

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06893

研究課題名（和文）腎尿細管糖取り込み調節による心腎血管障害治療戦略の構築

研究課題名（英文）regulating glucose uptake in renal proximal tubules for treating chronic cardiorenal failure.

研究代表者

中野 大介（Nakano, Daisuke）

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30524178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：SGLT2阻害薬が腎臓における糖の動態に与える影響と臓器保護効果について検討した。申請時の予備実験データと合わせて、正常尿細管においてはSGLT2の阻害は糖の取り込み動態に影響を与えないこと、障害尿細管におけるSGLT2の阻害が糖取り込みを減少させること、糖取り込みの減少はVEGFA分泌を促し、障害腎において毛細血管網再構築を促すことがわかった。VEGFAは血管透過性を亢進するが、SGLT2阻害薬による浮腫は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SGLT2阻害薬は臓器保護効果を示す糖尿病治療薬として注目を集めている。我々は、そのメカニズムの一端が、障害を受けた組織毛細血管網の再構築にあることを見出した。そして、一般的な予想とは異なり、正常細胞における糖取り込みはほとんど影響を受けないこと、障害細胞でのみそれを阻害し、障害軽減機序を活性化することを発見した。

研究成果の概要（英文）：We examined the reno-protective effects of SGLT2 inhibitors and its mechanism. Our data elucidated that the inhibitors for SGLT2 do not suppress the glucose uptake in the healthy proximal tubular cells, and that it does in the injured tubular cells. The kinetics of glucose uptake depends on GLUT2 that could be downregulated by the damage. The cells suppressed extracellular glucose uptake by the combination with cell damage and SGLT2 inhibition, upregulated angiogenic factors, such as VEGFA. This contributed to the reconstruction of capillary network in the kidney. The glucose uptake in the proximal tubules was unaffected even under the hyperglycemic or hypoglycemic condition, by SGLT2 inhibitor treatment.

研究分野：薬理学、腎臓内科学

キーワード：SGLT2 GLUT2 腎臓 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

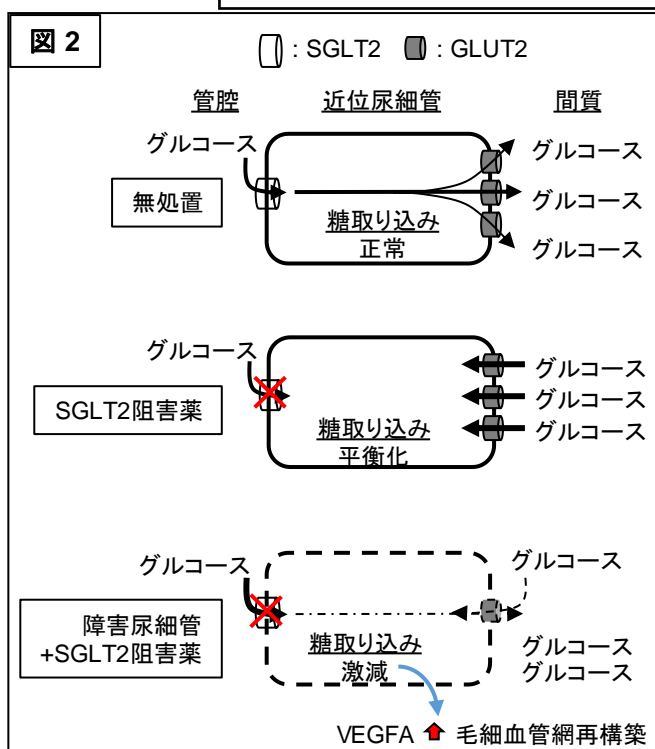
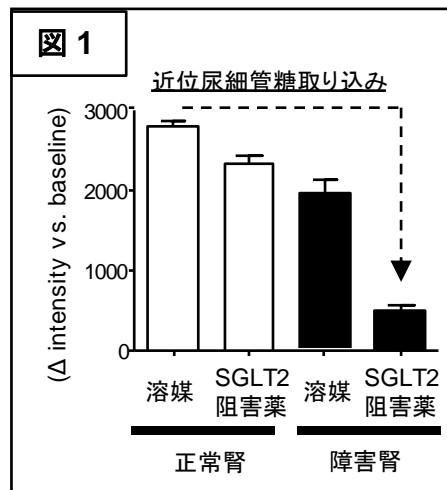
Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) は腎近位尿細管の管腔側、刷子縁膜に発現するトランスポーターで、正常時では糸球体にてろ過されたブドウ糖の約 90%を再吸収すると言われていいる。糖尿病における尿糖は、血糖値の上昇により、この再吸収が追いつかなくなることにより生じるものである。近位尿細管において取り込まれたブドウ糖は血液中に再吸収され再利用される。すなわち、SGLT2 の薬理的阻害は、血液中に回帰するはずのブドウ糖を尿中に排泄させることにより、血糖値の降下を誘導する。SGLT2 阻害薬の開発当初、この尿細管における糖取り込みの阻害が細胞エネルギー (ATP) 産生に影響を与えるのではないかと議論がなされたが、1) 遺伝性腎性糖尿 (SGLT2 遺伝子変異) では腎機能に明白な異常は認められないこと、2) ノックアウトマウスの腎機能も正常であること、3) 尿細管細胞は β 酸化により ATP を産生できることから、上記の懸念を否定する流れが形成された。

