

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19556

研究課題名(和文)腎臓における糖代謝調節機構とその破綻の分子メカニズム

研究課題名(英文)Glucose metabolisms in kidney

研究代表者

窪田 直人(Kubota, Naoto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50396719

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):腎臓近位尿細管における糖新生は、インスリンシグナルとグルコース再吸収の2つの機構によって調節されていることが明らかとなった。すなわち絶食時、原尿中からの糖の再吸収が低下するとNADH/NAD⁺比が低下しSirt1が活性化され、PGC1^αの脱アセチル化/活性化により糖新生関連酵素の発現が上昇する。同時に絶食時の血中インスリンレベルの低下に伴うインスリン受容体シグナルの減弱はFoxO1を活性化し、糖新生関連酵素の発現を増加させる。一方絶食時には糖の再吸収はSirt1の活性低下/PGC1^αのアセチル化を介して、インスリンシグナルはFoxO1の不活性化を介して糖新生を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、長年解明されていない“腎臓における糖新生の調節機構とその破綻の分子メカニズム”を解明しようとするものであり、極めて独創性・新規性が高く、また、肥満・2型糖尿病患者が直面している病態を解明しようとしている点で社会的意義も大きい。本研究は、腎臓の糖代謝調節機構の解明を通してその生理的/病態生理的役割を解明し、腎臓生理の根本原理に迫る斬新なプロジェクトであり、糖尿病や腎不全の予防・進行抑制さらには治療につながる卓越した成果が期待できる。

研究成果の概要(英文):We found that proximal tubules (PT)-specific IRS 1/2 double-knockout mice exhibited impaired insulin signaling and upregulated gluconeogenic gene expression and renal gluconeogenesis, resulting in systemic insulin resistance. In contrast, in streptozotocin-treated mice, although insulin action was impaired in the PTs, the gluconeogenic gene expression was unexpectedly downregulated in the renal cortex, which was restored by administration of an SGLT1/2 inhibitor. In the HK-2 cells, the gluconeogenic gene expression was suppressed by insulin, accompanied by phosphorylation and inactivation of FoxO1. In contrast, glucose deacetylated PGC1^α, a coactivator of FoxO1, via sirtuin 1, suppressing the gluconeogenic gene expression, which was reversed by inhibition of glucose reabsorption. These data suggest that both insulin signaling and glucose reabsorption suppress the gluconeogenic gene expression by inactivation of FoxO1 and PGC1^α, respectively.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖新生は乳酸やピルビン酸、アミノ酸などの糖質以外の物質からブドウ糖を産生する反応であり、通常、グルコース-6-ホスファターゼが存在する肝臓と腎臓(近位尿細管)でのみ起きる。肝臓の糖新生は絶食時や飢餓時に全身へブドウ糖を供給する生存に必須な役割を担っているが、一方で肥満・2型糖尿病ではその調節機構が破綻し、このことが病態形成に深く寄与している。インスリン分泌の枯渇している1型糖尿病では、空腹時においても肝臓における糖新生が亢進し高血糖を呈することから、インスリンは絶食時・摂食時を問わず肝臓の糖新生抑制に必須と考えられており、我々はこれまで一貫して肝臓におけるインスリン作用/インスリン抵抗性の分子機構を解明してきた(**Cell Metabolism** 6:55, 2007, **Nat. Commun.** 7:12977, 2016, **Cell Metabolism** 25:797, 2017)。ところが大変興味深いことに1型糖尿病モデル動物の腎臓では、肝臓とは逆にインスリンが枯渇しているにもかかわらず糖新生が抑制されていた。一方で腎臓の IRS-1/IRS-2 を欠損しインスリンシグナルを遮断すると糖新生の亢進が認められる。一連の結果は、腎臓はインスリンシグナルの調節を受けるものの、肝臓とは異なる制御機構が存在することを示唆するものである。肥満ではしばしば肝臓や骨格筋でインスリン抵抗性が認められ、これが2型糖尿病の発症に大きく寄与するが、腎臓においてもこうした臓器同様、インスリン抵抗性が惹起され高血糖の原因(病態形成の一因)となるのか、なるとするならばどのような機序が存在するのか、また腎不全ではしばしば低血糖が問題となるが、これが腎臓における糖新生障害に起因するものなのか、起因するとするならばどのようなメカニズムで糖新生が障害されるのか、解明すべき多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

