

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09683

研究課題名(和文)GIPの腎生理作用の解明と糖尿病性腎症におけるその腎保護効果についての検討

研究課題名(英文)The role of GIP in the pathogenesis of diabetic nephropathy and its renal protective effects

研究代表者

藤田 浩樹(FUJITA, HIROKI)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30333933

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)：インクレチンGIPの糖尿病腎における腎保護効果について検討した。糖尿病性腎症の発症に抵抗性を示すC57BL/6-Akita糖尿病マウスのGIP受容体を欠損させることで、アルブミン尿の増加や糖尿病性糸球体硬化病変の進行および腎酸化ストレスの増加が観察された。一方で、進行性糖尿病性腎症を発症するKK/Ta-Akita糖尿病マウスに対するGIP補充療法は腎病変の進展を抑制しなかった。マウスの腎臓におけるRT-PCRを用いたGIP受容体発現解析の結果、腎臓内でのGIP受容体の発現量はかなり少なく、GIP単独療法では進行した糖尿病性腎症に対して十分な腎保護効果を発揮できないものと考察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病腎において、2つの主要なインクレチンGLP-1とGIPはともに抗酸化作用を介して腎保護的に働いているが、腎臓内ではGLP-1受容体シグナルの方が中心となって腎保護の役割を担っていることが明らかとなった。GLP-1とGIPの併用療法による糖尿病腎における相加的腎保護効果の可能性が期待されることから、糖尿病性腎症に対する新たな治療戦略としての確立を目指し、今後さらなる研究を遂行していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether increased GIP receptor signaling provides protective effects in diabetic kidneys. Through the analysis in diabetic nephropathy-resistant C57BL/6-Akita mice, we found that GIP receptor-deficient C57BL/6-Akita mice which have reduced GIP receptor signaling exhibit increased albuminuria, glomerulosclerosis and oxidative stress. Unexpectedly, GIP administration did not ameliorate diabetic renal injury in KK/Ta Akita mice which develop progressive diabetic nephropathy. The RT-PCR analysis revealed that GIP receptor is poorly expressed in mouse kidneys as compared with the receptor of another gut incretin hormone GLP-1. Taken together, these findings suggest that the administration of GIP alone does not highly exert renal protective effects in progressive diabetic nephropathy. However, considering that GIP and GLP-1 have an anti-oxidative effect, the administration of GIP in addition to GLP-1 may provide additive protective effects in diabetic kidneys.

研究分野：腎臓病学、糖尿病学

キーワード：糖尿病性腎症 インクレチン GIP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インクレチンは血糖値依存性にインスリン分泌を促進する消化管ホルモンの総称であり、上部小腸の K 細胞から分泌される Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) と下部小腸の L 細胞から分泌される Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が 2 種類の主要なインクレチンとして生体内で働いている。インクレチン受容体はその作用の中心部位である膵β細胞のみならず、脳や心臓など様々な他の臓器においても発現しているようであり、これらの臓器においてインクレチンはいわゆる膵外作用としての何らかの生理作用を発揮しているものと考えられている。

インクレチンのうち、GLP-1 についてはその腎臓における役割に関して、これまでに我々は詳細な解析を行ってきた。最近、我々はマウスを用いた研究において、In situ hybridization と定量 RT-PCR の手法による腎臓内 GLP-1 受容体 (GLP-1R) の発現解析を行い、この受容体は腎臓内では糸球体係蹄壁と血管壁に特異的に発現していることをつきとめた (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)。さらに、我々の研究グループで確立した糖尿病性腎症 (以下、腎症) 発症進展への感受性の異なる 2 種類の非肥満型インスリン欠乏型 Ins2 Akita 糖尿病マウスモデル (Fujita et al. *J Am Soc Nephrol* 20: 1303-1313, 2009) を用いた研究から、腎症発症に抵抗性を示す C57BL/6-Ins2 Akita (C57BL/6-Akita と略す) マウスの GLP-1R を欠損させるとアルブミン尿およびメサンギウム基質の増加など腎症の進行がみられ、進行性腎症を発症する KK/Ta-Ins2 Akita (KK/Ta-Akita と略す) マウスに GLP-1R 作動薬 Liraglutide を投与すると腎症の進行が抑制されること、これらの効果は Akita マウスの耐糖能に関係なく、GLP-1 の独立した効果としてもたらされることを明らかにしてきた (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)。インスリン分泌における GLP-1R シグナル伝達の重要なセカンドメッセンジャーは cAMP であり、腎糸球体係蹄壁および血管壁においても同様な GLP-1R シグナル伝達系が働いているものと想定され、解析を進めた結果、GLP-1 の腎保護作用の土台となる分子メカニズムについては、cAMP/PKA シグナルの増加を介した抗酸化作用が主たる役割を果たしていることを解明した。

