



タウリンの糖尿病性腎症進展抑制効果とその機序

姜, 青雲

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2516

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002516>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【111】

氏名・(本籍) 姜青雲(中国)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1433号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の日付 平成14年3月31日

【学位論文題目】

タウリンの糖尿病性腎症進展抑制効果とその機序

審査委員

主査 教授 春日 雅人

教授 横野 浩一

教授 佐藤 茂秋

【緒言】

糖尿病腎症の重症度は糖尿病患者の予後に大きく関与する。大規模臨床研究によって、持続する高血糖が糖尿病腎症の進展を促進することが示された。高血糖による糖尿病腎症進展の機序として、蛋白質の糖化反応、ポリオール代謝亢進および酸化ストレスなどの関与が注目されている。蛋白質の糖化反応は、グルコースが生体内の蛋白質と非酵素的に反応し、3-デオキシグルコソン (3DG) のような高反応性の中間体の形成を経て、種々の糖化反応終末産物 (AGEs) の形成に至る反応の総称で、これらの中間体や AGEs が生体内の細胞傷害を引き起こす可能性が示唆されている。一方、ポリオール代謝は、グルコースからソルビトール、そしてフルクトースの形成に至る2段階の反応で糖尿病ではこの代謝が亢進している。

タウリンは、内因性の浸透圧調節物質であるとともに抗酸化作用などの生物活性を有する含硫アミノ酸で、種々の臓器保護作用が報告されている。これまでにタウリンを糖尿病ラットに投与すると尿蛋白排泄量が著明に減少することが報告されている。本研究では、このタウリンの腎症進展抑制効果の機序を解明する目的で、streptozotocin糖尿病モデルラットを使用し、生体内の糖化反応や腎組織中のポリオール代謝に及ぼすタウリン経口投与の影響を検討した。また、糖尿病に伴う腎糸球体組織の変化に対するタウリン経口投与の効果も免疫組織化学的手法で検討した。

【方法】

1. 実験動物

6週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットに、streptozotocin (STZ) を尾静脈より静注して糖尿病ラットを作製し、任意にタウリン非投与の糖尿病群 (n = 7) とタウリン投与糖尿病群 (n = 5) に分類した。同週齢の非糖尿病ラットを対照群 (n = 5) として用いた。タウリンは、飲水中に 1%w/v の濃度で混じり経口投与した。

2. 血漿 3DG 濃度の測定

STZ 静注後 6 ヶ月の各動物について糖化反応中間体 3DG の血漿レベルを既報告の HPLC による特異的定量法によって測定した。簡潔に述べると、各ラットの血漿 1ml を 2,3-ジアミノナフタレンと反応させ、3-DG を安定な誘導体に変換して HPLC で定量する方法である。

3. 糖化反応による蛋白質架橋形成に及ぼすタウリンの効果 (in vitro)

リゾチーム (10 mg/ml) をリン酸緩衝液中で、10mM の 3DG と、タウリン (10 mM あるいは 100 mM) を添加した場合としない場合とで、37°C で 4 週間インキュベーションした。リゾチームの糖化反応による架橋形成の評価は、15% SDS-PAGE によってポリマー形成の程度によって行った。

4. 腎皮質のポリオール代謝産物含量の測定

STZ 静注後 6 ヶ月の糖尿病ラットと対照群ラットから摘出した腎皮質中のグ

ルコース、フルクトース、ソルビトールの含量を Tomiya らの方法に準じて HPLC で測定した。

5. 腎皮質組織タウリン含量の測定

腎皮質組織中のタウリン含量は、ホモジネートの上清をトリクロロ酢酸で脱蛋白した後、アミノ酸分析機を使って測定した。

6. 腎皮質の免疫組織化学染色

各群ラットの腎皮質組織に対して、抗ラットフィブロネクチン抗体を用いて免疫組織化学染色をストレプトアビジン-ビオチン法によって施行した。

7. 統計学的処理

データは mean \pm SD で表し、群間の比較は Welch's t あるいは Student's t 検定によって行った。

【結果】

1. 実験動物プロフィールおよび 24 時間尿中蛋白排泄量

STZ 静注前の実験動物の体重、血糖値、糖化ヘモグロビン値は、いずれも、各群間で有意差はなかった。6 ヶ月後、糖尿病群では、対照群に比較して有意な体重増加の抑制と血糖値および糖化ヘモグロビン値の増加が認められたが、タウリン投与の有無はこれらの値に影響を与えなかった。24 時間尿中蛋白排泄量は、STZ 静注後 3 ヶ月以降、対照群に比較して糖尿病群で有意に増加した

