

論文の内容の要旨

論文題目 Effects of antioxidant drugs in diabetic nephropathy

和訳 糖尿病性腎症における抗酸化薬の治療効果

指導教員 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 浅羽研介

【背景】

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たしており、糖尿病における腎障害にも関与することが知られている。酸化ストレスの程度は活性酸素種 (ROS) の産生系と消去系のバランスにより決定される。ROS はキサンチンオキシダーゼ、nitric oxide synthase (NOS)、ミトコンドリア電子伝達系、シクロオキシゲナーゼ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。マクロファージの phagocyte NADPH oxidase は gp91phox と p22phox の 2 種類の膜成分と p47phox、p40phox、p67phox、Rac などの細胞質成分から構成され、p47phox がリン酸化し細胞質成分が細胞膜に移動して集合体を形成することで活性状態となり $O_2^{\cdot-}$ を産生する。腎臓では NADPH oxidase の各成分が糸球体、macula densa、遠位尿細管、血管平滑筋や内皮細胞に存在する。apocynin は NADPH oxidase の細胞質成分が細胞膜へ移動し集合体を形成するのを阻害する薬剤で、関節炎モデルや Crohn 病モデルにおいて抗炎症・臓器保護

作用が報告されている。tempol は NADPH oxidase により生じた $O_2^{\cdot -}$ を過酸化水素に変換する superoxide dismutase (SOD) mimetic で、血管拡張・血圧降下作用が知られている。

【目的】

糖尿病モデルにおいて NADPH oxidase 阻害薬の apocynin ならびに SOD mimetic の tempol を投与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】

糖尿病ラットモデルはストレプトゾトシン (60 mg/kg 体重) の静注により作成した。2 週目から 8 週目まで apocynin (16 mg/kg/day) もしくは tempol (200 mg/kg/day) で治療し、NADPH oxidase の発現と酸化ストレスについて検討した。

【結果および考察】

まず Part 1 としてストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの腎障害に対する apocynin の効果を検討した。腎臓で NADPH oxidase 構成成分の発現を Western blotting により検討すると、DM 群において細胞質成分の p47phox は腎の細胞膜分画と細胞質分画の両方で増加がみられた (細胞膜分画: DM 0.33 ± 0.04 vs. Control 0.20 ± 0.03 arbitrary unit, $P < 0.05$; 細胞質分画: DM 0.29 ± 0.03 vs. Control 0.18 ± 0.03 arbitrary unit, $P < 0.05$)。apocynin 治療群では細胞膜分画で p47phox の有意な減少が認められたが (0.21 ± 0.03 , $P < 0.05$ vs. DM)、細胞質分画では認められなかった (0.25 ± 0.02 , NS vs. DM)。また、p47phox の細胞膜/細胞質比は治療群で有意に低下した (0.85 ± 0.06 ; $P < 0.05$ vs. DM 1.13 ± 0.05 or vs. Control 1.10 ± 0.07)。これらは apocynin が p47phox の膜への移動を阻害することを示している。一方、細胞膜成分である gp91phox は DM 群で有意に増加したが (0.30 ± 0.02 vs. Control 0.20 ± 0.02 , $P < 0.01$)、apocynin 治療群では有意な増加はみられなかった (0.25 ± 0.02 , NS vs. Control)。もうひとつの膜成分である p22phox の発現は DM 群でも治療群でも変化しなかった。apocynin が p47phox とそのアンカーである gp91phox の結び付きを抑

制し、NADPH oxidase の活性化を阻害することが示唆される。

DM ラットの腎臓では NADPH oxidase の発現亢進に伴い、その産物である酸化ストレスの増加がみられた（尿中過酸化脂質：DM 98.1 ± 7.6 vs. Control 6.5 ± 0.7 nmol/mg Cr, $P < 0.001$ ；尿中過酸化水素：DM 26.9 ± 6.3 vs. Control 11.4 ± 1.2 unit/mg Cr, $P < 0.05$ ）。apocynin は NADPH oxidase を抑制することにより、酸化ストレス産物を有意に抑制した（過酸化脂質： 66.0 ± 10.7 vs. DM, $P < 0.05$ ；過酸化水素： 10.1 ± 1.3 vs. DM, $P < 0.01$ ）。

