

氏名	青木 厚 <small>あおき あつし</small>
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 438 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	2 型糖尿病患者における血管石灰化と動脈硬化：骨代謝マーカーと RBP 4 からの検討
論文審査委員	(委員長) 教授 荻尾 七 臣 (委員) 准教授 安藤 仁 准教授 大須賀 淳 一

論文内容の要旨

本研究は 2 部構成となっている。

第 I 部 頸動脈石灰化と骨代謝マーカーとの関連

第 II 部 2 型糖尿病患者における血管内皮前駆細胞および

レチノール結合蛋白 4 の動態：急性運動負荷

の順番で論じる。

1 研究目的

第 I 部

血管石灰化は骨代謝関連因子の影響を受けるか検討するために本研究を立案した。血管平滑筋細胞は、骨芽細胞様細胞あるいは軟骨細胞様細胞に分化し、骨・軟骨における石灰化過程と類似の機構で血管石灰化を引き起こす。破骨細胞の分化には骨芽細胞上に発現している RANKL と未熟破骨細胞に発現している RANK とのシグナル伝達が必要である。RANKL の decoy receptor として、RANK の活性を抑制するサイトカインとして、Osteoprotegerin(OPG) がクローニングされた。本研究では 2 型糖尿病患者を対象に、血管石灰化と血清 OPG 濃度との関係を検討した。

第 II 部

Retinol-binding protein 4 (RBP4) は、21kDa の蛋白質で主に肝細胞で合成されているが、骨格筋や脂肪細胞でも合成されインスリン抵抗性を表す指標の 1 つである。最近、Kahn らは、ラットでの急性運動負荷による筋由来の RBP4 を調べた。彼らは、対照群と比較して糖尿病ラットでは、筋由来 RBP4 mRNA の発現が亢進するが、運動はこれを修飾することを報告している。同様に我々は、糖尿病患者や虚血性心疾患患者において、急性運動負荷が骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) を速やかに増加させることを見い出した。本研究では、2 型糖尿病患者を対象に急性運動負荷が、血清 RBP 4 値や EPC 数に与える影響を検討した。さらに急性運動負荷によるこれらの反応性が糖尿病腎症の進展により変化するかについても検討した。

2 研究方法

第 I 部

2 型糖尿病患者 124 例 (男性 88 例 女性 36 例, 65.6 ± 8.2 歳) を、血清 OPG、osteocalcin、FGF23、25-hydroxyvitamin D3 の値により四分位に分け、総頸動脈石灰化の有無を評価した。また対象患者を、糖尿病腎症の病期分類に従い分けた場合の骨代謝マーカーならびに血管石灰化の有無を評価した。さらに、血清 OPG と様々な因子との間の単回帰分析や血管石灰化に影響を及ぼす因子を検討するために多変量解析を行った。

第 II 部

2 型糖尿病患者 62 例 (男性 50 例 女性 12 例, 年齢 65.1 ± 8.1 歳) を糖尿病腎症 1 期、糖尿病腎症 2 期から 4 期の 2 群に分けて、最大酸素摂取量に達するまで急性運動負荷をかけた。急性運動負荷前後での血清 RBP4 値、EPC 数を検討した。

3 研究成果

第 I 部

血清 OPG 値によって四分位に分けた場合、最下位群は他 3 群に比べて、有意に総頸動脈石灰化なしの割合が多く、石灰化ありの割合が少ない。一方、最上位群は他 3 群に比べて、有意に総頸動脈石灰化なしの割合が少なく、石灰化ありの割合が多い ($P=0.015$)。血清 osteocalcin、FGF23、25-hydroxyvitamin D3 の値により四分位に分け総頸動脈石灰化の有無を評価したが、有意な関係性は生じなかった。

また対象患者を糖尿病腎症の病期分類に従い分けた場合、血清 FGF23 は腎症 4 期において高値を示した ($P=0.007$)。血清 OPG、osteocalcin、25-hydroxyvitamin D3 は腎症病期において差異はなかった。頸動脈石灰化の有無に関しても、腎症病期とは関連性がなかった。血清 OPG は年齢 ($P<0.0001$)、収縮期血圧 ($P=0.030$)、Ln(adiponectin) ($P=0.001$) と正相関を示し、BMI ($P=0.045$)、Ln(25-hydroxyvitamin D3) ($P=0.001$) と負相関を示した。血管石灰化の有無を従属変数として、年齢、BMI、収縮期血圧、Ln(25-hydroxyvitamin D3)、Ln(adiponectin)、Ln(OPG) を独立変数として、多重ロジスティック回帰分析を行ったところ Ln(adiponectin) と BMI が有意であった。

