

助成番号 0724

メタボリック症候群の腎障害に対する食塩負荷の影響と GLP-1 受容体アゴニストの効果

宇津 貴

滋賀医科大学内科学講座

概要 メタボリック症候群のモデルである高脂肪食負荷マウスを用い腎障害に関して検討したところ、尿中アルブミン排泄量は増加し、糸球体サイズおよびメサンギウム領域も増大し、ヒトの肥満腎症やメタボリック症候群で報告された同様の病態が生じていた。また、高脂肪食マウスではコントロール群に比し、急性ナトリウム負荷後に対する尿中ナトリウム排泄が低下しており、このナトリウム排泄障害がヒトのメタボリック症候群における血圧の食塩感受性亢進に寄与している可能性が考えられた。また、Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) 受容体アゴニスト Exendin-4 は、肥満・糖尿病マウスで観察された糸球体サイズの拡大、メサンギウム領域の増大、ナトリウム排泄障害のいずれも改善した。GLP-1 は、糖代謝の改善効果のみならず腎に存在する受容体を介したナトリウム排泄促進作用を有する可能性が示され、高血圧・肥満にたいする新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

1. 研究目的

われわれは、メタボリック症候群患者では血圧の食塩感受性が亢進していることを証明するとともに、(Uzu T, *et al. J Hypertens* 2006, 文献 1)、肥満における腎障害には全身および腎局所の脂肪毒性が関与している可能性を示した (Kume, *et al. J Am Soc Nephrol* 2007, 文献 2)。これらは、腎における Na 排泄障害の改善と全身および腎局所の脂質代謝の改善が、肥満やメタボリック症候群の腎障害の治療ターゲットになることを示唆している。Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は、炭水化物や脂肪摂取後に小腸から分泌される消化管ホルモン(インレクチン)であり、cAMP をセカンドメッセンジャーとして作用することが知られている。GLP-1 は 2 型糖尿病患者におけるインスリン分泌作用が確認されているが、ジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) による不活化を受けるため半減期が短く臨床応用が困難であった。Exendin-4 は、DPP-IV による分解を受けず GLP-1 受容体アゴニストとして作用するペプチドで、2 型糖尿病患者を対象に糖尿病治療薬として臨床応用が始まっている。さらに、GLP-1 受容体は膵臓以外にも存在

していることが確認されており、Exendin-4 の膵外作用として虚血や心筋症モデルでの心筋保護作用、脂肪肝モデルでの肝脂肪沈着および炎症抑制作用などが報告されている。腎臓においても、GLP-1 受容体の mRNA が発現していること、Exendin-4 によりナトリウム利尿が生じることが報告されており、GLP-1 シグナルが何らかの生理的役割を果たしている可能性が考えられる。またその作用が、糖尿病、肥満、メタボリック症候群の腎障害共通機序として想定される腎局所の脂質代謝異常・腎ナトリウム排泄障害に対し、いずれも改善効果を有していることが期待される。しかし、腎における、GLP-1 受容体の局在、機能や制御機構の知見は乏しく、病的状態での GLP-1 の役割の報告は見あたらない。そこで、我々は GLP-1 に注目し、メタボリック症候群のモデルである高脂肪食負荷マウスを用いて腎内脂質代謝異常と食塩感受性の変化を検討するとともに、肥満・高血糖・高インスリン血症を示すモデル動物を用いて、Exendin-4 による腎保護および血圧の食塩感受性に対する影響を検討した。

2. 研究方法

2.1 腎局所の脂肪酸代謝障害および腎組織に影響を与えるか否かを検証するために、6週齢の雄性 C57BL6J マウスを、全摂取エネルギー中脂肪比率が60%の高脂肪食群と脂肪比率が10%の対照群に分け、全身の代謝状態と腎臓の変化について検討した。

