

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	別所 瞭一
<p>学位論文題目</p> <p>Hypoxia-inducible factor-1α is the therapeutic target of the SGLT2 inhibitor for diabetic nephropathy (低酸素誘導因子は SGLT2阻害薬による糖尿病腎症治療標的である)</p> <p>共著者名</p> <p>滝山 由美、滝山 貴央、橋内 博哉、竹田 安孝、坂上 英充、太田 嗣人</p> <p><i>Scientific Reports</i>, 2019; 9: 14754 DOI: 10.1038/s41598-019-51343-1.</p> <p>研究目的</p> <p>糖尿病腎症は、末期腎不全の原因として重要な疾患であり、有効な治療薬の開発が求められている。sodium-glucose cotransporter-2(SGLT2)阻害薬は、腎臓の近位尿細管における SGLT2を介したグルコースの再吸収を阻害することにより血糖降下作用を示す。近年、大規模臨床研究において SGLT2阻害薬の腎保護効果が相次いで報告された[1]が、SGLT2阻害薬の近位尿細管細胞に対する直接的な腎保護作用機構については十分に解明されていない。</p> <p>一方、糖尿病腎症の進展において、近位尿細管細胞の慢性低酸素状態が、糖尿病腎の線維化を促進することが明らかとなっている。Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1)は近位尿細管の低酸素応答において中心的な役割を有する転写因子であり、その持続的な発現は、糖尿病腎線維化を促進させることが報告されている。</p> <p>そこで今回我々は、SGLT2阻害薬 luseogliflozin が腎低酸素および HIF-1発現に及ぼす影響について、ヒト近位尿細管培養細胞と2型糖尿病モデルである <i>db/db</i> マウスの腎組織を用いて検証することを目的に以下の検討を行った。</p> <p>材料・方法</p> <p>I. ヒト近位尿細管培養細胞：Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells; HRPTEC (Lonza 社)培養液に SGLT2阻害薬 luseogliflozin を添加後、正常酸素条件および低酸素条件下(酸素濃度1%)で24時間培養を行い、以下の検討を行った。</p> <p>1. Western blot 法:</p> <p>核蛋白分画を抽出し、HRPTEC における核での HIF-1α 蛋白発現を検討した。同様に、全細胞溶解液において、AMP-activated protein kinase(AMPK)の Th172残基リン酸化について検討した。</p>			

2. quantitative RT-PCR法:

RNeasy mini kit(QIAGEN社)を用いtotal RNAを抽出し、HRPTECにおけるHIF-1標的遺伝子であるGLUT1、PAI-1、VEGF、HK-2、PKM mRNA発現を、TaqManプローブを使用しABI Prism 7300 software(Applied Biosystems社)にて検討した。

3. 免疫蛍光染色法:

HRPTECにおけるHIF-1 α 蛋白発現と、低酸素マーカーであるpimonidazoleの免疫蛍光染色を行い、細胞内酸素濃度を検討した。

4. 酸素消費量測定法:

Oxygen Consumption Rate Assay Kit(Agilent社)を用い細胞酸素消費量を測定した。

5. 細胞内ATP量測定法:

ATP assay kit(Abcam社)を用い細胞内ATP量を測定した。

II. 2型糖尿病モデルdb/dbマウスとその対照群db/mマウスに対し、8週齢時よりluseogliflozin混餌(15mg/kg/日)を8週間投与後、治療群と非治療群について下記の検討を行った。

6. 生理学および生化学的検討:

空腹時血糖、HbA1c、食餌摂取量、飲水量、体重、血圧、尿量、尿中アルブミン量(Albuwell M、Exocell社)を測定した。

7. 尿中および腎組織中Kidney Injury Molecule-1(KIM-1)量測定法:

Mouse KIM-1 ELISA kit(Abcam社)を用い、尿細管障害の指標である尿中および腎組織中KIM-1量を測定した。

8. 腎組織病理学的検討:

Periodic acid-Schiff(PAS)染色により、糖尿病性腎病変について半定量的に検討した。さらに、Picrosirius Red染色により尿細管間質の線維化について検討した。

9. 免疫組織化学染色:

