

平成 12 ・ 13 年度科学研究費補助金

研究成果報告書

基盤研究 (C) (2)

インスリン抵抗性にともなう血管 壁細胞酸化ストレスの分子機構

平成 14 年 3 月

滋賀医科大学医学部第三内科 教授

研究代表者 柏 木 厚 典

(研究課題番号 12671108)



目次

1. はしがき
2. 研究発表
3. 国際学会、国内シンポジウム発表
4. 研究成果
5. 主要研究成果目録

●高果糖食誘発インスリン抵抗性ラットの内皮依存性血管弛緩能異常は、NO/O₂⁻ 不均衡によるが、その原因は、内皮型 NO 合成酵素の補酵素テトラヒドロビオプテリン異常による。

Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, Toda N, Kikkawa R : Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. **Diabetes** 48 : 2437-2445, 1999

●高果糖食誘発インスリン抵抗性ラットの大動脈における内皮依存性血管弛緩能異常と血管壁酸化ストレスの亢進は、経口的に投与したテトラヒドロビオプテリンによって改善した。

Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, Masada M, Toda N, Kikkawa R, Kashiwagi A : Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. **Circ Res** 87 : 566-573, 2000

●インスリン抵抗性状態での血管機能異常の病因の一つは、血管内皮細胞よりの活性酸素の産生である。

Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Toda N, Kikkawa R : Free radical production in endothelial cells as a pathogenetic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state. **Diabetes Res Clin Pract** 45 : 199-203, 1999

●外因性高インスリン血症の大動脈血管内皮細胞特異的に NAD(P)H オキシダーゼが活性化されている。

Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Maegawa H, Maeno Y, Kanazawa A, Kojima H, Haneda M, Hidaka H, Yasuda H, Kikkawa R : Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats. **Am J Physiol** 277 : E976-E983, 1999

●インスリン抵抗性ラットの大動脈血管の弛緩反応による血管内皮細胞より活性酸素が遊離される。

Shinozaki K, Okamura T, Nishio Y, Kashiwagi A, Kikkawa R, Toda N : Evaluation of endothelial free radical release by vascular tension responses in insulin-resistant rat aorta. **Eur J Pharmacol** 394 : 295-299, 2000

●ヒトインスリン抵抗性患者での冠血管内皮依存性血管弛緩能異常は、ピオプテリン代謝異常と血管壁酸化ストレスと関連している。

Shinozaki K, Hirayama A, Nishio Y, Yoshida Y, Ohtani T, Okamura T, Masada M, Kikkawa R, Kodama K, Kashiwagi A : Coronary endothelial dysfunction in the insulin-resistant state is linked to abnormal pteridine metabolism and vascular oxidative stress. **J Am Coll Cardiol** 38 : 1821-1828, 2001

●高果糖食誘発インスリン抵抗性症候群は、PPAR-alpha の活性化により改善した。

Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A : Amelioration of high fructose-induced metabolic derangement by activation of PPAR-alpha. **Am J Physiol Endocrinology and Metabolism** (in press)

研究組織

研究代表者 柏木厚典

(滋賀医科大学第三内科)

研究協力者

西尾善彦、篠崎一哉、前川聡、永井義夫、

岡村富夫¹、戸田昇¹、吉川隆一

(滋賀医科大学第三内科、同薬理学¹)

研究経費

平成 12 年度 2,300,000 円

平成 13 年度 1,500,000 円

総額 3,800,000 円

はしがき

インスリン抵抗性症候群（内臓脂肪症候群、シンドロームx）は、現代における生活習慣を反映し、多くの冠動脈硬化の危険因子が集積した病態として、現代における糖尿病や、動脈硬化症発症の最も重要な病態である。しかし、その発症機構とその遺伝的背景、血管障害の分子機構に関しては、殆ど未解決である。インスリン抵抗性を誘導する生活習慣としては、高脂肪食、高果糖（蔗糖）食、過栄養、運動不足、ストレス等が指摘されるが、その結果発症した肥満、高血圧、糖尿病に伴うインスリン抵抗性状態では、内皮依存性血管拡張能が障害されている。しかし、インスリン抵抗性状態における内皮機能異常の分子機構とその臨床的意義については不明な点が多い。そこで本研究では高果糖食摂取ラットに発症するインスリン抵抗性症候群にみられる血管機能異常に関して以下の点を検討した。

- 1) インスリン抵抗性状態で血管壁におこる血管機能異常の分子機構は何か？
- 2) その異常機構にはインスリン抵抗性が重要か、それとも合併する高インスリン血症が重要か？
- 3) インスリン抵抗性での内皮依存性血管弛緩能異常は内皮型 NO 合成 (eNOS) 異常であると考えられるが、その異常の分子機構は何か？
- 4) 動物モデルで見られる異常が、ヒトのインスリン抵抗性状態でもみられるか？

