HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 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 |
| Author(s) | 三次, 有奈 |
| Description | 配架番号：2257 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第12359号 |
| Issue Date | 2016-06-30 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k12359 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/66338 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Arina_Miyoshi.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学　位　論　文

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 ）

２０１６年６月

北　海　道　大　学

三　次　有　奈

# 学　位　論　文

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 ）

２０１６年６月

北　海　道　大　学

三　次　有　奈

# 目　　　　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
1.1　2 型糖尿病と微小血管障害・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
1.2　糖尿病と好中球細胞外トラップ・・・ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4

2. 略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

3.　第一部　　コントロール良好な 2 型糖尿病患者の血清 MPO-DNA 複合体量と
　　　　　　臨床パラメータとの関連・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8
3.1　背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
3.2　目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
3.3　対象・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
3.4　方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11
　3.4.1　血清中の MPO-DNA 複合体の定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11
　3.4.2　臨床パラメータ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11
3.5　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12
　3.5.1　コントロール良好な 2 型糖尿病患者の臨床パラメータ・・・・・・・・ 12
　3.5.2　コントロール良好な 2 型糖尿病患者と健常者の血清 MPO-DNA 複合体量の
　　　　の比較・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
　3.5.3　コントロール良好な 2 型糖尿病患者に使用している糖尿病治療薬・・・ 14
　3.5.4　コントロール良好な 2 型糖尿病患者に使用している糖尿病治療薬の数と
　　　　血清中の MPO-DNA 複合体量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15
　3.5.5　コントロール良好な 2 型糖尿病患者の血清 MPO-DNA 複合体量と臨床
　　　　パラメータとの関連血中・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16
3.6　 小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

4.　第二部　高濃度グルコースにより NETs 形成が亢進するメカニズムの解明・・ 19
4.1　目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20
4.2　内容・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20
4.3　方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21

4.3.1　好中球の分離と NETs 誘導のプロトコル・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21
4.3.2　NETs の定量法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
4.3.3　統計・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
4.3.4　シトルリン化ヒストンの免疫蛍光染色・・・・・・・・・・・・・・・・・・23
4.4　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
4.4.1　NETs 形成のグルコース濃度依存性（実験 1）・・・・・・・・・・・・・・ 24
4.4.2　NETs 形成の培養時間依存性（実験 2）・・・・・・・・・・・・・・・・・・26
4.4.3　NETs 形成における浸透圧の影響（実験 3）・・・・・・・・・・・・・・・・27
4.4.4　NETs 形成におけるグルコース代謝の必要性（実験 4）・・・・・・・・・ 28
4.4.5　NETs 形成に必要なグルコース代謝経路（実験 5）・・・・・・・・・・・・ 29
4.4.5.1　背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
4.4.5.2　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
4.5　小括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32

5.　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

6.　総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

7.　謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36

8.　引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

# 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文に投稿し、採択された。

[主論文]

1. Arina Miyoshi, Mai Yamada, Haruki Shida, Daigo Nakazawa, Yoshihiro Kusunoki, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Circulating NET levels in well-controlled type 2 diabetes and pathway involved in high-dose glucose-induced NET formation. Pathobiology 83: 243-251, 2016.

[副論文]

2. Yuki Matsui, Utano Tomaru, Arina Miyoshi, Tomoki Ito, Shinji Fukaya, Hideaki Miyoshi, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. Overexpression of TNF-α converting enzyme promotes adipose tissue inflammation and fibrosis induced by high fat diet. Exp Mol Pathol 97: 354-358, 2014.

3. Daigo Nakazawa, Haruki Shida, Yoshihiro Kusunoki, Arina Miyoshi, Saori Nishio, Utano Tomaru, Tatsuya Atsumi, Akihiro Ishizu. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. J Autoimmun 67: 19-28, 2016.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

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 94 回北海道医学大会病理分科会・第 47 回　北海道病理談話会、2014 年 10 月 11 日、旭川

2. 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年4月30日、名古屋

3. 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年5月23日、下関

# 1.　緒言

## 1.1　2型糖尿病と微小血管障害

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[1]。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[2]。

わが国で行われたKumamoto studyをはじめとし、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[3-5]。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。

## 1.2　糖尿病と好中球細胞外トラップ

好中球細胞外トラップ（neutrophil extracellular traps: 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（Figure 1）[6]。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血管障害の発症に関与することが明らかとなってきた（Figure 2）[7]。

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[8]、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[9]。ただし、糖尿病患者におけるNETsの形成亢進を始めて報告したMenegazzoらの論文[9]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、これらは必ずしも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生体内NETsレベルをNETs特異的なmyeloperoxidase (MPO)-DNA複合体として血清中で測定し、臨床パラメータとの関連を明らかにすること（第一部)、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（第二部）とした。

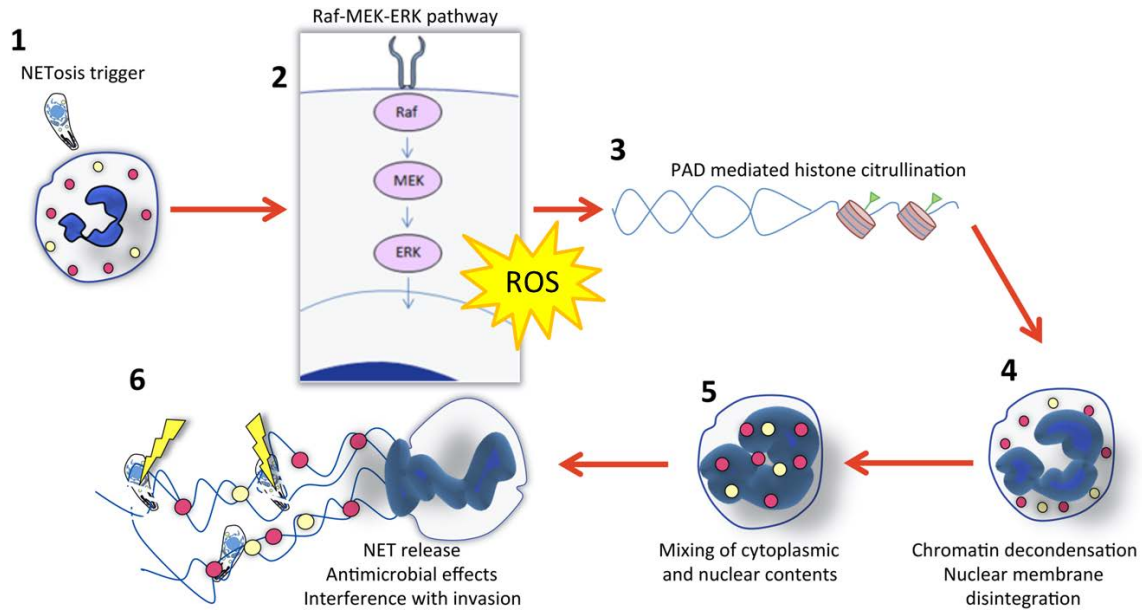



Figure 1. NETs の形成過程（Hakkim A, et al. Nat Chem Biol 7: 75-77, 2011 より引用改変）

細菌などの病原微生物による刺激を受けた好中球は、Raf-MEK-ERK 経路を活性化し、活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）依存的にヒストンをシトルリン化する。非刺激状態では DNA を巻き付けているヒストンがシトルリン化されることにより、DNA の巻きほどきが生じ、脱凝縮された DNA は細胞質内で抗菌タンパクと混合され、やがて細胞外に放出される。

