

平成 30 年 4 月 25 日

## 糖尿病性腎臓病の進展に関わる新しいメカニズムを解明！ ～2つのフルクトース代謝酵素の異なる役割～

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長：門松 健治）腎臓内科学の 道家 智仁（どうけともひと）客員研究員（筆頭著者）、同大学医学部附属病院（病院長：石黒 直樹）腎臓内科の石本 卓嗣（いしもと たくじ）助教（責任著者）および同大学医学系研究科分子生物学の門松 健治（かどまつ けんじ）教授、腎臓内科学の丸山 彰一（まるやま しょういち）教授らの研究グループは、我が国の透析導入原因として第 1 位の原疾患である糖尿病性腎臓病の進展における新しいメカニズムを解明し、本研究成果は、国際科学誌「Metabolism」に掲載されました（2018 年 3 月 29 日付の電子版）。

20 世紀以降、先進国を中心に砂糖の摂取量は増加し、また、天然甘味料である果糖ブドウ糖液が開発されて以降、清涼飲料水・加工食品に広く使用されることで、それらに多量に含まれる果糖（フルクトース）の摂取量は飛躍的に増加しており、フルクトース摂取と肥満・糖尿病・高血圧・脂肪肝などの代謝性疾患の発症には相関関係があることが知られています。また、フルクトースは食事由来（外因性）のみならず、糖尿病においてはポリオール経路<sup>※1</sup>を介して体内にて（内因性に）フルクトースが産生されます。本研究グループは、これまでに、外因性及び内因性のフルクトースの過剰な代謝を抑制することで、メタボリックシンドロームや糖尿病性腎臓病が改善することを報告してきました。

フルクトースは主にフルクトース代謝酵素であるケトヘキソキナーゼ（KHK）で代謝され、KHK には KHK-C と KHK-A の 2 種類があります。KHK-C は腎臓・肝臓・小腸に存在しており、フルクトースの代謝能力が高い一方で、KHK-A は腎臓を含め幅広い臓器に分布していますが、フルクトースの代謝能力は低く、詳細な機能は不明な部分が多い状態でした。そのため、本研究では糖尿病性腎臓病における KHK-A 及び KHK-C それぞれの役割の解析を行いました。その結果、KHK-C によるフルクトース代謝は、酸化ストレス・核酸分解を介して尿細管障害を引き起こすことを見出し、KHK-C によるフルクトース代謝が糖尿病性腎臓病の増悪の一因であることを解明しました。一方で、KHK-A の欠損は腎臓でのさらなるフルクトース代謝の亢進・炎症の増悪・低酸素を誘導し、より重度の尿細管障害・腎機能障害を引き起こすことから、糖尿病性腎臓病において KHK-A は保護的な役割を持つことが新たに解明されました。また、これらは KHK-A がフルクトース代謝酵素以外の機能を持つことに由来することを見出しました。

本成果は、糖尿病性腎臓病の進展における KHK-C・KHK-A の相反する役割を示すものであり、選択的な KHK-C 阻害薬の開発は、糖尿病性腎臓病の進展抑制が期待されるだけでなく、メタボリックシンドロームの新規治療法に結びつくことが期待されます。

# 糖尿病性腎臓病の進展に関わる新しいメカニズムを解明！ ～2つのフルクトース代謝酵素の異なる役割～

## ポイント

- 糖尿病性腎臓病の進展において、2種の果糖（フルクトース）の代謝酵素、ケトヘキソキナーゼ（KHK-A、KHK-C）の相反する役割を解明しました。
- 糖尿病ではポリオール経路の活性化を介して、腎臓でのフルクトース産生が増加します。腎臓での KHK-C によるフルクトース代謝は炎症・酸化ストレス・核酸分解を介して糖尿病性腎臓病を悪化させることが考えられます。
- 一方で、KHK-A の欠損は、腎臓でのさらなるフルクトース代謝・炎症の増悪・低酸素を引き起こし、より重度の尿細管障害・腎機能障害を引き起こすことから、糖尿病性腎臓病において KHK-A は保護的な役割を持つことが新たに解明されました。
- KHK-A を抑制せず KHK-C を選択的に阻害することが、末期腎不全の第1位の原疾患である糖尿病性腎臓病の新規治療法の開発につながると期待されます。

