

学位論文の要旨

学位の種類

博 士

氏 名

佐々木 麻衣

学位論文題目

Effects of Nitric Oxide on Regeneration of Retinal Pericytes
triggered under High- Glucose Condition

(高血糖状態における網膜血管周皮細胞への一酸化窒素による影響)

共著者名

引地 泰一

吉田 晃敏

穴戸 直美

中村 正雄

石川 一志

岩元 純

林 要喜知

掲載医学雑誌名

未公表

研 究 目 的

糖尿病網膜症は失明原因の第1位を占め、糖尿病の重大な合併症であり、その病態解明と治療および予防は極めて重要である。糖尿病網膜症の病変の主座は網膜毛細血管であり、糖尿病の早期より毛細血管の透過性亢進¹⁾、内腔閉塞¹⁾などの異常が生じることが知られている。そのメカニズムについてはいまだ不明な点が多いが、その原因の1つに酸化ストレスの増加が挙げられる。網膜毛細血管は内皮細胞、周皮細胞、及び基底膜の3つの構成成分からなり、血液網膜関門を形成し、眼内環境の維持に重要な役割を果たしている。特に網膜血管周皮細胞は、酸化ストレスによる影響を受けやすいことが示唆され、また網膜症の初期に部分的喪失が認められることが報告されている²⁾。今回我々は、網膜血管周皮細胞を用いて網膜症病態細胞モデル系を作製し、酸化ストレスにより生じる活性酸素種、特に一酸化窒素(NO)に注目し細胞変性におけるNOの影響を検討した。

材 料 ・ 方 法

1. 網膜血管周皮細胞の調整

新鮮牛眼球から網膜を切り出し、テフロンホモジナイザーを用いた3～4回のストロークにより網膜細胞を分散させた。この細胞懸濁液を網目サイズの異なる3種類(200, 90, 50 μm)のナイロンメッシュを順に通過させ、最後のメッシュ(50 μm)に捕捉された細胞および小さな細胞塊を回収した。これらにコラーゲナーゼ処理(37℃、20分)を施し、遠心(1000rpm、5分間)した。その遠心沈査を20%牛胎児血清(FCS)入り基礎培地(DMEM)に溶かしてコラーゲン塗布皿に播き、二酸化炭素インキュベーター(5% CO₂/Air、37℃)で静置培養した。これを3～4週間増殖させた後、通常のトリプシン処理(0.25%, 5分)をし、2週間ごとに継代培養を繰り返した。また、抗ヒト平滑筋アクチン抗体による免疫染色にて、これらが周皮細胞であることを同定した。

2. 糖尿病網膜症病態細胞モデル条件

【高血糖処理】

周皮細胞を培養し20mM、及び40mMの高濃度グルコース処理されたものを高血糖モデル細胞とした。生体の正常グルコース濃度である5.5mM、およびその2倍量の11mMを含む培養液による培養細胞を対照とした。

【培養加齢処理 (In Vitro Aging)】

主に9継代した細胞を加齢処理(In Vitro Aging)群とし、継代数3回目の細胞を対照群とした。また両者の中間的処理細胞として7継代目の細胞を用いた。

【細胞変性の同定】

変性細胞の検出、および細胞数のカウントにHoechst 染色(3 $\mu\text{g/ml}$)を用いた。室温で40分間処理した後、蛍光顕微鏡下で写真撮影を行った。

3. 活性酸素消去酵素活性の測定

高血糖暴露による活性酸素消去酵素活性の変化を調べるため、5～7継代測定細胞を用いた。定法に従い、Glutathione reductaseの活性測定はNADPH(1mM)およびGSSG(3.0mM)を含む反応液の吸光度変化(340nm)をモニターすることで求めた。Glutathione Peroxidase やSuper Oxide Dismutase (SOD)の測定は、Uriniら(1995) およびMcCordら(1969)の方法に従った。実験に用いた細胞は測定1ポイントあたり直径10cm培養皿3枚相当の細胞(10^7 細胞)を使用し、正常

グルコース濃度の11mM、高グルコース濃度の20mM、40mMでそれぞれ4日間処理した。遠心操作で細胞を凍結融解し、遠心上清（15000rpm, 5分）をサンプル液としてGSSG（3.0mM）を含む反応液の吸光度変化（340nm）をモニターすることで求めた。Glutathione Peroxidase やSuper Oxide Dismutase (SOD)の測定は、Uriniら（1995）およびMcCordら（1969）の方法に従った。実験に用いた細胞は測定1ポイントあたり直径10cm培養皿3枚相当の細胞（ 10^7 細胞）を使用し、正常グルコース濃度の11mM、高グルコース濃度の20mM、40mMでそれぞれ4日間処理した。遠心操作で細胞を凍結融解し、遠心上清（15000rpm, 5分）をサンプル液とした。

