

氏名（本籍）	竹之内 康広	（愛知県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第130号	
学位授与年月日	平成21年3月16日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Functional changes in the vascular endothelium and smooth muscle in the hyperinsulinemic conditions and its improvement	

論文審査委員	主査	教授	鎌田 勝雄
	副査	教授	瀬山 義幸
	副査	教授	亀井 淳三

論文内容の要旨

【目的】

糖尿病は若年で発症するインスリン依存性糖尿病（1型糖尿病）と、中高年で発症することの多いインスリン非依存性糖尿病（2型糖尿病）とに大別され、日本人では2型糖尿病患者が約95%を占め現在も増加の一途をたどっている。2型糖尿病では、インスリン分泌不全とともに、大部分の患者でインスリン抵抗性が認められる。更に糖尿病のみならず、メタボリックシンドロームにおいては、高インスリン血症やインスリン抵抗が中心的役割をしていることが明らかにされ、血管障害との因果関係が重要である。また、このインスリン抵抗性状態では、血管弛緩機能、特に血管内皮機能障害が認められる。しかし、その詳細な機序については明確にされていない。

そこで、今回私は、1) 器官培養法を用いた血管へのインスリンによる作用機序の解明 2) インスリン抵抗性を生じる nicotinamide+streptozotocin 誘発 2型糖尿病モデルマウスによる血管弛緩機能の解明、さらにその血管機能障害に対する治療薬についても検討した。

【方法】

実験では 1) 器官培養法を用いた、糖尿病ラット摘出胸部大動脈への高インスリン処置及び 2) nicotinamide+streptozotocin 誘発 2型糖尿病モデルマウス摘出胸部大動脈により、インスリンでの血管機能を検討した。

1) 実験には、8週齢の雄性 Wistar 系ラットに streptozotocin (STZ) を尾静脈内投与し、10週経過した糖尿病ラットを用い胸部大動脈を摘出した。

器官培養には、摘出した胸部大動脈を serum-free Leibovitz' s L-15 medium を用いて 16 時間、インスリン処置培養し、その後らせん標本とし Krebs-Henseleit Solution (KHS) 中にて norepinephrine (NE) にて収縮させた後の acetylcholine (ACh)、NO ドナーによる累積弛緩反応、さらに、HPLC 法による NOx 測定、NBT 還元法による O_2^- 測定、nitrotyrosine の免疫染色、nitrotyrosine-SERCA の immunoprecipitation による測定を行った。

2) 実験には、5 週齢の雄性 ICR マウスに nicotinamide 処置後 STZ を投与することにより発症させた 2 型糖尿病モデルマウスを用いた。投与後 12 週の動物を用い糖尿病群とし、コントロール群としては同週齢の ICR 雄性マウスを用いた。Simvastatin 慢性処置は粉末飼料中に混合し、nicotinamide+STZ 投与後 8 週目から 4 週間給餌したものを simvastatin 慢性処置群とし 3 群間で比較検討した。血管反応性の検討は摘出した胸部大動脈を長さ 3mm のリング標本とし、KHS 中で等尺性に反応を記録した。Prostaglandin $F_{2\alpha}$ で tonus を一定に維持した後 sodium nitroprusside dehydrate (SNP)、clonidine、adrenomedullin による累積弛緩反応を測定した。なお、NOS 阻害薬である L-NNA、Akt inhibitor の前処置は反応測定 30 分前に処置した。また、血中パラメータは各種キットを用い、total Akt、Akt のリン酸化及び PTEN のリン酸化は western blotting 法を用いて検討した。血中パラメータは各種キット、タンパク発現はウェスタンブロット法を用いて行った。

【結果】

1) 器官培養を用いた糖尿病血管へのインスリン処置は、a) ACh による内皮依存性弛緩反応、Angeli' s salt (NO ドナー) による平滑筋弛緩反応の減弱を生じた。一方、コントロール血管では、インスリン処置による弛緩の減弱は認められなかった。b) ONOO⁻ scavenger の uric acid もしくは O_2^- scavenger の SOD 処置によって、これらの弛緩反応の減弱への効果は抑制された。c) 培養中における NOx 産生の増加が認められたが、培養後の血管への ACh 刺激による NO 産生は低下した。d) O_2^- 、nitrotyrosine (ONOO⁻) 産生の増加が認められた。e) SERCA タンパクにおける nitrotyrosine 量の増加が認められ、ONOO⁻ scavenger により抑制された。血管における SERCA の影響を検討するため、SERCA 阻害薬処置下による NO ドナーによる弛緩反応を検討した。コントロール血管の弛緩反応は減弱するが、インスリン処置した糖尿病血管においては、弛緩の減弱は認められなかった。

2) 糖尿病群ではコントロール群に比べ血中グルコース値、コレステロー

ル値及び血圧に有意な増加が見られたが、simvastatin 慢性処置により糖尿病群に比べグルコース値、コレステロール値には変化が見られなかったが血圧の低下が認められた。また、血中インスリン値は 3 群間で変化が見られなかった。PI3-K/Akt 経路を介した弛緩である clonidine 及び adrenomedullin による弛緩反応は糖尿病群で減弱が見られたが simvastatin 慢性処置により改善した。血管における Akt/eNOS pathway の影響を検討するため、NOS 阻害薬である L-NNA 及び Akt 阻害薬処置下での clonidine による弛緩を検討したところ、すべての群においてほぼ弛緩反応が消失した。また、Akt 阻害薬処置下での adrenomedullin による弛緩反応は、コントロール及び糖尿病動物に simvastatin を慢性処置した群での血管の弛緩反応は減弱するが、糖尿病血管においては、弛緩の減弱は認められなかった。Total Akt タンパク発現量、clonidine 刺激による NOx 産生量及び Akt のリン酸化は糖尿病群で減少が見られたが simvastatin 慢性処置によりコントロールレベルとなった。PI3-K/Akt 経路を抑制する因子である PTEN のリン酸化タンパクは糖尿病群で増加が見られたが simvastatin 慢性処置によっても影響が見られなかった。