その結果、インスリン抵抗性状態で血管壁細胞に酸化ストレスが誘導されるが、その分子機構として NO 産生の低下、スーパーオキシド (O_2^-) の過剰産生が認められた。この異常に関係する酵素として血管内皮細胞における内皮型 NO 合成酵素の活性低下と NAD(P)H オキシダーゼ活性化によることが明らかとなった。更に eNOS 活性異常には、eNOS 活性化補酵素のテトラヒドロビオプテリン (BH4) の減少と不活性型補酵素 (BH2) の著明な増加が関連していた。BH4/BH2 比の低下はインスリン作用不全と関連し、その合成酵素の異常にて誘導された。

4. 研究成果

I. 欧文原著論文

1. Harada N, Kashiwagi A, Nishio Y, Kikkawa R : Effects of cholesterol-lowering treatments on oxidative modification of plasma IDL plus LDL fraction in type 2 diabetic patients. **Diabetes Res Clin Pract** 43 : 111-120, 1999
2. Yasuda H, Terada M, Taniguchi Y, Sasaki T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R : Impaired regeneration and no amelioration with aldose reductase inhibitor in crushed unmyelinated nerve fibers of diabetic rats. **NeuroReport** 10 : 2405-2409, 1999
3. Nakamura T, Fox-Robichaud A, Kikkawa R, Kashiwagi A, Kojima H, Fujimiya M, Wong NC : Transcription factors and age-related decline in apolipoprotein A-1 expression. **JLipid Res** 40 : 1709-1718, 1999
4. Maegawa H, Obata T, Shibata T, Fujita T, Ugi S, Morino K, Nishio Y, Kojima H, Hidaka H, Haneda M, Yasuda H, Kikkawa R, Kashiwagi A : A new antidiabetic agent (JTT-501) rapidly stimulates glucose disposal rates by enhancing insulin signal transduction in skeletal muscle. **Diabetologia** 42 : 151-159, 1999
5. Maegawa H, Shi K, Hidaka H, Iwai N, Nishio Y, Egawa K, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Nakamura Y, Kinoshita M, Kikkawa R, Kashiwagi A : The 3'-untranslated region polymorphism of the gene for skeletal muscle-specific glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 in the type 2 diabetic Japanese population. **Diabetes** 48 : 1469-1472, 1999
6. Maeda S, Haneda M, Yasuda H, Tachikawa T, Isshiki K, Koya D, Terada M, Hidaka H, Kashiwagi A, Kikkawa R : Diabetic nephropathy is not associated with the dinucleotide repeat polymorphism upstream of the aldose reductase (ALR2) gene but with erythrocyte aldose reductase content in Japanese subjects with type 2 diabetes. **Diabetes** 48 : 420-422, 1999
7. Maegawa H, Hasegawa M, Sugai S, Obata T, Ugi S, Morino K, Egawa K, Fujita T, Sakamoto T, Nishio Y, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Kikkawa R, Kashiwagi A : Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. **J Biol Chem** 274 : 30236-30243, 1999

8. Kojima H, Hidaka H, Matsumura K, Fujita Y, Yamada S, Haneda M, Yasuda H, Kikkawa R, Kashiwagi A : Effect of glycemic control on plasma sterol levels and post-heparin diamine oxidase activity in type 1 diabetic patients. **Atherosclerosis** 145 : 389-397, 1999
9. Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, Toda N, Kikkawa R Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂- imbalance in insulin-resistant rat aorta. **Diabetes** 48 : 2437-2445, 1999
10. Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Toda N, Kikkawa R : Free radical production in endothelial cells as a pathogenetic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state. **Diabetes Res Clin Pract** 45 : 199-203, 1999
11. Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Maegawa H, Maeno Y, Kanazawa A, Kojima H, Haneda M, Hidaka H, Yasuda H, Kikkawa R : Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats. **Am.J Physiol** 277 : E976-E983, 1999
12. Suzuki E, Kashiwagi A, Hidaka H, Maegawa H, Nishio Y, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Morikawa S, Inubushi T, Kikkawa R : ¹H- and ³¹P-magnetic resonance spectroscopy and imaging as a new diagnostic tool to evaluate neuropathic foot ulcers in TypeII diabetic patients. **Diabetologia** 43 : 165-172, 2000
13. Maeno Y, Kashiwagi A, Nishio Y, Takahara N, Kikkawa R : IDL can stimulate atherogenic gene expression in cultured human vascular endothelial cells. **Diabetes Res Clin Pract** 48 : 127-138, 2000
14. Koya D, Haneda M, Nakagawa H, Isshiki K, Sato H, Maeda S, Sugimoto T, Yasuda H, Kashiwagi A, Ways D. Kirk, King George 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
15. Yasuda H, Hirai A, Joko M, Terada M, Kawabata T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Maeda T, Kikkawa R : Effect of aldose reductase inhibitor on cutaneous nerve fiber length in diabetic patients. **Diabetes Care** 23 : 705-705, 2000
16. Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kitasato H, Kikkawa R : Increases in K⁺ conductance and Ca²⁺ influx under high glucose with suppressed Na⁺/K⁺-pump activity in rat myelinated nerve fibers. **NeuroReport** 11 :

