

主論文の要旨

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

〔 ストレプトゾトシン誘導糖尿病マウスにおいて、
ケトヘキソキナーゼ A 欠損は腎障害を悪化させる 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

道家 智仁

【緒言】

ケトヘキソキナーゼ (KHK) は、フルクトースを代謝する酵素である。KHK は KHK-C と KHK-A の 2 種類のアイソフォームがある。KHK-C は腎臓、肝臓、小腸に発現しており、フルクトース親和性が高い。一方で、KHK-A は腎臓を含め幅広い臓器に分布しているが、フルクトース親和性は低い。また、KHK-A はフルクトース代謝以外に、phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PRPS1) をリン酸化する機能を有する。我々は以前に KHK-A/C 両欠損マウスにおいて、糖尿病性腎症(DKD)の進展が抑制されたことを示したが、KHK-A 及び KHK-C のそれぞれの DKD における役割は解明されておらず、本研究では、KHK-A 単独欠損マウスを用いて、KHK-A 及び KHK-C が DKD に及ぼす影響を検討した。

【対象と方法】

8-12 週齢の雄、野生型マウス(C57BL/6)、KHK-A・KHK-C 両欠損マウス (KHK-A/C KO)、KHK-A 単独欠損マウス(KHK-A KO) を実験に用い、Streptozotocin (STZ) を 5 日間連続で腹腔内投与(50 mg/kg)し、1 型糖尿病(D)を作成した。非糖尿病群をコントロール群(C)とし、合計 6 群作成した。体重、血糖値、血圧、食事摂取量を観察し、STZ 最終投与から 22-24 週後に屠殺した。ELISA, 免疫組織染色, Western blotting, Quantitative RT-PCR などの手法を用い、腎機能、尿細管障害、炎症、酸化ストレス、低酸素を検討した。メタボロミクス解析を用いて、尿及び腎フルクトース代謝、解糖系及び tricarboxylic acid cycle (TCA) 回路、核酸・nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 代謝を検討した。

【結果】

1: 腎機能障害、糸球体及び尿細管障害

糖尿病群において体重、血糖値、血圧、食事摂取量に有意な差は認めなかったが (Table 1)、D-WT, D-KHK-A/C KO と比較して D-KHK-A KO では、腎機能が有意に低下していた (Figure 1d,e)。病理学的検討では、D-KHK-A KO は、D-KHK-A/C KO と比較して、尿細管の有意な拡張を認め、尿細管上皮細胞の変性、空胞化が顕著であった (Figure 2a-c)。D-WT, D-KHK-A KO は、D-KHK-A/C KO と比較して、尿 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) の上昇を認め、D-KHK-A KO で有意な差を認めた (Figure 2d)。尿中アルブミン、糸球体メサンギウム領域は糖尿病群間で有意な差を認めなかった (Figure 2e,g)。

2: 腎の炎症

D-KHK-A KO は、D-WT, D-KHK-A/C KO と比較して、腎 F4/80 陽性細胞の浸潤、F4/80 mRNA 発現が有意に増加していた (Figure 3a-c)。D-KHK-A KO は、D-WT と比較して、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA 及びタンパク、tumor necrosis factor α (TNF α) mRNA, inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA の有意な上昇を認めた (Figure 3d-g)。

3: ポリオール経路とフルクトース代謝

腎グルコース、腎フルクトース、腎フルクトース 1リン酸 (F1P) は、コントロール群と比べて、糖尿病群で有意に上昇しており、腎 *aldo-keto reductase family 1 member 3* (AKR1B3) mRNA の有意な上昇を伴っていた(Figure 4a-e)。KHK-A/C KO は、D-WT, D-KHK-A KO と比較して、腎フルクトース、血清フルクトースの有意な上昇を認めた(Figure 4d,h)。腎における KHK のタンパク発現は D-WT、D-KHK-A KO 間で有意な差は認めなかったが、腎フルクトースは D-WT と比較して、D-KHK-A KO で有意な上昇を認めた(Figure 4d,f)。

