

学位論文題名

実験糖尿病マウスにおける糖尿病腎症への
エラスターゼの効果検討

学位論文内容の要旨

I. 緒言

糖尿病のような高血糖状態の中ではグルコースと蛋白が非酵素的に結合し終末糖化産物 (AGE) が産生され、細胞外基質などに蓄積し、組織の機能や構築に障害をきたし糖尿病慢性合併症の発症進展に関与するとされている。AGE は多様な物質の総称であるが、最近ではカルボキシメチルリジン(CML)構造を持つ CML 型 AGE と、同構造を持たない non-CML 型 AGE に大別されており、糖尿病患者の血中や腎組織では両者の蓄積が認められている。AGE 産生や蓄積の阻害は合併症の治療に有用であると考えられ、現在までにアミノグアニジン、PTB、OPB-9195 などが AGE 阻害剤として開発されているが、これらの薬剤は長期投与での生体への安全性が確立されていない。ブタの膵臓から抽出されたエラスターゼは脂質代謝改善薬として長く用いられているが、糖尿病モデル動物の腎糸球体の基底膜の肥厚を抑えることが報告されており、また糖尿病患者に対する投与では尿アルブミン排出量を減少させるという報告がある。本研究では膵エラスターゼ (以下エラスターゼ) の糖尿病腎症に対する効果を、AGE 阻害の関与の点から検討した。

II. 材料と方法

1. エラスターゼの AGE 阻害効果の評価

マウスIV型コラーゲンをコーティングした ELISA 用プレートに AGE 化ウシ血清アルブミン (AGE-BSA) を入れ、インキュベーションしてコラーゲンと結合させた。各 well にエラスターゼを添加しさらにインキュベーションした後 well を洗浄し、プレートのコラーゲンに結合している AGE-BSA を ELISA にて測定した。コラーゲンに結合できずに除去された AGE-BSA の比率をエラスターゼ非添加の well を基準として算出し、エラスターゼの AGE 阻害率とした。

2. 糖尿病モデル動物の作成と薬剤の投与

8 週齢の雌性 Balb/c マウスにストレプトゾトシンを腹腔内投与し、2 週後の血糖値が 300mg/dl 以上のものを糖尿病とした。未処置正常マウスをコントロール群とした。糖尿病を発症したマウスのうちエラスターゼ投与群にはエラスターゼを、プラセボ群には生理食塩水を連日筋注した。投与期間は 12 週間とした。

3. 血糖値および尿アルブミン排出量 (UAE; urinary albumin excretion) の測定

マウスの随時血糖は 2 週毎にグルコースオキシダーゼ法により測定した。また薬剤投与後 4 週と 12 週で 24 時間蓄尿を行い、UAE をマウスアルブミンに対する抗体を用いた ELISA 法にて測定した。

4. 腎の組織学的評価および AGE の測定

投与後 12 週後でマウスを犠牲死させ腎を採取した。腎の PAS 染色標本の光顕像を、画像情報をデジタル処理する MCID システムに取り込み、糸球体の断面積を計測し、形態計測の理論式 (Weibel の式) から糸球体体積を求めた。また同システムを用いて糸球体の断面積に占めるメサンギウム領域の比率を計測した。

AGE の測定は腎皮質を酸加水分解してコラーゲン分画を抽出し、ヒドロキシプロリン量の測定からコラーゲン量を算出、さらにコラーゲン分画中の non-CML 型 AGE 量および CML 型 AGE 量を、抗 AGE 抗体を用いた競合 ELISA で測定した。

III. 結果

1. In vitro におけるエラスターゼの効果

0.5 μ g/ml のエラスターゼはコラーゲンと AGE-BSA との結合を時間依存性に阻害し、8 時間での阻害率は 43%であった。5 μ g/ml のエラスターゼの結合阻害率は 8 時間で 65%であった。50 μ g/ml のエラスターゼの結合阻害率は 5 μ g/ml と有意差はなかった。

