

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11129

研究課題名(和文) 近位尿細管代謝異常と代謝障害センサーの役割に着目した糖尿病性腎症進展の機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of roles of metabolic disorder in proximal tubules and its sensor in progression of diabetic nephropathy

研究代表者

藤本 新平 (Fujimoto, Shimpei)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00333576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病状態の近位尿細管上皮細胞(PTEC)では、尿糖増加による尿細管側からのナトリウム・グルコース共役輸送体(SGLT)を介するグルコース・ナトリウム流入の増加が代謝的ストレスであり、代謝障害センサーであるTXNIPの糖尿病性腎症進展における役割を解明する必要がある。糖尿病モデルであるSTZマウスでは対照と比較して、血糖の上昇と尿中アルブミンの有意な増加を認め、骨格筋では有意なTXNIP蛋白の発現増加を認めたが、肝臓、腎尿細管では認めなかった。STZマウスにSGLT2阻害薬を投与したところ血糖値の低下を認め、骨格筋では有意なTXNIP蛋白の発現低下を認めたが、肝臓、腎尿細管では認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてTXNIPが糖尿病の尿細管における代謝ストレスを感知する役割を担っていることが証明されれば、新たな治療ターゲットが提示でき、医療経済的にも重要課題である透析予防において新規治療戦略の構築に貢献できる可能性があった。しかし実験の結果、その関与は否定的であった。本研究によりTXNIPは骨格筋においては代謝障害センサーとして作動する可能性が示唆されたので、更なる研究がすめば、糖尿病の病態への理解が深まり、新たな治療戦略の端緒となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In proximal tubular epithelial cells (PTEC) in diabetes, increase in glucose and sodium flux through sodium-glucose cotransporter (SGLT) due to increase in urine glucose causes metabolic stress on these cells. Therefore, roles of thioredoxin-interacting protein (TXNIP), a metabolic stress sensor, in PTEC in progression of diabetic nephropathy should be elucidated. In diabetic STZ mice, blood glucose and urinary albumin increased compared to controls. Protein expression of TXNIP increased in skeletal muscle but did not increased in liver and proximal tubules. In STZ mice, oral administration of SGLT2 inhibitor decreased blood glucose and caused decrease in TXNIP expression in skeletal muscles but did not alter TXNIP expression in liver and proximal tubules.

研究分野：糖尿病学、栄養学

キーワード：糖尿病 腎障害 近位尿細管 ナトリウム・グルコース共役輸送体 代謝障害センサー

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は透析導入の原因疾患として第1位であり、その発症予防・進展抑制は临床上重要課題であるが、既存の血糖・血圧コントロールや蛋白制限食の効果は十分でない症例も多く、新規介入方法が望まれている。また発症・進展の機序に関しても十分に解明されていない。近年、病理学的検討から糖尿病性腎症の腎機能低下の進展には糸球体病変より尿細管病変が強く関与することが報告され(Nath KA, *Am J Kidney Dis* 20:1,1992)、尿細管病変の腎症進展における重要性が認識されるようになってきた。一方、近位尿細管上皮細胞(proximal tubular epithelial cell: PTEC)は、(1)原尿中の多数の物質の能動輸送を行っており ATP 必要量が多くミトコンドリアを豊富に含む、(2)肝細胞と並んで糖新生を行うことが可能である、などの点で全身のグルコース代謝制御においても重要な細胞であるが(Tiwari S *et al. J Am Soc Nephrol* 24:1209, 2013)、代謝・栄養学的観点からは十分に研究されているとはいえない。また糖尿病状態における PTEC においてはミトコンドリア機能異常、活性酸素種(ROS)産生亢進など様々な代謝異常が尿細管障害をきたすことが報告されている(Higgins GC *et al. Br J Pharmacol* 171:1917, 2014)。

α -arrestin family に属する蛋白である thioredoxin-interacting protein (TXNIP)は、代謝障害センサーとして働き、高グルコースなどで発現が誘導される蛋白で主として以下のようなグルコース代謝関連機能を有する。(1)抗酸化蛋白である thioredoxin に直接抑制的に作用し ROS 除去を障害する。(2)核へ移行し転写調節因子として働きミトコンドリア機能を修飾する。しかし、TXNIP の PTEC における代謝・栄養制御における役割、糖尿病における病態への関与は十分に解明されていない。特に糖尿病状態の PTEC においては尿糖増加に起因する尿細管側からの sodium-glucose cotransporter(SGLT)を介するグルコース・ナトリウム流入の増加が PTEC に対する代謝的ストレスとなっており代謝障害センサーである TXNIP の役割を解明する必要がある。

2. 研究の目的

糖尿病状態における PTEC の SGLT を介する栄養素の過剰流入が細胞内代謝にどのような影響を与えているか病態を明らかにし、代謝障害センサーTXNIP の病態における役割・腎機能障害との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

ミトコンドリア代謝実験系の確立

尿細管が大部分を占める腎皮質をホモジネートし、ホモジネート液を超遠沈し、ミトコンドリア分画を得る。ミトコンドリア分画に様々な基質を加え酸素電極で酸素消費速度を測定することで機能を評価する。またサフラニン O 蛍光強度で ATP 産生の駆動力となるミトコンドリア内膜電位を評価する。ウェスタンブロットでミトコンドリア内膜に局在する呼吸鎖 complex 1~5、リン酸キャリアー、ATP/ADP キャリアー、チトクローム C、Uncoupling Protein 2 のタンパク量を評価する。呼吸鎖タンパクは super complex と呼ばれるタンパク複合体を形成し機能に影響することが示されており、複合体を形成したまま泳動できる BN-PAGE を用いて complex 1~5 や他のミトコンドリア内膜上の蛋白との複合体を検索する。

糖尿病状態における TXNIP を介する尿細管グルコース代謝異常・細胞障害の検討

野生型及び TXNIP 欠損マウスにストレプトゾトシン(STZ)投与により糖尿病モデルマウスを複製し、PTEC における TXNIP の過剰発現の有無をウェスタンブロットで評価する。血糖上昇度が群間で均一とならない場合は STZ 投与量を変更して調整する。計測(体重,血圧,尿量)、血液検査(グルコース,ケトン体,クレアチニン)、尿検査[アルブミン,クレアチニン]を経時的に実施する。STZ マウスに SGLT2 阻害薬(ダパグリフロジン)経口投与を2週間実施し、計測(体重,血圧,尿量)、血液検査(グルコース,ケトン体,クレアチニン)、尿検査[アルブミン,クレアチニン]を経時的に実施する。PTEC における TXNIP の発現量を対照と比較し、ウェスタンブロットで評価する。

4. 研究成果

ミトコンドリア代謝実験系の確立と機能評価

ミトコンドリア機能解析には、質の高い単離技術が重要である。マウス腎臓尿細管からミトコンドリアを単離する技術を確立するために、単離ミトコンドリアの酸素消費の実験系における respiratory control ratio [基質+ADP 存在下 (state 3) における酸素消費速度と基質のみ存在下 (state 4) における酸素消費の比]を指標に野生型マウスを用いて単離方法の試行錯誤を行

った。その結果、respiratory control ratioの高い高品質のミトコンドリアを腎尿細管から単離する方法を確立した。

非糖尿病状態における TXNIP 欠損自体がミトコンドリア機能に与える影響を検討するために、非糖尿病野生型マウスと TXNIP 欠損マウスの尿細管ミトコンドリアを単離し機能解析を実施した。

基質による ATP 産生実験では、呼吸鎖 complex 4 から電子を供与する基質において TXNIP 欠損マウスで ATP 産生低下を認め、TCA サイクルにおける代謝や TCA サイクルから電子が供与される呼吸鎖上流よりも complex 4 以降の下流の障害が示唆された。またこの条件下での内膜過分極における電位に差はなく、また state 3, state 4 における酸素消費や respiratory control ratio にも有意差はなく、脱共役の影響は示唆されなかった。

ウェスタンブロットにおける complex 1~5、リン酸キャリアー、ATP/ADP キャリアー、チトクローム C、Uncoupling Protein 2 のタンパク量にも差がなかった。呼吸鎖タンパクは super complex と呼ばれるタンパク複合体を形成し機能に影響することが示されており、複合体を形成したまま泳動できる BN-PAGE を用いて complex 1~4 の複合体を検索したが差はなかった。また BNP-page により complex 5 のモノマー・ダイマー・オリゴマーや ATP 合成酵素複合体 (complex 5、リン酸キャリアー、ATP/ADP キャリアーの複合体) の解析を実施したが有意な差は認められなかった。

STZ マウスの作製と PTEC における TXNIP の発現の評価

8 週齢雄の C57BL/6 マウスにストレプトゾトシン (STZ) 20mg/ml (0.05M クエン酸緩衝液 pH4.5) を 250mg/kg で腹腔投与した (投与方法 1)。コントロール (CNT) にはクエン酸緩衝液のみを投与した。10 日後の随時血糖は CNT 群 153 ± 29 (以下平均値 \pm 標準偏差) mg/dL、STZ 群 650 ± 84 mg/dL と有意な上昇を認めたが、血中ケトン体の有意な上昇は認めなかった。また体重は、CNT 群 24.0 ± 0.7 g、STZ 群 20.7 ± 1.1 g と有意に低下を認めていた。血圧は CNT 群 $127 \pm 6/63 \pm 13$ mmHg、STZ 群 $114 \pm 7/55 \pm 10$ mmHg と低下傾向を認めた。尿中アルブミンは増加傾向にあった。この STZ 投与方法による糖尿病モデル動物作成では血圧にやや影響し、体重低下が認められた。血圧低下により腎血行動態に影響を与えた可能性があり、投与方法を変更して作製することとした。

8 週齢雄の C57BL/6 マウスに STZ 20mg/ml (0.05M クエン酸緩衝液 pH4.5) を 50mg/kg で 5 日間連続腹腔投与した (投与方法 2)。コントロール (CNT) にはクエン酸緩衝液のみを投与した。33 日後の随時血糖は CNT 群 168 ± 26 (以下平均値 \pm 標準偏差) mg/dL、STZ 群 623 ± 35 mg/dL と有意な上昇を認めたが、血中ケトン体の有意な上昇は認めなかった。また体重は、CNT 群 26.1 ± 0.3 g、STZ 群 25.4 ± 1.3 g と有意差はなかった。血圧は CNT 群 $103 \pm 6/44 \pm 6$ mmHg、STZ 群 $121 \pm 13/61 \pm 11$ mmHg と有意に上昇を認めた。尿中アルブミンは CNT 群 85 ± 59 mg/day、STZ 群 531 ± 249 mg/day と有意に増加した。すなわちこの投与方法においては、高血糖状態により腎症進展において重要なマーカーとなる尿中アルブミンの増加が見られることが確認できた。

投与方法 2 において TXNIP のタンパク量を GAPDH を対照として骨格筋、肝臓、腎尿細管で評価した。骨格筋では有意な TXNIP の発現増加を認めたが、肝臓、腎皮質では認めなかった。

STZ マウスへの SGLT2 阻害薬の投与と PTEC における TXNIP の発現の評価

糖尿病状態の PTEC においては尿糖増加に起因する尿細管側からの sodium-glucose cotransporter (SGLT) を介するグルコース・ナトリウム流入の増加が PTEC に対する代謝的ストレスとなっている。SGLT2 阻害薬の投与は、PTEC におけるグルコース・ナトリウム流入を抑制し代謝的ストレスが軽減される。8 週齢雄の C57BL/6 マウスに STZ 20mg/ml (0.05M クエン酸緩衝液 pH4.5) を 50mg/kg で 5 日間連続腹腔投与し、10 週齢の STZ マウスを作製した。SGLT2 阻害薬であるダパグリフロジン (dapa) を飲水に溶解 (終濃度 0.02mg/dL) して投与し (STZ-dapa 群)、対照の dapa を投与しない STZ マウス (STZ-cnt 群) と比較した。dapa 投与前は両群間で体重、随時血糖 (STZ-cnt 群: 416 ± 62 (以下平均値 \pm 標準偏差) mg/dL、STZ-dapa 群: 411 ± 56 mg/dL、 $P=0.8622$)、血圧、尿中アルブミンに有意差はなかった。dapa 投与後は体重、血圧、尿中アルブミンに有意差はなかったが、随時血糖は STZ-dapa 群で有意に低下していた (STZ-cnt 群: 479 ± 72 (以下平均値 \pm 標準偏差) mg/dL、STZ-dapa 群: 258 ± 72 mg/dL、 $P<0.001$)。TXNIP のタンパク量を GAPDH を対照として骨格筋、肝臓、腎尿細管で評価した。骨格筋では dapa により有意な TXNIP の発現低下を認めたが、肝臓、腎皮質では認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Funakoshi S, Yoshimura K, Hirano S, Ohmi S, Amano E, Fukuda Y, Terada Y, Fujimoto S	4. 巻 12
2. 論文標題 Undercarboxylated osteocalcin correlates with insulin secretion in Japanese individuals with diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetol Metab Syndr	6. 最初と最後の頁 article No.72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13098-020-00579-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto S	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel mechanism of impaired metabolism-secretion coupling in β -cells: Loss of cytosolic adenosine triphosphate by leakage (Commentary)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 1401-1404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13094.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishikawa H, Taniguchi Y, Matsumoto T, Arima N, Masaki M, Shimamura Y, Inoue K, Horino T, Fujimoto S, Ohko K, Komatsu T, Udaka K, Sano S, Terada Y	4. 巻 93
2. 論文標題 Knockout of the interleukin-36 receptor protects against renal ischemia-reperfusion injury by reduction of proinflammatory cytokines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney Int.	6. 最初と最後の頁 599-614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2017.09.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Amano E, Funakoshi S, Yoshimura K, Hirano S, Ohmi S, Takata H, Terada Y, Fujimoto S	4. 巻 10
2. 論文標題 Fasting plasma mannose levels are associated with insulin sensitivity independent of BMI in Japanese individuals with diabetes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetol Metab Syndr	6. 最初と最後の頁 article No. 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13098-018-0391-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Amano E, Yoshimura K, Funakoshi S, Hirano S, Ohmi S, Terada Y, Fujimoto S
2. 発表標題 Correlation analysis between insulin sensitivity, branched-chain acid, and adiponectin levels in Japanese individuals with varying degrees of glucose tolerance
3. 学会等名 American Diabetes Association, 80th Scientific Sessions, Chicago (On line sessions), IL, USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Funakoshi S, Ohmi S, Amano E, Terada Y, Fujimoto S
2. 発表標題 Undercarboxylated osteocalcin is correlated with insulin secretion in Japanese individuals with diabetes
3. 学会等名 American Diabetes Association, 79th Scientific Sessions, San Francisco, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------