## 1. 背景

わが国における透析を始める原因となる疾患の第1位は糖尿病腎症であり、増加の一途を辿っています。顕著な蛋白尿・むくみがみられ急速に腎機能が低下することが典型的ですが、近年、糖尿病において顕著な蛋白尿の増加のない腎機能障害例が増加しており、新たに「糖尿病性腎臓病」という概念が提唱されています。これらの腎臓組織では尿細管間質の炎症・線維化、細動脈硬化など、主に糸球体外での病変が認められますが、糖尿病性腎臓病における尿細管障害のメカニズムは解明されていません。糖尿病には多くの治療薬がありますが、腎障害の進行を完全に抑えることは難しく、糖尿病性腎臓病の病態の解明、新たな治療薬の開発が望まれています。

近年、フルクトースが多く含有されている清涼飲料水・加工食品の摂取は増加しており、外因性のフルクトース摂取と肥満・糖尿病・脂肪肝・高血圧の発症に相関関係があることが注目されています。また糖尿病では、高血糖によりポリオール経路が活性化し、体内において（内因性に）グルコースからフルクトースが産生されます。フルクトースはケトヘキソキナーゼ（KHK）により代謝され、フルクトース1リン酸へ変換されます。KHKには2種類（KHK-A・KHK-C）があり、ともに腎臓では近位尿細管のみに存在しています。腎・肝・小腸などの限られた臓器にのみ存在する KHK-C は、KHK-A に比してフルクトースの代謝能力は高く、一方で KHK-A は広く全身に存在しています。本研究グループはこれまでに、過剰なフルクトース代謝が重要なエネルギーの単位である ATP の枯渇<sup>※1</sup>、核酸分解<sup>※2</sup>、尿酸産生、炎症、酸化ストレスを引き起こし、フルクトースを代謝することができないマウス（KHK-A/C 両欠損マウス）では肥満・脂肪肝・高インスリン血症および糖尿病性腎臓病が改善することを報告してきました。一方で、野生型マウスと比較して KHK-A 単独が欠損したマウスでは、フルクトース摂取により、誘導される肥満・脂肪肝がより悪化することを報告しており、KHK-A 及び KHK-C が異なった役割を担っていることが示唆されています。また、KHK-A はプロテインキナーゼ（蛋白質をリン酸化する酵素）としての機能（ホスホリボシルピロリン酸シンターゼ1（PRPS1）をリン酸化し、肝細胞癌の増殖に関与する）も有するとの報告がなされています。本研究では、KHK-A,C のそれぞれが糖尿病性腎臓病に及ぼす影響を新たに検討しました。

