

用いて、細胞個々の Ca^{2+} 応答と、血管組織片の局所的な収縮・弛緩反応を同時に評価可能であるかどうかについて検討を行った。血管組織片に 30 nM のフェニレフリンを適用すると、組織片の収縮に伴った内皮細胞の移動が認められた。この状態で 100 nM のアセチルコリンを適用すると内皮細胞はフェニレフリンの適用時とは逆方向に移動した。またこの移動に先行して内皮細胞の Ca^{2+} 応答が認められた。さらに、アセチルコリンを除去すると再び収縮方向に内皮細胞が移動し、最後にフェニレフリンを洗浄すると、内皮細胞は弛緩方向に移動した。以上の結果より、自作のチャンバーを用いて、動画から個々の内皮細胞の Ca^{2+} 応答と、血管組織片の局所的な収縮・弛緩反応を同時に評価可能であると判断した。収縮反応の定量的な評価は、それぞれの血管組織片について、50 nM のフェニレフリン適用を行い、その時の移動距離に対する各試薬の適用による移動距離の割合を収縮率 (%) として表した。

(2-2) 流れ刺激存在下、LPA により誘発される血管組織応答

流れ刺激存在下で LPA を適用した時に誘発される内皮細胞の Ca^{2+} 応答に引き続いて起こる組織応答が収縮反応であるか弛緩反応であるかについて検討を行った。流れ刺激 20 dyne/cm² では 3 μ M LPA により、40 dyne/cm² では 1 μ M LPA により内皮細胞の反復性のカルシウム応答の後にフェニレフリン適用時と同様の組織片の移動が認められた (図 8)。また、この時には平滑筋細胞層における Ca^{2+} オシレーション頻度の上昇が認められた。ことから、収縮応答が生じることが明らかとなった。内皮細胞の Ca^{2+} 応答とその後の血管組織の収縮反応は、LPA 濃度及び流れ刺激強度に依存して増大した。

(2-3) 流れ刺激存在下、LPA により誘発される血管収縮反応のメカニズム

薬理的な検討により、LPA により誘発される血管収縮反応は、トロンボキサン A₂/プロスタグランジン H₂ 受容体阻害薬である SQ-29548 の適用 (収縮率: 16.2 \pm 3.0% . p<0.01. Student *t* test. n=3) およびトロンボキサン A₂ 合成系の合成酵素阻害薬である OKY-046 (収縮率: 32.9 \pm 4.9%. p<0.05. Student *t* test. n=3) 並びにアスピリンの前処置 (収縮率: 23.3 \pm 7.2%. p<0.05. Student *t* test. n=3) によりほぼ完全に抑制された。これらの阻害薬は、内皮細胞の Ca^{2+} 応答には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、LPA は、流れ刺激存在下で、内皮細胞の Ca^{2+} 応答を介してトロンボキサン A₂/プロスタグランジン H₂ の産生・遊離を促進し、これらの物質による血管組織の収縮反応を誘発することが示唆された。

(2-4) 流れ刺激存在下、LPA により誘発される内皮細胞傷害

流れ刺激存在下で LPA が誘発する血管反応のもう一つの可能性として、内皮細胞傷害について検討したデータを示す (図 9)。流れ刺激存在下で LPA を適用すると高濃度の LPA (3 μ M) が高い流れ刺激 (20 or 40 dyne/cm²) と共に内皮細胞に適用されたときに、内皮細胞の傷害とともに蛍光指示薬の細胞外漏出が認められた。LPA により傷害を受けていない内皮細胞の Ca^{2+} 応答が上昇下降を繰り返すオシレーションであるのに対して (図 9 C), 傷害された内皮細胞では、細胞傷害直前に比較的長時間の持続的な Ca^{2+} 上昇が認められた (図 9 D)。以上の結果から、高濃度の LPA は強い流れ刺激が負荷された条件では一部の内皮細胞に対して傷害的に作用し、その傷害メカニズムには Ca^{2+} 応答の持続的な増強が密接に関与することが示唆された。

D. 考 察

アポトーシス刺激時の細胞内情報伝達で重要

な役割を果たしているカスパーゼについて、細胞内オルガネラ内での活性化をイメージで捉え、解析するためのプローブ開発を行った。

核内でのカスパーゼの活性化については、カスパーゼ3は核膜を透過すると考えられることから、核内での活性化の検出は予想される場所であった。核内、細胞質への各局在化プローブを用いて活性化のタイミングを調べてみると、全ての細胞で核内の活性化が細胞質に数分遅れて生じることが明らかとなった。その原因としては、1) 活性型カスパーゼ3そのものの細胞質から核への拡散、2) カスパーゼ3活性化の連鎖の核への伝播、3) カスパーゼ3を活性化する酵素の核への拡散、等が核膜によって妨げられることによるものと考えられる。ただし、現在までのところ、細胞質内あるいは核内のおのおのでは、活性化のタイミングには部位差は見出されていない。したがって、細胞質内あるいは核内での活性化の伝播は極めて速いと考えられることから、恐らく核膜を障壁としてカスパーゼの拡散の遅れというより活性化の伝播の遅れが主な要因と考えられる。

ミトコンドリア内カスパーゼ活性化については、ミトコンドリア内にはそもそもカスパーゼが存在しないという報告、あるいはカスパーゼは存在するが活性化されると細胞質に放出されるという報告等、意見がわかれている。本研究では、ミトコンドリア内のカスパーゼ活性化を示唆する結果は得られなかった。またミトコンドリア内カスパーゼ活性化プローブの蛍光変化が捉えられていなかった可能性を考え、さらに、ミトコンドリア局在プローブを発現させた細胞をアポトーシス刺激し、ミトコンドリアを単離し、SDS-PAGEによってプローブ断片の解析を行ったが、カスパーゼによって切断された断片は検出されなかったという結果(未発表データ)によっても、この結果は確認された。小胞体においても、ミトコンドリア同様にアポトーシス

刺激を加えても、カスパーゼの活性化を示唆するシグナル変化は検出されなかった。これらの結果はミトコンドリア及び小胞体におけるカスパーゼの活性化を否定するものである。

$[Ca^{2+}]_i$ 、 pH_i 及びNOのマルチカラーイメージングは、本研究グループの確立した極めてユニークな解析系であるが、この解析系を用いて、大動脈標本において、血管内皮細胞に流れ刺激を加えながらLPAを添加すると、血管収縮が生じるとともに血管内皮細胞に細胞傷害が起こることが観察された。その原因としては、LPA刺激によって血管内皮細胞内 Ca^{2+} が上昇するとともに、トロンボキサン A_2 /プロスタグランジン H_2 の産生・遊離が生じることが示されるとともに、さらに内皮細胞内 Ca^{2+} の大きな上昇によって細胞傷害が生じることが示唆された。血液中ではLPAは時によって本実験条件と同程度の濃度まで上昇することも想定され、この現象と循環器系疾患との係りが注目される。

E. 研究成果

1. T. Suzuki, T. Nishimaki-Mogami, H. Kawai, T. Kobayashi, Y. Shinozaki, Y. Sato, T. Hashimoto, Y. Asakawa, K. Inoue, Y. Ohno, T. Hayakawa, and T. Kawanishi; Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using GFP derivatives, *Phytomedicine* (in press)
2. H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, H. Sakurai, H. Ohata, K. Honda, K. Momose, I. Namekata, H. Tanaka, K. Shigenobu, R. Nakamura, T. Hayakawa, and T. Kawanishi; Simultaneous real-time detection of initiator and effector caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol.Sci.* (in press)
3. H. Tanaka, C. Komikado, H. Shimada, K. Takeda, I. Namekata, T. Kawanishi, K. Shigenobu; The R(-)-Enantiomer of

Efonidipine Blocks T-type but Not L-type Calcium Current in Guinea-Pig Ventricular Myocardium, *J Pharmacol. Sci.*, **96**, 499-501 (2004)

4. H. Kawai, T. Suzuki, T. Kobayashi, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Kawanishi. Simultaneous imaging of initiator / effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1693**, 101-110 (2004)
5. T. Hashimoto, H. Ohata, and K. Momose. Itch-scratch response induced by lysophosphatidic acid in mice. *Pharmacology* **72**, 51-56 (2004).
6. 大幡久之, 新岡丈治, 金明淑, 安藤さなえ, 山本雅幸, 百瀬和享メカノセンシタイザーとしてのリゾホスファチジン酸の役割, 日本薬理学雑誌 **124**, 329-335 (2004).
7. 川西 徹, 河合 洋: 細胞傷害機構のイメージング, 実験医学 **22**, 428-429 (2004)

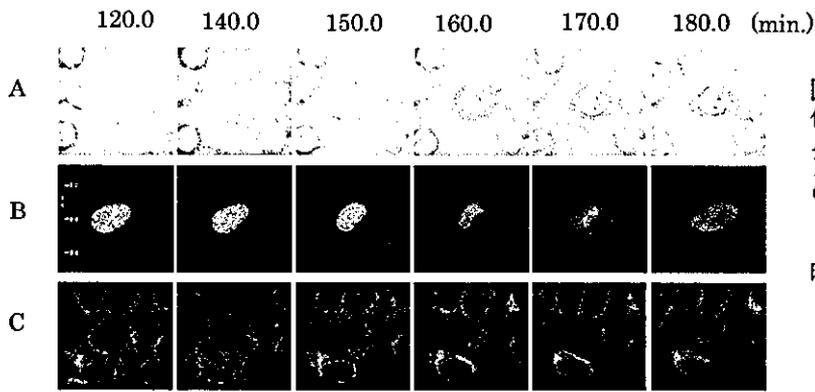


図2. NLS-CYを用いた核内カスパーゼ活性化のイメージング
 A: ノーマルスキー微分干渉像
 B: 蛍光強度比の疑似カラー像
 C: ミトコンドリア膜電位 (テトラメチルローダミンメチル エステルの取り込み)
 時間はTNF- α 処置後の時間経過

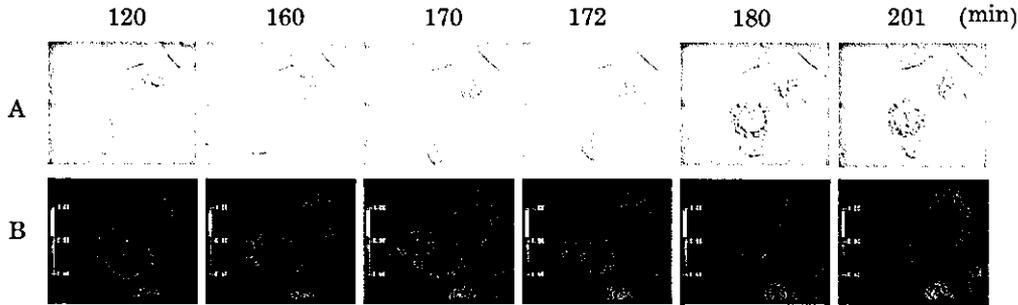


図3. NES-GRを用いた細胞質カスパーゼ活性化のイメージング
 A: ノーマルスキー微分干渉像
 B: 蛍光強度比の疑似カラー像
 時間はTNF- α 処置後の時間経過

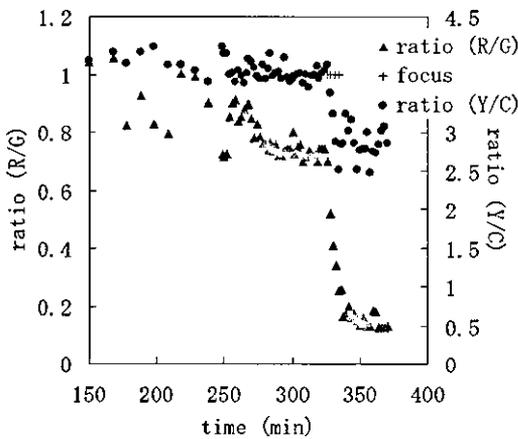


図4. 単一細胞中の細胞質および核のカスパーゼ活性化の同時検出

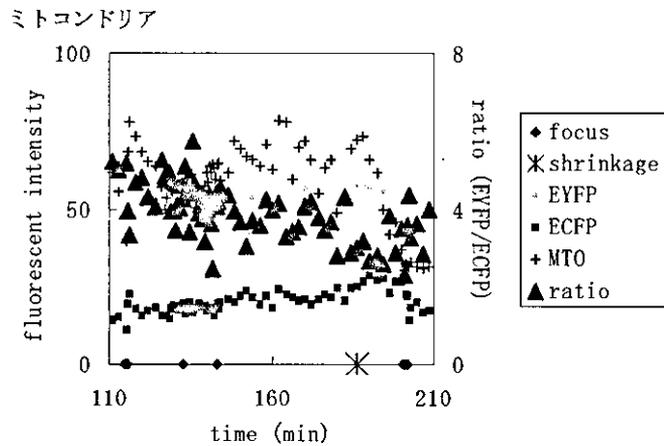


図5. ミトコンドリア内のカスパーゼ活性化 MTO MitoTrackerOrange, *:shrinkage:形態変化

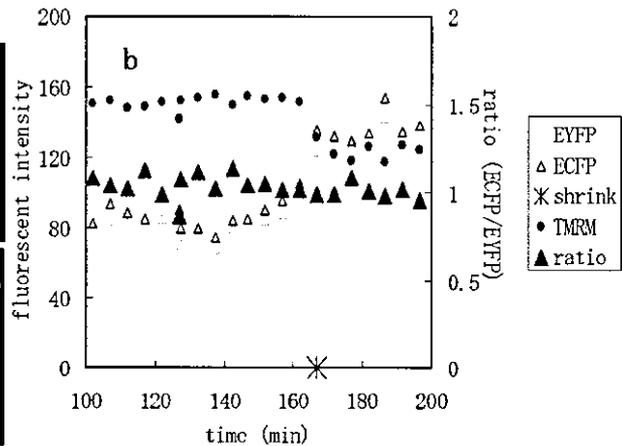
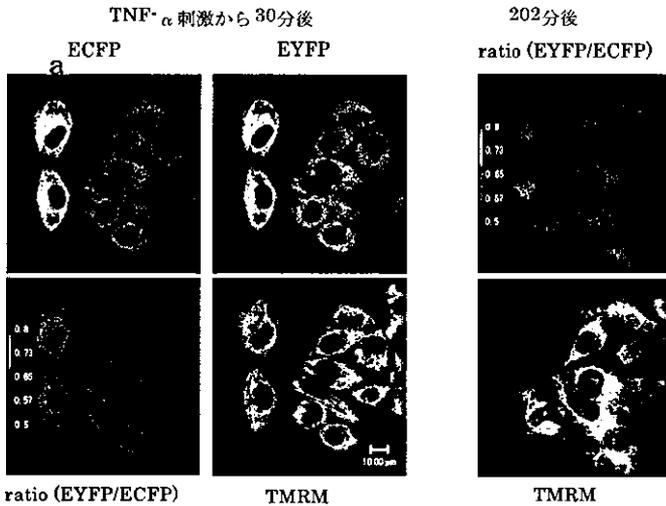


図6. ER-CYを用いた小胞体カスパーゼ活性化のイメージング
 a. 各イメージング
 b. TNF- α 曝露細胞における蛍光強度および蛍光強度比変化のプロット

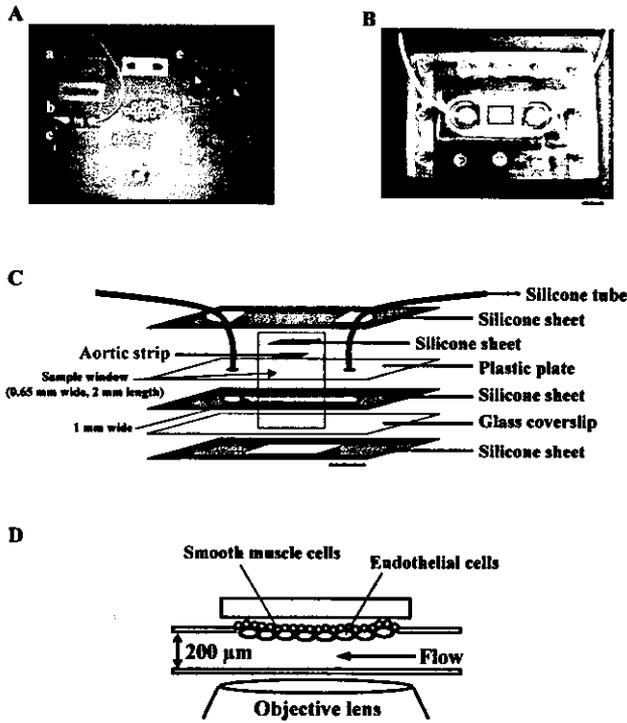


図1. 平行平板型チャンバー
 A. 写真は部品を示している (a: シリコンシート; b: プラスチック板; c: カバーガラス; d: スクリュー、ナット、ワッシャー; e: クロロエチレン板)
 B. 完成品の写真
 C. 各部品の略図
 D. 大動脈組織は蛍光プローブを取り込ませ対物レンズ側に内皮細胞を向けてプラスチック板に固定する。
 バーは10mmを示す。

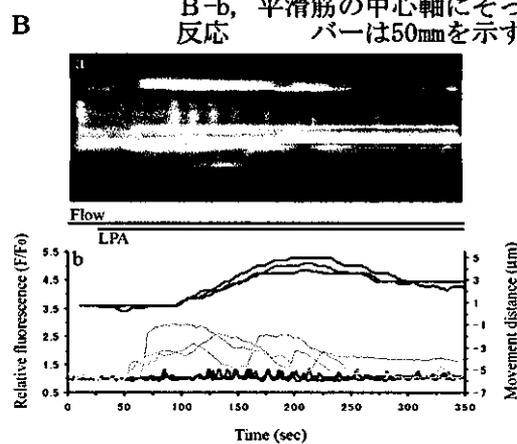
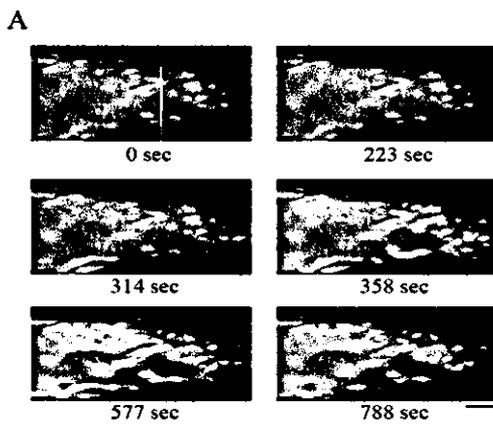


図7. 流れ刺激下でLPAによって引き起こされたCa²⁺反応および内皮の動き
 A. LPA 3mM の存在下40dyne/cm²の流れ刺激存在下で発生した大動脈組織の内皮細胞および平滑筋のCa²⁺反応のイメージング。
 B-a. x-t 蛍光イメージング
 B-b. 平滑筋の中心軸にそった内皮の動きとCa²⁺反応
 バーは50μmを示す。

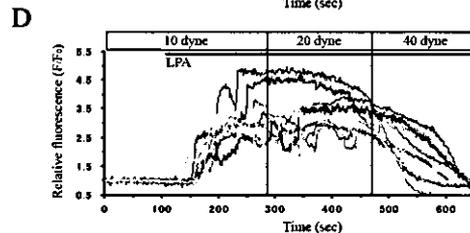
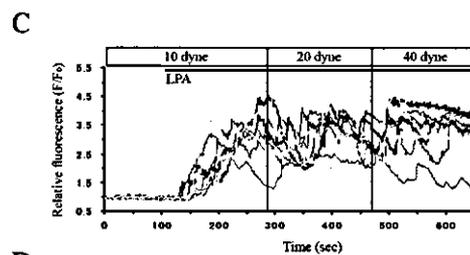
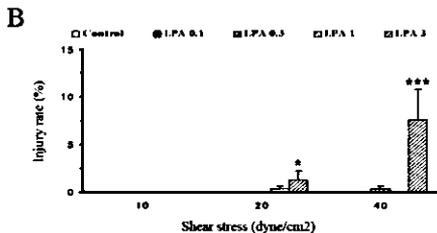
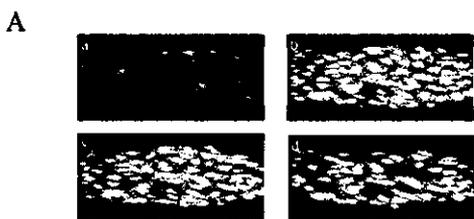


図8. LPAと流れ刺激による内皮細胞傷害

A. LPA 3mM の存在下40dyne/cm²の流れ刺激存在下で発生したマウス大動脈組織の内皮細胞および平滑筋のCa²⁺反応のイメージング (a, LPA適用前; b, 10dyn/cm²刺激後; c, 20dyn/cm²刺激後; d, 40dyn/cm²刺激後)
 B. 傷害をうけた細胞の割合 (例数=5) *p<0.05, ***p<0.001 ANOVA-Dunnet
 C. 正常血管内皮細胞のCa²⁺反応
 D. 傷害血管内皮細胞のCa²⁺反応

標識モノクローナル抗体による神経障害防御機構の解析と診断治療への応用

分担研究者 新井孝夫 東京理科大学理工学部応用生物科学科教授
研究協力者 黒岩憲二 東京理科大学理工学部応用生物科学科助手

研究要旨

ペルオキシナイトライトによる神経障害により誘導される細胞死を防御する物質ネオエキヌリン A の作用機構を調べ、この物質が細胞内に存在するシグナル伝達系のタンパク質を標的とする可能性を示唆する結果を得た。また、脂質過酸化物質 4-ヒドロキシノネナール (HNE) による神経細胞死の際に、 α -チューブリンが HNE 修飾の標的となっていることを明らかにした。

