

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670455

研究課題名(和文)系球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系障害と糖尿病腎症との関連の検討

研究課題名(英文)The role of insulin signaling pathway on the development of diabetic nephropathy

研究代表者

鈴木 康志(Kaburagi, Yasushi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・臓器障害研究部長

研究者番号：40342927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：系球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系と糖尿病腎症との関連を検討するため、系球体上皮細胞特異的ノックアウト(KO)マウスを作製し、腎機能への影響を解析した。KOマウスは生後3週齢よりアルブミン尿を呈し、腎機能不全により10週齢までに死亡した。KOマウス腎臓では系球体上皮細胞の腫大、および足突起消失が認められ、週齢の経過とともに系球体硬化病変やPAS陽性尿円柱を有する尿細管が観察された。本研究において、系球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系の障害は高度蛋白尿を誘発し、系球体上皮細胞の機能制御において重要な働きを担うことが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of insulin signaling pathway in podocytes on the development of diabetic nephropathy. The podocyte-specific knock-out mice were generated using the Cre-mediated recombination controlled by the podocin promoter. Knock-out mice was developed proteinuria around 3 week-old age, and died due to end stage renal failure by 10 weeks after birth. Histologically, features characteristic of focal segmental glomerular sclerosis, including podocyte foot process effacement, mesangial sclerosis, and casts, were observed in the kidney of knock-out mice. Podocytes isolated from knockout-mice also exhibited the lowered autophagic activity as indicated by an increased abundance of p62 and a decreased abundance of LC3B-II. These findings suggest that dysregulation of insulin signaling pathway in podocytes may be involved in the pathogenesis of podocyte injury, leading to proteinuric kidney disease.

研究分野：糖尿病学

キーワード：系球体上皮細胞 インスリンシグナル伝達系

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病患者数は増加の一途をたどっており、約 2050 万人にも上ると試算される糖尿病有病者の減少は急務の課題であることはもちろん、医療経済学においても深刻な問題となりつつある。申請者は平成 2 年から東京大学附属病院の門脇孝助手（当時）の指導の下でインスリン作用伝達機構についての研究を行った。インスリン受容体の膜直下領域に体系的に部位特異的の変異を導入した変異受容体発現細胞や遺伝子改変マウスの詳細な解析により、insulin receptor substrate (IRS)、および phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の協力関係がインスリンシグナル伝達に重要であることを明らかにした (Nat Genet 21:230-235, 1999; J Clin Invest 105:1437-1445, 2000; Diabetes 50:1455-1463, 2001; Diabetologia 44:992-1004, 2001)。平成 13 年に国立国際医療センター研究所に着任後は、培養細胞や臨床検体を用いた糖尿病関連タンパク質のプロテオーム解析に取り組んでいる。2 型糖尿病モデルマウス血清を用いた標識ショットガンプロテオーム解析では 2 型糖尿病の発症早期より関連するタンパク質の同定に成功した (J Proteomics 84:40-51, 2013)。また、透析導入された患者の原疾患第一位として対策が求められている糖尿病腎症については、早期腎症患者尿蛋白を用いた 2 次元電気泳動、ならびに非標識定量ショットガンプロテオーム解析を行い早期腎症と関連する複数のタンパク質マーカーの同定に成功した (特願 2013-173382 (2013/08/23 出願))。

なお、糖尿病腎症の発症・進展では一般に尿中アルブミン量の増加が認められるが、これは糸球体ろ過バリア機能を有する糸球体上皮細胞の障害や消失が主な原因であると考えられている。2010 年に Welsh らは、podocyte におけるインスリン受容体の欠損が高血糖を伴わずに急速なアルブミン尿、ならびに腎糸球体硬化病変形成を引き起こすことを遺伝子改変マウスにより証明した (Cell Metabolism 12:329-340, 2010)。インスリン抵抗性は 2 型糖尿病のみならず 1 型糖尿病患者の腎症進展においても重要な原因の一つであると考えられており (Kidney Int 62:963-970, 2002)、インスリン抵抗性の改善は腎症の効果的な治療戦略となる可能性がある。

2. 研究の目的

糖尿病腎症の発症・進展におけるインスリンシグナル伝達分子の関与を検討するため、糸球体上皮細胞特異的なインスリンシグナル伝達分子欠損マウスを作製し、代謝表現型解析や糖尿病腎症の進展の程度を病理学的に評価する。併せて糸球体上皮細胞障害や消失を引き起こす分子基盤を *in vivo*, *in vitro* にて解析する。