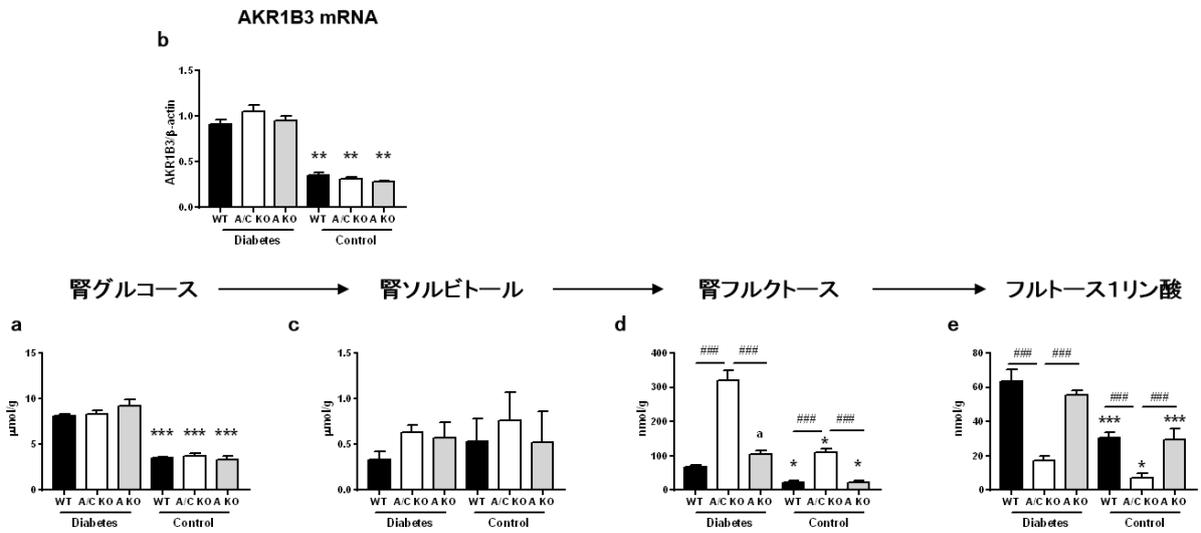
## 2. 研究成果

本研究グループは、KHK-A/C を有した糖尿病野生型 (D-WT)、糖尿病 KHK-A/C 両欠損マウス (D-KHK-A/C KO)、糖尿病 KHK-A 単独欠損マウス (D-KHK-A KO)、及びそれぞれのタイプに対して非糖尿病である群を作成し、腎機能、尿細管障害、炎症、酸化ストレス、低酸素について検討しました。さらに、腎組織、血清、尿検体を対象にして代謝産物を網羅的に測定できるメタボロミクス解析を行い、フルクトース代謝を含め、基本的な糖代謝 (解糖系<sup>※3</sup>・TCA 回路<sup>※4</sup>)・核酸代謝<sup>※2</sup>・NAD 代謝<sup>※5</sup> など詳細な代謝産物の動態を解析しました。全ての糖尿病群において、腎のグルコース、フルクトース値の有意な上昇、アルドース還元酵素 (グルコースをソルビトールに変換する酵素) の有意な発現上昇が認められ、腎でのポリオール経路<sup>※6</sup> の活性化が確認されました (図 1)。KHK-A/C を有した糖尿病野生型 (D-WT)、糖尿病 KHK-A 単独欠損マウス (D-KHK-A KO) では、腎腫大、尿細管障害の増悪を認められ、酸化ストレス・核酸代謝の亢進を伴っていましたが、フルクトースを代謝できない糖尿病 KHK-A/C 両欠損マウス (D-KHK-A/C KO) では、これらは有意に軽減していました (図 2)。一方で、血液中の老廃物などの濾過装置として機能している糸球体の障害については糖尿病群間で有意な差は認めませんでした。フルクトース代謝では ATP<sup>※1</sup> が消費され AMP<sup>※7</sup> が増加し核酸分解経路が活性化することが知られています。核酸代謝の最終代謝産物であるアラントイン<sup>※6</sup> の尿中濃度は、腎 AMP 及び尿細管障害マーカー<sup>※9</sup> である尿中 NGAL<sup>※10</sup> と有意な相関関係を認めました (図 3)。これらの結果から、野生型および KHK-A 欠損マウス両者に存在する KHK-C によるフルクトース代謝は尿細管障害を引き起こし、糖尿病性腎臓病の進展の一因になっていることが示唆されました。

