

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09284

研究課題名(和文) 近位尿細管輸送とエンドサイトーシスにおけるV-ATPase/mTORCの意義

研究課題名(英文) The role of V-ATPase/mTORC in sodium transport and endocytosis in renal proximal tubules

研究代表者

鈴木 正志 (SUZUKI, Masashi)

東京学芸大学・保健管理センター・教授

研究者番号：90595662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは全身の糖ホメオスターシス調節、電解質調節に重要な役割を担っているが、近位尿細管におけるナトリウム輸送、糖新生調節機構は明らかになっていない。本研究では単離尿細管を用いた実験で、インスリンによる近位尿細管NBCe1機能刺激作用はAkt2、mTORC2により調節され、糖新生抑制作用はIRS1、Akt2、mTORC1およびmTORC2を介している事を明らかにした。糖尿病では近位尿細管糖新生が増加し、インスリンの近位尿細管ナトリウム輸送刺激作用はメタボリック症候群、糖尿病でも保たれている。近位尿細管における選択的インスリン抵抗性が高血糖、高血圧の病態に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Insulin is known to promote sodium transport and regulate gluconeogenesis in renal proximal tubules (PTs). Akt and mammalian target of rapamycin complexes (mTORCs) are key regulators in the insulin signaling pathway. However, the roles of Akt and mTORCs in PTs are poorly understood. In this study, we examined the components of insulin signaling in isolated human and rat PTs. Our data indicate that Akt2 and mTORC2, but not mTORC1 mediates insulin-stimulated sodium bicarbonate co-transporter 1 (NBCe1) activity. In addition, insulin decreased the expression of gluconeogenic genes in human and rat PTs. Furthermore, our data using specific inhibitors and siRNA showed that insulin-suppressed PT gluconeogenesis is mediated via the IRS1, Akt2 and both mTORC1 and mTORC2. These distinct pathways may play important roles in hypertension and hyperglycemia in metabolic syndrome and diabetes mellitus.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：近位尿細管 ナトリウム輸送 糖新生

1. 研究開始当初の背景

体液の酸塩基・電解質の恒常性維持や血圧調節にとって不可欠な腎尿細管輸送調節因子の一つとしてラパマイシン標的キナーゼ複合体 (mTORC) シグナルネットワークが注目されている。mTORC は増殖刺激や各種ストレスなどに応答し、細胞肥大やアポトーシスなど多岐に渡る調節機能を司り、結合蛋白や調節因子の違いにより mTORC1, mTORC2 に分類される。腎臓における mTORC の意義については糖尿病性腎症の糸球体硬化やポドサイト生存シグナルとの関連が明らかにされている。また集合管におけるインスリン/PI3 キナーゼ/Akt/mTORC2 経路によるナトリウムチャネル ENaC の活性化や、ヘンレループにおける炎症性シグナル/PI3 キナーゼ/Akt/mTORC1 経路による重炭酸輸送抑制も報告されている。しかし近位尿細管ナトリウム輸送調節機構における mTORC 経路の関与については未だ明らかでない。

2. 研究の目的

上記のように近位尿細管においてインスリンのナトリウム輸送調節機構は明らかになっていない。また、近位尿細管は肝臓と並ぶ糖新生器官と考えられているが、インスリンが近位尿細管における糖新生を抑制するか、また、糖新生を抑止した場合、そのシグナル伝達経路は明らかでない。本研究では近位尿細管におけるインスリンのナトリウム輸送調節機構を糖新生抑制作用と共に明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト、ラットの単離尿細管において、インスリンのシグナル伝達に想定される構成要素 (Akt, mTORC1/2) に対して特異的阻害剤、siRNA を作用させ、近位尿細管 NBCe1 の活性の変化を評価する事によりシグナル伝達の構成要素を明らかにした。また、単離近位尿細管において cAMP を作用させ糖新生関連酵素 PEPCCK mRNA 発現量を測定する事により糖新生刺激作用を評価した。また、ナトリウム輸送と同様に特異的阻害剤、siRNA を作用させる事によりシグナル伝達に関係する構成要素を明らかにした。また、各構成要素の活性化を確認するためにリン酸化抗体によるウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

ヒト単離尿細管において Akt 阻害剤 VIII、mTORC1/2 阻害剤 PP242 はインスリンの NBCe1 刺激作用を抑制したが、mTORC1 阻害剤 rapamycin はインスリンの NBCe1 刺激作用に影響はなかった(図 1、2)。インスリンは Akt のリン酸化を促進し、Akt 阻害剤、rapamycin、PP242 はこれらのリン酸化を抑制した(図 3、4)。これらの結果はラットの単離尿細管でも同様であった。