A. 研究目的

分担研究者と協力者は、ペルオキシナイトライトによる神経障害により誘導される細胞死の防御作用を有する物質のスクリーニング系を確立し、微生物代謝産物ネオエキヌリン A がペルオキシナイトライトによる神経障害を特異的に防御することを明らかにした。また、この物質はペルオキシナイトライト消去能をもつが、神経障害の防御にはこの物質による細胞の抵抗性を高める作用が重要であることを示してきた。一方、活性酸素による膜障害に構成する脂質の過酸化物質 4-ヒドロキシノネナール (HNE) が産生され、この物質が神経細胞死を誘導することが報告されている。

本年度の目標は、ネオエキヌリン A の神経細胞障害防御の際の標的物質と HNE 誘導神経細胞障害の際の標的物質を同定することである。

B. 研究方法

ネオエキヌリン A の作用機構は、前処理後にこの物質を除去してからペルオキシナイトライト発生剤である SIN-1 を添加する方法により調べた。また、ネオエキヌリン A の作用時間を変える

ことにより、標的物質の存在が細胞表面か細胞内かを調べた。さらに、標的物質の探索の目的で、ビオチン化ネオエキヌリン A を合成した。

HNE を初代培養細胞・3Y1 細胞・分化 PC12 細胞に添加して、細胞死の誘導を調べた。また、再構成微小菅より調製したチューブリンに HNE を加え、その重合に与える影響を調べた。さらに、HNE 修飾チューブリンをマウスに免疫し、ハイブリドーマを作製した。まず、HNE-修飾チューブリンと反応し、未修飾チューブリンに反応しない抗体を選択した。次いで、競合 ELISA 法により、修飾アミノ酸に対する反応特異性を調べた。

なお、生細胞数は細胞数計測キット (kit-8) をもちいて測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学実験施設の指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. ネオエキヌリン A の作用機構の研究

神経障害防御作用は、SIN-1 の添加前にネオエキヌリン A を 6 時間処理した時は認められず、12 時間以上処理した時に認められた (図 1)。6

時間処理後にネオエキヌリン A を除去し、SIN-1 を加えるまでにさらに6時間インキュベーションしたところ、神経障害防御作用が認められた (図 2)。すなわち、この物質は6時間以上の反応により細胞内に存在する標的物質と結合し、その後の6時間以上のインキュベーションによりシグナル伝達系が活性化されている可能性が示唆された。

標的物質を探索するため、ビオチン化ネオエキヌリン A を合成した。図 3 に示したように、このビオチン化物質はネオエキヌリン A とほぼ同等の神経障害防御作用を示した。現在、このビオチン化物質をもちいて、標的物質の同定を行っている。

2. HNE に誘導される神経細胞死における微小管障害の研究

高濃度の HNE は神経細胞死を誘導する。これに対し、低濃度の HNE が神経突起の変性を引き起こすとともに微小管を脱重合させることを、蛍光免疫染色法により示した。図 5 は、HNE が試験管の系において、微小管重合を阻害することを明らかにしたものである。チューブリンが HNE で修飾される可能性を調べるために、HNE 修飾チューブリンに対するモノクローナル抗体を作製した (図 5)。チューブリンとは反応せず HNE・チューブリンに特異的に反応する抗体を4種類得た。これらの抗体の修飾残基特異性を競合 ELISA 法で調べたが、いずれも残基特異性は認められなかった。これらの抗体をもちいることにより、細胞に HNE を添加した時、 α -チューブリンが HNE 修飾のよい標的となることが示された。

D. 考察

ネオエキヌリン A の作用には6時間以上の反応とその後の6時間以上のインキュベーションが必要である。すなわち、ネオエキヌリン A の標的物質は、シグナル伝達系の細胞内たんぱく質であることが示唆される。ビオチン化ネオエキヌリン A

がもとの物質と同程度の神経障害保護作用を示したことは、これが標的物質の同定に有用であることを示している。

HNE は神経突起を変性させ、微小管を脱重合させるとともに、試験管内の微小管重合を阻害する。一方、HNE を細胞に添加すると、 α -チューブリンが選択的に HNE 修飾される。これらのことは、 α -チューブリンの HNE 修飾が原因で、微小管が脱重合し、神経突起が変性すると考えられる。

E. 結論

ネオエキヌリン A の標的物質はシグナル伝達系の細胞内たんぱく質である可能性が強く示唆された。また、ビオチン化ネオエキヌリン A がネオエキヌリン A と同程度の神経障害防御作用を示すことから、標的物質の同定に有用であると思われる。一方、HNE による神経突起の変性と微小管脱重合は、HNE が α -チューブリンを修飾し、その重合を抑制した結果であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maruyama, K., Ohuchi, T., Yoshida, K., Shibata, Y., Sugawara F. and Arai, T. (2004) Protective properties of neoechinulin A against SIN-1-induced neuronal cell death. *J. Biochem. (Tokyo)* 136: 81-87.
- 2) 新井孝夫 (2004) モノクローナル抗体をもちいたポリグルタミン酸化チューブリンの神経細胞内局在、*実験医学*、22: 1876-1877.
- 3) Okada, Y., Suzuki, A., Takagi S., Hirai, H., Saitoh R., Adachi, A., Yanagisawa, T., Ueki M., Fujii T. and Arai, T. Polyglutamylation of tubulin during differentiation of neural precursor cells. *Bioimages* (in press)

2. 学会発表

- 1) 小久保潤、吉田健二、新井孝夫：脂質過酸化反応産物 4-hydroxynonenal の微小管重合に対する影響、第 57 回日本細胞生物学会大会、大阪、2004 年 5 月
- 2) 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男：血管炎における活性化好中球の CD69 分子、15 回日本生体防御学会、長崎、2004 年 7 月
- 3) 木本匡昭、青木俊明、倉持浩司、柴田康史、丸山清稔、大内敬、黒岩憲二、小林進：neoechinulin A 及び構造類縁体の、分化 PC12 細胞に対する保護作用と細胞毒性、第 77 回日本生化学会大会、横浜、2004 年 10 月
- 4) 小久保潤、岡田陽介、黒岩憲二、新井孝夫：脂質過酸化反応産物 4-hydroxynonenal の微小管に対する影響、第 13 回日本バイオイメージング学会学術集会、京都、2004 年 11 月
- 5) 山岸舞、村山研、坂本明彦、新井孝夫、鈴木和男、船津高志：好中球の活性化に伴う CD69 分子の細胞膜表面移行のイメージング、第 13 回日本バイオイメージング学会学術集会、京都、2004 年 11 月
- 6) 塚田充泰、小久保潤、黒岩憲二、新井孝夫：アストログリア細胞の分子マーカーとなるモノクローナル抗体の作製、第 13 回日本バイオイメージング学会学術集会、京都、2004 年 11 月
- 7) 新井孝夫：ペルオキシナイトライトにより誘導される神経細胞死に対するネオエキヌリン A の防御作用、ナノメディシン公開シンポジウム「ナノバイオイメージングで切り開く先端的生体機能解析—血管炎と微小循環血流障害における分子生理機能を解き明かす—」、東京、2004 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

