

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19186

研究課題名(和文) インスリンによるエンドサイトーシス受容体発現の変化が尿細管機能障害に及ぼす影響

研究課題名(英文) The change of endocytosis receptor expression and its possible role during the progress of proximal tubular injury

研究代表者

黒崎 祥史 (Kurosaki, Yoshifumi)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：20602030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：近位尿細管上皮細胞HK-2において、インスリンがメガリン発現に及ぼす影響について検討したが、メガリン発現に大きな変化が見られなかった。一方で、高グルコースおよび過酸化水素処理がメガリン発現を増加させ、酸化ストレスがメガリン発現を増加させることを明らかにした。さらに酸化ストレスによるメガリン発現の増加はPI3K/Akt経路を介して起こった。ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットでメガリンおよびpAkt発現の上昇が確認され、また降圧剤テルミサルタンは酸化ストレスの抑制とともに、メガリンおよびpAkt発現を低下させた。酸化ストレスによるメガリン発現の増加は腎症進展に關与することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Effects of insulin on megalin expression in proximal tubular cells were evaluated. It was clarified insulin has no effect on megalin expression in HK-2 cells. Then we examined the effect of high glucose on megalin expression. High glucose treatment significantly increased megalin expression in HK-2 cells. Hydrogen peroxide also significantly increased megalin expression. Furthermore, the hydrogen peroxide-induced increase in megalin expression was blocked by treatment with PI3K and Akt inhibitors. In animal experiments, we demonstrate that increased expression of renal cortical megalin and p-Akt accompanies oxidative stress in diabetic rats, prior to albuminuria development. Telmisartan, which is one of RAS inhibitor, treatment prevented the diabetes-induced elevation of oxidative stress, megalin and p-Akt expression. Taken together, our results indicate that oxidative stress increases renal megalin expression via PI3K/Akt pathway in the normoalbuminuric stage of diabetes.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：近位尿細管 エンドサイトーシス メガリン

1. 研究開始当初の背景

糸球体から濾過された低分子タンパク質は腎近位尿細管でエンドサイトーシス受容体メガリンによって再吸収される。これら受容体の発現量は尿細管におけるタンパク質再吸収機能に関与すると、多くの検討がなされてきた。アンジオテンシン II (Ang II) はアンジオテンシン II タイプ 1 受容体(AT1) を介してメガリン発現を抑制し、その抑制はインスリンシグナル (Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) /Phosphoinositide 3-kinase (P13K) 経路) を介して阻害されることが報告されている (*Endocrinology* 150: 871-878, 2009)。さらにインスリンシグナルによる Akt のリン酸化は、Dab-2 や AS-160 のリン酸化を介してタンパク質取り込みを促進することが報告されている (*PLoS ONE* 10: e0140417, 2015) (*Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1013-1024, 2012)。糖尿病モデル動物を用いた実験においても、メガリン発現の低下や局在変化による機能障害が見られることが知られており、近位尿細管障害によるメガリン発現の減少と尿中アルブミンの検出を裏づける結果が示されている (*Hypertens Res* 26:413-419, 2003)。このように糖尿病やインスリンとメガリン発現に関して検討されてきたが、メガリン発現の詳細なメカニズムについては明確ではない。

メガリンはビタミン結合子タンパク質を再吸収して生理的機能を担う一方で、腎毒性物質を再吸収することも知られている。そのためメガリン発現機構の開発は、腎障害の進展メカニズムの解明に重要である。

2. 研究の目的

インスリンおよび高血糖がメガリン発現に及ぼす影響を検討する。また、糖尿病モデルラットを作製し、メガリンおよびその他エンドサイトーシス受容体の発現の変化と腎障害の進展の関連について解析する。

3. 研究の方法

1. 細胞培養

細胞はヒト近位尿細管上皮細胞 (HK-2) を用いた。血清飢餓の後、0.1-0.4 mmol/L H₂O₂ を添加して 3-24 時間後に細胞回収を行った。また、5 mmol/L N-acetyl-cysteine (NAC) (Sigma), 0.5 μmol/L wortmannin (CST), 10 μmol/L MK-2206(Selleckchem) は、H₂O₂ 添加の前に 30 分間反応させた。

2. リアルタイム PCR による mRNA 定量

HK-2 細胞から ISOGEN-II (NIPPON Gene) を用いて総 RNA を抽出し、cDNA 合成を Prime Script RT reagent Kit (Takara Bio)にて行った。cDNA を用いて、メガリンの mRNA 発現を定量 PCR により解析した。