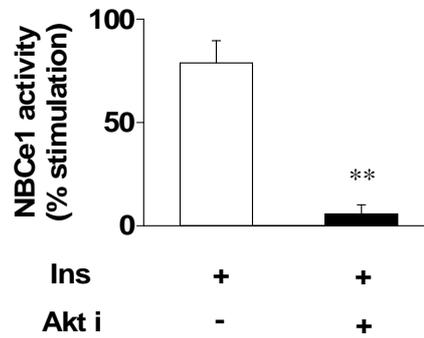


図 1

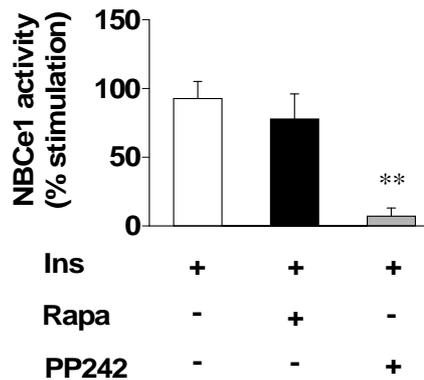


図 2

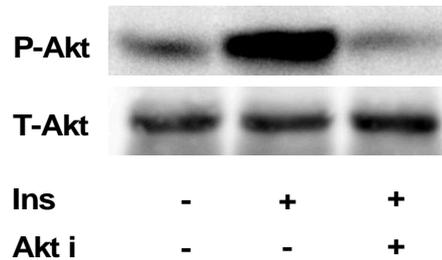


図 3

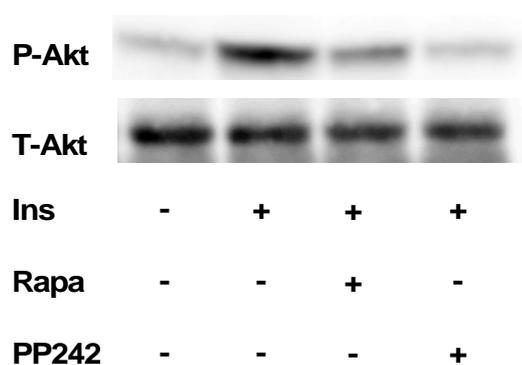


図 4

さらに、ラット単離尿細管においてインスリンの NBCe1 刺激作用は Akt2、Rictor(mTORC2 の構成要素) に対する siRNA により抑制されたが、Akt1、Raptor(mTORC1 の構成要素) に対する siRNA の影響を受けなかった(図 5、6)。これらの結果からインスリンの NBCe1 刺激作用は Akt2、mTORC2 を介していると考えられた。

