

## 7 協力者への結果の開示

得られた研究結果は協力してくださった患者様 1 人 1 人に報告させていただきます。

## 8 研究成果の公表

研究終了後、1 年以内に学会報告および学術誌への投稿にて公表の予定です。

## 9 研究から生じる知的財産権の帰属

研究によって得られた知的財産権は協力者には帰属いたしません。

## 10 研究終了後の試料取扱の方針

今回の臨床研究の試料としては、サンプルとして血液・新鮮尿がありますが、双方とも通常の外来で施行している既存の臨床検査の検体であり、検査終了後、臨床検査室で通常の方法で医療廃棄物として破棄されます。また、今回の研究にて得られたデータおよび匿名化に使用する連結表は、研究終了後も 5 年間、本研究代表者である個人情報管理者が鍵のかかった場所に暗号化可能 USB にて保存させていただきます。

## 11 費用負担に関する事項

採血、検尿は通常の臨床検査であり保険診療内の部分は協力者に負担していただきます。通常診療と比較して、研究参加に伴う追加的な費用負担は一切ございません。

## 12 問合せ先

研究代表者：慶應義塾大学医学部腎内分泌代謝内科 講師 脇野 修

連絡先 03-5363-3428

ご協力宜しくお願い致します。

第 1.0 版 平成 23 年 1 月 11 日作成  
研究協力の同意書

慶應義塾大学  
医 学 部 長 殿

私は、腎性インスリン抵抗性症候群に対するアルドステロンブロッカーの治療効果の研究（研究題目）について、\_\_\_\_\_より説明文書を用いて説明を受け、研究の目的と方法、私が協力して行う次の研究協力事項（診療情報の提供、エプレネロン内服、採血、検尿、画像検査）とその危険性について理解し、研究協力に同意します。

説明を受け理解した項目（□の中にご自分でレを付けて下さい。）

- 1 研究目的
- 2 研究協力の任意性と撤回の自由
- 3 研究方法・研究協力事項
- 4 研究協力者にもたらされる利益および不利益
- 5 個人情報の保護
- 6 研究計画書等の開示
- 7 協力者への結果の開示
- 8 研究成果の公表
- 9 研究から生じる知的財産権の帰属
- 10 研究終了後の試料取扱の方針
- 11 費用負担に関する事項
- 12 問い合わせ先

説明実施日 年 月 日

同意日 年 月 日

（署名または捺印） \_\_\_\_\_

住所 \_\_\_\_\_

電話 \_\_\_\_\_

研究実施責任者

脇野 修

## プロトコール（エプレネロン投与）

・倫理審査許可日～1年間に当院腎臓内分泌代謝内科外来を受診した外来患者より①糖尿病性腎症患者は除く②Cr 2.0mg/dl以下③K 5.0mEq/l以下④血中Ald 200以上⑤HOMA-IR 1.6以上、の5つの項目を満たす症例の中より患者を抽出し、外来で説明した順に薬剤投与群、薬剤非投与群（コントロール群）をくじ引きで振り分ける。（投与群 40名、非投与群 40名）

・外来で同意を得られた患者は下記検査を行う

採血(CBC, TP, Alb, BUN, CRTNN, UA, Na, K, Cl, Ca, IP, HgbA1c, GA, TG, HDL-C, LDL-C, AST, ALT, ALP, GGTP, TB, ANP, BNP, ARC, Ald,)、検尿(Na, K, Cl, Ca, IP, BUN, CRTNN, TP, B2M, NAG, A1M,)、Xp、心電図、心エコー、頸動脈エコー、ABI、PWV、頭部CT

・エプレネロン投与群にはエプレネロン 25mg/日の投与を開始する。採血、検尿のF/Uは下記のスケジュールで行う。薬剤非投与群は、4ヶ月後の採血、検尿、また30ヶ月後および60ヶ月後の採血、検尿、Xp、心電図、心エコー、頸動脈エコー、ABI、PWV、頭部CTは必須であるが、その他の検査は必要に応じて行う。

	0(月)	1-4(月)	6-28(月)	30(月)	33-57(月)	60(月)
採血	○	○ (1回/1カ月)	○ (1回/2カ月)	○	○ (1回/3カ月)	○
検尿	○	○ (1回/1カ月)	○ (1回/2カ月)	○	○ (1回/3カ月)	○
レントゲン	○	○ (1回/1カ月)	○ (1回/2カ月)	○	○ (1回/3カ月)	○
心電図	○			○		○
頸動脈エコー	○			○		○

心エコー	○			○		○
頭部 CT	○			○		○
ABI	○			○		○
PWV	○			○		○
CAVI	○			○		○

・エプレネロン中止の基準としては、高カリウム血症が最も問題となる副作用であるが、具体的には血清カリウム値が 1.0mEq/L 以上上昇する、もしくは絶対値として 5.5mEq/L を超える場合はエプレネロン投与中止とする。また、すべての薬剤に共通する副作用として、考えられる肝機能障害、腎機能障害、薬疹、などが出現した際には、ただちに介入打ち切りとする。その他、介入にて、患者の自覚症状が悪化し、患者より中止の希望があった場合は例外なく介入打ち切りとする。さらに副作用伴う打ち切りが高頻度である場合；副作用伴う打ち切りが全体の 20%を超えた場合、研究の中止とする。ただし最初の 10 症例までは、3 例の打ち切り例が出るまで臨床研究を継続する。薬剤投与による効果が明らかにならないと判断した場合；短期的な効果がまず判断されるが（4 ヶ月～6 ヶ月に HOMA-IR でインスリン抵抗性を評価する）、統計学的に薬剤投与による効果が明らかにならないと判断された場合は（HOMA-IR がエプレネロンにより改善しないと判断された場合）、その時点で、長期的な効果も含めて臨床研究の中止とする。（この項目は研究者の主観的な判断が入るため、研究グループ内で十分議論検討する。）

・研究終了後、統計学的な検討を行う。

添付資料 3

症例数(男性/女性)	24(15/9)
年齢(歳)	64.3±4.2
BMI	23.2±0.81
Systolic blood pressure (mmHg)	126.4±5.7
Diastolic blood pressure (mmHg)	79.2±4.1
eGFR(ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	56.24±5.2
UA (mg/dl)	5.8±0.51
LDL-C(mg/dl)	108±5.0
TG(mg/dl)	121±8.8
FBS (mg/dl)	109±2.3
IRI(μU/ml)	15.9±2.8
HOMA-IR	3.36±0.51
Aldo (pg/ml)	212±7.8
K (mEq/L)	4.27±0.29