2. 糖尿病モデル動物におけるエラスターゼの効果

エラスターゼ投与群とプラセボ群では血糖値は 400mg/dl を越えていたが、各時点における両群間の差はなかった。投与後 4 週ではプラセボ群とエラスターゼ投与群の間に UAE の差はなかった。12 週ではプラセボ群の UAE は正常群の 5.7 倍に増加していたが、エラスターゼ投与群では 1.5 倍で有意に抑制されていた。組織学的評価ではプラセボ群の糸球体体積は正常群の 1.5 倍に増大していたが、エラスターゼ投与群では 1.2 倍と有意に抑制された。また糸球体面積に対するメサンギウム領域比はプラセボ群では正常群の 2.3 倍に拡大していたが、エラスターゼ投与群では 1.3 倍と有意に抑制された。腎皮質の non-CML 型 AGE 量はプラセボ群が正常群の 3.4 倍であったが、エラスターゼ投与群では 1.3 倍と有意に低かった。また CML 型 AGE 量もプラセボ群が正常群の 2.9 倍であったのに対し、エラスターゼ投与群では正常群の 1.5 倍と抑制されていた。

IV. 考察

糖尿病腎症の病理学的特徴は糸球体の肥大、基底膜の肥厚、メサンギウム領域の拡大であり、臨床的には微量アルブミン尿から顕性蛋白尿へと進展する。これらの変化の要因として AGE の関与が知られており、AGE の蓄積により糸球体の size barrier および charge barrier の破綻をきたし、アルブミン尿が出現する。また細胞外マトリックスに AGE が蓄積すると、プロテアーゼによる分解を受けずらくなり、メサンギウム領域が拡大、糸球体は肥大し、腎症の病理学的変化が進行する。今回の結果よりエラスターゼはストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの糸球体の肥大、メサンギウムの拡大を抑制し、尿アルブミン排出量を減少させることが示された。エラスターゼが尿アルブミン排出量を減少させるという報告は以前より散見されるが、その作用機序はこれまで不明であった。今回の検討では、エラスターゼが *in vitro* で AGE 化蛋白とコラーゲンの結合を阻止し、*in vivo* では腎における AGE の蓄積を阻害し、糖尿病腎症の発症と進展を阻止できることを示唆している。エラスターゼが AGE の蓄積を抑制する機序についてはコラーゲンの水解作用などが推察されるが、詳細なメカニズムについてはさらに検討が必要である。現在まで、報告されているアミノグアニジン、PTB、OPB-9195 などの AGE 阻害剤は実験動物における有効性は確認されているが、長期投与時の生体への安全性は確立されていない。エラスターゼは脂質代謝改善剤として長年用いられてきた

薬剤であり、現在まで重大な副作用の報告ない。したがって、エラスターゼは現在使用できる AGE 阻害剤として有望である可能性があり、今後の臨床的な有用性の検討が必要と考えられた。

V. 結語

エラスターゼは *in vitro* においてコラーゲンの AGE 化を阻害した。またストレプトゾトシン糖尿病マウスへの投与により腎での AGE の蓄積を阻害し、糸球体肥大やメサンギウム領域の拡大を阻止し、尿アルブミン排出量の増加を抑制した。以上の結果より、エラスターゼは AGE 阻害剤として糖尿病腎症の治療に有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 小 柳 知 彦
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