第 II 部

糖尿病腎症 1 期の群において、最大酸素摂取量に達する急性運動負荷をかけたところ、血清 RBP4 は有意に増加した (負荷前 48.2 ± 4.3 , 負荷後 $54.3 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$ $P=0.0006$)、一方、糖尿病腎症 2-4 期の群においては、血清 RBP4 の変動に影響を与えなかった (負荷前 53.5 ± 3.6 , 負荷後 $52.2 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$ $P=0.57$)。糖尿病腎症 1 期、糖尿病腎症 2 期から 4 期の 2 群に分けて、恒常状態における EPC 数を検討したが、2 群間に差異はなかった (糖尿病腎症 1 期の群 88.9 ± 18.6 , 糖尿病腎症 2-4 期の群 $63.2 \pm 13.4 \text{ cells}/100 \mu\text{l}$, $P=0.259$)。急性運動負荷後両群において、血清 EPC 数は有意に増加した (糖尿病腎症 1 期の群 $P=0.0003$, 糖尿病性腎症 2-4 期の群 $P=0.005$)。また急性運動負荷による血清 RBP4 の変動は、eGFR と正の相関を示した ($r=0.30$, $P=0.018$)。

4 考察

第 I 部

2型糖尿病患者の血管石灰化は、血清 OPG 値との関連が示唆されたが、血清 osteocalcin、FGF23、25-hydroxyvitamin D3 などの骨関連液性因子との関連性はみられなかった。他の骨関連因子がリンや鉄などを介して作用するのに対して、OPG は直接に血管平滑筋の骨芽細胞化に影響を与える。また、FMD は動脈硬化初期の変化として現れる血管内皮機能低下を評価するのに良い指標である。FMD の変化は、血清 OPG 値とは関連がなかった。対象患者 124 例中糖尿病腎症 4 期の症例は 6 例のみで糖尿病腎症が軽度から中等度の患者を対象にしているが、血管石灰化の割合や血清 OPG 値は糖尿病腎症の進展とは関連がない。OPG は動脈硬化や糖尿病腎症の進展とは独立して、血管石灰化に抑制的に作動することが示唆される。

第 II 部

Kahn らは、糖尿病ラットではコントロールラットと比較して、骨格筋での RBP4mRNA の発現が 4 倍亢進していることを、また筋由来 RBP4mRNA の発現が急性運動負荷により増加することを報告した。Kahn らの報告より、急性運動負荷は僅か 8 分の負荷であり、我々の研究で見出した、血清 RBP4 値の上昇は筋由来ではないかと推察される。本研究は、急性運動負荷により血清 RBP4 値が増加することを示した初めての報告であるが、その生理学的、病理学的な役割は未解明のままである。急性運動負荷による筋組織から放出される RBP4 や RBP4 の病態生理学的役割に関して今後の研究で解明する必要がある。

細小血管障害がない、またはわずかに糖尿病腎症がみられる糖尿病患者において、EPC 数は急性運動負荷により有意に増加した。急性運動負荷により誘発される EPC の機序は明らかではないが、急性運動負荷は、骨髄由来の EPC を誘導することにより、血管内皮を修復するものと推測される。

5 結論

第 I 部

2型糖尿病患者において、血清 OPG 値の上昇は血管石灰化に関連がある。OPG の作用は、糖尿病腎症の進展と関わりなく、直接石灰化を抑えることが示唆される。

第 II 部

2型糖尿病患者において急性運動負荷により血清 RBP4 値は腎症のない症例で速やかに増加するが、腎症のある症例では変化がみられなかった。EPC 数は、腎症の有無に関わらず、急性運動負荷により増加した。これらの成績より、急性運動負荷により増加した RBP4 は、糖尿病腎症進展に伴って低減するが、急性運動負荷により増加した EPC 数は、腎症の進展に関わらず保持されることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、2 型糖尿病患者 124 例を対象とした横断研究において、骨代謝に関連する

osteoprotegerin(OPG) のバイオマーカーとしての意義を明らかにした。本研究において、血中 OPG レベルと頸動脈エコーで評価した血管石灰化の有無に関連があることを見出した。さらに、血中 OPG レベルの関連因子として、年齢、血中 25-hydroxyvitamin D3、血中アディポネクチンレベルの 3 因子を明らかにした。これらは、新規性のあるところである。血中 OPG レベルは定量的に頸動脈石灰化に関連しているわけではなく、血中 OPG レベルは他のリスク因子と独立して頸動脈石灰化と関連しているわけでもない。しかし、本研究は、今後、さらに、血中 OPG が個人の動脈硬化の石灰化にどの程度、関わるかを示す縦断研究を行う必要性を示す貴重な研究であると考ええる。

後半の研究では、2 型糖尿病患者において急性運動負荷を行い、血清 Retinol-binding protein 4 (RBP4) 値の変化を検討している。急性運動負荷により、糖尿病性腎症のある群では、血中血管内皮前駆細胞上昇は見られるものの、血中 RBP4 の上昇は抑制されていることを新たに明らかにした。この現象の機序と臨床的意義は、今後の研究にゆだねられる。以上の学位論文内容は、糖尿病患者の臓器障害の進展と非薬物治療の指標となる新規バイオマーカーの臨床的意義を明らかにするものである。一部、統計解析を追加し、結果と結論が異なる点を修正した上で、審査員全員より本研究は学位論文に値すると判断した。

最終試験の結果の要旨

本審査に関する諮問では、血中バイオマーカー上昇の機序と臨床的意義、さらに統計解析に関する質問がなされた。その受け答えは的確であり、本人自身が本研究を主体的に遂行したことが伺えた。その後の審査員の指摘に対する修正も適切であり、十分な学識を有することが伺えた。

以上より、申請者は本学の学位授与に値すると審査員全員により判断した。