

糖尿病網膜症における周皮細胞の脱落と内皮細胞の増殖におけるアルドース還元酵素の役割

The Role of Aldose Reductase in Retinal Pericyte Apoptosis and Endothelial Cell Proliferation in Diabetic Retinopathy

高村 佳弘*

はじめに

中途失明の大きな要因を占める糖尿病網膜症の発生・進行予防は、糖尿病患者の増加に伴い、臨床において今後もますます大きな課題である。臨床的に観察される糖尿病網膜症の初期変化は網膜毛細血管瘤であるが、これにおいて周皮細胞の脱落と内皮細胞の増殖が観察される^{1,2)}。ガラクトース含有食を長期間摂取したイヌにおいて、ヒト糖尿病網膜症と類似して血管透過性の亢進、血管閉塞、出血といった所見などが観察される^{3,4)}が、アルドース還元酵素阻害薬（ARI）はこれらの病変の発生を抑制することが知られている^{5,6)}。アルドース還元酵素（AR）は高血糖においてグルコースをポリオール（糖アルコール）へと変換する律速酵素であり、細胞内浸透圧の上昇に基づく細胞障害をひき起こす。ARIは糖尿病患者においても網膜毛細血管瘤の形成を抑制することが報告されている⁷⁾。ただし、その機序については明らかではない。

本報告では以下の二点を明らかとすることが目的である。第一に周皮細胞の脱落がARの働きと関連があるか否か。第二に周皮細胞の脱落と内皮細胞の増殖が互いに関連して起きるのか、独立しているのか。関連しているならば、その機序は何か。これらを明らかにすることで、網膜毛細血管瘤の形成を抑制することができ、ひいては糖尿病網膜症の治療につながると考えられる。

I 方 法

眼球から網膜を採取し、血管周皮細胞と内皮細胞をそれぞれ単離、培養した⁸⁾。周皮細胞と内皮細胞であるこ

とは、それぞれ muscle-type actin, と von Willebrand factor に対する特異的抗体反応の有無にて確認した。pEGFP (enhanced green fluorescent protein)-c1 (Invitrogen 社) に AR cDNA を組み込み、AR 発現プラスミドとした。内皮細胞において AR 蛋白を強制発現させるため、lipofectamin 法にてトランスフェクションを行った。

周皮細胞と内皮細胞の共培養は以下のように行った⁹⁾。まず周皮細胞の細胞増殖をマイトマイシン C (10 μg/ml) 処理 2 時間にて行い、フィブロネクチンコートディッシュに撒き、翌日同数の内皮細胞を撒いた (0 日)。翌日交換した培養液により、通常濃度グルコース (5 mM)、高グルコース (30 mM)、AR 阻害薬 (10 μM fidarestat, 三和化学研究所) を含む高グルコース (30 mM) の 3 つのグループに分けた。内皮細胞に特異的な Willebrand factor に対する免疫染色、hoechst 核染色を行い、細胞数の計測をした。

TGF (変換成長因子)-β1 の効果を確認するため、TGF-β1 中和抗体 (150 μg/ml) (R & D Systems 社) ないし TGF-β1 合成蛋白 (1 ng/ml) (R & D Systems 社) を用いた。培養液中の活性型 TGF-β1 量は、TGF-β1 Emax Immuno Assay System (Promega 社) を用いて定量した。

周皮細胞、内皮細胞における AR 蛋白の発現量を、ABC Staining System (Santa Cruz 社) を用いた免疫組織染色と western blot 法にて解析した。アポトーシスの有無は、In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics 社) を用いて、細胞の生存活性は

* Yoshihiro Takamura: 福井大学医学部眼科学教室

〔別刷請求先〕 高村佳弘: 〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月 23-3 福井大学医学部眼科学教室

colorimetric MTS assay (Promega 社) を用いてそれぞれ解析した。細胞内ポリオール量は液体ガスクロマトグラフィー法にて行った。すべての実験は最低4回行い、有意差の検定は Fisher's test にて行った。

