

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15105

研究課題名(和文) 糖尿病血管障害の発症における好中球細胞外トラップの関与について

研究課題名(英文) Involvement of neutrophil extracellular traps in the development of diabetic angiopathy

研究代表者

石津 明洋 (Akihiro, Ishizu)

北海道大学・保健科学研究院・教授

研究者番号：60321957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高濃度グルコースへの暴露は、好中球細胞外トラップ(NETs)の形成を亢進させた。同じ浸透圧のマンニトールや2-デオキシグルコースではNETsの形成は亢進しなかった。ポリオール経路に関わるアルドース還元酵素の阻害薬が、高濃度グルコースにより誘導されるNETs形成を有意に阻害した。血清中のNETsは、コントロール良好な糖尿病患者で健常者に比べて有意に上昇していた。糖尿病患者では高血糖のためNETs形成が亢進し、これにはグルコース代謝のポリオール経路が関与している。糖尿病患者は、コントロールが良好であっても、食後高血糖により生体内でNETs形成が亢進している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that high-dose glucose induces neutrophil extracellular trap (NET) formation which can be a risk for microvascular disorders. Thus, we attempted to determine the correlation of circulating NET levels and clinical/laboratory parameters in well-controlled T2D patients and to reveal the mechanism of NET formation induced by high-dose glucose. As a result, serum MPO-DNA complex levels that represent the NET formation in vivo were significantly higher in some well-controlled T2D patients in correlation with the clinical/laboratory parameters, which have been regarded as risk markers for microvascular complications. The aldose reductase inhibitor, ranirestat, could inhibit the NET formation induced by high-dose glucose. These findings suggest that elevated levels of circulating NETs can be a risk marker for microvascular complications in well-controlled T2D patients, and that the polyol pathway is involved in the NET formation induced by high-dose glucose.

研究分野：病理学

キーワード：糖尿病血管障害 微小炎症 好中球細胞外トラップ

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病はわが国の成人の 10 人にひとりが増えている現代の国民病である。その怖さは合併症にあり、腎症、網膜症、神経障害、心筋梗塞、脳梗塞などの合併症の発生をいかに防ぐかが、患者の QOL ならびに生命維持にとって重要である。これらの合併症に共通する病態は血管障害である。これまで、糖尿病血管障害のメカニズムとして、高血糖によるポリオール代謝亢進や酸化ストレス過剰などにより血管内皮細胞が障害される機序が考えられてきた。

好中球細胞外トラップ (NETs) は、活性化された好中球が自身の DNA に細胞質内抗菌蛋白をまぶして細胞外に放出することによって病原微生物をトラップし、効率良く殺菌する自然免疫システムである。感染症における生理的役割や、自己免疫疾患における病因論的意義が明らかになってきているが、糖尿病と NETs の関係はこれまで注目されていなかった。高血糖が NETs 形成に及ぼす影響を初めて報告した Joshi らの論文では、高血糖状態における NETs の形成亢進が示されている。NETs の過剰は微小炎症の原因となることが示されていることから、申請者は、高血糖による NETs の形成亢進が微小炎症を介して糖尿病血管障害の成因になりうるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

高血糖が NETs の形成亢進を誘導することを明らかにし、NETs を介した微小炎症が糖尿病血管障害に関与していることを示す。そして、NETs を標的とした糖尿病合併症に対する新規予防・治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. 高血糖が NETs の形成を亢進させることの証明

健常者の好中球を分離し、グルコースを添加して NETs の形成を観察する。添加するグルコースの濃度と時間を振って、NETs の形成を定量する。NETs の形成は、DAPI 染色により観察される細胞外 DNA に、NETs 形成時に必ず産生されるシトルリン化ヒストンが共存していることで確認する。NETs の定量は、形成された NETs の面積を画像解析する。高濃度グルコースによる NETs の形成亢進が、高浸透圧によるものか、細胞内のグルコース代謝に依存するものかを調べるために、マンニトールや 2-デオキシグルコースの効果を検討する。

### 2. 高血糖が NETs の形成を亢進させるメカニズムの解明

NETs の形成には活性酸素種 (ROS) の作用が不可欠である。グルコース代謝経路において ROS を産生する代表的な経路はポリオール経路と de novo DAG 経路である。そこで、これらの経路を阻害することにより、高血糖による NETs の形成が抑制されるか検討する。ポリオール経路の阻害剤としてはアルドース還元酵素阻害剤である AS-3201 (raniestat) を、de novo DAG 経路の阻害剤としてはプロテインキナーゼ C 阻害剤である AEB071 (sotrastaurin) を用いる。

### 3. 糖尿病患者の生体内で NETs が過剰に形成されていることの証明

糖尿病患者(血糖コントロール不良群 n=10、血糖コントロール良好群 n=10)の血清中の DNA-MPO 複合体を ELISA 法で定量し、健常者 (n=10) と比較する。また、血糖値と血清中の DNA-MPO 複合体量の相関を検討する。

## 4. 研究成果

高濃度グルコースに暴露した好中球では NETs の形成が亢進した。同じ浸透圧のマンニトールやグルコースアナログである 2-デオ

キシグルコースでは NETs の形成亢進は認められなかった。ポリオール経路に関わるアルドース還元酵素の阻害薬を高濃度グルコースとともに添加することにより、NETs の形成が有意に阻害された。血清中の NETs は、コントロール良好な糖尿病患者で健常者に比べて有意に上昇していた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. J Autoimmun 67: 19-28, 2016. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.08.018. (査読有)
2. Miyoshi A, Yamada M, Shida H, Nakazawa D, Kusunoki Y, Nakamura A, Miyoshi H, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. Circulating neutrophil extracellular trap levels in well-controlled type 2 diabetes and pathway involved in their formation induced by high-dose glucose. Pathobiology 83(5): 243-251, 2016. DOI: 10.1159/000444881. (査読有)
3. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. Clin Chim Acta 459: 89-93, 2016. DOI: 10.1016/j.cca.2016.05.029. (査読有)

[学会発表](計2件)

1. 三次有奈, 山田真衣, 舘山ゆう, 楠 由

宏, 志田玄貴, 中沢大悟, 外丸詩野, 三好秀明, 渥美達也, 石津明洋. 高血糖による好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) の形成亢進. 第 104 回日本病理学会総会, 2015/4/30, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市.

2. 三次有奈, 山田真衣, 舘山ゆう, 楠 由宏, 志田玄貴, 中沢大悟, 中村昭伸, 外丸詩野, 三好秀明, 渥美達也, 石津明洋. 高血糖による好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) の形成亢進. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015/5/23, 海峡メッセ下関, 山口県下関市.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学学術成果コレクション(HUSCAP)

<http://hdl.handle.net/2115/61171>

<http://hdl.handle.net/2115/61981>

<http://hdl.handle.net/2115/62574>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

石津 明洋 (ISHIZU, Akihiro)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号：60321957

### (2)研究分担者

外丸 詩野 (Tomaru, Utano)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20360901

### (3)連携研究者なし

### (4)研究協力者なし