



Dissociated Effects of High Concentration of Glucose on Endothelium-Derived Relaxing Factor Production and Cyclic GMP Accumulation in Retinal Endothelial Cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 千, 正鎬 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1036

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 183号	学位授与年月日	平成 17年 3月27日
氏 名	千 正 鎬		
論文題目	Dissociated Effects of High Concentration of Glucose on Endothelium -Derived Relaxing Factor Production and Cyclic GMP Accumulation in Retinal Endothelial Cells (網膜血管内皮細胞における血管内皮由来弛緩因子産生とサイクリ ック GMP 蓄積におよぼす高濃度グルコースの分離効果)		

博士(医学) 千 正 鎬

論文題目

Dissociated Effects of High Concentration of Glucose on Endothelium-Derived Relaxing Factor Production and Cyclic GMP Accumulation in Retinal Endothelial Cells

(網膜血管内皮細胞における血管内皮由来弛緩因子産生とサイクリック GMP 蓄積におよぼす高濃度グルコースの分離効果)

論文の内容の要旨

【目的】糖尿病による血管障害には、糖尿病に特有の細小血管障害と、糖尿病以外でも認められる大血管障害に分類されている。糖尿病性細小血管障害のひとつである糖尿病性網膜症の初期病変に血管透過性の亢進が関与しているが、透過性の調節機構の詳細については不明であった。血管内皮由来弛緩因子(酸化窒素)が血管透過性に影響を与えているという報告がなされており、糖尿病における血管障害発生の機序を解明する上で注目されている。本研究においては、糖尿病に共通して認められる高血糖が血管の機能を障害し、これが糖尿病性細小血管障害の発症に関与する可能性について検討するために、ウシ網膜血管内皮細胞での実験系を確立し血管内皮透過性および、酸化窒素産生に影響を与える物質を同時負荷して検討を加えた。

【方法】網膜血管内皮細胞は、ウシ眼球より酵素法により分離し使用した。細胞の同定は形態学的特徴と、蛍光抗体法による第Ⅷ因子の確認によった。血管透過性の検討には人工膜を隔てて上下の二重の腔を有する24穴培養プレートを用いた。すなわち、膜上に血管内皮細胞を単層に培養し、上室に2種類の透過性指示薬と負荷物質を混合投与し、下室へ透過した指示薬を蛍光測定装置により分別計測した。透過性指示薬としては、主に細胞間を通過するデキストラン(FD)と、主に細胞内を透過するアルブミン(Alb)それぞれの蛍光標識物質を混合投与し、透過したFD及びAlbを、分別計測する実験系を用いた。この実験系を用いてHGによる細胞間通過及び細胞内透過に与える影響を、酸化窒素に影響を与える種々の条件下に検討した。また、同様の条件下での酸化窒素の産生量と、酸化窒素産生により増加するサイクリックGMP(cGMP)量の動きについても検討した。

酸化窒素産生量の測定についてジアゾ化カップリング法により測定した。cGMP量については酵素免疫法により計測した。酸化窒素合成に作用する物質としては、ブラジキニン(BK)、酸化窒素合成酵素阻害剤であるNG-モノメチル-L-アルギニン(LNMMA)およびNG-ニトロ-L-アルギニン(LNA)を用いた。

【結果】FDの透過性(細胞間通過)はHG前処理によって増加した。HG条件下でBKを投与すると、細胞間通過が有意に低下したが、Albの透過性(細胞内透過)は明らかな修飾を受けなかった。酸化窒素産生はHG前処理により著しく増加したが、この増加は、酸化窒素合成酵素阻害剤であるLNMMAおよびLNAによって完全に抑制された。細胞内cGMP量はグルコースにより濃度依存性に低下し、同時にBKに対する増加反応も抑制された。

【結論】血管内皮細胞では、L-アルギニンから酸化窒素合成酵素により、酸化窒素が産生され、血管平滑筋に作用して細胞内cGMP濃度上昇により平滑筋の弛緩を起こす。また、酸化窒素は内皮細胞内のcGMP濃度を増加させ血管内皮細胞の透過性に関与していることが推測されている。HGによりFDの透過性が亢進したが、さらにBK負荷により透過性が逆に低下したことは、BK受容体の機能、或いはそれ以後の刺激伝達系がHGによって障害される可能性が推測された。さらに、HGによる血管内

皮細胞への作用が、一方では透過性亢進を制御している生理物質である酸化酵素の放出増強を惹起し、他方では酸化窒素により増加するといわれている細胞内の cGMP 濃度低下を招くという分離効果を示した。

以上のことから高血糖が血管の機能を障害する機序の少なくとも一部には、血管内皮細胞の透過性調節機能障害および、内皮由来弛緩因子の放出とその受容機構の異常が関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖尿病では種々の合併症を引き起こすが、血管障害によるものが重要とされる。その障害は網膜症などに見られる細小血管障害と、糖尿病以外にも見られる大血管障害に分けられる。糖尿病性血管障害の初期に血管透過性が亢進していることが認められる。最近この透過性調節に NO (酸化窒素) が関与していることが注目されている。NO は従来、血管内皮由来弛緩因子とよばれていたものである。

(対象及び方法)

申請者は糖尿病の際の高血糖が血管透過性を亢進するモデルとして、牛の網膜の血管内皮細胞を培養して、この血管のデキストランとアルブミンの透過性を検討した。また同時に NO 産生能と NO により活性が亢進するとされる guanylate cyclase の活性をサイクリック GMP (cGMP) 濃度で検討した。

(結果)

デキストランすなわち細胞間の透過性は高血糖で増加した。また高血糖条件下で、ブラディキニン投与によりデキストランの透過は低下したが、これは細胞間通過が低下したことを意味する。一方、細胞内通過の指標であるアルブミンの通過は影響受けなかった。NO 産生は高血糖で著しく亢進した。細胞内 cGMP 濃度は高血糖で低下した。

(結論)

NO は血管の透過性を調節しているが、透過性亢進因子に対する細胞間通過が高血糖では逆に低下した。また、高血糖で内皮の NO 産生の上昇と、細胞内 cGMP 濃度の低下が認められ、NO を消去する guanylate cyclase の機能低下で NO は消去されず、NO 自身がフリーラジカルとして細胞を障害する可能性が考えられた。

また、別の可能性として、NO が活性酵素と反応して毒性の強い ONOO⁻を生じて細胞を障害することも考えられた。

これらにより、透過性調節を含む血管内皮細胞の機能が障害され糖尿病における血管合併症の発症に関与している可能性が考えられた。

これに続いてつぎのような質問が出された。

- 1) 正常の細胞にグルコースを加えるとソルビトールが増え浸透圧が増加するか
- 2) グルコースを培養液に加えた際の浸透圧の影響はどうか
- 3) ニトロプルシドの負荷で cGMP は増えるか
- 4) グルコースを負荷すると血管内皮細胞の NO 産生系にどのような影響があるか
- 5) 培養細胞間の構造はどうなっているか
- 6) 牛の眼を用いた理由

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も充分理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	教授	高	田	明	和						
	副査	教授	寺	川		進	副査	教授	中	島	光	好
	副査	教授	渡	辺	郁	緒	副査	助教授	中	村		達