

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08248

研究課題名(和文) 近位尿細管におけるmTORC2の生理的な意義の解明

研究課題名(英文) Physiological significance of mTORC2 in the proximal tubule

研究代表者

中村 元信 (Nakamura, Motonobu)

東京大学・医学部附属病院・講師

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)：天然化合物であるレスベラトロールはポリフェノール的一种であり、*in vitro*と*in vivo*の両方の研究で、炎症の軽減、抗がん作用、抗酸化作用、アンチエイジング特性が報告されているが、近位尿細管における作用や腎臓病に対する効果は不明である。そこで、今回、我々は、レスベラトロールの近位尿細管ナトリウム再吸収に及ぼす影響と腎臓病進展抑制効果について、検討した。その結果、レスベラトロールは近位尿細管において、インスリンによるNa再吸収亢進作用を抑制し、腎保護作用を有する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORC2の腎近位尿細管における役割や意義については、不明な点が多い。今回、我々は、レスベラトロールは近位尿細管において、mTORC2を抑制することによりインスリンによるNa再吸収亢進作用を抑制すること、*in vivo*の検証においてレスベラトロールが腎保護作用を有する可能性を見出したことから、インスリン/mTORC2経路は、腎近位尿細管において、腎障害進展と関連している可能性がある。従って、この経路を標的とした腎臓病の治療につながる可能性があり、糖尿病性腎症の進展を抑制する次世代の治療法を見出すことができれば、末期腎不全の進展をさらに抑制することができると思われる。

研究成果の概要(英文)：Resveratrol (RSV), a natural compound, is one of the polyphenols, which has been reported to reduce inflammation, have anti-cancer, anti-oxidant, and anti-aging effects in both *in vitro* and *in vivo* studies, however, its effects in the proximal tubules and on kidney disease are unknown. In the present study, we used isolated proximal tubules (PTs) and rat models to examine the effects of RSV on its effects on the PTs, and its inhibitory effects on the progression of renal injury.

As a result, RSV inhibits insulin-induced sodium reabsorption in PTs, suggesting that it could have a renoprotective effect.

研究分野：腎臓病生理学

キーワード：近位尿細管 ナトリウム再吸収 腎保護 mTOR mTORC2

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全の原因疾患として最も多い糖尿病性腎症(DMN)の進展抑制は重要な課題であり、レニン-アンジオテンシン系(RAS)阻害薬を中心とした集学的な管理を行ってもその進展を完全に抑制することは困難であることが示唆されていた。近年、DMN に対するナトリウム・グルコース共輸送体(SGLT)2 阻害剤の投与が心血管疾患発症や腎障害の進展を抑制する事が大規模臨床試験によって明らかにされ、以降、SGLT2 阻害剤の臓器保護効果は大きな注目を集めている。

SGLT2 阻害剤の臓器保護効果の機序として、近位尿細管(PT)管腔側の Na/H 交換輸送体(NHE)3 との共役関係、利尿効果、糸球体過剰濾過の是正等、Na 輸送と関連する可能性が示唆されているが PT の Na 再吸収は、その大部分が PT 管腔側の NHE3 と基底側の Na-HCO₃ 共輸送体(NBCe)1 との協調的な輸送に依存しており、SGLT の PT における Na 再吸収に及ぼす影響は非常に少ないと考えられる。さらに、DPP-IV も NHE3 と共役することが報告されているが、DPP-IV 阻害剤の大規模臨床試験では腎保護効果は証明できていない。これらの知見から、SGLT2 阻害剤による臓器保護効果は、Na 利尿作用による降圧効果以外の作用が考えられるが、その詳細は不明であった。

SGLT2 阻害剤の大規模臨床試験で示された SGLT2 阻害剤の DMN 進展抑制効果は、RAS 阻害薬や糖尿病薬および利尿薬等への上乗せ効果であることから、糸球体障害、尿細管障害および血管内皮障害などを複合的に改善させるという機序が推測される。これらの機序の一つとして、DMN では mTORC1 の異常活性化による糸球体障害や尿細管障害が惹起され、SGLT2 阻害剤により産生されたケトン体が mTORC1 シグナルを抑制し、DMN の進展を抑制することが示された。その他にも、DMN の腎障害進展機序として、Ins による mTOR を介したオートファジーの異常が提唱されている。しかしながら、ラパマイシン(mTORC1 特異的阻害剤)による腎保護効果は限定的であり、mTORC1 の抑制だけでは腎保護効果を十分に説明はできない。一方で、最近、mTORC1/2 阻害剤(レスベラトロールや PP242)の腎保護効果が示され、腎障害の進展には mTORC2 が関与している可能性があるが、PT における mTORC2 の生理的な意義は不明であり、SGLT2 と mTORC2 の関連については不明である。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は、SGLT2 阻害剤の腎保護効果に着目し、PT における mTORC2 の生理的な意義の解明を通じて、DMN の進展機序と進展抑制因子を解明する事である。

