

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461230

研究課題名(和文) IRS1/インスリンシグナルによるポドサイト障害修復メカニズムの解明

研究課題名(英文) IRS1/insulin signaling-induced repair mechanisms of podocyte injury

研究代表者

美馬 晶 (MIMA, Akira)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00432401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：培養ポドサイトにおいて低グルコース(LG)下におけるpAktはインスリンにより 4.5 ± 0.7 倍に増加し、高グルコース(HG)により抑制された。pIRS1はインスリンにより2倍程度増加するが、HGにより抑制された。アデノウイルスベクターを用い、IRS1をポドサイトに過剰発現するとアポトーシスが57%減少した。IRS1をsiRNAによりノックダウンするとアポトーシスが 2.4 ± 0.4 倍増加した。DPP-4i添加により、pAktの発現が $131 \pm 28\%$ 増大した。これらの結果からIRS1の賦活化あるいはDPP-4iによるインスリンシグナル増強がポドサイトアポトーシスを抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Immunoblot analyses showed insulin (10nM) increased the levels of phosphorylation of Akt (pAkt) which had anti-apoptotic effects by 4.5 ± 0.7 -fold. In contrast, high glucose (HG; 20mM) levels decreased the expression by 7.8%. Insulin increased tyrosine phosphorylation of insulin substrate (IRS)1 by 2-fold in low glucose (LG; 5.6mM), while HG decreased the expression by 10%. Infection with IRS1 using adenoviral vector (Ad-IRS1) decreased HG-induced podocyte apoptosis by 57%. To assess the role of IRS1 in mediating the podocyte apoptosis, IRS1 expression was reduced with siIRS1. Knockdown of IRS1 in podocytes increased apoptosis by 2.4 ± 0.4 -fold. Lastly, DPP-4 inhibitor increased the levels of pAkt by $131 \pm 28\%$. These results suggest that increases in insulin signaling activity in podocytes using Ad-IRS1 or DPP-4i could inhibit HG-induced podocyte apoptosis.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：インスリンシグナル ポドサイトアポトーシス IRS1

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)患者が急速に増加しているが中でも糖尿病性腎症の患者数が著しく増加している。糖尿病性腎症の確かな診断、治療法開発が急務である。申請者は、糖尿病状態が引き起こす腎系球体内インスリンシグナル異常が糖尿病性腎症進展・増悪に重要であることを示している。しかしながら、糖尿病性腎症の病理学的特徴であるポドサイトアポトーシスとインスリンシグナルの関係は不明な点が多い。

2. 研究の目的

糖尿病状態が引き起こす腎系球体内インスリンシグナル異常が糖尿病性腎症進展・増悪に重要であることを示している。しかしながら、糖尿病性腎症の病理学的特徴であるポドサイトアポトーシスとインスリンシグナルの関係は不明な点が多い。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インスリン受容体基質(IRS)1を中心としたポドサイト内インスリンシグナルとアポトーシスの関係を明らかにする。このことで責任分子の同定と病態形成におけるシグナル伝達機構を解明し、新たな糖尿病性腎症治療法を開発するものである。インスリンシグナルとアポトーシスに注目した本研究は腎症にとどまらず、網膜ペリサイトのアポトーシスに特徴づけられる糖尿病性網膜症への応用も期待され、あまねく糖尿病合併症に対する新規治療法が生み出される可能性がある。

3. 研究の方法

ポドサイト特異的 IRS1 ノックアウトマウスの作成

Cre-loxP システムを用い、ポドサイト特異的 IRS1 ノックアウトマウス(podIRS1KO)を作製する。得られたマウスの腎機能(アルブミン尿、糸球体濾過量)、腎組織(PASM 染色、IV型コラーゲン染色、電子顕微鏡による組織評価)を検討する。さらに、ポドサイトアポトーシスの程度を調べるため WT-1 染色陽性細胞のカウントと cleaved caspase3 の染色、定量化を行う。ピーズ還流、マグネット法によりマウス系球体を回収する方法を確立しているが、この方法により回収した系球体を用いて western blotting によるチロシンリン酸化 IRS1、リン酸化 Akt、リン酸化ネフリンといったシグナルを確認する。さらに、cleaved caspase3 の発現も確認することでポドサイトアポトーシスの程度を検討する。さらに、*ex vivo* アッセイは前述の方法で回収した系球体をインスリンで刺激することで生じるシグナル変化を western blotting により確認する。laser capture micro dissection を用い bolus インスリン投与後 WT マウスポドサイトから RNA を取出し、quantitative PCR を用いてインスリンシグナルにより誘導される抗アポトーシス分子を探索する。siRNA を用いて培養ポドサイトにおける IRS1 をノックダウンすることによるポドサイトアポトーシスの変化を検討する。さらに、すでに確立しているアデノウイルスベクターを用いた IRS1 過剰発現系(Ad-IRS1)を *in vivo* にも応用する。つまり、podIRS1KO に Ad-IRS1 を投与することでポ

ドサイトアポトーシスの軽減、腎機能の回復がもたらされるかどうかを検討する。この際、アデノウイルスベクターを経静脈的に投与するとその多くが肝臓に取り込まれるため、腎動静脈選択的に投与、還流することで糸球体内への取り込み効率を上昇させる予定である。

プロテインチロシンフォスファターゼ阻害剤による抗アポトーシス効果の確認

高血糖状態で賦活化するプロテインチロシンフォスファターゼ、Src homology-2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1)によるポドサイトアポトーシス誘導メカニズムをすでに明らかにしている。近年、SHP-1 特異的阻害剤である tyrosine phosphatase inhibitor-1 (TPI-1)による抗腫瘍効果が示された(*J Immunol* 2010)。ストレプトゾトシン誘導糖尿病マウスに TPI-1 を投与し、ポドサイトにおけるアポトーシスが減少するかどうかを確認する。さらに糖尿病状態で阻害されたポドサイト内チロシンリン酸化 IRS1 が回復し、抗アポトーシス作用を示すことを示す。TPI-1 による細胞毒性は低いことが知られており、生体投与時の安全性が高い。プロテインチロシンフォスファターゼ阻害をターゲットにした糖尿病性腎症の新規治療法確立が期待される。

ポドサイト特異的 IRS2 ノックアウトマウスによる IRS1 と IRS2 の比較検討

IRS1 と IRS2 は高い相動性を示す。申請者は糖尿病性腎症における糸球体内 IRS1 発現は IRS2 より著明に低下することを示している。ポドサイト特異的 IRS2 ノックアウトマウスを作製、腎機能と腎組織をポドサイト特異的 IRS1 ノックアウトマウスのそれらと比較検討することでポドサイトにおける IRS1 と IRS2 の動きの違いを解明する。

4. 研究成果

培養ポドサイトにおけるインスリンシグナルを検討した。抗アポトーシス効果を有するリン酸化 Akt の発現変化を western blotting により確認した。低グルコース(5.6mM)におけるリン酸化 Akt の発現はインスリン(10nM)により 4.5±0.7 倍に増加した。一方、高グルコース(20mM)におけるリン酸化 Akt は低グルコース時に比べ、7.8%減少した(図1)。

インスリン受容体基質(IRS)1 のチロシンリン酸化はインスリンにより 2 倍程度増加するが、高グルコースにおいては 10%程度抑制されていた。一方、インスリンレセプターのチロシンリン酸化はインスリンにより 19±6 倍増加し、高グルコースにより 61%減少した(図2)。

我々は既にプロテインフォスファターゼの一種である SHP-1 が高血糖状態において賦活化されることで血管内皮細胞増殖因子(VEGF)レセプターのリン酸化が抑制されることによるポドサイトアポトーシスのメカニズムを示しているが、実際、本研究においても SHP-1 は高グルコースにより 1.2±0.6 倍増加していた(図3)。

次に、IRS1 を過剰発現することによりポドサイト内インスリンシグナルを増強することを試みた。アデノウイルスベクターを用い、IRS1 をポドサイトに過剰発現すると高血糖により誘導されるポドサイトアポトーシスが

57%減少した。一方、IRS1 を siRNA によりノックダウンすると低グルコース状態では通常認められない、ポドサイトアポトーシスが 2.4 ± 0.4 倍増加した(図4)。

経口糖尿病治療薬である Dipeptidyl Peptide(DPP)-4 阻害剤によるポドサイトアポトーシスへの影響について検討を行った。低グルコースにおけるリン酸化 Akt の発現は DPP-4 阻害剤(50nM)添加により $131 \pm 28\%$ 増大した。

今回の研究では IRS1 の賦活化、あるいは DPP-4 阻害薬によるインスリンシグナル増強により高血糖状態によるポドサイトアポトーシスが抑制されることが明らかになった。これまでに糖尿病状態、インスリン抵抗性状態をもたらす糸球体内皮細胞内インスリンシグナル阻害による腎症悪化は糸球体内皮細胞特異的に IRS1 を過剰発現することで回復し、腎保護作用をもたらされることを明らかにしているが、ポドサイトにおいても IRS1 を中心としたインスリンシグナルが糖尿病状態において阻害されることが腎症悪化メカニズムの一つであることが明らかになった。IRS1 の過剰発現あるいは DPP-4 阻害剤によるポドサイト内インスリンシグナル回復が糖尿病性腎症の新規治療法になる可能性がある。

図 1

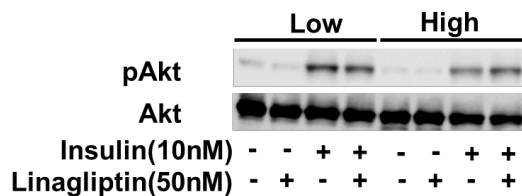


図 2

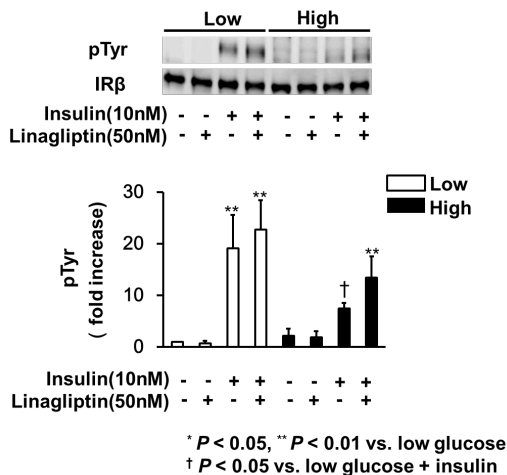


図 3

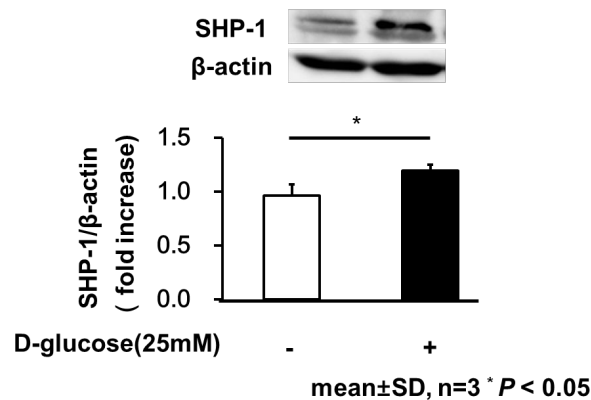
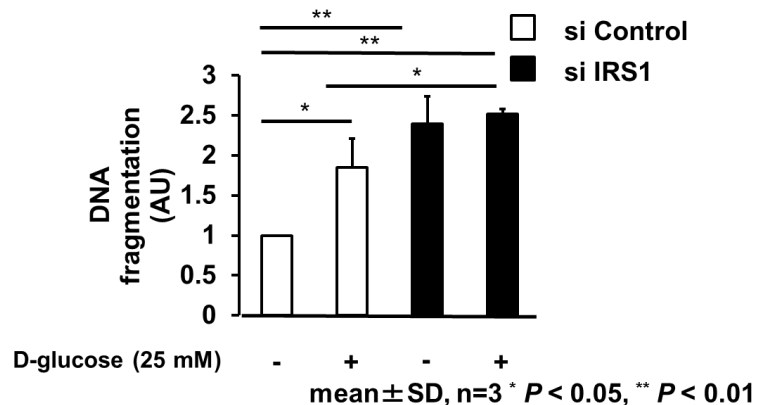
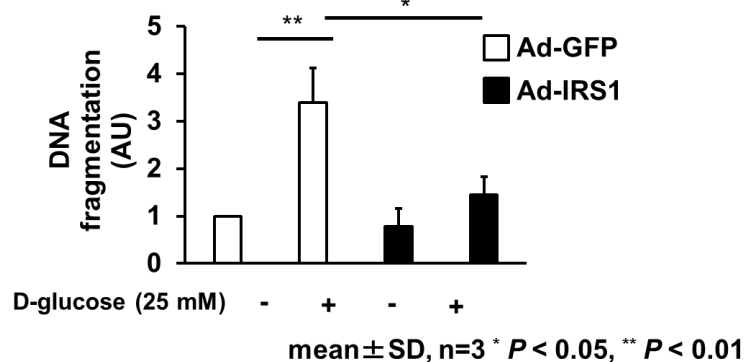


図 4



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 12 件)

Zhong J, Gong Q, Mima A, Inflammatory Regulation in Diabetes and Metabolic Dysfunction, *J Diabetes Res*, 2017,5165268, doi: 10.1155/2017/5165268, 2017 査読有

Mima A, Efficacy of mizoribine and prednisolone combination therapy in adult patients with IgA vasculitis, *Rheumatol Int*, doi: 10.1007/s00296-017-3685-6, 2017 査読有

Mima A, Nagahara D, Tansho K, Methotrexate induced pneumatosis intestinalis under hemodialysis patient, *Hemodial Int*, 21, E9-E12, 2017 査読有

Araki M, Matsubara T, Abe H, Torikoshi K, Mima A, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Arai H, Doi T, Conditional Deletion of Smad1 Ameliorates Glomerular Injury in Progressive Glomerulonephritis, *Sci Rep*, 6,316,2016 査読有

Katagiri S, Park K, Maeda Y, Rao TN, Khamaisi M, Li Q, Yokomizo H, Mima A, Lancerotto L, Wagers A, Orgill DP, King GL, *Diabetes*, 65, 2760-71, 2016 査読有

Park K, Mima A, Li Q, Rask-Madsen C, He P, Mizutani K, Katagiri S, Maeda Y, Wu IH, Khamaisi M, Preil SR, Maddaloni E, Sørensen D, Rasmussen LM, Huang PL, King GL, *JCI Insight*, 1, pii: e86574, 2016 査読有

Mima A, Incretin-Based Therapy for Prevention of Diabetic Vascular Complications, *J Diabetes Res*, 2016:1379274, 2016 査読有

Matsubara T, Araki M, Abe H, Ueda O, Jishage K, Mima A, Goto C, Tominaga T, Kinoshita M, Kishi S, Nagai K, Iehara N, Fukushima N, Kita T, Arai H, Doi T, Bone Morphogenetic Protein 4 and Smad1 Mediate Extracellular Matrix Production in the Development of Diabetic Nephropathy, *Diabetes*, 64, 2978-90, 2016 査読有

米田 龍生, 吉田 克法, 平尾 佳彦, 斎藤 能彦, 柏井 浩希, 丘田 英人, 三馬 省二, 熊本 廣実, 青山 秀雄, 松原 博, 松本 宗輔, 金子 佳照, 吉岡 伸夫, 枝川 光太郎, 枝川 篤永, 森田 壮平, 阿部 泰志, 松田 尚史, 田中正己, 美馬 晶, 西谷 喜治, 益田 眞理, 白濱 ちひろ, 原本 順規, 金子 嘉志, 吉井 将人, 金子 嘉成, 本宮 善恢, 近藤 雅彦, 堀井 康弘, 森田 昇, 西野 俊彦, 平松 侃, 仲川 嘉紀, 浜野 正義, 田中 賢治, 筒井 久善, 沢田 陽子, 中本 吉彦, 宮高 和彦, 大貫 雅弘, 吉江 貴, 杉原 清貴, 京田 有輔, 壬生 寿一, 田畑 尚一, 川野 貴弘, 中辻 史好, 和田 信弘

奈良県における慢性透析患者の現況 2014年12月末の統計的観察

奈良県医師会透析部会誌 21(21-27) 2016

美馬 晶, 松浦 元一, 土井 俊夫
CKD 診断マーカーとしての尿中 Smad1 の評価
腎臓 37(32-36) 2015

Mizutani K, Park K, Mima A, Katagiri S, King GL, Obesity-associated Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance, *J Dent Res*, 93, 596-601, 2014 査読有

Gohda T, Mima A, Moon JY, Kanasaki K, Combat diabetic nephropathy: from pathogenesis to treatment, *J Diabetes Res*, 2014:207140, 2014 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

長原 大, 丹正 幸佑, 美馬 晶 IgG 型軽鎖沈着症による二次性膜性増殖性糸球体腎炎に対し、レナリドミドが腎機能障害を改善した一例 第 46 回日本腎臓学会西部学術大会 シーガイアコンベンションセンター(宮崎県) 2016 年 10 月 15 日

長原 大, 丹正 幸佑, 美馬 晶 血液透析患者に対するメトトレキサート投与により壊死性腸管気腫症を引き起こした 1 例 第 61 回日本透析医学会学術集会 大阪国際会議場(大阪府) 2016 年 6 月 11 日

松原 弘和, 兵藤 透, 小久保 謙一, 花房 規男, 美馬 晶, 瀧澤 亜由美, 若井 陽希, Nguyen Duc Nam, 川村 明夫, ホーチミン透析医学会(HSDT)設立報告と今後の課題 第 61 回日本透析医学会学術集会 大阪国際会議場(大阪府) 2016 年 6 月 11 日

瀧澤 亜由美, 小久保 謙一, 花房 規男, 美馬 晶, 松原 弘和, 兵藤 透, 石森 勇, 村上 淳, 金子 岩和, 峰島 三千男, 土谷 健, 新田 孝作, 秋葉 隆 ベトナムにおける透析医療の現状調査~ベトナム南部最大の総合病院での調査~ 第 61 回日本透析医学会学術集会 大阪国際会議場(大阪府) 2016 年 6 月 10 日

Mima A: Hemodialysis Vascular Access Complications, Launching Ceremony and the Scientific Congress of Ho Chi Minh City Society of Dialysis Therapies (HSDT), the CME Course on Nephrology and Dialysis, and the 1st Congress of the HSDT, ザ レヴェリーサイゴン(ベトナム ホーチミン) 2015 年 12 月 26 日

Mima A, Yasuzawa T, Ueshima S, Tsubaki K: The effects of linagliptin on insulin signaling and apoptosis of the podocytes in diabetic nephropathy, International Diabetes Federation World Diabetes Congress 2015, バンクーバーコンベンションセンター(カナダ バンクーバー) 2015 年 12 月 1 日

金森 弘志, 市田 公美, 平野 央, 美馬 晶, 柳田 素子 遺伝性腎性低尿酸血

症に伴う運動後急性腎不全(ALPE)の一例
第 45 回日本腎臓学会西部学術大会 金沢歌
劇座(石川県)2015年10月23日

藤田茉莉子、美馬 晶、椿 和央 難治性
特発性血小板減少症を合併した維持透析患
者に対しトロンボポエチン受容体作動薬が
有効であった一例 第 60 回日本透析医学会
学術集会・総会 パシフィコ横浜(神奈川県)
2015年6月27日

Wang X, Sørensen D, Lockhart S, Li Q, Park
K, Mima A, Rasmussen LM, King GL,
Rask-Madsen C: Augmenting endothelial cell
insulin signaling prevents accelerated intestinal
tumor formation in obesity, 75th American
Diabetes Association Scientific Sessions, ポス
トコンベンション&エキシビジョンセンタ
ー(アメリカ ポストン)2015年6月8日

美馬 晶 GLP-1 受容体作動薬の腎保護作
用とその分子機構(2) 第1回日本慢性疾患重
症化予防学会 兵庫医科大学 平成記念会館
(兵庫県)2015年2月15日

吉本 咲耶, 長井 幸二郎, 小野 広幸, 柴田
恵理子, 上田 紗代, 田蔭 昌憲, 安部 尚子,
村上 太一, 美馬 晶, 松浦 元一, 安部 秀
斉, 土井 俊夫, サルコイドーシス, 高カルシウム
血症により間質障害を呈した一例 第44回
日本腎臓学会西部学術大会 神戸国際会議
場(兵庫県)2014年10月4日

小野 広幸, 村上 太一, 松浦 元一,
美馬 晶, 吉本 咲耶, 上田 紗代, 田蔭
昌憲, 柴田 恵理子, 長井 幸二郎, 安部
秀斉, 土井 俊夫 ループス腎炎との鑑別
を要した IgG4 関連腎症の1例 第44回日
本腎臓学会西部学術大会 神戸国際会議場
(兵庫県)2014年10月3日

Park K, Mima A, Li Q, Rask-Madsen C,
Huang PL, He P, King GL: Identification of
insulin's novel action on endothelin b receptor
expression and Ca²⁺-calmodulin-eNOS
activation to reduce atherosclerosis, 74th
American Diabetes Association Scientific
Sessions, モスコーンコンベンションセンタ
ー(アメリカ サンフランシスコ)2014年
6月16日

美馬 晶、近藤 直樹、野間 喜彦、小堀
浩幸、田中 勉、土井 俊夫 2型糖尿病血
液透析患者におけるサキサグリブチンの有
効性と安全性の検討 第59回日本透析医学
会学術集会・総会 神戸国際会議場(兵庫
県)2014年6月15日

竹内 理沙、野田 康裕、長井 幸二郎、
小野 広幸、吉本 咲耶、牧野 友美、近田
優介、小林 誠司、大西 実季、高松 愛子、
山田 香苗、美馬 晶、柴田 恵理子、松浦
元一、安部 秀斉、土井 俊夫 実血流量
の確保において引き込みは指標となりうる
か 第59回日本透析医学会学術集会・総会
神戸国際会議場(兵庫県)2014年6月13日

新井 悠太, 長井 幸二郎, 柴田 恵理子,
藤田 美香, 美馬 晶, 松浦 元一, 安部
秀斉, 土井 俊夫, 宮本 龍郎, 三田村 佳
典 第 110 回日本内科学会四国地方会 あ
わぎんホール(徳島県)2014年6月8日

〔図書〕(計 2 件)

美馬 晶
血管内皮細胞内インスリンシグナルを用い
た劣化腹膜治療法の開発
日本透析医学会雑誌 30(158-160) 2015

美馬 晶
糖尿病患者の口腔の健康管理 15 糖尿病関
連疾患と歯周病:腎臓病
月刊糖尿病 6(89-94) 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)
近畿大学・医学部附属病院・講師
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:

(4) 研究協力者

()