3. FITC 標識アルブミン取り込み量の測定

HK-2 細胞に H₂O₂ を添加して 4.5 時間培養後、0.025 mg/mL FITC 標識 Albumin (FITC-alb) (Sigma-Aldrich) を添加した。洗浄後、FLUO star OPTIM (BMG LABTECH) にて FITC の蛍光強度を測定した (Ex/Em =485 nm/520 nm)。

4. DQ-アルブミンの取り込み

リソソームより消化される際に発光する H₂O₂ を添加して 1 時間後、10 μg/mL DQ-albumin (Thermo Fisher Scientific) を添加して 30 分培養した。培養後の細胞は、加温 PBS にて 2 回洗浄および PFA により固定後、hoechst33342 (Dojindo) にて核染色した。封入した後、共焦点顕微鏡で細胞形態を観察した。

5. ウェスタンブロットによる megalin 発現量の分析

培養した細胞を PBS にて一回洗浄後、lysis buffer を添加して細胞内タンパク質を回収した。細胞溶解液を、ウェスタンブロットによりメガリン発現を比較検討した。1 次抗体には、Rabbit anti-megalin (ab-76969), anti-pAkt (Ser473, CST), anti-Akt (CST), anti-actin (SCB) を用いた。

6. 糖尿病モデルラット作製

雄 Sprague-Dawley ラット (日本 SLC) に streptozotocin (STZ, 65mg/kg 体重, Sigma-Aldrich) を静脈投与した群を STZ 群 (n=5) とし、生理食塩水のみを静脈投与した群 Sham 群 (n=5) とした。また、STZ を投与し telmisartan (TLM, 10 mg/kg 体重, 東京化成工業) を餌に混ぜ与えたものを STZ + TLM 群 (n=5)、生理食塩水を投与し TLM を餌に混ぜ与えたものを Sham + TLM 群 (n=5) とした。STZ 投与 2 週間後に解剖を実施した。腎皮質 3-NT 値は電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法で測定した。

4. 研究成果

(1) HK-2 細胞における高血糖および酸化ストレスがメガリン発現に及ぼす影響

インスリンを添加してメガリン発現の変化を検討したが、一定の変化が見られなかった (data not shown)。そこで高グルコース (30 mmol/L) によるメガリン発現の変化を観察したところ、メガリン発現が有意に増加した。

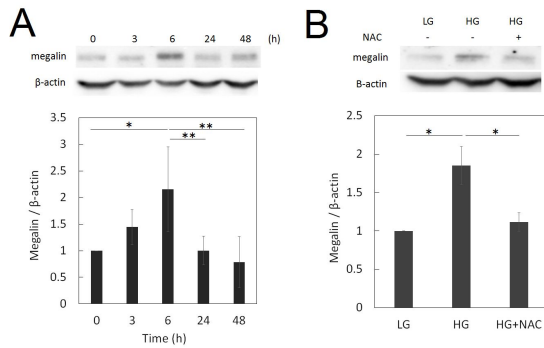


図1 高グルコース培養がメガリン発現に及ぼす影響 ; (A) 高グルコース添加後のメガリン発現のタイムコース, (B) 抗酸化剤 NAC 添加の影響

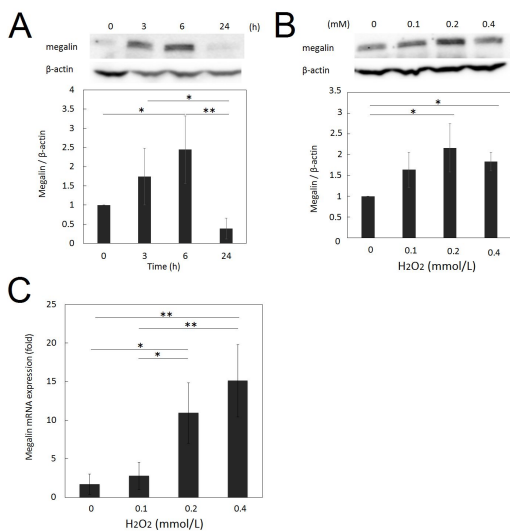


図2 過酸化水素処理がメガリン発現に及ぼす影響

また、抗酸化剤 NAC を添加することによりメガリン増加は抑制された(図1)。次いで、酸化ストレスの影響を考慮して過酸化水素を添加したところ、過酸化水素濃度および時間に依存してメガリン発現が増加した(図2)。

