

血管内皮細胞におけるメチルグリオキサール誘導アポトーシス

高橋恭兵, 立浪良介, 丹保好子*

Methylglyoxal-induced Apoptosis of Endothelial Cells

Kyohei TAKAHASHI, Ryosuke TATSUNAMI, and Yoshiko TAMPO*

*Hokkaido Pharmaceutical University School of Pharmacy,
7-1 Katsuraoka-cho, Otaru City 047-0264, Japan*

(Received February 1, 2008; Accepted July 1, 2008)

Diabetic patients exhibit increased blood plasma levels of methylglyoxal (MG), a metabolite of glucose. Since MG generates advanced glycation end-products (AGEs) that disrupt the functions of such biomolecules as proteins, it is responsible for the progression and complications of diabetes. A functional disorder of the vascular endothelium may also contribute to the progression and complications of diabetes. In endothelial cells, MG is the major precursor for the formation of AGEs. In this study, we examined the effects of MG on vascular endothelial cells and found that it induced the apoptosis of bovine aortic endothelial cells (BAECs). MG induced the collapse of mitochondrial membrane potential, an index of apoptosis, and the elevation of caspase-3 activity, an apoptotic execution enzyme, leading to cell death. Flow cytometric analyses with annexin-V and propidium iodide double staining revealed that cells exposed to a lethal dose of MG displayed features characteristic of apoptosis. MG induced an increase in the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) prior to induction of apoptosis. Taken together, these findings suggest that BAECs exposed to MG die by apoptosis due to the increase of intracellular ROS level.

Key words—methylglyoxal; apoptosis; advanced glycation end-product; endothelial cell; reactive oxygen species

序 論

血管内皮細胞は、血液と血管壁を隔てるバリアとしての機能を有している。糖尿病などにより血管内皮細胞が障害されると、動脈硬化の発症や進展を引き起こす。したがって、これらの疾患を予防・治療する上で血管内皮の細胞障害を十分に理解することは重要であると考えられる。

近年、糖尿病や動脈硬化性疾患に酸化ストレスが関係していることが明らかになってきた。糖尿病の病態では、抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) が減少し、抗酸化酵素活性が変動する。^{1,2)} アロキサンやストレプトゾトシン糖尿病モデル動物では活性酸素種 (ROS) 産生が亢進され、³⁾ 抗酸化物質や抗酸化酵素の投与により阻止軽減される。⁴⁾ また、高血糖状態では、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼは糖化を受け失活する。⁴⁾ 一方、細胞が ROS に曝されると、アポトーシスに至

ることがいくつかの実験で示されている。例えば、膵β細胞に高濃度グルコースを添加すると、酸化ストレスが亢進し、アポトーシスが誘導される。⁵⁾

糖尿病により血中グルコース濃度が上昇すると、グルコースの自動酸化、タンパク質のアミノ基との共有結合形成を介して、グリオキサール、メチルグリオキサール (MG)、3-デオキシグルコソンが生成する。糖尿病患者では、これらジカルボニル化合物の血中濃度の上昇が認められている。^{6,7)} これらの化合物は、グルコースと比較して反応性が高く、メイラード反応を介して終末糖化産物 AGEs (advanced glycation end-products) の形成を促進する。⁸⁾ このことが、糖尿病性の網膜症、神経症、腎症などのいわゆる三大合併症に結び付くと考えられている。⁹⁾

血管内皮細胞においては、AGEsの前駆体は主としてMGであることが報告されている。^{10,11)} すなわち、大動脈内皮細胞に高濃度グルコースを添加した場合、グリオキサールや3-デオキシグルコソンの濃度は不変である一方で、MG濃度は約2倍に上昇

