
糖化最終産物の血管透過性と 内皮細胞間接着に及ぼす影響

研究課題番号：10672158

平成10年度～平成11年度
科学研究費補助金 基盤研究 (C)(2)
研究成果報告書
平成12年3月

研究代表者 村木 篁
(東京女子医科大学・医学部・教授)



はしがき

糖尿病の合併症の成因の一つとして、高血糖状態で非酵素的に生成される最終糖化産物（AGE）の生体内での蓄積が注目されている。本研究では、糖尿病での血管障害のメカニズムを明らかにする目的で、AGEとの関連性に注目しながら以下の3項目について研究した。

- I) ストレプトゾトシン糖尿病マウスを用いて、いくつかの起炎物質による皮膚血管透過性亢進作用を正常マウスと比較した。
- II) 蛋白の糖化産物の、炎症性細胞の機能に与える影響について、培養細胞を用いて研究した。
- III) AGEのプラスミノゲン活性化抑制因子(PAI-1)mRNA遺伝子発現への影響を培養ラット白色脂肪細胞を用いて研究した。

研究組織

研究代表者：村木 篁（東京女子医科大学・医学部・教授）

研究分担者：藤井恵美子（東京女子医科大学・医学部・助教授）

研究分担者：入江かをる（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究経費

平成10年度	2700千円
平成11年度	1100千円
計	3800千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Emiko FUJII, Toshimasa YOSHIOKA, Keiji WADA, Hiroyasu ISHIDA, Kaoru IRIE & Takamura MURAKI
Microvascular permeability change induced by platelet-activating factor is impaired in diabetic mice
Microvascular Res, 58, 74-78 (1999)
2. Emiko FUJII, Keiji WADA, Hiroyasu ISHIDA, Toshimasa YOSHIOKA & Takamura MURAKI
Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin
Europ J Pharmacol, 377, 219-222 (1999)
3. 藤井恵美子、村木 篁
エンドトキシンおよびリポタイコ酸によるマウス皮膚炎症反応の比較
臨床薬理、29 (1・2), 137-138 (1998)
4. 藤井恵美子、和田圭司、村木 篁
エンドトキシン前処置によって惹起されるマウス皮膚血管透過性抑制作用
炎症, 18 (4), 301-304 (1998)
5. Emiko FUJII, Toshimasa YOSHIOKA, Hiroyasu ISHIDA, Kaoru IRIE & Takamura MURAKI
Evaluation of iNOS-dependent and independent mechanisms of the microvascular permeability change induced by lipopolysaccharide
Br J Pharmacol 印刷中

(2) 口頭発表

1. 石田浩康、藤井恵美子、入江かをる、吉岡俊正、村木 篁
ONO-4007 (Lipid A analog) によるマウス皮膚血管透過性亢進作用における各種炎症
メディエーター
第100回日本薬理学会関東部会 1999.6.5 日薬理誌
2. 藤井恵美子、和田圭司、石田浩康、村木 篁
アラキドン酸によるマウス皮膚血管透過性亢進作用
第19回日本炎症学会 1998.9.4 予稿集 p149
3. 藤井恵美子、和田圭司、石田浩康、吉岡俊正、村木 篁
エンドトキシン投与24時間後におけるマウス皮膚血管透過性亢進作用と内因性 NO
第4回日本エンドトキシン研究会 1998.9.25 抄録集 p30
4. Takamura MURAKI, Emiko FUJII, Keiji WADA & Toshimasa YOSHIOKA
Impaired response of dermal microvessels to platelet activating factor (PAF) in streptozotocin-
diabetic mice, IUPHAR 13th International Congress of Pharmacology 1998.7.26-31
Naunyn-Schimid Arch Pharmacol 358 (1) (Suppl 2) R552 (1998)
5. Emiko FUJII, Keiji WADA, Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA, Ikuko URAKAWA &
Takamura MURAKI
Inhibition by adenosine 3', 5' cyclic monophosphate (cAMP) of lipopolysaccharide (LPS)-
induced increase in mouse dermal microvascular permeability
IUPHAR 13th International Congress of Pharmacology 1998.7.26-31 Naunyn-Schimid
Arch Pharmacol 358 (1) (Suppl 2) R737 (1998)

(3) 出版物

1. 藤井恵美子、村木 篁
エンドトキシン研究1、基礎と臨床「エンドトキシンによる血管透過性亢進に対す
るトレランス」
日本エンドトキシン学会 編 pp228① 155-159 菜根出版 東京 (1998)

I) ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病マウスにおける、各種起炎物質による皮膚血管透過性亢進作用の研究

【緒言】

種々起炎物質をマウス背部皮下に注射すると、前もって静脈内投与しておいた色素の漏出がおこる。我々は、この色素漏出を炎症反応の指標として、炎症のメカニズムを、内因性一酸化窒素 (NO) およびプロスタグランディンの関与等について研究して来た。

本研究では、STZ糖尿病マウスにおける、セロトニン (5-HT)、ヒスタミン、PAF (血小板活性化因子)、サブスタンスP、およびブラジキニンによる色素漏出を計測し、正常マウスの場合と比較した。また、PAFについては、STZ糖尿病マウスにおける血管透過性亢進抑制のメカニズムについてより詳しく研究した。

【方法】

1. 動物

ddY系 5 週齢雄性マウスを購入後、恒温恒湿下 (22±2°C、55±5%)、6:00-20:00 照明の条件下、固形飼料と水は自由に摂取させて飼育し、1 週間後、実験に供した。

2. 実験糖尿病マウスの作成

ストレプトゾトシン (STZ) 170 mg/kg体重腹腔内投与 2 週間後に実験した。対照には、溶媒のクエン酸緩衝液 (pH 4.7) を投与した。

3. マウス皮膚血管透過性測定法

ポンタミンスカイブルー (PSB) 50 mg/kg の尾静脈内投与 5 分後に各起炎物質をそれぞれ 0.1 ml/site 背部皮下に投与し、1 時間後に頸椎脱臼により屠殺し、投与部位の背部皮膚を切り取り、色素をアセトンで抽出後比色定量した。

【結果】

1. 生理食塩水背部皮下注射による色素漏出量

生理食塩水 0.1 ml 背部皮下注射 5、30、60 分後の注射部位の色素漏出量は STZ 群で減少傾向を示した (表 1)。

2. 各種起炎物質による血管透過性亢進作用

5-HT 0.1 µg/site、ヒスタミン 1 µg/site、PAF 0.1 µg/site、サブスタンスP 1.35 µg/site およびブラジキニン 50 µg/site 皮下注射 1 時間後の色素漏出量を STZ 投与動物と対照群とで比較した。5-HT による色素漏出量は STZ 投与動物で有意に増加したが、ヒスタミン、PAF およびサブスタンスP による色素漏出量は STZ 投与動物で有意に減少した。またブラジキニンでは、有意な変化は認められなかった (表 2)。

表 I-1. STZ-糖尿病マウスにおける生理食塩水背部皮下投与による血管透過性

	Dye leakage ($\mu\text{g/g}$ wet weight)		
	Time (min)		
	5	30	60
control	7.9 \pm 1.5	9.3 \pm 1.0	15.0 \pm 1.3
STZ	4.0 \pm 1.2	8.0 \pm 1.0	9.6 \pm 2.0