【考察】

インスリン抵抗性での血管機能を検討するため、1) 器官培養を用いた糖尿病血管への高インスリン処置、つまり糖尿病でのインスリン抵抗で見られる高インスリン血症時における血管機能変化、及び 2) インスリン抵抗性を伴った 2 型糖尿病モデルマウス摘出胸部大動脈での血管機能変化及び治療について検討を行った。1) の実験より糖尿病状態の血管と高濃度のインスリンが共存する状態において、内皮依存性、非依存性弛緩反応の減弱を生じる。その原因としては、O₂⁻ と NO によって産生する ONOO⁻ 増加によって内皮 NO 産生の低下、SERCA のニトロ化による SERCA 機能不全の可能性が考えられる。2) の実験より 2 型糖尿病では血管内皮細胞による弛緩、特に Akt を介した経路に障害を生じることが示唆された。simvastatin は、血中コレステロールに影響の無い濃度において、血管弛緩反応を回復させることが示唆された。その機序として、simvastatin は Akt タンパク及び Akt のリン酸化を増加させることにより Akt の機能を回復させるが、糖尿病により増加した PTEN のリン酸化を抑制させる結果ではないことが示唆された。

以上の結果より、インスリン抵抗性によって血管弛緩機能不全、特に PI3-K/Akt pathway を介した内皮依存性弛緩反応及び NO ドナーによる平滑筋弛緩反応にも障害を引き起こすことが明らかとなった。原因としてはそれぞれ

ONOO⁻ 増加、 Akt タンパクの低下、 SERCA 機能不全の可能性が示唆され、これらがインスリン抵抗性による血管機能障害に対する治療のターゲットとなることが考えられる。その治療薬の一つとして simvastatin があることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

インスリン抵抗性や高インスリン血症は、メタボリックシンドロームにおいて中心的役割をしていることが明らかにされ、血管障害との因果関係にリンクしている。また、このインスリン抵抗性状態では、血管弛緩機能、特に血管内皮機能障害が認められる。しかし、その詳細な機序については明確にされていない。そこで、今回竹之内君は、1) 器官培養法を用いて、血管に対するインスリンの作用機序に関する検討、2) インスリン抵抗性を生じる nicotinamide + streptozotocin 誘発 2 型糖尿病モデルマウスにおける血管弛緩機能の解明、さらにその血管機能障害に対する治療薬について検討した。

1) 器官培養を用いた糖尿病血管へのインスリン処置は、a) ACh による内皮依存性弛緩反応、Angeli's salt (NO ドナー) による平滑筋弛緩反応の減弱を生じた。b) ONOO⁻ scavenger の uric acid もしくは O₂⁻ scavenger の SOD 処置によって、これらの弛緩反応の減弱への効果は抑制された。c) 培養中における NO_x 産生の増加が認められたが、培養後の血管への ACh 刺激による NO 産生は低下した。d) O₂⁻、nitrotyrosine (ONOO⁻) 産生の増加が認められた。e) SERCA タンパクにおける nitrotyrosine 量の増加が認められ、ONOO⁻ scavenger により抑制された。血管における SERCA の影響を検討するため、SERCA 阻害薬処置下による NO ドナーによる弛緩反応を検討した。コントロール血管の弛緩反応は減弱するが、インスリン処置した糖尿病血管においては、弛緩の減弱は認められなかった。

2) 2 型糖尿病モデルマウスにおいては、PI3-K/Akt 経路を介した弛緩である clonidine 及び adrenomedullin による弛緩反応の減弱が見られたが simvastatin 慢性処置により改善した。血管における Akt/eNOS pathway の影響を検討するため、NOS 阻害薬である L-NNA 及び Akt 阻害薬処置下での clonidine による弛緩を検討したところ、すべての群においてほぼ弛緩反応が消失した。また、Akt 阻害薬処置下での adrenomedullin による弛緩反応は、コントロール及び糖尿病動物に simvastatin を慢性処置した群での血管の弛緩反応は減弱するが、糖尿病血管においては、弛緩の減弱は認められなかった。Total Akt タンパク発現量、clonidine 刺激による NO_x 産生量及び Akt のリン酸化は糖尿病群で減少が見られたが simvastatin 慢性処置によりコントロールレベルとなった。PI3-K/Akt 経路を抑制する因子である PTEN のリン酸化タンパクは糖尿病群で増加が見られたが

simvastatin 慢性処置によっても影響が見られなかった。

以上の結果より、インスリン抵抗性によって血管弛緩機能不全、特に PI3-K/Akt pathway を介した内皮依存性弛緩反応及び NO ドナーによる平滑筋弛緩反応にも障害を引き起こすことが明らかとなった。原因としてはそれぞれ ONOO⁻ 増加、Akt タンパクの低下、SERCA 機能不全の可能性が示唆され、これらがインスリン抵抗性による血管機能障害に対する治療のターゲットとなることが考えられる。その治療薬の一つとして simvastatin があることが明らかとなった。

以上の結果より、本論文は、博士（薬学）の学位を授与するに相当であると判断する。