

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16071

研究課題名(和文) インスリンによる近位尿細管V-ATPase活性化の意義

研究課題名(英文) Stimulatory effect of V-ATPase of Insulin on proximal tubules

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウスの腎臓より単離した新鮮単離近位尿細管を用い、近位尿細管管腔側のV-ATPase活性がインスリンにより活性化されることを見出した。このインスリンによる刺激作用は、Akt阻害剤(Akt inhibitor VIII)、mTORC1/2阻害剤(PP242)によりほぼ完全に抑制されたが、mTORC1阻害剤(Rapamycin)では阻害されなかった。これらの結果から、インスリンによるV-ATPase活性亢進作用はAkt/mTORC2を介していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリンは近位尿細管管腔側におけるナトリウム輸送のみならず、酸塩基平衡の制御に関与していることが示された。このことから、高インスリン血症が酸血症に関与している可能性が示唆された。さらに、この制御にはmTORC2が関与していることが示唆された。mTORC2選択的な阻害剤は、腎疾患の創薬ターゲットになる可能性があると考えられる。

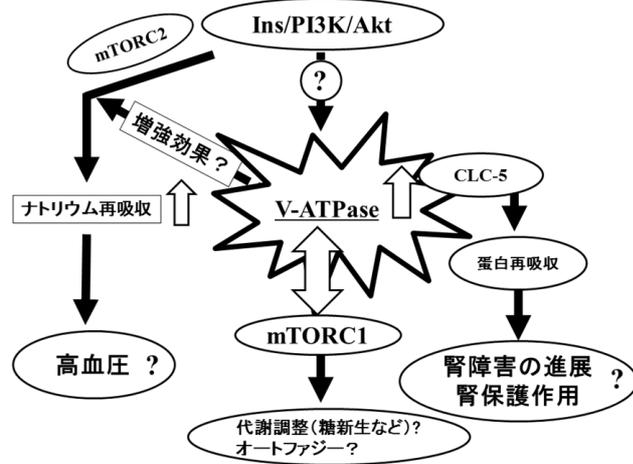
研究成果の概要(英文)：We found that V-ATPase activity on the luminal side of renal proximal tubules was activated by insulin by using a freshly isolated proximal tubule which was obtained from mouse kidney cortex. This stimulation by insulin was almost completely suppressed by Akt inhibitor (Akt inhibitor VIII) and mTORC1/2 inhibitor (PP242), but not by mTORC1 inhibitor (Rapamycin). These results indicated that the stimulation of V-ATPase activity on the luminal side of renal proximal tubules by insulin is mediated via Akt/mTORC2 pathway.

研究分野：腎生理学

キーワード：酸塩基平衡 インスリン 近位尿細管 腎生理 mTOR mTORC2

1. 研究開始当初の背景

申請者らは PT Na-HCO₃ 共輸送体 NBCe1 の変異により眼症状、片頭痛を伴う近位尿細管性アシドーシスが生じること、チアゾリジン系糖尿病薬が PPAR の non-genomic 経路を介して PT Na 再吸収を亢進させることが浮腫の一因であること、動物では二相性であるアンジオテンシン II の PT Na 輸送調節作用がヒトでは一相性であることなどを報告し、近位尿細管のイオン輸送機構に関する研究を行ってきた。その中で、インスリンによる近位尿細管 Na 再吸収亢進作用がインスリン抵抗性に伴う高血圧や糖尿病性腎症進展に重要であることを報告し大きな注目を集めている。さらに、Dent 病発症機序の解析の中で V-ATPase と CLC-5 がエンドゾーム内だけでなく PT 細胞膜上でも密接な機能的共役関係にあることを見出した。こうした研究の中で siRNA を用いた単離 PT の特定遺伝子発現抑制法や split-open 法を用いた PT 管腔側輸送体の解析法など画期的な新規実験系も開発した。ここで近位尿細管のプロトンポンプである V-ATPase は細胞内小胞の酸性化を介してエンドサイトーシスやライソゾーム内での蛋白分解など様々な役割を担っているが、その活性測定は技術的に困難であり、調節機構に関する解析もほとんど進んでいなかった。



2. 研究の目的

本研究の目的は、最新の知見や業績を踏まえインスリンによる近位尿細管の V-ATPase 活性化の詳細とその生理的・病態的意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

インスリンによる V-ATPase 活性化の近位尿細管の Na 輸送への影響を、管腔側における主要な Na 輸送体と考えられている Na/H 交換輸送体 NHE3 の trafficking を指標として評価を行った。

具体的には、C57Bl6 マウスの腎皮質より、実体顕微鏡下で、速やかに近位尿細管を単離し、単離近位尿細管を我々が開発し報告した split-open 法 (Pflugers Arch 2016; 468:1183) を用いて管腔側を露出させ、スライドガラス上に貼付し灌流を行った。灌流液の Na 濃度を急速に 0 とすることによる細胞内 pH 変化を NHE3 活性と定義し、NHE3 活性を測定することにより評価を行った。また、灌流液の Na 濃度が 0 となった際に、Na 濃度非依存的に細胞内 pH が上昇する変化を V-ATPase 活性と定義した。

まず、インスリンの近位尿細管の管腔側 Na 輸送体活性亢進作用が、V-ATPase 活性の阻害によりどのように変化するかを検証し、蛋白発現に関する影響を Western blotting により評価し、検証した。

次に、インスリンの近位尿細管の管腔側 Na 輸送体活性亢進作用が V-ATPase の特異的な阻害剤であるパフィロマイシンにより V-ATPase 活性を阻害した場合にどのように変化するかを検証し、蛋白発現に関する影響を Western blotting により評価し、検証した。

次に、インスリンの近位尿細管の管腔側 Na 輸送体活性亢進作用と V-ATPase 活性亢進がインスリンの古典的なシグナル伝達経路である Akt を介しているかどうかについて、Akt 阻害剤 Akt inhibitor VIII を使用により、どのように変化するかを検証し、蛋白発現に関する影響を Western blotting により評価し、検証した。

最後に、インスリンによる近位尿細管の V-ATPase 活性亢進作用と mTOR の関連を調べるために、mTORC1 の特異的な阻害剤である Rapamycin および mTORC1/2 の阻害剤である PP242 を添加し、検討を行った。蛋白発現に関する影響を Western blotting により評価し、検証した。

これらの阻害剤による近位尿細管の管腔側 Na 輸送に及ぼす影響については、NHE3 活性を測定することにより評価を行った。

4. 研究成果

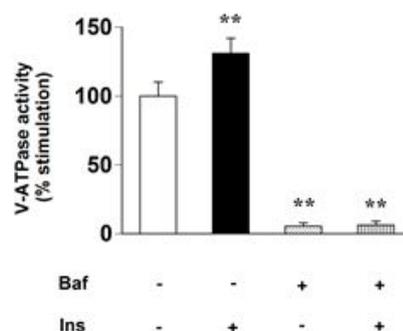
最初にマウス腎皮質より単離した新鮮単離近位尿細管を用いて、近位尿細管における V-ATPase 活性測定を行った。

単離近位尿細管において、灌流液の Na を急速に除去すると、Na 濃度非依存的な pH 変化を認め、この変化は、特異的阻害剤であるバフィロマイシンでほぼ完全に抑制された。

このことから、この変化が V-ATase 活性であることが分かった。

さらに、近位尿細管管腔側の Na 輸送に及ぼす影響を確認したところ、バフィロマイシンの添加により NHE3 活性には影響を認めなかった。

次に、生理的濃度 (10^{-8} M) のインスリン刺激が、近位尿細管の V-ATPase 活性亢進作用と管腔側の NHE3 に及ぼす影響について検討をした。インスリン刺激により、近位尿細管の V-ATPase 活性は約 20% 亢進し、NHE3 の活性も約 20% 亢進した。このインスリンによる V-ATPase 活性亢進作用は、Akt 阻害剤 (Akt inhibitor VIII) の添加によりほぼ完全に抑制された。インスリンによる NHE3 の活性亢進作用も同様にほぼ完全に抑制された。



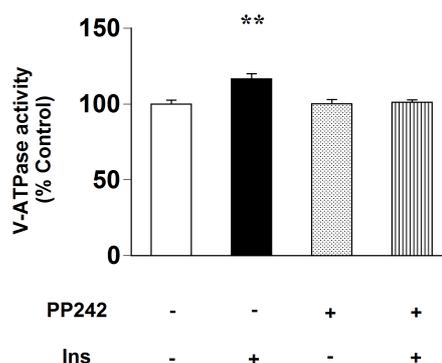
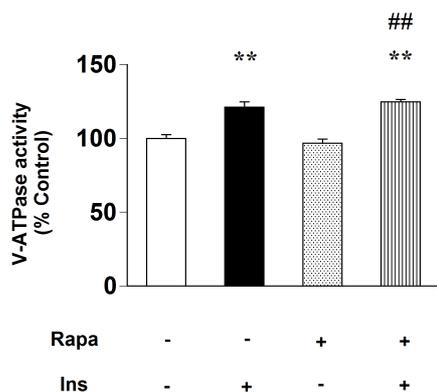
Western blotting を用いて蛋白発現について検討をしたところ、インスリンによる Akt^{Ser473} のリン酸化は、ほぼ完全に抑制されていたが、V-ATPase 発現量については、変化を認めなかった。

これらの結果から、インスリンによる V-ATPase 活性亢進作用は、Akt を介していることが示唆された。

我々は、近位尿細管におけるインスリンによるナトリウム輸送については、Akt を介していることは以前に報告している。一方で、近年、アミノ酸シグナルがリソソームの内腔側から V-ATPase を介して mTORC1 をリソソーム表面に結合させ活性化すること報告されている。そのため、V-ATPase と mTOR の関係について検討をした。

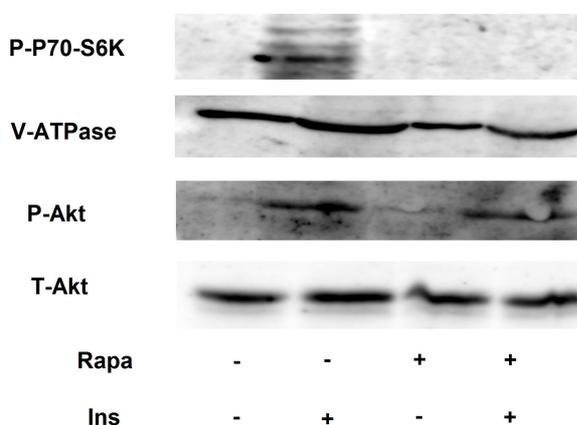
mTORC1 阻害剤であるラパマイシン添加により、インスリンによる V-ATPase 活性はほとんど変化しなかったが、興味深いことに、mTORC1/2 阻害剤である PP242 ではほぼ完全に抑制された。

NHE3 の活性も同様に、インスリンによる NHE3 活性亢進作用は、ラパマイシンではほとんど変化を認めなかったが、PP242 の添加により、ほぼ完全に抑制された。



Western blotting を用いて蛋白発現について検討をしたところ、ラパマイシンの添加により、インスリンによる Akt^{Ser473} のリン酸化は保たれていたが、インスリンによる phos-p70s6k の発現亢進は、ほぼ完全に抑制されていた。PP242 の添加でも同様に、インスリンによる Akt^{Ser473} のリン酸化は保たれていたが、インスリンによる phos-p70s6k の発現亢進は、ほぼ完全に抑制されていた。