さらに、糖尿病 KHK-A 単独欠損マウス (D-KHK-A KO) は KHK-A/C を有した糖尿病野生型 (D-WT) と比べ、有意に腎機能が低下しており、より強い炎症・尿細管障害が認められました。フルクトース代謝産物を詳細に検討した結果、D-WT と比べ、D-KHK-A KO において、腎フルクトース、フルクトース代謝の下流に位置するジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) <sup>※11</sup> や、TCA 回路の中間代謝産物<sup>※4</sup> が有意に増加しており、腎フルクトース代謝が D-KHK-A KO でより活性化していることが示唆されました (図 4)。さらに、D-KHK-A KO では、D-WT と比べ腎 NAD<sup>※5</sup> の有意な減少とともに、腎 hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) <sup>※12</sup> の発現及び尿中乳酸の有意な上昇を認め、腎の低酸素状態が示されました (図 5)。NAD 低下は Sirtuin1<sup>※13</sup> の不活性化を介して、HIF1 $\alpha$  の発現を上昇させます。KHK-A はプロテインキナーゼとしての機能を有しており、PRPS1 をリン酸化することで、ホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) という酸を産生します。PRPP は NAD 合成経路に必要であるため、D-KHK-A KO では、PRPP の不足により NAD 産生が低下し、低酸素状態を形成したと考えられました。

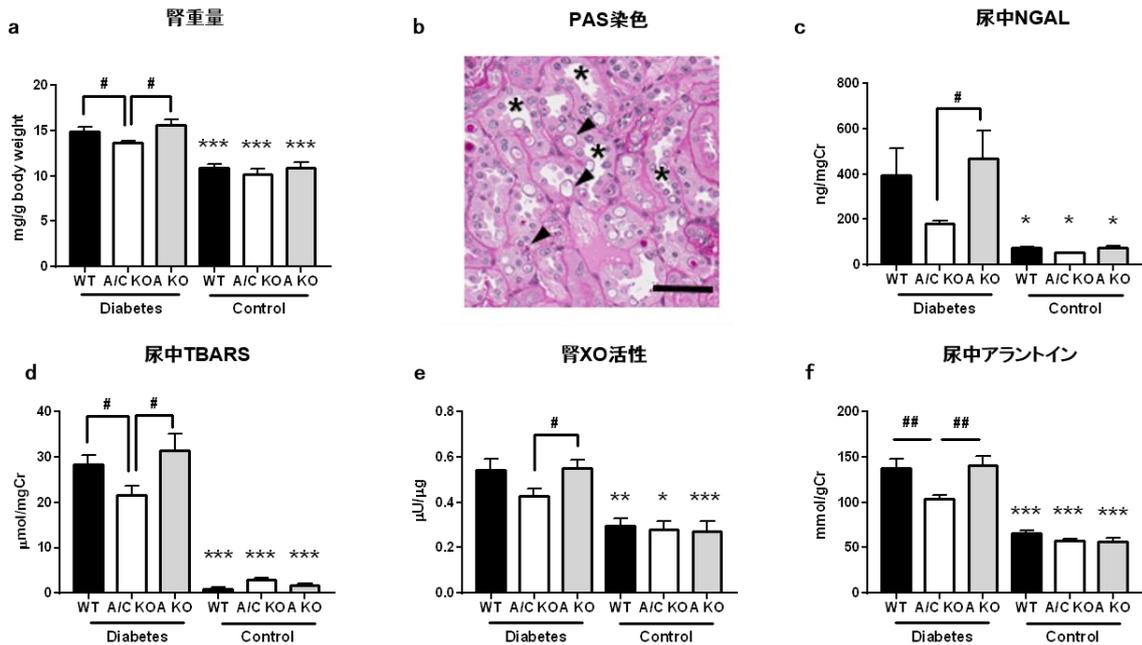
本研究の成果により、KHK-C によるフルクトース代謝は糖尿病性腎臓病を増悪させることが示唆され、一方で、KHK-A は糖尿病性腎臓病の進展に保護的に作用することが示唆されました (図 6)。