## 腎性インスリン抵抗性症候群の臨床的意義に関する研究

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

研究要旨 慢性腎臓病（CKD）にはインスリン抵抗性（IR）が存在し、Renal Insulin Resistance Syndrome（RIRs, 腎性インスリン抵抗性症候群）と呼ばれるが、その発症機序及び臨床的意義は明らかではない。今回我々は、当院腎臓内科外来患者に対して臨床研究を行い、CKDにおけるIR及び血中アルドステロン、尿細管障害との関連を単回帰分析、重回帰分析にて検討した。さらに、3年間のコホート研究にて腎性インスリン抵抗性症候群の臨床的意義を検討した。RIRsの発症にアルドステロンの影響が疑われ、CKD患者へのアルドステロンブロッカー投与でRIRsは改善した。さらにRIRsは尿細管障害を介して腎機能障害の進行を引き起こす可能性が示唆された。

### A. 研究目的

慢性腎臓病（CKD）にはインスリン抵抗性（IR）が存在し、Renal Insulin Resistance Syndrome（RIRs, 腎性インスリン抵抗性症候群）と呼ばれるが、その発症機序及び臨床的意義は明らかではない。一方で、IRはそれ自体で腎機能障害及びCVDを引き起こすことが知られているが、我々はCKDにおいてRIRsがCKD進行並びに心腎連関を引き起こす基盤病態ではないかと想定している。本研究の目的は、当院腎臓内科外来CKD患者について統計学的に、RIRsの発症機序及び臓器障害作用を検討することである。

### B. 研究方法

対象は当院腎臓病外来患者185名、空腹時血糖 $\geq 126$ mg/dL、GA $\geq 16.0\%$ は対象外とした。検討項目としては、eGFR；MDRD法（日本人換算式）、代謝パラメーター；空腹時インスリン血中

濃度（IRI）、空腹時血糖（FBS）、脂質データ、HOMA-IR、血中ホルモン値；アルドステロン（ALDO）、ACTH、活性化レニン濃度（ARC）、検尿パラメーター；尿 $\beta 2$ -microglobulin（ $\beta 2$ MG）、NAG、 $\alpha 1$ -microglobulin（ $\alpha 1$ MG）を測定し、各ステージごとにパラメータの分布を分散分析にて比較、相関が疑われるパラメーターにつき単回帰分析及び重回帰分析にて解析した。さらには3年間のコホート研究にて、HOMA-IRと腎機能障害進行の関連を検討した。

アルドステロンのRIRsに対する影響を検討するため介入試験を行った。対象は当院腎臓病外来患者12名、CKDstage2~3、HOMA-IR $>1.6$ 、血中アルドステロン値 $>200$ pg/mlの全てを満たすという条件で選定した。対象患者12名を無作為に2グループに分配し、1グループに対してはアルドステロンブロッカーであるスピロノラクトン25mg/日の投与、もう1グループは対象群として、

4ヶ月後の検査データを比較した。

C. 研究結果

1. CKDにおけるIR

、CKD Stage1は5名、Stage2は89名、Stage3は78名、Stage4は6名、Stage5は8名であった。各ステージ間に内服薬の有意な差は認められなかった。各CKDステージごとのパラメーターは、CKDステージが進行するに従い有意なIRI値の上昇、HOMA-IR値の上昇を認めた。(図1)また、単回帰分析では、HOMA-IRとIRIに対してeGFRが有意な相関を認め(図2)、腎性インスリン抵抗性症候群の存在が明らかとなった。

図1

	IRI( $\mu$ U/mL)	HOMA-IR
CKDstage1	8.38	2.17
CKDstage2	9.98	2.63
CKDstage3	10.87*	3.00*
CKDstage4/5	19.07**	5.06**

\*;p<0.05 vs. stage 1    \*\*;p<0.01 vs. stage 1

図2

a)

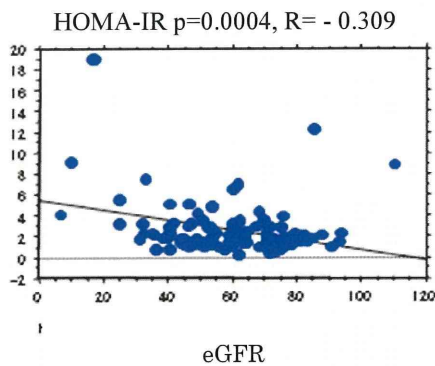
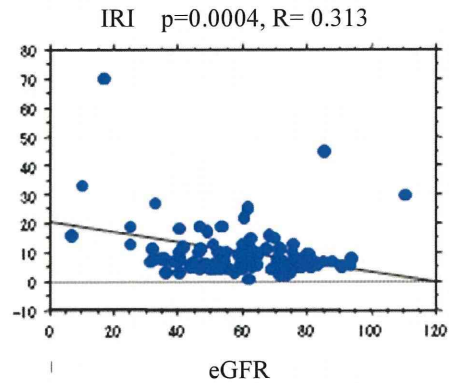


図2

b)



2. CKDにおけるeGFRとアルドステロン

CKDにおけるIRとアルドステロンとの関連を検討したところ、CKDステージが進行するに従い、HOMA-IRと血中アルドステロンが同様に上昇傾向であることが分かった。(図3)。さらにCKDにおいて、血中アルドステロンはeGFRと相関することが分かり(図4)、アルドステロン調節因子であるARC、K、ACTH、eGFRによる重回帰分析にてeGFRのみが採択され、CKDにおいて、eGFRがアルドステロンのもっとも強い調節因子である可能性が示唆された。(図5)

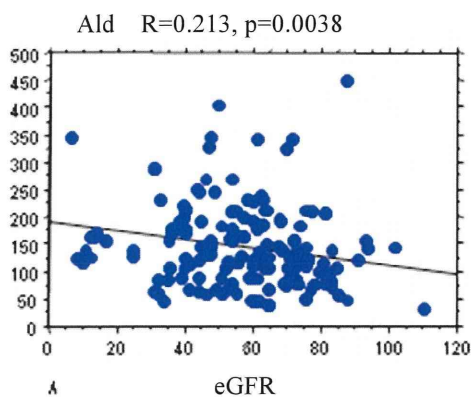
図3

	HOMA-IR	Ald(pg/ml)
CKDstage1	2.17	131.5
CKDstage2	2.63	130.8
CKDstage3	3.00*	156.2
CKDstage4/5	5.06**	168.2

\*;p<0.05 vs. stage 1    \*\*;p<0.01 vs. stage 1



図 4



	$\beta$ 値	P 値
TG	0.347	<0.0001
Ald	0.149	<0.0001
BMI	0.178	<0.0001
eGFR	-0.178	<0.0001

