

インスリンによる血管新生の誘導とその生理的意義

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/2297/9387

インスリンによる血管新生の誘導とその生理的意義

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡邊洋宇教授)

金沢大学医学部医学科生化学第二講座 (主任: 山本 博教授)

川 上 卓 久

糖尿病患者ではインスリン治療により網膜症が増悪することが臨床的に知られているが、その分子機構はなお明らかでない。本研究で筆者は、インスリンがヒト微小血管内皮細胞の増殖と管腔形成にどのような影響を及ぼすかにつき検討した。その結果、微小血管内皮細胞のDNA合成と管腔形成は培地中に添加したインスリンの濃度に依存して促進されることが見出された。また、このインスリンの血管新生促進作用は主として血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) によって仲介されることが明らかとなった。これは以下の根拠からである。インスリンに曝露された内皮細胞では分泌型 VEGF をコードする mRNA 量が約3倍増加した。一方、VEGF受容体である含キナーゼインサート領域受容体 (kinase insert domain-containing receptor, *kdr*)、*fms* 様チロシンキナーゼ1 (*fms*-like tyrosine kinase1, *flt1*) の mRNA 量には変化を認めなかった。インスリンによる内皮細胞の増殖と管腔形成促進作用は抗 VEGF 単クローン抗体によって完全に中和された。さらに、インスリンは血管新生の代表的な促進因子である低酸素の血管新生活性を相加的に増強した。インスリンは内皮細胞のプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) の活性を増加させることもはじめて見出された。従ってインスリンはオートクリン VEGF を介して直接的に血管新生を促進させるのみならず、血栓形成により局所的な虚血状態を招くことで間接的にも血管新生を促し、糖尿病性網膜症の進展、増悪に関与するものと考えられた。

Key words insulin, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, hypoxia, diabetic retinopathy

ヒトインスリン製剤の臨床への応用は糖尿病患者に大きな恩恵をもたらしてきた。事実、インスリン治療により糖尿病性血管合併症の進展、増悪が阻止されうるという大規模な疫学調査の成績も近年報告されている¹⁾。しかし、インスリン治療は両刃の矢ともなる。治療に際して行われるインスリンの非生理的な投与は高インスリン血症を招き、高脂血症、高血圧を引き起こして動脈硬化を助長することが知られてきており²⁾、疫学的にもインスリンの投与そのものが糖尿病性網膜症を増悪させる独立した危険因子であることが明らかにされた³⁾。

近年、血管透過性因子としても知られる血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) が網膜虚血部で誘導され増殖性糖尿病性網膜症における血管新生に関与していることが明らかにされた^{4,5)}。筆者らも慢性的な高血糖状態で促進的に形成、蓄積される後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) が内皮細胞自身で産生されるオートクリン VEGF を介して血管新生を誘導することを既に報告している⁶⁾。さらに糖尿病性網膜症における血液-網膜関門 (blood-retinal barrier, BRB) の破綻にも VEGF の関与が指摘されており⁷⁾、このことは虚血や低酸素以外の他の因子によっても VEGF が誘導されうるとを示唆している。そこで本研究ではインスリンによる糖尿病性網膜症の進展、増悪の分子機構を明らかにするた

め、インスリンの血管新生に及ぼす影響につき検討した。

材料及び方法

I. 材料

ヒト皮膚微小血管内皮細胞はクラボウ社 (寝屋川) より患与された。細胞は E-BM 培地に 5% ウシ血清、0.4% ウシ脳抽出液、10 ng/ml の表皮増殖因子、1 μ g/ml のヒドロコルチゾンを加えた E-BM 培地で維持し、実験には 5 ~ 10 継代目の細胞を用いた。

II. 内皮細胞の低酸素培養

ヒト微小血管内皮細胞の培養フラスコを大気コントロール培養チェンバー (Bellco, Vineland, USA) 内に置き、O₂ (10%, 5% または 2.5%) と CO₂ (5%) と N₂ (85%, 90% または 92.5%) の混合ガス (日本酸素, 東京) を毎分 10 リットルの流量で 5 分間注入し密閉した後、37°C の恒温室に静置した。混合ガスは 24 時間毎に置換した。チェンバー内のガス組成は $\pm 0.05\%$ の精度で 24 時間一定に保たれていた⁸⁾。

III. 細胞増殖の定量

1. 生細胞数の算定

細胞を 24 穴のクラスターディッシュ (Costar, Pleasanton, USA) に播種後経時的に 0.25% トリプシンで分散し、0.17%

平成10年9月10日受付, 平成10年12月10日受理

Abbreviations: AGE, advanced glycation endproducts; BRB, blood-retinal barrier; EC, endothelial cells; *flt1*, *fms*-like tyrosine kinase1; *kdr*, kinase insert domain-containing receptor; mAb, monoclonal antibody; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction;

(w/v) 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生細胞数を算定した⁹⁾。

2. DNA合成能の測定

内皮細胞を24穴クラスターデッシュに各穴あたり 2×10^4 個播種し、細胞の接着を確認したうえで各種条件下で24時間培養後、DNA合成を測定した。すなわち最終濃度が $1 \mu\text{Ci/ml}$ となるように $[^3\text{H}]$ チミジン (82.9Ci/mmol , NEN Research Product, Boston, USA) を加え4時間インキュベーションした後、氷冷5%トリクロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) を加え20分間氷上に静置して細胞を固定し、細胞を氷冷5% TCAにて3回洗浄後、1M水酸化ナトリウム $200 \mu\text{l}$ を加え室温20分間の振盪により溶解した。1M塩酸 $200 \mu\text{l}$ で中和後、全量を5mlの液体シンチレーターと混和し ^3H 放射活性を測定した¹⁰⁾。

IV. DNAの化学合成

1. プライマーおよびプローブ

VEGFおよびVEGF受容体mRNA検出用オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーおよびプローブはフォスフォアミダイト法によりDNA合成装置モデル392 (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて化学合成した。合成後のオリゴデオキシリボヌクレオチド精製にはOPCカラム (Applied Biosystems) を用いた。VEGF, VEGF受容体である含キナーゼインサート領域受容体 (kinase insert domain-containing receptor, *kdr*), *fms* 様チロシンキナーゼ1 (*fms*-like tyrosine kinase1, *flt1*) ならびに β -アクチンのプライマーおよびプローブの配列はNomuraら⁹⁾に従った。

V. ポリ(A)⁺RNAの分離

種々の条件下で培養した微小血管内皮細胞からQuickPrep mRNA精製キット (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いてポリ(A)⁺RNAを分離した¹¹⁾。

VI. 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) とその産物のサザンブロット解析

GeneAmp RNA PCRキット (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) を用い、まずポリ(A)⁺RNAを鋳型として逆転写酵素にてcDNAを合成し、ついで、各mRNAに特異的なプライマーを用いてTaq DNAポリメラーゼにてcDNA断片を増幅した。反応にはDNAサーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を使用した¹²⁾。この際のPCR条件はNomuraら⁹⁾に従って定量性をもつと考えられる30ngのポリ(A)⁺RNAを用い、VEGFは30サイクル、*kdr*および*flt1*では25サイクルで行った。増幅後のcDNAを2%アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンフィルター (ハイボンDN⁺, Amersham, Buckinghamshire, UK) に転写し紫外線にて固定した。ついでフィルターを50%ホルムアミド、5×[食塩-リン酸ナトリウム-エチレンジアミン四酢酸液 (saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid, SSPE)], 5×デンハルト液 (0.1%ポリビニールピロリドン, 0.1%ウシアルブミン, 0.1%フィコール), 1% SDS, 500 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNAからなる溶液中で50℃, 4時間プレハイブリダイゼーションさせた後、50%ホルムアミド, 5×SSPE, 5×デンハルト液, 1% SDS, 500 $\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNA, ^{32}P 標識オリゴヌクレオチドプローブ10pmolからなる溶液中で50℃, 16時間ハイブリダイゼーションさせた。

プローブ標識には、DNA5'末端標識キット (宝酒造, 京都) と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ アデノシン三リン酸 (NEN Research Product) を使用した¹³⁾。ハイブリダイゼーション後、フィルターを $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDSにて室温で15分間洗浄し、 -80°C でオートラジオグラフィーを行った。シグナル強度の測定にはバイオイメージアナライザーFUJIX BAS1000 (富士フィルム, 浜松) を使用した。

VII. 微小血管内皮細胞の管腔形成

24穴クラスターデッシュを各穴あたり250 μl のマトリゲル (Collaborative Research, Bedford, USA) で被服し、37℃で1時間静置し溶液を固形化させた¹⁴⁾¹⁵⁾。その後、各穴あたり 4×10^4 個の微小血管内皮細胞を播種し細胞接着を確認したうえで、抗VEGF単クローン抗体であるBL-2 (三井製薬生物科学研究所より恵与) 10 $\mu\text{g/ml}$ の存在、非存在下で30分間前処置した。その後5% O₂の低酸素または0.1 $\mu\text{g/ml}$ のヒト組換え型インスリン (Sigma, St.Louis, USA) の投与、非投与下で6時間培養した。各条件ごとに無作為に選んだ9視野を写真に撮り、毛細管様構造の長さをNIHイメージ (Version 1.56) を用いてコンピュータ解析した。これらの毛細管様構造は電子顕微鏡像にて内腔を有していることが確認されている。

VIII. プラスミノゲンアクチベターインヒビター-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 活性の測定

0.1 $\mu\text{g/ml}$ のインスリンの投与、非投与下で内皮細胞を無血清培地にて24時間培養後、培地中に放出されたPAI-1活性を測定した。すなわち、調整培地25 μl に最終濃度3.8単位/mlのウロキナーゼ (JCR Pharmaceuticals Co.Ltd., 神戸), 20 $\mu\text{g/ml}$ のプラスミノゲン (Bio Pur AG, Bubendorf, Switzerland), さらに発色性の基質としてバリナーロイシン-リジン-ニトロアニリド化合物 (D-Val-Leu-Lys p-nitroanilide) (Sigma) を60 $\mu\text{mol/l}$ 加え、基質の加水分解を0分から240分まで計測し、プラスミンの生成を発色吸光度曲線より算定した。PAI-1活性はプラスミン生成の抑制程度より判定した¹⁶⁾。

成 績

I. インスリンの微小血管内皮細胞への作用

1. DNA合成の促進作用

ヒト微小血管内皮細胞の増殖にインスリンがどのような影響を及ぼすかをDNAへの $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み能で検討した。図1Aに示すようにインスリンにより内皮細胞におけるDNA合成は促進された。インスリンによる内皮細胞DNA合成促進活性は0.1 $\mu\text{g/ml}$ で最高値を示し対照群の約150%程度であった。

2. VEGFとその受容体の発現

ヒトVEGF遺伝子からはオルタナティブスプライシングにより鎖長の異なる4種のmRNAが生じ、このうち鎖長の長い2つのmRNA分子種からは非分泌型のVEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆が、残る2種からは分泌型のVEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅の蛋白質産物が生ずる。そこで4種のmRNAを峻別しうるRT-PCR法を用いて検討した結果を図1Bに示す。内皮細胞においては分泌型のVEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅に対応する486bpと618bpのDNA断片が増幅され、そ