2547-2551, 2000

17. Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Haneda M, Kashiwagi A, Saito T, Saida T, Kitasato H, Kikkawa R : The sera from GM1 ganglioside antibody positive patients with Guillain-Barre syndrome or chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy blocks Na⁺ currents in rat single myelinated nerve fibers. **Internal Med** 39 : 123-127, 2000
18. Suzuki E, Kashiwagi A, Nishio Y, Kojima H, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Morikawa S, Inubushi T, Kikkawa R : Usefulness of waveform analysis of popliteal artery in Type II diabetic patients using gated magnetic resonance 2D-cine-PC imaging and 31P spectroscopy. **Diabetologia** 43 : 1031-1038, 2000
19. Shinozaki K, Okamura T, Nishio Y, Kashiwagi A, Kikkawa R, Toda N : Evaluation of endothelial free radical release by vascular tension responses in insulin-resistant rat aorta. **Eur. J Pharmacol** 394 : 295-299, 2000
20. Egawa K, Nakashima N, Sharma PM, Maegawa H, Nagai Y, Kashiwagi A, Kikkawa R, Olefsky JM : Persistent activation of phosphatidylinositol 3-Kinase causes insulin resistance due to accelerated insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation in 3T3-L1 adipocytes. **Endocrinology** 141 : 1930-1935, 2000
21. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, Masada M, Toda N, Kikkawa R, Kashiwagi A : Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. **Circ Res** 87 : 566-573, 2000
22. Hidaka H, Terada M, Maegawa H, Kojima H, Koya D, Nishio Y, Haneda M, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R : Evaluation of a new care system provided to diabetic patients in the outpatient clinic. **Internal Med** 39 : 783-787, 2000
23. Obata T, Yaffe MB, Leparc G, Piro E, Maegawa H, Kashiwagi A, Kikkawa R, Cantley LC : Determination of the specific substrate motifs of AKT. **J Biol Chem** 275 : 36108-36115, 2000
24. Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, Inoki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R : Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated t-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. **J Am Soc Nephrol**. 12 : 1359-1368, 2001
25. Yamada S, Kojima H, Fujimiya M, Nakamura N, Kashiwagi A, Kikkawa R : Differentiation of immature enterocytes into multiple enteroendocrine-producing cells

- by Pdx1-overexpression. **Am J Physiol** 281 : G229-G236, 2001
26. Terashima T, Yasuda H, Terada M, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R : A related articles expression of Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult rat peripheral nerve. **J Neurochem** 77 : 986-993, 2001
27. Nakamura T, Kishi A, Wong NCW, Kojima H, Fujimiya M, Arai R, Kashiwagi A, Kikkawa R : Insulin production in a neuroectodermal tumor that express ISL-1 but not Pdx1. **J Clin Endocrinol Metab** 86 : 1795-1800, 2001
28. Egawa K, Maegawa H, Shimizu S, Morino K, Nishio Y, Bryer-Ash M, Cheung AT, Kolls JK, Kikkawa R, Kashiwagi A : Protein tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in L6 myocytes and fao hepatoma cells. **J Biol Chem** 276 : 10207-10211, 2001
29. Morino K, Maegawa H, Fujita T, Takahara N, Egawa K, Kashiwagi A, Kikkawa R : Insulin-induced JNK activation is negatively regulated by protein kinase C delta. **Endocrinology** 142 : 2669-2676, 2001
30. Sinozaki K, Hirayama A, Nishio Y, Yoshida Y, Ohtani T, Okamura T, Masada M, Kikkawa R, Kodama K, Kashiwagi A : Coronary endothelial dysfunction in the insulin-resistant state is linked to abnormal pteridine metabolism and vascular oxidative stress. **J Am Coll Cardiol** 38 : 1821-1828, 2001
31. Suzuki E, Kashiwagi A, Nishio Y, Egawa K, Shinnya S, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Morikawa S, Inubushi T, Kikkawa R : Increased arterial wall stiffness limits flow volume in the lower extremities in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care** (in press)
32. Kanazawa A, Nishio Y, Kashiwagi A, Inagaki H, Kikkawa R, Horiike K : Reduced activity of mtTFA decreases the transcription in mitochondria isolated from diabetic rat heart. **Am J Physiol Endocrinology and Metabolism** (in press)
33. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A : Amelioration of high fructose-induced metabolic derangement by activation of PPAR-alpha. **Am J Physiol Endocrinology and Metabolism** (in press)
34. Kojima H, Nakamura T, Fujita T, Kishi A, Fujimiya M, Yamada S, Kudo M, Nishio Y, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Kojima I, Seno M, Wong Norman C. W, Kikkawa R, Kashiwagi A : Combined expression of pancreatic-duodenal homeobox 1,

and islet factor-induces immature enterocytes to produce insulin. **Diabetes** (in press)

II. 国際学会発表

1. Maegawa H, Kashiwagi A, Hasegawa M, Obata T, Ugi S, Kikkawa R : Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. 59th Annual Meeting of American Diabetes Association, 1999 (一般)
2. Kashiwagi A : Abnormal biopterin metabolism is a cause for NO-dependent vascular dysfunction and oxidative stress in insulin-resistant rat aorta. The 3rd Japan-Europe Joint Forum on Atherosclerosis Research 10/11/1999, Ise, Japan (シンポジウム)
3. Egawa K, Maegawa H, Morino M, Obata T, Shimizu S, Kashiwagi A, Kikkawa R : Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1) plays a different role on insulin signaling among FAO cells, 3T3-L1 adipocytes, and L6 myocytes. 60th Annual Meeting of American Diabetes Association, 2000 (一般)
4. Kashiwagi A : International Strategic Meeting on diabetic management for 21st Century, 6/12, 2000, San Antonio, USA (Round Table Discussion)
5. Kashiwagi A : Abnormal biopterin metabolism is a cause for NO-dependent vascular dysfunction and oxidative stress in insulin-resistant rat aorta. The 10th MSDM Anniversary International Symposium on "Insulin resistance and atherosclerosis" 7/27-29, 2000 Osaka, Japan (シンポジウム)
6. Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Yoshida Y, Maeno Y, Masada M, Maegawa H : Supplemets of BH4 an eNOS activator, by a gene transfer of its biosynthetic enzyme cDNA into skeletal muscle improves vascular dysfunction in insulin-resistant rats. 61th Annual Meeting of American Diabetes Association, 2001 (一般)
7. Nishio Y, Kanazawa A, Kashiwagi A, Kikkawa R : Impairments of transcription of mitochondrial DNA, but not nuclear DNA in diabetic heart. 61st Annual Meeting of American Diabetes Association, 2001 (一般)
8. Egawa K, Maegawa H, Shimizu S, Morino M, Bryer-Ash M, Cheung AT, Kolls JK, Kashiwagi A, Kikkawa R : Protein tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in L6 myocytes and FAO hepatoma cells. 61 st Annual Meeting of American Diabetes Association, 2000 (一般)
9. Kashiwagi A : Insulin resistance as a central role for life style-related diseases in Japan. 5 International conference on Preventive Cardiology, 2001 (レクチャー)

Ⅲ. 国内学会シンポジウム・ワークショップ

1. 柏木厚典: 糖尿病におけるインスリン抵抗性とその臨床的意義、第 33 回糖尿病学の進歩イブニングセミナー、インスリン抵抗性改善剤の意義、富山、1999/2/26、レクチャー
2. 柏木厚典、西尾善彦、紀田康雄、吉川隆一: 糖尿病と動脈硬化；危険因子とその介入試験、第 25 回日本医学会総会、東京、1999/4/3、シンポジウム
3. 柏木厚典、西尾善彦、篠崎一哉、紀田康雄、原田夏樹: 増え続ける冠動脈疾患の合併にどう対処するか—循環器専門医との連携を探る—血糖コントロールは冠動脈疾患を予防しているか、進めていないか？ 第 42 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム、1999/5/15、東京、シンポジウム
4. 柏木厚典: インスリン抵抗性症候群—最近の話題；インスリン抵抗性と血管機能異常、第 72 回日本内分泌学会学術総会ランチヨンセミナー、1999/6/2、パシフィコ横浜、レクチャー
5. 柏木厚典: 糖尿病と動脈硬化；動脈硬化危険因子と血管壁酸化ストレス発症機構、第 31 回日本動脈硬化学会総会、宮崎、1999/6/24-25、シンポジウム
6. Yki-Jarvinen H.、柏木厚典、梅田文夫、山田信博: インスリン抵抗性と血管合併症、第 5 回インスリン抵抗性カンファレンス、1999/7/3、大阪、パネルディスカッション
7. 柏木厚典: 合併症から見た血圧コントロールのあり方はいかに、第 16 回糖尿病 Up to Date 賢島セミナー、1999/8/22、賢島、レクチャー
8. 柏木厚典: 高齢者の生活習慣病と QOL: 生活習慣と肥満、琵琶湖長寿科学シンポジウム、1999/11/9、大津、シンポジウム
9. 柏木厚典: 生活習慣病セミナー；糖尿病の予防、1999/11/29、大阪、レクチャー
10. 柏木厚典: 糖尿病と血管内皮細胞障害の病態、Research message:糖尿病と動脈硬化—研究と臨床の興味は今？ 第 43 回日本糖尿病学会年次学術集会、名古屋、5/2000、ワークショップ
11. 柏木厚典: 動脈硬化リスクファクター管理基準設定に向けて—糖尿病患者における動脈硬化リスクファクターの管理基準設定に向けて、第 32 回日本動脈硬化学会ワークショップ、6/2/2000、浦安市、レクチャー
12. 柏木厚典: 糖尿病と酸化ストレス—インスリン抵抗性と血管壁活性酸素障