図 5

血中アルドステロンに対する ARC, ACTH, K, eGFR の重回帰分析  
eGFR のみが  $\beta$  値-0.874 で採択された

### 3. CKD におけるアルドステロンと糖代謝

次に CKD における血中アルドステロンと糖代謝の関連を検討したところ、HOMA-IR は血中アルドステロンと相関し (図 6)、さらに HOMA-IR に対する年齢・血圧・Hg・BMI 脂質代謝マーカー・測定したホルモン値の重回帰分析にても血中アルドステロンが採択され (図 7)、CKD における IR にはアルドステロンが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

以上より、CKD においては、CKD ステージが進行するに従い、血中アルドステロン値が上昇し、上昇した血中アルドステロンが IR を引き起こす可能性が示唆された。

図 6

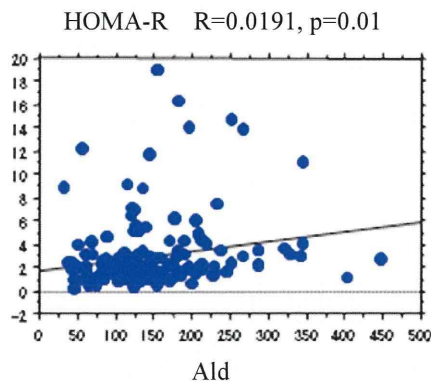


図 7

HOMA-IR に対する重回帰分析

TG, BMI, eGFR とともに Ald が採択された

	$\beta$ 値	P 値
eGFR	-0.874	0.0017

### 4. アルドステロン投与による RIRs の改善

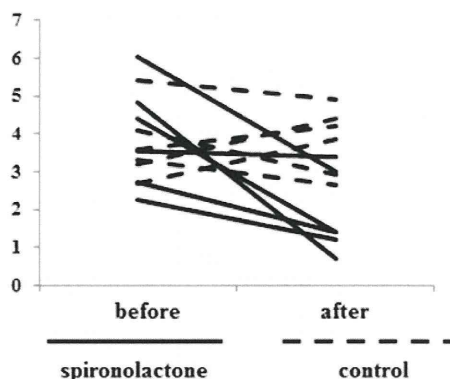
スピロラクトン投与群と、対象群間に年齢、BMI、血圧、脂質代謝マーカー、血清カリウム HOMA-IR を含めたパラメーターに有意差は認められなかった。内服薬に関しても 2 群間に有意さは認められなかった。

スピロラクトン投与開始 4 ヶ月後の HOMA-IR を比較したところ、血清カリウム値の上昇を伴うことなく、HOMA-IR の有意な改善を認めた。

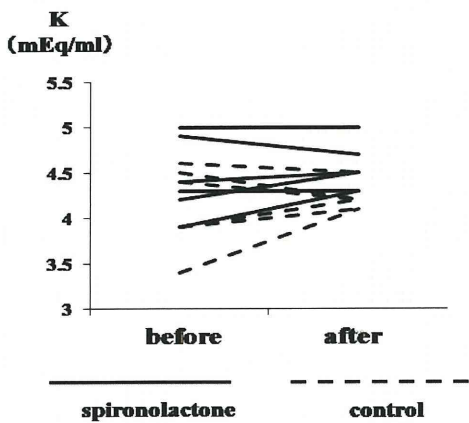
(図 8)

図 8

HOMA-IR







### 5. RIRs と尿細管障害

CKD において、尿細管障害がどのパラメーターで規定されているのかを検討するために、IRI と尿細管マーカーである  $\alpha 1 \text{MG}$  との単回帰分析をおこなったところ、有意な正相関が認められた (図 9)。さらに  $\alpha 1 \text{MG}$  に対する重回帰分析においても、eGFR とともに IRI が採択され (図 10)、CKD において、インスリンが尿細管障害を引き起こす可能性が示唆された。

図 9

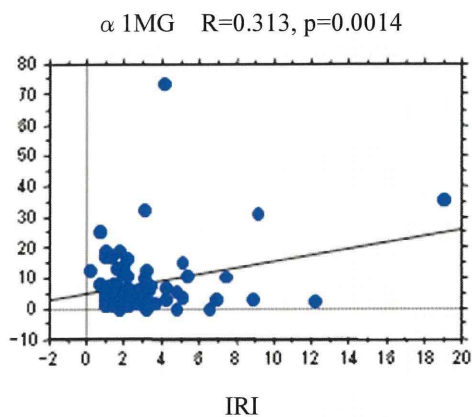


図 10

$\alpha 1 \text{MG}$  に対する重回帰分析

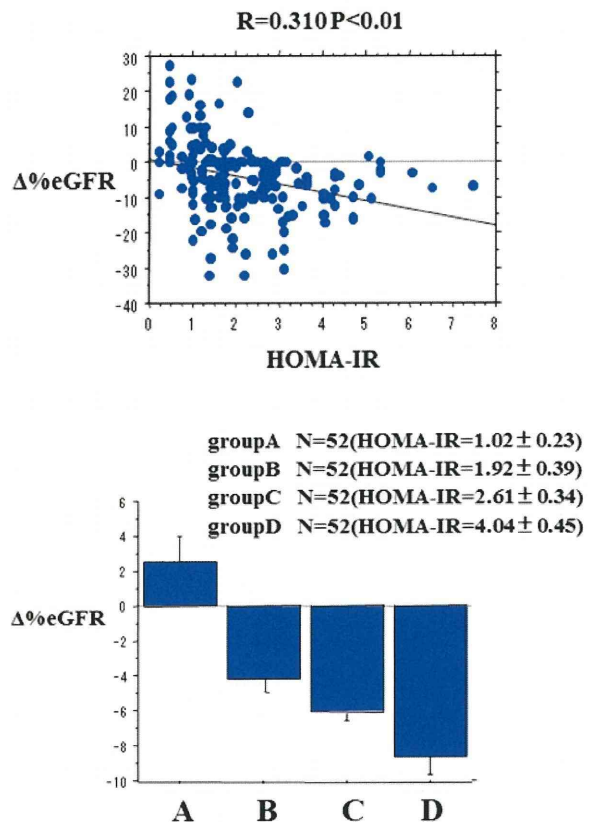
	$\beta$ 値	P 値
eGFR	-0.339	$P < 0.0001$
IRI	0.142	$P < 0.0001$

eGFR と IRI が採択された

### 6. RIRs の腎機能障害進行作用

3 年間の追跡調査で、HOMA-IR が高値である症例ほど、腎機能障害が進行していることがあきらかとなった。(図 11)

