

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09836

研究課題名(和文) SGLT2阻害薬による腎糖代謝の変化と糖尿病腎症発症への影響に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of effects for metabolic changes in kidney and diabetic nephropathy by SGLT2 inhibitor

研究代表者

河島 淳司 (Kawashima, Junji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70467984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト近位尿細管上皮の培養細胞を用いて腎臓の糖代謝に対するSGLT2阻害薬 canagliflozinの効果を検証した。1) 高グルコース培養の細胞にて亢進していた解糖系代謝経路が canagliflozinによって抑制された。2) canagliflozinによりペントースリン酸経路、グリコーゲン合成経路、ポリオール代謝経路も抑制され、細胞内AMPとATPが低下した。

以上の結果より、SGLT2阻害薬 canagliflozinは近位尿細管上皮細胞の様々な糖代謝経路を抑制することが明らかとなった。SGLT2阻害薬は、腎臓の糖代謝を変化させることにより糖尿病腎症の発症・進展を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者の治療目標は血糖コントロールのみならず、糖尿病網膜症などの糖尿病合併症の発症・進展の予防となるが、多額の医療費が必要となる糖尿病腎症による透析導入は患者自身のQOLを妨げるだけでなく、医療経済的にも非常に重要な問題である。経口血糖降下薬であるSGLT2阻害薬は糖尿病腎症の発症・進展を抑制することが臨床的に報告されているが、その詳細なメカニズムは分かっていなかった。

今回の研究により、SGLT2阻害薬は血糖値を下げるだけでなく、腎臓自体の糖代謝を変化させることで糖尿病腎症の発症・進展を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of a SGLT2 inhibitor, canagliflozin, for glucose metabolism in kidney itself. Although glycolysis pathway was exacerbated in human renal proximal tubular epithelium cells cultured in high-glucose medium, canagliflozin reduced the glycolysis pathway. Canagliflozin also inhibited the metabolic pathways of pentose phosphate, glycogen synthesis and polyol, and decreased cellular AMP and ATP.

This results indicated that SGLT2 inhibitors might block the progression of diabetic nephropathy by inhibition of various metabolic pathways in kidney.

研究分野：代謝・内分泌

キーワード：糖尿病性腎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血糖値を正常に維持するにはインスリンを分泌する膵臓やインスリン感受性組織である肝臓、筋肉、脂肪組織などの機能が重要であるが、腎臓も重要な臓器の一つとして考えられており、血糖維持に腎臓が積極的に関与していることが明らかになっている。糖の再吸収に関与するタンパク質 sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) と SGLT2 が腎近位尿細管に発現しており、SGLT2 阻害薬が抗糖尿病薬として上市されて以降、近位尿細管における糖再吸収だけでなく、腎における糖代謝にも注目が集まるようになってきた。

2型糖尿病患者や糖尿病モデル動物における腎でのグリコーゲン代謝に関する研究がいくつか報告されているが、腎臓におけるグリコーゲンの調整やその役割、さらには SGLT2 による腎グリコーゲンの制御についてはほとんど明らかになっていない。さらにグリコーゲンと同様に、SGLT2 阻害薬は腎の糖新生にも影響を及ぼしていると報告されており、そのメカニズムや腎尿細管細胞自体の糖代謝の変化については不明なままである。

最近の大規模臨床研究で、SGLT2 阻害薬が糖尿病腎症の発症・進展を抑制することが報告されたが、腎臓でのグリコーゲン蓄積が糖尿病腎症の発症・進展に関与していることが報告されていることから、SGLT2 阻害薬が腎グリコーゲン代謝や糖新生の変化を介して糖尿病腎症の発症・進展を抑制している可能性が考えられる。また、腎臓には細胞内エネルギーセンサーである AMP-activated protein kinase (AMPK) が発現しており、AMPK 活性が腎でのグリコーゲン合成を調整していると報告されているため、糖尿病患者の腎臓では AMPK を介してグリコーゲン代謝が制御され、糖尿病腎症の発症・進展に関与している可能性も考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では SGLT2 阻害薬投与下でメタボローム解析を行い、SGLT2 阻害薬の腎に対する糖代謝やグリコーゲン代謝に与える影響を検討する。さらには腎グリコーゲン代謝が糖尿病腎症の発症・進展に与える影響を検討することを目的とする。また、腎臓における糖代謝やグリコーゲン代謝に対して AMPK がどのように関与しているかについて検討する。