しかしながら、申請者は、発生時から特定の遺伝子を欠損した状態と、薬物による阻害の影響を同列で思考することはできないと考えている。また、細胞における糖の役割は ATP 産生に限らない (糖鎖生成、糖応答領域への影響等) ことから、SGLT2 阻害薬によってもたらされる腎機能変化が「ない、あるいは微小である」と結論付けるのは早計であると考えている。事実、EMPA-REG OUTCOME 試験 (Zinman et al. NEJM 2015、Wanner et al. NEJM 2016) や CANVAS-P 試験 (Neal et al. NEJM 2017) などの大規模臨床試験においては、心血管イベント死や透析導入率の低下が確認された。複数の薬物で確認されているため、この効果は SGLT2 阻害によるものだと受け止められている。血糖降下薬で心血管イベント予防が確認されたことは初めてであり、ブレイクスルーである。近位尿細管を標的とする SGLT2 阻害薬が、心血管腎に対して保護的に作用して人の命を救うメカニズムは、まだ全く明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究計画を開始する時点で既に得ていた予行実験データを図 1 に、それに基づいた作業仮説を図 2 に示す。本研究における仮説の土台は、尿細管細胞における糖取り込み不全と血管保護・新生因子の産生・分泌である。SGLT2 阻害薬による糖取り込みの減少は無条件に起こるわけではない。申請者は正常個体の近位尿細管において、SGLT2 阻害薬が抑制する糖取り込みは 20%以下であることを観察している (図 1)。これは図 2 に示すとおり、刷子縁膜における糖取り込みを阻害したところで、基底膜にて GLUT2 が逆向きに作動し、細胞内へと糖を補充するからである (=実際には正常な状態では糖取り込み不全は起きない)。申請者は独自に開発した生体イメージングによる糖取り込み能測定法により、これを確認することに成功した。また、尿細管細胞の極性が変わるような障害時では、GLUT2 が機能せず、SGLT2 阻害薬により急速に細胞内糖取り込み不全が生じること、糖取り込み不全が VEGFA の分泌を促し、傍尿細管毛細血管の再構築が進むこと、これにより腎線維化が軽減されることまで確認している。これは大規模臨床試験における SGLT2 阻害薬の効果を説明するものである。この仮説は全て申請者自身の研究結果から導かれたものであり、極めて独創性は高い。

本研究計画では、この糖取り込み不全から内分泌細胞化へのプロセスを明らかにするとともに、分泌された血管新生因子が心血管保護に働くことによって、心腎連関が産みだされる可能性について検討することを予定していた。本研究計画により腎臓を発端とした心血管系保護効果が確認できれば、糖尿病に限らない種々の病態における臓器保護戦略まで組み立てることができるからである。



