

氏 名 富田 一聖

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第 899

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

学位授与年月日 令和 3 年 3 月 9 日

学位論文題目 SGLT2 Inhibition Mediates Protection from Diabetic
Kidney Disease by Promoting Ketone Body-Induced mTORC1
Inhibition

(糖尿病性腎臓病に対する SGLT2 阻害薬による腎保護効果には、ケトン体上昇を介した mTORC1 阻害が寄与している)

審査委員 主査 教授 西 英一郎

副査 教授 向所 賢一

副査 教授 河内 明宏

論文内容要旨

*整理番号	908	(ふりがな) 氏名	とみた いっせい 富田 一聖
学位論文題目	SGLT2 Inhibition Mediates Protection from Diabetic Kidney Disease by Promoting Ketone Body-Induced mTORC1 Inhibition (糖尿病性腎臓病に対する SGLT2 阻害薬による腎保護効果には、ケトン体上昇を介した mTORC1 阻害が寄与している)		
<p>【研究の目的】</p> <p>糸球体病変を主座とし高度蛋白尿を伴う典型的な糖尿病性腎臓病(DKD)に対する治療法の確立は依然として重要な課題である。一方で、蛋白尿を伴わない DKD の症例が増えており、加齢や肥満による細動脈硬化とそれに伴う近位尿細管障害が一因であると考えられているが、その抑制機構は明らかでない。そこで、申請者らは、多様な病態を呈する DKD において、糸球体を治療標的とし蛋白尿を減らすだけでなく、動脈硬化による近位尿細管障害を抑制することが、DKD のより良い予後に繋がると考えるようになった。</p> <p>近年、SGLT2 阻害薬がアルブミン尿の程度に関わらず糖尿病患者の腎機能悪化を抑制すること、また、同薬剤の臓器保護機構に血中ケトン体上昇の関与が報告されている。ATP 産生を糖代謝ではなく脂肪酸酸化に大きく依存している腎近位尿細管細胞では、この脂肪酸酸化低下を介した腎エネルギー代謝不全が腎障害進展に関わることが報告されており、その是正を目的とした新規 DKD 治療の解明が望まれている。そこで申請者らは、新たな DKD 治療標的として、もう一つの ATP 産生源であるケトン体供給が、SGLT2 阻害薬における腎保護に関与するとの仮説を立てた。また近年 DKD において、近位尿細管および糸球体局所での The mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) の過剰亢進が病態の進展に関わることが報告されているが、その治療法は明らかとされていない。そこで、DKD における近位尿細管および糸球体での局所的な mTORC1 亢進に対して、絶食シグナルであるケトン体が抑制的に作用し腎保護効果を発揮するという仮説を立て、動脈硬化モデル、近位尿細管特異的 mTORC1 過剰発現モデル、肥満 2 型糖尿病モデルマウスを用いて以下の検証を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>①野生型・動脈硬化モデルマウスにおける近位尿細管での ATP 産生の検討</p> <p>野生型マウスと高脂肪食負荷 ApoE 欠損マウス (HFD-ApoE^{-/-}) の腎近位尿細管細胞を単離培養し、ブドウ糖を含まないエネルギーフリーの緩衝液に置き換え、そのままの群と脂肪酸・ケトン体附置の 3 群に分け、回収した細胞の ATP 含量を測定した。</p> <p>②動脈硬化モデルマウスにおけるケトン体含有食・SGLT2 阻害薬での腎保護効果の検討</p> <p>10 週齢から 16 週間高脂肪食を加えた HFD-ApoE^{-/-}マウスを作成し、ケトン体前駆物質である 1,3-ブタンジオール (1,3-BD) および SGLT2 阻害薬エンパグリフロジン (エンパ) を 8 週間経口投与し、腎機能、腎組織障害、腎 ATP 含量、近位尿細管組織での mTORC1 活性を評価した。さらに内因性ケトン体合成速酵素 Hmgcs2 と ApoE のダブルノックアウトマウスを作成し、エンパによる腎保護効果を検証した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

別紙様式3の2 (課程博士・論文博士共用)

(続紙)

③近位尿細管特異的 TSC1^{-/-}マウスにおけるケトン体含有食・SGLT2 阻害薬での腎保護効果の検討

腎局所の mTORC1 活性亢進に対するケトン体の役割を解明するために、mTORC1 抑制遺伝子である TSC1 遺伝子の flox マウスと Tamoxifen 誘導型近位尿細管特異的 Cre 発現 (NDRG1-CreER^{T2}) マウス交配により Tamoxifen 誘導型近位尿細管特異的 TSC1 欠損マウス (PTEC-TSC1^{-/-}) を作製し、1,3-BD およびエンパ投与での腎保護効果を検証した。

④肥満 2 型糖尿病モデルにおけるケトン体含有食・SGLT2 阻害薬での腎保護効果の検討

10 週齢の db/db マウスに対して、1,3-BD およびエンパを 12 週間経口投与し、アルブミン尿の程度、糸球体障害、糸球体組織での mTORC1 活性について検討した。

【結果】

①野生型マウス尿細管では脂肪酸附置により ATP 含量が上昇したが、HFD-ApoE^{-/-}マウス尿細管では脂肪酸附置で ATP 含量は上昇せず、ケトン体附置により ATP 含量が上昇した。

②野生型マウスに比べ、HFD-ApoE^{-/-}マウスは、腎機能低下を示す血清シスタチン C 上昇、腎組織障害、腎組織内 ATP 含量低下を認めた。1,3-BD およびエンパ治療は、血中ケトン体濃度上昇を伴い、HFD-ApoE^{-/-}マウスの腎機能低下、腎組織病変を改善させ、腎組織内 ATP 含量を上昇させた。さらに、HFD-ApoE^{-/-}マウスの腎免疫組織染色では、近位尿細管領域で mTORC1 活性を示す pS6 発現の亢進と脂肪酸酸化酵素 CPT1a 発現の減弱が認められたが、1,3-BD およびエンパ治療で mTORC1 抑制と脂肪酸酸化の改善が認められた。Hmgcs2 と ApoE のダブルノックアウトマウスでは、エンパ投与による血中ケトン体濃度上昇を伴わず、腎保護効果は認められなかった。

③Tamoxifen 投与 4 週後の 12 週齢 PTEC-TSC1^{-/-}マウスでは、TSC1^{+/+}マウスに比べ、腎腫大、腎近位尿細管での mTORC1 の活性亢進と脂肪酸酸化の低下、腎機能低下を認めたが、1,3-BD あるいはエンパによるケトン体供給によりそれらの病変は全て改善を認めた。

④db/m マウスに比べ、db/db マウスではアルブミン排泄量増加、糸球体免疫組織染色での WT1 陽性細胞数の低下や線維化を示すフィブロネクチン陽性領域の増大などの糸球体障害、pS6 発現亢進を認めたが、1,3-BD およびエンパ治療では血中ケトン体上昇を伴い、それらの病変は全て改善を認めた。

【考察】

糖尿病を合併した動脈硬化による DKD の病態では、近位尿細管で ATP 産生が脂肪酸依存性からケトン体依存性に変化しており、さらに mTORC1 活性亢進が脂肪酸酸化の抑制に寄与し、腎障害の病態と深く関わっている可能性が考えられた。また、SGLT2 阻害薬によるケトン体上昇は、腎保護において不可欠であり、病態の進展に関わり脂肪酸酸化抑制をもたらす mTORC1 を抑制することが示唆された。つまり、DKD の近位尿細管に対するケトン体供給が、ATP 産生というエネルギー供給だけでなく、mTORC1 活性抑制による脂肪酸酸化の回復をもたらし、SGLT2 阻害薬による腎保護に寄与することが明らかとなった。また蛋白尿を呈する肥満 2 型糖尿病に対しても、SGLT2 阻害薬によるケトン体上昇が、糸球体における mTORC1 抑制を介して腎保護効果を発揮している可能性が示唆された。本研究の結果より、ケトン体による腎エネルギー代謝の改善および mTORC1 抑制は、DKD の新規治療標的となる可能性が示された。

【結論】

DKD に対する SGLT2 阻害薬の腎保護効果には、ケトン体による腎への直接的なエネルギー供給および mTORC1 抑制による脂肪酸酸化の回復が寄与している。

博士論文審査の結果の要旨

整理番号	908	氏名	富田 一聖
論文審査委員			
<p>(博士論文審査の結果の要旨)</p> <p>本論文では、動脈硬化に起因する糖尿病性腎臓病 (DKD) における SGLT2 阻害薬の有効性、同薬効におけるケトン体および mTOR 経路の重要性について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 動脈硬化モデル apoE 欠損マウスにおける高脂肪食負荷が、近位尿細管障害、腎 ATP 低下、腎機能低下を誘導し、DKD モデルとして有用である。 2) DKD モデルマウスの近位尿細管細胞の ATP 産生源は脂肪酸からケトン体にシフトする。 3) DKD モデルマウスにケトン体を投与すると、腎 ATP 産生および腎障害が改善する。 4) DKD モデルマウスにおける SGLT2 阻害薬投与は、ケトン体濃度を上昇させ、腎障害を改善する。 5) ケトン体合成律速酵素 Hmgcs2 を欠損させた DKD モデルマウスでは SGLT2 阻害薬による腎保護作用が消失する。 6) ケトン体、SGLT2 阻害薬投与は DKD モデルマウス近位尿細管の mTORC1 活性を抑制する。 7) ケトン体投与は、近位尿細管特異的 mTORC1 過剰活性化マウスにおける腎機能低下、腎 ATP 低下、生存を改善する。 <p>本論文は、DKDにおけるSGLT2阻害薬の有効性とその機序(ケトン体の上昇、mTORC1活性の抑制)について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(2021年1月25日)</p>			