

1. 細小血管合併症の成因

山本 博^{*}, 米倉 秀人^{**}, 山本 靖彦^{**}, 渡邊 琢夫^{***},
 櫻井 繁^{**}, 安井 潔^{**}, Md. Joynal Abedin^{**}

細小血管は内腔を覆う一層の内皮細胞とそれをとり巻く周皮細胞から構成される。われわれは先に、両細胞種の共存培養実験で、周皮細胞が内皮細胞の増殖制御とプロスタサイクリン産生能の保持を司ることを明らかにした。糖尿病網膜症の初期に認められる周皮細胞喪失 (pericyte loss) は、このような細胞種間相互作用を破綻させ、血管新生や血栓傾向を招くと推定される。さらに、この pericyte loss にはグリケーションが関係する可能性が見出された。すなわち、培養網膜周皮細胞を後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts; AGE) に晒すと、周皮細胞が減少した。AGE は一方、オートクリン血管内皮増殖因子の誘導を介して培養ヒト微小血管内皮細胞の増殖と管腔形成を促進させるとともに、プロスタサイクリン低下とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 の亢進を介して血栓形成を促すことが見出された。AGE はまた、培養腎メサンギウム細胞による細胞外マトリックス蛋白産生を亢進させることから、腎症の初期病変である mesangial expansion にも原因的に関わっている可能性も考えられてきた。周皮・内皮・メサンギウム細胞へのこれらの AGE 作用は、AGE を認識する細胞膜表面特異受容体 (receptor for AGE; RAGE) をコードする mRNA に相補的なアンチセンス DNA やリボザイムで消失することから、RAGE との相互作用を介すると考えられる。

われわれは次に、RAGE を血管細胞で過剰発現するトランスジェニックマウスを複製し、糖尿病細小血管症と AGE RAGE 系の関わりを *in vivo* で検証した。このマウスを、生後早期から IDDM を発症する別のトランスジェニック系統と交配させると、得られたダブルトランスジェニックマウスは顕著な腎系球体硬化像を示し、これは AGE 阻害剤の投与により軽減された。RAGE 過剰発現 IDDM マウス網膜では血管透過性の亢進や無灌流野の増大も認められた。

したがって、AGE RAGE 系は糖尿病腎症、網膜症の発症、進展に機能的に関わりうると考えられ、糖尿病合併症予防、治療のための分子標的となりうると考えられる。

Mechanisms of diabetic microangiopathies

HIROSHI YAMAMOTO Department of Biochemistry, Kanazawa University School of Medicine



^{*}やまもと・ひろし：金沢大学医学部第2生化学教授。昭和50年金沢大学医学部卒業。昭和60年東北大学医学部第1医化学助教授。平成2年現職。主研究領域/生化学、血管生物学、分子医学。
^{**}よねくら・ひでと、やまもと・やすひこ、さくらい・しげる、やすいきよし、Md. Joynal Abedin：金沢大学医学部第2生化学。
^{***}わたなべ・たくお：金沢大学大学院医学研究科分子病態医学。

Key words

糖尿病細小血管症
 後期糖化反応生成物
 AGE レセプター
 トランスジェニック
 マウス

はじめに

糖尿病という病気が怖いのは高血糖の結果血管合併症が起こるためである。糖尿病患者の平均余命は男女とも一般人口に比べ10年以上短く、死因は血管死が最も多い。死に至る以前にも網膜症、腎症等の合併症により quality of life (QOL) が著しく損なわれる。したがって、糖尿病患者の生命予後と QOL 改善のためには、血管合併症の克服が必須である。

従来糖尿病血管症の成因としては、①グリケーション、②ポリオール経路の代謝亢進、③プロテインキナーゼ C イソフォームの活性化等が提唱されてきている。本稿では、これらのうちグリケーションに焦点をあて、教室の知見を中心に糖尿病細小血管症の成因を考えてみたい。

1. 細小血管構成細胞種とその相互作用

細小血管すなわち毛細血管、細静脈は一層の内皮細胞とそれをとり巻く周皮細胞から構成される。内皮細胞と周皮細胞の存在比は組織によって異なり、網膜や脳の微小血管では約1対1、骨格筋等では約20対1とされる。筆者らは、初代培養した内皮細胞と周皮細胞を用いた細小血管の再構成系を確立し、周皮細胞が隣接する内皮細胞の増殖を制御するとともに、抗血栓性プロスタノイドであるプロスタサイクリンの産生能を保持することを明らかにした¹⁾。したがって、糖尿病網膜症の病初期に周皮細胞喪失(pericyte loss)が起こると、このような内皮-周皮間相互作用が失われる結果、血管新生、血栓傾向を招き増殖性網膜症の症候発現に至ると推定される(図1)。