害、第 32 回日本動脈硬化学会、動脈硬化学会ランチオンセミナー、6/2/2000、浦安市、レクチャー

13. 柏木厚典: インスリン抵抗性仮説 vs. 脂肪細胞中心仮説、(Debate) 第 1 回マルチプルリスクファクターフォーラム、6/3/2000、東京 シンポジウム

14. 柏木厚典: インスリン抵抗性と血管合併症、第 6 回インスリン抵抗性カンファレンス、7/1-2, 2000、東京、パネル・デイスカッション

15. 柏木厚典、西尾善彦、篠崎一哉: 糖尿病と動脈硬化—危険因子としてのインスリン抵抗性の意義、第 15 回日本糖尿病合併症学会シンポジウム、10/21/2000、東京、シンポジウム

16. 高原典子、柏木厚典、吉川隆一: 糖尿病合併症の分子標的—プロテインキナーゼ C β 、第 15 回日本糖尿病合併症学会シンポジウム、10/21/2000、東京、シンポジウム

17. 柏木厚典、西尾善彦、篠崎一哉、金澤昭雄、高原典子: 糖尿病の Vascular Biology—高血糖と血管壁酸化ストレス、第 8 回日本血管生物学会シンポジウム、11/24/2000、東京、シンポジウム

18. 柏木厚典: 酸化ストレスと糖尿病における血管障害、第 35 回糖尿病学の進歩、2/24, 2001、広島、レクチャー

19. 柏木厚典: 食後高血糖へのベストアプローチ—食後高血糖の臨床的意義とその管理—、第 35 回糖尿病学の進歩、2/24, 2001、広島、イブニングセミナー

20. 柏木厚典: 糖尿病患者の無痛性心筋梗塞・突然死、第 65 回日本循環器病学会ランチオンセミナー、3/25, 2001、京都、レクチャー

21. 柏木厚典: 糖尿病における酸化ストレス発症機構—インスリン抵抗性の面から—、第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会、4/16/2001、京都、シンポジウム

22. 西尾善彦、篠崎一哉、関根理、柏木厚典: インスリン抵抗性と血管内皮障害、第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会、4/16/2001、京都、シンポジウム

23. 篠崎一哉、岡村富夫、柏木厚典、吉川隆一: 酸化ストレス研究の新展開—血管内皮細胞酸化ストレスとインスリン抵抗性、第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会、4/16/2001、京都、シンポジウム

24. 柏木厚典: マルチプルリスクファクター症候群—疫学から分子機構まで—、インスリン抵抗性とマルチプルリスクファクター、第 33 回日本動脈硬化学会、

6/7/2001、東京、シンポジウム

25. 柏木厚典: インスリン抵抗性と血管機能異常、第7回インスリン抵抗性カンファレンス、7/8/2001、大阪、シンポジウム

5. 主要研究成果

●高果糖食誘発インスリン抵抗性ラットの内皮依存性血管弛緩能異常は、NO/O₂⁻ 不均衡によるが、その原因は、内皮型 NO 合成酵素の補酵素テトラヒドロビオプテリン異常による。インスリン抵抗性動物では血管内皮依存性血管弛緩反応が低下する。しかし、その異常機構に関する詳細な検討は困難であった。本研究では、高果糖食にて誘導されるインスリン抵抗性ラットの血管弛緩能異常機構を検討した。インスリン抵抗性状態で血管内皮細胞 eNOS (NO 合成酵素) 活性は 58%低下し、内皮依存性血管弛緩が低下し、活性酸素の過剰産生が認められた。この eNOS 異常は eNOS 活性化補酵素 BH₄ の低下、不活性補酵素 BH₂ の増加と関連していた。すなわち、インスリン抵抗性状態の BH₄/BH₂ 比の低下による eNOS 活性化異常と eNOS からの活性酸素過剰産生は、インスリン抵抗性状態での血管内皮細胞異常の主要な分子機構であることを明らかにした。

Shinozaki K. et al. : Abnormal bipterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. **Diabetes** 48 : 2437-2445, 1999

