

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592017

研究課題名（和文） 2型糖尿病ラットにおける腎虚血再灌流性急性腎障害での知覚神経活性化の役割

研究課題名（英文） Activation of Sensory Neurons Reduces Ischemia/Reperfusion-induced Acute Renal Injury in Type 2 Diabetes Rats

研究代表者

工藤 享祐 (Kudo Kyosuke)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80336271

研究成果の概要（和文）：

高血糖に特徴づけられる糖尿病の病態では、正常の状況に比して、臓器傷害を生じやすいことが判明した。このメカニズムには、サイトカインをはじめとした、各種の炎症性メディエータの過剰な反応が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The diabetes patient which characterized by hyperglycemia, was recognized that it was easy to produce an organ injury compare with the normal condition. In this mechanism, it was suggested that the excessive reaction of various inflammatory mediators which were including cytokine, HMGB1 etc.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：2型糖尿、CGRP、TNF- α 、知覚神経、腎虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

我々のこれまでの研究で、若年ラットの腎虚血再灌流後には、腎組織 TNF- α 産生亢進に伴う好中球集積、活性化好中球から放出されるエラスターゼなどによる血管内皮細胞傷害が惹起され、腎血管透過性亢進及び腎組織血流低下が生じることを証明してきた。

一方、腎虚血再灌流は大血管手術、腎移植やショックに伴う急性腎不全の病態の重要な要因の一つである。しかし、この病態の生理学的機序は十分に解明されていない。さらに近年、この病態に陥る高齢患者が増加しており、予後は若年に比べ、悪い。この原因に

は様々なことが考えられるが、一つに高齢者にしばしば認める糖尿病の合併が考えられる。実際、2011年の日本の糖尿病人口は1067万4320人に上り、糖尿病人口の世界ランキング第6位になっており、成人（20～79歳）における世界の糖尿病人口は2011年現在で約3億6600万人に上り、成人人口の約8.3%が糖尿病とみられている。今後も増え続け、2030年には約5億5200万人、約9.9%に達すると言われている。これらのことから、糖尿病時の各種臓器傷害の解明は喫緊の課題であると言える。

2. 研究の目的

今回の研究では、高齢者で特に多くみられる糖尿病に絞って、糖尿病患者における腎虚血再灌流傷害時の病態解明と効果的な予防法を研究するとの発想に至り、実験を計画した。

3. 研究の方法

各種糖尿病ラットを用いて、様々な角度から糖尿病ラットの病態を解明するため、以下のモデルを本研究にて使用した。

1) 人為的高血糖がもたらす炎症反応の差異に関する検討

正常ラットに対して、リポポリサッカライド (LPS) を投与し、急性炎症モデルを作成。その後、20%グルコースを経静脈的に投与することで高血糖状態を作成した。その後、経時的な炎症性メディエータの測定や組織学的検討を行った。

2) 糖尿病ラットにおける急性炎症反応の差異とそのメカニズムについて

正常ラットに対して、ストレプトゾトシンを投与することで、インシュリン分泌に障害をもたらす、人為的な糖尿病ラットを作成。その後、LPS を投与し、急性炎症モデルを作成した上で、経時的な炎症性メディエータの測定や組織学的検討を行った。

3) 糖尿病ラットにおける腎虚血再灌流傷害モデルでの臓器傷害メカニズムの解明

正常ラットに対して、ストレプトゾトシンを投与することで、インシュリン分泌に障害をもたらす、人為的な糖尿病ラットを作成。その後、腎虚血再灌流傷害モデルを作成した上で、各種パラメーターについて検討を行った。

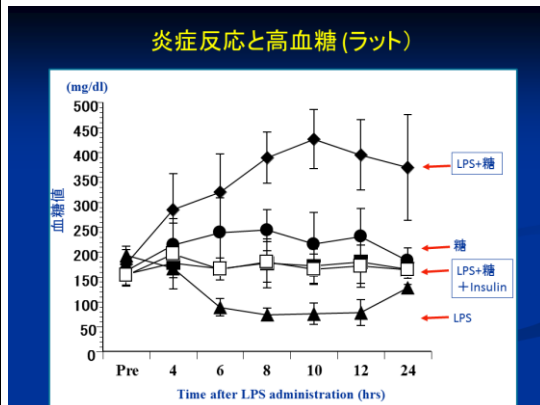
4. 研究成果

糖尿病性の疾患時において、臓器障害が変化するかは不明な点が多く、今回の研究を始めるにあたって、糖尿病状態と通常の状態での臓器障害の違いやその際の血糖値の変動を抑えることでの影響を初めに検討した。具体的な結果として以下に示す。

1) 人為的高血糖がもたらす炎症反応の差異に関する検討

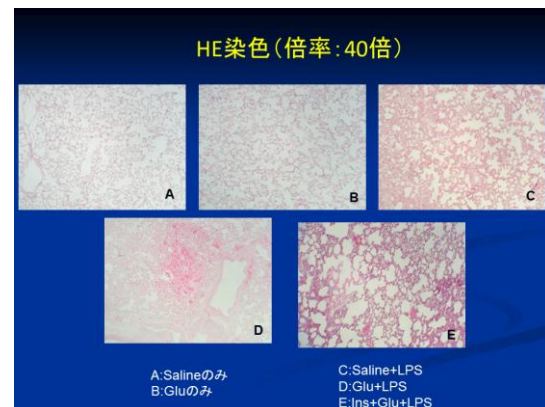
正常ラットに対して、LPS を静脈内投与した上で、20%グルコースを投与すると、炎症反応による耐糖能の低下から、単に20%グルコースを投与した群と異なり、血糖値の上昇を認める。これらの事実を元に下記群分けを行い、高血糖の臓器障害の差異を検討した。(下図参照。各群の経時的な血糖値の変化に

ついでのデータを示す)



使用した群は以下の通りである。

- A) 正常コントロール
- B) 20%グルコース投与群
- C) LPS 投与群
- D) 20%グルコース+LPS 投与群
- E) 20%グルコース+LPS+Insulin 投与群

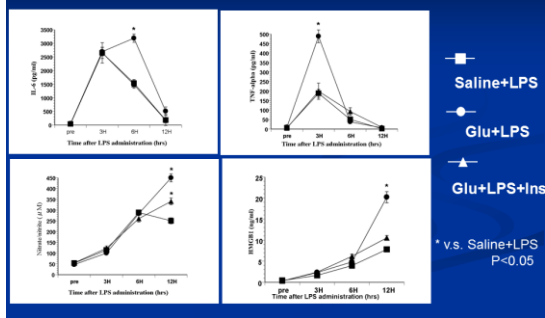


これらの群間における、LPS 投与後の肺組織像を下図に示す。

20%グルコース投与のみでは何も組織学的な変化を示さないが、LPS 投与により生じた肺組織中の炎症細胞の浸潤・肺胞壁の肥厚化が20%グルコース+LPS 投与群において、悪化することが示され、この変化はインスリンの投与により軽減できることが示された。このことは、高血糖に組織障害性があることを示した結果であると考えられる。

また、この時のサイトカイン等炎症に関与する因子を中心に測定したものが下図である。

血清中サイトカインの推移



C) LPS 投与群

D) 20%グルコース+LPS 投与群

E) 20%グルコース+LPS+Insulin 投与群

について、経時的な変化を検討したものであるが、IL-6・TNF- α ・HMGB1・NO $_x$ いずれの値も、20%グルコース+LPS 投与群において高く、高血糖時の催炎症作用が問題になる可能性を明らかにした。

2) 糖尿病ラットにおける急性炎症反応の差異とそのメカニズムについて

ここまでの研究から、急性の高血糖がもたらす臓器障害を明らかにすることが出来たので、次に糖尿病ラットを用いた臓器障害について検討を行うことを計画した。具体的には、ストレプトゾトシンをラットに静脈内投与することで、膵のランゲルハンス島細胞を破壊することで糖尿病と同じ状態を作成。急激な血糖上昇を確認した上で、飼育し高血糖状態を維持させたモデルを作成した上で、LPSを投与することで、臓器障害の程度を先の実験同様の方法で確認を行った。

下図に血糖における変化を示す。

血中グルコース濃度の経時変化

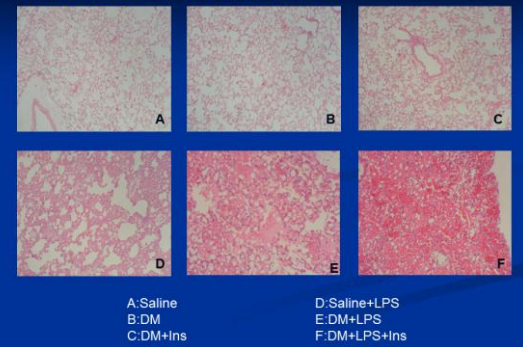
	0h	3h	6h	9h
DM	412.1 \pm 74.2 [*]	417.0 \pm 82.6 [#]	433.3 \pm 68.1 [%]	437.3 \pm 62.2 ^{&}
DM+Ins	405.9 \pm 71.5 [*]	175.9 \pm 52.5	176.1 \pm 30.4	155.4 \pm 23.8
DM+LPS	409.4 \pm 64.3 [*]	402.9 \pm 44.4 [#]	474.7 \pm 95.3 [%]	537.6 \pm 78.2 ^{&}
DM+LPS+Ins	413.4 \pm 66.9 [*]	209.4 \pm 80.3	182.8 \pm 87.9	171.9 \pm 90.8
Saline	171.5 \pm 17.1	165.5 \pm 25.1	162.7 \pm 29.0	162.5 \pm 26.9
LPS	176.3 \pm 14.5	166.0 \pm 22.7	89.0 \pm 40.9 [%]	66.3 \pm 29.4 ^{&}

使用した群は以下の通りである。

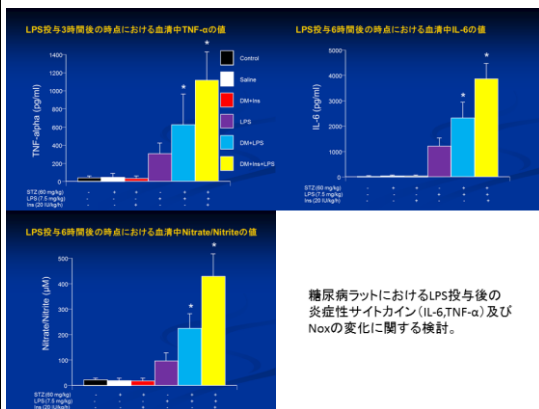
- A) 正常コントロール 群
- B) 糖尿病モデル群
- C) 糖尿病+インスリン投与群
- D) 正常ラット LPS 投与群
- E) 糖尿病+LPS 投与群
- F) 糖尿病+LPS+インスリン投与群

この様なラットモデルに対して、肺の組織学的検討を行うと、前述の急性高血糖時の肺傷害の悪化と同様に LPS 投与に比べて糖尿病+LPS 投与群での悪化を認めた。更に驚くべきことに、インスリンにて急激に血糖を低下させた群は、組織の糖利用環境の急激な変化についていくことが出来ずに、炎症反応が一番強く表れた。

HE染色 (LPS投与6時間後)



この時の炎症性サイトカイン (IL-6 および TNF- α) NO $_x$ についての変化につき検討を行った結果を下図に示す。やはり、糖尿病ラットでは通常のラットに比較して、炎症反応が過剰に生じていることが示された。更に、糖尿病ラットでの急激な血糖の低下はその後の炎症反応の観点から考えると更に強力に誘導されていることから、避ける必要があることが示された。



3) 糖尿病ラットにおける腎虚血再灌流傷害モデルでの臓器傷害メカニズムの解明

これらのことから、本題となる糖尿病ラットでの腎虚血再灌流傷害での検討を行ってきた。糖尿病ラットでの虚血再灌流性急性腎障害モデルにおいて虚血再灌流の刺激は、通常のラットに比較して悪化することが示された。その詳細なメカニズムを解析するためにカプサイシンやその他の刺激が知覚神経パニロイド受容体を活性化することで放出

された CGRP が血管内皮細胞上の CGRP 受容体に結合することで PGI₂ の産生を亢進するを想定し、これを糖尿病ラットでの虚血再灌流性急性腎障害モデルで検討したが、現在までの結果では残念ながら本経路の関与は十分に証明することが出来なかった。また、アンチトロンビン(ATIII)が、虚血再灌流に抗凝固作用ではなく、CGRP の産生を亢進する結果、血管内皮細胞からの PGI₂ の産生を亢進させ、TNF- α 産生亢進を抑制し、急性腎障害を軽減することを想定し、実験を遂行してきたがこちらに関しても、現在までのところ、十分な改善効果を得るに至っていない。今後、本科学研究費終了後も、各種研究費の応募を引き続き行い、研究費を獲得し糖尿病ラットにおける、腎虚血再灌流傷害時の臓器傷害悪化のメカニズムと改善方法について検討を行っていく予定である。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 享祐 (Kudo Kyosuke)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80336271

(2) 研究分担者

野口 隆之 (Noguchi Takayuki)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90156183

(3) 連携研究者

なし