

体形態に回復し、糸球体修復の観察に最も適したモデルであると考えた。

【方法】

腹腔内にSTZを投与した糖尿病ラットに抗Thy-1.1抗体(0X-7)を投与し、糸球体にメサンギウム融解、毛細血管傷害を惹起した(DM群)。腹腔内にbufferを投与したラットに0X-7を投与し対照群とした。0X-7を投与して惹起した糸球体傷害後の修復過程を、腎機能、病理組織学的、血管新生関連因子について観察し、DM群と対照群で比較検討した。特に傷害糸球体毛細血管網の修復過程は、Thrombomodulin(TM)とJG12に対する免疫染色を用いて内皮細胞を同定し、TMとProliferating nuclear antigen(PCNA)の二重染色を用いて増生内皮細胞を評価した。電子顕微鏡での観察も行った。血管新生関連因子は、Vascular endothelial growth factor(VEGF)、angiopoietin-1(Ang-1)やAng-2について、免疫染色及びWestern blotを用いて検討した。さらに糸球体修復不全と糸球体炎症の遷延との関連について、活性化メサンギウム細胞を α smooth muscle actin(α SMA)、増生活活化メサンギウム細胞を α SMAとPCNAの二重染色、糸球体上皮細胞障害をDesmin、浸潤マクロファージをED-1の免疫染色を用いて検討した。統計解析にはSPSSを用い、t検定を行った。

【結果】

DM群では0X-7を投与時(day 0: STZ投与後3日目)には、高血糖と浸透圧利尿が惹起されていた。0X-7投与後の糸球体傷害が最も強い7日目に両群とも尿蛋白は最大に達したが、糸球体修復とともに次第に減弱した。しかし、DM群では28日後でも尿蛋白の持続を認めた。

組織学的には、0X-7投与後1日目には、両群とも糸球体メサンギウム細胞融解が惹起され、3日目には毛細血管の破壊像であるballooningが形成され7日目まで増悪した。糖尿病は初期のメサンギウム細胞融解や毛細血管傷害の程度には影響を与えなかった。両群とも7日目頃から傷害糸球体は修復に向かい、血管再生とともにメサンギウム増殖性病変を形成した。対照群では14日目のメサンギウム細胞増殖は強く認めるものの、その後消退し28日目には正常糸球体構造に回復した。DM群では14日目のメサンギウム細胞増殖は部分的で、28日目には糸球体硬化病変への進展がみられた。

糸球体毛細血管は、修復早期に分節性に破壊されballooningを形成した後、対照群では14日目には再生血管がメサンギウム増殖性病変内に多く出現し、28日目まで毛細血管網の発達を認めた。DM群ではメサンギウム増殖性病変内の再生血管は少なく、毛細血管網の修復不全とともに28日目には硬化性病変を形成した。糸球体内のTM陽性+PCNA陽性の増生内皮細胞は、DM群では修復

早期で対照群よりも減少しているにも関わらず、28 日目では不完全な血管修復を伴い対照群よりも増加していた。電子顕微鏡では再生内皮細胞の成熟不全もみられた。

メサンギウム融解後には α SMA 陽性+PCNA 陽性の増生活性化メサンギウム細胞が増加し傷害糸球体は修復に向かう。DM 群 7 日目、14 日目で対照群より少なかった増生活性化メサンギウム細胞は、28 日目では対照群よりも増加した。傷害糸球体上皮細胞は desmin の免疫染色で同定可能である。対照群では傷害上皮細胞は 28 日目までに消失したが、DM 群では多くの残存していた。ED-1 陽性のマクロファージも、対照群では 28 日目までに消失したが、DM 群では残存していた。血管修復不全にともない糸球体内のメサンギウム細胞の増生活性化の継続、上皮細胞傷害像やマクロファージの浸潤の持続が認められ、微小血管網の再生不良を伴う傷害糸球体の修復不全には糸球体の炎症反応が持続し、糸球体硬化性病変に進展することが示された。