●高果糖食誘発インスリン抵抗性ラットの大動脈における内皮依存性血管弛緩能異常と血管壁酸化ストレスの亢進は、経口的に投与したテトラヒドロビオプテリンによって改善した。インスリン抵抗性状態での内皮依存性血管機能異常は、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) 異常による NO 産生低下と活性酸素過剰産生により、血管壁細胞に酸化ストレスを誘導するという説を提唱した。そこで本研究ではこの内皮 eNOS 活性化異常を、減少した eNOS 活性化補酵素を経口投与 (10 mg/kgBW/day) することにより血管内皮機能、血管壁酸化ストレスが改善するかどうかを検討した。その結果、インスリン抵抗性ラットの内皮依存性血管反応、eNOS 活性はほぼ正常化し、更に活性酸素過剰産生、血管壁における脂質過酸化、酸化ストレス関連遺伝子発現 (NF- κ B, AP-1) が正常化した。更に血流改善の結果、インスリン抵抗性、血圧、血清中性脂肪値も部分的に改

善した。

Shinozaki K. et al. : Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. **Circ Res** 87 : 566-573, 2000

●インスリン抵抗性状態での血管機能異常の病因の一つは、血管内皮細胞よりの活性酸素の産生である。高果糖食にて誘導されたインスリン抵抗性状態では、外因性高インスリン血症と同じく血管内皮細胞の NAD(P)H オキシダーゼ依存性の活性酸素産性が基礎値の約 4 倍に増加したが、外因性インスリンでは NO 産生が亢進するため相殺された。しかしインスリン抵抗性状態では eNOS 活性が低下し、血管内皮細胞由来の活性酸素が過剰に産生されていた。

Kashiwagi A, et al. : Free radical production in endothelial cells as a pathogenetic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state. **Diabetes Res Clin Pract** 45 : 199-203, 1999

●外因性高インスリン血症の大動脈血管内皮細胞特異的に NAD(P)H オキシダーゼが活性化されている。高血糖による酸化ストレスの血管内皮細胞障害作用を報告してきた。しかし、インスリン抵抗性、高インスリン血症による血管内皮細胞異常、特に活性酸素障害の可能性は殆ど検討されていなかった。そこで本研究では高インスリン血症動物モデルを作成し、血管壁細胞での活性酸素産生の有無と産生酵素系を検討した。その結果、高インスリン血症動物の血管からは活性酸素が 2.4 倍過剰産生されていた。この活性酸素は血管内皮細胞から特異的に産生され、産生酵素は NAD(P)H オキシダーゼで、インスリンの投与量に依存して生理的濃度のインスリンにより本酵素は活性化された。生理的高インスリン血症の血管内皮細胞活性酸素産生系への直接作用が証明された。

Kashiwagi A, et al. : Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats. **Am. J. Physiol** 277 : E976-E983, 1999

●インスリン抵抗性ラットの大動脈血管の弛緩反応による血管内皮細胞よる活性酸素が遊離される。インスリン抵抗性ラットでは、活性酸素消去による血管弛緩能の改善効果は、対象ラットに比べて大きく、一方 eNOS 阻害薬による血管収縮能の改善効果は、対象ラットに比べて低下していた。すなわち、インスリン抵抗性動物大動脈の血管弛緩能の測定は、血管壁細胞からの活性酸素産生を推定する良い指標となることを示した。

Shinozaki K, et al. : Evaluation of endothelial free radical release by vascular tension

responses in insulin-resistant rat aorta. **Eur J Pharmacol** 394 : 295-299, 2000

●ヒトインスリン抵抗性患者での冠血管内皮依存性血管弛緩能異常は、ピオブテリン代謝異常と血管壁酸化ストレスと関連している。ラットのインスリン抵抗性モデルで明らかにした血管内皮細胞 eNOS 活性化異常の主要因としての血漿 BH4/BH2 比の低下が、アセチルコリン (Ach) 依存性血管弛緩能異常に関連しているかどうかを検討した。インスリン抵抗性が亢進するに伴い Ach 依存性血管弛緩能は低下し、その程度と BH4/BH2 比、BH4 合成に関連する酵素(DHPR)は正相関した。また、インスリン抵抗性が増加するに伴い冠動脈内で産生される過酸化脂質の量が増加した。