### 3. 研究の方法

ヒト近位尿細管上皮細胞の継代培養細胞である RPTEC/TERT1 を用いて実験を行った。また、SGLT2 阻害薬として canagliflozin を使用した。RPTEC/TERT1 細胞を、正常血糖と同程度のグルコース濃度 (100 mg/dL) と高血糖状態のグルコース濃度 (500 mg/dL) で培養し、それぞれのグルコース濃度に canagliflozin を加え培養を行った。

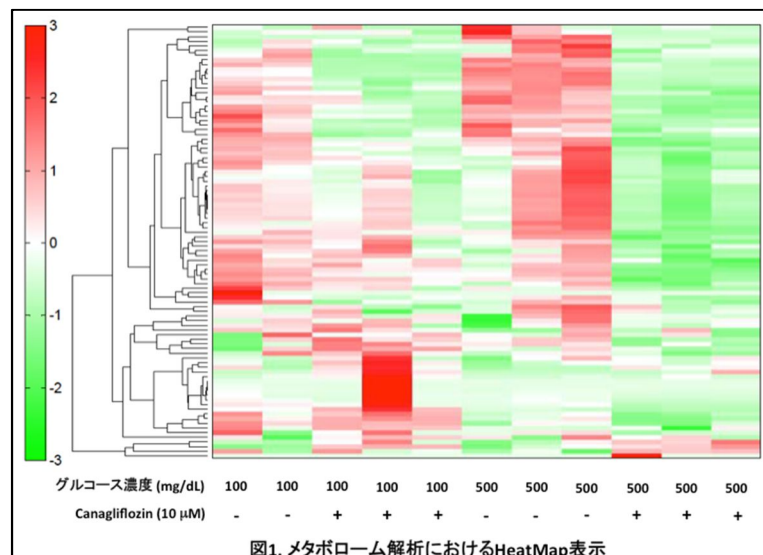
- ① 5.6 mM (100 mg/dL) グルコース濃度で培養 (LowG-Control)
- ② 5.6 mM (100 mg/dL) グルコース濃度に 10  $\mu$ M canagliflozin を添加 (LowG-CAN)
- ③ 27.8 mM (500 mg/dL) グルコース濃度で培養 (HighG-Control)
- ④ 27.8 mM (500 mg/dL) グルコース濃度に 10  $\mu$ M canagliflozin を添加 (HighG-CAN)

上記の条件で 24 時間培養した細胞のメタボローム解析を行った。次に上記の条件で 24 時間培養した細胞内のグリコーゲン量を測定した。さらに、上記の条件で 24 時間培養した細胞内のフルクトース量を測定した。最後に上記の条件で 24 時間培養した細胞内の AMP と ATP 量を測定し、AMPK 活性を測定した。

