

脳微小血管内皮細胞の透過性に対する  
advanced glycation end products の影響

学位論文内容の要旨

糖尿病は全身の様々な臓器の障害に関連しているが、その病態はそれぞれの臓器における血管病変が主体となっている。動脈硬化性血管病変を主体とした虚血性脳血管障害や虚血性心疾患の原因となるほか、血管増殖性変化に伴う網膜症や硬化性変化による腎症と関連していることが知られている。さらに、中枢神経系では糖尿病状態において血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)の透過性が亢進していることが報告されており、認知症と関連することもなど指摘されているが、その詳細についてはあまり言及されていない。

糖尿病性血管病変の形成の原因に関しては、持続する高血糖状態により生体内で過剰産生される advanced glycation end products (AGEs) が近年重要視されてきている。AGEs はグルコースなどの還元糖と蛋白質が非酵素的に結合して生成される多様な分子の総称である。AGEs は、AGE レセプター (receptor for AGE: RAGE) との相互作用によって、NADPH オキシダーゼの活性亢進による細胞内酸化ストレスの亢進を介して種々の遺伝子の発現の変動を起こし、動脈硬化症や糖尿病性網膜症、腎障害などの血管障害を引き起こすと考えられている。しかし、脳血管障害における AGE の役割については未だ明らかでない点が多い。

本研究では種々の AGEs のなかでも強い生理活性を持つことが知られている、glyceraldehyde 由来 AGE を使用し、培養細胞系で脳微小血管内皮細胞の透過性に対する影響を検討した。内皮細胞を多孔性メンブレンにより上室と下室に区画されたウェルに培養し、上室のみに HRP 標識ヒツジ IgG 加え、4 時間後に下室の培養液中の HRP 活性を測定した。この活性値が透過した IgG 量と考え、透過性の指標とした。また、血管透過性亢進作用を持つ血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の遺伝子発現を測定したほか、細胞内の活性酸素の変化も測定し、透過性や遺伝子発現との関連を検討した。

ウシ脳微小血管内皮細胞 (bovine brain microvessel endothelial cell: BBMEC) 及び、ウシ大動脈内皮細胞 (bovine aortic endothelial cell: BAEC) を培養し、それぞれに AGE を負荷して、透過性の変化を調べたところ、図 1 に示すように、BBMEC の透過性の基礎値は BAEC と比較して有意に低値を示した。しかし、BBMEC では AGE 100 µg/ml の負荷により、透過性は基

礎値の 1.25 倍まで上昇した。これに対し、BAEC では、AGE の負荷を行っても透過性には有意な変化は見られなかった。

BBMEC に 100 $\mu$ g/ml の AGE を負荷する際にエダラボン 20, 100 $\mu$ M を同時に加え透過性を測定したところ、図 2 のように AGE のみを負荷した群では、何も加えないコントロール群と比べ透過性は 1.24 倍に亢進した。一方、エダラボンを同時に加えた群では、透過性は亢進せず AGE のみを投与した群との比較では有意な差があった。

BBMEC, BMEC にそれぞれ、透過性実験と同様に AGE の負荷を行い、VEGF mRNA の発現の変化を検討したところ、BBMEC においては VEGF の mRNA 発現は 50, 100 $\mu$ g/ml の AGE の負荷により増強したが、BAEC では変化は見られなかった。また、BBMEC に AGE 100 $\mu$ g/ml を負荷する際に、20-100 $\mu$ M のエダラボンを同時に加え、VEGF mRNA 発現を評価したところ、VEGF mRNA の発現上昇は見られなかった。

AGE の投与による細胞内活性酸素産生の変動を測定したところ、いずれの内皮細胞においても活性酸素産生量は有意に増加したが、BBMEC においてより高値を示した。また、これらの AGE による作用は、エダラボンの同時投与により抑制された。

以上の結果より、まず AGE に対する内皮細胞の応答に脳微小血管と大血管で違いがあることが明らかとなったが、内皮細胞の由来の差による AGE に対する反応性に違いについて言及した報告は今まで無い。このように血管透過性の亢進に関して BBMEC の感受性が大血管の内皮細胞に比べ高いことは、糖尿病性脳血管障害の病態に影響を与えていることが考えられた。

VEGF は血管透過性に関して重要な分子である。今回の研究で、AGE の負荷により BBMEC の透過性は亢進し、同時に VEGF mRNA の発現も亢進した。しかし、BAEC では透過性の変化も VEGF 発現の増加も見られなかった。AGE の負荷により BBMEC での VEGF 産生が亢進し、オートクラインとして BBMEC 自体に作用することにより透過性が亢進したものと推察された。また、BBMEC, BAEC で AGE による VEGF の発現の変化に差異が存在することはこれまで報告されておらず、BBMEC において AGE に対する感受性が、VEGF 発現に関して高いことが糖尿病性の血管障害の発生パターンに影響を与えている可能性が考えられた。

AGE による細胞応答のシグナル伝達において活性酸素の存在が重要視されている。AGEs は RAGE に結合し NADPH オキシダーゼの活性を亢進させ、細胞内酸化ストレスの亢進を起こす。これに引き続き NF- $\kappa$ B や AP-1 等のレドックス感受性の転写因子を活性化し、組織因子や VCAM1, IL-6 等の発現を亢進させる。同様に AGE による VEGF の発現亢進が活性酸素を介して起こることが報告されており、今回の研究ではエダラボンにより AGE による superoxide の産生亢進と透過性の亢進は抑制されたことから、今回観察された BBMEC における AGE による VEGF の亢進も同様の機序によるものと推測された。

糖尿病が危険因子となる脳梗塞は動脈硬化性血管病変であることが良く知られている。臨床的にも糖尿病で脳微小血管の透過性が亢進していることを示唆する報告があり、糖尿病患者や高齢者でよく見られる大脳半球のび漫性の白質変化で

ある leucoaraiosis では BBB の透過性が亢進していることが指摘されている。これらの透過性が亢進した脳の病態は、今回の研究で見られた AGE による透過性亢進と関連した現象である可能性が考えられる。そのような病態が、持続的な高血糖状態で過剰産生される AGEs によってもたらされる事はこれまで強調されていない。今後、AGEs が引き起こす脳微小血管障害という病態を認識することが重要であると考えられた。

AGE は BBMEC の透過性を亢進させた。この反応には VEGF の関与が考えられた。AGE による透過性の亢進と VEGF の発現亢進はエダラボンにより完全に抑制され、細胞内活性酸素の変動と一致しており、これらの反応の信号伝達経路には細胞内酸化ストレスが強く関与しているものと思われた。また、BBMEC の AGE による透過性亢進作用に対する感受性が大血管の内皮細胞に比べ高いという事実は、糖尿病性脳血管障害の病態に影響を与えているものと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 崎 喜 信  
副 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 佐々木 秀 直

学 位 論 文 題 名

## 脳微小血管内皮細胞の透過性に対する advanced glycation end products の影響

糖尿病の中枢神経系の合併症では動脈硬化性変化に伴う脳梗塞についてはよく知られているが、そのほかに糖尿病状態で血液脳関門の透過性が亢進していることや大脳の萎縮、び漫性の白質変化などに関連することが指摘されており、従来の動脈硬化性病変だけでは説明できない病態が存在すると考えられる。また、advanced glycation endproducts (AGEs)が糖尿病性血管病変の形成に関与することが知られているが、脳血管障害における作用は不明の点が多い。

このような背景から本論文では、advanced glycation endproducts (AGEs)が、脳微小血管内皮細胞の透過性に与える影響が検討されている。同時に、血管透過性に強い影響を持つ VEGF の発現変化と、これを調節していると考えられる細胞内活性酸素を測定し、それらを大動脈内皮細胞と比較し検討している。また、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンを同時投与することにより AGE の作用を抑制できるかどうか調べられた。

その結果、脳微小血管内皮細胞では、AGE の負荷で透過性の亢進と VEGF mRNA の産生亢進とスーパーオキシドの上昇が見られたのに対し、大動脈ではスーパーオキシドの小さな上昇しか見られないことがわかった。また脳微小血管内皮細胞における AGE の作用は、エダラボンの同時投与によりすべて抑制されることがわかった。

これらのことから、AGE は脳微小血管内皮細胞の透過性を亢進させ、この反応には VEGF が関与していると考えられた。また、透過性の亢進と VEGF の発現亢進は、エダラボンにより抑制されることから、細胞内酸化ストレスの関与が考えられた。さらに、これらの反応に関して脳微小血管内皮細胞が、

他の部位の内皮細胞よりも感受性が高いということは、糖尿病性脳血管障害の病態に影響を与えているものと推察された。また、糖尿病合併症としての脳病変を考える上で、脳微小血管の障害の存在を認識することが重要であるという結論が得られた。

質疑応答では、AGE の作用とその細胞内シグナル伝達経路や内皮細胞の部位による反応の違いに関する質問や細胞培養に関する質問があり、いずれの質問に対しても、申請者は実験結果と論文での考察や文献を引用し解答した。

この論文は、AGE が脳微小血管内皮細胞の透過性を亢進させることに関して、他の部位の内皮細胞よりも感受性が高いという新規の知見を示した点で高く評価され、今後糖尿病の脳合併症の研究に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。