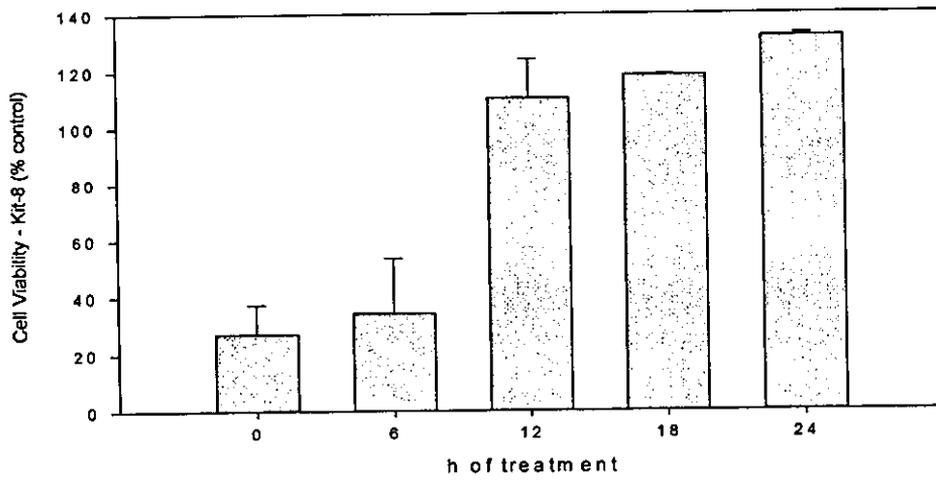


図1 ネオエキヌリンAの神経障害防御作用の前処理時間依存性

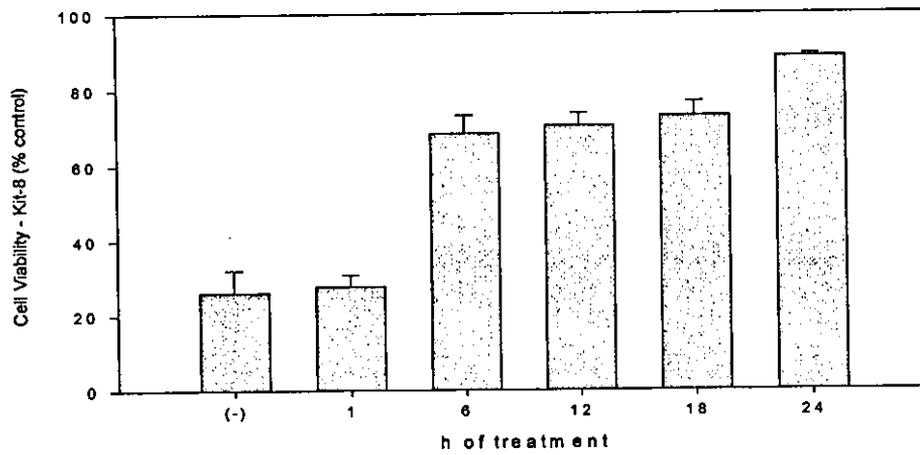


図2 ネオエキヌリンAの神経障害防御作用の除去後反応時間依存性

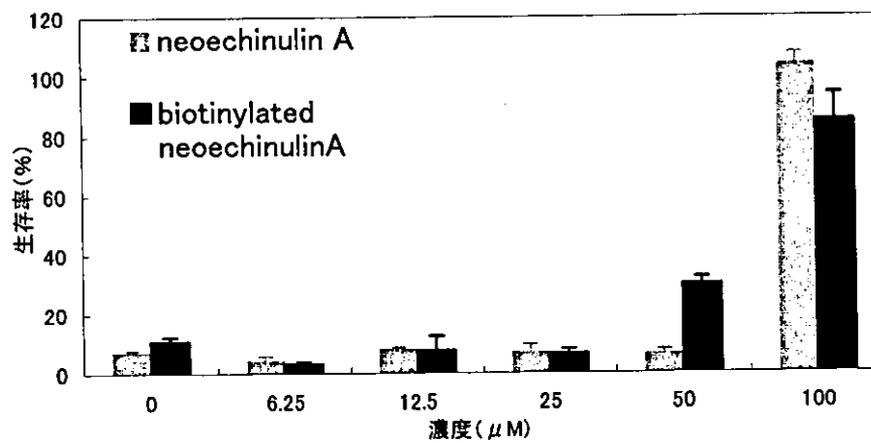


図3 ビオチン化ネオエキヌリンAの神経障害防御作用

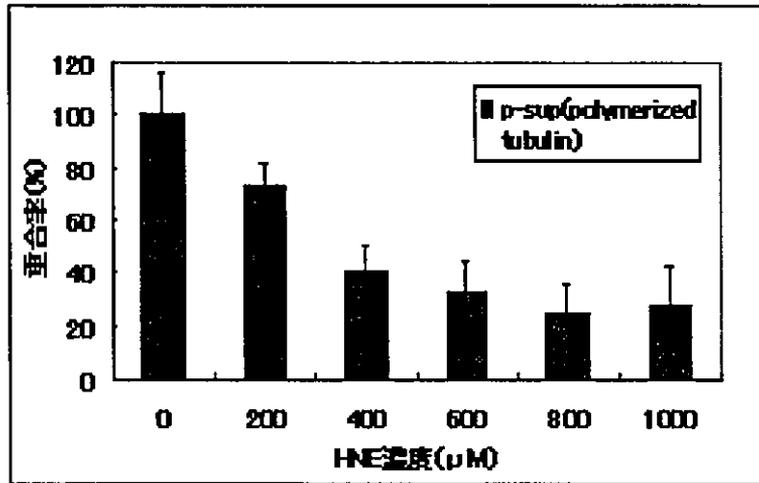


図4 HNEによる試験内チューブリン重合反応の阻害

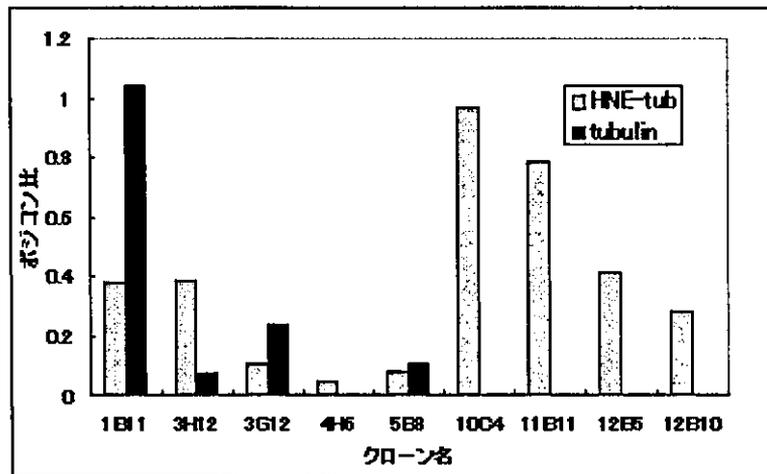


図5 HNE修飾チューブリンに対するモノクローナル抗体の作製

微小循環イメージングと糖尿病性細小血管障害機構の解明

分担研究者 関塚 永一 国立埼玉病院副院長

研究要旨

糖尿病における慢性高血糖状態が持続すると、心筋梗塞や脳梗塞などの大血管障害や、網膜症、腎症、神経障害の糖尿病に特有の細小血管障害といった合併症が引き起こされる。慢性高血糖により生じる生体内の異常には、血管障害や血液レオロジー異常が複雑に関与し、血管障害を引き起こす。

血球成分、特に血小板と血管内皮細胞に着目し、糖尿病における血栓形成性のメカニズムを検討した。光感受性物質フォトリンを利用した *in vivo* 血栓モデルを使用し、糖尿病ラットにおいて血栓粘着開始時間および血栓成長時間において有意な短縮を認め、糖尿病微小循環における易血栓形成性を初めて示した。血栓形成の場である血管内皮細胞と血小板に注目し *in vitro* での検討を行い、散乱光による血小板凝集能測定装置(LSPA)を用いて、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進を示した。糖尿病患者の血小板においては GPIIb/IIIa の発現異常の可能性が示された。

糖尿病患者と健常者での血小板凝集計による凝集能測定において、Epinephrine 惹起では有意な差を得た。その他の惹起物質による凝集能測定においても凝集の傾向が見られた。また、惹起物質投与時における PRP のマイクロチャネル通過時間においても増加の傾向が見られた。これらのことから、血小板粘着が糖尿病細小血管障害に影響を与えうることが推定された。また、マイクロチャネルの全血通過時間および赤血球浮遊液通過時間において正の相関が見られたが、赤血球浮遊液の通過時間は健常者および糖尿病患者において差は見られなかったが、用いたマイクロチャネル幅は赤血球とほぼ同じ直径であったためだと考えられる。

また内皮細胞の検討では、培養ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて、糖尿病状態下 (高グルコース培養および高 CML-AGE 培養) にある内皮細胞と血小板の静止接触下での相互作用を検討し、光化学反応血栓モデルでは濃度依存的な血小板粘着を認め、糖尿病状態により内皮細胞は著しく機能障害を受けていることが確認された。高血糖培養した内皮細胞における機能障害を、ミトコンドリア由来の活性酸素によるものであることを、各種の活性酸素を可視化することにより証明し、その影響はグリケーションの亢進により過剰に産生される終末糖化産物 AGE によって誘導される活性酸素からの障害が著しいことが示唆された。また糖尿病性細小血管症においては、活性酸素による血管内皮細胞機能障害が誘発されて、内皮細胞非剥離性血栓形成を助長していると考えられた。

シェアストレスを考慮に入れた血流のあるより血管内に近い状態を研究するため、Parallel Plate Flow Chamber に培養血管内皮細胞を組み込んだ灌流システムを構築し、低シェアおよび高シェアストレス下の糖尿病易血栓性における接着因子の関与について検討を行なった。その結果、正常培養 HUVEC においても、高シェアストレス下で血小板粘着が認められ、高血糖培養 HUVECs では、シェアストレスに依存して、血小板粘着が増大した。更に、拮抗剤およびモノクローナル抗体を用いた粘着抑制実験より、低シェアストレス下では、血小板膜上の GPIIb/IIIa と内皮細胞膜上の ICAM-1 が、高シェアストレス下では、血漿中の vWF と内皮細胞膜上の GPIb/IX/V の関与が強いことが示唆された。高グルコース培養及び静圧やずり応力を負荷した実験系において各種遺伝子解析を行った結果はグルコース負荷による変化よりも、静圧やずり応力による遺伝子発現の変化がより顕著であった。特に ICAM-1 と E-selectin は、静圧やずり応力負荷時にその発現量が大きく変化した。したがって、生体の血流動態による内皮細胞の遺伝子発現の変化は動脈硬化の発症に重要であると考えられる。さらに生理的な流れを負荷する、すなわち静圧とずり応力を脈動を修飾して同時に負荷する装置の開発を行ったので今後検討して行く。

またマウス脳虚血再灌流モデルにおいて白血球と血小板を染め分けたマルチカラーイメージングを行い、血小板が白血球に粘着する割合が多いことから、血小板が白血球を活性化して炎症反応を増大させていることを示した。特に糖尿病マウスでは虚血再灌流時の血小板粘着の増加が顕著であった。

A. 研究目的

糖尿病における慢性高血糖状態は、膵臓より生成されるインスリン量やインスリン抵抗性の異常により体内の糖が代謝されず、慢性の高血糖を引き起こすと考えられている。また、糖尿病における慢性高血糖状態は、血管障害や血液レオロジー異常をもたらす、前述した糖尿病性合併症を引き起こす中心的な要因と考えられている。しかし、なぜ糖尿病がこれだけ多彩な細胞障害、臓器障害をもたらすのか、その機序は完全に明らかにされているわけでない。

我々研究班では、糖尿病微小循環における血管障害機序を解明するため、光化学反応を利用した *in vivo* 血栓モデルを用いて、健常ラット群に比し、糖尿病ラット群では有意に血栓形成時間が短縮し、糖尿病における易血栓性が示された。更に、本血栓モデルでは、動脈硬化症などに見られるものとは異なる血管内皮細胞非剥離型血小板血栓であり、その大部分が内皮細胞と血小板により構成されていることを電子顕微鏡で確認した。

我々は、糖尿病微小循環における易血栓形成機序をより深く検討するため、血栓形成の構成要素である血球成分、特に血小板と血管内皮細胞に着目し、*in vitro*・*in vivo* 両方の系で実験を行っている。

しかし、実際の生体内における血栓部位では、シェアストレス、血圧、脈波の影響が大きく、易血栓性に何らかの影響を与えている可能性がある。そこで、本研究では、それらを考慮に入れた血流のあるより血管内に近い議論をするための系の確立も行い、糖尿病易血栓性における接着因子の関与について検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験システム

図1に示すような灌流システムを用いて、実験を行なった。倒立顕微鏡ステージ上には parallel plate flow chamber (CIRCULAR Parallel Plate Flow Chamber Kit, GlycoTech) を設け、シリンジポンプで血液を吸引し、灌流させる。顕微鏡からの画像は、高速度ビデオカメラを用いてコンピューターにデジタル画像として取り込んだ。また、flow chamber からの血液の漏れを防ぐために、真空ポンプを用いた。更に、実験中の試料温度を保つために、顕微鏡内をサーモスタットで、flow chamber と接する蛇の目リングをサーモプレートに変え、それぞれ 37°C に保った。

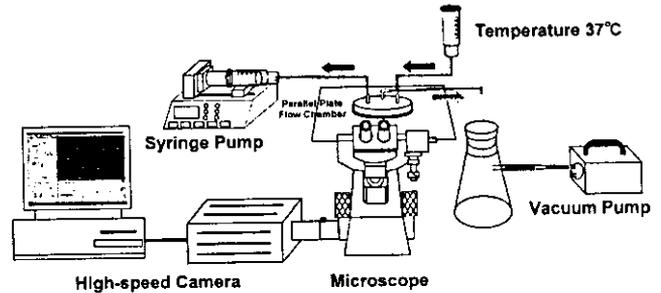


図1 高速度ビデオカメラ顕微鏡と灌流システム

Parallel Plate Flow Chamber

具体的な Parallel Plate Flow Chamber の構造は図2のようになっており、培養血管内皮細胞を播種した 35mm プラスチックディッシュを底面に、流路になるガスケット、血液の出入り口となるフローデッキの順に組み合わせ、流路の周りを真空にすることで固定した。