腎のマーカーとして、尿中アルブミン排泄量および腎組織学的変化を用いた。さらに、腎臓における病態生理学的異常については、免疫組織染色を用いIV型collagenの発現、oil red染色を用い腎内脂肪沈着についての検討も行った。

2.2 高脂肪食負荷肥満マウスにおいて、腎ナトリウム排泄が障害されているか否かを検討するため、6週齢の雄性 C57BL6Jマウスを、全摂取エネルギー中脂肪比率が60%の高脂肪食群と脂肪比率が10%の対照群に分け12週飼育し、食塩負荷時による尿中Na排泄能の変化について検討した

2.3 GLP-1が腎に直接作用を有する可能性を探索するため、マウスの腎にGLP-1受容体のmRNAが発現しているか否かを検証した。また、肥満・高血糖・高インスリン血症を示すモデル動物である雄性db/dbマウスと対照として雄性C57BLKS/J db/m miceを用い、db/dbマウスが腎局所の脂肪酸代謝障害や腎ナトリウム排泄障害を有しているのか、さらにExendin-4がこれらの異常を改善できるかについて検証した。Exendin-4は一日2回、腹腔内に投与し、vehicle群にはExendin-4と浸透圧を合わせた同量のマントールを一日2回腹腔内に投与した。

2.4 db/dbにおいて生じる腎組織障害が、Exendin-4によって阻止できるかについて、Exendin-4を一日2回腹腔内投与を行い検討した。

3. 研究結果

3.1 12週間の高脂肪食負荷を行ったマウスでは、体重(図 1A)、空腹時血糖値(図 1B) 血圧値(図 1C)のいずれもが、食餌変更後から増加・上昇し、12週後においては、コントロール食にて飼育したマウスに比して、いずれも有意に高値を示した。

次に、ヒトのメタボリック症候群において変化がみられる血糖以外の血中マーカー、すなわち、血中インスリン濃度、中性脂肪、HbA1c、アディポネクチンを測定した。表 1に

その結果を示す。12週の高脂肪食負荷によって、HbA1c 上昇および空腹時インスリン値の上昇を認めたことより、インスリン抵抗性を有しており、中性脂肪値の上昇アディポネクチン値の減少がみられた。また、体重増加にともない内臓脂肪が増加していたことをCTにて確認した(data not shown)。以上より、雄性C57BL6Jマウスに高脂肪食負荷を行うことによって、内蔵肥満、インスリン抵抗性、高中性脂肪血症、高血圧、アディポカインの異常など、ヒトのメタボリック症候群に類似した病態を誘発できることが確認された。

次に、このようなモデルで腎に関するパラメーターがどのように変化するかを検討した。図 2 上段に示すよう

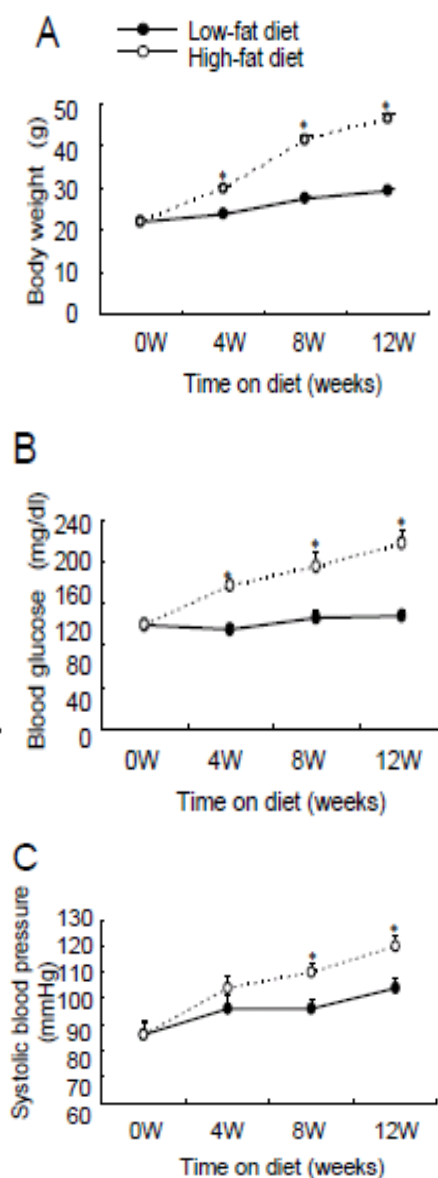


図 1

表 1. The characteristics at the 12th wk of experimental period

	Low-fat diet	High-fat diet
Plasma triglyceride (mg/ml)	83.4 ± 8.1	174.1 ± 7.6*
Hemoglobin A1c (%)	2.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1*
Plasma insulin (ng/ml)	0.20 ± 0.06	0.68 ± 0.09*
Adiponectin (ng/ml)	20.9 ± 0.7	13.6 ± 1.6*

Values are means ± SE. * $P < 0.05$ vs. mice on a L.F.D.

に、尿中アルブミン排泄量は、高脂肪食負荷 8 週後からコントロール群に比して有意な増加を示した。図 2G および図 2H に示したように、PAS 染色を行い定量化した糸球体サイズおよびメサンギウム領域を指標として腎組織の変化について検討を加えたところ、高脂肪食によって糸球体サイズは週齢を重ねるごとに大きくなり、その増大はメサンギウム領域の拡大をともなっていた。これらの事実はヒトの肥満腎症やメタボリック症候群で報告された同様の病態が、われわれが作成した高脂肪食肥満マウスにて生じていることを示している。さらに、高脂肪食群の腎臓では、糸球体のIV型collagenの増加とともに、糸球体・尿細管への脂肪沈着の増加を認め(data not shown)、全身のみではなく腎局所における代謝障害に基づく脂肪沈着が腎障害の発症に関与している可能性が考えられた。

3. 2 ヒトにおけるメタボリック症候群や高脂肪食負荷による血圧上昇機構に、腎におけるナトリウム代謝が関与している可能性を考え、食塩負荷による腎ナトリウム排泄に対する高脂肪食の影響を検討した。マウス腹腔内に食塩水を注入し、腎からのナトリウム排泄量を測定した。図 3A に示すように、高脂肪負荷群において、コントロール群に比し、負荷後から 4 時間までの尿中ナトリウム排泄が低下していたが、負荷 6 時間後では両者の差異は消失した。この急性ナトリウム負荷に対する反応性の低下は、高脂肪食によって腎ナトリウム排泄障害が生じていることを示しており、このナトリウム排泄障害がヒトのメタボリック症候群における血圧の食塩感受性亢進に寄与している可能性が考えられた。

3. 3 マウス各種臓器におけるGLP-1受容体の発現を図 4 に示す。GLP-1受容体は、膵臓に多く存在するが、膵臓のみではなく、多臓器に発現がみられ、腎臓においても発現していることを確認した。そこで、次に、肥満2型糖尿病モデルであるdb/dbマウスに対し、GLP-1受容体アゴニスト

