後期糖化反応生成物によるヒト膵癌細胞の増殖促進とその分子機構

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: 山本, 靖彦
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9193

金沢大学十全医学会雑誌　第105巻　第1号　162－169（1996）

後期糖化反応生成物によるヒト膵癌細胞の増殖促進とその分子機構

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）
山　本　靖　彦

糖尿病では膵癌発症の相対危険率が高いことが以前より知られているが，その分子的基礎については未だ明らかではない．本研究で著者は，高血糖状態で促進的に形成される後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) がヒト膵腺癌由来培養細胞 Mia PaCa-2 の増殖能にどのような影響を及ぼすかを検討した．その結果，AGE-ウシ血清アルブミン (AGE-bovine serum albumin, AGE-BSA) は Mia PaCa-2 細胞の [^{3}H] チミジン取り込みを濃度に依存して増大させ，1μg/ml では DNA 合成を約25％促進させた．AGE はまた，時間依存性に Mia PaCa-2 細胞の生細胞数を増加させた．一方，コントロールとして用いた非糖化 BSA は Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成や細胞数にはほとんど影響を及ぼさなかった．筆者は，この AGE による膵癌細胞の増殖を促がす主たる因子が血小板由来増殖因子 B (platelet-derived growth factor-B, PDGF-B) であることを結論づける証拠も得た．すなわち，AGE は添加後約2時間で Mia PaCa-2 細胞の PDGF-B mRNA 含量を約6.5倍に増大させること，AGE による Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成促進効果が培地に添加した抗ヒト PDGF-BB 抗体により完全に消失することである．筆者はさらに，AGE による膵癌細胞増殖促進に AGE を特異的に認識する細胞表面レセプター (receptor for AGE, RAGE) が機能的に関わっているかどうかを明らかにするため，RAGE mRNA に相補的なホスホロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドを化学合成し Mia PaCa-2 細胞の培地中に投与した．その結果，AGE による Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成促進効果ならびに PDGF-B 遺伝子発現誘導効果は RAGE アンチセンスオリゴヌクレオチドでほぼ完全に抑制された．以上より，AGE は RAGE によって認識された後，PDGF-B の産生を亢進させ，PDGF-B のオートクリン作用を介して Mia PaCa-2 細胞の増殖を促進するものと考えられた．これらの知見から，糖尿病状態は膵癌の増殖進展に原因的に関わりうると推定され，AGE が膵癌発症進展の危険因子の一つとなると考えられた．

Key words advanced glycation endproducts (AGE), receptor for AGE (RAGE), pancreatic cancer, antisense oligodeoxyribonucleotides, platelet-derived growth factor (PDGF)

1912年メイラードはブドウ糖などの還元糖とアミノ酸を混合して加熱すると黄褐色の物質が形成されることを報告した[1]．以来，還元糖とアミノ酸または蛋白質のアミノ基との非酵素的反応はメイラード反応と呼ばれ生体内においても普遍的に起こりうることが知られてきた[2]．現在，糖尿病患者の血糖コントロールの指標として広く用いられているヘモグロビン A_{1c} は，ブドウ糖とヘモグロビン蛋白との間のメイラード反応の結果生じる初期段階反応物（アマドリ化合物）と考えられている（図1）[2)3)]．その後，アマドリ化合物は緩徐にではあるが，脱水，重合などの複雑な反応を経て特有の蛍光を持つ黄褐色の物質，後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) を形成する[2)4)]．このアマドリ化合物以降の反応は不可逆的とされ，近年，糖尿病状態において促進的に形成される AGE が様々な細胞の機能に影響を及ぼし，糖尿病性細小血管合併症の進展に深く関わっていることが明らかにされてきている[5]．最近，腎細胞癌においても AGE がインターロイキン6 (interleukin-6, IL-6) の産生を介して腫瘍の増殖に関わることが報告された[6]．しかし，AGE が他の腫瘍の増殖にどのような影響を与えるかについては不明である．

最近の疫学調査において糖尿病が喫煙と並んで独立した膵癌発症進展の重要な危険因子であることが報告されたが[7]，糖尿病状態がどのように膵癌の発症や進展に関わるかについてはほとんど明らかではない．そこで本研究では，糖尿病状態で形成，蓄積される AGE とそれを認識する細胞表面レセプター (receptor for AGE, RAGE) が膵癌細胞の増殖に及ぼす影響について検討した．

材料および方法

Ⅰ．AGE の調製

ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (アルブミンフラクションⅤ脂肪酸フリー低エンドトキシン，Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を 500mM グルコースを含有する 10mM 燐酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) と37℃で6週間培養した[5]．その後，グルコースを透析

平成7年12月15日受付，平成8年1月22日受理

Abbreviations: AGE, advanced glycation endproducts; BSA, bovine serum albumin; IGF-Ⅰ, insulin like growth factor-Ⅰ; PDGF, platelet-derived growth factor; PKC, protein kinase C; RAGE, receptor for AGE; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SSPE, saline sodium phosphate ethylenediamine tetraacetic acid; TCA, trichroloacetic acid

により除去し，ヘパリンセファロースカラム CL-4B クロマトグラフィー (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) で AGE-BSA を未反応 BSA から分離作製した．SDS-PAGE で AGE 化を確認後[5]，精製 AGE-BSA をブラッドフォード法で定量した[8]．

Ⅱ．細　胞

ヒト膵腺癌由来培養細胞株 Mia PaCa-2 細胞はアメリカンタイプコレクション (American Type Collection) (Rockville, USA) から購入した．細胞は10％牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Cell Culture Laboratories, Cleaveland, USA) を含むイーグル最小必須培地 (Eagle's minimal essential medium, Eagle's MEM) (日水製薬，東京) にて 5% CO_2 気相下で維持した．

Ⅲ．DNA の化学合成

1．プライマーおよびプローブ

RAGE，血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) および PDGF 受容体 mRNA 検出用プライマー，プローブとして以下のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計し，フォスファミダイド法により DNA 合成装置モデル 392 (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて化学合成した．合成オリゴデオキシリボヌクレオチドは OPC カラム (Applied Biosystems) で精製した．プライマーの塩基配列は以下の通りである．RAGE-U (5'-ATGGAAACTGAACACAGGCC-3') (cDNA 塩基番号 150-169[5][9])，RAGE-D (5'-CACACATGTCC-CCACCTTAT-5') (416-435[5][9])，PDGF-A-U (5'-GATGGTACT-GATTTTCGCCG-3') (cDNA 塩基番号 296-315[10])，PDGF-A-D (5'-TCCATGCCACTAAGCATGTG-3') (590-609[10])，PDGF-B-U (5'-AGATCGAGATTGTGCGGAAG-3') (cDNA 塩基番号 581-600[11])，PDGF-B-D (5'-CCACTCTGATTCACCTCTTC-3') (1600-1619[11])，PDGF-α-U (5'-CGACATCCAGAGATCACTC-T-3') (cDNA 塩基番号 2393-2412[12])，PDGF-α-D (5'-CCAGT-GAAGTCTACGAGATC-3') (2893-2912[12])，PDGF-β-U (5'-CTTCTGGAAGCTTTCTGCTC-3') (cDNA 塩基番号祖 3792-3811[13])，PDGF-β-D (5'-GTAAATGTGCCAGTGTGGAG-3') (4501-4520[13])．プローブの配列は RAGE-I (5'-GCCGGACAG-AAGCTTGGA-3') (167-184[9])，PDGF-A-I (5'-AGTCAGATC-CACAGCATCCG-3') (493-512[10])，PDGF-B-I (5'-AATTCAA-GCACACGCATGAC-3') (791-810[11]) である．ヒト β-アクチン mRNA に対するプライマーおよびプローブの配列は文献14に従った．

Ⅳ．アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチド

ヒト RAGE mRNA の開始コドン近傍 5' 領域に相補的な17塩基のフォスフォロチオエート型アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド (5'-CAACTGCTGTTCCGGCT-3') (図 2) および対照となるセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド (5'-AGCCGGAACAGCAGTTC-3') を DNA 合成装置モデル 392 (Applied Biosystems) を用いて合成し，AQUAPORE RP-300 カラム (Applied Biosystems) を用いた逆相分配高速液体クロマトグラフィーにて精製した．フォスフォロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドは通常のフォスフェイト型に比し安定性が高く，細胞への取り込み効率も良好であることが知られている[15]．

Ⅴ．細胞増殖アッセイ

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％ (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[16]．

2．DNA 合成能の測定

細胞を24穴のクラスターディ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無血清培地に交換し24時間培養した．その後各濃度の AGE-BSA を培地に加え，20時間後既述の方法[15] に従い DNA 合成を測定した．すなわち，1μCi/ml の濃度で [^{3}H] チミジン (82.9Ci/mmol, NEN Research Product, Wilmington, USA) を加え 4 時間培養後，氷冷10％トリクロロ酢酸 (trichroloacetic acid, TCA) を加え20分間氷上に静置して細胞を固定し，つづいて細胞を氷冷 5% TCA で 3 回洗浄後，1N NaOH 200μl を加え室温20分間の振盪により溶解した．1N HCl 200μl で中和後，全量を 10ml の液体シンチレーターと混和し ^{3}H 放射活性を測定した．アンチセンスあるいはセンスオリゴヌクレオチド添加実験の際にはオリゴヌクレオチドとともに 1μg/ml の AGE-BSA を培地に加え 4 時間後に酸不溶性分画への [^{3}H] チミジン取り込みを測定した．

Ⅵ．抗ヒト PDGF-BB 抗体による中和実験

種々の濃度の抗 PDGF-BB 抗体 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) 存在下に 1μg/ml AGE-BSA を培地に加

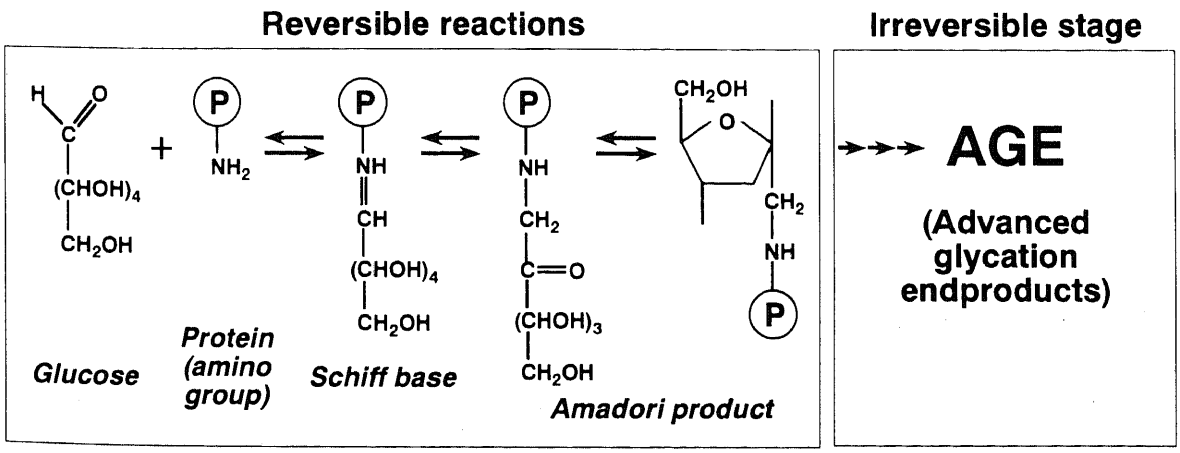

Fig. 1. The reactions of glucose with amino group of proteins to form the amadori products, and then irreversible AGE.

え，20時間後の DNA 合成を測定した．中和率は AGE-BSA 非存在下の [^{3}H] チミジン取り込みの放射活性を C_0, 1μg/ml AGE-BSA 存在下の放射活性をC_1とし，各濃度の抗体添加時の放射活性を Cp とする時

$$\frac{C_1-C_p}{C_1-C_0}\times 100$$ で算定した．

Ⅶ．総 RNA の分離

6穴クラスターディッシュに各条件下で培養した細胞から Chomczynski ら[17]の方法に基づいた ISOGEN (ニッポンジーン，東京) を用いて総 RNA を抽出精製した．すなわち1穴あたり 1ml の ISOGEN を加え攪拌し，室温で5分間放置後，0.2ml のクロロホルムを加えて激しく振盪した．4℃, 12,000×g にて15分間遠心後，上清を回収しイソプロパノールを 0.5ml 加え室温で5分間放置し，4℃, 10,000×g 10 分間の遠心で RNA を沈澱させた．沈澱物を75%エタノールで洗い減圧乾燥した後に吸光定量を行い至適濃度に調整した．

Ⅷ．逆転写ー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，まず総 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[18]．増幅後の DNA 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×食塩ーリン酸ソーダー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% BSA, 0.1% フィコール), 1% SDS, 500μg/ml 変性サケ精子 DNA (Sigma) からなる溶液中で50℃，6時間プレハイブリダイズさせた後，50% ホルムアミド，5×SSPE, 5×デンハルト液，1% SDS, 500μg/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 10pmole からなる溶液中で55℃，16時間ハイブリダイズさせた．プローブ標識には，DNA5' 末端標識キット (宝酒造，京都) と [γ-^{32}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×SSC, 0.1% SDS にて室温で20分間，ついで 0.5×SSC, 0.1% SDS にて室温で20分間，それぞれ1回ずつ洗浄し，−80℃で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アナライザー FUJIX BA1000 (富士フィルム，浜松) により放射活性の測定を行った．

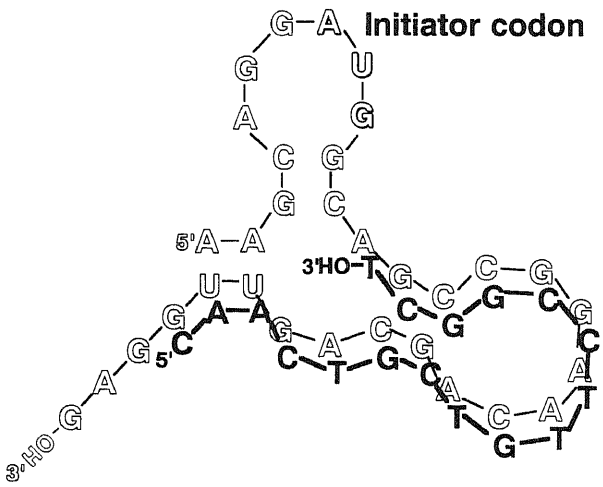

Fig. 2. Antisense oligodeoxyribonucleotide against human RAGE mRNA. The antisense DNA is complemented to the 5' region of RAGE mRNA. The secondary structure of the mRNA region was predicted by the algorithm of Zuker and Stieger[32].

成　　績

Ⅰ．AGE による Mia PaCa-2 細胞の増殖促進

図3に種々の濃度の AGE-BSA 存在下および 1μg/ml の非糖化 BSA 存在下で24時間培養したヒト膵癌細胞 Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成を示した．AGE 非添加時の DNA への [^{3}H] チミジン取り込みを100%として表すと，AGE は濃度に依存して Mia PaCa-2 細胞 DNA への [^{3}H] チミジン取り込みを増大させ，1μg/ml ではコントロールに比べ約 25% DNA 合成を促進させた．しかし，非糖化 BSA は Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成にはほとんど影響を及ぼさなかった．また，図4に示すごとく 1μg/ml AGE は検討したいずれの時点においても有意に Mia PaCa-2 細胞数を増加させ，24時間後の生細胞数はコントロールの約1.5倍に達した．非糖化 BSA は Mia PaCa-2 細胞数にも何ら影響を及ぼさなかった．