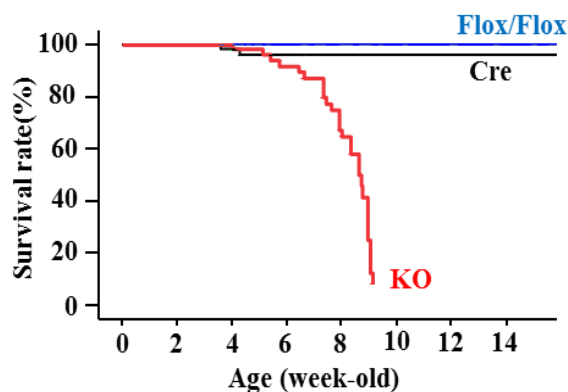


図 1. KO、および対照マウスの Kaplan-Meier 曲線

3. 研究の方法

糸球体上皮細胞特異的ノックアウトマウス (KO) の作製は、podocin-Cre トランスジェニックマウスと flox マウスとの交配による Cre-loxP システムを用いて作製した。KO の代謝表現型や腎組織病理像は対照 Cre マウス、ならびに flox マウスと比較し解析した。

4. 研究成果

KO マウスは生後 3 週齢頃よりアルブミン尿を呈し 10 週齢までに全例死亡した ( $n=75$ 、図 1)。KO マウスの血糖値は対照マウスと同程度であったものの、7 週齢では血清アルブミン、総タンパク値の有意な低下、および尿素窒素、クレアチニン、K 値の有意な上昇が認められたことから、KO マウスの死因は末期腎不全によるものと考えられた。KO の腎組織病理学的解析では 4 週齢から既に分節性の糸球体硬化病変が観察され、週齢の経過とともに全糸球体硬化病変や、PAS 陽性尿円柱を有する尿細管が多数観察された (図 2)。電子顕微鏡による観察でも 4 週齢 KO マウスにて糸球体上皮細胞の腫大、ならびに足突起消失が認められ

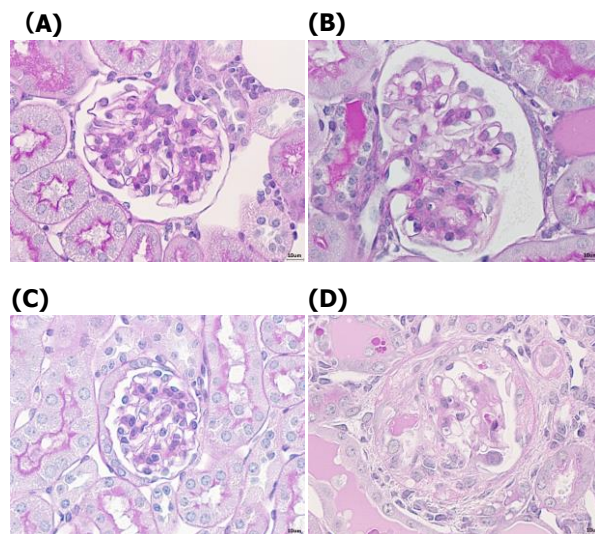


図 2. KO、および対照マウスの腎組織像 (A) 6 週齢対照 flox、(B) 6 週齢 KO、(C) 8 週齢対照 flox、(D) 8 週齢 KO

た。なお、K0 マウスの糸球体基底膜厚は対照群と同程度だった。

さらに K0 マウスからの単離培養糸球体上皮細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。K0 マウスにて発現上昇した遺伝子群を対象とするパスイ解析により glutathione-mediated detoxification、oxidative stress などが抽出され、糸球体上皮細胞における酸化ストレス亢進が推察された。さらに K0 マウス糸球体上皮細胞ではオートファジー誘導に関連する FIP200、Atg101 遺伝子の発現低下とともに LC3-II 量の低下と細胞内 p62 蓄積量の増加が認められ、糸球体上皮細胞におけるオートファジー障害が示唆された。