腎臓の近位尿細管は肝臓と並ぶ主要な糖新生臓器であり、短期絶食時のグルコースが主に肝臓から供給されるのに対し、腎臓は長期絶食時に重要な役割を果たすことが知られている。しかしその調節機構は今なお十分に解明されていない。どのような分子やシグナルによって制御されているのか、糖尿病の病態形成や腎不全時にしばしば認められる低血糖にどのように関わっているのか、そのメカニズムがわかっていないため適切な予防や対策、治療の実施が困難となっている。そこで本研究では、第一に (I) 腎臓近位尿細管における糖代謝調節機構の生理的・病態生理的役割を解明する。我々は既に肝臓同様、腎臓においても絶食・再摂食により糖新生酵素が増減することを確認済みである。そこで第二に (II) 腎臓近位尿細管における糖新生調節の分子機構について解明する

3. 研究の方法

(I) 腎臓近位尿細管における糖代謝調節機構の生理的・病態生理的役割を解明する

肥満・2型糖尿病モデル(インスリン抵抗性モデル)として高脂肪食負荷マウス、ob/obマウス、db/dbマウス、1型糖尿病モデル(高血糖モデル)としてSTZ投与マウス、Akitaマウス、インスリンシグナル遮断マウスとして我々が樹立した腎近位尿細管特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損マウスに対して、インスリン負荷試験、グルコース負荷試験、腎臓糖新生の基質であるグルタミン負荷試験を行い、血糖変動とともに腎臓における糖新生酵素の発現変動を検討する。糖新生の亢進や低下が認められた場合には、インスリンシグナル分子の発現や活性化(リン酸化レベル)、グルコース代謝に関わる分子を調べ、それぞれのモデル動物の腎臓におけるインスリン感受性や糖代謝状態を明らかにする。我々は既に腎組織を糸球体・近位/遠位尿細管を分離する技術を有しており、インスリン感受性や糖代謝に異常が認められた場合には、さらに詳細なメカニズムを検討すべく、レーザーマイクロダイセクションを用いて近位尿細管組織のみを抽出し、糖取り込みに関わる SGLT2 や GLUT2、解凍系律速酵素のヘキソキナーゼ(HK)をはじめ糖代謝に関わる分子、インスリン受容体(IR)、IRS-1/IRS-2、Akt、FoxO1等のインスリンシグナル関わる分子に着目しつつ、マイクロアレイ解析、血中・尿中メタボローム解析等を駆使し、インスリンシグナルや糖代謝、脂質代謝、酸化ストレス、小胞体ストレス、電解質、低酸素応答系の遺伝子発現や代謝調節機構を網羅的に解析し、腎臓近位尿細管を中心とする糖代謝調節機構の生理的・病態生理的役割の全貌を解明する。

(II) 腎臓近位尿細管における糖新生調節の分子機構について解明する

ヒト腎臓近位尿細管細胞株であるHK-2細胞を用いて、特に肝臓で糖新生酵素の発現制御に関わる転写因子 FoxO1 や PGC1 に着目し、インスリンシグナル、グルコース代謝を検討するとともに、FoxO1、PGC1 の過剰発現、ノックダウンの系を用いて糖新生に対する直接的な制御機構を解析する。我々は既にHK-2細胞にインスリンを投与すると FoxO1 の蛋白レベルが低下し、PEPCK の発現が抑制することを見出しており、インスリンシグナルによる直接制御が示唆される。さらに SGLT2 阻害薬やインスリンシグナル阻害による FoxO1 や PGC1 α のリン酸化、アセチル化状態を検討するとともに上記(I)の網羅的解析により明らかとなっ

た pathway について、糖新生調節機構への直接作用やそのメカニズム検討し、腎臓近位尿細管における糖新生調節機構とその破綻のメカニズムについて解明する。

4. 研究成果

腎臓近位尿細管における糖代謝調節機構

近位尿細管細胞にはグリコーゲン蓄積が認められないため、腎臓からの糖の放出は、大きく原尿からの糖の再吸収と糖新生の2つで行われる。糖の再吸収は尿細管腔側に発現している SGLT1 や SGLT2 を介して行われ、基底膜側の GLUT2 を介して血中に放出される。一方、糖新生関連酵素の発現はインスリンによって発現が抑制されることが報告されている。実際、摂食後の腎皮質におけるインスリンシグナルを検討すると血糖値やインスリン値の上昇とともにインスリン受容体 (IR)、インスリン受容体基質 (IRS) -1、IRS-2、さらに Akt、FoxO1 のリン酸化が認められ、PEPCK や G6Pase の発現が抑制されており、たしかにインスリンシグナルを介した調節が存在することが示唆された。さらに詳細にインスリン作用を検討するためレーザーマイクロダイセクション法を用いて、糸球体 (G)、近位尿細管 (PTs)、遠位尿細管 (DTs) を単離し、肝臓 (L) をコントロールとしてインスリンシグナルや糖代謝にかかわる遺伝子群を絶食/再摂食条件において解析したところ、近位尿細管には SGLT1 や SGLT2 に加えて、IR、IRS-1、IRS-2 といったインスリンシグナル分子や PEPCK、G6Pase といった糖新生関連酵素、glucose transporter (GLUT) や hexokinase (HK) が幅広く発現しており、一部の分子については絶食/摂食によってその発現が変化していることが明らかとなった。

