

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591225

研究課題名(和文) 糖尿病による腎不全・高血圧発症における腎内選択的インスリン抵抗性の意義

研究課題名(英文) The significance of selective insulin resistance in kidney for hypertension and renal insufficiency.

研究代表者

鈴木 正志 (Suzuki, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90595662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高インスリン血症はナトリウム輸送を介して高血圧の発症に関与すると考えられている。この機構を明らかにするために近位尿細管におけるインスリンによるナトリウム輸送を、ラット、ヒトにおいて調べた。IRS2の経路を介したインスリンのNBCe1に対する機能亢進作用はインスリン抵抗性を持つラット、ヒトで保たれていた。腎皮質では肝臓と異なりインスリン投与によりIRS2、SREBP1タンパクの発現量は変化しなかった。他の組織と異なり、インスリン抵抗性の状態でもIRS2を介したインスリンの近位尿細管の輸送活性亢進作用が保たれていることが、メタボリックシンドロームにおける高血圧の発症に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hyperinsulinemia can contribute to hypertension through effects on sodium transport. To test whether the stimulatory effect of insulin on renal proximal tubule sodium transport is preserved in insulin resistance, we compared the effects of insulin on adipocytes and proximal tubules in rats and humans. The stimulatory effect of insulin on NBCe1 activity via IRS2 pathway and IRS2 expression in the kidney cortex were exceptionally preserved in both rats and humans with insulin resistance. Unlike liver, acute insulin injection failed to change the expression levels of IRS2 and sterol regulatory element-binding protein 1 in rat kidney cortex, indicating that regulatory mechanisms of IRS2 expression are distinct in liver and kidney. Thus, preserved stimulation of proximal tubule transport through the insulin/IRS2/PI3-K pathway may play an important role in the pathogenesis of hypertension associated with metabolic syndrome.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧 インスリン抵抗性 メタボリック症候群

1. 研究開始当初の背景

肥満を伴う2型糖尿病による腎不全は世界中で増加しており、糖尿病性腎症の発症予防と予後改善のための抜本的対策が求められている。糖尿病性腎症および合併する高血圧の発症機序には不明の点も多いが、腎臓内では糸球体でのみインスリンシグナルが障害される腎内選択的インスリン抵抗性が注目されている。すなわち1型糖尿病性腎症の発症にはインスリン抵抗性の存在が関連し (Kidney Int 62:963,2002)、ポドサイト選択的インスリン受容体欠損マウスは糸球体硬化病変を発現する (Cell Metab 12:329,2010)。糖尿病性血管障害の主因の一つはインスリンによる一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 活性化障害であり、eNOS 欠損マウスは高血糖により糖尿病性腎症様病変を呈する (J Am Soc Nephrol 18:539,2007)。さらに糖尿病やインスリン抵抗性動物モデルではインスリンによる糸球体内皮細胞 eNOS 活性化が障害されている (Kidney Int 79:883, 2011)。一方、糸球体とは対照的にインスリンの尿細管 Na 輸送亢進作用は糖尿病やインスリン抵抗性においても保たれていると推測されているが、インスリンの尿細管への作用に関する研究は少ない。我々もインスリンの近位尿細管 Na 再吸収亢進作用がインスリン受容体基質 IRS2 /PI3 キナーゼ/ Akt を介しており、IRS1 シグナルの異常を基盤とするインスリン抵抗性においても保たれることを示している (J Am Soc Nephrol 16:2288, 2005) が、病態への影響や意義については明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は腎内選択的インスリン抵抗性出現のメカニズムを明らかにし、これを標的とする新規治療法の開発を目指すことである。具体的にはラットおよびヒトにおいてインスリン抵抗性の有無により近位尿細管におけるインスリンの $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ 共輸送体 (NBCe1) 輸送活性亢進作用が異なるかどうかを明らかにする。また、このインスリンによる作用が IRS1、IRS2 のどちらの経路を介したものを明らかにする。さらに、Forkhead box O (FoxO)1 および sterol regulatory element-binding protein (SREBP)1c は IRS2 の正負の転写調節因子として知られているが、腎尿細管でのインスリンによる Na 再吸収亢進作用に同経路がどのように関わっているか検討を行う事により、尿細管でのナトリウム再吸収のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

Wistar ラット、Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラット、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット、腎臓摘出時に得られたヒト腎皮質から近位尿細管を単離し pH 感受性蛍光色素を用いて細胞内 pH 測定法により NBCe1 活性を評価した。各組織への糖取り

込みについては、蛍光標識グルコース誘導体を用いて取り込み量を測定した。

IRS1、IRS2 に対しそれぞれ特異的な siRNA を作成し、単離尿細管、脂肪細胞に導入することにより NBCe1 活性、糖取り込みへのこれらの影響を評価した。