図 11



### D. 考察

CKD に伴う IR は以前より指摘されており、Renal Insulin Resistance Syndrome (RIRs, 腎性インスリン抵抗性症候群) と呼ばれるが、その発症機序及び臨床的意義は明らかにされていなかった。

本研究において、RIRs 発生機序には CKD の進行とともに上昇する血中アルドステロン濃度が関与している可能性が示唆された。CKD の進行にともなうアルドステロン血中濃度の上昇は、以前より指摘されており、その機序としては、血中 K 値の上昇および CKD 進行に伴うアルドステ

ロン尿排泄の低下が考えられている。また、アルドステロンがインスリン抵抗性を増悪させることも以前より指摘されており、その機序としては、アルドステロンによる血中 K 低下、酸化ストレス、炎症を介した間接的なものの他、アルドステロンがインスリン標的臓器の IRS-1 発現を低下させることによりインスリン感受性を低下させる直接的な機序も想定されている。アルドステロンブロッカーによる介入試験にても RIRs の改善が認められ、RIRs の発症機序にアルドステロンが関連している可能性がより強固となった。

インスリン抵抗性は、それ自体で高血圧、高脂血症、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（以下 RAA 系）および交感神経系の活性亢進、酸化ストレスの増大を介して臓器障害を引き起こすことが知られているが、本研究対象である CKD における IR に関しても同様な病態が予想される。つまり、CKD では、その進行にともない IR が引き起こされ、その IR がさらに CKD を進行させるという悪循環が形成されている可能性が示唆される。またこの RIRs が心腎連関の基盤病態となっている可能性も示唆される。RIRs の病態を解明しその治療を行うことで、CKD の進行を抑え、さらには CKD に伴う心血管イベントを抑制することが出来る可能性が示唆される。その RIRs の臓器障害の 1 つとして、本研究でしめした IRI と  $\alpha 1$  MG の関連は、インスリンの尿細管障害を示唆するデータである。また 3 年間のコホート研究では RIRs の腎機能障害作用が確認さ

れた。

#### E. 結論

CKD においては、IR が存在し、その発生機序にアルドステロンが関与している可能性が示唆された。さらに CKD における高インスリン血症は、尿細管障害を引き起こし、CKD の進行に関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

水口 齊, 脇野 修, 小松 素明, 金子 友香, 細谷 幸司, 藤村 慶子, 長谷川 一宏, 神田 武, 林 晃一, 伊藤 裕; 腎性インスリン抵抗性症候群と尿細管障害的意義, 心血管内分泌学会, 2011 年 11 月、大阪

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 腎性インスリン抵抗性症候群の発症機序に関する基礎的検討

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

研究要旨 <背景>慢性腎臓病（CKD）では、早期よりインスリン抵抗性（IR）が存在する。一方内因性の一酸化窒素合成酵素阻害物質 ADMA（asymmetric dimethylarginine）も CKD 早期より上昇し、心血管合併症発症の仲介物質として重要である。CKD での IR の発生における ADMA の役割につき CKD モデルラットおよび脂肪細胞を用いて検討した。<方法>5 週齢の SD ラットに腎臓摘出を施行しコントロール（C）群、1/2 腎摘群、5/6 腎摘群の 3 群を作成し、12 週間通常食にて飼育した。12 週後の血液生化学データ、耐糖能、分子生物学的変化を 3 群間で比較した。ADMA の血清濃度、組織濃度を ELISA 法で測定した。脂肪細胞を用いた検討では ADMA を 3T3L1-fibroblast が脂肪細胞に分化する過程で同時添加しその影響を検討した。<結果>3 群間に、血圧、体重、食事量の差は認めなかったが、腎摘群において血清クレアチニン値の軽度の上昇（C 群：0.33、1/2 腎摘群；0.43、5/6 腎摘群；0.50 mg/dl）、血清 ADMA 値、尿蛋白の有意な増加、そして OGTT およびインスリン負荷試験で有意な IR の増悪が認められた。臓器での IR をインスリン刺激後の腎臓、肝臓、筋肉、脂肪組織での Akt のリン酸化で検討したところ、脂肪組織のみで腎摘群において Akt のリン酸化の低下を認めた。組織の ADMA 濃度は脂肪組織においてのみ腎摘群で ADMA の上昇が認められた。3 群間に脂肪細胞のサイズに差は認められなかったが、腎摘群で白色脂肪組織重量の低下が認められた。さらに腎摘群の脂肪組織において PPAR $\alpha$  の発現の低下が認められた。脂肪細胞を用いた検討では ADMA 投与にて PPAR $\gamma$  が発現低下した。この脂肪組織の分化以上に伴って、5/6 腎摘ラットでは肝臓組織における脂肪の沈着が有意であった。<結論>CKD においてはその初期より IR が存在し、発生機序に脂肪組織での IR の関与、ADMA 濃度の上昇が示唆された。また、CKD に ADMA による脂肪細胞の成熟異常が関与する可能性が示唆され、この病態はリポディストロフィーの状態であると考えられた。

### A. 研究目的

インスリン抵抗性とはインスリン標的臓器におけるインスリンの生物作用が減弱下状と定義される。インスリン抵抗性の分子機構にはいくつかの報告があり、インスリン受容体自身、インスリ

ン受容体前、インスリン受容体後の細胞内シグナルの異常など様々な騎乗が報告されている。細胞内におけるインスリンシグナルの障害は最終的には細胞内へのブドウ糖の取り込みの障害となり、この障害を代償するために血液中のインスリン

濃度は上昇する。細胞内のインスリンシグナルにはいくつかのものがあるが、もっとも知られているのはPI-3 kinase (PI-3 キナーゼ)、Akt の経路である。この経路はインスリン特異的のものではなく、インスリン様成長因子 (IGF、insulin-like growth factor) も細胞に結合するとこの経路を活性化する。

临床上多くの疾患においてインスリン抵抗性が合併する。腎不全、慢性腎臓病もその一つでありこの病態は腎性インスリン抵抗性症候群と呼ばれている。腎不全、更に進んだ尿毒症にけるインスリン抵抗性の発症についてはおいくつかの機序が報告されている。ビタミンD欠乏、2次性副甲状腺機能亢進症、エリスロポイエチンの欠乏、代謝性アシドーシス、さらにある種の尿毒素物質の存在などがその病因の候補とされている。さらに近年軽度から中等度の慢性腎臓病においてもすでにグルコースクランプ法でインスリン抵抗性が認められることが明らかにされた。その病因としてインスリン感受性を亢進させるアディポネクチン (adiponectin) の血中レベルが低下していることが指摘されている。腎不全におけるインスリン抵抗性についてはインスリン標的組織の低向光性が全身におけるインスリン抵抗性の確立に重要であることが明らかにされている。しかしながら、臓器のインスリン抵抗性が重要であるかは明らかにされていない。

これまで多くの血液中の液性因子、組織の局所因子がインスリン抵抗性に関与することが明らかにされている。アディポサイトカインは脂肪組織から分泌される因子で肥満、メタボリックシンドロームにおけるインスリン抵抗性の原因因子とされている。TNF $\alpha$  や IL-6 などがその代表であり、これらはインスリン抵抗性を惹起する因子とし

て、肥満、メタボリックシンドロームの病態形成に深くかかわっている。近年内因性の一酸化窒素合成酵素阻害物質である asymmetrical dimethylarginine (ADMA) が脂肪細胞から分泌されることが明らかとなり、ADMA は adipocytokine であるということが認識されている。しかしながら腎不全の脂肪組織における ADMA の産生や、脂肪組織局所での ADMA レベルについての検討は明らかにされていない。

本研究ではラット 5/6 腎摘モデルを用い、腎不全におけるインスリン抵抗性の機序を明らかにする目的で各臓器におけるインスリン抵抗性を評価した。5/6 腎摘後のラットにおいては耐糖能異常、インスリン抵抗性、高インスリン血症が認められた。インスリンの静注後の各組織のインスリンシグナルの状況を検討したところ脂肪組織においてのみそのシグナルの減弱が認められていた。血液中および組織内の ADMA のレベルを検討したところ腎不全ラットで血液中の ADMA レベルは上昇しており、脂肪、腎臓、肝臓、筋肉の ADMA のレベルを検討すると、脂肪組織の ADMA レベルのみが腎不全において上昇していた。脂肪細胞の培養系を用いた検討では ADMA は脂肪細胞の分化を抑制することが明らかとなった。脂肪細胞の上昇した ADMA が脂肪細胞の分化を抑制しそれが脂肪組織のインスリン抵抗性を引き起こし、全身のインスリン抵抗性に寄与することが示唆された。

さらに近年慢性腎臓病と非アルコール性脂肪肝 (NASH) との関連が指摘されている。脂肪成熟障害を背景に CKD の状態はリポディストロフィーの状況であると考えられる。これを明らかにすることも本研究の目的である。

## B. 研究方法

130g から 140g の 6 週齢の雄性 SD ラット (チャールス・リバー社、神奈川) を用い実験を行った。各々のラットを代謝ゲージで飼育標準の餌を与え、水は自由飲水とした。餌は 1 日 15g とり、0.38% のナトリウム、0.97% のカリウム、25.1% のタンパクを含有する。ラットを 2 群に分けグループ 1 にはシャム手術を施行したラット 6 匹、グループ 2 には片腎を摘出したラット 6 匹、グループ 3 には 5/6 腎摘を施したラットを 6 匹実験に使用した。5/6 腎摘は従来の報告どおりまず左腎を 2/3 摘出し、その 1 週間後に右腎を全摘した。その後 12 週間通常食にて飼育した。12 週後の血圧、体重、血液生化学データ、蓄尿データ、耐糖能、分子生物学的変化を 3 群間で比較した。脂肪細胞を用いた検討としては 3T3L1-fibroblast を脂肪細胞に分化させる過程で、心腎連関仲介物質である ADMA を同時添加し、脂肪細胞分化に対する影響を解析した。

### C. 研究結果

#### ラットのデータ

収縮期血圧、体重は sham、1/2 腎摘群、5/6 腎摘群に有意差を認めなかった (図 1)。採血、検尿のデータをまとめたものを表 1 に示す。血清クレアチニン、尿蛋白は 1/2 腎摘、5/6 腎摘にて有意に上昇傾向であり、CKD モデルラットとして適切であると考えられた。血糖値は有意ではなかったが、5/6 腎摘群でやや低下しておりました。血中インスリン濃度は、1/2 腎摘群、5/6 腎摘群にて有意に上昇傾向であった。脂質マーカーは TC では 1/2、5/6 と上昇傾向であったが、TG、LDL-C とともに有意差は認めなかった。アディポネクチンは 3 群間に有意差を認めなかった。各群の OGTT と ITT のデータを図 2 および図 3 に示す。OGTT では 5/6 腎摘群、1/2 腎摘群に

おいて有意な耐糖能異常を認めた。また ITT では、15 分値にて有意なインスリン抵抗性を認めている。

#### インスリン標的臓器におけるインスリンシグナルの解析

インスリン抵抗性が CKD 動物にて認められることが確認されたが、どの臓器によってインスリン抵抗性が引き起こされているか検討した。インスリン標的臓器である、筋肉、肝臓、脂肪、腎臓、にて phospho-Akt の発現を確認したが、脂肪のみにてその発現が低下していた。このことより、CKD の脂肪組織では、インスリンシグナルの低下が起こっている可能性が示唆された (図 4)。インスリンシグナルの低下を認める原因として、インスリンレセプターの発現を確認したが、腎不全にてインスリン受容体の発現の変化は認められなかった。セリンリン酸化 IRS-1 の発現も確認しましたが、脂肪組織にてコントロール群・1/2 腎摘群・5/6 腎摘群に明らかな変化は認めなかった。以上より CKD おいて、肝臓、筋組織、腎臓ではインスリンシグナル伝達の異常は認めておりませんが、脂肪組織では IRS-1 セリンリン酸化、インスリンレセプター発現低下以外の何らかの原因で Akt のリン酸化障害が起こり、糖代謝障害が起こっていると考えられた。

#### CKD ラットにおける脂肪組織の解析

CKD モデルラットにおいて早期 CKD でインスリン抵抗性が認められ、さらに CKD では、脂肪組織において選択的にインスリンシグナルが減弱していることが確認されたが、それでは、インスリンシグナルの減弱が認められる脂肪組織はどうなっているかにつき検討した。まず脂肪組織の

重量を検討しましたが、腎不全群の精巢上体脂肪組織、腎周囲脂肪織双方で有意な脂肪重量の低下を認めた(図5)。CKD 脂肪組織におけるアディポサイトカインの RT-PCR の結果ですが、アディポネクチン、レプチン、TNF $\alpha$  ともに有意な変化を認めなかった(図6)。脂肪組織の組織所見では、腎不全群にて脂肪細胞のサイズの低下を認める印象を受け、脂肪細胞直径を比較したところ、CKD 群での有意な脂肪細胞直径低下を認めた(図7)。さらに脂肪細胞のサイズの分布を検討したが、コントロール群では直径が 75~90 $\mu$ m の細胞がもっとも多かったが、2 分の 1 腎摘群、6 分の 5 腎摘群では 75~90 $\mu$ m の細胞が減少し、60~75、45~60 の細胞の割合が増加していることがわかった(図8)。そこで、我々は CKD において脂肪細胞の分化成熟異常が起こっているのでは考えた。図9に in vitro での、3T3L1 細胞の脂肪細胞への分化過程をあらわす。脂肪細胞への分化は、まず CEBP $\beta$ 、CEBP $\delta$  の上昇がおこり、その後 CEBP $\alpha$ 、PPAR $\alpha$  の上昇が起こることにより完成され、PPAR $\gamma$  は脂肪細胞への分化に不可欠なものと考えられている。脂肪組織の PPAR $\gamma$  をリアルタイム PCR で解析したところ、図10の様に腎不全群にて有意な発現の低下を認めました。以上より、CKD においては脂肪細胞の分化成熟異常により、脂肪細胞の機能障害がおこり、インスリンシグナルの減弱、インスリン抵抗性が惹起されている可能性が示唆された。CKD にて脂肪組織の成熟異常を示唆するデータをもう一つ示す。図11のように腎不全への高脂肪食負荷では、腎不全群にて有意な体重の低下、脂肪重量の低下を認めた。組織所見としましては、1/2 腎摘群、5/6 腎摘群にて脂肪細胞肥大の著明な抑制が認められ、その変化は通常食での比較よりも顕

著であった。

#### 脂肪組織における ADMA の役割

腎不全ではどの物質が脂肪細胞の分化異常を引き起こしているかを次に検討した。我々は CKD における、心血管合併症発症の仲介物質 ADMA (asymmetric dimethylarginine) に注目し、ADMA の脂肪細胞に与える影響を検討した。ADMA の合成酵素・分解酵素がすべて脂肪細胞に発現していることより、ADMA は近年 adipocytokine としても注目されている。各群の血中 ADMA 濃度を測定したのですが、コントロール群と 5/6 腎摘群に有意差を認めるものの、コントロール群と 1/2 腎摘群では有意差は認めなかった(図12)。次に各組織の ADMA 濃度を測定したが、脂肪組織での ADMA 濃度の有意な上昇が認められた(図13)。この結果は脂肪組織特異的にインスリン抵抗性をきたす説明になりうると考えられた。

さらに脂肪肝の発症について検討した。肝臓組織内における脂肪含有について検討した。実際スダン III 染色を行い肝臓組織内の脂質を染色すると 5/6Nx 群で有意に脂肪沈着を認めた(図14)。Folch 法で測定される脂肪酸の組織含有量が 5/6Nx 群で有意に上昇していることが明らかとなった。(図15)。以上 CKD では脂肪細胞の成熟障害が認められ、その結果肝臓の異所性脂肪沈着が亢進していることが明らかとなった。

#### 脂肪細胞を用いた検討

脂肪細胞の培養系でこの事実を再現した。すなわち in vitro で ADMA 投与による脂肪細胞の分化障害を PPAR $\gamma$  の発現で評価したところ、ADMA

群にて有意な PPAR $\gamma$  の発現低下を認めた (図 16)。さらに ADMA とは、逆の効果を有すると考えられる cGMP 投与により、脂肪細胞 PPAR $\gamma$  の発現は上昇した。

次に ADMA が実際の脂肪細胞の分化を抑制するか脂肪細胞分化の系への添加実験で確認した。その結果 ADMA 投与で脂肪細胞の脂肪溜め込みが有意に低下し、分化マーカーも低下していることが明らかとなった。(図 17)

#### 考察

本研究では軽度の CKD においても全身のインスリン抵抗性が生じており、その原因として脂肪組織の成熟障害にある可能性が示唆された。インスリンは全身の糖および脂質代謝の主たる調節因子であるが骨格筋における糖利用が全身の糖利用の 70-90%を占めることが、脂肪における糖の取り込み、そしてエネルギー貯蔵の役割も重要である。このことは脂肪組織特異的なインスリン受容体欠損マウスのデータや臨床的に脂肪萎縮症における耐糖能異常や肥満の糖代謝異常から充分考えられる。

CKD においては、その初期よりインスリン抵抗性が存在し、発生機序に脂肪組織でのインスリン抵抗性の関与が示唆された。また、CKD におけるインスリン抵抗性には ADMA の影響と思われる脂肪細胞の成熟異常が関与する可能性が示唆された。脂肪組織においてインスリンシグナル伝達を抑制する因子として我々は内因性の一酸化酵素合成酵素阻害物質である ADMA に注目した。我々のデータにおいては ADMA は 5/5 腎摘ラットの脂肪組織局所においてのみ上昇しておりこのことは 5/6 腎摘ラットの脂肪組織においてのみインスリンシグナルが減弱させる起因物質

となりうると考えられたからである。本研究における脂肪組織における ADMA 濃度は 10.9 nmol/g タンパクであり、過去の報告の心臓組織局所における濃度 50.9nmol/g タンパクに匹敵する値である。さらに我々の予備データにおいては今回 in vitro で用いた ADMA 濃度 100mM を脂肪細胞に添加するとその後 ADMA は細胞内に取り込まれ、細胞内の ADMA 濃度は数 nmol/g タンパクのレベルとなり、したがってこのレベルの ADMA は充分インスリンシグナルを減弱させることが想定される。

ADMA は様々な組織において産生され、その細胞内濃度は主に産生と分解により調節される。前者をつかさどるものが PRMT (protein methyltransferase) であり、PRMT はアイソフォームが 1 から 7 存在する。後者をつかさどるものが DDAH (dimethylarginine dimethylaminohydrolase) であり、DDAH1 および DDAH2 の 2 つのアイソフォームが存在する。近年ヒトの脂肪組織における PRMT および DDAH の発現に関する検討が報告され、ADMA は脂肪組織内で合成されることが明らかとなっている。腎不全の脂肪組織内における ADMA の上昇に DDAH か PRMT のどのアイソフォームが関与するかが今後の検討課題である。

インスリンシグナルの減弱の意義を検討する目的で我々はまず腎不全脂肪組織におけるグルコーストランスポーター (glucose transporter、Glut) の発現を検討した。その結果 Glut1 および Glut4 の発現がともに腎不全ラットの脂肪組織において低下していることが明らかとなった。インスリンによる Glut の発現や活性調節については様々なメカニズムが提唱されているが転写レベルの調節も報告されている。脂肪組織における



Glut の発現低下は脂肪組織における糖取り込みの低下を引き起こす。これが全身のインスリンによる血糖低下作用の低下に寄与しうることは、脂肪組織特異的インスリン受容体欠損マウスが耐糖能異常を引き起こすことより明らかである。

つぎに我々は脂肪組織の成熟障害に着目した。インスリンは脂肪組織の分化を誘導する因子として重要であり、*in vitro* での分化誘導因子として用いられている。したがって腎不全ラットにおいては脂肪組織の分化異常が生じていることが想定される。我々のデータでは 5/6 腎摘ラットの脂肪細胞の径は小さく小型の細胞の割合が多いことが明らかとなった。この小型脂肪細胞が全身のインスリン抵抗性や全身の脂質代謝にどのような影響を及ぼすかをさらに検討したところ肝臓組織における脂肪沈着の亢進を認めた。

#### E. 結論

CKD においてはその初期よりインスリン抵抗性が存在し、発生機序に脂肪組織での IR の関与が示唆された。また、CKD におけるインスリン抵抗性には ADMA の影響と思われる脂肪細胞の成熟異常が関与する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

图 1

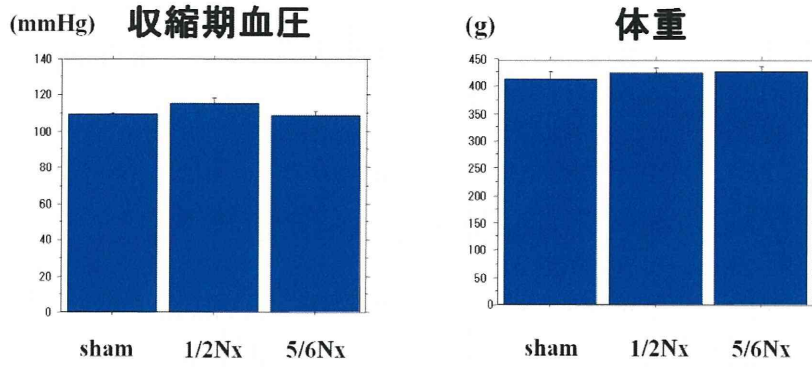


表 1

	Sham	1/2Nx	5/6Nx
TP (g/dl)	5.9±0.25	6±0.07	5.8±0.07
Alb(g/dl)	3.8±0.22	3.9±0.10	3.7±0.07
Creatinine(mg/dl)	0.32±0.014	0.43±0.015**	0.50±0.023**
FBS(mg/dl)	151±16.1	152±18.3	135±14.3
TG(mg/dl)	44.5±11.3	32±4.4	44.8±12.1
TC(mg/dl)	61.1±7.36	65.3±5.92	70.4±5.39
LDL-C(mg/dl)	9.0±0.85	8.7±0.57	9.6±0.10
Renin 活性 (ng/ml/hour)	13.1±1.39	7.4±0.53*	6.3±0.11*
Aldo(pg/ml)	213±23.0	244±28.6	166±18.1
Fasting Insulin(ng/ml)	1.30±0.073	1.51±0.093*	2.02±1.37*
尿蛋白(mg/day)	8.8±0.43	10.2±0.54*	16.9±1.60*
Adiponectin(ng/ml)	1214±208	1259±250	1161±152

图 2

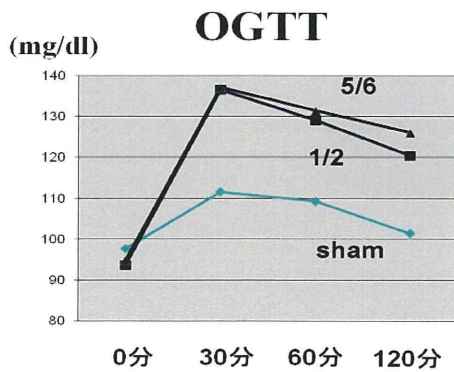


图 3

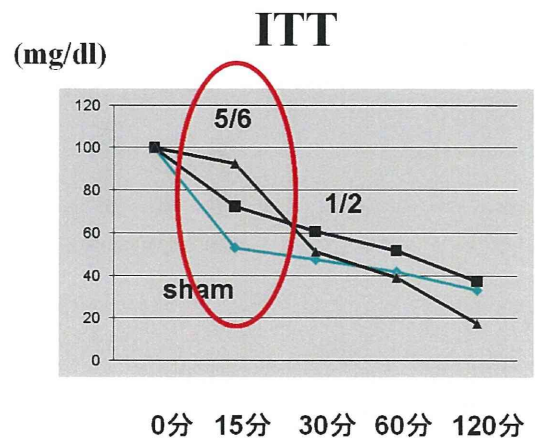


図 4

### インスリン標的臓器における インスリン刺激15分後のAktリン酸化

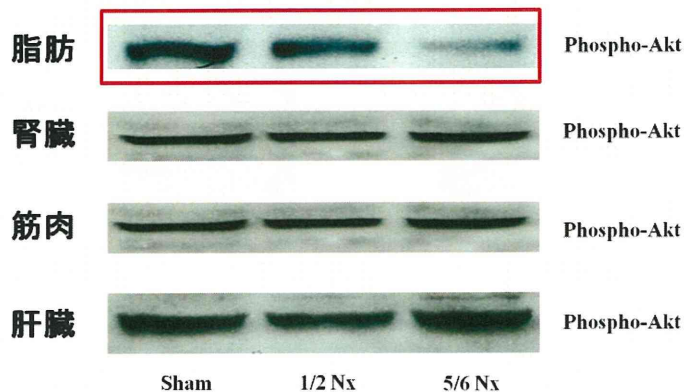
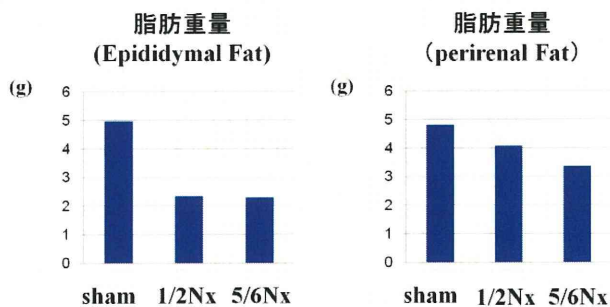


