

平成5・6年度科学研究費補助金

研究成果報告書  
(一般研究C)

# 高血糖と血管の老化

ラジカルスカベンジャー機能異常と内皮  
細胞活性化遺伝子発現

平成 7年 3月

滋賀医科大学医学部第三内科 講師

研究代表者 柏 木 厚 典

(研究課題番号05670854)

# 目次

## 1. はしがき

## 2. 研究発表

(1) 学会誌

(2) 出版物

滋賀医科大学附属図書館



1994020700

## 3. 研究成果

(1) 高血糖と血管の老化：ラジカルスカベンジャー  
機能異常と内皮細胞活性化遺伝子発現 -まとめ-

(2) 高血糖下でのペントースリン酸経路活性化異常と  
グルタチオンレドックス (GR) サイクルの活性低下

グルタチオン代謝異常と細胞障害：Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. (資料1)

ペントース代謝とNADPH供給異常：Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in high glucose medium (資料2)

(3) 高血糖状態に伴う血管内皮細胞の活性化遺伝子発現異常  
- 細胞間接着因子(ICAM-1)の誘導 -: Specific expression of intracellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) via an osmotic effect in human umbilical vein endothelial cells exposed to high glucose medium (資料3)

(4) 酸化LDLによる血管内皮細胞遺伝子発現異常  
- MCP-1の誘導 -: Lysophosphatidylcholine stimulates expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells (資料4)

(5) 内皮細胞からみた糖尿病と動脈硬化 (資料5)

# はしがき

老化・糖尿病における動脈硬化症の発症・進展を検討する上で、血管壁における活性型酸素の産生と分解の調節異常は、LDLの酸化と血管内皮細胞の活性化遺伝子発現を介してマクロファージや血管平滑筋細胞機能を修飾し、動脈硬化症を誘導すると指摘されている。これまで高血糖時に各種タンパク質の糖化反応及び各種代謝過程で活性型酸素が産生されることが示唆されている。一方我々はこれまで血管内皮細胞が活性型酸素の一種である過酸化水素をグルタチオンレドックス（GR）サイクルで分解するが、その機能は高グルコース状態で低下した。その結果、高グルコース条件下に培養した血管内皮細胞は、活性型酸素障害を強く受けることが示された。糖尿病では更に非酵素的糖化反応によって、SOD活性が低下することが報告され、活性酸素の分解機能は更に低下することになる。

そこで本研究では、高血糖状態で血管内皮細胞のラジカルスカベンジャー機能が低下する機構を、細胞内グルコース代謝の面から明らかにし、更にそれら異常を是正するための各種ラジカルスカベンジャーの有用性を評価する。このような酸化ストレスの亢進は、種々の血管内皮細胞遺伝子発現を誘導することが考えられる。本研究では、更に高血糖は血管内皮細胞におけるICAM-1発現を誘導し、更に酸化ストレスにともなう酸化LDL及びその主要成分であるLysophosphatidylcholine (LPC)の産生は、血管内皮細胞の単球遊走因子の遺伝子発現を高めた。このように糖尿病における代謝障害は、血管内皮細胞遺伝子発現を修飾し、血管内皮細胞と単球の相互作用を活発にする可能性を明らかにした。

## 研究組織

研究代表者 柏木厚典（滋賀医科大学第三内科）  
研究分担者 前川聡（滋賀医科大学第三内科）  
研究協力者 西尾善彦、朝比奈崇介、田中 逸、池淵元祥、  
高原典子、瀧秀樹（滋賀医科大学第三内科）  
佐伯行一（滋賀医科大学実験実習機器センター）

