

2012/5003A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

腎性インスリン抵抗性症候群に基づく
慢性腎臓病新規治療戦略の確立

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 裕

平成25(2013)年5月

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

腎性インスリン抵抗性症候群に基づく
慢性腎臓病新規治療戦略の確立に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 裕

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
腎性インスリン抵抗性症候群とその臨床的意義	7
慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤 裕	
II. 分担研究報告	
1. 腎性インスリン抵抗性症候群と腎性リポディストロフィー	19
脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科	
2. 腎性インスリン抵抗性症候群の発症機序に関する研究	35
細谷 幸司 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科	
3. CKDでのインスリン抵抗性の臨床的意義 末期腎不全患者における血糖 の日内変動の影響—CGMS を用いた検討—	43
細谷 幸司 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科	
4. インスリン治療 2 型糖尿病の慢性腎臓病患者の血糖血圧変動 (CGM・ABPM) と臓器障害 —CGMS を用いた検討—	51
脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	61

I. 総括研究報告書

腎性インスリン抵抗性症候群とその臨床的意義

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤 裕

研究要旨 CKD（Chronic Kidney Disease, 慢性腎臓病）と IR（Insulin Resistance, インスリン抵抗性）の関連は、以前より RIRs（Renal Insulin Resistance syndrome, 腎性インスリン抵抗性症候群）として認識されている。我々はすでに RIRs の発生機序に関して、CKD 患者では HOMA-IR が血清アルドステロンと正の相関をみとめ、アルドステロンブロッカーであるスピロラクトン投与にて HOMA-IR の改善を認めることを報告している。我々は RIRs を有する CKD 患者にアルドステロンブロッカー、エプレレノン投与し、長期的に腎機能障害進行の抑制及び CVD リスク低下が認められるかを Placebo-control study で評価する研究を開始している。現在まで登録患者は 37 名である。我々は RIRs の血糖の終日プロフィールを continuous glucose monitoring system を用い検討し、CKD 患者は糖尿病でなくとも食後の血糖上昇が高く、グルコーススパイクが認められることを明らかにした。最後に CKD モデルラットを用いた検討で CKD では脂肪組織の成熟障害が認められリポディストロフィーの状態となっていることを明らかにしている。

A. 研究目的

慢性腎臓病（CKD）の進行による心血管事故の増加と高額医療である維持血液透析患者の増加は我が国国民医療費の増加の一因としてがある。従って近年慢性腎臓病（CKD）の発症に対する早期介入および進展阻止を重視した実地医療の展開が強調されている。その手段として低蛋白食、減塩食、血圧管理、レニン・アンジテンシン系の抑制などの対策が採られているが、新規透析導入は未だ減少していない。いまこそ CKD の治療戦略におけるパラダイ

ムシフトが必要とされる。本研究では CKD 患者の増加の背景には CKD そのものによる腎性インスリン抵抗性症候群、高アルドステロン血症の 2 つが密接に相互作用し心血管事故や末期腎不全への進展に寄与するという新たなパラダイムを提唱した。平成 21 年度の厚生科学研究事業（臨床応用基盤研究）により本研究開始の準備が整備され、平成 22 年度の厚生科学研究事業（臨床応用基盤研究）により本研究のプロトコールが完成し、本塾の倫理委員会の審査を受け、承認を受けた。

さらに我々は RIRs の心血管事故および腎障害進展の危険因子である慢性腎臓病 (CKD) の病態解明は急務である。平成 21 年度の厚生科学研究事業 (医療技術実用化総合研究事業) で CKD の進展に伴いインスリン抵抗性および高アルドステロン血症が進行し、インスリン抵抗性と腎尿細管障害を引き起こすことを報告した。この病態は腎性 IR 症候群 (RIRs) と命名される。申請者は RIRs は高アルドステロン血症と相互作用し心血管事故や末期腎不全への進展に寄与するという独自の仮説に至った。平成 21 年度の厚生科学研究事業 (医療技術実用化総合研究事業) でこの仮説検証を進め症例の蓄積は本格化している。さらにアルドステロン拮抗薬であるスピロラク톤を投与し、RIRs が改善することを明らかにした。また動物実験を平行し、RIRs の発症機序は脂肪組織の IR であることを見出していく。

B. 研究方法および研究結果

1. RIRs の病態解明

我々はすでに RIRs の発生機序に関して、CKD 患者では HOMA-IR が血清アルドステロンと正の相関をみとめ、アルドステロンブロッカーであるスピロラク톤投与にて HOMA-IR の改善を認めることを報告している。今回は、横断研究にて CKD 患者では HOMA-IR と尿細管障害の指標である尿中 $\alpha 1$ ミクログロブリン値との間に正の相関が認められること、また 3 年間の prospective study にて、HOMA-IR 高

