

腎臓における誘導型 PFK-2 の発現と糖尿病腎症の関連

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 近年糖尿病患者数は爆発的に増加しており、患者数の増加に伴う合併症の増加は深刻な問題である。様々な大規模臨床研究で、厳格な血糖管理を行うことで慢性合併症の進展を抑えられることが証明されているが、多くの患者で良好な血糖管理がなされているとは言い難い状況にある。したがって、血糖値のみならず合併症そのものを標的にした新たな治療戦略が必要なことは明らかである。最近の研究では、糖尿病合併症の成因として、高血糖が引き起こす代謝異常、すなわちポリオール経路の亢進、ヘキソサミン経路の亢進、DAG-PKC-MAPK 経路の亢進、終末糖化産物の蓄積などの関連が示唆されている。さらに近年、上記の代謝異常に密接に関連して生体内活性酸素種の過剰な産生が起こっていることが明らかになった。Brownlee はこれらを統合し、生体内活性酸素種の過剰な産生や解糖系の亢進を通じて、種々の代謝異常が相互に連鎖して糖尿病合併症を進展させているというメカニズムを提唱した。解糖系は 2 分子の ATP を産生しながらグルコースがピルビン酸に転換していく反応系であり、糖代謝の中心的な役割を担っている。6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) は解糖系の律速酵素の一つである。ATP は PFK-1 の作用を阻害することが知られている。一方で PFK-1 の活性化因子として Fructose-2, 6-bisphosphate (F-2, 6-BP) が存在する。F-2, 6-BP は 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) により Fructose-6-phosphate (F-6-P) から合成され、ATP による PFK-1 活性の阻害に拮抗し、PFK-1 活性を亢進させ解糖系全体を活性化させる。PFK-2 は同一分子内にキナーゼドメインと、フォスファターゼドメインの両者を併せ持つ二機能性酵素で、4 種類のアイソフォームが報告されておりそれぞれ異なる遺伝子によりコードされている (PFKFB1~4)。各アイソフォームはキナーゼ・フォスファターゼの活性比や各臓器での発現様式が異なる。PFKFB3 蛋白は誘導型 PFK-2 とも呼ばれ、キナーゼ活性が最も高く、解糖系が活性化している組織で高発現するアイソフォームである。例えば癌細胞や胎盤などの増殖がさかんな臓器に高発現することが報告されており、誘導型 PFK-2 は解糖系の亢進における最も重要な PFK-2 アイソフォームと考えられている。前述のように糖尿病では、高血糖に伴い細胞へのグルコース取り込みが増加し、種々の代謝異常を引き起こしている。したがって解糖系の活性化が高血糖に伴う組織障害と密接に関連すると考えられ、細胞内解糖系の制御が糖尿病合併症の治療につながる可能性がある。今回、誘導型 PFK-2 による解糖系の活性化と糖尿病合併症の進展についての関係を明らかにする目的で、誘導型 PFK-2 の発現亢進による F-2, 6-BP を介した解糖系の活性化と、PKC-MAPK 経路や酸化ストレスの関連について検討を行った。

【方法と結果】 (実験 1) ヒト腎臓組織における PFKFB3 mRNA 及び誘導型 PFK-2 蛋白の発現について調べるため、免疫組織化学染色及び *in situ* hybridization 法を行った。PFKFB3 mRNA 及び誘導型 PFK-2 蛋白は、腎尿管上皮細胞に発現を認めた。In vivo における高血糖と解糖系の活性化についての関連を明らかにするため、C57BL/KsJ- db/db マウス及び +m/+m マウス

