

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890148

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症における糸球体内皮細胞内インスリンシグナルの働き

研究課題名(英文) Glomerular endothelial insulin signaling in diabetic nephropathy

研究代表者

美馬 晶 (MIMA, Akira)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00432401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞特異的IRS1過剰発現マウス(EC-IRS1Tg)を確立した。in vitroにおけるインスリンシグナルを確認したところリン酸化Akt、eNOSともにWTに比べインスリン無刺激で2倍程度上昇していた。インスリン刺激はリン酸化Akt、eNOSをともに上昇させたが、WTに比してEC-IRS1Tgでは1.5～2倍上昇していた。EC-IRS1Tgの左室、大動脈、大腿動脈、筋肉におけるリン酸化AktはWTに比べ1.5～4倍と著明に増加していた。EC-IRS1Tgは糖尿病により増加する尿中8-OHdG排泄量、糸球体細胞外基質増加を減少させた。

研究成果の概要(英文)：Insulin-induced phosphorylation of Akt and eNOS were significantly increased in primary lung endothelial cells from endothelial cells specific overexpression of IRS1 transgenic mice (EC-IRS1 Tg). Further, in vivo study, increases in these phosphorylation were recognized in left ventricle, femoral artery and muscle. Diabetes-induced increases in urinary 8-OHdG and mesangial expansion were ameliorated in EC-IRS1 Tg.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 インスリンシグナル 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

全世界において糖尿病患者が急速に増加する昨今、糖尿病性腎症をはじめ、糖尿病による種々の合併症の正確な診断と予防の確立は国民の健康障害にとって最も重要な国家的な問題である。増大する医療費の抑制にとっても重要な実現すべき社会的課題である。現在、年間1兆円を超える透析患者の治療は単純な薬剤による予防では発症時期を送らせることは可能であるが、治療としては不十分であり、末期腎不全患者を減少させることは不可能である。従って糖尿病性腎症の病態を解明し、その確かな診断法、予防法、治療法開発は今日の国民健康障害の対策としては国家が取り組むべき最重要命題である。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症の病理学的変化は主に糸球体に現れるが従来の研究は主にメサンギウム細胞、ポドサイトからのアプローチが大半を占める。本研究では今まで明らかにされてこなかった糖尿病性腎症における腎糸球体内皮細胞機能不全を中心に、責任分子の同定と病態形成におけるシグナル伝達機構の全貌を解明し、適切な手段を用いた新たな診断法、予防・治療法を開発するものである。

本研究の目的は糖尿病性腎症の進展における腎糸球体内皮細胞機能不全に焦点を絞り、他の糸球体構成細胞(メサンギウム細胞、ポドサイト)との細胞間クロストークの解析を行い、得られた知見を腎臓病学の病態生理に応用し、将来的に新たな治療法を開発することである。

3. 研究の方法

血管内皮特異的 IRS1 発現トランスジェニックマウス(EC-IRS1Tg)の確立

血管内皮特異的プロモーターには従来から知られている Tie-1, Tie-2, eNOS, PECAM-1, P-selectin などがあげられるがこれらのプロモーターは血球系細胞や平滑筋細胞にも発

現することが明らかになっている。そこで申請者は血管内皮発現特異性が非常に高い VE-cadherin プロモーターを使用し、ヒト IRS1cDNA を組み込むことで transgene を作成する。確立した EC-IRS1 Tg をストレプトゾトシンで糖尿病に誘導、あるいは高脂肪食を与え、その後アルブミン尿の計測、腎病変の検討を行う。これらの実験で腎糸球体内皮細胞における IRS1 の腎保護作用を示す。さらに培養糸球体内皮細胞、ポドサイト、メサンギウム細胞を用い、細胞間クロストークの検討を行う。既に糸球体内皮細胞にアデノベクターを用いて IRS1 を過剰発現するとインスリンシグナルが増強し、一酸化窒素(NO)が増加することを示している。予備実験では高血糖、あるいはアンジオテンシン II によるポドサイトアポトーシスは NO ドナーによって抑制されることを確認している。高血糖によるメサンギウム細胞における細胞外基質増加が NO ドナーにより減少するかどうか変化を検討する。

糖尿病性心血管合併症への応用

糖尿病を合併した透析患者が閉塞性動脈硬化症、足壊疽を来しやすいことが知られている。糖尿病性心血管合併症に対する効果的な治療方法を確立する必要が急務である。EC-IRS1 Tg による下肢虚血モデルを作成、虚血からの回復過程メカニズムを分子レベルで検討する。共同研究者らのグループ(科研費研究分担者、連携研究者にはなっていない)は下肢虚血部位にインスリンを局所的、且つ持続的に投与すると新生血管数の著明な増加、下肢血流の著明な改善を示すことを明らかにしている。このことは局所インスリンシグナルの増加が下肢虚血の回復に重要であることを示しており、申請者が作成する EC-IRS1 Tg による血管内皮特異的インスリンシグナル増強が下肢虚血の回復に対して効果的であることが期待される。さらに、冠動脈結紮モデルや腎動脈結紮モデルを検討

