

氏名(本籍)	た ち よう いち 田 地 陽 一 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,930 号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医 学 研 究 科		
学位論文題目	高グルコース濃度下における血管平滑筋細胞のグルタチオンレドックスサイクルに関する研究		
主査	筑波大学教授	医学博士	小 山 哲 夫
副査	筑波大学教授	医学博士	山 本 雅 之
副査	筑波大学教授	医学博士	杉 下 靖 郎
副査	筑波大学教授	医学博士	田 中 直 見
副査	筑波大学助教授	理学博士	石 井 哲 郎

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

糖尿病の重要な合併症である糖尿病性血管障害の成因は多彩であり、非酵素的糖化によるもの、あるいはポリオール代謝の亢進とミオイノシトール代謝異常の相互関係で糖尿病合併症の発症メカニズムを捉え、これらの代謝異常が糖尿病合併症を発症させるとの説などがある。後者のメカニズムには浸透圧仮説、 Na^+/K^+ ATPase 活性低下説、レドックスサイクル偏位説、などが提唱されている。

スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) などの反応性の高い活性酸素種 (reactive oxygen species) は、エネルギー代謝の過程、生体防御機構の中で細胞内外で発生しており、細胞ならびに組織障害を惹起する。生体内で発生した H_2O_2 の生理的濃度における分解は主にグルタチオンレドックスサイクルにより行われる。グルタチオンレドックスサイクルは還元型グルタチオン、酸化型グルタチオン、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオンレダクターゼ、NADPH などで構成され、これら構成要素のいずれかが障害を受けると、サイクル全体の機能は低下する。糖尿病において赤血球、血管内皮細胞において、このグルタチオンレドックスサイクルの機能低下が報告され、糖尿病性血管合併症との関連が示唆されているが、不明点が多い。

本研究は、糖尿病における高血糖 (高グルコース濃度) が血管平滑筋細胞のグルタチオンレドックスサイクルに及ぼす影響を明らかにする目的で以下の検討をおこなった。

- 1) 培養血管平滑筋細胞を用いて、高グルコース濃度のグルタチオンレドックスサイクルに及ぼす影響について検討した。また、あわせて血管内皮細胞でも同様の検討を行った。
- 2) インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) モデル動物の大動脈を用いて、糖尿病による高血糖と血管グルタチオン含有量の関係について検討した。

(実験方法)

1. 培養細胞における検討

ヒト大動脈由来の培養血管平滑筋細胞を用いて、高グルコース濃度下で7日間培養し、グルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 除去能の測定、細胞内グルタチオンの定量、細胞内NADPH含量の定量、細胞内から細胞

外へのグルタチオンefflux系の解析，細胞内へのシスチン取り込み活性の解析などの検索をおこなった。血管内皮細胞では，グルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 除去能の測定，細胞内グルタチオンの定量をおこなった。

2. 動物実験における検討

NIDDMのモデル動物であるOtuka Long-Evance Tokushima Fatty (OLETF) ラットの雄とそのコントロールモデルであるLong-Evance Tokushima Otuka (LETO) ラットの雄の大動脈を用いて，血管グルタチオン含有量を測定し，in vivo における高グルコース濃度の影響を検索した。また血糖値と血管グルタチオン含有量の相関関係なども検討した。

(結果と考察)

1. 培養細胞における検討

1 週間の高グルコース濃度培養により，グルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 除去能が血管内皮細胞において低下することが報告されている。しかし本研究では，1 週間，2 週間の高グルコース濃度培養によるグルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 除去能を検討したが，有意な変化は認められなかった。また，高グルコース濃度培養による細胞内グルタチオン含有量の変化も検討したが，有意差は認められなかった。これらの結果から，高グルコースは，血管内皮細胞におけるグルタチオンレドックスサイクルの機能に大きく影響しないことが示唆された。

一方，血管平滑筋細胞におけるグルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 の除去能におよぼす培養液グルコース濃度の影響を検討したところ，7 日間の高グルコース暴露により， H_2O_2 除去能がグルコース濃度依存性に有意に低下するという結果を得た。また，この H_2O_2 除去能低下の原因の一部は細胞内グルタチオン含有量の低下であり，さらに細胞内グルタチオン含有量低下は細胞内へのシスチンの取り込み低下に起因する可能性が示唆された。これらの結果より，血管平滑筋細胞のグルタチオンレドックスサイクルの機能は高グルコースにより低下することが示された。

2. 動物実験における検討

高グルコース条件の in vivo におけるモデルとして，高血糖をきたしたOLETFラットの血管グルタチオン含有量の検索を行ったが，コントロール群に対して有意な差は認められなかった。しかし，糖尿病発症後の高血糖をきたした高グルコース群において，血糖値と血管グルタチオン含有量にマイナスの相関関係が見られた。これは血管平滑筋細胞を用いた in vitro の検索において，グルコース濃度依存性に細胞内グルタチオン含有量が低下した結果と矛盾しないものであった。よって，生体内においても血糖値の上昇に伴い血管グルタチオン含有量が低下し，グルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 除去能が低下する可能性が示唆された。

(結論)

血管内皮細胞において，高グルコース濃度は，グルタチオンレドックスサイクルに大きな影響を与えない。血管平滑筋細胞において，グルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 の除去能は，グルコース濃度依存性に有意に低下した。また，この H_2O_2 の除去能低下の原因は細胞内グルタチオン含有量の低下に起因し，さらに細胞内グルタチオン含有量低下は，細胞内へのシスチンの取り込み低下による可能性が示唆された。よって，血管平滑筋細胞において，高グルコース濃度は，グルタチオンレドックスサイクルの機能を低下させることが示唆された。

糖尿病モデル動物において，糖尿病発症後の高血糖をきたした高グルコース群では，血糖値の上昇に伴い血管グルタチオン含有量が低下する可能性が示唆された。

以上により糖尿病性血管障害の成因に血管平滑筋細胞におけるグルタチオンレドックスサイクルの機能低下が関与する可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

糖尿病の重要な合併症である糖尿病性血管障害の成因は多彩である。著者は血管内皮細胞，血管平滑筋細胞におけるグルタチオンレドックスサイクル依存性 H_2O_2 の除去能について培養系および糖尿病自然発症ラットモデル動物の系を用いて検討し，血管平滑筋細胞ではグルコース濃度依存性に有意に低下することを示した。これらの結果は，高血糖による血管内皮細胞の障害の成因の一つとして，隣接する血管平滑筋細胞における H_2O_2 除去能の低下が関与している可能性が示唆された。高血糖における血管平滑筋細胞のグルタチオンレドックスサイクル機能低下の報告はなく，価値の高い論文である。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。