

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22643

研究課題名(和文)オートファジー制御分子による核内受容体の新規調節メカニズムの全容解明

研究課題名(英文) Regulation of nuclear receptor through autophagy-related proteins and other mechanisms

研究代表者

柴田 茂 (Shibata, Shigeru)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60508068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体は多面的な働きを有しており、その作用は状況依存的に調節されている。この研究では体液量と組成の維持に中心的な役割を果たすMRの作用の解明を目指し研究を行った。基礎的検討からCl/HCO<sub>3</sub>交換輸送体pendrinがMRの働きを修飾することが明らかとなっており、尿検体を用いてpendrinの臨床的意義を検討した結果、二次性高血圧である原発性アルドステロン症の病態にpendrinが関与することが明らかになった。また腎尿細管に高発現するビタミンD受容体が25D<sub>3</sub>によっても活性化されうること、MR調節と類似の機構が他のステロイド受容体でも存在する可能性なども明らかとなりつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミネラルコルチコイド受容体(MR)は腎臓において食塩の再吸収とカリウム排泄のバランスを調節しており、体液のイオン組成や食事の変化に対応して尿細管の働きを柔軟に変化させている。これまでの基礎的・臨床的検討から、Cl/HCO<sub>3</sub>交換輸送体pendrinの変化がMRの電解質調節作用のスイッチングに関わるキーイベントの一つであることが示されており、食生活習慣と健康の密接な関わり、なかでも食塩による血圧上昇(食塩感受性高血圧)やカリウム摂取による心血管保護作用の分子基盤が明らかとなっている。またMRと同様に腎尿細管に高発現するビタミンD受容体の活性化機構について新知見が得られている。

研究成果の概要(英文)：MR modulates the activity of transporters and channels in the kidney, regulating fluid homeostasis. We previously reported that pendrin, a Cl/HCO<sub>3</sub> exchanger, plays a key role in determining the balance between salt reabsorption and potassium excretion, and also showed that dephosphorylation of MR at the ligand-binding domain by the inactivation of ULK1 through AngII signaling increases pendrin, maximizing salt reabsorption. Using extracellular vesicles (EVs) isolated from urine, we determined the clinical significance of primary aldosteronism (PA), a major form of secondary hypertension. Pendrin in urinary EVs was highly correlated with renal expression, and its abundance was significantly attenuated by therapeutic interventions in PA. As a mechanism that regulates vitamin D receptor (VDR), another nuclear receptor highly present in the renal distal nephron, we showed that 25D<sub>3</sub> can stimulate VDR target genes, uncovering an alternative regulation of VDR signaling in renal tubules.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体 pendrin 食塩感受性 ビタミンD受容体

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核内受容体ファミリーに属するミネラルコルチコイド受容体 (MR) は多面的な作用を有しており、そのシグナルは状況依存的かつ細胞選択的に調節されていると考えられる。申請者らは尿細管における MR の作用メカニズムについて解析を行い、リガンドと受容体との結合を制御するリン酸化サイトの存在を明らかにした[1]。さらに、MR のリン酸化を担う分子を同定すべく約 200 種類のキナーゼ・ライブラリーを用いたスクリーニングアッセイを行い、ULK1 (Unc51-like-kinase 1) が MR のキナーゼとして作用することを見出した[2]。当該機構はアンジオテンシン II シグナルにより制御され、下流分子として腎集合管間在細胞で Cl/HCO<sub>3</sub> 交換輸送体 pendrin の活性化を介して MR の電解質作用を修飾しているものと考えられる。本研究に関連した領域の研究状況としては、ULK1 が Beclin-1 などのオートファゴソームの形成に関わる分子のリン酸化修飾を担うほか、糖代謝を制御する hexokinase や、細胞内の trafficking に関わる SEC16A といった分子が ULK1 のターゲットであることが報告されており (Li et al. Mol Cell 2016; Joo et al. Mol Cell 2016)、ULK1 の non-canonical な役割が明らかとなっている。pendrin を発現する腎集合管間在細胞は腎構成細胞の中でもオートファジー活性が高いこと (Li et al. J Am Soc Nephrol 2014)、また MR とともに腎尿細管で体液調節を担うセリン・スレオニンキナーゼ With-No-Lysine が ULK1 の発現量を調節することなども報告されている (Gallolu Kankanamalage S et al. PNAS 2016)。他の核内受容体ファミリーにおいては、ビタミン D 受容体 (VDR) がオートファジーを制御する可能性が明らかにされており (Tavera-Mendoza et al. PNAS 2017)、腎臓において VDR は遠位ネフロンに高発現している。また Cl/HCO<sub>3</sub> 交換輸送体である pendrin の役割として、本分子が酸塩基平衡の維持に関与するほか、Cl の再吸収を介して体液量を増加させ、高血圧の病態に寄与する可能性が基礎的検討により示されている。一方で、ヒトにおける pendrin の臨床的意義については十分な解析がなされていない。

