

## 論文の内容の要旨

論文題目 2-deoxyglucose attenuates acute kidney injury via changing the energy metabolism in proximal tubule. (2-デオキシグルコースは近位尿細管におけるエネルギー代謝の変化を介して急性腎障害を軽減する)

氏名 篠原明成

急性腎障害 (AKI) は、虚血や腎毒性物質によって急激に腎機能が低下する病態であるが、集中治療領域において死亡率を上昇させる危険因子であるうえ、慢性腎不全に移行しうることも近年の研究で明らかとなり、腎臓内科医にとって AKI を予防もしくは軽減させることは重要な課題の一つである。

AKI に関連する因子は多岐にわたるが、その中でも炎症は非常に重要な因子である。炎症に関わる主な細胞の中で、近年マクロファージが盛んに研究され、本研究も腎障害とマクロファージの関連について注目した。骨髄由来のマクロファージは大きく M1 と M2 に分類されるが、M1 が早期に傷害部位に集積してサイトカインやケモカインを放出し炎症を惹起するのに対し、M2 は M1 に遅れて集積し、炎症を沈静化させ、線維化に寄与すると考えられている。したがって、M1 を抑制することは、炎症を制御することに繋がり、炎症を伴う腎障害を軽減するとされている。

一方、エネルギー代謝も AKI に関連する重要な因子であり、特にオートファジーと脂質代謝に関連する研究が盛んである。オートファジーは、アミノ酸不足などの飢餓状態において生命活動に必要な遺伝子を発現させるために、既存のタンパク質をアミノ酸に分解して再利用するシステムであるが、特にシスプラチン腎症において保護的に機能すると考えられている。他方で、虚血再灌流 (IR) モデルでは ATP を増加させることが腎臓を保護することも報告されている。脂質代謝に関しては、脂肪酸酸化を促進することで、腎臓への脂質の蓄積や線維化を抑制する可能性があり、腎障害に保護的に働くとする報告が多い。また、脂肪酸酸化で生じるケトン体も SOD2 やカタラーゼを誘導して酸化ストレスを抑制すると考えられている。そのほか、NAD や NADPH、還元型グルタチオンも腎障害に対して保護的に作用する。

本研究で使用する 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) は自身がリン酸化されることでグルコース-6-リン酸もしくはフルクトース-6-リン酸の生成を阻害する物質であり、解糖系を抑制する薬剤として特にがん領域の研究で頻用されている。がん細胞のエネルギー源は主にグルコースで、好氣的条件においても主に解糖系を利用して ATP を合成しているため、2DG は抗がん剤や放射線療法との併用で効果が期待されている。がん細胞と同様、マクロファージのエネルギー代謝は M1 のみが解糖系に依存しているため、2DG は M1 を抑制しうる薬剤として注目されている。他方で、2DG は解糖系を抑制することで、近位尿細管における

脂肪酸酸化やアミノ酸分解など他の代謝経路を活性化する可能性があるが、尿細管にはグルコース-6-リン酸ホスファターゼが発現しているため、リン酸化された 2DG がどの程度蓄積するかは不明である。さらに、近位尿細管における解糖系の重要性もよくわかっていない。以上を背景に、本研究では、2DG がマクロファージと近位尿細管のエネルギー代謝に及ぼす影響と、それにより腎障害が軽減するか否かを検討した。

はじめに、無菌性の炎症を観察する目的でマウス腎片側 IR モデルを用い、2DG のマクロファージに対する効果を確認した。条件検討として、片側 IR モデルで虚血時間を 15 分、20 分、27 分に区切り、各々の虚血時間における術後の腎臓のサイトカイン発現量を観察した。IL-1 $\beta$  は虚血時間 15 分と 20 分では術後 7 日目にピークに達したが、27 分では 14 日目も上昇し続けた。TNF- $\alpha$  もほぼ同様で、IL-6 のピークは 15 分と 20 分で術後 1 日、27 分では 7 日目であった。以上の結果から、虚血時間 20 分で術後 7 日目が最も各サイトカインの発現量の変動が確認しやすいと判断した。2DG を IR の 3 時間前に 2 g/kg 腹腔内に投与し、術後も 1 日 1 回投与した。術後 7 日目のサイトカインの発現量は、2DG 群で TNF- $\alpha$  が上昇したものの、IL-1 $\beta$  の発現量は低下した。in vitro ではマウス腹腔由来のマクロファージである RAW264.7 細胞を用いて、2DG がマクロファージに及ぼす影響を観察した。RAW264.7 細胞を 100 ng/ml のリポポリサッカライド (LPS) で刺激したところ、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量は上昇したが、前処置として 5 mM の 2DG を投与したところ、IL-1 $\beta$  の発現量は著しく減少した。IL-1 $\beta$  は M1 から放出される主要なサイトカインの一つであることから、2DG が M1 の活性を抑制したと考えた。

