

オステオポンチンがもたらす心腎連関の悪循環を標的とした新たな心不全治療法の開発

白川公亮

順天堂大学大学院 医学研究科

【研究の背景】

心不全は我が国の主要な死因で、5年生存率は50%に満たない極めて予後不良な病態である。臨床では心機能と腎機能は密接に影響し合うことが知られており、心腎連関という概念として注目される。しかし、心腎連関の病態機序は不明な点が多い。最近、DAPA-HF試験やEMPEROR-Reduced試験により、腎近位尿細管上皮細胞特異的に作用する血糖降下薬であるSGLT2(sodium glucose cotransporter 2)阻害薬が、糖尿病を持たない心不全患者の予後を改善させることを示し、心腎連関の概念を裏付けた。一方で、“腎臓を標的とした治療がなぜ心不全の予後を改善させるのか？”に関する詳細な分子機序は明らかではない。

【目 的】

病的状態にある腎近位尿細管上皮細胞の代謝リプログラミングによる腎不全増悪機序と心腎連関を介した心不全増悪機序を解明する。

【方 法】

OPNをコードする遺伝子である*Spp1*のEGFPノックインマウスを用いて、様々な腎障害モデル(虚血再灌流障害(IRI)/片側尿管結紮(UUO)誘発慢性腎線維症モデル/ストレプトゾシン(STZ)誘発糖尿病性腎症モデル)におけるOPNの転写活性の局在や時系列を解析した。また、EGFP-*Spp1*ノックインマウス由来の近位尿細管上皮細胞 Primary culture を作成し、高血糖及び低血糖状態、もしくはSGLT2阻害剤や解糖系阻害剤である2-DG投与下での*Spp1*転写活性の強度を解析した。

【結 果】

オステオポンチン遺伝子をコードする*Spp1*のEGFPノックインマウスから近位尿細管上皮細胞の初代培養を確立し、これらの細胞をグルコース濃度5mM(90mg/dL;正常血糖値相当)および30mM(540mg/dL;高血糖値相当)で7日間培養したところ、5mMで培養した近位尿細管上皮細胞では*Spp1*の転写活性はほとんど起こらなかったが、30mMの高グルコース環境で培養した近位尿細管上皮細胞では*Spp1*の転写活性とオステオポンチンの産生が顕著に増加した。また、高グルコース環境下で*Spp1*の転写活性が上昇した近位尿細管上皮細胞では、ミトコンドリア活性酸素(ROS)の形成が増加した。次に、*Spp1*EGFPノックインマウスの近位尿細管上皮細胞を30mM高グルコース環境で7日間培養し、さらに5mM低グルコース環境で7日間培養すると、*Spp1*転写活性およびミトコンドリアROS形成は著しく抑制された。

*Spp1*EGFPノックインマウスの近位尿細管上皮細胞を30mM高グルコース環境下、CPT-1阻害剤エトモキシール存在下または非存在下で7日間培養した。しかし、エトモキシールによる脂肪酸β酸化の阻害は、高グルコース環境下で誘導されるミトコンドリアROS形成、*Spp1*転写活性化およびOPN産生に影響を与えなかった。以上のことは、高グルコース環境下での*spp1*の転写活性化には、脂肪酸のβ酸化は関与していないことが示唆された。

近位尿細管上皮細胞を高グルコース環境で培養すると、低グルコース環境と比較して乳酸の産生が著しく増加した。これらの結果は、高グルコース環境下では、近位尿細管上皮細胞において好気性解糖系が亢進していることが示唆された。

SGLT2 および GLUT2 を介したグルコースの細胞内取り込みは、糖尿病患者や齧歯類の糖尿病モデルの尿細管、および高グルコース環境で培養した近位尿細管上皮細胞で亢進することが知られている。2-DG による GLUT およびヘキソキナーゼからの細胞内グルコース流入の阻害は、高グルコース環境下で誘導される乳酸産生、ミトコンドリア活性酸素生成、*Spp1* 転写活性および OPN 産生を強く抑制した。さらに、SGLT2 阻害剤であるカナグリフロジンによる細胞内グルコース取り込み阻害は、高グルコース環境下で上昇した乳酸産生、ミトコンドリア活性酸素生成、*Spp1* 転写活性および OPN 産生を有意に抑制した。以上のことから、GLUT および SGLT2 を介したグルコースの流入と解糖系経路の活性化は、高グルコース環境下での *Spp1* 転写活性化に関与していることが示唆された。

ミオイノシトールは、グルコース-6-リン酸から合成される。高グルコース環境下では、ミオイノシトールオキシゲナーゼ (MIOX) の過剰発現によりミオイノシトールの異化が進み、近位尿細管上皮細胞の酸化ストレスが増大し、尿細管間質線維化を促進することが知られている。*Spp1* EGFP ノックインマウスの近位尿細管上皮細胞では、高グルコース環境下で MIOX の発現が上昇していた。MIOX を siRNA でノックダウンすると、ミトコンドリア酸化ストレスが低下し、*Spp1* 転写活性と OPN 産生が抑制された。特に、高グルコース環境における MIOX のアップレギュレーションは、2-DG と SGLT2 阻害剤の両方で阻害された。

【考 察】

本研究では、SGLT2 阻害剤が近位尿細管上皮細胞の代謝プログラミング、特に解糖系代謝の異常を回復させることにより、腎保護作用を発揮する可能性があることを明らかにした。尿細管特異的酵素である Miox は、糖尿病における尿細管細胞の酸化還元バランスの崩れとアポトーシスを調節し、尿細管間質線維化を引き起こす。高グルコース環境下における我々の培養系でも、Miox の発現が上昇し、Miox の発現を siRNA で抑制すると、高グルコース環境下で誘導される *Spp1* の転写活性とミトコンドリアの活性酸素産生が有意に抑制された。高グルコース環境による Miox の発現上昇は、canagliflozin と 2-DG によって抑制された。これらの結果は、近位尿細管上皮細胞における細胞内グルコース流入の増加に伴う糖毒性の少なくとも一部に、ミオイノシトール異化作用の亢進が関与している可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

OPN の高い血清濃度は、慢性腎臓病患者における推定糸球体濾過量 (eGFR) と負の相関があることが報告されている。心不全患者では、血清 OPN 濃度が上昇することが報告されている。さらに、血清 OPN 濃度は、心不全患者における心室頻拍および心室細動の予測因子であることが報告されている。心腎症の分子機構は未だ不明であるが、今回の結果から、SGLT2 阻害剤は代謝経路を解糖系に移行した病的近位尿細管上皮細胞への糖負荷、および OPN の産生を抑制し、心腎症イベントを抑制することが示唆された。

【参考・引用文献】

Shirakawa et al., Int J Mol Sci. 2020 Oct 16;21(20):7676. doi: 10.3390/ijms21207676.