

平成7・8年度科学研究費補助金

研究成果報告書

基盤研究(C)(2)

糖尿病における動脈硬化症危険因子の 血管生物学:酸化ストレスと高インスリ ン血症

平成9年3月

滋賀医科大学医学部第三内科 助教授

研究代表者 柏木厚典

(研究課題番号 07671127)

目次

1. はしがき
2. 研究発表
 - (1) 学会誌
 - (2) 国際学会、国内シンポジウム発表
3. 研究成果

主要研究成果目録

(1) 高血糖／酸化ストレス／酸化LDLと血管障害

高血糖下における酸化ストレス

ーグルタチオンレドックス (GR) サイクルの活性低下ー

グルタチオン代謝異常と細胞障害

(資料1)

ペントース代謝とNADPH供給異常

(資料2)

ペントース燐酸経路とグルタチオンレドックスサイクル異常

(資料3)

フラクトースと非酵素的グリケーションと活性酸素の産生

(資料4)

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 -

(資料5)

酸化LDLによる血管内皮細胞遺伝子発現異常

- リゾホスファチジルコリンによるMCP-1mRNA誘導 -

(資料6)

患者血漿LDLによる血管内皮細胞遺伝子発現異常

- ox-LDLとNF-kB転写活性化とMCP-1mRNA発現-

(資料7)

(2) インスリン抵抗性と血管障害

A. インスリン抵抗性機構の解明

促進性及び抑制性プロテインチロシンホスファターゼ (PTPase) の意義

(資料8)

高血糖下におけるインスリン作用異常

(資料9)

インスリン感受性増強剤による高血糖下PTPase異常の改善

(資料10)

促進性PTPaseのインスリン抵抗性における意義

(資料11)

促進性PTPase作用と相互作用を示す蛋白質の同定

(資料12)

B. 血管平滑筋細胞におけるインスリン抵抗性と細胞増殖シグナル

インスリン作用とその脱感作機構

(資料13)

アミノ酸輸送系とPI3キナーゼ活性化の意義

(資料14)

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

前川聡、西尾善彦、卯木智、居出理恵、高木敬文、
高原典子、瀧秀樹、長谷川雅昭、小畑利之、
藤田俊樹、小島秀人、日高秀樹、吉川隆一
（滋賀医科大学第三内科）

研究経費

平成7年度	1,400,000円
平成8年度	900,000円
総額	2,300,000円

はしがき

糖尿病患者における動脈硬化症は、その生命予後を決定する重要な合併症である。WHO多国間共同調査の結果でも、インスリン依存型、インスリン非依存型糖尿病患者ともに冠動脈硬化症と脳血管障害の有病率は一般人口の約3-10倍高頻度で、特に女性で顕著であった。そこで本研究では、糖尿病における特徴的動脈硬化危険因子を取り上げ、その作用機構を明かにし、その予防、診断、治療法を開発する戦略を検討する事を目的とした。そこで、インスリン非依存型糖尿病に特徴的な動脈硬化症危険因子として、高血糖に関連した酸化ストレス、高インスリン血症を取り上げ、分子生物学および細胞生物学的手法を用いてその関与を検討した。

1) 高血糖/酸化ストレス/酸化LDLと血管障害について a) 高血糖と血管内皮細胞接着因子遺伝子発現異常、b) 酸化LDLの主要活性成分としてリゾフォスファチジルコリン(LPC)の意義、c) 患者血漿IDLとLDL分画中LPC、過酸化脂質、易被酸化性の検討と血管内皮細胞の遺伝子発現誘導活性、d) 細胞内情報伝達機構としてラジカル産生とそれに伴う転写因子NF- κ B活性化の証明、e) 糖尿病動物の心血管壁組織における酸化ストレス関連遺伝子発現の有無とその誘導機構を明らかにする。

2) インスリン抵抗性機構と血管平滑筋細胞の増殖 : a) 培養線維芽細胞にインスリン受容体を過剰発現させ、インスリン受容体チロシンキナーゼ及びIRS-1のチロシンリン酸化調節機構としてのプロテインチロシンフォスファターゼ(PTPase)の活性化の意義を検討した。PTPaseにはインスリン作用を抑制する抑制性PTPaseと促進性PTPaseが存在する。前者は高グルコース状態で低下するインスリン作用異常に関与し、後者はSH2ドメインを有するSHP2のインスリンの細胞内情報伝達系での意義を明らかにした。b) 血管平滑筋細胞におけるインスリン、IGF-1作用の異動を明かにし、インスリンは、生理的濃度でPI-3キナーゼ活性化、p70S6Kの活性化を介して細胞内蛋白合成促進作用により動脈硬化を促進的する可能性を明らかにした。

研究発表

欧文誌

1. Maegawa, H., S. Ugi, M. Adachi, Y. Hinoda, R. Kikkawa, A. Yachi, Y. Shigeta, 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.