以上から、糸球体上皮細胞におけるインスリンシグナル伝達系の障害は高度蛋白尿を誘発し、糸球体上皮細胞の機能制御において重要な働きを担うことが示された。

#### 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 5 件)

- ① Sakai M, Tujimura-Hayakawa T, Yagi T, Yano H, Mitsushima M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Inoue H, Kido Y, Kasuga M, Matsumoto M. The GCN5-CITED2-PKA signalling module controls hepatic glucose metabolism through a cAMP-induced substrate switch. *Nat Commun* (2016) 7:13147. 査読有  
DOI:10.1038/ncomms13147
- ② Okumura A, Unoki-Kubota H, Yoshida-Hata N, Yamamoto-Honda R, Yamashita S, Iwata M, Tobe K, Kajio H, Noda M, Katai N, Yamagoe S, Kaburagi Y. Reduced serum level of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is associated with the presence of diabetic retinopathy. *Clin Chim Acta*. (2016) S0009-8981, 30440-30445. 査読有  
DOI:10.1016/j.cca.2016.10.031
- ③ Okumura A, Takahashi E, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y. *Biosci Trends*. A novel angiogenic peptide,  $\Delta$ ADT: A truncated adrenotensin peptide revealed by

secretory peptidome analysis of human retinal pericytes. *Biosci Trends*. (2016) 10, 500-506. 査読有  
DOI:10.5582/bst.2016.01189

- ④ Takahashi E, Unoki-Kubota H, Shimizu Y, Okamura T, Iwata W, Kajio H, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Yamashita S, Tobe K, Okumura A, Matsumoto M, Yasuda K, Noda M, Kaburagi Y. Proteomic analysis of serum biomarkers for pre-diabetes using the LEA rat, a spontaneous animal model of type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*, in press. 査読有  
DOI:10.1111/jdi.12638
- ⑤ 鍋木 康志. 糖尿病合併症研究における質量分析装置の有用性、糖尿病合併症 31, 62-65, 2016. 査読無

[学会発表] (計 19 件)

- ① 鍋木 康志. プロテオミクスを用いた糖尿病、ならびに糖尿病性細小血管症診断マーカー探索研究の現状と課題. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016. 5. 19-21 京都 口頭発表
- ② 高橋 枝里、久保田 浩之、本田律子、志賀 智子、奥村 彰規、梶尾 裕、野田 光彦、鍋木 康志. 非標識定量プロテオーム解析による糖尿病腎症の尿中関連蛋白質探索. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016. 5. 19-21 京都 口頭発表
- ③ 久保田 浩之、岩田 和希子、加藤 秀樹、清水 章、松本 道宏、南学 正臣、春日 雅人、鍋木 康志. Tuberous sclerosis complex 2の糸球体上皮細胞における役割の検討. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 2016. 5. 19-21 京都 口頭発表
- ④ 岩田 和希子、久保田 浩之、松本 道宏、寺内 康夫、春日 雅人、鍋木 康志. 糸球体上皮細胞におけるtuberous sclerosis complex 2の役割と腎機能への影響の解