### 2. 研究の目的

上述したような背景に基づき、本研究では Cl/HCO<sub>3</sub> 交換輸送体 pendrin のヒトの病態への関与を明らかにすること、またセリン・スレオニンキナーゼ ULK1 やオートファジーシグナルに着目して核内受容体の制御機構を探索することを主目的として、以下に述べる検討を行った。

### 3. 研究の方法

(1) Cl/HCO<sub>3</sub> 輸送体 pendrin の臨床的意義を明らかにするため、尿中の細胞外小胞画分を用いた検討を行った。腎尿細管に発現する膜輸送体は細胞外小胞 (extracellular vesicles; EV) として尿中に分泌される。尿中の細胞外小胞の解析の妥当性を検証するため、動物疾患モデルを用いた検討を行うとともに、代表的な二次性高血圧である原発性アルドステロン症患者の尿より EV 分画を単離し、膜輸送体蛋白質の発現量と臨床パラメータとの関連を解析した。

(2) これまでの報告から、ULK1 が (M/L)xx(S/T) モチーフを有するセリン・スレオニンをリン酸化することが明らかにされている。そこで核内受容体ファミリーのリガンド結合領域より同モチーフに合致するアミノ酸配列をスクリーニングし、キナーゼアッセイによる解析を行った。

(3) ビタミン D 受容体 (VDR) は腎臓の遠位ネフロンにおいてカルシウムやリンなどの電解質調節に関わるが、その他にも細胞増殖やオートファジーを制御する可能性が指摘されている。VDR の作用には活性型ビタミン D (1,25D<sub>3</sub>) が中心的な役割を担うが、一方で 25(OH)D<sub>3</sub> (25D<sub>3</sub>) は 1,25D<sub>3</sub> よりも高濃度で安定的に存在している。そこで CRISPR-Cas9 を用いて 1 位水酸化酵素を欠損した Cyp27b1 ノックアウト mDCT 細胞を樹立し、VDR のシグナル活性化メカニズムを解析した。

### 4. 研究成果

(1) 尿中 EV 分画を用いた pendrin 発現変化と原発性アルドステロン症の病態との関連

原発性アルドステロン症モデルとしてラットにアルドステロンを持続投与し、腎臓膜蛋白分画および超遠心法にて単離した尿中 EV 分画 (uEV) を用いて両者の相関を検討した。電子顕微鏡での解析にて、本法で単離した uEV には 20~100 nm の vesicle が豊富に存在することが確認された。uEV サンプルを用いた Western blot 解析では、~120 kDa および ~240 kDa に pendrin のシグナルが検出され、immunogen を用いた peptide blocking assay にて両者ともに完全に消失したことから、uEV において pendrin が

dimer を形成することが明らかとなった。uEV 中の pendrin 発現は腎臓膜蛋白分画の発現と高度に相関しており ( $R^2 = 0.50$ )、uEV の解析の有効性が裏付けられた。