腎組織におけるHIF-1 α およびfibronectin蛋白発現について、各抗体を用い検討した。

10. 統計学的解析:

I, IIの統計学的解析にはパラメトリック検定として一元配置分散分析およびTukey法による多重比較を行い、ノンパラメトリック検定としてKruskal-Wallis検定を行い、Mann-Whitney検定により群間比較を行った。

成 績

1. HRPTECにおけるSGLT2阻害薬による低酸素誘導HIF-1 α 蛋白発現抑制とAMPK活性化作用

低酸素暴露はHRPTECの核におけるHIF-1 α 蛋白発現を、正常酸素濃度のcontrolと比較し増加し($p < 0.01$)、SGLT2阻害薬は29.3%($p < 0.01$)抑制した。SGLT2阻害薬は正常酸素および低酸素下でのAMPKリン酸化(Th172)をそれぞれの条件下のcontrolと比較し有意に増加させた($p < 0.05$)。AMPK活性化剤のAICAR、および阻害剤のcompound Cは低酸素誘導HIF-1 α 蛋白発現に影響を及ぼさなかった。ミトコンドリア電子伝達系複合体I阻害剤rotenoneおよび複合体III阻害剤antimycin Aは低酸素誘導HIF-1 α 蛋白発現をそれぞれ92.3% ($p < 0.01$)、89.4%($p < 0.01$) 抑制した。

2. HRPTECにおけるSGLT2阻害薬によるHIF-1標的遺伝子発現抑制

低酸素暴露はHRPTECにおけるHIF-1標的遺伝子GLUT1、PAI-1、VEGF、HK-2、PKM mRNA発現を有意に増加させた($p<0.01$)。SGLT2阻害薬は低酸素暴露に誘導されたGLUT1 mRNA発現を24.6%($p<0.01$)、PAI-1 mRNA発現を31.2%($p<0.01$)、VEGF mRNA発現を23.0%($p<0.01$)、HK-2 mRNA発現を29.2%($p<0.01$)、PKM mRNA発現を13.3% ($p<0.05$)抑制した。

3. SGLT2阻害薬によるHRPTEC細胞内低酸素状態の回避

SGLT2阻害薬は、低酸素暴露により誘導された核におけるHIF-1 α 蛋白発現を抑制した。さらに、細胞質におけるpimonidazoleの染色性を減弱させた。

4. SGLT2阻害薬によるHRPTEC酸素消費量の減少

SGLT2阻害薬は、HRPTECの酸素消費量を正常酸素下でcontrolと比較し68.7%($p<0.05$)抑制した。低酸素暴露はHRPTECの酸素消費量を、正常酸素controlと比較し46.6%($p<0.05$)抑制した。SGLT2阻害薬は、低酸素下でHRPTECの酸素消費量を低酸素controlと比較し47.5%($p<0.05$)抑制した。

5. SGLT2阻害薬によるHRPTEC細胞内ATPの減少

SGLT2阻害薬はHRPTECの細胞内ATP量を正常酸素下でcontrolと比較し20.8%($p<0.05$)抑制した。低酸素暴露はHRPTECのATP量を正常酸素controlと比較し59.2%($p<0.05$)抑制した。低酸素下ではSGLT2阻害薬はHRPTECのATP量に有意な影響を及ぼさなかった。

6. 2型糖尿病モデルdb/dbマウスにおけるSGLT2阻害薬による代謝指標への影響

SGLT2阻害薬はdb/dbマウスにおいて空腹時血糖($p<0.01$)、HbA1c($p<0.01$)、飲水量($p<0.05$)を減少させた。食餌摂取量、体重、血圧、尿量、尿中アルブミン量に有意な影響は与えなかった。

7. SGLT2阻害薬によるdb/dbマウス尿中および腎組織中KIM-1量への影響

SGLT2阻害薬は尿中および組織中KIM-1量に有意な影響を与えなかった。

8. SGLT2阻害薬によるdb/dbマウス尿細管障害の改善

SGLT2阻害薬はdb/dbマウスの糸球体障害スコアを38.8%低下させるとともに、尿細管障害スコアを38.2%低下させた($p<0.05$)。さらに、SGLT2阻害薬は尿細管間質線維化の指標であるPicrosirius Red染色陽性領域を55%減少させた($p<0.05$)。

