

氏名・(本籍)	瀧 秀 樹 (大阪府)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 第247号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位論文題目	ストレプトゾトシン糖尿病ラット大動脈組織における酸化ストレスと抗酸化酵素の変動

審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
	副査 教授	堀 池 喜八郎
	副査 教授	吉 川 隆 一

論文内容の要旨

【目的】

糖尿病状態における動脈硬化症の発症・進展に酸化ストレスの関与が示唆され、また糖尿病患者での血清中の過酸化脂質量が増加していたとの報告もみられる。しかし、これまで大動脈壁組織での酸化ストレスの亢進に関連した生化学的異常に関する報告は少ない。そこで、ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病ラット大動脈組織を用いて過酸化脂質を定量し、酸化ストレスに関連した遺伝子 heme oxygenase (HO) の mRNA 量および抗酸化酵素である glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD), catalase の各 mRNA 量の異常についても検討した。

【方法】

1. STZ糖尿病ラットの作製：SD系雄性ラットに (STZ 55mg/kg体重) を尾静脈より投与し、糖尿病ラットを作製した。インスリンペレットを皮下に植え込み、インスリン治療を行った。実験にはSTZ投与4週と24週のラットおよびその対照ラットの大動脈壁組織を用いた。
2. 組織の過酸化脂質の定量：大動脈壁組織より粗膜画分を単離し、メタノール・クロロホルムにより脂質抽出を行い試料とした。過酸化脂質量の測定は、hydroperoxideにより2価鉄が3価鉄に酸化され色素 (xylenol orange) と呈色反応を示すFOX法を用いて行った。
3. ノーザンブロット法：組織より総RNAを抽出し、各30 μ gの総RNAを1%アガロースにて電気泳動し、ナイトラン膜に移行させた。ラットHO, SOD, GPX, catalaseの各cDNAを [α - 32 P] dCTPでラベルし、緩衝液 (0.5Mリン酸ナトリウム、1%牛血清アルブミン、1mM EDTA、7% SDS) 中でハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、autoradiographyによりmRNAを検出した。
4. カタラーゼ活性の測定：組織をリン酸緩衝液 (PBS, 5mM EDTA, 0.01% digitonin, 0.25% sodium cholate) 中で破碎し、遠心した上清を試料とした。20mM Tris-HCl, 250mM EDTA, 9mM H₂O₂に試料を加え、240nmの吸光度でH₂O₂濃度の減少を測定し、H₂O₂のモル吸光係数を0.071 mM⁻¹cm⁻¹としてカタラーゼ活性を算出した。

【結果】

1. 4及び24週糖尿病ラットは対照群ラットに比較し、体重は有意に減少し、血漿グルコース濃度は有意に増加した。4週間のインスリン治療により血漿グルコース濃度は改善され、対照群ラットの体重や血漿グルコース濃度に比べて有意差はなくなった。
2. 過酸化脂質量は4週の対照群、糖尿病群間で差がなかったが、24週では対照群の38.6 \pm 3.9 nmol/g湿重量に比較し、糖尿病群では81.0 \pm 13.8 nmol/g湿重量と2.1倍に増加した ($P < 0.05$)。
3. 4週糖尿病群のHO mRNA量は、対照群に比較し1.6倍に増加した ($P < 0.05$)。この増加は4週間のインスリン治療により対照群レベルまで改善された。更に24週糖尿病群のHO mRNA量は対照群の2.4倍に増加した。

4. 4週糖尿病ラットの抗酸化酵素のmRNA量の検討では、GPXとSODのmRNA量は共に対照群と差がなかったが、catalase mRNA量は、対照群に比較し1.6倍に増加した ($P<0.05$)。この増加は4週間のインスリン治療により対照群レベルまで改善された。更に24週糖尿病ラットのcatalase mRNA量は、対照群の4.4倍に増加した。
5. 24週糖尿病群のカタラーゼ活性 (13.9 ± 2.9 IU/g 蛋白) は、対照群 (9.2 ± 1.3 IU/g 蛋白) に比べ1.5倍に増加した ($P<0.05$)。

【考 察】

糖尿病ラット大動脈壁組織の過酸化脂質量の検討では、4週で対照群と差がなかったが、24週では対照群の2.1倍に増加していたことより、慢性の糖尿病状態による大動脈組織での酸化ストレスの亢進が認められた。更に大動脈組織での酸化ストレスの亢進を確認するためにHO mRNA量を検討した。HO遺伝子上流には酸化ストレスで活性化される転写因子NF- κ Bが存在し、種々の酸化ストレスにより誘導されることより酸化ストレスの指標となると考えられている。4, 24週の糖尿病ラットのHO mRNA量は対照ラットに比較して増加し、4週間のインスリン治療により対照群レベルまで改善した。このことより、糖尿病状態の大動脈組織で酸化ストレスの亢進が更に確認された。つぎに酸化ストレスの亢進に反応して変動する抗酸化酵素に関する検討では、糖尿病ラット大動脈壁のcatalase mRNA量は増加したが、GPXとSODのmRNA量は共に変化しなかった。Catalase mRNA発現に関しては、過酸化水素により活性化される転写因子oxyRの関与が大腸菌で報告されている以外、高等生物では不明な点が多い。更に各種臓器の抗酸化酵素の糖尿病での異常については様々の報告があり、これら酵素の誘導機構に関しては今後検討が必要である。

<結論>

過酸化脂質量とHO mRNA量の増加から、糖尿病ラットの大動脈壁組織では酸化ストレスが亢進していることが判明した。

論文審査の結果の要旨

動脈硬化症の発症・進展過程に酸化ストレスが関与している可能性が示唆されている。また、糖尿病においてフリーラジカル産生の亢進や、抗酸化物質の低下が報告されている。しかし、糖尿病大動脈組織における酸化ストレスの存在の有無についての報告は少なく、その機序に関しても明らかではない。本論文は、糖尿病大動脈組織における酸化ストレスの程度を明らかにする目的で糖尿病ラットを用い、過酸化脂質量と酸化ストレスに関連した遺伝子発現を検討したものである。実験的に以下の4点を確認している。

- 1) 大動脈壁組織中の過酸化脂質量の増加
- 2) 酸化ストレスにより誘導されるヘムオキシゲナーゼのmRNA量の増加
- 3) 抗酸化酵素のうちカタラーゼmRNA量の増加と活性の上昇
- 4) グルタチオンペルオキシダーゼおよび銅・亜鉛スーパーオキシドジスムターゼのmRNA量は変化しないこと

以上の結果より、糖尿病ラット大動脈壁組織では過酸化脂質量が増加することと、ヘムオキシゲナーゼmRNA量が増加することを明らかにし、酸化ストレスの亢進を示している。抗酸化酵素のうちカタラーゼmRNAのみが増加していたことから、酸化ストレスとして過酸化水素が増加することを示唆している。

本論文は、糖尿病大動脈組織における酸化ストレスの亢進を証明し、糖尿病における血管壁細胞の遺伝子発現異常を誘導する機序の一端を明らかにしたことより、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。