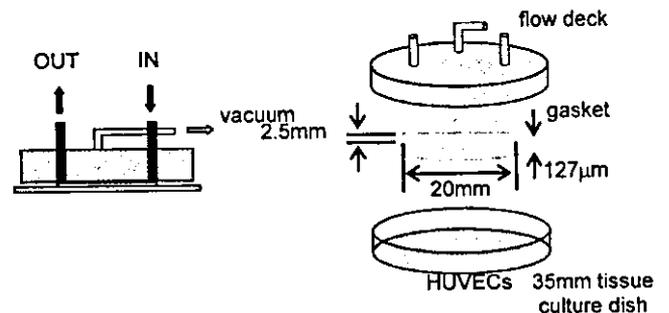


図2 Parallel Flow Chamber の概略図

また、流路内における血液の流れは、平板ポアズイユ流れになっており、流路のサイズと流路に流れる液量から、式(1)より任意のずり速度を設定することができる。

$$\tau = 6Q / a^2 b$$

τ : shear rate [s^{-1}], Q : volumetric flow rate [ml/min], a : gasket thickness [cm], b : gasket width [cm] (1)

Physiological flow system

電磁弁を用いた空圧システムにより灌流液に脈動を与え、流れ抵抗により細胞に負荷する静圧やずり応力を制御し、コンプライアンスチャンバーにより脈圧の振幅を制御するシステムの採用により生体内のあらゆる部位における血流を模擬することができた。

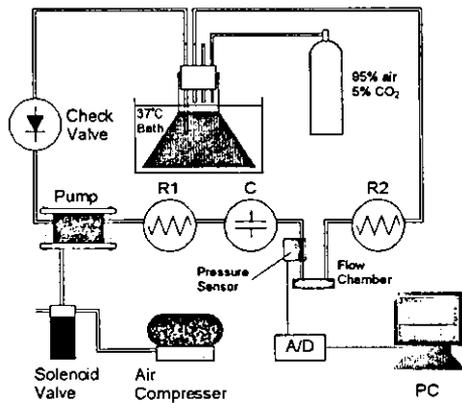


図3 Physiological flow system 概略図

Multi Color Imaging System

観察には水浸対物レンズを装着した生体顕微鏡を用いた。蛍光色素の励起にはキセノンランプ光源を用い、血流動態の撮影には 30fps の 3CCD カメラを用いた。映像は DVD レコーダにより記録した。

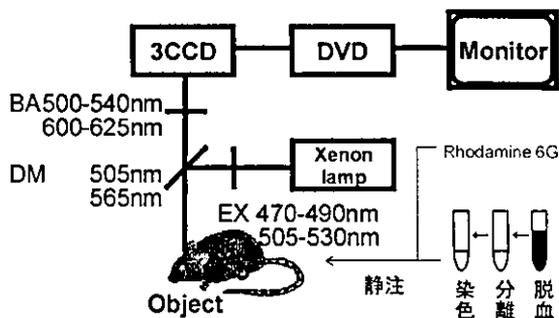


図4 マルチカラーイメージング顕微鏡システム

2. 実験試料

培養血管内皮細胞には、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs, 旭テクノガラス) を培養液 (Endothelial cell Basal Medium: EBM に 10ng/ml hEGF, 1mg/ml Hydrocortizone, 3mg/ml BBE, FBS, GA-10001 を添加した, 旭テクノガラス) で培養し, 4 代目から 15 代目のものを 0.24mg/ml I 型コラーゲンを固相化した 35mm プラスチックディッシュに 5000cells/cm² で播種し, 5~7 日目に細胞が confluent になったものを使用した。また, 高血糖培養血管内皮細胞においては, 80-90%程度 confluent になった HUVECs を 25mM D-glucose を添加した培養液で 48hous 培養し, 実験に用いた。血液は, 健康人および糖尿病患者の肘静脈より 21G でクエン酸採血した。

マウスは雄性 C57BL/6J mouse (20-25g) を α -chloralose (100mg/kg) (α -Chloralose Wako), urethane (1.00g/kg) (Urethane

Aldrich Chemical Company, Inc) の腹腔内投与にて麻酔し, 顕微鏡下で腹部中心部を切開し, 気管切開により気道を確保した。糖尿病マウスは, クエン酸 Na 溶液 (25mM) に溶解させた STZ (Streptozotoin) を定刻に 1 日 1 回, 5 日間連続で腹腔内投与 (60mg/kg) し, 3 週間後に高血糖 (≥ 300 mg/dl) となったものを用いた。

3. 実験プロトコル

実験 1: 正常培養した HUVECs を flow chamber に組み込み, 培養液を 100s⁻¹ で 5 分間灌流した後, 血液を灌流しながら徐々に任意の shear rate 100s⁻¹, 300s⁻¹, 500s⁻¹, 700s⁻¹, 900s⁻¹, 1100s⁻¹, 1300s⁻¹, 1500s⁻¹ まで上げ, 更に 10 分間灌流した。その後, 再び培養液を灌流し血液を洗浄した後, 透過光観察を行なった。

実験 2: 正常培養および高血糖培養した HUVECs を flow chamber に組み込み, 培養液を 100s⁻¹ で 5 分間灌流した後, 血液を灌流しながら徐々に 100s⁻¹ (low shear rate) または 1500s⁻¹ (high shear rate) まで上げ, 更に 10 分間灌流した。その後, 再び培養液を灌流し血液を洗浄した後, 透過光観察を行なった。

実験 3: 灌流前に, 健康者の血液および高血糖培養した HUVECs へ拮抗剤およびモノクローナル抗体を添加し, 37°C で 30 分間インキュベートした。GPIIb/IIIa の拮抗剤である FR144633 (藤沢薬品工業より提供) 1.0 μ M を健康者の血液に添加し, von Willebrand Factor のモノクローナル抗体である VW1-2 (タカラバイオ) 25 μ g/ml, GPIb/IX/V のモノクローナル抗体である GUR20-5 (タカラバイオ) 20 μ g/ml, α V β 3 のモノクローナル抗体である LM609 (Chemicon International) 40 μ g/ml, ICAM-1 のモノクローナル抗体である RR1/1 (Bender Med Systems) 20 μ g/ml を高血糖培養した HUVECs に添加した。実験は, 各拮抗剤およびモノクローナル抗体ごとに行い, 高血糖培養した HUVECs を flow chamber に組み込み, 培養液を 100s⁻¹ で 5 分間灌流した後, 血液を灌流しながら徐々に 100s⁻¹ (low shear rate) または 1500s⁻¹ (high shear rate) まで上げ, 更に 10 分間灌流した。その後, 再び培養液を灌流し血液を洗浄した後, 透過光観察を行なった。

実験 4: 活性酸素産生の経時的変化

細胞継代時に 24well のマイクロプレートに 0.5ml ずつの培地を入れ, そこに 1 $\times 10^5$ cells/ml 細胞を播種した。そして実験の 48, 24, 6, 3,

0.5 時間前に各々別の well の培地に 30mM D-glucose を添加. 実験時には各 well に高血糖 0.5 時間培養から 48 時間培養までの状態を作ることができる. それに glucose を添加しなかったコントロールの状態を加えた 6 つの状態をマイクロプレートに順に作った. この 6 つの一連の well にスーパーオキシド(O₂)を蛍光染色する DHE 3 μ g, または過酸化水素(H₂O₂)蛍光プローブである DHF 1 μ g を添加し, インキュベートから 10 分~30 分の蛍光画像を 10 分毎に記録し, 10 分から 30 分までの画像全体の平均輝度値をその条件での活性酸素産生量の指標とした. またミトコンドリア染色用の MitoRed を 1 μ g 添加し, 15 分間インキュベート後にした時の画像とも比較した.

実験 5 : 糖尿病血流障害における血小板・赤血球の関与の検討

健常者および糖尿病患者から採取した血液を遠心分離し, 多血小板血漿 (PRP) と赤血球浮遊液を作成した. 貧血小板血漿 (PPP) で血小板数 30 万個/ μ l に調整した PRP に対して血小板惹起物質として ADP, Epinephrine, Collagen を加えたものと何も加えてないものの計 4 種類の血小板凝集能を図のようなシステムを用いて測定した. 測定には, 半導体エッチング手法によってシリコン上に流路幅 7 μ m, 長さ 20 μ m, 流路数 7854 本の並列な溝を加工し, さらにその溝の基盤表面に対してガラス基板を圧着したマイクロチャネルを用いた. 20cm H₂O の水柱差による圧で全血および赤血球浮遊液をチャネル内に流し, それぞれ 100 μ l が通過する時間を測定した. 次に血小板数 15 万個/ μ l に調整した PRP に上記 3 種類の血小板惹起物質を投与し, 1 分間インキュベーションした後の PRP 100 μ l の通過時間を測定した.

実験 6 : マウス両総頸動脈を露出した後, 5-0 のシルク糸を用いて結紮した. 1 時間の BCCAO の後, 糸を取り去ることにより再灌流を達成した. 白血球および血小板の観察のため, 前頭骨に cranial window を作成した. 4 時間の再灌流の後, 白血球の観察のため 100 μ l の 0.02% Rhodamine-6G (Sigma Chemical) を 1.20ml/h で注入し, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE Dojindo Molecular Technologies Inc.) により *ex vivo* 染色した血小板を 5 分間かけて注入した. 観察部位は無作為に選んだ血管径が 25~45 μ m, 長さが 100 μ m 以上の分枝のない脳皮質細静脈における 4~5 血管とし, 30 秒間観察を行い, こ

の間に白血球および血小板が rolling または adhesion する個数を数えた. ここで, 15 秒間以上の固い粘着を adhesion と定義した. このようにして得られた血球の個数を円筒径の血管と仮定した時の血管壁 1mm² 当たりの血球数として示した. マウスは 2 つのグループに分類した: (1) control (虚血および両総頸動脈の露出を行わなかった); (2) I/R (1 時間 BCCAO および 4 時間再灌流を行った).

C. 結果

実験 1

任意の shear rate における正常培養した HUVECs への血小板粘着画像と任意の shear rate における正常培養した HUVECs への血小板粘着面積を図 6 に示す.

その結果, 比較的低い shear rate ではほとんど血小板粘着は観察されなかったが, 比較的高い shear rate では shear rate に依存して血小板粘着の増加が観察された. この結果から, shear rate の高いところでは, 何らかの接着因子が強く働いていることが示唆された.

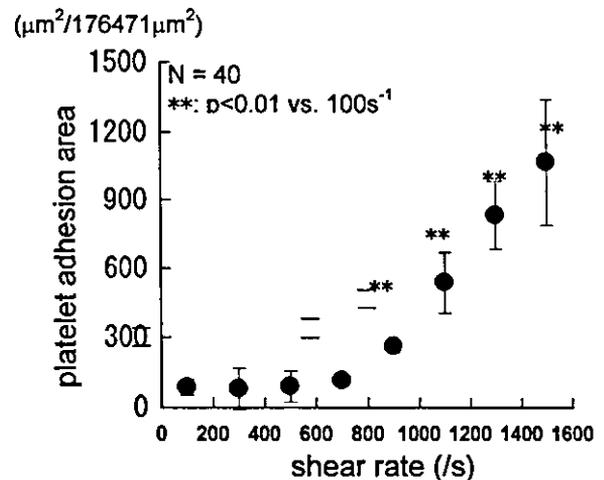


図 5 任意の shear rate 条件下における正常培養血管内皮細胞上の血小板粘着面積

実験 2

low shear rate および high shear rate 下における高血糖培養した HUVECs への血小板粘着画像を図 5 に, 高血糖培養および高シエアストレス下における HUVECs への血小板粘着面積を図 7 に示す.