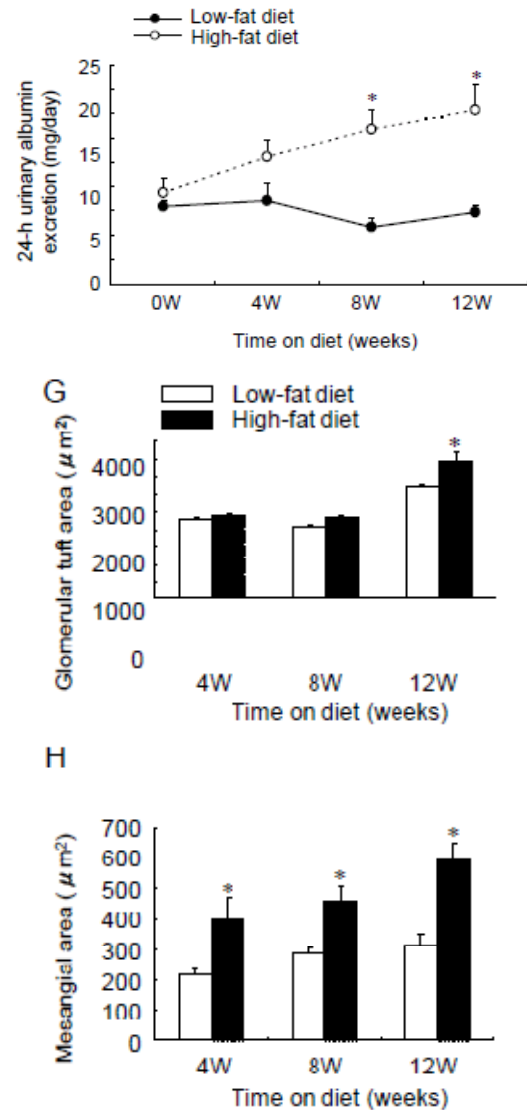


図 2

である Exendin-4 の腎作用について検討した。db/db マウスは、肥満・高血糖とともに血圧の上昇を示すが、Exendin-4 を投与したマウスでは、それら全てのパラメーターが改善していた。この Exendin-4 投与によって得られた降圧作用が、全身の代謝状態を改善したことのみで生じ

たのか、あるいは Exendin-4 が腎に直接作用を有しているのかを確認するため、非肥満の db/m マウスと肥満 db/db マウスに対して腹腔内に腹腔内に食塩水を注入し、腎ナトリウム排泄量を測定した。結果を図 5 に示す。

db/db マウスでは、db/m マウスに比し生理食塩水負荷に対する尿中ナトリウム排泄が障害されていたが、Exendin-4 の投与によりその障害は改善した。また、db/m マウスに対しても Exendin-4 による腎ナトリウム排泄亢進作用が観察された。以上より、Exendin-4 は体重減少、全身の代謝状態の改善のみではなく、腎に対しても直接作用し、ナトリウム排泄を促すことによる血圧低下作用を有していることが示唆された。Exendin-4 は受容体に結合後、細胞内cAMP濃度の上昇を介してインスリン分泌亢進などの作用を発現することが知られている。そこで、この腎における作用が、腎局所における GLP 受容体-cAMP を介していることを確認

するため、db/m および db/db マウスにおいて Exendin-4 投与による尿中 cAMP 排泄の変化を観察した。図 6 に示すように、db/m および db/db マウスのいずれも、Exendin-4