(2) 酸化ストレスによるメガリン発現上昇と PI3K/Akt 経路の関係について

インスリンはAktのリン酸化を介してタンパク質のエンドサイトーシスに関連することが知られている。そこで、酸化ストレスによるメガリン発現メカニズムを詳細に解明するために、PI3K/Akt 経路の阻害剤を用いて実験を行った。PI3K 阻害剤 wortmannin および Akt 阻害剤 MK-2206 を事前に添加して、30分後に過酸化水素を添加したところ、メガリン発現の増加が抑制された(図3)。

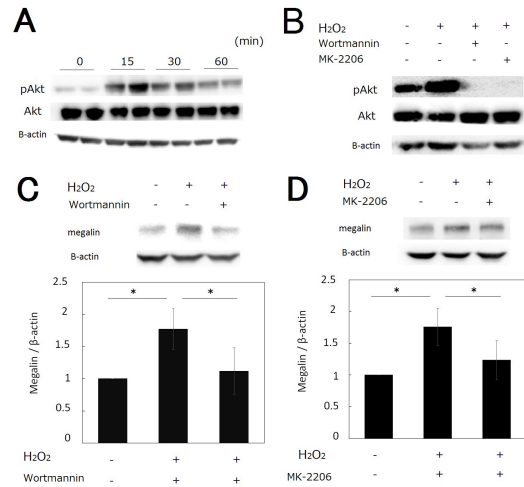


図3 Akt 阻害がメガリン発現に及ぼす影響 ; (A) 過酸化水素処理による Akt のリン酸化および (B) PI3K (wortmannin) および Akt 阻害剤 (MK-2206) の影響 ; (C, D) Akt 阻害が酸化ストレスによるメガリン発現上昇に及ぼす影響,

(3) 過酸化水素処理によるタンパク質取り込み能の変化

メガリン上昇に伴いタンパク質の取り込みが上昇するか検討した。過酸化水素添加時に、FITC 標識アルブミンおよび DQ-アルブミンの細胞内取り込みが上昇することが明らかになった(図4-A, B)。また、メガリン発現とタンパク質の取り込みのどちらが先行して起こるか明確にするため、アルブミンの有無によるメガリン発現の変化を検討したところ、アルブミンが存在しなくても酸化ストレスによりメガリン発現が増加した(図4-C)。このことは、メガリン発現上昇が先行して起こることを示す。

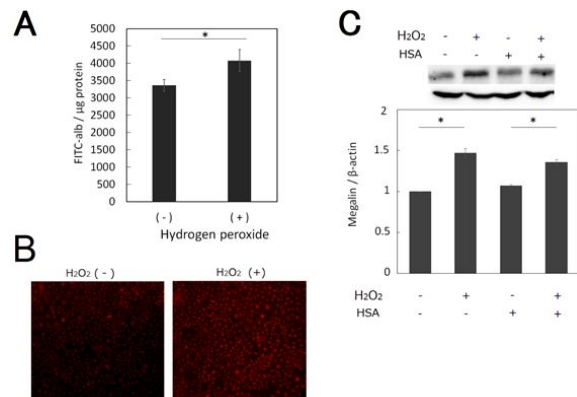


図4 過酸化水素処理によるタンパク質取り込みの変化

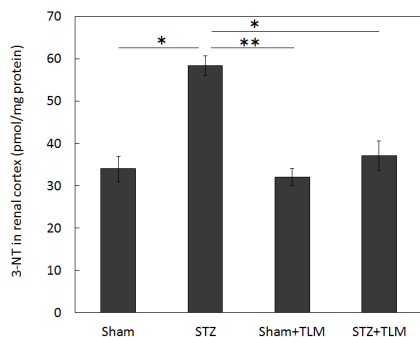


図5 STZ誘導糖尿病ラットにおける腎皮質ニトロチロシンの変化

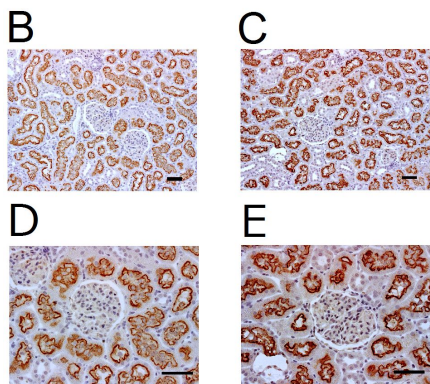
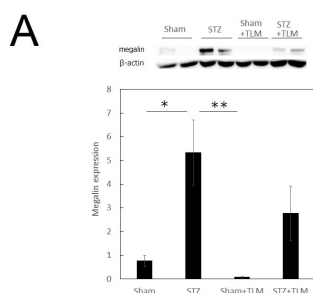