することで、血管内皮インスリンシグナル増強による様々な虚血性心血管合併症の治療方法を確立することを目指す。

共同研究者のグループは血管内皮細胞特異的インスリンレセプターノックアウトマウス、Apo e ノックアウトマウスとの交配によるダブルノックアウトマウスが通常の Apo e ノックアウトマウスに比べ著明な動脈硬化を呈することを示している。このことは血管内皮局所におけるインスリンシグナル異常が動脈硬化進展に寄与することを意味し、申請者の EC-IRS1 Tg が動脈硬化を軽減する可能性を示唆する。

4. 研究成果

血管内皮細胞特異的 IRS1 過剰発現マウス (EC-IRS1Tg) を確立した。EC-IRS1Tg から血管内皮細胞 primary culture を行い、western blotting を行うことでタンパクレベルでの IRS1 の発現確認を行った。その結果、EC-IRS1 Tg における IRS1 の発現は野生型 (WT) に比べ、2 倍程度増加していた (図 1)。次にインスリンシグナルを確認したところリン酸化 Akt、eNOS とともに WT における血管内皮細胞に比べインスリン無刺激で 2 倍程度上昇していた。インスリン刺激はリン酸化 Akt、eNOS をともに上昇させたが、WT に比して EC-IRS1Tg では 1.5~2 倍上昇していた (図 2)。各組織におけるインスリンに対する反応を検討したところ EC-IRS1Tg の左室、大動脈、大腿動脈、筋肉におけるリン酸化 Akt は WT に比べ 1.5~4 倍と著明に増加していた。しかしながら脂肪組織では両者間で差は認めなかった (図 3)。高脂肪食によるインスリン抵抗性状態で EC-IRS1Tg が腎保護作用を示すかどうか現在検討中である。WT、EC-IRS1Tg に高脂肪食を与え、インスリン抵抗性を誘発した。腹腔内ブドウ糖負荷試験、腹腔内インスリン負荷試験いずれにおいても両者間で有意差は認められなかった。下大

静脈よりインスリン (10mU/g) を投与し、腎皮質におけるインスリンシグナルを確認したところ EC-IRS1Tg におけるリン酸化 Akt、eNOS は共に WT に比べ 1.2~1.3 倍増加していた。ストレプトゾトシンにより糖尿病を誘発し、酸化ストレスマーカーとして尿中 8-OHdG を計測したところ EC-IRS1Tg では WT に比べ尿中 8-OHdG 排泄量は 50% 近く減少していた。さらに、糖尿病誘発後 6 か月の腎皮質を用いた western blotting において fibronectin、IV 型コラーゲンの増加は EC-IRS1Tg では WT に比べ 30~40% 抑制されていた。これらのことから糖尿病状態、インスリン抵抗性状態をもたらす系球体内皮細胞内インスリンシグナルの阻害は系球体内皮細胞特異的に IRS1 を過剰発現することで回復し、さらに腎保護作用をもたらす可能性が示唆された。

また、前述の共同研究者のグループは本マウスと Apo e ノックアウトマウスを交配することで動脈硬化病変に対する影響を検討した。その結果、EC-IRS1 Tg は動脈硬化を抑制することが明らかになった。血管内皮細胞内のインスリンシグナルを回復するとともに、各種炎症マーカーを低下させることがそのメカニズムと考えられた (学会発表 5)。今後、あまねく糖尿病性血管合併症に本研究から得られた知見、すなわち血管内皮細胞内インスリンシグナルを応用することを考えている。



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 6 件)

Mima A, Matsubara T, Endo S, Murakami T, Hashimoto Y, Use of a polysulfone hemodialysis membrane may prevent recurrent posterior reversible encephalopathy syndrome in a patient undergoing hemodialysis, *Int Urol Nephrol*, 46, 255-60, 2014 査読有

Li Q, Park K, Li C, Rask-Madsen C, Mima A, Qi W, Mizutani K, Huang PL, King GL, Induction of Vascular Insulin Resistance, Endothelin-1 Expression, and acceleration of atherosclerosis by the overexpression of protein kinase C β isoform in the endothelium, *Circ Res*, 113, 418-27, 2013 査読有

