

平成 21 年 4 月 25 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790198  
 研究課題名（和文）インスリンによる糖尿病性細小血管障害促進メカニズムに関する分子生物学的研究  
 研究課題名（英文）Mechanisms underlying the insulin-induced impairment of microvascular functions in diabetic state.  
 研究代表者  
 松本 貴之（MATSUMOTO TAKAYUKI）  
 星薬科大学・薬学部・助教  
 研究者番号：30366835

研究成果の概要：インスリンを糖尿病患者に投与すると、細小血管障害に由来する合併症が悪化する場合がある。そこで、インスリンの血管機能への影響について検討した。高インスリン血症動物では、胸部大動脈にて活性酸素、peroxynitrite 増大により内皮依存性弛緩反応が減弱し、angiotensin II 増加、ETA 受容体増加、MEK/ERK pathway 亢進により endothelin-1 収縮が増大していた。2 型糖尿病動物の腸間膜動脈にて内皮由来因子のバランス変化[収縮因子(EDCF)増大、過分極因子(EDHF)減弱]が起こり、この状態から、PDE3 阻害薬、metformin、ozagrel、EPA を慢性投与することで EDHF シグナルが改善することを見いだした。EDHF シグナルは、細小血管にて重要なため、高インスリン血症、インスリン抵抗性等の 2 型糖尿病病態時の細小血管障害に対する治療戦略の一端が本研究により見いだされた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環、糖尿病、内皮機能障害、内皮由来因子、EDHF、薬物治療、エンドセリン

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性合併症の病理学的特徴は血管障害であり、内皮細胞の機能不全から始まる。細小血管機能において内皮由来過分極因子(EDHF)が重要であるが、その本体、細胞内情報伝達機構はほとんどわかっていない。一方、インスリンを糖尿病患者に投与すると、しばしば細小血管障害に由来する網膜症や他の合併症が悪化する場合が報告されている。従って、糖尿病性細小血管障害に、EDHF を介した弛緩反応の障害が深く関与していることを考えると、このメカニズムならびに、イ

ンスリンとの関連性を解明することは非常に重要である。

## 2. 研究の目的

糖尿病モデル動物にインスリンを慢性投与したモデル、インスリン抵抗性モデル、高脂血症モデル、高血圧モデル動物における血管反応性を EDHF シグナリング系に焦点を絞り解析を行う。また、同時にこれらの動物における血管収縮性等を検討することによって、EDHF との関連性を薬理学・生理学・生化学・分子生物学的手法を駆使して多角的に検討

する。

### 3. 研究の方法

高インスリン血症モデルラット、2型糖尿病モデルラット及びこれらの動物に対し、様々な薬物[phosphodiesterase 3 (PDE3)阻害薬である cilostazol、metformin、thromboxane A2 合成酵素阻害薬である ozagrel、eicosapentaenoic acid (EPA)、angiotensin 受容体拮抗薬 losartan、インスリン抵抗性改善薬 pioglitazone]を慢性的に投与し、腸間膜動脈リング標本において、血管収縮性・拡張性について EDHF シグナリングを中心に、薬理的・生理学的手法を用いて検討した。具体的には、アセチルコリン (ACh)等による EDHF 様弛緩反応の検討、内皮依存性収縮反応、endothelin-1 (ET-1)による反応などについて検討した。同様に、胸部大動脈螺旋標本においても検討を行うことで、血管部位による差違について明らかとした。血管反応において特に重要な機能蛋白の蛋白発現変化、リン酸化状態、およびその活性について western blot 法、免疫染色法、生化学的手法を用いて検討した。全ての動物に対して、各種血中パラメータ[血糖値、コレステロール値、NO 代謝物、アディポサイトカイン量、ET-1 量、angiotensin II (Ang II)量など]も測定し、これらの変動との関連性についても検討した。

### 4. 研究成果

(1) 糖尿病モデルラット胸部大動脈に高濃度のインスリンを暴露すると、過剰な活性酸素、ならびにperoxynitriteが産生し、これらが、sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 活性を低下させその結果内皮依存性弛緩反応を減弱させることを明らかとした。

(2) ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルラットに対してインスリン抵抗性改善薬のピオグリタゾン慢性投与することによる内皮依存性弛緩反応への影響について検討したところ、ピオグリタゾン慢性投与によって、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応及びNOシグナリングが改善すること、SOD活性増加、NAD(P)H oxidase活性低下といった、血管における酸化ストレスを軽減させること、さらには、AP-1シグナリング抑制によるET-1産生低下を引き起こすことを明らかとした。

