

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17735

研究課題名(和文) ケトン体である ヒドロキシ酪酸を利用した慢性腎臓病の新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for chronic kidney disease with beta-hydroxybutyrate, a ketone body

研究代表者

小林 麻美子 (Kobayashi, Mamiko)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教

研究者番号：30791991

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)：ケトン体の一種である ヒドロキシ酪酸(OHB)の腎保護作用に着目した。ヒト腎尿細管培養細胞(HRCE)において、OHBはシスプラチン誘導性のアポトーシスに対する抑制作用を有し、その細胞保護作用の一つとして生存シグナル伝達経路であるAktの関連を見出した。またシスプラチン腎症モデルマウスにおいて、OHBの腹腔内投与により、血清Cr、BUN値の上昇が有意に減少し、cleaved caspase3の発現上昇は有意に抑制された。これより腎障害モデルマウスにおいても、OHBがアポトーシス抑制作用を有することを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OHBがAktのリン酸化を介してアポトーシス抑制作用を有し、腎保護作用を発揮する可能性を示すことができた。OHBは低糖質ダイエットやSGLT2阻害剤で誘導されることが報告されており、今後、腎臓病に対する新規治療法の一つとなる可能性を考える。

研究成果の概要(英文)：We focused on the renoprotective effects of hydroxybutyrate (OHB), a ketone body. In cultured human renal tubular cells (HRCE), OHB inhibited cisplatin-induced apoptosis. We found that Akt, a survival signaling pathway, was associated with the cytoprotective effect of OHB. Intraperitoneal administration of OHB significantly decreased elevated serum Cr and BUN levels in a mouse model of cisplatin nephropathy. Furthermore, cisplatin-induced increase in cleaved caspase3 expression was significantly suppressed by OHB. These results suggest that OHB has an inhibitory effect on apoptosis in a mouse model of renal injury.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ヒドロキシ酪酸 シスプラチン腎症

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病や動脈硬化症などを背景に持つ慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease, CKD) 患者は年々増加し、末期腎不全に進行し透析導入を要する患者数が増加している。CKD に対し尿毒素吸着薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬などを用いた集学的治療が試みられてきたが、十分な効果が得られているとは言えず、新たな治療法の開発と、臨床応用が求められている。

我々はケトン体の一種であるヒドロキシ酪酸 (Hydroxy Butyrate, OHB) に着目した。従来ケトン体は飢餓状態において末梢組織にエネルギーを供給する物質であると考えられてきたが、近年エネルギー基質としての作用のみならず、OHB はヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase, HDAC) 活性阻害作用を有しエピジェネティック調節に関わり多面的な臓器保護作用を有することが明らかになった。

またナトリウム-グルコース共輸送体 (SGLT2) 阻害薬が、心不全や糖尿病性腎症の進行抑制効果を持つことが示された。腎臓においては近位尿細管で特異的に発現する SGLT2 を阻害しグルコース再吸収を阻害することで効果を発揮するが、SGLT2 阻害薬の投与が血中ケトン体上昇を伴うことから、ケトン体が心筋及び腎保護作用を持つことも示唆される。しかしその分子機序は不明である。

そこでケトン体の腎保護効果における分子機序を解明し、CKD に対する新規治療法の開発を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は OHB の多面的な作用に着目し、腎保護作用のメカニズムを解明し、臨床応用につなげることである。まずヒト腎尿細管培養細胞 (Human Renal Cortical Epithelial cells, HRCE) を用いて、OHB によるシスプラチン誘導性のアポトーシスに対する抑制作用を FACS 分析とウェスタンブロッティング法による cleaved caspase-3 の蛋白発現の変化で確認した。さらに OHB は cleaved caspase-9 の蛋白発現の抑制作用を有し、OHB によるシスプラチン誘導性アポトーシスに対する腎保護効果が、一部は内因性アポトーシス経路の抑制であることを確認した。その OHB による抗アポトーシス作用のさらなる分子機序の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) シスプラチン腎症モデルマウスにおける OHB の腎保護効果の検証

7 週齢の C57BL/6 マウスに 20mg/kg のシスプラチンを腹腔内投与する群と、生理食塩水を腹腔内投与する群に分け、さらにその 2 群の中で OHB を腹腔内投与する群と、生理食塩水を投与する群に分けた。OHB はシスプラチン投与から 1 時間後に 500mg/kg の OHB を投与し、24 時間おきに投与を繰り返し 3 日後に採血で血清 Cr, BUN 値の変化を解析する。また得られた腎組織からタンパク抽出を行い、ウェスタンブロッティング法で cleaved caspase-3 の発現を解析する。

### (2) シスプラチン腎症モデルマウスにおける OHB の腎保護効果の分子機序の解明

(1) で得られた腎組織から抽出したタンパクを用いて、MAP キナーゼ経路である p38

や JNK ,アポトーシスに関わる STAT のリン酸化をウェスタンブロッティング法で解析する .

### (3) HRCE における OHB の Akt を介した腎保護効果の分子機序の解明

アポトーシスに対する細胞保護効果に関して ,生存シグナル伝達経路として Akt のリン酸化亢進が重要であることが知られている .そこで OHB が有する抗アポトーシス作用において Akt に着目し ,コンフルエントに増殖した HRCE に 25  $\mu$ M のシスプラチンと 10mM の OHB を 24 時間共添加し ,ウェスタンブロッティング法で Akt のリン酸化を解析する .また HRCE において OHB の Akt のリン酸化とアポトーシス抑制作用の関連を検討するため ,siRNA Akt を用いて Akt のノックダウンを行った条件下で ,シスプラチンと OHB を添加し cleaved caspase-3 の発現をウェスタンブロッティング法で解析する .

## 4. 研究成果

### (1) シスプラチン腎症モデルマウスにおける OHB の腎保護効果の検証

シスプラチン腎症モデルマウスに OHB を腹腔内投与した結果 ,シスプラチンにより誘導された血清 Cr ,BUN 値の上昇は有意に減少した .これよりシスプラチン腎症モデルマウスにおいて OHB が腎保護効果をもつことが示された .また抽出したタンパクの解析は ,シスプラチンにより誘導された cleaved caspase3 の発現の上昇は , OHB 投与により抑制され ,シスプラチン腎症モデルマウスにおいて OHB はアポトーシス抑制作用を有することが示唆された .

### (2) シスプラチン腎症モデルマウスにおける OHB の腎保護効果の分子機序の解明

(1) で抽出したタンパクを用いて ,ウェスタンブロッティング法で p38 ,JNK ,STAT のリン酸化を確認したがいずれも有意な変化はみられなかった .

### (3) HRCE における OHB の Akt を介した腎保護効果の分子機序の解明

HRCE においてシスプラチンにより誘導された Akt のリン酸化低下は , OHB の添加で有意に亢進し , OHB の細胞保護効果に Akt のリン酸化が関与している可能性を示唆した .また Akt のノックダウン条件下では ,シスプラチンにより誘導される cleaved caspase-3 の蛋白発現は , OHB を添加しても発現抑制作用はみられなかった .これより

OHB はシスプラチン誘導性尿細管培養細胞アポトーシスを抑制するが ,その機序として OHB による Akt のリン酸化亢進が細胞保護効果に関連している可能性を示唆した .

HRCE において OHB による細胞保護効果に対して ,一つの経路として生存シグナル伝達経路である Akt の関連を見出すことができた .今後の展開として ,Akt 以外の経路の関与の有無や OHB の作用で報告されているエピジェネティック調節との関連の追及を検証していく .また腎障害モデルマウスにおいて OHB はアポトーシス抑制作用を有することは示唆されたが ,その腎保護作用の分子機序の解析は検討中であり課題である .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林麻美子
2. 発表標題 ヒドロキシ酪酸はエピジェネティック制御を介してシスプラチン誘導性腎尿管細胞アポトーシスを抑制する
3. 学会等名 日本腎臓学会
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
---------	---------