(STZ 静注後 6 ヶ月で、 11.9 ± 3.1 vs. 29.0 ± 11.3 mg/24h, $P < 0.001$)。タウリン経口投与によって、この糖尿病ラットの尿中蛋白排泄量増加は有意 ($p < 0.01$) に抑制された (13.7 ± 3.5 mg/24h)。

2. ラット血漿中の 3DG 濃度

STZ 静注後 6 ヶ月後の各群の血漿中 3DG 濃度は、正常対照群 (136 ± 64 nM) に比較して、糖尿病群ラットでは 313 ± 44 nM と有意 ($p < 0.001$) に高値を示した。タウリン投与は、この糖尿病による血漿 3DG 値上昇に対して部分的な抑制傾向を示したが (247 ± 79 nM)、統計学的に有意ではなかった。

3. リゾチームの重合化に及ぼすタウリンの効果

リゾチームは、3-DG とのインキュベーションで重合化し二量体や三量体が形成されることが SDS-PAGE 解析によって確認された。タウリンは、このリゾチームの架橋形成を用量依存性に阻害した。

4. ラット腎皮質におけるポリオール代謝産物およびタウリンの含量

糖尿病群の腎皮質におけるグルコース、ソルビトール、フルクトースの含量は対照群と比較して、いずれも有意 ($P < 0.001$) に増加した。(グルコース; 21920 ± 4840 vs. 1880 ± 590 、ソルビトール; 383 ± 31 vs. 94 ± 14 、フルクトース; 106 ± 40 vs. 18 ± 12 。いずれも nmol/g 組織)。タウリン経口投与は、グルコースとフルクトース含量にはほとんど影響を与えなかった。一方、ソルビトール含量は有意 ($p < 0.001$) な減少を認めた ($195 \pm$

8 nmol/g 組織) が、対照群のレベルまでには低下しなかった。

糖尿病群では対照群と比較すると腎皮質のタウリン含量が有意 ($P < 0.001$) に低下していた (2130 ± 330 vs. 4800 ± 810 nmol/g 組織)。タウリンの経口投与は、この枯渇した腎皮質中のタウリン含量を回復させ、むしろ、正常レベルより高値を示すに至った (6850 ± 2020 nmol/g 組織)。

5. ラット腎皮質の免疫組織化学的解析

糖尿病ラットの腎系球体メサンギウム領域においてフィブロネクチンに対する抗体による免疫染色が増強していたが、タウリン投与によってその免疫染色強度は減少した。

【考察】

今回の糖尿病ラットでの検討結果では、糖尿病の腎皮質におけるタウリン含量の枯渇は、タウリンの経口投与によって効果的に予防された。それに伴い、蛋白尿排泄量が抑制されることも確かめられた。糖尿病性腎症の成因として、蛋白質の糖化反応やポリオール代謝の亢進が提唱されている。

糖尿病ラットでは、糖化反応中間体 3DG の血中レベルが増加する。タウリン経口投与によって血中 3DG レベルは部分的に抑制されたが有意な減少ではなく、この 3DG レベル自体を抑制する効果がタウリン作用の主要メカニズムとは考えにくい。しかし、今回の *in vitro* 実験で、リゾチームの 3DG によ

る重合化に対してタウリンが阻害作用を有することが示され、3DG 以後の糖化反応後期段階におけるタウリンの阻害作用の機序解明は今後の課題である。

ポリオール代謝経路と糖尿病合併症との関連には多くの仮説が提唱されている。そのひとつは、ソルビトール蓄積による浸透圧仮説である。今回の結果では、糖尿病ラットにタウリンを経口投与すると腎皮質のソルビトール含量は有意に低下したが、逆に、タウリン自身の増加量が著しく多かったため、組織の総浸透圧物質含量としては抑制されていない。また、ポリオール代謝経路の最終産物であるフルクトースの腎皮質組織中含量は、タウリン経口投与によって有意な変化を来さなかった。