実験糖尿病マウスにおける糖尿病腎症への エラスターゼの効果検討

糖尿病のような高血糖状態の中ではグルコースと蛋白が非酵素的に結合し、終末糖化物質 (AGE) が組織に蓄積し、糖尿病慢性合併症の発症と進展に関与する。AGE は多様な物質であるが、最近ではカルボキシメチルリジン(CML)構造を持つ CML 型 AGE と、同構造を持たない non-CML 型 AGE に大別されている。AGE を阻害することは合併症の治療に有用であると考えられる。ブタの膵臓から抽出されたエラスターゼは糖尿病モデルマウスの腎系球体の基底膜の肥厚を抑えることが報告されており、糖尿病腎症患者に対する投与で尿アルブミン排出量を減少させるという報告がある。本研究では膵エラスターゼ(以下エラスターゼ)の糖尿病腎症に対する効果を、AGE 阻害の点から検討した。*In vitro* の系ではエラスターゼがコラーゲンの AGE 化を阻止するかどうかを検討した。すなわち、マウスIV型コラーゲンをコーティングした 96well のプレートに AGE 化ウシ血清アルブミン (AGE-BSA) を入れ、コラーゲンと結合させた。各 well にエラスターゼを添加、インキュベーションした後、洗浄し、プレート上のコラーゲンに結合している AGE-BSA を ELISA にて測定した。コラーゲンに結合できずに除去された AGE-BSA の比率をエラスターゼ非添加の well を基準として算出し、エラスターゼの AGE 阻害率とした。0.5 μ g/ml のエラスターゼはコラーゲンと AGE -BSA との結合を時間依存性に阻害し、8 時間での阻害率は 43%であった。5 μ g/ml のエラスターゼの結合阻害率は 8 時間で 65%であった。50 μ g/ml のエラスターゼの結合阻害率は 5 μ g/ml と有意差はなかった。つぎに、糖尿病モデル動物をもちいて検討を行った。8 週齢の雌性 Balb/c マウスにストレプトゾトシンを腹腔内投与し、糖尿病を発症したマウスのうちエラスターゼ投与群にはエラスターゼを 5mg/kg、プラセボ群には生理食塩水を連日筋注した。投与期間は 12 週間とした。マウスの随時血糖を 2 週毎にグルコースオキシダーゼ法により測定した。各時点でエラスターゼ投与群とプラセボ群との間に血糖値の差はなかった。投与後 4 週と 12 週で 24 時間蓄尿を行い、尿

アルブミン排出量をマウスアルブミンに対する抗体を用いた ELISA 法にて測定した。投与後 12 週ではエラスターゼ投与群の尿アルブミン排出量はプラセボ群の約 40%に抑えられていた。投与後 12 週でマウスを犠牲死させ、腎を摘出した。腎の PAS 染色標本の光顕像を、画像情報をデジタル処理する MCID システムに取り込み、糸球体の断面積を計測し、形態計測の理論式 (Weibel の式) から糸球体体積を求めた。また、同システムを用いて糸球体の断面積に占めるメサンギウム領域の比率を計測した。プラセボ群の糸球体体積は正常群の 1.5 倍に増大していたが、エラスターゼ投与群では 1.2 倍と有意に抑制された。糸球体断面積に対するメサンギウム領域比は、プラセボ群では正常群の 2.3 倍に拡大していたが、エラスターゼ投与群では 1.3 倍と有意に抑制された。ついで、腎皮質を酸加水分解してコラーゲン分画を抽出し、ヒドロキシプロリン量を定量しコラーゲン量を算出、さらにコラーゲン分画中の non-CML 型 AGE 量および CML 型 AGE 量を、抗 AGE 抗体を用いた競合 ELISA で測定した。腎皮質の non-CML 型 AGE 量はプラセボ群が正常群の 3.4 倍であったが、エラスターゼ投与群では 1.3 倍で有意に低かった。また CML 型 AGE 量もプラセボ群が正常群の 2.9 倍であったのに対し、エラスターゼ投与群では正常群の 1.5 倍で有意に抑制されていた。以上の結果より、エラスターゼが *in vitro* で AGE 化蛋白とコラーゲンの結合を阻止し、*in vivo* では腎における AGE の蓄積を阻害し、糖尿病腎症の発症と進展を阻止できることが示唆された。

この論文はエラスターゼが AGE 阻害剤として糖尿病腎症の治療に有用であることを示したものであり、糖尿病合併症の治療に寄与するところが大きいもの考える。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。