

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16180

研究課題名(和文)腎近位尿細管の糖新生におけるグルカゴンの役割

研究課題名(英文)Role of glucagon in renal proximal tubule glycogenesis

研究代表者

佐藤 信彦 (Sato, Nobuhiko)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80572552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎近位尿細管におけるグルカゴンの役割とSGLT2阻害薬の効果を研究した。ラットの単離近位尿細管を用いたex vivo実験では、グルカゴンによる直接的な作用が観察され、糖新生酵素mRNA(PEPCKとG6Pase)の発現増加を認めた。SGLT2阻害薬投与による反応性グルカゴン上昇と腎保護作用に注目し、アルドステロンがミネラルコルチコイド受容体を介して近位尿細管Na輸送に影響し、SGLT2阻害薬で抑制されることを見出した。また、糖尿病性腎症モデルラットでは、SGLT2阻害薬が高カリウム血症を抑制し、これにもTWIK1やTASK2が関与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎近位尿細管の糖新生のホルモン調節は、受容体の存在から病態生理学的意義に至るまで不明な点が多い。近位尿細管におけるin vivoのグルカゴン作用には肝臓で産生されるcAMPが関与するという説が有力であるが、ex vivoでの検証では直接的な作用が確認された。また、SGLT2阻害薬は慢性腎不全にも適応が拡大された革命的な治療薬であり、投与時のインスリン感受性や血糖値の変動とグルカゴンの関与も示唆されており、本研究はその作用機序を明らかにし、治療効果を向上させる手がかりを提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The role of glucagon in the renal proximal tubules and the effects of SGLT2 inhibitors were studied. In ex vivo experiments using isolated rat proximal tubules, direct effects of glucagon were observed, with increased expression of glycogenic enzyme mRNAs (PEPCK and G6Pase), focusing on the reactive glucagon elevation and renoprotective effects of SGLT2 inhibitor treatment, and the possibility that aldosterone may mineralocorticoid receptors, and that this effect is suppressed by SGLT2 inhibitors. In addition, in a rat model of diabetic nephropathy, SGLT2 inhibitors suppressed hyperkalemia, which also involved TWIK1 and TASK2.

研究分野：腎生理学

キーワード：近位尿細管 糖新生 ホルモン調節 インスリン グルカゴン SGLT2阻害薬 アルドステロン OXSR1

1. 研究開始当初の背景

近年、生体エネルギー代謝制御の観点から糖尿病の病態生理や治療が見直されており、肝臓に次ぐ糖産生臓器である腎近位尿細管 (PT) が注目され、その制御経路の解明は糖尿病治療の新たなターゲットとなる可能性を秘めている。本研究では、インクレチン関連薬と SGLT2 阻害薬が肝糖新生に対して相反する作用を示す臓器保護作用の背景に、PT 糖新生が関与しているという仮説に基づき、両薬剤に共通する因子であるグルカゴンによる PT 糖新生調節機構、および SGLT2 阻害薬と酸塩基平衡が PT 糖新生に及ぼす影響について検討した。申請者の専門分野である腎尿細管生理機能解析を用いて、両薬剤共通の因子であるグルカゴンによる PT 糖新生調節機構と、SGLT2 阻害薬および酸塩基平衡が PT 糖新生に及ぼす影響を解明する。

2. 研究の目的

インスリン分泌調節にとどまらない新たな作用機序を有する糖尿病治療薬の登場により、血糖のみならず生体エネルギー代謝の調節という広い視点から糖尿病の病態生理と治療が再考されている。本研究の目的は、インクレチン関連薬 (糖新生を抑制する) と SGLT2 阻害薬 (糖新生を亢進する) に共通する臓器保護作用の背後には、肝糖新生に対して相反する作用を示す PT 糖新生が関与しているという仮説に基づき、両薬に共通する因子であるグルカゴンによる PT 糖新生調節機構と、SGLT2 阻害薬および酸塩基平衡が PT 糖新生に及ぼす影響を検討することである。両薬剤に共通する因子であるグルカゴンによる PT 糖新生調節機構と、SGLT2 阻害薬および酸塩基平衡が PT 糖新生に及ぼす影響を、申請者の専門である腎尿細管生理機能解析を用いて解明する。

3. 研究の方法

(1) 正常近位尿細管 (PT) における糖新生に及ぼすグルカゴンの影響：正常近位尿細管の糖新生に及ぼすグルカゴンの影響を、単離近位尿細管を用いた *ex vivo* 系で解析する。ここでは、Wistar ラットの単離 PT を用いてグルカゴン作用の濃度依存性を検討し、qPCR による糖新生酵素 mRNA の定量、キットを用いた糖新生酵素活性および糖産生能の測定を行い、正常 PT の糖新生に対するグルカゴンの影響を解析する。