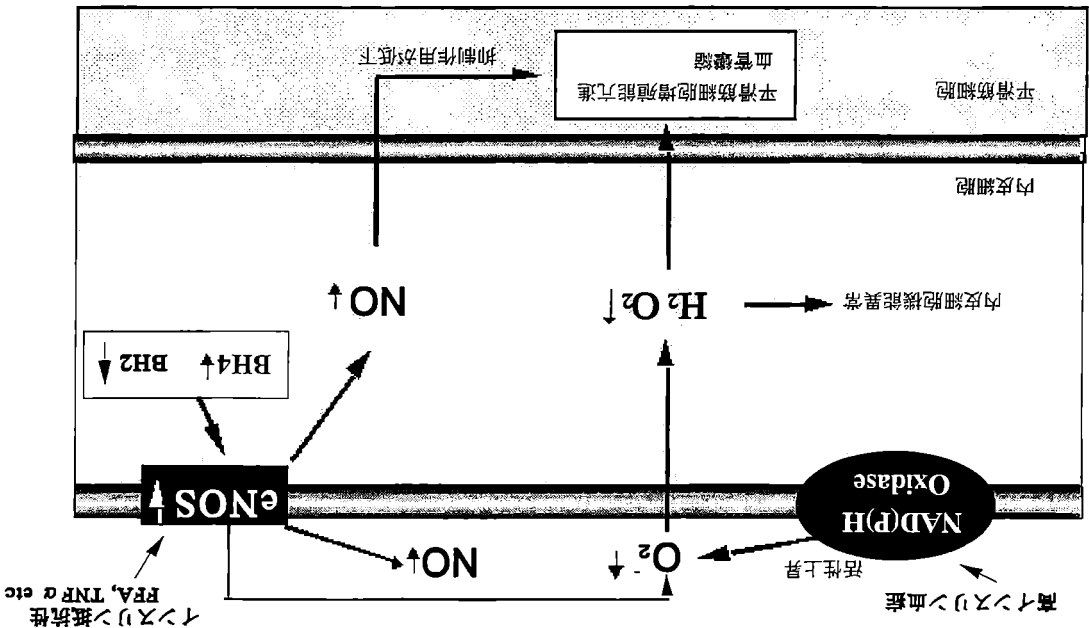
Sinozaki K, Hirayama A, Nishio Y, Yoshida Y, Ohtani T, Okamura T, Masada M, Kikkawa R, Kodama K, Kashiwagi A : Coronary endothelial dysfunction in the insulin-resistant state is linked to abnormal pteridine metabolism and vascular oxidative stress.

J Am Coll Cardiol 38 : 1821-1828, 2001

●高果糖食誘発インスリン抵抗性症候群は、PPAR-alpha の活性化により改善した。高果糖食にて形成される高血圧、脂質異常、高インスリン血症、内臓脂肪、脂肪肝などの病態が集積して出現するインスリン抵抗性症候群は、肝臓内で脂肪合成に関与する転写因子 sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)の発現増加と脂肪酸酸化に関連する PPAR-alpha の発現低下に関連していた。この PPAR-alpha の活性をフェノフィブラート投与にて改善すると、インスリン抵抗性症候群は改善した。

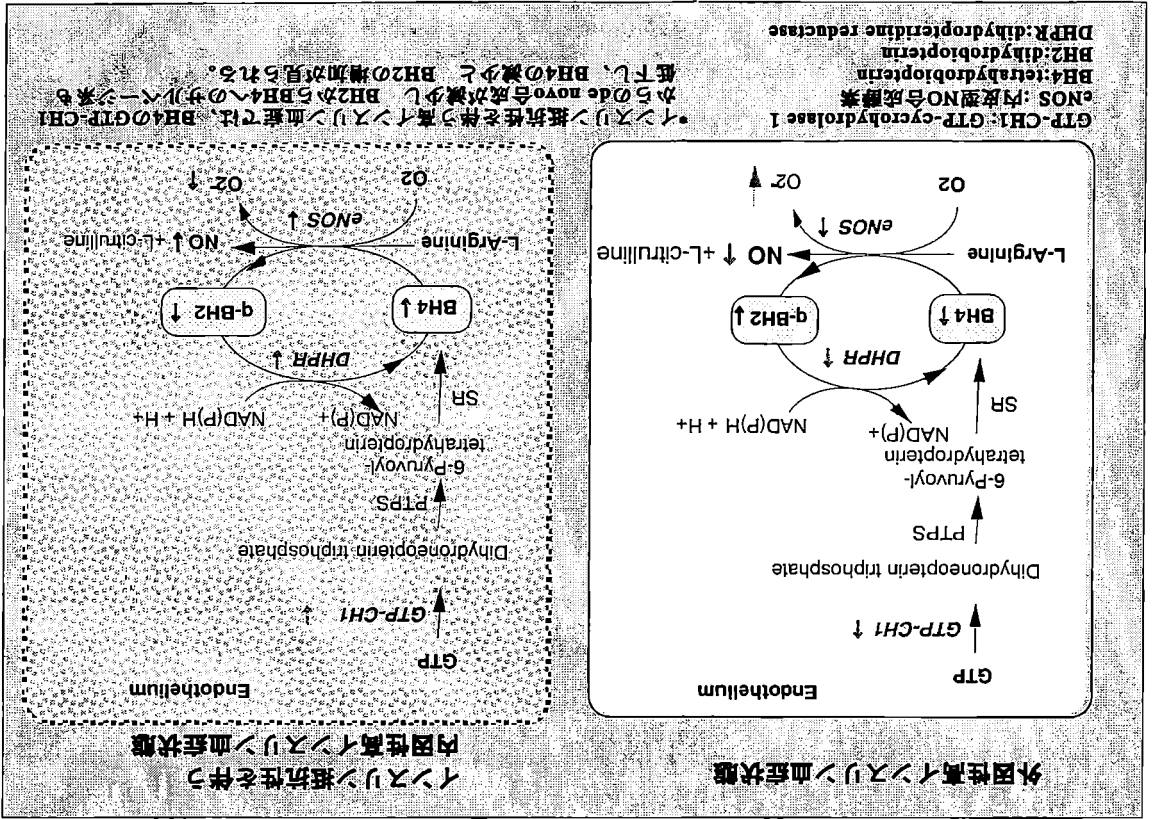
Nagai Y, et al. : Amelioration of high fructose-induced metabolic derangement by activation of PPAR-alpha. **Am J Physiol Endocrinology and Metabolism** (in press)

