

論 文 要 旨

Association between reduced ADAMTS13 and diabetic nephropathy

〔 糖尿病性腎症における ADAMTS13 の低下 〕

谷口 尚大郎

【序論および目的】

ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif, member 13) は VWF を特異的に切断する酵素である。VWF は血小板 α 顆粒、血管内皮細胞の Weibel-Palade 体から「超高分子量」VWF multimer として放出され、ADAMTS13 によって適切なサイズに切断される。VWF の血小板凝集・粘着機能は VWF multimer の size に依存しており、ADAMTS13 は「止血には適切」であるが「病的血栓とはならない」ように VWF multimer size を精妙に制御することにより、血小板血栓形成能を制御している。また、流速の速い微小循環の血管内壁では、ずり応力 (shear stress) により VWF multimer が globular form から extended form へ「ほぐれる」ことより、強く活性化される。微小循環においては、ADAMTS13 の減少により「高分子量」で「ほぐれた」VWF multimer が増加し、血栓傾向が惹起されるが、その代表的な疾患が血栓性血小板減少性紫斑病である。

一方、糖尿病腎症の発症・進展には多くの機序が関与しているが、腎臓内微小循環での凝固異常は糖尿病腎症進展に関与していると考えられており、糖尿病腎症に対する抗血小板療法や抗凝固療法の有効性も報告されている。

ADAMTS13 と糖尿病腎症との関連についてはまだ報告されておらず、本研究では ADAMTS13 と糖尿病腎症の関連を検討した。

【材料および方法】

平和台病院にて 2006 年 1 月から 2008 年 12 月に入院加療を行った 2 型糖尿病患者の中で血栓性疾患、炎症性疾患、肝疾患 (肝硬変)、他の腎疾患を除外した 86 名と、健常人ボランティア 26 名の VWF 抗原、ADAMTS13 抗原を測定し VWF/ADAMTS13 ratio を計算した。これらの値と腎機能 (eGFR [estimated glomerular filtration rate], 尿検査所見) を解析し、細小

血管障害である糖尿病腎症との関連について検討をおこなった。

また、大血管障害との関連を調べるために、VWF 抗原、ADAMTS13 抗原および VWF/ADAMTS13 ratio と頸動脈 IMT との相関についても検討を加えた。

【結果】

健常者と比較し、糖尿病患者では VWF 抗原が有意に高値であったが、ADAMTS13 抗原は有意差を認めなかった。糖尿病患者において、糖尿病腎症悪化 (eGFR 低下) に伴い有意に ADAMTS13 抗原低値、VWF/ADAMTS13 ratio 高値を示したが、VWF は有意な相関を認めなかった。また、尿検査所見により糖尿病患者を 3 群 (尿所見正常群、微量アルブミン尿群、顕性蛋白尿群) に分け、健常者群を加えて検討したところ、全群の中で顕性蛋白尿群のみ有意な ADAMTS13 抗原の低下を認めた。

頸動脈 IMT による検討では、mean IMT 肥厚に伴い有意な ADAMTS13 抗原低値、VWF/ADAMTS13 ratio 高値を認めた。しかし mean IMT と VWF、高感度 CRP には有意な相関を認めなかった。mean IMT を測定した糖尿病患者を eGFR と ADAMTS13 レベルで 4 群に分けると、同じ eGFR グループであっても、ADAMTS13 低値の患者群では mean IMT がより肥厚していた。

【結論および考察】

糖尿病細小血管障害の一つである糖尿病腎症による腎機能の悪化は、ADAMTS13 低値および VWF/ADAMTS13 ratio 高値と関連があることが示された。VWF/ADAMTS13 ratio 高値状態では large size の VWF 増加が推定されるため、検討が可能であった少数例で VWF マルチマー解析を行ったが、有意な変化は確認できなかった。ADAMTS13 の低下は「糖尿病腎症の発症および進展に関与」しているのか、「糖尿病腎症悪化に伴う結果」なのかは、そのメカニズムを含めた更なる検討を要するが、VWF と ADAMTS13 のバランス (VWF/ADAMTS13 ratio) の乱れが糖尿病腎症に関連があることが示唆された。VWF と ADAMTS13 のバランス (VWF/ADAMTS13 ratio) の乱れについては心筋梗塞等で報告されているが、糖尿病腎症については今回の論文が初めてである。

また本研究では、糖尿病大血管障害と ADAMTS13 の関連も示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	686	号	氏名	谷口 尚大郎
審査委員	主査	乾 明夫			
	副査	谷本 昭英		坂本 泰二	