II 結 果

ブタ網膜から周皮細胞、内皮細胞がそれぞれ単離されたことは、内皮細胞のマーカである von Willebrand factor に対する抗体反応で確認した (図 1B)。周皮細胞の脱落における AR の役割を知るべく、まず周皮細胞と内皮細胞それぞれにおける AR 蛋白の発現レベルを免疫組織染色および western blot 法にて解析した。AR は、周皮細胞の細胞質に強く発現しており、内皮細胞において染色は乏しかった (図 1A)。Western blot 法においても同様に周皮細胞において内皮細胞と比較して約 15 倍の強度で AR は発現していた (図 1B, C)。

続いて AR の生理的な役割を確認するため、高グルコ

ース (30mM) 含有培養液での培養を9日間行い、TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) 染色でアポトーシスの有無を解析した。30 mM グルコース培養にて周皮細胞では TUNEL 陽性細胞の有意な増加があり、ARI の同時投与により抑制された (図 2B-a)。TUNEL 陽性細胞の核は濃縮しており、アポトーシス細胞の特徴を有していた (図 2A)。一方、内皮細胞では高グルコース培養でもアポトーシス細胞の陽性率は有意な変化がなかった (図 2B-b)。AR の酵素反応による産物であるソルビトール量を計測した結果、周皮細胞では高グルコース培養により有意に上昇し、ARI 同時投与により抑制された (図 2C-a)。一方、AR の発現の乏しい内皮細胞では高グルコース培養してもソルビトールの蓄積はなかった (図 2C-b)。

高グルコースによるアポトーシスの誘導が周皮細胞で誘導され、内皮細胞では生じない理由が AR の発現量に依存するか否かを知るため、AR の発現量の少ない内皮

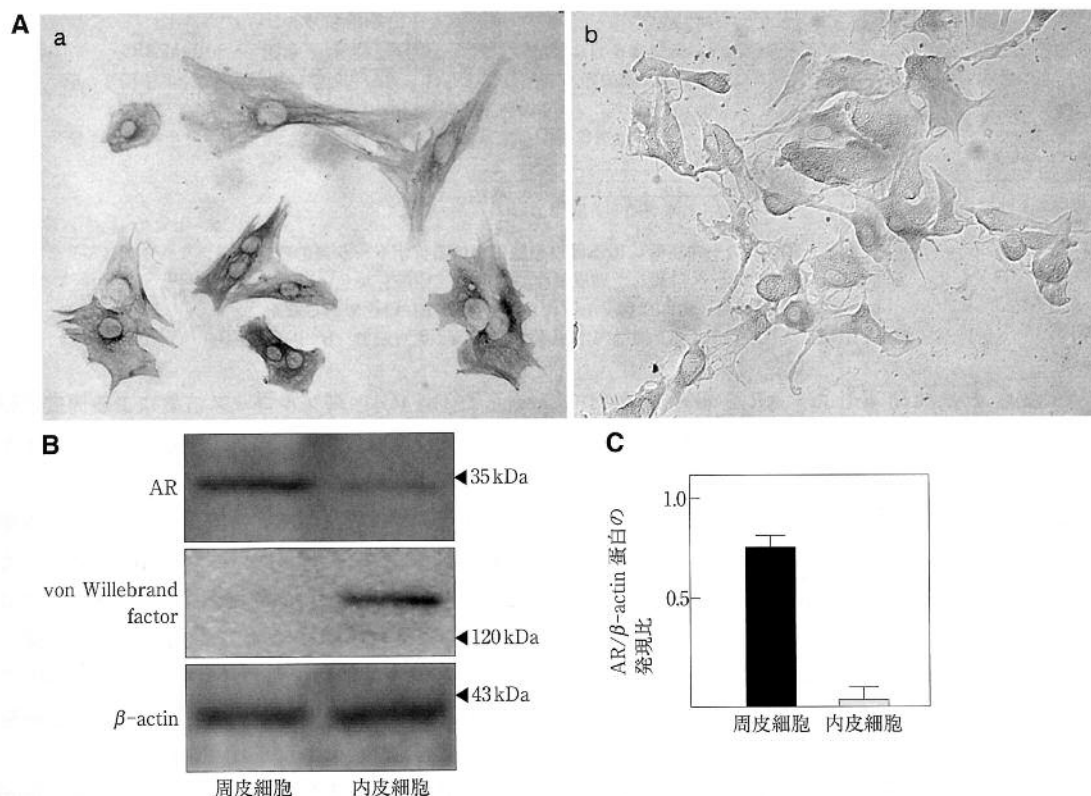


図 1 周皮細胞と内皮細胞における AR 発現量の違い

A: AR 蛋白に対する免疫染色 (a: 周皮細胞, b: 内皮細胞)。

B: Western blot 法による周皮細胞, 内皮細胞における AR, von Willebrand factor, β-actin 蛋白量の解析。

C: 周皮細胞, 内皮細胞における AR/β-actin 蛋白発現の比。

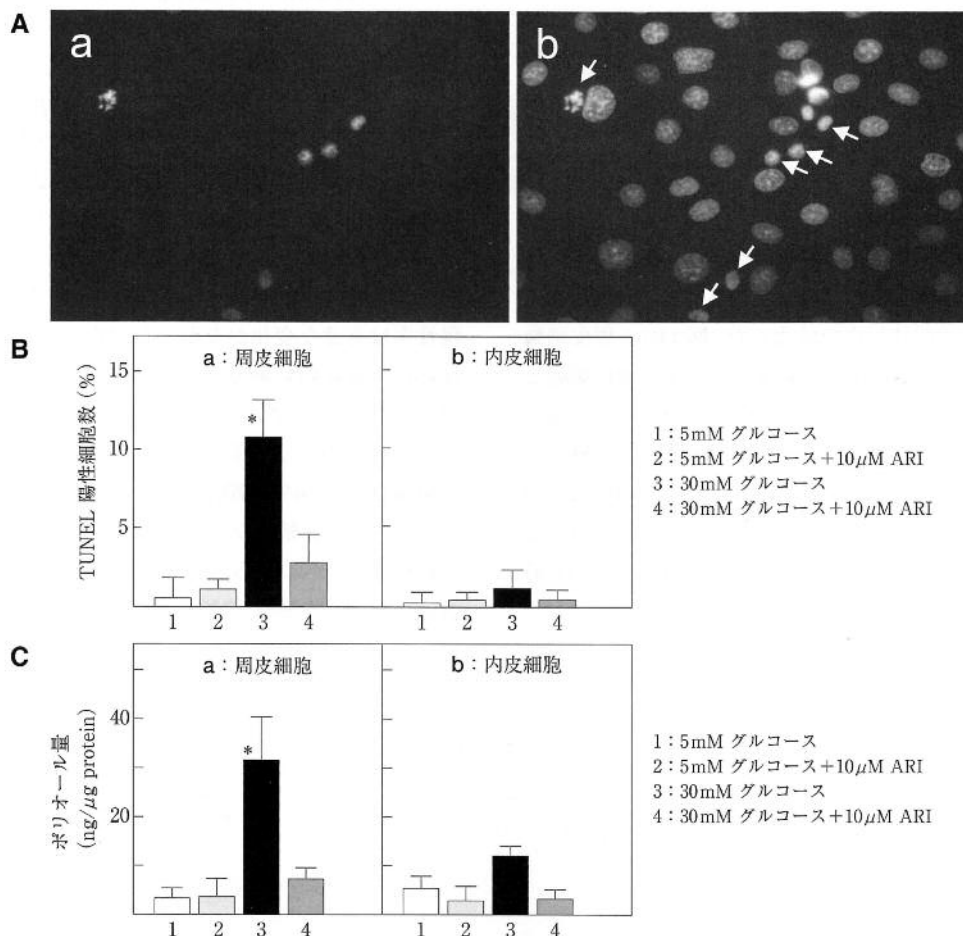


図 2 高グルコース培養による周皮細胞におけるアポトーシスの誘導
 A-a: 30 mM グルコース培養した周皮細胞における TUNEL 染色。
 b: ヘキスト核染色。矢印は図 2A-a において TUNEL 陽性である細胞。
 B: TUNEL 陽性細胞数。C: 細胞内ポリオール量 (a: 周皮細胞, b: 内皮細胞)。

