



Anti-oxidative Effect of the β -blocker Carvedilol on Diabetic Nephropathy in Non-obese Type 2 Diabetic Rats

Yonekura, Yuriko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6510号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006510>

※ 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。



(過程博士関係)

学位論文の内容要旨

Anti-oxidative Effect of the β -blocker Carvedilol on Diabetic Nephropathy in Non-obese Type 2 Diabetic Rats

非肥満 2 型糖尿病ラットにおける糖尿病性腎症に対する
 β 遮断薬カルベジロールの抗酸化作用

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腎臓内科学
(指導教員：西愼一教授)

米倉由利子

Introduction

糖尿病性腎症は末期腎不全に進行しうる慢性腎臓病の原因疾患として最も重要な病態の一つである。その発症や進展にはレニンアンジオテンシン系 (RAS) など様々な経路の関与が考えられているが、酸化ストレスも糖尿病性腎症進展の悪化因子として注目されており、これまでに糖尿病モデルを用いた実験において、抗酸化物質による糖尿病性合併症に対する治療効果が示されてきている。

糖尿病性腎症における β 遮断薬の使用についてはインスリン感受性低下などの理由からその是非については意見が分かれている。カルベジロールは $\alpha 1$ アドレナリン受容体遮断作用を持つ非選択的アドレナリン β 受容体遮断薬である。 $\alpha 1$ 遮断作用により反射性の血管収縮を抑制して骨格筋での血流増加を介してインスリン感受性を亢進させることが知られており、カルベジロールは糖尿病患者においても安全に使用することができる。さらに、カルベジロールは抗酸化作用を有しており、心血管疾患や糖尿病性骨症におけるカルベジロールの抗酸化作用が示されているが、糖尿病性腎症に対するカルベジロールの効果はまだ十分には明らかにされていない。

2 型糖尿病モデルラットを用いて、糖尿病性腎症に対するカルベジロールの抗酸化作用を検証するため、本研究を行った。

Methods

モデル動物

自然発症非肥満 2 型糖尿病モデルラットである Spontaneous Diabetic Torii (SDT) ラットを用いた。SDT ラットは Sprague Dawley (SD) ラットのなかで、尿糖を呈する個体同士を交配させて確立された系統であり、雄の SDT ラットでは肥満を呈さずに緩徐にインスリン分泌能の低下をきたし、20 週齢頃には高血糖を呈するようになる。日本クレア社から購入した雌性 SDT ラットを 20 週齢で 3 群に分け、((i) INS 群 (インスリン投与) (n=5)、(ii) CAR 群 (カルベジロール 10mg/kg 連日経口投与) (n=6)、(iii) DM 群 (vehicle 投与) (n=6))、データの参照として同週齢の SD ラットを用いた (n=6)。インスリンは一定量のインスリンを放出するインスリンペレットを 2 週ごとに皮下に埋め込んだ。

10 週間の薬剤投与の後、30 週齢で屠殺した。屠殺時に左室穿刺により血液を採取、両側腎臓を摘出し、片方を病理組織検査と免疫染色に、他方を RNA 抽出に用いた。屠殺の前に代謝ケージを用いて 24 時間尿を採取した。

これらの動物の飼育および実験手技は神戸大学動物実験施設の許可のもと実施した。

血清・尿検体

血清で、クレアニン、尿素窒素、アルブミンを測定した。全血検体を用いてヘモグロビン A1c を測定した。尿検体ではクレアチニン、アルブミン、8-OHdG を測定した。

血圧測定

血圧及び心拍数は tail-cuff 法により測定し、連続 10 回の測定結果の平均値を求めた。

病理組織学的評価

摘出した腎臓を 10% 中性ホルマリンで固定した後パラフィン包埋し、3 μm 厚の切片を作成し periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行った。1 検体あたり、無作為に 20 個の糸球体を抽出し、画像解析ソフト Lumina Vision を用いて糸球体とメサンギウム領域の面積を計測し、過去の報告にならって glomerular volume (GV) と mesangial index を計算して求めた。

腎組織 RNA 抽出及び遺伝子発現分析

腎組織から ISOGEN kit (ニッポンジーン社製) を用いて RNA を抽出した。抽出された RNA から ReverTra ACE qPCR RT 試薬を用いて (東洋紡社製) 逆転写反応により cDNA を作成した。作成した cDNA は LightCycler (Roche 社製) を用いた SYBR Green 法を用いた定量的 PCR により遺伝子発現を解析した。プライマーは以下のものを用いた。ラット *NADPH oxidase p22^{phox}*: 5'-GGTGAGCAGTGGACTCCCATT-3' (forward)、5'-TG GTAGGTGGCTGCTTGATG-3' (reverse)、ラット *NADPH oxidase p47^{phox}*: 5'-GTGAAGCC ATCGAGGTCATTC-3' (forward)、5'-CCC GCGCTCTAATCTGT-3' (reverse)、ラット *GAPDH*: 5'-TGGGAAGCTGGTCATCAAC-3' (forward)、5'-GCATCACCCATTGATGTT-3' (reverse)。

統計解析

結果は平均±標準誤差で表記した。統計解析は SPSS version 22 for Microsoft Windows (IBM 社製) を用いて行い、Tukey-Kramer 法により 3 群間 (DM, INS, CAR 群) の差を比較し、p<0.05 を統計学的有意差ありとした。

Results

20 週齢時、各群間で体重、HbA1c 値に差を認めなかった。30 週齢においては DM 群と CAR 群とでは体重、収縮期血圧に差を認めなかった。CAR 群では心拍数が低い傾向があった。DM 群と CAR 群では HbA1c は同等であった。INS 群は DM 群、CAR 群と

比較して体重は高値、腎重量とクレアチニンクリアランスは有意に低値であった (Table 1.)。尿中アルブミン排泄量は DM 群と比較して CAR 群で有意に低値であった (CAR 群: 42.82 ± 3.94 vs DM 群: 76.62 ± 13.74 mg/day; P < 0.05; Fig. 1)

病理組織学的評価では、glomerular volume, mesangial index とともに INS 群と CAR 群では DM 群よりも低値であった。

尿中 8-OHdG 排泄量は DM 群では INS 群よりも高値であり、CAR 群では DM 群よりも低い傾向があった。糸球体での 8-OHdG 陽性細胞数は DM 群よりも CAR 群で有意に低値であった。(Figure 4,5) 腎組織における NADPH oxidase p22, p47 の発現は INS 群及び CAR 群で DM 群よりも低値であった。

Discussion

DM 群と比較して CAR 群では、尿中アルブミン排泄、糸球体腫大、メサンギウム増殖が軽度であった。糸球体 8-OHdG 陽性細胞数も DM 群よりも CAR 群で低値であった。INS 群でこれらの改善は最も顕著であったが、CAR 群においては高血糖状態であるにも関わらず、改善が認められた。

本研究では早期糖尿病性腎症の病態 (微量アルブミン尿、糸球体腫大、メサンギウム増殖) を呈するラットを用いた。微量アルブミン尿は顕性の腎機能低下を伴わなくても心血管病関連死亡の独立した危険因子であり、早期からの糖尿病性腎症の病態への介入が将来的な心血管病のリスク軽減に重要であるからである。

CAR 群において、DM 群よりも尿中アルブミン排泄量は軽減していた。高血糖によりもたらされる Glomerular filtration barrier の障害とメサンギウム増殖はいずれもアルブミン尿の原因となり得る。本研究の結果から、カルベジロールが glomerular filtration barrier への障害とメサンギウム増殖を改善させた可能性がある。

酸化ストレスと糖尿病性糸球体障害の進行に関して、活性酸素種 (ROS) が、糸球体血管内皮 glycolcalyx 層を障害し、血管内皮細胞を介したアルブミンの漏出が生じること、NADPH oxidase 阻害薬である apocynin の投与によりポドサイトを介したアルブミン輸送が抑制されることが示されている。本研究では CAR 群では DM 群と比較して、糸球体 8-OHdG 陽性細胞数は有意に低値であり、腎組織での NADPH oxidase p22, p47 遺伝子発現は低下していた。これらの結果から、カルベジロールが腎局所で酸化ストレスを軽減して、アルブミン尿の改善に寄与したことを示唆しているのではないかと考える。

糸球体内高血圧による糸球体腫大は早期糖尿病性腎症の特徴の一つである。高血糖による輸入細動脈の拡張、RAS 活性化、腎での ROS 産生が糸球体内高血圧に関与すると考えられている。輸出細動脈はアンギオテンシン II による血管収縮作用に対して、輸入細動脈より感度が高い。糖尿病における RAS 亢進状態では、この糸球体の輸入輸出細動

脈の血管拡張の不均等さが糸球体内高血圧をもたらす。ROS は TGF- β 1 経路とともにこの作用に関連しているとされている。本研究では glomerular volume は DM 群において増大しており、CAR 群では DM 群と比較して有意に低値であったが、これら 2 群間で血圧、血糖コントロールは同等であった。そのことから、糸球体サイズの改善は血圧や血糖を介した変化ではないことが示唆される。

抗酸化物質のストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットへの投与により、酸化ストレスの減少を介した糸球体腫大の改善が観察されている。我々の先行データでは尿中アンギオテンシノーゲンは DM 群よりも CAR 群において低値であり、RAS 活性化の抑制が、CAR 群における糸球体腫大やメサンギウム増殖の改善に寄与することを示唆している。しかし、RAS 抑制に加えてカルベジロールは抗酸化作用を有することが知られており、これは種々の β 遮断薬のなかでもカルベジロールに独特の特徴であることから、今回我々は主に酸化ストレスに焦点を当てることとした。

これまでに多数の研究で、カルベジロールの心保護効果、さらには他の β 遮断薬に対するカルベジロールの優位性が示されている。カルベジロールはフリーラジカスカベンジャーとして働き、過酸化物質、ヒドロキシラジカル産生システムの存在下で電子の結合を阻害することにより抗酸化作用を発揮することが知られている。基礎実験においても、カルベジロールによる臓器保護効果には抗酸化作用および抗アポトーシス作用が介在していることが示されており、本研究での、CAR 群におけるアルブミン尿、糸球体腫大、メサンギウム増殖の改善も抗酸化作用を介したものであると考えられる。

カルベジロールが、STZ 誘発糖尿病モデル動物において酸化ストレスの軽減を介して腎機能障害を改善させたことが報告された。これらの研究では、TBARS、MDA、グルタチオン、nitrite/nitrate 比が酸化ストレスの指標として評価されているが、本研究では、GFR の増大とアルブミン尿が特徴である早期糖尿病性腎症におけるカルベジロールの効果を検証し、異なる酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG を評価した。本研究では DNA の酸化障害と ROS 産生の状態を評価しており、カルベジロールの抗酸化作用について、さらなる知見を加えるものであると考える。

過去の研究では、カルベジロールは 1~30mg/kg という量で投与されているが m30mg/kg を投与したラットにおいても血圧低下は認められていない。また Arozal らは、カルベジロールの抗酸化作用は 1mg/kg と 10mg/kg の比較では用量依存的であることを示した。これらの結果をもとに、本研究においては 10mg/kg に用量を設定したが、明らかな血圧降下作用は観察されなかった。カルベジロールの抗酸化作用は血圧降下作用を呈する量よりも低用量でも認められることが臨床研究において報告されている。本研究の結果は、これらの結果に合致している。

カルベジロールによる抗酸化作用は、糖尿病性腎症の進行を抑制する可能性がある。より詳細なメカニズムを明らかにするために、更なる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2537 号	氏 名	米倉 由利子
論文題目 Title of Dissertation	Anti-oxidative Effect of the β -blocker Carvedilol on Diabetic Nephropathy in Non-obese Type 2 Diabetic Rats 非肥満 2 型糖尿病ラットにおける糖尿病性腎症に対する β 遮断薬カルベジロールの抗酸化作用		
審査委員 Examiner	主 査 平田 健一 Chief Examiner 副 査 小川 渉 Vice-examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner		

(要旨は 1, 000 字~2, 000 字程度)

【目的】

糖尿病性腎症は末期腎不全に進行する慢性腎臓病の原因疾患として最も重要な病態の一つである。その発症や進展にはレニンアンギオテンシン系 (RAS) など様々な経路の関与が考えられているが、酸化ストレスも糖尿病性腎症進展の悪化因子として注目されている。糖尿病性腎症における β 遮断薬の使用についてはインスリン感受性低下などの理由からその使用の是非については意見が分かれている。カルベジロールは $\alpha 1$ アドレナリン受容体遮断作用を持つ非選択的アドレナリン β 受容体遮断薬である。 $\alpha 1$ 遮断作用により反射性の血管収縮を抑制して骨格筋での血流増加を介してインスリン感受性を亢進させることが知られている。さらに、カルベジロールは抗酸化作用を有しており、心血管疾患や糖尿病性骨症におけるカルベジロールの抗酸化作用が示されているが、糖尿病性腎症に対するカルベジロールの効果はまだ十分には明らかにされていない。今回、申請者らは、2 型糖尿病モデルラットを用いて、糖尿病性腎症に対するカルベジロールの抗酸化作用の有効性について検討を行った。

【方法】

自然発症非肥満 2 型糖尿病モデルラットである Spontaneous Diabetic Torii (SDT) ラットを用いた。SDT ラットは Sprague Dawley (SD) ラットのなかで、尿糖を呈する個体同士を交配させて確立された系統であり、雄の SDT ラットでは肥満を呈せずに緩徐にインスリン分泌能の低下をきたし、20 週齢頃には高血糖を呈するようになる。雌 SDT ラットを 20 週齢で 3 群に分け、(i) INS 群 (インスリン投与)、(ii) CAR 群 (カルベジロール 10mg/kg 連日経口投与)、(iii) DM 群 (vehicle 投与)、データの参照として同週齢の SD ラットを用いた。インスリンは一定量のインスリンを放出するインスリンペレットを 2 週ごとに皮下に埋め込んだ。

10 週間の薬剤投与の後、30 週齢で血液を採取、両側腎臓を摘出し、片方を病理組織検査と免疫染色に、他方を RNA 抽出に用いた。血清で、クレアニン、尿素窒素、アルブミンを測定し、全血検体を用いてヘモグロビン A1c を測定した。尿検体ではクレアチニン、アルブミン、8-OHdG を測定した。摘出した腎臓から 3 μ m 厚の切片を作成し、PAS 染色を行ない、糸球体とメサンギウム領域の面積を計測し、glomerular volume (GV) と mesangial index を計算して求めた。腎組織から抽出した RNA を用いて定量的 PCR により遺伝子発現を解析した。

【結果】

20 週齢時、各群間で体重、HbA1c 値に差を認めず、30 週齢では、DM 群と CAR 群とでは体重、収縮期血圧に差を認めなかった。DM 群と CAR 群では HbA1c は同等であった。INS 群は DM 群、CAR 群と比較して体重は高値、腎重量とクレアチニンクリアランスは有意に低値であった。尿中アルブミン排泄量は DM 群と比較して CAR 群で有意に低値であった。病理組織学的評価では、glomerular volume, mesangial index とともに INS 群と CAR 群では DM 群よりも低値であった。尿中 8-OHdG 排泄量は DM 群では INS 群よりも高値であり、CAR 群では DM 群よりも低い傾向があった。糸球体での 8-OHdG 陽性細胞数は DM 群よりも CAR 群で有意に低値であった。腎組織における NADPH oxidase p22, p47 の発現は INS 群及び CAR 群で DM 群よりも低値であった。

【結論】

DM 群と比較して CAR 群では、尿中アルブミン排泄、糸球体腫大、メサンギウム増殖が軽度であった。糸球体 8-OHdG 陽性細胞数も DM 群よりも CAR 群で低値であった。INS 群でこれらの改善は最も顕著であったが、CAR 群においては高血糖状態であるにも関わらず改善が認められた。

これまでに多数の研究で、カルベジロールの心保護効果、さらには他の β 遮断薬に対するカルベジロールの優位性が示されている。カルベジロールはフリーラジカルスカベンジャーとして働き、過酸化物質、ヒドロキシラジカル産生システムの存在下で電子の結合を阻害することにより抗酸化作用を発揮することが知られている。基本研究での、CAR 群におけるアルブミン尿、糸球体腫大、メサンギウム増殖の改善も抗酸化作用を介したものであると考えられる。

本研究では、GFR の増大とアルブミン尿が特徴である早期糖尿病性腎症におけるカルベジロールの有効性を示した価値ある研究であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）を得る資格があると認める。