

培養網膜血管内皮細胞に対する
グルコースおよびインスリンの影響

早川 和久



培養網膜血管内皮細胞に対する
グルコースおよびインスリンの
影響

早川 和久

培養網膜血管内皮細胞に対する グルコースおよびインスリンの 影響

早川 和久

1. 研究目的、研究背景

近年、糖尿病網膜症は先進国の後天性失明の原因疾患の第一位を占めるようになって^{1,2}。糖尿病による視力障害のうち恒常的な障害を呈するものとして、黄斑症、視神経症、増殖網膜症にともなう硝子体出血及び網膜剥離などが挙げられる³⁻⁵。増殖網膜症は網膜と内境界膜で接する硝子体との三次元的増殖を足がかりに網膜前出血や網膜前増殖膜形成、ひいては網膜剥離を呈するとされる⁶。従って増殖をいかに予防または抑制するかが糖尿病眼科治療の主眼とされてきた⁷。糖尿病網膜症に関する基礎研究に於いても網膜由来の細胞増殖因子や内因性及び外因性増殖抑制物質に関連する研究が散見される。Glaserらにより増殖糖尿病網膜症眼の硝子体中に血管内皮細胞の増殖を刺激する物質が確認され網膜由来増殖因子として注目されたが現在では塩基性線維芽細胞増殖因子と同一の物であり血管内皮細胞に特異的な増殖刺激活性を示す物ではないことがわかっている⁸⁻¹⁰。最近の報告では腫瘍細胞の産生する血管透過性亢進因子として知られていた物質が血管内皮細胞増殖を特異的に刺激する物質と同一で、血管内皮細胞の低酸素負荷の後に産生が亢進することや、ヒト培養網膜血管内皮細胞より産生されその受容量をダウンレギュレートするというオートクリンを示すことが証明されている。従って現時点で、この血管内皮細胞増殖因子 (VEGF/VEP) が網膜の血管新生の病態を説明する最有力な候補である¹¹⁻¹³。血管新生抑制因子に関しては、血管新生抑制性ステロイド、代謝拮抗剤、抗生物質、Transforming growth factor β 等が報告されているが治療薬として有用なものは未だ確立していない¹⁴⁻¹⁷。一方、血管新生の生じる以前の単純網膜症においても、黄斑部と視神経乳頭部に視機能上重要な視細胞、神経線維が集簇しているという組織学的、生理学的特異性により、局所の血管透過性亢進や血管閉塞が重篤な視力障害をひきおこすことが指摘されている¹⁸⁻²⁰。このような病態の形成に関しては、多くの臨床的、基礎的研究がなされている。糖尿病網膜症の組織学的特徴は、網膜血管ペリサイトの脱落、基底膜の肥厚、細小血管瘤の形成、血管内皮細胞の増殖であるとされ^{21,22}。また、生理学的には網膜細小血管や網膜色素上皮細胞の血液網膜柵の破綻が知られている²³。これらの変化は、臨床的に網膜症がとらえられる以前に生じており、その障害が進行すると顕性化するものと推測される。

細小血管基底膜の肥厚、ペリサイトの脱落は、血液の易凝固性や赤血球の変形能の低下などと相まって、局所の血栓形成に関与する事が指摘されている^{24,25}。また、ペリサイトは高いアルドース還元酵素活性を有するため、高グルコース環境でソルビトール蓄積が生じ細胞傷害に至ると推測されている^{26,27}。一方、高グルコース環境が基底膜蛋白の非酵素的糖化を引き起こすことが血管内皮細胞の接着、移動、増殖をはじめ基底膜と内皮細胞の相互作用に影響して病態の形成に関与することも指摘されている²⁸⁻³¹。また、血液凝固線溶系、増殖因子、サイトカインが細胞間接着分子を介して相互に影響し合っていることが報告されて以来、血管内皮細胞が単なる血管の内壁を裏打ちする細胞ではなく積極的に局所の免疫や血管再構築に関係しており、その機能の多様性が注目されている³²。血管内皮細胞の遊走、増殖、接着及び物質透過に基底膜蛋白が重要な役割を果

たすことから、血管内皮細胞と基底膜が糖尿病状態に於いて相互に作用しあい網膜病変の形成に寄与していると推測された³³⁻³⁷。

このように網膜細小血管の傷害が網膜血管の透過性や局所凝固の亢進、血管閉塞、血管新生といった一連の病態を形成すると考えられており、その主要構成要素である網膜血管内皮細胞の生理、病理を研究する意義は大きい。トリプシン消化伸展標本による網膜血管の病理組織学的研究以来、おもにストレプトゾトシンや高ガラクトース食による実験的糖尿病動物を用いた組織学的研究と糖尿病網膜症眼の病理組織学的検討がなされてきた。これらの方法では詳細な初期病変の検討や網膜血管内皮細胞、網膜血管ペリサイト、細胞外基質など個々の病態や相互作用に関する検討に限界がある。そこで、網膜血管ペリサイト、網膜血管内皮細胞の分離培養が試みられている。初めて網膜血管内皮細胞の分離培養に成功したのはBuzneyらでありウシ網膜からの分離を行っている³⁸。我々もこの方法に従ってわが国で初めて網膜血管内皮細胞の分離培養に成功している³⁹。

糖尿病網膜症は、1；網膜血管の透過性亢進を基本病態とし、網膜浮腫、網膜出血、硬性白斑を代表的な眼底病変とする単純網膜症 2；網膜細小血管閉塞を基本病態とする増殖前網膜症 3；血管新生や線維血管性増殖を基本病態とする増殖網膜症に分類することが一般的である。これらの基本病態の発症と進展の機序についてはまだ明らかでない点が多く、これらを研究するためには良い実験モデルの作成が不可欠である。

そこで、高グルコース環境による網膜血管内皮細胞傷害の実験モデルを作成することを目的として、網膜血管内皮細胞の培養系を確立し、高グルコース環境およびインスリンの短期間の曝露がどのような影響を及ぼすかについて、半透膜上に培養した単層細胞を介する分子量4千および7万のフルオレセインイソチオシアネイトデキストラン透過性、プラスチック培養皿上での基底膜蛋白（IV型コラーゲン）新生および細胞増殖の3点について実験を行った。

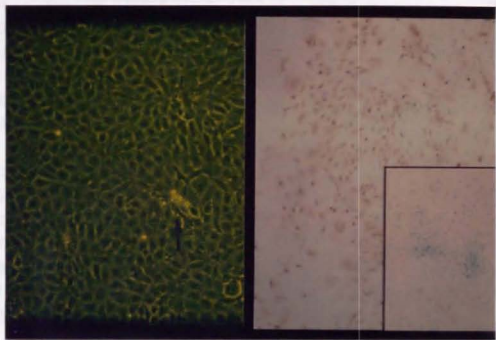
II. 対象及び方法

牛およびブタ網膜血管内皮細胞の培養

網膜血管内皮細胞の培養方法は、既発表の方法に一部変更を加えた³⁸⁻⁴⁰。屠殺後6時間以内に半切した眼球から網膜を採取しペニシリン100 U/ml、ストレプトマイシン0.1mg/ml、アンフォテリシンB 0.25 μ g/ml (Antibiotic antimictic solution: SIGMA) を添加したDulbecco改変Eagle 培地 (DMEM: SIGMA) で3回洗浄の後100 U/ml コラゲナーゼ (Type IV、SIGMA) 添加培地で約10分間酵素処理を行った。酵素処理はシャーレの中で行い位相差顕微鏡での観察像を指標として酵素処理を終了した。網膜は高い透光性を持った膜であるが、酵素処理が進むとともに透光性の悪い暗い部分が広がっていくのが観察される。網膜全体の透光性が悪くなった時点でピペティングを行い、血管片および網膜断片の浮遊液を作成、52 μ のナイロンメッシュで血管片を採取し、1%ゼラチンコーティングした培養皿 (Falcon Primaria) で培養を開始した。増殖培地には、10%牛胎児血清、0.2 μ g/ml インスリン、5.0 μ g/ml アスコルビン酸を前述の抗生物質添加DMEMに加えたものを用いた。5%CO₂、95%湿度の環境で1週間培養し培地は3日毎に交換した。培養開始約1週で血管片に接して内皮細胞のコロニーが形成されるがそのままにすると容易に網膜血管ペリサイトの混入がみられる。血管内皮細胞のコロニーが確認された時点で、培養皿に附着している血管片を含めてラバーポリスマンで掻き落とすことで内皮細胞のコロニーを拡大させ継代した (図1a)。

