

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790589
 研究課題名 (和文) 腎近位尿細管上皮細胞におけるエンドサイトーシス仲介型ステロイドホルモン作用の解明
 研究課題名 (英文) The investigation into the endocytosis-mediated effects of the steroid hormones in renal proximal tubular epithelial cells

研究代表者
 佐藤 博慶 (SATO HIROYOSHI)
 新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教
 研究者番号：30413610

研究成果の概要 (和文)：腎近位尿細管上皮細胞 (PTEC) におけるアルドステロンなどのステロイドホルモンのエンドサイトーシスを介した作用を有する可能性の基礎的検討と、アルドステロンと関係の深いレニン-アンジオテンシン系 (RAS) によるエンドサイトーシス受容体メガリンの PTEC における発現調節についての検討を行った。まずアルドステロン受容体 MR とアルドステロン応答遺伝子 SGK1 の PTEC におけるタンパク質レベルでの発現を確認した。また RAS 構成因子であるアンジオテンシン II による PTEC におけるメガリンの発現抑制とそれを回復させるインスリンシグナルとのクロストークを解明した。

研究成果の概要 (英文) : I performed basic examination of possibility to have action through endocytosis of steroid hormone aldosterone etc in renal proximal tubular epithelial cells (PTEC), and I examined the expressional control of endocytotic receptor megalin by renin-angiotensin system (RAS) with a closely relation of aldosterone in PTEC. First, protein level of aldosterone receptor MR and aldosterone response gene SGK1 was confirmed in PTEC. Second, it was clarified the crosstalk with the insulin signal that recovered the control of angiotensin II on the suppression of Megalin expression in PTEC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯学系

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：腎臓学、近位尿細管、エンドサイトーシス、ホルモン

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎近位尿細管上皮細胞 (PTEC) は、アルブミンなどの原尿中の低分子量タンパク質、ペプチド、脂質などのほぼ全てをメガリンや

キュビリンが関与する受容体介在性エンドサイトーシスにより再吸収し、代謝する。糖尿病性腎症、メタボリックシンドロームや高血圧に伴う腎障害では、顕性蛋白尿に先立ち

微量アルブミン尿が観察される。このような慢性腎臓病 (CKD) 初期の段階では、糸球体機能異常・過剰濾過に伴う原尿量・尿蛋白増加だけではなく、近位尿細管機能異常によるタンパク質再吸収能低下が同時に生じて、尿蛋白負荷に伴う下位尿細管傷害など病態の進展に深く関与しているものと考えられる。このような生活習慣病関連疾患進展には、体内のNa代謝や血圧維持に重要なレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の亢進が深く関与している。アンジオテンシン II 刺激により産生されるアルドステロンはコルチゾールのように副腎皮質において合成される脂溶性のステロイドホルモンの一種で、従来は主に腎集合管や結腸などの上皮組織において転写因子でもあるミネラルコルチコイド受容体 (MR) に結合して活性化させ、Naなどの電解質調節や血圧調節に寄与するのみと考えられてきた。しかし近年、MR 阻害薬が心不全の生命予後を改善する、といった心血管系でのアルドステロン-MR 系の重要性が、腎疾患が悪化すると心機能も悪化するという心腎連関と相まって注目されている。またMRの腎における発現が集合管に限らず近位尿細管を含む多くの組織・細胞にみられることが知られるようになり、実際にPTECに対するアルドステロンの有害作用が報告され、炎症や腎症の進展にアルドステロンが重要な役割を担っているものと考えられる。原発性アルドステロン症の患者では、高血圧やインスリン抵抗性の出現に伴い腎症を発症し微量アルブミン尿を呈するが、MR拮抗薬で抑制される。また、MR阻害薬が2型糖尿病性腎症患者の蛋白尿を改善する。このようなMR阻害薬の腎保護作用は従来のアルドステロン標的臓器である集合管への作用だけでは説明できない。従って、近位尿細管でのアルドステロン作用を検討する必要がある。また、グルココルチコイド受容体 (GR) アゴニストのコルチゾールが血中運搬タンパク質 (corticosteroid binding globulin, CBG) ・核内受容体・遺伝子発現レベルでアルドステロンと作用点がクロストークしている。

