

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17698

研究課題名(和文)腎近位尿細管における糖新生の制御機構と病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Hormonal regulation and pathophysiological significance of gluconeogenesis in renal proximal tubules

研究代表者

佐藤 信彦 (Sato, Nobuhiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80572552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラットとヒトの腎近位尿細管を用いてPTHによる腎糖新生調節機構の検討を行った。PTHは近位尿細管の糖新生酵素の発現を有意に増加させ、その増加は糖新生抑制ホルモンであるインスリンの影響を受けなかった。プロテインキナーゼ阻害薬とsi-RNAによる特異的遺伝子抑制法と蛋白定量の結果から、PTHはPKCを介してインスリン/Akt/FoxO1経路を阻害して近位尿細管におけるインスリン抵抗性を惹起することが示唆された。本研究の結果は、原発性副甲状腺機能亢進症、偽性副甲状腺機能低下症およびCKDに伴う糖代謝異常やインスリン抵抗性の病態解明の一端となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、動物やヒトにおけるPT糖新生を肝糖新生との比較を通じて多面的に解析することで、PT糖新生の調節機構を明らかにし、2型糖尿病やCKDに合併する高血糖やインスリン抵抗性の病態形成におけるPT糖新生の意義を検討するものである。本研究結果から、PTHはPKCを介して近位尿細管糖新生を亢進させ、インスリン/Akt/FoxO1経路を阻害して近位尿細管におけるインスリン抵抗性を惹起する可能性が示唆された。また、この制御機構は肝臓にはない、PT特異的なものであり、原発性副甲状腺機能亢進症、偽性副甲状腺機能低下症およびCKDに伴う糖代謝異常やインスリン抵抗性の病態解明の一端となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of renal glycogenesis regulation by PTH was investigated in rat and human renal proximal tubules.

PTH significantly increased the expression of glycogenesis enzymes in the proximal tubule, and the increase was not affected by insulin, a glycogenesis inhibitory hormone. The results of specific gene silencing by si-RNA and inhibition by protein kinase inhibitors suggested that PTH induces insulin resistance in the proximal tubule by inhibiting the insulin/Akt/FoxO1 pathway via PKC. The results of this study may contribute to the understanding of the pathogenesis of abnormal glucose metabolism and insulin resistance associated with primary hyperparathyroidism, pseudohypoparathyroidism and CKD.

研究分野：腎生理学

キーワード：近位尿細管 糖新生 副甲状腺ホルモン インスリン PKC

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管で行われる糖新生は、全身の糖産生への寄与が通常の状態では約 10-25%程度とされる。しかし、長期の絶食状態では肝糖新生と同等の糖新生能を認め、食後状態においても最大で 60%に達すると報告されている。また、ヒト肝移植症例の報告では無肝期でもエピネフリン、乳酸、グリセロール、遊離脂肪酸といった糖新生に関連するホルモンと非糖質性基質の濃度が有意に上昇していることが示されており、腎臓で糖新生が代償的に働いた可能性が示唆されている。即ち、これまで過小評価されてきた近位尿細管糖新生は実際には糖代謝恒常性に強く関与しているが、肝糖新生と比較して近位尿細管糖新生の特異性については不明な点が多い。

近位尿細管糖新生の調節因子として、カテコラミン、コルチゾール、成長ホルモン、副甲状腺ホルモン (PTH) などが正の調節因子として、インスリンが負の調節因子として報告されており、その中でも PTH は全身の糖代謝異常との関連が指摘されている。例えば、慢性腎臓病 (CKD) では病状の進行と共に PTH 血中濃度が上昇する一方で、インスリン抵抗性を合併しやすいことや、原発性副甲状腺機能亢進症では耐糖能異常やインスリン抵抗性の合併率が高いこと、副甲状腺摘出後に耐糖能が改善したことなどが挙げられ、さらにラットを用いた検討では PTH の直接投与による近位尿細管糖新生が観察されている。

このように、PTH はインスリン抵抗性を惹起し、全身の糖代謝に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかしながら、肝糖新生と比較して PT 糖新生の特異性や詳細な調節機構については、遺伝子改変動物作成にかかる多大な時間と経費などが実験上の制約となり、その解明に新しい視点からのアプローチが必要とされてきた。