(3) 2型糖尿病モデルラット(OLETFラット)脳底動脈において、内皮依存性弛緩反応が減弱し、これはNAD(P)H oxidase活性増大に伴った活性酸素増大によりNOバイオアベイラビリティが低下することによることを明らかとした。

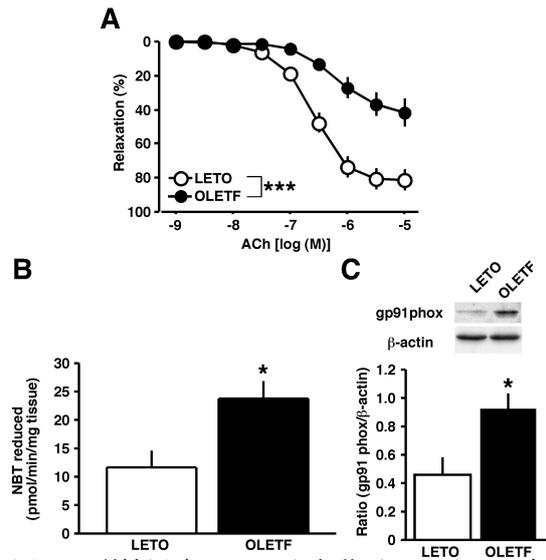


図1 2型糖尿病ラット脳底動脈におけるA.内皮依存性弛緩反応、B.活性酸素産生、C. gp91phox [NAD(P)H oxidase component]発現の検討。

(4) 2型糖尿病モデルラット(OLETFラット)腸間膜動脈において、内皮由来因子のバランスの変化[収縮因子(EDCF, 血管収縮性 prostanoids)増大、弛緩因子(EDHF)減弱]を明らかとした。血管収縮性prostanoid産生増大は、cyclooxygenase (COX)-1、-2レベルの増大に起因し、この不均衡性は酸化ストレスの増大に起因している可能性を明らかとした。

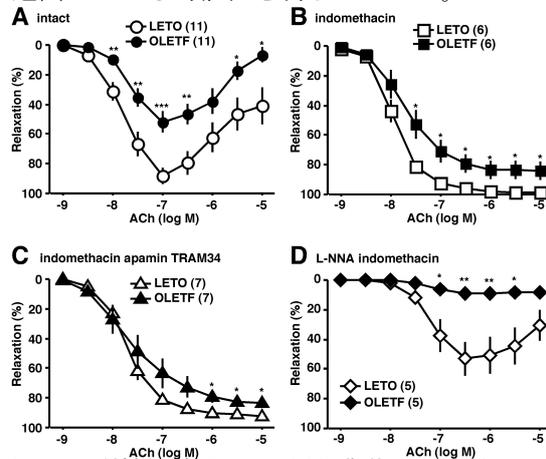


図2 2型糖尿病ラット腸間膜動脈におけるACh誘発内皮依存性弛緩反応。A. OLETF群で減弱。ACh高濃度側での収縮は、Bで見られる様にindomethacin (COX阻害薬)で消失。C. NOによる弛緩反応。D. EDHF弛緩反応。OLETF群で著明に減弱。

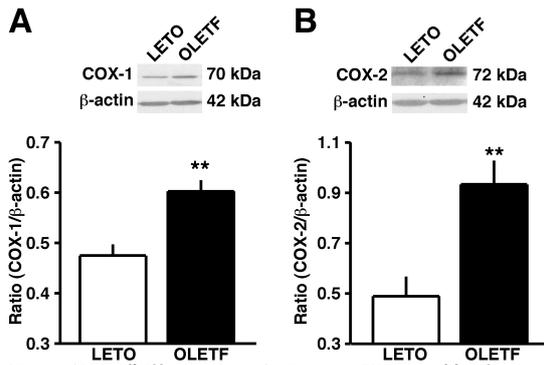


図3 腸間膜動脈におけるCOX発現の検討。OLETF群にてCOX発現の増大が認められた。

(5) STZ ラットに対し、インスリンを慢性投与して高インスリン血症糖尿病モデルを作成し、胸部大動脈の ET-1 収縮の検討を行った。本モデルにて、ET-1 反応性が増大し、これは、Ang II 増加による、ETA receptor 増加、MEK/ERK pathway 亢進が原因であることを明らかとした。

(6) 2型糖尿病モデルの GK ラット腸間膜動脈において、ET-1 収縮反応性が増大し、これには、endothelin 受容体の upregulation, MEK/ERK pathway の亢進が関与していることを明らかとした。

