

培養ヒトメサンギウム細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞における単球走化性因子のサイトカイン誘導性産生とチアゾリジン系薬剤によるその抑制

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9495

培養ヒトメサンギウム細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞における 単球走化性因子のサイトカイン誘導性産生と チアゾリジン系薬剤によるその抑制

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

横 山 将 嘉

糖尿病, 肥満, 脂質代謝異常, 高血圧などにおけるインスリン抵抗性は腎硬化症や動脈硬化症の危険因子と考えられており, 糖尿病治療の標的の一つである。メサンギウム細胞や血管内皮細胞の産生する単球走化性因子 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) は単球の遊走活性を介して動脈硬化と腎硬化症の発症に重要な役割を担っている。近年, インスリン感受性増強作用を有するトログリタゾンはインスリン抵抗性の改善により動脈硬化や糖尿病血管障害の進展を抑止しうることが報告されている。しかしながら, トログリタゾンが血管構成細胞に直接的に作用し, 腎硬化症を含む動脈硬化症の進展を抑止しうかどうかは明確ではない。本研究では, ヒトメサンギウム細胞 (human mesangial cells, HMC) およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) の培養におけるサイトカイン誘導性の MCP-1 産生におよぼすトログリタゾンの効果を検討した。HMC と HUVEC を 5, 50 または 500 ng/ml の腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 存在下で, 1 または 10 μ M のトログリタゾン存在下, 非存在下の培地で 24 時間培養し, HMC や HUVEC から分泌された MCP-1 量を測定した。インスリン抵抗性状態や動脈硬化巣で上昇する TNF- α は容量依存性に HMC や HUVEC から MCP-1 産生を促進した。HMC では MCP-1 産生はコントロールに比し TNF- α 刺激により 55 倍に増加した。トログリタゾンは容量依存性に TNF- α 誘導性 MCP-1 産生を抑制し, 10 μ M のトログリタゾンでは 49.3 % に抑制した。HUVEC では MCP-1 産生はコントロールに比し TNF- α 刺激により 119 倍に増加した。トログリタゾンは容量依存性に MCP-1 産生を抑制し, 10 μ M のトログリタゾンでは 19.4 % に抑制した。ノーザンブロット解析では, HMC および HUVEC においてトログリタゾンは TNF- α 刺激により増加した MCP-1 mRNA レベルを抑制していた。トログリタゾンの分子構造はクロマン環とチアゾリジン環から成り立っている。クロマン環をもつアルファートコフェロールや, チアゾリジン環はもつがクロマン環はもたないピオグリタゾンは, とともに TNF- α 誘導性 MCP-1 産生を抑制したことから, MCP-1 産生におけるトログリタゾンの抑制効果はクロマン環とチアゾリジン環の両者に起因するものと考えられる。今回の研究はチアゾリジン系薬剤が内皮細胞やメサンギウム細胞からの MCP-1 産生を抑制することによって動脈硬化症や腎硬化症の進展を抑止しう可能性を示唆する。

Key words monocyte chemoattractant protein-1, troglitazone, thiazolidinedione, peroxisome proliferator-activated receptor- γ , atherosclerosis

近年, 糖尿病, 肥満, 脂質代謝異常, 高血圧などを含有するインスリン抵抗性症候群¹⁾は2型糖尿病の成因としてばかりではなく, 高インスリン血症や高脂血症を伴い, 腎硬化症を含む動脈硬化症の重要な要因となっていることが明らかにされつつあり^{2)~4)}, それらの改善は動脈硬化の発症・進展の抑止という観点から糖尿病治療の大きな目標となっている⁵⁾。

単球走化性因子 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) は 1989 年に精製⁶⁾およびクローニング⁷⁾された塩基性蛋白で, 単球に対して特異的な遊走活性化作用を示す。単球やマクロファージの糸球体内への浸潤は細胞外マトリックスの増大や糸球体

硬化の進展に関与しており, 腎硬化症や糖尿病性腎症の病初期に認められている⁸⁾⁹⁾。また, 単球やマクロファージの血管内皮下への遊走・浸潤も粥状硬化の病初期に認められ, こうした病巣に MCP-1 が過剰発現していることが報告されている^{10)~13)}。さらに, MCP-1 は単球, マクロファージ, 線維芽細胞, メサンギウム細胞, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞などから産生され⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾, 動脈硬化病巣形成の初期段階に重要な役割を担っていると考えられている。

近年, インスリン感受性増強作用を有するチアゾリジン誘導体 (トログリタゾンやピオグリタゾン) が臨床応用され, イン

平成 12 年 11 月 8 日受付, 平成 12 年 12 月 5 日受理

Abbreviations: FBS, fetal bovine serum; HMC, human mesangial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; LDL, low density lipoprotein; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PPAR- γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; TNF- α , tumor necrosis factor- α

スリン抵抗性改善による高血糖や高脂血症の是正により、動脈硬化症の発症や進展を抑止しうる可能性が示唆されている¹⁶⁾。トログリタゾンはチアゾリジン環とビタミンE骨格と類似のクロマン環から構成されており(図1-A)、近年このクロマン環が抗酸化作用を発揮し、脂質の酸化を抑制することが報告され^{17,18)}、抗酸化作用による抗動脈硬化作用が注目されている。しかし、血管内皮細胞やメサングウム細胞に直接的に作用し、抗動脈硬化作用を発揮するかについては不明である。

そこで本研究では、まずインスリン抵抗性状態や動脈硬化果で産生が亢進している炎症性サイトカインがメサングウム細胞および血管内皮細胞におけるMCP-1の発現誘導におよぼす影響を検討した。次にMCP-1発現および産生の抑制を腎硬化症・糖尿病性腎症および粥状硬化症の発症・進展に対する抗動脈硬化作用の指標の一つと位置づけ、チアゾリジン誘導体がメサングウム細胞や血管内皮細胞からのMCP-1発現および産生を抑制するかについて検討した。さらにトログリタゾンがMCP-1産生に対する抑制作用を有するなら、その効果はチアゾリジン環に由来するものか、あるいはクロマン環による抗酸化的効果に由来するものなのかについて、クロマン環を有するアルファートコフェロール(図1-B)、およびクロマン環を有していないチアゾリジン誘導体であるピオグリタゾン(図1-C)の作用とトログリタゾンの作用を比較することにより検討した。

材料および方法

I. 細胞

ヒトメサングウム細胞(human mesangial cells, HMC)およびヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells,

HUVEC)はクロネティクス(San Diego, USA)から購入した。HMCは5%の牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS), 50mg/mlゲンタマイシン, 50 μ g/mlアンホテリシンBを含むメサングウム細胞基礎培地(Clontech Corp)にて、HUVECは2%のFBSと50mg/mlゲンタマイシン, 50 μ g/mlアンホテリシンBを含む内皮細胞基礎培地(Clontech Corp)にて5%CO₂気相下で維持した。HUVECは実験時にはFBS濃度を0.4%とした。

II. MCP-1刺激因子および薬剤の添加

細胞は5から8継代のものを本研究に使用し、細胞を12穴のクラスターディッシュ(Costar, Pleasanton, USA)に各穴2 $\times$ 10⁴個播種し、細胞の接着を確認したうえで各クラスターディッシュの培地を交換し、24時間培養した。その後各濃度(5, 50, 500ng/ml)の腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(Endogen, Carbridge, MA)と1または10 μ Mのトログリタゾン, 10 μ Mのピオグリタゾン(三共, 東京), 10 μ Mのアルファートコフェロール(和光, 東京)を添加し、24時間まで培養した。その後、各穴の培養上清を採取し、解析に使用するまで-20℃で保存した。

III. 生細胞数の算定

細胞を12穴のクラスターディッシュに播種後0.25%のトリプシンで分散、回収後、0.17%(w/v)のトリパンブルーを含む培地で希釈し、血球計算板を用いてトリパンブルー染色されない生細胞数を算定した。

IV. MCP-1蛋白濃度解析

細胞上清中のMCP-1蛋白濃度を酵素結合による免疫吸着法を用いたELISAキット(Human MCP-1 Immunoassay, R&D system, USA)にて解析した。すなわち、MCP-1に対するラットのモノクローナル抗体でコーティングされた96穴のプレートに各測定サンプルを200 μ lずつ注入し、2時間常温放置した。次に各穴のサンプルを除去し、PBSで4回洗浄した後、各穴にMCP-1に対するペルオキシダーゼ標識のポリクローナル抗体を200 μ lずつ投与し、1時間常温放置した。再び各穴の内容物を排除し、PBSで4回洗浄した後、結合した抗体に対する発色基質液(ハイドロゲンペルオキシダーゼ+テトラメチルベンジジン)200 μ lを注入した。20分後、2Nの硫酸50 μ l投与にて発色反応を停止させ、450nmの波長に対する吸光度をマイクロプレートリーダー(Conona, 茨城)にて測定した。MCP-1蛋白濃度はprotein assay kit(Pierce, Rockford, IL)を用い、全細胞蛋白量で補正した。

V. 総RNAの分離

75cm²のフラスコで培養し、コンフルエントに達したHMCを5%FBSと500ng/ml TNF- α を含むメサングウム細胞基礎培地にて、10 μ Mのトログリタゾンの存在下、非存在下で6時間培養した。上清を除去し、培養細胞表面をPBSで3回洗浄後、Isogen(ニッポンジーン, 東京)を用いたイソチオシアン酸グアニジン塩化フェノール・クロロホルム法¹⁹⁾にて総RNAを抽出精製した。すなわち、1フラスコ当たり3mlのIsogenを加え細胞を融解、回収し、室温で5分間放置後、0.6mlのクロロホルムを加えて激しく振盪した。室温、12000 $\times$ gにて15分間遠心後、上清を回収しイソプロパノールを1.5ml加え室温で5分放置し、4℃、15000 $\times$ g 60分間の遠心にてRNAを沈澱させた。沈澱物を75%エタノールで洗浄し乾燥後、純水で溶解し260nmの吸光定量を行い至適濃度に調整した。

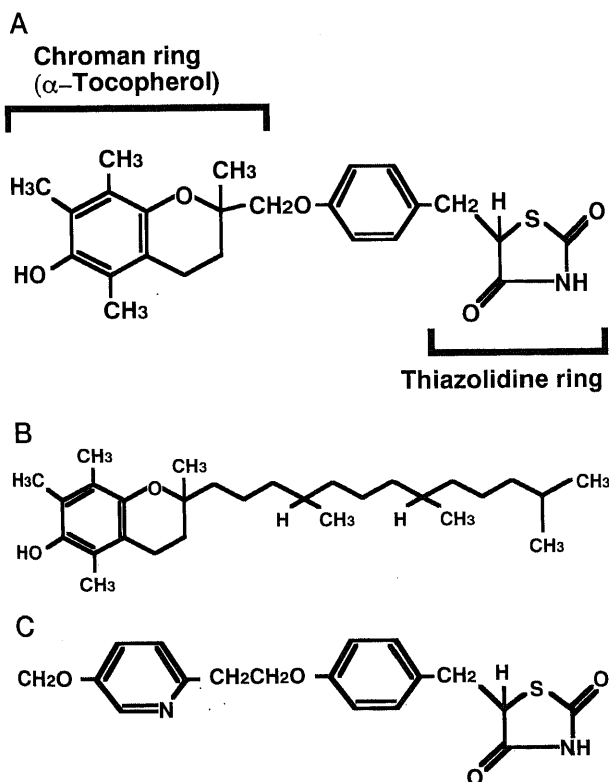


Fig. 1. The structure of troglitazone, α -tocopherol and pioglitazone. (A) Troglitazone, (B) Pioglitazone, (C) α -tocopherol.

Ⅵ. ノーザンブロット解析

MCP-1 cDNAの第256-285 bpに相補的なオリゴヌクレオチド、5'-TTGGGTTTGCTTGTCCAGGTGGTCCATGGA-3' (グライナー・ジャパン, 東京) をMCP-1検出用プローブとして用い、対照としてのグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) cDNAの第340-359 bpに相補的なオリゴヌクレオチド、5'-GAGATGATGACCTTTTGGC-3' (グライナー・ジャパン, 東京) をGAPDH検出用プローブとして用いた²⁰⁻²¹). プローブはDNA5'末端標識キット (宝酒造, 京都) と [γ -³²P] アデノシン三リン酸 (NEN Research Product, Boston, USA) を用いて標識した。10 μ gの総RNAを1.2%アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンフィルターに転写し、紫外線にて固定した。ついでフィルターに50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液 (Oncor, Inc. Gaithersburg, USA) で42°C, 6時間プレハイブリダイゼーション後、³²P標識オリゴヌクレオチドプローブを添加し、42°C, 24時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、フィルターを2×SSC, 1×

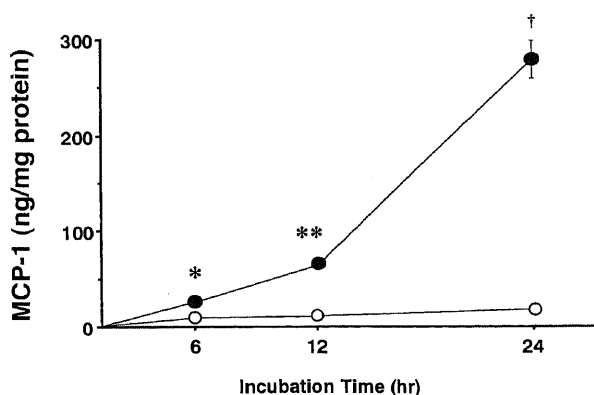


Fig. 2. Time course of TNF- α -induced soluble MCP-1 secretion from human mesangial cells. Results are the $\bar{x} \pm$ SEM of triplicate values from three separate experiments. Control (○), TNF- α alone (●). * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$, † $P < 0.001$ vs. Control.

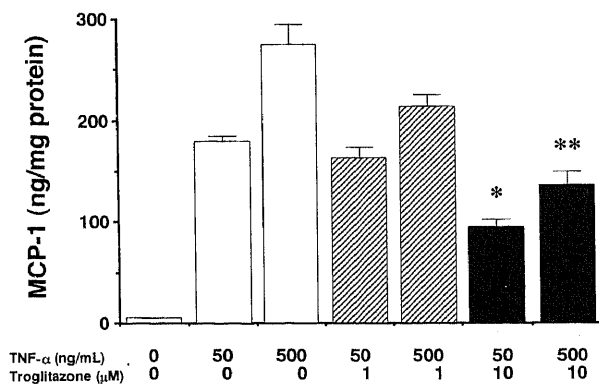


Fig. 3. Effects of troglitazone on TNF- α -induced MCP-1 secretion from human mesangial cells. Troglitazone (Tro) at a dose of 10 μ M significantly reduced TNF- α (50 or 500 ng/mL)-stimulated MCP-1 secretion from human mesangial cells after 24 h of incubation. Results are the $\bar{x} \pm$ SEM of triplicate values from three separate experiments. * $P < 0.005$, ** $P < 0.001$ vs. TNF- α alone.

SSC: 0.15M塩化ナトリウム, 0.015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム) を用いて室温で20分間洗浄し、フジメーキングアナライザーフィルム (富士フィルム, 浜松) に露出し、オートラジオグラフィーを行った。さらにバイオイメージングアナライザー FUJIX BAS1000 (富士フィルム) により放射活性を定量した。

Ⅶ. 統計学的解析

測定値は平均標準偏差で表示した。群間の平均値の有意差検定はScheffe's F分散分析で行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とみなした。

成 績

Ⅰ. TNF- α による MCP-1 の産生誘導

500ng/mlのTNF- α 存在下でHMCを24時間培養した結果、細胞上清中のMCP-1濃度は時間依存性に増加した (図2)。TNF- α 無添加のコントロールではMCP-1濃度の上昇はほとんどみられなかった。また24時間での検討ではTNF- α はMCP-1産生に対し、0-500ng/mlの範囲で濃度依存性であった (図3)。一方、500ng/mlのTNF- α 存在下でHUVECを24時間培養した結果、細胞上清中のMCP-1濃度はHMCと同様に時間依存性に増加した (図4)。また、24時間での検討ではTNF- α はMCP-1産生に対し、0-50ng/mlの範囲で濃度依存性であった (図5)。

Ⅱ. HMCにおけるトログリタゾンによる MCP-1 蛋白の産生抑制

メサンギウム細胞においてMCP-1産生に対するトログリタゾンの抑制効果を検討するため、TNF- α (50または500ng/ml) および1または10 μ Mのトログリタゾンの存在下、非存在下にてHMCを24時間培養し、培養上清中のMCP-1濃度を測定した (図3)。50または500ng/ml TNF- α 刺激により、MCP-1産生はコントロールに比しそれぞれ36または55倍に増加した。これに対し、1 μ Mのトログリタゾンは有意な抑制効果をおよぼさなかったが、10 μ Mのトログリタゾンは、50ng/mlのTNF- α によるMCP-1産生を52.6%に、また500ng/mlのTNF- α によるそれを49.3%に抑制した。

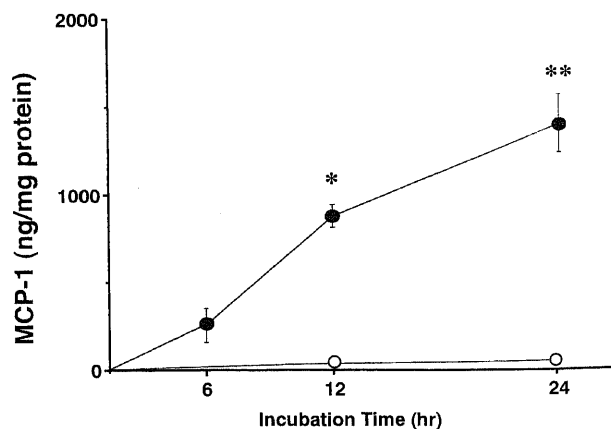


Fig. 4. Time course of TNF- α (500 ng/mL)-induced soluble MCP-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. The results represent the $\bar{x} \pm$ SEM of triplicate values from three separate experiments. Control (○), TNF- α alone (●). * $P < 0.005$, ** $P < 0.001$ vs. Control.

Ⅲ. HUVECにおけるトログリタゾンによるMCP-1蛋白の産生抑制

血管内皮細胞においてMCP-1産生に対するトログリタゾンの抑制効果を検討するため、TNF- α (5, 50, 500ng/ml) および1または10 μ Mのトログリタゾンの存在下、非存在下にHMVECを24時間培養し、培養上清中のMCP-1濃度を測定した(図6)。TNF- α によりコントロールの79倍から119倍に増加したMCP-1産生に対し、1 μ Mのトログリタゾンは有意な抑制効果を示さなかったが、10 μ Mのトログリタゾンは最大19.4%に抑制した。なお、トリパン・ブルー排泄法にてトログリタゾンが細胞に与える毒性の有無をメサングウム細胞および血管内皮細胞において検討したところ、トログリタゾン無添加群ならびに添加群とも生細胞数は95%以上であり、両群間に有意差は認められなかった。

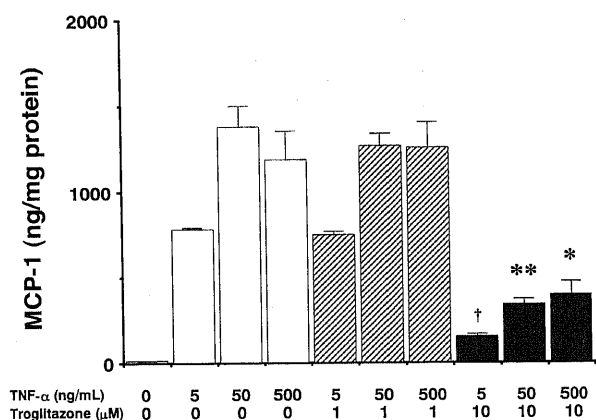


Fig. 5. Effects of troglitazone on TNF- α -induced MCP-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. Troglitazone (Tro) at a dose of 10 μ M significantly reduced TNF- α (5, 50 or 500 ng/mL)-stimulated MCP-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells after 24 hr of incubation. Results are the $\bar{x} \pm$ SEM of triplicate values from three separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, $^{\dagger} P < 0.001$ vs. TNF- α alone.

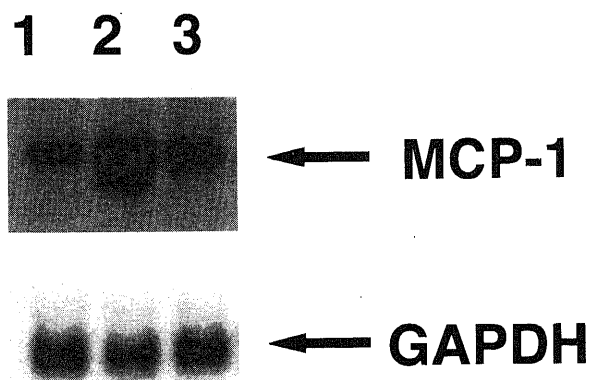


Fig. 6. Northern blot analyses of MCP-1 mRNA in TNF- α -treated human mesangial cells. The presence of 10 μ M troglitazone reduced TNF- α -induced MCP-1 mRNA expression. GAPDH mRNA was analyzed as an internal control. Lane 1, control; Lane 2, 500 ng/mL TNF- α ; Lane 3, 500 ng/mL TNF- α + 10 μ M troglitazone.

Ⅳ. MCP-1 mRNA発現に対するトログリタゾンの抑制効果

HMCおよびHUVECにおけるTNF- α 誘導性MCP-1発現と、そのトログリタゾンによる抑制機構を探るため、500ng/mlのTNF- α および10 μ Mのトログリタゾンの存在下または非存在

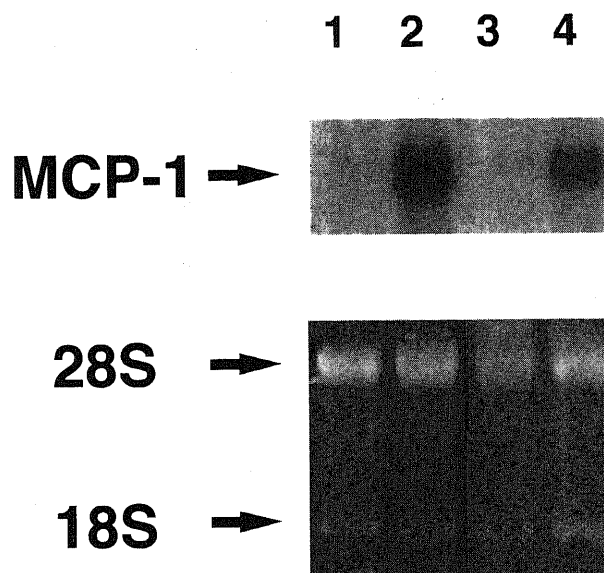


Fig. 7. Northern blot analyses of MCP-1 mRNA in TNF- α -induced human umbilical vein endothelial cells. The presence of 10 μ M troglitazone reduced TNF- α -induced MCP-1 mRNA expression. Arrows indicate the relative migration of 28S and 18S RNAs run on the same gel. UV transillumination demonstrated equal quantities of RNA applied to ethidium bromide-stained agarose gel (lower). Lane 1, control; Lane 2, 500 ng/mL TNF- α ; Lane 3, 10 μ M troglitazone alone; Lane 4, 500 ng/mL TNF- α + 10 μ M troglitazone.

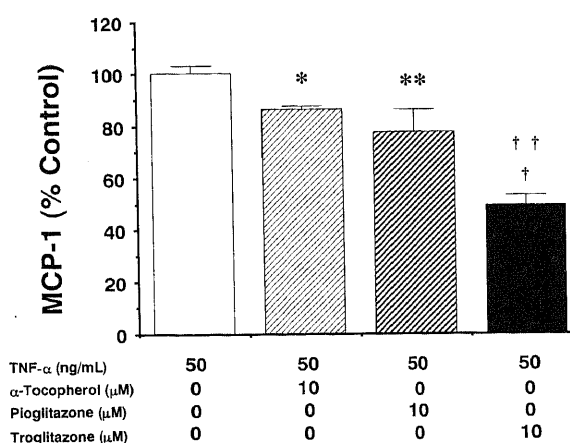


Fig. 8. Effects of troglitazone, pioglitazone and α -tocopherol on TNF- α -induced MCP-1 secretion from human mesangial cells. Troglitazone (Tro) at a dose of 10 μ M significantly reduced TNF- α (50 ng/mL)-stimulated MCP-1 secretion from human mesangial cells for a period of 24 hr vs. pioglitazone (Pio) or α -tocopherol (AT). MCP-1 secretion is expressed as a percentage of the amount secreted by values from 3 separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $^{\dagger} P < 0.005$ vs. TNF- α alone, $^{\dagger\dagger} P < 0.005$ vs. TNF- α + pioglitazone or TNF- α + α -tocopherol.

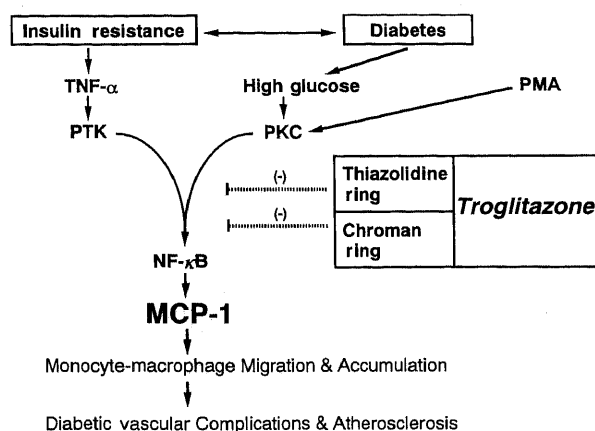


Fig. 9. The mechanism of the inhibitory effects of troglitazone on MCP-1 production.

下に6時間培養し、MCP-1 mRNA量をノーザンブロット解析にて検討した。HMCでは、500ng/ml TNF- α 添加によって MCP-1 mRNA量はコントロールの約2.0倍に増加した。10 μ M のトログリタゾンではTNF- α により誘導されたMCP-1 mRNA量を73%に抑制した(図6)。一方、HUVECでは500ng/ml TNF- α 添加によって MCP-1 mRNA量はコントロールの約9.3倍に増加した。10 μ M のトログリタゾンはTNF- α により誘導されたMCP-1 mRNA量を34%に抑制した(図7)。

V. トログリタゾンの分子構造内のチアゾリジン環およびクロマン環の構造-機能特異性

トログリタゾンによるMCP-1産生抑制がチアゾリジン環あるいはクロマン環のいずれに由来するものなのかを明らかにする目的で、トログリタゾン、およびクロマン環を有さないチアゾリジン系薬剤であるピオグリタゾン、さらにクロマン環を有するアルファートコフェロールがHMCでのTNF- α によるMCP-1蛋白の誘導性におよぼす効果を比較検討した。50ng/mlのTNF- α による刺激にて誘導されたMCP-1蛋白を10 μ Mのアルファートコフェロールは86.3%に、10 μ Mのピオグリタゾンは77.5%に、そして10 μ Mのトログリタゾンは46.8%に抑制した(図8)。

考 察

脂肪組織から過剰に分泌されるTNF- α は、細胞質内のリン酸化を含むインスリン受容体からのシグナル伝達を抑制し²²⁾、さらに4型糖輸送体の発現を抑制して糖の細胞内への取り込みを抑え、インスリン抵抗性を引き起こす可能性が示されている²³⁾。チアゾリジン誘導体は脂肪細胞への分化の決定因子であるペロキシソーム増殖応答性受容体ガンマー (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) のリガンドとして作用し²⁴⁾、脂肪細胞を分化させ、脂肪細胞からのTNF- α 産生を低下させる²⁵⁾。またチアゾリジン誘導体はリポ蛋白リパーゼを活性化し、中性脂肪の分解を促進し、糖尿病における脂質代謝障害を改善させることが知られている²⁶⁾。トログリタゾンによるインスリン抵抗性の改善機構として、2型糖尿病患者において骨格筋での糖利用を促進し、肝での糖新生を抑制し、空腹時および食後の血糖値を低下させることが証明されている²⁷⁾。しかし近年、2型糖尿病においてのみならず、インスリン依存型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン糖尿病ラットにおいても、トログリタ

ゾンが血管内膜の過形成を是正させること²⁸⁾や、糖尿病性腎症における微量アルブミン尿を低下させること²⁹⁾などが明らかにされた。こうしたトログリタゾンの効果は、従来から考えられてきたインスリン抵抗性改善作用を介する血糖降下作用や脂質代謝改善作用に加えて、血管を構成する細胞に直接作用することによるものと推測した。また、トログリタゾンが低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) の酸化を抑制することが報告されていること¹⁷⁾¹⁸⁾から、こうした一連の効果が抗酸化作用による可能性も考えた。これらの知見を踏まえて、本研究ではトログリタゾンがメサンギウム細胞や血管内皮細胞に直接的に作用し、抗動脈硬化作用を発揮するかについて、動脈硬化病形成の初期段階で重要なMCP-1に着目し^{8)~13)}、その抑制機構を検討した。その結果、トログリタゾンはメサンギウム細胞および血管内皮細胞からのMCP-1蛋白産生をmRNAレベルから抑制しうることが明らかにした。HMCではTNF- α 非投与下においても、10 μ MのトログリタゾンはMCP-1蛋白濃度をコントロールの41.5%に抑制した。これは培地に使用した血清によるMCP-1産生促進作用の抑制と考える。またHMCにおいて、TNF- α によるmRNAの誘導が蛋白量に比し低かった点については、細胞の継代数の違いや、mRNAの回収時間などが影響したものと考える。

本研究で得られた知見をもとに、筆者はトログリタゾンによるMCP-1産生の抑制機構について一つのモデルを提唱する。図9に示すようにTNF- α の刺激はプロテインチロシキナーゼを介して³⁰⁾、高グルコースやホルボール・12-ミリステート・13-アセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) による刺激はプロテイン・キナーゼC (protein kinase C, PKC) を介して伝達され、さらにこれらのシグナルはその後合流し、核内転写因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) によってMCP-1発現が誘導される³¹⁾。今回の研究の結果、トログリタゾンがMCP-1発現を抑制したことから、この薬剤が細胞内のシグナル機構あるいは転写因子の段階に作用している可能性を考えた。トログリタゾンの分子構造はクロマン環とチアゾリジン環から成り立っているが、今回得られた抑制効果がそのどちらに起因しているかは明確ではなかった。そこでクロマン環をもつアルファートコフェロールとクロマン環をもたないチアゾリジン環をもつピオグリタゾンを、両者をもつトログリタゾンと比較することで分子構造における作用の相違について検討した。最近、チアゾリジン誘導体はPPAR- γ のリガンドとして作用し、脂肪細胞の分化を促進させる一方で、NF- κ Bを介する種々のサイトカイン産生を抑制することが明らかとなった³²⁾。従って、MCP-1の抑制はトログリタゾンによるNF- κ Bの抑制によって説明できるかもしれない(図9)。さらに、このサイトカインの抑制はクロマン環をもたないチアゾリジン誘導体でも認められていることから³²⁾、NF- κ Bの抑制効果はチアゾリジン環に起因しているかもしれない。今回の研究の結果、ピオグリタゾンはTNF- α 刺激によるMCP-1産生をも抑制することが明らかとなった。一方、トログリタゾンのクロマン環は、アルファートコフェロールと同様の抗酸化作用を有していることが証明されている¹⁷⁾¹⁸⁾。これまでPMAや高グルコース刺激によるPKCの活性はアルファートコフェロールによって阻害されること³³⁾³⁴⁾や酸化LDL刺激によるMCP-1発現に対し、アルファートコフェロールはNF- κ Bの抑制を介して、MCP-1発現を抑制すること³⁵⁾が知られている。今回の研究の結果、アルファートコフェ

ロールはTNF- α 刺激によるMCP-1産生をも抑制することが明らかとなった。著者はすでにトログリタゾンがメサングウム細胞や血管内皮細胞からのPMA刺激によるMCP-1産生をも抑制することを明らかにしている³⁶⁾。さらに興味深いことにトログリタゾンは3剤の中で最も強いMCP-1産生抑制効果を示した。従って、トログリタゾンはチアゾリジン環によるNF- κ Bの抑制とクロマン環による抗酸化効果の両者の効果を合わせ持つことで最も強いMCP-1産生抑制効果を示した可能性を考える(図8)。

腎硬化症や糖尿病性腎症の病初期にMCP-1によって糸球体内へ浸潤・集積した単球やマクロファージは形質転換増殖因子を放出し、やがてメサングウム領域への細胞外基質の増大や糸球体硬化の進展をもたらす^{37,38)}と考えられており、また粥状硬化の病初期にMCP-1によって血管内皮下への遊走・浸潤した単球はマクロファージに分化し、内皮下のLDLをさかんに貪食しやがて泡沫細胞となる。この泡沫細胞から種々の増殖因子が放出され、血管平滑筋細胞の内皮下への遊走・増殖が起こりプラークが形成されていく^{39)~41)}。こうした病態の初期段階に重要なMCP-1を抑制することは動脈硬化や糖尿病性合併症の発症・進展を抑止する上で極めて重要である。本研究はトログリタゾンが従来の血糖降下作用の他に、メサングウム細胞や血管内皮細胞からのMCP-1産生を抑制するといった直接的な抗動脈硬化作用を有することを示唆する。今後はシグナル伝達の各段階の阻害剤を用いてトログリタゾンによるMCP-1発現抑制機構を解明するとともに、チアゾリジン系薬剤が実際に生体内で動脈硬化進展を抑止しうるか検討していきたい。

結 論

動脈硬化初期病巣形成に重要なMCP-1に対するインスリン抵抗性改善剤(トログリタゾン)の抑制効果につき検討し、以下の新知見を得た。

1. メサングウム細胞および血管内皮細胞においてTNF- α はMCP-1産生をmRNAのレベルから促進した。
2. チアゾリジン系薬剤であるトログリタゾンはHMCおよびHUVECからのTNF- α 誘導性MCP-1産生を濃度依存性に抑制した。
3. トログリタゾンはHMCおよびHUVECからのTNF- α 誘導性MCP-1 mRNA発現を抑制した。
4. メサングウム細胞におけるMCP-1産生の抑制効果は、ピオグリタゾン、アルファートコフェロールでも認められたことから、チアゾリジン環とクロマン環はともにTNF- α 誘導性MCP-1産生を特異的に抑制し、トログリタゾンは両者の作用を合わせ持つと推定する。

以上の結果よりトログリタゾンは直接的な抗動脈硬化作用により動脈硬化や糖尿病性合併症の発症・進展を抑止しうる可能性を考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接のご指導を賜りました筆俊成助手ならびに永井幸広博士に心から感謝致します。さらに御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部内科学第一講座の皆様へ感謝いたします。なお本文の要旨の一部は第32回アメリカ糖尿病学会リサーチ・シンポジウム(1997年、フロリダ)、第40回(1997年、東京)、第41回(1998年、和歌山)日本糖尿病年次学術集会において発表した。

文 献

- 1) DeFranto RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14: 173, 1991.
- 2) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607, 1988
- 3) Moller DE, Flier JS. Insulin resistance: Mechanisms, syndromes and implications. *N Engl J Med* 324: 938-948, 1991
- 4) Dzurik R, Spustova V, Janekova K. The prevalence of insulin resistance in kidney disease patients before the development of renal failure. *Nephron* 69: 281-285, 1995
- 5) Abate N. Obesity and cardiovascular disease. Pathogenetic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *J Diabetes Complications* 14: 154-74, 2000
- 6) Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, Leonard EJ. Purification and acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* 169: 1449-1459, 1989
- 7) Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 136: 1229-1233, 1990
- 8) Furuta T, Saito T, Ootake T, Soma J, Obara K, Abe K, Yoshinaga K. The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 21: 480-485, 1993
- 9) Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, Eng E, Gordon K, Floege J, Couser WG, with statistical assistance from Seidel K. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 47: 935-944, 1995
- 10) Nelken NS, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88: 1121-1127, 1991
- 11) Yu X, Dluz S, Graves DT, Zhang L, Antoniadis HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6953-6957, 1992
- 12) Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4141-4145, 1991
- 13) Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol* 24: 534-539, 1993
- 14) Valente AJ, Graves DT, Vialle-Valentin CE, Delgado R, Scheartz CJ. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman monocyte primate vascular cells in culture. *Biochemistry* 27: 4162-4167, 1988
- 15) Rovin BH, Yoshimura T, Tan L. Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured

human mesangial cells. *J Immunol* 1: 2148-2153, 1992

16) Kumar S, Boulton AJM, Beck-Nielsen H, Berthezene F, Muggeo M, Persson B, Spinass GA, Donoghue S, Lettis S, Stewart-Long P, for the Troglitazone study group. Troglitazone, an insulin action enhancer, improves metabolic control in NIDDM patients. *Diabetologia* 39: 701-709, 1996