ポントアミンスカイブルー (PSB) 静注 5 分後に生理食塩水 0.1ml/site 背部皮下に投与し、5、30、60分後の注射部位の皮下に漏出した色素量を測定した。平均値 \pm 標準誤差 (n=5)

表 I-2. STZ-糖尿病マウスの各種起炎物質による血管透過性亢進作用

Mediators	Δ Dye leakage ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	
	STZ	
	-	+
5-HT	30.0 \pm 2.0	42.0 \pm 1.5 *
Hist	55.0 \pm 4.5	38.7 \pm 0.5 *
PAF	59.2 \pm 4.0	32.0 \pm 5.1 *
Sub P	47.5 \pm 3.0	21.5 \pm 3.2 *
BK	31.5 \pm 2.8	34.3 \pm 3.5

PSB 静注 5 分後に各種起炎物質を 0.1ml/site 背部皮下に投与し、60分後の注射部位の色素漏出量を測定した。* P<0.01 vs. STZ (-)

3. PAF による血管透過性亢進作用 (Microvascular Res. 58: 74-78, 1999)

【考察】

STZ 投与動物での炎症反応は、起炎物質により増強、減弱あるいは不変と異なる反応結果が得られた。なぜ異なる反応性を示すのかは不明であるが、各起炎物質による炎症反応の機序が明らかになれば、原因究明に繋がると考える。

II) 血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の機能におよぼす糖化産物の影響

【緒言】

高血糖状態で非酵素的に生成される蛋白の糖化産物が、糖尿病における合併症の成因の一つと考えられている。研究 (I) で、STZ 糖尿動物では起炎物質による皮下血管透過性亢進に異常が見られたので、細小血管の構成成分である内皮細胞、平滑筋細胞について研究を行った。本研究では、糖化の初期産物である 3-デオキシグルコソン (3-DG)、および最終糖化産物 (AGE) の、(1) 培養血管内皮細胞を用いたアルブミンの透過性、(2) 白血球の血管内皮細胞との接着反応、(3) 平滑筋細胞の migration、(4) 内皮細胞および平滑筋細胞の一酸化窒素 (NO) 合成能および (5) 糖化コラーゲンコート培養細胞に及ぼす影響について研究した。

【方法】

1. 細胞培養

ウシ頸動脈内皮細胞 (BCAEC) は、剥離法により単離し、10% 正常仔ウシ血清 (NCS) と抗菌剤 (ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml) を含む DMEM 培地で培養し、8-15 継代目の細胞を用いた。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は、酵素法 (トリプシン) により単離し、ECGS (endothelial cell growth supplement) 30 µg/ml、ヘパリン 50 µg/ml、抗菌剤および 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む M199 培地でコラーゲンコートした培養皿に培養し、2-5 継代目の細胞を用いた。

ラット頸動脈平滑筋細胞 (SMC) は移植片培養法で単離した細胞を、東京女子医科大学内分泌内科学教室の吉本貴宣助手より譲り受け、10% NCS と抗菌剤を含む DMEM 培地で培養し、8-15 継代目の細胞を用いた。

ヒト臍帯静脈内皮由来細胞 (ECV304) は、10% NCS と抗菌剤を含む DMEM 培地で培養した。

ヒト単球由来の U-937 細胞は、10% FBS と抗菌剤を含む RPMI 1640 培地で培養した。

2. 蛋白の糖化産物

3-DG は東京女子医科大学化学教室の堀川博朗助教授より供与された。

AGE-BSA は 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) 2 ml 中に、0.5 M グルコース-6-リン酸 (G-6-P)、BSA (ウシ血清アルブミン) 100 mg、1 M アジ化ナトリウム 12 µl を加えて 37 °C の暗所で 4 週間放置後、PBS(-) で透析したものをを用いた。G-6-P を除いて同様に処理した BSA を対照として用いた。AGE-BSA は褐色を呈し、ex360/em450 の蛍光強度の増加により AGE 化を確認した。

ヒト血清アルブミンの糖化産物 (GHSA) は、シグマより購入した。

3. アルブミンの透過性

BCAEC 3×10^4 cells/0.1 ml を 24 穴培養皿に置いたコスター社のトランスウェル (#3470、ポリエステル膜、ポアサイズ 0.4 µm) の上室に播き、下室には培地を 0.6

mlを加えて細胞を通常培地で培養した。2および4日後に培地交換をし、4日後(十分なタイトジャンクションが形成された頃)には培地交換と同時に上室に薬物を加えた。薬物添加48時間後、次の方法でアルブミンの透過性を測定した。トランスウェルをハンクス平衡塩(HBSS)で2回洗浄後、下室にはHBSS 0.6 mlを、上室にはトリパンプルー-BSA液(HBSS 1ml中にトリパンプルー 1.8 mg、BSA 20 mgを溶解) 0.1 mlを加えて、下室に漏れ出るトリパンプルー-BSAを経時的にOD 590 nmで比色定量した。

4. 白血球の血管内皮細胞との接着反応

血管内皮細胞は48穴培養皿に播種し通常培地で培養し、コンフルエントになった後0.5% FBS入り培地に変え(図II-8では10%のまま)、薬物(AGE-BSA 0.3、1 mg/ml、TNF- α 10 ng/ml他、詳細は図の脚注を参照)を一定時間作用させ、その後、U-937との接着反応を次のように測定した。U-937 5×10^6 cells/ml (U-937用の培地)にBCECF-AM(蛍光色素; 同仁化学)を3 μ l加えて37°C、30分インキュベートして蛍光色素を取り込ませる。その後内皮細胞用のM199培地(0.5%血清)に変えて2回洗浄後、 5×10^5 cells/mlに調整し、0.25 ml/wellを先の薬物処理後の内皮細胞に加え37°C、1時間インキュベートする。その後M199培地で2回、さらにPBS(+)で1回洗浄後、1% Triton X-100で溶解し、PBSで希釈、ex 490 nm/em 520 nmの蛍光強度を測定した。

5. 平滑筋細胞の migration

SMC 3×10^4 cells/0.1 ml (NCS 1%を含むDMEM培地)を24穴培養皿に置いたコスター社のトランスウェル(#3472、ポリエステル膜、ポアサイズ3 μ m)の上室に播き、下室には各薬物を含んだ培地(NCS(-)、DMEM)を0.6ml入れて20時間培養した。20時間後、上室の底面の細胞を、先端をカットしたピペットチップで擦って除き(下室側に移動した細胞は膜の下室面に残る)、トランスウェルはPBS(+)で洗浄した。この細胞の付着したトランスウェルをメタノールで固定後、ギムザ染色し顕微鏡で観察し、下室側に移動した細胞数を数えた。

6. BCAECおよびSMCのNO産生能に対する(1) GHSAおよび(2) AGE-Collagen コートの効果

(1) 細胞を48穴培養皿に 5×10^4 cells/wellで播種し2日後、コンフルエントになった時、フェノールレッド(-)、10% NCSの培地に変えて薬物を20時間作用させ、上清中のnitrite+nitrate量をケイマン社のNitrite/Nitrate Assay Kitにより測定した。