GLP-1R シグナル伝達系に関連したもう一つの重要な研究課題は、GLP-1 を活性型から不活性型に分解する酵素 Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) から派生する腎臓内シグナル伝達系と腎症におけるその役割を解明することである。DPP-4 は GLP-1 以外の基質をもターゲットとすることが知られている。ごく最近我々は、マウスを用いた研究から、DPP-4 阻害が腎糸球体上皮細胞および遠位ネフロンでの Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1; CXCL 12) の発現増加を惹起し、SDF-1 による抗酸化・抗線維化作用および尿中ナトリウム排泄の増加を介した糸球体高血圧および糸球体過剰濾過の是正から腎症における腎保護に貢献することを明らかにしてきた (Takashima et al. *Kidney Int* 90: 783-796, 2016)。

このように現在インクレチン関連薬として 2 型糖尿病の治療に幅広く用いられている GLP-1 受容体作動薬、DPP-4 阻害薬の腎保護効果の可能性を我々は示してきたが、もう一つの主要なインクレチンである GIP の腎臓内における生理作用と役割については全く知られていない。このような学術的背景から、本研究では、腎臓における GIP 受容体 (GIPR) の発現と局在、GIPR 欠損による腎症進展ならびに GIP 補充療法による糖尿病腎保護効果の可能性について解析する。本研究により、腎症の病態における GIP の腎生理作用が解明されれば、腎症の新しい治療法の確立に貢献することが期待される。

2. 研究の目的

消化管由来のホルモンであるインクレチン GIP の糖尿病腎における生理作用を解明し、この GIP をターゲットとした治療が腎症の病態において腎保護効果をもたらすのか、さらには腎症に対する新しい治療戦略となり得るのか明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腎臓における GIPR の発現と局在の解析

本研究では、はじめに 8 週齢オス C57BL/6 マウスの腎臓において、RT-PCR と In situ hybridization の手法を用いて GIPR の発現と局在について解析を行うことを計画した。

(2) GIPR 欠損 (Gipr^{-/-}) C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの作製とその腎病変についての解析

腎症抵抗性 C57BL/6-Akita 糖尿病マウス GIPR を欠損させ、腎症の進展がみられるのかアルブミン尿や腎組織病変など経時的に観察するとともに、酸化ストレスマーカーの変化を中心とした機能解析を行う。GIPR シグナルの腎臓内セカンドメッセンジャーの中心と考えられる cAMP/PKA のレベルの変化についても調査を行った。具体的には、オス C57BL/6-Akita マウスとメス Gipr^{-/-} C57BL/6-WT マウスを交配することで、Gipr^{-/-} C57BL/6-Akita 糖尿病マウスを作製した。オス Gipr^{-/-} C57BL/6-Akita マウスが得られたのち、10 週齢ごとにアルブミン尿の変化を Exocel 社の測定キットで測定、糸球体濾過率 (GFR) については我々が開発した FITC-inulin single bolus injection 法にて測定を行った。30 週齢時に麻酔下で腎臓を摘出し、パラフィン切片を作製した。PAS 染色標本にて糸球体病変の程度を観察し、腎線維化については Masson trichrome 染色標本を用いて評価を行った。腎酸化ストレスの状態については、酸化ストレスマーカーの Malondialdehyde (MDA) の免疫組織化学染色により評価を行った。

