



高グルコース濃度下培養マウスメサングウム細胞におけるフィブロネクチン産生亢進に対するアルデヒド還元酵素過剰発現の効果

上山, 茂充

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 63(3/4):9-16

(Issue Date)

2003-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317270>



高グルコース濃度下培養マウスメサングウム細胞における フィブロネクチン産生亢進に対する アルデヒド還元酵素過剰発現の効果

上山 茂 充

神戸大学大学院医学系研究科 応用分子医学講座
糖尿病代謝・消化器・腎臓内科学

(指導：春日 雅人教授)

連絡先：上山 茂充

神戸大学大学院医学系研究科 応用分子医学講座
糖尿病代謝・消化器・腎臓内科学

Tel : (078)382-5861 Fax : (078)382-2080

(平成14年12月27日受付)

要 約

糖尿病性腎症に特徴的な組織像は、糸球体における細胞外基質 (ECM) の蓄積である。糸球体メサングウム細胞を高濃度グルコース下で培養すると、ECM 産生が亢進するが、その機序には不明な点が多い。一方、糖尿病では、蛋白質糖化反応およびポリオール代謝を介して、高反応性ジカルボニル化合物である 3-デオキシグルコソン (3-DG) の生成が亢進し、いわゆるカルボニルストレスの一因として合併症進展に関与している可能性が有る。生体内には、この 3-DG を非活性物質に代謝する防御機構が存在し、中でもアルデヒド還元酵素 (ALR) の重要性が指摘されている。今回、高濃度グルコース条件下の培養マウスメサングウム細胞 (MMC) におけるフィブロネクチン (FN) 産生亢進機序への 3-DG の関与を評価する目的で、ラット ALR cDNA 組換えアデノウィルスベクターを用いて ALR を過剰発現させた MMC を作製し、その FN 産生能の変化を検討した。高濃度グルコース下 (25 mM) で培養した MMC は、正常濃度グルコース下 (5.5mM) の場合に比較して FN 産生が亢進したが、ALR 過剰発現によって 31%抑制され、ほぼ正常濃度グルコース下レベルの FN 量となった。この結果は、糖尿病性腎症でみられる糸球体内 ECM 蓄積に 3-DG によるカルボニルストレスが関与している可能性を示唆しており、今後の腎症治療を考えていく上で有用な知見と思われた。

緒 言

糖尿病性腎症は本邦において、1998年以降透析新規導入の原因疾患第一位となっており、糖尿病患者の予後及び QOL に最も大きく関与する合併症のひとつである。大規模臨床研究によって、厳格な血糖管理が腎症の発症進展を阻止し得ることが示されており¹⁻³⁾、腎症の成因に、持続する高血糖の関与が示唆されるが、その詳細な機序には不明な点が多い。

高血糖による腎症の発症進展の機序として、グリケーションやポリオール代謝の亢進の関与が注目されている⁴⁻⁸⁾。グリケーションは、グルコースなどの還元糖が生体内の蛋白質と非酵素的に反応し 3-デオキシグルコソン (3-DG) やメチルグリリオキサールのような高反応性の中間体の形成を経て、種々の糖化反応終末産物 (AGEs) の形成に至る反応の総称である。一方、ポリオール代謝は、グルコースからソルビトール、そしてフルクトースの形成に至る二段階の反応で、糖尿病ではこの代謝が亢進している。最終産物のフルクトースはグルコースよりも蛋白質を糖化する力価が高いことが知られており⁹⁾、この経路を介しても 3-DG が形成することが指摘されている¹⁰⁾。従って、3-DG は、グルコースからグリケーションとポリオール代謝の両者を介して形成され得ることとなり、高血糖由来代謝異常による腎症の発症進展を考える上で重要な物質といえる。実際に、糖尿病ラットにおいて血漿中の 3-DG 濃度が増加し、それとともに 3-DG 由来 AGE である pyrraline の血漿濃度も上昇していることが証明され

