

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790798  
 研究課題名（和文） ペルオキシソーム増殖因子受容体の迅速シグナル伝達系を介した心腎相関作用の意義  
 研究課題名（英文） The significance of cardio-renal interaction via the rapid signal transduction system of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
 研究代表者  
 堀田 晶子（HORITA SHOKO）  
 東京大学・医学部附属病院・特任助教  
 研究者番号：20534895

## 研究成果の概要（和文）：

経口糖尿病薬チアゾリジン誘導体の副作用として浮腫や心不全が発生する機序について、培養細胞やマウス、ラットなどの腎臓を用いた生理実験や関連蛋白の解析等を行い、チアゾリジン誘導体の作用で、PPAR $\gamma$ が遺伝子転写調節によらない迅速な細胞情報伝達系を介して、腎臓の近位尿細管におけるナトリウム再吸収を亢進させることを明らかにした。チアゾリジン誘導体による浮腫・心不全発症の予防や、浮腫を起こさない新しい糖尿病薬の開発につながることを期待される。(Cell Metabolism 13(5), pp.550-561, 2011に掲載)

## 研究成果の概要（英文）：

Thiazolidinediones (TZDs), the medical drug used for the treatment of diabetes, have the side-effects of edema and congestive heart failure. We have investigated the mechanism of this side-effect by physiological studies and assays of proteins with culture cells and the kidneys of rats and mice. We found that TZDs enhance sodium reabsorption from renal proximal tubules via rapid signal transduction system, independently of transcription system. This may lead to develop new drugs for diabetes that do not have such side effects. (Cell Metabolism 13(5), pp.550-561, 2011)

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：水・電解質代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソーム増殖因子受容体（PPAR $\gamma$ ）は核内受容体スーパーファミリーに属し、脂肪細胞分化や糖・脂質代謝のホメオスタシスにおいて中心的な役割を果たしていると同時に、チアゾリン系薬剤の標的受容体でもある。チアゾリン系薬剤は強いインスリン抵抗性改善作用を有し、II型糖尿病の治療にお

いて主要な位置にあるが、体液貯留作用による浮腫や心不全という重篤な副作用があり、心・血管系機能障害を伴う糖尿病に対する治療の上で大きな足かせとなっていた。

これまで、腎集合管 PPAR $\gamma$  欠損マウスを用いた検討により、PPAR $\gamma$  の転写活性調節作用を介した上皮性ナトリウムチャンネル（ENaC）の発現増強がチアゾリン系薬剤によ

る体液貯留の主たる原因であるとする説が提唱されていた。しかしチアゾリンによる体液貯留は ENaC 選択的阻害薬であるアミロライドによってマウスでは確かに抑制されるものの、ラットにおいては全く抑制されないことが報告されており、申請者らはマウス以外の種ではチアゾリン系薬剤による体液貯留に ENaC 活性化以外の機序も関連しているのではないか、という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

申請者らはチアゾリン系薬剤が PPAR $\gamma$  の転写調節機能に依存しない non-genomic 作用を介して ERK 経路をごく短時間に活性化し、近位尿細管再吸収を亢進させるとともに、Na/H 交換輸送体 NHE1 活性を増強させることを確認した。本研究の目的はこうした PPAR $\gamma$  の迅速シグナル伝達系を介した心腎機能調節作用の意義を明らかにすることである。

これまでは、PPAR $\gamma$  の転写活性調節作用を介した遠位尿細管での上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) の発現増強がチアゾリン系薬剤による体液貯留の主たる原因であるとする説が提唱されていた。しかし種々の検討の結果、PPAR $\gamma$  の腎・心血管作用には ENaC 活性の増強につながる古典的な転写活性調節作用と、それとは独立して働く ERK 経路活性化につながる non-genomic 作用が混在していると考えられた。

チアゾリンが ENaC 活性化と異なる機序を介して集合管と近位尿細管再吸収を亢進させれば、その効果は相乗的に働くことが予想され、チアゾリン投与に伴い時に観察される著明な浮腫をうまく説明することができる。一方、NHE1 活性の亢進は細胞内 Na $\cdot$ Ca 濃度変化などを介して虚血による心筋障害を増悪させることもよく知られている。本研究はこうした知見を背景とし、特に PPAR $\gamma$  の non-genomic 作用を介した心腎相関作用の意義を明らかにするために立案された。

## 3. 研究の方法

1. 「PPAR $\gamma$  を介した non-genomic シグナルにおける Src の意義についての検討」

PPAR $\gamma$  を介した non-genomic シグナルにおける Src の役割を明らかにするために、Yes/Fyn/c-Src 欠損マウスより樹立した胎児線維芽細胞 (SYF $^{-/-}$ ) および c-Src 発現のみ回復させた細胞 (YF $^{-/-}$ ) を用いて、チアゾリンによる ERK 活性化、および NHE1 活性化の度合いを比較検討する。YF $^{-/-}$  細胞においては dominant negative 変異を組みこんだ PPAR $\gamma$  を導入し、non-genomic シグナルに対する影響を明らかにする。

2. 「チアゾリンの genomic 作用と non-genomic 作用の相乗効果の検討」

チアゾリンの genomic 作用と non-genomic 作

用の in vitro での相乗効果を検証するために、ラットに慢性的にチアゾリンまたは vehicle を投与した後、近位尿細管を単離する。細胞内 pH 変化から Na-HCO $_3$  共輸送体 (NBC1) 活性を同定し、チアゾリンの近位尿細管輸送機能に対する急性の増強作用が、チアゾリン慢性投与によってどのように変化するか評価する。チアゾリンの腎内 PPAR $\gamma$  発現に対する影響についても免疫染色法ならびに Western blot 法を組み合わせることで総合的に評価する。

チアゾリンの genomic 作用と non-genomic 作用の in vivo での相乗効果を検証するために、ラットに慢性的にチアゾリンまたは vehicle を投与した後、無麻酔下にてクリアランス実験を行い、チアゾリンによる急性の近位尿細管再吸収亢進作用に与える影響を検証する。チアゾリンによる尿量減少・体液貯留効果が近位尿細管輸送の変化を反映していることを確かめるために、食餌に少量の LiCl を混ぜ、FELi も合わせて算出する。さらに近位尿細管再吸収阻害剤である Acetazolamide を用いた実験も行い、対照とする。一方、腎血行動態の変化の有無については血圧測定、糸球体濾過量、腎血流量測定などにより総合的に判断する。

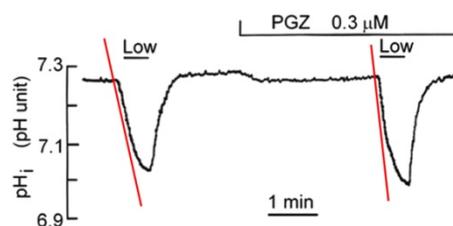
## 4. 研究成果

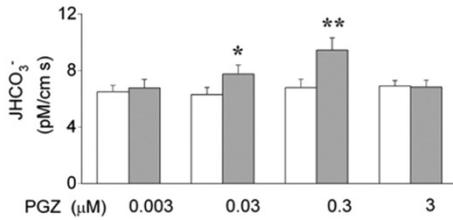
### A. 「TZD の近位尿細管輸送亢進作用と種特異性」

単離したウサギ近位尿細管を用いた in vitro 実験系で、細胞内 pH 測定および stop-flow 法による重炭酸吸収量の測定を行った。生理的濃度 (0.03-0.3 $\mu$ M) の TZD は数分以内に管腔側の Na/H 交換輸送体 NHE3 および基底側の Na-HCO $_3$  共輸送体 NBCe1 を活性化させることにより、Na-HCO $_3$  再吸収量を著明に増加させた (図 1, 図 2)。阻害剤による抑制効果の検討や腎皮質の Western blot 解析などにより、この TZD の輸送刺激作用は PPAR $\gamma$ , EGFR, MEK/ERK に依存することが示された。また免疫組織染色法による解析によって、ウサギ近位尿細管における PPAR $\gamma$  蛋白の発現を確認した。

図 1

図 2





次に TZD の近位尿細管作用における種特異性の有無を検討した。ラットとヒト近位尿細管は PPAR $\gamma$  蛋白を発現しており (図 3, 4)、TZD により NBCe1 活性は著明に亢進した。一方、マウス近位尿細管は PPAR $\gamma$  蛋白を発現していたが、TZD には全く反応しなかった (図 5)。その原因を調べてみると、マウス近位尿細管における Src/EGFR 経路の恒常的活性化が PPAR $\gamma$  シグナルを阻害することが判明した (図 6)。以上より TZD は今まで知られていない機序を介して近位尿細管輸送を亢進させること、およびこの作用には種特異性があることが示された。

図 3 : 腎皮質の PPAR $\gamma$  発現

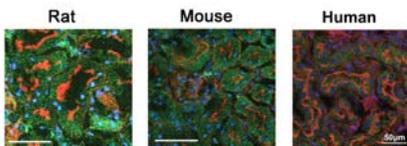


図 4 :

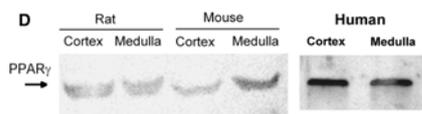


図 5 : TZD による NBCe1 活性化の種差

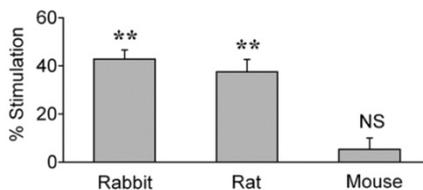
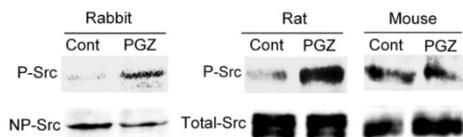


図 6 : マウスの Src/EGFR 経路の恒常的活性化

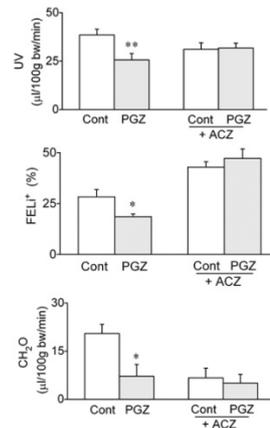


化

### B. 「TZD の in vivo の急性効果」

TZD の近位尿細管作用が体液量に与える影響を検討するため、水利尿を起こさせたラットに TZD (10 mg/kg) を投与した後 90 分間のクリアランス実験を施行したところ、糸球体濾過量や血圧の変化を伴わずに、尿量、リチウム排泄率 (FELi)、自由水クリアランス (CH<sub>2</sub>O) が有意に低下した (図 7)。これらの変化は炭酸脱水酵素阻害剤 (Acetazolamide) の投与により抑制されたため、近位尿細管再吸収量の増加を反映していると考えられた。免疫組織染色法や Western blot 法による解析にて、TZD の in vivo 投与によりラット腎近位尿細管の ERK がリン酸化されることが確認された。一方、マウスでは単離尿細管を用いた in vitro 実験と同様に、TZD の in vivo 投与によっても近位尿細管再吸収量は変化しなかった。

図 7



### C. 「マウス胎児線維芽細胞における PPAR $\gamma$ 依存性の NHE1 活性化機構」

PPAR $\gamma$  依存性の nongenomic シグナリングの性質をさらに調べるために、PPAR $\gamma$  欠損マウス由来で唯一の生存細胞である胎児線維芽 (EF) 細胞を用いた解析を行った。まず細胞内アシドーシスを介した ERK 活性化により、PPAR $\gamma$  欠損 EF 細胞でも野生型細胞と同程度に NHE1 活性が亢進することを確認した。一方、生理的濃度の TZD (0.3 μM) は野生型 EF 細胞において数分以内に NHE1 活性化と ERK リン酸化を生じたが、PPAR $\gamma$  欠損 EF 細胞ではこれらの TZD 作用は認めなかった (図 8)。また野生型 EF 細胞の TZD による NHE1 活性化は転写阻害剤では阻害されないが、PPAR $\gamma$ 、EGFR、MEK の阻害剤で抑制されるため、近位尿細管と同様の nongenomic シグナリングを介していると考えられた。

次に、アデノウイルスベクターを用いて PPAR $\gamma$  欠損 EF 細胞に PPAR $\gamma$  全長コンストラ

クト (図9) を発現させたところ、TZD による NHE1 活性化と ERK リン酸化反応が回復した。さらに DNA 結合ドメインを削除した PPAR $\gamma$  リガンド結合ドメインのみを PPAR $\gamma$  欠損 EF 細胞に発現させたところ、やはり TZD による NHE1 活性化と ERK リン酸化反応が回復した。しかしこの回復現象はリガンド結合を阻害する Q284P 変異を挿入したリガンド結合ドメインでは生じなかった (図10)。一方、PPAR $\gamma$  欠損 EF 細胞の脂肪分化反応は PPAR $\gamma$  全長コンストラクトによって回復したが、リガンド結合ドメインのみでは回復しなかった。以上の結果から、PPAR $\gamma$  の nongenomic シグナリングはリガンド結合能には依存するが、遺伝子転写調節能には依存しないことが示された。

図8 : WTと PPAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> EFcellにおけるNHE1 活性の比較

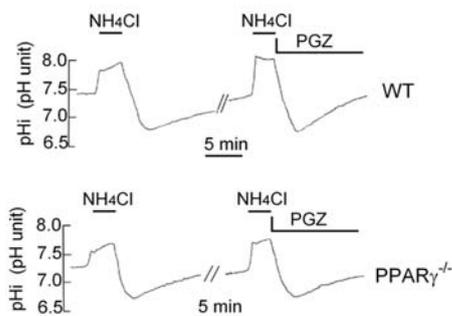


図9

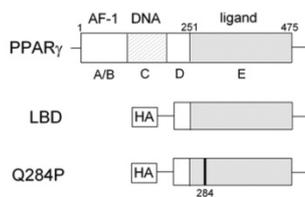
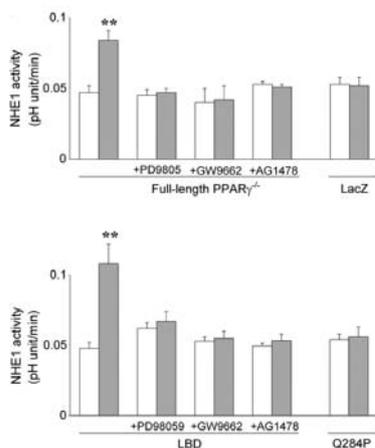


図10



#### D. 「PPAR $\gamma$ 依存性 nongenomic シグナリングにおける Src の役割」

最後に TZD の nongenomic シグナリングにおける Src の役割を検討した。TZD による NHE1 活性化および ERK リン酸化反応は Src を発現する EF 細胞では確認されたが、Src 欠損 EF 細胞では認めなかった (図11)。また免疫沈降実験にて Src と PPAR $\gamma$  が共沈し、TZD がこの結合を増強することが確認された (図12)。PPAR $\gamma$  リガンド結合ドメインを用いても同様の現象を認めたが、Q284P 変異を持つコンストラクトでは認めなかった (図13)。以上より、TZD の nongenomic シグナリングは Src に依存することが確認された。またこのシグナルには TZD による Src と PPAR $\gamma$  の結合増強も関与することが示唆された。

図11

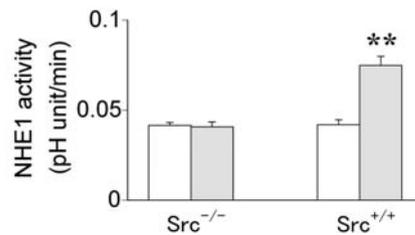


図12

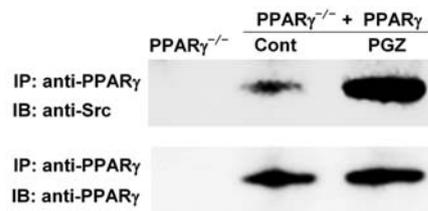
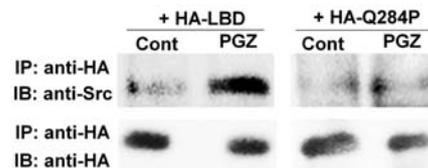


図13



#### E. 「まとめと展望」

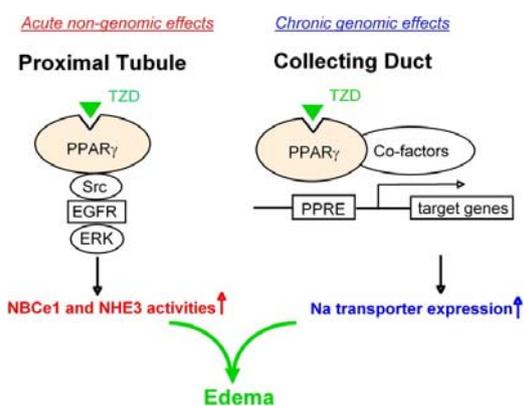
本研究は核内受容体 PPAR $\gamma$  が遺伝子転写調節を介さない nongenomic シグナリングを介して Src-EGFR-ERK 経路を活性化すること、および TZD がこの経路を介して近位尿細管再吸収を著明に増加させることを示した。TZD による浮腫は単一利尿剤による治療に対して抵抗性を示すことが知られている。図14に示すように、TZD による浮腫には PPAR $\gamma$  の遺伝子転写調節作用を介した遠位尿細管 Na

輸送体の発現増強と、PPAR $\gamma$ の nongenomic 作用を介した近位尿細管 Na 再吸収亢進の両方が関与すると考えられた。

TZD は浮腫を生じるだけでなく、心血管系リスクを増大させるのでは、とも懸念されている。核内受容体であるエストロゲン受容体では、リガンド結合様式の微調整によって遺伝子転写調節作用と nongenomic 作用の分離が可能であるとされている。選択的 PPAR $\gamma$  modulator も既に開発されているが、これらの導入が浮腫や心血管系副作用の軽減につながるかどうか、今後の重要な検討課題である。

本研究の成果は「Cell Metabolism 13(5), pp. 550-561, 2011」に掲載された。

図 1 4



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Endo Y, Horita S, Seki G, et al.: Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR $\gamma$ -dependent non-genomic signaling. Cell Metabolism 13(5), pp. 550-561, 2011 査読: 有

2. Horita S, Seki G, et al.: Insulin resistance, obesity, hypertension and renal sodium transport. Int J Hypertension Volume 2011 査読: 有

3. Lo YF, Seki G, Horita S, et al.: Severe metabolic acidosis causes early lethality in NBC1 W516X knock-in mice as a model of human isolated proximal renal tubular acidosis. Kidney International (2011) 79, 730-741. 査読: 有

4. Yamazaki O, Horita S, Seki G, et al.: Functional characterization of

nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBCe1A. Pfluegers Arch. 2011 461(2):249-59 査読: 有

5. Yamada H, Horita S, Seki G, et al.: Functional role of a putative carbonic anhydrase II-binding domain in the electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBCe1 expressed in Xenopus oocytes. Channels (Austin). 2011;5(2):106-9. 査読: 有

6. Suzuki M, Horita S, Seki G, et al.: Defective membrane expression of the Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. Proc Nat Acad Sci 107(36), pp. 15963-15968, 2010. 査読: 有

[学会発表] (計 10 件)

1. Shirai A, Horita S, Seki G, et al. oles of NO/sGC/cGMP/PKG Pathway in the Regulation of NBCe1 Activity by Angiotensin II. ASN Renal Week 2010 (2010 年 11 月, 米国デンバー)

2. Suzuki M, Seki G, Horita S, et al. Defective Membrane Expression of Na-HCO3 Cotransporter NBCe1 Is Associated with Migraine. ASN Renal Week 2010 (2010 年 11 月, 米国デンバー)

3. Yamazaki O, Horita S, Seki G, et al. Functional Analysis of SNP Mutations Leading to Single Amino Acid Substitution in NBCe1. ASN Renal Week 2010 (2010 年 11 月, 米国デンバー)

4. 堀田晶子, 関常司, 他: インスリンの近位尿細管作用に対するTNF $\alpha$ の影響。日本腎臓学会第 53 回学術総会, 2010 年 6 月, 神戸

5. 山崎修, 堀田晶子, 関常司, 他: NBC1 の SNP 変異 K558R は機能低下型変異である。日本腎臓学会第 53 回学術総会, 2010 年 6 月, 神戸

6. 白井雅弓, 堀田晶子, 関常司, 他: アンジオテンシン II はヒト近位尿細管 NBC1 活性を濃度依存的に亢進させる。日本腎臓学会第 53 回学術総会, 2010 年 6 月, 神戸

7. 山崎修, 堀田晶子, 関常司, 他: NBC1 W516X ノックインマウスによる NBC1 生理的機能の解析。日本腎臓学会第 53 回学術総会, 2010 年 6 月, 神戸

8. 関常司, 堀田晶子, 他: 近位尿細管性アシドーシス研究の現状と課題。第44回日本小児腎臓学会学術集会, 2009年6月, 東京

9. 山崎修, 堀田晶子, 関常司, 他: Na-HCO<sub>3</sub>共輸送体(NBC1)のSNP変異体の機能解析。日本腎臓学会第52回学術総会, 2009年6月, 横浜

10. 鈴木正志, 堀田晶子, 関常司, 他: NBC1 65del変異体はERに留まり dominant negative作用を有する。日本腎臓学会第52回学術総会, 2009年6月, 横浜

[図書] (計2件)

1. 堀田晶子, 関常司: 腎と透析増刊号 CKDにおいて使われる薬剤: 利尿剤 東京医学社, 2010年

2. 堀田晶子, 関常司, 他 改訂第7版内科学書(近位尿細管機能異常) 中山書店, 2009年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀田 晶子 (HORITA SHOKO)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号: 20534895

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: