

# インスリン抵抗性惹起因子としての尿毒素

田中小百合\*1 矢野彰三\*2 杉本利嗣\*1

\*1 島根大学医学部内科学講座内科学第一 \*2 島根大学医学部臨床検査医学

key words : インスリン抵抗性, 腎不全, 尿毒素, 脂肪細胞

## 要旨

インスリン抵抗性は心血管 (CV) イベントや CV 死亡に対する独立した危険因子であり, 慢性腎臓病 (CKD) では肥満・糖尿病がなくてもインスリン抵抗性を認めること, 特定の腎疾患よりも CKD 病態そのものにより惹起されることから, CKD 進行とともに蓄積する尿毒素が CKD のインスリン抵抗性に関与している可能性について検討した。マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を培養し, 尿毒素としてフェニル酢酸 (PAA)・インドキシル硫酸 (IS)・p クレゾール (PC)・p クレゾール硫酸 (PCS) を添加し, 細胞反応を評価した。PC は培養マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞の増殖・分化・成熟を抑制し, その結果, グルコース uptake を著明に抑制した。PAA・IS・PCS は, 細胞増殖, 分化・成熟に有意な影響を及ぼさなかった。一方, PCS はインスリンによるグルコース uptake の促進反応を減弱した。また, PCS は TNF $\alpha$  合成を有意に亢進した。そこで, TNF $\alpha$  中和抗体を前投与したところ, PCS のインスリンによるグルコース uptake 促進作用が抑制された。以上より, PCS は TNF $\alpha$  の合成促進を介してインスリン作用を阻害していることが示され, PC とは異なる機序でインスリン抵抗性を惹起している可能性が考えられた。

## 1 目的

インスリン抵抗性 (高インスリン血症) は, 炎症, 交感神経亢進, レニン・アンギオテンシン系, 酸化ストレスなどと関連し, 血管障害, 動脈硬化, 心血管 (CV) イベント発症に関与する。透析・CKD 患者では CV イベントによる死亡が多いが, 腎不全では肥満・糖尿病がなくてもインスリン抵抗性を認める<sup>1)</sup>。インスリン抵抗性は CKD 早期から生じるが, 特定の腎疾患よりも CKD 病態そのものにより惹起される<sup>2)</sup>。さらに, 非糖尿病末期腎不全患者におけるインスリン抵抗性は CV 死亡に対する独立した危険因子であり<sup>3)</sup>, 保存期 CKD においても報告されている<sup>4)</sup>。

そこで, 本研究では, 尿毒素物質の有害性とそのメカニズムを細胞レベルで明らかにするため, 培養脂肪細胞に対する尿毒素物質の作用とその機序の解明について検討を行った。

## 2 方法

マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を培養し, 尿毒素としてフェニル酢酸 (PAA)・インドキシル硫酸 (IS)・p クレゾール (PC)・p クレゾール硫酸 (PCS) などを濃度, 作用時間を変えて添加し, 細胞反応を評価した。脂肪細胞への分化は, 細胞がコンフルエントになった後, 1  $\mu$ g/ml insulin, 0.25  $\mu$ M dexamethasone, and 0.5

Uremic toxin as an inducer of insulin resistance

Department of Internal Medicine 1, Shimane University Faculty of Medicine

Sayuri Tanaka

Toshitsugu Sugimoto

Department of Laboratory Medicine, Shimane University Faculty of Medicine

Shozo Yano

mM IBMX を添加し誘導した。

- ① 細胞の viability を確認後、細胞数と Brd-U により増殖能、アポトーシスを断片化 DNA に対する ELISA 法にてアポトーシスを評価した。細胞の分化・成熟については、Oil Red-O 染色による脂肪蓄積を評価し、重要な分化誘導の転写因子である PPAR $\gamma$  の mRNA 発現について定量的 real time RT-PCR 法を用いて検討した。
- ② インスリン感受性に対する各尿毒素物質の影響を検討するため、細胞内へのグルコース uptake について RI ( $^3\text{H}$ -Labeled 2-deoxyglucose, 2-DOG) を用いたトレーサー実験をインスリン (100 nM) の存在下および非存在下で行った。急性効果ではなく長期作用を明らかにするため、各尿毒素は前駆脂肪細胞の分化開始時より添加した。