(2) さらに著者はイソフラボンや酸化ステロールのエストロゲン様作用について研究してきておりステロイドホルモンの作用機構についての知識を豊富に持っている。その中で注目したのはステロイドホルモンの非ゲノム作用のほかに、テストステロンを血中運搬タンパク質ごと細胞がエンドサイトーシスによって取り込んでゲノム作用を示すというエンドサイトーシス仲介型作用が近年発見され、PTECではメガリン・キュビリンを介したタンパク質のエンドサイトーシスが盛んなことから、エンドサイトーシス仲介型作用がコルチゾールやアルドステロンで

もPTECで生じているのではないかという仮説に至った。

2. 研究の目的

(1) 腎臓におけるタンパク質再吸収・代謝に主要な役割を担っている腎近位尿細管上皮細胞におけるアルドステロン・コルチゾールを中心としたステロイドホルモン作用を、特に血中運搬タンパク質-ホルモン複合体がメガリンやキュビリンに結合して受容体介在性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれて作用する可能性や細胞のエンドサイトーシス能の変化について細胞・個体レベルで解析することを目的とする。即ち、古典的な血中の遊離型ステロイドホルモン (脂溶性) が脂質二重膜である細胞膜を自由に透過し核内受容体に結合することにより発揮される遺伝子発現調節作用 (ゲノム作用) に加え、細胞膜受容体を介したシグナル伝達による非ゲノム作用、さらに新奇なエンドサイトーシス介在性作用機序を解明することにより、腎近位尿細管上皮細胞におけるステロイドホルモンの新規な生理作用やその生体・病態における寄与度を明らかにすることを目的とする。

(2) また、腎疾患やアルドステロンと関連の深いレニン-アンジオテンシン系の生理活性ペプチドであるアンジオテンシン II のPTECへの作用、メガリンの機能調節にどのように関わるのかを検討することを目的とする。

(3) さらに、メガリン・キュビリンやメガリンのアダプター蛋白質であるDab2がメガリンやその小田野分子とどのような相互作用を示し機能するのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) まず、各種近位尿細管上皮細胞株におけるアルドステロン・コルチゾールなどの脂溶性ステロイドホルモンの核内受容体MR・GRのmRNAおよびタンパク質レベルでの発現確認、ホルモン応答性遺伝子のmRNAおよびタンパク質レベル発現確認・ホルモンによる発現誘導など基礎的検討をRT-PCRならびにWestern Blottingにより行った。

(2) 次に、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系としてアルドステロンと密接な関係があるアンジオテンシン II、および糖尿病性腎症と関連するインスリンおよびグルコースが近位尿細管上皮細胞のメガリン発現・機能に与える影響をAT1受容体安定発現OK細胞株を用いてWestern Blotting、Real-Time RT-PCRなどを用いて検討した。

(3) さらに、メガリン・キュビリンとメガリンのアダプター分子Dab2などの各種近位尿細管上皮細胞株における発現の有無ならび

に量を Western Blotting にて検討し、Dab2 の役割について免疫沈降法、GST-pull down 法、密度勾配超遠心法にてメガリンや他分子との相互作用にて検討した。

4. 研究成果

- (1) まず、各種近位尿細管上皮細胞株における MR・GR の発現を Western Blotting により確認したところ、タンパク質レベルでの内因性の発現が確認され、これらの細胞株がアルドステロン・コルチゾールなどのステロイドホルモンに応答する可能性が示された。またアルドステロン・コルチゾール応答性遺伝子である SGK1 の発現が各細胞株にてタンパク質レベルで確認された。一部の細胞株では、この SGK1 の発現がアルドステロンやコルチゾールによって増加することが示された。また SGK1 の発現はアンジオテンシン II により調節されることが新たに確認され、SGK1 のリン酸化を促進するインスリンシグナルとの関連を含め、SGK1 の転写レベルだけではなくリン酸化を含めたシグナル伝達など SGK1 を指標として上流・下流シグナルが近位尿細管上皮細胞の生理的作用・病態寄与を解明する点で重要な知見であると考えられる。
- (2) 次に、アンジオテンシン II 受容体 AT1AR を安定導入した腎近位尿細管上皮細胞株 OK 細胞に高グルコース状態でアンジオテンシン II を作用させるとエンドサイトーシス受容体メガリンのタンパク質レベルならびに mRNA レベルでの発現が低下し、アルブミンの細胞への取り込み・分解が抑制された。このメガリンの発現・機能の低下には ERK1/2 のリン酸化増加が関与していることが判明した。この ERK1/2 の活性化に対して ERK1/2 リン酸化経路阻害薬 PD98059 と U0126、インスリン-PI3K 経路が拮抗的に作用し、低下したメガリンの発現を部分的に回復させた。また、低グルコースと比較して高グルコース、低グルコース+インスリン条件でメガリン発現量は多かったが、高グルコース+インスリンにおいてさらなる相加的のメガリン発現上昇はみられなかった。さらに、各種シグナル伝達経路阻害薬を用いてアンジオテンシン II によるメガリン発現低下のメカニズムを追求したところ、TGF- β 受容体 I キナーゼ (ALK5) 阻害薬がアンジオテンシン II によるメガリン発現低下をタンパク質あるいは mRNA レベルで部分的に回復させた。従って、アンジオテンシン II による近位尿細管上皮細胞におけるメガリン発現低下には ERK1/2 経路活性化の他に、新たに TGF- β 受容体を介した経路の活性化が関わっていることが示された。
- (3) 近位尿細管において糸球体濾過タンパク質をエンドサイトーシスにより再吸収する