血管内皮細胞であることの同定は、培養中は敷石状の培養形態を参考にし固定後は第VIII因子関連抗原に対する免疫組織染色で行った⁴¹。細胞の固定は4%パラホルムアルデヒド燐酸緩衝液で15分間行い一次抗体に抗第VIII因子関連抗原ウサギ血清、二次抗体にビオチン化抗ウサギ血清、発色にビオチン化ペルオキシダーゼ、ストレプトアビジン、チアミノベンチジンを用いて行った。陰性コントロールとしては、非免疫ウサギ血清を用いた (図1b)。

図 1



- a : 位相差顕微鏡像 (200倍)。 b : 抗 von Willebrand factor 抗体
敷石状の配列をした細胞がみ
られ、一部重層した部も認め
られる (↑)。
細胞質に顆粒状の陽性反応を
認める。挿図は陰性コントロール。

形態観察

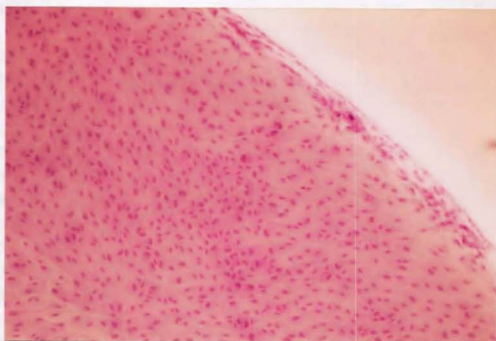
細胞形態は、位相差顕微鏡、光学顕微鏡、透過電子顕微鏡にて観察した。物質透過実験に用いる為に混合セルロースエステル膜上に培養させた細胞についても、同様に観察した。光学顕微鏡観察のためには、2%パラホルムアルデヒド燐酸緩衝液で30分間固定の後にヘマトキシリンエオジン染色、脱水、キシロール透徹包埋を行った。透過電子顕微鏡観察のためには、2.5%グルタルアルデヒド燐酸緩衝液固定、1%二酸化オスミウム後固定の後、型のごとくアルコール系列で脱水を行ないエポンに包埋した。厚切り切片を作成しトルイジンブルーにて染色して光顕観察後、超薄切片を作成し、酢酸ウラン、硝酸鉛による二重電子染色を行い電顕にて観察した。

物質透過に対する影響

有効透過面積 0.6 cm^2 の混合セルロースエステル膜（ミリセルH A、Millipore, Japan）に、 1×10^5 個づつ細胞を培養し、約10日間培養を継続した。コンフルエントは、膜の内外の電気抵抗をミリセルE R S（ミリポア社）で測定し約 $90\ \Omega/\text{cm}^2$ の高い抵抗が得られることで確認した。さらに数個を任意抽出して、ヘマトキシリンエオシン染色で形態観察を行った（図2a）。物質透過性実験のトレーサーは、分子量4,000と70,000のFluorescein isothiocyanate dextran（F D 4およびF D 70）を用いた。透過量の測定はフルオロトロンマスター（コヒレント社）付属の血漿測定プログラムを用いており、測定精度はFITCデキストランで $5.0 \times 10^{-8}\ \text{M}$ であることを確認している。チャンパー上側に $50\ \text{nmol}$ のF D 4またはF D 70を添加し、下側への透過量は経時的に下側チャンパーからサンプルを採取し前述の蛍光測光装置で計測した（図2b）。

グルコースおよびインスリンの影響を評価するために、コンフルエントの確認後2週間、 $5.6\ \text{mM}$ または $25\ \text{mM}$ のグルコース含有培養液で培養した後、それぞれについてさらに24時間、 $35\ \text{nM}$ インスリン添加群と非添加群とに分類して培養を継続した。これらの4群に対して、F D 4の透過実験を 37°C 及び 4°C で行い透過量、単位面積単位時間当たりの透過量を比較検討した。また細胞接着を可逆的に傷害するサイトカリンBを $10\ \mu\text{M}$ 添加した場合とセルロースエステル膜のみで細胞を培養しない場合を透過の陽性コントロールとした。

a



b

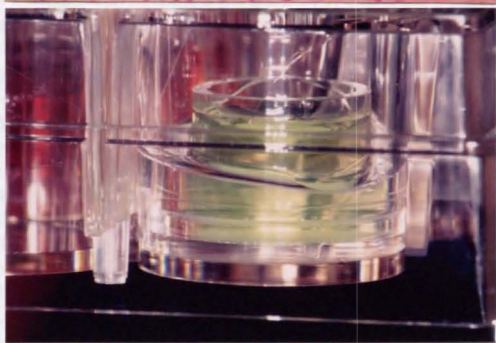


図 2

a : ミリセル上の網膜血管内皮細胞 (H E 染色 2 0 0 倍)

核の重層はみられず単層配列が確認される。細胞密度の少ない部では長軸方向に配列する傾向がみられる。

b : フルオレセインデキストラン (F D) 透過実験

ミリセル上部チャンバーに F D が添加されている。下部チャンバーに透過した F D を経時的に測定する。

IV型コラーゲン産性に及ぼす影響

放射性同位元素にて標識したアミノ酸を用いて新生蛋白を標識し分析する方法を用いた⁴²⁻⁴⁵。6ウェル培養皿に 3.0×10^5 個毎の細胞を蒔きコフルーセントになるまで培養を続けた。ブロン非含有培養液で2回洗浄した後に、グルコース濃度を5.6、または25 mMに調整したブロン非含有、75 μ g/mlアスコルビン酸および50 μ g/mlフォルマリン β 7ミ/ア β 7オトリル含有DMEMで培養した。このとき、インスリンを35 nMに添加したものと添加しない群に分けた。同様の実験を、増殖抑制のために1.0 mM D β 7ミ/ア β 7オトリルを添加した状態でも行った。培養液交換30分後に、 L - $\{^{14}\text{C}\}$ β 7ミ/ア β 7オトリル (250 Ci/mol, Amersham Australia, Sydney, Australia) を1.0 μ Ci/mlの濃度に添加して24時間培養を続けた。以後の操作は、内因性コラーゲナーゼの影響を受けないように4°Cで行った。培養液と細胞の洗浄に用いた燐酸緩衝生理食塩水 (PBS) を採取し硫酸アンモニウム45%飽和溶液で蛋白の凝集を行い遠心分離した。細胞層は、2 mMエドト酸ナトリウムと8 mM N-エチルメラミド (蛋白分解酵素阻害剤) 添加0.5 M酢酸溶液で24時間抽出を行った。硫酸アンモニウムで凝集した懸濁液を、同様の溶液で24時間透析を行い、27,000 G 30分遠心分離で上清を採取した。さらにこれを1.71 M塩化ナトリウムで沈殿させ再び蛋白分解酵素阻害剤を含む0.5 M酢酸溶液で溶解したのち、0.5 M塩化ナトリウム含有0.05 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で48時間透析を行った。27,000 G 30分の遠心分離で同様に可溶性分画を採取し、さらに0.1 M酢酸溶液で同様に透析を行い最終の分離を行った。それぞれの、精製ステップでの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した (LS6800 Beckman, Boston, MA, USA)。新生IV型コラーゲン量は最終精製産物の放射活性を総放射活性で補正して得た値と比較し、統計処理は、T検定を用いた。

