

論文の内容の要旨

論文題目 NADPH oxidase: A Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy

1. Oxidative stress and NOS in rat diabetic nephropathy: Effects of ACEI or ARB
2. Effect of combination therapy with dipyridamole and quinapril in diabetic nephropathy
3. Radical scavenging effect of gliclazide in diabetic rats fed with a high cholesterol diet.

和訳 糖尿病性腎症の治療標的としての NADPH oxidase

1. 糖尿病性腎症ラットにおける酸化ストレスと NOS: ACEI と ARB の効果
2. 糖尿病性腎症におけるジピリダモールとキナプリルの併用療法の効果
3. 高コレステロール食負荷糖尿病ラットにおけるラジカルスカベンジャー作用を持つグリクラジドの効果

指導教官 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 小野里 マリステラ リカ

【はじめに】酸化ストレスは糖尿病や高血圧、心血管系疾患の発症進展に重要な役割を果しており近年、多くの研究者が重点的に研究している。酸化ストレスはミトコンドリア電子伝達系、キサンチンオキシダーゼ、シクロオキシゲナーゼ、チトクローム P450、nitric oxide synthase (NOS)などにより産生されるが、主な産生源は nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 由来のスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)である。 $O_2^{\cdot-}$ は細胞膜や細胞質内の酵素、DNAの酸化により直接細胞障害を起こしたり、細胞増殖シグナルや接着分子、線維化の活性化を引き起こす。マクロファージの classic phagocytic NADPH oxidase は p22phox と gp91phox の 2つの膜成分と p47phox, p67phox, p40phox, small GTP-binding protein の Rac などの細胞質成分から構成される。non-phagocytic NADPH oxidase の構成は phagocytic NADPH oxidase と同様であるが、われわれは

腎臓では NADPH oxidase の各成分が糸球体、遠位尿細管、macula densa、血管平滑筋や内皮細胞に存在し、NADPH oxidase は nitric oxide (NO)合成酵素(NOS)とネフロン上で共存し、NO の作用を調節していることを高血圧モデルで報告した。

【目的】糖尿病モデルにおいて NADPH oxidase の発現を調節し酸化ストレスを抑制することにより糖尿病性腎症の治療を検討した。

【方法】糖尿病モデルはストレプトゾトシン (60mg/kg 体重) の静注により作成し2週目よりアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI, quinapril 3mg/kg/day), アンジオテンシン受容体 AT1 遮断薬 (ARB, candesartan 0.05mg/kg/day)で4週まで治療し NADPH oxidase の発現と酸化ストレスについて検討した。また dipyridamole (0.3g/kg/day)と ACEI(quinapril 3mg/kg/day)の併用効果について検討した。4%高コレステロール食を糖尿病ラットに投与し、NADPH oxidase 発現調節と酸化ストレスの産生に対する糖尿病と高脂血症の相加効果について検討した。

【結果および考察】まずはじめに、1型糖尿病のラットモデルにおいて腎障害発症における NADPH oxidase の役割について検討した。Western blot による検討ではストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット(DM)の腎臓で NADPH oxidase の増加がみられ(DM 0.32 ± 0.02 vs. control 0.21 ± 0.01 arbitrary units; $p < 0.0005$)、その産物である腎組織内の酸化ストレスの増加がみられた (renal hydrogen peroxide in DM 4.62 ± 0.02 vs. control 3.78 ± 0.13 FI unit/ μ g protein, $p < 0.05$)。内皮型 NOS(eNOS)の発現は DM ラットの腎臓で増加しているが、NO 作用はスーパーオキシドによる消去作用のため減少している。NO と $O_2^{\cdot -}$ の反応化合物 peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$)の産生を腎内 nitrotyrosine の Western blot で評価するとコントロールに比べ糖尿病で有意に増加していた。糖尿病ラットにおけるこれらの酸化ストレスの腎臓における増加は糸球体を障害し尿中アルブミン排泄を有意に増加した(DM 1.23 ± 0.39 vs. Control 0.12 ± 0.02 mg/24h, $p < 0.005$)。ACEIあるいはARBは NADPH oxidase p47phox の発現を抑制し(DM+ACEI 0.24 ± 0.02 ; $p < 0.005$ vs. DM; DM+ARB 0.23 ± 0.01 ; $p < 0.002$ vs. DM)、腎組織内の酸化ストレス(renal hydrogen peroxide: DM+ACEI 3.85 ± 0.22 ; $p < 0.05$ vs. DM; DM+ARB 3.72 ± 0.33 FI unit/ μ g