北海道薬科大学

*e-mail: y-tampo@hokuyakudai.ac.jp

した.¹¹⁾したがって、高血糖状態ではMGが血管内皮細胞に対して様々な影響を与えていると思われるが、その詳細は明らかではない。ヒト臍帯静脈内皮細胞では、MGは細胞の分化・増殖に関する extracellular signal-regulated kinase や、ストレス応答に関与する Jun-N-terminal protein kinase の活性化を誘導することが報告されている。^{12,13)} また、ラットシワ細胞などの培養細胞株において、MGがアポトーシスを誘導することが示されている。¹⁴⁻¹⁶⁾ このことから、MGは血管内皮の細胞傷害を惹起する可能性が考えられる。

本研究において筆者らは、血管内皮細胞を用い、MGの影響について検討した。その結果、MGが血管内皮細胞のアポトーシスを誘導し、この過程においてROS生成の増大が認められたので報告する。

実験方法

1. 試薬 MGはSigma Chemical Co. (St. Louis, MO) より購入した。MitoLight Apoptosis Detection KitはChemicon International Inc. (Temecula, CA, USA) より、抗カスパーゼ-3-phycoerythrin (PE) 抗体はSanta Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。Annexin-V-FLUOS Staining KitはRoche (Indianapolis, IN, USA) より、ジヒドロエチジウム (HE) はInvitrogen (Eugene, OR, USA) より購入した。その他の試薬は、市販特級品を使用した。

2. 細胞培養とMG処理 細胞はCambrex Co. (MD, USA) から購入したbovine artery endothelial cells (BAECs)を使用した。培養には10% FBS及びL-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシンを添加したDMEMを用いた。MG処理は、培地を2%FBSを含むDMEMに交換したのち、MGを添加して行った。インキュベーション後、細胞層をDPBSで洗浄し、各種測定に用いた。

3. 細胞生存率の測定 細胞生存率は、血管内皮細胞の生細胞数と相関性を示す酸性ホスファターゼ活性を指標として測定した。¹⁷⁾ コントロール及びMG処理したBAECs (3×10^4 cells) に10 mM *p*-ニトロフェニルリン酸及び0.1% Triton-X 100 含有酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) を100 μ l 添加し、20分間インキュベーションした。ついで、1 M NaOH 溶液10 μ l を加えて反応を停止し、405 nm の吸光度

を測定した。

4. ミトコンドリア膜電位の測定 ミトコンドリア膜電位は、特異的プローブMitoLightを用いて測定した。BAECs (10^6 cells) をMG処理後、MitoLightを含む緩衝液を添加し、室温で15分間インキュベーションした。続いて、細胞をトリプシンにより剥離遠心して洗浄し、得られた細胞懸濁液をセルストレーナーチューブ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) でろ過した。MitoLight 蛍光はCoulter ELITE cytofluorometer (Beckman Coulter Inc., CA, USA) 用いFL-1チャンネル (530 nm) により測定した。

5. カスパーゼ-3の測定 MG処理BAECs (10^6 cells) をパラホルムアルデヒドで固定後、氷冷メタノールを用いて細胞膜を透過性とした。ブロッキング処理したのち、抗カスパーゼ-3-PE抗体を添加し、室温で30分間インキュベーションした。以後の操作はミトコンドリア膜電位の測定と同様に行った。抗カスパーゼ-3-PEの蛍光はフローサイトメーター (FL-2チャンネル: 585 nm) により測定した。

6. 細胞死様式の判定 Annexin-V-FLUOS Staining Kitを用い、アポトーシス及びネクローシスの細胞死様式について検討した。MG処理BAECs (10^6 cells) をトリプシンにより剥離し、遠心後、Annexin-V-FLUOS溶液を加え、室温で5分間インキュベーションした。以後の操作はミトコンドリア膜電位の測定と同様に行った。フローサイトメーターを用い、アネキシン-V (FL-1チャンネル: 530 nm) とヨウ化プロピジウム (PI) (FL-2チャンネル: 585 nm) の蛍光を測定した。FL-1のみ蛍光強度が上昇した細胞をアポトーシス、FL-1及びFL-2の両蛍光強度が上昇した細胞をネクローシスと判定した。