(2) グルカゴンによる PT 糖新生の制御経路：PKA および IP3R-1 阻害剤の存在下、および siRNA を用いて単離 PT における特定遺伝子の発現を抑制し、Wistar ラットおよびヒトの単離 PT における糖新生機能を IP3R-1、PKA 下流の CREB、および FOXO1 遺伝子ノックダウン存在下で解析し、グルカゴンによる PT 糖新生亢進のシグナル伝達経路を明らかにする。

(3) SGLT2i とアルドステロンに着目し、PT におけるナトリウムおよびカリウム輸送に対する影響を解析するため、新鮮な単離 PT を用い、BCECF-AM を用いて管腔 NHE 活性および基底側 NBCe1 活性を解析した DKD モデルラットは、片側腎摘出、高塩分食、浸透圧ポンプによる治療を行い、DKD ラットは SDT ラットにアルドステロン (Ald) を持続投与して得た。DKD ラットは組織学的解析のため、A) 無治療群 B) エサキシレノン (Esx) 群 C) Esx+ダパグリフロジン (DAPA) (Esx-DAPA) 群に無作為に割り付け、カリウムトランスポーター発現については SD ラットを対照群とした。

(4) PT におけるナトリウム輸送機能の調節因子であるインスリン、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) アゴニスト、アンジオテンシン (Ang) II 経路に共通する因子を解析するため、3) と同様の方法で、新鮮単離したヒトおよびラットの尿細管におけるケモファクターの mRNA 発現およびリン酸化を解析した。SGLT2i 投与中のナトリウム輸送機能、化学因子の mRNA 発現およびリン酸化を 3) と同様の方法で解析した。

4. 研究成果

単離されたラット近位尿細管を用いた *ex vivo* 実験系において、グルカゴン (1~100nM) が糖新生酵素 mRNA に及ぼす影響を測定した。その結果、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 発現が対照系に比べてそれぞれ 2~3 倍増加した。近位尿細管におけるグルカゴンの生体内作用には肝臓で産生される cAMP が関与しているという説とは対照的に、単離された尿細管を用いた生体外系では直接的な作用が観察された。

次に、病態生理学的観点から、SGLT2 阻害薬投与による反応性グルカゴン上昇と腎保護作用に注目した。SGLT2 阻害薬の効果を検討する過程で、グルカゴンと生理作用を共有するアルドステロンとミネラルコルチコイド受容体 (MR) と近位尿細管ナトリウム輸送を解析したと

ころ、アルドステロンはは NBCe1 と NHE3 の活性を有意に上昇させたが、これらの刺激作用は高アルドステロン薬であるエサキセロノンによって完全に抑制された。in vivo 実験では、糖尿病モデルラット (DKD ラット; 片側腎摘出、高塩分食、浸透圧ポンプを用いたアルドステロン持続投与により作成) は高アルブミン尿と高血圧を伴う腎機能障害を発症したが、エサキセロノンまたはエサキセロノン-ダパグリフロジン投与群ではこれらの病態の発症が有意に抑制された。組織学的評価では、DKD ラットは糸球体肥大と糸球体硬化を示したが、エサキセロノン投与群またはエサキセロノン-ダパグリフロジン投与群で有意に改善した。血清カリウム値はエサキセロノン投与群で対照群より高かったが、エサキセロノン-ダパグリフロジン投与群では有意差はなかった。タンパク質発現評価では、DKD ラットはそれぞれカリウムチャネルである TWIK1 および TASK2 の発現がコントロール群に比べて上昇したが、エサキセロノン投与群では TWIK1 の発現が低下し、TASK2 の発現が上昇し、エサキセロノン-ダパグリフロジン投与群では TWIK1 の発現が上昇し、TASK2 の発現が低下した。DKD ラットでは、TWIK1 および TASK2 の発現がコントロール群に比べてともに増加したが、エサキセロノン投与群では TWIK1 の発現が減少し TASK2 の発現が増加し、エサキセロノン-ダパグリフロジン投与群では TWIK1 の発現が増加し TASK2 の発現が減少した。以上を国際学会にて報告した (ISN 2024)。また、SGLT2 阻害薬が、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) を介して OXSR1 (酸化ストレス応答性キナーゼ 1) のリン酸化を阻害することにより、近位尿管 Na 輸送調節の中心的役割を阻害する可能性についても解析し、現在論文を作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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, 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 -
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 -

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 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Motonobu Nakamura, Nobuhiko Satoh, Tomohito Mizuno, Mayuko Takagi, Shoko Horita, Masaomi Nangaku
2. 発表標題 SGLT2 inhibitors prevent MR blocker-induced hyperkalemia via regulation of TWIK1 and TASK2 in the proximal tubule
3. 学会等名 World Congress of Nephrology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 中村 元信(東京大学医学部附属病院), 水野 智仁, 佐藤 信彦, 堀田 晶子, 南学 正臣
2. 発表標題 SGLT2阻害剤は、ミネラルコルチコイド受容体を介した近位尿細管ナトリウム輸送活性を抑制する
3. 学会等名 日本腎臓学会誌(0385-2385)63巻4号 Page427(2021.06)
4. 発表年 2021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
---------	---------