3. 研究の方法

虚血再灌流動物モデル

雄性 C57Bl/6 マウス (5 週齢) を用いた。麻酔下にて腎虚血再灌流モデルを作製する。本モデルは 37°C に体温を保った動物の片腎動脈を 30 分クランプすることにより作製した。急性腎障害の影響を観る目的で、急性腎障害を生じる片腎摘処置済 (10 日前) マウスと片腎摘なしの 2 腎 1 側虚血再灌流モデルを用いた。急性腎障害モデルでは、経時的に尿量、血糖値、血中尿素窒素を測定し、SGLT2 阻害薬投薬処置による影響を比較した。また虚血再灌流処置 7 日および 28 日後に腎臓を摘出し、腎線維化を評価した。一部の動物群には VEGF 受容体阻害薬 (スーテント®) を処置した。

組織化学的評価

ヘマトキシリン・エオシン染色、シリウスレッド染色およびアザン染色により行った。腎虚血再灌流処置により引き起こされる線維化は膠原繊維によるものが顕著であるため、エラスティカワンギーソン染色は行っていない。

免疫反応により、CD31 陽性内皮細胞、NG2 陽性周皮細胞、Ki67 および BrdU 陽性分裂細胞、ピモニダゾール陽性低酸素領域、SGLT2 陽性近位尿細管細胞を染色した。

腎障害モデル

Wistar 系ラットにアデニン (200 mg/kg、10 日間) を処置した。その後、6 週間飼育し、腎障害を進展させた。

糖尿病モデル

雄性 C57Bl/6 マウス (5 週齢) を用いた。ストレプトゾトシンを腹腔内投与し、5 日目に血糖値を測定して、発症を確認した。高血糖の影響を観る目的で、腎症を発症していない 7 日目のマウスを用いた。

低血糖モデル

雄性 C57Bl/6 マウス (5 週齢) を用いた。下記、生体イメージングのセッティングを済ませた後、インスリンを腹腔内投与することにより低血糖を誘導した。

SGLT2 阻害薬

ルセオグリフロジン (10 mg/kg/day、経口投与、3 日間) を用いた。これらは大正製薬より供与頂いた。

糖取り込みイメージング

[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) を 2 あるいは 6 mg/kg 静脈内投与することにより、糖の動態を観察した。腎臓の糸状体イメージングは我々の構築した 2 光子顕微鏡イメージングにより行った。まずペントバルビタール+イソフルランにより麻酔を施し、気道確保、静脈カテーテル処置を行った。腎臓を露出し、固定後、2 光子レーザー顕微鏡により生体イメージングを行った。2-NBDG は 860 nm 励起光「緑」フィルターにて蛍光検出を行い、720 nm 青色フィルターにて尿細管細胞形態を検出した。2-NBDG 静脈内注射後の尿細管出現順序により近位尿細管の上流下流を特定し、それぞれ別々に解析した。実験終了後、片側腎を摘出し、凍結、Western blotting 法により GLUT2 発現を分析した。

4. 研究成果

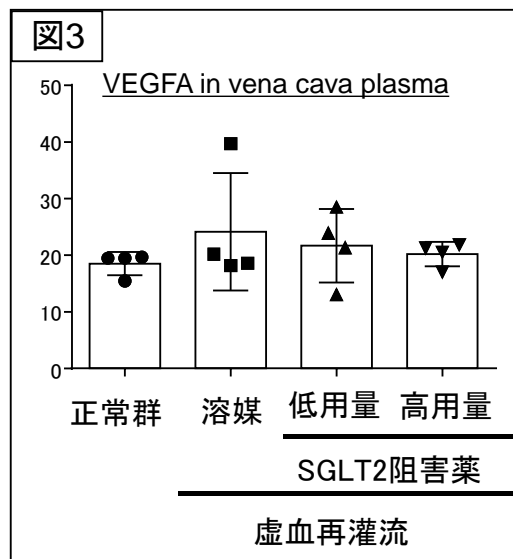
虚血再灌流モデル実験

腎虚血再灌流後急性期 (<7 日間) における急性腎障害にはルセオグリフロジンは影響を与えなかった。Ki67 および BrdU 陽性分裂細胞数にも影響は出ておらず、尿細管再生への影響も限られていると考えられた。SGLT2 陽性近位尿細管細胞領域に差はみられなかった。しかし、7 日後の組織切片を確認すると、ルセオグリフロジン群において、確かなうっ血・出血症状の改善が確認できた。この点を、さらに拡張して解析する目的で、ルセオグリフロジンを 7 日間投与後、休薬し、4 週間後に組織学的解析を行ったところ、確かに症状の改善 (線維化抑制) が確認された。ルセオグリフロジンの最も知られた作用機序は、腎近位尿細管細胞刷子縁膜における糖取り込み抑制であるため、腎生体イメージングを行ったところ、驚くべきことに、正常個体におけるルセオグリフロジンの投与は腎尿細管細胞における糖取り込みに影響を極限られた影響しか与えなかった。しかし、虚血再灌流障害を起こした個体においては、ルセオグリフロジンによる劇的な糖取り込み抑制が確認された (図 1)。これは基底膜に発現している GLUT2 が双方向的に働き、糖取り込みを代償し、急性腎障害により尿細管細胞の極性が失われることにより GLUT2 発現が減少し、総糖取り込みが抑制されたと考えられた。

そこで、この尿細管細胞で何が起きているかを確認する目的で培養近位尿細管細胞において、培地中の糖濃度を調整し、糖取り込み障害を再現した。結果は、尿細管細胞における糖取り込みの減少は血管内皮成長因子 VEGFA の発現を亢進させることがわかった。この VEGFA は急性腎障害により障害された腎内毛細血管床を再構築していたため (CD31 免疫染色による陽性領域、

NG2 陽性周皮細胞の脱落、およびピモニダゾール陽性低酸素領域の拡大により確認)、VEGFA 受容体阻害薬をマウスに処置して、同様のルセオグリフロジン投与を行ったところ、ルセオグリフロジンによる腎保護効果は消失した。したがって、障害尿細管細胞におけるルセオグリフロジンによる糖取り込み抑制が VEGFA の発現・分泌を促し、腎内毛細血管網再構築をサポートすることにより、腎線維化が抑制されたと考えられた。

SGLT2 阻害薬は腎臓だけでなく心血管系イベントの抑制効果も確認されている。上記、分泌された VEGFA が内分泌物質として心血管系に影響を及ぼすには、腎臓から全身循環系に入る必要がある。しかし、虚血再灌流を施し、さらに SGLT2 阻害薬を処置したマウスにおいて、下部大静脈より採血したサンプル中にて VEGFA の有意な上昇を認めることは出来なかった (図 3)。これは SGLT2 阻害薬投与 4、6 および 24 時間後に採血した場合でも同様であった。したがって、少なくとも VEGFA は、SGLT2 阻害薬の遠隔臓器における血管再構築に関与しているとは考えにくいとの結論に至った。これは同時に、VEGFA が網膜に到達しているわけではないとの考察も可能であり、糖尿病における網膜症への増悪作用を心配する必要はなさそうである。