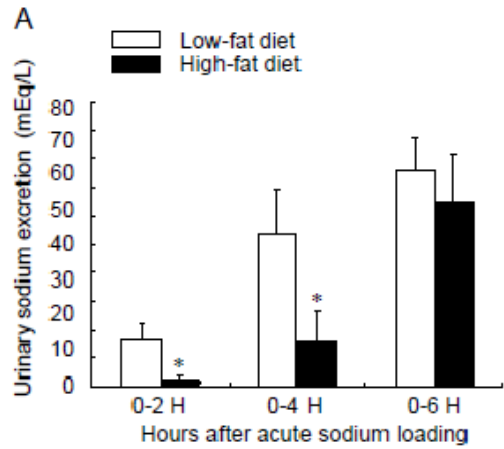


図 3. 高脂肪食負荷による食塩負荷時の腎ナトリウム排泄における変化

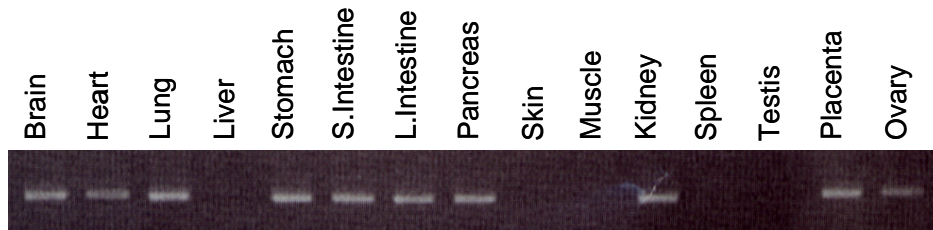


図 4. マウスにおけるGLP-1受容体mRNA発現

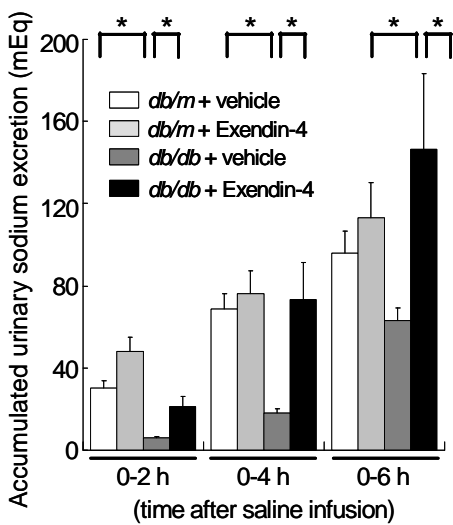


図 5. 生理食塩水負荷による尿中ナトリウム排泄量の変化
*P < 0.05

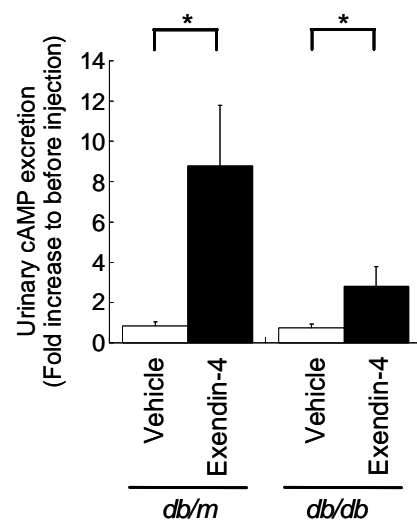


図 6. Exendin-4 による尿中 cAMP 排泄変化

の尿中 cAMP 排泄量は亢進していた。つまり、肥満糖尿病モデル動物に対し、Exendin-4 は GLP 受容体を介して腎に対する作用を有しており、その作用を介して尿中ナトリウム排泄亢進が生じるものと考えられた。

高脂肪食負荷にて糸球体サイズの拡大とメサンギウム増大が生じること、高脂肪食負荷にて腎ナトリウム排泄障害が生じることが明らかになるとともに、Exendin-4 は肥満糖尿病モデル動物にて観察されたナトリウム排泄障害を腎に対する直接作用によって改善する可能性が示された。そこで次に、Exendin-4 が肥満糖尿病モデル動物にて観察される糸球体障害を改善し得るかについて腎組織の検討を行った。図 7 に示した糸球体サイズ、図 8 に示したメサンギウム領域のいずれにおいても、db/m マウスに比し db/db マウスでは増大していた。しかし、Exendin-4 の投与を 12 週間行ったマウスでは、同週齢の db/m マウスに対する腎組織に影響を与えなかったが、db/db マウスで観察された糸球体サイズの拡大、メサンギウム領域の増大のいずれも改善した。

4. 考察

肥満・メタボリック症候群は心血管合併症のみではなく腎に関しても危険因子と考えられている。また、腎が障害されると、心血管合併症の危険が増大することが明らかになり、慢性腎臓病(CKD)＝心血管リスクとの概念が定着している。しかし、つまり、肥満・メタボリック症候群の心血管リスク増大の一因に腎の要素が関与していると考えられる。しかし、肥満・メタボリック症候群による腎障害の発症・進展機構は明らかにされていない。我々の今回の検討によって肥満を呈する糖尿病やメタボリック候群に伴う慢性腎疾患には、全身の代謝状態のみではなく腎極所における脂肪に関する代謝が関与していることが示された。さらに、腎ナトリウム排泄障害に基づいた食塩感受性の亢進が腎のみではなく、全身血圧の上昇を介して、心血管リスクの増大に関わっている可能性も示唆された。さらに、GLP-1 には、糖代謝の改善効果のみならず腎に存在する受容体を介したナトリウム排泄促進作用を有する可能性が示され、高血圧・肥満を呈する 2 型糖尿病患者に対する新たな治療戦略になる可能性が考えられた。