図1: 腎ポリオール経路の解析



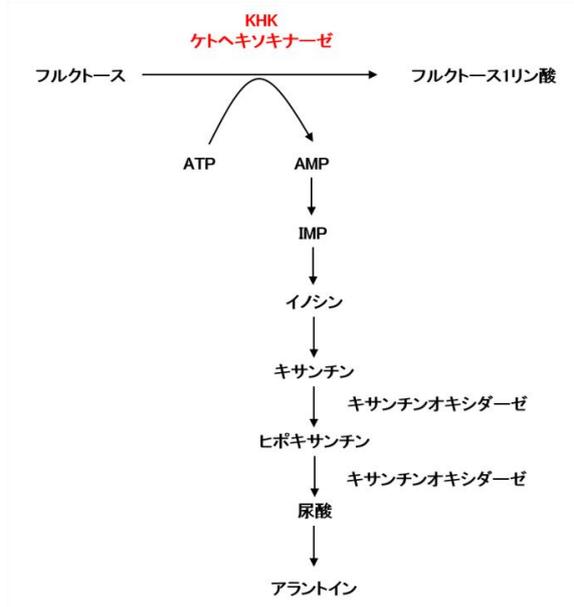
腎グルコース、フルクトース値、アルドース還元酵素のmRNA発現は糖尿病群で有意に高値であり、糖尿病腎でのポリオール経路の亢進を認めた。フルクトース代謝はKHK-A/C KOマウスで抑制されていた。

図2: 腎腫大、酸化ストレス・核酸代謝の亢進、尿細管障害の評価



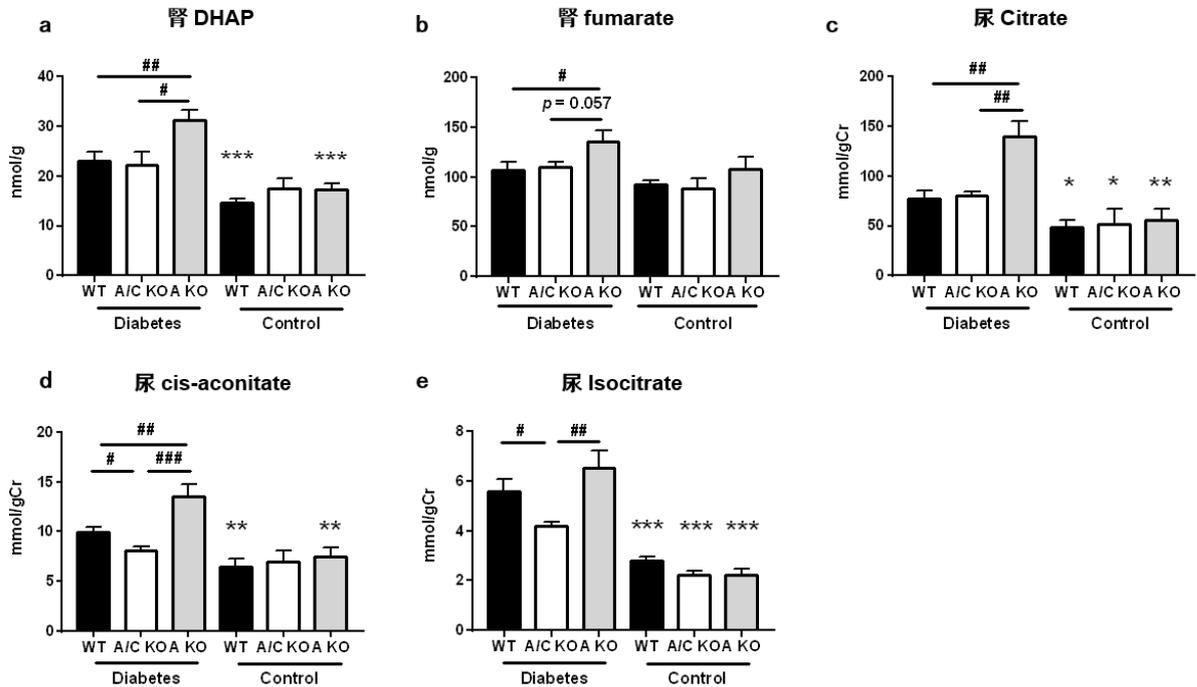
D-WT、D-KHK-A KOは、KHK-A/C KOと比較して有意な腎腫大、尿細管障害マーカーである尿中NGAL、酸化ストレスマーカーである尿中TBARS・腎XO活性の上昇、核酸代謝の最終分解産物である尿中アラントインの上昇を認め、D-KHK-A KOでは、より重度の尿細管上皮細胞変性・尿細管拡張を認めた。