- 析. 第53回日本臨床分子医学会学術集会  
2016. 4. 15-16 東京 ポスター発表
- ⑤ 鏑木 康志. 糖尿病合併症研究における  
質量分析装置の有用性. 第31回日本糖尿病  
病合併症学会 2016. 10. 7-8 仙台 口頭  
発表
- ⑥ 高橋 枝里、久保田 浩之、本田律子、奥  
村 彰規、梶尾 裕、山下 滋雄、野田 光  
彦、鏑木 康志. 非標識定量プロテオミ  
クス法による糖尿病腎症関連尿蛋白質の  
同定 第31回日本糖尿病合併症学会  
2016. 10. 7-8 仙台 口頭発表
- ⑦ 岩田 和希子、久保田 浩之、加藤 秀樹、  
清水 章、松本 道宏、寺内 康夫、南学  
正臣、春日 雅人、鏑木 康志. 糸球体上  
皮細胞におけるmTORC1の役割と腎機能へ  
の影響の解析. 第31回日本糖尿病・肥満  
動物学会年次学術集会 2017. 2. 10-11  
横浜 口頭発表
- ⑧ Unoki-Kubota H, Takahashi E,  
Yamamoto-Honda R, Shiga T, Okumura A,  
Kajio H, Noda M, Kaburagi Y. Label-free  
quantitative urinary proteomic  
analysis for discovering biomarkers of  
diabetic nephropathy. Keystone  
symposia Diabetes: New Insights into  
Molecular Mechanisms and Therapeutic  
Strategies, Kyoto, October, 2015.
- ⑨ 久保田 浩之、高橋 枝里、本田律子、志  
賀 智子、奥村 彰規、梶尾裕、野田光彦、  
鏑木 康志. 非標識定量プロテオミクス  
法による糖尿病腎症関連尿マーカーの探  
索. 第30回日本糖尿病合併症学会, 名古  
屋, 11月, 2015.
- ⑩ 奥村 彰規、高橋 枝里、久保田 浩之、鏑  
木 康志. 網膜周皮細胞の分泌ペプチド  
ーム解析で得られた新規鎖長ペプチドΔ  
ADTの機能解析. 第30回日本糖尿病合併  
症学会, 名古屋, 11月, 2015.
- ⑪ 高橋 枝里、久保田 浩之、清水 有紀子、  
奥村 彰規、岡村 匡史、本田 律子、梶  
尾 裕、野田 光彦、鏑木 康志. 非肥満  
性2型糖尿病モデルラットLEAラットの  
血清プロテオーム解析による2型糖尿病  
関連因子の探索. 第58回日本糖尿病学会  
年次学術集会, 下関, 5月, 2015.
- ⑫ 久保田 浩之、高倉 美智子、奥村 彰規、  
高橋 枝里、岩田 和希子、本田 律子、梶  
尾 裕、野田 光彦、鏑木 康志. 尿中  
serine protease inhibitor A3と糖尿病  
腎症との関連の検討. 第58回日本糖尿病  
学会年次学術集会, 下関, 5月, 2015.
- ⑬ 高橋 枝里、久保田 浩之、清水有紀子、  
奥村 彰規、岡村 匡史、本田 律子、梶  
尾 裕、野田 光彦、鏑木 康志. 非肥満  
性2型糖尿病モデルラットLEAラット血清  
を用いた2型糖尿病関連蛋白質の探索.  
第52回日本臨床分子医学会学術集会, 京  
都, 4月, 2015.
- ⑭ Takahashi E, Unoki-Kubota H, Shimizu Y,  
Okumura A, Okamura T, Noda M, Kaburagi  
Y. Proteomic Analysis of Serum  
Proteins in LEA Rat, a New Rat Model of  
Nonobese Type 2 Diabetes Mellitus.  
American Diabetes Association 74th  
Scientific Sessions, San Francisco,  
USA, June, 2014.
- ⑮ Okumura A, Unoki-Kubota H, Matsushita  
Y, Shiga T, Yamamoto-Honda R, Kajio H,  
Noda M, Kaburagi Y. Serum leukocyte  
cell-derived chemotaxin 2 levels are  
decreased in patients with diabetic  
retinopathy. 第37回日本分子生物学会  
年会, 横浜, 11月, 2014.
- ⑯ 久保田浩之, 高倉美智子, 高橋枝里, 岩  
田和希子, 本田律子, 志賀智子, 梶尾裕,  
野田光彦, 鏑木康志. 糖尿病腎症患者に  
おける尿中serine protease inhibitor

A3濃度の検討. 第29回日本糖尿病合併症学会, 東京, 10月, 2014.

- ⑰ 久保田浩之, 岩田和希子, 奥村彰規, 姜美子, 梶尾裕, 野田光彦, 鏑木康志. 糖尿病腎症患者における血清可溶性LDL receptor relative with eleven binding repeats濃度の検討. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪, 5月, 2014.
- ⑱ 高倉美智子, 久保田浩之, 本田律子, 梶尾裕, 野田光彦, 鏑木康志. 非標識定量プロテオミクス法を用いた糖尿病腎症早期診断マーカーの探索. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪, 5月, 2014.
- ⑲ 高橋枝里, 久保田浩之, 清水有紀子, 奥村彰規, 岡村匡史, 鏑木康志. 糖尿病モデルLEAラットの血清プロテオーム解析とヒト2型糖尿病患者における検討. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪, 5月, 2014.

[図書] (計 1 件)

- ① 久保田浩之, 鏑木康志, 山岸昌一. アンチエイジングのための100の質問. 太田博明 監修, 山岸昌一 編, メディカルレビュー社, 東京, p66-67, 2014.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgm-dmcomp.umin.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鏑木 康志 (KABURAGI, Yasushi)

国立国際医療研究センター・研究所・糖尿病研究センター・臓器障害研究部・部長

研究者番号: 40342927

### (2) 研究分担者

久保田 浩之 (KUBOTA, Hiroyuki)

国立国際医療研究センター・研究所・糖尿病研究センター・臓器障害研究部・室長

研究者番号: 40323290