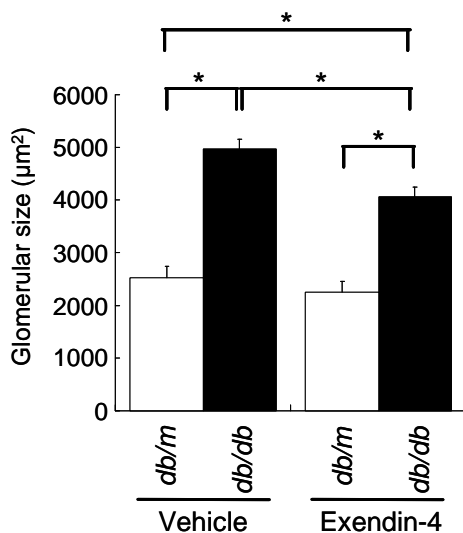


図 7. 肥満糖尿病マウスに対する Exendin-4 による糸球体サイズ拡大の抑制

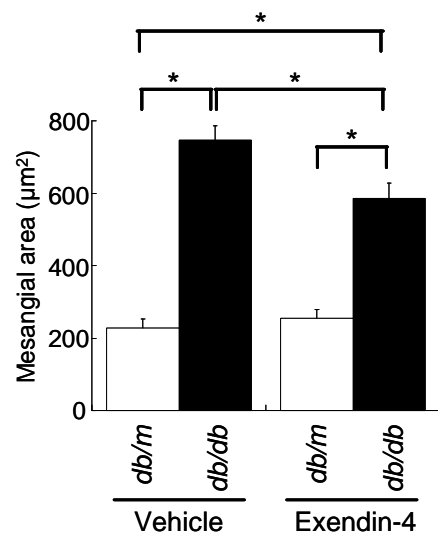


図 8. 肥満糖尿病マウスに対する Exendin-4 によるメサンギウム領域拡大の抑制

No. 0724

Exendin-4, GLP-1 Receptor Agonist, Ameliorates the Development of Renal Injury and High Salt-Sensitivity of Blood Pressure in Type 2 Diabetic Mice

Takashi Uzu

Shiga University of Medical Science

Summary

The metabolic syndrome is associated with the development of increased risk for chronic kidney disease (CKD). Here, we examined the renal injury in metabolic syndrome and type 2 diabetes by using mice under a high fat diet (HFD) or type 2 diabetic db/db mice. In addition, we examined the effect of Exendin-4, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analog on the renal abnormalities.

HFD induced core characteristics of metabolic syndrome and renal abnormalities, including such as glomerulosclerosis and albuminuria. In addition, the urinary sodium excretion in response to salt-loading was significantly attenuated by HFD. The db/db mice also showed albuminuria, glomerulosclerosis and mesangial expansion. Treatment with Exendin-4 attenuated the developments of hyperglycemia and hypertension, and subsequently ameliorated the increases in urinary albumin excretion, mesangial expansion and glomerulosclerosis. In db/db mice, urinary sodium excretion in response to sodium-loading was delayed, and high-salt-induced hypertension was observed. In contrast, these alterations in response to salt-loading in db/db mice were attenuated by Exendin-4. These results indicated that GLP-1 signaling regulates salt-sensitivity, and Exendin-4 can ameliorate the development of nephropathy through the improvements of high salt-sensitivity.