(3) GIPR 欠損 ($Gipr^{-/-}$) KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの作製とその腎病変についての解析

進行性腎症を発症する KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの GIPR を欠損させることで、腎症のさらなる進展がみられるのか解析を行った。具体的には、オス KK/Ta-Akita マウスとメス $Gipr^{-/-}$ KK/Ta-WT マウスを交配し、 $Gipr^{-/-}$ KK/Ta-Akita マウスを作製し、(2) と同様な方法で腎病変の変化について解析を行った。

(4) 進行性腎症を発症する KK/Ta-Akita 糖尿病マウスに対する GIP 補充療法の腎症進展抑制効果についての検討

進行性腎症を発症するオス KK/Ta-Akita 糖尿病マウスに対して 8 週齢より 4 週間、皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプを介して human GIP (25 nmol/kg/day; AnaSpec, CA, USA) の投与を行い、(2) と同様な方法で腎病変の変化について解析を行った。対照群には生理食塩水の投与を行った。

(5) 統計学的解析

データは means \pm SEM で表記し、データの統計学的解析は、One-way ANOVA と Bonferroni's multiple comparison test、Friedman's test と Dunn's multiple comparison test、または Mann-Whitney U test にて行った。P<0.05 を統計学的に有意と判定した。

4. 研究成果

(1) 腎臓における GIPR の発現と局在

GIPR の腎臓における発現量は GLP-1R よりもかなり少ないことが RT-PCR 解析の結果から判明した。すなわち、RT-PCR において、GIPR は 35 サイクルの PCR にてかろうじてバンドが確認でき、45 サイクルの PCR にてバンドが確認できるような結果が得られた。GIPR の腎臓における局在については、糸球体、尿細管、集合管、血管において発現が確認され、広範囲に局在して発現していることを確認した (図 1)。また、GIPR の腎臓における発現量がかなり少なかったことから、In situ hybridization による解析は遂行できなかった。

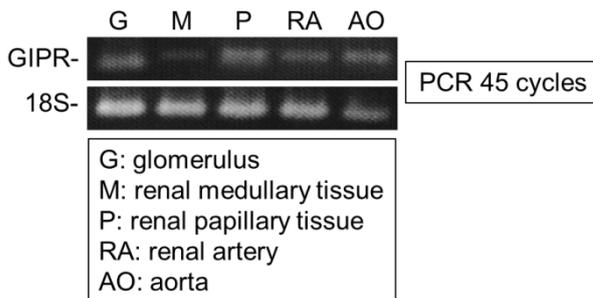


図 1. 8 週齢 C57BL/6-WT マウスの腎臓における GIPR の RT-PCR 解析

(2) GIPR 欠損 ($Gipr^{-/-}$) C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの血液生化学パラメーターと腎病変

$Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウス作製後、30 週齢まで経時的に観察を行った。30 週齢時の C57BL/6-Akita 糖尿病マウスにおいて、 $Gipr^{+/+}$ と $Gipr^{-/-}$ の間で血糖、脂質、クレアチニンなどの血液生化学パラメーターに差は認められなかった。 $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの尿中アルブミンの変化を図 2 に示す。興味深いことに $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの尿中アルブミン値は、 $Gipr^{+/+}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスと比較して観察期間中、有意に高値を示していた。GFR については、30 週齢時に測定を行った。 $Gipr^{+/+}$ と $Gipr^{-/-}$ の C57BL/6-Akita 糖尿病マウスはともに糸球体高血圧を反映して GFR の上昇を示していたが、両者の GFR は同等であった (図 3)。