(2) 96穴のコラーゲンコート培養皿(Iwaki)に、PBS(-)、2-200 mMグルコース、0.5-50 mM G-6-Pまたは0.5-50 mM F-6-P(各糖はPBS(-)に溶解した)を200 μ l各wellに満たして暗所で6週間37°Cでインキュベートし、コラーゲンを糖化させた。各wellから溶液を除き乾燥させ、細胞を培養した。 2×10^4 cells/wellで播種して2日後、10% NCS入り培地に薬物を添加し20時間作用させた。培地をフェノールレッド(-)、NCS(-)に変えて10 μ M DAF-2(第一化学薬品)、1 mM アルギニン存在下で2時間培養した。この間に生成されるNOにより変化したDAF-2Tの蛍光強度(ex 495 nm/em 515 nm)を測定した。

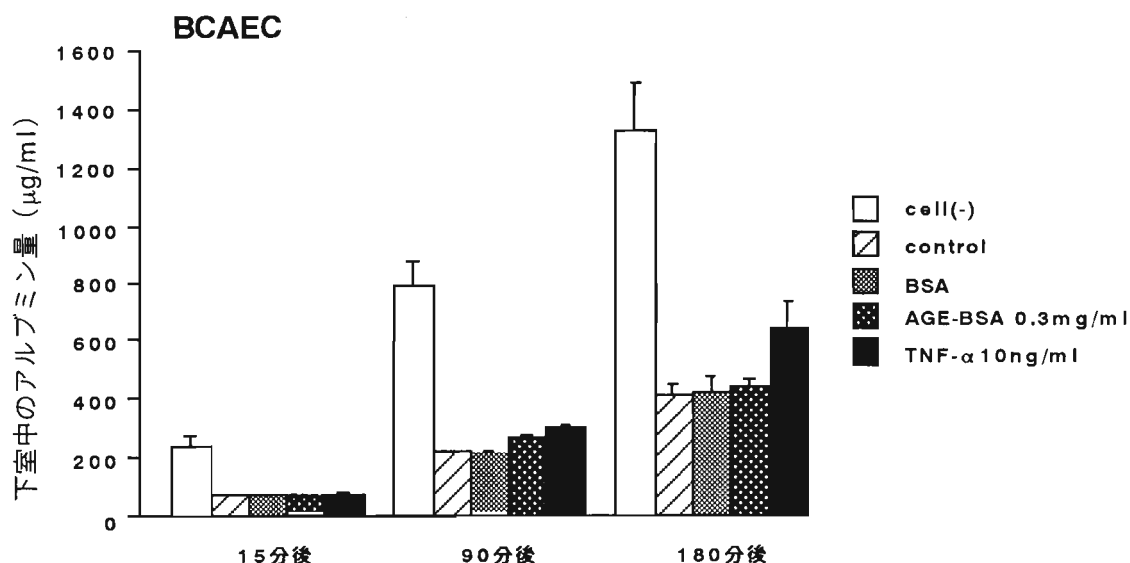
【結果】

1. AGE-BSA の生成

上記の方法で生成した AGE-BSA の蛍光強度 (ex360/em450) は、対照の BSA のみで 4 週間インキュベートしたものは 31(F.I.) だったのに対し、G-6-P を加えた方では 525 (F.I.) であった。この蛍光強度の著しい増加から、BSA の AGE 化が推測された。

2. アルブミンの透過性

図 II-1 に示す通り、細胞のないシートに比べ、細胞を培養したシートではアルブミンの透過性が著しく抑制されており、タイトジャンクションが形成されていることを示した。TNF- α 48 時間前処置では、アルブミンの透過性は増加傾向を示したが、AGE-BSA 前処置では BSA 対照群との間に差は認められなかった。薬物の処理時間を 16 時間に変えても同様であった。

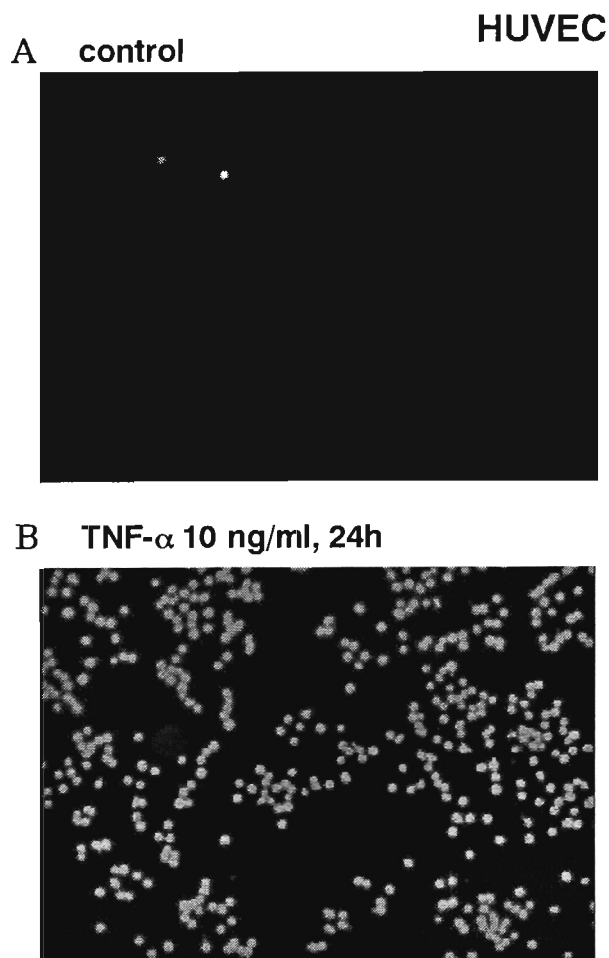


図II-1 ウシ頸動脈内皮細胞 (BCAEC) のアルブミンの透過性に及ぼす AGE-BSA、TNF- α 前処置の影響。BCAEC をトランスウェル (コスター社) にシート状に培養し、十分なタイトジャンクションが形成された状態で、上室から下室へのアルブミンの透過性を調べた。縦軸は、薬物を上室に添加し48時間作用させた後、上室にアルブミン・トルイジンブルーを加えて、15、90、180分後の下室中のアルブミン量を示す。n = 6。