キーワード：糖尿病性腎症、3-デオキシグルコソン、フィブロネクチン、アルデヒド還元酵素、メサングウム細胞、グリケーション

ている¹¹⁾。ヒトにおいても糖尿病患者において血清3-DG 濃度が上昇していることや¹²⁾、3-DG 由来の AGEs (pyrraline¹³⁾およびイミダゾロン化合物¹⁴⁾が糖尿病患者の腎病変部に蓄積していることが示され、3-DG の糖尿病腎症の発症進展への関与が示唆される。近年、3-DG やメチルグリオキサールのような反応性の高いジカルボニル化合物は、AGEs の前駆体としてだけでなく、それ自体が細胞機能に影響を与える可能性が指摘され、糖尿病で惹起されるいわゆるカルボニルストレスの一因とされるようになってきた。これに関連して、Suzuki らは、PC12細胞株に対して3-DG がアポトーシスを誘導することを報告している¹⁵⁾。最近、腎糸球体構成細胞であるメサングウム細胞においても、メチルグリオキサールによってアポトーシスが誘導されることが確認され、腎症進展にもカルボニルストレスが関与している可能性が示唆される。生体内には、このカルボニルストレスに対する防御機構が存在し、3-DG を活性の低い3-デオキシフルクトースに代謝する酵素であるアルデヒド還元酵素 (ALR) もその一つである¹⁶⁾。

一方、糖尿病性腎症に特異的な組織像は、びまん性および結節性 (Kimmelstiel-Wilson 結節) の糸球体硬化症である^{17, 18)}。これは、高血糖に曝された腎糸球体のメサングウム領域に次第に細胞外基質 (フィブロネクチン、IV型コラーゲン等) の蓄積が進行して糸球体構造の異常改築をきたし、このため糸球体機能の遂行が妨げられて次第に機能廃絶に向かう病態である¹⁹⁾。培養メサングウム細胞を使用した *in vitro* 実験系でも高濃度グルコースによりフィブロネクチンの産生が増加することが報告されているが^{20, 21)}、そのメカニズムの詳細は不明である。本研究では、この培養メサングウム細胞のフィブロネクチン産生亢進の成因に、3-DG のようなグルコース由来の高反応性ジカルボニル化合物が関与していないかを解明する目的で、3-DG を非活性化する ALR を過剰発現させたマウス由来メサングウム細胞を作製して、そのフィブロネクチン産生に及ぼす影響を検討した。

方 法

1. 使用細胞

C57BL/6マウス (CLEA Japan, Inc., Osaka, Japan) より、既報告の Sieve 法^{22, 23)}にて単離した腎糸球体からメサングウム細胞を初代培養し、グルコース濃度 1 g/l の Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO BRL, Rockville, MD) に 17% Fetal calf serum (FCS, JRH Biosciences CSL Company,

Lenexa, KS) を加えて継代し、第 6 から第 8 継代目で以下の実験に使用した。すべての培養液にペントシリン (100 μ /ml) とストレプトマイシン (100 μ g/ml) を添加した。

2. マウスメサングウム細胞培養条件

6cm dish で confluent に達した培養マウスメサングウム細胞に 5.5mM および 25mM グルコース濃度の DMEM (1% FCS 含) 1.5ml 加えて培養した。培養開始後 48 時間まで、定期的に培養液を採取し、そのフィブロネクチン含量をイムノブロット法で解析した。

3. ALR 蛋白の過剰発現

ラット ALR の cDNA を、既知の塩基配列を参考にしてラット腎 cDNA ライブラリーを鋳型に PCR 法にて作製し、その上流に CAG プロモーター (サイトメガロウイルスエンハンサー、チキンベータアクチンプロモーター) を付した組換えアデノウィルスベクター (Adex ALR) を Adenovirus Expression Kit (TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan) を使用して作製した。ウィルス力価を測定した精製ウィルスを細胞培養液中に添加して感染させ、ALR が過剰発現する 24 時間後から、上記と同様に 5.5mM および 25mM グルコース濃度の各培養液で刺激を開始し 6~48 時間後の培養上清中フィブロネクチン含量をイムノブロット法で解析した。その際、ウィルス自身による細胞毒性を除外するために、ウィルス感染以後の細胞形態および細胞数を観察して細胞毒性の生じないウィルス量を決定した。また、実際に、ALR 蛋白が過剰発現しているかどうかを抗ラット ALR ウサギポリクローナル抗体 (大阪大学、谷口直之先生より供与) を用いてイムノブロット法で確認した。さらに対照実験として、 β -ガラクトシダーゼ蛋白をコードした以外は同構造のアデノウィルス (Adex β -gal) を等力価のウィルス量で使用した。