Park K, Li Q, Rask-Madsen C, Mima A, Mizutani K, Winnay J, Maeda Y, D'Aquino K, White MF, Feener EP, King GL, Serine Phosphorylation Sites on IRS2 Activated by Angiotensin II and Protein Kinase C To Induce Selective Insulin Resistance in Endothelial Cells, *Mol Cell Biol*, 33,3227-3241, 2013 査読有

Nagai K, Miyoshi M, Kake T, Fukushima N, Matsuura M, Shibata E, Yamada S, Yoshikawa K, Kanayama HO, Fukawa T, Yamaguchi K, Izaki H, Mima A, Abe N, Araoka T, Murakami T, Kishi F, Kishi S, Tominaga T, Moriya T, Abe H, Doi T, Dual involvement of growth arrest-specific gene 6 in the early phase of human IgA nephropathy, *PLoS One*, 8, e66759, doi: 10.1371, 2013 査読有

Mima A, Diabetic nephropathy: protective factors and a new therapeutic paradigm, *J Diabetes Complications*, 27, 526-30, 2013 査読有

Mima A, Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: new insights on its inhibition as new therapeutic targets, *J Diabetes Res*, 2014, doi: 10.1155/2014/207140, 2013 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

美馬 晶、土井 俊夫 慢性腎臓病 第 23 回日本医療薬学会年会 仙台国際センター (宮城県) 2013 年 9 月 21 日

美馬 晶 慢性腎臓病(CKD)の診断、経過観察に必要な検査 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会 あわぎんホール (徳島県) 2013 年 9 月 1 日

美馬 晶 インクレチン製剤を用いた糖尿病性腎症の新治療戦略 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会 あわぎんホール (徳島県) 2013 年 8 月 31 日

Mima A, King GL, Doi T: Selective insulin receptor substrate 1 and its functions in glomeruli of diabetic and insulin resistant rats, 2012 American Society of Nephrology Annual Meeting, サンディエゴコンベンションセンター (アメリカ サンディエゴ) 2012 年 11 月 1 日

Direct demonstration that overexpression of IRS1 and enhanced insulin actions in vascular endothelial cells can reduce atherosclerosis: Park K, Mima A, Li Q, Rask-Madsen C, Chen H, King GL. 73rd annual meeting of American Diabetes

Association, マコーミックプレイス(アメリカ シカゴ) 2013 年 6 月 21 日

Mima A, Li Q, Mizutani K, Park K, Rask-Madsen C, King GL: The effects of diabetes and angiotensin on the loss of glucagon-like peptide-1's protective actions in diabetic endothelial glomerulopathy, 72nd annual meeting of American Diabetes Association, ペンシルバニアコンベンションセンター (アメリカ フィラデルフィア) 2012 年 6 月 10 日

Park K, Li Q, Rask-Madsen C, Mima A, Feener EP, Winnay J, King GL: Serine phosphorylation (Ser303) of IRS2 by angiotensin II (AngII) inhibits insulin activation of p-Akt/eNOS in endothelial cells, 72nd annual meeting of American Diabetes Association, ペンシルバニアコンベンションセンター (アメリカ フィラデルフィア) 2012 年 6 月 10 日

Mizutani K, Mima A, Park K, King GL: Obesity induced insulin resistance in gingival tissue and periodontitis via PKC activation and oxidative stress, 72nd annual meeting of American Diabetes Association, ペンシルバニアコンベンションセンター (アメリカ フィラデルフィア) 2012 年 6 月 10 日

Li Q, Park K, Li C, Rask-Madsen C, Mima A, King GL: Endothelial over expression of PKC β 2 accelerates the development of atherosclerosis, 72nd annual meeting of American Diabetes Association, ペンシルバニアコンベンションセンター (アメリカ フィラデルフィア) 2012 年 6 月 9 日

Mizutani K, Jeong I, Mima A, Li Q, Park K, Rask-Madsen C, Mooney DJ, King GL: Diabetes causes persistent insulin resistance and impairment of angiogenic function of mesenchymal stem cells (MSC) by protein kinase C β (PKC) activation, 72nd annual meeting of American Diabetes Association, ペンシルバニアコンベンションセンター (アメリカ フィラデルフィア) 2012 年 6 月 9 日

〔図書〕(計 3 件)

美馬 晶、土井 俊夫

Na⁺/グルコース共役輸送担体(SGLT2)阻害薬

SGLT、GLUT の遺伝子調節と腎性尿糖

Diabetes Frontier 24(6) 784 (707-710)

2013

美馬 晶、土井 俊夫

脱水 老年医学講義テキスト 327(121 - 123)2013

美馬 晶

腎不全 歯科医師のための医学ハンドブック 222 (85-87)2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美馬 晶 (MIMA Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号: 00432401

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: