

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17717

研究課題名(和文) 糖尿病性腎臓病における代謝変容の解析とエネルギー代謝制御による新規治療の開発

研究課題名(英文) Analysis of metabolic alterations in diabetic kidney disease and development of new treatment strategy by amelioration of metabolic alterations

研究代表者

藤井 健太郎 (Fujii, Kentaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70626390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メタボロームおよびマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージングを組み合わせた手法により、腎臓の代謝産物を半定量的に可視化し、腎臓の部位に異なる代謝変容を明らかにした。またFebuxostatがsalvage pathwayを介したアデニル酸の産生促進によりATP再合成を増加させ尿細管細胞保護効果を発揮することを見出した。STZ投与糖尿病モデルマウスのメタボローム解析にてBCAA(イソロイシン、ロイシン、バリン)が増加し、特に糸球体で有意なBCAA蓄積を認めることを明らかにした。ロイシン投与STZマウスにおける腎不全の進行と、腎組織ヒストンH3、H4のアセチル化亢進を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎慢性虚血に伴うアデニル酸喪失の回復のためATP投与やミトコンドリア賦活化などの基礎検討が行われてきたが、実臨床の応用には至っていない。本研究では、尿酸降下薬としてすでに上市されているFebuxostatが、腎アデニル酸を回復させ腎保護効果を示すことが示された。本研究により、腎臓における慢性虚血によるアデニル酸代謝変容の病態メカニズムと、糖尿病性腎臓病の病態プロセスにおける新たな代謝変容が示され、アデニル酸代謝やアミノ酸代謝の変容への治療介入による、新規腎保護戦略が提案された。

研究成果の概要(英文)：We successfully visualized the metabolic alteration in different parts of the kidney semi-quantitatively by combining MALDI-IMS and metabolome analyses. Febuxostat, a xanthine oxidase inhibitor, increased ATP by promoting re-synthesis of adenine nucleotides via the salvage pathway, and showed reno-protective effect. Metabolomic analysis of streptozotocin-induced diabetic model mice showed increase of BCAA (isoleucine, leucine, and valine) and significant BCAA accumulation, especially in glomeruli. Progressive renal failure and increased total acetylation of histones H3 and H4 in renal tissues were also observed in leucine-treated STZ mice.

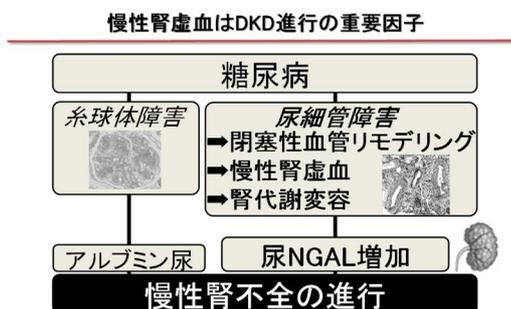
研究分野：腎臓内科

キーワード：腎虚血 糖尿病性腎臓病 代謝変容 アデニル酸代謝 アミノ酸代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)は、患者数 1300 万人をこえる国民病である。多岐に渡る CKD の原疾患の中で、糖尿病性腎症は平成 10 年より透析導入原疾患として最多であり、様々な新規糖尿病薬の発売により血糖管理が改善しているにも関わらず、糖尿病性腎症による透析導入患者数は減少していない。その背景として、糖尿病性腎症の特徴として考えられていたアルブミン尿を伴わない腎機能低下を呈する糖尿病性腎症の患者層の増加が指摘されている。このような世界的背景を受け、糖尿病に伴う腎機能低下をより広い概念で捉えるため、糖尿病腎臓病 (Diabetic kidney disease: DKD) という概念が提唱された。



一方、従来の糖尿病性腎症に対する病態プロセスの解明と治療標的は糸球体およびアルブミン尿に主眼をおいた検証が中心であった[World J Diabetes. 2012. 15; 3(1): 7-18.]. しかし全身の動脈硬化性変化をきたす糖尿病では、腎血管の閉塞性リモデリングを示唆する腎動脈抵抗値が増加し、腎予後と相関する[Diabetes. 2006. 55(1):234-9.]. このような臨床的背景を踏まえ、我々は動脈硬化による腎動脈の閉塞性血管リモデリングに伴う慢性腎虚血が、DKD 進展において最も重要な病態プロセスであると考えた。