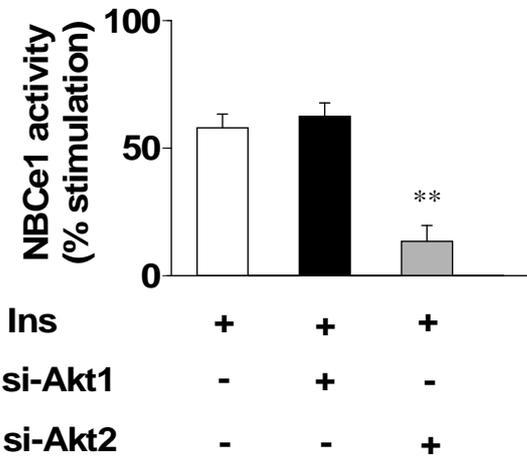


図 5

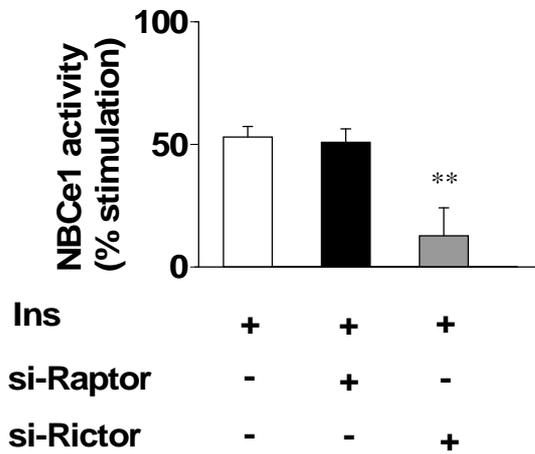


図 6

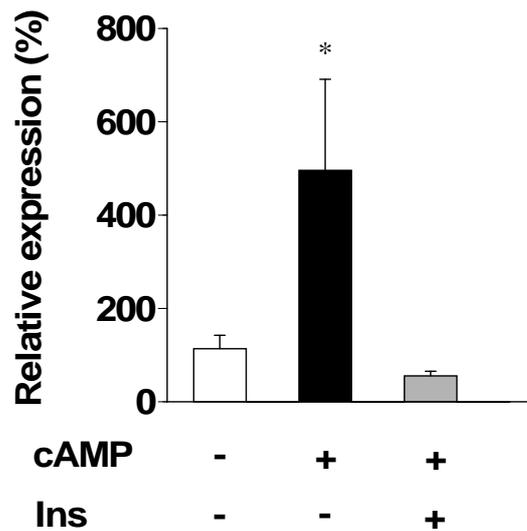


図 7

また、ヒト単離尿細管において cAMP は糖新生関連酵素 PEPCK の mRNA 発現を増加させ、インスリンはこの増加を抑制した事から、インスリンは近位尿細管における糖新生を抑制したと考えられた(図 7)。このインスリンによる糖新生抑制作用はラット単離尿細管でも観察された。

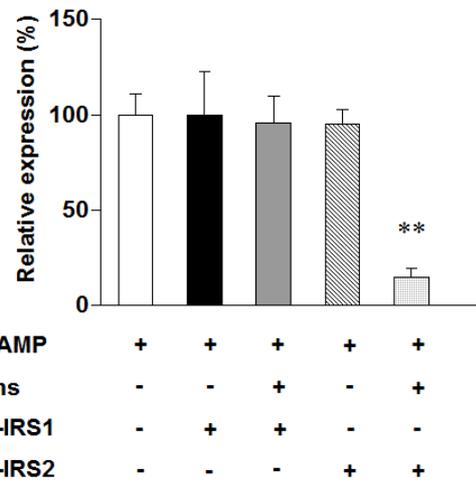


図 8

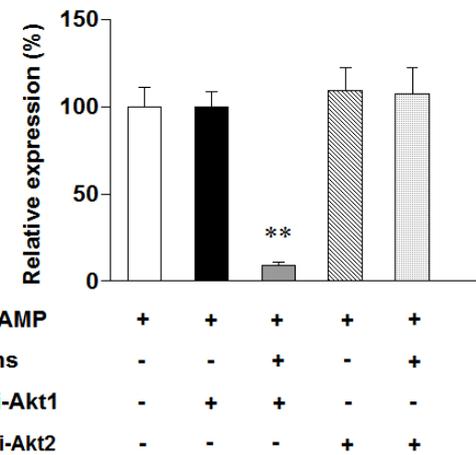


図 9

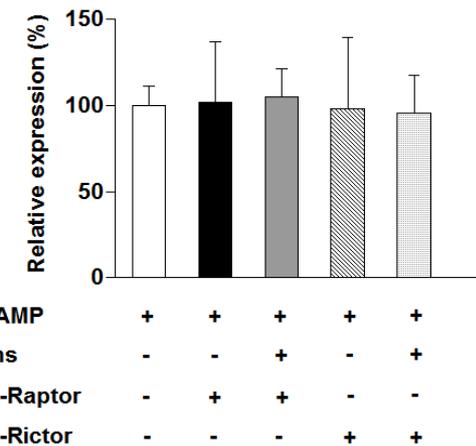


図 10

ラット単離尿細管においてインスリンの糖新生抑制作用は IRS1、Akt2、Raptor、Rictor に対する siRNA により抑制され、IRS2、Akt1 に対する siRNA の影響を受けなかった(図 8-10)。これらの結果から近位尿細管における糖新生のインスリンによる抑制作用は IRS1、Akt2、mTORC1/2 を介していると考えられ

た。
我々はメタボリックシンドローム、糖尿病等インスリン抵抗性の状態においてもインスリンの近位尿細管 NBCe1 刺激作用が保たれている事を報告している。また、メタボリックシンドローム、糖尿病の状態では近位尿細管 IRS1 の発現が減少しているが IRS2 発現は保たれている事を報告している。インスリンによるナトリウム輸送刺激作用と糖新生抑制作用が異なる経路を介しており、インスリンのナトリウム輸送刺激作用が保たれ、糖新生抑制作用が抑えられている事がこれらの病態での高血圧、高血糖に寄与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

Satoh N, Nakamura M, Suzuki A, Tsukada H, Horita S, Suzuki M, Moriya K, Seki G. Effects of Nitric Oxide on Renal Proximal Tubular Na⁺ Transport. *Biomed Res Int*. 査読有, 2017;2017:6871081.

doi: 10.1155/2017/6871081.

