

氏名・(本籍) 篠崎 一哉 (兵庫県)
学位の種類 博士 (医学)
学位記番号 博士第343号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日 平成12年3月27日
学位論文題目 Abnormal Biopterin Metabolism Is a Major Cause of Impaired Endothelium-Dependent Relaxation Through Nitric Oxide/ O_2^- Imbalance in Insulin-Resistant Rat Aorta

(ビオプテリン代謝異常は、一酸化窒素とスーパーオキシドアニオンの産生不均衡を介してインスリン抵抗性ラット大動脈における内皮依存性の血管弛緩反応障害の主要な原因となる)

審査委員 主査 教授 堀池 喜八郎
副査 教授 岡村 富夫
副査 教授 吉川 隆一

論文内容の要旨

【目的】

近年、インスリン抵抗性状態は、動脈硬化危険因子の集積をきたす病態として注目されている。我々は、これまで動脈硬化形成過程におけるインスリン抵抗性の意義について臨床的に検討し、冠攣縮や動脈硬化などの血管内皮機能異常を伴う病態にインスリン抵抗性が普遍的に存在することを *in vivo* で証明した (参考論文1-4)。これらの研究により、インスリン抵抗性状態では何らかの原因により血管内皮での NO (一酸化窒素) 合成経路の異常が生じ、血管機能障害をもたらされる可能性が示唆された。内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) はその補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (以下BH₄) により活性化され、インスリンは BH₄ の *de novo* 合成の重要な律速酵素である GTP シクロヒドラーゼ1 (GTP-CH1) 活性を調節することも報告されている。一方、BH₄ の減少に伴い eNOS 活性が低下し、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) の産生亢進がおけると報告されている。そこで、本研究ではインスリン抵抗性状態における BH₄ 量の低下および eNOS 活性化異常に伴う内皮機能異常とその分子機構を明らかにした。

【方法】

1. インスリン抵抗性ラット及び外因性高インスリン血症ラットの作製: 6週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、高果糖食負荷によりインスリン抵抗性に伴う内因性の高インスリン血症を示すモデル (F群)、インスリンペレットを皮下に植え込み外因性の高インスリン血症を示すモデル (I群) と対照群 (C群) を作製した。4週後に胸部大動脈を採取し、以下の検討を行った。
2. 等尺性張力試験を用いた血管弛緩反応: Organ chamber 内で大動脈切片に静止張力をかけ、インドメサシン存在下に L-フェニレフリンで前収縮させた後に、アセチルコリンおよび Ca イオノフォア A23187 による血管弛緩反応を検討した。
3. 内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) 活性の測定: 大動脈より剥離した内皮をトリス緩衝液中で破碎し、遠心した上清を試料とした。上清に反応液と [³H] L-アルギニンを入れ、カラムにチャージし溶出した検体を液体シンチレーションカウンターで測定した。
4. RNase protection assay を用いた eNOS mRNA 量の検討: 組織より総 RNA を抽出し、10 μg の RNA と [α -³²P] CTP でラベルした eNOS リボプローブを混合しエタノール沈殿した。ペレットを溶解しハイブリダイズさせ、一本鎖 RNA 部分を RNase で分解した後、二本鎖のプローブを 6% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、autoradiography により mRNA を検出した。
5. 高感度 NO 分析器 (化学発光法) を用いた NO 生成量測定: 0.1 U/ml nitrate reductase, 200 μM NADPH, 50 μM FAD を含む 2ml の Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 内で大動脈切片をインキュ

べートし、1M アスコルビン酸の存在下でオゾン化学発光法（スカラテック社製 NO 分析器）を用いて測定した。

6. ルシゲニン化学発光法を用いた O_2^- 生成量測定：大動脈を 50mM リン酸緩衝液中で破碎し、遠心した上清を試料とした。HBSS に上清を入れ、50 μ M ルシゲニン存在下に O_2^- 生成量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

7. HPLC 法を用いた NOS の補酵素の含有量および GTP-CH1 活性測定：大動脈を 25mM triethanolamine-HCl 緩衝液中で破碎し、遠心した上清中の BH_4 量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した。また、GTP-CH1 活性は試料を GTP と反応させることによりできた dihydro-neopterin triphosphate を phosphatase 処置した後にその産生される neopterin を HPLC を用いて測定した。

【結果】

1. C 群と比較し、I 群、F 群は共に高インスリン血症を示した。F 群では、他の群に比べインスリン感受性は低下し、高中性脂肪血症、血圧上昇を認めた。

2. F 群の動脈片のアセチルコリンおよび A23187 による内皮依存性弛緩反応は、C 群および I 群と比較し有意に低下した。また、Superoxide dismutase (SOD) 処置により F 群の内皮依存性血管弛緩反応異常は有意に改善した。

3. F 群の大動脈内皮破碎上清分画中の eNOS 活性は、C 群と比較し 58% に低下 ($p < 0.01$) したが、I 群では C 群の 2 倍に増加した。

4. 大動脈壁 eNOS mRNA 量は C 群と F 群間で有意差を認めなかったが、I 群では C 群の 2 倍に増加した。

5. F 群大動脈片の A23187 刺激下での NO 生成量は C 群に比べ 59% 低値であったが、 BH_4 添加により正常化した。一方、I 群では A23187 刺激下での NO 生成量は C 群の 3 倍に増加した。

6. F 群大動脈片の A23187 刺激下の O_2^- 生成量は、C 群と比較し約 4 倍の有意な高値を示した。この O_2^- 生成は BH_4 添加により有意に低下したことから、eNOS に由来することが明らかとなった。

7. F 群の血管内皮 BH_4 含量は、C 群と比較し有意に低値で、逆に、酸化（不活性）型のジヒドロビオプテリン (BH_2) 含量は有意に高値であった。一方、C 群に比べ I 群の血管内皮 BH_4 含量は有意に高値で、 BH_2 含量は有意に低値であった。また、GTP-CH1 活性は、C 群に比べ F 群では有意に低値で、I 群では有意に高値であった。

【考察】

大動脈の内皮依存性の血管弛緩反応は、インスリン抵抗性を伴う高インスリン血症を示す高果糖食ラットでは対照群と比較し有意に低下した。一方、インスリン抵抗性を示さないインスリン治療ラットでは高インスリン血症にともない、eNOS 活性が増加し、NO 産生が亢進したが、その理由として eNOS mRNA 量および GTP-CH1 活性上昇に伴う BH_4 含量の増加が明らかとなった。一方、インスリン抵抗性ラットでは eNOS 活性低下に伴い O_2^- 過剰産生をきたし、NO/ O_2^- 産生不均衡がさらに進展した。更にその分子機構として eNOS mRNA に変化はなかったが、eNOS 活性が有意に低下しその機構として BH_4 の低下、 BH_2 の上昇が示され、更に BH_4 低下の一因として GTP-CH1 活性の低下が示唆された。高果糖食ラット血管壁での NO 生成量の低下は BH_4 添加により有意に改善することより、 BH_4 量の意義が確認された。

【結語】

本研究により、内因性の高インスリン血症を伴うインスリン抵抗性状態では、外因性高インスリン血症と異なり、ビオプテリン代謝異常 (BH_4 の低下と BH_2 の増加) が生じる。その結果、eNOS 活性化異常とそれに伴う eNOS 由来の O_2^- の産生の亢進をきたし、内皮依存性の血管弛緩反応の障害がもたらされることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、インスリン抵抗性に伴う血管機能障害の機構を解明するために、モデルラットの大動脈を用いて、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 活性・スーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生量・血管弛緩反応とビオプテリン代謝との関連について検討したものである。

その結果、次のことを明らかにした。1) 内因性高インスリン血症を伴うインスリン抵抗性状態では、外因性高インスリン血症 (インスリン抵抗性を示さない) と異なり、テトラヒドロビオプテリンの合成活性の低下、テトラヒドロビオプテリン含有量の低下、その酸化 (不活性) 型の含有量の増加という、ビオプテリン代謝異常が生じる。2) そのため eNOS 活性化障害とそれに伴う eNOS 由来の O_2^- 産生が亢進し、内皮依存性の血管弛緩反応が障害される。

これらの成果は、インスリン抵抗性による動脈硬化症の発症やその進展の解明に、また治療に寄与するところ大であり、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年2月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。