分離操作を行う前の蛋白溶液と抗IV型コラーゲン抗体による免疫沈降反応により得られた沈降物、および分離精製蛋白の定性分析にはフルオログラムを用いた。分離ゲルのアクリルアミド濃度は10または7.5%、導入ゲルの濃度は4%を用いた。サンプルは、2% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 6M尿素、0.002%プロモフェノールブルーを含有する0.0625 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解し、5分間煮沸温浴の後に電気泳動を行った⁴⁶。放射性同位元素標識サンプルでは、ゲルをアルコール酢酸固定と増感処理 (Amplify, Beckman, Boston, MA, USA) の後乾燥し、オートラジオグラフィ用フィルム (X-Omat, Kodak, USA) に-70°Cで2週間感光した⁴⁷。

放射性同位元素非標識サンプルは、銀染色にてバンドを検出した (Silverstain kit, Bio-Rad, USA)。また、一部は泳動の後に、ニトロセルロース膜に転写、抗IV型コラーゲン抗体 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA)、アビジンビオチンHRP (Horse-radish peroxidase) 法を用いたWestern Blotを行った⁴⁸。

細胞増殖に対する影響

5-6 継代の牛網膜血管内皮細胞を96ウェル培養プレートに 1×10^4 個毎時き4時間付着させた。0.5% FBS 添加DMEMに5.6 mM または25 mMグルコース含有培養液で、24 時間(対数期)または4日間(定常期)培養した後にそれぞれ5.6、11、17、25 mM グルコース培養液に交換した。最後に $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -チミジン(5 Ci/mM, Amersham Australia, Sydney, Australia) を添加し、2 4時間反応させた。0.1%Na-EDTAで細胞を浮遊させたのち、セルハーベスターで細胞を濾紙に捕捉し乾燥した後にトルエン系シンチレーションカクテルに挿入して細胞への取り込みを液体シンチレーションカウンター(Beckman, Boston, MA, USA) で計測した。2次培養は35 nMインスリン添加と非添加の2群に分けて検討した。実験はすべて同一の個体から得た細胞で行い標本数は各群3個ずつとした。同様の実験を3度行うことで再現性を確認し、それぞれのデータをプールするために、コントロールを100%としたチミジン取り込み率で示した。

III. 結果

培養細胞の微細形態

プラスチック上で培養させた場合には、位相差顕微鏡顕微鏡で観察すると核の重層はみられず単層の配列しているようであるが、透過型電子顕微鏡で観察すると重層した胞体の間に基底膜様物質と思われる電子密度の高い無構造物多くがみられた。一方、半透膜上に培養した場合には、細胞の配列はどこを観察しても単層で細胞外基質の沈着はプラスチック上培養と比して著明でなかったが、豊富な粗面小胞体と半透膜側（基底側）に分泌胞がみられる。（図3）。7 α ヒドロキシステロイドの透過性実験の際に陽性コントロールとした10 μ MサイトカラシンB負荷細胞の多くは剥離するが残存細胞も空胞変性が著しい（図4）。

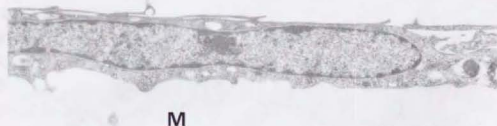


図3

培養網膜血管内皮細胞（ミリセル上）の透過電顕像

単層の細胞がみられるが基底膜様物質の沈着は明かではない。

(M: ミリセル) ーは1 μ m



図4

サイトカラシンB (10 μ M) 暴露後の培養網膜血管内皮細胞の透過電顕像（ミリセル上）

多くの細胞は剥離するが、残存細胞も空胞変性が生じている。

(M: ミリセル) ーは1 μ m

単層培養細胞を介するデキストランの透過性

上側から下側チャンバーへのFDの透過性は、下側FD濃度を経時的に測定することで評価した。上側チャンバーのFD分子量及び反応温度と透過率の関係を図5に示す。70kDaデキストランでは反応温度と無関係に、 $0.05 \text{ nmol/cm}^2\text{h}$ と著しく低い透過率であった。4kDaデキストランでは 4°C で 1.3 ± 0.3 、 37°C で $1.85 \pm 0.15 \text{ nmol/cm}^2\text{h}$ であり、温度による影響がわずかにみられたが有意の差ではなかった。以後の実験は4kDaフルオレseinデキストランを用いFD4と略す。上側チャンバーのFD4濃度と培養ブタ網膜血管内皮細胞のシートを介する1時間の透過率の関係を図6に示す。FD4濃度が6.2から $50 \mu\text{M}$ までは、透過率とほぼ正の相関を示すがそれ以上の濃度ではなだらかな増加にとどまっている。サイトカラシンB、インスリンの透過率への影響と反応温度の関係を図7に示す。サイトカラシンBにより透過率は、 $13.5 \text{ nmol/cm}^2\text{h}$ と約8倍に達しているが反応温度による影響は有意ではなかった。インスリンは、透過率を約 $1/2$ に減少させるがやはり、反応温度による影響は有意ではなかった。

予め5.6および25mMのグルコース濃度で2週間培養した後に上側から下側への透過実験を行い下側のFD4濃度を経時的に測定した(図8)。細胞を培養していない状態をブランクとして点線で記載してあるが、20分ですでに20nMが透過した。5.6mMグルコース培養では、60分以降の透過量の増加が少なくプラトーとなるが、25mM培養では60分以降も透過量の増加がみられた。培養グルコース濃度に関係なく、35nMインスリンは有意に透過量を減少させた。

IV型コラーゲン産生に及ぼすグルコースおよびインスリンの影響

培養細胞及び培養液からの分離

5.6mMグルコース培養液で培養した細胞と培養液から精製した ^{14}C ラベルコラーゲン様蛋白をIV型コラーゲンに精製する過程の放射活性を表1に示す。1.71M NaClで沈澱させた蛋白(第一段階)は、フルオログラフィーの1列目に相当する(図9)。0.5M NaCl含有トリス緩衝液pH7.4で溶出する蛋白(第二段階)をフルオログラフィーで見ると、220, 200, 170, 140, 120kDaの分子量のバンドを示した(図9、2列目)。第二段階精製物を、0.1M 酢酸で透析した時の上清は(第三段階)、放射活性をほとんど示さなかったため、その後は、第三段階の分離操作を省略した。第二段階のフルオログラムは、前述のように5つのバンドを示し、これらはproalpha-1(IV)、およびproalpha-2(IV)に相当する^{44, 45, 49}。免疫沈降反応で、培養液及び細胞抽出液から精製した ^{14}C 標識蛋白のフルオログラフィーも、200, 170, 140, 120kDaのバンドを示し、さらに60kDaのバンドも弱いながら認められた(図9、3列目)。同位元素で標識を行わなかったサンプルと、精製ヒト胎盤IV型コラーゲン(Sigma)にたいする、抗IV型コラーゲン抗体を用いたウエスタンブロッティングを(図10)に示す。網膜血管内皮細胞のサンプル(右)では、120, 60kDaのバンドが認められ、市販のIV型コラー

ゲンのバンド(左)と120kDaが一致している。

グルコース及びインスリンの影響

^{14}C プロリンで標識した新生コラーゲン蛋白の、フルオログラムを図11に示す。1列目は5.6 mMグルコースで培養したものであり120、140 kDaが目だがそのほかに200、170 kDaも見られる。2列目は5.6 mMグルコースに35nMインスリンを添加した場合である。全体に放射活性が強く特に120、140 kDaが明かであるが、ほかに220、200、170さらに90、80、20、16 kDaの低分子バンドがみとめられる。

3列めは25mMまでグルコース濃度を上昇させたときのものである。弱い140 kDaのバンドがみとめられる。4列めは、25mMグルコースに35nMインスリン添加した場合である。2列めと同様に、多くのバンドが認められるが、全体的に濃度は低い。 ^{14}C プロリン標識IV型コラーゲン(第二段階精製サンプル)の放射活性を網膜血管内皮細胞の総取り込み量で補正し、培養グルコース、インスリン濃度毎に示したのが表2である。グルコース濃度にかかわらず35nMインスリンは、標識蛋白の産生を有意に刺激した($p<0.05$)。培養グルコース濃度が、25mMの場合は5.6mMと比べて有意に網膜血管内皮細胞のIV型コラーゲン新生量が増加していた($p<0.05$)。