細胞に AR 蛋白を強制発現した。AR を組み込んだ EGFP プラスミドをトランスフェクションし AR 蛋白が発現していることを western blot 法で確認した (図 3A)。細胞内ソルビトール量を計測した結果、AR を強制発現させた内皮細胞では高グルコース (30 mM) 培養によりソルビトールが蓄積し、ARI によりこれは抑制された (図 3B)。MTS assay により細胞の生存活性を解析した結果、AR 蛋白を強制発現させたうえで高グルコース培養すると、周皮細胞同様に生存活性が低下したが、ARI により正常化した (図 3C)。

マイトマイシン C にて細胞増殖を停止させた周皮細胞は、高グルコース培養にて経時的にその数が減少したが、ARI により維持された (図 4A)。一方、内皮細胞は高グルコース培養でも細胞増殖に有意な影響を及ぼさな

かった (図 4C)。高グルコース培養による周皮細胞の脱落が、内皮細胞の増殖にどのような影響を及ぼすかを知るために、両者の共培養を行った。通常のグルコース濃度 (5 mM) では周皮細胞と共培養したことで内皮細胞の増殖は抑制された (図 4D 実線、図 4C 実線との比較)。高グルコース培養では、周皮細胞の数が減少したが (図 4B 破線)、それに合わせて培養開始 6 時間後以降、内皮細胞は過剰な増殖に陥った (図 4D 破線)。ARI で周皮細胞の脱落が抑制されると (図 4B 点線)、内皮細胞の過剰な増殖も抑制された (図 4D 点線)。

活性型 TGF- β 量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法により計測した結果、周皮細胞、内皮細胞いずれにおいてもわずかな量しか検出されなかったが (図 4A, B)、共培養により著しく上昇した (図 5C