Satoh N, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, Horita S, Seki G, Moriya K. Functional coupling of V-ATPase and CLC-5. *World J Nephrol*. 査読有, 2017 Jan 6;6(1):14-20.

doi: 10.5527/wjn.v6.i1.14.

Horita S, Nakamura M, Suzuki M, Satoh N, Suzuki A, Seki G. Selective Insulin Resistance in the Kidney. *Biomed Res Int*. 査読有, 2016;2016:5825170.

doi: 10.1155/2016/5825170.

Satoh N, Yamada H, Yamazaki O, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, Ashida A, Yamamoto D, Kaku Y, Sekine T, Seki G, Horita S. A pure chloride channel mutant of CLC-5 causes Dent's disease via insufficient V-ATPase activation. *Pflugers Arch*. 査読有, 2016 Jul;468(7):1183-96.

doi: 10.1007/s00424-016-1808-7.

Satoh N, Nakamura M, Suzuki M, Suzuki A, Seki G, Horita S. Roles of Akt and SGK1 in the Regulation of Renal Tubular Transport. *Biomed Res Int*. 査読有, 2015;2015:971697.

doi: 10.1155/2015/971697.

Nakamura M, Satoh N, Suzuki M, Kume H, Homma Y, Seki G, Horita S. Stimulatory effect of insulin on renal proximal tubule sodium transport is preserved in type 2 diabetes with nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2015 May

22;461(1):154-8.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.005.

[学会発表](計 7件)

Motonobu Nakamura, Masashi Suzuki, Nobuhiko Satoh, Atsushi Suzuki, Hiroyuki Tsukada, George Seki, Yusuke Sato, Yukio Homma, Shoko Horita, Masaomi Nangaku. Insulin Suppresses Gluconeogenesis in Renal Proximal Tubules via the IRS1/Akt2/mTORC Pathway. *The Kidney Week 2017*. 2017.

中村元信, 鈴木正志, 佐藤信彦, 鈴木淳司, 塚田弘之, 関常司, 佐藤悠佑, 本間之夫, 堀田晶子, 南学正臣. インスリンは IRS1/Akt2/mTORC を介して近位尿細管糖新生を抑制する. 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017.

中村元信, 鈴木正志, 佐藤信彦, 鈴木淳司, 塚田弘之, 関常司, 佐藤悠佑, 本間之夫, 堀田晶子, 南学正臣. 近位尿細管ナトリウム輸送調節における WNK1/OSR1/SPAK の意義. 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017.

Motonobu Nakamura, Masashi Suzuki, Nobuhiko Satoh, George Seki, Atsushi Suzuki, Yusuke Sato, Yukio Homma, Shoko Horita, Masaomi Nangaku. Insulin Stimulates Renal Proximal Tubule Sodium Transport via Akt2/mTORC2 Pathway. *The Kidney Week 2016*. 2016.

中村元信, 鈴木正志, 佐藤信彦, 鈴木淳司, 関常司, 久米春喜, 本間之夫, 堀田晶子, 南学正臣. インスリンによる近位尿細管 Na 再吸収亢進作用は Akt2 と mTORC2 を介している. 第 59 回日本腎臓学会学術総会, 2016.

Motonobu Nakamura, Nobuhiko Sato, Masashi Suzuki, Atsushi Suzuki, Haruki Kume, Yukio Homma, George Seki, Shoko Horita. Insulin Stimulates Renal Proximal Tubule Sodium Transport in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy. *The Kidney Week 2015*. 2015.

中村元信, 堀田晶子, 鈴木正志, 佐藤信彦, 榎本裕, 久米春喜, 本間之夫, 関常司. インスリンの近位尿細管 Na 輸送亢進作用は進行した糖尿病性腎症の高血圧維持に重要である. 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 正志 (SUZUKI, Masashi)

東京学芸大学・保健管理センター・教授
研究者番号: 90595662

(2)研究分担者

堀田 晶子 (HORITA, Shoko)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 20534895

中村 元信 (NAKAMURA, Motonobu)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 40459524