4. NO産生量の測定

高血糖によるNO₂産生量を調べるため、周皮細胞の培養液を回収し、使用まで凍結保存した。NO₂の測定をもって、NO産生の評価とした。測定には1ポイントにつき直径3.5cmのディッシュを4枚使用し、5.5mMグルコース、4.0mMグルコース及び5.5mM グルコース+34.5mMマニトールの3条件を計測した。

5. DAF-2DA染色による細胞内NO産生部位

細胞内NOの局在パターンを、DAF-2DA染色により継代数7の正常グルコース濃度処理、高グルコース濃度処理及びマニトール処理細胞で見た。

6. 高血糖処理細胞へのL-NAMEの影響

高血糖処理された周皮細胞で細胞変性とNOとの関連を見るため、NO合成酵素阻害剤であるL-NAMEを投与し、細胞変性について検討した。

7. 統計処理

統計処理による有意差検定は、ANOVAを用いて統計処理し、危険率5%未満を有意とした。

成 績

1. 糖尿病網膜症病態モデル細胞系の構築

継代数 3 の周皮細胞を正常及び高グルコース濃度存在下で8日間培養したが、両群の生存率に差異は認められなかった。培養加齢処理を施した 9 継代数の細胞では、高グルコース濃度において著しい細胞変性が認められ、数日間のうちにほとんどすべての細胞が死滅したが、正常グルコース濃度では、継代数 3 の細胞と同様に生存率は良好であり、有意差がみられた。次に、このモデルにおける高血糖誘導細胞死が、高血糖自体のストレスによるものなのか、あるいは、浸透圧上昇による効果なのかを調べるため、40mM高グルコースと40mMマニトール（5.5mMグルコース+34.5mMマニトール）における細胞生存率を比較した。その結果、前者の顕著な細胞死誘導に比べ、後者では、生存率の低下は全く認められなかった。

2. 活性酸素消去酵素活性の変動

高濃度グルコースによる細胞ストレスを解析するため、細胞死が誘導されない 7 継代数の細胞を解析した。40mMの高血糖状態では、位相差顕微鏡やHoechst染色像からは、細胞に軽度の形態変化が認められたが、著しい細胞変性は観察されなかった。SODとGPxの酵素活性は20及び40mMの高グルコース処理により、ともに有意な活性の上昇を認めた。GRでも上昇傾向が確認され、11mMグルコース下での培養と比べそれぞれ10%、40%の増大が認められた。

3. 高グルコースによるNO産生増加

培養液中のNO₂濃度は高グルコース下培養では、培養 1 日後から有意な上昇を認め、正常濃度及び高マニトール濃度ではNO₂産生の上昇は認められなかった。

4. DAF-2DA染色による細胞内NO産生部位の変化

正常濃度のグルコース存在下で、NOはペリサイト細胞内核周囲に点在していた。高グルコース処理では、細胞質に広く拡散していた。高マニトール処理細胞では中間的な像が得られた。

5. L-NAMEによる細胞死の抑制

正常グルコース濃度の細胞では、L-NAME投与による影響はなく、生存率も良好であった。一方、高血糖処理を施した細胞では、L-NAMEの濃度依存性に生存率の有意な上昇が認められ、1mMのL-NAMEでは、ほぼ100%に近い生存率になった。

考 案

本研究では、継代を重ねたin vitro agingにより網膜血管周皮細胞に細胞変性を生じさせることが可能となった。このシステムの特徴は従来の高グルコースによる周皮細胞の細胞死誘導がごく一部の細胞でしか認められなかったのに対し、本システムでは100%近い細胞が死滅することである。それゆえ、生化学的な解析や、DNAアレーのような遺伝子解析が可能となる。また培養周皮細胞は高グルコースストレスに抵抗性を示すが、実際の病態では、周皮細胞は変性しやすい性質を持ち、この矛盾を解決する系として本モデル系は有益である。さらにこの矛盾を説明する事ができれば、実際の病態における周皮細胞の細胞変性を遅延させることが可能となるかもしれない。ただ、病態モデルとして適切であるか否かは、病態もモニターする多くの分子が同じような挙動をするか今後も注意深く比較検討する必要がある。

本モデルシステムのポイントは、培養系における継代数を9回以上にする事に加え、20週間以上の長期培養を施す培養加齢処理である。そして、この操作により、周皮細胞は高グルコースに対するNO生産性の増大、さらには、それらを引き金とする細胞死誘導のカスケードが可動することである。継代数の少ない細胞では、これらの反応系が十分に形成されていないか、反応系を抑制するシステムが作動していると推測される。生体においては、網膜症を発症する以前の糖尿病初期において周皮細胞の部分的変性脱落が認められるが、培養系においてはなかなか細胞死の誘導がおこらなかったことからグルコースストレスに対し、培養環境下では強い抵抗性を持つと考えられた。生体では、周皮細胞が内皮細胞やグリア細胞などとの相互関連により高血糖下で影響を受けている可能性も考えられる。