これらの結果を考慮すると、タウリン投与の効果は、蛋白質糖化反応産物の形成抑制効果やポリオール代謝関連異常の是正によるものではなく、むしろ、糖尿病によって起こるタウリン自体の枯渇を予防したことに起因することが示唆される。つまり、タウリン補充によって、それ自身の抗酸化作用などの活性が回復して腎系球体での組織変化が抑制される可能性が考えられる。これに関連して、酸化ストレスが病態に関与している他の腎疾患実験モデルとして、*age-related progressive renal fibrosis* や *puromycin aminonucleoside nephropathy* が挙げられるが、いずれもタウリン投与によってそれらの腎障害進展が抑制されたという報告もある。

今回、タウリンの経口投与が、糖尿病モデルラットの腎皮質組織中で枯渇す

るタウリン自身を補充することがき、それに伴い、糖尿病による蛋白尿排泄量増加と腎組織の形態学的変化の抑制という効果が得られた。これらは、糖尿病性腎症に対する今後の薬物療法を考える上で有用な知見と考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1428号	氏名	姜青雲
論文題目	タウリンの糖尿病性腎症進展抑制効果とその機序		
審査委員	主査 春日 雅人 () 副査 伏見 茂秋 () 副査 横野 浩一 ()		
審査終了日	平成14年 2月28日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

糖尿病性腎症は糖尿病患者の予後に大きく関与するため、その有効な治療法の確立が重要な課題である。いくつかの大規模臨床研究によって、持続する高血糖が糖尿病性腎症の進展を促進することが示されている。この高血糖による糖尿病性腎症進展の機序として、蛋白質の糖化反応、ポリオール代謝亢進および酸化ストレスの関与などが提唱されている。本研究で着目されたタウリンは、内因性の浸透圧調節物質であるとともに抗酸化作用などの生物活性を有する含硫アミノ酸で、種々の臓器保護作用が示唆されている。糖尿モデル動物に対しても蛋白尿抑制効果を有することが報告されていたが、その機序についてはほとんど解明されていなかった。そこで、本研究では、このタウリンの腎症進展抑制効果の機序を解明する目的で、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを使用して、高血糖関連代謝異常および腎組織変化に及ぼすタウリン経口投与の影響が検討された。

糖尿病群では、糖尿病発症3ヶ月目以降になると正常対照群に比較して尿中蛋白排泄量が増加したが、糖尿病にタウリンを投与した群(1%タウリン飲水)では、ほぼ対照群レベルまで抑制されることが確認された。同動物に対して、まず、糖化反応中間体である高反応性3-デオキシグルコソン(3-DG)の血中レベルを、安定な誘導体に変換してHPLCで検出する特異的定量法を用いて測定したところ、糖尿病群では対照群に比較して有意に増加していた。タウリン投与によってこの血中3-DG増加はわずかに抑制傾向を示したが統計学的には有意でなかった。次に、腎皮質組織中のポリオール代謝産物(ソルビトールおよびフルクトース)の含量を高感度HPLCによって測定するとともに、組織中のタウリン自身の含量も測定した。その結果、糖尿病群において腎皮質組織中のポリオール代謝産物は増加したが、逆にタウリン含量は鏡像的に著減していることが示された。タウリン経口投与によって、この組織中タウリンの枯渇は完全に予防されたが、ソルビトール蓄積に対する抑制効果は部分的に留まり、フルクトース含量についてほとんど変化を与えなかった。免疫組織学的解析では、糖尿病性腎症の特徴である糸球体メサングウム領域のフィブロネクチン蓄積がタウリン投与によって抑制される

ことも示された。

これらの結果から、タウリンの糖尿病性腎症進展抑制作用は、糖化反応産物形成亢進やポリオール代謝亢進に対する是正効果は部分的で、むしろタウリン自身の枯渇が予防されたことによると考えられた。これによって、タウリンの持つ抗酸化作用などの活性が回復し腎組織障害進展が抑制された可能性が示唆された。

本研究はタウリンの糖尿病性腎症に対する抑制効果の作用機序について、その高血糖関連代謝異常や腎組織変化への影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった腎組織中のタウリン自身の含量とポリオール代謝産物の含量の相互関連を中心とした糖尿病腎症の病態に及ぼすタウリンの影響が解明され、糖尿病性腎症に対する今後の薬物療法を考える上で重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を取る資格があると認める。