スの腎組織における F-2, 6-BP 量を測定した。F-2, 6-BP 量は、+m/+m マウスよりも db/db マウスの腎組織で有意に高値を示していた。また、誘導型 PFK-2 蛋白の発現をウエスタンブロット法および免疫組織化学染色にて調べた。ウエスタンブロット法にて、腎組織での誘導型 PFK2 蛋白の発現は+m/+m マウスよりも db/db マウスで高発現していることが示された。免疫組織化学染色にて、db/db マウスにおいてもヒトと同様に腎尿細管上皮細胞に誘導型 PFK2 蛋白の発現を認めた。これらより、db/db マウスの腎臓では解糖系の活性化が起こっていることが示唆された。(実験 2) In vitro での検討として、PFKFB3 を HEK293 細胞に遺伝子導入し安定株を樹立した。Empty vector を導入したものを対照群として、PFKFB3 の強制発現群と対照群で比較を行った。強制発現群では、F-2, 6-BP 量が著明に増加し、また 2-deoxy-[3H] glucose の細胞内への取り込みが増加していた。誘導型 PFK-2 を高発現させた細胞では解糖系の活性化が起こっていることが示唆された。解糖系の活性化と PKC-MAPK 経路についての関連を明らかにするため、MAPK のリン酸化、PKC のリン酸化についてウエスタンブロット法を用いて解析した。MAPK の発現には差はなかったが、強制発現群で MAPK のリン酸化、PKC のリン酸化が亢進していた。誘導型 PFK-2 を高発現させた細胞では PKC-MAPK 経路の亢進が起こっていることが示唆された。解糖系の活性化と酸化ストレスについての関連を明らかにするため、NAD(P)H オキシダーゼの構成蛋白である p22phox の発現について RT-PCR およびウエスタンブロット法を行った。強制発現群では p22 phox の mRNA およびタンパク質の高発現を認め、酸化ストレスの亢進が示唆された。

【考察】本研究は解糖系が糖尿病血管合併症のメカニズムに関与する可能性を示した初めての報告である。糖尿病モデルマウスの腎で PFK-2 の高発現と F-2, 6-BP 量の高値を認め、解糖系の活性化が起こっていることが示唆された。組織学的変化との関連については不明であるが、糖尿病腎症の早期における尿細管細胞での機能異常に、解糖系の亢進が関わっている可能性が考えられた。また、誘導型 PFK-2 による解糖系の活性化が糖尿病合併症の進展に関連しているという仮説を検証するために、培養細胞である HEK293 細胞に遺伝子導入し in vitro での検討を行った。誘導型 PFK-2 を高発現させた HEK293 細胞において、PKC-MAPK 経路の亢進を認めた。さらに、誘導型 PFK-2 を高発現させた HEK293 細胞において、p22 phox の高発現を認め、酸化ストレスが亢進していることが認められた。誘導型 PFK-2 による解糖系の亢進が PKC-MAPK 経路や酸化ストレスの亢進を介して糖尿病合併症の進展に寄与している可能性があると考えられた。解糖系は糖代謝の中心的な役割を担っているのにも関わらず、糖尿病の治療への応用という点からはこれまであまり注目されてこなかった。今後、ヒトの糖尿病性腎症で誘導型 PFK-2 を介した解糖系の活性化が生じていることが証明されれば、何らかの方法で解糖系への介入を行うことが糖尿病合併症の新しい治療に結びつく可能性が考えられる。

【結論】誘導型 PFK-2 による F-2, 6-BP を介した解糖系の活性化は PKC-MAPK 経路や酸化ストレスの亢進を起こし、糖尿病合併症を進展させる作用を有していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

腎臓における誘導型 PFK-2 の発現と糖尿病腎症の関連

本研究では、誘導型 PFK-2 による解糖系の活性化と糖尿病合併症の進展についての関係を明らかにする目的で、誘導型 PFK-2 の発現亢進による F-2,6-BP を介した解糖系の活性化と、PKC-MAPK 経路や酸化ストレスの関連について検討を行った。