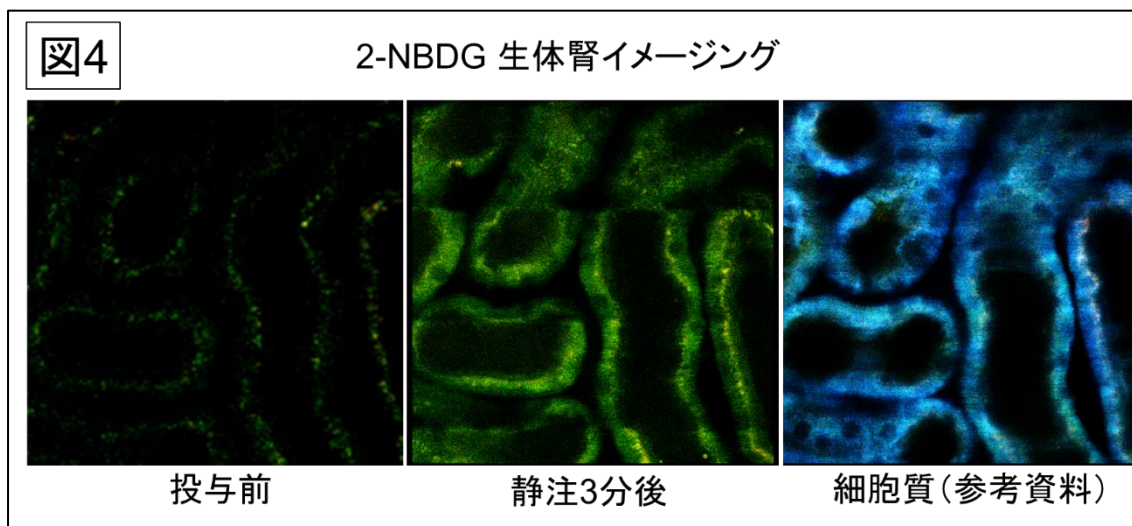
アデニン腎症モデル実験

SGLT2 阻害薬による劇的な環境変化は腎内分泌状態に影響を与えることがわかった。既報の臨床試験から SGLT2 阻害薬による造血系への影響が示唆されていたため、腎性貧血モデルを作製し、エリスロポエチン系への影響を検討した。

しかし、ラットアデニンモデルにおいて、ルセオグリフロジンによるエリスロポエチン系への影響は確認できず、腎性貧血に対する造血効果も確認できなかった。既存のエリスロポエチン活性化薬では、確かな造血反応が確認された。これは培養ヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞へのルセオグリフロジン処置においても同様の結果であった。

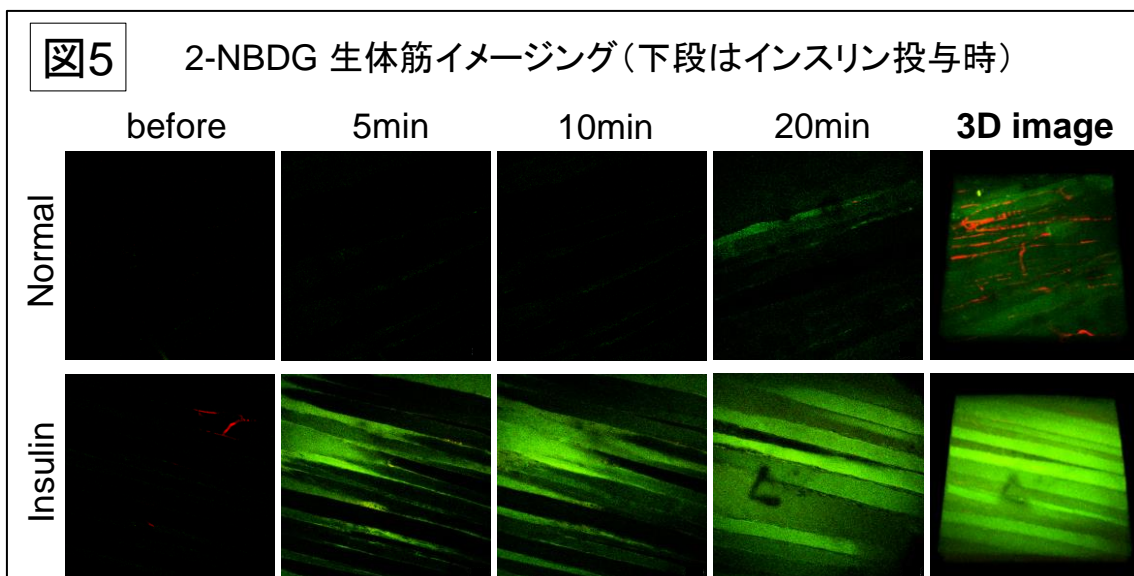
糖尿病モデルにおける腎糖取り込み測定実験

2-NBDG の生体糖取り込み解析を行った (図 4)。



本システムであれば、細胞内への糖取り込みを秒単位でリアルタイムに計測できる。また腎は取り込み (SGLT2) と間質への再回収 (GLUT2) が存在するが、筋肉では取り込みのみであり (GLUT2 & 4)、その動態比較によりシステムの信頼度を検証した。