図 5

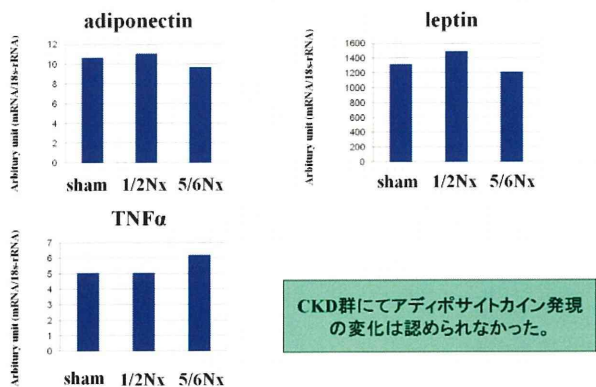
### 脂肪組織重量



CKD群で有意に脂肪重量の低下を認めた。

### 脂肪組織leptin、adiponectin、TNF $\alpha$ の発現

図 6



CKD群にてアディポサイトカイン発現の変化は認められなかった。

図 7

### 脂肪細胞組織所見と脂肪細胞直径

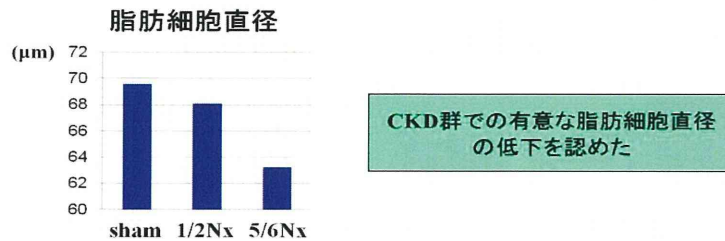
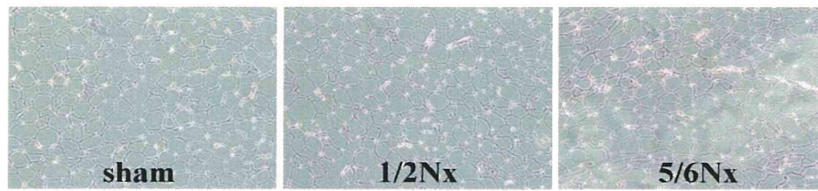
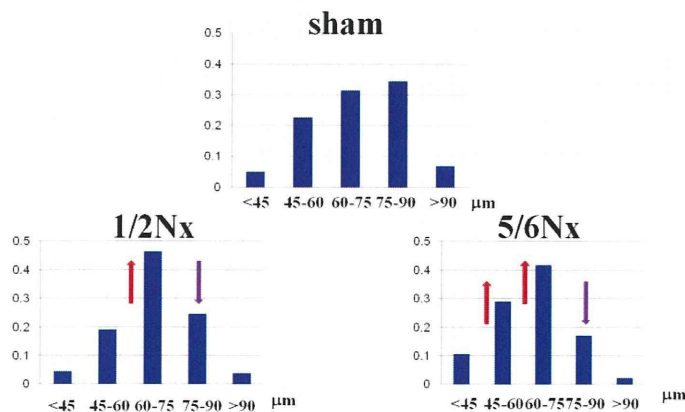


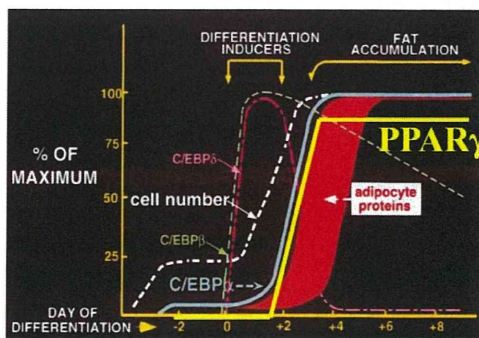
図 8

### 脂肪細胞の大きさの分布



脂肪細胞の分化、成熟異常が示唆される。

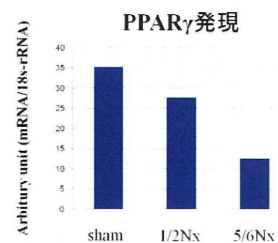
図 9



PPAR $\gamma$ は脂肪細胞への分化に不可欠である。

図 10

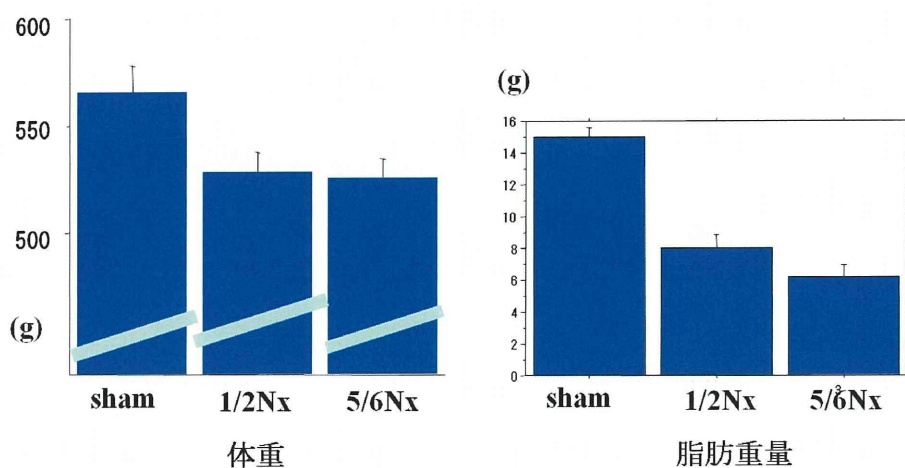
### 脂肪組織PPAR $\gamma$ 、RT-PCR結果



CKD脂肪組織でのPPAR $\gamma$ 発現の低下を認め脂肪細胞の分化、成熟異常が示唆された。

図 1 1

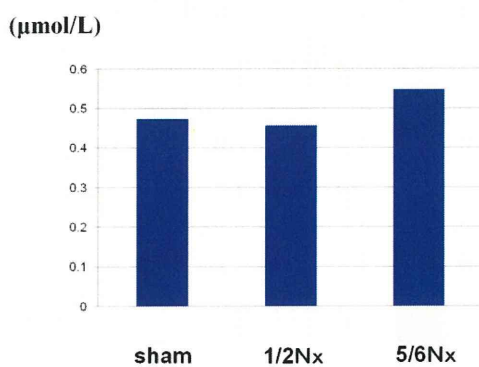
### 脂肪細胞、脂肪組織成熟異常を示唆するデータ CKDラットに対する高脂肪負荷(1ヶ月)



早期CKDは高脂肪食でも体重増加しない。脂肪重量が増加しない

図 1 2

### 血中ADMA濃度



CKDラットの血中ADMAはコントロール群と5/6腎摘群に有意差を認めるものの、コントロール群と1/2腎摘群では有意差は認めなかった。