

氏 名 ろぶな あり あぶでるざひる
LOBNA ALY ABDELZAHER

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 197 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学専攻

学位論文題目 **Astaxanthin alleviates oxidative stress insults-related deragment in human vascular endothelial cells exposed to glucose fluctuations**
(グルコース変動による酸化ストレスを介した内皮型一酸化窒素合成酵素機能障害とアスタキサンチンの改善効果)

論文審査委員

(主査)	教授	近藤 隆
(副査)	教授	井ノ口 馨
(副査)	教授	戸邊 一之
(副査)	教授	山崎 光章
(指導教員)	教授	服部 裕一

論文内容の要旨

ABSTRACT

Glycemic fluctuations may play a critical role in the pathogenesis of diabetic complications, such as cardiovascular disease. We investigated whether the oxycarotenoid astaxanthin can reduce the detrimental effects of fluctuating glucose on vascular endothelial cells. Human umbilical venous endothelial cells were incubated for 3 days in media containing 5.5 mM glucose, 22 mM glucose, or 5.5 mM glucose alternating with 22 mM glucose in the absence or presence of astaxanthin or N-acetyl-L-cysteine (NAC). Constant high glucose increased reactive oxygen species (ROS) generation, but such an effect was more pronounced in fluctuating glucose. This was associated with up-regulated p22phox expression and down-regulated peroxisome proliferator activated receptor- γ coactivator (PGC-1 α) expression. Astaxanthin inhibited ROS generation, p22phox up-regulation, and PGC-1 α down-regulation by the stimuli of glucose fluctuation. Fluctuating glucose, but not constant high glucose, significantly decreased the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation level at Ser-1177 without affecting total eNOS expression, which was prevented by astaxanthin as well as by the anti-oxidant NAC. Transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) showed increased cell apoptosis in fluctuating glucose. Glucose fluctuation also resulted in up-regulating gene expression of pro-inflammatory mediators, interleukin-6 and intercellular adhesion molecule-1. These adverse changes were subdued by astaxanthin. The phosphorylation levels of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 were significantly increased by glucose fluctuations, and astaxanthin significantly inhibited the increase in JNK and p38 phosphorylation. Taken together, our results suggest that astaxanthin can protect vascular endothelial cells against glucose fluctuation by reducing ROS generation.

学位論文審査の要旨

【目的】

糖尿病により心臓血管疾患のリスクが高まることが知られている。血糖値コントロールにより、このリスクは軽減されるが、空腹時低血糖と食後高血糖の繰り返しによる血糖値変動が心臓血管に関わる合併症の重要な要因として注目されるようになった。また不適切なインスリンや抗糖尿病薬の服用により起こる血糖値変化によっても心臓血管疾患リスクが上昇することが報告されており、本リスクの低減化は重要課題である。

アスタキサンチンは甲殻類やサケ、マス、ヒトデといった海洋生物の赤色色素に多く見られる非プロビタミン A 性カロテノイドであり、キサントフィルに分類される。アスタキサンチンは抗酸化作用、抗がん作用、抗炎症作用等のさまざまな生理活性作用を示すことが知られており、近年糖尿病と高血圧の動物モデルにおいてアスタキサンチンが血管内皮障害を軽減するという報告も発表されている。本研究では、血管内皮細胞を対象に恒常的な高血糖よりも生物学的影響が大きいとされる断続的な高血糖環境の影響とアスタキサンチンによる軽減効果を活性酸素種 (ROS) 産生と内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 活性化の観点から検討した。

【材料と方法】

本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を 3 日間の恒常的高グルコース濃度 (22 mM) と断続的高グルコース濃度 (12 時間ごとに培養液のグルコース濃度を 5.5 mM と 22 mM に変動させる) に曝し、細胞内 ROS を DCF (2', 7'-ジクロロフルオレセイン) によって検出した。血管内皮細胞における NADH/NADPH 酸化酵素の一員である p22^{phox}, NADPH 酸化酵素ファミリーの一員である Nox4, ミトコンドリアの ROS スカベンジ酵素である Mn-SOD 等の発現量をイムノブロットで調べるとともに、eNOS の発現量とリン酸化の機序についても検討した。加えて、NOx (NO₂⁻と NO₃⁻) 産生についても調べた。また、TUNEL アッセイによりアポトーシスを定量するとともに、炎症誘発性サイトカインである IL-6 と ICAM-1 の発現量を定量 PCR によって調べた。対照群として通常グルコース濃度 (5.5 mM) 処理群を用いた。

【結果】

細胞内 ROS を測定した結果では、通常グルコース濃度に比べ、高グルコース濃度では有意にその産生が上昇し、断続的高グルコース濃度においては更なる上昇を認めた。そしてその上昇は、0.05 μM-0.5 μM のアスタキサンチンによって濃度依存的に抑制され、代表的な抗酸化剤 N-acetyl-L-cysteine (NAC) によって完全にブロックされた。主要な ROS 産生源

は NADPH であるが、関連分子 p22^{phox} 発現量を調べたところ、断続的高グルコース濃度による有意な上昇と、NAC による有意な抑制が観察された。Nox4 と Mn-SOD 発現量に関しては、グルコース濃度による有意な変化はなかった。また eNOS に関しては、断続的高グルコース濃度によって発現量自体は変化しないが、活性化部位である Ser-1177 部位でのリン酸化は減少した。eNOS 阻害部位である Thr-495 部位のリン酸化はグルコース変動によって変わらなかった。そして eNOS Ser-1177 のリン酸化はアスタキサンチンによって有意に抑制され、NAC によって更なる強い抑制が見られた。それと連動して NOx 産生は断続的高グルコース濃度によって減少し、アスタキサンチンによって有意な回復を認めた。アポトーシス細胞は高グルコース濃度では増加が見られ、断続的高グルコース濃度においては更なる増加が認められた。アスタキサンチンによってその数は減少し、NAC によっては完全に消失した。IL-6 と ICAM-1 の発現量は、高グルコース濃度では増加し、断続的高グルコース濃度において更に増加し、共にアスタキサンチンによって有意に抑制された。

【総括】

ROS は正常な酸素の代謝によって副次的に産生されるが、その過剰産生や除去機能低下が糖尿病を含む多くの疾患と関係していることが知られている。本研究により、正常ヒト血管内皮細胞において恒常的な高グルコース環境が細胞内 ROS の上昇を惹起し、断続的な高グルコース環境により更なる上昇を引き起こされることが明らかになり、断続的高血糖状態が内皮細胞においてより有害であることが示された。その機序として ROS 産生促進には内皮における NADH/NADPH 酸化システムの一つである p22^{phox} が関与しており、更に断続的高グルコース環境は eNOS 活性化部位である Ser-1177 リン酸化の減少、NOx レベルの低下、アポトーシス細胞の増加、IL-6 と ICAM-1 の発現増加を引き起こすことを明らかにした。そしてこれらの指標はアスタキサンチンにより抑制されることを示した。以上の結果より、断続的高グルコース環境が血管内皮細胞に与える有害性と、アスタキサンチンの抗酸化作用による低減効果が明らかになった。

本研究は動物実験による検証が必要であるものの、新規の知見を示し、学術的重要性は高い。また、アスタキサンチンを用いた新たな糖尿病治療戦略も期待され、今後の臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。