

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08671

研究課題名(和文) 近位尿細管ナトリウム輸送と鉱質コルチコイドシグナルにおけるSGLT2の意義

研究課題名(英文) The significance of SGLT2 on the sodium transport and mineral corticoid signaling in the proximal tubule

研究代表者

堀田 晶子 (Horita, Shoko)

東京大学・医学部附属病院・届出診療員

研究者番号：20534895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では近年脚光を浴びるSGLT2阻害薬とミネラルコルチコイド受容体拮抗薬が近位尿細管のNa輸送体NHE3およびNBCe1の輸送活性の調節にどのように関与するかを解析した。アルドステロン腎障害モデルラットにおいて近位尿細管のNa輸送活性が亢進すること、および通常ラットにおいてSGLT2阻害薬がアルドステロンによるNa輸送活性亢進を抑制することが確認された。また、近位尿細管での体液貯留機序において重要なPPAR の内因性シグナルについて解析し、酸化LDL代謝産物azPCが関与することを認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、日本および世界、特に先進国や一部発展途上国において健康上の重要な脅威となる高血圧および慢性腎臓病の発症・進展機序の解明につながることを期待される。また、現在脚光を浴びる一部の治療薬の作用機序の解明につながる発見がなされたことにより、今後の治療薬の開発、疾患治療において重要なポイントを明らかにしたことは、今後の高血圧、慢性腎臓病の発症・進展の予防、さらにはこれらの疾患のend stageとしての心血管イベントや腎臓絶といった生命予後に関わる病態の予防にもつながるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed how SGLT2 inhibitors and mineralocorticoid receptor antagonists, which have recently been in the spotlight, are involved in the regulation of the transport activity of the proximal tubular Na transporters NHE3 and NBCe1. We found that Na transport activity in the proximal tubule is enhanced in a rat model of aldosterone-induced renal injury, and that SGLT2 inhibitors suppress aldosterone-induced enhancement of Na transport activity in normal rats. We also analyzed endogenous PPAR signaling, which is important in the mechanism of fluid retention in the proximal tubule, and found that the oxidized LDL metabolite azPC is involved.

研究分野：腎臓生理学

キーワード：SGLT2 ミネラルコルチコイド 近位尿細管 ナトリウム輸送 高血圧 糖尿病 慢性腎臓病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

SGLT2 阻害剤は大規模臨床試験の結果により、今までの血糖降下剤にない心血管リスク低下、腎保護作用、降圧作用などに注目されているが、その詳細な効果発現機序は明らかでない。近位尿細管(PT)の Na 輸送は管腔側の Na-H 交換輸送体(NHE3)、基底側の Na-HCO₃ 共輸送体(NBCe1)が協調的に調節されていることが知られており、申請者の所属する研究室においては、最近インスリン/IRS2 による PTNa 再吸収亢進がインスリン抵抗性に伴う高血圧発症の一因であること(引用文献)、さらに WNK1/OSR1 系路がインスリン、アンジオテンシン II、チアゾリジン系糖尿病薬等異なるメディエータによる PT での Na 輸送亢進シグナルを収斂するマスターレギュレーターとして働く事を明らかにした(Biochem Biophys Res Commun. 2015;461:154, KidneyInt. 2015;87:535, アメリカ腎臓学会 ASN kidney week 2018:口演 FR-OR064)。

一方、SGLT2 サブユニット MAP17 が同定され(JASN.2017;28:85)、さらにはミネラルコルチコイド受容体(MR)を介した血圧上昇反応に SGLT2 が関与する可能性が報告された(JCIInsight.2018;3:e95107)。

関連する国内外の研究動向として、SGLT2 阻害剤の腎保護作用についてはいくつかの仮説が提唱されていた。Tanaka らは SGLT2 阻害が糖代謝の改善を介して酸化ストレスを抑制する事(KidneyInt.2018;doi:10.1016/j.kint.2018.04.025)、また Umino らは GLUT2 を介する糖センサーが SGLT2 発現を調節すること(SciRep.2018;8:6791)、一方、Zhang らは CKD では GLUT2 発現が低下しており、SGLT2 阻害は PT 細胞内糖濃度の変化を介して VEFF-A 発現を増強させることなどを提唱した(KidneyInt.2018;94:524)。しかし、SGLT2 阻害剤の降圧作用については利尿作用、体重減、腎臓のリモデリング、動脈硬化の改善等がその機序として想定されているが、仮説の域を出ていなかった(JAmSocHypertens.2015;9:48)。こうした SGLT2 研究の進展を阻んできた理由の一つが、SGLT1 とは異なり SGLT2 単独発現系ではその輸送活性が極めて低い事であったが、最近 SGLT2 の C 末端 PDZ ドメインに scaffold 蛋白である MAP17 が結合し、最大活性化させることが示され(JASN.2017;28:85)、これまで困難であった SGLT2 機能解析が一気に進む事が期待された。実際申請者らもアフリカツメカエル発現系を用いた予備解析で、SGLT2 単独では検出限度以下であった輸送活性(糖依存性電流)が、MAP17 との共発現によって SGLT1 活性と同等まで著明に増大する事を確認した。さらに、MAP17 は NHE3 調節因子である PDZK1 との結合などを介して NHE3 だけでなく NBCe1 など他の Na 輸送体との相互作用を発揮する可能性も考えられていた(AJPRenalPhysiol.2003;285:F784)。

これらの知見に基づき、本研究は高血圧発症や腎障害進行における PT での MR シグナル、WNK1/OSR1 系路、SGLT2 の意義を明らかにするために立案された。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は、SGLT2/MAP17 輸送活性の調節機構の解明と、SGLT2 と NHE3/NBCe1 など他の PT における Na 輸送体との相互作用の有無の解析を介して SGLT2 阻害による降圧機序を明らかにすること、また MR シグナルの PT における Na 輸送調節メカニズムや酸化ストレスを介した腎障害促進作用について、インスリンシグナル、SGLT2 ならびに WNK1/OSR1 系路の役割に注目して解析することにより、PT での MR シグナルの生理的・病的意義を明らかにすることである(図 1)。

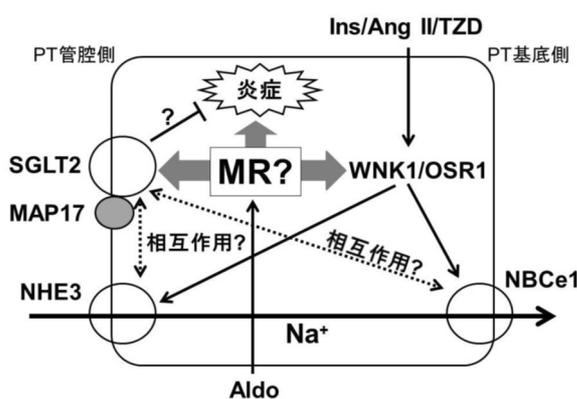


図 1

さらに、PT においては、我々は以前、経口血糖降下薬ピオグリタゾンによる体液貯留が、核内受容体 PPAR の ERK 依存性 non-genomic 経路を介して PT での Na 再吸収を亢進させる事を報告した(Cell Metab2011 ; 13 : 550)。しかし、一方で PPAR の内因性リガンドによる Na 再吸収への影響については不明な点も多い。そのため、PPAR の内因性アゴニストである酸化 LDL 代謝産物 azPC(1-0-hexadecyl-2-azelaoyl-snglycerol-3-phosphocholine)の PT における Na 輸送作用調節について検討した。

3. 研究の方法

腎障害モデルラットの作成：アルドステロン(Ald)による腎障害モデルラットを、6週齢のWistarラットの片腎摘を行い、その後、Aldを2週間持続投与することにより、作成した。

単離PTによる生理実験：Wistarラットもしくは同意を得て腎癌摘出術にて得られたヒト腎の健常部分において、PTを顕微鏡下で単離した。PTのNa輸送活性測定には、管腔側を露出させたPTにおいて管腔側のNa-H⁺交換輸送体(NHE)3活性を、および管腔側を虚脱させたPTにおいて基底側Na/HCO₃共輸送体(NBCe1)活性を、それぞれ測定した。測定にはMetaFluor™を用い、細胞内pHを蛍光色素(BCECF)を用いて測定した。灌流液中のNaや重炭酸濃度を变化させる事により管腔側Na/H交換輸送体(NHE3)と基底側Na/HCO₃共輸送体(NBCe1)の活性を同定した。

ヒト腎癌症例検体の健常部分より採取した単離PTの管腔側を露出ないし虚脱させ、蛍光色素(BCECF)を用いて細胞内pHを測定した。灌流液中のNaや重炭酸濃度を变化させる事により管腔側Na/H交換輸送体(NHE)と基底側Na/HCO₃共輸送体(NBCe1)活性を同定した。

リン酸化解析：キナーゼリン酸化の解析は腎皮質のWestern blottingにより実施した。

4. 研究成果

近位尿細管ナトリウム輸送と鉍質コルチコイドシグナルにおけるSGLT2の意義について

アルドステロン(Ald)による腎障害モデルラットにおいて腎機能を検索したところ、Ald非投与群では血清クレアチニンの上昇は認められなかったが、Ald投与群では有意な血清クレアチニンの上昇を認めた。また、Aldの添加により近位尿細管ナトリウム輸送活性が亢進することも見出した。