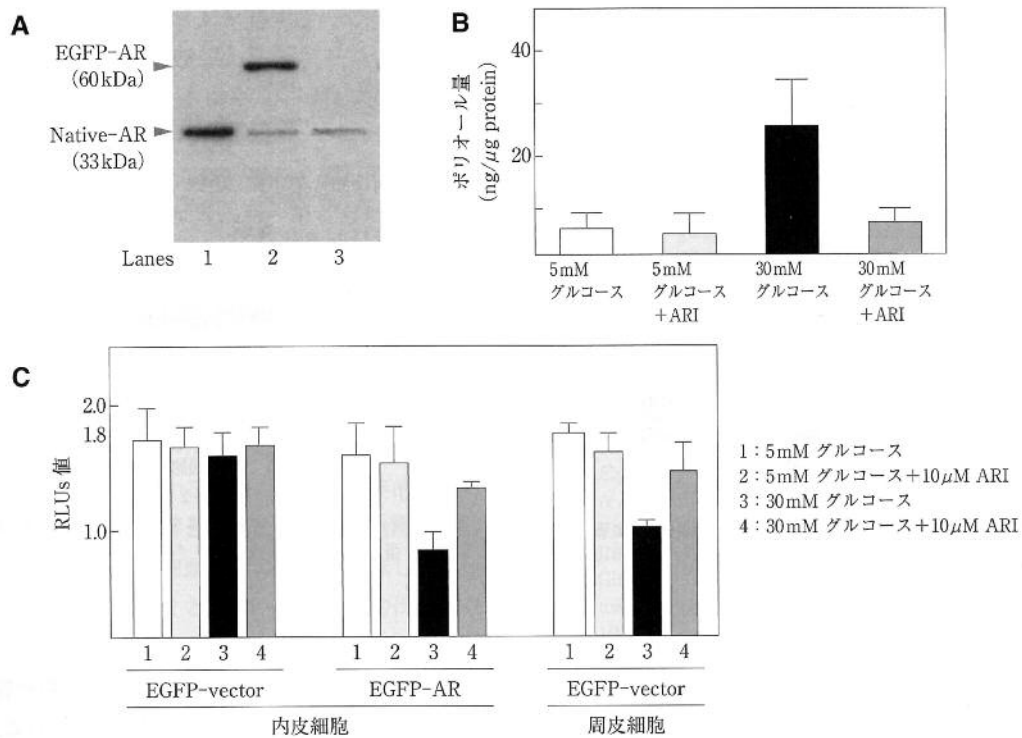


図3 AR 強制発現した内皮細胞における高グルコース培養の影響

A: EGFP-vector を周皮細胞に (レーン1), EGFP-AR を内皮細胞に (レーン2), EGFP-vector を内皮細胞に (レーン3) トランスフェクションし, 抗 AR 抗体を用いて western blot 法で解析した結果。
B: 細胞内ポリオール量. C: MTS assay による生存活性の解析.

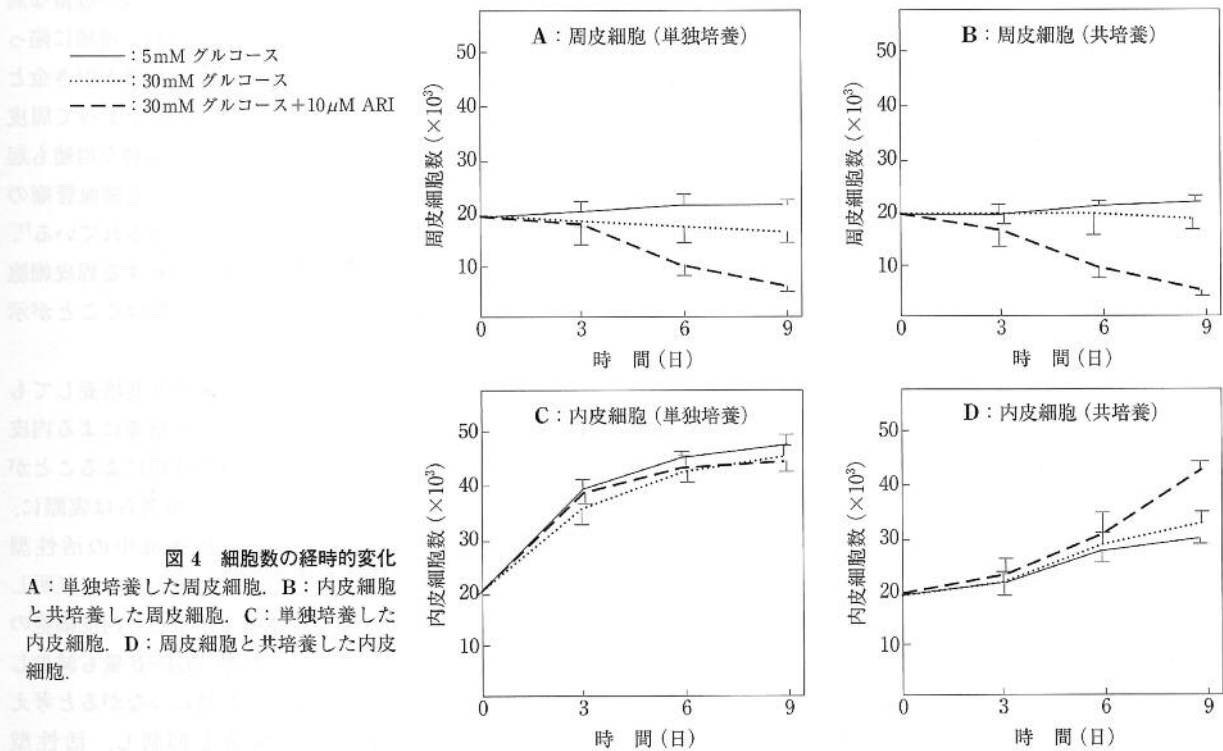


図4 細胞数の経時的変化

A: 単独培養した周皮細胞. B: 内皮細胞と共培養した周皮細胞. C: 単独培養した内皮細胞. D: 周皮細胞と共培養した内皮細胞.