2. 研究の目的

申請者の所属する研究室は PT 生理機能に関する多くの知見を報告しており、その際に用いるオリジナルの単離 PT 培養系と遺伝子抑制法は上記の課題を克服し、PT 糖新生調節機構の全容解明にとって新しい切り口となりうる。実際、申請者らはインスリンによる PT 糖新生の負の調節に関する基盤的知見の報告をしており、本研究はその知見を発展させ、動物やヒトにおける PT 糖新生を肝糖新生との比較を通じて多面的に解析することで、PT 糖新生の調節機構を明らかにし、2 型糖尿病や CKD に合併する高血糖やインスリン抵抗性の病態形成における PT 糖新生の意義を検討するものである。単離 PT を用いた実験系は PT 糖新生の解析における培養細胞の限界を克服し、そこから得られる知見により PT 糖新生の病態生理学的意義や糖新生調節機構における肝糖新生にはない PT 糖新生の特異性が明らかになれば、国民病でもある糖尿病や CKD のインスリン抵抗性に対する新規治療法開発へとつながることが期待され、その臨床的意義は非常に大きいと考えられる。

3. 研究の方法

所属施設の動物実験規約に準拠して飼育された Wistar ラットおよび倫理委員会で承認されたヒト腎組織 (手術検体) より用手的に近位尿細管を単離し、糖新生制御機構の解析を *ex vivo* で行った。また、前者においては PT 糖新生との比較を目的として初代単離肝細胞の培養とその糖新生制御機構の解析も行った。糖新生機能評価には、糖新生関連酵素である PEPCK (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ) と G6Pase (グルコース-6-ホスファターゼ) の mRNA の定量的 PCR、Glucose Assay Kit で測定したグルコース産生能、PEPCK Assay Kit で測定した PEPCK 酵素活性、Glucose 6 Phosphate Assay Kit で測定した G6P 濃度を使用した。ホルモン調節機構の解析で用いるヒト 1-34 PTH (以下 PTH) は、Wistar ラットとヒトそれぞれの単離尿細管と培養した時の PEPCK、G6Pase の mRNA 発現量から濃度依存性の糖新生亢進作用を確認し、1 nM を至適濃度として実験に使用した。PT 糖新生のシグナル伝達経路の解析には、PTH の下流のメッセンジャーである PKA (プロテインキナーゼ A) と PKC (プロテインキナーゼ C) それぞれに対する特異的阻害剤 (H89 および Gö 6983) を使用すると共に、既報に基づく si-RNA を用いた遺伝子発現抑制法によりインスリンシグナル伝達の下流にある構成要素をノックダウンした尿細管も使用した。

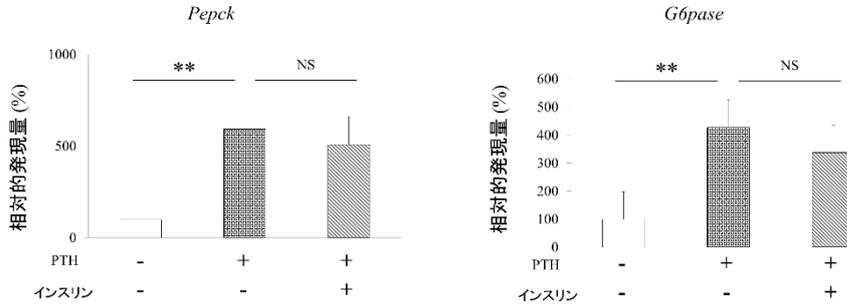
4. 研究成果

1) 近位尿細管糖新生とその制御機構

ラット近位尿細管とヒト近位尿細管それぞれに db-cAMP を添加した群では、非添加群と比較して *Pepck* および *G6pase* の有意な発現量の亢進を認め、この作用はインスリンの添加により抑制された。(腎組織を採取した患者 14 例に糖代謝異常や腎機能障害なし) ラット近位尿細管ではさらにグルコース産生能、PEPCK 酵素活性および G6P 濃度を測定したが、同様に db-cAMP の糖新生酵素発現亢進とインスリン添加による抑制が観察された。