## 研究経費

平成5年度	1,200,000円
平成6年度	900,000円
総額	2,100,000円

# 研究発表

## 学会誌

1. Tanaka, Y., A. Kashiwagi, Y. Saeki, and Y. Shigeta. "Abnormalities in cardiac alpha 1-adrenoceptor and its signal transduction in streptozocin-induced diabetic rats." Am J Physiol 263 (1992):E425-E429
2. Harano, Y., H. Kojima, K. Kosugi, M. Suzuki, M. Harada, T. Nakano, H. Hidaka, A. Kashiwagi, R. Torii, Y. Taniguchi, and a. l. et. "Hyperlipidemia and atherosclerosis in experimental insulinopenic diabetic monkeys." Diabetes Res Clin Pract 16 (1992): 163-73.
3. Kashiwagi, A., T. Obata, M. Suzaki, Y. Takagi, Y. Kida, T. Ogawa, Y. Tanaka, T. Asahina, M. Ikebuchi, Y. Saeki, and a. l. et. "Increase in cardiac muscle fructose content in streptozotocin-induced diabetic rats." Metabolism 41 (1992): 1041-6.
4. Maegawa, H., A. Kashiwagi, T. Haruta, K. Egawa, S. Ugi, Ide R. Tachikawa, M. Hasegawa, M. Kobayashi, and Y. Shigeta. "Co-expression of mutant and normal human insulin receptors in COS 7 cells." Biochim Biophys Acta 1216 (1993): 425-30.
5. Maegawa, H., Ide R. Tachikawa, S. Ugi, M. Iwanishi, K. Egawa, R. Kikkawa, Y. Shigeta, and A. Kashiwagi. "Pioglitazone ameliorates high glucose induced desensitization of insulin receptor kinase in Rat 1 fibroblasts in culture." Biochem Biophys Res Commun 197 (1993): 1078-82.
6. Tanaka, Y., A. Kashiwagi, Y. Saeki, Y. Takagi, T. Asahina, R. Kikkawa, and Y. Shigeta. "Effects of verapamil on the cardiac alpha 1-adrenoceptor signalling system in diabetic rats." Eur J Pharmacol 244 (1993): 105-9.
7. Ikebuchi, M., A. Kashiwagi, T. Asahina, Y. Tanaka, Y. Takagi, Y. Nishio, H. Hidaka, R. Kikkawa, and Y. Shigeta. "Effect of medium pH on glutathione redox cycle in cultured human umbilical vein endothelial cells." Metabolism 42 (1993): 1121-6.
8. Maegawa, H., S. Ugi, O. Ishibashi, Ide R. Tachikawa, N. Takahara, Y. Tanaka, Y. Takagi, R. Kikkawa, Y. Shigeta, and A. Kashiwagi. "Src homology 2 domains of protein tyrosine phosphatase are phosphorylated by insulin receptor kinase and bind to the COOH-terminus of insulin receptors in vitro." Biochem Biophys Res Commun 194 (1993): 208-14.
9. Maegawa, H., S. Ugi, M. Adachi, Y. Hinoda, R. Kikkawa, A. Yachi, Y. Shigeta, and A. Kashiwagi. "Insulin receptor kinase phosphorylates protein tyrosine phosphatase containing Src homology 2 regions and modulates its PTPase activity in vitro." Biochem Biophys Res Commun 199 (1994): 780-5.
10. Ugi, S., H. Maegawa, J. M. Olefsky, Y. Shigeta, and A. Kashiwagi. "Src homology 2 domains of protein tyrosine phosphatase are associated in vitro with both the insulin receptor and insulin receptor substrate-1 via different phosphotyrosine motifs." FEBS Lett 340 (1994): 216-20.

11. Ide, R., H. Maegawa, R. Kikkawa, Y. Shigeta, and A. Kashiwagi. "High glucose condition activates protein tyrosine phosphatases and deactivates insulin receptor function in insulin-sensitive rat 1 fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun 201 (1994): 71-7.
12. Maegawa H, Ide R, Hasegawa M, Ugi S, Egawa K, Iwanishi M, Kikkawa R, Shigeta Y, Kashiwagi A "Thiazolidine derivatives ameliorate high glucose-induced insulin resistance via the normalization of protein-tyrosine phosphatase activities." J Biol Chem 270 (1995) :1-7
13. Ide R, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A, Shigeta Y "High glucose concentration desensitizes insulin action at the levels of receptor kinase." Endocrine J (In press)
14. Takagi Y, Kashiwagi A, Tanaka Y, Maegawa H, Shigeta Y "Insulin-specific activation of S6 kinase and its desensitization in cultured vascular smooth muscle cells." Atherosclerosis 113 (1995) 19-27
15. Ogawa T, Kashiwagi A, Kikkawa R, Shigeta Y "The increase of voltage-sensitive calcium channels and calcium accumulation in skeletal muscles of streptozocin-induced diabetic rats. " Metabolism (In press)
16. Asahina T, Kashiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, Takagi Y, Saeki Y, Kikkawa R, Shigeta Y "Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in high glucose medium." Diabetes (In press)
17. Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. Diabetes (Supplement) (In press)