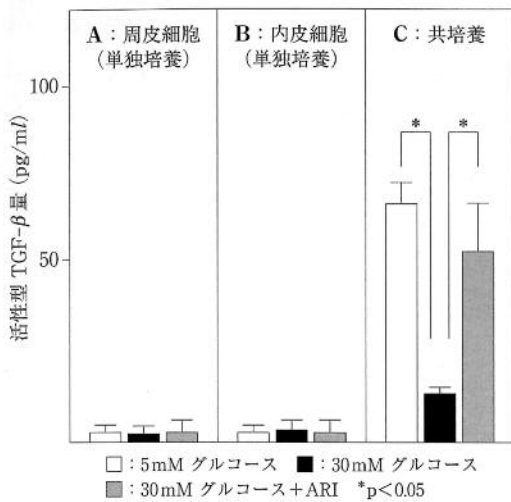


図5 TGF-β1 Emax Immuno Assay System による活性型 TGF-β 量の定量

白の棒グラフ)。高グルコース培養下で共培養した際には、TGF-β量は有意に抑制されたが(図5C黒の棒グラフ)、ARI同時投与により高いレベルのTGF-β量が維持された(図5Cグレイの棒グラフ)。

通常のグルコース濃度(5mM)で共培養した際は、内皮細胞の増殖は抑制されるが、抗TGF-β抗体を培養液に加えると内皮細胞単独培養時と有意差がないまでに増殖した(図6Aレーン3)。高グルコース培養では共培養においても、単独培養と同様に内皮細胞は過剰な増殖に陥ったが、TGF-β蛋白を培養液に加えることで内皮細胞の増殖は有意に抑制された(図6Bレーン4)。

III 考 察

本研究で、高血糖下で周皮細胞が選択的に脱落するのは、周皮細胞においてARが豊富に発現しているからである、ということが示された。ARの発現量が乏しい内皮細胞でも、ARを強制発現して高グルコース培養すれば、周皮細胞と同様にアポトーシスが誘導された。よって、周皮細胞の選択的脱落は細胞の特異性ではなく、ARの発現量に依存することが明らかとなった。アポトーシス細胞の数の増減と細胞内ポリオール量の間には強い相関性があり、ARによりポリオールが細胞内に蓄積し、細胞内浸透圧が上昇することでアポトーシスが誘導されることが示唆された。ARIがこういった高グルコース下でのアポトーシスの誘導を強力に抑制したことが、周皮細胞の脱落に関しARが責任的役割を果たして

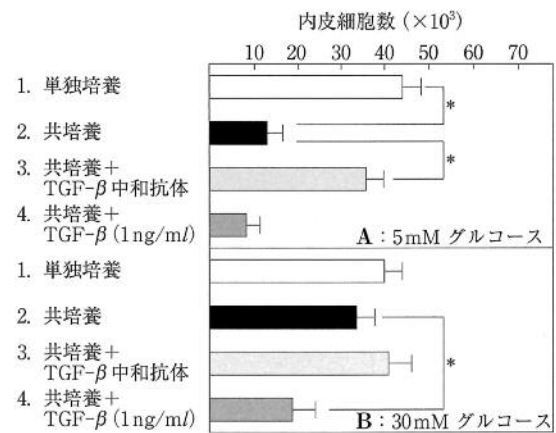


図6 内皮細胞数の変化

レーン1: 単独培養時、レーン2: 共培養時、レーン3: 共培養で培養液にTGF-β中和抗体を添加、レーン4: 共培養にTGF-β蛋白(1ng/ml)を添加。*p<0.05。

いる何よりの証拠である。

糖尿病網膜症の初期病変である網膜毛細血管瘤では、周皮細胞だけでなく内皮細胞の増殖もみられる。両細胞の動態が互いに関連したものか独立したものかを知るために、共培養を用いた実験を行った。通常グルコース濃度では、周皮細胞と共培養すると内皮細胞の増殖は抑制される。しかし高グルコースではARの発現が豊富な周皮細胞が脱落するにつれ、内皮細胞は過剰な増殖に陥った。よって内皮細胞の増殖は周皮細胞の脱落が引き金となって起きると考えられる。実際、ARIによって周皮細胞の脱落が抑えられると、内皮細胞の過剰な増殖も起きなかった。ARIは糖尿病患者において毛細血管瘤の発生を低下させたことが臨床治験により示されている⁷⁾。本報告から、その機序はARが豊富に存在する周皮細胞がARIにより細胞死から免れることに基づくことが示唆される。

TGF-βの中和抗体により、周皮細胞と共培養しても内皮細胞は過剰に増殖することから、共培養による内皮細胞の増殖抑制は、活性型TGF-βの作用によることがOrlidgeらによって示されていた¹⁰⁾。筆者らは実際に、単独培養では低レベルであった培養液中の活性型TGF-β量が、共培養では劇的に上昇することを証明した。高グルコースで周皮細胞が減少すると、内皮細胞の単独培養と近い状態となり、活性型TGF-β量も減少した。このため、内皮細胞は過剰な増殖につながると考えられる。ARIは周皮細胞の脱落を抑制し、活性型

TGF- β 量も同様に高レベルに維持するので内皮細胞は過剰な増殖に陥らないと考えられる。

周皮細胞が脱落すると、もはや内皮細胞の増殖は避けられないのであろうか？ 両者をつなぐ要因が活性型 TGF- β 量の減少であるならば、それを補ってやればよいのではないかと筆者らは考えた。筆者らの予想どおり、活性型 TGF- β を培養液に加えることで、たとえ高グルコース培養で周皮細胞が脱落しても内皮細胞の増殖は抑制されることが示された。しかし、生体内において活性型 TGF- β を内皮細胞に対し選択的にドラッグデリバリーすることは容易ではなく、ARI にて周皮細胞の脱落を防ぎ、活性型 TGF- β 量を維持することで内皮細胞の増殖をコントロールする治療のほうが現実的であろう。周皮細胞の選択的脱落とそれに引き続く内皮細胞の増殖、それはすなわち毛細血管瘤の形成を意味し、本研究はその機序において AR と TGF- β が中心的役割を果たしていることを明らかとした。本成果により、ARI の有効性が実験的に明確に示された。糖尿病網膜症の進行ないし発症の予防として、今後の臨床応用が大いに期待される。

文 献

1) Cogan DG, Kuwabara T : Capillary shunts in the patho-

genesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* **12** : 293-300, 1963

- 2) Robison WG Jr, Tillis TN, Laver N et al : Diabetes-related histopathologies of the rat retina prevented with an aldose reductase inhibitor. *Exp Eye Res* **50** : 355-366, 1990
- 3) Engerman RL, Kern TS : Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes* **33** : 97-100, 1984
- 4) Kador PF, Akagi Y, Terubayashi H et al : Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries of galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol* **106** : 1099-1102, 1988
- 5) Kador PF, Akagi Y, Takahashi Y et al : Prevention of retinal vessel changes associated with diabetic retinopathy in galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol* **108** : 1301-1309, 1990
- 6) Akagi Y, Kador PF : Effect of aldose reductase inhibitors on the progression of retinopathy in galactose-fed dogs. *Exp Eye Res* **50** : 635-639, 1990
- 7) A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. *Arch Ophthalmol* **108** : 1234-1244, 1990
- 8) Gitlin JD, D'Amore PA : Culture of retinal capillary cells using selective growth media. *Microvasc Res* **26** : 74-80, 1983
- 9) Orledge A, D'Amore PA : Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* **105** : 1455-1462, 1987
- 10) Orledge A, Saunders KB, Smith SR et al : An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 4544-4548, 1989

☆

☆

☆