1 mMヒドロキシウレアで増殖を抑制した場合の、グルコース、インスリンの影響を同様に示す(表3)。グルコース濃度にかかわらず、インスリンはIV型コラーゲン産生を刺激するが、培養グルコース濃度の違いによる影響は認められなかった。また、フルオログラムにより産生蛋白の定性分析を行ったが、培養グルコース濃度やインスリン刺激による影響はみられず特異なバンドの検出はみられなかった(図12)。

トリチウムチミジン取り込みに対する培養液グルコース濃度の影響

対数増殖期細胞に対するグルコースおよびインスリンの影響

インスリン濃度とチミジン取り込みの関係を図13に示す。10nMから有意の刺激作用を有した為に、グルコース濃度を変化させたときのインスリン刺激群は35nMの濃度とした。5.6 mMグルコース含有培養液で24時間培養した後に、培養液グルコース濃度を11.1、16.7、25mMに上昇させても、トリチウムチミジン取り込みに明かな変化は見られなかった。培養液に、35 nMインスリンを添加した場合には、グルコース濃度に関わらず常に添加しなかった場合より、取り込みの増加がみられた。しかしこの効果は、2次培養のグルコース濃度が16.7 mM以上になると有意に抑制された。また、各濃度のグルコースと同じ浸透圧になるようにマンニトールを添加した場合は、グルコースでみられたような濃度による影響が見られないことが確認された(図14)。

25 mMグルコースで24時間培養した後に、培養液グルコース濃度をそれぞれ、16.7、11.1、5.6 mMに低下させたとき、チミジン取り込みへの影響は見られなかった。35nMインスリンが添加された場合には、2次培養のグルコース濃度が、減少するとチ

ミジン取り込みが増加する傾向がみられたが、5.6mMに低下させたときに限り統計学的に有意な上昇となった ($P < 0.05$; 図15)。

定常期細胞に対するグルコースおよびインスリンの影響

5.6 mMグルコース含有培養液で4日間培養した後に、チミジンを添加すると対数増殖期と比べ著しく取り込みは減少しており、培養グルコース濃度を変化させてもほとんど変化はみられなかった。インスリンを添加した場合、チミジン取り込みの倍加が見られるがグルコース濃度の影響は見られなかった(図16)。16.7 mMグルコース含有培養液で4日間培養した後に、グルコース濃度を低下させると、インスリンを添加しない場合は、全く変化を認めないが、インスリンを添加した場合は、グルコース濃度を5.6mMまで低下させたときに、有意のチミジン取り込み増加が見られた ($P < 0.01$; 図17)。

IV. 考案

単層細胞を介する物質輸送をみた今回の実験は、血液網膜柵の透過性をみているのではない^{50,51}。あくまでも、網膜血管内皮細胞の培養状態での物質透過である。今回用いた測定系は、蛍光測光であり R I で標識したものをトレーサーとした場合と比較すると精度が低い、それでもインスリンによる分子量4000のFD透過の抑制が確認できた。透過性測定の際に、反応温度による影響が殆どみられず、基質濃度と透過濃度の関係にプラトーがみられないことからおそらく細胞間隙を通る受動輸送であろうと考えられた⁵²。インスリンが作用しない場合には、細胞同士の接合が疎になり細胞間隙を通る高分子漏出が増加するのであろうと推測される。培養グルコース濃度による物質透過への影響は、透過量の経時変化をみた場合に2時間後の透過量がインスリンの有無に関わらず、有意に高グルコース培養(2.5 mM)で高かった。このことは、高グルコース培養そのものが、網膜血管内皮細胞の高分子透過性を亢進させる可能性を示している。

半透過上に培養した単層培養網膜血管内皮細胞を介する物質透過性を検討した報告はなく今回が初めての報告である。繰り返すが、この系は生理的な状態における内側血液網膜柵の機能を検討するためのものではなく網膜血管内皮細胞の物質透過に及ぼす種々の影響をみるモデルとして有用である。今後薬物の毒性や、サイトカインの影響などの検討に広く応用の可能性があると思われる。

網膜血管内皮細胞基底膜の層状肥厚は、糖尿病網膜症に比較的特異的な病理所見である。層状肥厚の原因は、おそらく内皮細胞の脱落と再被覆の繰り返しにより生じたものであると考えられている。今回の研究で、高グルコース環境が網膜血管内皮細胞の基底膜構成蛋白(IV型コラーゲン)産生を刺激するという結果を得た。Caglieroらも、ヒト臍静脈血管内皮細胞を用いてIV型コラーゲン、ラミニンのm-RNA量を半定量する方法で、高グルコース培養が基底膜構成蛋白の産生を刺激すると報告し本邦でも同様の結果が報告されている^{53,54}。また、培養腎糸球体細胞でも高グルコース環境がIV型コラーゲンやフィブロンネクチンの産生を刺激することが知られている⁵⁵。このように、網膜血管以外では高グルコース環境が血管内皮細胞の細胞外基質の産生を刺激することが報告されていたが、今回初めて網膜血管においても確認された。以前、我々は全く逆の報告すなわち高グルコース培養がIV型コラーゲン産生を抑制すると報告した。これは、¹⁴Cプロリンの総取り込み量で精製IV型コラーゲンの放射活性を補正しなかったことから生じた間違った結果の解釈であった。我々の方法は、新生蛋白をトレーサーを用いて標識した後、IV型コラーゲンを抽出し定量している。m-RNAの転写、蛋白合成などの障害や、蛋白合成の著しい亢進、細胞外基質の分解が亢進している場合には、総取り込みプロリン量が増加しこのような異なった結果が起こり得る。糖尿病で循環血液中や網膜血管局所のIV型コラーゲンの増加がみられることと、培養網膜血管内皮細胞が高グルコース培養でIV型コラーゲンを多く産生する事の直接の因果関係を論ずることはできないが、少なくともこれまでの報告と矛盾はない⁵⁶⁻⁵⁹。基底膜構成蛋白は、細胞の接着、遊走、分化に関与することが知られており、高グルコース培養といった環境の悪化によって、正常な基底膜の産生が増加するとは考えにくい^{43,60}。糖尿病腎症では正常腎と異なっ

た基底膜蛋白が表出されることが報告されており同様の現象が網膜症においても生じている可能性は否定できない⁶¹。今回は、基底膜物質の分解については検討していないが、網膜血管内皮細胞基底膜物質のturnoverに培養グルコース濃度やインシュリンが影響を与えていると推測される。

培養網膜血管内皮細胞の細胞増殖に及ぼすグルコース濃度変動の影響は、対数増殖期でも、定常期でも有意ではなかった。しかし、対数増殖期の細胞で35nMインスリン存在下では、生理的グルコース濃度(5.6 mM)から16.7 mM以上に上昇させると有意にチミジン取り込みが抑制された。この現象は、グルコース濃度を変化させずに、浸透圧をマンニトールを用いてグルコース濃度上昇に見合うだけ変化させた場合にはみられなかった。従って、浸透圧ではなくグルコース濃度の増加がインスリンの増殖刺激作用を抑制したことが示唆される。ヒトの生理的インスリン濃度はIRI (immune reactive insulin) 測定では、0.1-0.5 nMとされており、今回インスリン添加群に用いた濃度は、およそ100倍の濃度であった。より低濃度でも、インスリンの増殖刺激効果は確認しているが、培養グルコース濃度と有意の相関がみられたのは高濃度インスリン添加時のみであった。これまでの報告では、高グルコース環境は培養ウシ網膜ペリサイトの増殖を抑制するが、網膜及び大動脈血管内皮細胞に影響を及ぼさないとされていた^{62,63}。本研究でも、インスリンが作用していない状態では同様に、チミジン取り込み量とグルコース濃度に有意の関係はみられなかった。しかし、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いた実験では、高グルコース環境がDNA複製を抑制するとともに、DNAそのものに対する障害を引き起こすことが示されている⁶⁴⁻⁶⁷。この、異なった結果の背景には、網膜血管内皮細胞の部位特殊性、種の特異性も否定できないが、2-4週間に及ぶ長期の培養の後に有意差を認めていることから、高グルコース環境の暴露期間の差も大きいと考えられた。今回、高グルコース環境に4日間暴露した定常期の細胞に対しても検討したが、暴露グルコース濃度や濃度変化は細胞のチミジン取り込みに影響を及ぼさなかった。しかし、さらに長期にわたる試験期間の継続と、チミジンとの接触時間の延長により培養グルコース濃度そのものが培養網膜血管内皮細胞のDNA複製に有意の影響を及ぼすかもしれない。というのも、臨床例の統計学的解析において、血液グルコース濃度の長期の上昇が網膜症の発症と進展に大きく関与することが明らかとなり、その原因として糖化反応が注目されているからである⁶⁸。細胞に高い濃度のグルコースが長期に作用すると基底膜や細胞膜の蛋白に非酵素的糖化が生じ数時間でシッフ塩基、数日でアマドリ化合物、数週間で後期反応生成物(AGEs)が生じるとされる。AGEsの生物作用としては、酵素や細胞外基質の機能障害のような直接的なものと、AGEs受容体を介して血管内皮細胞の透過性の亢進やトロンボジェニシスの表出減少、サイトカインの産生調節等が知られている⁶⁹。従って、数週間にわたるの高グルコース培養でAGEsが産生され網膜血管内皮細胞の増殖能低下や物質透過性亢進が生じる可能性が高い。そこで、培養期間を2週間に延長して網膜血管内皮細胞のDNA複製への影響も調べたが、細胞の変形や細胞の剥離などにより結果のばらつきが大きく再現性も乏しいためにデータは示していない。今後、長期の高グルコース培養でも再現性のある結果が得られるような培養方法やAGEsを直接作用させる方法を用いて網膜血管内皮細胞のDNA複製への影響を検討

する必要がある。インスリンの網膜血管内皮細胞増殖刺激作用は既に報告されているが、グルコース濃度変化とインスリン刺激作用を同時に調べた報告はない⁶²。長期コントロール不良の糖尿病患者に、インスリンによる急激な血糖正常化がもたらされた場合に、増殖性変化が生じたり悪化したりすることが知られている⁷⁰⁻⁷⁴。この病態のモデルとして、培養グルコース濃度を変化させると同時に、インスリンを作用させて網膜血管内皮細胞のトリチウム取り込みを測定した。増殖期にある細胞では、グルコース濃度の上昇にとともにDNA複製が抑制され、グルコース濃度の正常化にもなって複製が増強されることが確認された。また、定常期の細胞においてもわずかではあるが、同様の効果が確認された。とはいえ、この結果を、直ちに臨床的にみられる病態と結びつけることはできない。なぜならば、高グルコース暴露の期間が実際の糖尿病網膜症の場合補比して著しく短期間であること、チミジン取り込みの暴露期間が24時間と短いこと、ウシ網膜由来培養細胞で検討していること、インスリン刺激濃度が生理的濃度の約100倍でありインスリンの作用でなくインスリン様成長因子の受容体を介する反応をみているかもしれないなど生体内で生じている病態とかけ離れている部分が多いからである。Kingらは培養グルコース濃度の上昇により細胞内に流入するグルコースが増加すると同時に網膜血管内皮細胞のProtein kinase Cの局在を細胞質から細胞膜に移動させ活性化が起こることを報告している^{75,76}。Protein kinase Cの活性化により細胞の分化や増殖、ホルモンに対する応答に変化が生じることが糖尿病の細小血管障害に関係があるかもしれない。比較的短期間の高グルコース培養とインスリン刺激の組み合わせで網膜血管内皮細胞への影響を検討した今回の実験では、この系を介する細胞の応答をとらえている可能性が考えられる。本論文で得られた結果が直ちに糖尿病網膜症の病態解明につながるものではないが、今後この実験モデルを用いる上での基礎データとしての価値は十分にある。この実験モデルをさらに発展させ、長期のグルコース暴露、AGEs、糖化コラーゲン、サイトカイン等による影響を調べることで、グルコースによる網膜血管内皮細胞増殖能への影響がより明らかになることが期待される。

V. まとめ

糖尿病網膜症の基本病態である、基底膜肥厚、透過性亢進、細胞増殖を網膜血管内皮細胞の培養系を用いて検討するためのモデルの作成を試みた。ウシ培養網膜血管内皮細胞の増殖と基底膜蛋白(IV型コラーゲン)産生を定量するモデルを作成し、高濃度インスリン刺激で有意に刺激されることが確認された。従来の報告どおり高グルコース培養で培養網膜血管内皮細胞のIV型コラーゲン産生が亢進した。ブタ培養網膜血管内皮細胞を半透膜に培養しFITCデキストランの透過量を測定した。網膜血管内皮細胞を用いた物質透過性実験の系はこれまで報告がなく今後有用なモデルとなり得る。インスリン刺激はFITCデキストラン透過を抑制し、高グルコース環境がインスリンの作用に対して抑制的に働いた。グルコース濃度の網膜血管細胞増殖に対する影響は、24時間のチミジン取り込みで検討した。非生理的な高濃度インスリンによる増殖刺激状態においては

グルコース濃度が高いとDNA複製量が低下した。増殖が刺激されていない場合にはグルコース濃度とDNA複製量に有意の関係はみられなかった。

本実験の結果を直ちに臨床に還元することはできないが、培養網膜血管内皮細胞を用いた網膜血管病変の検討を行う際の基礎データとしての価値は十分にある。今後、グリケーション、サイトカインに関する研究、薬剤の毒性の検討などに、今回作成した実験系が役立つことを期待する。

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...
16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...

VI. 文献

1. Dwyer MS, Melton, LJ, Ballard DJ, Palumbo PJ, Trautmann JC, Chu CP: Incidence of diabetic retinopathy and blindness. A population-based study in Rochester, Minnesota. *Diabetes Care* 8:316-322, 1985.
2. Maruo T, Ikebukuro N, Kawanabe K, Kubota N: Changes in cases of visual handicaps in Tokyo. *Jpn J Ophthalmol* 35:268-272, 1991.
3. Aiello LM, Rand LI, Sebestyen JG, Weiss JN, Bradbury MJ, Wafai BM, et al: The eyes and diabetes. In Marble A, et al (Eds): *Joslin's diabetes mellitus*. 12th Edt. Lea & Febiger, Philadelphia, 600-634, 1985.
4. 福田雅俊: 糖尿病性眼合併症とその病理. *糖尿病眼科学、医学書院、東京、35-66*, 1986.
5. Benson WE, Brown GC, Tasman W: *Diabetes and its ocular complications*. WB Saunders Company, Philadelphia, 1-197, 1988.
6. Davis MD: Vitreous contraction in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 74:741-751, 1965.
7. Early treatment diabetic retinopathy study research group: Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report Number 9 *Ophthalmology* 98:766-785, 1991.
8. Glaser BM, D'Amore PA, Michels RG, Patz A, Fenselau A: Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J. Cell Biol* 84:298-304, 1980.
9. Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK: Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells. *Exp Eye Res* 43:459-476, 1986.
10. Luty GA, Chandler C, Bennett A, Fait C, Patz A: Presence of endothelial cell growth factor activity in normal and diabetic eyes. *Curr Eye Res.* 5:9-17, 1986.
11. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309, 1989.
12. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359:843-845, 1992.
13. Simorre-Pinatel V, Guerrin M, Chollet P, Penary M, Clamens S, Malececa F, and Plouet J: Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:3393-3400, 1994.
14. Folkman J, Weisz PB, Joullie MM, Li WW, Ewing WR: Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 243:1490-1493, 1989.
15. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith S, D'Amore PA: An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4544-4548, 1989.
16. Sato Y, Rifkin DB: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of latent transforming growth factor- β 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109:309-315, 1989.
17. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J: Synthetic analogue of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 348:555-557, 1990.
18. Barr CC, Glaser JS, Blankenship G: Acute disk swelling in juvenile diabetes. Clinical profile and natural history of 12 cases. *Arch Ophthalmol* 98:2185-2192, 1980.
19. Pavan PR, Aiello LM, Wafai Z, et al: Optic disk edema in juvenile-onset diabetes. *Arch Ophthalmol* 98:2193-2195, 1980.