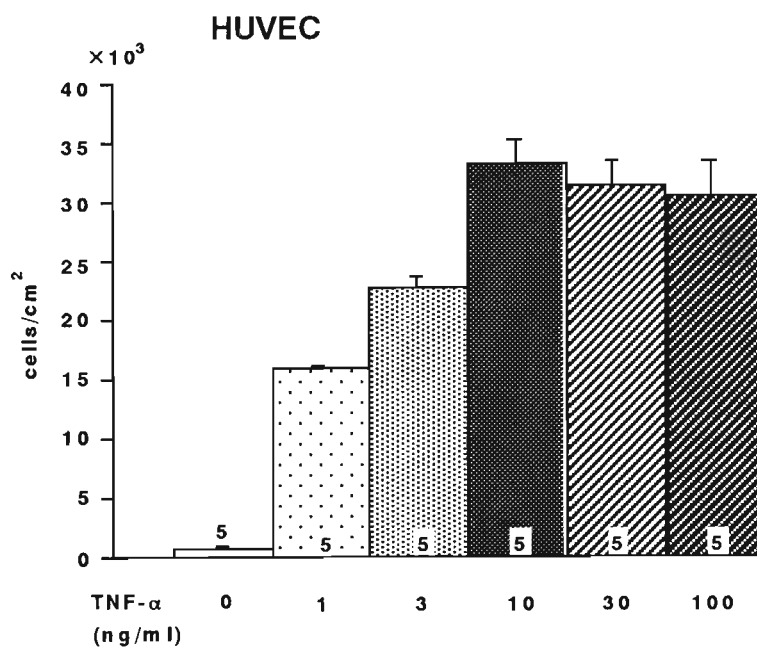
3. 白血球の血管内皮細胞への接着反応に及ぼす糖化蛋白の効果

HUVEC を TNF- α で 24 時間処理後、蛍光ラベルした U-937 との接着反応を見た (図 II-2)。TNF- α で前処置した HUVEC には多数の白血球が付着しているのが認められた。TNF- α の前処置時間は 5 時間でもほぼ同様であったので、以下の実験では薬物処置時間は 5 または 24 時間とした。図 II-3 は TNF- α の濃度 (0-100 ng/ml、24 時間) を変えて調べたもので、U-937 の HUVEC への接着反応増強作用

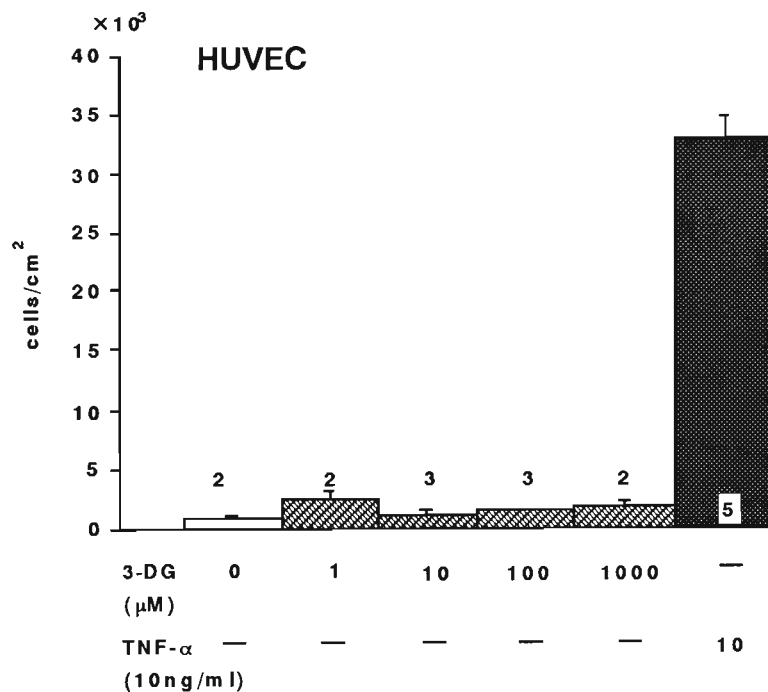
は濃度依存性であり、この方法は定量性のあることを確認した。TNF- α の時と同様にして、蛋白の初期糖化産物 3-DG の接着反応への効果について調べた。3-DG (1-1000 μ g/ml、24 時間) は HUVEC と U-937 との接着反応に特に影響を及ぼさなかった (図 II-4)。



図II-2 ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と U-937 との接着反応におよぼす TNF- α (10 ng/ml, 24h) の効果。HUVEC を TNF- α で 24h 前処置した後、蛍光色素 (BCECF) を取り込ませた U-937 と 1 時間インキュベートした。光っているのは U-937 細胞。



図II-3 ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とヒト単球由来細胞 U-937 との接着反応に及ぼす TNF- α の影響。縦軸は、TNF- α (0–100 ng/ml) 処置 24 時間後の HUVEC に接着した U-937 数を示す。



図II-4 蛋白の初期糖化産物 3-デオキシゲルコソン (3-DG) の HUVEC と U-937 の接着反応に及ぼす影響。3-DG (0–1000 μ M) または TNF- α を HUVEC に 24 時間作用させた後、U-937 との接着反応を測定した。

HUVEC 由来の不死化細胞 ECV-304 と U-937 との接着反応について調べたところ、無処置細胞については、ECV-304 では HUVEC より多くの U-937 と接着したが、TNF- α による接着増強作用は HUVEC より弱かった。さらに、3-DG (1-1000 $\mu\text{g/ml}$ 、24 時間) が TNF- α による白血球接着増強作用を修飾するか否かを調べた。3-DG (10-1000 $\mu\text{g/ml}$ 、24 時間) は、TNF- α (10 ng/ml、24 時間) の白血球接着反応増強作用に対して、何ら影響を及ぼさなかった (図 II-5)。AGE-BSA (0.003-0.3 mg/ml) の 20 時間処理も ECV-304 の白血球接着反応に影響を与えなかった (図 II-6)。ヒトの糖化アルブミン (GHSA、1 mg/ml、20 h) 処理も有意な変化をもたらさなかった (図 II-7)。

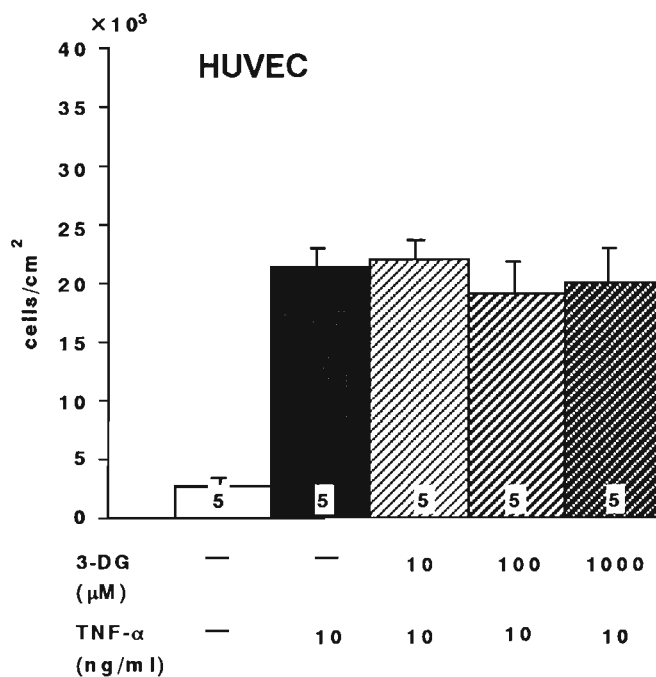
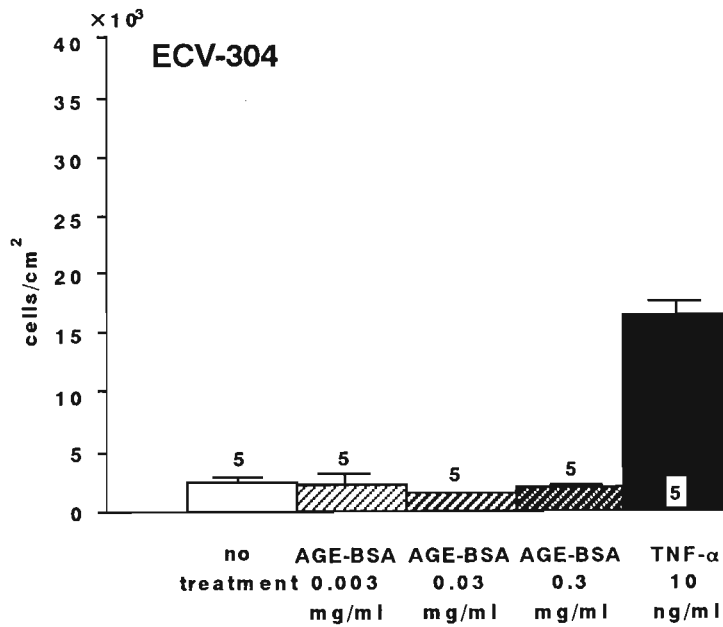
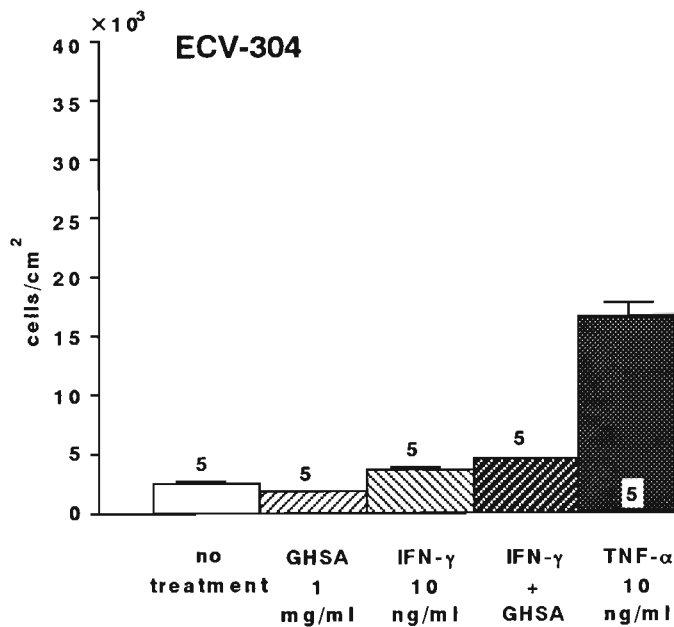


図 II-5 HUVEC 由来の不死化細胞 ECV-304 への U-937 の接着反応に及ぼす TNF- α および 3-DG の影響。TNF- α および 3-DG は ECV-304 に 24 時間作用させた。



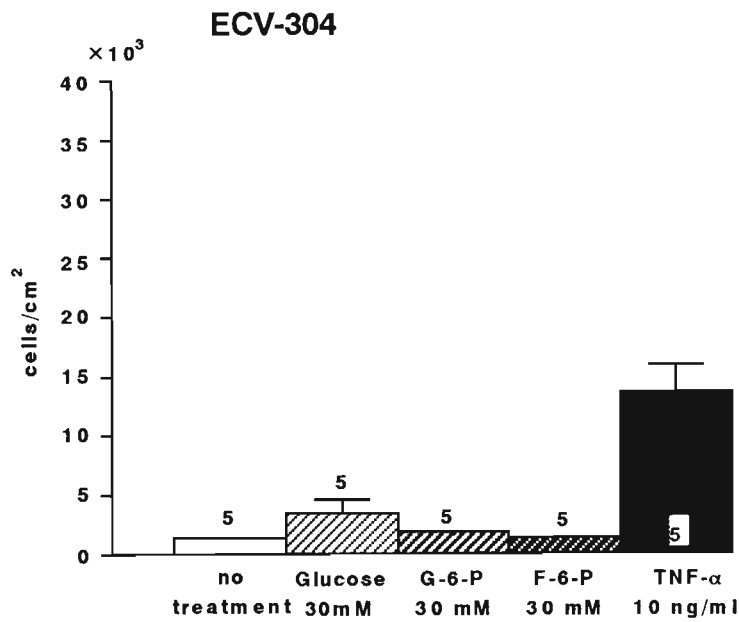
図II-6 ECV-304 と U-937 との接着反応におよぼす AGE-BSA および TNF- α の影響。薬物は ECV-304 に 20 時間作用させた。TNF- α はポジティブコントロール。



図II-7 ECV-304 と U-937 との接着反応に及ぼす糖化ヒトアルブミン (GHSA) およびサイトカインの影響。糖化ヒトアルブミン GHSA およびサイトカインは 20 時間 ECV-304 に作用させた。

さらに、栄養液中に高濃度の糖を添加することによる影響について調べた。グルコース、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) およびフルクトース-6-リン酸 (F-6-P) はいずれもアルブミンと反応して AGE を生成する。なお AGE 生成能は F-6-P>G-6-P>グルコースの順である。いずれの糖も接着反応に有意な変化をもたらさなかった

(図 II-8)。



図II-8 ECV-304 と U-937 との接着反応におよぼす高濃度糖の影響。糖は 10% FBS を含む培地で 48時間作用させた。

4. 平滑筋細胞 (SMC) の migration

この実験では、細胞が薬物に反応して上室から下室へ移動するのを観察しており、走化性を観ているとも言える。ポジティブコントロールの血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) は SMC の移動を促進したが、AGE-BSA 0.1-1 mg/ml は SMC の移動に対して効果がなかった (表 II-1)。

表 II-1. ラット平滑筋細胞 (SMC) の migration に及ぼす AGE-BSA および血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) の影響。

treatment	migrated cells/field (n)
control	11.5 (2)
BSA (0.3 mg/ml)	2.0 (1)
AGE-BSA (0.1 mg/ml)	11.0 (1)
AGE-BSA (0.3 mg/ml)	15.0 (1)
AGE-BSA (1.0 mg/ml)	11.0 (2)
PDGF-BB (0.3 mg/ml)	132.0 (2)

薬物は 20時間作用させた。PDGF-BB はポジティブコントロールとして用いた。n は well 数を示す。

5. BCAEC および SMC の NO 産生能に対する糖化ヒトアルブミン (GHSA) および AGE-Collagen コートの影響

(1) GHSA の影響

内皮細胞上清中の nitrite+nitrate 量は、対照群に比し cytokine mixture 添加により有意に増加しており、iNOS の誘導が推測された。しかし、インターフェロン- γ +30 mM グルコースだけでは、増加せず、さらに GHSA を加えても有意な増加はもたらされなかった (図 II-9)。内皮細胞に較べ平滑筋細胞では、cytokine mixture に対する反応性が大きく多量の iNOS の誘導が示唆された (図 II-10)。しかし、インターフェロン- γ のみでは nitrite+nitrate 量は増加せず、また AGE-BSA を加えても有意な増加にはならなかった (図 II-10)。

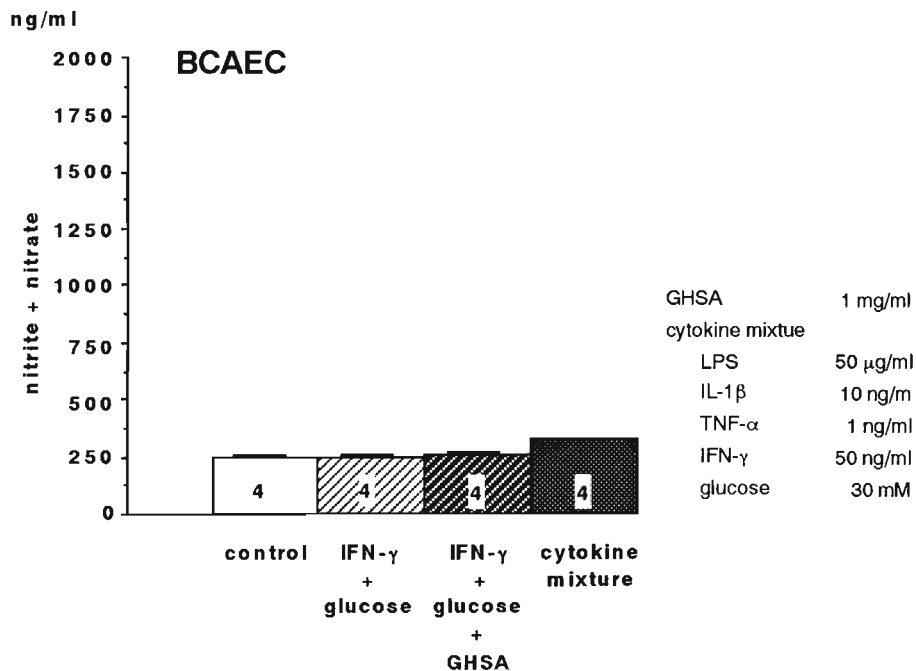
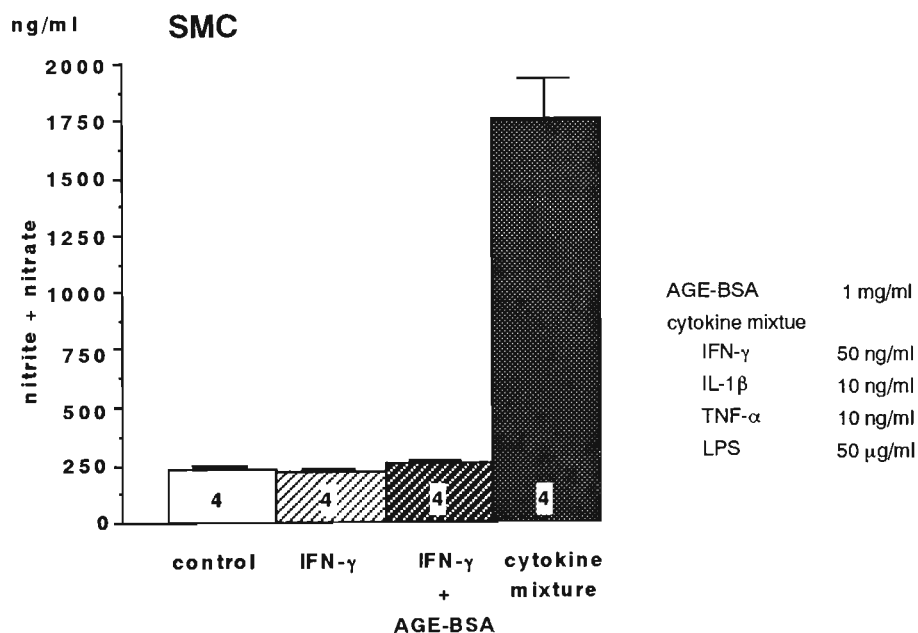


図 II-9 ウシ頸動脈内皮細胞 (BCAEC) の NO 産生能に対するグルコース、糖化ヒトアルブミン (GHSA)、サイトカインの影響。薬物は表示の濃度で 20 時間作用させ、この間に栄養液中に遊離された nitrite + nitrate 量を測定し、NO 産生量の指標とした。



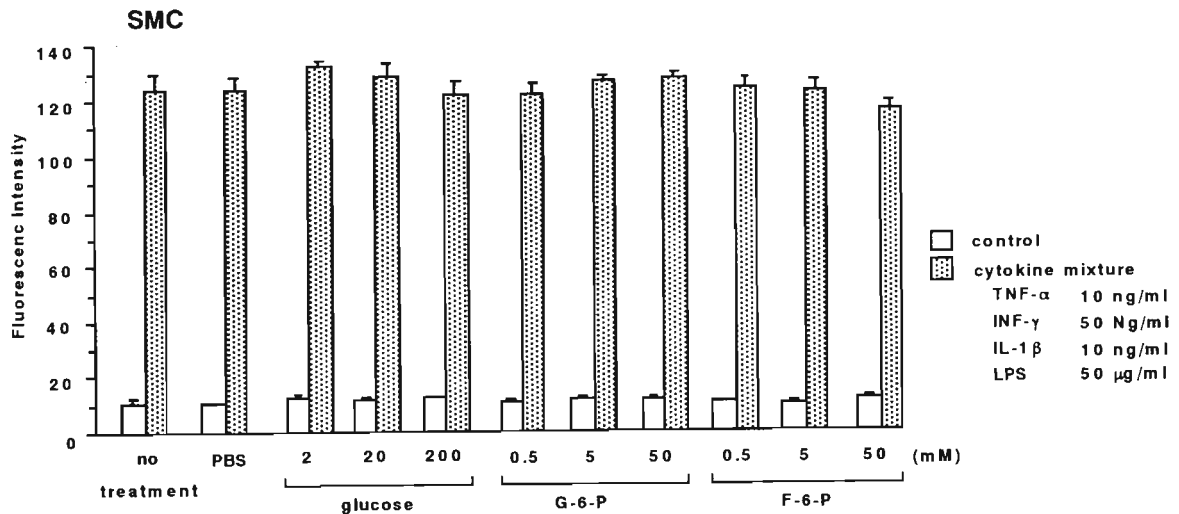
図II-10 ラット平滑筋細胞 (SMC) の NO 産生能に対する AGE-BSA およびサイトカインの影響。薬物は表示の濃度で 20 時間作用させ、この間に栄養中に遊離した nitrite + nitrate 量を測定した。

(2) AGE-Collagen コートで培養した細胞の NO 産生量および細胞生育への影響

コラーゲンコートディッシュに糖溶液を入れて 37°C で 6 週間インキュベートすると、F-6-P 50 mM では溶液が黄変し、コラーゲンの AGE 化が推測された。ex 485nm/em 538nm の蛍光強度を測定すると G-6-P 50 mM および F-6-P 5, 50 mM では有意に蛍光強度が高く、コラーゲンの AGE 化が示唆された (図 II-11)。このディッシュに SMC を播種して 2 日間培養後、サイトカイン処理 20 時間後の NO 産生能を調べた (図 II-12)。サイトカイン無添加 (control) のとき、no treatment の well に比べ、種々糖溶液で 6 週間インキュベートした well で特に NO 産生が高いということはない。また、サイトカインによる NO 産生増加作用にも、糖インキュベートによる影響は認められなかった。なお、糖化コラーゲンコートディッシュでの SMC 生育能を、アラマーブルーによる生細胞数検出法により調べたが、プレートの糖処理による影響は認められなかった (図なし)。



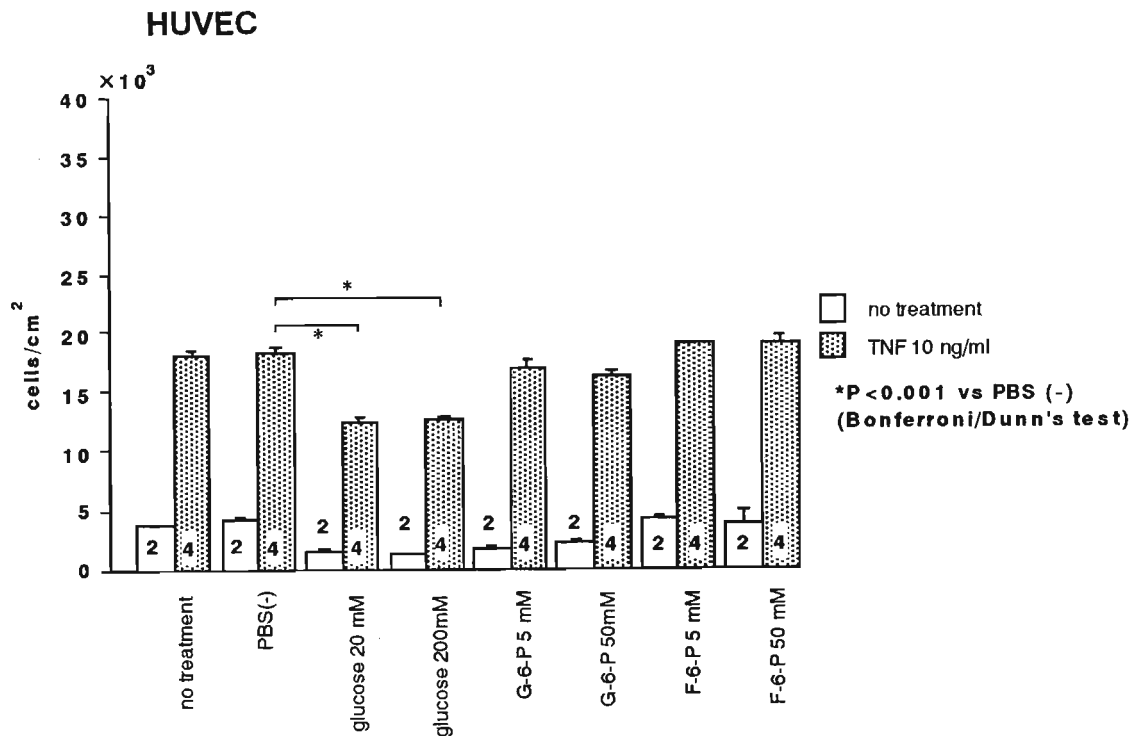
図II-11 コラーゲン (Type 1) コートディッシュに糖溶液を加え 6 週間後の溶液中の AGE 量。AGE 量は ex. 485 nm/em 538 nm の蛍光強度を指標とした。n = 7 ~ 8



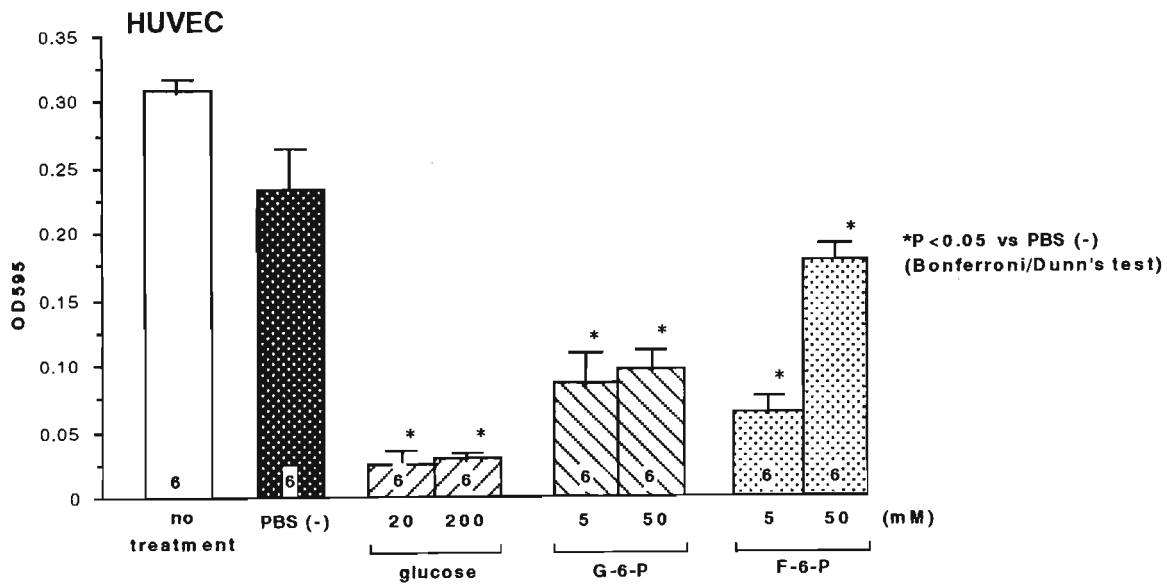
図II-12 AGE-コラーゲンコートディッシュで培養した SMC による NO 産生。市販のコラーゲンコートディッシュ well に糖溶液 (横軸の座標) を満たして 6 週間 37°C でインキュベート後、糖溶液を吸引、乾燥し、SMC を播種して 2 日間培養した。0.5% NCS 入り培地に変えて、cytokine mixture を 20 時間作用させた後、DAF-2 と 2 時間インキュベートして NO 量を計測した。n = 6 ~ 8

一方、この糖処理したプレートに HUVEC を培養し、U-937 との接着反応を調べると、グルコース処理では U-937 との接着反応が有意に減少した (図 II-13)。U-937 との接着反応の減少は、TNF- α 処置の有無にかかわらず認められた。そこで、接着反応の減少が、細胞数の違いによる可能性について検討した。同一条件で培養した HUVEC の細胞数をアラマブルー法によって計測したところ、糖処理をした well ではいずれも有意に細胞数が少なく、特にグルコース処理では著しく細胞数が少なかった (図 II-14)。したがって、プレートの糖処理は HUVEC の生育を阻害し

て、U-937 との接着反応を阻害したことが示唆された。



図II-13 AGE-コラーゲンコートディッシュで培養した HUVEC とU-937 との接着反応。市販のコラーゲンコートディッシュに糖溶液を加えて6週間37°Cでインキュベート後、糖溶液を吸引、乾燥後、HUVECを播種した。培養3日後、0.5% FBS 入り培地に変えて TNF- α を5時間作用させた後、U-937 との接着反応を計測した。



図II-14 AGE-コラーゲンコートディッシュでの HUVEC 生育能。コラーゲンコートディッシュに糖溶液を満たして6週間インキュベート後、糖溶液を除去して HUVEC を播種した。培養3日後、生細胞をアラマーブルーにより計測した。

【考察】

各種培養細胞を用いて、AGE-BSAの作用を調べたが、アルブミンの透過性、白血球の内皮細胞への接着反応および平滑筋細胞の migration に対して、AGE-BSAは有意な変化を効果をもたらさなかった。蛍光強度の増加から、用いたAGE-BSAのAGE化は確認されている。また、研究 III において、同じAGE-BSAにPAI-1 mRNA 誘導能のあることが、脂肪細胞において見いだされており、用いたAGE-BSAが生物活性を有していることは確かである。今回研究した培養細胞の機能に対しては、AGE-BSAはほとんど作用が認められなかったが、文献的には、アルブミンの透過性¹⁾、白血球の内皮細胞への接着反応²⁾および平滑筋細胞の migration³⁾を促進すると報告されている。

糖化コラーゲンコートには、培養細胞の種類によっては、生育を阻害する作用があることが認められた。AGEコートディッシュで細胞のプレートへの接着を阻害する作用のあることが報告されており⁴⁾、本研究の生育阻害との関連が考えられる。しかし、本研究において、AGEの指標としての蛍光強度とHUVEC生育の阻害度とは相関せず、HUVEC生育の阻害が糖化コラーゲンによるのかどうか、さらに研究が必要である。

【文献】

- 1) Esposito, C. et al., J.Exp. Med. 170: 1387-1407 (1989).
- 2) Schmidt, A.M. et al., J. Clin. Invest. 96: 1395-1403 (1995).
- 3) Higashi, T. et al., Diabetes 46: 463-472 (1997).
- 4) Hasegawa, G., et al., J. Biol. Chem. 270: 3278-3283 (1995).

III) AGE の白色脂肪細胞における PAI-1 遺伝子発現に対する作用

【緒言】

肥満者および糖尿病患者（NIDDM）において血中 PAI-1 レベルが上昇し、糖尿病性血管症の発症、進展に重要に係るとの報告がある。しかし、血中 PAI-1 の上昇が何に起因するか、およびその詳細な機序は不明である。そこで糖尿病性合併症の成因の 1 つとして注目される AGE の、脂肪細胞 PAI-1 遺伝子発現に対する作用について、ノーザン解析を行った。

【方法】

1. 白色脂肪細胞の初代培養

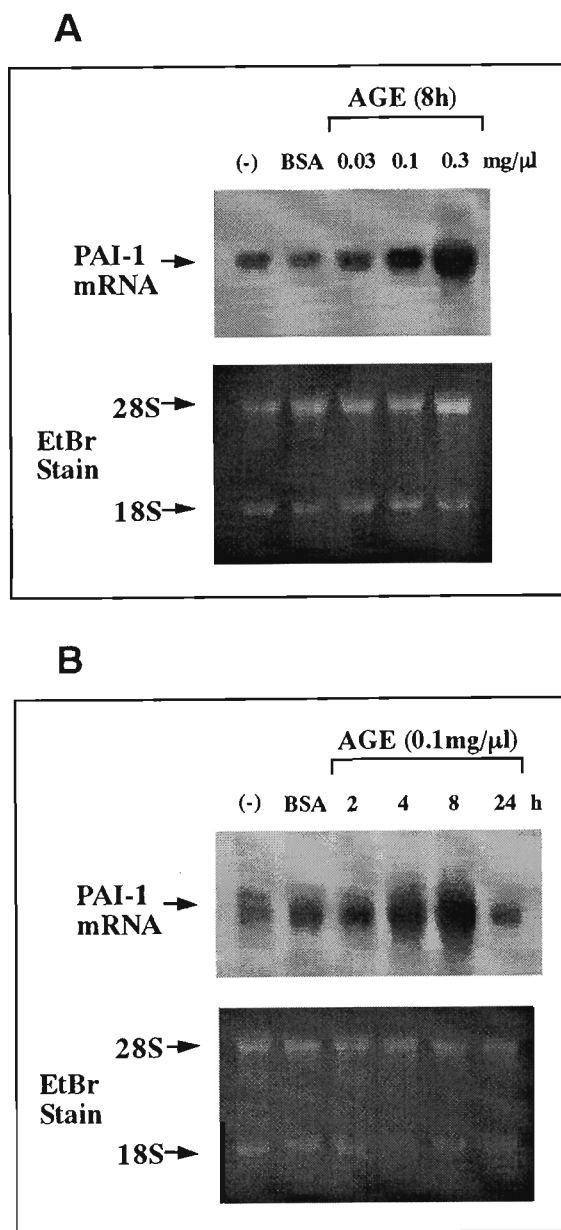
4 週齢の雄性 Wistar-今道系ラットの副精巣周囲から白色脂肪組織を無菌的に摘出し、Rehmark の方法に準じて脂肪前駆細胞を採取、培養し脂肪細胞に分化したものを使用した。即ち、細切した組織を 0.2% type 2 コラゲナーゼ含有 HEPES 緩衝液（pH 7.4）に懸濁して 5 分毎に攪拌しながら 37°C、15 分間インキュベートした。終了後、残存組織を 250 μ m のナイロンメッシュで除去後、細胞懸濁液を静置し成熟脂肪細胞と脂肪滴を除去した。間質・血管成分を含有する 25 μ m ナイロンメッシュ濾過液を採取し、700 xg にて 10 分間遠心し得られた脂肪前駆細胞を培養液に懸濁した。脂肪前駆細胞は 6 ウエルマルチプレートを用いて 10% ウシ胎仔血清、4nM インスリン、25 μ g/ml Na アスコルビン酸、10 mM HEPES、4mM グルタミン、50 IU/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中、5% CO₂ 通気下で培養した。

2. Northern blot によるラット PAI-1 mRNA 発現の解析

培養白色脂肪細胞から total RNA を Isogen を用いて、チオシアン酸グアニジン法にて抽出した。total RNA 10 μ g/lane を、6%ホルムアルデヒド含有 1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブラン (Hybond N, Amersham) にブロットした。メンブランは ³²P-ラベルプローブ (ラット PAI-1 オリゴプローブ) でハイブリダイズし、室温において、2x SSC、0.05% SDS 液で 40 分、0.1x SSC、0.1% SDS 液で 40 分洗浄後、X線フィルム (Kodak X-O mat) を用いオートラジオグラフィーを実施した。

【結果】

培養13日目の脂肪細胞に AGE を添加すると、濃度依存性 (0.03–0.3 mg/μl) に PAI-1 mRNA 量の増加が認められるが、対照BSA ではその作用がほとんどない (図A)。AGE を 0.1 mg/μl 添加し、time-course をとると、8 時間まで著明な増加を示し、24 時間には投与前値に回復した。



図III. 白色脂肪細胞の PAI-1 mRNA に対する AGE の作用
total RNA を 10 μg/lane 添加しノーザン解析を行なった。
下段はエチジウムブロマイド染色したリボソーム RNA を示す。
A : 濃度による変化
B : 経時的変化

【結語】

AGEにより白色脂肪細胞の PAI-1 遺伝子発現の増加が認められ、肥満を背景とした糖尿病態における血中 PAI-1 値の上昇には、AGE 刺激により脂肪組織で誘導される PAI-1 遺伝子発現増加が関与する可能性が示唆された。血中 PAI-1 値の上昇は血栓傾向を引き起こし、細小血管の閉塞を招き、糖尿病性血管症の発症・進展を促すと考えられる。今後、他の細胞の PAI-1 遺伝子発現についても、研究を進める予定である。