



Glucose Enhances the Processing of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Via Protein Kinase C Activation in Cultured Endothelial Cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 胡, 鳳楠 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1063

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 210号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏 名	胡 鳳 楠		
論文題目	Glucose Enhances the Processing of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Via Protein Kinase C Activation in Cultured Endothelial Cells (Glucose は Protein Kinase C 活性化を介して血管内皮細胞におけるアンギオテンシン変換酵素 (ACE) のプロセッシングを促進する)		

博士(医学) 胡 鳳 楠

論文題目

Glucose Enhances the Processing of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Via Protein Kinase C Activation in Cultured Endothelial Cells

(Glucose は Protein Kinase C 活性化を介して血管内皮細胞におけるアンギオテンシン変換酵素 (ACE) のプロセッシングを促進する)

論文の内容の要旨

【目的】糖尿病性血管障害の発症機序として血管内皮細胞局所のレニン-アンギオテンシン系の役割が注目されている。アンギオテンシン変換酵素 (ACE) は血管内皮細胞に局在する膜結合型と血液中存在する可溶型 (SACE) として生体内に広く分布している。1980年以来、血中 SACE 活性の上昇と糖尿病、特に糖尿病に伴う細小血管障害との関連性を示唆する報告が見られるが、糖尿病での SACE 活性増加の機序、さらに糖尿病性血管障害との病因論的な関係についてはまだ不明である。本研究は培養血管内皮細胞を用いて血管内皮細胞 ACE、ことに膜結合型 ACE から可溶型 ACE へのプロセッシングの調節機序に及ぼす高濃度 Glucose の影響を検討した。

【方法】牛胸部大動脈より分離した血管内皮細胞を10%FCSを加えた DMEM にて培養した。Confluent になった時点で無血清培養液に交換し、各濃度 (5.5mM、16.5mM、27.5mM) の D-Glucose、Mannitol、L-Glucose をそれぞれ加えた。また、これらに加えて、Glucose 代謝阻害剤 2-DG、Protein Kinase C (PKC) 阻害剤である H 7、Aldose reductase 阻害剤である ONO-2235を加えた実験も行った。24時間培養した後培養液と細胞を回収し、それぞれの ACE 活性 (人工合成基質を使用し、Friedland's 蛍光法による) と PKC 活性 (Pierce Colorimetric PKC Assay Kit, Pierce and Warriner Laboratories) を測定した。培養液と細胞膜より ACE を粗精製後、SDS/PAGE-Western Blotting を行い、ECL Western Blot 検出システム系 (Amersham Life Science) を用いて、ACE 蛋白の分子型を検討した。蛋白量の測定は Lowry 法によって行った。

【結果】

1. D-Glucose は濃度依存的に培養液中の ACE 活性を増加させたが、細胞 ACE 活性は逆に低下した。
2. Mannitol は D-Glucose よりやや弱いものの、同様な傾向が認められた。
3. L-Glucose の ACE 活性への影響は Mannitol とほぼ同様であった。
4. 2-DG の存在下では Glucose の影響が弱められた。
5. ONO-2235添加群は D-Glucose、L-Glucose、Mannitol のいずれに対しても、ACE 活性への影響が認められなかった。
6. H 7 添加によって、Mannitol と L-Glucose による ACE 活性に影響はなかったが、D-Glucose による培養液中 ACE 活性上昇を減弱させ、逆に膜結合型 ACE 活性低下も弱めた ($p < 0.05$)。
7. 高濃度の D-Glucose は内皮細胞の PKC 活性を有意に増加させた ($p < 0.05$)。このような PKC の活性化は同浸透圧の Mannitol と L-Glucose では起こらなかった。
8. Western Blot 解析では培養液中の ACE は膜結合型 (分子量は約150kD) より分子量が小さく、約145kDであり、高濃度 Glucose による膜結合型から可溶型へのプロセッシングの増加が確認された。

【結論】

1. Glucose は培養血管内皮細胞に濃度依存的に細胞内 ACE を可溶型にして細胞外へ遊離させる。
2. 細胞外 ACE の増加は Glucose の浸透圧作用と Glucose の細胞内での代謝によるものである。
3. 高濃度 Glucose によって、内皮細胞内 PKC が活性化されたが、これは Glucose の代謝によって起こると推測される。
4. 高血糖は糖尿病における SACE 活性上昇の原因の一つと思われ、高浸透圧と Glucose 代謝による作用を介して、血管内皮細胞内 ACE が可溶型になって放出された結果であろう。従って、SACE の増加は血管内皮細胞に由来し、細胞の表面で産生されるアジオテンシン II によって、血管攣縮による一層の血管障害を回避しようとする反応であると推測される。