腎臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損 (SIRS-1/2DKO) マウスおよび STZ 投与マウスの解析

そこで我々は以前樹立した腎臓近位尿細管特異的 Cre (SGLT-2Cre) Tg マウスを利用して腎臓特異的 IRS-1/IRS-2 ダブル欠損 (SIRS-1/2DKO) マウスを作製し、インスリンシグナルを介した近位尿細管における糖代謝調節機構を解析することとした。SIRS-1/2DKO マウスは体重や耐糖能障害は認められなかったが、インスリン抵抗性が認められ、肝臓/腎臓共通の糖新生基質であるピルビン酸あるいは腎臓における糖新生基質であるグルタミン投与により高血糖を呈し、糖新生が亢進していることが明らかとなった。この結果はインスリンシグナルが肝臓と同様、腎臓近位尿細管において直接糖新生を調節していることを示すものであった。次に我々は STZ を投与し、低インスリン高血糖マウスを作製し、肝臓/腎臓における糖新生について検討した。肝臓における糖新生はインスリンシグナルによって抑制されるため、PEPCK や G6Pase の発現は上昇したが、腎臓では非常に興味深いことに逆に糖新生の抑制が認められ、インスリンシグナルによらない糖代謝調節機構の存在が示唆された。さらにこのマウスに対してフロリジン (PHZ) を投与し SGLT1/SGLT2 を阻害したところ、腎臓における糖新生関連酵素の発現上昇が認められた。同様の現象は SIRS-1/2DKO マウスでも認められ、グルコースはインスリンシグナルとは独立に糖新生を調節していることが示された。一連の結果から腎臓ではインスリンシグナルに加えグルコースによっても糖新生が抑制されており、PHZ の投与により近位尿細管細胞への糖の流入が阻害された結果、糖新生酵素の発現が上昇したと考えられた。

HK-2 細胞を用いた解析

肝臓では糖新生関連酵素の発現はインスリンシグナルの下流にある FoxO1 によって調節されている。ヒト近位尿細管 (HK-2) 細胞を用いて検討したところ、FoxO1 のノックダウンにより PEPCK の発現が抑制されたことから、腎臓においても肝臓同様インスリンシグナル - FoxO1 によって糖新生関連酵素の発現は調節されていることが示唆された。次にグルコースによる発現調節機構を検討するため、低グルコース (LG) ならびに高グルコース (HG) 条件下で実験を行ったところ、HG により PEPCK の発現は低下し PHZ 投与によりその低下が抑制された。この時 HG 投与下では NADH/NAD⁺ 比が増加し PHZ 投与により低下したところから、我々は Sirt1 による発現調節の可能性を考えた。実際、HG では Sirt1 の発現には変化は認められなかったが、糖新生関連酵素の発現調節に重要な PGC1 α のアセチル化が亢進し、PHZ 投与により低下していた。Sirt1 ならびに PGC1 α の糖新生関連酵素の発現の直接作用を検討するためそれぞれのノックダウンを行ったところ、いずれにおいても PEPCK の発現抑制が確認された。

腎臓における糖新生調節機構

以上の結果から腎臓近位尿細管における糖新生は、インスリンシグナルとグルコース再吸収の2つの機構によって協調的に調節されていることが明らかとなった。すなわち絶食時、原尿中からの糖の再吸収が低下すると NADH/NAD⁺ 比が低下し Sirt1 が活性化され、PGC1 α の脱アセチル化/活性化により糖新生関連酵素の発現が上昇する。同時に絶食時の血中インスリンレベルの低下に伴うインスリン受容体シグナルの減弱は FoxO1 を活性化し、糖新生関連酵素の発現を増加させる。一方絶食時には糖の再吸収は Sirt1 の活性低下/PGC1 α のアセチル化を介して、インスリンシグナルは FoxO1 の不活性化を介して糖新生を抑制していることが明らかとなった。また SIRS-1/2DKO マウスにおいても PHZ による糖新生上昇作用が認められた事実は、グルコースによる糖新生抑制作用のほうがインスリンシグナルによる抑制よりも強いことを示唆している。糖の再吸収も糖新生もどちらも一定のエネルギーを必要とするが、理論的には糖 1 分子の再吸収には 1/3~2/3 の ATP が必要なのに対し (SGLT1 を介するか SGLT2 を介するかで異なる)、