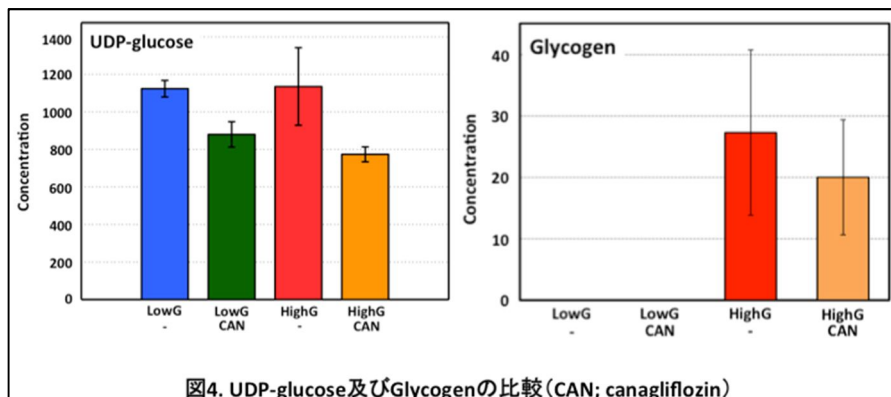
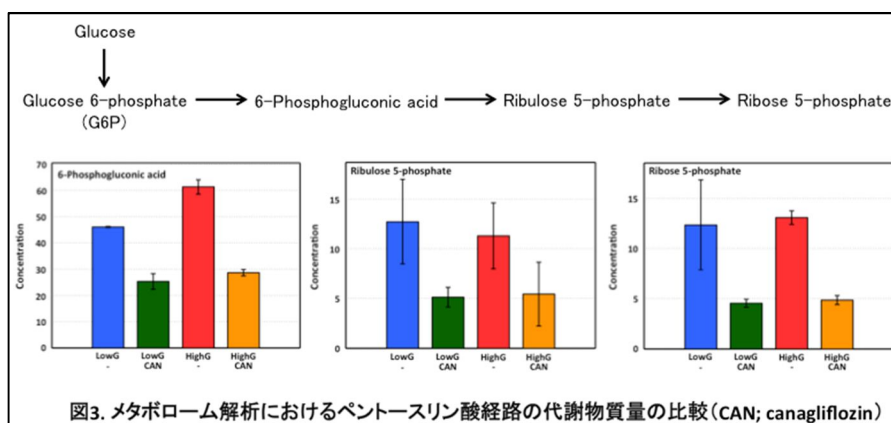
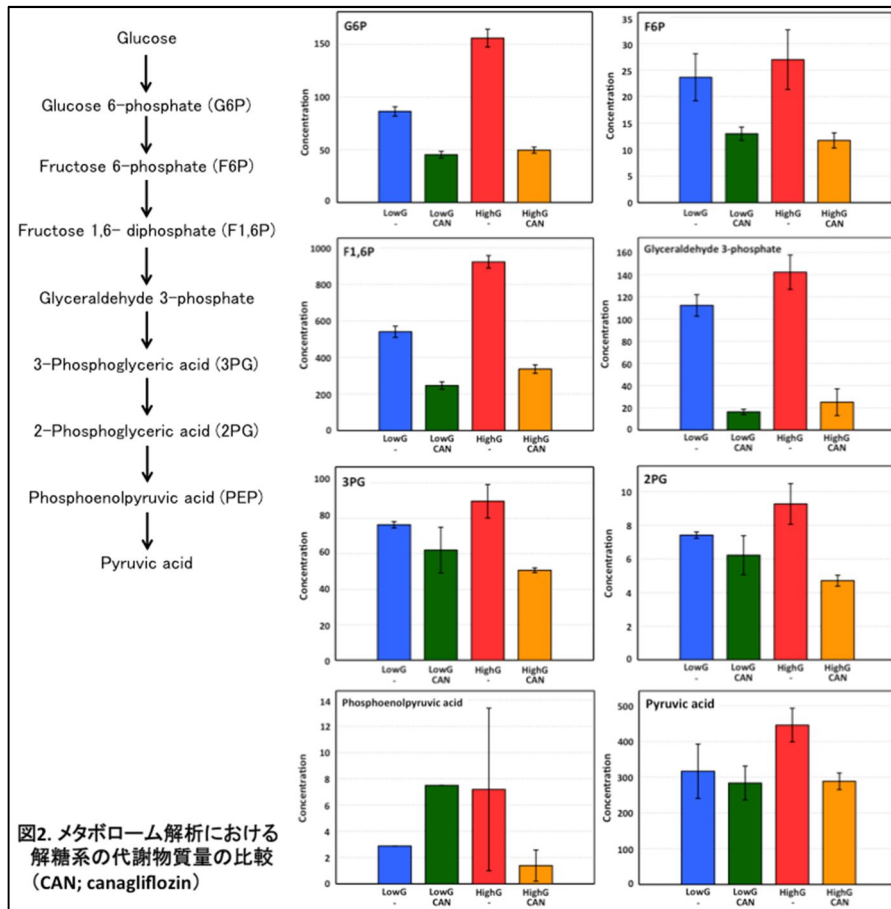
### 4. 研究成果

CE-TOFMS 及び CE-QqQMS を用いて RPTEC/TERT1 細胞の代謝物質を解析した。測定対象として、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、ポリアミン・クレアチン代謝経路、プリン代謝経路、グルタチオン代謝経路、ニコチンアミド代謝経路、コリン代謝経路および各種アミノ酸代謝経路にて主要な役割を占める 116 種の代謝物質を選出し、解析を行った。検出された代謝物質を用いて階層的クラスタリングを行い、HeatMap させた結果を図 1 に示した。