protein; $p < 0.05$ vs. DM)および peroxynitrite (ONOO⁻)の産生を有意に抑制した。ACEI および ARB は腎酸化ストレスの抑制によりアルブミン尿を有意に減少させた (DM+ACEI 0.29 ± 0.09 , $p < 0.02$ vs. DM; DM+ARB 0.51 ± 0.16 mg/24h, $p < 0.05$ vs. DM)。このことは AT₁ 受容体が糖尿病性腎症早期の酸化ストレスによる腎障害の進展に病因として関与していることを示している。

ACEI/ARB は糖尿病性腎症に効果的ではあるが、腎障害の進展を完全に抑制できるほど満足のいくものではない。そこで part II として ACEI に NO の腎保護作用を増加させる作用のあるジピリダモールを併用しその効果を検討した。ジピリダモールを ACEI に併用するとフォスフォジエステラーゼを抑制し NO のセカンドメッセンジャーである cGMP の分解を抑制することにより NO 作用を増強し、かつ NADPH oxidase の直接的抑制により eNOS の発現を増強し、尿蛋白を正常化し (DM+ACEI+dipyridamole 0.22 ± 0.06 mg/24h, NS vs. Control)、相加的な腎保護作用の増強を示した。

近年、多くの糖尿病患者は高脂血症を合併しており、高脂血症自体も酸化ストレスの産生をもたらすので、腎障害の増悪に関与している。そこで part III として高コレステロール血症が糖尿病性腎症において酸化ストレス産生と腎障害進展に相加的効果をもたらすか検討した。DM ラットに高コレステロール食 (HC-DM) を投与すると 4 週目から NADPH oxidase p47phox の発現が普通食の DM ラットに比べさらに増加し、ICAM-1 の発現増加から糸球体内マクロファージの浸潤が増加した (HC-DM 2.28 ± 0.10 vs. DM 0.40 ± 0.03 , $p < 0.0001$)。酸化ストレスを尿中過酸化脂質 (LPO) で評価すると普通食下で糖尿病ではコントロールに比べ上昇しているが (DM 7.1 ± 1.7 vs. Control 3.3 ± 0.4 nmol/mgCr, $p < 0.005$)、高コレステロール食下では糖尿病になるとさらに著明な増加を示した (HC-DM 125.2 ± 22.0 vs. HC-Control 17.7 ± 1.3 nmol/mgCr, $p < 0.0001$)。さらに、抗酸化機構の MnSOD の発現は高脂血症を合併した糖尿病の腎臓では有意に減少した。Azabicyclo octyl ring 構造により抗酸化作用をもつスルホニル尿素薬のグリクラジドで高コレステロール血症を伴う糖尿病ラットを治療すると酸化ストレスの産生が減少し (尿中 LPO: HC-DM+gliclazide 57.9 ± 13.0 nmol/mgCr, $p < 0.05$ vs.

HC-DM)、さらに MnSOD と eNOS の発現が回復し NO bioavailability が増加した (腎内 nitrite 産生: HC-DM 57.7 ± 4.8 vs. HC-DM+gliclazide $82.9 \pm 14 \mu\text{mol/kidney}$, $p < 0.05$)。グリクラジド治療による NADPH oxidase の抑制と NO bioavailability の増加により ICAM-1 の発現が減少し、糸球体内マクロファージ浸潤が抑制され (HC-DM+gliclazide 1.85 ± 0.08 , $p < 0.0001$ vs. HC-DM)、微量アルブミン尿は有意に改善された。

【結論】腎臓における AT_1 受容体を介した NADPH oxidase の刺激による酸化ストレスの増加と NO bioavailability の減少が糖尿病における腎障害の進展に重要な病因的役割を果していると考えている。ACEI や ARB による腎アンジオテンシン II を介した NADPH oxidase の抑制だけでなく、腎 NADPH oxidase の直接的抑制によって糖尿病性腎症を抑制する治療法が将来的には期待される。