2. 周皮細胞喪失のメカニズム

この周皮細胞喪失の成因として筆者らが着目したのが後期糖化反応生成物(advanced glycation endproducts; AGE)である。AGEとは、グルコースなどの還元糖とタンパク質のアミノ基とが非酵素的に反応し、Schiff塩基、Amadori転移化合物を経て形成される不可逆的な架橋物質の総称である。Yamagishiらは²⁾AGE化アルブミンを調製してウシ網膜微小血管周皮細胞の培養培地中に添加したところ、周皮細胞の増殖が遅延するとともに、AGEが細胞種特異的な急性毒性を示すことを見出した。このAGE作用は、周皮細胞表面に発現している特異レセプター(receptor for AGE; RAGE)を介すると考えられる。RAGE mRNAに相補的なアンチセンスDNAによって、AGEによる周皮細胞減少がほぼ完全に防止されるからである。

3. AGEの内皮作用

AGEは内皮にも直接作用する。すなわち、ヒト微小血管内皮細胞をAGE化アルブミンに晒すと、周皮細胞の場合とは逆に、内皮細胞の増殖が促進され³⁾、また、プロスタサイクリン産生低下とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1の産生亢進を来す⁴⁾。これらのAGE作用はいずれもRAGEアンチセンスで消去されることから、AGEとRAGEの相互作用を介すると考えられる。したがって、グリケーションは①内皮-周皮相互作用の破綻、②内皮への直接作用、という二重のメカニズムにより、血管新生と血栓形成を来しうることになる。

筆者らは先に、血管新生の主要因である低酸素によって誘導される内皮細胞増殖は、内皮細胞と周皮細胞自身が産生する血管内皮増

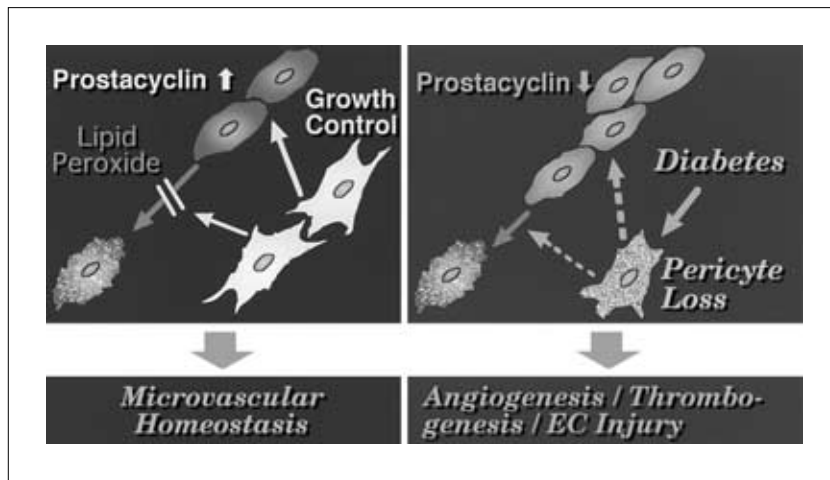


図1 内皮細胞 周皮細胞間相互作用とその破綻

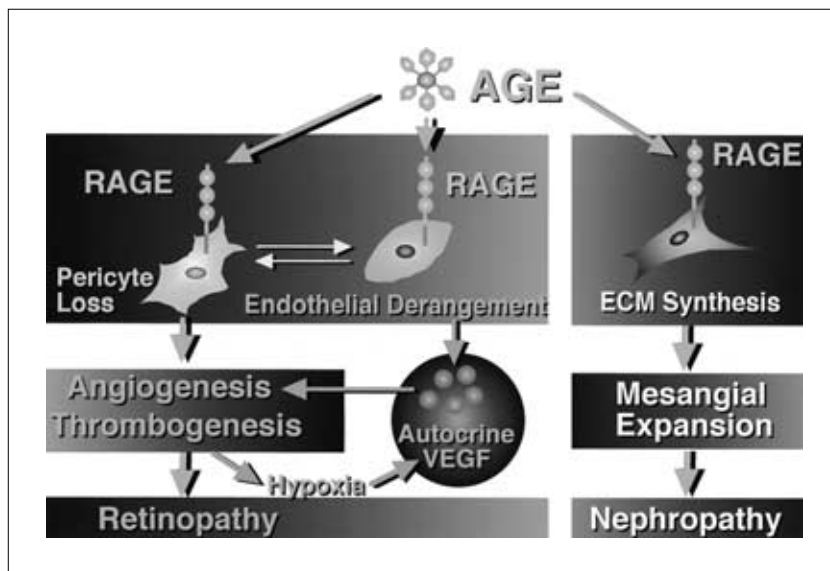


図2 糖尿病による細小血管傷害仮説³⁾

殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF) のオートクリン・パラクリン作用を介することを明らかにした^{5,6)}。AGEの血管新生活性も血管 VEGF によって仲介される。すなわち、内皮細胞を AGE に晒すと濃度依存的に VEGF 遺伝子の発現が誘導され、AGE による内皮細胞増殖と管腔形成は抗 VEGF

抗体で中和されることが観察された³⁾。

4. 糖尿病腎症と AGE RAGE 系

糖尿病腎症に特徴的な結節性病変はメサンギウム領域での細胞外マトリックスの蓄積に起因する。Tsuji ら⁷⁾は、ラット腎メサンギウム

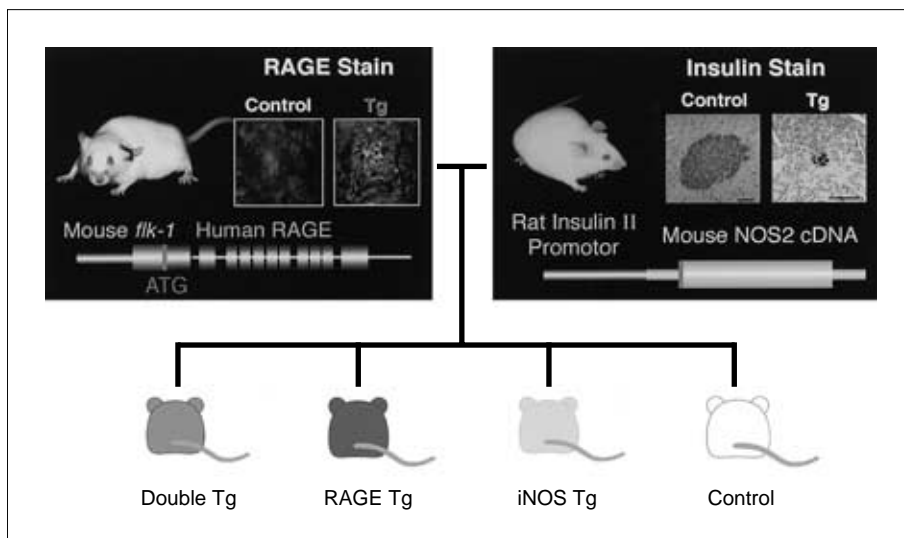


図3 RAGE 過剰発現糖尿病マウスの作製⁹⁾

細胞を AGE に晒すと 細胞外マトリックス成分の一つである IV 型コラーゲンの産生が亢進し、これは RAGE mRNA に相補的なリボザイムにより防止されることを示した。したがって、AGE RAGE 系は網膜症と腎症という二大糖尿病細小血管合併症の発症、進展に関与しうると考えられた (図 2)。

5. RAGE トランスジェニックマウス

上記仮説を *in vivo* で検証するため、血管細胞で RAGE を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、生後早期からインスリン依存性糖尿病 (IDDM) を発症する別系統トランスジェニックマウス⁹⁾と交配させた (図 3)。得られたダブルトランスジェニックマウスは、対照 IDDM マウスに比し、腎重量・アルブミン尿・糸球体硬化係数・血清クレアチニン値の有意の増大を示し、これらの腎症関連形質は AGE 形成阻害剤である OPB-9195 (大塚製薬株式会社藤井記念研究所より恵与) で軽減された。この RAGE 過剰発現糖尿病マウスは、網膜電図における律動様小波の潜時

遅延、網膜微小血管透過性の亢進、網膜無灌流野の増大も示し、したがって、AGE RAGE 系は腎症、網膜症の発症、進展に機能的に関わることが立証された。

おわりに

このように、糖尿病性細小血管症成因の少なくとも一部は、AGE という環境因子と RAGE という遺伝因子の相互作用で説明しうるかと考えられる。後者に関して最近、NF- κ B や Sp-1 を介する発現調節機構も明らかにされ、発現誘導因子として腫瘍壊死因子 α やエストラジオールが同定された¹⁰⁾。これらの分子装置は、本来発生や生体防御のために進化してきたものと考えられるが、糖尿病では不利な方向に用いられているようにみえる。今後、RAGE 後細胞内シグナリング経路や細胞種毎の AGE 応答機構の解明を通じて、このような悪用を断ち切る血管合併症予防・治療手段を講じる必要がある。

〔文献〕

- 1) Yamagishi S, Kobayashi K, Yamamoto H : Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 190 : 418 425.
- 2) Yamagishi S, Hsu CC, Taniguchi M, *et al.* : Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products : A possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 213 : 681 687.
- 3) Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, *et al.* : Advanced glycation endproducts-driven angiogenesis *in vitro* : Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 8723 8730.
- 4) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, *et al.* : Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 1998 ; 41 : 1435 1441.
- 5) Nomura M, Yamagishi S, Harada S, *et al.* : Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 28316 28324.
- 6) Yonekura H, Sakurai S, Liu X, *et al.* : Placenta growth factor, vascular endothelial growth factor B and C expressions in microvascular endothelial cells and pericytes : implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 35172 35178.
- 7) Tsuji H, Iehara N, Masegi T, *et al.* : Ribozyme targeting of receptor for advanced glycation end products in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 245 : 583 588.
- 8) Takamura T, Kato I, Kimura N, *et al.* : Transgenic mice overexpressing type 2 nitric-oxide synthase in pancreatic β cells develop insulin-dependent diabetes without insulinitis. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 2493 2496.
- 9) Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, *et al.* : Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2000 ; 902 : 163 172.
- 10) Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, *et al.* : The receptor for advanced glycation endproducts is induced by the glycation products themselves and TNF- α through NF- κ B, and by 17 β -estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 25781 25790.