値を認める CKD 患者では、尿中 $\alpha 1$ ミクログロブリン高値が持続し、CKD の進行も急速であることが示唆された。

2. 臨床試験

我々は RIRs を有する CKD 患者にエプレレノン (E) を投与し、長期的に P は腎機能障害進行の抑制、E は腎機能障害進行抑制及び CVD リスク低下が認められるかを Placebo-control study で評価する。しかし平成 23 年ピオグリタゾンによる傍観がんリスクの上昇が報告され臨床試験の困難さが認められた。そこでエプレレノンの投与実験のみ遂行している。

平成 23 年度

- 組み入れ期間; 倫理審査許可日 ~ 1 → 2 年間 (2010 年から 2011 → 2012 年)、患者の同意が得られた時点で P もしくは E を投与開始する。
- 研究協力者の選定・依頼と協力の詳細; P 群に関しては①非糖尿病性腎症患者②Cr 2.0mg/dl 以下③HOMA-IR 1.6 以上④尿中 $\alpha 1$ ミクログロブリン高値、の 4 項目を満たす症例、E 群に関しては①非糖尿病性腎症患者② Cr 2.0mg/dl 以下③ K 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を抽出する。各症例に予め用意した書面 (表 1) をもって臨床研究の説明を行い、協力者からは同意書を得る (表 2) 同意が得られ

た症例につきPまたはE投与を行う。

- 実施期間；実施期間は投与開始より3年とする。投与開始後4～6ヵ月でHOMA-IRの改善の確認を行い、3年後にアウトカムを対照群と比較する。
- 対象者に対する介入打ち切り基準；Pは浮腫が副作用であり、体重が2.0kg以上増加した場合は投与中止とする。Eは高カリウム血症が副作用であり、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を超える場合は中止とする。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。
- 結果（アウトカム）の指標；P投与群では、短期的（4ヵ月～6ヵ月）には、尿中 α 1ミクログロブリンで比較する。長期的（3年）にはCKDの進行（eGFR）およびCVDの発症率で比較する。E投与群では、短期的には、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IRの改善もしくはグルコースクランプ法におけるMCR（glucose metabolic clearance rate）の改善、長期的には、CKDの進行（eGFR・尿中 α 1ミクログロブリンで比較）およびCVD発症率で比較する。採血、検尿は表5のようなスケジュールでおこなう。CVD

発症は、心電図、カテーテル検査もしくは心筋シンチで新しく病変を認めたものと定義する。

- 個人情報の保護；学会発表、論文発表の場合も、個人情報は一切記載せずに保護される。
- 研究の中止基準；副作用を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。

今回当院の倫理審査委員会に承認され患者のリクルートを開始した。

当院外来患者の中からE投与群18名、対照群19名を確保している。（添付資料1）。プラセボ群とエプレレノン群との薬剤投与前の各種パラメーターを比較したが、有意差のあるものは認めなかった。（添付資料2）エプレレノン投与により、6ヶ月後のデータでは、有意なHOMA-IRの改善、ARCおよびAldの上昇が認められた。（添付資料3、4）また血清K値は軽度の上昇を認めるのみであり（添付資料3-4）、エプレレノン内服群で血清K値上昇のために、研究より離脱した症例は認められなかった。

3. CKD患者における終日の血糖プロフィールの検討

CKD患者のインスリン抵抗性にはインスリンの尿よりの排泄障害も共存する。したがって、肥満などのインスリン抵抗性とは異なる糖代謝プロフィールをきたすと考えられる。また高インスリン血症による深夜の低血糖の存在も否定できない。我々は持続的

糖モニターシステム (Medtronic 社製、CGMS[®] gold[™]) を用いて RIRs の血糖の日内変動を解明している。現在すでに研究代表者の施設では透析導入前の CKD 患者を中心に使用中であり、CKD においては食後高血糖の上昇量は健常者に比べて低いが、食後最高血糖値に達する時間および正常に戻る時間は健常者に比べ長い傾向にあり高血糖状態が長く続くことを明らかにしている。

4. 腎性リポディストロフィー

腎性インスリン抵抗性症候群の発症機序およびその影響について動物実験も遂行している。すなわち 5/6 腎摘ラットの脂肪組織では脂肪組織の成熟障害が認められ、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。この腎性リポディストロフィーの病態は腎不全下の脂質異常症、動脈硬化症の原因を明らかにする意味で重要と思われる。

