

## 論文の内容の要旨

論文題目 Stimulatory effect of insulin on renal proximal tubule NBCe1-dependent sodium transport is preserved in insulin resistance

(インスリン抵抗性でもインスリンの近位尿細管の NBCe1 によるナトリウム輸送機能は保たれる。)

中村 元信

近年、心血管疾患の危険因子として、内臓肥満、耐糖能異常、脂質代謝異常、高血圧などが知られており、これらを包括した疾患として、メタボリック症候群が提唱されている。メタボリック症候群には、環境要因や個人差なども関与するが、その基盤に高インスリン血症が存在する。高インスリン血症が持続することにより、インスリン抵抗性や耐糖能異常が出現し、Ⅱ型糖尿病発症にもつながると考えられている。本邦を含め先進国等では、Ⅱ型糖尿病は慢性腎臓病や末期腎不全の原因疾患の第一位であるが、病態や進展機序については不明な点が多い。これらの患者の増悪因子として、高血圧があるが、临床上は、体液貯留を合併する症例が多く、腎機能の低下のみでは説明が困難な体液貯留を認める症例もある。また、インスリン抵抗性は、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) を介して高血圧の発症に関与していることが報告されている。インスリン抵抗性と高血圧の関係については、様々な議論がなされているが、高インスリン血症の持続が高血圧発症の一因とも考えられている。インスリンには PI3 キナーゼ/Akt 経路を介した NO 産生による血管拡張作用があることが知られているが、インスリン抵抗性が出現すると NO 産生が低下し、血管拡張作用が低下することが知られている。さらに、高インスリン血症が腎臓でのナトリウムの再吸収亢進に関与していることも報告されている。インスリン受容体は、近位尿細管から集合管までの全てに発現しており、全てナトリウムの再吸収に関与していることが報告されており、特に近位尿細管ではナトリウムだけではなく、水の再吸収亢進も行っていることが知られている。

インスリンシグナル伝達系には主に 2 つの基質 (IRS1・IRS2) が知られているが、筋肉、肝臓、脂肪など臓器によって主たる基質が異なることが知られているが、腎臓については、報告が少ない。近年、IRS1 と IRS2 のノックアウトマウスにより、IRS2 が腎尿細管では主である可能性が示唆されている。また、インスリン抵抗性改善薬の一つであるチアゾリジンは、副作用として、体液貯留が知られている。その原因として、近位尿細管でのナトリウム再吸収を亢進させることも近年報告されている。インスリン抵抗性においてもインスリンの尿細管 Na 再吸収亢進作用が保たれているかどうかを明らかにするために、今回よりヒトに近い肥満から高インスリン血症となりインスリン抵抗性を呈し、糖尿病となることが知られているラットとして、OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat) を使用し、コントロールとして、LETO (Long-Evans Tokushima rat) を使用し高インスリン血症と近位尿細管でのナトリウム再吸収について研究した。また、同様な事象がヒトでも起こり得るかどうかについても、腎悪性腫瘍患者の検体をインスリン抵抗

性のある症例とない症例に分け、検討した。

検討方法として、インスリン抵抗性については、脂肪細胞のブドウ糖取り込み能力がインスリン刺激により保たれているかどうかをラットとヒトの脂肪細胞を使用し確認した。ブドウ糖取り込み量の確認方法として、ブドウ糖に蛍光色素ついた 2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) を使用した。また、ナトリウム再吸収については、近位尿細管を単離し、蛍光色素である BCECF/AM (2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) を使用し、細胞内 pH 測定・NBCe1 ( $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  cotransporter) の活性を同定し、ラットとヒトの NBC1 活性を同定比較することにより、NBC1 の調節機構の種差についても検討した。また、腎臓では IRS1/IRS2 どちらが主の経路であるかについても検討した。インスリン抵抗性は、 $\text{HOMA-IR} = 2.6$  をカットオフ値とした。

まず、Wistar rat を使用し、インスリンの近位尿細管 NBCe1 刺激作用が PI3K を介していることを証明した。また、si-RNA による遺伝子発現抑制実験により近位尿細管インスリン作用では IRS2 が主であることを確認した。次に、インスリン抵抗性存在下での脂肪細胞のインスリン刺激によるブドウ糖取り込み能および、尿細管でのインスリン刺激によるナトリウムの再吸収亢進作用について検討した。肥満により高インスリン血症およびインスリン抵抗性が発症する OLETF ではインスリン刺激によるブドウ糖取り込み能は著しく減弱していたが、近位尿細管でのインスリン刺激によるナトリウムの再吸収亢進作用は完全に保たれていた。インスリンシグナル伝達経路についても確認したところ、OLETF では、インスリン刺激による Akt のリン酸化が脂肪細胞では低下しており、肝臓、筋肉、脂肪組織の IRS1/IRS2 mRNA の両方ともが減少していた。しかしながら、近位尿細管では Akt のリン酸化および IRS2 mRNA 発現は保たれていた。腎皮質では IRS2 蛋白の発現量も保たれていた。

次に、ヒトでも同様の検討を行った。ヒトでもラットと同様に、インスリン抵抗性が存在するとインスリン刺激によるブドウ糖取り込み能は著しく減弱していたが、近位尿細管でのインスリンによる NBCe1 活性亢進作用については、インスリン抵抗性に関係なく、保たれていた。同様に、インスリン抵抗性が存在すると、インスリン刺激による Akt のリン酸化が脂肪細胞では低下していたが、近位尿細管ではインスリン抵抗性に関係なく、Akt のリン酸化は保たれていた。また、インスリン抵抗性が存在すると脂肪組織では IRS1 と IRS2 mRNA が共に減少していたが、尿細管では IRS2 mRNA の発現は保たれていた。

以上のことから、腎臓では IRS2 が主の経路であり、インスリンは IRS2/PI3K/Akt を介してシグナルが伝わり NBCe1 を活性化することによりナトリウム再吸収が亢進することが示された。インスリン抵抗性ではインスリンの血管拡張作用が減弱すること合わせ、高インスリン血症による腎 Na 再吸収亢進が高血圧発症の一因となっていることが強く示唆された。