Association between reduced ADAMTS13 and diabetic nephropathy

(糖尿病性腎症における ADAMTS13 の低下)

ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif, member 13) は VWF (Von Willebrand factor) 特異的切断酵素であり、血管内皮細胞の Weibel-Palade body 等から分泌された「超高分子量」の VWF マルチマーを適切なサイズに切断する。VWF の血小板凝集・粘着機能はマルチマーサイズ依存性であることから、ADAMTS13 は「止血には適切」であるが「病的血栓とはならない」ように VWF のマルチマーサイズを精妙に制御することにより、血小板血栓形成能を制御している。一方、糖尿病の細小血管障害である糖尿病性腎症の発症・進展には様々な機序が関与するが、その一つとして腎臓内微小循環における血栓傾向が関与していると考えられている。現在までに VWF/ADAMTS13 依存性血小板血栓が関連した疾患が複数報告されているが、糖尿病性腎症との関連については未だ報告されていない。そこで学位審査者は、健常人と糖尿病患者における VWF および ADAMTS13 を測定、VWF/ADAMTS13 比を計算し、糖尿病性腎症との関連について検討した。また、頸動脈 IMT を大血管障害の指標とし、ADAMTS13 と大血管障害の関連についても検討を加えた。

結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. 健常人群と比較し、糖尿病患者群では VWF が有意に高値、ADAMTS13 は低値傾向となり VWF/ADAMTS13 比が有意に高値を示した。
2. 糖尿病患者群において、糖尿病性腎症に伴う腎機能 (eGFR) 低下患者群では、腎機能良好患者群と比較し有意に ADAMTS13 低値、VWF/ADAMTS13 比高値となった。
3. 糖尿病患者群を尿所見でグループ分けして検討すると、最も糖尿病性腎症が進行している「顕性蛋白尿患者群」のみ ADAMTS13 が有意に低値となった。
4. 頸動脈 IMT を指標として大血管障害との関連を調べると、頸動脈 IMT が肥厚した患者群では ADAMTS13 低値、VWF/ADAMTS13 比が高値となった。腎機能良好患者群の中にも ADAMTS13 が低値を示す患者がおり、それらの患者では頸動脈 IMT が肥厚していた。

今回の結果より、細小血管障害である糖尿病性腎症による腎機能の悪化は、ADAMTS13 低値および VWF/ADAMTS13 比高値と関連があることが示された。糖尿病性腎症において、腎糸球体過剰濾過に伴う「ずり応力」増加は腎臓内の血栓傾向に関与するとされている。一方、ずり応力は VWF の構造を球状構造から伸展構造に変化させ、生物学的活性を強めることが知られている。糖尿病性腎症に伴う腎糸球体内のずり応力増加によって活性の強い「ほぐれた」VWF が増加し、さらに ADAMTS13 低下による VWF マルチマーの高分子量化が加わって VWF の活性がより強まり、腎臓内微小血栓増加を介して糖尿病性腎症を悪化させた可能性がある。腎機能低下とともに VWF/ADAMTS13 比も上昇しており、高分子量の VWF マルチマー増加が示唆される。「ADAMTS13 低下に伴う糖尿病性腎症悪化」とは逆に、「糖尿病性腎症悪化による ADAMTS13 低下」の可能性もあり、本研究の結果からは ADAMTS13 低下が糖尿病性腎症の原因なのか結果なのかを述べることができない。しかし糖尿病性腎症の悪化による ADAMTS13 の低下は個体としては血栓傾向へと向かうと考えられ、糖尿病患者の血栓傾向として重要な意義を持つと考えられる。本研究では ADAMTS13 低下と大血管障害との関連も示唆されており、糖尿病性腎症とともに、更なる大規模な臨床研究やメカニズムの研究が期待される。

本研究は糖尿病性腎症のメカニズムの一つである腎微小循環内血栓傾向について、血小板血栓に重要な役割を果たす VWF と、その活性調節に重要な VWF 特異的切断酵素 ADAMTS13 について検討したものである。学位審査者は、VWF/ADAMTS13 依存性血小板血栓関連疾患として初めて糖尿病性腎症を報告した。糖尿病性腎症による腎内環境と VWF マルチマー構造及び ADAMTS13 の関与の考察、VWF/ADAMTS13 比による VWF マルチマーサイズの推定、糖尿病患者の血栓傾向との関連といった考察も興味深い。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第	686号	氏名	谷口 尚太郎
審査委員	主査	乾 明夫		
	副査	谷本 昭英	坂本 泰二	
<p>主査および副査の3名は、平成22年3月15日、学位請求者 谷口尚太郎 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) VWFがADAMTS13を直接制御するなどの作用はあるか。 (回答) ADAMTS13が血管内皮細胞にあるWeibel-Palade bodyからのVWFの過剰分泌を制御している可能性が報告されている。</p> <p>質問2) 一般的にVWFは糖尿病性網膜症と関連があるが、今回の研究では有意差がなかった。糖尿病性網膜症の客観的な再現性の高い評価法として、臨床研究や薬剤の治験のための重症度分類法(Early Treatment Diabetic Retinopathy study: ETDRS分類)があり、再評価を行ってみたいかどうか。 (回答) 本研究では、福田分類による病期分類を用いて評価を行った。福田分類によって糖尿病性網膜症の有無で分けた検討および単純型網膜症群と増殖型網膜症群で分けた検討を行ったが、本研究ではVWFと糖尿病性網膜症の間に関連を認めなかった。ETDRS分類による再評価については、福田分類からETDRS分類への変換が困難であったため再評価を行うことができなかった。網膜症とADAMTS13の関連については、眼科医と連携してのETDRS分類を用いた再検討が今後の課題であると考えます。</p> <p>質問3) ADAMTS13の基質特異性は、他にどのようなものが証明されているか。 (回答) ADAMTS13の基質は、現時点ではVWFのみであることが報告されている。</p> <p>質問4) ADAMTS13は主に肝星細胞で産生されるが、それ以外に産生している細胞はあるか。 (回答) 最近の報告では、血小板・血管内皮細胞・腎臓ポドサイトで産生されることが報告されている。糖尿病性腎症の進行とおもにポドサイトが脱落することが報告されているため、糖尿病性腎症の進行とともにADAMTS13を産生するポドサイトが減少して腎局所で微小循環が障害され、さらなる腎症悪化が惹起されていることが示唆される。現時点では腎ポドサイトにおけるADAMTS13の生理学的意義は不明とされているが、重要臓器である腎臓局所の微小循環維持に関係している可能性があると考えられる。</p> <p>質問5) ADAMTS13は肝星細胞で産生されるが肝硬変における変化についての報告はあるか。 (回答) 肝硬変の患者ではADAMTS13がchild分類Aで80%程度、Bで60%程度、Cで40%程度に低下していることが報告されている。肝星細胞はDisse腔内にあり、類洞血管内皮細胞の外側に張り付くように存在していることから、肝臓の微小循環調節に重要と考えられている。肝硬変では肝星細胞が線維芽細胞に形質転換してADAMTS13の産生ができなくなり、肝微小循環調節が障害される可能性が報告されている。</p> <p>質問6) ADAMTS13低下は「細小血管障害」と「大血管障害」の両方に関与していると述べているが、両者に共通するメカニズムについて考察が可能か。 (回答) 糖尿病患者において心腎連関のような、細小血管障害と大血管障害をつなぐ因子になる可能性があると考えている。最近ノックアウトマウスの研究で、ADAMTS13が炎症をdown-regulateし、血栓と炎症をリンクさせることが報告された。その論文をふまえて考察すると、大血管障害による内皮細胞障害により慢性的にVWFが上昇してADAMTS13が消費され、その消費にともなうADAMTS13低下によって大血管局所の炎症がさらに悪化するとともに、末梢側の微小循環での血栓傾向および炎症が惹起されて細小血管障害も進展させるかもしれない。今回の研究で糖尿病性腎症の悪化とともにADAMTS13が低下することが分かったため、糖尿病性腎症(細小血管障害)の悪化が大血管障害の悪化につながる可能性もある。また、糖尿病性腎症を持つ患者では「糖尿病の罹病期間」が長いことから、同時に大血管障害も合併していた可能性がある。頸動脈IMTを測定した患者群を4群に分けた検討では、腎機能が同程度であってもADAMTS13低値の患者では頸動脈IMTが肥厚しており、糖尿病性腎症と頸動脈IMTはそれぞれ独立してADAMTS13低下と関連があるのではないかと考えた。</p>				