図3: KHKとフルクトース代謝、核酸分解経路の関係



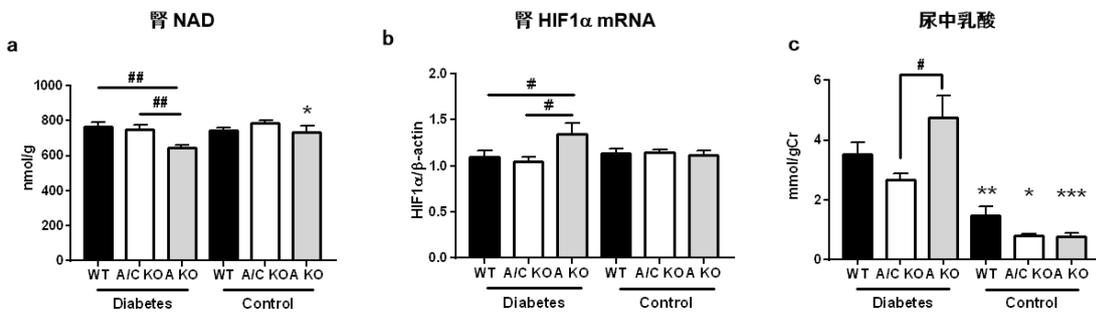
KHKによりフルクトースが代謝される際にATPが消費され、核酸分解経路が亢進する。ヒトでは最終代謝産物は尿酸であるが、げっ歯類ではアラントインまで変換され、尿中に排泄される。

図4: フルクトースの下流代謝産物に関する解析



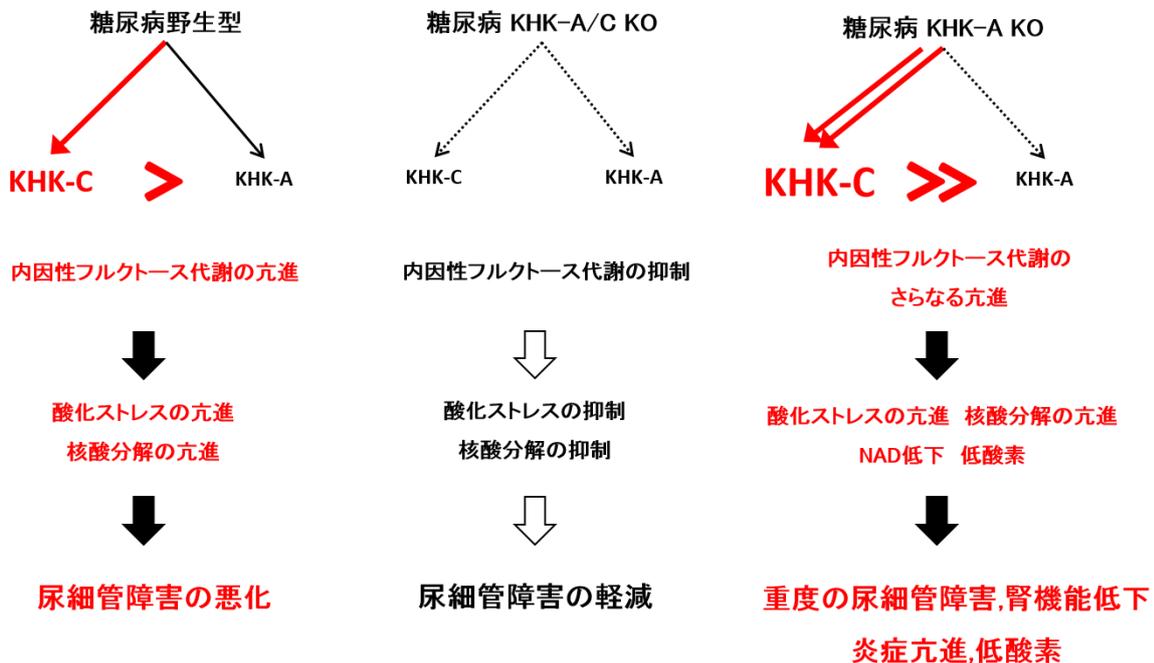
D-KHK-A KOはD-WT, D-KHK-A/C KOと比較して腎DHAP・腎fumarate・尿citrate・尿cis-aconitate・尿isocitrateが有意に高値であった。D-WTは、D-KHK-A/C KOと比較して、尿cis-aconitate・尿isocitrateが有意に高値であった。D-KHK-AKOマウスは、D-WTマウスと比べて、フルクトース代謝が亢進していることが示唆された。