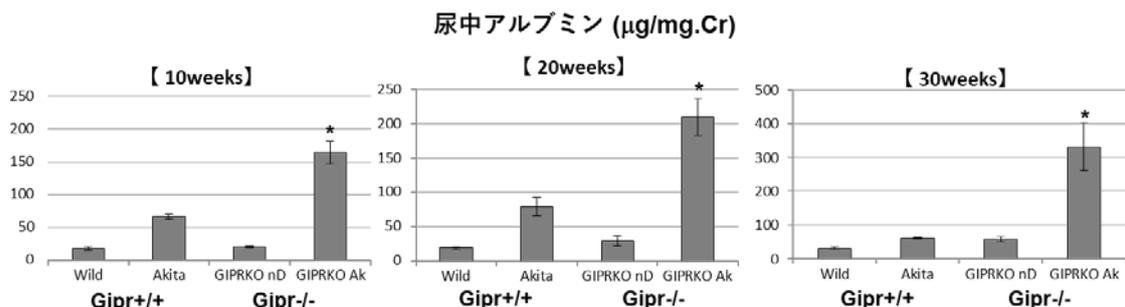


図 2. $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの尿中アルブミンの経時的変化

(Wild: $Gipr^{+/+}$ C57BL/6-WT マウス、Akita: $Gipr^{+/+}$ C57BL/6-Akita マウス、GIPRKO nD: $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-WT マウス、GIPRKO Ak: $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita マウス、* P<0.01 vs. Akita)

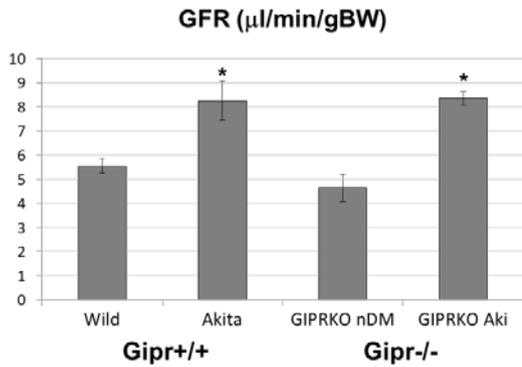


図 3. 30 週齢時 $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの GFR
 (Wild: $Gipr^{+/+}$ C57BL/6-WT マウス、Akita: $Gipr^{+/+}$ C57BL/6-Akita マウス、GIPRKO nDM: $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-WT マウス、GIPRKO Aki: $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita マウス、* $P < 0.01$ vs. Wild)

30 週齢時における $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの腎組織像を図 4 に示す。PAS 染色での糸球体病変の解析から、 $Gipr^{+/+}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスに比して、 $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの糸球体ではメサンギウム基質の顕著な増加がみられ、糖尿病性糸球体硬化が進行することが明らかとなった。さらに、Masson trichrome 染色による解析から、 $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの腎臓では間質の線維化が進行することも確認された。

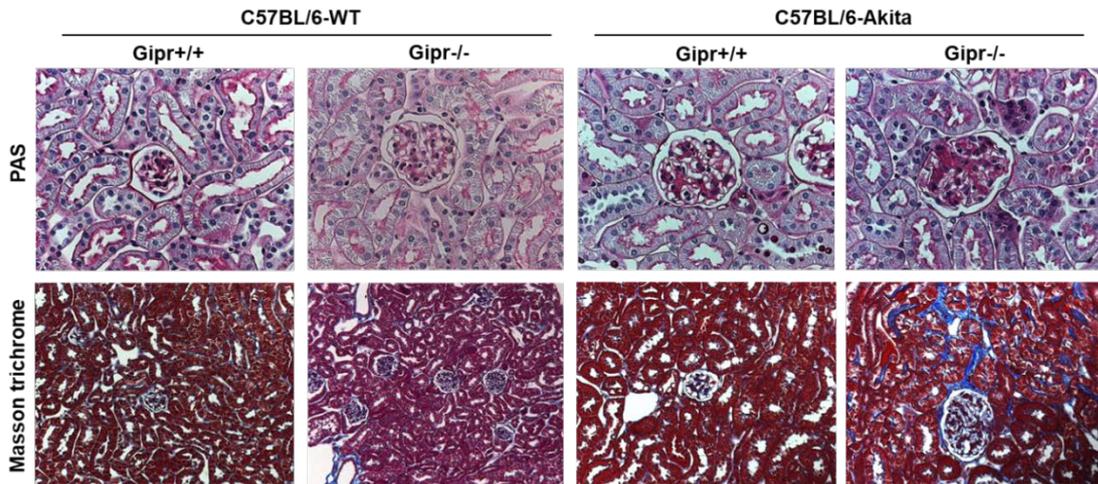


図 4. 30 週齢 $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの腎組織像

30 週齢時における $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの腎酸化ストレスの状態について、MDA 染色にて評価を行った。MDA 染色像を図 5 に示す。 $Gipr^{+/+}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスに比して、 $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの腎臓では、糸球体上皮細胞と尿管管上皮細胞管腔側を中心に MDA の強い染色シグナルを認め、酸化ストレスの増加が観察された。