7. 活性酸素の測定 MG処理BAECs (10^6 cells) に10 μ M HEを添加し、20分間インキュベーションした。続いて細胞をトリプシンにより剥離遠心して洗浄し、フローサイトメーター用の試料を調製した。HEの蛍光は、FL-2チャンネル (585 nm) により検出した。

8. 統計処理 F検定で分散分析後、Studentの*t*検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 細胞生存率に対する MG の影響 BAECs を MG 処理し、細胞生存率を経時的に測定した (Fig. 1). 生存率は、内皮細胞の生細胞数と相関性を示す酸性ホスファターゼ活性を指標とした.¹⁷⁾ MG 5 mM で処理すると、生存率はインキュベーション 4 時間以降から著しく低下し、8 時間の生存率はわずか 13% であった。これに対し、MG 1 mM で処理した場合、8 時間後においても生存率の大きな変動は認められなかった。以後の実験は、MG の影響が顕著に観察された 5 mM 処理の条件で行った。

2. MG 処理 BAECs のミトコンドリア膜電位とカスパーゼ-3 活性の変動 MG (5 mM) による BAECs 生存率の低下と、アポトーシスとの関連性を検討した。アポトーシスが誘導される際、先行してミトコンドリア膜電位の崩壊が認められている。¹⁸⁾そこで、ミトコンドリア膜電位の変化について、蛍光色素を用いフローサイトメトリーにより測定した。蛍光色素 MitoLight は、ミトコンドリア膜電位の崩壊した細胞では単量体として細胞質に局在し、強い緑色蛍光を放つ。コントロール細胞 (MG 未処理) では、正常なミトコンドリア膜電位を示す A 領域に 96% の細胞が分布した (Fig. 2)。一方、BAECs を MG で 2 時間処理すると、A 領域の分布割合は 43% に減少し、ミトコンドリア膜電位の崩壊を示す B 領域の分布割合が 57% に増加した。この場合の蛍光強度は、コントロールの 3.8 倍であ

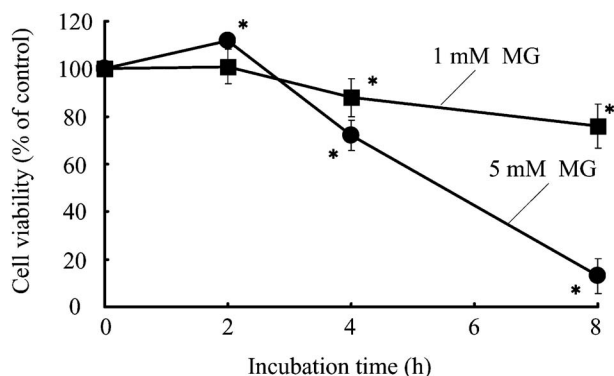


Fig. 1. Viability of BAECs Treated with MG

BAECs were treated with MG at concentrations of 1 and 5 mM for 0 to 8 h. Cell viability was determined by acid phosphatase assay, as described in "Experimental Procedure." Viability is expressed as percentage of surviving cells with respect to control at the each time. Data are means \pm S.D. of six independent experiments. * $p < 0.05$, compared with control at each time.

た。なお、MG による MitoLight の蛍光強度の増加は、BAECs が存在しない条件下では認められなかった (data not shown).

次に、アポトーシスカスケードの下流に位置するアポトーシス実行酵素のカスパーゼ-3¹⁸⁾の活性を測定した。BAECs を MG で 4 時間処理すると、カスパーゼ-3 活性の上昇を示す A 領域から B 領域へのシフトが観察された (Fig. 3)。活性化の程度はコントロールの 1.8 倍であった。これらの結果から、MG (5 mM) による BAECs 生存率の低下には、ア

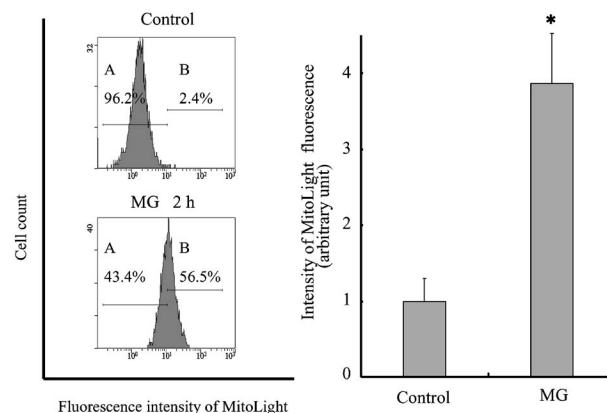


Fig. 2. Disruption of Mitochondrial Membrane Potential in BAECs Treated with MG

Experiments were carried out as described in "Experimental Procedure." Cells were treated with 5 mM MG for 2 h. The status of the mitochondrial membrane potential was detected by flow cytometry using MitoLight. The FL-1 channel recorded cells that emitted the greenish-yellow fluorescence of MitoLight monomers. Regions A and B contain cells with intact and disrupted mitochondrial membrane potential, respectively. Relative fluorescence of untreated cells was set to 1.0. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

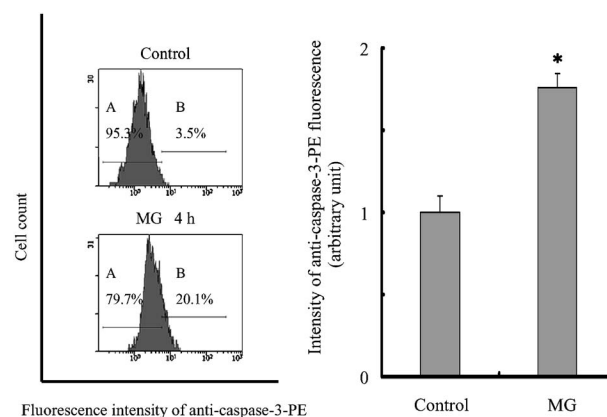


Fig. 3. Activation of Caspase-3 in BAECs Treated with MG

Cells were treated with 5 mM MG for 4 h and collected, fixed, and processed for immunofluorescence-based flow cytometry as described in "Experimental Procedure." Relative fluorescence of untreated cells was set to 1.0. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

ポトーシスが関与している可能性が示唆された。

3. MG 処理 BAECs における細胞死様式の判定

MG (5 mM) 処理 BAECs における細胞死様式の検討するため、アネキシン-V 及び PI の二重染色法を用い、フローサイトメトリー分析を行った。細胞膜の完全性が保たれているアポトーシスの状態では、ホスファチジルセリンは細胞膜の内側から外側へ移行し、これにアネキシン-V が結合して FL-1 蛍光強度の上昇を示す。一方、ネクローシスの状態に至ると、細胞膜の構造が崩壊するため、アネキシン-V と PI の両蛍光強度が増加し、FL-1 と FL-2 の両蛍光強度が増加する。Figure 4 に、コントロール細胞及び MG 処理細胞のアネキシン-V (横軸) と PI (縦軸) の蛍光強度を示した。この場合、細胞膜統合性が維持されている生存細胞は A 領域に、アポトーシス細胞は B 領域に、ネクローシス細胞は C 領域に位置すると考えられる。コントロール細胞では、アネキシン-V と PI の蛍光強度はいずれも小さく、A 領域に分布した。一方、MG で 4 時間処理すると、約 87% の細胞がアポトーシスを示す B 領域へとシフトした。この場合、ネクローシスを示す C 領域への有意なシフトは認められなかった。また、B 領域へのシフトは、MG で 2 時間処理した場合には認められなかった (data not shown)。なお、MG がアネキシン-V や PI の蛍光に対して影響を与えないことは、BAECs が存在し

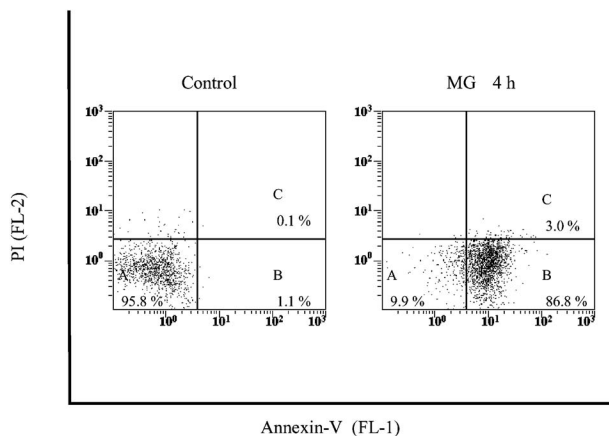


Fig. 4. Alteration of Phosphatidylserine Distribution in BAECs Treated with MG

Cells were treated with 5 mM MG for 4 h and analyzed by flow cytometry using the annexin-V/PI double-staining method, as described in "Experimental Procedure." Regions A, B, and C contain viable, apoptotic, and necrotic cells, respectively. Control cells not treated with MG were annexin-V-negative and PI-negative. Similar results were obtained in two additional independent experiments using different cell preparations.

ない条件下で確認した (data not shown)。以上の結果から、MG 処理 BAECs において、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。

4. MG 処理 BAECs における ROS の生成

ホルムアルデヒド、アクロレインなどのアルデヒド化合物により誘導される細胞死には、ROS が関与することが報告されている。^{19,20} そこで、ROS 産生を検討するため、蛍光プローブである HE を用いフローサイトメトリー分析を行った (Fig. 5)。コントロール細胞では、HE の蛍光は小さく、大部分が A 領域に分布した。一方、MG (5 mM) により 2 時間処理すると、約 33% の BAECs が ROS の生成を示す B 領域へとシフトした。蛍光強度はコントロールの 1.9 倍に上昇した。なお、MG 自身は HE の蛍光に対し、有意な影響を与えなかった (data not shown)。このことから、MG 処理細胞において、ROS が産生していることが示唆された。

考 察

本研究では、MG が BAECs における細胞死を時間依存的に誘導することが明らかとなった (Fig. 1)。BAECs の細胞死誘導効果は、mM オーダーの高濃度 MG 処理により認められた。MG はヒト中皮細胞及びラット膵 β 細胞株 RINm5F において、それぞれ 1.4 μ M, 1 mM で、細胞死を誘導する。^{21,22} これらの知見から、MG に対する感受性は細胞の種類によって異なり、BAECs の場合 MG に対する抵抗性が比較的高いと考えられる。糖尿病患者の血清中

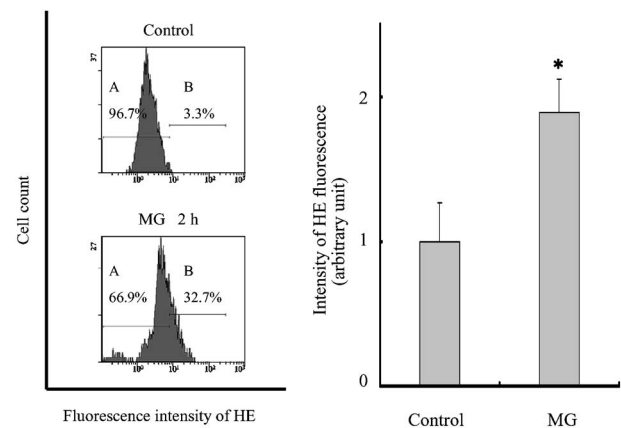


Fig. 5. Generation of ROS in BAECs Treated with MG

After treatment with 5 mM MG for 2 h, cells were incubated with 10 μ M HE for 20 min at 37°C. HE fluorescence was detected by flow cytometry at FL-2. Relative fluorescence of untreated cells was set to 1.0. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

で、MG濃度は $2\mu\text{M}$ 程度である。⁷⁾しかし、MGは解糖を介して生成するため、2型糖尿病患者の細胞内MG濃度は血漿と比較して高くなると予測される。事実、ラット動脈組織のMG濃度は、血漿濃度より約5倍高い。²³⁾チャイニーズハムスター卵巣細胞において、MG濃度は $310\mu\text{M}$ 存在することが報告されている。²⁴⁾これらの知見を考慮しても、本実験系で用いたMG濃度は比較的高いと考えられる。ChanとWuは、ヒト血管内皮細胞において、高グルコース条件下では $5\mu\text{M}$ のMGでも Ca^{2+} とROS、NO依存性のアポトーシスが誘導されることを報告している。²⁵⁾しかし、MGによるBAECs生存率の低下に対し、グルコース及びNOドナー添加の影響は認められなかった (data not shown)。一方、Denisらは、アルブミンと結合したMGは $3\mu\text{M}$ で網膜周皮細胞のアポトーシスを誘導することを報告している。²⁶⁾しかしながら、あらかじめ調製したMG-BSA混液を添加した場合も、MG単独と比較してBAECsの生存率に明らかな差は認められなかった (data not shown)。

細胞死は大別して、能動的細胞死であるアポトーシスと受動的細胞死であるネクローシスに分類される。DNA損傷などのストレスを受けると、細胞はカスパーゼ群の活性化を介してDNAを断片化し、プログラム化細胞死、いわゆるアポトーシスを生じる。²⁷⁾一方、細胞機能が不能になるほどの強いストレスを受けた場合、細胞膜のイオン輸送系が崩壊し、細胞内に水が流入することにより、細胞は膨化破裂を引き起こし、ネクローシスへと至る。²⁷⁾ミトコンドリアは、細胞の生死を決定する細胞内小器官であり、ミトコンドリア膜電位の崩壊は、ミトコンドリア関連アポトーシス誘導の不可逆的通過点として認められている。¹⁸⁾BAECsにおいてMGは、細胞死の誘導に先行して、ミトコンドリア膜電位の崩壊を惹起し (Fig. 2)、さらに、アポトーシス実行酵素とされるカスパーゼ-3の活性化を引き起こした (Fig. 3)。ミトコンドリア傷害は、ミトコンドリア内膜から細胞質へシトクロムc遊離を引き起こし、カスパーゼカスケードを活性化する。^{28,29)}したがって、MGはBAECsにおいて、ミトコンドリアを介したカスパーゼ依存機構によりアポトーシスを誘導することが示唆される。MG処理したBAECsは、細胞膜の完全性が保たれている状態で、細胞内

膜から外膜へホスファチジルセリンが移行していることが確認され、(Fig. 4)、このことはアポトーシスの形態学的特徴を示している。

近年、血管内皮細胞のアポトーシスにROSの関与が報告されている。³⁰⁾また、ヒト臍帯静脈内皮細胞や網膜周皮細胞では、MG誘導アポトーシスに対するROSの関与が報告されている。^{25,26)}MGはBAECsの細胞死に先行して、ROSの産生を示すHE蛍光強度の上昇を誘導した (Fig. 5)。HEはROSの中でもスーパーオキシドに対する特異性が高い蛍光プローブである。³¹⁾本研究の条件下では、スーパーオキシドの産生が亢進している可能性が考えられるが、MG処理細胞にスーパーオキシドジスムターゼを添加しても、HE蛍光強度に対する影響は認められなかった (data not shown)。一方で、一酸化窒素、過酸化亜硝酸などの活性窒素種が、血管内皮細胞系のアポトーシスを誘導することが報告されている。^{32,33)}今後、MG誘導血管内皮細胞死に関与する活性酸素分子種について、詳細に検討する必要がある。

REFERENCES

- 1) Maritim A. C., Sanders R. A., Watkins. 3rd. J.B., *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **17**, 24–38 (2003).
- 2) Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G., *Metabolism*, **44**, 363–368 (1995).
- 3) Kawada J., *Yakugaku Zasshi*, **112**, 773–791 (1992).
- 4) Yoshikawa T., Igarashi O., Itogawa Y., “Free Radical to Shippei Yobou,” Kenpaku Co., Tokyo, 1997, pp. 98–101.
- 5) Duh E., Aiello LP., *Diabetes*, **48**, 1899–1906 (1999).
- 6) McLellan A. C., Thornalley P. J., Benn J., Sonksen P. H., *Clin. Sci. (Lond)*, **87**, 21–29 (1994).
- 7) Odani H., Shinzato T., Matsumoto Y., Usami J., Maeda K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 89–93 (1999).
- 8) Goldin A., Beckman J. A., Schmidt A. M., Creager M. A., *Circulation*, **114**, 597–605 (2006).
- 9) Beisswenger P. J., Howell S. K., Nelson R. G., Mauer M., Szewgold B. S., *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1358–1363 (2003).

- 10) Schalkwijk C. G., van Bezu J., van der Schors R. C., Uchida K., Stehouwer C. D., van Hinsbergh V. W., *FEBS Lett.*, **580**, 1565–1570 (2006).
- 11) Shinohara M., Thornalley P. J., Giardino I., Beisswenger P., Thorpe S. R., Onorato J., Brownlee M., *J. Clin. Invest.*, **101**, 1142–1147 (1998).
- 12) Akhand A. A., Hossain K., Mitsui H., Kato M., Miyata T., Inagi R., Du J., Takeda K., Kawamoto Y., Suzuki H., Kurokawa K., Nakashima I., *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 20–30 (2001).
- 13) Akhand A. A., Hossain K., Kato M., Miyata T., Du J., Suzuki H., Kurokawa K., Nakashima I., *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1228–1235 (2001).
- 14) Fukunaga M., Miyata S., Liu B. F., Miyazaki H., Hirota Y., Higo S., Hamada Y., Ueyama S., Kasuga M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 689–695 (2004).
- 15) Miller A. G., Smith D. G., Bhat M., Nagaraj R. H., *J. Biol. Chem.*, **281**, 11864–11871 (2006).
- 16) Okado A., Kawasaki Y., Hasuike Y., Takahashi M., Teshima T., Fujii J., Taniguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 219–224 (1996).
- 17) Connolly D. T., Knight M. B., Harakas N. K., Wittwer A. J., Feder J., *Anal. Biochem.*, **152**, 136–140 (1986).
- 18) Kim J. S., He L., Lemasters J. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 463–470 (2003).
- 19) Saito Y., Nishio K., Yoshida Y., Niki E., *Toxicology*, **210**, 235–245 (2005).
- 20) Tanel A., Averill-Bates D. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1743**, 469–478 (2001).
- 21) Sheader E. A., Benson R. S., Best L., *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 1381–1386 (2001).
- 22) Amore A., Cappelli G., Cirina P., Conti G., Gambaruto C., Silvestro L., Coppo R., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **18**, 677–688 (2003).
- 23) Randell EW., Vasdev S., Gill V., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **51**, 153–157 (2005).
- 24) Chaplen F. W., Fahl W. E., Cameron D. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 5533–5538 (1998).
- 25) Chan W. H., Wu H. J., *J. Cell Biochem.*, **103**, 1144–1157 (2008).
- 26) Denis U., Lecomte M., Paget C., Ruggiero D., Wiernsperger N., Lagarde M., *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 236–247 (2002).
- 27) Miura M., Yamada M., “Apoptosis,” Yodo Co., Tokyo, 1996, pp. 16–17.
- 28) Hu Y., Benedict M. A., Ding L., Nunez G., *EMBO J.*, **18**, 3586–3595 (1999).
- 29) Jiang X., Wang X., *J. Biol. Chem.*, **275**, 31199–31203 (2000).
- 30) Irani K., *Circ. Res.*, **87**, 179–183 (2000).
- 31) Zhao H., Joseph J., Fales H. M., Sokoloski E. A., Levine R. L., Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 5727–5732 (2005).
- 32) Ramachandran A., Moellering D. R., Ceaser E., Shiva S., Xu J., Darley-Usmar V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 6643–6648 (2002).
- 33) Gu X., El-Remessy A. B., Brooks S. E., Al-Shabrawey M., Tsai N. T., Caldwell R. B., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C546–C554 (2003).