図5: 腎低酸素に関する解析



D-KHK-A KOはD-WT,D-KHK-A/C KOと比較して腎NADが有意に低値、腎HIF1 $\alpha$  mRNA発現が有意に高値であった。D-KHK-A KOはD-KHK-A/C KOと比較して尿中乳酸が有意に高値であった。D-KHK-A KOマウスでの腎低酸素状態が示された。

図6: KHK-A及びKHK-Cの糖尿病性腎症における役割



### 3. 今後の展開

ケトヘキソキナーゼ (KHK) によるフルクトース代謝は肥満・高血圧・脂肪肝・インスリン抵抗性などのメタボリックシンドロームや糖尿病性腎臓病の進展に関わっています。本研究の結果により、肥満・脂肪肝・インスリン抵抗性<sup>\*1,4</sup>に加え、末期腎不全の第1位の原疾患である糖尿病性腎臓病において KHK-C によるフルクトース代謝が増悪因子として考えられ、KHK-A は保護的な役割を有していることが解明されました。KHK-C の選択的阻害薬の開発は、これらのメタボリック

シンドローム及び糖尿病性腎臓病の進展抑制につながる新規治療法の開発につながることを期待されます。

#### 4. 用語説明

- 1, ATP: adenosine triphosphate の略。アデノシン三リン酸と呼ばれ、体内で細胞が活動するときを使うエネルギーを貯蔵しており、生体のエネルギー通貨とも呼ばれている。
- 2, 核酸: リボ核酸 (RNA)とデオキシリボ核酸 (DNA)の総称。アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C)、ウラシル (U) などの塩基骨格を持つ。ATP,AMP はアデニンとリボースからなるアデノシンにリン酸基が結合しているもので、核酸の 1 種である。フルクトースが KHK により代謝される際、核酸である ATP が使用され、AMP へ代謝される。AMP はその後、ヒトでは尿酸、げっ歯類ではアラントインまで代謝されるため、尿酸やアラントインは核酸関連物質と呼ばれている。
- 3, 解糖系: グルコースを代謝する主な経路であり、ほとんどすべての生物に認められる。最終的にピルビン酸まで代謝される。嫌氣的条件では乳酸へ変換され、好氣的条件では TCA 回路に合流する。
- 4, TCA 回路: TCA 回路はクエン酸回路とも呼ばれ、ミトコンドリア内で酸素を用いて好氣的代謝を行うことで効率の良いエネルギー産生を可能にしている。クエン酸、シス・アコニット酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸などが TCA 回路の中間代謝産物である。
- 5, NAD: nicotinamide adenine dinucleotide の略。NAD は Sirtuin1 の活性化に必要であり、NAD 不足は Sirtuin1 の不活性化から HIF1 $\alpha$ の上昇を引き起こし、低酸素状態を形成する。NAD 低下は糖尿病性腎症の進展と密接な関係を持っている。NAD は、生体内で主に salvage 経路を介して合成される。NMN (nicotinamide mononucleotide)は NAD の前駆体であり、NMN は NAM (nicotinamide) と PRPP (phosphoribosyl pyrophosphate) から合成される。KHK-A は PRPS1 (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1) をリン酸化することで、PRPP の合成を促進するため、KHK-A 欠損により PRPP の供給が不足し、NAD が減少することで低酸素状態を形成すると考えられる。
- 6, ポリオール経路: グルコースを代謝する経路の一つ。解糖系はグルコース代謝の主経路であるが、ポリオール経路はグルコース代謝の副経路であり、体内においてグルコースからフルクトースを産生する。アルドース還元酵素を介してグルコースからソルビトールができ、ソルビトール還元酵素によりソルビトールからフルクトースが産生される。
- 7, AMP: Adenosine monophosphate の略。アデノシン一リン酸と呼ばれ、ATP の加水分解により得られる有機化合物である。
- 8, アラントイン: げっ歯類における核酸代謝の最終代謝産物。フルクトースが代謝される際に ATP が消費される結果、AMP が産生される。AMP はその後、キサンチン、ヒポキサンチン、尿酸へと代謝されていく。ヒトでは尿酸を代謝する酵素であるウリカーゼが欠損しており、尿酸が最終代謝産物になるが、げっ歯類では、ウリカーゼが保存されているため、アラントインへ変換され、尿中へ排泄される。
- 9, 尿細管障害マーカー: 尿細管上皮細胞は腎臓を構成する主な細胞である。糸球体で濾過された水分や栄養素を再吸収する役割をもつ。尿細管障害は腎機能低下と密接な関係にあることが知られ