これらの結果から、近位尿細管の V-ATPase 活性はインスリンにより亢進することが示され、インスリンによる近位尿細管 V-ATPase 活性亢進作用と NHE3 活性亢進作用は、Akt/mTORC2 経路を介していることが示唆された。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Patency with antiplatelet treatment after vascular access intervention therapy: a retrospective observational study Tomohito Mizuno, **Motonobu Nakamura**, Nobuhiko Satoh, Hiroyuki Tsukada, Akihiko Matsumoto, Yoshifumi Hamasaki, Haruki Kume and Masaomi Nangaku Renal Replacement Therapy 2018 4:43

SLC4A4 compound heterozygous mutations in exon-intron boundary regions presenting with severe proximal renal tubular acidosis and extrarenal symptoms coexisting with Turner's syndrome: a case report. Horita S, Simsek E, Simsek T, Yildirim N, Ishiura H, **Nakamura M**, Satoh N, Suzuki A, Tsukada H, Mizuno T, Seki G, Tsuji S, Nangaku M. BMC Med Genet. 2018 Jun 18;19(1):103. doi: 10.1186/s12881-018-0612-y.

Effects of Nitric Oxide on Renal Proximal Tubular Na⁺ Transport. Satoh N, **Nakamura M**, Suzuki A, Tsukada H, Horita S, Suzuki M, Moriya K, Seki G. Biomed Res Int. 2017;2017:6871081. doi: 10.1155/2017/6871081.

Functional coupling of V-ATPase and CLC-5. Satoh N, Suzuki M, Nakamura M, Suzuki A, Horita S, Seki G, Moriya K. World J Nephrol. 2017 Jan 6;6(1):14-20. doi: 10.5527/wjn.v6.i1.14.

[学会発表] (計 13 件)

Stimulation of proximal tubule sodium transport by insulin is mediated via Akt2/mTORC2 pathway, **Nakamura M**, Satoh N, Suzuki M, et.al. ISN frontier meeting 2018 Meet the professor, Tokyo, Japan

Stimulation of proximal tubule sodium transport by insulin is mediated via Akt2/mTORC2 pathway, **Nakamura M**, Satoh N, Suzuki M, et.al. ISN frontier meeting 2018, Tokyo, Japan

A novel case of SLC4A4 compound heterozygous mutations in exon-intron boundary regions presenting with severe proximal renal tubular acidosis and extrarenal symptoms Shoko Horita S, **Nakamura M**, et.al. ISN frontier meeting 2018, Tokyo, Japan

Ultrasound-guided vascular access intervention therapy is safe and effective Hiroyuki Tsukada, **Nakamura M**, et.al. ISN frontier meeting 2018, Tokyo, Japan

副甲状腺ホルモンの近位尿細管糖代謝作用 塚田 弘之、**中村 元信**、他 2018年日本腎臓学会総会、新潟、日本

近位尿細管ナトリウム輸送調節における WNK1/OSR1 経路の意義 **中村 元信**、他 2018年日本腎臓学会総会、新潟、日本

VAIVT 後の Vascular Access(VA)開存における抗血小板薬の有用性 水野 智仁、**中村 元信**、他 2018年日本透析医学会総会、神戸、日本

Renal proximal tubule sodium transport is regulated by OSR1/WNK1 pathway **Nakamura M**, Satoh N, Suzuki M, et.al. American Society of Nephrology Kidney Week 2018, San Diego, U.S.A

近位尿細管ナトリウム輸送調節における WNK1/OSR1/SPAK の意義、**中村 元信**、佐藤 信彦、他、2017年日本腎臓学会総会、仙台、日本

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、**中村 元信**、佐藤 信彦、他、2017年日本腎臓学会総会、仙台、日本

近位尿細管管腔側 Na 依存性酸塩基輸送体の検討、鈴木 淳司、**中村 元信**、佐藤 信彦、他、2017年日本腎臓学会総会、仙台、日本

超音波ガイド下 VAIVT の有効性と安全性についての検討、塚田 弘之 **中村 元信** 他

2017年 日本透析医学会総会、横浜、日本
Insulin suppresses gluconeogenesis in renal proximal tubules via IRS1/Akt2/mTORC pathway Nakamura M et.al. American Society of Nephrology Kidney Week 2017, Philadelphia, U.S.A

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。