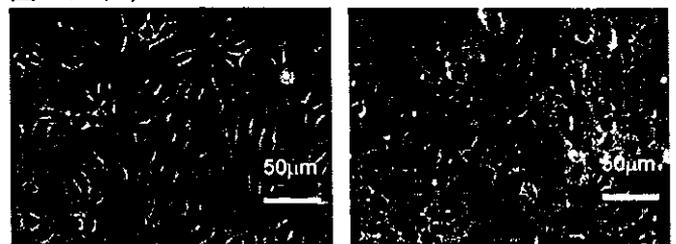


図 6 low および high shear rate 下における高血糖培養血管内皮細胞上への血小板粘着

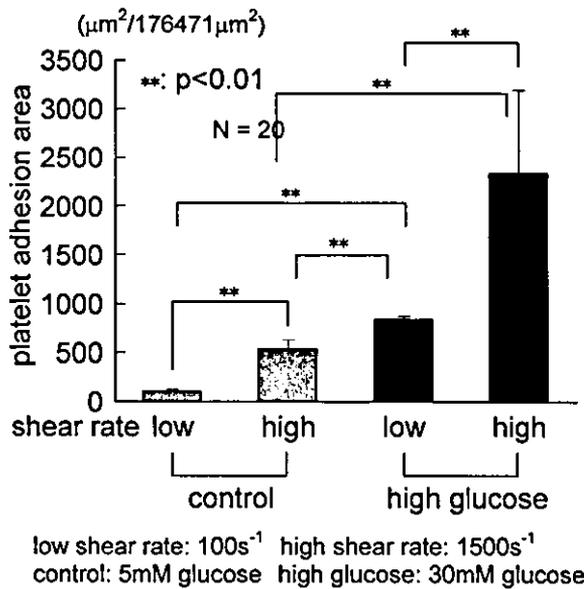


図7 高血糖培養および高シアストレス下における血小板粘着面積

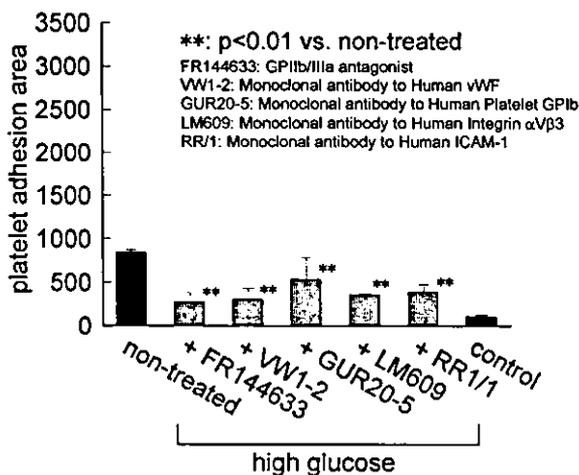
その結果, low, high いずれの shear rate 下においても高血糖培養した血管内皮細胞により多くの血小板粘着が見られた。また, 正常培養および高血糖培養いずれの培養条件においても, low shear rate 下に比し, high shear rate 下において, 粘着がより増加していた。さらに, 正常培養した血管内皮細胞上を high shear rate で灌流させるよりも, 高血糖培養血管内皮細胞上を low shear rate で灌流させる方が, 血小板粘着が増大していた。これらの結果より糖尿病では, 高シアストレス下において易血栓性がより亢進していることが示唆された。また, 糖尿病における易血栓性は, シアストレスによる影響よりも, 高血糖による影響の方が強いことが示唆された。

実験3

low shear stress 下および high shear stress 下における各拮抗剤およびモノクローナル抗体を用いた血小板粘着抑制実験の結果を図に示す。

low shear rate (100s⁻¹)

(µm²/176471µm²)



high shear rate (1500s⁻¹)

(µm²/176471µm²)

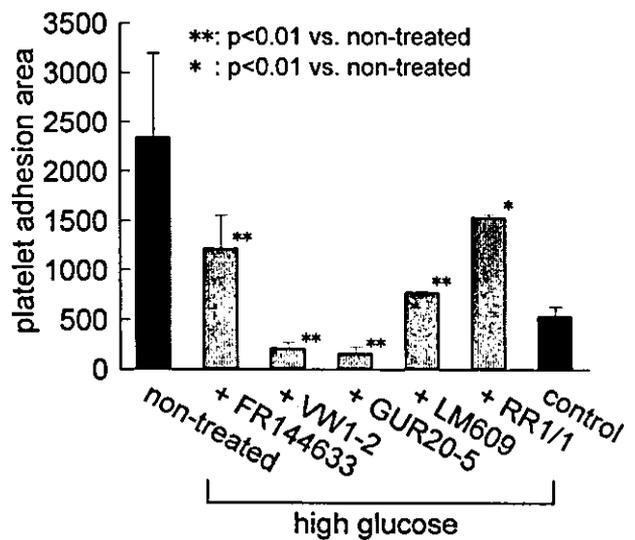
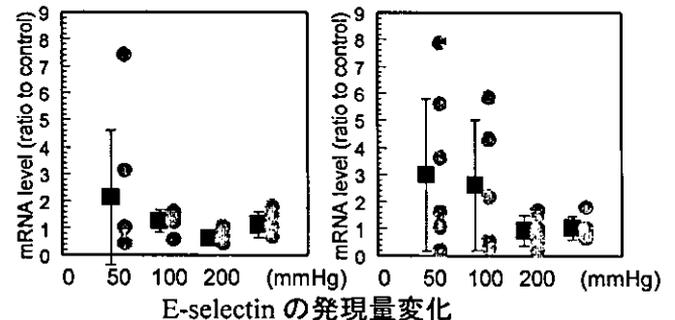
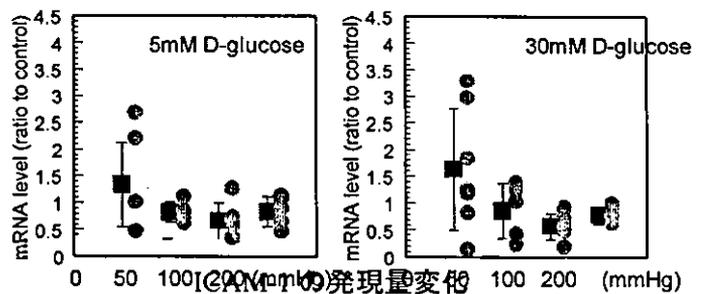
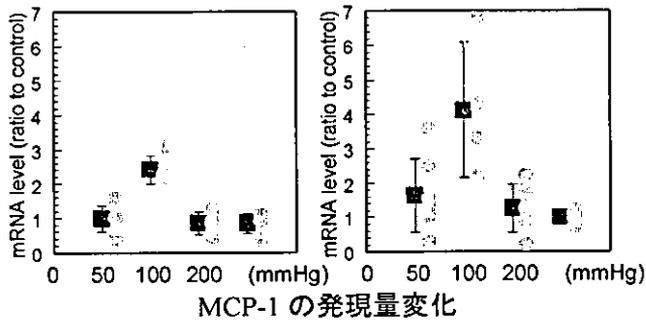


図8 高血糖培養およびシアストレス下における拮抗剤およびモノクローナル抗体を用いた血小板粘着抑制実験

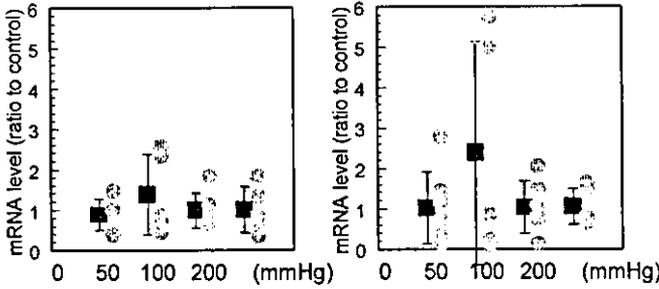
実験4

HUVEC を通常培地, 高 D-グルコース培地, 高 L-グルコース培地にて, 静圧およびずり応力を負荷した状態で 8 時間培養を行い, 炎症に関わる因子の遺伝子発現レベルを測定した。その結果グルコース負荷による変化よりも, 静圧やずり応力による遺伝子発現の変化がより顕著であった。特に ICAM-1 と E-selectin は, 静圧やずり応力負荷時にその発現量が大きく変化した。したがって, 生体の血流動態による内皮細胞の遺伝子発現の変化は動脈硬化の発症に重要であると考えられる。





MCP-1 の発現量変化



e-NOS の発現量変化

図 9 圧負荷による各種遺伝子発現量の変化

実験5 活性酸素産生の経時的变化

活性酸素を蛍光染色することによって蛍光画像が得られた。微弱に光る塊が細胞1つに相当する。このような画像から、各wellでの平均輝度値の変化を、30mM D-glucoseを添加していないwellの平均輝度値を1として各高D-glucose培養時間ごとにプロットした。O₂およびH₂O₂についての結果を図に示す。

図から分かるように、O₂量はグルコース添加から30分後に若干増加、その後減少するという傾向はあるものの、変化の大きさとしてはあまり大きなものではなかった。

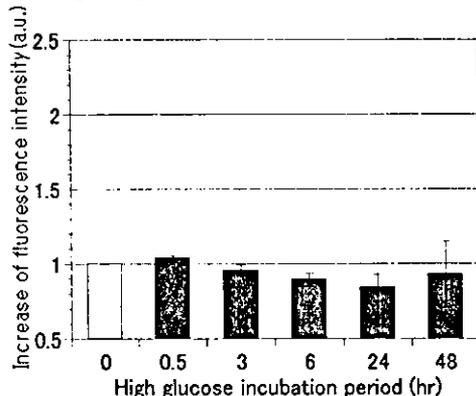


図 10 高 D-glucose 培養時間による O₂ 染色蛍光強度の変化

これに対してH₂O₂はグルコース濃度上昇後すぐに急激に上昇、一端減少して再び上昇、その後変化は緩やかになるという2段階の増加を呈した。

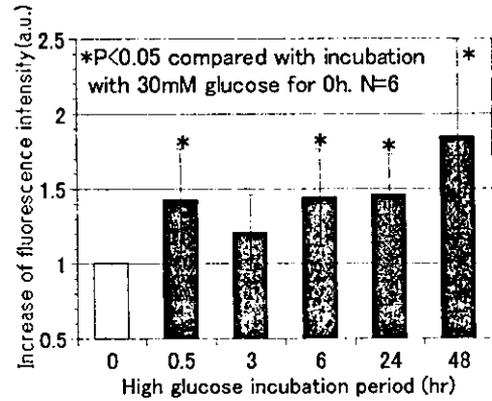


図 11 高 D-glucose 培養時間による H₂O₂ 染色蛍光強度の変化

また、ミトコンドリア由来活性酸素の確認のために MitoRed によって赤く染色されたミトコンドリアの画像と DHF-DA によって緑色に染色された H₂O₂ の画像が図 12 である。どちらも画面右上から左下にかけて伸びる一つの細胞を写している。右上に細胞内で赤く染まっていない部分はミトコンドリアが存在しないことから核だと考えられる。白く囲った部分は画像処理によって特にコントラストを強めた。この部位を見ると分かるように、ミトコンドリアの局在と H₂O₂ 産生部位の局在は一致した。