ており、尿細管障害を反映する種々のマーカーが知られている。

- 10, NGAL: 尿中の好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)。尿細管障害を反映するバイオマーカーであり、腎障害のマーカーとして広く用いられている血清クレアチニンよりも感度が高いことが知られている。急性腎障害 (AKI) 及び慢性腎臓病 (CKD) の両方に有用なバイオマーカーとして期待されており、保険適用もなされている。
- 11, ジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) : フルクトースの下流代謝産物の1つ。フルクトースからフルクトース 1リン酸へ代謝され、さらにジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒドへ代謝される。その後、ジヒドロキシアセトンリン酸は解糖系へ流入しエネルギー産生に使用される他、トリグリセリド合成にも使用される。
- 12, Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) : 低酸素誘導因子。細胞の酸素供給不足に応じて発現する蛋白質である。低酸素状態に対する細胞の防御機構と考えられているが、持続的な HIF1 $\alpha$  の発現は組織の線維化を起こすことが報告されている。
- 13, Sirtuin1: 長寿遺伝子として知られているサーチュイン遺伝子から合成される蛋白質。サーチュインはヒストン脱アセチル酵素であり、HIF1 $\alpha$  の転写調節に関与している。サーチュインの活性化には NAD が必要である。
- 14, インスリン抵抗性: 細胞がインスリンに対して感受性が低下すること。肥満などのメタボリックシンドロームの患者では、インスリン抵抗性が高いことが知られている。

## 5. 発表雑誌

Tomohito Doke<sup>1, 4</sup> Takuji Ishimoto,<sup>1</sup> Takahiro Hayasaki,<sup>1</sup> Satsuki Ikeda,<sup>2</sup> Masako Hasebe,<sup>2</sup> Akiyoshi Hirayama,<sup>2</sup> Tomoyoshi Soga,<sup>2</sup> Noritoshi Kato,<sup>1</sup> Tomoki Kosugi,<sup>1</sup> Naotake Tsuboi,<sup>1</sup> Miguel A. Lanasa,<sup>3</sup> Richard J. Johnson,<sup>3</sup> Kenji Kadomatsu,<sup>4</sup> and Shoichi Maruyama<sup>1</sup>

1 Departments of Nephrology, Nagoya University Graduate School of Medicine

2 Institute for Advanced Biosciences, Keio University

3 Division of Renal Diseases and Hypertension, University of Colorado Denver

4 Departments of Biochemistry, Nagoya University Graduate School of Medicine

" Lacking Ketohexokinase-A Exacerbates Renal Injury in Streptozotocin-induced Diabetic Mice. "

Metabolism (2018 年 3 月 29 日付の電子版に掲載)。

DO : 10.1016/j.metabol.2018.03.020

**English ver.**

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Metabolism\\_20180425en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Metabolism_20180425en.pdf)