次に、原発性アルドステロン症患者の尿を用いた検討を行った。ラットモデルと同様に、この検討でも pendrin は dimer および monomer として検出され、治療前後の比較にて 49% の pendrin 発現低下が認められた。pendrin の減少率は治療前の ARR と正の相関があり、血清 K と逆相関する傾向があった。更に、未治療 PA における横断的検討では pendrin 発現量と ARR の間に有意な相関が確認された。本研究から、基礎研究で示されている pendrin の体液調節作用が原発性アルドステロン症の病態にも関連する可能性が示されている。

## (2) ULK1 に着目した核内受容体調節の解析

核内受容体の中でもステロイド受容体ファミリーに着目し、(M/L)xx(S/T)モチーフに合致するアミノ酸配列をスクリーニングしたところ、アンドロゲン受容体 (AR) およびプロゲステロン受容体 (PR) に MxxS モチーフが確認された (下図)。そこで AR-S779 に焦点をあて、AR-S779 を含むペプチド (KKDLVFNEYRMHKSRMYSQ) および標的領域をアラニンに置換したペプチド (AR-A779) を合成し、ADP-glo assay を用いて ULK1 および ULK2 によるリン酸化能を *in vitro* にて評価した。その結果、MR peptide と比較してシグナルは弱いものの、AR-S779 ペプチドでも ULK1 および ULK2 によるリン酸化シグナルが確認された。このシグナルは AR-A779 では ULK1 においては 98-99%、ULK2 においても 92-96% 減弱したことから、シグナルの特異性が確認された。

## (3) ビタミン D 受容体の制御機構の検討

ビタミン D 受容体 (VDR) の作用に中心的な役割を担う活性型ビタミン D (1,25D<sub>3</sub>) の産生には 1 位水酸化酵素が関与するが、同酵素が高発現するのは近位尿細管においてであり、遠位尿細管や集合管においては

	hMR (S843)	VFNEEKMHQ <b>S</b> AMYELCQGM
	hAR (S779)	VFNEYRMHK <b>S</b> RMYSQCVRM
	hPR (S792)	ILNEQRMK <b>S</b> SFYSLCLTM
	hBeclin1 (S15)	TSNNSTMQV <b>S</b> FVCQRCRCSQP
	hENO1 (S282)	PDQLADLYK <b>S</b> FIKDYPVVS
	hPFKM (S762)	AKYEIDLDT <b>S</b> DHAHLEHIT
	hSQSTM1 (S407)	LSQMLSMGF <b>S</b> DEGGWLTRL
	hSTING (S366)	MSQPELLIS <b>S</b> GMEIPLPLR
	hSyntenin1 (S6)	____MSLYPS <b>S</b> LEDLKVQDKV

1,25D<sub>3</sub> に加え、血中に安定的かつ高濃度で存在する 25(OH)D<sub>3</sub> (25D<sub>3</sub>) が VDR のリガンドとして作用することも想定される。そこで、遠位尿細管における 25D<sub>3</sub> の生理活性を評価するため、CRISPR-Cas9 法を用いて Cyp27b1 遺伝子を欠損した Cyp27b1 ノックアウト (KO) mDCT 細胞を樹立した。クローニングした 162 細胞中、ホモ変異が生じたのは 5 細胞であった。ホモ KO 細胞の KO-1 細胞と KO-2 細胞の 2 細胞で発現する変異型 Cyp27b1 は、いずれも塩基の挿入や欠損でアミノ酸コーディングにフレームシフトが生じ、N 末端側のみの短い CYP27B1 が翻訳されていた。これらを細胞に過剰発現させて 25D<sub>3</sub> を投与しても 1,25D<sub>3</sub> は全く合成されないことから、これら変異型 Cyp27b1 の 1 位水酸化活性は完全に失活したことが明らかとなった。25D<sub>3</sub> の濃度を変化させて KO-1 細胞に投与したところ、 $1.0 \times 10^{-7}$  M で VDR の核内移行がウェスタンブロットティングと免疫蛍光染色で観察され、ビタミン D の代表的な標的遺伝子である Cyp24a1 遺伝子の発現も誘導された。即ち、25D<sub>3</sub> は  $10^{-7}$  M に達すると VDR の核内移行と標的遺伝子の発現変動を引き起こすビタミン D 活性を発揮すると考えられた。同様の結果は KO-2 細胞でも得られた。