次に、急性期に及ぼす影響を観察するため、術後 1 日目で血清クレアチニン値がピークとなる両側 IR モデルを用い、片側と同様に IR の 3 時間前に 2DG を 2 g/kg 投与し、vehicle 群と比較したが、腎臓におけるサイトカインの発現量に有意差なく、血清クレアチニン値、病理所見とともに、同条件では 2DG の効果は示せなかった。また、2DG の尿細管への影響を確認するため、投与 3 時間後の腎皮質の pAMPK、AMPK、LC-3、p62 の蛋白発現量をウエスタンブロットにて解析したが、有意差なく、2DG が投与 3 時間以内に AMPK やオートファジーを活性化させる可能性は否定された。

そこで、2DG を 24 時間前に投与することで、エネルギー代謝が変化するか、両側 IR による腎障害が軽減するかを確認した。術後 1 日目の血清クレアチニン値は vehicle 群で  $1.4 \pm 0.4$  mg/dl、2DG 群で  $0.9 \pm 0.1$  mg/dl と有意差を認めた。尿細管壊死の指標である Kim-1 の発現量も 2DG 群で有意に低下し、病理所見も尿細管壊死は 2DG 群で軽度であった。一方、サイトカインやケモカインの発現量には変化なく、同条件でも 2DG の炎症に対する効果は否定的であった。IR 直前、投与 24 時間後の腎皮質の pAMPK、AMPK、LC-3、p62 の蛋白発現量をウエスタンブロットにて解析したところ、2DG 群で AMPK の活性は抑制され、2DG が腎皮質の ATP を増加させる可能性が示唆された。ATP が上昇した原因を解明するため、解糖系やグルコース再吸収に関連する遺伝子の発現量を確認したが、Hk、Gpi、Glut、Sglt に変化なかった。脂質代謝では、脂肪酸酸化に関連する、Ppara、Cpt、Acox の

発現量が 2DG 群で有意に上昇していた。両群で食事摂取量に差はなく、血糖値や血清トリグリセライド値にも差はなかったが、遊離脂肪酸が NS 群で  $475 \pm 78 \mu\text{Eq/l}$ 、2DG 群で  $657 \pm 94 \mu\text{Eq/l}$  と 2DG 群で有意に上昇していた。以上の結果から、遊離脂肪酸の上昇が PPAR $\alpha$  を活性化し、腎臓の脂肪酸酸化亢進と ATP 増加に寄与していると考えられた。遊離脂肪酸が増加した理由は、他臓器の解糖系が抑制されたことに伴う、脂肪細胞からの遊離ではないかと考えた。アミノ酸分解酵素では、Sds の発現量のみが上昇していた。セリンは解糖系の中間産物である 3-ホスホグリセリン酸から合成され、ピルビン酸に分解されるアミノ酸であるため、解糖系の下流や側路であるペントースリン酸回路が関与している可能性を疑った。結果、2DG の前処置によって、Pk の mRNA 発現量が上昇していることが確認され、上流ではペントースリン酸回路に作用する G6pd と Tkt も発現量が上昇していた。さらに、ペントースリン酸回路で生成される NADPH/NADP の変動を示唆する Nqo1 や酸化ストレス酵素である Gpx の発現量も上昇していた。vitro でも 2DG のペントースリン酸回路への影響と酸化ストレス物質の発現量を、ヒト近位尿細管細胞である HK-2 細胞を用いて確認したが、同様の傾向を示した。さらに、4 mM の過酸化水素による細胞死を LDH assay にて比較したが、vehicle 群で  $60.1 \pm 2.5\%$ 、2DG 群で  $53.3 \pm 1.9\%$  と有意差を認めた。

上述の結果から、2DG は、①M1 の活性を抑制することで、片側 IR による腎障害を軽減する可能性があること、②遊離脂肪酸の放出を促し、近位尿細管細胞の ATP を増加させることで、炎症細胞に及ぼす作用とは独立して虚血に対して有利に働くこと、③ペントースリン酸回路を亢進し、酸化ストレスに対して保護的に働くことが示された。

本研究の問題点は、第一に、片側 IR 術後 7 日目も ATP の増加やペントースリン酸回路の亢進によって、腎障害が軽減している可能性がある。IL-1 $\beta$  の発現量低下は、腎障害軽減の結果を見ているだけの可能性があり、マクロファージ特異的に解糖系を抑制した遺伝子改変動物を用い、片側 IR による腎障害が軽減するかを確認する必要がある。また、個体数も増やして解析しなければならない。第二に、3 時間前に高用量の 2DG を投与したマウスの腎臓でもペントースリン酸回路が亢進すると考えられるが、同条件では両側 IR による腎障害は軽減しなかった。これは急激なエネルギー代謝の変化それ自体が悪影響を及ぼした可能性がある。第三に、vivo と vitro では近位尿細管のエネルギー代謝が完全には一致せず、2DG がそれぞれに与える影響も異なる可能性がある。本研究では、各エネルギー代謝酵素の mRNA を vivo と vitro で一致させて対応したが、各々の代表的な酵素活性の計測や、メタボローム解析が必要かもしれない。しかし、その場合でも腎皮質には近位尿細管以外に、糸球体や一部遠位尿細管が混在するため、マイクロダイゼクションまで必要かもしれない。第四に、PPP の活性化は Nrf2 が関与しているかもしれない。最後に、遊離脂肪酸が近位尿細管の ATP を増加させ、低酸素や低栄養に対して保護的に働くことを vitro でも確認する必要がある。