3. 研究の方法

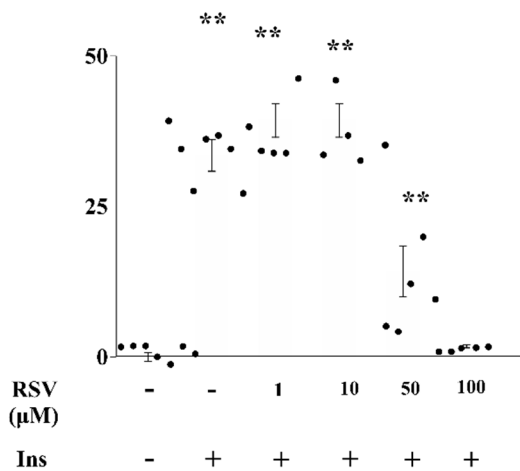
Ex vivo の検証では、基底側 NBCe1 活性と管腔側 NHE 活性を評価する。具体的には、基底側 NBCe1 活性は、ラットより単離した PT の内腔を虚脱させ、基底膜側のみを灌流液で灌流させ、灌流液の急速な重炭酸濃度の変化による細胞内 pH 変化を pH 感受性蛍光色素 BCECF-AM を用いて NBCe1 の活性を評価する。管腔側 NHE 活性は、split-open 法により、灌流液の急速な Na 濃度の変化による細胞内 pH 変化により測定した。さらに、これらが、インスリンの有無およびレスベラトロールの有無によりどのように変化するかを測定し、解析した。

In vivo では、OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットに高塩分食餌を負荷することにより、DMN モデルを作成し、SGLT2 阻害剤の投与およびレスベラトロールの投与による mTORC2 の影響やシグナル伝達について、検証した。

4. 研究成果

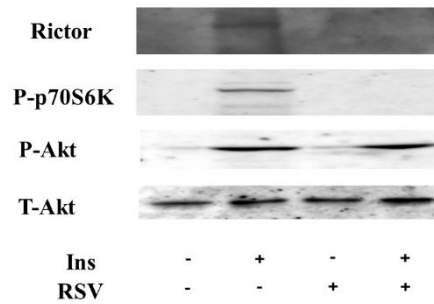
レスベラトロール(RSV)は濃度依存的に、PT におけるインスリンによる NBCe1 活性亢進作用を有意に抑制した。

つぎに、インスリンによるシグナル伝達を評価した。その結果、インスリンは、mTORC1 の下流シグナルである p-70S6K のリン酸化を亢進させ、mTORC2 の構成因子である rictor の発現量も亢進させたが、RSV は、イ



インスリンによるAktのリン酸化に影響を及ぼさず、インスリンによる p-70S6K のリン酸化亢進および rictor の発現亢進作用を抑制していた (図2)

図2. RSV suppressed p70S6K phosphorylation and Rictor expression without affecting insulin-induced Akt phosphorylation



そこで、インスリンによる mTORC2 活性化を RSV により抑制することが、腎臓に及ぼす影響について、モデルラットを作成し、検証した。モデルラットは、OLETF rat に高塩分食餌を20週間与え、作成した。対照群として、LETO rat を使用した。

その結果、表1に示すように、高塩分食餌を与えた OLETF rat は血圧上昇、インスリン抵抗性、腎機能障害を示し、高度の蛋白尿も伴っていたが、RSV の投与により血圧上昇、インスリン抵抗性、腎機能障害、および高度の蛋白尿は抑制されていた。