図6 STZ誘導糖尿病ラットにおける腎皮質メガリン発現の変化;(A)腎皮質メガリン発現、(B-E)コントロールラット(B,D)および糖尿病ラット(C,E)の腎におけるメガリン免疫組織化学染色;倍率100×(B,C) or 400×(D,E)

(4) 糖尿病モデルラットにおけるメガリンおよび pAkt 発現の変化

STZを投与して2週間の糖尿病モデルラットを作製した。コントロールラットと比較して、糖尿病ラットの尿中アルブミン排泄に有意な差がなかった(0.39±0.17 mg/day vs 0.52±0.17 mg/day, p>0.05)。一方で、腎皮質3-ニトロチロシンは糖尿病ラットで上昇した(図5)。また、3-ニトロチロシンの上昇は、テルミサルタン投与により抑制された。STZを投与して2週間の糖尿病ラットは尿中アルブミン排泄が正常で酸化ストレスが亢進しているモデルであることを確認した。

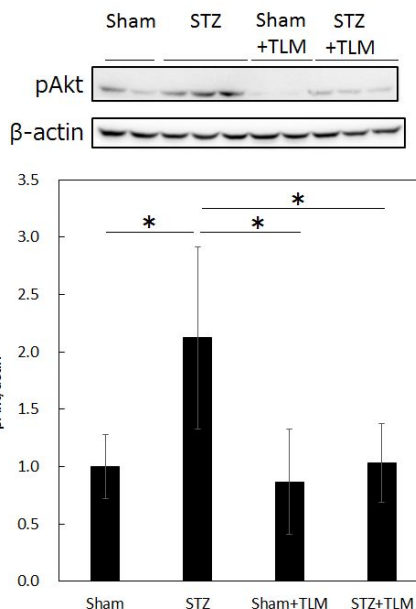


図7 STZ誘導糖尿病ラットにおける腎皮質 pAkt 発現の変化

メガリン発現は糖尿病ラットにおいて有意に上昇した(図6)。また、TLMの投与によりメガリン発現は抑制された。さらに、糖尿病ラットは腎皮質中の pAkt 発現が上昇し、TLM投与は pAkt 発現の上昇を抑制した(図7)。

(5) 結語

本研究では、近位尿管上皮細胞において酸化ストレスはPI3K/Akt経路を介してメガリン発現を増加させることが明らかとなった。メガリン発現の上昇は腎毒性分子の過剰な取り込みを引き起こす可能性があり、腎症進展に関連することが考えられる。

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1件)

(1) Masanori Yokoba, Tsuyoshi Ichikawa, Akira Takakura, Naohito ishii, Yoshifumi Kurosaki, Yuya Yamada, Tomoaki Tsukushi, Noriyuki Masuda, Paul A. Easton, Masato Katagiri. Aminophylline increases respiratory muscle activity during hypercapnia in humans. *Pulm Pharmacol Ther*, 30:96-101, 2015. (査読有り、2015 IF: 2.930)

〔学会発表〕(計13件)

(1) 黒崎祥史、井本明美、土筆智晶、小幡進、横場正典、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：糖尿病における酸化ストレス亢進

は近位尿細管の megalin 発現を上昇させる、第 28 回日本糖尿病性腎症研究会、2016 年 12 月 4 日、都市センターホテル（東京都千代田区）

(2) 市岡匡睦、阿部 篤、五十嵐大士、井本明美、**黒崎祥史**、土筆智晶、小幡進、鈴木英明、竹中恒夫、片桐真人、市川尊文、石井直仁：腎症発症前の糖尿病ラットにおけるオートファジーによる腎機能保護について、第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会、2016 年、12 月 3 日、パレス熊本（熊本県熊本市）

