

原著 高グルコース負荷はヒト単球系 U937 細胞において 酸化ストレス誘発性アポトーシスの caspase 非依存性経路を促進する

昭和大学医学部第一薬理学教室

大石 修史 辻 まゆみ 長谷川仁美
田鹿 牧子 入江 悠子 小口 勝司

要約：近年，血液透析患者における血球細胞の透析膜接触による酸化ストレスが報告され問題視されている。また，酸化ストレスは血液透析患者の合併症の進行において重要な危険因子であり，特に糖尿病患者の高血糖状態はフリーラジカルを産生し，アポトーシスを誘導すると考えられている。本研究では，糖尿病を合併した血液透析患者の酸化ストレスによるアポトーシスの実験モデルを確立し，その発生経路を解明することを目的とした。ヒト単球系 U937 細胞を高グルコースで培養後，過酸化水素 (H_2O_2) により酸化ストレスを誘発させた。高グルコースで培養した U937 細胞を H_2O_2 24 hr 処置 (0.5 ~ 10 mM)，および抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を 1 時間前処置した。酸化ストレスに対して活性酸素種 (ROS) 生成量を測定し，アポトーシス検出には single strand DNA, AnnexinV 染色, caspase-3 活性を測定，さらにミトコンドリア膜電位差の変化 (MPT), JNK のリン酸化能, glycation を測定した。 H_2O_2 により濃度依存的に ROS 生成増加, MPT 低下, アポトーシス誘発作用がみられたが， H_2O_2 によるこれらの作用は高グルコース負荷によりさらに促進され，抗酸化剤である NAC 前処置にて抑制された。caspase-3 活性は， H_2O_2 負荷では濃度依存的に増加したが，高グルコース負荷によるさらなる増加の助長は認められなかった。以上より，高グルコース負荷で酸化ストレス誘発性アポトーシスは，さらに促進され，本実験モデルの結果から，臨床における血液透析患者の糖尿病合併症は強い酸化ストレスを生じ，アポトーシスを促進していることが裏づけられた。また，高グルコース負荷による酸化ストレス誘発性アポトーシスの経路は，caspase 非依存性である可能性が考えられた。

キーワード：アポトーシス，高グルコース，酸化ストレス，透析，カスパーゼ

近年，血液透析患者において，透析治療により酸化ストレスが惹起されて，それには，血球細胞の透析膜接触，細菌感染，腹膜透析液の生体適合性，残存腎機能低下と体液過剰などの関与が考えられている。また，抗酸化酵素である血中 Cu/Zn-SOD 増加，白血球中 Cu/Zn-SOD mRNA の発現亢進^{1,2)}や，血球細胞の透析膜接触による酸化ストレス改善策として，vitaminE-coated dialyzer 使用^{3,4)}，vitaminC の経口投与⁵⁾の報告がされており，透析治療による酸化ストレスが問題視されている。また，血液透析患者の合併症の進行において，酸化ストレスや糖化最終生成物 (advanced glycation end products : AGEs) が重要な危険因子であること⁶⁾が報告され

ており，特に糖尿病患者の高血糖状態はフリーラジカルを産生し，アポトーシスを誘導する^{7,8)}と考えられている。高血糖はミトコンドリアのスーパーオキシドアニオン生成増加⁹⁾とブドウ糖自動酸化¹⁰⁾の過程で ROS レベルを上昇させる。

ミトコンドリアはストレス傷害細胞のアポトーシス細胞死経路において重要な役割を果たし，ROS のターゲットとさらなる ROS 生成の供給源である。生成された ROS は引き続きミトコンドリアの膜電位 (mitochondrial membrane potential: MPT) による膜透過性移行孔を開き細胞質にチトクローム C を遊離する。チトクローム C は procaspase-9 の活性化と共に apoptosome を形成し caspase-3 を活性

化シアポトーシスを誘導する¹¹⁾。最近、高血糖が生体内でミトコンドリアから細胞質に放出されたチトクローム C と caspase-3 経路の活性化がブドウ糖の高レベルに由来する ROS が引き金となり、高グルコース下でのアポトーシスが caspase 依存性経路で誘発されることが報告された¹²⁾。また、ミトコンドリア内膜に存在しているアポトーシス誘発因子 (apoptosis inducing factor: AIF) がアポトーシス誘発によりミトコンドリアより細胞質に放出し、核にトランスロケーションする経路も認められている¹³⁾。さらに、高グルコース誘発性アポトーシスは、caspase 非依存的であり、ミトコンドリアから核までの AIF トランスロケーションと相関しているという報告もみられている¹⁴⁾。このように高グルコースによるアポトーシスは caspase 依存性または caspase 非依存性経路と様々でありいまだ十分に解明されていない。

本実験において、糖尿病を合併した血液透析患者の酸化ストレス誘発性アポトーシスの実験モデルを *in vitro* で確立するため、血球細胞であるヒト単球系 U937 細胞を使用し、高グルコース環境下で培養し、過酸化水素 (H_2O_2) で酸化ストレスを誘発した。さらに、高グルコース培養下での H_2O_2 誘発性酸化ストレスによるアポトーシスの経路が caspase 依存性か非依存性かを明白にすることとした。