4: 酸化ストレス、核酸代謝

D-KHK-A/C KO と比較して、D-WT, D-KHK-A KO において、尿 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)、腎 *xanthine oxidase* (XO)活性、腎 *osteopontin* (OPN) mRNA 発現、核酸代謝の最終代謝産物である尿中アラントインの有意な上昇を認めた(Figure 5a-d)。尿中アラントインは、腎 AMP、尿 NAGL と有意な相関関係を認めた(Figure 5e,f)。

5: フルクトースの下流代謝産物

D-WT, D-KHK-A/C KO と比較して、D-KHK-A KO では、腎 *dihydroxyacetone phosphate* (DHAP)に加え、腎 *fumarate*, 尿 *citrate*, 尿 *cis-aconitate*, 尿 *isocitrate* の有意な上昇、及び、腎 *protein kinase C-β* (PKC-β) mRNA の発現の亢進を認めた(Figure 6a-f)。このうち、尿 *cis-aconitate*, 尿 *isocitrate* は、D-KHK-A/C KO と比較して、D-WT で有意な上昇を認めた(Figure 6e,f)。

6: 腎 NAD 代謝、低酸素

D-WT, D-KHK-A/C KO と比較して、D-KHK-A KO では腎 NAD の有意な低下、腎 *hypoxia inducible factor 1α* (HIF1α) mRNA 発現の有意な上昇を認めた(Figure 7a,d)。D-KHK-A/C KO と比較して、D-KHK-A KO は、腎 *nicotinamide* (NAM)、尿中乳酸の有意な上昇を認めた(Figure 7c,f)。

【考察】

腎アルドース還元酵素の遺伝子発現及び腎フルクトース値がコントロール群と比較して、糖尿病群で有意に上昇していたことから、糖尿病群では、ポリオール経路の活性化を介して腎での内因性フルクトース産生が亢進していることが示された。糖尿病群間の食事摂取量、体重、血糖値、血圧に有意な差は認めなかったものの、D-WT, D-KHK-A KO で認められた腎重量の増加、尿 NGAL の増加、腎におけるフルクトース代謝・核酸代謝の亢進、酸化ストレスの亢進はいずれも D-KHK-A/C KO で抑制されていた。D-WT, D-KHK-A KO はともに KHK-C を有しているが、KHK-C は近位尿細管に発現しており、糸球体には発現していない。糸球体障害を反映する尿中アルブミン値やメサンギウム領域に群間差がなかったことを踏まえると、KHK-C による近位尿細管細胞でのフルクトース代謝が、尿細管障害を増悪させた一因と考えられた。

本研究での重要な知見は、D-WT と比べ、D-KHK-A KO において腎機能が有意に悪化しており、炎症の増悪、より強い尿細管障害を伴っていたことである。D-WT と比

較し、D-KHK-A KO は腎フルクトース, DHAP, TCA 回路の中間代謝産物の有意な上昇を認め、腎フルクトース代謝が D-KHK-A KO でより亢進していることが示唆された。

NAD 低下は、Sirt1 の活性化低下を引き起こし、低酸素環境と同じ状態を作り出す。D-KHK-A KO では、D-WT と比べ腎 NAD の有意な低下とともに、腎 HIF1 α の発現、及び、尿中乳酸の上昇が認められ、D-KHK-A KO の腎低酸素状態が示唆された。KHK-A は PRPS1 をリン酸化することで、phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP)を産生する。PRPP は *de novo* NAD 合成経路に必要であるため、D-KHK-A KO では、PRPP 不足により、NAD が低下したと考えられた。

【結語】

D-WT , D-KHK-A KO で認められた腎重量の増加、尿 NGAL の増加、腎フルクトース代謝・核酸代謝の亢進、酸化ストレスの亢進は、D-KHK-A/C KO で軽減していた。D-WT と比較して、D-KHK-A KO は腎フルクトース代謝の亢進、低酸素、炎症の増悪を認め、より重度の尿細管障害を呈し、腎機能低下を引き起こした。KHK-C によるフルクトース代謝は DKD を増悪させることが示唆され、一方で、KHK-A は DKD の進展に保護的に作用することが示唆された。