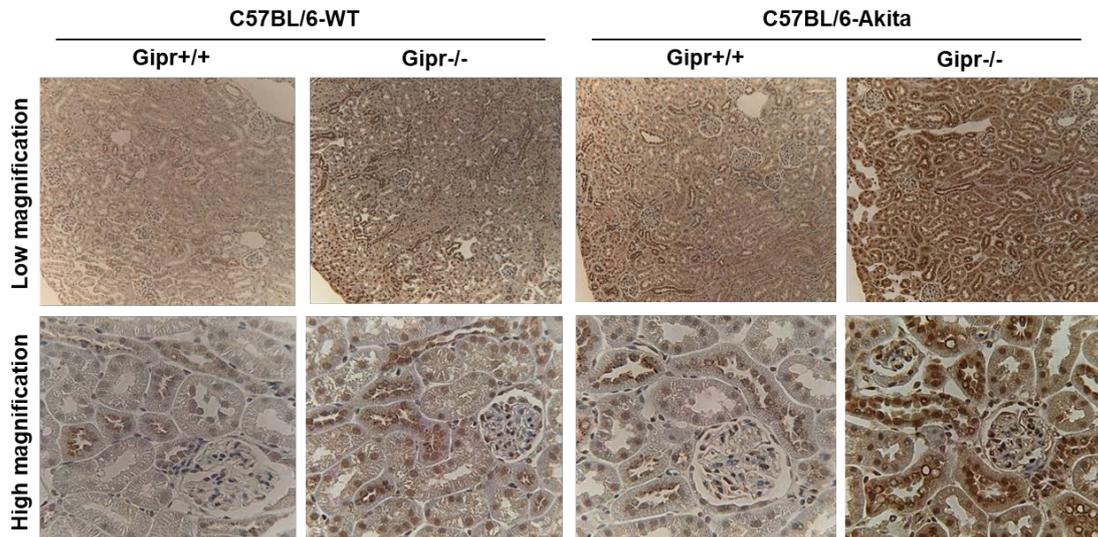


図 5. 30 週齢 $Gipr^{-/-}$ C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの腎 MDA 染色像

(3) Gipr^{-/-} KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの腎病変

30 週齢時における Gipr^{-/-} C57BL/6-Akita 糖尿病マウスの腎病変の進行が確認されたことから、進行性腎症を発症する KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの GIPR を欠損させることで、腎症のさらなる進展がみられるのか解析を行った。20 週齢時における PAS 染色での糸球体病変の解析から、Gipr^{+/+} KK/Ta-Akita 糖尿病マウスはメサンギウム基質の顕著な増加およびメサンギウム領域の拡大等、進行した糖尿病性糸球体硬化病変を示していたが、Gipr^{-/-} KK/Ta-Akita 糖尿病マウスでも同等な糸球体病変を示しており、進行性腎症マウスモデルである KK/Ta-Akita 糖尿病マウスにおいては、GIPR 欠損によるさらなる腎病変の進行は観察されなかった。腎酸化ストレスの状態については、MDA 染色にて評価を行った。Gipr^{+/+} KK/Ta-Akita と Gipr^{-/-} KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの両マウスは腎酸化ストレスの増加を反映して、糸球体上皮細胞と尿細管上皮細胞において強い MDA 染色シグナルを示していたが、両マウス間での MDA 染色シグナルの程度に差はみられなかった。また、Gipr^{+/+} KK/Ta-Akita と Gipr^{-/-} KK/Ta-Akita 糖尿病マウスは同程度の血糖値を示しており、KK/Ta-Akita 糖尿病マウスにおいても GIPR 欠損による耐糖能への影響はみられなかった。

(4) 進行性腎症を発症する KK/Ta-Akita 糖尿病マウスに対する GIP 補充療法の腎症進展抑制効果

引き続き GIP 補充療法が KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの腎病変の進行を抑制し得るか検討を行った。浸透圧ポンプを用いて Gipr^{+/+} KK/Ta-Akita 糖尿病マウスに対し、human GIP を 4 週間投与後に血中 Total GIP レベルの測定を行い、human GIP 投与群での血中 Total GIP レベルの上昇を確認した。血糖、脂質、血漿クレアチニン値については、KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの対照群と human GIP 投与群の間で有意な差はみられなかった。尿中アルブミンについても、KK/Ta-Akita 糖尿病マウスにおいて human GIP 投与前後で有意な変化はみられなかった。また、PAS 染色像では KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの対照群と human GIP 投与群は同程度の進行した糖尿病性糸球体硬化所見を示しており、MDA 染色にて評価した腎酸化ストレスの状態についても MDA 染色シグナルは両群で同程度のレベルを示しており、KK/Ta-Akita 糖尿病マウスに対しては human GIP 投与による腎症の進展抑制効果はみられなかった。

(5) 研究成果のまとめと今後の展望

はじめに、我々はこれまでに GLP-1R は腎臓内では糸球体係蹄壁と血管壁において豊富に発現していることを明らかにしてきた (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)。本研究の結果から、腎臓内での GIPR の発現量は GLP-1R と比較してかなり少ないこと、また GIPR は腎臓内では糸球体、尿細管、集合管、血管など、広範囲に局在して発現していることが判明した。糖尿病腎での GIPR シグナルの役割を解明するため、腎症発症に抵抗性を示す C57BL/6-Akita マウスの GIPR を欠損させることで腎臓内 GIPR シグナルを減少させたところ、アルブミン尿の増加や糖尿病性糸球体硬化などの腎病変の進行とともに腎酸化ストレスの増加が確認された。我々はこれまでに腎臓内 GLP-1R シグナルが cAMP/PKA を介して抗酸化作用を発揮することを報告してきたが (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)、腎臓内 GIPR シグナルについても抗酸化作用を介して腎保護的に働いている可能性が示唆された。しかしながら、進行性腎症を発症する KK/Ta-Akita マウスに対する GIP 補充療法においては、腎臓内 GIPR シグナル増加による腎症進展抑制効果は確認できなかった。腎臓における GIPR の発現量が GLP-1R に比してかなり少なく、GIPR シグナルによる十分な抗酸化作用を発揮できないことがその理由として挙げられる。したがって、2 つの主要なインクレチン GLP-1 と GIP はともに抗酸化作用を介して腎保護的に働いているが、腎臓内では GLP-1R シグナルの方が中心となって腎保護の役割を担っていると結論付ける。糖尿病腎において程度は低い GIP は抗酸化作用を介して腎保護的に働いているようであり、GLP-1 と GIP の両者の併用療法による腎保護の相加的効果が期待されることから、腎症に対する新たな治療戦略としての確立を目指し、今後さらなる研究を遂行していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 奈良光彦、藤田浩樹、藤嶋広美、大友瞳、山田芙久子、清水辰徳、佐藤雄大、森井宰、山田祐一郎
2. 発表標題 糖尿病腎症におけるGIP受容体シグナルの役割の検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Fujita
2. 発表標題 Extra-pancreatic actions of incretin beyond its glucose-lowering effect
3. 学会等名 11th Asian Association for the Study of Diabetes (AASD) Scientific Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田浩樹
2. 発表標題 インクレチン関連薬による腎保護効果の可能性
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田浩樹
2. 発表標題 インクレチンホルモンによる腎保護効果の可能性
3. 学会等名 第30回日本糖尿病性腎症研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

秋田大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝・老年内科学講座ホームページ
<http://www.med.akita-u.ac.jp/~rounen/index.html>

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	山田 祐一郎 (YAMADA YUICHIRO) (60283610)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	