Cilostazol Prevents the Progression of Experimental Diabetic Nephropathy: Beneficial Effects on Glomerular Na-K-ATPase Activity and Glomerular Charge Barrier System

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8521

シロスタゾールの糖尿病性腎症進展抑制効果とその作用機序に関する検討

金沢大学医学部内科学第一講座（主任：小林健一教授）
家　城　恭　彦

シロスタゾール（cilostazol，化学名：6-[4-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl) butoxy]-3, 4-dihydro-2 (1H)-quinolinone）は，cAMP ホスホジエステラーゼを阻害することにより，血小板凝集抑制作用と末梢血管拡張作用を併せ持つ薬剤である．本研究では，同薬剤が糖尿病性腎症の進展に及ぼす影響について，実験糖尿病モデルを用いて検討した．ストレプトゾトシン（streptozotocin, STZ）誘発糖尿病ラットの尿中アルブミン排泄率は糖尿病発症8週以後は正常対照ラットに比し有意に増加した（0.77±0.26 vs. 0.17±0.01μg/min, $p<0.01$）．この増加は，12週間のシロスタゾール経口投与（20mg/kg 体重/day）により有意に抑制された（0.28±0.17μg/min, $p<0.05$）．糖尿病群では腎糸球体 Na-K-ATP アーゼ活性の低下，および腎糸球体基底膜（glomerular basement membrane, GBM）の陰性荷電粒子数の減少が認められた（8.53±0.20 vs. 27.0±4.91μmol/mg 蛋白/hr, $p<0.01$. 4.8±0.36 vs. 7.8±0.42 個/1000nm, $p<0.01$）が，これらの変化もシロスタゾール投与により有意に抑制された（14.5±0.55 μmol/mg 蛋白/hr, $p<0.01$. 7.6±0.45 個/1000nm, $p<0.01$）．腎糸球体 cAMP 含量は非糖尿病群に比し糖尿病群で減少しており（30.1±3.4 vs. 73.3±11.0 fmol/mg 蛋白，$p<0.01$），シロスタゾールにはその減少を抑制する傾向が認められた（37.7±0.42fmol/mg 蛋白，$p=0.827$）．一方，体重，血糖，クレアチニン・クリアランス，および尿中トロンボキサン B_2 と 6-ケト-プロスタグランジン $F_{1\alpha}$ との比には，シロスタゾール投与による変化は認められなかった．以上より，シロスタゾールには Na-K-ATP アーゼ活性の増大，および GBM 陰性荷電障壁破綻の防止を介して糖尿病性腎症の進展を抑制する効果があり，その効果には一部腎糸球体細胞内 cAMP 量の増加が関与している可能性が考えられた．

Key words　diabetic nephropathy, cilostazol, Na-K-ATPase, charge barrier, cAMP

糖尿病性腎症（腎症）は，持続的な高血糖状態によってもたらされる細小血管障害が主に腎糸球体に生ずることにより，徐々に腎機能の低下を来し，慢性の経過の後に腎不全にいたる病変である．その発生機序についてこれまで様々な説が提唱されており，依然として明確な説明は困難な状況にあるが，現在のところ高血糖によって引き起こされる蛋白の非酵素的糖化やポリオール代謝異常が腎糸球体の機能障害，さらには器質的変化をもたらすとする説が有力視されている[1]．すなわち，糸球体基底膜やメサンギウム基質において非酵素的に糖化[2]されたコラーゲンなどの構成蛋白は，蛋白分解酵素による分解を受けにくくなり局所に蓄積しやすくなるため，基底膜の肥厚やメサンギウム領域の拡大を生じ[3]，一方で糖化の進行に伴って産生される活性酸素やラジカルが組織に障害を起こす[4]．また持続する高血糖はメサンギウム細胞内のポリオール代謝経路の亢進をもたらし，同時に細胞内ミオイノシトール含量および Na-K-ATP アーゼ活性の低下を引き起こす[5]結果，メサンギウム細胞の機能障害[6]を惹起して，糸球体過剰濾過[7]やメサンギウム基質の増加，あるいは基底膜の陰性荷電を担うグリコサミノグリカン（glycosaminoglycan）の減少を生じるとするものである[8]．しかし，これらの異常が細胞内のどのような代謝調節系の変化を介して生じているかについては不明な点が多い．

cAMP は細胞内情報伝達系における重要なセカンドメッセンジャーであり，cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素（A キナーゼ）を活性化し，種々の蛋白リン酸化を介することで細胞増殖や蛋白合成などの機能調節を行っている．腎内各部位においてもアデニレート・シクラーゼ系は存在し，中でも糸球体内での cAMP の変化は腎血行動態に影響を及ぼすことが知られている[9][10]．これまで，cAMP と腎症との関連については，棚橋ら[11]がストレプトゾトシン（streptozotocin, STZ）誘発糖尿病ラットの腎皮質における cAMP 含量の低下を，江本ら[12]がインスリン非依存型糖尿病（non-insulin dependent diabetes mellitus）モデルである KK マウスの腎糸球体病変が，cAMP ホスホジエステラーゼ（phosphodiesterase, PDE）の阻害剤であるフタラジノール（phthalazinol）の投与により軽減されたことを報告しており，腎症の進展に cAMP が何らかの関与を有することが推測されるが，この点に関して検討した報告は少ない．

シロスタゾール（cilostazol，化学名：6-[4-(1-cyclohexyl-1H-

平成5年12月8日受付，平成6年1月12日受理

Abbreviations : AER, albumin excretion rate ; BGG, bovine gamma globulins ; BSA, bovine serum albumin ; Ccr, creatinine clearance ; DM, vehicle-treated diabetic rats ; DMC, cilostazol-treated diabetic rats ; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid ; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay ; GBM, glomerular basement membrane ; GFR, glomerular filtration rate ; 6-keto-$PGF_{1\alpha}$, 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$; N, vehicle-treated

tetrazol-5-yl) butoxy]-3, 4-dihydro-2 (1H)-quinolinone) は，図1に示す如くオキソキノリン誘導体の構造を有する cAMP-PDE 阻害剤である．同薬剤は血小板や血管平滑筋細胞内の cAMP 量を増加させることにより血小板凝集抑制作用と末梢血管拡張作用を示すため[13][14]，臨床では主に動脈硬化性疾患に対して用いられている．細小血管症を特徴とする糖尿病性の慢性合併症に関しては，末梢神経障害に対する有効性を述べた報告[15]がわずかに認められるのみで，腎症における検討は見当たらない．そこで今回著者は，腎症の発症・進展におけるアデニレート・シクラーゼ-cAMP-A キナーゼ系の役割について検討することを目的として，STZ 誘発糖尿病ラットにシロスタゾールを投与し，腎症の指標としての尿中アルブミン排泄率 (albumin excretion rate, AER) の経時的変化を調べた．また，腎症進展における関与が推測される腎糸球体の Na-K-ATP アーゼ活性，腎糸球体基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) の陰性荷電，トロンボキサン B_2 (thromboxane B_2, TXB_2) および 6-ケト-プロスタグランジン $F_{1\alpha}$ (6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$) の尿中排泄量などについても，薬剤の投与前後でその変化を検討した．

材料および方法

Ⅰ．試薬類

特に会社名の記載のない各種薬品は，和光純薬 (大阪) の製品を用いた．また，シロスタゾールの原末は，大塚製薬 (東京) より供与を受けた．

Ⅱ．実験動物

8週齢の雄性ウィスター・ラット (体重約 150g) を以下の4群に分けた．

1．糖尿病シロスタゾール投与群 (cilostazol-treated diabetic rats, DMC 群：n=6).

2．糖尿病シロスタゾール非投与群 (vehicle-treated diabetic rats, DM 群：n=6).