4. 培養上清中フィブロネクチン蛋白質量の解析 (イムノブロット法)

上記の各実験で採取した 6 μ l の培養上清に、SDS サンプルバッファー (62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 50mM DTT, 0.1% bromophenol blue, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin) 4 μ l 加え、6% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ニトロセルロースメンブレン (ADVANTEC, Toyo Roshi kaisha, Ltd.) にトランスファーした後、抗ラットフィブロネクチンヤギポリクローナル抗体 (Calbiochem-

Novabiochem Corporation, San Diego, CA)($\times 2,500$)を一次抗体として、抗ヤギ IgG HRP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)($\times 2,000$)を二次抗体としてイムノブロットを行った。フィブロネクチンのバンドは、ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) を使用して可視化し、その強度を NIH Image Version 1.56 を使用して定量化した。

結 果

1. 培養メサングウム細胞由来フィブロネクチン蛋白量に及ぼすグルコース濃度の影響

培養メサングウム細胞によるフィブロネクチン蛋白の分泌は正常濃度グルコース (5.5mM) 及び高濃度グルコース (25mM) の両条件下とも30分後には認められ、その蛋白含量は48時間後まで時間依存性に増加した。培養開始後6時間以降では高濃度グルコース条件下で培養したメサングウム細胞の培養上清中フィブロネクチン含量は正常濃度グルコース下培養の場合に比較して増加しており、48時間後には24%増加となった (Figure 1)。

2. ALR 蛋白の過剰発現

予備実験で、Adex ALR を培養メサングウム細胞に感染させて、形態学的に細胞毒性の生じないウィルス量を決定し実験に用いた。この際、Adex ALR 添加後24時間のメサングウム細胞における ALR 蛋白の発現は、ウィルスを添加しなかったメサングウム細胞に比較して約24倍に増加していることが確認された (Figure 2)。また、アデノウィルス感染後の培養上清中のフィブロネクチン蛋白量の時間経過を解析した結果、いずれのグルコース濃度においても時間依存性にフィブロネクチン蛋白量は増加していた (Figure 3)。これは、実験期間中は、ウィルス感染によっても、メサングウム細胞の細胞外基質蛋白の合成分泌機能が障害されずに維持されていることを示している。

3. メサングウム細胞由来フィブロネクチン蛋白量に及ぼす ALR 蛋白過剰発現の影響

Adex ALR 感染培養メサングウム細胞では、正常濃度グルコース及び高濃度グルコースのいずれの条件下でインキュベーションした場合でも、48時間後の培養上清中フィブロネクチン蛋白量は、アデノウィルス非感染のメサングウム細胞に比較して減少していた (Figure 4A)。特に、高濃度グルコース条件下でのフィ

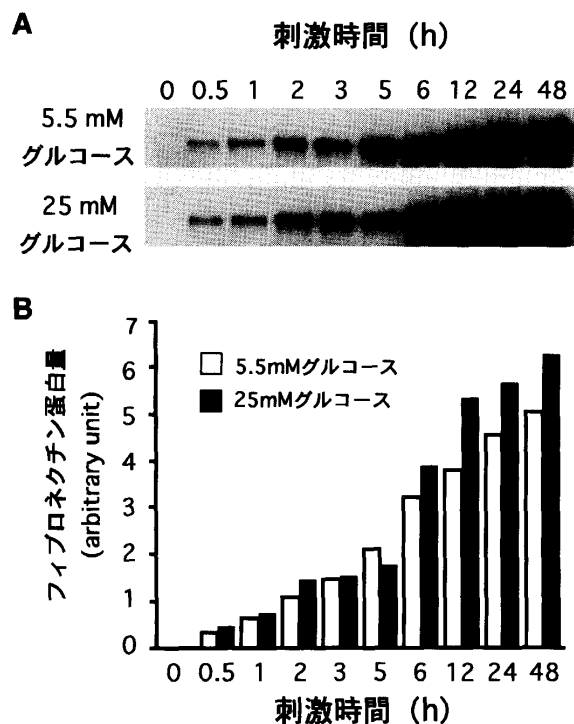


Figure 1. 高濃度グルコース条件による培養マウスメサングウム細胞上清中FN蛋白量の増加

- (A) 培養マウスメサングウム細胞を正常濃度グルコース (5.5mM) 及び高濃度グルコース (25mM) の条件下で培養し、48時間後まで定期的に培養液を採取し、フィブロネクチン (FN) 蛋白含量をイムノブロット法で解析した。両条件下とも、30分後より時間依存性に FN 蛋白の分泌が認められた。また、培養開始後6時間以降では、正常濃度グルコース条件下に比較して、高濃度グルコース条件下で FN 蛋白質の増加がみられた。
- (B) NIH Image Version 1.56 を使用して FN のバンドを定量化したところ、高濃度グルコース条件下での培養上清中 FN 含量は正常濃度グルコース条件下に比較して、6時間後で約22%、48時間後では約24%の増加であった。

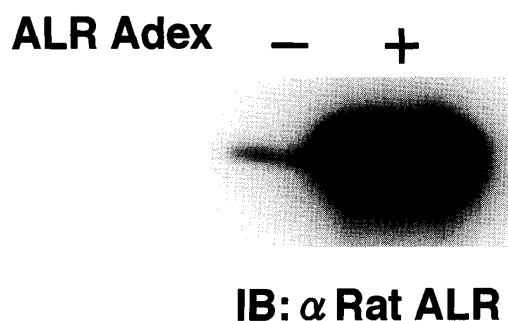


Figure 2. Adex ALR による ALR 蛋白の過剰発現

培養マウスメサングウム細胞に、細胞毒性を生じないウィルス量の Adex ALR を添加した際の ALR 蛋白発現量を抗ラット ALR 抗体を用いてイムノブロット法で解析した。ウィルス非添加の培養マウスメサングウム細胞と比較して、ウィルス非添加の培養マウスメサングウム細胞と比較して、約24倍の ALR 蛋白の過剰発現が確認された。

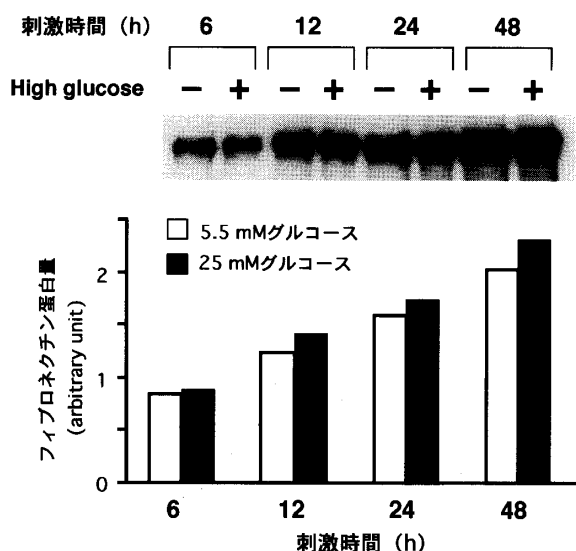


Figure 3. メサンギウム細胞のFN産生機能に及ぼすAdex ALR感染の影響

Adex ALRを添加した培養マウスメサンギウム細胞において培養上清中のFN蛋白量の時間的変化をイムノブロット法で解析した。正常濃度グルコースおよび高濃度グルコースのいずれの条件でも、FN蛋白量は時間依存性に増加しており、インキュベーション期間中のメサンギウム細胞の細胞外基質蛋白合成分泌機能は障害されず保持されていたと考えられる。定量化にはNIH Image Version 1.56を使用した。

ブロンネクチン蛋白量増加は、Adex ALR感染によるALR蛋白の過剰発現によって著明に抑制され、ウィルス非感染の場合に比較して31%減少していた(Figure 4B)。一方、対照用のAdex β -galを感染させた場合には、この抑制効果は認められなかった。

考 察

今回、マウスのメサンギウム細胞において、高濃度グルコース条件下で培養すると、刺激開始後6時間以後の培養上清中のフィブロネクチン蛋白量は、正常濃度グルコース条件下の場合と比較して増加していることが確認された。これまで、ラットのメサンギウム細胞を使用した類似実験の報告が有るが、高濃度グルコースの影響がみられるのは刺激後24時間²⁰⁾から2週間²¹⁾であることが多く、本研究の結果に比較して緩徐である傾向がみられる。これが種差によるものなのか、検出方法の相違によるものかはさらに検討を要する。後者については、多くの既報告がELISA法を用いているに対して、本研究ではイムノブロット法を用いており、さらに、検体処理過程を簡素化することによって処理中の蛋白分解の可能性を回避したことが奏効した

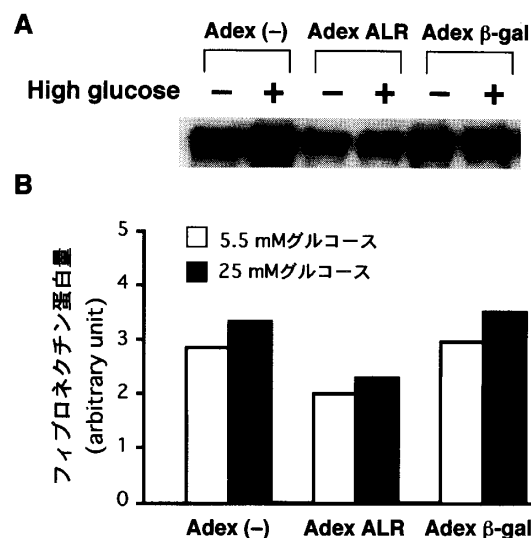


Figure 4. 培養メサンギウム細胞由来FN蛋白量に及ぼすALR蛋白過剰発現の影響

- (A) アデノウィルス添加なし、Adex ALR添加、Adex β -gal添加の各培養マウスメサンギウム細胞において、正常グルコース条件下および高グルコース条件下で48時間インキュベーションし、培養上清中のFN蛋白量をイムノブロット法で解析した。Adex ALR添加細胞ではアデノウィルス非感染細胞に比較して、培養上清中FN蛋白量は抑制された。特に、アデノウィルス非感染の細胞でみられた高濃度グルコース条件下でのFN蛋白量の増加はALR蛋白の過剰発現によって抑制された。
- (B) 48時間刺激時のFN由来バンドをNIH Image Version 1.56を使用して定量化したところ、アデノウィルス非感染細胞の高グルコース条件下の場合のFN蛋白量に比較して、Adex ALR感染細胞では、同条件下でのFN蛋白量は31%減少していた。一方、対照として用いたAdex β -galを感染させた細胞では、この抑制効果はみられなかった。

のかもしれない。さらに、この高濃度グルコース条件によるメサンギウム細胞の培養上清中フィブロネクチン蛋白量の増加がアデノウィルスを用いたALR蛋白の過剰発現によって、抑制されることが示されたことから、その機序にALRの基質である3-DGが関与していることが示唆される。

糖尿病性腎症の病態の進展において、糸球体におけるフィブロネクチンなどの細胞外基質(ECM)蛋白の蓄積は重要な役割をしている。その機序としては、高血糖や糸球体内血行動態異常(糸球体内高血圧)に伴い、メサンギウム細胞においてPKC β 活性化^{24, 25)}や酸化ストレス²⁶⁾を介したTGF- β 1活性化によるECM蛋白の産生亢進などが提唱されている。糖化反応との関連では以下のような機序が考えられる。1. 高血糖

下で形成亢進した AGEs によるメサングウム細胞における TGF- β 1 の遺伝子発現の誘導²⁷⁾, 2. ECM 蛋白そのものが AGEs によって修飾されて蛋白分子間の架橋を形成し, matrix metalloproteinase (MMP) superfamily のようなプロテアーゼによる分解に抵抗を示すこと²⁸⁾, 3. プロテアーゼ自身が AGE 修飾されることにより, その蛋白質分解活性が低下する可能性。これらのいずれの機序においても 3-DG は, AGEs の前駆体として重要な役割をすることが考えられる。実際に, 糖尿病性腎症の病変部に 3-DG 由来の AGEs である pyrraline¹³⁾ やイミダゾロン化合物¹⁴⁾ の蓄積が証明されていることから, 局所において 3-DG による反応が糖尿病で亢進していることが示唆される。また, ALR 自身も生体内で糖化修飾を受け, その活性が低下することが報告されている²⁹⁾, つまり, 糖尿病状態では, グルコースあるいは, それから生成した 3-DG によって ALR が糖化修飾され, その 3-DG に対する処理能力が低下することによって, さらに生体内の 3-DG 量が増加するという悪循環を形成する。また, 最近, 3-DG のようなジカルボニル化合物が AGEs 形成を介さないで, 直接, 細胞機能に影響を与える可能性が指摘され, 糖尿病で惹起されるカルボニルストレスの一因とされている。例えば Akhand ら³⁰⁾ は, 3-DG と同様にジカルボニル基を有するメチルグリリオキサールが内皮細胞に対して MAP キナーゼファミリーを活性化することを報告している。MAP キナーゼファミリーが TGF- β 1 活性制御に関与していることが示唆されている³¹⁾ ことを考慮すると, 糖尿病では, 3-DG を含めたジカルボニル化合物によって惹起されるカルボニルストレスが, MAP キナーゼファミリーの細胞内シグナル伝達を介して TGF- β 1 を活性化する可能性も考えられる。今後, このような 3-DG による ECM 産生機序の詳細を解明していくことが重要な課題と思われる。

今回, 糖尿病で生成亢進しているジカルボニル化合物である 3-DG の代謝酵素 ALR を過剰発現したメサングウム細胞において, 高濃度グルコースによるフィブロネクチン産生の抑制が認められたことは, 糖尿病性腎症の特徴的組織変化である糸球体内 ECM 産生亢進にカルボニルストレスが関与していることを示唆している。また, この知見は, 今後の腎症治療のターゲットを考えていく上で重要な情報となることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御高閲を賜りました

春日 雅人教授に深謝致します。また, この研究に際して御協力, 御指導頂きました宮田 哲先生に謝意を表します。

文 献

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329: 977-986, 1993.
2. Ohkubo, Y., Kishikawa, H., Araki, E., Miyata, T., Isami, S., Motoyoshi, S., Kojima, Y., Furuyoshi, N., Shichiri, M.: Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res. Pract.* 28:103-117, 1995.
3. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group.: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 352:837-853, 1998.
4. Brownlee, M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414:813-820, 2001.
5. 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.
6. Yang, C.W., Vlassara, H., Peten, E.P., He, C.J., Striker, G.E., Striker, L.J.: Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 9436-9440, 1994.
7. Shah, V.O., Dorin, R.I., Sun, Y., Braun, M., Zager, P.G.: Aldose reductase gene expression is increased in diabetic nephropathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:2294-2298, 1997.
8. Kasajima H., Yamagishi, S., Sugai, S., Yagihashi, N., Yagihashi, S.: Enhanced in situ expression of aldose reductase in

- peripheral nerve and renal glomeruli in diabetic patients. *Virchows Arch.* 439:46-54, 2001.
9. Dills, W.L., Jr.: Protein fructosylation : fructose and the Maillard reaction. *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (5 Suppl): 779-787, 1993.
 10. Shin, D.B., Hayase, F., Polymerization of proteins caused by reaction with sugars and the formation of 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Agric. Biol. Chem.* 52:1451-1458, 1988.
 11. Yamada, H., Miyata, S., Igaki, N., Yatabe, H., Miyauchi, Y., Ohara, T., Sakai, M., Shoda, H., Oimomi, M., Kasuga, M.: Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific in vivo determination of intermediate in advanced Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* 269:20275-20280, 1994.
 12. Hamada, Y., Nakamura, J., Fujisawa, H., Yago, H., Nakashima, E., Koh, N., Hotta, N.: Effects of glycemic control on plasma 3-deoxyglucosone levels in NIDDM patients *Diabetes Care* 20:1466-1469, 1997.
 13. Miyata, S., Monaier, V.: Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J. Clin. Invest.* 89: 1102-1112, 1992.
 14. Niwa, T., Katsuzaki, T., Miyazaki, S., Miyazaki, T., Ishizaki, Y., Hayase, F., Tatemichi, N., Takei, Y.: Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *J. Clin. Invest.* 99:1272-1280, 1997.
 15. Suzuki, K., Koh, Y.H., Mizuno, H., Hamaoka, R., Taniguchi, N.: Overexpression of aldehyde reductase protects PC12 cells from the cytotoxicity of methylglyoxal or 3-deoxyglucosone. *J. Biochem.* 123:353-357, 1998.
 16. Kanazu, T., Shinoda, M., Nakayama, T., Deyashiki, Y., Hara, A., Sawada, H.: Aldehyde reductase is a major protein associated with 3-deoxyglucosone reductase activity in rat, pig and human livers. *Biochem. J.* 279 (Pt3): 903-906, 1991.
 17. Kimmelastiel, P., Wilson, C.: Intercapillary lesions is glomeruli of kidney. *Am. J. Pathol* 12:83-89, 1936.
 18. Osterby, R., Parving, H.H., Hommel, E.: Glomerular structure and function in diabetic nephropathy. Early to advanced stages, *Diabetes* 39:1057-1063, 1990.
 19. Wolf, G., Ziyadeh, F.N.: Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 56:393-405, 1999.
 20. Lin, S., Sahai, A., Chugh, S.S., Pan, X., Wallner, E.I., Danesh, F.R., Lomasney, J.W., Kanwar, Y.S.: High glucose stimulates synthesis of fibronectin via a novel protein kinase C. Rap1b, and B-Raf signaling pathway *J. Biol. Chem.* 277:41725-41735, 2002.
 21. Studer, R.K., Craven, P.A., DeRubertis, F.R.: Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes.* 42:118-126, 1993.
 22. Kreisberg, J.I., Karnovsky, M.J., Glomerular cells in culture. *kidney Int.* 23:439-447, 1983.
 23. Lovetl, D.H., Sterzel, R.B.: Cell culture approaches to the analysis of glomerular inflammation. *Kidney Int.* 30:246-254, 1986.
 24. Koya, D., Jirousek, M.R., Lin, Y.W., Ishii, H., Kuboki, K., King, G.L.: Characterization of protein kinase C isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- β , extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 100:115-126, 1997.
 25. Koya, D., Haneda, M., Nakagawa, H., Isshiki, K., Sato, H., Maeda, S., Sugimoto, T., Yasuda, H., Kashiwagi, A., Wasy, D.K., King, G.L., Kikkawa, R.: Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC β inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J.* 14:439-447, 2000.
 26. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M.: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature.* 404:787-790, 2000.

27. Yang, C.W., Vlassara, H., Peten, E.P., He, C.J., Striker, G.E., Striker, L.J., Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:9436-9440, 1994.
28. Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., Cerami, A.: Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*. 232:1629-1932, 1986.
29. Takahashi, M., Lu, Y.B., Myint, T., Fujii, J., Wada, Y., Taniguchi, N.: In vivo glycation of aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme identification of glycation sites. *Biochemistry* 34:1433-1438, 1995.
30. Akhand, A.A., Hossain K., Kato, M., Miyata, T., Du, J., Suzuki, H., Kurokawa, K., Nakashima, I., Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1228-1235, 2001.
31. Isono, M., Cruz, M.C., Chen, S., Hong, S.W., Ziyadeh, F.N., Extracellular signal-regulated kinase mediates stimulation of TGF- β 1 and matrix by high glucose in mesangial cells. *J. Am Soc. Nephrol.* 11:2222-2230, 2000.

Effect of Overexpression of Aldehyde Reductase on High Glucose-induced Overproduction of Fibronectin in Mouse Mesangial Cells.

Shigemitsu Ueyama

Division of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases. Department of Clinical Molecular Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, JAPAN

Abstract

One of the characteristic pathological changes in diabetic nephropathy is the accumulation of extracellular matrix (ECM) in the glomerular mesangium. Although ECM production has been indicated to be accelerated in the glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions, the precise mechanism still remains unknown. On the other hand, formation of 3-deoxyglucosone (3-DG), a highly reactive dicarbonyl compound, is accelerated through both the glycation reaction and the polyol pathway under diabetic conditions, inducing so-called carbonyl stress that probably contributes to the development of diabetic complications. Aldehyde reductase (ALR) has been postulated to play an important role in the defense systems against carbonyl stress in vivo by metabolizing 3-DG to a relatively inert species. In the present study, we evaluated fibronectin (FN) production in mouse mesangial cells (MMC) with ALR overexpression, in order to clarify the involvement of 3-DG in the fibronectin overproduction in MMC cultured under high glucose conditions. MMC secreted more FN in 25mM glucose milieu compared with 5.5mM glucose milieu, that was suppressed almost to the latter level even under high glucose conditions when the cells were overexpressed ALR with the use of an adenovirus vector. These results suggest that the involvement of carbonyl stress raised by 3-DG in the development of diabetic glomerulosclerosis due to the accumulation of ECM in the glomerular mesangium, providing useful information about a novel approach to the treatment for diabetic nephropathy.