエン酸の低下がみられたが、回路後半のリンゴ酸は有意に蓄積していた。これらはアセチル CoA 低下に伴う TCA 回路の回転レベル低下を示唆する所見であった。アデニル酸代謝産物ではトホグリフロジン投与により ATP が低下傾向にあり、逆にその分解産物の AMP、アデノシンの有意な上昇がみられた(図 1)。したがって、細胞内のエネルギー代謝レベルを反映する指標である、アデニル酸エネルギーチャージ( $(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)$ )は有意に低下した。これらより SGLT2 阻害薬を投与したマウスの腎臓において、尿糖再吸収阻害に伴う腎のエネルギー代謝レベルが低下し、ATP の脱リン酸産物であるアデノシンが増加することが示された。マスイメージングにおいてもアデノシンの増加が認められた。アデノシンは腎虚血時

に血流維持に作用する一方で、腎自律神経求心路の主要な刺激物質としても知られており、SGLT2 阻害薬投与に伴う腎アデノシン増加が、腎自律神経求心路および脂肪交感神経の活性化を介して、その体重減少効果に関与する可能性が考えられた。

(1)- アデノシンの腎動脈注入により脂肪組織でのHSL活性が有意に上昇し、一方、RDNを施行した群ではアデノシン腎動脈注入による脂肪組織のHSL活性上昇を認めなかった。以上の結果より、SGLT2阻害薬による体重減少の機序として、SGLT 2 阻害薬の尿糖増加に伴う腎糖低下が腎代謝を変容させ、アデノシン上昇をきたし、そのシグナルが腎交感神経求心路を介して、脂肪組織交感神経を活性化させ、脂肪分解を亢進させる可能性が示唆された。以上より、SGLT2阻害薬は尿糖再吸収の低下、腎糖低下から腎臓全体のエネルギー代謝を変容させ、腎自律神経求心路を介して全身のエネルギー代謝にも影響を与える可能性が示唆された。

(2)- マウス腎動脈クリッピングによる 10 分間の短時間虚血による AKI について検討し、虚血モデルとして頻用される ROS 産生が顕著な 45 分虚血とは異なり、10 分虚血の AKI では ROS 産生は顕著ではなく組織学的な腎障害を認めないものの、尿中 Na 排泄分画 (FeNa) 低下を伴う腎不全を認めることを見出した。このことから腎 Na 再吸収を駆動する腎エネルギー代謝の低下が示唆された。10 分虚血 24 時間再灌流 (10mIR) の経過における、ATP、ADP から尿酸に至る、腎アデニル酸代謝産物の局在をマスイメージングにて腎臓の部位別に可視化して解析した。10 分間の短時間虚血で、近位尿細管が分布する腎皮質 (Cortex) および外側髄質外側線条 (OSOM) では ATP が低下し、総アデニル酸 (ATP+ADP+AMP) の喪失を生じた。一方、外側髄質内側線条 (ISOM) および内側髄質 (IM) では総アデニル酸の喪失は生じなかった。24 時間の再灌流による腎皮質および OSOM での総アデニル酸の回復は、虚血前の 80%程度にとどまり、その結果として再灌流後も ATP 低下が遷延した。これらの所見から、ROS 産生が顕著ではない短時間虚血において AKI が生じる機構に、虚血に伴う腎皮質の総アデニル酸低下に伴う ATP 低下の関与を考えた。また、短期間の虚血に伴う AKI の新しい治療戦略として、虚血により喪失した腎皮質の総アデニル酸の回復が有用との仮説を立てた。

(2)- マスイメージングを用いた解析で、Feb を投与したマウスでは、虚血再灌流 24 時間後における、腎皮質の ATP レベルが上昇し、腎障害が緩和されることを見出した。ATP から尿酸への分解過程にあるヒポキサンチンが増加していたことから、ATP レベルの上昇は、ヒポキサンチンからアデニル酸への再合成が促進することでもたらされる可能性が考えられた。腎尿細管細胞を用いた検討において、プリンサルベージ経路でアデニル酸を再合成する酵素であるヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (HRPT1) を阻害すると、Feb による ATP 回復の促進が消失した。これらの結果から Feb は、血流不足に伴う ATP レベルの低下を、アデニル酸再合成の促進によって緩和し、腎保護効果を発揮することが明らかになった (図 2)。皮質 ATP レベルの低下が腎不全進展に関与し、ATP 代謝の制御が腎不全の新たな治療戦略になると示唆された。マウスで示された、XO 阻害によるアデニル酸再合成促進を介した腎保護効果が、ヒトにおいても有効であるかを検証する今後の研究が期待される。