の発現量はインスリンにより増強された。0.1 $\mu\text{g/ml}$ のインスリン投与により対照と比して約3倍程度の誘導が認められた。一方、VEGF受容体である *kdr* や *flt1* の mRNA レベルはインスリンの投与により変化はうけなかった。

3. 抗VEGF単クローン抗体による増殖中和作用
インスリンによる内皮細胞の増殖促進作用にオートクリン

VEGFが機能的に関与しているかどうかを明らかにするため、内皮細胞をBL-2で30分間前処置した後、0.1 $\mu\text{g/ml}$ のインスリンの投与、非投与下で24時間培養し ^3H チミジンの取り込み能を検討した。この結果、図1Cに示すように抗ヒトVEGF単クローン抗体であるBL-2はインスリンによる内皮細胞のDNA合成促進作用を量依存的に減少させた。10 $\mu\text{g/ml}$ のBL-2でイン

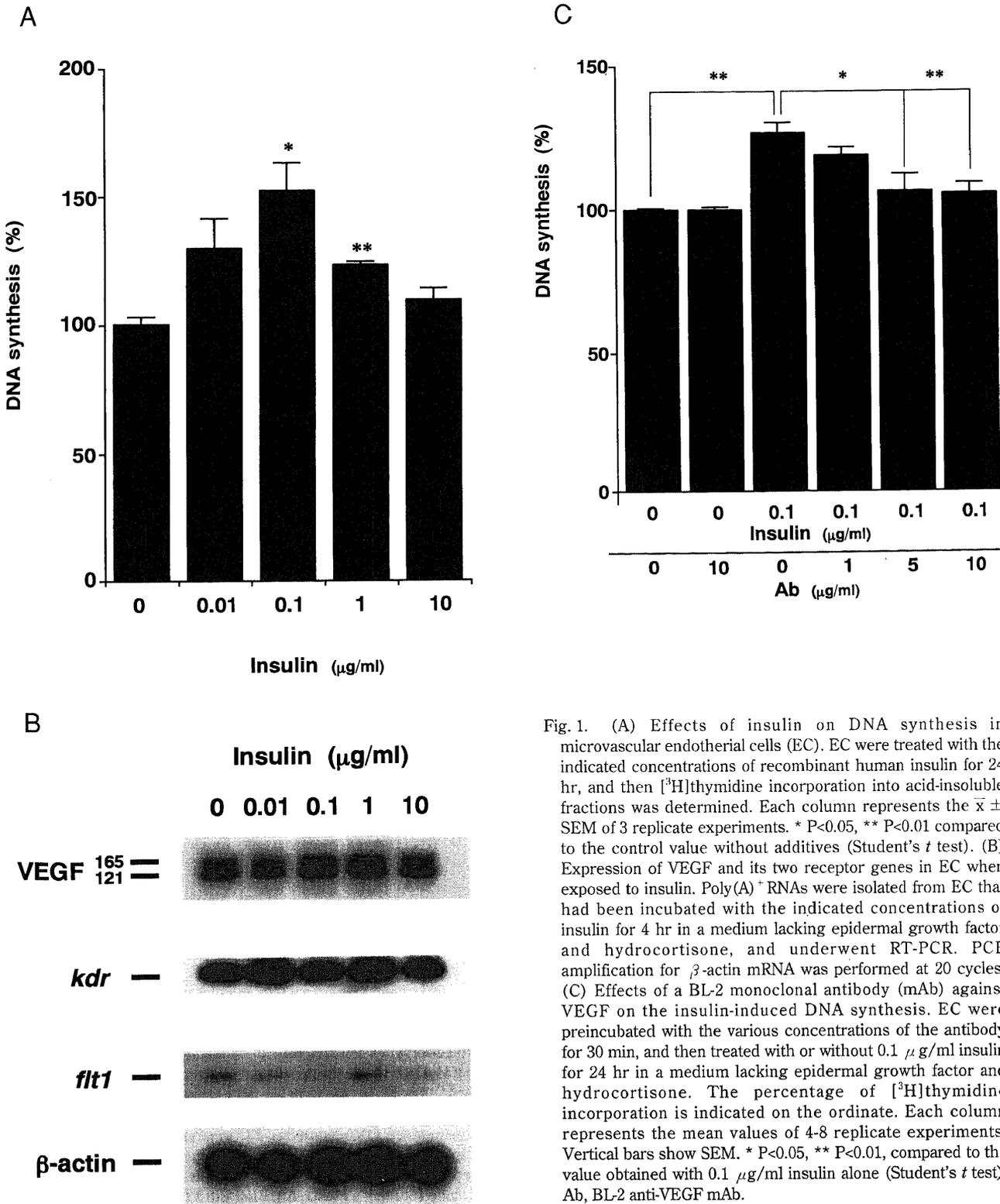


Fig.1. (A) Effects of insulin on DNA synthesis in microvascular endothelial cells (EC). EC were treated with the indicated concentrations of recombinant human insulin for 24 hr, and then ^3H thymidine incorporation into acid-insoluble fractions was determined. Each column represents the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of 3 replicate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the control value without additives (Student's t test). (B) Expression of VEGF and its two receptor genes in EC when exposed to insulin. Poly(A)⁺ RNAs were isolated from EC that had been incubated with the indicated concentrations of insulin for 4 hr in a medium lacking epidermal growth factor and hydrocortisone, and underwent RT-PCR. PCR amplification for β -actin mRNA was performed at 20 cycles. (C) Effects of a BL-2 monoclonal antibody (mAb) against VEGF on the insulin-induced DNA synthesis. EC were preincubated with the various concentrations of the antibody for 30 min, and then treated with or without 0.1 $\mu\text{g/ml}$ insulin for 24 hr in a medium lacking epidermal growth factor and hydrocortisone. The percentage of ^3H thymidine incorporation is indicated on the ordinate. Each column represents the mean values of 4-8 replicate experiments. Vertical bars show SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to the value obtained with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ insulin alone (Student's t test). Ab, BL-2 anti-VEGF mAb.

スリンの作用は完全に中和された。また同濃度の抗体はインスリン非投与下での内皮細胞のDNA合成には何ら影響を与えなかった。

II. 低酸素の微小血管内皮細胞への作用

1. 種々の低酸素下での増殖促進作用

従来より血管新生を惹起する主要因のひとつとして虚血の結果生ずる組織内酸素濃度の低下が考えられている。そこで実際に血管新生の場となる微小血管内皮細胞を用いて低酸素の内皮

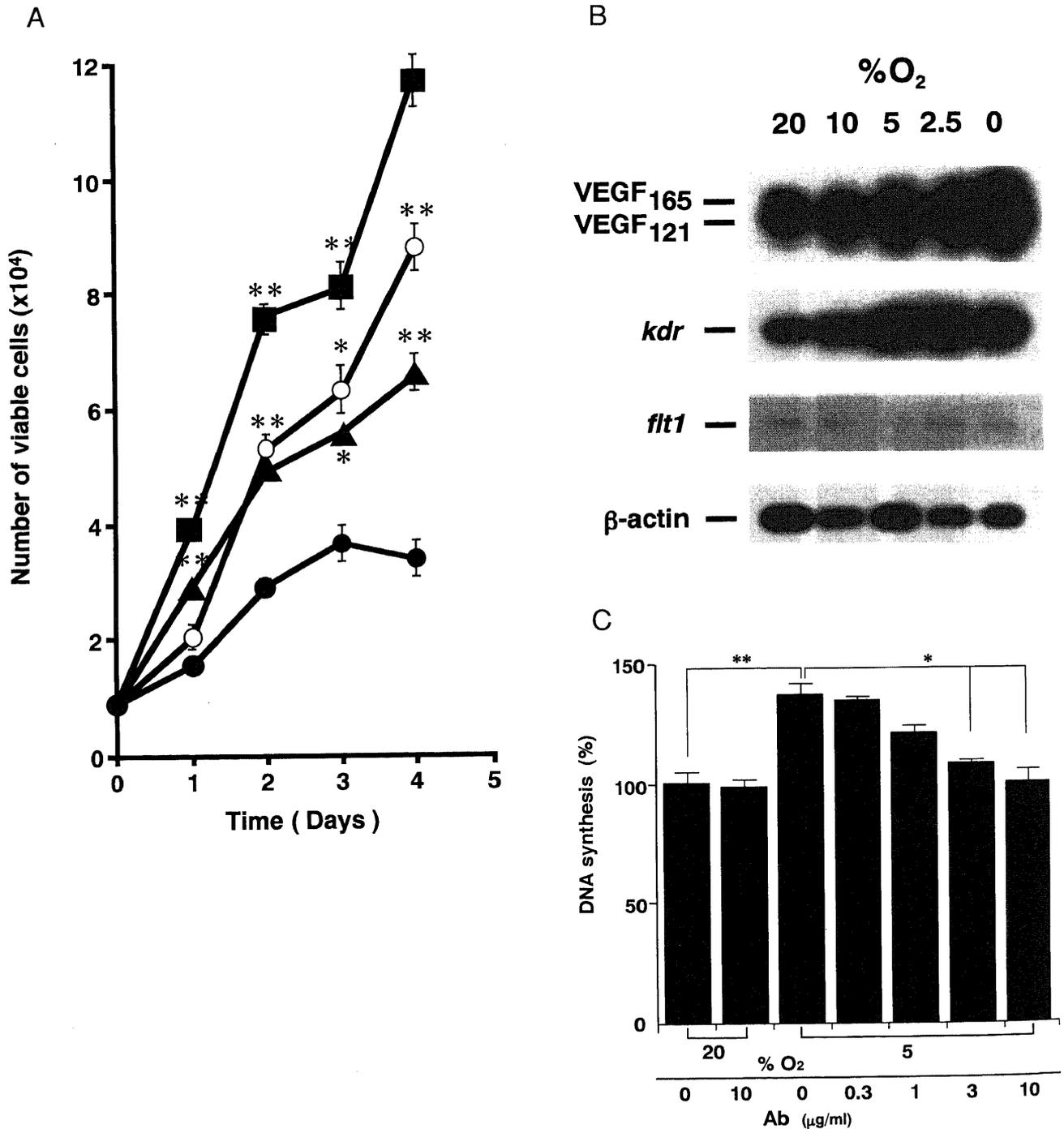


Fig. 2. (A) Growth of human microvascular EC under hypoxia. 2×10^4 cells were seeded per well and grown under various concentrations of oxygen. The number of viable cells is indicated on the ordinate. Culture period after cell attachment is indicated on the abscissa. Each point represents the mean for triplicate experiments; vertical bars show SEM when larger than the symbol: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the number of the cells cultured under 20% O₂ (Student's *t* test). ●, 20%; ○, 10%; ■, 5%; ▲, 2.5% O₂. (B) EC expression of VEGF and its two receptor genes under hypoxia. Poly(A)⁺ RNAs were isolated from EC treated with the indicated concentrations of oxygen for 24 hr, and analyzed by RT-PCR. (C) Neutralization by anti-VEGF mAb of hypoxia-induced DNA synthesis. EC were preincubated with a BL-2 mAb for 30 min, and then exposed to 5% O₂ for 24 hr in E-BM medium supplemented with 5% fetal bovine serum alone. The percentage of [³H]thymidine incorporation is indicated on the ordinate. Each column represents the mean value of 4 replicate determinations. Vertical bars show SEM. * $P < 0.001$, ** $P < 0.0001$ compared to the value with 5% O₂ alone (Student's *t* test). Ab, BL-2 anti-VEGF mAb.

細胞増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、図2Aに示すように低酸素状態により内皮細胞の増殖は有意に促進され、5% O₂で最大の増殖促進効果が得られた。酸素濃度による増殖促進効果は5% > 10% > 2.5% > 20%であった。

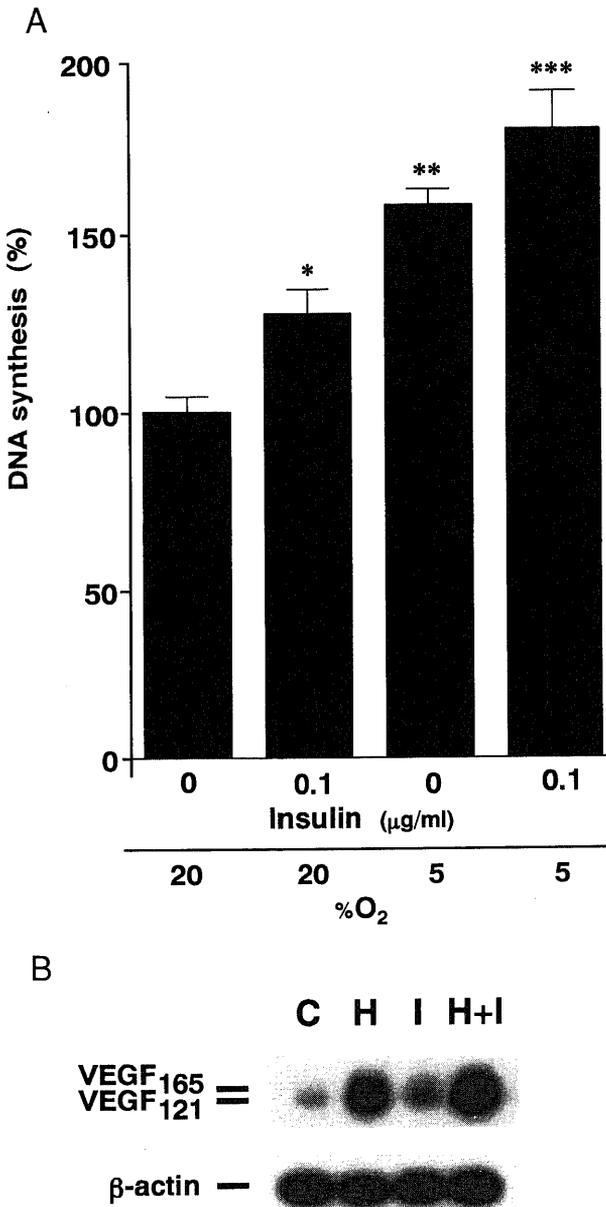


Fig. 3. Microvascular EC DNA synthesis and VEGF gene expression in the presence of insulin and hypoxia. (A) EC were exposed to 5% or 20% O₂ in the presence or absence of 0.1 μg/ml insulin for 24 hr in a medium lacking epidermal growth factor and hydrocortisone, and assayed for [³H]thymidine incorporation. Each column represents the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of 4 replicate determinations. * P<0.05, ** P<0.005, *** P<0.001 compared to the control value without additives (Student's *t* test). (B) EC were exposed to 5% or 20% O₂ for 20 hr, and further incubated with or without 0.1 μg/ml insulin for 4 hr under the same atmosphere. Then 30 ng poly(A)⁺ RNA from each culture were amplified by RT-PCR. C, control without additives; H, hypoxia (5% O₂); I, 0.1 μg/ml insulin; H+I, hypoxia (5% O₂) plus 0.1 μg/ml insulin.

2. VEGFとその受容体の発現

種々の酸素濃度で24時間培養した内皮細胞 (2.5%, 5%, 10%, 20% O₂) からポリ(A)⁺ RNAを分離して定量的RT-PCR法により VEGF mRNAレベルを検討した結果が図2Bである。酸素濃度の低下に伴ってVEGF mRNAレベルが著しく増大することが見出された。VEGF mRNAレベルは無酸素状態で最も高く、20%酸素時の約5倍にまで増加した。VEGF受容体では酸素濃度の低下に伴って *kdr* mRNAレベルが増大傾向を示したが、*flt1* mRNAレベルに変動は無かった。

3. 抗VEGF単クローン抗体による中和作用

VEGFが低酸素刺激による微小血管内皮細胞の増殖誘導に機能的に関わっているかどうかをみるため、抗VEGF単クローン抗体であるBL-2を用いて内皮細胞のDNA合成におよぼす効果を調べた。BL-2を加えた30分間の前処置後、5% O₂の低酸素培養で内皮細胞のDNAへの [³H]チミジンの取り込み能を検討した。その結果、図2Cに示すように低酸素刺激によるDNA合成促進作用はBL-2によって用量依存的に抑制された。BL-2単独では内皮細胞のDNA合成は何ら影響をうけなかった。

Ⅲ. インスリンと低酸素による相加的な内皮細胞増殖促進作用

さらに筆者はインスリンが低酸素による内皮細胞のDNA合成促進効果に相加的に作用するか否かを検討した。すなわち、微小血管内皮細胞を0.1 μg/mlインスリンならびに5% O₂の存在、非存在下で24時間培養し、内皮細胞のDNA合成に及ぼす影響を検討した。その結果、図3Aに示す如く、コントロールと比べてインスリンの投与で約30%、低酸素処理で約50%、低酸素下インスリン投与で約80%のDNA合成の増加を認めた。このことからインスリンは低酸素による内皮細胞の増殖促進に相加的に作用することが明らかとなった。また図3Bに示す如く、内皮細胞におけるVEGF mRNAの発現もインスリンと低酸素により相加的に誘導されることが示された。

Ⅳ. インスリン、低酸素による管腔形成誘導作用

ついでインスリン、低酸素刺激による微小血管内皮細胞の管腔形成能に及ぼす影響について検討した。マトリゲルで被覆した24穴クラスターデッシュに内皮細胞を播種し、BL-2存在、非存在下で30分間前処置した後、0.1 μg/mlのインスリンならびに5% O₂の低酸素存在、非存在下で6時間培養を行った。その結果、図4Aに示す如く、インスリン、低酸素はともにマトリゲル上での内皮細胞管腔形成を促進した。また、そのいずれの効果も10 μg/mlのBL-2で完全に抑制されたことから、オートクリンVEGFを介すると思われる。インスリン単独では約50%、低酸素処理では約100%、そしてインスリンと低酸素両

Table 1. Effects of insulin on PAI-1 activity in microvascular EC

Treatment	PAI-1 activity (%)
None	100.0+7.3
Insulin	206.3+5.7 *

After microvascular EC had been treated with or without 0.1 μg/ml insulin for 24 hr, conditioned medium was assayed for PAI-1 activity.

Data represent the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of 9 replicate determinations.

*P<0.05 compared to the value without insulin (Student's *t* test).

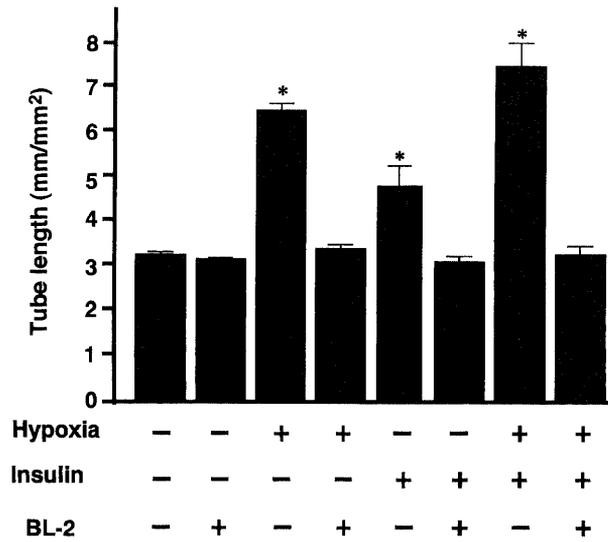
者で約150%の管腔形成促進作用が観察された。図4Bに典型的な写真を示す。

V. インスリンによる PAI-1 活性増強作用

微小血栓が形成されれば、その末梢部は低酸素状態におちい

る。そこで微小血管内皮細胞のPAI-1活性におよぼすインスリンの影響につき検討した。その結果は表1に示す如く、24時間の0.1 $\mu\text{g/ml}$ のインスリン処理によって内皮細胞のPAI-1活性はコントロールの約2倍にまで高められた。

A



B

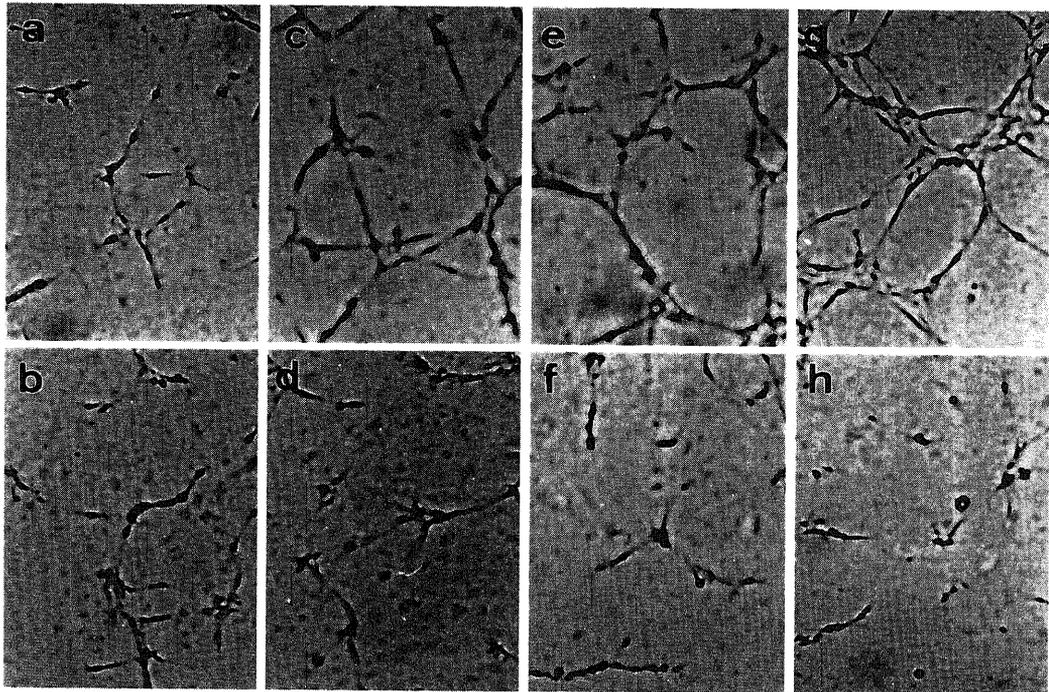


Fig. 4. On-gel tube formation assay. (A) Quantitative representation. EC were seeded on Matrigel with or without 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-VEGF mAb (BL-2), and then exposed to 5% (hypoxia +) or 20% O₂ (hypoxia -) in the presence or absence of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ insulin (insulin) for 6 hr. Nine fields were randomly selected for each culture and photographed. Lengths of tube-like structures were measured with a microcomputer-assisted NIH Image. Each column represents the \bar{x} value. Bars show SEM. * $P < 0.05$ compared to the value without additives (Student's *t* test). (B) Typical microphotographs of EC tubes. a, Culture without additives; b, with 10 $\mu\text{g/ml}$ BL-2 mAb; c, with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ insulin; d, with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ insulin plus 10 $\mu\text{g/ml}$ BL-2 mAb; e, under 5% O₂; f, under 5% O₂ with 10 $\mu\text{g/ml}$ BL-2 mAb; g, under 5% O₂ with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ insulin; h, under 5% O₂ with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ insulin plus 10 $\mu\text{g/ml}$ BL-2 mAb.

考 察

本研究により、血管新生のキーステップである内皮細胞の増殖と管腔形成がインスリンにより誘導されることがはじめて明らかにされた。このインスリンの血管新生活性は、ブタインスリンがウシ網膜内皮細胞でのDNA合成を促進させたというKingら¹⁷⁾の報告と一致する。彼らの報告と今回の実験結果ではインスリンによるDNA合成の促進程度に若干の差が認められるが、それは実験に用いた内皮細胞の種類、動物種、培養条件の違いによると考えられる。さらに筆者はインスリンの血管新生活性が主に血管内皮細胞自身で産生されたオートクリンVEGFを介することも見出した。すなわちインスリンにより内皮細胞で分泌型VEGFのmRNA量が増加し、インスリンによる微小血管内皮細胞の増殖と管腔形成の誘導が抗VEGF単クローン抗体により完全に中和された。この抗体自体は内皮細胞の増殖や管腔形成に影響をおよぼさなかったことから、上記中和活性は抗体の毒性によるものとは考えにくい。

さらに本研究では低酸素刺激においても主としてオートクリンVEGF作用により微小血管内皮細胞の増殖と管腔形成が促進されることが観察された。低酸素下でのVEGFの作用は以前に大血管であるヒト臍静脈内皮細胞でも報告されている⁸⁾。この2つの内皮細胞における低酸素下での増殖反応には多少の差異が認められた。具体的には臍静脈内皮細胞では10% O₂下で、一方、微小血管内皮細胞では5% O₂下で最大の増殖を示した。これは内皮細胞の多様性 (heterogeneity) の一端を示すものと考えられる¹⁸⁾。さらに5% O₂下ではインスリンによる微小血管内皮細胞のDNA合成と管腔形成促進作用は相加的に増強されたが、これらの効果はいずれも抗VEGF単クローン抗体により中和された。したがって、インスリンと低酸素は共にVEGFを血管新生を導く主要メディエーターとしていると推測された。

近年、網膜の虚血や低酸素によってVEGFの産生が誘導され、糖尿病性網膜症での血管新生を促進することが報告されている⁴⁾⁵⁾¹⁹⁾。従って、本研究の結果から糖尿病性網膜症においては、インスリン治療がVEGF産生を促して病態をさらに増悪させるという機能的関連を理解することができる。VEGFはまた、血管透過性因子としても知られており²⁰⁾、糖尿病患者にみられるBRB破綻に関与することも示唆されている⁷⁾。糖尿病性網膜症においてはBRB破綻による血管透過性の亢進が特徴的な初期病変と見なされている²¹⁾ことから、初期の糖尿病性網膜症の進展にもインスリンが関与している可能性も考えられる。事実、インスリン投与によって血管透過性が亢進し毛細血管からのアルブミン漏出が増加することが報告されており²²⁾、この可能性を支持している。さらにインスリン療法による急激な血糖降下によってもVEGFの誘導が引き起こされる²³⁾ことから、これらの機序が組合わさってインスリン治療中に糖尿病性網膜症の増悪が観察されるのであろう²⁴⁾。

インスリンによるVEGF mRNAの誘導機構は現段階では明らかになっていないが、インスリン様増殖因子-Iが0.1~10 μ g/mlの濃度でVEGF mRNAの誘導を引き起こさなかった (未発表データ) ことから、インスリンは微小血管内皮細胞上のインスリン受容体を介して作用するものと推測される²⁵⁾。またインスリンは受容体のチロシン酸化を介して核内因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)を活性化しうることが報告されている²⁶⁾。

従ってインスリンはNF- κ Bを介する経路によってVEGF mRNAレベルを増加させうるのかもしれない²⁷⁾。

糖尿病性網膜症の進展には様々な血栓傾向が関係している²⁸⁾²⁹⁾。Yamagishiらは以前に慢性的な高血糖状態で形成、蓄積されるAGEが内皮細胞の抗凝固性プロスタノイドであるプロスタサイクリンの産生を阻害するだけでなく、PAI-1活性を増加して内皮細胞での血栓形成を助長することを報告している⁹⁾¹⁶⁾³⁰⁾。本研究ではインスリンが微小血管内皮細胞でPAI-1活性を増大させ線維素溶解活性を弱め、凝固した線維塊を安定させる作用があることも初めて明らかにされた。末梢血管で形成される微小血栓は局所の虚血と低酸素状態を引き起こし、VEGFの過剰な産生を介してさらに血管新生を促進させ、糖尿病性網膜症を進展、増悪させうるのであろう。

結 論

インスリンによる血管新生誘導とその分子機構につき検討し、以下の新知見を得た。

1. インスリンは、ヒト微小血管内皮細胞の増殖と管腔形成を促進した。
2. インスリンは内皮細胞の分泌型VEGFのmRNA量を増加させた。一方、VEGF受容体である*kdr*と*flt1*のmRNA量には影響を及ぼさなかった。
3. インスリンによる内皮細胞の増殖と管腔形成促進作用は抗VEGF単クローン抗体により完全に中和された。
4. インスリンの内皮細胞増殖・管腔形成促進作用は、代表的な血管新生促進因子である低酸素の作用と相加的であった。
5. インスリンはPAI-1活性を高め、内皮細胞における線維素溶解活性を抑制した。

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渡邊洋字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金沢大学医学部生化学第二講座の山本 博教授、山岸昌一講師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浦山 博講師ほか金沢大学医学部第一外科学講座ならびに生化学第二講座の皆様にも感謝致します。

文 献

- 1) The diabetes control and complications trial research group. The effects 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
- 2) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607, 1988
- 3) Klein R, Klein BEK, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 102: 527-532, 1984
- 4) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487, 1994
- 5) Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor

- levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445-450, 1994
- 6) Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 272: 8723-8730, 1997
 - 7) Murata T, Ishibashi T, Khalil A, Hata Y, Yoshikawa H, Inomata H. Vascular endothelial growth factor plays a role in hyperpermeability of diabetic retinal vessels. *Ophthalmic Res* 27: 48-52, 1995
 - 8) Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J, Yamamoto H. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270: 28316-28324, 1995
 - 9) Yamagishi S, Kobayashi K, Yamamoto H. Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 418-425, 1993
 - 10) Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu CC, Yamamoto H. Advanced glycosylation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS Lett* 384: 103-106, 1996
 - 11) Yamagishi S, Hsu CC, Kobayashi K, Yamamoto H. Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 840-846, 1993
 - 12) Yamagishi S, Hsu CC, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, Kobayashi K, Yamamoto H. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: A possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 681-687, 1995
 - 13) Yamamoto Y, Yamagishi S, Hsu CC, Yamamoto H. Advanced glycosylation end products-receptor interactions stimulate the growth of human pancreatic cancer cells through the induction of platelet-derived growth factor-B. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 700-705, 1996
 - 14) Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589-1598, 1989
 - 15) Grant DS, Lelkes PI, Fukuda K, Kleinman HK. Intercellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A: 327-336, 1991
 - 16) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41: 1435-1441, 1998
 - 17) King GL, Goodman D, Buzney S, Moses A, Kahn R. Receptors and growth-promoting effects of insulin and insulinlike growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J Clin Invest* 75: 1028-1036, 1985
 - 18) Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Rober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3561, 1998
 - 19) Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: Identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* 1: 182-193, 1995
 - 20) Ferrara N, Houck KA, Winer J, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18-32, 1992
 - 21) Dorchy H. Characterization of early stages of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 16: 1212-1214, 1993
 - 22) Nestler JE, Barlascini CO, Tetrault GA, Fratkin MJ, Clore JN, Blackard WG. Increased transcapillary escape rate of albumin in nondiabetic men in response to hyperinsulinemia. *Diabetes* 39: 1212-1217, 1990
 - 23) Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Kondo S, Hanatani M, Suzuki H, Yamashita K. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulation by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 193-198, 1996
 - 24) Van Ballegooye E, Hooymans JMM, Timmerman Z, Reitsma WD, Sluiter WJ, Schweitzer NMJ, Doorenbos H. Rapid deterioration of diabetic retinopathy during treatment with continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Care* 7: 236-242, 1984
 - 25) Frank HJL, Pardridge WM, Morris WL, Rosenfeld RG, Choi TB. Binding and internalization of insulin and insulin-like growth factors by isolated brain microvessels. *Diabetes* 35: 654-661, 1986
 - 26) Bertrand F, Atfi A, Cadoret A, L'Allemain G, Robin H, Lascols O, Capeau J, Cherqui G. A role of nuclear factor kB in the antiapoptotic function of insulin. *J Biol Chem* 273: 2931-2938, 1998
 - 27) Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 17: 4015-4023, 1997
 - 28) Small M, Kluft C, MacCuish AC, Lowe GDO. Tissue plasminogen activator inhibition in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 12: 655-658, 1989
 - 29) Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients-relationship with plasma

insulin. *Thromb Hemostas* 61: 370-373, 1989

30) Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu C-C, Yamamoto

H. Role of AGE-RAGE system in the development of diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 63: S240 (Abstract), 1996

Insulin Induction of Angiogenesis and Its Physiological Significance Takuhisa Kawakami, First Department of Surgery and Department of Biochemistry, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **107**, 517 — 525 (1998)

Key words insulin, angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia, diabetic retinopathy.

Abstract

Insulin treatment is epidemiologically known as an independent risk factor in the progression of diabetic retinopathy. However, how insulin exacerbates the retinopathy is not yet fully understood. In this study, the effects of insulin on the growth and tube formation of microvascular endothelial cells (EC) were investigated. When human skin microvascular EC were grown under various concentrations of insulin, DNA synthesis as well as tube formation of EC were found to be significantly stimulated. Evidence that vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main mediator of the angiogenic activity of insulin was obtained as follows. Insulin upregulates the level of mRNA coding for secretory forms of VEGF, while the expression of the two VEGF receptor genes, *kdr* and *flt1*, was essentially unchanged by the exposure to insulin. A monoclonal antibody against human VEGF can completely neutralize both the proliferation and the tube formation of EC that is induced by insulin. The angiogenic effects of insulin were additive with those of hypoxia, a principal factor in causes of angiogenesis. Further, insulin significantly stimulated plasminogen activator inhibitor-1 activity in EC. The results thus suggest that insulin not only elicits angiogenesis through the induction of autocrine VEGF but is also a predisposing factor for thrombogenesis, which may give rise to focal ischemia that could superdrive angiogenesis, thereby leading to the exacerbation of diabetic retinopathy.