研究方法

1. 研究材料と細胞培養

ヒト単球系 U937 細胞 (EC85011440) は、European Collection of Animal Cell Culture (ECACC, UK) より、NAC (抗酸化剤) および H_2O_2 は、Wako Co. (Osaka, Japan) より、Fetal bovine serum (FBS) は、Sigma-Aldrich Co. (MO, USA) より購入した。また、penicillin G sodium, streptomycin sulfate は、Invitrogen Corp. (CA, USA) より、5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; (CM- H_2 DCF-DA) は、Molecular Probes (Eugene, OR, USA) より購入した。高グルコース負荷のために、U937 細胞は 28.9 mM glucose 含有 RPMI-1640 培養液で 1 日～6 日間培養し、high glucose 群とした。また標準 RPMI-1640 (D-glucose 11.1 mM 含有) 培養液で培養した U937 細胞を normal glucose 群とした。U937 細胞は 10% FBS, penicillin G sodium 100 units/ml,

streptomycin sulfate 100 μ g/ml を含む各培養液で、37°C, 5% CO_2 下で常法に従って培養した。

2. 薬物処置

1 日～5 日間培養した normal glucose 群, high glucose 群の U937 細胞に H_2O_2 (0.5～10 mM) を 24 時間処置した。さらに、抗酸化剤である NAC 10 mM 処置は、 H_2O_2 処置の 1 時間前に処置し、その後 NAC 10 mM + H_2O_2 5 mM を 24 時間処置した。また、以上の操作はすべて無菌条件で行った。

3. アポトーシスの評価

1) single strand DNA (ssDNA) 測定

H_2O_2 (0.5～10 mM), NAC 10 mM, NAC 10 mM + H_2O_2 5 mM を 24 時間処置した normal glucose 群, high glucose 群の U937 細胞を 80% メタノール/PBS で固定後、アポトーシス細胞のみ特異的に変性させる formamide にて DNA を変性させた¹⁵⁾。変性した DNA を ssDNA に対する一次モノクローナル抗体および horseradish peroxidase 標識抗マウス IgM (Chemion International, Inc., CA, USA) にて反応後、2, 2'-azino-bis[3-ethylbenziazoline-6-sulfonic acid] により発色させ、吸光度測定した。Negative control として、S1 nuclease (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) を処置した細胞を用いた。

2) Hoechst33342 および AnnexinV-Cy3 染色

U937 細胞の核形態を観察するために、 H_2O_2 (0.5～10 mM), NAC 10 mM, NAC 10 mM + H_2O_2 5 mM で処置した normal glucose 群, high glucose 群の U937 細胞を Hoechst33342 (Wako Co. Osaka, Japan) で染色した。Hoechst33342 で染色された U937 細胞は、PBS で洗浄後、さらに AnnexinV-Cy3 染色を行った。Apoptosis 誘発の初期段階において細胞は細胞内膜に存在する phosphatidyl-serine (PS) が細胞外膜に転移することが知られている。PS は AnnexinV と親和性が高く、本実験では Cy3 標識 AnnexinV (AnnexinV-Cy3 apoptosis Detection Kit: Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd, Nagoya, Japan) で染色された apoptosis 細胞を Meta Xpress Image Acquisition (Molecular Devices Co. Tokyo, Japan) で分析した。

3) caspase-3 活性の測定

H_2O_2 (0.5～10 mM), NAC 10 mM, NAC 10 mM + H_2O_2 5 mM を処置した normal glucose 群, high glucose 群の U937 細胞の caspase-3 活性は、fluoro-

metric protease assay kit (Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd., Nagoya, Japan) で測定された。Caspase-3 の基質として、DEVD (Asp- Glu- Val- Asp)-7-amino-4-trifluoro methyl coumarin (AFC) を用い、caspase-3 により切断・遊離した AFC は励起波長 400 nm, 測定波長 500 nm における蛍光強度を蛍光プレートリーダー (Berthold Technologies GmbH & Co., KG, Bad Wildbad, Germany) により測定された。

4. 活性酸素種 (ROS) 測定による酸化ストレスの評価

細胞内 ROS 生成の測定には、CM-H₂DCFDA を用いた。CM-H₂DCFDA は、細胞内に取り込まれた後、エステラーゼによって 2', 7'-Dichlorofluoresin に変化し、細胞内 ROS により酸化されて蛍光性の 2', 7'-Dichlorofluorescein を生じる¹⁶⁾。Normal glucose 群および、high glucose 群の U937 細胞に H₂O₂ (0.5 ~ 10 mM), NAC 10 mM, NAC 10 mM + H₂O₂ 5 mM を 30 分, 1 時間処置し、生成された ROS の量を測定した。CM-H₂DCFDA は DMSO (dimethyl sulfoxide) で溶解後、U937 細胞 (3 × 10⁶ cells/ml) に 7 μM CM-H₂DCFDA を負荷し、37℃ 5% CO₂ 下で 15 分間 incubation した。その後、暖めた PBS で洗浄し、励起波長 488 nm, 測定波長 525 nm における蛍光強度を蛍光プレートリーダー (Berthold Technologies GmbH & Co., KG, Bad Wildbad, Germany) により測定した。

5. ミトコンドリア膜電位差 (MPT) の変化の観察

H₂O₂ (0.5 ~ 10 mM), NAC 10 mM, NAC 10 mM + H₂O₂ 5 mM を処置した normal glucose 群, high glucose 群の U937 細胞のミトコンドリア膜電位変化は、脂溶性カチオンプローブである azolcarboxyanine iodide (JC-1) を用い、Mito Capture Apoptosis Detection Kit (Medical & Bio-logical Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan) により行い、励起波長 490 nm, 測定波長 590 nm および、527 nm における蛍光強度を蛍光プレートリーダー (Berthold Technologies GmbH & Co., KG, Bad Wildbad, Germany) で測定し、タンパク質当たりの 590 nm/527 nm の蛍光比を求めた。

6. JNK のリン酸化能の評価

H₂O₂ (0.5~10 mM), NAC 10 mM, NAC 10 mM + H₂O₂ 5 mM を 24 時間処置した normal glucose 群,

high glucose 群の U937 細胞 (3 × 10⁶ cells/well) は、JNK (Thr 183/Tyr185) ELISA kit (Ray Biotech, Inc., USA) にて、anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) と anti-JNK を用い、全 JNK 量当たりのリン酸化した JNK 量を求めた。

7. Glycation の評価

Glycation はアミノ基とカルボニル基の間の非酵素的な化学反応で、この反応で AGEs が生成される。AGEs は、蛋白や脂質、DNA に悪影響を与えるとされている¹⁷⁾。H₂O₂ (0.5 ~ 10 mM), NAC 10 mM, NAC 10 mM + H₂O₂ 5 mM を 24 時間処置した normal glucose 群, high glucose 群の U937 細胞の AGE タンパク質化合物を OxiSelect Advanced Glycation End Product (AGE) ELISA Kit (Cell Biolabs, Inc., CA, USA) にて測定した。

8. 統計処理

実験結果は平均 ± 標準誤差で示した。有意差検定は Dunnetts 検定を用い、p < 0.05 のものを有意とした。

結 果

1. 高グルコース, H₂O₂ によるアポトーシスへの影響

U937 細胞は慢性高血糖状態を模倣するために、6 日間 28.9 mM の glucose 含有培養液で培養された。high glucose 群および normal glucose 群ともに、培養 1 日および 5 日後に 24 時間 H₂O₂ を処置した U937 細胞において、H₂O₂ 濃度依存的に増加した。両群とも特に、5 日間の培養後の細胞において、ssDNA 値は H₂O₂ 無処置細胞に比べ有意な ssDNA の増加が見られた (Fig. 1)。また、10 mM NAC 前処置細胞は 5 mM H₂O₂ 処置細胞に比べ ssDNA 量は有意に抑制された。さらに high glucose 群は normal glucose 群に比べ有意に ssDNA 量の有意な増加が認められ、高グルコース処置、H₂O₂ 処置により、アポトーシス誘発が促進されている事が確認された。

アポトーシス誘発早期の細胞は細胞膜の外膜にホスファチジルセリン (PS) が覆われ、AnnexinV は PS に結合し、生細胞とアポトーシス細胞との区別ができる¹⁸⁾。normal glucose 群の H₂O₂ 無処置群では Hoechst33342 染色にて青色蛍光を示す核のみが観察されたが、high glucose 群では、核の変形と細胞膜に赤色蛍光を示す AnnexinV 染色が見られた

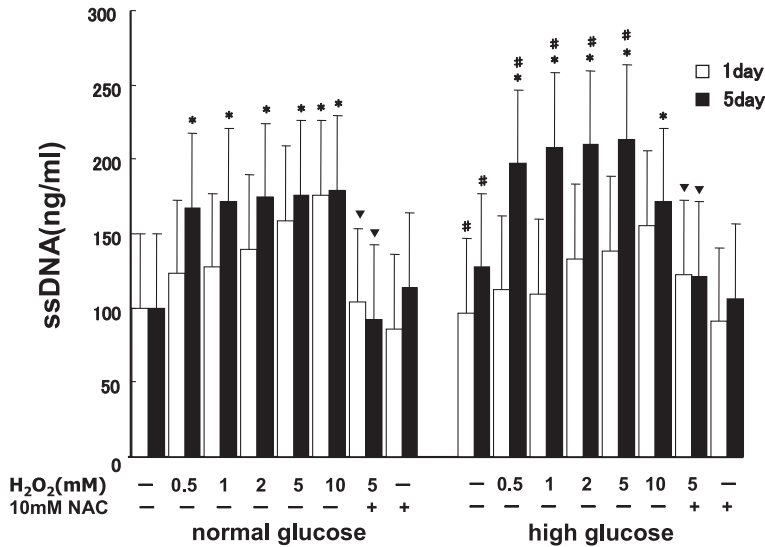


Fig. 1 Effect of high glucose and H₂O₂ on ssDNA in U937 cells. The selective denatured DNA in apoptotic cells by formamide was detected. The ssDNA was stained with the primary antibody to the ssDNA and peroxidase-labeled secondary antibody for color development. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (n = 6 ~ 18). Statistically significant changes are indicated as *p < 0.05 compared with non-treated U937 cells at each time point. #p < 0.05 compared with U937 cells of normal glucose group treated by various doses of H₂O₂. ▼p < 0.05 compared with H₂O₂ 5 mM; Dunnet's post hoc test.

(Fig. 2). また、5 mM H₂O₂ 処置により AnnexinV で染色された細胞が H₂O₂ 無処置細胞に比べ増加し、high glucose 群の H₂O₂ 処置した細胞では、さらに多くの細胞が AnnexinV 染色されており、アポトーシス誘発促進が観察された。

高グルコースと酸化ストレスにより誘発されるアポトーシスが caspase 活性化によって実行されるかどうかを調べるために caspase-3 活性を測定した。Caspase-3 活性は、normal glucose 群および high glucose 群共に、H₂O₂ 無処置細胞に比べ H₂O₂ 濃度依存的に活性上昇を認めたが、10 mM NAC 前処置細胞では caspase-3 活性が 5 mM H₂O₂ 処置細胞に比べ有意に抑制された (Fig. 3)。また、high glucose 群は normal glucose 群に比べ caspase-3 活性上昇が有意に低下しており、高グルコース処置による caspase-3 活性の低下が認められた。caspase-3 は H₂O₂ で活性化されたが、高グルコース負荷でアポトーシス誘発が促進されたことより、高グルコース負荷によるアポトーシス誘発は caspase 非依存的な機構での可能性が考えられた。

2. ROS 生成に対する高グルコース、H₂O₂ の影響

ROS の生成は、H₂O₂ 無処置細胞に比べ、H₂O₂ 処置により濃度依存的な増加が見られたが、10 mM NAC 前処置細胞では、5 mM H₂O₂ 処置細胞に比べ ROS 生成が有意に抑制された (Fig. 4)。さらに、high glucose 群は normal glucose 群に比べ ROS 生成が有意に増加し、長時間の高グルコース環境下における、H₂O₂ 処置による ROS の生成増強が確認された。

3. ミトコンドリア膜電位差 (MPT) に対する、高グルコース、H₂O₂ の影響

アポトーシスシステムにおいては、MPT 減少はアポトーシス経路の因子と考えられている。過剰な ROS 生成は MPT の減少を導き、アポトーシス細胞死を誘発する。MPT は normal glucose 群および high glucose 群共に、H₂O₂ 無処置細胞に比べ H₂O₂ 処置細胞は濃度依存的に低下したが、10 mM NAC 前処置細胞では、5 mM H₂O₂ 処置細胞に比べ、MPT の低下が抑制された (Fig. 5)。さらに high glucose 群は normal glucose 群に比べ MPT が有意

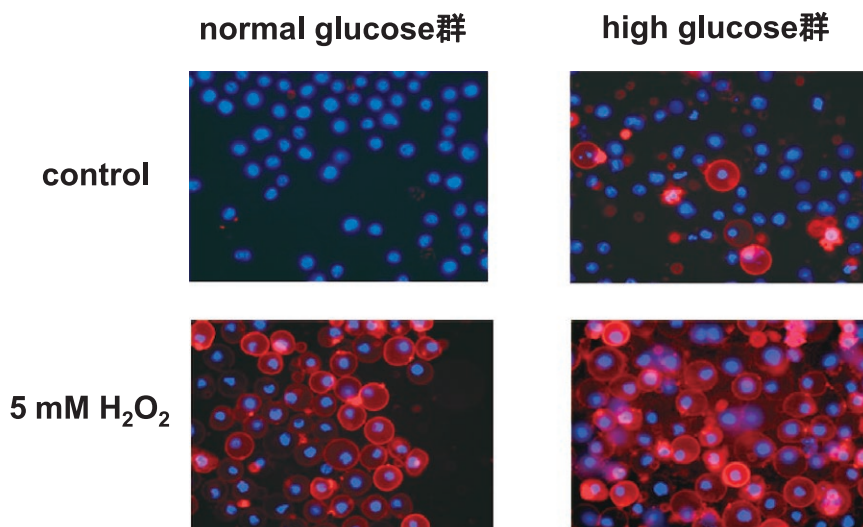


Fig. 2 Effect of high glucose and H₂O₂ on apoptosis in U937 cells. After U937 cells were incubated with normal medium or high glucose medium for 5 days, U937 cells treated for 24 hr with 5 mM H₂O₂ were processed for staining with Hoechst 33342 and AnnexinV and then analyzed by a Meta Xpress Image Acquisition.

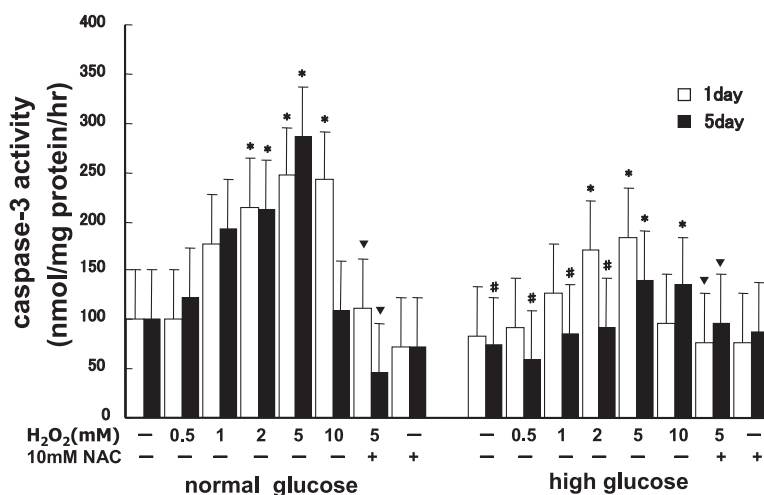


Fig. 3 Effect of high glucose and H₂O₂ on caspase-3 activity in U937 cells. The caspase-3 activity was determined by using the substrate Asp-Glu-Val-Asp-AFC. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three independent experiments (n = 6 ~ 18). Statistically significant changes are indicated as *p < 0.05 compared with non-treated U937 cells at each time point. #p < 0.05 compared with U937 cells of normal glucose group treated by various doses of H₂O₂. ▼p < 0.05 compared with H₂O₂ 5 mM.; Dunnet's post hoc test.

に低下しており、高グルコース環境下における、H₂O₂ 処置によるミトコンドリア障害が確認された。

4. JNK のリン酸化能に対する高グルコース、H₂O₂ の影響

JNK のリン酸化能は、normal glucose 群および high glucose 群共に、H₂O₂ 無処置細胞に比べ H₂O₂ 濃度依存的に増加を認めましたが、10 mM NAC 前処置細胞では、5 mM H₂O₂ 処置細胞に比べ JNK のリン

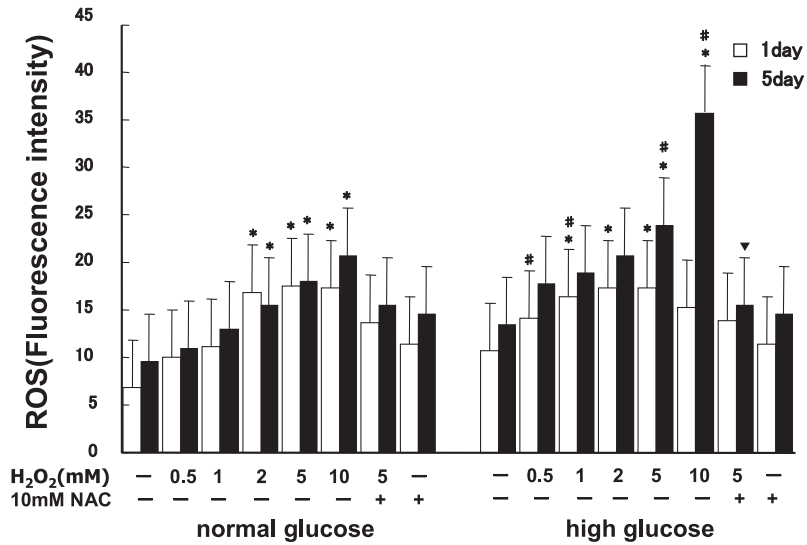


Fig. 4 Effect of high glucose and H₂O₂ on ROS generation in U937 cells. Each value represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments (n = 6 ~ 18). Statistically significant changes are indicated as *p < 0.05 compared with non-treated U937 cells at each time point. #p < 0.05 compared with U937 cells of normal glucose group treated by various doses of H₂O₂. ▽p < 0.05 compared with H₂O₂ 5 mM.; Dunnet's post hoc test.

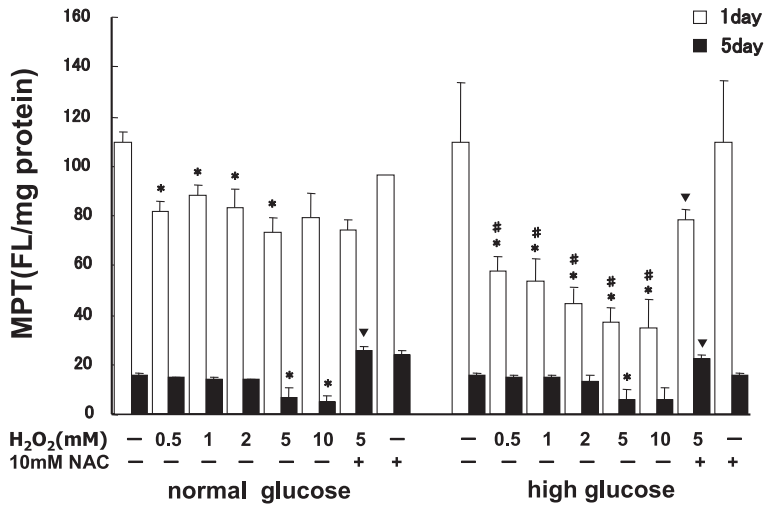


Fig. 5 Effect of high glucose and H₂O₂ on alteration of mitochondrial membrane potential in U937 cells. Each value represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments (n = 6 ~ 18). Statistically significant changes are indicated as *p < 0.05 compared with non-treated U937 cells at each time point. #p < 0.05 compared with U937 cells of normal glucose group treated by various doses of H₂O₂. ▽p < 0.05 compared with H₂O₂ 5 mM.; Dunnet's post hoc test.

酸化能が抑制された (Fig. 6). また, high glucose 群は normal glucose 群より有意な増加を認めず, 高グルコース処置による JNK リン酸化能に対する変化は見られなかった.

5. Glycation に対する高グルコース, H₂O₂ の影響
Glycation は, 高グルコースで, 5日間培養した high glucose 群では, normal glucose 群より glycation が有意に増加していた. また, NAC 前処置に

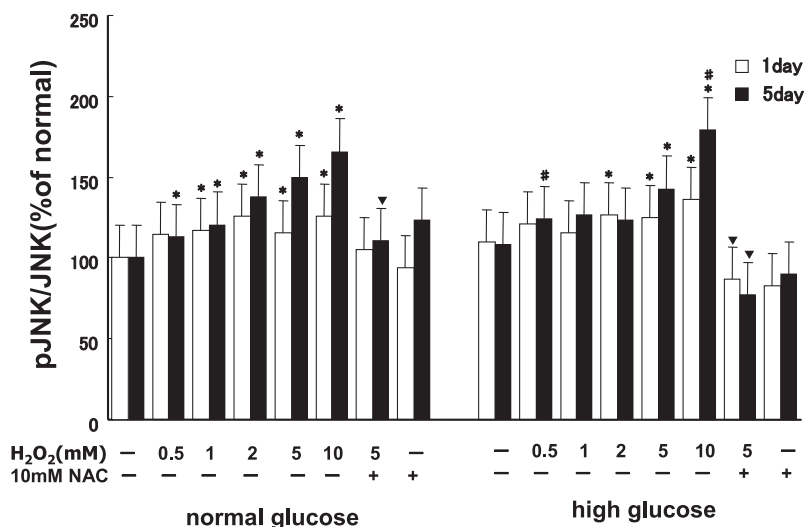


Fig. 6 Effect of high glucose and H₂O₂ on phosphorylation of Jun NH2-terminal kinase (JNK) in U937 cells. Each value represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments (n = 6 ~ 18). Statistically significant changes are indicated as *p < 0.05 compared with non-treated U937 cells at each time point. #p < 0.05 compared with U937 cells of normal glucose group treated by various doses of H₂O₂. ▽p < 0.05 compared with H₂O₂ 5 mM.; Dunnet's post hoc test.

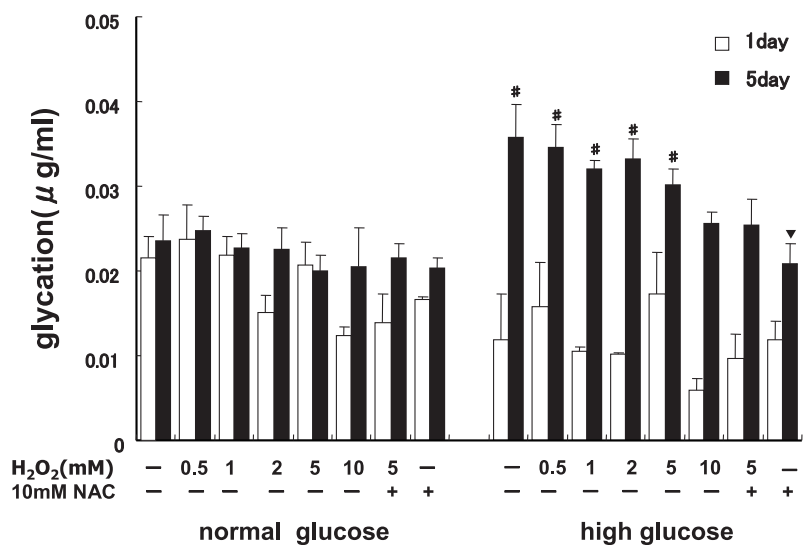


Fig. 7 Effect of high glucose and H₂O₂ on glycation in U937 cells. Each value represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments (n = 6 ~ 18). Statistically significant changes are indicated as #p < 0.05 compared with U937 cells of normal glucose group treated by various doses of H₂O₂. ▽p < 0.05 compared with non-treated U937 cells of high glucose group.; Dunnet's post hoc test.

より glycation の低下が見られた (Fig. 7).

考 察

近年、酸化ストレスは慢性腎不全により惹起され、高血圧、心血管病、神経障害、貧血、腎臓の炎症、線維化、アポトーシスの原因として重要な危険因子とされており、透析治療における酸化ストレスの亢進が問題視されている。血液透析を受けている末期腎疾患患者における体外回路の非生物学的透析膜と血球との接触は、多形核白血球を活性化し、ROSを増加する¹⁹⁾。臨床的には長期血液透析患者で約14倍のROS増加が報告され²⁰⁾、増加したROSが隣接した組織や細胞に損傷を与える²¹⁾。Rajらは血液透析患者のリンパ球において、ROS生成増加とMPT低下によりアポトーシスが誘発されることを報告した²²⁾。本実験で用いたU937細胞においてもH₂O₂処理でROS生成増加、MPT低下、caspase-3活性増加がみられ、アポトーシスが誘発された。MPT低下はミトコンドリアから細胞質にチトクロームCを放出させ、ATP存在下、procaspase-9とApaf-1の結合によりapoptosomeを形成する²³⁾。Apoptosomeの形成はprocaspase-9の開裂を引き起こしcaspase-3を活性化し、polyadenosine diphosphate ribose polymerase (PARP)に作用し、apoptosisを引き起こす²⁴⁾。生理的条件下での細胞においては、ROSレベルは多数の酵素 (superoxide dismutase, カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼなど) によって調整されている。本実験においてNAC前処理が、ROS生成を減少させ、MPTを維持し、NACの抗酸化作用による細胞保護作用が見られ、酸化ストレスがアポトーシス細胞死に大きく関わっていることが認められた。

また、糖尿病による高血糖状態は、フリーラジカルを産生し酸化ストレス誘発性アポトーシスを誘導すると考えられている^{7,8)}。本実験では、糖尿病を合併した血液透析患者の酸化ストレスにより生じるアポトーシスの実験モデルを*in vitro*で確立し、その機序を解明するために血球細胞であるヒト単球系U937細胞を使用し、高グルコース環境下で培養し、H₂O₂で酸化ストレスを誘発した。高グルコース負荷により浸透圧を増加させるが、以前マンニトールを用い30 mM高グルコース処理と同等の浸透圧に調整した実験において、高浸透圧調整をしたマンニ

トール処置では、アポトーシス細胞数には、影響を及ぼさず無処置controlと同程度であり、30 mMグルコース負荷による浸透圧の増加ではアポトーシス細胞死は認められなかった¹⁴⁾。本実験において高グルコース負荷によりH₂O₂によるROS生成増加、MPT低下、アポトーシス誘発作用は明らかに促進された。糖尿病による高血糖状態においてAGEsは、ミトコンドリア細胞膜に存在するNADPHオキシダーゼ活性を介しROS生成を促進し、酸化ストレスを亢進させると報告されている²⁵⁾。本実験においても、高グルコース負荷でAGEs生成を示すglycationの増加が認められた。

しかし、caspase-3活性は、H₂O₂処置では濃度依存的に増加したが、高グルコース負荷によるcaspase-3活性にさらなる増加は認められなかった。この結果は、高グルコース負荷または糖尿病がcaspase依存的にアポトーシスを誘発するという以前の報告^{26,27)}と異なっていた。この矛盾は、異なる*in vitro*モデル、動物種や細胞種によるものかもしれない。しかしながら、網膜内皮細胞を用いた実験において、H₂O₂処理によりcaspase-3活性は増加したが、高グルコース負荷によるcaspase-3活性増加は認められず、高グルコース負荷によるアポトーシス経路は、caspase非依存性経路であり、AIFのミトコンドリアから核へのトランスロケーションの増加を示した報告がある¹⁴⁾。AIFは通常ミトコンドリア内膜に局在しているが、アポトーシス誘発によりミトコンドリア膜間腔で切断され細胞質に放出され、その後、核にトランスロケーションする。AIFを介するアポトーシスには炎症性や虚血-再灌流後に誘発されることが知られている²⁸⁾。本実験においても高グルコース下での酸化ストレス誘発性アポトーシスはAIFを介したcaspase非依存性経路に関わっている可能性が考えられた。またグルコースはタンパク質と非酵素的に反応し、一部がAmadori転位により安定なケトアミンであるAmadori産物を生成する。前期糖化産物はさらに酸化的開裂や架橋形成反応によりAGEsを生成し、タンパク質機能が失われる²⁹⁾。本実験における長期間の高グルコース負荷ではglycationが増加していたことより、caspase活性が低下した可能性が考えられた。高グルコース負荷によるアポトーシス経路に関して、細胞で高グルコース負荷によりc-Jun NH₂-terminal

kinase (JNK) が⁸, caspase-3 活性を増加することが報告された³⁰⁾。しかし, 本実験では JNK のリン酸化能は, 酸化ストレスにより増加が認められたが, 高グルコース負荷による JNK のリン酸化能のさらなる増加は認められなかった。H₂O₂ のみの処置に比べ高グルコース負荷では, caspase-3 活性のさらなる増加が認められなかったことより, JNK による caspase-3 活性増加を誘発する経路は確認できなかった。この矛盾は細胞種によるものか不明のままである。

以上の結果より, 高グルコース負荷で酸化ストレス誘発性アポトーシスは, さらに促進され, 本モデルで血液透析患者の糖尿病合併症は強い酸化ストレスを生じ, アポトーシス誘発を助長していることが裏付けられた。さらに, 高グルコース負荷による酸化ストレス誘発性アポトーシスは ROS 生成増加によるミトコンドリア障害は認められたが, それ以降の経路に関しては caspase 非依存性の経路である可能性が考えられた。

文 献

- 1) Pawlak K, Pawlak D and Mysliwiec M: Cu/Zn superoxide dismutase plasma levels as a new useful clinical biomarker of oxidative stress in patients with end-stage renal disease. *Clin Biochem* 38 : 700-705, 2005.
- 2) Akiyama S, Inagaki M, Tsuji M, *et al*: mRNA study on Cu/Zn superoxide dismutase induction by hemodialysis treatment. *Nephron Clin Pract* 99 : c107-c114, 2005.
- 3) Satoh M, Yamasaki Y, Nagake Y, *et al*: Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int* 59 : 1943-1950, 2001.
- 4) Akiyama S, Inagaki M, Tsuji M, *et al*: Comparison of effect of vitamin E-coated dialyzer and oral vitamin E on hemodialysis-induced Cu/Zn-superoxide dismutase. *Am J Nephrol* 25 : 500-506, 2005.
- 5) Washio K, Inagaki M, Tsuji M, *et al*: Oral vitamin C supplementation in hemodialysis patients and its effect on the plasma level of oxidized ascorbic acid and Cu/Zn superoxide dismutase, an oxidative stress marker. *Nephron Clin Pract* 109 : c49-c54, 2008.
- 6) Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, *et al*: Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 70 : 218-224, 2006.
- 7) Min C, Kang E, Yu SH, *et al*: Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 46 : 197-202, 1999.
- 8) Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, *et al*: Role of AGEs in diabetic nephropathy. *Curr Pharm Des* 14 : 946-952, 2008.
- 9) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, *et al*: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404 : 787-790, 2000.
- 10) 荒木 厚: 糖尿病と酸化ストレス ジカルボニル化合物とフリーラジカルを中心に, 日老医誌 34 : 716-720, 1997.
- 11) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al*: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 : 479-489, 1997.
- 12) Cai L, Li W, Wang G, *et al*: Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 51 : 1938-1948, 2002.
- 13) Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, *et al*: Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J* 24 : 1375-1386, 2005.
- 14) Leal EC, Aveleria CA, Castilho AF, *et al*: High glucose and oxidative/nitrosative stress conditions induce apoptosis in retinal endothelial cells by a caspase-independent pathway. *Exp Eye Res* 88 : 983-991, 2009.
- 15) Frankfurt OS and Krishan A: Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 49 : 369-378, 2001.
- 16) Afzal M, Matsugo S, Sasai M, *et al*: Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 304 : 619-624, 2003.
- 17) Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR, *et al*: Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reaction. Mechanism of action of pyridoxamine. *J Biol Chem* 275 : 21177-21184, 2000.
- 18) Vermes I, Haanen C and Reutelingsperger C: Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 243 : 167-190, 2000.
- 19) Sela S, Shurtz-Swirski R, Shapiro G, *et al*: Oxidative stress during hemodialysis: effect of heparin. *Kidney Int* 78 : 159-163, 2001.
- 20) Yang CC, Hsu SP, Wu MS, *et al*: Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane

- on hemodialysis-induced oxidative stress. *Kidney Int* **69** : 706-714, 2006.
- 21) Chien CT, Chang WT, Chen HW, *et al*: Ascorbate supplement reduces oxidative stress in dyslipidemic patients undergoing apheresis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24** : 1111-1117, 2004.
- 22) Raj DSC, Boivin MA, Dominic EA, *et al*: Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Eur J Clin Invest* **37** : 971-977, 2007.
- 23) Zou H, Li Y, Liu X, *et al*: An APAF-1, cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274** : 11549-11556, 1999.
- 24) Khan N, Afaq F and Mukhtar H: Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* **28** : 233-239, 2007.
- 25) Ge QM, Dong Y and Su Q: Effects of glucose and advanced glycation end products on oxidative stress in MIN6 cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **56**(suppl) : OL1231-OL1238, 2010.
- 26) Busik JV, Mohr S and Grant MB: Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* **57** : 1952-1965, 2008.
- 27) Mohr S, Xi X, Tang J, *et al*: Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients. *Diabetes* **51** : 1172-1179, 2002.
- 28) Zhang W, Shokeen M, Li D, *et al*: Identification of apoptosis-inducing factor in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301** : 147-151, 2003.
- 29) Bousova I, Bakala H, Chudacek R, *et al*: Glycation-induced inactivation of aspartate aminotransferase, effect of uric acid. *Mol Cell Biochem* **278** : 85-92, 2005.
- 30) Chan WH: Effect of resveratrol on high glucose-induced stress in human leukemia K562 cells. *J Cell Biochem* **94** : 1267-1279, 2005.

HIGH GLUCOSE PROMOTES OXIDATIVE STRESS-INDUCED
APOPTOSIS VIA A CASPASE- INDEPENDENT PATHWAY
IN HUMAN MONOCYTIC U937 CELLS

Shuji OISHI, Mayumi TSUJI, Hitomi HASEGAWA,
Makiko TAJIKA, Yuko IRIE and Katsuji OGUCHI

Department of Pharmacology, Showa University School of Medicine

Abstract — Recently, oxidative stress caused by direct contact of blood with dialyzer membrane surfaces in hemodialysis patients has been reported. It is well known that oxidative stress serves as an important risk factor for the development and progression of several complications in hemodialysis patients. In particular, patients with diabetes mellitus are associated with increased oxidative stress. High blood glucose may generate free radicals to induce apoptosis in cells. The purpose of this study was to elucidate the mechanisms of cell apoptosis induced by high glucose and hydrogen peroxide (H_2O_2). To induce oxidative stress, human monocytic (U937) cells were exposed to high glucose for 2 or 6 days; H_2O_2 was added to the cells on the last day. Exposure of U937 cells to H_2O_2 resulted in a significant increase in cellular apoptosis and the generation of ROS, and a decrease in mitochondrial membrane potential. Under high glucose conditions, treatment with H_2O_2 significantly promoted these actions; however, pretreatment with antioxidant agent N-acetyl-cysteine (NAC) in H_2O_2 -induced apoptotic cells significantly suppressed the induction of apoptosis and oxidative stress. After incubation with H_2O_2 or high glucose and H_2O_2 , caspase-3 activity also significantly increased in U937 cells; however, pretreatment with NAC significantly reduced the increases, as compared with H_2O_2 or high glucose and H_2O_2 . Treatment with high glucose and H_2O_2 did not promote caspase-3 activity, compared with treatment with H_2O_2 alone. In conclusion, these results showing that high glucose promoted and amplified apoptosis by oxidative stress in this model demonstrated that patients with diabetes mellitus undergoing hemodialysis treatment accelerate apoptosis induction. Oxidative stress by high glucose may induce the caspase-independent apoptotic pathway.

Key words: apoptosis, high glucose, oxidative stress, hemodialysis, caspase

[受付：5月31日，受理：6月24日，2010]