

主論文の要旨

**Fructose increases the activity of sodium hydrogen  
exchanger in renal proximal tubules that is  
dependent on ketohexokinase**

フルクトースは腎臓の近位尿細管におけるナトリウム  
水素交換輸送体の活性をケトヘキソキナーゼ依存的に  
増加させる

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)

早崎 貴洋

## 【緒言】

近年、高フルクトース摂取は、実験動物およびヒトにおいてメタボリックシンドロームを引き起こすことが知られている。フルクトースの摂取は腎におけるナトリウムの再吸収を促進し血圧を上昇するが、この過程におけるフルクトース代謝の役割は明らかではない。我々は、フルクトースのフルクトース1リン酸への主な代謝酵素であるケトヘキソキナーゼ (KHK) によるフルクトース代謝の、腎臓の近位尿細管細胞でのナトリウム水素交換輸送体 (NHE) の活性化および腎臓でのナトリウム再吸収における役割を検討した。

## 【方法】

C57BL/6、雄の野生型 (WT) 及び KHK ノックアウト (KHK-KO) マウスを用いた (n=6、 Study1、 Study2)。Study1: WT、KHK-KO マウスに対し、食餌として高塩食 (4%NaCl、 HSD) 又は通常食 (CD) を、飲水として 10%フルクトース水 (w/v、 Fr) 又は水道水 (Wa) を与え、計 8 群を作成した (Fig. 1A)。5 週間投与し、血圧を tail cuff 法にて測定し、6 時間絶食の上で屠殺し、組織採取を行った。Study2: フルクトースによる腎臓でのナトリウム再吸収への効果を、腸管での吸収の影響を除いて検討するため、WT 及び KHK-KO マウスに CD と Fr を 5 週間与え、0、1、3、5 週目に生理食塩水 1.5ml を腹腔内投与し、採尿を行った後、各 1 週間後に組織採取を行った (Fig. 3A)。Study 3: ブタ腎臓近位尿細管細胞 (LLC-PK1) を用い、0、1、5mM のフルクトース刺激を 48 時間行い、KHK siRNA の有無によるフルクトース代謝と NHE 活性の関連を検討した (Study3、 Fig. 5A)。全データを means ± SEM で示した。各群間の検定では、 $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 【結果】

Study1 において、WT マウスの 4 群の中でフルクトース水と高塩食を与えた群 (WT HSD+Fr) にのみ、4 週以降の有意な収縮期血圧の上昇を認め、尿中ナトリウム排泄の低下を認めた。一方、KHK-KO マウスでは全群でこれらの変化を認めなかった (Fig. 1B、 1C)。腎臓において、WT はフルクトースの摂取により、NHE3 と共に KHK の 2 種類のスプライスバリエントである、KHK-A、KHK-C の mRNA の発現増加を認めた (Fig. 1D-F)。KHK 及び NHE3 が近位尿細管に発現していることを免疫組織染色にて確認し (Fig. 2A、 2B)、腎組織の連続切片を用いた免疫組織染色 (Fig. 2C) 及び免疫蛍光二重染色 (Fig. 2D) により、KHK 陽性近位尿細管細胞の刷子縁に NHE3 が存在することを確認した。Study2 において、フルクトースの摂取により、WT における生理食塩水の腹腔内投与後の尿中ナトリウム排泄の低下を認めたが、KHK-KO では変化を認めなかった (Fig. 3B)。WT はフルクトースの摂取により、腎臓における KHK-A、KHK-C の mRNA の発現増加を認めた (Fig. 3C、 3D)。一方、腎における NHE3 蛋白レベルには有意な変化は認めなかったが、開始時に比して 4 週時で p-NHE3 / total NHE3 比の有意な減少を認め、またこれらは同時期の KHK-KO に比して有意に低かつ

た (Fig. 3E)。Study3 において、LLC-PK1 の KHK siRNA による KHK 発現の抑制、フルクトースの代謝物であるフルクトース 1 リン酸の抑制を確認した (Fig. 4B-D)。LLC-PK1 において、フルクトースは濃度依存的に NHE 活性を上昇させたが (Fig. 4A)、KHK siRNA によりその活性の上昇は抑制を認めた (Fig. 5B)。フルクトース刺激により、LLC-PK1 は細胞内アデノシン三リン酸 (ATP)、環状アデノシン一リン酸 (cAMP) 及び p-NHE3 / total NHE3 比の減少を認め (Fig. 5C-E)、その変化は KHK 発現の抑制によって防がれた。

### 【考察】

Study1 において、腎臓において KHK と NHE3 は近位尿細管に発現し、フルクトースと塩分の併用において KHK によるフルクトース代謝依存的な尿中ナトリウム排泄の低下および血圧の上昇を認めた。Study2 において、KHK によるフルクトース代謝は、pNHE3 / NHE3 比を減少し、腎臓におけるナトリウム再吸収を高めることが示された。これまでに、NHE3 の活性化は p-NHE3 / total-NHE3 比の減少を伴うことが報告されており、本研究においても、フルクトース摂取により WT の p-NHE3 / total NHE3 比は 4 週目において、開始時及び同時期の KHK-KO よりも有意な減少を認めた (Fig. 3E)。糸球体で濾過された NaCl の約 70% は近位尿細管の NHE3 を介して再吸収されることが知られており、またフルクトースは LLC-PK1 細胞において、cAMP 減少による PKA 経路のダウンレギュレーションを介して、pNHE3 の総 NHE3 に対する比率を減少させることにより、NHE1 ではなく NHE3 を活性化することが知られている。cAMP は細胞質内のアデニリルシクラーゼによって ATP から合成されるが、KHK による過剰なフルクトース代謝は細胞内 ATP の枯渇を引き起こすことが知られている。本研究においても、LLC-PK1 細胞において、フルクトース刺激は細胞内 ATP、cAMP レベルの低下、NHE3 のリン酸化の減少および NHE 活性の上昇を誘導した。しかし、siRNA による KHK のノックダウンは、これらの変化を抑制した。これは、KHK によるフルクトースのリン酸化が細胞内 ATP を消費し、続いて細胞内 cAMP を減少し、NHE のリン酸化を減少させることで、NHE 活性を増加させることを示唆していると考えられた (Fig. 6)。以上より、腎臓の近位尿細管細胞において、KHK によるフルクトース代謝は ATP を消費し、それに伴う細胞内 cAMP レベルの減少を介して NHE 活性を上昇し、結果として腎臓でのナトリウム再吸収の亢進および血圧の上昇をもたらすと考えられた。

### 【結語】

フルクトースは腎臓の近位尿細管におけるナトリウム水素交換輸送体の活性をケトヘキソキナーゼ依存的に増加させる