17) Nagasaka Y, Kaku K, Nakamura K, Kaneko T. The new oral hypoglycemic agent, CS-045, inhibits the lipid peroxidation of human plasma low density lipoprotein in vitro. *Biochem Pharmacol* 50: 1109-1111, 1995

18) Noguchi N, Sakai H, Kato Y, Tsuchiya J, Yamamoto Y, Niki E, Horikoshi H, Kodama T. Inhibition of oxidation of low density lipoprotein by troglitazone. *Atherosclerosis* 123: 227-234, 1996

19) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987

20) Strieter RM, Wiggins R, Phan SH, Wharram BL, Showell HJ, Remick DG, Chensue SW, Kunkel SL. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biophys Res Commun* 162: 694-700, 1989

21) Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett* 244: 487-493, 1989

22) Hotamisligil GS, Paraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665-668, 1996

23) Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT 4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 272: 971-976, 1997

24) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270: 12953-12956, 1995

25) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101: 1354-1361, 1998

26) Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B. Regulation of triglyceride metabolism by PPARs: fibrates and thiazolidinediones have distinct effects. *J Atheroscler Thromb* 3: 81-89, 1996

27) Nolan JJ, Ludvig B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treatment with troglitazone. *N Eng J Med* 331: 1188-

1193, 1994.

28) Law RE, Meehan WP, Xi XP, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, Faxon D. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 98: 1897-1905, 1996

29) Fuji M, Takemura R, Yamaguchi M, Hasegawa G, Shigeta H, Nakano K, Kondo M. Troglitazone (CS-045) ameliorates albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 46: 981-983, 1997

30) Pai R, Ha H, Kirschenbaum MA, Kamanna VS. Role of tumor necrosis factor- α on mesangial cell MCP-1 expression and monocyte migration: mechanisms mediated by signal transduction. *J Am Soc Nephrol* 7: 914-923, 1996

31) Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor- κ B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int* 48: 1263-1271, 1995

32) Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86, 1998

33) Tasinato A, Boscoboinik DB, Bartoli GM, Azzi A. d- α -Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidative properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12190-12194, 1995

34) Keaney JF, Guo Y, Cunningham D, Shwaery GT, Xu A, Vita JA. Vascular incorporation of α -tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. *J Clin Invest* 98: 386-394, 1996

35) Takahara N, Kashiwagi Y, Nishio Y, Harada N, Kojima H, Maegawa H, Hidaka H, Kikkawa R. Oxidized lipoproteins found in patients with NIDDM stimulate radical-induced monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Diabetologia* 40: 662-670, 1997

36) Yokoyama M, Nagai Y, Yamashita H, Yoshizawa M, Hisada A, Kobayashi K. Inhibitory effect of troglitazone (CS-045) on cytokine-induced monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human mesangial cells. *Diabetologia* 40: A434, 1997

37) Sharma K and Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease: the case for transforming growth factor- β as a key mediator. *Diabetes* 44: 1139-1146, 1995

38) Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 45: 522-530, 1996

39) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993

40) Witatum JL, Steinberg D. Roles of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792, 1991

41) Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91: 2844-2850, 1995

Inhibitory Effect of Thiazolidinedione Derivatives on TNF- α -Induced Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) in Human Mesangial and Umbilical Vein Endothelial Cells Masayoshi Yokoyama, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **109**, 372 — 379 (2000)

Abstract

Insulin resistance including diabetes, obesity, dyslipidemia and hypertension has been considered as a risk factor for atherosclerosis and one of the targets of treatment for diabetes. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is known to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and glomerulosclerosis through the induction of monocyte migration. Recently, a new oral insulin-sensitizing agent, troglitazone, has been reported to protect against the development of atherosclerosis and microvascular complication via its improvement of insulin resistance. However, it has not yet been clarified whether troglitazone acts directly on vascular cells and inhibits the progression of atherosclerosis including glomerulosclerosis. We therefore investigated the effects of troglitazone on MCP-1 production from human mesangial cells (HMC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). HMC and HUVEC were treated with or without troglitazone (1 or 10 μ M) in the presence or absence of various concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) (5, 50 or 500 ng/ml), and then the amounts of MCP-1 secreted from the HMC and HUVEC were measured. TNF- α , which is elevated in insulin resistance state and atherosclerotic lesions was found to, dose dependently stimulate MCP-1 production by HMC and HUVEC. In HMC, TNF- α increased MCP-1 production by 55-fold vs. the control, and troglitazone dose dependently inhibited this TNF- α -induced increase in MCP-1 secretions by 49.3% at 10 μ M of troglitazone. In HUVEC, TNF- α increased MCP-1 production by 119-fold vs. the control, and troglitazone dose dependently inhibited this TNF- α -induced increase in MCP-1 secretions by 19.4% at 10 μ M of troglitazone. Northern blot analyses revealed that troglitazone decreased the TNF- α -induced increase of MCP-1 mRNA levels in HMC and HUVEC. Although the molecular structure of troglitazone consists of a chroman ring and thiazolidine ring, both α -tocopherol, which a non-thiazolidinedione has a chroman ring and pioglitazone, a thiazolidinedione without a chroman ring, also inhibited the TNF- α -induced increase in MCP-1 production from HMC, suggesting that the inhibitory effects of troglitazone on MCP-1 production may derive from both structures. The present study suggests the possibility using of thiazolidinedione to prevent the progression of atherosclerosis and glomerulosclerosis by inhibiting MCP-1 production from endothelial and mesangial cells.