続いて NO 産生系について検討した。内皮型 NOS (eNOS) の発現は DM ラットの腎臓で増加しており、apocynin はこれを変化させなかった。しかし、腎における NO 産生は apocynin 治療群で DM 群より有意に増加した (DM+apocynin 100.2 ± 11.6 vs. DM 71.0 ± 4.7 $\mu\text{mol/mL}$, $P < 0.05$)。apocynin が O_2^- による tetrahydrobiopterin の酸化を抑制して eNOS uncoupling を防ぎ NO bioavailability を高めた可能性が考えられる。

糖尿病ラットの腎臓では、メサンジウム基質の増加や fibronectin、I 型コラーゲンの発現増加がみられた。また尿蛋白は有意に増加した (0.55 ± 0.13 vs. Control 0.31 ± 0.03 mg/mg Cr, $P < 0.05$)。apocynin 治療による酸化ストレスの抑制と NO bioavailability の増加により、これらの腎組織障害および尿蛋白は有意に改善した (DM+apocynin 0.27 ± 0.02 vs. DM, $P < 0.05$)。

次に Part 2 として tempol による糖尿病性腎症の治療効果を検討した。腎細胞膜分画における NADPH oxidase p47phox の発現は DM 群で有意に増加したが (0.33 ± 0.05 vs. Control 0.20 ± 0.02 arbitrary unit, $P < 0.05$)、tempol により抑制された (0.27 ± 0.03 , NS vs. Control)。p22phox では有意な変化を認めなかった。

NADPH oxidase により生じた O_2^- は SOD により過酸化水素に変換され、過酸化水素は catalase により最終的に水へと分解される。また過酸化水素からは myeloperoxidase (MPO) の作用により ROS の一種である hypochlorite アニオンが産生される。DM ラットの腎臓では NADPH oxidase の発現亢進ならびに catalase の発現低下 (0.31 ± 0.01 vs.

Control 0.36 ± 0.01 arbitrary unit, $P < 0.05$) の結果、過酸化水素の増加を認めた。tempol は SOD 活性を亢進させ (15.9 ± 1.09 vs. DM 13.2 ± 0.37 unit/mg protein, $P < 0.05$)、糸球体内の過酸化水素を抑制したが、腎全体では過酸化水素の産生量は DM 群と同様であった。さらに DM 群では MPO の発現が亢進しており (0.38 ± 0.02 vs. Control 0.24 ± 0.02 arbitrary unit, $P < 0.001$)、その産物である hypochlorite が増加した (44.8 ± 3.4 vs. Control 28.1 ± 4.5 arbitrary unit, $P < 0.01$)。これらは tempol により減少しなかった (MPO: 0.39 ± 0.02 ; hypochlorite: 47.5 ± 2.0 , NS vs. DM)。

腎組織の検討では、DM 群の糸球体で TGF- β および fibronectin の発現亢進、メサンジウム基質の増大を認めたが、これらは tempol により抑制された。一方、尿蛋白および尿中 N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) は tempol により減少しなかった。MPO 亢進に伴い増加した hypochlorite による尿細管障害の影響が考えられる。

【結論】

apocynin は糖尿病ラットにおける NADPH oxidase の発現と p47 phox の細胞膜への移動を抑制することにより、NADPH oxidase の活性化を阻害して酸化ストレスを抑制した。また、apocynin は NO bioavailability を増加させるとともに尿蛋白や腎組織障害を改善した。一方、tempol は糖尿病ラットの糸球体において TGF- β の発現を抑制しメサンジウム基質増加を改善したが、MPO による hypochlorite 産生の増加に伴い尿蛋白は改善しなかった。