図1 インスリン抵抗性状態におけるNO/O₂-不均衡における血管内皮細胞・血管平滑筋細胞機能運関



Shinozaki K. et al: Diabetes 1999,

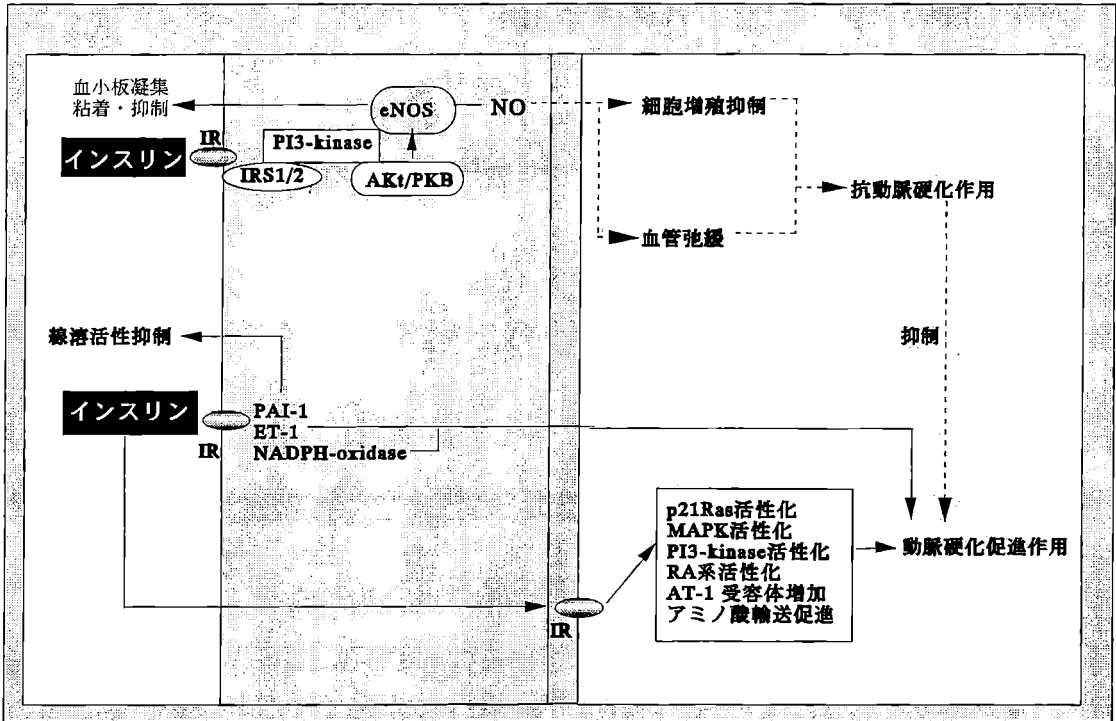
図2 インスリン抵抗性を伴う内因性高インスリン血症状態での内皮型NO合成酵素活性化補酵素1 (eNOS)の生合成調節



GTP-CHI: GTP-cyclohydrolase 1
 eNOS: 内皮型NO合成酵素
 BH4: tetrahydrobiopterin
 BH2: dihydrobiopterin
 DHP: dihydropyridine reductase

インスリン抵抗性を伴う高インスリン血症では、BH4のGTP-CHIからのde novo合成が減少し、BH2からBH4へのサルベージ系も低下し、BH4の減少とBH2の増加が見られる。

図3 インスリンによる血管内皮細胞機能調節と平滑筋細胞増殖の調節



血管壁細胞に対するインスリン作用には2面性があり、血管内皮細胞が健全であれば、インスリンは内皮細胞に作用しeNOSを活性化することにより、血管平滑筋細胞の増殖、収縮を抑制する。しかし血管壁にインスリン抵抗性が存在すると、内皮細胞由来のNOの産生が低下し血管壁細胞に活性酸素が過剰に遊離され酸化ストレスが亢進し、血管壁細胞の増殖刺激が誘導される。更に、同時に存在する高インスリン血症はインスリンの直接血管壁作用を介してhypertrophic responseを誘導することが明らかとなってきた。すなわち、インスリン抵抗性自身が血管壁における動脈硬化促進作用を有することが明らかとなった。