C. 結論

国民医療費の増加の一因として慢性腎臓病 (CKD) の進行による心血管事故の増加と高額医療である維持血液透析患者の増加がある。従って近年慢性腎臓病 (CKD) の発症に対する早期介入および進展阻止を重視した実地医療の展開が強調されている。その手段としてさまざまな対策が採られているが、新規透析導入は未だ減少していない。いまこそ CKD の治療戦略におけるパラダイムシフトが必要とされ

る。本研究では CKD 患者の増加の背景には IRIs と高アルドステロン血症の 2 つが密接に相互作用し心血管事故や末期腎不全への進展に寄与するという新たなパラダイムを提唱した。平成 22 年度は患者登録を継続させ臨床試験を開始する準備を整えた。さらに RIRs の臨床意義について我々のコホートを用い検討した。RIRs の発症機序について原因物質の同定についてメタボローム解析を用い検討を続ける。さらに RIRs の病態解明のため終日の血糖モニタリング (CGMS) のデータ集積も開始している。本研究で得られる新知見は学術的にも有意義なものであるのみならず、CKD による加齢健康障害を阻止する新治療を提示できる可能性が高く、心血管事故や末期腎不全の発症の予防につながるとと思われる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

Tokuyama H, Wakino S, Hara Y, Washida N, Fujimura K, Hosoya K, Yoshioka K, Hasegawa K, Minakuchi H, Homma K, Hayashi K, Itoh H. Role of mineralocorticoid receptor/Rho/Rho-kinase pathway in obesity-related renal injury. 査読有 Int J Obes (Lond). 2012 ;36(8):1062-71.

脇野 修, 伊藤 裕 【心腎連関の病態と治療の進歩-心臓と腎臓からみた循環器疾患】 メタボリックシンドロームに伴う心腎連関の治療 カレントセラピー 30 巻 8 号 Page804-810, 2012

脇野 修, 伊藤 裕 【慢性腎臓病:最近の進歩】 慢性腎臓病と各種疾患 肥満・メタボリックシンドローム日本内科学会雑誌 101 巻 5 号 Page1310-1317, 2012

2. 学会発表

肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明, 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田 直輝, 長谷川 一宏, 水口 斉, 藤村 慶子, 本間 康一郎, 林 晃一, 伊藤 裕, 日本心血管内分泌代謝学会 2012 年 11 月 23 日 東京

腎性インスリン抵抗性症候群と Lipodystrophy, 水口 斉, 脇野 修, 細谷 幸司, 藤村 慶子, 長谷川 一宏, 鷺田 直輝, 神田 武志, 徳山 博文, 林 晃一, 伊藤 裕, 日本心血管内分泌代謝学会 2012 年 11 月 23 日 東京

腎性インスリン抵抗性症候群と腎障害, 水口 斉, 脇野 修, 吉藤 歩, 二木 功治, 金子 友香, 小松 素明, 藤村 慶子, 細谷 幸司, 長谷川 一宏, 鷺田 直輝, 神田 武志, 徳山 博文, 林 晃一, 伊藤 裕, 日本高血圧学会

総会 2012 年 11 月 23 日 名古屋

肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明, 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田 直輝, 長谷川 一郎, 水口 斉, 藤村 慶子, 本間 康一郎, 小松 素明, 金子 友香, 林 晃一, 伊藤 裕, 日本高血圧学会総会 2012 年 11 月 23 日 名古屋

高血圧学会員が知っておくべき他領域の基本知識 肥満と高血圧の接点 肥満と CKD 肥満による CKD と CKD における腎性リポディストロフィー, 脇野 修, 徳山 博文, 水口 斉, 林 晃一, 伊藤 裕, 日本高血圧学会総会 2012 年 11 月 23 日 名古屋

肥満関連腎症の病態生理における脂肪腎臓連関の重要性, 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田 直輝, 長谷川 一宏, 水口 斉, 二木 功治, 本間 康一郎, 林 晃一, 伊藤 裕, 日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 日 横浜

5/6 腎摘 CKD モデルマウスにおける骨格筋ミトコンドリアと身体能力, 田 蒔 昌憲, 宮下 和季, 脇野 修, 三石 正憲, 田中 久美子, 林 晃一, 伊藤 裕, 日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 日 横浜

CKD における血糖日内変動の異常 CGMs を用いた検討 細谷 幸司, 脇野 修, 水口 斉, 鷺田

直輝, 徳山 博文, 林 晃一, 伊藤 裕,
日本腎臓学会学術総会 2012年6月1
日 横浜

腎性インスリン抵抗性症群のCKD進行
に及ぼす影響, 水口 斉, 脇野 修,
細谷 幸司, 長谷川 一宏, 鷲田 直輝,
神田 武志, 徳山 博文, 林 晃一, 伊
藤 裕, 日本腎臓学会学術総会 2012
年6月1日 横浜

腎性インスリン抵抗性症候群と腎性
リポディストロフィー, 水口 斉, 脇
野 修, 細谷 幸司, 林 晃一, 伊藤
裕, 日本腎臓学会学術総会 2012年6
月1日 横浜

F. 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

添付資料 1

実薬群とプラセボ群の投与前パラメータ比較

プラセボ群と実薬群の基本データ1

Parameter	実薬群(エブレノン)	プラセボ群
n (男性/女性)	18(9/9)	19(9/10)
年齢(歳)	65.7±2.80	70.5±3.05
BMI	24.0±0.99	23.5±0.77
収縮期血圧 (mmHg)	130.9±3.4	133.0±2.1
拡張期血圧 (mmHg)	77.5±1.9	76.1±1.3
eGFR (ml/min/1.73m ²)	58.0±4.7	72.1±7.3
Hb (g/dL)	14.2±0.24	13.2±1.13
TG	134.5±18.4	117.1±13.1
HDL-C	51.4±3.4	52.0±3.1
LDL-C	104.2±5.1	110.4±4.3
血糖値 (mg/dL)	101.2±2.5	106.1±3.2
IRI	13.7±2.9	9.1±1.2
HOMA-IR	3.82±0.82	2.54±0.35
Aldosterone (ng/ml)	183.4±11.6	179.9±17.9
ARC	8.1±1.9	7.6±2.2

プラセボ群と実薬群の基本データ2

Parameter	エブレノン群	プラセボ群
Na	141.9±0.3	140.8±1.2
K	4.2±0.1	4.2±0.1
Cl	105.6±0.5	±0.77
Ca	9.4±0.1	9.3±0.2
IP	3.4±0.2	3.7±0.2
AST	20.2±1.1	20.9±2.5
ALT	19.1±1.9	22.3±2.3
ALP	234.5±14.3	197.9±20.8
GGTP	30.9±5.0	32.2±6.9
UA	5.9±0.2	5.9±0.3
ABI	1.17±0.03	1.18±0.01
PWV	1692.9±71.6	1758.8±77.2
IMT	0.772±0.035	0.784±0.054

添付資料 2

エプレレノン投与前後のパラメータの比較 (6ヵ月後)

薬剤投与後のデータ

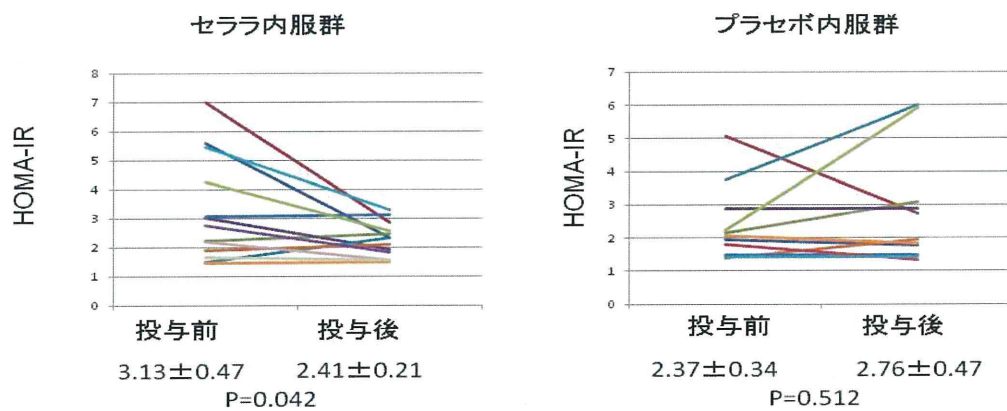
Parameter	エプレレノン前	エプレレノン後
収縮期血圧 (mmHg)	130.9±3.4	128.4±2.1
拡張期血圧 (mmHg)	77.5±1.9	76.4±3.7
eGFR (ml/min/1.73m ²)	58.0±4.7	54.6±4.3*
TG	134.5±18.4	132.1±11.2
HDL-C	51.4±3.4	55.0±3.9
LDL-C	104.2±5.1	109.1±4.7
血糖値 (mg/dL)	101.2±2.5	102.8±2.8
IRI	13.7±2.9	9.5±1.8*
HOMA-IR	3.82±0.82	2.41±0.20*
Aldosterone (ng/ml)	183.4±11.6	239.8±25.1*
ARC	8.1±1.9	21.9±5.1*
K	4.23±0.09	4.34±0.08
A1M/Cr	9.2±2.3	6.5±2.5
Nag/Cr	9.31±0.85	7.18±2.4
B2M/Cr	675.1±175.2	484.4±244.2

*: p<0.05

添付資料 3

薬剤投与前後の HOMA-IR

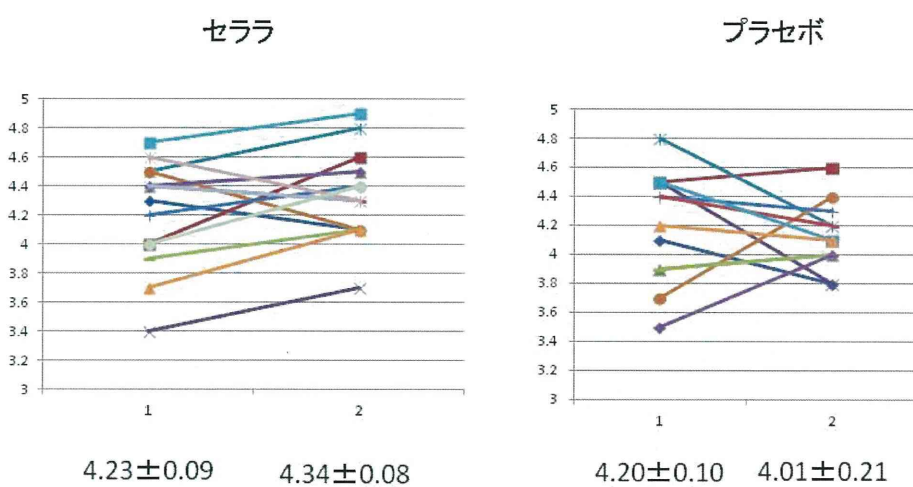
エプレレノン内服によるHOMA-IRの変化
プラセボとの比較



添付資料 4

添付資料 4 エプレレノン投与前後の血清 K 値の比較

エプレレノン内服によるKの変化 プラセボとの比較



II. 分担研究報告書

腎性インスリン抵抗性症候群と腎性リポディストロフィー

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。また、ADMA の分解酵素である DDAH（Dimethylarginine dimethylaminohydrolase）トランスジェニックマウスを用いた実験により、CKD における ADMA の役割を検討した。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上昇が認められた。CKD ラットにおいて、脂肪組織のみで ADMA が上昇している原因として、CKD ラットの脂肪組織での DDAH1 および DDAH2 の発現の低下が認められた。3 群間に脂肪細胞のサイズに差は認められなかったが一腎摘群では有意な脂肪細胞径の低下が認められ、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 γ 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 γ が発現低下した。この脂肪組織の分化異常に伴って、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。DDAH1 および DDAH2 トランスジェニックマウスにおいては、CKD モデル（5/6Nx）で脂肪組織の ADMA 濃度の上昇は抑制されており、それに伴い全

身の糖代謝異常の改善、脂肪細胞径の低下および脂肪組織重量の低下の抑制が認められた。〈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 α 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

一の状態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い標準の餌を与え、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。また ADMA の分解酵素である DDAH のトランスジェニックマウスを使用することにより、CKD 脂肪組織で ADMA 濃度の上昇を抑制した状況での全身の糖代謝異常、異所性脂肪沈着に与える影響を検討した。

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において、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のようなかにつき検討した。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、腎周囲脂肪組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 α 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 μ 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 μ 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 β 、CEBP δ の上昇がおこり、その後 CEBP α 、PPAR γ の上昇が起こることにより完成され、PPAR γ 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 γ 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)。CKD において ADMA が脂肪組織特異的に上昇している原因として、CKD 脂肪組織特異的な DDAH の上昇が認められた。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 γ の発現で評価したところ、ADMA 群にて有意な PPAR γ 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 γ 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)

DDAH トランスジェニックマウスを用いた検討
DDAH1 および DDAH2 トランスジェニックマウスでは CKD 群 (5/6Nx) において、脂肪組織特異的な ADMA 濃度の上昇は抑制され、それに伴い、脂肪組織径・脂肪組織重量低下の抑制 (図 18)、耐糖能異常の抑制 (図 19)、異所性脂肪沈着の抑制 (図 20) が認められた。

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委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为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うることが想