IRS1、IRS2 mRNA 発現量は定量的 RT-PCR により測定した。

NBCe1、IRS1、IRS2、Foxo1、SREBP1c タンパク発現量を Western blot にてそれぞれの特異的抗体を用いて評価した。

4. 研究成果

Wistar ラットの近位尿細管においてインスリンによる NBCe1 活性亢進作用は anti-IRS2 siRNA によって抑制されたが、anti-IRS1 siRNA の影響は受けなかった (図 1)。脂肪細胞におけるインスリンによるブドウ糖取り込み促進作用は anti-IRS1 siRNA により完全に抑制されたが、anti-IRS2 siRNA による影響は見られなかった。 (図 2)

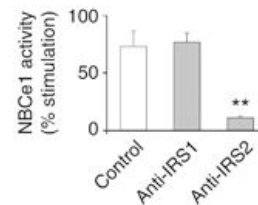


図 1. Anti-IRS1, IRS2 siRNA の近位尿細管 NBCe1 輸送活性への影響

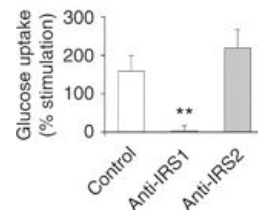


図 2. 脂肪細胞における Anti-IRS1, IRS2 siRNA のブドウ糖取込への影響

インスリン抵抗性を示す OLETF ラットにおいて脂肪細胞のブドウ糖取り込みは LETO ラットとくらべ減少しており、インスリンによるブドウ糖取り込み促進作用も減弱していた (図 3)。一方近位尿細管における NBCe1 活性およびインスリンによる活性亢進作用は LETO と OLETF で差がなかった (図 4)。

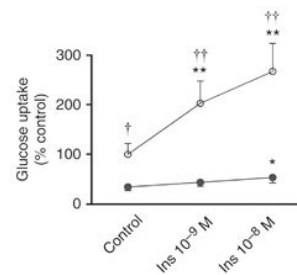


図 3. 脂肪細胞におけるインスリンによるブドウ糖取込 : LETO、 : OLETF

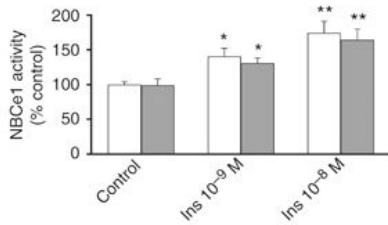


図 4. インスリンによる近位尿細管 NBCe1 輸送活性亢進作用 : LETO、 : OLETF

脂肪組織、肝、骨格筋、腎皮質における IRS1、IRS2 の発現を LETO と OLETF で比較した。IRS1 mRNA はすべての組織において OLETF で発現が減少していたが、腎皮質における IRS2 のみ OLETF でも mRNA の発現量は保たれていた。(図 5)腎皮質での IRS1 タンパク量は OLETF で減少していたが、IRS2 タンパク量は保たれていた(図 6)。これらの結果からラットにおいて近位尿細管におけるインスリンによる活性亢進作用は IRS2 に依存しており、インスリン抵抗性の状態でも保たれていると考えられた。

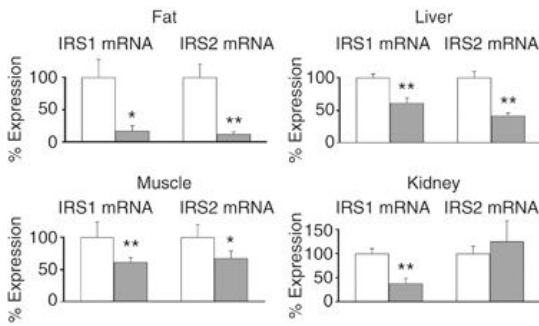


図 5. 各組織における IRS1、IRS2 mRNA 発現量 : LETO、 : OLETF

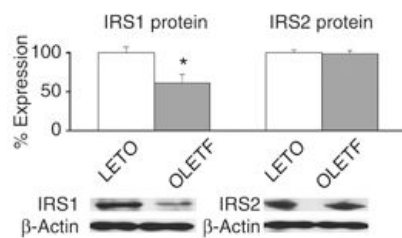


図 6. 腎皮質における IRS1、IRS2 タンパクの発現量 : LETO、 : OLETF

次に腎臓摘出時に得られたヒト腎および脂肪組織において同様の検討を行った。脂肪組織においては、インスリンによるブドウ糖取り込み促進作用はインスリン抵抗性の状態で低下していたが、近位尿細管でのインスリンによる NBCe1 活性亢進作用はインスリン抵抗性の状態でも保たれていた(図 7, 8)。脂肪組織、腎皮質共に IRS1 mRNA 発現量はインスリン抵抗性の状態で減少していたが、IRS2 mRNA の発現量は脂肪組織では減少していたが、腎皮質では保たれていた(図 9)。こ