次ページ、図 5 において、生体筋イメージングを行った。2-NBDG 静脈内投与後時間依存的に筋肉への 2-NBDG 蓄積が確認された。これはインスリンを前処置することにより、劇的な取り込み増加がみられ、既存の知識と同様の糖動態がこのシステムで 2-NBDG を用いることで再現された。



この系を用いて、高血糖・正常血糖・低血糖において、SGLT2 阻害による糖取り込みへの影響を検証した。確認方法として、取り込みによる蛍光強度上昇の最大値、最大値に到達するまでの時間、最大値から半分値にまで蛍光強度が減少する時間、そして最大値を到達時間で除したものの、最大値の半分を半減時間で除したものを、これらをそれぞれ比較した。

2-NBDG は内因性のグルコースとトランスポーターにおいて拮抗するため、高血糖では総じて値が低くなる傾向がみられたが、これは 2-NBDG の投与量を増やすことにより、各血糖値とも比例した値の変化が観られ、その傾きは類似していたため、結論として高血糖における変化はないとしている。

また、SGLT2 阻害下においても 2-NBDG の取り込みは正常レベルで行われた。これは SGLT2 と GLUT2 の *in vivo* における取り込み効率に大きな差がないことを意味する。各トランスポーターの V_{max} 値および K_i 値は異なるが、生体内では発現量等でバランスを取っているのではないかと考えられる。

まとめ

本研究により、SGLT2 阻害薬のユニークさの一端が明らかとなった。障害尿細管においては糖取り込みを抑制することで、細胞を再プログラミング化し、臓器生存戦略(血流回復)を発動させる。一方で、造血ホルモンであるエリスロポエチンへの直接的な作用は確認できず、散見される SGLT2 阻害薬投与患者での造血反応は、腎内環境が向上したことによる 2 次的な作用ではないかと考えている。また、たとえ高血糖であっても SGLT2 阻害は糖取り込み能に影響を与えることはなく、GLUT2 の発現レベルがこれにクリティカルであると考えられる。

5. 研究成果発表 (計 3 件)

学会

中野大介、Anqi Zhang、西山成 *in vivo* analysis of glucose uptake in proximal tubules under SGLT2 inhibitor treatment, 第 24 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2021 年 (online)

Anqi Zhnag、中野大介、西山成 生体における近位尿細管糖取り込みキネティクスと SGLT2 阻害薬による影響、第 64 回日本腎臓学会学術総会、2021 年 (横浜)

中野大介、Anqi Zhnag、西山成 Renal proximal tubular glucose uptake is not affected by a SGLT2 inhibitor, luseogliflozin, treatment, 第 50 回日本心脈管作動物質学会、2021 年 (長野)

学術論文

Ansary T, Nakano D, Nishiyama A. Diuretic effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and their influence on the renin-angiotensin system. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(3):629.

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 Ansary Tuba M., Nakano Daisuke, Nishiyama Akira	4. 巻 20
2. 論文標題 Diuretic Effects of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors and Their Influence on the Renin-Angiotensin System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 629 ~ 629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20030629	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野大介、Anqi Zhang、西山成
2. 発表標題 in vivo analysis of glucose uptake in proximal tubules under SGLT2 inhibitor treatment
3. 学会等名 第24回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Anqi Zhnag、中野大介、西山成
2. 発表標題 生体における近位尿細管糖取り込みキネティクスとSGLT2阻害薬による影響
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野大介、Anqi Zhnag、西山成
2. 発表標題 Renal proximal tubular glucose uptake is not affected by a SGLT2 inhibitor, luseogliflozin, treatment
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------