20. Patz A, Schatz H, Berkow JW, Gittelsohn AM, Ticho U: Macular edema-an overlooked complication of diabetic retinopathy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 77:34,1973.
21. Cogan DG, Kuwabara T: Retinal vascular patterns, 4 Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol* 66:366-378, 1961.
22. Speiser P, Patz A: Studies on diabetic retinopathy, 3 Influence of diabetes on intramural pericytes. *Arch Ophthalmol* 80:332-337, 1968.
23. Cunha-Vaz JG, Abreu JFR, Campos AJ, Figo GM: Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol* 59:649-656, 1975.
24. Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y: Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats. *Diabetes* 30:601-606,1981.
25. Roy MS, Podgor MJ, Rick ME: Plasma fibrinopeptide A, β -thromboglobulin, and platelet factor 4 in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 29:856-860,1988.
26. Akagi Y, Kador PF, Kuwabara T, Kinoshita JH: Aldose reductase localization in human retinal mural cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1516-1519, 1983.
27. Kinoshita JH: Aldose reductase in the diabetic eye. XLIII Edward Jackson memorial lecture. *Am J Ophthalmol* 102:685-692, 1986.
28. Li W, Khatami M, Robertson GA, et al: Nonenzymatic glycosylation of bovine retinal microvessel basement membranes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:884-892, 1984.
29. Tsilbary EC, Charonis AS, Reger LR, Wohlhueter RM, Furcht LT: The effect of nonenzymatic glycosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. *J Biol Chem* 263:4302-4308,1988.
30. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A :Advanced glycosilation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87:432-438,1991.
31. Haitoglou CS, Tsilbary EC, Brownlee M, Charinis AS: Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 267:12404-12407,1992.
32. Liversidge J, Sewell HF, Forrester JV: Interaction between lymphocytes and cells of the blood-retinal barrier; mechanisms of T lymphocyte adhesion to human retinal capillary endothelial cells and retinal pigment epithelial cells in vitro. *Immunology* 71:390-396,1990.
33. Kleinman HK, Murray JC, McGoodwin EB, et al: Connective tissue structure: Cell binding to collagen. *J Invest Dermatol* 71:9-11, 1978.
34. Kefalides NA, Apler R, Clark CC: Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int Rev Cytol* 61:167-228, 1979.
35. Murray JC, Stingl G, Kleinman HK, et al: Epidermal cell adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *J Cell Biology*, 80:197-202, 1979.
36. Pearlstain E, Gold LI, Garcia-Pardo A: Fibronectin: A review of its structure and biological activity. *Mol Cell Biochem* 8:103-128, 1980.
37. Leivo I, Alitalo K, Risteli L, et al: Basal lamina glycoproteins, laminin and type IV collagen are assembled into a fine-fibered matrix in cultures of teratocarcinoma derived endothelial cells line. *Exp Cell Res* 137:15-23, 1982.
38. Buzney SM, Massicotte SJ, Hetu S, Zetter BR: Retinal vascular endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:470-480, 1983.
39. 早川和久、北野滋彦、堀貞夫：ウシ網膜由来培養血管内皮細胞 一糖負荷による形態の変化—あたらしい眼科 5:931-936, 1988.

40. Gitlin JD, D'Amore PA: Culture of retinal capillary endothelial cells using selective growth media. *Microvasc Res* 26:74-80, 1985.
41. Mukai K, Rosai J, Burgdorf WHC: Localization of factor VIII related antigen in vascular endothelial cells using immunoperoxidase method. *Am J Pathol* 4:273-280, 1980.
42. Miller EJ: Biochemical characteristics and biological significance of the genetically distinct collagen. *Mol Cell Biochem* 13:165-192, 1976.
43. Sage H, Woodbury RG, Bornstein P: Structural studies on human type IV collagen. *J Biol Chem* 254:9893-9900, 1979.
44. Tryggvason K, Robey PG, Martin GR: Biosynthesis of type IV procollagens. *Biochemistry* 19:1284-1289, 1980.
45. Li W, Rockey H: Extracellular matrix production by cat retinal pigment epithelium in vitro: Characterization of type IV collagen synthesis. *Exp Eye Res* 38:291-304, 1984.
46. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
47. Bonner WM, Laskey RA: A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids on polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 46:83-88, 1974.
48. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.
49. Salomon DS, Liotta LA, Panneerselvan M, et al: Analysis of basement membrane synthesis and turnover in mouse embryonal and human A431 epidermoid carcinoma cells in serum-free medium, Eds Barnes DW, Sirbasku DA, Sato GH, *Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum free animal cell culture*:295-319, 1984. Alan R Liss Inc, New York .
50. Murta JN, Cunha-Vaz JG, Sabo CA et al: Microperfusion studies on the permeability of retinal vessels. A new model demonstrating organic anion transport and a reabsorptive fluid flux. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:471-480, 1990.
51. Tornquist P, Alm A, Bill A: Permeability of ocular vessels and transport across the blood-retinal barrier. *Eye* 4 (Pt 2) 303-309, 1990.
52. Hashida R, Amamizu C, Yagyu-Mizuno Y, Ohkuma S, Takano T: Transcellular transport of fluorescein dextran through an arterial endothelial cell monolayer. *Cell struct. Funct.* 11:31-42, 1986.
53. Cagliero E, Maiello M, Boeri D, et al: Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J Clin Invest* 82:735-738, 1988.
54. 森谷 茂樹: ヒト血管内皮細胞のIV型コラーゲン合成に及ぼすグルコースの影響. *糖尿病* 36:299-306, 1993.
55. Foidart M, Foidart B, Mahieu R: Synthesis of collagen and fibronectin by glomerular cells in culture. *Renal Physiol* 3:183-192, 1980.
56. Cuthbertson RA, Mandel TE: Pancreatic islet transplantation ameliorate the effect of diabetes on retinal capillary endothelial cells kinetics. *Cur Eye Res* 8:681-686, 1989.
57. Gamse G, Fromme HG, Kresse H: Metabolism of sulfated glycosaminoglycans in cultured endothelial cells and smooth muscle cells from bovine aorta. *Biochem Biophys Acta* 544:514-528, 1978.
58. Schwartz SM, Gajdusek CM, Selden SC: Vascular wall growth control: The role of the endothelium. *Arteriosclerosis* 1:107-126, 1981.

59. Wight TN, Kinsella MG, Potter-Perigo S: Proteoglycans synthesized and secreted by cultured vascular cells, Ed Hari Redd A, Extracellular Matrix: Structure and Function: 321-332, 1985. Alan R Liss Inc, New York
60. Vracko R: Basal lamina scaffold - Anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol* 77:314-338, 1974.
61. Kim Y, Kleppel M, Butkowski S, Mauer M: Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 138:413-420, 1991.
62. King GL: Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro and macrovessels. *J Clin Invest* 71:974-979, 1983.
63. King GL: Cell biology as an approach to the study of the vascular complications of diabetes. *Metabolism* 34:17-22, 1985.
64. Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S: Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. *Diabetes* 34:621-627, 1985.
65. Lorenzi M, Nordberg JA, Toledo S: High glucose induces DNA damage in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 77:322-325, 1986.
66. Lorenzi M, Montisano DF, Toledo S, Barrioux A: High glucose prolongs cell cycle traversal of cultured human endothelial cells. *Diabetes* 36:1261-1267, 1987.
67. Porta M, La Selva M, Bertagna A, Molinatti GM: High glucose concentration inhibit DNA synthesis and replication without causing death or impairing injury repair in cultured human endothelial cells. *Diabetes Res* 7:59-63, 1985.
68. The diabetes control and complication trial research group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986, 1993.
69. Brownlee M: Lilly lecture 1993 Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43:836-841, 1994.
70. Daneman D, Drash AL, Lobes LA, et al: Progressive retinopathy with improved control in diabetic dwarfism (Mauriac's syndrome). *Diabetes Care* 4:360-365, 1981.
71. Lawson PM, Champion MC, Canny C, et al: Continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) does not prevent progression of proliferative and preproliferative retinopathy. *Br J Ophthalmol* 66:762-766, 1982.
72. Lauritzen T, Larsen KF, Larsen HW, et al: Effect of one year of near normal blood glucose levels on retinopathy in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1:200-204, 1983.
73. 垂井清一郎: 長期間きわめて治療不全であった糖尿病患者における急速な血糖調節に伴う網膜症の変動。悪化。 *糖尿病* 27:743-745, 1984.
74. Funatsu H, Yamashita H, Ohashi Y, Ishigaki T: Effect of start of glycemia control on progression of diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 36:356-367, 1992.
75. Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL: Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5141-5145, 1989.
76. Lee TS, MacGregor LC, Fluharty SJ, King GL: Differential regulation of protein kinase C and Na⁺/K⁺-ATPase activities by elevated glucose level in retinal capillary endothelial cells. *J Clin Invest* 83:90-94, 1989.

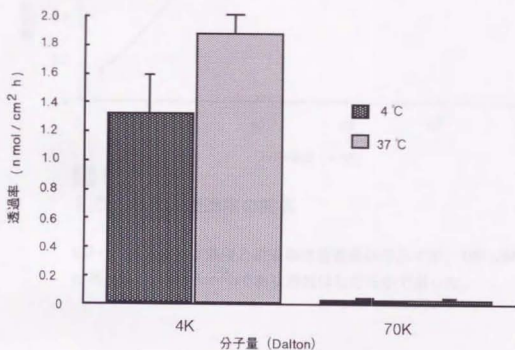


図5

混合セルロース膜（ミリセル）上の網膜血管内皮細胞を介する物質透過
分子量及び反応温度と透過率の関係

（平均±標準偏差 ; n=9）

70kDaでは反応温度に無関係に透過率は著しく低い。4kDaでは反応温度による影響は認められたが統計学的に有意ではなかった。

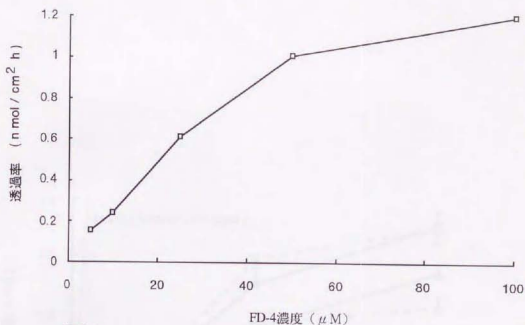


図6

FD 4 濃度と透過率の関係

6.2 - 50 μM までは濃度と透過率は直線関係を示すが、100 μM では透過率1.2nmol/cm²hであり増加はなだらかであった。

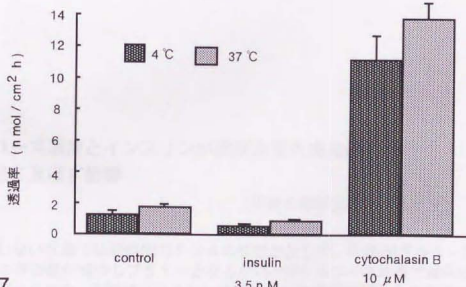


図7

網膜血管内皮細胞のFD 4透過に及ぼすサイトカラシンB、インスリンと反応温度の影響

(平均±標準偏差 ; n = 9)

サイトカラシンBは、約8倍に透過率を上昇させるが、反応温度による影響は見られない。インスリンは逆に透過率を約半分減少するがやはり反応温度による影響は有意でなかった。

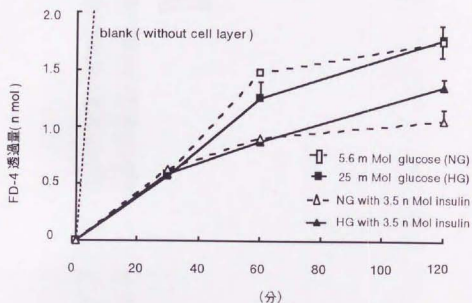


図 8

培養グルコース濃度とインスリンが網膜血管内皮細胞の
FD 4 透過に及ぼす影響

(平均±標準偏差 ; n = 9)

細胞を培養しない状態では短時間でFD 4の拡散が生じた。5.6mMグルコース培養では60分以降の透過量が減少しプラトーとなるが25mMグルコース培養では60分後も透過量の増加がみられた。3.5nMインスリンはグルコース濃度に関わらず有意に透過量を減少させた。



図 9

^{14}C プロリンラベル新生蛋白の精製物のフルオログラム
 (10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

Lane 1: 0.5 M 酢酸溶解後1.71 M NaCl での析出蛋白

Lane 2: 0.05M トリスバッファー(pH 7.4) 0.5M NaCl 析出蛋白
 220、200、170、140 kDa のバンドが認められる。

Lane 3: Lane 1 蛋白を抗IV型コラーゲン抗体で沈降反応された蛋白。
 140、200 kDa のバンドが認められ、Lane2 の精製物とよく一致する。



