

# 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

美馬 晶

近畿大学医学部奈良病院腎臓内科

key words : インスリンシグナル, 血管内皮細胞, IRS1, 一酸化窒素

## 要 旨

腎代替療法の一つとして腹膜透析があるが、その利点は連続的な治療であること、残存腎機能の保持に優れていることがあげられる。しかしながら、生体膜を利用することにより長期間の治療により腹膜の劣化が生じる。さらに、被嚢性腹膜硬化症へ移行すると、しばしば致命的になることもある。腹膜は中皮細胞、間質、血管から構成されるが、腹膜劣化のメカニズムは中皮細胞の脱落、間質線維化による腹膜肥厚、血管の狭窄が組み合わさって生じると考えられる。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは不明である。申請者は糖尿病状態において、インスリンシグナルの最下流における内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の賦活化が阻害されることが、糖尿病性腎症進展・増悪に関与することを明らかにしている。本研究では、血管内皮細胞特異的 IRS1 (insulin receptor substrate; IRS) 過剰発現マウスを確立する。腹膜におけるインスリンシグナルの増強と eNOS 賦活化を介し、局所 NO が増加することで腹膜硬化が減弱するかどうかを検討する。さらに培養細胞を用いた実験系では、外因性 NO である sodium nitroprusside (SNP) による抗線維化効果を検討する。これらのことで、被嚢性腹膜硬化症に対する新規治療方法を確立することを目指す。

## 1 研究方法

血管内皮細胞への発現が高いプロモーターとして

VE-cadherin を用いた。この vector を用いた血管内皮細胞特異的 PKC $\beta$ 2 過剰発現マウス (EC-PKC $\beta$ 2Tg) により、血管内皮細胞における発現が高度であることを確認している<sup>1)</sup>。この vector にヒト IRS1cDNA を組み込むことで、transgene を作成する。確立した血管内皮細胞特異的 IRS1 過剰発現マウス (EC-IRS1Tg) における血管内皮細胞内での IRS1 の発現は、血管内皮細胞初代培養を確立し、western blotting により確認する。また、各組織における IRS1 の発現は、western blotting と quantitative PCR により確認する。blotting band は Image-J (NIH) により定量化を行った。腹膜硬化モデルマウスは 5/6 腎摘出を行った後に、グルコースを連日腹腔内に投与する、あるいはクロルヘキシジンの腹腔内投与により作製する。マウス腹膜中皮細胞の初代培養を確立し、本細胞を高グルコースで培養する。このことにより、増加する細胞外基質が外因性 NO を投与することで抑制されることを検討する。

## 2 結 果

VE-cadherin をプロモーター<sup>1)</sup>として用いることで、確立した EC-IRS1Tg の肺を用いて血管内皮細胞初代培養を確立した。western blotting によりタンパクレベルでの IRS1 を確認したところ、野生型から確立した血管内皮細胞初代培養に比べ 6.6 倍増加していた (図 1)。血管内皮細胞内インスリンシグナルの増加は、リン酸化 Akt, eNOS を確認することで評価した。EC-

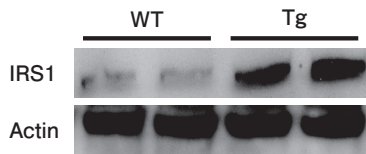


図1 血管内皮細胞初代培養における IRS1 発現 (WT: 野生型, Tg: EC-IRS1Tg)

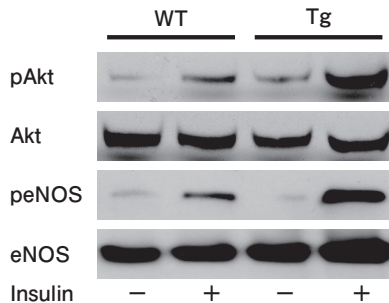


図2 血管内皮細胞初代培養内インスリンシグナルの変化 (pAkt; リン酸化 Akt, peNOS; リン酸化 eNOS, WT; 野生型, Tg; EC-IRS1Tg)

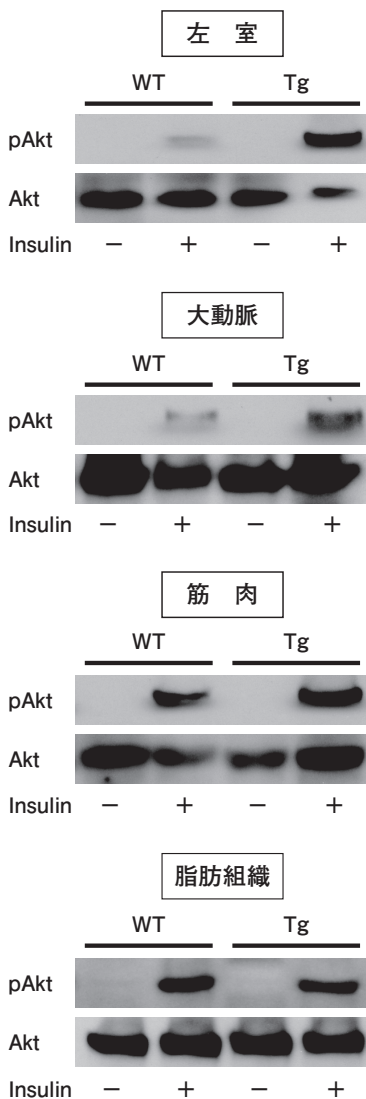


図3 各臓器におけるインスリンシグナルの変化 (pAkt; リン酸化 Akt, WT; 野生型, Tg; EC-IRS1Tg)

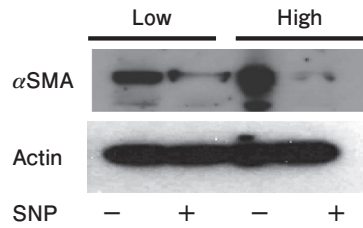


図4 外因性一酸化窒素による細胞外基質産生への影響 (Low; 低濃度グルコース, High; 高濃度グルコース,  $\alpha$ SMA;  $\alpha$ 平滑筋アクチン)

IRS1Tg における血管内皮細胞初代培養でのリン酸化 Akt は、インスリン刺激がない状態で野生型のそれに比べて 2.7 倍と著明に増加していた。さらにインスリン刺激により増加するリン酸化 Akt は、野生型の血管内皮細胞をインスリン刺激したときに比べ、EC-IRS1Tg においては 4.6 倍と増加していた (図 2)。同様に、インスリン刺激により増加するリン酸化 eNOS は、野生型に比べ、EC-IRS1Tg では 4.3 倍と増加していた (図 2)。

次に EC-IRS1Tg の各組織におけるインスリン刺激時のインスリンシグナル変化を *in vitro* 同様、western blotting で確認した。EC-IRS1Tg におけるリン酸化 Akt は野生型に比べ、左室では 7.6 倍、大腿動脈では 5.3 倍、筋肉では 3.6 倍とそれぞれ増加していた。しかしながら、脂肪組織では両者間に有意差を認めなかった。野生型と比較して変化はなかった (図 3)。マウスを用い、腹膜透析液濃度に近いグルコースを注入することで腹膜硬化モデルを確立することを試みたが、結果的にはクロルヘキシジングルコン酸を用い腹膜硬化を惹起した。しかしながら、安定した効果が得られておらず条件のさらなる検討が必要である。

マウス腹膜を用いた初代培養腹膜中皮細胞の確立も困難であったため、マウスメサンギウム細胞を用い、外因性 NO である SNP による抗線維化効果を検討した。その結果、高血糖により 1.97 倍に増加した  $\alpha$  平滑筋アクチンは、SNP (4  $\mu$ M) により 94.7% 減少した (図 4)。

### 3 考察

*in vitro* では腹膜中皮細胞の初代培養が順調ではないため、メサンギウム細胞を用いた検討を行ったが、高血糖刺激により増加する細胞外基質は、外因性 NO である SNP により著明に抑制された。現在、commer-

cial product のヒト腹膜中皮細胞を用いて検討を行っているが、外因性 NO を用いた被嚢性腹膜硬化症の新規治療方法が期待される。EC-IRS1Tg を用いた検討では、IRS1 の血管内皮細胞での十分な発現が確認でき、さらに *in vitro*, *in vivo* のいずれにおいてもインスリンシグナルの上昇を確認できた。しかしながら、安定した腹膜硬化モデルマウスが確立できておらず、EC-IRS1Tg による腹膜硬化症に対する影響の検討は十分に行えていない。クロルヘキシジンにより腹膜硬化は誘発されるが糖毒性による腹膜硬化ではなく、実際の被嚢性腹膜硬化症における臨床症状を反映していないと考えられる。今後、終末糖化産物のマウス腹腔内注入により腹膜硬化が生じるかについて検討を進める。

今回の研究からは、preliminary なものではあるが、外因性 NO を用いた被嚢性腹膜硬化症に対する新規治療法の可能性が示唆された。実際、血管内皮細胞内 eNOS ノックアウトマウスを糖尿病に誘導すると糸球体硬化が増悪するといった報告がされており、NO による抗線維化効果が期待される<sup>2)</sup>。興味深いことに、EC-IRS1Tg から初代培養を行った血管内皮細胞におけるインスリン刺激時のリン酸化 eNOS の発現が亢進していることが確認できたため、*in vivo* においても一酸化窒素合成を介した腹膜保護作用が期待される。実際の臨床では silostazol が一酸化窒素合成能を高めるとの報告もあり、今後、腹膜透析患者において silosta-

zol を長期投与した際の腹膜機能や被嚢性腹膜硬化症発症率も検討する予定である。また、腹膜透析バッグ内に外因性 NO である SNP, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) を添加するという臨床応用も検討課題である。

## 謝 辞

本研究の一部は公益社団法人日本透析医会より研究助成 (JADP Grant 2014-03) の交付を受けて行われたものです。厚く御礼申し上げます。

## Article information

図の一部は、H24 年度持田記念医学薬学振興財団研究助成金報告書、H24~25 年度科学研究費助成 (研究活動スタート支援) 報告書においても掲載されているが、論文等の出版物においては使用していない。

## 文 献

- 1) Mima A, Hiraoka-Yamamoto J, Li Q, et al. : Protective effects of GLP-1 on glomerular endothelium and its inhibition by PKCbeta activation in diabetes. *Diabetes*, 61; 2967-2979, 2012.
- 2) Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. : Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18; 539-550, 2007.