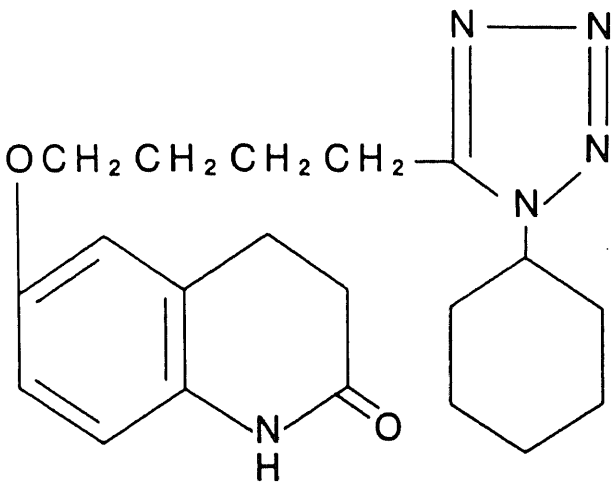


Fig. 1. Chemical structure of cilostazol. It is one of the 2-oxoquinoline derivatives and is a novel specific inhibitor of cAMP phosphodiesterase.

3．非糖尿病シロスタゾール投与群 (cilostazol-treated non-diabetic rats, NC 群：n=6).

4．非糖尿病シロスタゾール非投与群 (vehicle-treated non-diabetic rats, N 群：n=6).

糖尿病群は，上記ラットに 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.6) に溶解した STZ (Sigma, St. Louis, MO, USA) を，エーテル麻酔下に尾静脈より 50mg/kg (0.1ml) 投与して作製した．非糖尿病群には，同量の 0.1M クエン酸緩衝液のみを同じく尾静脈より注射した．また，シロスタゾールは，原末を1％アラビアゴム溶液に一様に懸濁させ，20mg/kg (1.0ml) をラット用経口注入器 (夏目製作所，東京) を用いて，STZ 投与翌日より連日経口投与した．シロスタゾール非投与群には，同量のアラビアゴム溶液のみを同じく経口投与した．すべてのラットはオリエンタル固形飼料 (オリエンタル酵母，東京) で飼育した．

Ⅲ．方　法

1．血糖測定

STZ 投与前，および 4, 8, 12 週後に，以下の方法で随時血糖を測定した．すなわち，午後のほぼ一定時刻に尾静脈より 6μl の血液 (全血) を採取し，グルコースオキシダーゼ法を応用した富士ドライケム100タイプG (富士メディカルシステム，東京) を用いて測定した．

2．採尿

STZ 投与前，および 4, 8, 12 週後に代謝ケージ (夏目製作所) を用い，絶食自由飲水下で24時間の蓄尿を行い，尿量を確認した上で，AER，尿中 TXB_2，尿中 6-keto-$PGF_{1\alpha}$，クレアチニン・クリアランス (creatinine clearance, Ccr) の測定に供した．

3．尿中アルブミンの測定

尿中アルブミンの測定は，酵素結合免疫吸着剤検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法[16]にて行った．まず，96穴マイクロプレート (Costar, Cambridge, MA, USA) に 0.05M 炭酸・重炭酸緩衝液 (carbonate bicarbonate buffer, pH9.78) で 0.25μl/ml に希釈した抗ラット・アルブミンヒツジ IgG (Cappel, Malvern, PA, USA) を室温で90分間固相化した．固相表面に残存する未反応の活性基をブロックするために，1％の牛ガンマグロブリン (フラクションⅡ) (bovine gamma globulins (fraction Ⅱ), BGG, Miles, Naperville, USA) を加えた 0.05% ツィーン-20 (Sigma)/0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.2) (phosphate-buffered saline, PBS, ブロック用緩衝液) で洗浄 (200μl/ウェル，3回) した後，1%BGG/PBS (PBS(G)) で1000倍に希釈した検体 (尿)，あるいは 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000μg/l に希釈したラット・アルブミン (Sigma) を 50μl/ウェルずつ加え，室温で1時間孵置した．0.05%ツィーン-20/PBS (洗浄用緩衝液) で洗浄 (200μl/ウェル，3回) した後，標識抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ラット・アルブミンヒツジ IgG (Cappel) を PBS で 0.25μl/ml に希釈して 50μl/ウェルずつ加え，室温で1時間孵置した．洗浄用緩衝液で再び洗浄 (200μl/ウェル，3回) した後，基質として 0.12%オルトーフェニレンジアミン/0.05M クエン酸緩衝液 (pH4.6) 50ml に過酸化水素水 10μl を加えたものを 100μl/ウェ

non-diabetic rats; NC, cilostazol-treated non-diabetic rats; PBS, phosphate-buffered saline; PDE, phosphodiesterase; PEI, polyethyleneimine; sCr, serum creatinine; STZ, streptozotocin; TCA, trichloroacetic acid; TXB_2, thromboxane B_2; uCr, urinary creatinine

ルずつ加え，遮光下室温で15分間反応させた後，1N 硫酸を50μl/ウェルずつ加えて反応を止め，492nm における吸光度をMTP-22 形マイクロプレート光度計（コロナ電気，茨城）により測定した．ラット・アルブミンの希釈系列より得られた測定値を片対数グラフにプロットして標準曲線を作製し，この曲線から各検体のアルブミン濃度を求め，尿量を乗じて単位時間当りの排泄量（μg/min）で表した．本測定系の変動係数は6.8％以下であった．

4．Ccr の測定

腎血行動態を示す指標として，STZ 投与前，および12週後に Ccr を測定した．すなわち，尾静脈より採取した血液を用いて血清クレアチニン（serum creatinine, sCr）を，上記の方法で得られた尿を用いて尿中クレアチニン（urinary creatinine, uCr）を各々測定し，Ccr (ml/min)＝uCr･V/sCr (V：尿量 (ml)) から求め，体重 (kg) で除して補正した．sCr, uCr は自動分析装置736形（日立，東京）で測定した．

5．尿中 TXB_2, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ の測定

STZ 投与前，および12週後に上記の方法により得られた尿を用い，TXB_2 および 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ の [^{125}I] ラジオイムノアッセイ・キット（デュポン，東京）にて各々測定した．

6．GBM における陰性荷電状態の検討

ポリエチレンイミン (polyethyleneimine, PEI) を利用した Schurer らの方法[17]に従い行った．各群から無作為に3匹ずつ選び，エーテル麻酔下に PEI（分子量 70,000, Polysciences, Warrington, PA, USA）の1.5％溶液（1N 塩酸，生理食塩水により pH7.4, 400mOsm に調整）1.0ml/kg を尾静脈より静注し，15分後に生理食塩水約 50ml で両腎を灌流後摘出，右腎の一部より電顕標本を作製し GBM の陰性荷電を観察した．電顕用の腎組織は，1mm^{2}以下に細切後0.1％グルタルアルデヒド－2％リンタングステン酸溶液にて前固定し，1時間後 0.1M カコジル酸緩衝液にて30分間（10分間，3回）洗浄した．Epon (Epok) 812 に包埋後，ウルトラマイクロトームにて超薄切片を作製し，酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を10分間行い，電子顕微鏡 H-600（日立，東京）を用いて GBM の荷電を示す PEI 染色顆粒を観察した．すなわち，各ラットの超薄切片から GBM5視野を各々1万5千倍で撮影した写真を作製し，GBM 1000nm 当りの PEI 染色顆粒数を数え，無作為に選んだ10視野の平均値で表した．