糖 1 分子の糖新生には 6 分子の ATP が必要であり、近位尿細管は全身循環へグルコースを供給するために、通常は ATP 消費の少ない糖の再吸収を行ない、糖の再吸収で十分に血糖を維持できない状況に限って ATP 消費の多い糖新生を行なっていることが想定された。

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 Kobayashi M, Ohsugi M, Sasako T, Awazawa M, Umehara T, Iwane A, Kobayashi N, Okazaki Y, Kubota N, Suzuki R, Waki H, Horiuchi K, Hamakubo T, Kodama T, Aoe S, Tobe K, Kadowaki T, Ueki K	4. 巻 38
2. 論文標題 The RNA Methyltransferase Complex of WTAP, METTL3, and METTL14 Regulates Mitotic Clonal Expansion in Adipogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e00116-00118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00116-18	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 Igarashi Miki, Watanabe Kazuhide, Tsuduki Tsuyoshi, Kimura Ikuo, Kubota Naoto	4. 巻 33
2. 論文標題 NAPE-PLD controls OEA synthesis and fat absorption by regulating lipoprotein synthesis in an in vitro model of intestinal epithelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3167 ~ 3179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801408R	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 Yanagida Keisuke, Igarashi Hidemitsu, Yasuda Daisuke, Kobayashi Daiki, Ohto-Nakanishi Takayo, Akahoshi Noriyuki, Sekiba Atsushi, Toyoda Tsudoi, Ishijima Tomoko, Nakai Yuji, Shojima Nobuhiro, Kubota Naoto, Abe Keiko, Kadowaki Takashi, Ishii Satoshi, Shimizu Takao	4. 巻 3
2. 論文標題 The G _{12/13} -coupled receptor LPA4 limits proper adipose tissue expansion and remodeling in diet-induced obesity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 9 7 2 9 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.97293	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 Kubota Tetsuya, Inoue Mariko, Kubota Naoto, Takamoto Iseki, Mineyama Tomoka, Iwayama Kaito, Tokuyama Kumpei, Moroi Masao, Ueki Kohjiro, Yamauchi Toshimasa, Kadowaki Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Downregulation of macrophage Irs2 by hyperinsulinemia impairs IL-4-induced M2a-subtype macrophage activation in obesity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07358-9	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪田 哲也、窪田 直人、井上 真理子、林 高則、相原 允一、高本 偉碩、植木 浩二郎、山内 敏正、門脇 孝
2. 発表標題 マクロファージにおけるIrs2はIL-4によるM2a-subtype活性化を減弱し、インスリン抵抗性を惹起する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田 哲也、窪田 直人、林 高則、相原 允一、高本 偉碩、山内 敏正、門脇 孝
2. 発表標題 血管内皮細胞のIrs2の役割の解明
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田 直人、窪田 哲也、山内 敏正、門脇 孝
2. 発表標題 肥満合併症としての肝疾患-NASHと肝細胞癌をどう捉えるか- 肥満に伴う選択的インスリン抵抗性の分子機構 肝臓のmetabolic zonation
3. 学会等名 第39回日本肥満学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田 哲也、窪田 直人、井上 真理子、林 高則、相原 允一、高本 偉碩、山内 敏正、植木 浩二郎、門脇 孝
2. 発表標題 マクロファージIrs2はNCoR1/HDAC3/FoxO1を介してM2a-subtypeマクロファージの活性化を調節する
3. 学会等名 第39回日本肥満学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 高則、窪田 直人、窪田 哲也、井上 真理子、相原 允一、高本 偉碩、門脇 孝
2. 発表標題 中枢におけるインスリン受容体基質(IRS)1の成長・代謝に関する役割の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 窪田 直人、佐々木 元大、笹子 敬洋、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (有)科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 内分泌・糖尿病・代謝内科	

1. 著者名 窪田 哲也、窪田 直人、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (公社)生命科学振興会「医と食」編集部	5. 総ページ数 4
3. 書名 医と食	

1. 著者名 窪田 直人、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)東京医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 腎と透析	

1. 著者名 桜井 賛孝、窪田 直人、門脇 孝	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (有)科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 内分泌・糖尿病・代謝内科	

〔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
研究 分担者	笹子 敬洋 (Sasako Takayoshi) (20550429)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究 分担者	中村 元信 (Nakamura Motonobu) (40459524)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	