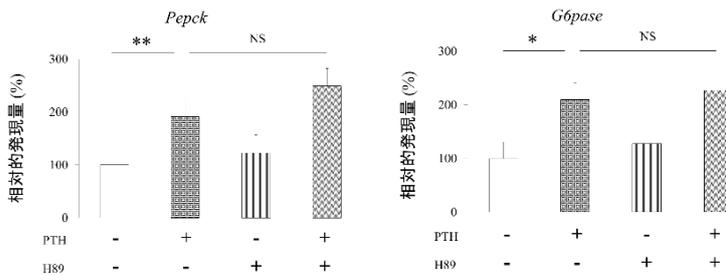
2) PTHによる近位尿細管糖新生亢進作用と制御機構の解析

ラット近位尿細管とヒト近位尿細管それぞれに 1 nM PTH を添加したところ、Pepck および G6pase の有意な発現量の亢進を認めた。一方で 1) とは異なり、PTH によって発現亢進した糖新生酵素遺伝子はインスリン添加により抑制されなかった。ラット近位尿細管ではさらにグルコース産生能、PEPCK 酵素活性および G6P 濃度を測定したが、同様に PTH の糖新生酵素発現亢進は観察されたが、インスリン添加による有意な変化を認めなかった (下図)
以下、使用する図において** p < 0.01, NS: 有意差なしを意味する。

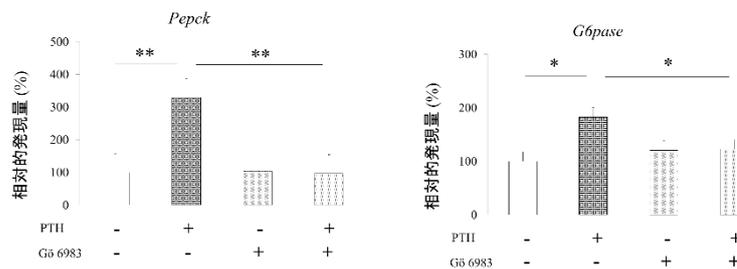


3) 近位尿細管糖新生亢進作用のシグナル伝達経路の解析

PTH の主要な細胞内シグナル伝達経路として知られる cAMP/PKA 経路と PLC/PKC 経路を念頭に置き、ラット近位尿細管と PKA と PKC の特異的阻害剤を用いたシグナル伝達経路の解析を行った。PKA 阻害剤 (H89) は db-cAMP の添加による Pepck と G6pase の発現亢進作用を有意に抑制したが、PTH の添加による Pepck と G6pase の発現亢進作用には影響を与えなかった (下図)。



対照的に、PKC 阻害剤 (Gö 6983) は db-cAMP の添加による Pepck と G6pase の発現亢進作用に影響を与えなかったが、PTH の添加による Pepck と G6pase の発現亢進作用を有意に抑制した。これらの結果から、PTH による近位尿細管糖新生亢進作用は PKC を介していることが示唆された。



4) PTHが近位尿細管のインスリンシグナルに与える影響

1)においてインスリンが PTH による PT 糖新生亢進に影響しなかったことより翻り、PTH による糖新生亢進がインスリンの糖新生制御に影響を及ぼす可能性について検討した。具体的には PTH がインスリンシグナル下流に存在する Foxo1 発現に及ぼす影響を解析した。

まず、1 nM PTH を添加したラット近位尿細管の Foxo1 発現量を調べたところ、対照と比較して有意な発現亢進を認めた。次に、si-RNA を使用して近位尿細管 Foxo1 に対する特異的遺伝子発現抑制を行ったところ、db-cAMP の添加による Pepck と G6pase の発現亢進作用、および PTH の添加による Pepck と G6pase の発現亢進作用も有意に抑制された。以上より、PTH による PT 糖新生亢進作用が Foxo1 に関与していることが示唆された。

5) PTHが腎皮質のインスリンシグナルに与える影響

1)~4)の結果を踏まえ、PTH がインスリンシグナル伝達のメッセンジャー蛋白発現量に及ぼす

影響を Western Blotting で解析した。蛋白発現量を解析ための十分な検体量を確保するため、ここでは単離尿細管ではなくラット腎皮質を使用した。まず、インスリンはラット腎皮質の Akt リン酸化を 2 倍に亢進させたが、PTH を添加してもリン酸化 Akt に特別な変化は観察されなかった。次に、FoxO1 発現量に関して同様の検討を行ったところ、インスリンは FoxO1 のリン酸化を 2.3 倍に亢進させ、さらにこの作用は PTH を添加したことで有意に抑制された。これらの結果から、PTH は FoxO1 のリン酸化を直接的に阻害し、近位尿細管におけるインスリン抵抗性を惹起する可能性が示唆された。

6) PTH と肝糖新生の関連

主たる糖新生臓器である肝臓でも PTH による PT 糖新生亢進作用を認めるかどうかについて、ラット初代単離培養肝細胞で検討した。まず、既報に基づき初代単離培養肝細胞に db-cAMP と DEX (デキサメサゾン) を添加したところ、*Pepck* および *G6pase* のそれぞれで有意な発現亢進を認め、この作用がインスリン添加による抑制されるという 1) と同様の事象が観察された。次に、PTH を添加したが、初代単離培養肝細胞では *Pepck* および *G6pase* のいずれにおいても発現亢進を認めず、PTH の糖新生亢進作用は PT 特異的な現象であることが示唆された。

7) 本研究の限界について

第一に、用手的に単離した近位尿細管に si-RNA を導入して得られるサンプル量は蛋白発現の定量を行うには不十分であり、そのために *Foxo1* の特異的遺伝子抑制が FoxO1 のタンパク発現に与える影響の解析は行えなかった。第二に、ラット近位尿細管における *Foxo1* の特異的遺伝子抑制について、用いた si-RNA は一種類のみであり、異なる配列の si-RNA での検討は行っていない。第三に、ラット近位尿細管に PTH を添加した際の *Foxo1* の mRNA 発現変動については total-FoxO1 発現量の変化と解離があり、各サンプルでの内在性コントロール蛋白発現の評価も必要であった。第四に、近位尿細管における FoxO1 の発現量は肝臓のそれと比較して著しく少なく、さらに良質な FoxO1 抗体も存在しなかったため、本研究では腎皮質もしくは近位尿細管における FoxO1 の細胞内局在変動について免疫組織学的な解析が困難であった。第五に、*ex-vivo* の検討で用いたヒト 1-34 PTH (テリパラチド) の濃度に関しては生理的濃度との解離がある。即ち、骨粗鬆症治療に用いられるテリパラチドの治療域の血中濃度は 50~80 pM であるが、本研究で糖新生亢進作用を認めた 1 nM は治療域の血中濃度の約 10 倍に相当し、PTH が生理的な濃度でも全身の糖代謝異常に影響を及ぼすかどうかは不明である。最後に、ヒトでは得られる検体量がごくわずかであるため、特異的阻害剤による検討や si-RNA を用いた検討が遂行できなかった。本研究の作業仮説の検証のために、更なる詳細な研究が必要である。

8) 本研究の結果

本研究から、PTH は PKC を介して近位尿細管糖新生を亢進させ、インスリン/Akt/FoxO1 経路を阻害して近位尿細管におけるインスリン抵抗性を惹起する可能性が示唆された。また、この制御機構は肝臓にはない、PT 特異的なものであった。本研究の結果は、原発性副甲状腺機能亢進症、偽性副甲状腺機能低下症および CKD に伴う糖代謝異常やインスリン抵抗性の病態解明の一端となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Motonobu, Tsukada Hiroyuki, Seki George, Satoh Nobuhiko, Mizuno Tomohito, Fujii Wataru, Horita Shoko, Moriya Kyoji, Sato Yusuke, Kume Haruki, Nangaku Masaomi, Suzuki Masashi	4. 巻 97
2. 論文標題 Insulin promotes sodium transport but suppresses gluconeogenesis via distinct cellular pathways in human and rat renal proximal tubules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 316 ~ 326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2019.08.021	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 0件）

1. 発表者名 塚田 弘之、中村 元信、水野 智仁、佐藤 信彦、佐藤 悠佑、堀田 晶子、関 常司、久米 春喜、南学 正臣、鈴木 正志
2. 発表標題 副甲状腺ホルモンはPKC/FOXO1を介して近位尿細管糖新生を亢進させる
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Tsukada, Motonobu Nakamura, Shoko Horita, Wataru Fujii, Tomohito Mizuno, Nobuhiko Saotoh, Yusuke Sato, George Seki, Haruki Kume, Masaomi Nangaku, Masashi Suzuki
2. 発表標題 Parathyroid hormone enhances gluconeogenesis via PKC/FoxO1 pathway in proximal tubules
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019
4. 発表年 2019年 ~ 2020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
---------	---------