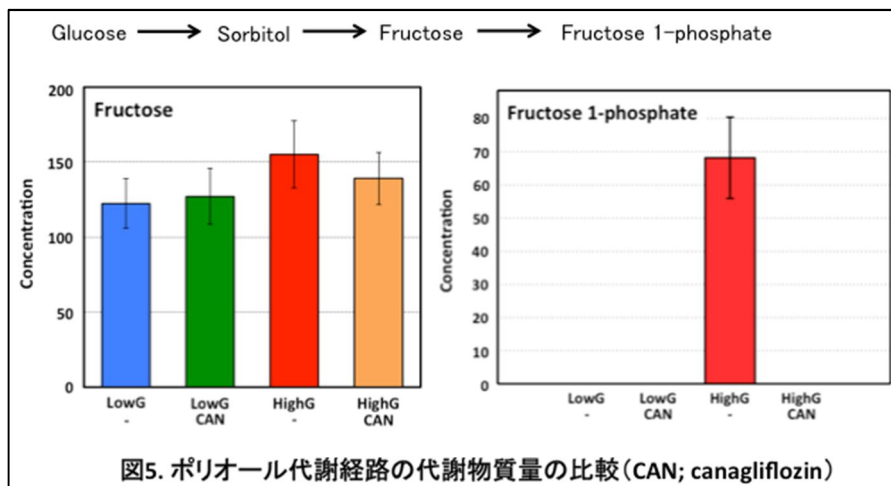
HeatMap の結果から、条件 ② もしくは ④ の canagliflozin が添加された培養液で culture された RPTEC/TERT1 細胞では代謝が大きく変動していることが明らかとなった (図 1)。この HeatMap 上のそれぞれの化合物を代謝経路に当てはめ、代謝



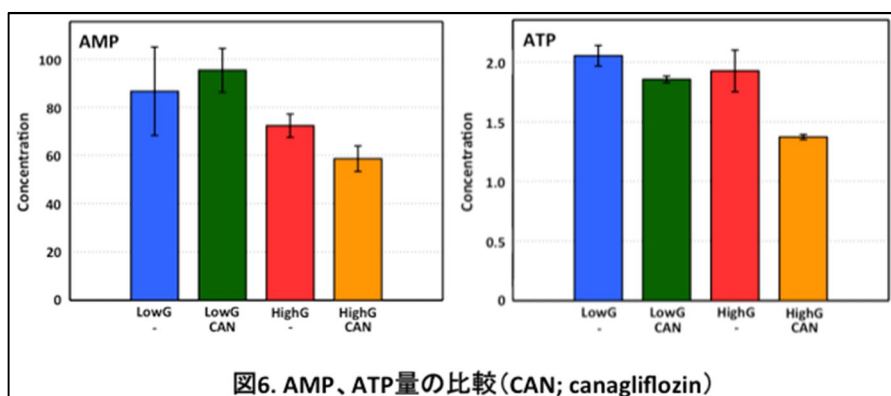
経路の変動を比較したところ、高グルコース培養下で亢進していた解糖系の代謝経路が canagliflozin によって抑制されていた (図 2)。また、canagliflozin は解糖系と同様にペントースリン酸経路も抑制していた (図 3)。グリコーゲンの構成物質である UDP-グルコースは、canagliflozin によって低下していた (図 4)。条件 1 と 2 の低グルコース培養下ではグリコーゲン量は測定感度以下であったが、条件 1 の高グルコース培養下で見られたグリコーゲン量の増加は canagliflozin によって約 25%低下した (図 4)。



フルクトースの代謝物質であるフルクトース-1-リン酸が高グルコース条件で上昇し、canagliflozin によってその上昇が抑制されていた(図5)。それぞれの条件下で培養された細胞のフルクトース量を測定したところ、フルクトース量は高グルコース培養で上昇していたが、その上昇は canagliflozin によって抑制された(図5)。従って、高血糖により誘導されたポリオール代謝経路は SGLT2 阻害薬である canagliflozin により抑制されると考えられた。



高グルコース条件で培養した③と④の細胞の AMP 量は、低グルコース条件で培養した①の細胞と比べて有意に低下していたが、条件③の高グルコースで培養された細胞よりも高グルコースに canagliflozin が添加された条件④の方がより AMP 量が低下していた(図6)。しかしながら、ATP 量は条件①の細胞と比べて、条件④の細胞が有意に少なく、条件③で培養された細胞よりも canagliflozin が添加された④の方が有意に ATP 量が少なかった。AMP/ATP 比はいずれの群でも有意差がなく、AMPK 活性も差がなかった。



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	荒木 栄一  (Araki Eiichi)  (10253733)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授    (17401)	