ことに関与する受容体メガリン・キュビリンとメガリンのアダプタータンパク質 Dab2 は、近位尿細管上皮由来細胞株であってもその発現の有無・量が各細胞株によって大きく異なることを確認した。近位尿細管上皮細胞のモデル細胞株である不死化ラット近位尿細管細胞 (IRPTC) には、メガリンと Dab2 が多く発現しており、エンドサイトーシス機構を検討するための良いモデル細胞株である。この細胞株で、細胞ライセートから抗メガリン抗体で免疫沈降を行ったところ、Dab2 とともに 200KDa ほどのタンパク質が共沈してきた。この未知のタンパク質を配列解析したところ、nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA, MYH9) というモータータンパク質と判明した。メガリンを含めたこの 3 者のタンパク質が複合体を形成しているものと考え、共発現細胞系や腎皮質の密度勾配超遠心による複合体分離、GST-pull down assay を行ったところ、メガリンの C 末端は Dab2 の N 末端側と結合し、MYH9 は Dab2 の C 末端側と結合していることが判明した。即ち、メガリンと MYH9 はアダプタータンパク質 Dab2 を介して結合し、エンドサイトーシスの際に機能していることが示された。

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 3 件)

- ① 斎藤亮彦、佐藤博慶、飯野則昭、竹田徹朗、Molecular Mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium、Journal of Biomedicine and Biotechnology、2010 巻、1-7、2010、査読あり
- ② 保坂聖子、竹田徹朗、飯野則昭、細島康宏、佐藤博慶、悴田亮平、山本佳子、小林麻子、下条文武、斎藤亮彦、Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells、Kidney International、75 巻、1308-1315、2009、査読あり
- ③ 細島康宏、佐藤博慶、山本佳子、悴田亮平、相馬多恵子、小林麻子、鈴木哲世、蒲澤秀門、竹山綾、生山健児、飯野則昭、西山成、Thomas J Thekkumkara、竹田徹朗、鈴木芳樹、下条文武、斎藤亮彦、Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin- mediated signaling cross talk、Endocrinology、150 巻、871-878、2009、査読あり

〔学会発表〕（計3件）

- ①佐藤博慶、山本佳子、細島康宏、相馬多恵子、鈴木哲世、蒲澤秀門、竹山綾、笹川泰司、生山健児、塩田友也、飯野則昭、竹田徹朗、鈴木芳樹、下条文武、斎藤亮彦、培養近位尿細管上皮細胞における Glucose, Insulin, Ang II による Megalin の発現調節機構、第 52 回日本腎臓学会学術総会、2009.6.4、横浜
- ②佐藤博慶、細島康宏、山本佳子、鈴木哲世、相馬多恵子、小林麻子、蒲澤秀門、竹山綾、飯野則昭、竹田徹朗、西山成、鈴木芳樹、下条文武、斎藤亮彦、近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンの発現調節におけるアンジオテンシン II / AT1 受容体とインスリン / グルコースのクロストーク、トランスポーターワークショップ in 鶴岡、2008.11.15、鶴岡（山形）
- ③細島康宏、佐藤博慶、飯野則昭、小林麻子、相馬多恵子、竹田徹朗、西山成、Thomas J Thekkumkara、鈴木芳樹、下条文武、斎藤亮彦、Angiotensin II and insulin-mediated signaling pathways that regulate the expression of megalin in cultured proximal tubule cells、ISN Nexus symposium “Diabetes and the Kidney”、2008.6.27、Dublin (Ireland)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 博慶 (SATO HIROYOSHI)

新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：30413610