れらの結果から近位尿細管における IRS2 依存のインスリンによる活性亢進作用はインスリン抵抗性のヒトにおいて保たれていると考えられた。

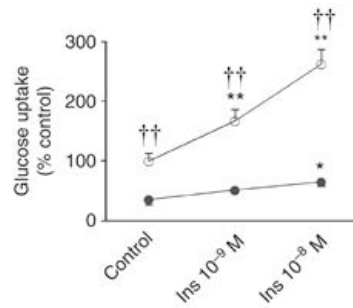


図 7. ヒト脂肪細胞におけるインスリンによるブドウ糖取込 : インスリン抵抗性なし、 : インスリン抵抗性あり

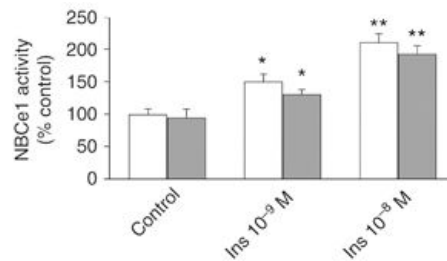


図 8. インスリンによるヒト近位尿細管 NBCe1 輸送活性亢進作用 : インスリン抵抗性なし、 : インスリン抵抗性あり

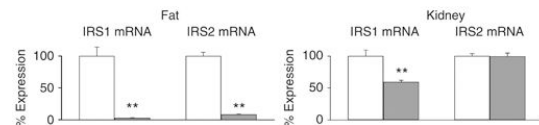


図 9. ヒト組織における IRS1、IRS2 mRNA 発現量 : インスリン抵抗性なし、 : インスリン抵抗性あり

転写因子の FoxO は肝臓において IRS2 遺伝子の転写をコントロールし IRS2 の発現を増加させる。インスリン抵抗性の状態では SREBP1 の発現が増えることにより FoxO による刺激作用に拮抗して IRS2 の発現を抑制している。肝臓、腎臓において FoxO1 と SREBP1c が IRS2 タンパクの発現の調節にどのように関わっているかを検討した。Wistar ラットを一晩絶食群および自由摂食後にインスリン (0.75 mU/g 体重) を腹腔内注射した群に分け、腎皮質および肝臓内の IRS2、FoxO1、および SREBP1c のタンパク発現量を比較した。肝臓では既報の通り、自由摂食群で絶食群と比べ FoxO1 発現は著減し、逆に SREBP1c 発現は著増し、その結果 IRS2 発現は著減した。これに対して腎皮質においては FoxO1、SREBP1c および IRS2 発現は絶食群、自由摂食群で差がなかった。(図 10 a, b)次にインスリン抵抗性の有無で同様の検討を行った。SREBP1c mRNA は OLETF ラットの肝臓で著増していたが、

腎では対照群と差がなく、インスリン抵抗性を示すヒト腎においても同様であった(図11)。以上より、近位尿細管のIRS2発現は肝臓と異なりインスリン/SREBP1c経路による抑制を受けないことが初めて示され、このことがメタボリック症候群において高インスリン血症に伴うNa貯留・高血圧発症に関与することが示唆された。