また、Aldが鉍質コルチコイド受容体(MR)を介して近位尿細管(PT)のNa輸送活性に及ぼす作用に、Na-Glucose共輸送体(SGLT)2阻害薬およびMR拮抗薬(MRA)が及ぼす影響について、Wistarラットの単離PTを用いて解析を行った。

SGLT2阻害薬を添加した培養液で処理した単離PTではNHEの基礎活性に変化はなかった。Aldは、PTのNHE3輸送活性を約40%亢進させ、この活性亢進作用は拮抗薬によりほぼ完全に抑制された(p<0.01)。一方で、SGLT2阻害薬を添加培養した単離PTでは、AldによるNHE3輸送活性亢進作用、インスリンによるNHE3輸送活性亢進作用とも有意に抑制されていた(いずれもp<0.01)。

以上から、AldがMRを介してPTでのNHE3輸送活性を亢進させることが認められた。また、SGLT2阻害剤は、AldのMRを介したNHE3輸送活性更新作用を抑制することが示唆された。

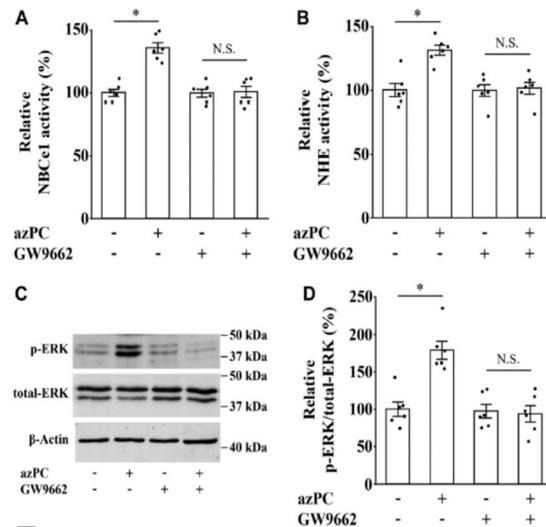


図2

酸化LDL代謝産物azPCの腎近位尿細管におけるNa輸送作用への影響について

Wistarラットおよびヒトの単離近位尿細管において、azPC(0.3μM)添加はNBCe1およびNHE3活性をともに約30%亢進させた。この活性亢進作用は、MEK阻害剤(PD98059)とPPAR選択的阻害剤(GW9662)、CD36阻害剤sulfosuccinimidyl oleate(SSO)によりほぼ完全に抑制された。

続いて、ラットおよびヒト腎皮質の抽出蛋白においてWestern blottingを行ったところ、azPCはERKリン酸化を誘導したが、PD98059、GW9662およびSSOはこのリン酸化誘導を完全に抑制した(図2)。

さらに、PPARの発現をsiRNAにて抑制したところ、azPCによるNBCe1、NHE3の活性亢進作用はほぼ完全に消失した

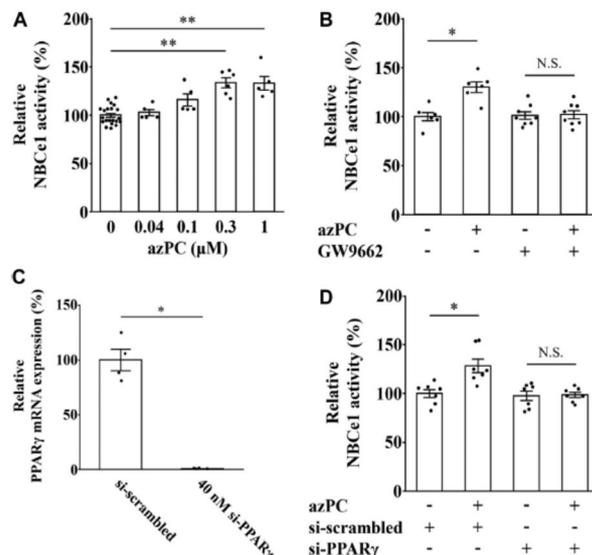


図3

(図 3)

これらの結果から、ラットおよびヒトにおいて、azPC が PPAR /ERK 経路を介して PT での Na 輸送を亢進させることが示され、動脈硬化を惹起・促進する物質と考えられている酸化 LDL 代謝産物による PT での Na 輸送亢進作用が、動脈硬化に伴う高血圧の一因である可能性が示唆された (図 4)