### 3 結果と考察

- ① 培養 3T3-L1 細胞の増殖を細胞数で検討したところ、100  $\mu\text{M}$  以上の PC により有意に抑制された。同様の結果は Brd-U によっても確認されたことから、PC は細胞周期に影響を及ぼし細胞増殖を抑制することが示された。アポトーシスの検出では、100  $\mu\text{M}$  以上の PC により 3 日後には有意にアポトーシスが増加していた。次に、分化開始 7 日後の Oil Red-O 染色性や分化開始 3 日後の PPAR $\gamma$  mRNA 発現の低下から、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化・成熟を PC が抑制することを見出した。
- ② 100  $\mu\text{M}$  以上の PC 添加はインスリン存在下、非存在下におけるグルコース uptake を顕著に抑制した。
- ③ PCS, IS, PAA は、培養 7 日後までの細胞数・Brd-U、分化開始後 7 日までの Oil Red-O 染色性や PPAR $\gamma$  mRNA 発現レベルについて検討したが対照群と有意差がなかったため、これらの尿毒素は細胞増殖、分化・成熟に対して影響しないと考えられた。
- ④ 細胞内へのグルコース uptake は、IS, PAA の添加群において変化を認めなかったが、PCS200  $\mu\text{M}$  の添加群においてインスリンによるグルコース uptake 促進作用が有意に阻害された。
- ⑤ PCS200  $\mu\text{M}$  を 7 日間添加した群において TNF $\alpha$

合成が有意に亢進していた。

- ⑥ インスリンによるグルコース uptake 促進作用の PCS による阻害は TNF $\alpha$  中和抗体の前投与にて抑制された。

以上の結果から、脂肪細胞において、PC は細胞増殖、分化・成熟、グルコース uptake に対して強力な抑制作用を示した<sup>5)</sup>。一方、PCS は TNF $\alpha$  の合成促進を介してインスリン作用を阻害していることが示され、PC とは異なる機序でインスリン抵抗性を惹起している可能性が考えられた。

CKD 患者において、PC 濃度の上昇と CV イベント発症に強い関連があることが報告されている<sup>6)</sup>。しかし、PC として測定された物質は、実は PC そのものではなかった<sup>7)</sup>。すなわち、PC は生体内では大部分が代謝され、硫化物である PCS (またはグルクロン酸抱合体) として存在する。すなわち、PC ではなく高濃度の PCS が CV イベント発症と関連する可能性があると考えられる。

今回の結果から、PCS は PC に比較して非常に軽微な有害性が認められるに留まった。しかしながら、PCS は生体への影響がないのではなく、おそらく酸化ストレスやサイトカイン誘導により、CKD 患者におけるインスリン抵抗性の病態形成に関与していることが示唆された。本研究の PCS 濃度は透析患者において認められる濃度であるため、実際に生体への影響が考えられる。今後のさらなる研究の発展と効率的な尿毒素除去の治療法の開発が望まれる。

### 4 結論

本研究から、次の 3 点が明らかになった。

- ① PC は培養マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞の増殖・分化・成熟を抑制し、その結果、グルコース uptake を著明に抑制した。
- ② PCS は細胞増殖・分化・成熟に影響を与えなかったが、おそらく TNF $\alpha$  の誘導を介してインスリンによるグルコース uptake の促進反応を減弱した。
- ③ PAA と IS は、少なくとも今回の実験条件では、3T3-L1 細胞の増殖・分化・成熟に対する有意な影響は認められなかった。

平成 26 年度透析医学会公募研究助成により得られた

成果は、原著論文として投稿中であるため、二重投稿となることを避け、本報告ではその概要を総説的に記載した。

#### 文 献

- 1) Zoccali C, Tripepi G, Cambareri F, et al. : Adipose tissue cytokines, insulin sensitivity, inflammation, and cardiovascular outcomes in end-stage renal disease patients. *J Ren Nutr* 2005; 15 : 125-130.
- 2) Leyking S, Fliser D : Insulin resistance in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9 : 638-640.
- 3) Shinohara K, Shoji T, Emoto M, et al. : Insulin resistance as an independent predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 : 1894-1900.
- 4) Xu H, Huang X, Arnlöv J, et al. : Clinical correlates of insulin sensitivity and its association with mortality among men with CKD stages 3 and 4. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014; 9 : 690-697.
- 5) Tanaka S, Yano S, Sheikh AM, et al. : Effects of uremic toxin p-cresol on proliferation, apoptosis, differentiation, and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Artif Organs* 2014; 38 : 566-571.
- 6) Meijers BK, Claes K, Bammens B, et al. : p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5 : 1182-1189.
- 7) Vanholder R, Bammens B, de Loor H, et al. : Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 : 1464-1467.