糸球体内の血管新生関連因子である VEGF, Ang-1, Ang-2 の発現も糖尿病状態では変化していた。VEGF は糸球体上皮細胞と増殖メサンギウム細胞に発現しているが、対照群では 7 日目に発現が最大となりその後漸減した。DM 群では 7 日目の発現は少なく、その後漸増した。修復初期での VEGF 産生の低下が血管新生・再生の不良を誘導し、不完全な血管修復の継続が VEGF 産生の持続に関連していると考えた。Ang-1 は糸球体上皮細胞と増殖メサンギウム細胞に発現していたが、DM 群では修復過程を通じて明らかな増加を認めなかった。Ang-2 は DM 群で次第に漸増した。DM 群の修復後期にも残存していた再生血管の成熟不全は Ang-1 低値と Ang-2 高値のバランスの乱れが影響していると考えた。

【考察】

糖尿病の重篤な合併症として、糖尿病腎症と網膜症が知られている。その両者には糖尿病による微小血管傷害が関与している。糖尿病腎症の進展にも糸球体の微小血管傷害とメサンギウム融解が繰り返し起こっている。傷害組織の予後は、傷害と修復のバランスにより規定されているが、糖尿病腎症での糸球体毛細血管網の修復を観察した論文はない。微小血管傷害後の糸球体内の血管新生関連因子の動態も明らかではない。本研究は、糖尿病における微小血管傷害後の毛細血管網の修復、再生血管の成熟を主体に観察し、それに関わる血管新生関連因子について明らかにした。さらに、糖尿病により傷害毛細血管網の修復が不完全であると糸球体炎症反応の持続がみられ、糸球体硬化病変へ進展することを示した。糖尿病腎症の進展には、その傷害因子の検討ばかりではなく、傷害からの修復機転を考慮した展開が必要である。

組織の修復には血管新生が関わり、血管新生関連因子である VEGF, Ang-1,

Ang-2 は重要な役割を担う。糖尿病では多くの研究で VEGF が上昇することが報告されている。しかし、最近のヒトの症例では、低下する場合もあることも報告されている。本研究では、糸球体微小血管傷害後に誘導される VEGF の増加が糖尿病では対照群よりも軽微で、修復早期にみられる血管新生を伴う毛細血管の再生も不良であった。一方、対照群では毛細血管の修復の完了とともに VEGF は減少したが、糖尿病では毛細血管修復が継続し VEGF の産生も持続していた。この結果は、微小血管傷害の原因とされている糖尿病の VEGF の産生亢進が、糖尿病による傷害微小血管の修復不全の結果である可能性を示している。Ang-1 は血管の安定化や成熟に、Ang-2 は血管を不安定化し退縮に関与する。一般的に糖尿病下では Ang-2 の増加が指摘されている。本研究では、糖尿病下で Ang-1 は持続的に低下し、修復後期で Ang-2 は上昇した。この Ang-1/Ang-2 の比の低下が、再生毛細血管の成熟不良に関連していると思われた。腎糸球体では上皮細胞が VEGF, Ang-1, Ang-2 を主に産生している。糖尿病での糸球体上皮細胞傷害の持続が血管新生関連因子の産生に影響している可能性も示唆された。

糖尿病では、内皮細胞、メサンギウム細胞の活性化や増生の持続、マクロファージ浸潤の残存に伴う糸球体炎症の遷延を認めた。糸球体毛細血管網が傷害された場合、糸球体の修復には傷害血管の修復が必須であり、修復の完了に先がけて糸球体炎症の消退を認める。一般に糖尿病腎症では、局所の炎症が継続していることも知られている。今回の糸球体炎症の遷延も、血管修復不良による傷害糸球体の修復不全に関連していると考えられた。

近年、糖尿病網膜症に抗 VEGF 療法が適用されている。この治療戦略は画期的ではあるが、VEGF 抑制が糸球体微小血管の傷害を誘導し、蛋白尿が増悪する報告もある。今回の研究でも、糖尿病下で糸球体硬化に至る過程に VEGF の低下を認めた。VEGF 抑制療法は微小血管傷害を増悪する可能性もあり、安易な VEGF 抑制療法の施行には注意が必要である。VEGF 増加は糖尿病腎症の原因ではなく、修復不全の結果の可能性もあり、糖尿病腎症には微小血管傷害からの血管保護と血管修復促進を考慮した治療が必要と考える。

【結論】

糖尿病ではメサンギウム融解や微小血管傷害による傷害糸球体の修復過程が遅延した。糖尿病腎症の進展には、微小血管傷害そのものだけでなく、修復不良が関与している可能性が高かった。糖尿病存在下の腎修復機転の検討は、本研究が初めてであり、今後の糖尿病腎症の進展機序の解明に寄与し、有用な治療法の開発に繋がると考える。