(3) 阿部 篤、井本明美、五十嵐大士、市岡匡睦、**黒崎祥史**、竹中恒夫、片桐真人、市川尊文、石井直仁：近位尿細管において高グルコースにより誘導 BNIP3L 活性化はミトコンドリア機能維持に關与する、第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会、2016 年、12 月 3 日、パレス熊本（熊本県熊本市）

(4) 五十嵐大士、**黒崎祥史**、井本明美、阿部篤、市岡匡睦、竹中恒夫、片桐真人、市川尊文、石井直仁：腎症発症前の 1 型糖尿病ラットにおける尿中メガリンの解析、第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会、2016 年、12 月 3 日、パレス熊本（熊本県熊本市）

(5) 井本明美、阿部 篤、**黒崎祥史**、五十嵐大士、鈴木英明、小幡進、横場正典、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：HK-2 細胞において高グルコースおよびアルブミン負荷がミトコンドリア機能を低下させ中性脂肪蓄積を誘発する、第 63 回日本臨床検査医学会、2016 年 9 月 2 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

(6) **黒崎祥史**、五十嵐大士、井本明美、阿部篤、土筆智晶、小幡進、横場正典、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：近位尿細管上皮細胞において高血糖による酸化ストレスの亢進は megalin 発現を上昇させる、第 63 回日本臨床検査医学会、2016 年 9 月 2 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

(7) 石井直仁、**黒崎祥史**、井本明美、阿部 篤、五十嵐大士、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、横場正典、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人：酸化ストレスが亢進している腎症発症前の糖尿病の腎皮質におけるマイトファジーと低酸素応答について、第 62 回日本臨床検査医学会、2015 年 11 月 22 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

(8) 井本明美、**黒崎祥史**、五十嵐大士、阿部篤、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、横場正典、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：近位尿細管上皮細胞において高グルコースおよび

アルブミン負荷がミトコンドリア恒常性維持機構に及ぼす影響、第 62 回日本臨床検査医学会、2015 年 11 月 22 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

(9) 鈴木英明、小菅優子、小林浩二、川上文貴、川島 麗、前川達則、**黒崎祥史**、井本明美、石井直仁、青山直善、市川尊文、石原和彦：正常ラットにおける血小板活性化剤とヒートショックプロテイン 72 の共存による血小板凝集の影響、第 55 回日本臨床化学学会年次学術集会、2015 年 10 月 30 日、大阪大学コンベンションセンター（大阪府吹田市）

(10) **黒崎祥史**、五十嵐大士、阿部 篤、井本明美、土筆智晶、小幡進、十良澤勝雄、鈴木英明、市川毅、横場正典、池永秀樹、青木芳和、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁：尿アルブミン正常糖尿病ラットにおいて酸化ストレス亢進が腎メガリンおよびキュビリン発現に及ぼす影響、第 55 回日本臨床化学学会年次学術集会、2015 年 10 月 30 日、大阪大学コンベンションセンター（大阪府吹田市）

(11) 井本明美、**黒崎祥史**、阿部 篤、五十嵐大士、土筆智晶、小幡進、鈴木英明、横場正典、市川尊文、片桐真人、石井直仁：近位尿細管上皮細胞において高グルコースがミトコンドリア恒常性維持機構に及ぼす影響、第 28 回北里バイオサイエンスフォーラム、2015 年 8 月 7 日、北里大学相模原キャンパス（神奈川県相模原市）

(12) **黒崎祥史**、五十嵐大士、阿部 篤、井本明美、土筆智晶、小幡進、鈴木英明、横場正典、市川尊文、片桐真人、石井直仁：尿アルブミン正常糖尿病ラットにおいて酸化ストレス亢進が腎メガリンおよびキュビリン発現に及ぼす影響、第 28 回北里バイオサイエンスフォーラム、2015 年 8 月 7 日、北里大学相模原キャンパス（神奈川県相模原市）

(13) 石井直仁、山田優也、阿部 篤、五十嵐大士、**黒崎祥史**、井本明美、土筆智晶、小幡進、鈴木英明、横場正典、小寺義男、市川尊文、片桐真人：腎症発症前の糖尿病の腎皮質における低酸素応答とマイトファジーについて、第 28 回北里バイオサイエンスフォーラム、2015 年 8 月 7 日、北里大学相模原キャンパス（神奈川県相模原市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒崎 祥史（KUROSAKI, YOSHIFUMI）
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号：20602030