マイクロアレイ解析で 1,25D<sub>3</sub> と 25D<sub>3</sub> の網羅的な標的遺伝子を解析したところ、両標的遺伝子群には類似性が認められた。さらに、カルシウム再吸収に関連する遺伝子群に着目したところ、Calbindin-D9k と Megalin を同定した。さらに ChIP 法とルシフェラーゼアッセイにより Megalin 遺伝子上流域の -1881/-1866 と -868/-853 の 2 ヶ所に VDR が結合する VDRE を同定した。以上の検討より、マウス遠位尿細管細胞において 25D<sub>3</sub> は 1,25D<sub>3</sub> の作用の一部を代償して VDR シグナルの活性化を担う可能性が明らかとなった[3]。

<引用文献>

- Shibata S, Rinehart J, Zhang J, Moeckel G, Castaneda-Bueno M, Stiegler AL, et al. Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metab.* 2013;**18**(5):660-671.
- Shibata S, Ishizawa K, Wang Q, Xu N, Fujita T, Uchida S, et al. ULK1 Phosphorylates and Regulates Mineralocorticoid Receptor. *Cell Rep.* 2018;**24**(3):569-576.
- Kikuyama T, Susa T, Tamamori-Adachi M, Iizuka M, Akimoto M, Okinaga H, et al. 25(OH)D<sub>3</sub> stimulates the expression of vitamin D target genes in renal tubular cells when Cyp27b1 is abrogated. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;**199**:105593.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kikuyama Takahiro, Susa Takao, Tamamori-Adachi Mimi, Iizuka Masayoshi, Akimoto Miho, Okinaga Hiroko, Fujigaki Yoshihide, Uchida Shunya, Shibata Shigeru, Okazaki Tomoki	4. 巻 199
2. 論文標題 25(OH)D3 stimulates the expression of vitamin D target genes in renal tubular cells when Cyp27b1 is abrogated	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105593 ~ 105593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2020.105593	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 Sakai Kazuhiro, Yamazaki Osamu, Ishizawa Kenichi, Tamura Yoshifuru, Wang Qin, Ueno Masaki, Hayama Yuto, Fujigaki Yoshihide, Shibata Shigeru	4. 巻 524
2. 論文標題 Upregulation of renal Na/K/2Cl cotransporter 2 in obese diabetes mellitus via a vasopressin receptor 2-dependent pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 710 ~ 715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.142	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 Omizo Hiroki, Tamura Yoshifuru, Morimoto Chikayuki, Ueno Masaki, Hayama Yuto, Kuribayashi-Okuma Emiko, Uchida Shunya, Shibata Shigeru	4. 巻 10
2. 論文標題 Cardio-renal protective effect of the xanthine oxidase inhibitor febuxostat in the 5/6 nephrectomy model with hyperuricemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-65706-6	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 Wang Qin, Ishizawa Kenichi, Li Jinping, Fujii Wataru, Nemoto Yoshikazu, Yamazaki Osamu, Tamura Yoshifuru, Miura Yutaka, Nie Xuedan, Abe Ryo, Segawa Hiroko, Kuro-O Makoto, Shibata Shigeru	4. 巻 3
2. 論文標題 Urinary phosphate-containing nanoparticle contributes to inflammation and kidney injury in a salt-sensitive hypertension rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	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) 10.1038/s42003-020-01298-1	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 該当する