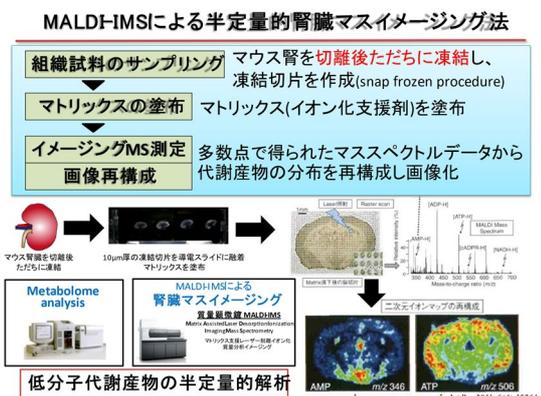
虚血は酸素や代謝基質の運搬障害により細胞および組織の代謝を変化させる。DKD に伴う慢性腎虚血でも、腎代謝がダイナミックに変化する[Nat Med. 2013. 19:1496-504.]. しかし代謝小分子は不安定な物質であるため、従来の研究手法では空間的解析が困難であり、DKD における慢性腎虚血に伴う腎代謝変容による腎障害進展メカニズムの実態は明らかにされてこなかった、しかし一方で、ATP やアデノシンなどのアデニル酸代謝産物はエネルギー担体としてだけでなく、臓器障害または臓器保護的メディエーターとして重要な役割を果たし、ニコチン酸代謝産物はエピゲノム修飾酵素の活性制御により CKD 病態進展に重要な役割を果たしている。このように、各種代謝経路の代謝酵素を標的とした腎保護戦略は、DKD に限らず全ての腎不全において共通の病態である慢性腎虚血に対して広く有効となる可能性が考えられ、非常に広い患者層での臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

ストレプトゾトシン(STZ)投与糖尿病モデルマウスおよび我々が独自に開発した慢性虚血腎モデルマウスの技術を融合し、DKD における慢性腎虚血の意義と腎代謝変容の実態について、腎臓マスマイミゼーションとメタボローム解析を用いて時間的・空間的な 4 次元解析を行う。そして Xanthine oxidase 阻害作用によりヌクレオシド代謝経路をせき止め、salvage pathway を賦活化させる薬剤である Febuxostat を用いて、DKD と慢性腎虚血に伴うアデニル酸代謝変容を是正することで腎保護作用を発揮する可能性を検証する。Febuxostat による代謝介入の観点からの新規腎保護戦略を示し、腎代謝変容改善という新規観点からの DKD 治療を提案する。さらに STZ 投与糖尿病モデルマウスに対して質量分析イメージングを応用することにより、治療標的となりうる新たな代謝小分子についての知見を模索する。

3. 研究の方法

(1) マウス腎臓を切離後ただちに急速凍結し、凍結切片上の各点で得られたマスマスペクトルデータを画像化する MALDI-IMS による質量分析イメージングと、メタボローム解析を組み合わせ、腎臓における低分子代謝産物の半定量的腎臓マスマイミゼーションを行う。1 分間および 10 分間の腎動脈クリップによる短期完全腎虚血におけるアデニル酸代謝変容について、半定量的腎臓マスマイミゼーションにより解析した。さらに 10 分間虚血後 24 時間の再灌流を行った腎臓について、フェブキソスタット非投与あるいは投与によるアデニル酸代謝変容の違いについて検討した。



(2) 培養ヒト尿細管 (HK-2) 細胞を無糖培地および 1%低酸素インキュベーターにて 12 時間培養(Oxygen glucose deprivation: OGD)後、標識ヒポキサンチンを添加した通常培地にて 16 時間再酸素化を行い、標識 ATP および標識総アデニレート測定した。また HK-2 細胞の hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)-1 を knockdown し、Febuxostat 添加による ATP 産生・H2O2 産生・遺伝子発現を評価した。

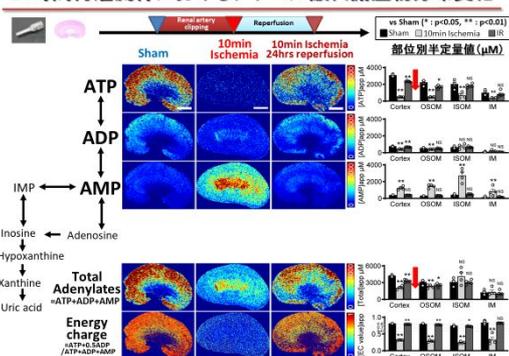
(3) STZ 200mg/kg を 2 回腹腔内投与して、血糖値 400~600mg/dl とした 1 型糖尿病モデルマウス

の腎臓を回収し、インスリン欠損と高血糖に伴う腎組織でのアミノ酸代謝変容について、メタボロームならびに MALDI-IMS による半定量的腎臓マスマイメーキングを用いて解析した。また、飲水中に 2.5% の濃度でロイシン、バリン、アルギニンを追加して STZ マウスに 4 週間投与し、腎不全の進展を検討した。

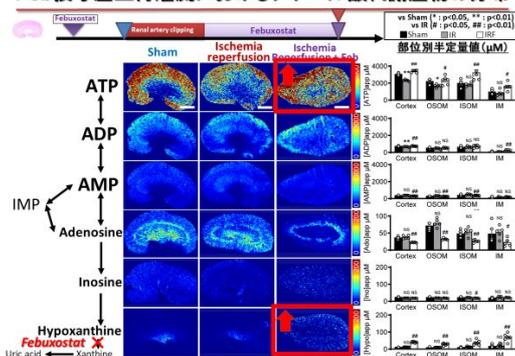
4. 研究成果

(1) 10 分間の腎動脈クリップによる短期完全腎虚血により、腎全体で ATP が低下し、腎皮質においては約 80% の ATP 低下を認めた。また、ATP, ADP, AMP の総和である総アデニル酸は、腎髓質では低下せず、腎皮質においてのみ低下を認めた。10 分間虚血後 24 時間の再灌流を行っても、腎皮質における総アデニル酸と ATP の低下は遷延し、酸化ストレスによる組織障害を伴わない腎機能の低下を認めた。Febuxostat は xanthine oxidase 阻害作用によりヌクレオシド代謝経路をせき止め、salvage pathway を賦活化させる薬剤である。Febuxostat 投与により、虚血再灌流による腎障害は軽減し、皮質を中心とした全腎の ATP および総アデニル酸の回復が促進した。

24時間再灌流腎におけるアデニル酸代謝産物分布変化

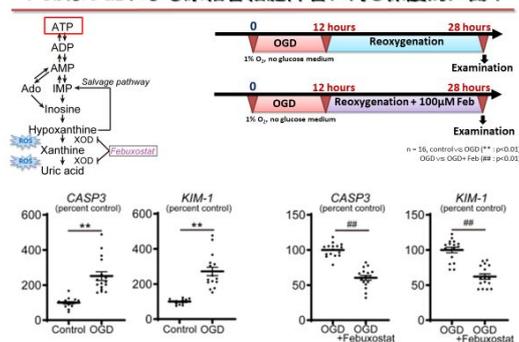


Feb投与と虚血再灌流におけるアデニル酸代謝産物の分布

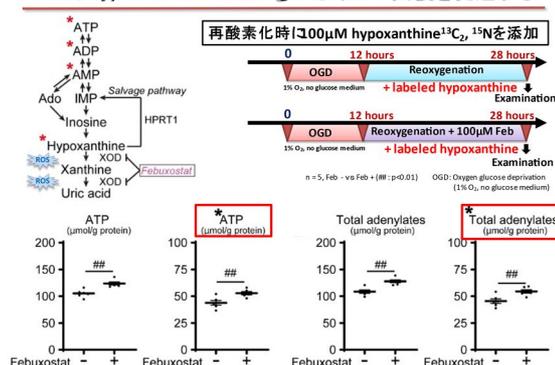


(2) 培養ヒト尿細管 (HK-2) 細胞を無糖培地および 1% 低酸素インキュベーターにて 12 時間培養 (Oxygen glucose deprivation: OGD) 後、通常培地にて 16 時間再酸素化を行い、OGD 群において ATP の優れた低下と、尿細管細胞障害関連遺伝子の発現増加を認めたが、Febuxostat の添加により、ATP 産生は回復し、遺伝子発現増加は抑制された。培養細胞のメタボローム解析において、標識ヒポキサンチンの salvage により再合成されたものと考えられる標識 ATP および標識総アデニレートは全体の約半分を占め、尿細管細胞の再酸素化過程における ATP 産生回復が大きく salvage pathway に依存していることが示された。さらに、標識 ATP および標識総アデニレートはフェブキソスタットの投与により増加しており、フェブキソスタットによる ATP 産生回復は salvage pathway を介したものであることが示唆された。Salvage pathway の key enzyme である hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)-1 の knockdown により、尿細管細胞

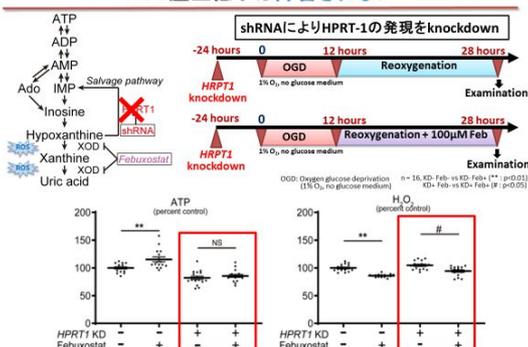
OGDにより尿細管細胞障害が生じ、FebはOGDによる尿細管細胞障害に対し保護的に働く



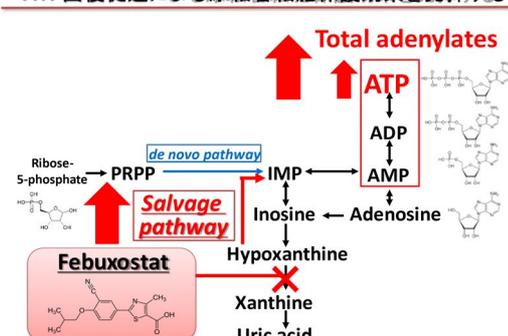
FebはhypoxanthineのsalvageによりATP回復を促進する



HPRT-1 KDにてFebによるATP回復促進は消失するが ROS産生低下は障害されない



Febuxostaはsalvage pathwayを介した ATP回復促進による尿細管細胞保護効果を発揮する



における Febuxostat による ATP の回復促進効果は消失したが、ROS 産生低下は障害されていない。すなわち、Febuxostat は salvage pathway を介したアデニル酸の産生促進により ATP 再合成を増加させ、尿細管細胞保護効果を発揮すると考えられた。虚血再灌流による腎障害機序には、当初酸化ストレス障害とアデニル酸代謝変容の可能性が示されていたが、短時間虚血においては、Febuxostat は ATP 産生回復促進を介して腎保護効果を発揮する可能性が示唆された。

(3) STZ 投与糖尿病モデルマウスにおける腎メタボローム解析では、STZ マウスでは著しく高血糖を示すにも関わらず、解糖系の Glucose-6-phosphate (G6P) から Phosphoenolpyruvic acid (PEP) までの中間代謝物の総和及び Lactate の量に変化はなかった。TCA cycle 中間体にも変化が見られなかった。核酸の生合成に関わるペントースリン酸経路も変化がなかった。その一方で、正常血糖マウスと比較してグリシン、リシン、メチオニン、グルタミンが減少し、BCAA (イソロイシン、ロイシン、バリン) が、顕著に増加していた。BCAA は、腎尿細管におけるアミノ酸トランスポーター L-type amino acids transporter (LAT) 1, 2 ならびに、糸球体足細胞の LAT3 により細胞内に取り込まれることから、STZ マウスの腎皮質では LAT1~3 を介した BCAA 取込が亢進していると考えられた。さらなる解析で、腎皮質のなかでも糸球体における有意な BCAA 蓄積が示された。これらアミノ酸は、STZ によるインスリン欠乏に伴い、筋肉の蛋白分解により供給されるものと考えられた。



そこで、増加した BCAA が腎線維化と腎不全の進展に関与するとの仮説をたて、アルギニン、ロイシン、バリンを4週間飲水投与後、尿生化学検査、PCR法による遺伝子発現解析、腎組織学的検査にて、腎線維化ならびに腎機能障害の進展を検討したところ、ロイシンを投与した STZ マウスで、腎不全が著明に進行することを見出した。腎組織のヒストンアセチル化を免疫染色法で検討したところ、ヒストン H3, H4 の総アセチル化が、ロイシン投与で増加していた。

[雑誌論文]

1. Ryuzaki M, Miyashita K, Sato M, Inoue H, Fujii K, Hagiwara A, Uto A, Endo S, Oshida T, Kinouchi K, Itoh H. Activation of the intestinal tissue renin-angiotensin system by transient sodium loading in salt-sensitive rats. *J Hypertens*. 2022 Jan 1;40(1):33-45.
2. Fujii K, Kubo A, Miyashita K, Sato M, Hagiwara A, Inoue H, Ryuzaki M, Tamaki M, Hishiki T, Hayakawa N, Kabe Y, Itoh H, Suematsu M. Xanthine oxidase inhibitor ameliorates postischemic renal injury in mice by promoting resynthesis of adenine nucleotides. *JCI Insight*. 2019 Nov 14;4(22):e124816.

[学会発表]

1. Fujii K, Miyashita K, Kubo A, Sato M, Hagiwara A, Inoue H, Ryuzaki M, Suematsu M, Itoh H. Febuxostat promoted re-synthesis of adenine nucleotides via the HPRT1-dependent purine salvage pathway and exerted reno-protective effect. 第63回日本腎臓学会学術総会 2020年8月
2. Fujii K, Miyashita K, Kubo A, Sato M, Hagiwara A, Inoue H, Ryuzaki M, Suematsu M, Itoh H. DISTRIBUTION OF ADENOSINE IN THE KIDNEY DETERMINES LOCAL VASCULAR TONE VIA A2b ACTIVATION AND AFFECTS RENO PROTECTION AGAINST ACUTE ISCHEMIA IN MICE. 56th ERA-EDTA congress June 14 2019, Budapest, Hungary.
3. Miyashita K, Fujii K, Kubo A, Sato M, Hagiwara A, Inoue H, Suematsu M, Itoh H. Protective role of adenosine in the renal corticomedullary boundary zone against acute ischemia. 50th Scientific Meeting of Korean Society of Hypertension, 17 May 2019, Jeju, South Korea. (Invited)
4. 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. 高濃度アデノシンによる A2b 受容体活性化を介した腎血流維持による腎保護効果の検討. 第92回 日本内分泌学会学術総会. 2019年5月10日 仙台
5. 33. 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, 宇都飛鳥, 遠藤翔, 末松誠, 伊藤裕. A2b 受容体活性化を介した高濃度アデノシンの腎血流維持による腎保護効果の解析. 第62回日本腎臓学会学術総会 2019年7月2日 名古屋

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Fujii Kentaro, Kubo Akiko, Miyashita Kazutoshi, Sato Masaaki, Hagiwara Aika, Inoue Hiroyuki, Ryuzaki Masaki, Tamaki Masanori, Hishiki Takako, Hayakawa Noriyo, Kabe Yasuaki, Itoh Hiroshi, Suematsu Makoto | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Ryuzaki M, Miyashita K, Sato M, Inoue H, Fujii K, Hagiwara A, Uto A, Endo S, Oshida T, Kinouchi K, Itoh H. | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Activation of the intestinal tissue renin-angiotensin system by transient sodium loading in salt-sensitive rats. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Hypertens | 6. 最初と最後の頁 33-45 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/HJH.0000000000002974. | 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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kentaro Fujii, Kazutoshi Miyashita, Akiko Kubo, Masaaki Sato, Aika Hagiwara, Hiroyuki Inoue, Masaki Ryuzaki, Makoto Suematsu, Hiroshi Itoh |
| 2. 発表標題 Febuxostat promoted re-synthesis of adenine nucleotides via the HPRT1-dependent purine salvage pathway and exerted renoprotective effect |
| 3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020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 高濃度アデノシンによるA2b受容体活性化を介した腎血流維持による腎保護効果の検討 |
| 3. 学会等名 第92回 日本内分泌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kentaro Fujii, Kazutoshi Miyashita, Akiko Kubo, Masaaki Sato, Aika Hagiwara, Hiroyuki Inoue, Masaki Ryuzaki, Makoto Suematsu, Hiroshi Itoh |
| 2. 発表標題 DISTRIBUTION OF ADENOSINE IN THE KIDNEY DETERMINES LOCAL VASCULAR TONE VIA A2b ACTIVATION AND AFFECTS RENO |
| 3. 学会等名 56th ERA-EDTA (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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, 木内謙一郎, 伊藤裕 |
| 2. 発表標題 A2b受容体活性化を介した高濃度アデノシンの腎血流維持による腎保護効果の解析 |
| 3. 学会等名 第61回 日本腎臓学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazutoshi Miyashita, Kentaro Fujii, Akiko Kubo, Masaaki Sato, Aika Hagiwara, Hiroyuki Inoue, Masaki Ryuzaki, Makoto Suematsu, Hiroshi Itoh |
| 2. 発表標題 Protective role of adenosine in the renal corticomedullary boundary zone against acute ischemia - findings from mass imaging analysis |
| 3. 学会等名 Hypertension Jeju 2019 in Conjunction with the 51st Scientific Meeting of the Korean Society of Hypertension (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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|