7．腎糸球体 Na-K-ATPアーゼ活性の測定

Na-K-ATPアーゼ活性の測定は，Cohen らの方法[18]に準じて行った．すなわち，ステンレス製メッシュ（孔径：63, 150, 250μl，飯田製作所，大阪）を用いたふるい分け法により摘出腎から糸球体を単離し，10mM Tris-HCl (pH7.4) 2ml を加えたものを，Na-K-ATPアーゼ活性測定用の 20μl を2本 (A, B) と蛋白測定用の 1ml にそれぞれ分注した．Aには 60mM 塩化ナトリウム，5mM 塩化カリウム，2mM 塩化マグネシウム，2mM ATP（オリエンタル酵母），0.1mM エチレンジアミン四酢酸 (etylenediaminetetraacetic acid, EDTA，半井，京都）を含む 100mM Tris-HCl (pH7.4) を，Bには 1mM ウアバイン (Aldrich, Milwaukee, MO, USA), 2mM 塩化マグネシウム，2mM ATP 0.1mM EDTA を含む 100mM Tris-HCl (pH7.4) を 2ml ずつ加え，37℃で30分間孵置後，氷冷した 10％ (W/V) トリクロル酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 0.5ml を加えて反応を止め，遠心 (3000rpm, 10min, 4℃) により得られた上清 (1.5ml) 中に放出された無機リンを以下の方法で測定した．すなわち，上記の上清 1.5ml に発色試薬（1％ モリブデン酸アンモニウム（第一，東京）/1.15N 硫酸溶液 10ml に硫酸第一鉄 400mg を加えたもの）1.5ml を加えて攪拌し，25℃の水浴中に10分間保った後，700nm の吸光度を測定した．標準曲線用として，リン酸カリウム 13.6mg を 10mM Tris-HCl (pH7.4) 1ml に溶解して 100μmol/ml とし，さらに同緩衝液を用いて100倍希釈を行い，その後は2倍希釈を繰り返して希釈系列を作った．このようにして測定したAおよびBの無機リンの差を単位蛋白重量当りの値 (μmol/mg/hr) として表し，求める Na-K-ATP アーゼ活性とした．なお，本測定系の変動係数は8.9％以下であった．

8．蛋白の定量

蛋白定量は，Lowry 法[19]に準じ以下の手順で行った．すなわち，先に分注しておいた沈渣に，2％炭酸ナトリウム/0.1N 水酸化ナトリウムと0.5％硫酸銅5水和物/1％酒石酸ナトリウムを 50:1 に混合したものを 2ml 加えて室温で20分間放置，さらにフェノール試薬をイオン交換水で2倍に希釈したものを 0.2ml 加えて室温で30分間放置し，750nm における吸光度を測定し求めた．標準曲線用として牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma) を 10mM Tris-HCl (pH7.4) で 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640μg/ml に希釈して用いた．

9．腎糸球体細胞内 cAMP 量の測定

前述の単離糸球体を約10倍量（重量）の6％ TCA (2～8℃) 中で懸濁化した後内容をガラス試験管に移し，2000g, 2～8℃ で15分間遠心した．得られた上清に5倍量（容積）の水飽和エーテルを加え，振盪後エーテル層を吸引除去する操作を4回繰り返し，得られた抽出液を凍結乾燥し，その試料中の cAMP 量を cAMP [^{125}I] アッセイシステム（アマシャム・ジャパン，東京）を用いて測定し，糸球体重量当りの放射活性で表した．

Ⅳ．統計学的検討

測定値はすべて平均±標準誤差で表し，平均値の差の検定は2群間では対応のない t-検定を用い，3群間以上では一元配置分散分析後 Scheffé の多重比較法を用いて行った．また，2群間の相関，回帰分析は Pearson の相関係数，回帰分析を用いて検討した．危険率5％未満を有意差ありとした．

成　　績

Ⅰ．体重の変化

体重は非糖尿病群では順調に増加する一方，糖尿病群では増加速度は低下しており，12週後には糖尿病群で 374.7±17.7g (n＝12) と，非糖尿病群の 574.0±17.3g (n＝12) に比して有意に低値であった ($p<0.01$，図2)．シロスタゾールの投与により，非糖尿病，糖尿病両群ともに有意な変化は認められなかった（図3）．

Ⅱ．随時血糖の変化

随時血糖は，糖尿病群では STZ 投与4週以降高値を取り続ける一方，非糖尿病群では変化なく，12週後糖尿病群で 484.0±25.9mg/dl (n＝12) と，非糖尿病群の 161.8±6.34mg/dl (n＝12) に比して有意に高値であった ($p<0.01$，図4)．シロスタゾールの投与による変化は体重と同様認められなかった（図5）．

Ⅲ．AER の変化

AER は STZ 投与後糖尿病群において経時的に増加し，糖尿

病発症後8週以降は非糖尿病群に比して有意に高値であった ($p<0.01$, 図6). 12週後の AER は, DM 群で 0.77±0.26μg/min (n=6) と, N群の 0.17±0.01μg/min (n=6) に比して有意な増加を示した ($p<0.05$). DMC 群では 0.28±0.17μg/min (n=6) であり, シロスタゾールの投与によりその増加は有意に抑制された ($p<0.05$, 図7).

Ⅳ. 腎糸球体 Na-K-ATP アーゼ活性の変化

腎糸球体 Na-K-ATP アーゼ活性は, DM 群では 8.53±0.20 μmol/mg 蛋白/hr (n=6) とN群の 27.0±4.91μmol/mg 蛋白/hr (n=6) に比して有意に低下した ($p<0.01$). DMC 群では 14.5±0.55μmol/mg 蛋白/hr (n=7) であり, シロスタゾールの投与によりその低下が有意に抑制された ($p<0.01$, 図8). N, NC 群各6匹, DM, DMC 群各5匹を対象に AER と Na-K-ATP アーゼとの関係について検討したところ, 両者の間に相関係数 r=−0.543 の有意な負の相関関係が認められた (図9).

Ⅴ. Ccr の変化

Ccr は DM 群 3.71±0.27ml/min/kg (n=6), N群 3.71±0.24ml/min/kg (n=6) と両群間で有意差は認められず, シロスタゾールの投与によっても非糖尿病, 糖尿病両群ともに変化しなかった.

Ⅵ. 尿中 TXB_2 および 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ の変化

尿中 TXB_2 は DM 群で 7.05±0.80ng/24hr (n=6) と, N群の

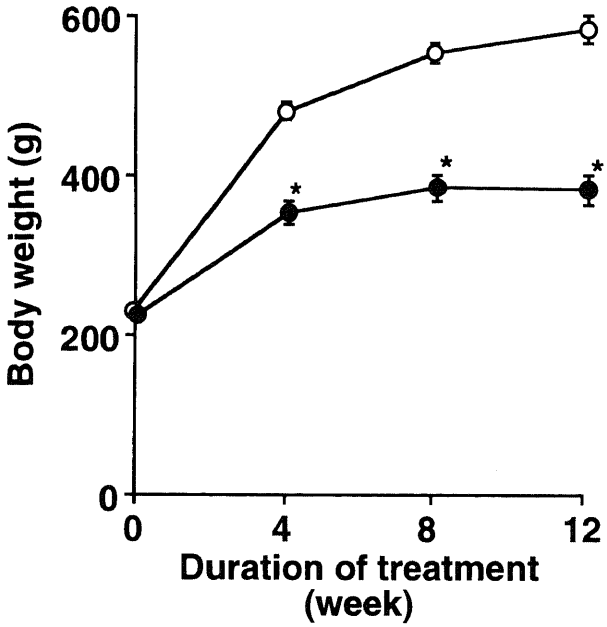


Fig. 2. Serial changes of body weight in diabetic (●, n=12) and non-diabetic (○, n=12) rats. Values are expressed as mean±SEM. *$p<0.01$ vs. non-diabetic rats by unpaired t-test.

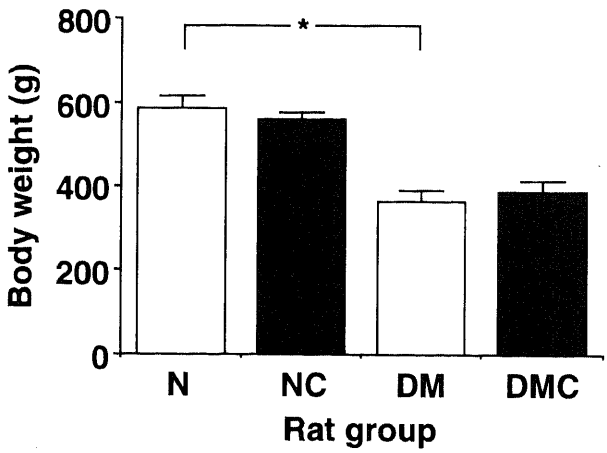


Fig. 3. Body weitht at 12th week in vehicle-treated non-diabetic (N, n=6), cilostazol-treated non-diabetic (NC, n=6), vehicle-treated diabetic (DM, n=6), and cilostazol-treated diabetic (DMC, n=6) rats. Values are expressed as mean±SEM. *$p<0.05$. NS, not significant by one-way ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

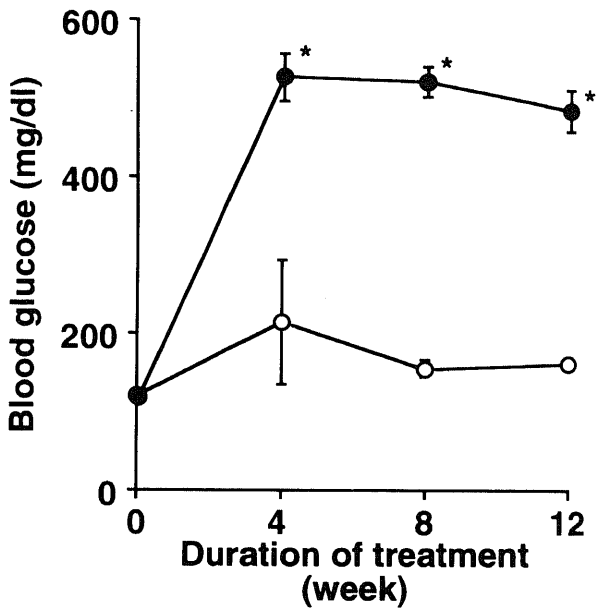


Fig. 4. Serial changes of blood glucose in diabetic (●, n=12) and non-diabetic (○, n=12) rats. Values are expressed as mean±SEM. *$p<0.01$ vs. non-diabetic rats by unpaired t-test.

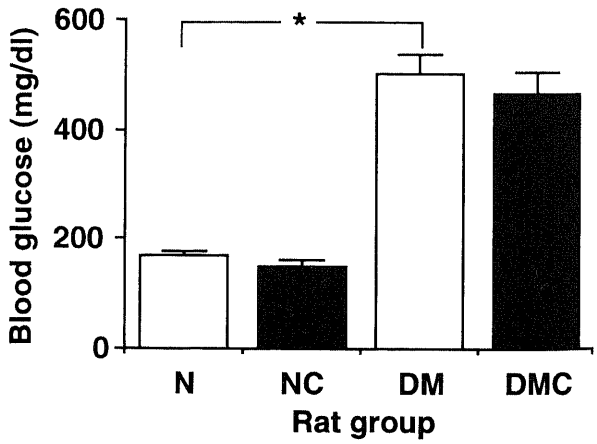


Fig. 5. Blood glucose at 12th week in vehicle-treated non-diabetic (N, n=6), cilostazol-treated non-diabetic (NC, n=6), vehicle-treated diabetic (DM, n=6), and cilostazol-treated diabetic (DMC, n=6) rats. Values are expressed as mean±SEM. *$p<0.05$. NS, not significant by one-way ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

3.73±0.52ng/24hr (n=6) に比して有意に増加していた (p<0.01, 図 11A). また, 尿中 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ は DM 群で 21.7±4.20ng/24hr (n=6) と, N群の 12.4±2.46ng/24hr (n=6) に比して増加する傾向が認められた (図 11B). しかし, いずれもシロスタゾールの投与により有意な変化は認められなかった. 相反する作用を有する両者の比 (TXB_2/6-keto-$PGF_{1\alpha}$) をとってみたが, DM 群 0.42±0.06 (n=6), N 群 0.35±0.06 (n=6) と両群間で有意差はなく, シロスタゾールの投与によっても変化しなかった (図 11C).

Ⅶ. 腎糸球体細胞内cAMP の変化

腎糸球体細胞内の cAMP 量は, DM 群で 30.1±3.4fmol/mg 蛋白 (n=3) と, N群の 73.3±11.0fmol/mg 蛋白 (n=3) に

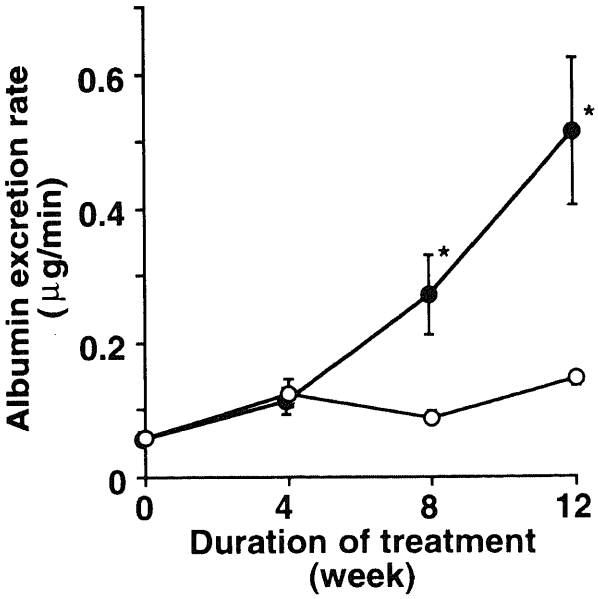


Fig. 6. Serial changes of albumin excretion rate in diabetic (●, n=12) and non-diabetic (○, n=12) rats. Values are expressed as mean±SEM. *p<0.01 vs. non-diabetic rats by unpaired t-test.

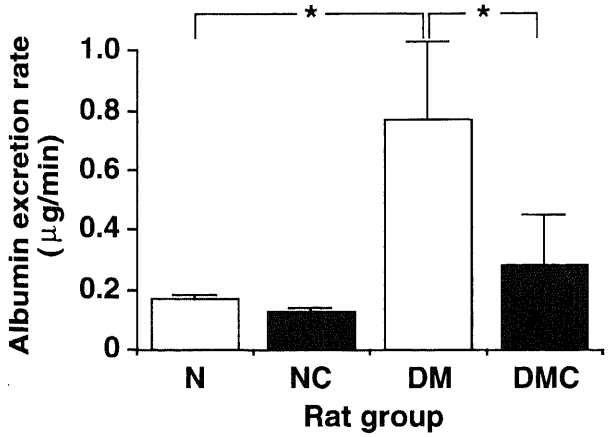


Fig. 7. Albumin excretion rate at 12th week in vehicle-treated non-diabetic (N, n=6), cilostazol-treated non-diabetic (NC, n=6), vehicle-treated cilostazol-diabetic (DM, n=6), and cilostazol-treated diabetic (DMC, n=6) rats. Values are expressed as mean±SEM. *p<0.05. NS, not significant by one-way ANOVA with Scheffé's mulitiple comparison.

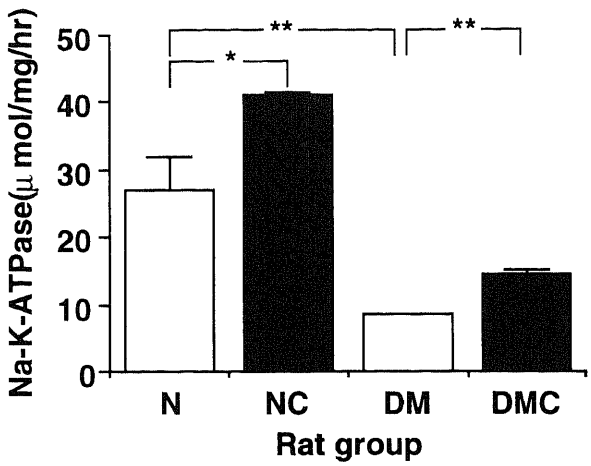


Fig. 8. Glomerular Na-K-ATPase activity at 12th week in vehicle-treated non-diabetic (N, n=6), cilostazol-treated non-diabetic (NC, n=6), vehicle-treated diabetic (DM, n=6), and cilostazol-treated diabetic (DMC, n=6) rats. Values are expressed as mean±SEM. **p<0.01. *p<0.05 by one-way ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

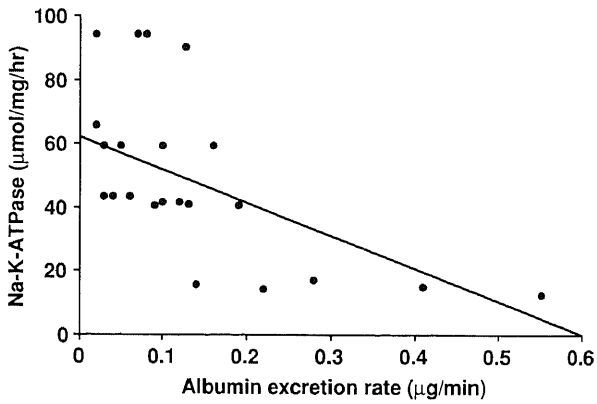


Fig. 9. Correlation between urinary albumin excretion rate and glomerular Na-K-ATPase activity at 12th week in diabetic and non-diabetic rats. Solid line shows the regression line (y=−113.35x+62.375, r=−0.543, p<0.01, n=22).

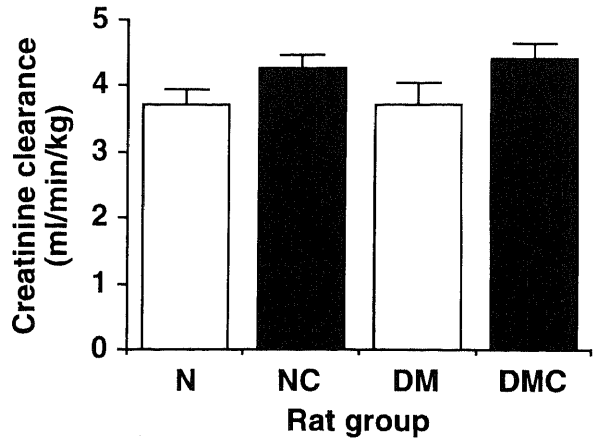


Fig. 10. Creatinine clearance at 12th week in vehicle-treated non-diabetic (N, n=6), cilostazol-treated non-diabetic (NC, n=6), vehicle-treated diabetic (DM, n=6), and cilostazol-treated diabetic (DMC, n=6) rats. Values are expressed as mean±SEM. NS, not significant by one-way ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

比して有意に低下していた ($p<0.05$) が，DMC 群では 37.7±0.42fmol/mg 蛋白 (n=3) と，有意ではないもののシロスタゾール投与によりその低下が抑制される傾向が認められた．

Ⅶ．GBM における陰性荷電状態の変化

各群の GBM の電顕像を図13に示す．Cに示す DM 群では，形態学的に足突起の癒合傾向が認められ，GBM 単位長さ当りの PEI 染色顆粒（矢印）数も 4.8±0.36 個/1000nmp (n=3) と，Aに示すN群の 7.8±0.42 個/1000nm (n=3) に比して有意に減少していた ($p<0.01$) が，Dに示す DMC 群では 7.6±0.45 個/1000nm (n=3) と，シロスタゾールの投与によりその減少が有意に抑制された ($p<0.01$，表1)．

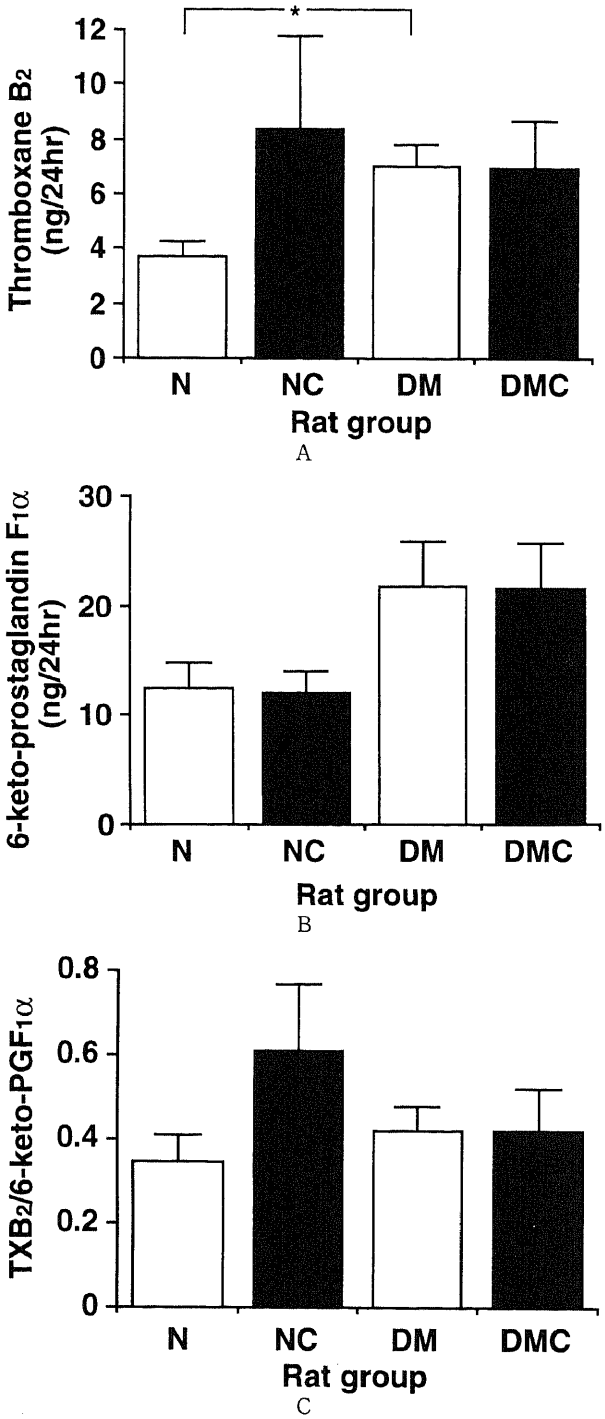


Fig. 11. Urinary excretion of thromboxane B_2 (TXB_2) (A), 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-$PGF_{1\alpha}$) (B), and the ratio of TXB_2 to 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (C) at 12th week in vehicle-treated non-diabetic (N, n=6), cilostazol-treated non-diabetic (NC, n=6), vehicle-treated diabetic (DM, n=6), and cilostazol-treated diabetic (DMC, n=6) rats. Values are expressed as mean±SEM. *$p<0.05$. NS, not significant by one-way ANOVA with Scheffé's mulitiple comparison.

考　　察

STZ 誘発糖尿病ラットは，腎糸球体基底膜の肥厚[20]，尿中アルブミン排泄の増加[21]，腎糸球体 Na-K-ATPアーゼ活性の低下[18]，腎糸球体基底膜の陰性荷電密度減少[22]など，ヒトの糖尿病性腎症に共通する多くの異常を示すことより，実験腎症モデルとして多くの検討がなされてきた．本研究で用いたラットでも，糖尿病発症8週以降は尿中アルブミン排泄の増加を示し，12週後には腎糸球体 Na-K-ATPアーゼ活性の低下と糸球体基底膜の陰性荷電密度の減少を認め，腎症モデルとして適しているものと考えられた．興味深いことに，シロスタゾール投与はこれらの異常を全て軽減した．すなわちシロスタゾールには，非投与群で認められた尿中アルブミン排泄増加を64%，Na-K-ATPアーゼ活性低下や陰性荷電密度の減少をそれぞれ32%，93%軽減する効果が認められ，同薬剤には実験腎症の進行を予防する作用があることが示された．また今回の結果は，腎症の発症・進展に重要な役割を担うとされる糸球体 Na-K-ATPアーゼ活性や糸球体基底膜の陰性荷電状態が相互に関連性を有し，シロスタゾールにより影響される共通した因子による調節を受けている可能性を示唆している．

Na-K-ATPアーゼはあらゆる組織の細胞膜に存在し，Na^+ を細胞外に汲み出し，K^+ を細胞内に汲み入れることで細胞内外の濃度勾配を作り，細胞の機能維持に関与している[23]．高血糖下では，グルコースによる競合的阻害やポリオール代謝亢進によるソルビトール蓄積のため，細胞内へのミオイノシトール取り込みが減少し，その結果ミオイノシトールを基質とする細胞膜イノシトールリン脂質の合成，代謝が損なわれるため

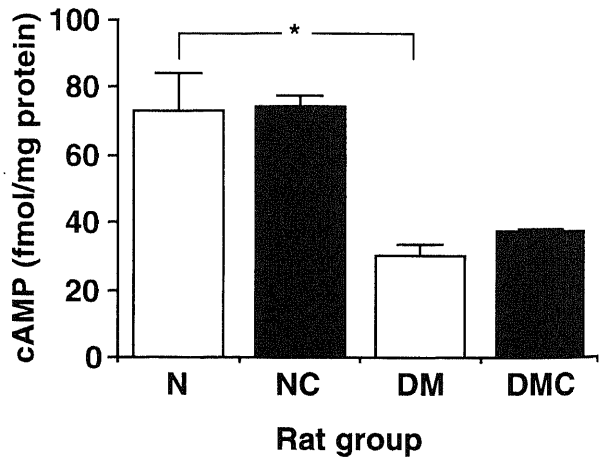


Fig. 12. Glomerular cAMP contents at 12th week in vehicle-treated non-diabetic (N, n=3), cilostazol-treated non-diabetic (NC, n=3), vehicle-treated diabetic (DM, n=3), and cilostazol-treated diabetic (DMC, n=3) rats. Values are expressed as mean±SEM. *$p<0.05$. NS, not significant by one-way ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

Na-K-ATPアーゼ活性の低下が起こるが，Na-K-ATPアーゼはミオイノシトールの細胞内への取り込みにも関与しているため，同活性の低下はさらに細胞内ミオイノシトールの減少を引き起こし，その結果細胞の機能障害をきたし，最終的に慢性合併症に至るとするのがポリオール・ミオイノシトール代謝異常説である[5]．しかし，高血糖により生じるNa-K-ATPアーゼ活性低下などの代謝異常が，どのような機序で尿中アルブミン排泄の増加を結果としてもたらすのかについては不明な点が多い．これまで，糖尿病ラットの腎糸球体におけるNa-K-ATPアーゼ活性の低下を示した報告[18]でも，尿中アルブミン排泄率との関係は示されていなかった．今回の結果で，Na-K-ATPアーゼ活性と尿中アルブミン排泄率との間に統計学的に有意な負の相関関係が認められたことは，腎症の発症・進展におけるNa-K-ATPアーゼ活性低下の重要性を示唆している．

Table 1. Number of polyethyleneimine (PEI) particles per 1000nm glomerular basement membrane at 12th week

Rat group	Number of animals	Number of PEI particles (mean±SEM/1000nm)
N	3	7.8±0.42
NC	3	7.7±0.35
DM	3	4.8±0.36*
DMC	3	7.6±0.45**

*p<0.01, vs. N, **p<0.01, vs. DM. by one-way ANOVA with Scheffé's multiple comparison.

では，シロスタゾールはどのような機序でNa-K-ATPアーゼ活性の低下を抑制したのであろうか．Garnerら[24]は，高血糖下ではNa-K-ATPアーゼ自身が糖化を受けるために活性が低下することを報告しているが，シロスタゾールは血糖値に影響を及ぼさなかったことより，糖代謝の改善を介した同活性上昇の可能性は否定的である．糖尿病性神経障害の研究において，Sonobeら[25]はアデニレート・シクラーゼを活性化してcAMPを上昇させるプロスタグランジンE_1のアナログにより，糖尿病ラット坐骨神経のNa-K-ATPアーゼ活性が高められたことを報告し，Aキナーゼ系によるNa-K-ATPアーゼ調節の可能性を推測している．またShindoら[15]は，シロスタゾールにより糖尿病ラット坐骨神経のcAMP量が増加し，その結果Na-K-ATPアーゼ活性の上昇と神経伝導速度の改善が認められたことを報告している．したがって，腎糸球体においてもシロスタゾールによるcAMP量増加がNa-K-ATPアーゼ活性上昇をもたらす可能性が考えられたが，今回の検討ではシロスタゾール投与群において糸球体cAMPの上昇傾向は認めるものの有意ではなかった．測定上あるいは統計処理上の問題で有意

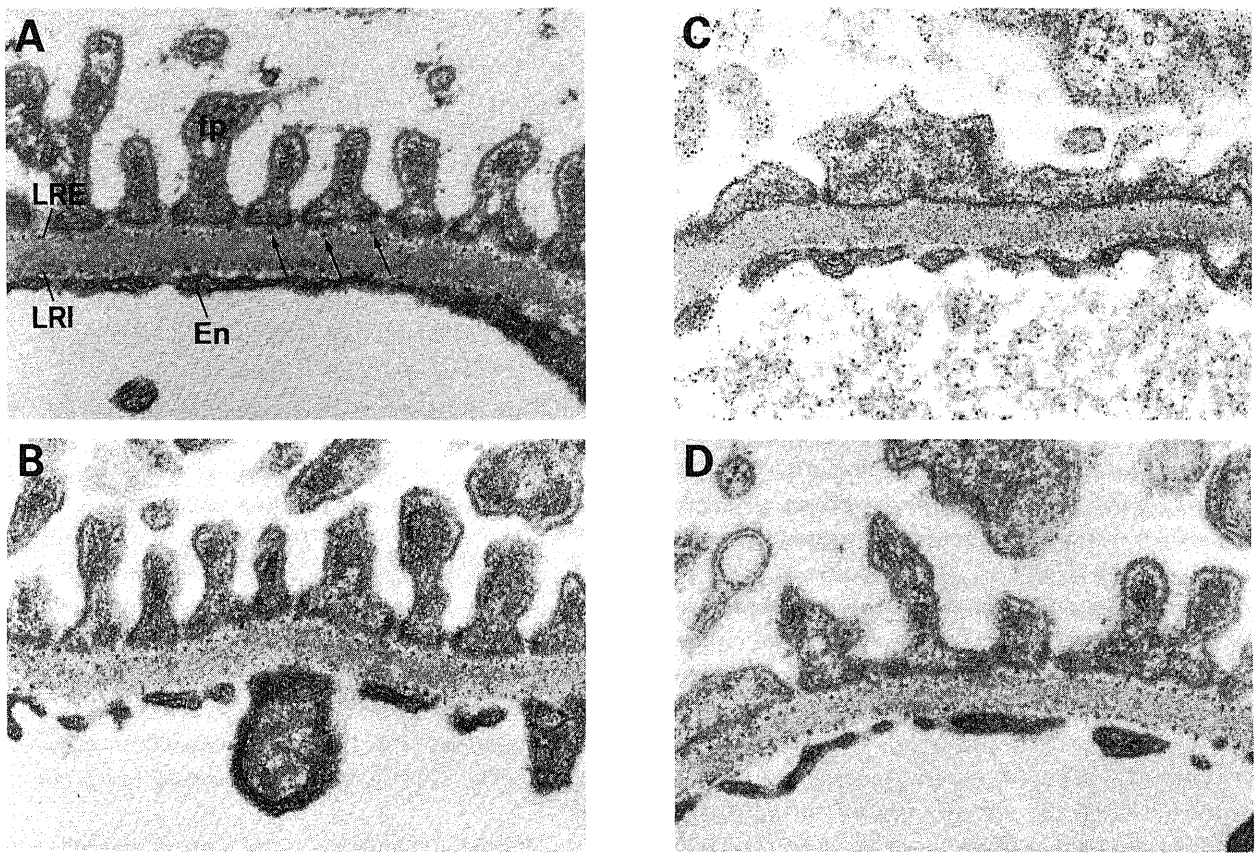


Fig. 13. Electron micrographs of polyethyleneimine (PEI)-stained glomerular basement membrane at 12th week of vehicle-treated non-diabetic (A), cilostazol-treated non-diabetic (B), vehicle-treated diabetic (C), and cilostazol-treated diabetic (D) kidneys (×15,000). (A) PEI particles (arrows) are distributed at regular intervals along the lamina rara interna (LRI) and externa (LRE). (B) Administration of cilostazol makes no differance in concentration of PEI particles in non-diabetic kidneys. (C) PEI particles in the diabetic kidneys are diffusely reduced along the LRE and LRI. (D) Administration of cilostazol prevents the reduction of PEI particles significantly in diabetic kidneys. En, endothelium ; fp, foot processes.