また高グルコース処理で誘導された細胞死が高浸透圧によるものではなかったことから、この細胞死の誘導はグルコース特有のストレスであることがわかった。さらに高血糖暴露により活性酸素消去酵素活性の増大が認められたため、消去酵素活性を上げることにより酸化ストレスに対し生体防御機構を働かせていると考えられた。一方、NOは血管細胞に対して通常弛緩作用をもち、血管径の調節の役割を担っているが、糖尿病においてこのNOに対する感受性の低下が報告されている。本研究においては高血糖処理により細胞死の誘導が引き起こされたことからNO感受性の低下による弛緩作用の低下と高血糖によるNO産生増加による細胞死誘導との関連についても検討の必要性があると思われた。

結 論

1. 高グルコース処理による網膜血管周皮細胞の変性、死滅の誘導にはNOの強い関与が認められた。本実験系の周皮細胞は、糖尿病網膜症血管周皮細胞と共通する細胞変性系を有すると考えられるため、病態解析モデル系として興味あるシステムである。

引用文献

- 1) T . Ishibashi : Cell Biology of Intraocular Vascular Diseases. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 103 : 923-947,1999.
- 2) Cogan DG, Toussant D, Kuwabara T: Retinal Vascular Patterns. Diabetic Retinopathy. Arch Ophthalmol 66 : 366-378, 1961.

参考文献

- 1) T. Hikichi, F. Mori, M. Sasaki, A. Takamiya, M. Nakamura, N. Shishido, M. Takeda, Y. Horikawa, H. Matsuoka, A.Yoshida : Inhibitory Effect of Bucillamine on Laser-induced Choroidal Neovascularization in Rats. Current Eye Research 24 : 1-5, 2002.
- 2) T. Hikichi, F. Mori, S. nakajima, A. Takamiya, M. Takeda, M. Sasaki, Y. Horikawa, A. Yoshida : Dynamic Observation of Selective Accumulation of A Photosensitizer and Its Photodynamic Effects in Rat Experimental Choroidal Neovascularization. Retina 21:126-131, 2001.
- 3) T. Hikichi, F. Mori, A. Takamiya, M. Sasaki, Y. Horikawa, M. Takeda, Y. Horikawa, A. Yoshida: Inhibitory Effect of Losartan on Laser-induced Choroidal Neovascularization in Rats. American Journal of Ophthalmology 132 : 587-589, 2001.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	佐々木 麻衣
審査委員長 高井 章  審査委員 牧野 勲  審査委員 吉田 晃敏 			
学 位 論 文 題 目 Nitric oxide mediates glucose-induced apoptosis in long-term cultured retinal pericytes 「長期培養網膜血管周皮細胞の一酸化窒素による高血糖依存性アポトーシス誘導」			
網膜血管内皮細胞の外周には、収縮性を有する平滑筋様の細胞、周皮細胞が存在する。糖尿病患者では、しばしばこの細胞の一部の喪失が起り、それがいわゆる糖尿病性網膜症の成立の重要な因子になっていることが示唆されている。しかるに、分離した周皮細胞を単に高濃度のグルコースの存在下で培養しても退行性的変化を誘導することができないので、糖尿病患者における高血糖と周皮細胞の喪失との関係は不明であった。 そこで、今回、ウシ網膜から採取した周皮細胞を様々な条件で培養し、高血糖（20-40 mM）が周皮細胞に与える影響の変化を観察した。 その結果、次のことが判明した： （以下次ページ）			

- (1) 9回以上の継代を繰返した場合に高血糖曝露にともなってアポトーシスが誘発されるようになる。
- (2) このアポトーシス反応は、細胞内の NO の上昇を伴う。
- (3) NO synthase 阻害剤である L-NAME (0.1 - 1 mM)により濃度依存性に抑制される。
- (4) このような変化は、当濃度のマニトールでは起らなかったのも、高グルコースの効果が浸透圧上昇に起因するものではない。
- (5) 9回以下の継代培養細胞においては glutathione reductase および glutathion peroxidase の活性が 30% 上昇していた。

このように、本論文は、細胞の老化が高グルコース刺激に対し周皮細胞が感受性を示すようになる要因の一つである可能性を示した点、高グルコースによるアポトーシスが NO 上昇を介して起る可能性を示した点、さらに高グルコース環境で周皮細胞が抗酸化酵素群の誘導という自己防衛的な反応を示すことを示した点など、糖尿病性網膜合併症の病態の理解を一步前進させた意義を有する。

論文提出者は、3名の審査員による個別の口頭試問においても、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、当人がこの領域に置いて十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。