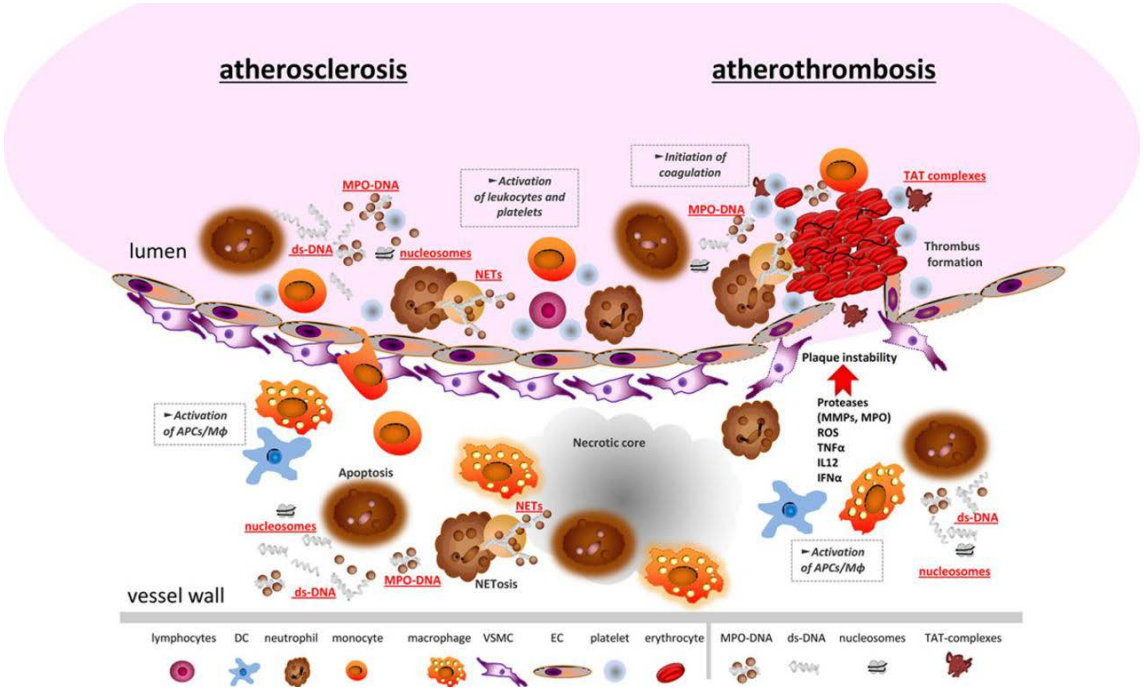



Figure 2. NETs による血管障害機序(Döring Y, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 33: 1735-1736, 2013 より引用)

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動脈硬化症や血栓症にも関与する。

# 2.　略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

| | |
|---|---|
| ABTS | 2,2’-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) |
| ALT | alanine transaminase, |
| ANCA | anti-neutrophil cytoplasmic antibody |
| AST | aspartate transaminase |
| BSA | bovine serum albumin |
| BUN | blood urea nitrogen |
| CPG | casual plasma glucose |
| Cr | creatinine |
| DAPI | 4’, 6-diamidino-2-phenylindole |
| 2-DG | 2-deoxyglucose |
| LPS | lipopolysaccharide |
| MPO | myeloperoxidase |
| NET | neutrophil extracellular trap |
| OD | optical density |
| PFA | paraformaldehyde |
| PKC | protein kinase C |
| PMA | phorbol myristate acetate |
| ROS | reactive oxygen species |
| SD | standard deviation |
| T2D | type 2 diabetes |

# 3.　第一部

## コントロール良好な 2 型糖尿病患者の血清 MPO-DNA 複合体量と臨床パラメータとの関連

# 3.1　背景

2 型糖尿病に対する強化療法は、微小血管障害の合併を有意に抑制する[3-5]。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探索は重要である。

糖尿病患者では、高血糖時に生体内で NETs 形成が亢進することが推測される。生体内で形成された NETs は、血中の NETs 関連物質として測定が試みられ、Menegazzo らの論文[9]では、血中のエラスターゼや dsDNA を測定し、生体内の NETs 量を推定していた。しかしながら、これらは必ずしも NETs 特異的な物質とはいえない。

そこで、本研究では生体内の NETs 量をより正確に反映すると考えられる血清中の MPO-DNA 複合体[10]を測定することとした。測定法は、既報[10]に準じ、抗 MPO 抗体と抗 DNA 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法（Figure 3）を用いた。

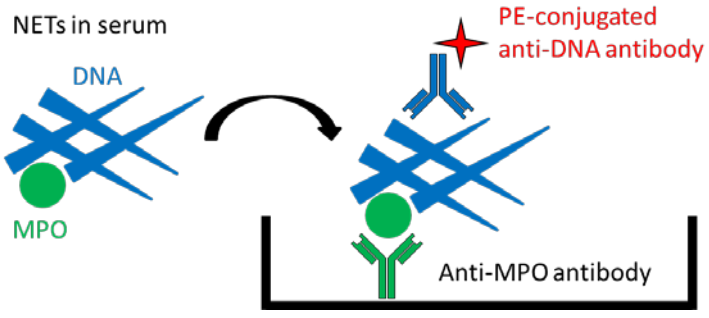



Figure 3. 血中 MPO-DNA 複合体の定量（イメージ）

血中の NETs 断片は MPO と DNA の複合体として存在することが知られており、抗 MPO 抗体と抗 DNA 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法でこれを定量した。

## 3.2　目的

コントロール良好な糖尿病患者の生体内 NETs レベルを、NETs 特異的な MPO-DNA 複合体として血清中で測定し、臨床パラメータとの関連を明らかにする。

## 3.3　対象

2014 年 6 月～8 月に北海道大学病院内科Ⅱ外来に来院した 2 型糖尿病患者のうち、随時血糖が 200 mg/dl を超えないコントロール良好な患者で、本研究に同意が得られた者を対象とした。また、健常者を対照とした。（北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認番号：014-0043）

# 3.4 方法

## 3.4.1　血清中の MPO-DNA 複合体の定量

キャプチャー抗体として、5 µg/ml の抗 MPO モノクローナル抗体 (AbD Serotec, Kidllington, UK)を 96 穴マイクロプレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に 1 ウェルあたり 75 µl 入れ、4 ℃ で一晩静置し、固相化した。翌日、プレートを PBS で洗浄し、各ウェルを 125 µl の 1% BSA で 1 時間ブロッキングした。1% BSA を除去後、各ウェルに細胞死検出キット (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) に同封されているペルオキシダーゼで標識された抗 DNA モノクローナル抗体 80 µl と被検血清 40 µl を添加し、振盪装置を用いて 320 rpm で 2 時間、室温で振盪した。PBS で洗浄後、細胞死検出キットの ABTS 基質溶液を各ウェルに 100 µl 分注し、37℃で 40 分間、遮光下に静置した。その後、各ウェルに 100 µl の ABTS 反応停止液を分注し、405 nm の波長を Fluostar Optima (BMG Labtech, Saitama, Japan)で測定した。

## 3.4.2　臨床パラメータ

カルテより、年齢、糖尿病罹病期間、ボディマス指数 (body mass index: BMI)、随時血糖値 (casual plasma glucose: CPG) 、HbA1c、尿素窒素 (BUN) 、クレアチニン (Cr) 、尿アルブミン/クレアチニン比、AST、ALT の値を抽出した。

# 3.5 結果

## 3.5.1　コントロール良好な２型糖尿病患者の臨床パラメータ

解析に用いたコントロール良好な２型糖尿病患者11名の臨床パラメータをTable 1に示す。

Table 1.　Clinical parameters of well-controlled T2D patients

| Parameter | Range | Mean ± SD |
|---|---|---|
| Age (years) | 37-82 | 60.2 ± 14.2 |
| Disease duration (months) | 5-25 | 12.8 ± 5.5 |
| BMI (%) | 18.7-33.9 | 23.8 ± 5.1 |
| CPG (mg/dl) | 80-160 | 115.0 ± 23.1 |
| HbA1c (%) | 6.1-7.1 | 6.6 ± 0.3 |
| BUN (mg/dl) | 10-20 | 14.2 ± 3.5 |
| Cr (mg/dl) | 0.59-0.87 | 0.74 ± 0.09 |
| Urinary albumin (mg/gCr) | 2.8-20.0 | 10.1 ± 5.2 |
| AST (IU/l) | 18-28 | 22.7 ± 3.5 |
| ALT (IU/l) | 11-41 | 20.6 ± 10.6 |

### 3.5.2　コントロール良好な2型糖尿病患者と健常者の血清MPO-DNA複合体量の比較

対照として用いた健常者13名の血清中のMPO-DNA複合体量を表すELISAのOD値は0.135±0.053であったのに対し、コントロール良好な2型糖尿病患者11名では0.209±0.133と高い傾向にあった（Figure 4）。

両者の間には統計学的な有意差は認められなかったが、2型糖尿病患者ではその値が分散しており、血清中のMPO-DNA複合体量が多い患者と少ない患者がいると考えられた。

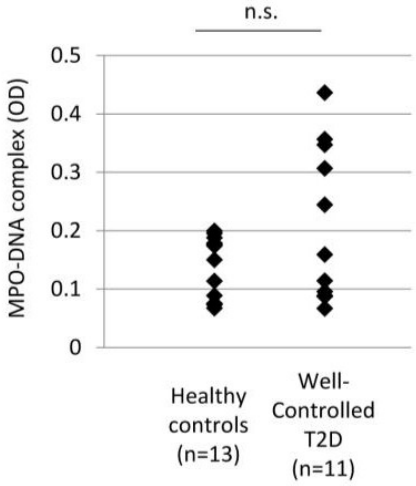



Figure 4. 血清中のMPO-DNA複合体

健常者（n=13）とコントロール良好な2型糖尿病患者（n=11）の比較。
血清中のMPO-DNA complexを、抗MPO抗体と抗DNA抗体を用いたサンドイッチELISA法で測定した。n.s.：有意差なし。

### 3.5.3　コントロール良好な2型糖尿病患者が使用している糖尿病治療薬

2型糖尿病患者では健常者に比較して、血清中のMPO-DNA複合体の値が分散しており、生体内で形成されているNETsの量が多い患者と少ない患者がいると考えられた。そこで、その違いを規定する要因を探索した。本研究で血清を解析した11名の2型糖尿病患者はいずれもコントロール良好で、HbA1cのレベルも6.1～7.1%の比較的狭い範囲にあったが、使用されている糖尿病治療薬はTable 2に示すとおりさまざまであった。

Table 2.　Anti-diabetes drugs used in well-controlled T2D patients

| ID | BG | SU | DPP4i | TZD | GLP-1a | α-GI | Insulin | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 4 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 6 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 7 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 10 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

BG: Biguanide, SU: sulfonylurea, DPP4i: dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, TZD: Thiazolidine, GLP-1a: Glucagon-like peptide-1 agonist, α-GI: α-glucosidase inhibitor

### 3.5.4　コントロール良好な 2 型糖尿病患者が使用している糖尿病治療薬の数と血清中の MPO-DNA 複合体量

2 型糖尿病に対する一般的な治療では、コントロールの程度に応じて薬剤を付加していくため、治療薬の数は 2 型糖尿病の病状をある程度反映していると考えられる。本研究においても、使用されている糖尿病治療薬が 3 剤未満の群（n=6）と 3 剤以上の群（n=5）に分けて解析したところ、後者の群で血清中の MPO-DNA 複合体量が前者や健常者に比べて有意に高いことが明らかとなった（Figure 5）。

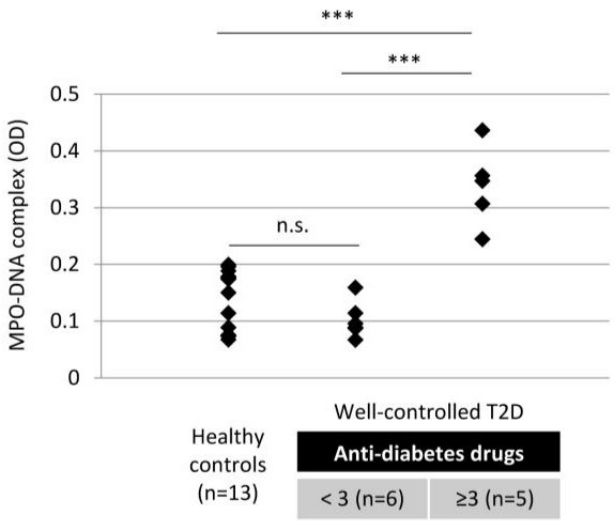



Figure 5. 血清中の MPO-DNA 複合体

コントロール良好な 2 型糖尿病患者は、3 剤未満の糖尿病治療薬で治療されている群（n=6）と 3 剤以上の糖尿病治療薬で治療されている群（n=5）に分けて、健常者（n=13）と比較した。***$p<0.001$, n.s.：有意差なし。

### 3.5.5　コントロール良好な2型糖尿病患者の血清MPO-DNA複合体量と臨床パラメータとの関連

次に、コントロール良好な2型糖尿病患者の血清中のMPO-DNA 複合体量と臨床パラメータの相関を検討した。年齢、糖尿病罹病期間、BMI、随時血糖値、HbA1c、BUN、Cr、尿アルブミン/クレアチニン比、AST、ALTのうち、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について、血清中のMPO-DNA複合体量との間に正の相関（$R^2$＞0.1）が認められた（Figure 6）。

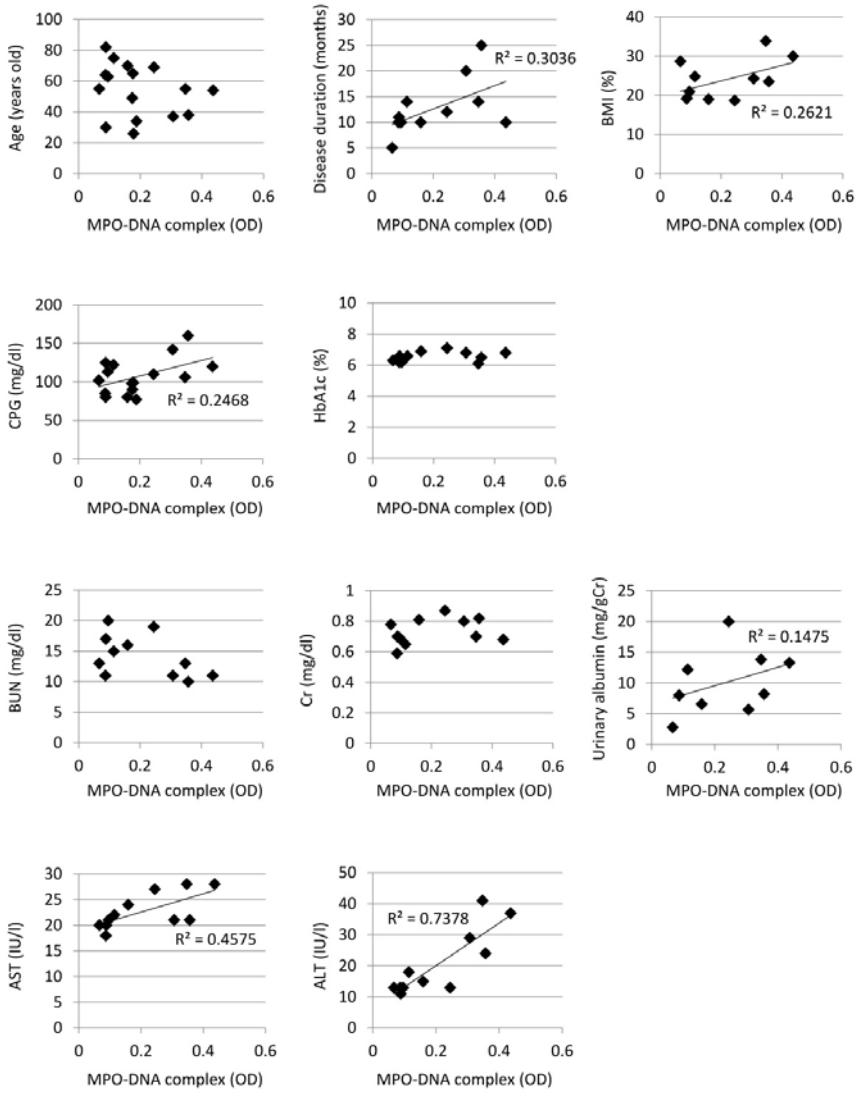



Figure 6. コントロール良好な2型糖尿病患者の血清中のMPO-DNA複合体量と臨床パラメータの相関

ステップワイズ法による重回帰分析では、MPO-DNA 複合体量との関連において、ALT が最も寄与度の高い因子として抽出された（Table 3）。

Table 3.　重回帰分析（ステップワイズ法）

| 説明変数 | 標準偏回帰係数 | P値 |
|---|---|---|
| ALT (IU/L) | 0.9638 | 0.000 |

## 3.6 小括

- ✓ コントロール良好な 2 型糖尿病患者のうち、3 剤以上の糖尿病治療薬で治療されている患者では、3 剤未満で治療されている患者や健常者に比べて、血中 MPO-DNA 複合体の量が有意に高かった。

- ✓ コントロール良好な 2 型糖尿病患者では、血中 MPO-DNA 複合体の量と、糖尿病罹病期間、BMI、随時血糖値、尿アルブミン/クレアチニン比、AST、ALT との間に正の相関を認めた。ALT との関連が最も顕著であった。年齢、HbA1c、BUN、Cr との間には正の相関は認めなかった。

# 4.　第二部

# 高濃度グルコースにより NETs 形成が亢進するメカニズムの解明

## 4.1　目的

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。

## 4.2　内容

以下の実験を行った。

実験 1: NETs 形成のグルコース濃度依存性の確認
実験 2 : NETs 形成の培養時間依存性の確認
実験 3 : NETs 形成における浸透圧の影響の確認
実験 4 : NETs 形成におけるグルコース代謝の必要性の確認
実験 5: NETs 形成に必要なグルコース代謝経路の確認

# 4.3　方法

## 4.3.1　好中球の分離とNETs誘導のプロトコル（Figure 7）

15 ml のファルコンチューブに 5 ml の Polymorphprep（Axis-Shield, Dundee, Scotland）を入れ、健常者末梢血 5 ml を重層し、20 ℃、1900 rpm の条件で、40 分間遠心分離した。上清を除去し、好中球を含む多核白血球分画層を回収した。回収した好中球にPBSを加え、$5\times10^5$/ml に調整し、4 穴Chamber Slide（Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)の各ウェルに 400 µl ずつ播種した。37 ℃で 15 分間インキュベートした後、メディウムを除去し、残存細胞をPBSで洗浄した。その後、それぞれの実験に応じて以下の刺激物を添加した。

実験1: 各濃度のグルコース（5.5/10/20/30 mM)、陽性対照としてphorbol myristate acetate（PMA, 100 nM)
実験2: 20 mMのグルコース
実験3: 各濃度のグルコースとマンニトール（それぞれ 5.5/10/20 mM)
実験4: グルコース20 mM、2-deoxyglucose（2-DG, 20/30 mM)、陽性対照としてPMA(100nM)
実験5: グルコース 30 mMにラニレスタットもしくはソトラスタウリン（それぞれ0.25/0.5/1 µM）を添加

NETsを誘導するため、さらに37 ℃でインキュベートした。2時間後、PBSで洗浄し、4%paraformaldehyde(PFA)で15分間、室温で固定した。チャンバーを除去し、スライドガラスに残った細胞をDAPI入りの封入剤(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で封入した。

※補足※　刺激物のメーカーは以下の通りである（溶媒はPBSを使用）
PMA（Sigma-Aldrich)
グルコース、マンニトール、2-DG　(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)
ラニレスタット（aldose reductase inhibitor, Sumitomo Dainippon Pharma, Sapporo, Japan)
ソトラスタウリン（protein kinase C（PKC）inhibitor, Sigma-Aldrich)

1. 好中球分離

2. 播種

各ウェルに好中球を4×10$^5$個ずつ播き、
15分インキュベートする。

※溶媒：PBS（グルコース0%）

↓

①から⑧に実験に応じて刺激物
（グルコース、PMAなど）を
添加し、インキュベートする。

3. PFAで固定後、DAPIで染色

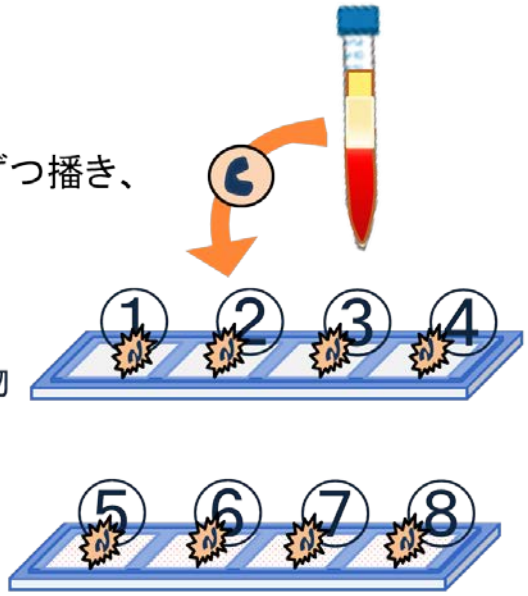



Figure 7. 好中球の分離と NETs 誘導

### 4.3.2　NETs の定量法

蛍光顕微鏡下でチャンバースライドの1 ウェルあたりランダムに6視野写真撮影し（200 倍）、Image J software を用いて、DAPI 陽性エリアを計測した。これを好中球数で補正した値を NETs 値とした。

### 4.3.3　　統計

独立した2群を比較するため、対応のない Student の *t*-検定を行った。2群の分散が同等でない時は、ウェルチの *t*-検定を行った。P 値が 0.05 未満をもって有意とした。

### 4.3.4　　シトルリン化ヒストンの免疫蛍光染色

PFA で固定した細胞を、20 μg/ml の抗シトルリン化ヒストン抗体(Abcam, Cambridge, UK）と室温で 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、Alexa Fluor 594-標識抗ウサギ IgG 抗体（500 倍希釈, Invitrogen, Tokyo, Japan）を室温で 60 分間反応させ、PBS で洗浄後に DAPI を含む封入剤で封入した。標本を蛍光顕微鏡で観察した。

# 4.4　結果

## 4.4.1　NETs 形成のグルコース濃度依存性（実験 1）

10 mM 以上のグルコースに曝露することにより、グルコースの濃度依存的に NETs の形成亢進が認められた（Figure 8）。

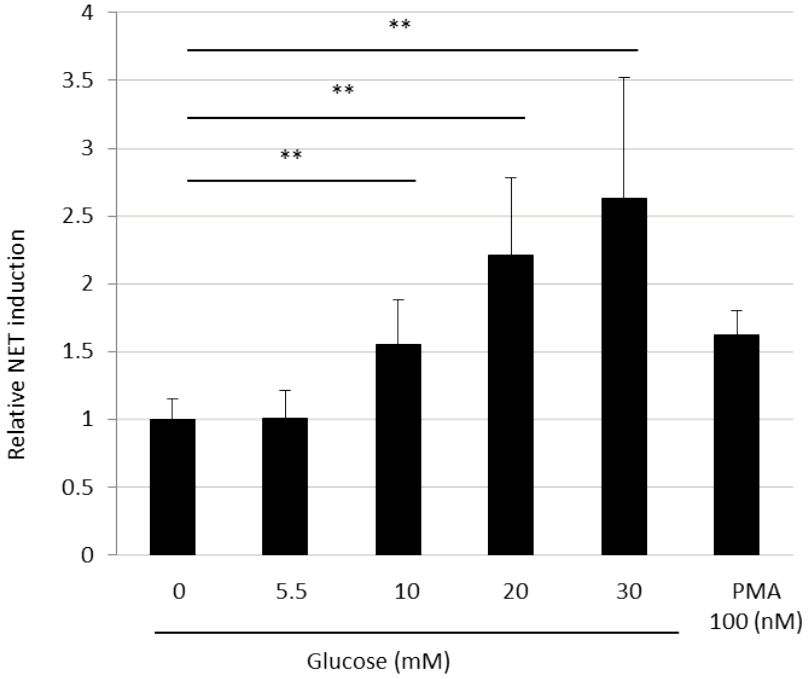



Figure 8. NETs 形成のグルコース濃度依存性

種々の濃度に調整したグルコース溶液を健常者の好中球に添加し、2 時間培養した。4%PFA で固定後、DAPI を含む封入剤で封入した。蛍光顕微鏡下にランダムな 6 視野を撮影し、画像処理によって NETs の面積を数値化した。それを各視野中の好中球数で補正し、グルコース 0 mM（PBS）で刺激した時の NETs 量を 1 として、相対表示した。**$p<0.01$。

高濃度グルコースにより NETs が誘導されることを、DNA ファイバーと、NETs の形成に必須なシトルリン化ヒストンが共局在していることで確認した (Figure 9)。

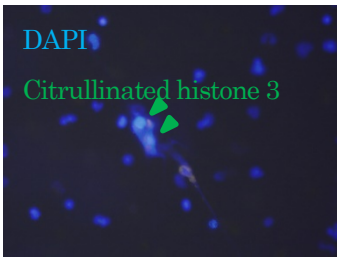



Figure 9. 高濃度グルコースによる NETs 形成の証明

グルコース 20 mM (360 mg/dl) で 2 時間刺激した健常者の好中球。4%PFA で固定後、抗シトルリン化ヒストン抗体による免疫蛍光染色を行った。PBS で洗浄後に DAPI を含む封入剤で封入した。矢頭は、シトルリン化ヒストン (緑) と DNA (青) の共局在を示す。

### 4.4.2　NETs 形成の培養時間依存性（実験 2）

20 mM（360 mg/dl）の高濃度グルコース刺激下で NETs の形成を観察し、培養時間の影響を検討した。Figure 10 に示すとおり、NETs の形成は 2 時間以降に有意に亢進した。

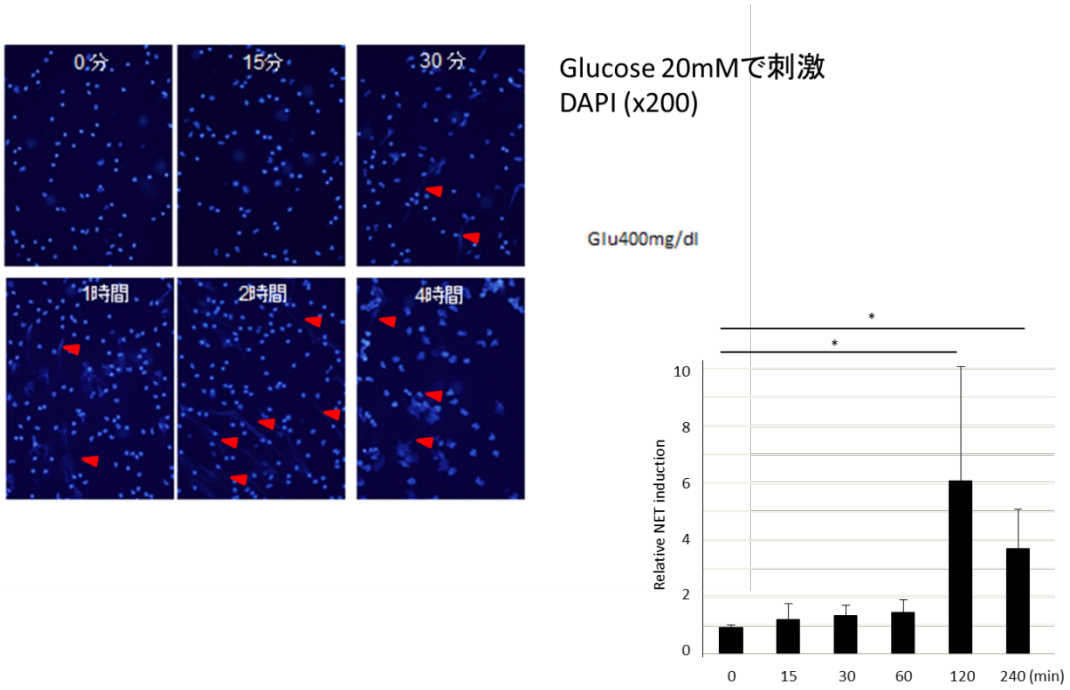



Figure 10. NETs 形成の培養時間依存性

健常者の好中球を 20 mM のグルコース溶液で 15 分間、30 分間、1 時間、2 時間、4 時間培養した。4%PFA で固定後、DAPI を含む封入剤で封入した。

（左の写真）赤い矢頭は NETs を示す。

（右のグラフ）蛍光顕微鏡下にランダムな 6 視野を撮影し、画像処理によって NETs の面積を数値化した。それを各視野中の好中球数で補正し、0 分の NETs 量を 1 として、相対表示した。*p<0.05。

### 4.4.3　NETs 形成における浸透圧の影響（実験 3）

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どうか検討した。グルコースと同程度の浸透圧を持つマンニトール[11]で NETs の誘導を試みたところ、Figure 11 に示すように、20 mM のグルコース下では NETs の形成亢進がみられたものの、同等浸透圧のマンニトールでは、NETs の形成亢進はみられなかった。したがって、高濃度グルコースによる NETs の形成亢進は高浸透圧によるものではないと考えられた。

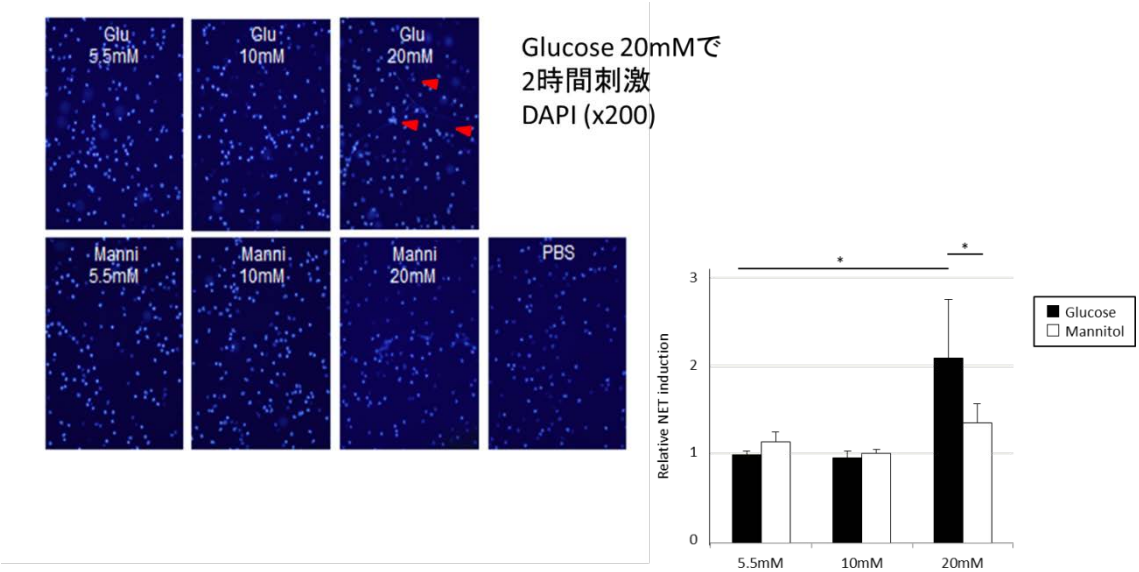



Figure 11. NETs 形成における浸透圧の影響

5.5 mM、10 mM、20 mM の濃度に調整したグルコース溶液またはマンニトール溶液を健常者の好中球に添加し、2 時間培養した。4%PFA で固定後、DAPI を含む封入剤で封入した。

(左の写真) 赤い矢頭は NETs を示す。

(右のグラフ)蛍光顕微鏡下にランダムな 6 視野を撮影し、画像処理によって NETs の面積を数値化した。それを各視野中の好中球数で補正し、グルコース 5.5 mM で刺激した時の NETs 量を 1 として、相対表示した。*$p<0.05$。

### 4.4.4　NETs 形成におけるグルコース代謝の必要性（実験 4）

高濃度グルコースによる NETs 形成亢進がグルコース代謝によるものか確認するために、グルコースのアナログである 2-DG を用いて確かめることにした。グルコースが 6 リン酸化後も代謝されアデノシン三リン酸になるのに対し、2-DG はグルコースと同様に GLUT から取り込まれるが、6 リン酸化後は代謝されず細胞内にとどまることが知られている[12]。

結果は Figure 12 に示すとおり、グルコース 20 mM では NETs の形成亢進が認められたが、2-DG では 30 mM に濃度を上げても無刺激の状態と変わらず、NETs の形成亢進を認めなかった。

よって、高濃度グルコースによる NETs の形成亢進には、グルコースが細胞内で代謝されることが必要と考えられた。

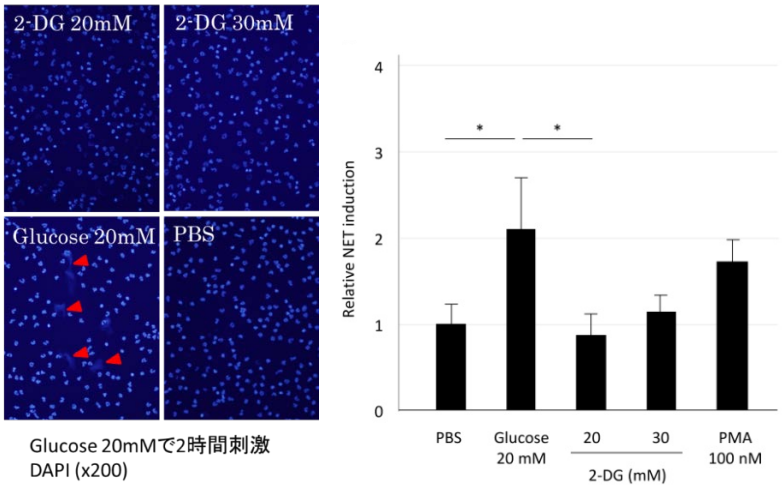



Figure 12. NETs 形成におけるグルコース代謝の必要性

20 mM の濃度に調整したグルコース溶液または 20 mM、30 mM の濃度に調整した 2-DG 溶液を健常者の好中球に添加し、2 時間培養した。4%PFA で固定後、DAPI を含む封入剤で封入した。

（左の写真）赤い矢頭は NETs を示す。

（右のグラフ）蛍光顕微鏡下にランダムな 6 視野を撮影し、画像処理によって NETs の面積を数値化した。それを各視野中の好中球数で補正し、PBS（グルコース：0 mM）で刺激した時の NETs 量を 1 として、相対表示した。*$p<0.05$。

### 4.4.5 NETs 形成に必要なグルコース代謝経路（実験 5）

#### 4.4.5.1 背景

高濃度グルコースが NETs を誘導する際に、好中球内のどのグルコース代謝経路が使われているか検討した。

高濃度グルコースが好中球に NETs 形成を誘導する経路として、活性酸素種(ROS)の産生経路の関与が想定される。グルコース代謝における ROS 産生経路には、ポリオール経路と de novo DAG 経路があるが、ポリオール経路において産生される NADH が de novo DAG 経路における DAG の産生を制御しているため、ポリオール経路がより上流に位置しているといえる（Figure 13）[13]。

そこで、これらの経路を上流で阻害する阻害剤として、アルドース還元酵素阻害剤のラニレスタットを、下流の支流で阻害する阻害剤として、PKC 阻害剤のソトラスタウリンを用いた実験を行った。

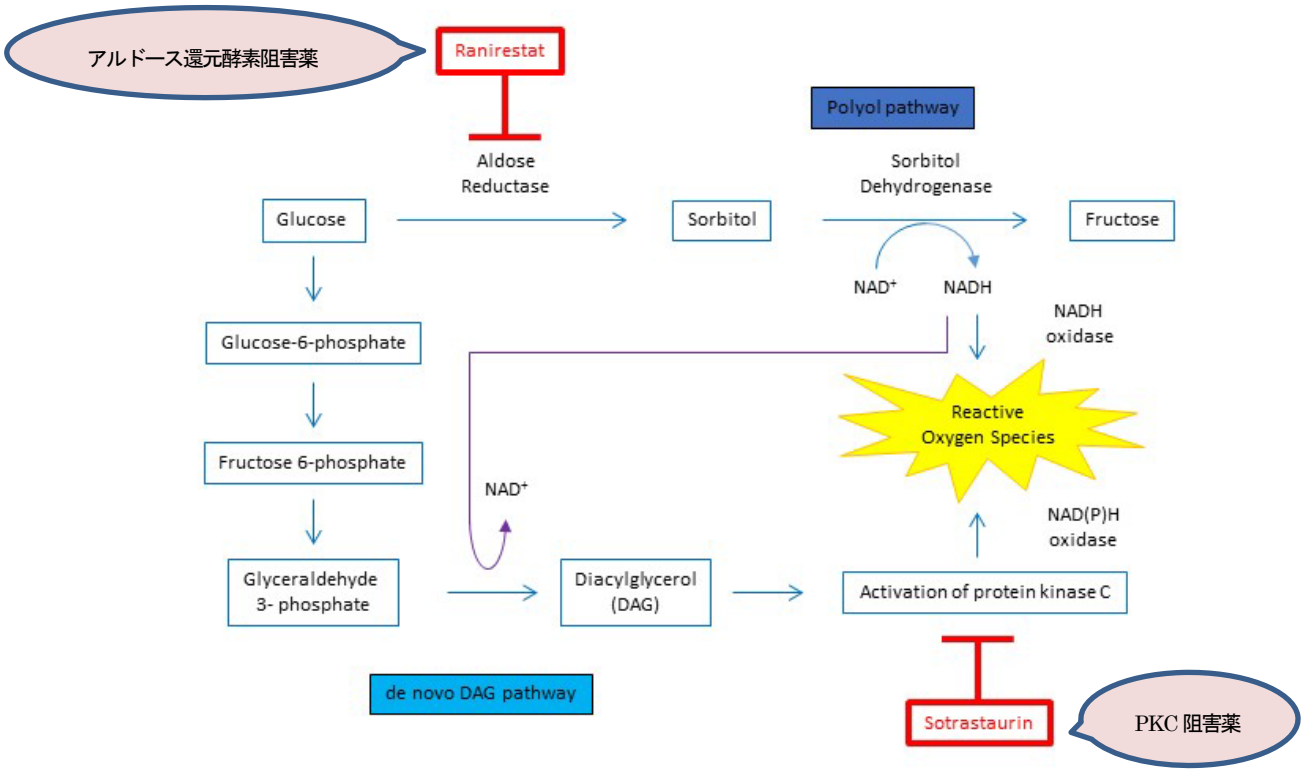



Figure 13. グルコース代謝経路における ROS 産生経路とその阻害剤

グルコース代謝における ROS 産生経路には、ポリオール経路と de novo DAG 経路がある。ポリオール経路において産生される NADH が de novo DAG 経路における DAG の産生を制御しているため、ポリオール経路がより上流に位置している。これらの経路を上流で阻害する阻害剤として、アルドース還元酵素阻害剤のラニレスタットを、下流の支流で阻害する阻害剤として、PKC 阻害剤のソトラスタウリンを使用した。

### 4.4.5.2　結果

アルドース還元酵素阻害剤のラニレスタットは 0.25 μM の低濃度でも完全に NETs の形成を抑制したのに対し、PKC 阻害剤のソトラスタウリンは、0.5 μM 以上の比較的高濃度でも NETs の形成を完全には抑制しなかった（Figure 14）。

このことから、高濃度グルコースによる NETs 形成には、好中球におけるグルコース代謝経路の中のポリオール経路が関与しており、その上流での阻害により、効率良く NETs 形成を抑制できることが示された。

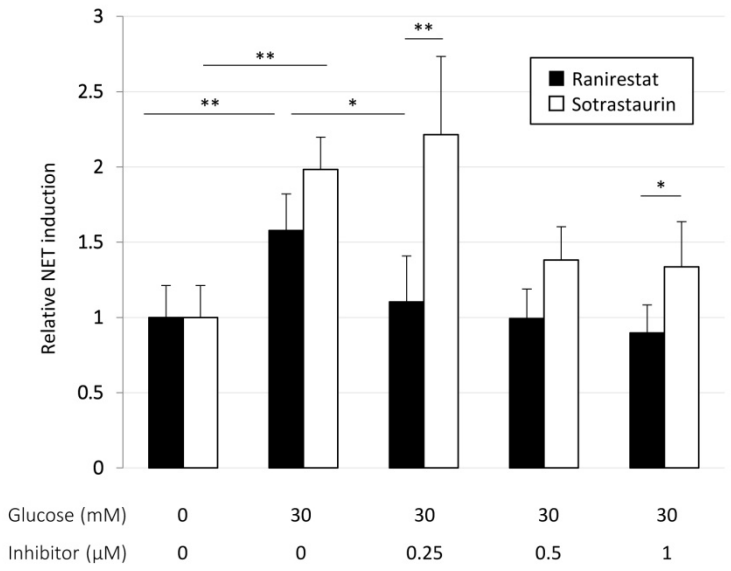



Figure 14. 高濃度グルコースによる NETs 誘導に対するラニレスタットとソトラスタウリンの効果

健常者の好中球を 30 mM のグルコース溶液で 2 時間培養する系に、0.25 μM、0.5 μM、1 μM に調整したラニレスタットまたはソトラスタウリンを添加した。 4%PFA で固定後、DAPI を含む封入剤で封入した。PBS（グルコース：0 mM、阻害剤：0 μM）で培養した時の NETs 量を 1 として、相対表示した。**$p<0.01$, *$p<0.05$。

## 4.5　小括

- ✓ 健常者の好中球を 10 mM 以上のグルコースに曝露することにより、グルコースの濃度依存的に NETs の形成亢進が認められた。
- ✓ 高濃度グルコース下で培養開始後 2 時間以降に NETs の形成が観察された。
- ✓ NETs の形成亢進を誘導する高濃度グルコースと同等の浸透圧に調整したマンニトールの刺激では NETs の形成は亢進しなかった。
- ✓ GLUT から細胞内に取り込まれるが代謝されない 2-DG の刺激では、NETs の形成は亢進しなかった。
- ✓ 高濃度グルコースによる NETs の形成亢進には、ポリオール経路とその下流の de novo DAG 経路における ROS 産生が関与している。

# 5. 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[14]、高血糖が NETs 形成を誘導するという報告がある[9]。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。

本研究において、コントロール良好な 2 型糖尿病患者のうち、その良好なコントロールを維持するのに 3 剤以上の糖尿病治療薬を必要としている群の方が、3 剤未満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、生体内で形成される NETs の量を反映する血清中の MPO-DNA 複合体の量は、患者の罹病期間、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。これらの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[15]、したがって、血清中の MPO-DNA 複合体の量は、コントロール良好な 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や糖尿病患者では、創傷治癒が遅延するという報告があり[16,17]、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[18, 19]。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[20]。本研究により、その効果の一端は、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。

# 6.　総括および結論

① ②　本研究全体から得られた新知見および意義

1. 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。

2. 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りうる。

③ ④　今後の研究展開および課題

1. 今後、ラニレスタットが承認されたのち、糖尿病神経障害がある 2 型糖尿病患者のラニレスタット服用前後での血中 NETs 量を測定し、糖尿病神経障害の改善の程度との相関関係を検討する。また、ラニレスタットの糖尿病微小血管障害抑制効果を検証するため、前向き臨床試験を計画・実施する。

2. 本研究のコントロール良好な 2 型糖尿病患者の血清を用いた実験は、各患者、一回のみの血清採取での検討である。したがって、同一患者での血糖値の変動と血清 NETs 量の関係は不明である。血糖値は食事摂取の影響を受けるため、同一患者で食前の血糖値が低いとき、食後で血糖値が高いときの異なる時点での血清を用いて各々NETs 量を測定し、NETs 高値が食後の高血糖の一時的なものなのか、慢性的なものなのか調べることは今後必要と考えられる。それにより、NETs による微小血管障害の原因が、急性の高血糖状況なのか、慢性の血糖値高値なのか、理解することが可能となる。

# 7.　謝辞

実験・理論・論文作成・発表準備の全般にわたり大変お忙しい中、懇切丁寧にご指導いただいた、石津明洋 教授に感謝申し上げます。

また節目に有用なアドバイスをいただいた、渥美達也 教授、三好秀明 診療准教授、中村昭伸 助教、外丸詩野 准教授にも大変お世話になりました。

大学院の先輩である中沢大悟 先生、志田玄貴 先生には実際の実験の方法などをご指導いただき大変お世話になりました。後輩の楠由宏 先生には有用な文献を教えていただきお世話になりました。

保健科学院大学院生の山田真衣さんには阻害薬を用いた実験で大変お世話になりました。

# 8. 引用文献


1. Liebl, A. et al. Health economic evaluation of type 2 diabetes mellitus. Clin. Med. Insights Endocrinol. Diabetes 8: 13-19, 2015.
2. Roberts, AC. et al. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. Diab. Vasc. Dis. Res. 10: 472-482, 2013.
3. Ohkubo, Y. et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Res. Clin. Pract. 28, 103-117, 1995.
4. Turner, RC. et al. Lessons from UK prospective diabetes study. Diabetes Res. Clin. Pract. 28 (Suppl), S151-157, 1995.
5. Kohner, EM. Microvascular disease: what does the UKPDS tell us about diabetic retinopathy?. Diabet. Med. 25 (Suppl 2), 20-24, 2008.
6. Brinkmann, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303: 1532-1535, 2004.
7. Döring, Y. et al. Footprints of neutrophil extracellular traps as predictors of cardiovascular risk. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 33: 1735-1736, 2013.
8. Rodriguez-Espinosa, O. et al. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. Immunology 145: 213-224, 2015.
9. Menegazzo, L. et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. Acta Diabetol. 52: 407-503, 2015.
10. Kessenbrock, K. et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat. Med. 15, 623-625, 2009.
11. Chen, FQ. et al. Effects of mycophenolate mofetil on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 and fibronectin in high glucose cultured human mesangial cells. Genet. Mol. Res. 13, 3154-3161, 2014.
12. Marcus, RG. et al. Altered renal expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in experimental diabetes mellitus. Am. J. Physiol. 267, F816-824, 1994.
13. Koya, D. et al. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes 47, 859-866, 1998.

14. Joshi, MB. et al. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. F.E.B.S. Lett. 587: 2241-2246, 2013.
15. Pandey, A. et al. Type-2 diabetes: current understanding and future perspectives. I.U.B.M.B. Life 67, 506-513, 2015.
16. Wong, SL. et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. Nat. Med. 2015 (doi:10.1038/nm.3887)
17. Fadini, GP. et al. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans. Diabetes 2016 (pii: db150863)
18. Bril, V. et al. Ranirestat for the management of diabetic sensorimotor polyneuropathy. Diabetes Care 32, 1256-1260, 2009.
19. Giannoukakis, N. Evaluation of ranirestat for the treatment of diabetic neuropathy. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 10, 1051-1059, 2014.
20. Cogan, DG. et al. NIH conference. Aldose reductase and complications of diabetes. Ann. Intern. Med. 101, 82-91, 1984.