質問 7) 肝硬変合併の糖尿病は大血管障害が軽いことが報告されている。ADAMTS13 との関連で考察は可能か。

(回答) 肝硬変合併状態では、ADAMTS13 合成が低下する。ADAMTS13 ノックアウトマウスでは接着因子増加などを介して血管内皮細胞上での白血球ローリングが減速して白血球の血管外遊走が起り、炎症成立に重要な役割を果たすことが報告された。ADAMTS13 の減少はむしろ動脈硬化の進展に関係するのではないかと考える。

質問 8) ADAMTS13 は血管内に恒常的に分泌されているか。

(回答) ADAMTS13 の分泌については現在研究が進行中であるが、血管内皮細胞では ADAMTS13 が恒常的に分泌され、血管内皮細胞表面に結合している VWF マルチマーサイズを調整していることが 2009 年に明らかにされた。

質問 9) ADAMTS13 は肝星細胞や腎臓で産生されているが、ADAMTS13 は「局所産生」と「血中への分泌」の各々の意義はあるのか。

(回答) 「局所産生」と「血中への分泌」の意義については、重要な臓器である肝臓や腎臓で「局所産生」することによって効率的に臓器保護をしつつ、「血中への分泌」によって末梢での VWF マルチマーサイズの調整を行うのではないかと考えられる。

質問 10) 糖尿病患者ではかなり早い時期から VWF が増加しているが ADAMTS13 は 100%程度である。

VWF の増加に伴い ADAMTS13 も増加するのではないかと考えられるが、VWF 高値の状態での ADAMTS13 正常値は、どう考えるべきか。

(回答) ADAMTS13 の血中濃度は VWF の 10 分の 1 程度であるため、糖尿病患者での慢性的な VWF 増加に対して、ADAMTS13 の産生が追い付いていない可能性もあるが、今後の検討課題と考える。

質問 11) 糖尿病患者の尿中では ADAMTS13 は検出されなかったようだが、顕性蛋白尿患者の尿中でも検出されなかったか。

(回答) 全症例の尿中 ADAMTS13 は検討していないが、尿所見の正常・微量アルブミン尿・顕性蛋白尿すべての患者群で尿中に ADAMTS13 は検出されなかった。

質問 11) 糖尿病性腎症患者では ADAMTS13 が低下しているが、蛋白制限食や ACE 阻害薬による糖尿病性腎症の治療を行うと ADAMTS13 が変化するなどの報告があるか。

(回答) 糖尿病性腎症と ADAMTS13 の関係については本研究が初めての報告であるので、糖尿病性腎症の治療による ADAMTS13 の変化について述べた報告はまだはないが、本研究期間中に、顕性蛋白尿患者 6 名において、入院中に約 1 ヶ月間の蛋白制限食を行い、その前後での VWF、ADAMTS13、VWF/ADAMTS13 比の変化を検討したが、有意な差は得られなかった。長期間の蛋白制限食や ACE 阻害薬、ARB を用いた場合の変化について今後検討したい。治療という観点では、TTP 患者や脳梗塞患者への recombinant ADAMTS13 の投与が検討されている。閉塞しかかった強い狭窄部位では非常に強いつり応力がかかり、VWF 特異的な血小板血栓が形成される。その状態に対して ADAMTS13 を補充することで、閉塞しかかった血管を特異的に開通させることが可能なのではないかと考えられている。今後、糖尿病性腎症悪化への ADAMTS13 低下の関与が十分に証明されれば、ADAMTS13 補充が糖尿病性腎症治療の選択肢となる可能性がある。

質問 12) ADAMTS13 と年齢は関係があるか。

(回答) 健常人において、ADAMTS13 は年齢とともにわずかに低下することが報告されている。本研究において、腎機能不良の患者群では高齢な方が多かったため、年齢の影響を受けた可能性があるが、糖尿病性腎症の発症には長い罹病期間が必要となるため、腎機能不良の患者群は高齢者が多くなると考えられる。糖尿病患者では、年齢による ADAMTS13 低下がより加速されるのではないかと考えている。

質問 13) 一般的には高感度 CRP と頸動脈 IMT には相関があるが、今回の研究では相関がなかった。対象が糖尿病患者であったため相関が得られなかったのか。

(回答) 高感度 CRP と頸動脈 IMT の間には相関があるのが一般的である。今回の研究では有意な相関は認められなかったが、その理由は不明であった。

質問 14) 糖尿病のモデル動物で、ADAMTS13 の変化や肝星細胞での ADAMTS13 産生などについて検討された研究はあるか。

(回答) 現時点では、糖尿病モデル動物における ADAMTS13 の研究はまだ行われていない。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。