

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 三次 有 奈

### 学位論文題名

コントロール良好な2型糖尿病における NET レベルと  
高グルコースによる NET 誘導経路

(Circulating NET levels in well-controlled type 2 diabetes and pathway  
involved in high-dose glucose-induced NET formation)

**【背景と目的】** 2型糖尿病はわが国の成人の10人にひとりが罹患し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、神経障害などの発生をいかに防ぐかが重要である。これらの合併症に共通するのは微小血管障害である。これまで、2型糖尿病に伴う微小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タンパクの非酵素的糖化、酸化ストレス過剰などが血管内皮細胞障害を誘導する機序が考えられてきた。わが国で行われた Kumamoto study をはじめ、2型糖尿病に対する強化療法が微小血管障害の合併を有意に抑制することが報告されている。しかしながら、良好なコントロールが得られた症例においても、約10%には、腎症や網膜症が合併する。したがって、コントロール良好な2型糖尿病患者での微小血管障害のリスクを反映するバイオマーカーの探索は重要である。好中球細胞外トラップ (NETs) とは、活性化された好中球が DNA に細胞内抗菌タンパクをまぶして細胞外に放出することで病原微生物をトラップし、効率よく殺菌する自然免疫システムである。NETs は生体にとって不可欠な生体防御機構である一方、過剰な NETs は白血球や血小板を活性化し、血管内皮細胞を障害することによって血栓症を含む微小血管障害の発症に関与することが明らかとなってきた。

糖尿病と NETs の関係についても、いくつか報告が出始めている。例えば、好中球はエネルギー代謝のほとんどをグルコースに依存しており、NETs の形成はグルコース依存的に生じること、また、高血糖状態は NETs の形成を促進し、2型糖尿病患者では NETs の存在を示唆する血中のエラスターゼや dsDNA のレベルが健常者に比べて有意に高く、血中 dsDNA のレベルは腎症や心血管障害の有無、血中 IL-6 のレベルと相関することなどが報告されている。ただし、糖尿病患者での NETs の増加を始めて報告した Menegazzo らの論文では、生体内における NETs 形成を血中のエラスターゼや cell free DNA でモニターしており、当然のことながらこれらは NETs 特異的な指標とはいえない。

そこで、本研究の目的を、まず、コントロール良好な糖尿病患者の血中 NETs レベルをより直接的な MPO-DNA 複合体として測定し、臨床パラメータとの関連を明らかにすること (実験1)、次に、高濃度グルコースにより NETs 形成が亢進するメカニズムを明らかにすること (実験2) とした。

**【対象と方法】** (実験1) 北海道大学病院糖尿病外来に通院中の2型糖尿病患者のうち、随時血糖値が 200 mg/dl を超えないコントロール良好な患者11名の血清を用いた。対照には、健常者13名の血清を用いた。ミエロペルオキシダーゼ (MPO) と DNA の複合体として検出される血清中の NETs を測定し、上記健常者と糖尿病患者で比較した。また、血清

中の MPO-DNA 複合体レベルと各種臨床パラメータの相関を解析した。(実験 2) 健常者の末梢血から好中球を分離し、高濃度グルコースに暴露して NETs の形成を観察した。その程度を、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を用いた場合と比較した。高濃度グルコースと同時に、糖代謝経路阻害剤を添加して、その影響を検討した。

**【結果】** (実験 1) 血清中の MPO-DNA 複合体レベルは 2 型糖尿病患者で健常者に比べて高い傾向にあった。使用している治療薬の数で 2 型糖尿病患者を 2 群に分類すると、3 剤以上の糖尿病治療薬を必要としている群の方が、2 剤以下の糖尿病治療薬で良好なコントロールを得ている群に比べて、生体内で形成される NETs の量が有意に多い結果であった。また、血清中の MPO-DNA 複合体の量は、罹病期間、BMI、随時血糖値、尿アルブミン/クレアチニン比、AST、ALT といった臨床パラメータと正の相関を示した。(実験 2) 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。ポリオール代謝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した場合、他の経路の阻害剤を用いた場合よりも強く NETs の形成が阻害された。

**【考察】** 糖尿病患者における NETs 形成については、患者好中球では NETs 形成が抑制されるとする報告と、高血糖が NETs 形成を誘導するという報告がある。これらは一見、矛盾するように見受けられるが、前者は高血糖状態にある患者の好中球を用いた実験系であり、後者は健常者の好中球を高濃度グルコース環境に曝した実験系である。常に高血糖状態にあるようなコントロール不良な 2 型糖尿病患者では、好中球の NETs 形成能が障害されており、そのことが糖尿病患者における易感染性に関与していると考えられる。一方、血糖値が比較的正常に推移するコントロール良好な 2 型糖尿病患者では、好中球の NETs 形成能が保たれ、時に上昇する血糖値に反応して、NETs 形成が亢進する可能性が考えられる。

生体内で形成される NETs の量を反映する血清中の MPO-DNA 複合体の量と正の相関を示した、罹病期間、BMI、随時血糖値、尿アルブミン/クレアチニン比、AST、ALT といった臨床パラメータは、いずれも糖尿病における微小血管障害の危険因子であり、以上より、血清中の MPO-DNA 複合体の量は、2 型糖尿病患者における微小血管障害のリスクを反映するバイオマーカーのひとつとなる可能性が示唆された。

この他、血中 NETs レベルを測定する意義として、創傷治癒期間との関連も指摘されている。血中 NETs レベルの高い糖尿病マウスでは、創傷治癒が遅延するという報告があり、血中 NETs レベルを測定し、それを低い状態に保つことは、患者にとって有益であると考えられる。

本研究において、高血糖により誘導される NETs 形成に、好中球内におけるグルコース代謝経路、中でもポリオール経路の関与が明らかとなったことは大きな意義がある。糖尿病患者において、血中 NETs レベルを低下させる薬剤として、ポリオール経路を上流で阻害するラニレスタットなどのアルドース還元酵素阻害剤の有効性が期待される。ラニレスタットはすでに糖尿病性神経障害に対する第 III 層臨床試験が終了しており、その安全性と有効性が示されている。また、神経障害以外にも、心血管系の糖尿病合併症に対する抑制活性も報告されている。本研究により、その効果の一旦は、高血糖により誘導される NETs 形成の抑制作用に起因している可能性が示唆される。

**【結論】** 血清中の MPO-DNA 複合体量に反映される生体内の NETs 形成量は、コントロール良好な 2 型糖尿病患者の微小血管障害のリスクを反映するバイオマーカーとなる可能性がある。また、高血糖により誘導される NETs の形成亢進には、好中球内におけるグルコース代謝経路、中でもポリオール経路が関与しており、アルドース還元酵素阻害剤によるその上流での阻害は、NETs の形成亢進を抑制する有効な方法となる。