実験 1 として免疫組織化学染色及び *in situ hybridization* 法を行い、ヒト腎臓組織の腎尿細管上皮細胞に PFKFB3 mRNA 及び誘導型 PFK-2 蛋白発現を認めた。実験 2 として C57BL/KsJ-db/db マウス及び +m/+m マウスの腎組織における F-2,6-BP 量を測定し、db/db マウスの腎組織で有意に高値を示した。また、腎組織での誘導型 PFK-2 蛋白の発現をウエスタンブロット法および免疫組織化学染色で解析し、db/db マウスで高発現していること、発現の局在は腎尿細管上皮細胞であることを示した。実験 3 として、PFKFB3 を HEK293 細胞に遺伝子導入し安定株を樹立し、Empty vector を導入したものを対照群として、PFKFB3 の強制発現群と対照群で比較を行った。強制発現群では、F-2,6-BP 量が著明に増加し、またグルコースの細胞内への取り込みが増加していた。また、ウエスタンブロット法及び RT-PCR を行い、強制発現群では、MAPK のリン酸化、PKC のリン酸化の亢進と、NAD(P)H オキシダーゼの構成成分である p22 phox の mRNA および蛋白の高発現を認めた。

これらの結果から、糖尿病腎症の早期における尿細管細胞での機能異常に、解糖系の亢進が関わっている可能性が考えられた。また、誘導型 PFK-2 による解糖系の亢進が PKC-MAPK 経路や酸化ストレスの亢進を介して糖尿病合併症の進展に寄与している可能性があると考えられた。本研究は解糖系が糖尿病血管合併症のメカニズムに関与する可能性を示した初めての報告である。解糖系は糖代謝の中心的な役割を担っているのにも関わらず、糖尿病の治療への応用という点からはこれまであまり注目されてこなかった。今後、ヒトの糖尿病性腎症で誘導型 PFK-2 を介した解糖系の活性化が生じていることが証明されれば、何らかの方法で解糖系への介入を行うことが糖尿病合併症の新しい治療に結びつく可能性が考えられる。

学位論文公开发表では、副査畠山鎮次教授から、対象として腎臓を選択した理由および解糖系亢進と MAPK 活性化の関係についての質問があった。申請者は、糖尿病腎症は代表的な糖尿病細小血管合併症であり様々な知見が蓄積され、PKC β 阻害薬などによる治療なども期待されていることから、糖尿病合併症研究の対象としてふさわしい点について回答した。また、解糖系が亢進するとグルコースからピルビン酸への代謝が進む過程でジアシルグリセ

ロールの増加が起こり、PKC 活性化、さらに MAPK 活性化に繋がっていくことについて回答した。

次いで副査筒井裕之教授から、レニン・アンジオテンシン系(RAS)との関連、解糖系亢進と酸化ストレスの関連についての質問があった。申請者は、誘導型 PFK-2 と RAS の直接の関係は現在のところ示されていないが、糖尿病腎症においては RAS の亢進が起こっておりこれを阻害することで腎症の治療・予防ができる点、および早期の糖尿病腎症で起こっている種々の代謝異常に誘導型 PFK-2 が関わっている可能性について述べた。また、解糖系が活性化することで、AGE の増加、PKC 活性化、ミトコンドリア電子伝達系などを介して活性酸素が増加し、酸化ストレスの亢進につながる点について回答した。

さらに主査小池隆夫教授から、尿細管上皮細胞の障害と糖尿病腎症の進行の関連および今後の展望、本研究の臨床への応用についての質問があった。申請者は、糖尿病腎症の早期では、近位尿細管の代謝異常が引き起こされるとともに、ナトリウム再吸収が亢進し、高血圧の発症とともに、尿細管・糸球体フィードバックを介した糸球体過剰濾過が惹起されて糖尿病腎症の進行に繋がっていく点について回答した。また、解糖系と糖尿病合併症の関連についてはまだ不明な点が多く、今後の展望としては、病態を時系列で追ひ、病期毎の誘導型 PFK-2 の発現や解糖系の活性化を評価することや他の合併症メカニズムとの関連を検討すること、ヒトの糖尿病腎症における解析を行うこと、解糖系の臓器毎の誘導型 PFK-2 のノックダウン等を検討し糖尿病の病態における解糖系の働きについて探索を進めていくこと等が臨床への応用に繋がっていく可能性があるとして回答した。

この論文は、解糖系の律速酵素である誘導型 PFK-2 が糖尿病合併症のメカニズムに関与する可能性を示した点で高く評価され、今後の糖尿病治療に新たな治療戦略を示すことが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。