2. 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.

3. 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.

- 4 . Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, Kikkawa R, Shigeta Y: Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. Diabetologia 37 (1994): 264-269
- 5 . 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
- 6 . Ide R, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A, Shigeta Y: High glucose concentration desensitizes insulin action at the levels of receptor kinase. Endocrine J 42 (1995): 1-8
- 7 . 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
- 8 . Takagi Y, Kashiwagi A, Tanaka Y, Asahina T, Kikkawa R, Shigeta Y: Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end product. J. Diab Compl 9 (1995) :87-91
- 9 . 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 44 (1995):1455-1461
10. 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 H₂O₂ in high glucose medium. Diabetes 44 (1995) 520-526
11. Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y : Glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. Diabetes 45 (Suppl) (1996)S84-S86
12. Taki H, Kashiwagi A, Tanaka Y, Horiike K: Expression of intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) via an osmotic effect in human umbilical vein endothelial cells exposed to high glucose medium. Life Science 58 (1996):1713-1721
13. Takahara N, Kashiwagi A, Maegawa H, Shigeta Y: Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells. Metabolism 45 (1996): 559-564
14. Ugi S, Maegawa H, Kashiwagi A, Adachi M, Olefsky JM, Kikkawa R: Expression of dominant negative mutant SHPTP2 attenuates phosphatidylinositol 3'kinase activity via modulation of phosphorylation of insulin receptor substrate-1. J. Biol Chem 271 (1996) 12595-12602
15. Maegawa H, Kashiwagi A, Fujita T, Ugi S, Hasegawa M, Obata T, Nishio Y, Kojima H, Hidaka H, Kikkawa R: SHPTP2 serves adapter protein linking between Janus kinase 2 and insulin receptor substrates. Biochem Biophys Res Commun 228 (1996) 122-127
16. Sugimoto T, Haneda M, Togawa M, Isono M, Shikano T, Araki S, Nakagawa T, Kashiwagi A, Guan KL, Kikkawa R: Atrial natriuretic peptide induces the expression of MKP-1, a mitogen-activated protein kinase phosphatase, in glomerular mesangial cells. J Biol Chem 271 (1996): 544-547

17. Obata T, Kashiwagi A, Maegawa H, Nishio Y, Ugi S, Hidaka H, Kikkawa R: Insulin signaling and its regulation of system A amino acid uptake in cultured rat vascular smooth muscle cells. Circ Res 79 (1996): 1167-1176

18. Takahara N, Kashiwagi A, Harada N, Kojima H, Maegawa H, Hidaka H, Kikkawa R: Oxidized lipoproteins found in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus stimulate radical-induced MCP-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. Diabetologia (in press)

出版物

1. 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

国際学会発表

1. Maegawa H, Ide R, Hasegawa M, Egawa K, Ugi S, Kashiwagi A: Activation of PTP1B induces insulin resistance. 55th Annual Meeting and Scientific Sessions. Diabetes (Suppl 1) 44 (1995): 83A

2. Takahara N, Kashiwagi A, Taki H, Nishio Y: Antiatherogenic action of HDL and cyclic AMP via modulation of MCP-1 production in vascular endothelial cells. Diabetes (Suppl 1) 44 (1995): 174A

3. Ugi S, Maegawa H, Obata T, Egawa H, Hasegawa M, Kashiwagi A: Expression of catalytically inactive mutant SHPTP2 inhibits rapamycin-sensitive S6 kinase activity. Diabetes (Suppl 1) 44 (1995): 208A

4. Obata T, Kashiwagi A, Maegawa H, Takagi Y, Ugi S, Takahara N, Shigeta Y: Insulin signalling and its desensitization in cultured vascular smooth muscle cells. Diabetes (Suppl 1) 44 (1995): 174A

5. Ugi S, Maegawa H, Fujita T, Hasegawa M, Obata T, Kashiwagi A: Jak Tyrosine kinase family associate with insulin receptor and insulin receptor substrate 1 in response to insulin. Diabetes (Suppl 2) 45 (1996) : 31A

6. Obata T, Kashiwagi A, Maegawa H, Nishio Y, Hidaka H, Kojima H, Kikkawa R: Translational control of system A amino acid uptake via PI3'-kinase in cultured rat vascular smooth muscle cells. Diabetes (Suppl 2) 45 (1996) : 63A

7. Takahara N, Kashiwagi A, Nishio Y, Harada N, Taki H, Kojima H, Hidaka H, Kikkawa R: In vivo oxidation of lipoprotein and its atherogenic activity in patients with NIDDM. Diabetes (Suppl 2) 45 (1996): 90A

8. Maegawa H, Kashiwagi A, Obata T, Egawa K, Hasegawa M, Fujita T, Ugi S, Hidaka H, Kikkawa R: Thiazolidine derivatives improve insulin resistance but not restore receptor dysfunction of epidermal growth factor in high glucose condition. Diabetes (Suppl 2) 45 (1996) : 234A

9. Kashiwagi A, Nishio Y, Takahara N, Harada N, Hidaka H, Kikkawa R: Oxidized lipoproteins found in patients with NIDDM modulate gene expression of endothelial cells through radical production. 32nd American Diabetes Association Research symposium on "Role of oxidants and antioxidant therapy in diabetic complications" Orland, Florida, 1996
10. Taki H, Kashiwagi A, Nishio Y, Takahara N, Harada N, Hidaka H, Kikkawa R: Oxidative stress-induced abnormalities in gene expression in the heart and aorta of diabetic rats. 32nd American Diabetes Association Research symposium on "Role of oxidants and antioxidant therapy in diabetic complications" Orland, Florida, 1996
11. Kashiwagi A, Maegawa H, Kikkawa R: Protein tyrosine phosphatases as stimulators and inhibitors of insulin signalling-possible candidates for insulin resistance- International symposium on "Channels, transport and regulation of metabolic state" Okazaki, Japan 1997

国内学会シンポジウム・ワークショップ

1. 柏木厚典 : 糖尿病におけるフリーラジカル産生・分解異常と血管内皮細胞障害、第37回日本糖尿病学会年次学術集会, 1994, ワークショップ
2. 柏木厚典, 前川聡、紀田康雄: 糖尿病発症における標的器官の役割—筋肉・脂肪組織における糖代謝異常による糖尿病、第29回糖尿病学の進歩, 1995, シンポジウム
3. 柏木厚典: 血管生物学からみた糖尿病の動脈硬化危険因子とそのIntervention trialへの提言、第38回日本糖尿病学会年次学術集会, 1995, ワークショップ
4. 柏木厚典: 21世紀へ向けての糖尿病の予防対策—糖尿病性血管合併症の予防—、第30回糖尿病学の進歩, 1996, シンポジウム
5. 柏木厚典: 糖尿病の血管生物学—糖尿病と酸化的ストレス—、第39回日本糖尿病学会年次学術集会, 1996, ワークショップ
6. 柏木厚典: 糖尿病と大血管障害—糖尿病のリスクマネジメント: 高血糖と動脈硬化—平成8年度日本動脈硬化学会サテライトシンポジウム, 1996
7. 柏木厚典: 糖尿病と動脈硬化症発症機構—糖尿病と酸化ストレス—第31回糖尿病学の進歩, 1997, シンポジウム

研究成果

(I) 高血糖／酸化ストレス／酸化LDLと血管障害

A) 高血糖下における活性酸素スカベンジャー機能異常

高血糖状態では、血管内皮細胞での活性酸素処理系としてのグルタチオンレドックス (GR) サイクルが低下し、活性酸素処理異常が出現する結果、血管内皮細胞障害が出現する(文献4)。このGRサイクル異常は、ペントース燐酸経路の活性化が悪く、NADPHの供給が低下していることが主要な要因となっている(文献10,11)。

B) フラクトースと非酵素的グリケーションと活性酸素の産生

高血糖状態では細胞内フルクトース濃度が増加するが、その結果 Advanced glycation End Products (AGEs)が形成される。フルクトースはグルコースに比べて効率よくAGEsを産生し、同時に蛋白をヒドロキシラジカルの産生を介して蛋白の酸化を誘導する。(文献8)

これら結果は高血糖下に活性酸素の産生亢進と分解機能の低下をきたすことを示している。その結果血管内皮細胞は、酸化ストレスに曝されることになる。

C) 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 -

一方高血糖状態では、血管内皮細胞における細胞接着因子のうちICAM-1が特異的に増加するが、これは高グルコース濃度による代謝効果ではなく高浸透圧による効果であった。しかしVCAM-1、E-selectinなどの異常は見られなかった(文献12)。

D) 酸化LDLによる血管内皮細胞遺伝子発現異常

- リゾホスファチジルコリン (LPC) によるMCP-1mRNA誘導 -

既に、LPCが血管内皮細胞におけるHB-EGF、ICAM-1などの発現を促進すると報告されているが、血漿に存在するLPC濃度にて血管内皮細胞における単球走化性因子(monocyte chemoattractant protein-1) のmRNA発現を誘導した(文献13)。

患者血漿LDLによる血管内皮細胞遺伝子発現異常

- ox-LDLとNF- κ B転写活性化とMCP-1mRNA発現-

患者血漿IDL+LDL分画中に存在する酸化LDLは血管内皮細胞MCP-1遺伝子発現を誘導する生物活性を有する。この活性は血管内皮細胞を抗酸化剤にて処理することにより完全に正常化し、またその誘導機構として転写因子NF- κ Bの活性化が関与していることが明らかとなった(文献18)。

E) 糖尿病動物の心血管壁組織における酸化ストレス関連遺伝子発現の有無とその誘導機構：糖尿病状態では、活性酸素の産生の亢進とその分解の障害にて心血管組織における酸化ストレスが亢進し、酸化ストレス関連遺伝子の発現が亢進した。これら異常は抗酸化剤の治療にて正常化した(国際学会発表10)。

(2) インスリン抵抗性と血管障害

A) インスリン抵抗性機構の解明

促進性及び抑制性プロテインチロシンホスファターゼ (PTPase) の意義

インスリンによる細胞増殖の調節は、インスリン受容体チロシンキナーゼ (IR-TK) とプロテインチロシンホスファターゼ (PTPase) により情報伝達系チロシンリン酸化蛋白のリン酸化状態にて両方向性の調節を受けている。特にPTPaseの細胞増殖における意義に関しては不明な点が多くある。近年PTPaseには受容体型と非受容体型の二種類が存在し、細胞の増殖・分化調節に重要な役割をしていると報告されている。本研究では特に、非受容体型PTPaseであるPTP1BとSHPTP2 (SHP2) について検討した。**高血糖下におけるインスリン作用異常:** 線維芽細胞にインスリン受容体を過剰発現し、高グルコース状態にて培養するとインスリン作用が減弱した、このインスリン抵抗性機構はPTP1Bの活性化によった (文献3,6)。**インスリン感受性増強剤による高血糖下PTPase異常の改善:** この高グルコース効果によるPTP1B活性化は、インスリン感受性増強剤にて正常化した (文献5)。一方、**促進性PTPaseのインスリン抵抗性における意義:** インスリン作用を促進的に調節するPTPaseとしてSHP2が存在し、このPTPaseドメインを欠損した変異遺伝子をインスリン受容体を過剰発現した線維芽細胞に導入し、インスリン作用を検討した。IRS-1 (insulin receptor substrate-1) のチロシンリン酸化が低下し、インスリン情報伝達系の障害が認められた (文献14, 15)。

B. 血管平滑筋細胞におけるインスリン抵抗性と細胞増殖シグナル

培養平滑筋細胞 (SMCs) を用いて、インスリン作用を検討した。SMCsのインスリン作用は生理的インスリン濃度にて、Shc、Ras-MAP系情報伝達は認められず、PI3-キナーゼの活性化が主な経路であった。このインスリン情報は慢性高インスリン状態にて脱感作されることが明かとなった (文献7)。このPI3-キナーゼの活性化はワルトマニンで抑制され、ラパマイシンにては抑制されない情報伝達にてアミノ酸輸送系 (A system) の活性化に関連していることが明かとなった (文献17)。