論文審査の結果の要旨

血管障害は糖尿病の重篤な合併症であるが、その発症機序として血管内皮細胞におけるレニン-アングiotenシン系の関与が注目されている。アングiotenシン変換酵素 (ACE) には血管内皮細胞に局在する膜結合型と血液中に存在する可溶型がある。糖尿病性網膜症を始めとする糖尿病の血管障害とこの可溶型 ACE の増加との関連性を示す報告があるが、その可溶型 ACE の増加の機序についての詳細な検討はなされていない。本研究論文は培養血管内皮細胞を用いて血管内皮細胞内の膜結合型 ACE から可溶性 ACE へのプロセッシングの調節機序に及ぼす高濃度 glucose の影響をしらべて、糖尿病における可溶型 ACE の増加の機序を明らかにすることを目的とした。

実験系：牛胸部大動脈より分離した血管内皮細胞を培養して confluent になった後に培養液を無血清培養液に替えて、種々の薬剤を添加して24時間培養した。培養後の細胞および培養液について生化学的検索を行った。

その結果以下の所見と結論が得られた。

1) ACE 活性への影響

D-glucose は培養血管内皮細胞培養液中の可溶型 ACE 活性を濃度依存的に有意に増加させ、この時細胞内 (膜結合型) ACE 活性は逆に減少した。非代謝性の L-glucose と細胞内に入らない mannitol によっても極く軽度ではあるが濃度依存的に軽度の可溶性 ACE の増加を認められた。また glucose 代謝阻害剤である 2-deoxy-D-glucose は D-glucose の影響を弱めた。aldose reductase 阻害剤の添加は、これら D-glucose、L-glucose、または mannitol の効果のいずれに対しても影響はなかったので、sorbitol 経路によるグルコース代謝の影響はないと考えられた。

2) protein kinase C (PKC) 活性への影響

高濃度の D-glucose は内皮細胞の PKC 活性を有意に増加させたが、等張浸透圧の mannitol と L-glucose では影響はなかった。PKC 阻害剤である H-7 の添加は D-glucose による培養液中の ACE 活性上昇を抑制し、膜結合型の ACE 活性低下も抑制した。

3) 結論

glucose は培養血管内皮細胞の細胞内 (膜結合型) ACE を濃度依存的に可溶型 ACE に転換して細胞外へ遊離させると推定された。これは glucose の細胞内代謝によるが、glucose の浸透圧作用も影響していると考えられた。高濃度 D-glucose によって内皮細胞内の PKC の活性が上昇したが、これも glucose 自体の代謝によって起きると考えられた。高濃度 glucose による PKC の活性化を介して secretase の活性が上昇して膜結合型 ACE から可溶性 ACE への変化が促進されるのではないかと申

請者は推測した。本研究は糖尿病での血管障害におけるアンギオテンシン系の役割に注目し、高濃度 glucose が可溶性アンギオテンシンの増加を促進する機序を解析した有用な研究であることが評価された。

申請者の発表に対して、これに関連した次のような質疑が行われた。

- 1) D-glucose と L-glucose を相互に移行させる機構はないか
- 2) 血中の可溶性 ACE と血管内皮細胞内の ACE (膜結合型) との量的関係およびその生理的重要性について
- 3) 可溶性 ACE の産生に関わる protease は知られているか
- 4) 高浸透圧が可溶型 ACE の産生に影響を及ぼすのは何故か
- 5) ACE 活性の温度に対する安定性はどうか
- 6) 血中可溶性 ACE と血管内皮細胞内の ACE とはどちらが血管壁の肥厚に影響を及ぼすか
- 7) ACE の阻害剤の投与は血中の可溶性 ACE と血管内皮細胞内の ACE のどちらに影響を及ぼすか
- 8) Angiotensin II の分解機構について
- 9) H-7 は PKC の特異的阻害剤か、その阻害は可逆的かどうか
- 10) 何故 PKC の活性が増加すると ACE のプロセッシングが増加するのか

これらの質問に対して申請者の解答はおおむね適切であり、本論文は糖尿病における血管障害の解明に寄与するところがあり、本論文が博士 (医学) の学位を授与するのに十分な内容を有するものと審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 市 山 新 副査 教授 中 島 光 好

副査 助教授 浦 野 哲 盟 副査 助教授 菱 田 明