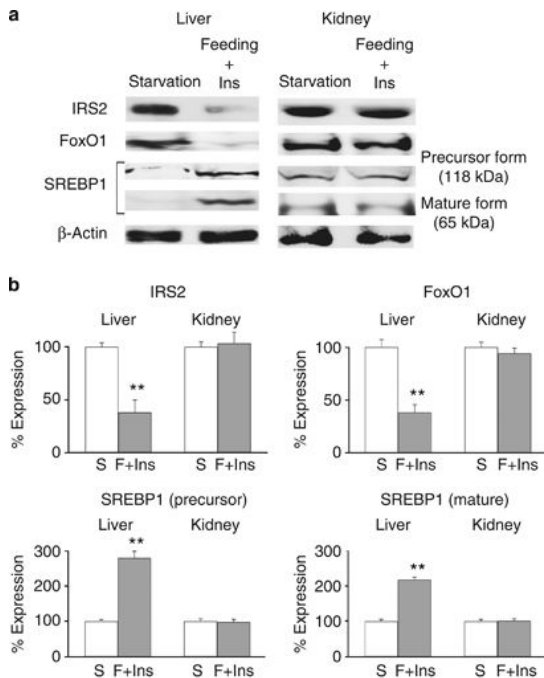


図 10. インスリン投与によるタンパク発現量 S: 絶食群、F+Ins: 自由摂食群

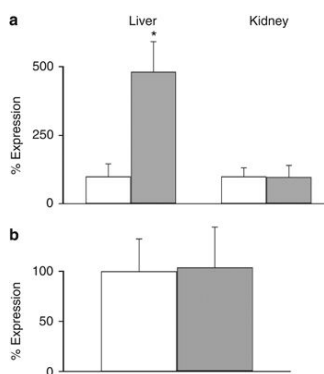


図 11. SREBP1c mRNA 発現量 a) : LETO、: OLETF、b)ヒト腎皮質 : インスリン抵抗性なし、: インスリン抵抗性あり

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 7件)

Nakamura M, Yamazaki O, Shirai A, Horita S, Satoh N, Suzuki M, Hamasaki Y, Noiri E, Kume H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G. Preserved Na/HCO₃ cotransporter sensitivity to insulin may promote hypertension in metabolic

syndrome. *Kidney Int.* 2015 Mar;87(3):535-42.

Nakamura M, Shirai A, Yamazaki O, Satoh N, Suzuki M, Horita S, Yamada H, Seki G. Roles of renal proximal tubule transport in acid/base balance and blood pressure regulation. *Biomed Res Int.* 2014;2014:504808.

Shirai A, Yamazaki O, Horita S, Nakamura M, Satoh N, Yamada H, Suzuki M, Kudo A, Kawakami H, Hofmann F, Nishiyama A, Kume H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G. Angiotensin II dose-dependently stimulates human renal proximal tubule transport by the nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate pathway. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Jul;25(7):1523-32.

Seki G, Horita S, Suzuki M, Yamazaki O, Usui T, Nakamura M, Yamada H. Molecular mechanisms of renal and extrarenal manifestations caused by inactivation of the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1. *Front Physiol.* 2013 Oct 1;4:270.

Seki G. Unexpected effect of the appetite-stimulating hormone ghrelin on ENaC: hunger for sodium? *Kidney Int.* 2013 Sep;84(3):438-40.

Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T. Roles of renal proximal tubule transport in the pathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rev.* 2013 May;9(2):148-55. Suzuki M, Seki G, Yamada H, Horita S, Fujita T. Functional Roles of Electrogenic Sodium Bicarbonate Cotransporter NBCe1 in Ocular Tissues. *Open Ophthalmol J.* 2012;6:36-41.

〔学会発表〕(計 6件)

Motonobu Nakamura, Osamu Yamazaki, Shoko Horita, Nobuhiko Sato, Hideomi Yamada, Masashi Suzuki, George Seki, Preserved expression of IRS2 mediates the stimulatory effect of insulin on renal proximal tubule sodium transport in insulin resistance. Annual meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, USA, Nov. 13, 2014.

中村元信、白井雅弓、山田秀臣、堀田晶子、鈴木正志、佐藤信彦、榎本裕、久米春喜、本間之夫、関常司、インスリン抵抗性における腎近位尿細管インスリンシグナル伝達保持機構、第 57 回日本腎臓学会学術総会、横浜、2014 年 7 月 6 日

中村元信、白井雅弓、山田秀臣、堀田晶子、鈴木正志、佐藤信彦、関常司、イン

スリンは PI3 キナーゼ/IRS2/Akt2 を介して近位尿細管 Na 再吸収を亢進させる、第 57 回日本腎臓学会学術総会、横浜、2014 年 7 月 6 日

中村元信、山崎修、白井雅弓、山田秀臣、堀田晶子、鈴木正志、榎本裕、久米春喜、本間之夫、関常司、第 56 回日本腎臓学会学術総会、東京、2013 年 5 月 11 日

Motonobu Nakamura, Ayumi Shirai, Osamu Yamazaki, Hideomi Yamada, Masashi Suzuki, Shoko Horita, Yukio Homma, George Seki, Stimulatory Effect of Insulin on Renal Proximal Na Transport Is Preserved in Insulin Resistance, Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego, CA, USA, Nov. 1, 2012.

中村元信、山崎修、白井雅弓、山田秀臣、堀田晶子、鈴木正志、榎本裕、久米春喜、本間之夫、関常司、藤田敏郎、インスリン抵抗性におけるインスリンの近位尿細管輸送亢進作用機序、第 55 回日本腎臓学会学術総会、横浜、2012 年 6 月 2 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 正志 (Suzuki Masashi)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：90595662

(2) 研究分担者

関 常司 (Seki George)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30206619

山田 秀臣 (Yamada Hideomi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60396752

堀田 晶子 (Horita Shoko)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20534895