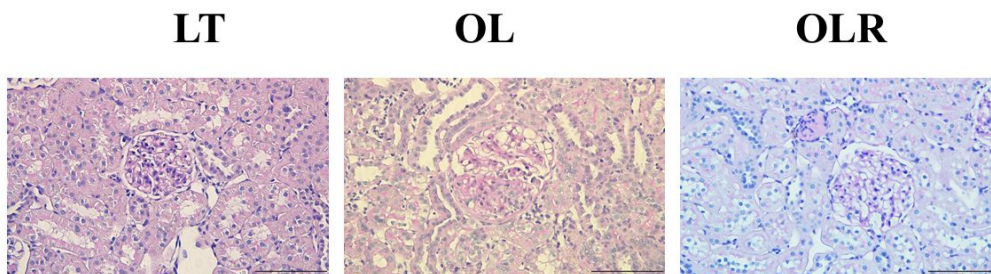
表1. High-dose RSV administration suppresses DKD: an in-vivo experiment

	LT	OL	OL+RSV
N	5	5	5
BW(g)	307.7 ± 13.9	374.9 ± 16.8** ##	331.5 ± 6.54
sBP (mmHg)	106.4 ± 3.65	160 ± 16.6** ##	126.4 ± 1.82
CCr/BW100g	2.40 ± 0.18	1.44 ± 0.13** ##	2.46 ± 0.08
Serum K (mEq/L)	3.35 ± 0.36	5.5 ± 0.33** ##	4.32 ± 0.98
U _{TP/Cre} (g/gCre)	0.30 ± 0.03	8.89 ± 1.30** ##	1.09 ± 0.36
HOMA-IR	0.30 ± 0.04	3.46 ± 0.758** ##	0.94 ± 0.30

LT:LETO rats, OL: OLETF rats, OL+RSV: OLETF rats with RSV

次に、腎障害を病的に評価した。その結果、腎病理では、高塩分食餌を与えた OLETF rat は、糖尿病性腎症に矛盾しない、分葉可や結節性病変などの所見を呈していたが、RSV 投与により、腎病理所見の有意な改善を認めた。

図3. High Doses of Resveratrol Inhibit Diabetic Kidney Disease in Pathological Findings



PT のインスリンによるナトリウム再吸収亢進作用は、以前に我々が示したように mTOR シグナルを介している可能性がある。高濃度の RSV はインスリンによる mTOR シグナル伝達の阻害を介して PT のナトリウム再吸収亢進作用の抑制を通じて血圧の上昇を抑制し、インスリン抵抗性を改善し、蛋白尿を抑制するだけでなく、腎保護作用も有する可能性が示唆された。

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 Nakamura Motonobu, Satoh Nobuhiko, Horita Shoko, Nangaku Masaomi	4. 巻 13
2. 論文標題 Insulin-induced mTOR signaling and gluconeogenesis in renal proximal tubules: A mini-review of current evidence and therapeutic potential	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 01-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2022.1015204	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 Mizuno Tomohito, Satoh Nobuhiko, Horita Shoko, Tsukada Hiroyuki, Takagi Mayuko, Sato Yusuke, Kume Haruki, Nangaku Masaomi, Nakamura Motonobu	4. 巻 298
2. 論文標題 Oxidized alkyl phospholipids stimulate sodium transport in proximal tubules via a nongenomic PPAR -dependent pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101681 ~ 101681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101681	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 Nakamura Motonobu, Nangaku Masaomi	4. 巻 102
2. 論文標題 Snapshots of nascent RNA can validate different nephron segment responses in acute kidney injury: a step toward clinically useful biomarkers?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 678 ~ 680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2022.06.004	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 Mizuno Tomohito, Satoh Nobuhiko, Horita Shoko, Tsukada Hiroyuki, Takagi Mayuko, Sato Yusuke, Kume Haruki, Nangaku Masaomi, Nakamura Motonobu	4. 巻 298
2. 論文標題 Oxidized alkyl phospholipids stimulate sodium transport in proximal tubules via a nongenomic PPAR -dependent pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101681 ~ 101681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101681	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 Nakamura Motonobu
2. 発表標題 Combining MR blockers with SGLT2 inhibitors prevent MR blocker-induced hyperkalemia via regulation of TWIK1 and TASK2 in the proximal tubule
3. 学会等名 International Society of Nephrology (ISN) World Congress of Nephrology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakamura Motonobu
2. 発表標題 Resveratrol inhibits proximal tubular sodium reabsorption and suppresses the progression of renal injury
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	堀田 晶子 (Horita Shoko) (20534895)	帝京大学・医学部附属病院・講師 (32643)	
研究分担者	佐藤 信彦 (Satoh Nobuhiko) (80572552)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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
---------	---------