図1. SGLT2 阻害薬投与による腎糖代謝低下およびアデノシン増加

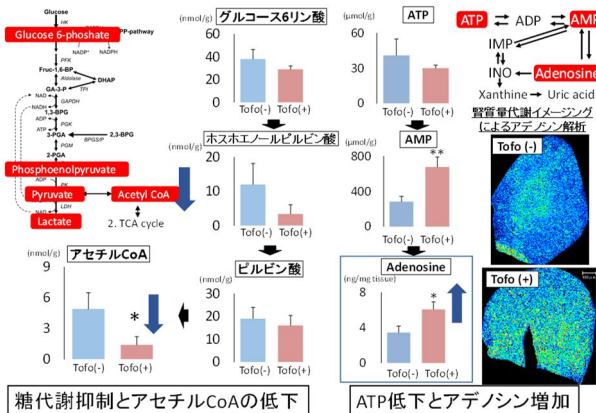
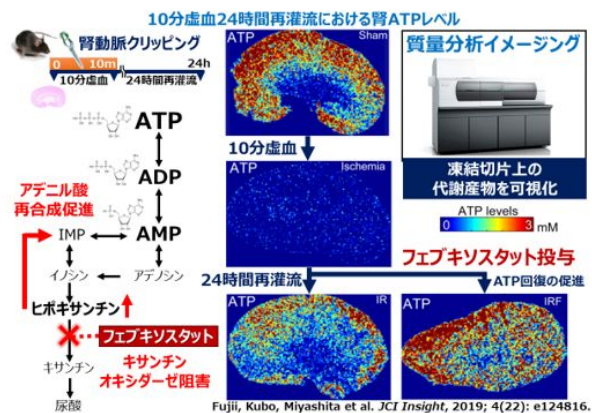


図2. フェブキソスタットによるATP回復の促進と腎保護効果



< 引用文献 >

- [1] Muller L et al. Kidney Int. 88: 186, 2015
- [2] Leon G. Fine et al. Kidney Int. 74: 867, 2008
- [3] Yamazoe S et al. ACS Nano. 24: 8(6): 5622, 2014
- [4] Christoph W et al. N Engl J Med. 375: 323, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kentaro Fujii, Akiko Kubo, Kazutoshi Miyashita, Masaaki Sato, Aika Hagiwara, Hiroyuki Inoue, Masaki Ryuzaki, Masanori Tamaki, Takako Hishiki, Noriyo Hayakawa, Yasuaki Kabe, Hiroshi Itoh, and Makoto Suematsu	4. 巻 4
2. 論文標題 Xanthine oxidase inhibitor ameliorates postischemic renal injury in mice by promoting resynthesis of adenine nucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCI insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.124816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 日本腎臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本内分泌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Fujii, K. Miyashita, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
2. 発表標題 Renoprotective effect of adenosine by vasodilatation via A2B receptor activation.
3. 学会等名 ISN FRONTIERS MEETINGS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Fujii, K. Miyashita, A. Kubo, M. Sato, A. Hagiwara, H. Inoue, M. Suematsu, H. Itoh
2. 発表標題 ADENOSINE A2 RECEPTORS ARE INDISPENSABLE FOR THE MAINTANANCE OF RENAL BLOOD FLOW UNDER ACUTE ISCHEMIA.
3. 学会等名 54th ERA-EDTA congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 腎皮髄境界アデノシンによる虚血腎保護効果の検討
3. 学会等名 第40回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 萩原 あいか, 宮下 和季, 井上 博之, 藤井 健太郎, 宇都 飛鳥, 遠藤 翔, 竜崎 正毅, 伊藤 裕
2. 発表標題 抗糖尿病治療薬の心血管・臓器保護効果を考える SGLT2阻害薬による腎アデノシン代謝制御の抗肥満作用
3. 学会等名 第40回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 萩原 あいか, 宮下 和季, 佐藤 正明, 井上 博之, 藤井 健太郎, 伊藤 裕
2. 発表標題 SGLT2阻害薬による体重減少における腎アデノシンの意義
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fujii Kentaro, Miyashita Kazutoshi <sup>1</sup> , Kubo Akiko <sup>1</sup> , Sato Masaaki <sup>1</sup> , Hagiwara Aika <sup>1</sup> , Inoue Hiroyuki <sup>1</sup> , Ryuzaki Masaki <sup>1</sup> , Endo Sho <sup>1</sup> , Uto Asuka <sup>1</sup> , Kinouchi Kenichiro <sup>1</sup> , Suematsu Makoto <sup>1</sup> , Itoh Hiroshi <sup>1</sup>
2. 発表標題 DISTRIBUTION OF ADENOSINE IN THE KIDNEY DETERMINES
3. 学会等名 56th ERA-EDTA congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
連携研究者	宮下 和季  (MIYASHITA Kazutoshi)  (50378759)	慶應義塾大学・医学部・特任講師   (32612)	
連携研究者	伊藤 裕  (ITOH Hiroshi)  (40252457)	慶應義塾大学・医学部・教授   (32612)	