差が出なかった可能性も考えられるが，一方ではAキナーゼ系以外の経路による Na-K-ATPアーゼ活性調節の存在も考慮する必要があるのかも知れない．Greene ら[26]は，アロキサン誘発糖尿病ウサギの坐骨神経を用いた検討で，低下した Na-K-ATPアーゼ活性がプロテインキナーゼC (protein kinase C) のアゴニストであるホルボールエステル (phorbol ester) やジアシルグリセロール (diacylglycerol) の投与により正常化したと報告している．また Kato ら[27]は，Aキナーゼ系がホスファチジールイノシトール・キナーゼ (phosphatidylinositol kinase) の活性化を介し，イノシトール三リン酸 (inositol 1, 4, 5-trisphosphate) およびジアシルグリセロールを増加させ，結果としてCキナーゼ系を活性化することを，さらに Anderson ら[28]は培養腎 LLC-PK_1 細胞において，cAMP によるプロテインキナーゼCの活性化を証明している．今後，Aキナーゼ系のみならずCキナーゼ系に対するシロスタゾールの影響も検討する必要がある．

糸球体基底膜を構成するヘパラン硫酸 (heparan sulfate) は，陰性荷電物質としてシアル酸などとともに腎における荷電障壁を形成し，基底膜の透過性に重要な役割を演じている[29]が，腎症においてはその減少が認められるため，陰性に荷電したアルブミンが尿中に漏出するものと理解されている[8]．ヘパラン硫酸減少の原因としては STZ 糖尿病マウスにおいて産生の低下が報告されている[30]．本研究においてシロスタゾールには陰性荷電の減少を予防する効果が認められたが，Nagase ら[31]は同じ cAMP-PDE 阻害剤で蛋白尿抑制効果を有するジピリダモールの投与により，アミノヌクレオシド腎症モデルラットの GBM における陰性荷電の減少が抑制されたことを報告しており，今回の結果を支持するものとして注目される．また，腎糸球体 Na-K-ATPアーゼ活性と糸球体基底膜の陰性荷電状態との関連性について調べた検討は著者が知る限りなく，今回同一の実験系でそれぞれの異常が同時期に認められたことは，両者の成因の上での関連性を示唆するものとして興味深い．Na-K-ATPアーゼ活性低下で示される腎糸球体細胞の機能低下状態の一つの現れとして，ヘパラン硫酸産生低下による陰性荷電の減少が生じているとする説明も可能かと思われるが，詳細な機序については今後の検討が必要である．

シロスタゾールには，血中 6-keto-$PGF_{1\alpha}$の増加作用，及び血中 TXB_2 の減少作用が確認されており[32]，今回もそれらを介した腎症への効果が期待されたが，いずれも尿中排泄量でみる限りシロスタゾール投与による変化は認められなかった．Ccr にも有意な変化は認められなかったことから，少なくとも今回の検討では腎血行動態への影響は少なかったと考えられる．実際，STZ 誘発糖尿病ラットにおける微小穿刺法を用いた腎内血行動態の検討では発症直後（数日）から糸球体濾過率 (glomerular filtration rate, GFR)，腎血漿流量，単一ネフロン GFR，毛細血管内圧の上昇が見られるが[33]，重症糖尿病ラットでは GFR はかえって減少するという結果が得られている[7]．今回用いたラットの糖尿病の程度は，随時血糖 484.0±25.9mg/dl から明らかに重症と考えられ，しかも発症後12週経過していることも考慮すると，すでに糸球体過剰濾過の時期が終了していたために Ccr に有意差を認めなかったものと考えられる．また，イヌの各種動脈に対するシロスタゾールの血流増加作用は，大腿動脈や椎骨動脈などでは濃度依存性に強く現れるのに対し，腎動脈ではほとんど認められていない[14]ことから，少なくとも太い血管レベルでの腎血行動態への影響は少ないと考えられる．しかし，さらに細いレベルの血管である輸入，輸出細動脈に及ぼす影響に関しては未だ検討がなされていないため，シロスタゾールが糸球体過剰濾過を改善するか否かは不明である．

いずれにせよ，今回認められたシロスタゾールの実験腎症進展抑制効果は同薬剤が臨床の場においても腎症の治療薬として有効かも知れないとの期待を抱かせるものである．今後，作用機序に関するより詳細な検討に加え，臨床応用についても考慮する価値があると思われる．

結　論

STZ 誘発糖尿病ラットを用いて，cAMP-PDE 阻害剤シロスタゾールの腎症進展抑制効果とその作用機序を検討し，以下の結論を得た．

1．AER は非糖尿病群に比し糖尿病群で有意に増加したが，シロスタゾールはその増加を有意に抑制した．

2．腎糸球体 Na-K-ATPアーゼ活性は，非糖尿病群に比し糖尿病群で有意に低下したが，シロスタゾールはその低下を有意に抑制した．

3．GBM の PEI 染色顆粒数は，非糖尿病群に比し糖尿病群で有意に減少したが，シロスタゾールはその減少を有意に抑制した．

4．腎糸球体細胞内の cAMP 量は，非糖尿病群に比し糖尿病群で有意に減少したが，シロスタゾールにはその減少を抑制する傾向が認められた．

5．尿中 TXB_2 は非糖尿病群に比し糖尿病群で有意に上昇し，6-keto-$PGF_{1\alpha}$ も糖尿病群で上昇傾向が認められたが，Ccr や TXB_2/6-keto-$PGF_{1\alpha}$ には有意な変化は認められず，シロスタゾールによっても変化しなかった．

6．以上の結果より，シロスタゾールは腎症進展抑制効果を有すると考えられる．その作用機序として，腎糸球体 Na-K-ATPアーゼ活性の低下抑制による糸球体細胞機能の維持，および GBM の陰性荷電減少抑制による荷電障壁破綻の軽減が示唆された．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します．また，終始直接の御指導を賜りました宮腰久嗣博士ならびに大沢謙三博士に心から感謝いたします．さらに，本研究遂行に多大な御協力を戴きました金沢大学医学部第一内科第一研究室の諸先生方に深く感謝の意を表します．

なお，本論文の要旨の一部は，第34回日本糖尿病学会総会 (1991年，山形)，および第9回国際内分泌学会 (1992年，ニース) において発表した．

文　献

1） **Reddi, A. S. & Camerini-Davalos, R. A.**: Diabetic nephropathy. An update. Arch. Intern. Med., **150**, 31-43 (1990).

2） **Brownlee, M., Cerami, A. & Vlassara, H.**: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N. Engl. J. Med., **318**, 1315-1321 (1988).

3） **Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, H.**: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic

complications. Ann. Int. Med., **101**, 527-537 (1984).

4) **Hunt, J. V., Dean, R. T. & Wolff, S. P.**: Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. Biochem. J., **256**, 205-212 (1988).

5) **Greene, D. A., Lattimer, S. A. & Sima, A. A. F.**: Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. N. Engl. J. Med., **316**, 599-606 (1987).

6) **Kikkawa, R., Kitamura, E., Fujiwara, Y., Arimura, T., Haneda, M. & Shigeta, Y.**: Impaired contractile responsiveness of diabetic glomeruli to angiotensin Ⅱ: A possible indication of mesangial dysfunction in diabetes mellitus. Biochem. Biophys. Res. Comm., **136**, 1185-1190 (1986).

7) **Hostetter, T. H., Troy, J. L. & Brenner, B. M.**: Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. Kidney Int., **19**, 410-415 (1981).

8) **Shimomura, H. & Spiro, R. G.**: Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteo-glycan and laminin. Diabetes, **36**, 374-381 (1987).

9) **Schor, N., Ichikawa, I. & Brenner, B. M.**: Mechanism of action of various hormones and vasoactive substances on glomerular ultrafiltration in the rat. Kidney Int., **20**, 442-451 (1981).

10) **Mene, P. & Dunn, M.**: Eicosanoids and control of mesangial cell contraction. Circ. Res., **62**, 916-925 (1988).

11) **棚橋 忍, 梶沼 宏, 葛谷信貞**：ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける血中 cAMP 濃度と尿中 cAMP 排泄量の関係. 日本内分泌学会雑誌, **55**, 481 (1979).

12) **江本正直, 白川博史, 松谷秀俊, 伊藤 博, 宮村 敬, 西村正彦**：KK マウスの腎糸球体病変に対する Cyclic AMP Phosphodiestrase Inhibitor-Phthalazinol (EG 626)-投与の影響について. 現代医療, **12**, 1477-1481 (1980).

13) **Kimura, Y., Tani, T., Kanbe, T. & Watanabe, K.**: Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Drug Res., **35**, 1144-1149 (1985).

14) **Kawamura, K., Watanabe, K. & Kimura, Y.**: Effect of cilostazol, a new antithrombotic drug, on cerebral circulation. Drug Res., **35**, 1149-1154 (1985).

15) **Shindo, H., Tawata, M. & Onaya, T.**: Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate enhances sodium, potassium-adenosine triphosphatase activity in the sciatic nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. Endocrinol., **132**, 510-516 (1993).

16) **Fielding, B. A., Price, D. A. & Houlton, C. A.**: Enzyme immunoassay for urinary albumin. Clin. Chem., **29**, 355-357 (1983).

17) **Schurer, J. W., Kalicharan, D., Hoedemaeker, P. J. & Molenaar, I.**: The use of polyethyleneimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and collagen fibrils. J. Histchem. Cytochem., **26**, 688-689 (1978).

18) **Cohen, M. P., Dasmahapatra, A. & Shapiro, E.**: Reduced glomerular sodium/potassium adenosine triphosphatase activity in acute streptozocin diabetes and its prevention by oral sorbinil. Diabetes, **34**, 1071-1074 (1985).

19) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

20) **Cohen, M. P. & Klein, C. V.**: Glomerulopathy in rats with streptozotocin diabetes. Accumulation of glomerular basement membrane analogous to human diabetic nephropathy. J. Exp. Med., **149**, 623-631 (1979).

21) **Anderson, S., Rennke, H. G., Garcia, D. L. & Brenner, B. M.**: Short and long term effects of antihypertensive therapy in the diabetic rat. Kidney Int., **36**, 526-536 (1989).

22) **Cohen, M. P. & Surma, M. L.**: ^{35}S-sulfate incorporation into glomerular basement membrane glycosaminoglycans is decreased in experimental diabetes. J. Lab. Clin, Med., **98**, 715-722 (1981).

23) **Horisberger, J. D., Lemas, V., Kraehenbuhl, J. P. & Rossier, B. C.**: Structure-function relationship of Na-K-ATPase. Annu. Rev. Physiol., **53**, 565-584 (1991).

24) **Garner, M. H., Bahador, Z. & Sachs, G.**: Nonenzymatic glycation of Na-K-ATPase. Effects of ATP hydrolysis and K^+ occlusion. J. Biol. Chem., **265**, 15058-15066 (1990).

25) **Sonobe, M., Yasuda, H., Hisanaga, T., Maeda, K., Yamashita, M., Kawabata, T., Kikkawa, R., Taniguchi, Y. & Shigeta, Y.**: Amelioration of Na-K-ATPase activity independently of myo-inositol level by PGE_1 analogue OP-1206·α-CD in streptozocin-induced diabetic rats. Diabetes, **40**, 726-730 (1991).

26) **Greene, D. A. & Lattimer, S. A.**: Protein kinase C agonists acutely normalize decreased ouabain-inhibitable respiration in diabetic rabbit nerve. Implications for Na-K-ATPase regulation and diabetic complications. Diabetes, **35**, 242-245 (1986).

27) **Kato, H., Uno, I., Ishikawa, T. & Takenawa, T.**: Activation of phosphatidylinositol kinase and phosphatidylinositol-4-phosphate kinase by cAMP in saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., **264**, 3116-3121 (1989).

28) **Anderson, R. J. & Breckon, R.**: cAMP stimulates protein kinase C activity in cultured renal LLC-PK_1 cells. Am. J. Physiol., **261**, F945-950 (1991).

29) **Kanwar, Y. S. & Farquhar, M. G.**: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1303-1307 (1979).

30) **Rohrbach, D. H., Wagner, C. W., Star, V. L., Martin, G. R., Brown, K. S. & Yoon, J. W.**: Reduced synthesis of basement membrane heparan sulfate proteoglycan in streptozotocin-induced diabetic mice. J. Biol. Chem., **258**, 11672-11677 (1983).

31) **Nagase, M., Kumagai, H. & Honda, N.**: Suppression of proteinuria by dipyridamole in rats with aminonucleoside

nephropathy. Renal Physiol., 7, 218-226 (1984).
32) 永川祐三，小貫陽子，折茂 肇，原澤道美：シロスタゾール (OPC-13013) のアラキドン酸代謝に及ぼす影響．薬理と治療，14, 279-284 (1986).
33) Hostetter, T. H., Troy, J. L. & Brenner, B. M.: Glomerular dynamics in rats with diabetes mellitus. Proc. Am. Soc. Nephrol., 11th Annual Meeting, Kidney Int., 121-136 (1978).

Cilostazol Prevents the Progression of Experimental Diabetic Nephropathy: Beneficial Effects on Glomerular Na-K-ATPase Activity and Glomerular Charge Barrier System

Yasuhiko Ieki, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **103**, 163－172 (1994)

Key words diabetic nephropathy, cilostazol, Na-K-ATPase, charge barrier, cAMP

Abstract

Cilostazol, cAMP phosphodiesterase inhibitor, was given to streptozotocin-induced diabetic rats to examine its effect on the progression of experimental diabetic nephropathy. At 12th week after the onset of diabetes, the urinary albumin excretion rate (AER) was markedly increased compared with non-diabetic controls (0.77 ± 0.26 vs. $0.17\pm0.01\,\mu$g/min, $p<0.01$). Administration of cilostazol (20 mg/kg body wt/day, p.o.) significantly prevented the increase in AER in diabetic rats ($0.28\pm0.17\,\mu$g/min, $p<0.05$). Glomerular Na-K-ATPase activity and the density of anionic sites on the glomerular basement membrane (GBM) were significantly reduced in diabetic rats compared with controls (8.53 ± 0.20 vs. $27.0\pm4.91\,\mu$mol/mg protein/hr, $p<0.01$. 4.8 ± 0.36 vs. 7.8 ± 0.42/1000 nm, $p<0.01$), and these reductions were also prevented by cilostazol ($14.5\pm0.55\,\mu$ mol/mg protein/hr, $p<0.01$. 7.6 ± 0.45/1000 nm, $p<0.01$). Glomerular cAMP contents were reduced in diabetics (30.1 ± 3.4 vs. 73.3 ± 11.0 fmol/mg protein, $p<0.01$), and this reduction was only marginally prevented by cilostazol (37.7 ± 0.42 fmol/mg protein). Cilostazol had no effect on body weight, blood glucose level, creatinine clearance, and the ratio of urinary thromboxane B_2 to 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$. These results suggest that cilostazol prevents the progression of experimental diabetic nephropathy by enhancement of glomerular Na-K-ATPase activity and by restoration of the charge barrier system on GBM. The increase in glomerular cAMP contents may partially contribute to these effects.