

糖尿病患者における血管合併症と nick β 2-GPIratio との関連性に関する検討

学位論文内容の要旨

糖尿病における血管病変の原因としては、酸化ストレスや糖化蛋白による血管内皮細胞機能障害、血小板機能の亢進、凝固因子の増加、線溶系の低下が報告されており、糖尿病患者は非糖尿病患者と比較し血栓形成傾向にあると考えられている。生体内における血栓形成傾向、凝固線溶異常を推定する臨床的マーカーとしては、フィブリノーゲン (Fbg)、プラスミノーゲンアクチベータ、インヒビター (PAI-1)、プラスミン・ α_2 プラスミンインヒビター複合体 (PIC)、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体 (TAT)、D-ダイマー、などがあり、生体内での凝固反応を促進と抑制の両面より制御している興味深い蛋白として β 2-GPI が注目されている。

β 2-GPI は、I, V の 5 つのドメインより構成され、陰性荷電を持つリン脂質に結合し、血小板凝集抑制、トロンビン生成の抑制、Xa 因子の活性化抑制など凝固反応を抑制する一方、活性化プロテイン C による Va 因子阻害能を抑制する事で凝固を促進する作用も有している。凝固抑制作用や、凝固亢進作用はリン脂質結合能に由来しており、V ドメインに存在する Lys317-Thr318 の結合が切断されるとリン脂質に対する結合の親和性が減少し、 β 2-GPI の機能は消失し nick β 2-GPI に変化することが知られており、更にこの切断はプラスミンやトリプシンにより起こる事が明らかとなった。血管内に微小血栓が生成されると、プラスミンが産生され、 β 2-GPI が nick β 2-GPI に変化すると考えられる。そこで本研究では nick β 2-GPIratio, すなわちプラスミンにより β 2-GPI から nick β 2-GPI に変化した割合 [(血清中 nick β 2-GPI / 血清 total β 2-GPI) \times 1000] と糖尿病における血管合併症との関連性を検討し、血管障害を反映する新しい指標としての有用性を検討した。

対象は北海道大学病院第二内科外来に通院している糖尿病患者のうち、文書にて同意が得られた 204 人 (男性: 女性 110 人: 94 人)。年齢は 24 歳から 81 歳 (60.3 \pm 12 歳)。更に三井記念病院脳ドック受診者のうち研究に同意した 495 人を非糖尿病対照群とした。外来受診時、身体所見と血液検査を行い、総頸動脈内膜中膜肥厚 (IMT) の測定を実施した。降圧剤内服例または、収縮期血圧、拡張期血圧が各々 140mmHg, 90mmHg 以上を高血圧と判定した。高脂血症薬内服例または、血清総コレステロール、中性脂肪がそれぞれ 220mg/dl, 150mg/dl 以上を高脂血症と判定した。

糖尿病細小血管合併症の有無は下記の方法で検討した。糖尿病神経障害は自覚症状と、他覚的検査結果にて振動覚の低下、腱反射の消失を確認した場合、更に神経伝達速度の遅延にて判定した。糖尿病網膜症は専門の眼科医が Davis 分類 (改変) に基づいて診断した。糖尿病腎症は血液検査、尿検査により評価した。腎症の病期分類は、腎症なし, II 期,

III期, IV期と分類した. 虚血性心疾患の有無は既往歴と負荷心電図などにより判定した. 脳ドックを受診者に対しては, 脳MRI検査を施行し画像は脳外科医が読影を行った.

nick β 2-GPIの測定はNGPI-60F(ab)₂を一次抗体, NGPI-23(ab)-Biotinを標識抗体として使用しサンドイッチELISA法によって測定した. 同様に β 2-GPIの測定はNGPI-23を一次抗体, Anti human β 2-GPI rabbit IgG-Biotinを標識抗体として使用しサンドイッチELISA法によって測定した.

IMTと臨床所見との関連を検討するため, IMTを従属因子として年齢, 罹病期間, BMI, nick β 2-GPI ratio, 総コレステロール, 中性脂肪を独立因子として単回帰分析を行った. また高血圧, 高脂血症, 虚血性心疾患, 糖尿病細小血管合併症についてはMann-WhitneyU検定にて解析を行った. IMTはnick β 2-GPI ratio ($p=0.0201$, $R=0.27$), 年齢 ($p=0.0001$, $R=0.44$), 高脂血症 ($p=0.032$) とのみ有意な相関を認め, 更に多変量ロジスティック解析を行ったところ, 年齢が独立した危険因子であった. nick β 2-GPI ratioについても, 同様に単回帰分析とMann-WhitneyU検定, 更に糖尿病細小血管合併症の病期による比較は, Kruskal-Wallisの検定を用い群間の有意差を検定した. nick β 2-GPI ratioは罹病期間, BMI, コレステロール, 中性脂肪と相関を認められず, 年齢とのみ有意な相関を認め ($p<0.0001$, $R=0.29$), 非糖尿病群と比較し糖尿病群で有意に上昇していた (nick β 2-GPI ratio 中央値: 非糖尿病群; 0.910, 糖尿病群; 1.55, $p<0.0001$). 更にnick β 2-GPI ratioは糖尿病神経障害の合併群において有意に高値を示し (nick β 2-GPI ratio 中央値: 神経障害なし; 0.752, 神経障害あり; 1.070, $p=0.0038$), 糖尿病網膜症, 糖尿病腎症の病期の進行した群において高値を示した (nick β 2-GPI ratio 中央値: 網膜症なし; 0.813, 単純網膜症; 0.980, レーザー治療後; 1.485, 増殖前網膜症; 1.650 $p=0.0705$, 腎症なし; 0.812, II期; 0.803, III期; 1.290, IV期; 1.720 $p=0.0057$). 高血圧, 高脂血症に関してはnick β 2-GPI ratioと有意な関連は認められず, 更に薬物投与の有無におけるnick β 2-GPI ratioも検討したが差は認めなかった. 虚血性心疾患の有無では有意な差は認められず, 脳梗塞を認める群においてはnick β 2-GPI ratioが有意に高値を示した (nick β 2-GPI ratio 中央値: 脳梗塞なし; 0.750, 脳梗塞あり; 0.940 $p=0.027$). 更にIMTの上昇に伴い, nick β 2-GPI ratioは高値を示した (nick β 2-GPI ratio 中央値: $IMT \leq 0.51mm$; 0.656, $0.52-0.6mm$; 0.750, $0.61-0.73mm$; 1.160, $\geq 0.74mm$; 1.395 $p=0.0013$).