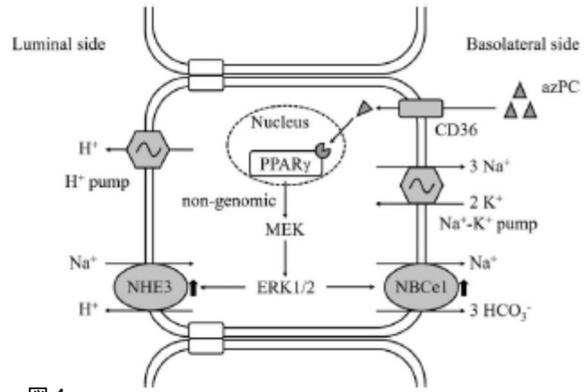


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizuno T, Satoh N, Horita S, Tsukada H, Takagi M, Sato Y, Kume H, Nangaku M, Nakamura M.	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 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 101681-101691
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 M, Tsukada H, Seki G, Satoh N, Mizuno T, Fujii W, Horita S, Moriya K, Sato Y, Kume H, Nangaku M, Suzuki M.	4. 巻 97(2)
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 Int.	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 -

1. 著者名 Yasukawa M, Kitagawa S, Togashi R, Asakawa S, Nagura M, Arai S, Yamazaki O, Tamura Y, Kondo F, Ohashi R, Uchida S, Shibata S, Fujigaki Y.	4. 巻 58(14)
2. 論文標題 A Patient with MPO-ANCA-positive IgA Nephropathy Diagnosed with the Clinical Onset of Macrohematuria.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 2051-2056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.2475-18.	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 Ouchi H, Nishi H, Nakamura M, Hirakawa Y, Tanaka T, Takeda N, Akai T, Ohashi Y, Hoshina K, Takayama T, Nangaku M.	4. 巻 4(11)
2. 論文標題 Vascular Ehlers-Danlos Syndrome Diagnosed in a Patient Initiating Hemodialysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney Int Rep.	6. 最初と最後の頁 1646-1648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ekir.2019.07.020.	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 堀田 晶子	4. 巻 4979
2. 論文標題 治療法の再整理とアップデートのために 専門家による私の治療 尿管性アシドーシス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 51-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 水野 智仁, 中村 元信, 藤井 航, 塚田 弘之, 佐藤 信彦, 佐藤 悠佑, 堀田 晶子, 久米 春喜, 南学 正臣, 鈴木 正志
2. 発表標題 酸化LDL代謝産物azPCはヒト腎近位尿管においてもNa輸送作用を亢進させる
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚田 弘之, 中村 元信, 藤井 航, 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 副甲状腺ホルモンの生体内投与による腎糖新生亢進作用
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizuno T, Nakamura M, Satoh N, Tsukada H, Sato Y, Horita S, Kume H, Suzuki M, Nangaku M
2. 発表標題 Oxidized Alkyl Phospholipids Stimulate Proximal Tubule Sodium Transport via PPAR /ERK Pathway
3. 学会等名 ASN kidney week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

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

1. 発表者名 水野 智仁, 中村 元信, 塚田 弘之, 佐藤 信彦, 堀田 晶子, 南学 正臣, 鈴木 正志
2. 発表標題 酸化LDL代謝産物azPCはPPAR /ERKを介し近位尿細管NA輸送を亢進させる
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukada H, Nakamura M, Horita S, Fujii W, Mizuno T, Satoh N, Sato Y, Seki G, Kume H, Nangaku M, Suzuki M
2. 発表標題 Parathyroid Hormone Enhances Gluconeogenesis via the PKC/FoxO1 Pathway in Proximal Tubules
3. 学会等名 ASN Kidney week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura M, Satoh N, Tsukada H, Mizuno T, Fujii W, Horita S, Nangaku M, Suzuki M
2. 発表標題 Insulin Stimulates V-ATPase on Renal Proximal Tubules via the Akt/mTORC2 Pathway
3. 学会等名 ASN Kidney week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai K, Yamazaki O, Ishizawa K, Nemoto Y, Fujigaki Y, Shibata S
2. 発表標題 Role of Vasopressin V2 Receptor Signaling in NKCC2 Regulation in Diabetes Mellitus
3. 学会等名 ASN Kidney week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Omizo H, Tamura Y, Yamazaki O, Uchida S, Fujigaki Y, Shibata, S
2. 発表標題 Cardio-Renal Protective Effect of the Xanthine Oxidase Inhibitor Febuxostat in the 5/6 Nephrectomy Model with Hyperuricemia
3. 学会等名 ASN Kidney week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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	中村 元信 (Nakaura Motonobu) (40459524)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	佐藤 信彦 (Satoh Nobuhiko) (80572552)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	山崎 修 (yamazaki Osamu) (80757229)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 正志 (Suzuki Masashi) (90595662)	東京学芸大学・保健管理センター・教授 (12604)	

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