## 出版物

18. Kashiwagi A, Shigeta Y. Glucose metabolism in endothelial cells. Recent advances in endothelial cell dysfunction in diabetes. ed by George L.King, Yukio Shigeta Churchill Livingstone, pp 3-15, 1994
19. Kashiwagi A, Kikkawa R. Abnormal glutathione redox cycle in cultured human endothelial cells for the pathogenesis of diabetic vascular complication. Diabetes 1991 ed by H.Rifkin, Colwell JA, Taylor SI, Elsevier Science Publisher pp679-p682, 1991
20. 柏木厚典 内皮細胞からみた糖尿病と動脈硬化 糖尿病学 1993  
小坂樹徳・赤沼安夫編 診断と治療社 pp181-202, 1993
21. 柏木厚典 フリーラジカル・NOと糖尿病性合併症 糖尿病合併症性合併症研究の最前線 ホルモンと臨床 PP103-110, 1994

# 研究成果

## - まとめ -

老化・糖尿病における動脈硬化症の発症・進展を誘導する要因として、血管壁における活性型酸素の産生と分解の調節異常が重要である。特に高血糖は、血管内皮細胞での活性酸素処理の異常をきたし、血管内皮細胞の活性化をきたす遺伝子発現が誘導され、血管機能が障害される可能性がある。高グルコース、酸化ストレス状態での血管内皮細胞のグルコース代謝異常に関して検討し、糖尿病における代謝障害による血管内皮細胞における各種細胞接着因子、MCP-1タンパクの誘導を明らかにした。

### 1) 高血糖下でのペントース燐酸経路活性化異常とグルタチオンレドックス (GR) サイクルの活性低下

高グルコース状態で培養した血管内皮細胞は、活性酸素を処理をする能力が低下していた (Kashiwagi et al Diabetes 1992、Kashiwagi et al. Diabetologia 1994)。この異常は主にGRサイクルの異常で、その最も主要な機構として五炭糖燐酸経路の活性酸素による活性化が障害されている結果NADPH供給が低下する結果であった。更に活性酸素処理系として重要なGRサイクルの活性低下による血管内皮細胞障害を報告した(Kashiwagi et al. Diabetologia 1994, Asahina et al Diabetes 1995)。これら異常は、アシドーシス状態でも認められた(Ikebuchi et al Metabolism 1993)。これら異常は各種ラジカルスカベンジャーにより改善し(Kashiwagi et al. Diabetes 1991 1991)、更にピルビン酸により是正された(kashiwagi et al Am J Physiol 投稿中)。

### 2) 高血糖状態に伴う血管内皮細胞の活性化遺伝子発現異常：高グルコース状態は浸透圧効果を介して細胞間接着因子(ICAM-1)の遺伝子発現を特異的に誘導し、VCAM-1やE-selectinの遺伝子発現には影響しなかった。この結果、血管内皮細胞への単球の接着が増強された (Taki et al. Atherosclerosis 投稿中)。しかしこの作用は酸化ストレスの亢進によるものではなかった。

### 3) 酸化LDLによる血管内皮細胞遺伝子発現異常：酸化LDLまたはその主要な構成要素であるLysoPCは血管内皮細胞で単球遊走因子MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)の遺伝子発現を増強し、MCP-1蛋白質の培養液への放出を促進した。その機構としてPKCの活性化が関与していることが明らかとなった (Takahara et al Metabolism 投稿中)。

「まとめ」以上の結果から糖尿病に伴う代謝異常（高血糖・高浸透圧・アシドーシス、脂質酸化）により、血管内皮細胞は酸化ストレスの影響を強く受け、また血管内皮細胞の各種遺伝子発現は修飾され、その結果糖尿病状態では、単球と血管内皮細胞間相互作用が増強された。このような機構は糖尿病性血管障害の発症・進展を阻止する上で示唆に富む結果である。今後血管の老化を予防するという観点から、糖尿病患者でin vivoにおける酸化ストレスを抑制する臨床的研究を行うと共に、糖尿病患者における酸化LDL濃度の検討とその是正を検討する予定である。