今回の研究結果からnick β 2-GPI ratioの上昇は血管内皮細胞の障害が凝固線溶系の異常を引き起こし, 組織で産生されたプラスミンによって β 2-GPIからnick β 2-GPIの形成が促進されたためと考えられる. 糖尿病患者におけるnick β 2-GPI ratioの上昇は血管合併症と凝固線溶異常の関連を示唆する興味深い成績と考えられる.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

糖尿病患者における血管合併症と nick β 2-GPIratio との関連性に関する検討

糖尿病患者は、血管内皮細胞機能障害、血小板機能の亢進、凝固因子の増加、線溶系の低下により血栓形成傾向にあると考えられている。生体内における血栓形成傾向、凝固線溶異常を推定する臨床的マーカーとしては、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター(PAI-1)、プラスミン・ α_2 プラスミンインヒビター複合体(PIC)、トロンビン・アンチトロンビン III 複合体(TAT)、D-ダイマー、などがあるが、凝固線溶異常の新たな指標として β 2GPI がプラスミンにより限定分解された、nick β 2GPI の上昇が報告された。

β 2-GPI は、I~V の 5 つのドメインより構成され、陰性荷電を持つリン脂質に結合し、凝固反応を抑制する一方、凝固を促進する作用も有している。しかし、V ドメインに存在する Lys317-Thr318 の結合が、プラスミンにより切断されると nick β 2-GPI に変化し、 β 2-GPI がもつ凝固制御機能は失われる。血管内に微小血栓が生成されると、プラスミンが産生され、 β 2-GPI が nick β 2-GPI に変化すると考えられる。そこで本研究では nick β 2-GPI ratio、すなわちプラスミンにより β 2-GPI から nick β 2-GPI に変化した割合〔(血清中 nick β 2-GPI/血清 total β 2-GPI) \times 1000〕と糖尿病における血管合併症との関連性を検討し、血管障害を反映する新しい指標としての有用性を検討した。

対象は、糖尿病群として北海道大学病院第二内科外来に通院している糖尿病患者のうち、文書にて同意が得られた 204 人、平均年齢は 60.1 歳。更に三井記念病院脳ドック受診者のうち研究に同意した 495 人を非糖尿病対照群とした。検討項目として高血圧、高脂血症の有無や、糖尿病細小血管合併症である糖尿病神経障害、糖尿病網膜症、糖尿病腎症の有無と病期分類、また大血管障害として虚血性心疾患、脳硬塞、総頸動脈内膜中膜肥厚(IMT)につき行った。

nick β 2-GPI の測定は NGPI-60F (ab')₂ を一次抗体、NGPI-23 (ab')-Biotin を標識抗体として使用しサンドイッチ ELISA 法によって測定した。同様に β 2-GPI の測定は NGPI-23 を一次抗体、Anti human β 2-GPI rabbit IgG-Biotin を標識抗体として使用しサンドイッチ ELISA 法によって測定した。

nick β 2-GPI ratio と年齢、罹病期間、BMI との関連については単回帰分析を行っ

た。また高血圧、高脂血症、虚血性心疾患、糖尿病細小血管合併症については Mann-Whitney U 検定を行い、更に糖尿病網膜症、糖尿病腎症の病期分類といった 2 群以上の比較は、Kruskal-Wallis の検定を行った。nick β 2-GPI ratio は罹病期間、BMI と相関を認められず、年齢とのみ有意な相関を認め、非糖尿病群と比較し糖尿病群で有意に上昇していた。更に nick β 2-GPI ratio は糖尿病神経障害の合併群において有意に高値を示し、糖尿病網膜症、糖尿病腎症の病期の進行した群において高値を示した。高血圧、高脂血症に関しては nick β 2-GPI ratio と有意な関連は認められず、更に薬物投与の有無における nick β 2-GPI ratio も検討したが差は認めなかった。虚血性心疾患の有無では有意な差は認められず、脳梗塞を認める群においては nick β 2-GPI ratio が有意に高値を示した。更に IMT の上昇に伴い、nick β 2-GPI ratio は高値を示した。

質疑応答においては石橋教授から、nick β 2GPI ratio の血管に対する作用と危険予測因子としての作用について、測定時のプラスミン活性について、測定の結果を平均値で比較検討することについての解釈方法について質問があった。ついで浅香教授から、nick β 2GPI ratio と nick β 2GPI の測定の違いについて、糖尿病患者以外の疾患での nick β 2GPI ratio の測定結果について、細小血管障害、大血管障害における nick β 2GPI ratio の上昇の機序の違いについて、小池教授から、nick β 2GPI ratio と他の凝固マーカーの測定との違いについて、nick β 2GPI ratio が今後血管障害の危険予測因子としての可能性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論文における検討から、今後は凝固線溶を介した血管障害の指標として、また血管合併症の危険予測因子として有用であると考えられた。

審査委員一同は、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。