図10

IV型コラーゲンに対するウエスタンブロット

Lane 1: シグマ社精製IV型コラーゲン

140、120、100、90 kDa の陽性バンドが認められる。

Lane 2: ブタ網膜血管内皮細胞よりの抽出蛋白

120、60 kDa がみられる。

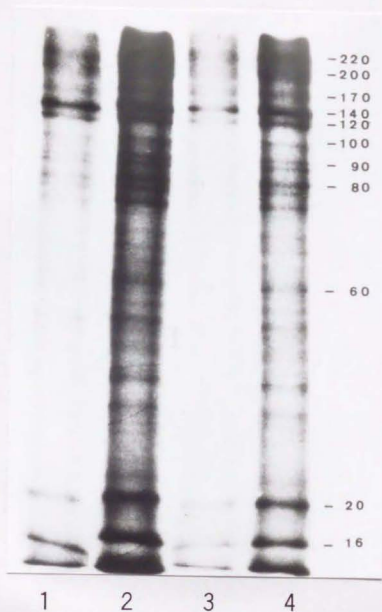


図11

¹⁴Cプロリンラベル新生蛋白

Lane 1 : 5.6 mMol グルコース培養

120、140kDa、と弱い200、170 kDa のバンドがみられる。

Lane 2 : 5.6 mMolグルコース + 35 nMol インシュリン

120、140kDa の他に90、80、20、16kDa、の低分子バンドがみられる。

Lane 3 : 25 mMol グルコース

主に140kDaのバンドが弱くみられる。

Lane 4 : 25 mMolグルコース + 35 nMol インシュリン

Lane 2と同様のバンドがみられるが全体に弱い。

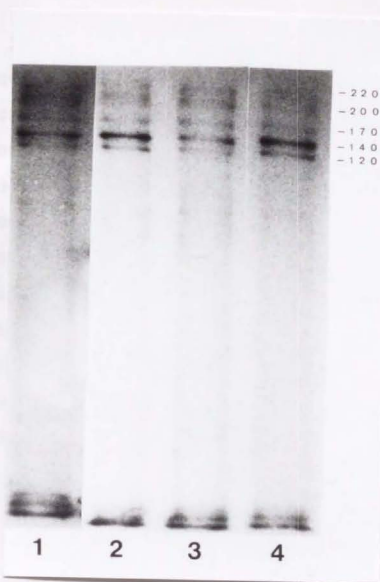


図12

ヒドロキシウレアでの増殖抑制下の ^{14}C プロリンラベル新生蛋白

Lane 1: 5.6 mMol グルコース培養

Lane 2: 5.6 mMolグルコース+ 35 nMol インシュリン

Lane 3: 25 mMol グルコース

Lane 4: 25 mMolグルコース+ 35 nMol インシュリン

増殖抑制を行わない場合と同様に120、140 kDa、と弱い200、170 kDaのバンドがみられる。

グルコース濃度やインシュリンにより新生コラーゲン様蛋白の質的变化は明らかでない。

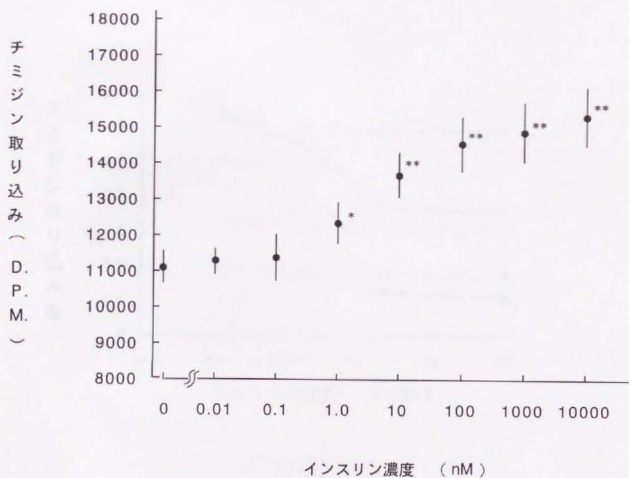


図13

インスリン濃度と網膜血管内皮細胞チミジン取り込み

インスリン濃度が1.0 nMよりチミジン取り込みが有意に増加した。以後のインスリン刺激実験には、3.5 nMを用いた。

(平均 ± 標準偏差 ; n = 6) * : p < 0.05, ** : p < 0.01

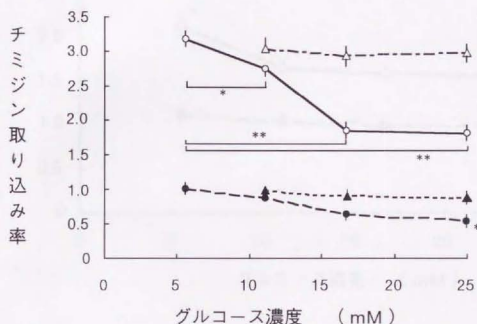


図14

対数増殖期細胞のチミジン取り込みへの影響
(グルコース濃度変化による)

△ : 35nMol インスリン刺激; マニトールの浸透圧変化をグルコース濃度で換算

○ : 35nMol インスリン刺激; グルコース濃度変化

▲ : インスリンなし; マニトールの浸透圧変化をグルコース濃度で換算

● : インスリンなし; グルコース濃度変化

(平均±標準偏差 ; n = 9)

インスリン刺激で約3倍のチミジン取り込み増加がみられ、グルコース濃度の増加でこの効果は抑制される。マニトールを用いてグルコースと同等の浸透圧上昇を作成した場合はインスリンの効果は抑制されない。インスリンの刺激がない場合でもグルコースを生理的濃度から上昇させるとチミジン取り込みは有意に減少した。(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

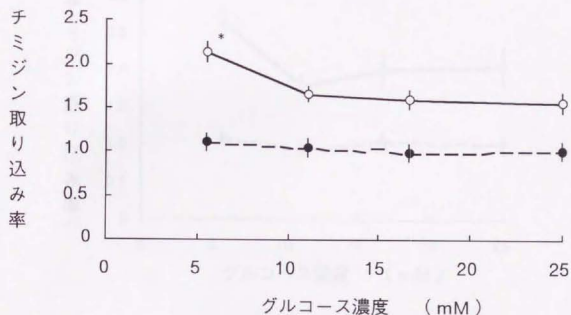


図15

対数増殖期細胞のチミジン取り込みへの影響
(25mMで24時間培養後グルコース濃度を下降)

● : 35nMol インスリン刺激

○ : インスリン刺激なし

(平均±標準偏差 ; n = 9)

2.5 mMグルコースで培養後インスリン刺激をおこなうと、チミジン取り込みは約2倍となる。この効果は、グルコース濃度の正常化により明かとなるが11.1 mMまでの低下では有意でない。インスリン刺激のない場合は、グルコース濃度の低下とチミジン取り込みに相関はみられない。 (* : $p < 0.05$)

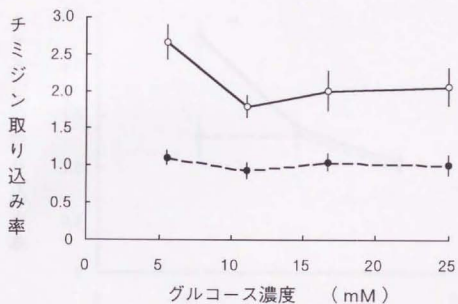


図16

定常期細胞のチミジン取り込みへの影響

(4日間5.6 mMで培養後グルコース濃度を上昇)

○ : 35nMol インスリン刺激

● : インスリン刺激なし

(平均±標準偏差 : n = 9)

定常期細胞はチミジン取り込みが少なく、グルコース濃度による影響も明かでない。35 nM インスリンでチミジン取り込みの2倍化がみられるが、グルコース濃度上昇による影響は有意でない。

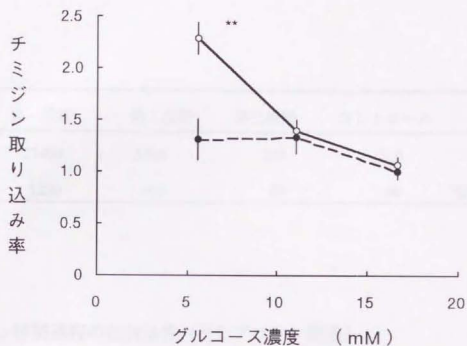


図17

定常期細胞のチミジン取り込みへの影響

(4日間2.5 mMで培養後グルコース濃度を下降)

○ : 35nMol インスリン刺激

● : インスリン刺激なし

(平均±標準偏差 ; n = 9)

インスリン刺激がない場合は、グルコース濃度の変化はチミジン取り込みに影響しない。2.5 mMグルコースで4日間培養の後に、グルコース濃度を11.1 mMまで低下させてもインスリン刺激に反応しないが、5.6 mMまで低下させるとチミジン取り込みの有意の増加がみられる (** : $p < 0.01$)。

	第一段階	第二段階	第三段階	コントロール	
^{14}C	27490	5700	250	210	平均
	1230	640	20	40	標準危険率

n = 6

表 1 : 精製過程の放射活性 (^{14}C プロリン 標識)

第一段階 : 1.71M NaClで析出したものを0.5 M酢酸溶液で溶出

第二段階 : 第一段階を0.05 Mトリス緩衝液 (pH7.4) で透析後の遠沈上清

第三段階 : 第二段階を0.1M酢酸で透析後の遠沈上清

0.1M酢酸をコントロールとした。単位は 核崩壊/分

	インスリンなし	インスリン (35 nMol)	
低グルコース (5.6 mM)	1399 (87.8)	1604 (130)	P< 0.05
高グルコース (25 mM)	1537 (87.7)	1744 (160)	P< 0.05
	P< 0.05	ns	

(最終精製物の放射活性を総取り込み活性で補正) 平均 n=6
(標準危険率)

表2：新生IV型コラーゲン量 (^{14}C プロリン標識) への
培養グルコース濃度とインスリン刺激の影響

インスリン刺激を行わない場合には25mMグルコース培養で有意に新生IV型コラーゲンの増加がみられる。グルコース濃度に関わらず35nMインスリンにより新生IV型コラーゲンの増加がみられる。

	インスリンなし	インスリン (35 nMol)	
低グルコース (5.6 mMol)	386 (57)	791 (52)	P<0.05
高グルコース (25 mMol)	486 (23)	689 (46)	P<0.05
	N S	N S	

n = 6

平均
(標準危険率)

(最終精製物の放射活性を総取り込み活性で補正)

表3：新生IV型コラーゲン量 (^{14}C プロリン標識) への
培養グルコース濃度とインスリン刺激の影響
1.0 mMol ヒドロキシウレアにより増殖抑制

ヒドロキシウレアによる増殖抑制を行っても35nMインスリンは新生IV型コラーゲン量を有意に増加させた。高グルコース培養の方が新生IV型コラーゲン量が多い傾向があったが有意差は認めなかった。



平論製本
ヤマザキ
社(株) 2958 1681



Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak