

Effect of Glucose on Collagen Synthesis of Cultured Cardiac Fibroblasts from KK Mice

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/2297/8551

KK マウスの心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成能と それにおよぼすグルコースの影響

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)
田 口 富 雄

インスリン非依存性糖尿病モデルである KK マウスのコラーゲンとそれにおよぼすグルコースの影響を明らかにする目的で、7 週齢の心筋線維芽細胞を用い、7 代継代培養後³H-プロリンで標識してコラーゲン合成能を量的 (Peterkofsky らのコラーゲナーゼ消化法)、質的 (Hata らの方法) に検討した。更にインスリンを 0.1U 添加して、コラーゲン合成能におよぼすインスリンの影響についても検討した。その結果、グルコース濃度 5.5mM では、KK 群のコラーゲン合成量とコラーゲン合成比は対照の DDY マウス群と差を認めなかった。また DDY 群ではグルコース濃度を上昇させてもコラーゲン合成量、コラーゲン合成比は不変であった。それに対して KK 群では、グルコース濃度 11.0mM で有意にコラーゲン合成量の増加を認め (5.5mM 対 11.0mM: 31509±1860 対 76723±14138dpm/ウエル, $P<0.05$)、コラーゲン合成比も増加を認めた (49.2±4.2 対 23.2±1.8%, $P<0.05$)。グルコース濃度 16.5mM では、5.5mM とコラーゲン合成量に差を認めなかった。KK 群の型別コラーゲン分析においては、グルコース濃度 5.5mM に比し 11.0mM において I 型コラーゲンが減少し、III, IV, V 型コラーゲンの増加が認められた (5.5mM 対 11.0mM: III/I, 0.228 対 0.640; IV/I, 0.134 対 0.509; V/I, 0.033 対 0.333)。また、グルコース濃度 11.0mM の KK 群にインスリンを添加し、コラーゲン合成能におよぼす影響を検討したが、コラーゲン合成能は変化しなかった。以上の結果より、KK マウスの心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成能は生体におけるグルコース濃度に相当する 11.0mM で増加を示し、先天的あるいは後天的にコラーゲン合成が増加するよう形質変換されているものと推定された。

Key words KK mouse, diabetes mellitus, cardiac fibroblast, collagen synthesis

糖尿病では巨大血管症としての冠動脈硬化症や高血圧症による心筋障害が発生することはよく知られているが、他方これらに起因しない心筋障害が生じることが指摘され、糖尿病性心筋症として注目されている¹⁾²⁾。この病理組織学的検討において、心筋間質の線維化が増加していることが報告され³⁾⁴⁾、糖尿病心における心筋間質線維化増加と心機能障害との関連性が示唆されている。

心筋間質の線維化は主としてコラーゲン線維からなり、このコラーゲン線維は心筋線維芽細胞によって合成されている⁵⁾。非収縮性蛋白であるコラーゲン線維は心筋細胞の周囲を取り囲み、心筋の収縮・弛緩を同一方向に働くよう規定すると同時に、心臓の硬さを規定して形態を保持する重要な役目を担っている⁶⁾⁷⁾。しかしながら、このコラーゲン線維の不調和な増加は、心臓の収縮・拡張機能を障害する。梅田⁸⁾、Shimizu ら⁹⁾は、糖尿病心における免疫組織学的検討より、糖尿病心では心筋間質の線維化の増加と心機能に関連性が認められ、さらにこの線維化には III 型コラーゲンの増加が関与していることを報告し、糖尿病心ではコラーゲン代謝の量的のみならず質的变化が生じている可能性を示唆している。そこで著者は、糖尿病心において心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成が増加しているか否かを量的、質的に検討することを目的とし、インスリン非依存性

糖尿病モデルである KK マウス^{10)~12)}を用いて心筋線維芽細胞を培養し、コラーゲン合成能の評価およびその型別分析を行い、さらにコラーゲン合成能におよぼすグルコースの影響についても検討を行なった。

対象および方法

1. KK マウスの心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成能およびグルコース濃度の影響

1. 実験動物

7 週齢の雄性 KK マウス (平均±標準偏差: 36.4±0.6g) および対照として同じく 7 週齢の雄性 DDY マウス (35.8±0.5g) を用いた。KK マウスの血糖値は 220±18.2 (mg/dl) であり、DDY マウスの血糖値は 100±20.5 (mg/dl) であった。

2. 細胞培養

心筋線維芽細胞は Ross の方法¹³⁾に従って得た。エーテル麻酔後、胸部正中切開にてマウスの心臓を取り出し、大血管および心房を切除して心室筋のみを用いた。これを 1mm 立方以下の大きさに細切し、これらをエクスプラント (explant) とした。このエクスプラントを 25cm² 培養フラスコ (Corning, NY, USA) に散布し、37°C, 5% CO₂, 95% 空気の下で培養した。培地として 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS)

平成 6 年 1 月 19 日受付, 平成 6 年 3 月 2 日受理

Abbreviations: CP, collagenous protein; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; NCP, non-collagenous protein; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

(Gibco, NY, USA), カナマイシン (100 μ g/ml), アンフォテリシン B (5 μ g/ml) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) を用い、3日毎に培地を新鮮なものに交換した。エクスプラントより細胞が遊出増殖し、細胞密度がコンフルエント (confluent) に達した時に、2%エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)-0.25% トリプシン (trypsin) を用いて細胞を継代し、さらに培養した。一部の継代細胞を用い免疫組織化学染色を施行して、心筋線維芽細胞であることの確認を行なった。以下に染色方法を詳述する。免疫染色はペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ (peroxidase-antiperoxidase, PAP) 法にて行なった。スライドガラス上の細胞をアセトンにて1分間固定後、過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼのブロックを行なった後、非特異的の反応を阻害するためウサギ正常血清を室温にて20分間反応させた。一次抗体として抗ビメンチン、抗デスミン、抗第Ⅶ因子関連抗原の3種の抗体 (ダコジャパン、京都) を用い、常温にて20分間反応させた。二次抗体として抗マウスIgGグロブリン・ウサギ抗体を常温にて20分間反応させた。次に標識抗体としてペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ・マウス抗体複合体を常温にて20分間反応させた。各反応の後に 0.05M Tris 緩衝液にて10分間洗浄を行なった。発色は3-アミノ-9-エチルカルバゾールおよび N, N'-ジメチルホルムアミド溶液を用いた。核染色はマイヤーヘマトキシリンにて行ないアンモニア溶液に浸した後、封入し検鏡した。その結果図1に示すごとく、抗ビメンチン抗体のみ核周囲の細胞質に染色像が認められた。抗デスミン抗体、抗第Ⅶ因子関連抗原抗体では陰性であり、培養細胞が心筋線維芽細胞であることが確認された^{10,15}。以下の実験には7代継代細胞を用いた。

3. コラーゲン合成能の解析

細胞を10% FBS 添加 DMEM 1ml を加えた 35mm 径プラスチックシャーレに 1×10^6 個接種した。7日後の定常期の細胞を用い、3種のグルコース濃度 (5.5, 11, 16.5mM) とインスリン添加群 (11mM グルコース+インスリン 0.1U) の新鮮な10% FBS 添加 DMEM と交換し、同時に 50 μ Ci/ml の L-[2, 3-³H] プロリン (Amersham, Greenwich, USA), 0.1mM のアスコルビン酸ナトリウムおよび 0.5mM ベータ・アミノプロピオニトリルマール酸を培養液に加えた。24時間標識後、培地と共に細胞

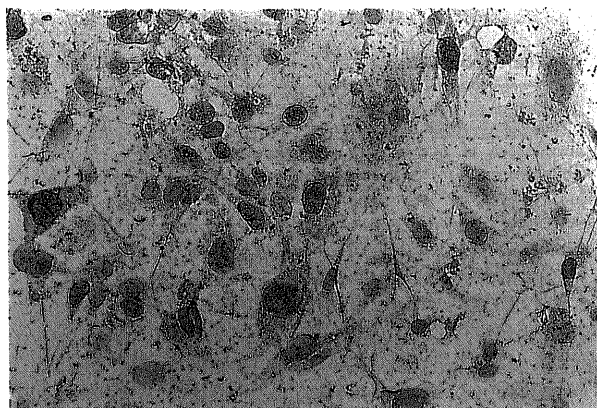


Fig. 1. Cultured KK mice-derived fibroblasts by immunohistochemical staining for vimentin. The cytoplasm around nuclei of fibroblasts were reacted with anti-vimentin antibodies ($\times 400$).

を回収して超音波処理し、一部は定量分析、残りを型別分析用の試料とした。

1) コラーゲンの定量分析

試料を5分間煮沸し、種々の酵素を不活性化した。分析は Peterkofsky らの¹⁶ コラゲナーゼ消化法を用いた。試料は、0.05M 酢酸に対して十分な透析を行なった後、凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を 0.04N 水酸化ナトリウム水溶液に再溶解させ、次いで Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) で中和した後、コラゲナーゼ (*Clostridium histolyticum* コラゲナーゼ, Form III) (Advance Biofactures Corporation, NY, USA) で37 $^{\circ}$ C, 2時間消化を行なった。消化後試料に10%トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) と0.5%タンニン酸を加え、1000 \times g で5分間の遠心により沈殿した高分子量画分 (非コラーゲン性蛋白) (non-collagenous protein, NCP) を上清中の低分子量画分 (コラーゲン性蛋白) (collagenous protein, CP) と分離した。各々の画分を液体シンチレーター ACS II (Amersham) に溶解し、シンチレーションカウンター LSC-700 (アロカ、東京) で放射活性を測定した。次いで、総蛋白合成活性の比を Peterkofsky らの¹⁶ の式

$$[\text{CP}/(\text{CP}+5.4 \times \text{NCP})] \times 100 (\%)$$

より算出した。

2) コラーゲンの定性分析

試料に中性プロテアーゼインヒビター (0.25M EDTA 2Na, 10mM フェニルメタンсульフォニルフルオリド, 0.1M N エチルマレイミド) を加えた後、コラーゲンの型別分析を行なった。

分析は Hata らの¹⁷ の方法を用いた。分析用試料に硫酸アンモニウム (176mg/ml) を加えて硫酸沈殿画分を得た。この画分を 0.5M 酢酸に再び溶解させ、最終濃度 100 μ g/ml のペプシン (Sigma, St. Louis, USA) を用いて 4 $^{\circ}$ C, 6時間で消化した。試料全容量の 1/10 量の 2M Tris-HCl 緩衝液を加えた後、5N 水酸化ナトリウム溶液でペプシンを不活性化し、凍結乾燥して電気泳動用試料とした。

電気泳動は Weber らの¹⁸ のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) を用いた。アクリルアミドの濃度に関しては濃縮用ゲルは 3% (pH6.8), 分離用ゲルは 5% (pH8.8) に調節した。

泳動終了後、スラブ・ゲルを 1.1M サリチル酸ナトリウムに1時間浸した後乾燥し、フルオログラフイー^{19,20}を行なった。X線フィルム XAR-5 (Eastman Kodak Company, Rochester, USA) を-80 $^{\circ}$ C, 5日ないし10日、乾燥ゲルに露光した後、現像した。感光したフィルム上の各コラーゲンに相当するバンドの濃度をデントメーター PDS15 (サクラ、東京), 500nm の波長の吸光度を測定し、記録紙に記録した。I型コラーゲンは $\alpha_2(I)$ および $\alpha_1(I)$ のバンドを、III型コラーゲンは還元前の γ 位置の $\alpha(III)$ を、IV型コラーゲンは還元前のバンドを、また、V型コラーゲンについては $\alpha_1(V)$ のバンドを代表してV型コラーゲンバンドとして計測した (図2)。各バンドに相当する吸光波形を記録紙から切り抜いて各型別の重量を測定することにより、各型別コラーゲンの割合を算出した。

II. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値土標準誤差で示した。各群間の

平均値の差の検定は、一元配置分散分析後、Scheffe の多重比較を用いて行ない、危険率 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

I. 培養心筋線維芽細胞のコラーゲン合成能に対するグルコース濃度の影響

1. コラーゲン合成能

各実験群における1ウエル当たりの総コラーゲン合成量、非コラーゲン合成量及び全蛋白量に対するコラーゲン合成比を表1に示す。

1) DDY マウスの心筋線維芽細胞

対照群 (DDY マウス) では、総コラーゲン合成量はグルコース濃度 5.5mM で 44920 ± 4980 dpm/ウエルであり、グルコース濃度が増加しても総コラーゲン量は変化しなかった。非コラーゲン合成量もグルコース濃度を上昇させても変化しなかった。

全蛋白量に対するコラーゲン合成比率を図3に示す。DDY 群におけるコラーゲン合成比率は培地のグルコース濃度により影響を受けなかった。

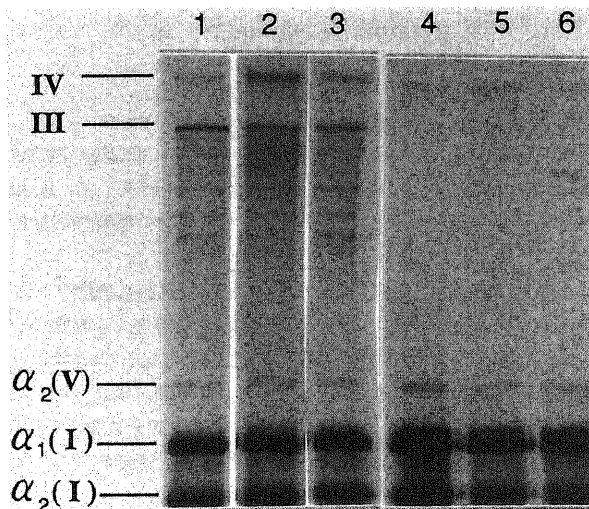


Fig. 2. SDS-PAGE of ^3H -proline labeled collagenous protein in cultured cardiac fibroblasts of KK mice. Lanes 1-3, non-reduction; lanes 4-6, reduction by DTT; Glucose concentrations (mM): lanes 1 and 4, 5.5; lanes 2 and 5, 11.0; lanes 3 and 6, 16.5.

2) KK マウスの心筋線維芽細胞

KK マウス群では対照群と比較して、グルコース濃度 5.5mM では総コラーゲン合成量には差がなかった。総コラーゲン合成量はグルコース濃度を上昇させると 5.5mM, 31509 ± 1860 dpm/ウエル; 11.0mM, 76723 ± 14138 dpm/ウエルと、

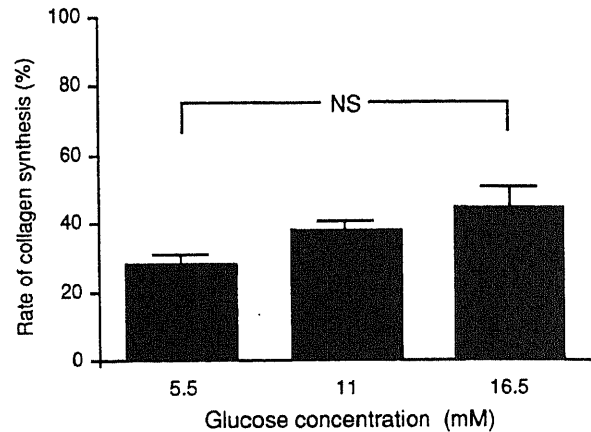


Fig. 3. Effects of glucose on rate of collagen synthesis of cultured cardiac fibroblasts from DDY mice.

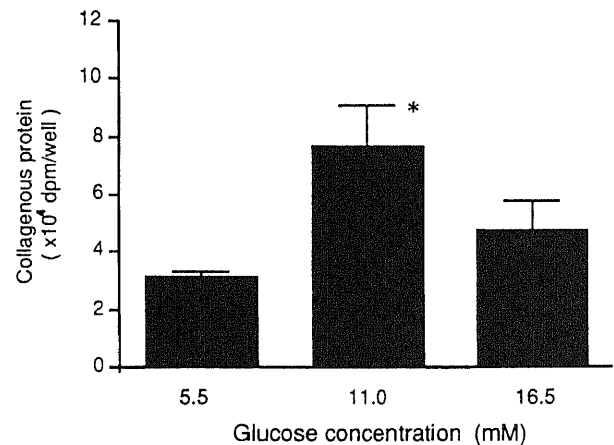


Fig. 4. Effects of glucose on collagenous protein synthesis of cultured cardiac fibroblasts from KK mice. *, $p < 0.05$ vs. cells incubated in 5.5 mM glucose

Table 1. Effect of glucose on collagen synthesis in cultured cardiac fibroblasts

Glucose concentration in culture medium (mM)	Source of cardiac fibroblasts examined	Addition of insulin ^{a)}	Amount of protein synthesized (mean \pm S. E., dpm/well)		Collagen ratio ^{b)}
			Collagenous protein	Non-collagenous protein	
5.5	DDY	-	44920 ± 4980	20689 ± 1116	28.6 ± 2.5
5.5	KK	-	31509 ± 1860	19501 ± 1245	23.2 ± 1.8
11.0	DDY	-	53762 ± 6008	17992 ± 4071	38.0 ± 3.1
11.0	KK	-	$76723 \pm 14138^*$	17061 ± 6887	$49.2 \pm 4.2^*$
11.0	KK	+	$68426 \pm 10099^*$	15001 ± 653	$45.1 \pm 2.9^*$
16.5	DDY	-	59414 ± 5814	15918 ± 4716	44.7 ± 5.9
16.5	KK	-	47667 ± 10021	24653 ± 7093	27.5 ± 3.6

a) Amount of insulin added, 0.1 unit. -, not added; +, added.

b) Collagen ratio (%) = [collagenous protein / (collagenous protein + 5.4 \times non-collagenous protein)] $\times 100$

*, $P < 0.05$ vs. cells incubated in 5.5 mM.

ルコース濃度 11.0mM において有意に増加した。しかしながら、グルコース濃度 16.5mM における総コラーゲン合成量は、5.5mM と差がなかった (図 4)。KK 群の非コラーゲン合成量はグルコース濃度 5.5mM で 19501±1245dpm/ウエルと DDY 群と差がなく、またグルコース濃度が上昇しても増加しなかった。全蛋白量に対するコラーゲン合成比率はグルコース濃度 5.5mM で 23.2±1.8% と DDY 群と差がなかったが、11.0mM では 49.2±4.2% と 5.5mM の KK 群に比し有意に増加した。グルコース濃度 16.5mM では 27.5±3.6% と 5.5mM の KK 群と差がなかった (図 5)。

II. KK 群のコラーゲン合成能におよぼすインスリンの影響

グルコース濃度 11.0mM にインスリン 0.1U を添加した KK 群では、総コラーゲン合成量 68426±10099dpm/ウエル、非コラーゲン合成量 15001±653dpm/ウエル、全蛋白量に対するコラーゲン合成比 45.1±2.9% とすべてインスリン無添加群と差がなく、5.5mM の KK 群より有意に大であった (図 6, 7)。

III. 型別コラーゲンの変化 (表 2)

KK マウスの培養心筋線維芽細胞の合成するコラーゲンの型別比率は、グルコース濃度 5.5mM では I 型コラーゲンが 71.7% と大部分を占め III/I 比は 0.228 であったが、グルコース濃度 11.0mM では I 型コラーゲンの比率が 40.3% と減少し、III, IV, V 型の比率が増加した。グルコース濃度 16.5mM では、I, III, IV, V ともグルコース濃度 5.5mM とほぼ同じ比率であった。

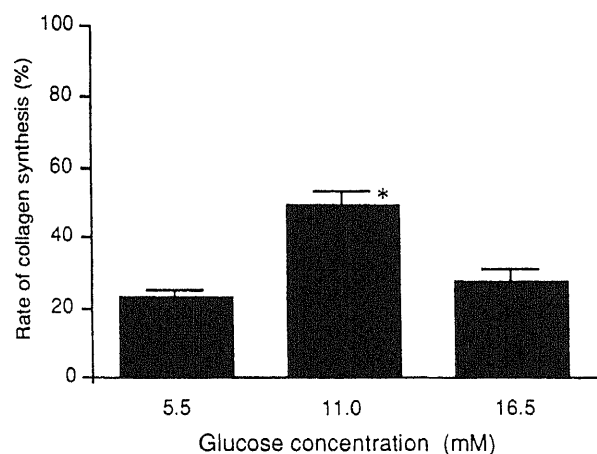


Fig. 5. Effect of glucose on rate of collagen synthesis of cultured cardiac fibroblasts from KK mice. *, p<0.05 vs. cells incubated in 5.5 mM glucose

IV. 型別コラーゲン比率におよぼすインスリンの影響

グルコース濃度 11.0mM にインスリン 0.1U を添加した KK 群では、III/I 比 0.500, IV/I 比 0.409, V/I 比 0.273 と、グルコース濃度 11.0mM のインスリン無添加 KK 群と比較し、型別比率は変化がなかった (表 2)。

考 察

糖尿病では心血管病変の合併が高率であり、その多くは巨大血管症としての冠動脈硬化症や高血圧症による心筋障害として

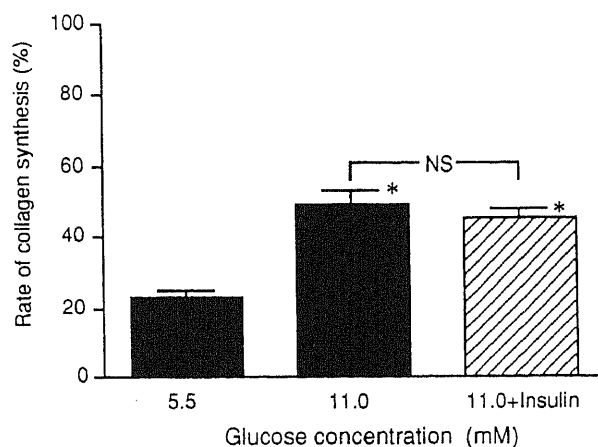


Fig. 6. Effect of insulin on collagenous protein synthesis of cultured cardiac fibroblasts from KK mice. *, p<0.05 vs. cells incubated in 5.5 mM glucose

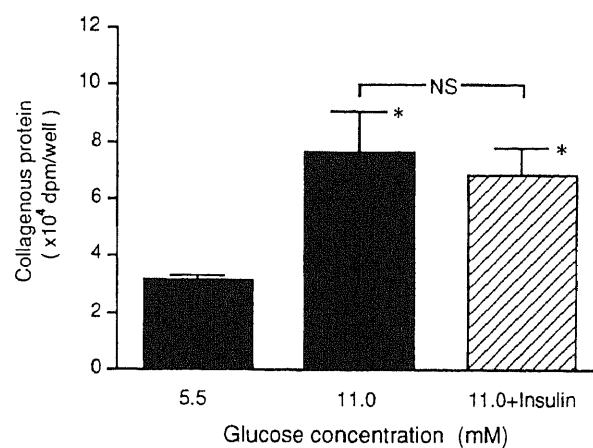


Fig. 7. Effect of insulin on rate of collagen synthesis of cultured cardiac fibroblasts from KK mice. *, p<0.05 vs. cells incubated in 5.5 mM glucose

Table 2. Relative proportions of collagen types I, III, IV and V

Glucose concentration (mM)	Addition of insulin ^{a)}	The percentage of collagen types						
		I	III	IV	V	III/I	IV/I	V/I
5.5	-	71.7	16.3	9.6	2.4	0.228	0.134	0.033
11.0	-	40.3	25.8	20.5	13.4	0.640	0.509	0.333
11.0	+	45.8	22.9	18.8	12.5	0.500	0.409	0.273
16.5	-	69.4	18.1	7.0	5.5	0.261	0.101	0.079

a) Amount of insulin added, 0.1 unit. -, not added; +, added.

知られているが、近年冠動脈硬化症を伴わない心筋障害が注目されている。1972年 Rubler ら¹⁾は糖尿病性腎糸球体硬化症 4 例の剖検心にて心筋細胞肥大、心筋間質のびまん性線維化、小動脈壁肥厚を認め、新しいタイプの心筋症として報告した。次いで1974年 Hamby ら²⁾は主幹冠動脈に病変のない糖尿病剖検心にて類似の所見を得、糖尿病性心筋症と命名した。糖尿病性心筋症の成因は心筋内細小血管病変が主体と考えられているが、第二には心筋の代謝障害も考えられている。Regan ら²¹⁾が冠血流と無関係な心筋細胞内の脂質代謝変化を推定し、長瀬ら¹²⁾は人のインスリン非依存性糖尿病モデルである KK マウスを用い、Mg および Ca の代謝障害の関与を示唆した。KK マウスは、人のインスリン非依存性糖尿病モデル¹³⁾であり、西ら¹¹⁾は KK マウスの心筋に 5 週齢以後心外膜への石灰沈着を認め、16 週齢以後に心筋細胞の変性、線維化、石灰沈着などが生じることを報告している。そこで著者は、心筋線維化を生じ始めると考えられる 7 週齢の KK マウスの心筋を取り出し、線維化の主因となるコラーゲン産生を生じる心筋線維芽細胞を継代し、コラーゲン合成におよぼすグルコースの影響を検討した。

コラーゲンは、哺乳動物では最も多い蛋白質であり、からだの蛋白質の30%を占め、 α 鎖の一次構造の違いにより少なくとも12の分子種が存在することが知られている^{22,23)}。このうち心筋はI, III, IV, V, VI型コラーゲンの5種類が存在することが知られており^{24,25)}、最も多いI型は $\alpha_1(I)$ の2本と $\alpha_2(I)$ の1本のポリペプチド鎖の3重螺旋構造から成り、 $\alpha_1(III)$ の3本より成るIII型と併せ90%以上を占める。全てのポリペプチド鎖の1/3がグリシン残基であり、グリシン-プロリン-ヒドロキシプロリンの配列を多く含んでいる。プロリンはコラーゲンのヒドロキシプロリンの前駆体であり、プロリンヒドロキシラーゼによる水酸化反応で生じる。このプロリンをトリチウムで標識した³H-プロリンを用い、糖尿病性心筋症の心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成能を Peterkofsky らのコラーゲナーゼ消化法¹⁶⁾にて量的に、Hata らの方法¹⁷⁾にて質的に検討した。その結果、グルコース濃度 5.5mM では、KK 群のコラーゲン合成量は対照の DDY 群と比較し差異を認めなかった。しかし、血糖値 200mg/dl に相当するグルコース濃度 11.0mM では KK 群のコラーゲン合成量が増加を示し、型別コラーゲンにおいてもI型コラーゲンの減少に伴いIII, IV, V型のコラーゲンの増加が認められた。高濃度グルコース状態の実験のため、浸透圧増大によって心筋線維芽細胞への³H-プロリンの受動的取り込みが増大し、コラーゲン合成能を亢進させる可能性^{26)~28)}が推測されたが、対照の DDY 群では 11.0mM の高濃度グルコース状態でもコラーゲン合成能の亢進を認めなかった。さらに 16.5mM の高濃度グルコース状態でも DDY 群と KK 群の心筋線維芽細胞は共に細胞膨化の所見はなく、心筋線維芽細胞の破壊は認められなかったことより、浸透圧による影響は少ないものと考えられた。KK 群のコラーゲン合成能はグルコース濃度 11.0mM で最大を示した。この理由として KK 群の 11.0mM のグルコース濃度でのコラーゲン合成能亢進が、先天的に同濃度で高まるような遺伝因子が介在する可能性に加え、後天的に KK マウスが成育条件時 200mg/dl (11.0mM) 台の血糖値で心筋組織が還流されその血糖値に心筋線維芽細胞が順応していた可能性も推定される。グルコース濃度 16.5mM では、5.5mM と比較しコラーゲン合成量、型別コラーゲンに変化を認めなかった。この第一の要因として高濃度のグルコースがコラーゲン合

成にむしろ抑制的に作用した可能性が推定される³⁰⁾。人の皮膚線維芽細胞を用いた実験で 25mM のグルコースが 0.56mM のアスコルビン酸を抑制し、コラーゲン合成を減少させたと報告^{31,32)}されており、本実験では 16.5mM のグルコースが 0.1mM のアスコルビン酸を抑制した可能性が示唆された。

KK 群では 11.0mM のグルコース濃度でコラーゲン合成量の増加に加え、質的变化すなわちIII型、IV型、V型コラーゲンの比率の増加が認められた。Weber ら⁶⁾は高血圧心での検討でIII型コラーゲンの比率の増加が、拡張能の低下につながり、その後、虚血等による心筋細胞障害により収縮能の低下をきたすものと推測している。梅田、⁸⁾ Shimizu ら⁹⁾はヒト糖尿病心での免疫組織学的検討で、III型コラーゲンの有意な増加を認め、I型コラーゲンは収縮、拡張機能の両者と関連し、III型コラーゲンは主として拡張機能と関連する傾向を認めると報告しており、今回の結果と合わせると、糖尿病心では心筋線維芽細胞において主としてIII型コラーゲンの合成が亢進し、心拡張機能に影響を与えるものと推定される。IV型、V型コラーゲン増加の病態生理学的意義に関しては今のところ不明であるが、今後の課題として更に検討する必要がある。

KK 群におけるコラーゲン合成増加に対するインスリンの効果を検討するため、KK 群のグルコース濃度 11.0mM 条件下でインスリン 0.1U を添加して検討したが、コラーゲン合成量、型別コラーゲンともに変化を認めなかった。KK マウスは血糖値に拘わらず遺伝的に高インスリンであると報告されており³³⁾、KK マウスの心筋線維芽細胞のコラーゲン合成能がインスリン添加により変化しなかったことから、KK マウス心においてはインスリンレセプター数が心筋線維芽細胞に少ない³⁴⁾あるいはインスリン抵抗性³⁵⁾である可能性が示唆された。インスリン抵抗性に関しては、インスリンレセプターチロシンキナーゼ活性の低下が報告されている。Maddux ら³⁶⁾は健常者とインスリン非依存性糖尿病患者の培養皮膚線維芽細胞を比較し、後者ではインスリンレセプターの数は変化しないものの、インスリンレセプターチロシンキナーゼ活性が低下し、その抑制糖蛋白が発現することを示した。以上より、インスリンは直接 KK マウスの心筋線維芽細胞に働いてコラーゲン合成能を抑制する作用を有しないものと推定された。

本実験により、インスリン非依存性糖尿病ではグルコース濃度が心筋線維芽細胞のコラーゲン合成能に直接影響をおよぼすことが示された。従って糖尿病性心筋症の線維化を抑制するためには、第一に線維化の促進因子である血糖値の下降が重要と考えられる。インスリンは直接心筋線維芽細胞のコラーゲン合成に関与しなかったが、他の細胞を介しての血糖下降は有効であると思われる。第二に高血圧心、肥大型心筋症で報告されている^{37,38)}ように線維化の促進因子であるレニン-アンジオテンシン系を抑制する薬剤(アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、レニン阻害薬)の使用が線維化を抑制する可能性も考えられる。また最近、低分子ヘパリンがコラーゲン合成を抑制するとの報告³⁹⁾もあり、今後コラーゲン合成抑制因子のみならず、病的にリモデリングした心筋コラーゲンの分解を促進する因子についても検討する必要がある。

結 論

糖尿病モデル動物である KK マウスの心筋線維芽細胞におけ

るコラーゲン代謝を明らかにする目的で心筋線維芽細胞を培養し、³H-プロリンを標識し、異なるグルコース濃度によるコラーゲン合成能を評価した。Peterkofsky らのコラーゲナーゼ消化法を用いコラーゲン合成能を量的に、Hata らの方法を用いコラーゲン合成能を質的に評価した。更にインスリンを 0.1U 添加し、コラーゲン合成能におよぼす影響についても検討し、以下の結論を得た。

1. 基礎状態 (グルコース濃度 5.5mM) における KK マウスの心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成量とコラーゲン合成比は、DDY マウス群と差を認めなかった。

2. DDY マウス群では、グルコース濃度が上昇してもコラーゲン合成量、コラーゲン合成比は増加しなかったが、KK マウス群では、グルコース濃度 11.0mM でコラーゲン合成量とコラーゲン合成比は有意に増加した。

3. KK マウス群の型別コラーゲン分析では、グルコース濃度 11.0mM において I 型コラーゲンの比率の減少と、III, IV, V 型コラーゲンの比率の増加が認められた。

4. KK マウス群のグルコース濃度 11.0mM 培地にインスリン 0.1U を添加した群では、インスリン無添加群と比較しコラーゲン合成能に差は認められなかった。

これらの結果から、KK マウスの心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成能は 11.0mM のグルコース濃度で高まり、先天的あるいは後天的に生体における血糖レベルでコラーゲン合成が増加するよう形質変換されているものと推定された。また、インスリンは心筋線維芽細胞のコラーゲン合成能に影響を与えなかった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師金沢大学第二内科竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また終始御指導、御教示を頂きました金沢大学第二内科清水賢巳講師に深く感謝し、本研究の遂行に際し、多大な御協力を頂きました金沢大学第二内科第四研究室の各位に感謝致します。さらに、コラーゲンの解析に関して御指導を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室 (現大阪医科大学第二病理学教室) の岡田仁克講師に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、日本循環器学会第92回東海・第77回北陸合同地方会において発表した。

文 献

- 1) Rubler, S., Dlugash, F. J., Yuceoglu, Y. Z., Kumral, F. T., Braunwood, A. W. & Grishman, A.: New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, **30**, 595-602 (1972).
- 2) Hamby, R. I., Zonerach, S. & Sherman, L.: Diabetic cardiomyopathy. *JAMA*, **229**, 1749-1754 (1974).
- 3) Sutherland, C. G. G., Fisher, B. M., Dargie, H. J., More, I. A. R. & Lindop, G. B. M.: Endomyocardial biopsy pathology in insulin-dependent diabetic patients with abnormal ventricular function. *Histopathology*, **14**, 593-602 (1989).
- 4) Sunni, S., Bishop, S. P., Kent, S. P. & Geer, J. C.: Diabetic cardiomyopathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **110**, 375-381 (1986).
- 5) Green, H. & Goldberg, B.: Collagen and cell protein synthesis by an established mammalian fibroblast line.

Nature, **204**, 347-349 (1964).

- 6) Weber, K. T.: Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **13**, 1637-1652 (1989).
- 7) Weber, K. T. & Brilla, C. G.: Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation*, **83**, 1849-1865 (1991).
- 8) 梅田 研: 糖尿病心臓における型別コラーゲンの局在、およびその定量的評価と心機能に及ぼす影響の検討. *十全医会誌*, **99**, 42-58 (1990).
- 9) Shimizu, M., Umeda, K., Sugihara, N., Yoshio, H., Ino, H., Takeda, R., Okada, Y. & Nakanishi, I.: Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. *J. Clin. Pathol.*, **46**, 32-36 (1993).
- 10) Nakamura, M.: A diabetic strain of the mouse. *Proc. Jpn. Acad.*, **38**, 348-352 (1962).
- 11) 西 征二, 田中弘充, 新屋敷辰郎, 金久卓也, 西村正彦, 岩塚 壽: 自然発症糖尿病マウス (KK マウス) の心筋病変について. *医学の歩み*, **97**, 286-288 (1976).
- 12) 長瀬教夫, 田村禎通, 小林総一郎, 工藤 隆, 宮上盛史, 佐光春信, 斉藤 憲, 仁木敏春, 近森一正, 森 博愛: 自然発症糖尿病マウス (KK マウス) の心筋障害の成因に関する研究. *医学の歩み*, **124**, 181-183 (1983).
- 13) Ross, R.: The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. cell Biol.*, **50**, 172-186 (1971).
- 14) Osborn, M., Debus, E. & Weber, K.: Monoclonal antibodies specific for vimentin. *Eur. J. Cell Biol.*, **34**, 137-143 (1984).
- 15) Eghbali, M., Blumenfeld, O. O., Seifter, S., Buttrick, P. M., Robinson, T. F., Zern, M. A. & Giambone, M. A.: Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **21**, 103-113 (1989).
- 16) Peterkofsky, O. B., Chojkier, M. & Bateman, J.: Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture systems. *In* H. Furthmeyer (ed.), *Immunochemistry of the Extracellular Matrix*. Vol. II. Applications, 1st ed., p19-47, CRC Press, Florida, 1982.
- 17) Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. & Tsukada, Y.: Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. *Biochemistry*, **19**, 169-176 (1980).
- 18) Weber, K. & Osborn, M.: Proteins sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and procedures. *In* H. Neurath, R. L. Hill & C. L. Boeder (eds.), *The Proteins*, Vol. 1, 3rd ed., p179-223, Academic Press, New York, 1975.
- 19) Lasky, R. A. & Mills, A. D.: Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, **56**, 335-341 (1975).
- 20) Chamberlain, J. P.: Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.*, **98**, 132-135 (1979).
- 21) Regan, T. J., Ettinger, P. O., Khan, M. I., Jesrani,

- M. U., Lyons, M. M., Oldewurtel, H. A. & Weber, M.: Altered myocardial function and metabolism in chronic diabetes mellitus without ischemia in dogs. *Circ. Res.*, **35**, 227-237 (1974).
- 22) Kathryn, S. E. C.: Collagen genes and inherited connective tissue disease. *Biochem. J.*, **229**, 287-303 (1985).
- 23) Marion, K. G., Donald, R. G. & Bjorn, R. O.: Type XI collagen: Distinct extracellular matrix component discovered by cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6040-6044 (1987).
- 24) McLain, P. E.: Characterization of cardiac muscle collagen. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2303-2311 (1974).
- 25) Adomian, G. E.: Existence of type VI collagen in the extracellular network surrounding myocytes in the newborn and adult human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **17**, 15 (1985).
- 26) Tesfamariam, B., Brown, M. L. & Cohen, R. A.: Aldose reductase and myo-inositol in endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 153-157 (1992).
- 27) Weisbrod, R. M., Brown, M. L. & Cohen, R. A.: Effect of elevated glucose on cyclic GMP and eicosanoids produced by porcine aortic endothelium. *Arterioscler. Thromb.*, **13**, 915-923 (1993).
- 28) Natarajan, R., Gonzales, N., Xu, L. & Nadler, J. L.: Vascular smooth muscle cells exhibit increased growth in response to elevated glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 552-560 (1992).
- 29) Sugihara, H., Funatsumaru, S., Yonemitsu, N., Miyabara, S., Toda, S. & Hikichi, Y.: A simple culture method of fat cells from mature fat tissue fragments. *J. Lipid Res.*, **30**, 1987-1995 (1989).
- 30) Sibbitt, W. L., Mills, R. G., Bigler, C. F., Eaton, R. P., Griffey, R. H. & Vanderjagt, D. L.: Glucose inhibition of human fibroblast proliferation and response to growth factors is prevented by inhibitors of aldose reductase. *Mech. Ageing Dev.*, **47**, 265-279 (1989).
- 31) Fisher, E., McLennan, S. V., Tada, H., Heffernan, S., Yue, D. K. & Turtle, J. R.: Interaction of ascorbic acid and glucose on production of collagen and proteoglycan by fibroblasts. *Diabetes*, **40**, 371-376 (1991).
- 32) Schmidt, R. J., Chung, L. Y., Andrews, A. M. & Turner, T. D.: Toxicity of L-ascorbic acid to L929 fibroblast cultures: relevance to biocompatibility testing of materials for use in wound management. *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 521-530 (1993).
- 33) Asselot, C., Robert, J. L. & Kern, P.: Heparin fragments regulate collagen phenotype and fibronectin synthesis in the skin of genetically diabetic mice. *Biochem. pharmacol.*, **38**, 895-899 (1989).
- 34) Inadera, H., Ishikawa, Y., Shirai, K., Saito, Y. & Yoshida, S.: Proliferation and triglyceride synthesizing activities of fibroblast-like cells derived from epididymal and subcutaneous adipose tissues of rats. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **53**, 225-229 (1993).
- 35) Lithell, H.: Insulin resistance and cardiovascular drugs. *Clin. Exp. Hypertens.*, **14**, 151-62 (1992).
- 36) Maddux, B. A., Sbraccia, P., Reaven, G. M., Moller, D. E. & Goldfine, I. D.: Inhibitors of insulin receptor tyrosine kinase in fibroblasts from diverse patients with impaired insulin action: evidence for a novel mechanism of postreceptor insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 73-79 (1993).
- 37) Brilla, C. G., Maisch, B. & Weber, K. T.: Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodelling in hypertensive heart disease. *in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. Clin. Invest. Med.*, **71**, 35-41 (1993).
- 38) Hirakata, H., Fouad-Tarazi, F. M., Bumpus, F. M., Kyosla, M., Healy, B., Husain, A., Urata, H. & Kumagai, H.: Angiotensins and the failing heart. Enhanced positive inotropic response to angiotensin I in cardiomyopathic hamster heart in the presence of captopril. *Circ. Res.*, **66**, 891-899 (1990).

Effect of Glucose on Collagen Synthesis of Cultured Cardiac Fibroblasts from KK Mice Tomio Taguchi, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **103**, 522—529 (1994)

Key words KK mouse, diabetes mellitus, cardiac fibroblast, collagen synthesis

Abstract

To clarify the effect of glucose and insulin on collagen synthesis of cardiac fibroblasts from diabetic mice, which is an animal model of human non-insulin dependent diabetes mellitus, the synthetic activity of collagenous protein was measured with ^3H -proline uptake, and subsequent analysis of collagen types by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The effects of insulin were also studied. Fibroblasts from the myocardium of seven-week-old KK mice and normal DDY mice were cultured and used in the 7th passage. In the control medium (5.5 mM glucose), collagen production of cardiac fibroblasts from KK mice was commensurate with that from DDY mice. By raising the glucose concentration of the medium, collagen production of DDY mice did not change. However, at a glucose concentration of 11 mM, collagenous protein and its rate of production in KK mice increased with a relatively high proportion of type III, IV and V collagen. At a glucose concentration of 16.5 mM, collagen production of KK mice was no different than that at 5.5 mM. With the addition of insulin at a glucose concentration of 11 mM, cardiac fibroblasts from KK mice didn't increase the collagen production. It is suggested that, at 11 mM glucose, cardiac fibroblasts from KK mice are transformed genetically or are secondary to the increase in the production of collagenous protein.