1. 著者名 Shibata Shigeru	4. 巻 32
2. 論文標題 Role of Pendrin in the Pathophysiology of Aldosterone-Induced Hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 607 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ajh/hpz054	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 柴田 茂、広浜大五郎	4. 巻 62
2. 論文標題 集合管の生理学 ~主細胞と間在細胞の協調作用のメカニズム~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	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) なし	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takahiro Kikuyama, Takao Susa, Mimi Tamamori-Adachi, Masayoshi Iizuka, Shunya Uchida, Tomoki Okazaki, Shigeru Shibata
2. 発表標題 25(OH)D3 alone stimulates expression of 1,25(OH)2D3-responsive genes, Calbindin-D9K and Megalin, in mpkDCT cells where Cyp27b1 gene was deleted by CRISPR-Cas9
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Sakai, Osamu Yamazaki, Kenichi Ishizawa, Yoshikazu Nemoto, Shinichiro Asakawa, Michito Nagura, Shigeyuki Arai, Yoshifuru Tamura, Yoshihide Fujigaki, Shigeru Shibata
2. 発表標題 Role of vasopressin V2 receptor signaling in NKCC2 regulation in diabetes mellitus • American Society of Nephrology Kidney Week 2019
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Qin Wang, Kenichi Ishizawa, Yoshikazu Nemoto, Yutaka Miura, Jinping Li, Makoto Kuro-o, Shigeru Shibata
2. 発表標題 Disturbed phosphate metabolism facilitates kidney damage in Dahl salt-sensitive hypertensive rats
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumika Ochiai1, Emiko Kuribayashi-Okuma, Kenichi Ishizawa, Yuya Tsurutani, Tetsuo Nishikawa, Shigeru Shibata
2. 発表標題 Pre- and post-treatment analysis of pendrin in the urinary exosome in primary aldosteronism
3. 学会等名 American Heart Association Hypertension 2020 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田 茂
2. 発表標題 尿細管の機能を統合的に理解する ~基礎から最新の知見まで~
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 柴田 茂
2. 発表標題 MR拮抗薬と高血圧関連疾患
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 諏佐崇生、菊山崇浩、安達（玉盛）三美、秋元美穂、飯塚眞由、内田俊也、柴田茂、岡崎具樹。
2. 発表標題 25(OH)D3は腎細胞においてビタミンD3活性を発揮する
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊山崇浩、諏佐崇生、安達（玉盛）三美、飯塚眞由、内田俊也、岡崎具樹、柴田茂。25(OH)D3は腎細胞においてビタミンD3活性を発揮する
2. 発表標題 25(OH)D3は腎細胞においてビタミンD3活性を発揮する
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 酒井 一広、山崎 修、山中 仁樹、石澤 健一、田村 好古、内田 俊也、藤垣 嘉秀、柴田 茂
2. 発表標題 糖尿病におけるNKCC2の活性化とバソプレシンシグナルの関与
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 Wang Qin, Ishizawa Kenichi, Nemoto Yoshikazu, Miura Yutaka, Li Jinping, Uchida Shunya, Kuro-o Makoto, Shibata Shigeru
2. 発表標題 Sucroferric oxyhydroxideはDahl食塩感受性ラットにおいて腎障害を抑制する(Sucroferric Oxyhydroxide Attenuates Kidney Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats)
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 大溝啓揮、田村好古、森本幾之、浅川信一郎、上野雅樹、早間悠人、内田俊也、藤垣嘉秀、柴田 茂
2. 発表標題 febuxostatは高尿酸血症合併CKDモデルにおいて酸化ストレス負荷を軽減し、腎障害および心肥大を抑制する
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 落合文佳、栗林恵美子、石澤健一、浅川信一郎、広浜大五郎、奈倉倫人、新井繁幸、山崎 修、田村好古、藤垣嘉秀、柴田 茂
2. 発表標題 原発性アルドステロン症におけるCl/HCO3輸送体pendrinの検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会総会
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
研究分担者	岡崎 具樹  (Okazaki Tomoki)  (60203973)	帝京大学・医学部・教授    (32643)	
研究分担者	藤垣 嘉秀  (Fujigaki Yoshihide)  (20283351)	帝京大学・医学部・教授    (32643)	
研究分担者	石澤 健一  (Ishizawa Kenichi)  (10772684)	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	諏佐 崇生  (Susa Takao)  (20445852)	帝京大学・医学部・講師    (32643)	

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