Ⅱ．AGE によるPDGF-A, -B 遺伝子の発現誘導

AGE 投与下で Mia PaCa-2 細胞の PDGF-A, -B 遺伝子の発

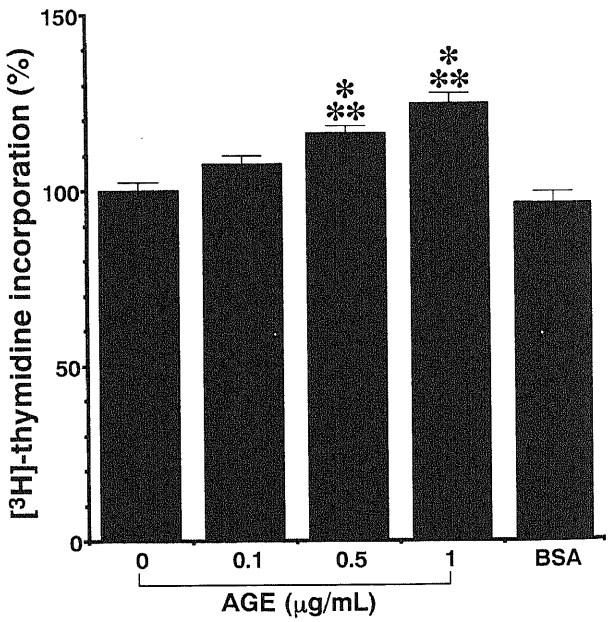

Fig. 3. Effect of AGE on DNA synthesis in Mia PaCa-2 cells. Cells were grown in the presence or absence of 0.1, 0.5, 1 μg/ml AGE-BSA (AGE) or 1 μg/ml non-glycated BSA (BSA), and assayed for [^{3}H]-thymidine incorporation. Each column represents $\bar{x}\pm$SEM of triplicate experiments and is expressed as percent of the control without additives; vertical bars show SEM. *P<0.05, compared to the value without AGE-BSA, **P<0.05, compared to the value with non-glycated BSA (Student's *t* test).

現がどのように影響されるかを RT-PCR 法にて調べた．このためまず Mia PaCa-2 細胞より分離した総 RNA を鋳型として鋳型量とサイクル数に対して産物シグナル強度をプロットした検量曲線を得，PDGF-A, -B mRNA ともに定量性をもつと判定された鋳型総 RNA 量は 300ng，増幅サイクルはそれぞれ35回，30回の条件で RT-PCR 反応を行った．内部対照の β-アクチン mRNA 検出反応も同様に鋳型総 RNA 量は 300ng，増幅サイクル30回の条件で行った．1μg/ml の AGE を培地に添加しそれぞれ 0, 2, 4, 8 時間後に Mia PaCa-2 細胞から総 RNA を分離し，上記の条件下で RT-PCR を行い PDGF-A, -B mRNA レベルを検討した結果が図 5 である．PDGF-A mRNA レベルは AGE 添加後 2 時間で約 2 倍に増加されたにすぎなかったが，PDGF-B mRNA レベルは 2 時間後で約6.5倍，8 時間後でも約 2 倍誘導された．一方，対照の β-アクチン mRNA レベルは全経過を通じて不変であった．

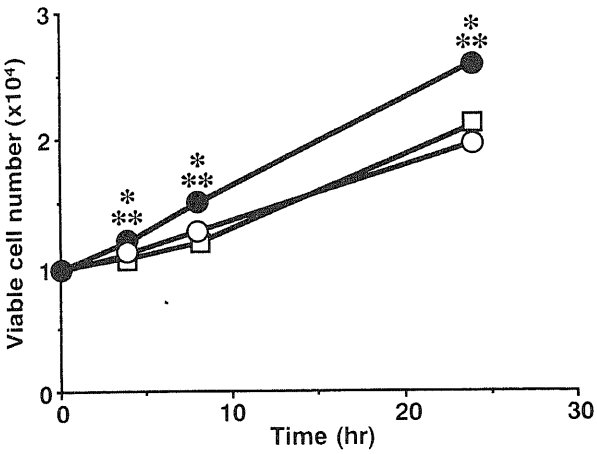

Fig. 4. Effect of AGE on Mia PaCa-2 cell growth. Culture period after the addition of AGE-BSA is indicated on the abscissa, and viable cell number on the ordinate. The cells were cultured in the presence (●) or absence (□) of 1 μg/ml of AGE-BSA or 1 μg/ml of non-glycated BSA (○). Each point presents the mean for triplicate experiments; SEM are smaller than the symbols. *P<0.05, compared to the value without AGE-BSA, **P<0.05, compared to the value with non-glycated BSA (Student's *t* test).

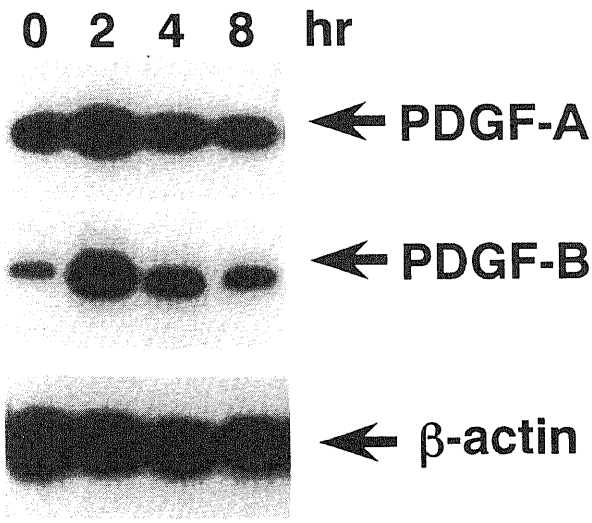

Fig. 5. AGE-induced upregulation of PDGF-A and -B mRNAs. Total RNA from cells cultured in the presence or absence of 1 μg/ml of AGE-BSA for indicated time periods were analyzed by RT-PCR. Arrows indicates the positions to which the RT-PCR products of PDGF-A, -B mRNA migrated. Lower panel shows signals for β-actin mRNA.

Ⅲ．Mia PaCa-2 細胞における PDGF-α, -β 受容体の発現

PDGF 受容体は α 鎖または β 鎖の 2 種類のポリペプチドからなる 2 量体で αα, αβ, ββ の 3 種類のアイソフォームが存在することが知られている[19]．PDGF-α 型受容体は 3 種類の PDGF アイソフォームいずれとも結合できるのに対し，β 型受容体は PDGF-BB とはよく結合するが，PDGF-AB との親和性は低く，PDGF-AA とは全く結合しないことが知られている[20]．そこで Mia PaCa-2 細胞における PDGF 受容体 mRNA の検出を鋳型総 RNA 量 300ng，増幅サイクル数30回の条件下で定量的 RT-PCR 法で行ったところ，図 6 に示すごとく α 型受容体遺伝子の発現は極めて弱く Mia PaCa-2 細胞は主に β 受容体遺伝子を発現していることが明らかとなった．従って AGE による Mia PaCa-2 細胞の増殖促進効果には主として PDGF-B, PDGF-β 受容体系が関係しているものと考えられた．

Ⅳ．抗 PDGF-BB 抗体による AGE の細胞増殖促進作用の中和

AGE による Mia PaCa-2 細胞の増殖誘導の主たる因子が PDGF-B であるかどうかを明らかにするためヒト PDGF-BB に対するポリクローナル抗体を培地に加え AGE 存在下の Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成能におよぼす影響を検討した．図 7 に示す如く抗 PDGF-BB 抗体は濃度依存的に AGE による Mia PaCa-2 細胞の増殖促進効果を抑制した．約 50μg/ml の抗体投与では AGE 効果はほぼ完全に消失した．

Ⅴ．アンチセンス RAGE DNA による AGE の PDGF-B 遺伝子発現誘導・細胞増殖促進作用の防止

AGE が RAGE を介して PDGF-B の遺伝子発現を促進し，Mia PaCa-2 細胞の増殖誘導に関わっているかどうかを明らかにするため，ヒト RAGE mRNA に相補的なアンチセンスオリ

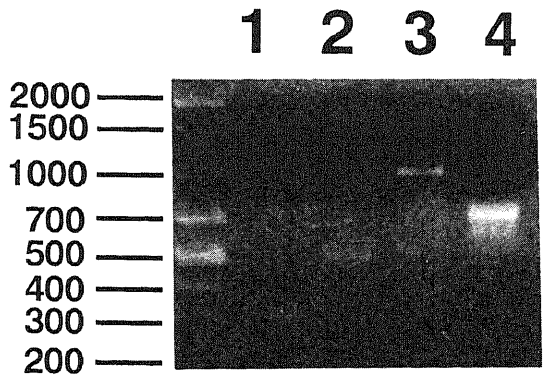

Fig. 6. RT-PCR analysis of PDGF-α and -β receptor mRNAs in Mia PaCa-2 cells. lane 1, expression of PDGF-A gene; lane 2, expression of PDGF-α receptor gene; lane 3, expression of PDGF-B gene; lane 4, expression of PDGF-β receptor gene. Numbers on the left indicate size markers in base pairs.

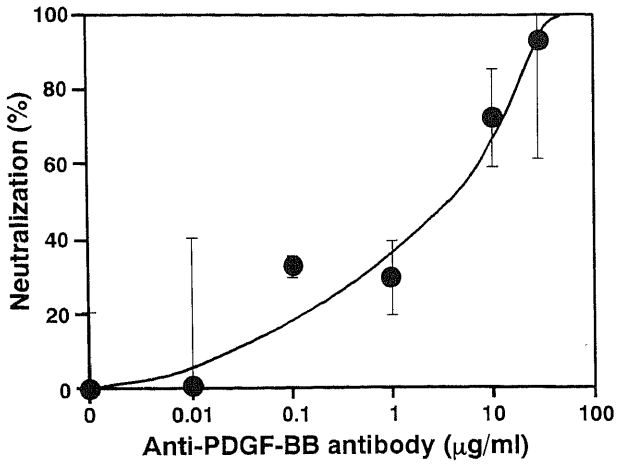

Fig. 7. Neutralization of AGE-dependent DNA synthesis by anti-human PDGF-BB antibody. The abscissa indicates concentrations of anti-PDGF-BB antibody added to the medium, and the ordinate the percentage of neutralization. The percentage of neutralization was defined as $\frac{C_1-C_p}{C_1-C_0}\times 100\%$, where C_0 was the radioactivity of [^{3}H]-thymidine incorporated into the culture without AGE-BSA while Cp and C_1 were those for cultures treated by AGE-BSA in the presence or absence of anti-human PDGF-BB antibodies, respectively. A curve linking symbols at 0 and 50 μg/ml was deduced. Vertical bars show SEM.

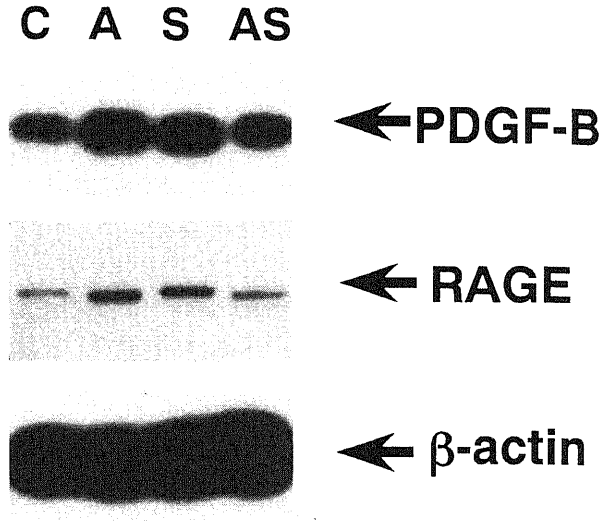

Fig. 9. Reversal of AGE-induced upregulation of PDGF-B mRNA by antisense oligonucleotides against RAGE mRNA. Total RNA from cultures with 1 μg/ml AGE-BSA (A) or without AGE-BSA (C) and from those with both AGE-BSA and 10 μM sense (S)/antisense (AS) oligonucleotides were analyzed by RT-PCR. Arrows indicate the RT-PCR products of PDGF-B and RAGE mRNAs. Lower panel shows signals for β-actin mRNA. The antisense-induced decrease in RAGE mRNA could be ascribed to an RNase H-driven degradation of target mRNA.

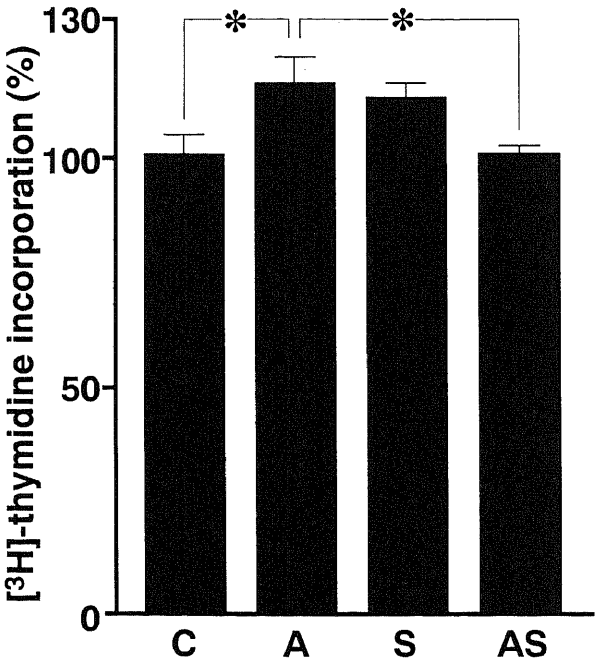

Fig. 8. Effect of antisense RAGE oligonucleotides on the AGE-induced increase in Mia PaCa-2 synthesis of DNA. Cells were cultured with 1 μg/ml AGE-BSA in the presence or absence of oligomers or with neither AGE-BSA or oligomers. The percentage of [^{3}H]-thymidine incorporation is indicated on the ordinate. Each column represents $\bar{x}\pm$SEM of triplicate experiments. $*P<0.05$, compared to the value with AGE-BSA alone (Student's t test). C, control without additives; A, 1 μg/ml AGE-BSA; S, 1 μg/μl AGE-BSA plus 10 μM sense oligomers; AS, 1 μg/ml AGE-BSA plus 10 μM antisense oligomers.

ゴヌクレオチド (図 2) を作製し AGE による Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成促進作用におよぼす効果を検討した．図 8 に示すごとく，10μM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与により 1μg/ml の AGE 添加による DNA 合成促進効果はほぼ完全に抑制された．一方，センスオリゴヌクレオチドは AGE 効果にはほとんど影響を与えなかった．さらにアンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチド投与下における RAGE および PDGF-B 遺伝子の発現につき定量的 RT-PCR 法にて鋳型総 RNA 量 300ng，増幅サイクル30回の条件下で検討した．図 9 に示すごとく RAGE mRNA レベルはアンチセンスオリゴヌクレオチドにより約50%にまで抑制され，さらに AGE による PDGF-B 遺伝子発現誘導効果もほぼ完全に抑制された．しかし，センスオリゴヌクレオチドは RAGE や PDGF-B 遺伝子発現には全く影響を与えなかった．

考　　察

糖尿病と膵癌の関係については古くから議論の多い[21)22)]ところであり糖尿病自体が膵癌の危険因子の一つであるのか，あるいは膵癌が発症することによって結果的に糖尿病が発症してくるのか明らかではない．しかし，最近の統計学的解析により膵癌の相対危険率は糖尿病群の方が非糖尿病群に比して有意に高いことが示され[7)]，糖尿病が喫煙と同様に独立した危険因子として認められる傾向にある．本研究で筆者は，糖尿病状態で膵癌がどのように増悪進展するかを高血糖状態でその形成が促進的に生じる AGE に着目して追及した．その結果，AGE が培養ヒト膵癌細胞の増殖を促進しうることが見い出され，さらにこの AGE による増殖促進効果は主として RAGE を介するオートクリン PDGF-B の産生亢進によることがはじめて示された．

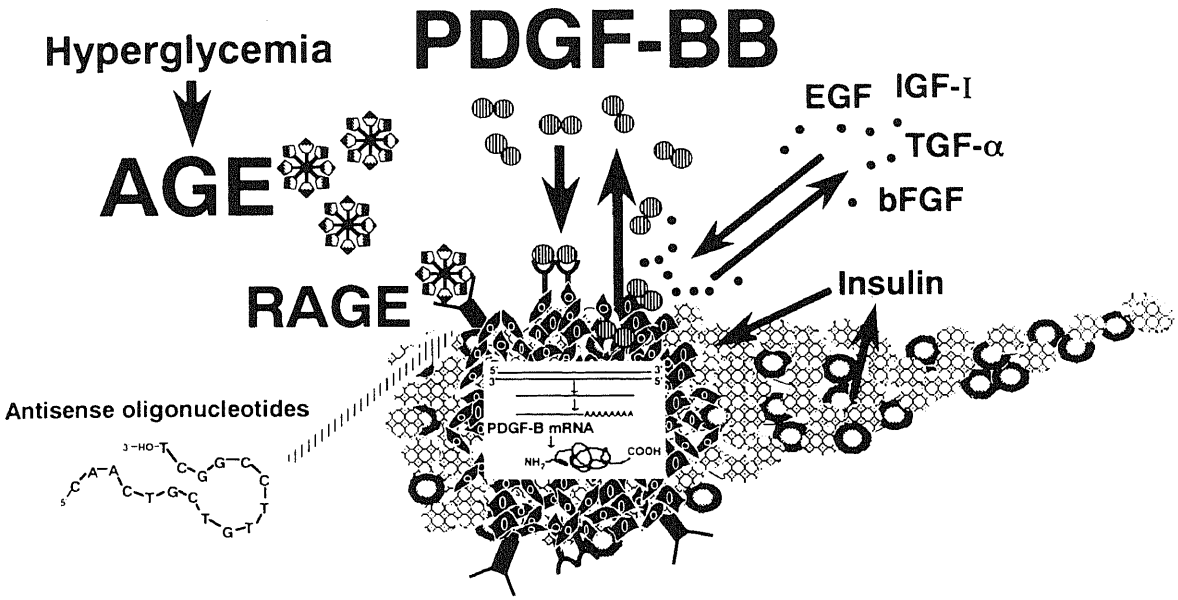

Fig. 10. A possible mechanism of AGE-induced progression of pancreatic cancer.

Mia PaCa-2 細胞については，表皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF)[23]，α型トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor-α, TGF-α)[24]，インスリン様成長因子-I (insulin like growth factor-I, IGF-I)[25]がオートクリンに作用し増殖を促進していることが知られている．したがって，AGE により細胞周期の G_0 から G_1 への導入を促進するコンピーテント因子である PDGF-B の産生が誘導されることによりこれらのプログレッション因子とともに Mia PaCa-2 細胞の増殖が加速度的に促進されるものと考えられる．また，AGE はマクロファージにおいて PDGF 分泌を介して IGF-I の産生を亢進させる事実[26)27)]もあり，Mia PaCa-2 細胞においても AGE が PDGF-B を介し，IGF-I などのプログレッション因子の産生を同時に誘導し，Mia PaCa-2 細胞の増殖に深く関わっているのかもしれない．

AGE が RAGE によって認識された後，いかなる情報経路を介して PDGF-A, -B 遺伝子発現を誘導するかについては不明である．しかし，近年 Schmidt ら[28]により血管内皮細胞において AGE が RAGE に認識された後，酸化的ストレスを誘導し転写因子である核内因子 -κB (nuclear factor-κB, NF-κB) の活性化を介して内皮細胞機能に影響を及ぼすことが報告されている．一方，平滑筋細胞においては O^{2-}, H_2O_2 などの酸化的ストレスがプロテインCキナーゼ (protein kinase C, PKC) の経路を介して細胞増殖を誘導しうるという報告もあり[29]，AGE によって活性化された酸化的ストレスが PKC の経路を介して PDGF-A, -B 遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性も考えられる．血管内皮細胞においては PKC は主として PDGF-B 遺伝子誘導を 2〜4 時間で約 8 倍ひきおこすことが指摘されており[30]，本研究でみられる AGE による PDGF-B 遺伝子誘導と類似している．従って今後はホルボールミリステートアセテイト (phorbol myristate acetate, PMA) の前処置によりCキナーゼ系をダウンレギュレート[31]したり，ラジカルスカベンジャーを用いて，AGE による PDGF 遺伝子誘導につながる RAGE 以降のシグナル伝達機構を解明していきたい．

以上，本研究で得られた知見から，筆者は糖尿病における膵癌の増殖誘導機構に関する一つのモデルを提唱する．図10に示すように，高血糖により AGE が集積すると膵癌細胞に発現している RAGE を介し，PDGF-B 遺伝子発現が誘導され，産生された PDGF-B が PDGF-β レセプターを介してオートクリンに作用するというものである．このモデルに従えば，上記の過程のどこかの段階を断ち切ることで糖尿病合併例における膵癌細胞の増殖を阻止，あるいは軽減することも理論上可能と考える．具体的には，高血糖状態の改善，AGE 合成・蓄積の防止，アンチセンスオリゴヌクレオチドによる RAGE 遺伝子のブロック，特異抗体による PDGF-B のオートクリン作用の中和といった手段が考えられる．

結　　論

糖尿病状態で促進的に形成される AGE が培養膵癌細胞の増殖にどのように影響するかを検討し，以下の新知見を得た．

1．培養膵癌細胞 Mia PaCa-2 細胞の増殖は AGE の濃度に依存して促進された．

2．AGE は Mia PaCa-2 細胞の PDGF-B mRNA レベルを増大させ，抗ヒト PDGF-BB 抗体は AGE による Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成をほぼ完全に抑制した．

3．RAGE mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により AGE の Mia PaCa-2 細胞の DNA 合成促進および PDGF-B 遺伝子発現誘導効果はほぼ完全に抑制された．

以上の結果より，AGE は培養膵癌細胞 Mia PaCa-2 細胞の増殖を誘導し，この増殖誘導には RAGE を介するオートクリン PDGF-B の産生亢進を介するものと結論された．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，ご指導とご校閲を賜わ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わりました金沢大学医学部生化学第二講座の山本　博教授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なら

びに生化学第二講座の皆様に感謝致します．なお本論文の要旨の一部は第5回生体におけるメイラード反応の意義研究会（1995年，熊本）において発表した．

文 献

1) **Maillard, L. C.**: Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidies par voie methodique. CR. Acad. Sci., **154**, 66-68 (1912).

2) **Brownlee, M., Cerami, A. & Vlassara, H.**: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N. Engl. J. Med., **318**, 1315-1321 (1988).

3) **Rahbar, S., Blumenfeld, O. & Ranney, H. M.**: Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. Biochem. Biophys. Res. Commun., **36**, 838-843 (1969).

4) **Monnier, V. M.**: Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. J. Gerontol., **45**, B105-B111 (1990).

5) **Yamagishi, S., Hsu, C. C., 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).

6) **Miki, S., Kasayama, S., Miki, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, M., Sata, B. & Kishimoto, T.**: Expression of receptors for advanced glycosylation end products on renal carcinoma cells in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun., **196**, 984-989 (1993).

7) **Everhart, J. & Wright, D.**: Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. J. A. M. A., **273**, 1605-1609 (1995).

8) **Bradford, M. M.**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**, 248-254 (1976).

9) **Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D. & Shaw, A.**: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. J. Biol. Chem., **267**, 14998-15004 (1992).

10) **Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M. S., Eddy, R., Shows, T. B., Philpott, K., Mellor, A. L., Knott, T. J. & Scott, J.**: cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. Nature, **320**, 695-699 (1986).

11) **Ratner, L., Josephs, S. F., Jarrett, R., Reitz, M. S. Jr. & Wong-Staal, F.**: Nucleotide sequence of transforming human c-sis cDNA clones with homology to platelet-derived growth factor. Nucleic Acids Res., **13**, 5007-5018 (1985).

12) **Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B. & Heldin, C. H.**: cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 4917-4921 (1989).

13) **Gronwald, R. G., Grant, F. J., Haldeman, B. A., Hart, C. E., O'Hara, P. J., Hagen, F. S., Ross, R., Bowen-Pope, D. F. & Murray, M. J.**: Cloning and expression of a cDNA coding for the human platelet-derived growth factor receptor: evidence for more than one receptor class. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 3435-3439 (1988).

14) **Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Hayashi, Y., Yamashima, 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).

15) **Scanlon, K. J., Ohta, Y., Ishida, H., Kijima, H., Ohkawa, T., Kaminski, A., Tsai, J., Horng, G. & Kashani-Sabet, M.**: Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. FASEB J., **9**, 1288-1296 (1995).

16) **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).

17) **Chomczynski, P. & Sacchi, N.**: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., **162**, 156-159 (1987).

18) **Wang, A. M., Doyle, M. V. & Mark, D. F.**: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 9717-9721 (1989).

19) **Heldin, C. H. & Westermark, B.**: Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. Cell Regul., **1**, 555-566 (1990).

20) **Hart, C. E., Forstrom, J. W., Kelly, J. D., Seifert, R. A., Smith, R. A., Ross, R., Murray, M. J. & Bowen-Pope, D.F.**: Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. Science, **240**, 1529-1531 (1988).

21) **Murphy, R. & Smith, F. H.**: Abnormal carbohydrate metabolism in pancreatic cancer. Med. Clin. North. Am., **47**, 397 (1963).

22) **Noy, A. & Bilezikian, J. P.**: Diabetes and pancreatic cancer: clues to the early dignosis of pancreatic malignancy. J. Clin. Endocrinol. Metab., **79**, 1223-1231 (1994).

23) **Smith, J. J., Derynck, R. & Korc, M.**: Production of transforming growth factor a in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7567-7570 (1987).

24) **Ohmura, E., Okada, M., Onoda, N., Kamiya, Y., Murakami, H., Tsushima, T. & Shizume, K.**: Insulin-like growth factor I and transforming growth factor a as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. Cancer Res., **50**, 103-107 (1990).

25) **Beauchamp, R. D., Lyons, R. M., Yang, E. Y., Coffey, R. J. Jr. & Moses, H. L.**: Expression of and

response to growth regulatory peptides by two human pancreatic carcinoma cell lines. Pancreas, **5**, 369-380 (1990).

26) **Kirstein, M., Brett, J., Radoff, S., Ogawa, S., Stern, D. & Vlassara, H.**: Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 9010-9014 (1990).

27) **Kirstein, M., Aston, C., Hintz, R. & Vlassara, H.**: Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. J. Clin. Invest., **90**, 439-446 (1992).

28) **Schmidt, A. M., Hori, O., Brett, J., Yan, S. D., Wautier, J. L. & Stern, D.**: Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. Arterioscler. Thromb., **14**, 1521-1528 (1994).

29) **Baas, A. S. & Berk, B. C.**: Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H_2O_2 and O_2- in vascular smooth muscle cells. Circ. Res., **77**, 29-36 (1995).

30) **Starksen, N. F., Harsh, G. R. Ⅳ, Gibbs, V. C. & Williams, L. T.**: Regulated expression of the platelet-derived growth factor A chain gene in microvascular endothelial cells. J. Biol. Chem., **262**, 14381-14384 (1987).

31) **Suzuki, M., Asplund, T., Yamashita, H., Heldin, C. H. & Heldin, P.**: Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-β1 involves activation of protein kinase C. Biochem. J., **307**, 817-821 (1995).

32) **Zuker, M. & Stiegler, P.**: Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary informations. Nucleic Acids Res., **9**, 133-148 (1981).

Advanced Glycation Endproducts-induced Stimulation of Pancreatic Cancer Cell Growth is Mediated by Their Receptor and Autocrine Platelet-Derived Growth Factor-B

Yasuhiko Yamamoto, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **105**, 162—169 (1996)

Key words advanced glycation endproducts (AGE), receptor for AGE (RAGE), pancreatic cancer, antisense oligodeoxyribonucleotides, platelet-derived growth factor (PDGF)

Abstract

Effects of advanced glycation endproducts (AGE) on the growth of Mia PaCa-2 cells, a human pancreatic cancer cell line, were investigated. AGE-bovine serum albumin (AGE-BSA) were found to stimulate DNA synthesis in Mia PaCa-2 cells in a dose-dependent manner and to significantly increase the viable cell number. Evidence that platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) mediates this action was obtained: AGE upregulated the level of the PDGF-B mRNA, and antibodies against PDGF-BB efficiently neutralized the AGE-induced DNA synthesis. Antisense oligonucleotides complementary to mRNA coding for AGE receptor were found to reverse completely both the AGE-induced DNA synthesis and the upregulation of PDGF-B gene expression. These results indicate that AGE action would be receptor-mediated and that the AGE ligand-receptor interactions can take active part in the progression of pancreatic cancer through an autocrine action PDGF-B.