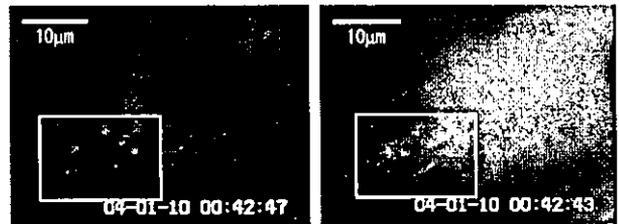


図 12 ミトコンドリア(左)と活性酸素(右)の蛍光染色画像

実験 5

血小板凝集計による凝集能測定において、Epinephrine 惹起では有意な差を得た。その他の惹起物質による凝集能測定においても凝集の傾向が見られた(図 13 (a))。また、惹起物質投与時における PRP のマイクロチャネル通過時間においても増加の傾向が見られた(同図 (b))。以上から、血小板粘着が糖尿病細小血管障害に影響を与えることが推定された。

また、マイクロチャネルの全血通過時間および赤血球浮遊液通過時間において正の相関が見られたが、赤血球浮遊液の通過時間は健常者および糖尿病患者において差は見られなかった(同図(c))。

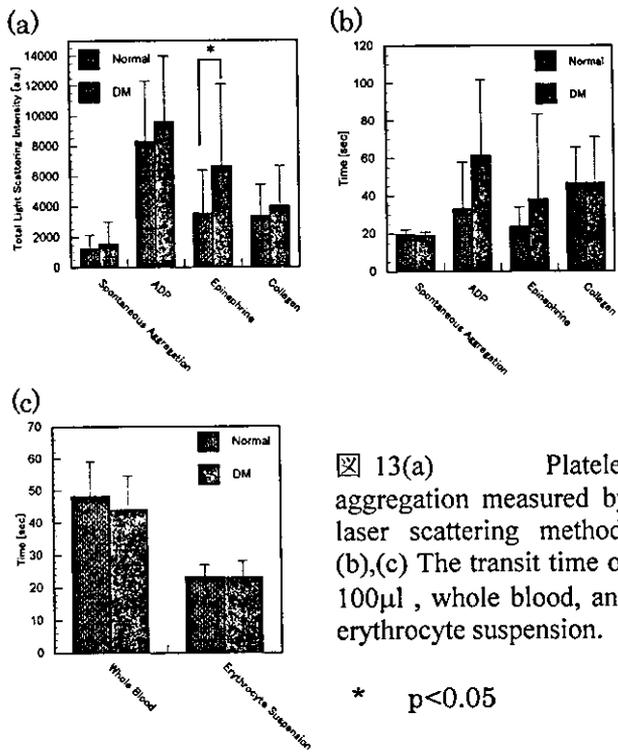


図 13(a) Platelet aggregation measured by laser scattering method. (b),(c) The transit time of 100μl, whole blood, and erythrocyte suspension.

* p < 0.05

実験 6

1 時間虚血 4 時間再灌流において、マルチカラーイメージングによって捕らえた蛍光画像をもとに解析した結果を示した。得られた解析結果より血小板粘着において 80.3%が白血球への粘着であり、19.7%が内皮細胞への粘着であった。また、白血球粘着のうち 37.6%の白血球に血小板による粘着が認められた。

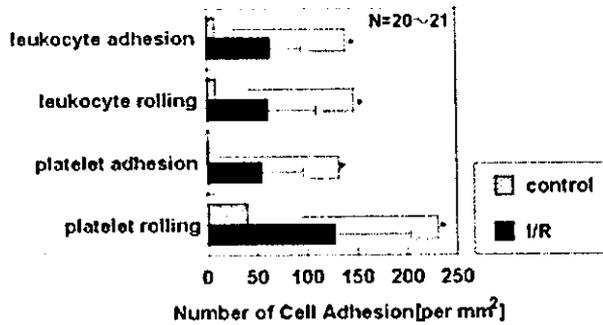


図 14 Effect of leukocyte and platelet dynamics induced cerebral ischemia and reperfusion. *P<0.001

Table 1 Ratio of cell adhesion

platelet adhesion		leukocyte adhesion	
v.s. leukocyte [%]	v.s. endothelial cell [%]	presence of platelet adhesion [%]	absence of platelet adhesion [%]
80.3	19.7	37.6	62.4

(b) 脳虚血再灌流 (I/R) を行った糖尿病マウスにおいて白血球の内皮細胞および血小板との粘着数の有意な増加が見られた。これは血管の炎症に対する反応と考えられる。糖尿病において炎症の原因となる活性酸素の産生が亢進されるが、脳虚血再灌流においてはそれがより多く産生されていることが結果より示唆された。

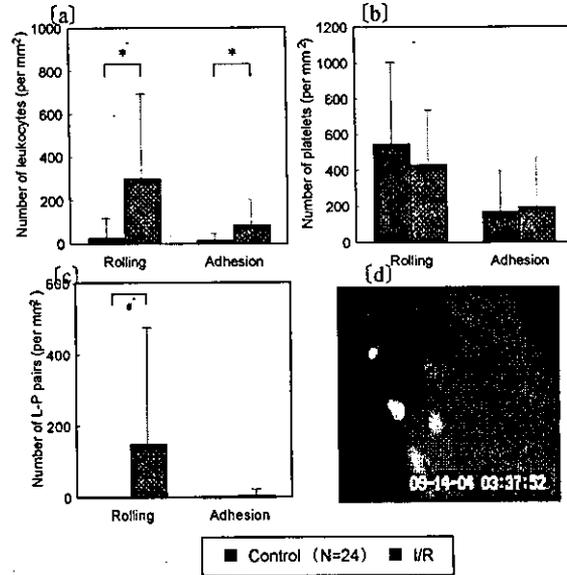


図 15 Rolling and adherent [a] leukocytes to endothelial cells, [b] platelets to endothelial cells, [c] pairs of leukocytes and platelets (L-P) and [d] image of the fluorescent labeled leukocytes and platelets in cerebral postcapillary venules in DM mice (N: number of venules, * P<0.01, # P<0.05) .

D. 考察

現在、血小板血栓形成機序の一般的なモデルは、血管壁損傷により血管内皮細胞が剥離した後、血管内皮下組織に血小板が粘着、凝集すると考えられている。しかし近年、*in vivo* 実験において、活性酸素、ウイルス感染などによって血管内皮細胞が傷害されると、血小板が血管内皮細胞に粘着するという報告が幾つかある。加えて、研究背景でも述べたように、我々研究班では、活性酸素による血管内皮細胞傷害によって内皮細胞非剥離型血小板血栓が形成されることを *in vivo* 実験で認めている。更に、*in vitro* 実験においても、トロンピンに暴露した血管内皮細胞に血小板が粘着するという報告³⁾や、活性化血小板が GPIIb/IIIa を介して血管内皮細胞に粘着するという報告もある^{4),5)}。我々研究班においても *in vitro* 実験において高血糖培養および高 AGE 培養血管内皮細胞への血小板粘着

を確認しているが、これらの報告は全て血小板と血管内皮細胞の静止接触のみの検討である。流動下における血管内皮細胞への血小板粘着においても報告がある^{6,9)}が、shear rate で 10s^{-1} 程度での検討であり、微循環レベルでの検討はなされていない。

今回我々の報告では、まず、正常培養血管内皮細胞への shear rate 別血小板粘着の検討に関しては、shear rate に依存して血小板粘着が増加する結果は得られなかった。つまり、比較的低い shear rate (100s^{-1} , 300s^{-1} , 500s^{-1} , 700s^{-1}) 下においては、殆ど血小板粘着は見観察されなかった。これは、血管内皮細胞が本来持つ抗血栓性が働いているものと思われる。しかし、比較的高い shear rate (900s^{-1} , 1100s^{-1} , 1300s^{-1} , 1500s^{-1}) 下においては、coverage にして最大 1% 未満であるが、急激に血小板粘着が shear rate に依存して増加する結果が得られた。これは、血管内皮細胞の抗血栓性が失われつつある可能性と、血小板が shear stress により、活性化されている可能性とが考えられ、何らかの接着因子が強く関与していると思われる。

次に、高血糖培養および high shear stress 下における血小板粘着の検討に関しては、low, high いずれの shear rate 下においても、正常培養条件下に比し、高血糖培養条件下の方が、血管内皮細胞への血小板粘着面積は有意に増加していた。この結果は、以前、我々研究班が報告した、静止接触下における高血糖培養血管内皮細胞への血小板粘着についての検討結果と一致する所見が得られた。また、高血糖培養条件下では、low shear rate 下に比し、high shear rate 下においては、血小板粘着面積が、2~3 倍に増加しており、糖尿病では、high shear stress 下において、易血栓性がより亢進していることが示唆された。さらに、high shear rate 下における正常培養血管内皮細胞への血小板粘着面積に比し、low shear rate 下における高血糖培養血管内皮細胞への血小板粘着面積の方が、有意に増加しているという結果から、血管内皮細胞への血小板粘着には、shear stress の影響よりも、高血糖の影響の方が、より強く働いていることも示唆された。このことは、糖尿病においては、血小板膜糖蛋白である GPIIb/IIIa の発現増加¹⁰⁾や vWF の血中濃度増加¹¹⁾、血管内皮細胞からの産生増加、フィブリノーゲンの血中濃度増加、血管内皮細胞膜上のインテグリンリガンドである ICAM-1 の発現増加などに起因しているものと考えられる。

最後に、高血糖培養および high shear stress 下における血小板粘着への接着因子の関与に

についての検討では、拮抗剤およびモノクローナル抗体を添加した際の血小板粘着面積(緑の棒グラフ)と、何も添加しなかった際の血小板粘着面積(赤の棒グラフ)とから、血小板粘着抑制効果を計算し(表 1)、拮抗剤およびモノクローナル抗体ごとに low shear rate 下と high shear rate 下で、比較した結果、low shear rate 下においては血小板膜上 GPIIb/IIIa と血管内皮細胞膜上 ICAM-1 が、high shear rate 下においては血漿中 vWF と血管内皮細胞膜上 GPIb の関与が強いことが示唆された。また、血管内皮細胞膜上 $\alpha\text{V}\beta 3$ に関しては high shear rate 下に比し、low shear rate 下において若干関与が高かったが、low shear rate 下と high shear rate 下で、血小板粘着への関与の違いにそれほど差異はないと考えられる。

表 1 high shear stress 下および low shear stress 下における各接着因子の関与

shear rate	GPIIb/IIIa	vWF	GPIb	$\alpha\text{V}\beta 3$	ICAM-1
low	68%	65%	37%	59%	55%
high	48%	91%	94%	67%	34%

以上の考察から、高血糖状態下における血管内皮細胞への血小板粘着機序は、low shear stress 下では血小板膜上の GPIIb/IIIa と血管内皮細胞膜上の ICAM-1 が血漿中のフィブリノーゲン (Fg) やフィブロネクチン (Fn) を介して結合する機序がより強く働くと考えられる。また、high shear stress 下は、血小板膜上の GPIb と血管内皮細胞膜上の GPIb が血漿中の vWF を介して結合する機序がより強く働くと考えられる。

MitoRed によるミトコンドリア染色像、活性酸素 (H_2O_2) 蛍光の局在から高グルコース培養初期におけるミトコンドリア由来であることが視覚的に示唆された。励起光照射直後から数秒で、核を中心に急速に細胞全体が蛍光で飽和してしまった。しかし、ある程度のレーザー照射強度でないと蛍光が検出できず、濃度が高くてもすぐに細胞全体に蛍光が飽和してしまうという点でミトコンドリア局在を示す画像取得は非常に困難であった。DHF はミトコンドリア内の活性酸素まで高感度に検出できる。しかし、その反面ミトコンドリアや細胞からの漏洩が大きく、バックグラウンド光も大きくな

ってしまう。しかしコントラストを強めるために余計な試薬を洗浄しようとしても、細胞内の試薬も一緒に流れてしまう。さらに B 励起によって細胞内のフラビンまたはフラビン含有酸化酵素が活性化されて H_2O_2 が発生してしまうことも蛍光飽和の大きな要因である

血小板凝集計による凝集能測定において、Epinephrine 惹起では有意な差を得た。その他の惹起物質による凝集能測定においても凝集の傾向が見られた。また、惹起物質投与時における PRP のマイクロチャネル通過時間においても増加の傾向が見られた。以上から、血小板粘着が糖尿病細小血管障害に影響を与えうる事が推定された。

また、マイクロチャネルの全血通過時間および赤血球浮遊液通過時間において正の相関が見られたが、赤血球浮遊液の通過時間は健常者および糖尿病患者において差は見られなかった。一方、糖尿病状態において赤血球変形能低下の報告がなされている¹ことから、今回糖尿病患者における赤血球浮遊液通過時間に延長が見られると予想した。両者において差が見られなかった原因の一つとして、用いたマイクロチャネル幅は赤血球とほぼ同じ直径であるため、影響を受けにくかったことが考えられる。

小腸における虚血再灌流では血小板粘着の 74% が白血球に依存する粘着であり、白血球粘着のうち 40~45% が血小板の寄与によるものであった。一方、本研究による脳虚血再灌流時においてもこれらの粘着の割合に対して大きな差異がないため、炎症反応における臓器特異性は認められないと考えられた。また、血小板が白血球に粘着する割合が多いことから、血小板が白血球を活性化して炎症反応を増大させていると考えられた。しかし、白血球との複合体を形成する血小板は特定の白血球とのみ粘着していることが画像から認められたため、血小板粘着の生じる白血球の種類が単球、リンパ球、好中球のどの種類であり、それに関与する接着因子の同定を行う必要があると考えられた。健常マウスと糖尿病マウスでの I/R 実験を比較した結果、糖尿病マウスにおいて白血球・血小板共に粘着数の増加が見られた。これには糖尿病を原因とする血小板凝集能の上昇が白血球に対するシグナルを増大し、粘着を増加させたという機序が成り立っていると考えられる。

E. 結論

今回我々の報告では、静止状態でなく、シェアストレスを考慮に入れた血流のあるより血

管内に近い状態設定のため、血流下における血管内皮細胞非剥離型血小板血栓モデルを構築し、更に低シェアおよび高シェアストレス下の糖尿病易血栓性における接着因子の関与について検討を行なった。その結果、①正常培養内皮細胞においても、高シェアストレス下ではより多くの血小板粘着が認められ、高シェアストレス下では、何らかの接着因子が働いていることが示唆された。②高血糖培養内皮細胞においては、低シェアストレス下に比し、高シェアストレス下で血小板粘着が 3 倍増大しており、糖尿病では、高シェアストレス下において易血栓性がより亢進していることが示唆された。③また、高シェアストレス下における正常培養内皮細胞への血小板粘着に比し、低シェアストレス下における高血糖培養内皮細胞への血小板粘着が 1.5 倍増大しており、糖尿病における易血栓性には、シェアストレスの影響よりも、高血糖の影響の方が強いことが示唆された。更に、④低シェアストレス下の糖尿病易血栓形成機序には、血小板膜上の GPIIb/IIIa および血管内皮細胞膜上の ICAM-1 がより強く関与しており、⑤高シェアストレス下の糖尿病易血栓形成機序には、血漿中 vWF および血管内皮細胞膜上の GPIb/IX/VI が強く関与していることが示唆された。最後に、⑥糖尿病におけるシェアストレス下血管内皮細胞非剥離型血小板血栓機序の仮説を提唱した。

HUVEC を通常培地、高 D-グルコース培地、高 L-グルコース培地にて、静圧およびずり応力を負荷した状態で 8 時間培養を行い、炎症に関わる因子の遺伝子発現レベルを測定した。その結果グルコース負荷による変化よりも、静圧やずり応力による遺伝子発現の変化がより顕著で、特に ICAM-1 と E-selectin は、静圧やずり応力負荷時にその発現量が大きく変化した。生体の血流動態による内皮細胞の遺伝子発現の変化は動脈硬化の発症に重要であると考えられる。

血管内皮細胞を高グルコース状態で培養し、その際の活性酸素産生の経時的変化および局在性について 2 つの結論を得た。

まず高グルコース培養による活性酸素 (O_2^- および H_2O_2) の変化を蛍光試薬の輝度値を画像から求めることで評価した。その結果、 O_2^- には大きな変化はなく、やや減少傾向があった。一方 H_2O_2 はグルコース添加後急激に増加、一端減少するものの再び増加するという 2 段階の増加を呈することが分かった。

また、この活性酸素の増加が主にミトコンドリア由来であることを、高グルコース状態で 30 分間培養した HUVEC の H_2O_2 とミトコンド

リアを二重染色することで示した。

以上のことから高血糖状態における血管内皮細胞ではグルコース添加直後からミトコンドリア由来の活性酸素(O₂)が増加することが分かった。

血小板凝集計による凝集能測定において、Epinephrine 惹起では有意な差を得た。その他の惹起物質による凝集能測定においても凝集の傾向が見られた。また、惹起物質投与時におけるPRPのマイクロチャンネル通過時間においても増加の傾向が見られた。以上から、血小板粘着が糖尿病細小血管障害に影響を与えうることが推定された。

脳虚血再灌流(I/R)を行った糖尿病マウスにおいて白血球の内皮細胞および血小板との粘着数の有意な増加が見られた。これは血管の炎症に対する反応と考えられる。糖尿病において炎症の原因となる活性酸素の産生が亢進されるが、脳虚血再灌流においてはそれがより多く産生されていることが結果より示唆された。

また、同時期に行われた健常マウスでのI/R実験と比較した結果、糖尿病マウスにおいて白血球・血小板共に粘着数の増加が見られた。これには糖尿病を原因とする血小板凝集能の上昇が白血球に対するシグナルを増大し、粘着を増加させたという機序が成り立っていると考えられる。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

論文発表

- 1) Hirose Y., Nakadate H., Gokan H., Minamitani H., Sekizuka E., Oshio C., Izumida T., Sakamoto N., Shimozawa M., Yoshikawa T. : Enhanced platelet aggregability in diabetic patients established by laser light scattering method, *Microcirculation Annual*, 20, pp.49-50, 2004.
- 2) Nakadate H., Sekizuka E., Oshio C., Hirose Y., Gokan H., Minamitani H. : The effect of shear stress on the accelerated adhesion of diabetic platelets, *Microcirculation Annual*, 20, pp.51-52, 2004.
- 3) Terao S., Sekizuka E., Ishikawa M., Yamaguchi N., Minamitani H., Kawase T. : Color imaging of platelets and leukocytes labeled with different fluorescent material in brain pial vessels of C57BL/6 mouse, *Microcirculation Annual*, 20, pp.99-100,

2004.

- 4) Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Tsujioka K., Minamitani H. : Red blood cell velocity and oxygen tension measurement in cerebral microvessels by double-wavelength photoexcitation, *J.Appl.Physiol.*, 96, pp1561-1568, 2004.
- 5) Arai T., Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Terao S., Hase K., Minamitani H. : RBC flow imaging and pO₂ measurement in cerebral microcirculation: Effect of hemodilution on oxygen supply to brain cortical arterioles, *Proc. IEEE EMBC 2003*, pp1054-1057, 2003-9 (Cancun, Mexico).
- 6) Hirose Y., Sekizuka E., Nakadate H., Ozawa T., Minamitani H., Oshio C., Ishii H. : Role of oxidative stress in interaction between endothelial cells and platelets in diabetes, *Organ Microcirculation - A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Interventions -*, pp.239-241, ed. by H.Ishii, M.Suematsu, K.Tanishita, H.Suzuki, Springer-Verlag Tokyo, 2005.
- 7) Hiromiti Nakadate, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Yasunori Hirose, Haruhiko Gokan and Hruyuki Minamitani The effect of shear stress on high thrombogenesis of diabetes mellitus, In *Microcirculation annual 2004* M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon Igakukan, Tokyo, 2004, in press
- 8) Yasunori Hirose, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, Hiromiti Nakadate, Haruhiko Gokan and Hruyuki Minamitani Enhanced platelet aggregation in diabetic patient by laser light scattering method, In *Microcirculation annual 2004* M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon Igakukan, Tokyo, 2004, in press
- 9) Mami Ishikawa., Eiichi Sekizuka., Boris Krischek, Ulrich Sure., Raif Becker, Helmut Bertalanffy, Role of nitric oxide in the regulation of spinal arteriolar tone *Neurosurgery* 50(2):371-378, 2002
- 10) Kosuke Tsukada, Yosataka Ogata, Noriyuki Yamaguchi, Eiichi Sekizuka, Chikara Oshio, and Haruyuki Minamitani Blood flow analysis in cerebral microcirculation during exchange blood transfusion with hemoglobin-encapsulated liposome In *Microcirculation annual 2002* M.Asano, and C.Ohkubo, eds., Nihon Igakukan, Tokyo, pp.41-42, 2002, October
- 11) Tadas Ozawa, Eiichi Sekizuka, Kosuke