9. db/dbマウス腎臓におけるSGLT2阻害薬によるHIF-1 α およびfibronectin蛋白発現抑制

SGLT2阻害薬は、db/dbマウス腎皮質尿細管細胞におけるHIF-1 α 発現量を42%抑制し($p<0.05$)、さらに fibronectin発現量を55%抑制した($p<0.05$)。

考 案

本研究において、我々はSGLT2阻害薬が腎近位尿細管培養細胞HRPTECと2型糖尿病モデルdb/dbマウス腎皮質において尿細管細胞におけるHIF-1 α 蛋白発現を抑制することを見出した。

昨年、ヒト慢性腎臓病患者において、blood oxygenation level-dependent magnetic resonance imaging (BOLD-MRI)検査によって測定された腎組織の酸素状態から、腎皮質の低酸素状態が患者の腎機能低下の独立した予測因子であることが報告されている。SGLT2阻害薬は、低酸素状態下でHRPTECの酸素消費量を抑制し、低酸素マーカーpimonidazole染色性を減少させた。この結果は、SGLT2阻害薬が酸素消費を抑制することにより、細胞内酸素濃度を上昇させ、低酸素状態を回避したことを示唆しており、SGLT2阻害薬の糖尿病患者の腎保護作用の説明機序の一つとして、腎皮質低酸素状態の改善が考えられる。

また、糖尿病腎症患者における腎皮質HIF-1 α 発現増強、HIF-1 α の持続的発現が腎線維化を促進することが報告されており、SGLT2阻害薬はHIF-1 α 発現抑制作用により腎線維化を抑制する。SGLT2阻害薬は、HRPTECにおいてAMPKを活性化したが、糖尿病腎では、AMPK活性低下と、AMPK活性化によるミトコンドリア機能回復を介した腎保護作用が報告されている[2]。SGLT2阻害薬は、血糖非依存的に腎尿細管細胞に直接的に作用し、低酸素回避作用、HIF-1 α 発現抑制作用、AMPK活性化作用などにより、糖尿病腎症患者において腎保護効果を呈すると考えられる。

HIF-1は低酸素応答における制御因子として中心的な役割を有するとともに、代謝疾患、心血管疾患、がんなどの様々な病態において主要因子として関与している[3]。本研究で明らかとなったSGLT2阻害薬によるHIF-1 α 発現抑制作用は、それら疾病における治療効果も示唆しており、糖尿病患者の健康寿命の延伸、生命予後の改善が期待される。

結 論

SGLT2阻害薬は、腎近位尿細管細胞の低酸素状態を回避し、HIF-1 α 発現とともに腎線維化を抑制し、糖尿病腎症において腎保護的に作用する。

引 用 文 献

- [1] Neuen B, Young T, Heerspink H, Neal B, Perkovic V, Billot L, Mahaffey K, Charytan D, Wheeler D, Arnott C, Bompont S, Levin A, Jardine M. SGLT2 inhibitors for the prevention of kidney failure in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 11, 845-854 (2019).
- [2] Bhargava P, Schnellmann R. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol* 10, 629-646 (2017).
- [3] Semenza G. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399-408 (2012).

参 考 論 文

1. Takiyama Y, Sera T, Nakamura M, Ishizeki K, Saijo Y, Yanagimachi T, Maeda M, **Bessho R**, Takiyama T, Kitsunai H, Sakagami H, Fujishiro D, Fujita Y, Makino Y, Abiko A, Hoshino M, Uesugi K, Yagi N, Ota T, Haneda M. Impacts of Diabetes and an SGLT2 Inhibitor on the Glomerular Number and Volume in db/db Mice, as Estimated by Synchrotron Radiation Micro-CT at SPring-8. *EBioMedicine* 36, 329-346 (2018).
2. Takeda Y, Fujita Y, **Bessho R**, Sato M, Abe T, Yanagimachi T, Sakagami H, Abiko A, Takiyama Y, Ota T, Haneda M. Increment of plasma glucose by exogenous glucagon is associated with present and future renal function in type 2 diabetes: a retrospective study from glucagon stimulation test. *BMC Endocr Disord* 19, 99 (2019).