(7) 2型糖尿病モデルの OLETF ラット腸間膜動脈にて、内皮由来因子バランス変化(EDHF 低下、EDCF 増大)を(4)より見いだしていたが、この異常が起こっている動物に対して、薬物を慢性投与して改善効果を検討した。① Cilostazol (EDCF 変化なし。cAMP/PKA pathway 改善によって EDHF 改善)。② Metformin [EDCF 産生(血管収縮性 prostanoids)抑制。EDHF 改善、血管における活性酸素産生減少]。③ EDCF の成分であるトロンボキサン A2 合成酵素阻害薬(ozagrel)で EDHF 改善。④ EPA [EDCF 産生抑制、EDHF 改善。ERK 活性抑制、NF-kappaB 活性抑制により COX2 発現低下]。これらの薬物投与によって EDHF シグナルが改善することが明らかとなった。

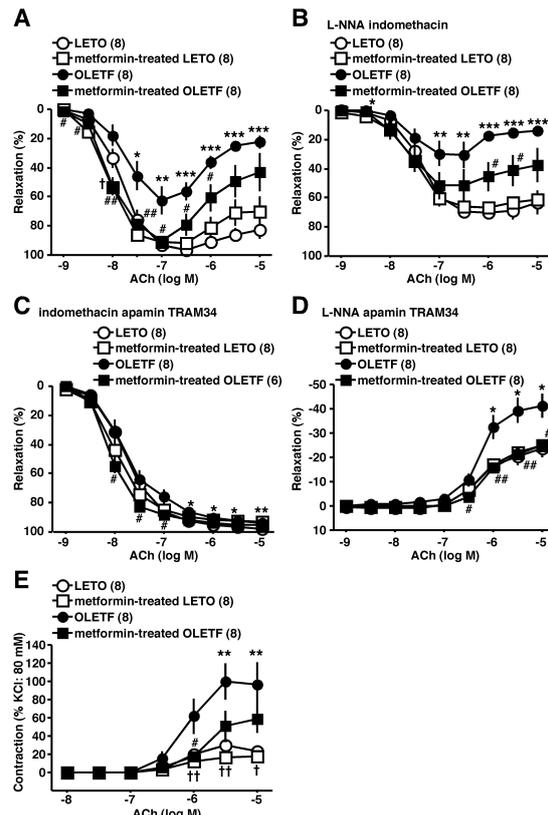


図4 2型糖尿病ラット(OLETF)腸間膜動脈における metformin 慢性投与の影響。A.内皮依存性弛緩反応。B. EDHF 弛緩反応。C. NO による弛緩反応。D. COX による反応。E. EDCF による反応。Metformin 慢性投与によって EDHF の改善、EDCF の抑制が認められた。

以上の研究結果より、高インスリン血症病態あるいはインスリン抵抗性病態をはじめとする、糖尿病性血管障害に対して、酸化ストレスが主要な機能障害の原因であることを明らかとし、これらのターゲットの幾つかを分子レベルで明らかとした。(4)の研究と合わせて考えると、細小血管障害においても酸化ストレスが深く関与していることが考えられ、酸化ストレス産生源となる因子、及びこれらのターゲット因子を調節することによって、細小血管障害を改善することが出来る可能性を見いだした。さらに、高インスリン血症あるいはインスリン抵抗性病態を基盤とする血管障害に対して、Ang II や、ET-1 が異常を引き起こす原因であることを明らかとし、それに関連する情報伝達因子についても明らかとした。また、2型糖尿病ラット腸間膜動脈にて EDHF 障害が起こっている状態から、PDE3 阻害薬、metformin、ozagrel、EPA を慢性投与することで EDHF シグナルが改善することが明らかとなり、EDCF が EDHF シグナルを抑制していることを見いだした。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Takenouchi Y, Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis*. 2009 Mar 19 [Epub ahead of print] in press. 査読有
- ② Matsumoto T, Ishida K, Nakayama N, Kobayashi T, Kamata K. Involvement of NO and MEK/ERK pathway in enhancement of endothelin-1-induced mesenteric artery contraction in later-stage type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Mar 13 [Epub ahead of print] in press. 査読有
- ③ Matsumoto T, Takaoka E, Ishida K, Nakayama N, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K. Abnormalities of endothelium-dependent responses in mesenteric arteries from Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats are improved by chronic treatment with thromboxane A<sub>2</sub> synthase inhibitor. *Atherosclerosis*. 2008 Nov 25. [Epub ahead of print] in press. 査読有
- ④ Matsumoto T, Nakayama N, Ishida K, Kobayashi T, Kamata K. Eicosapentaenoic acid improves imbalance between vasodilator and vasoconstrictor actions of endothelium-derived factors in mesenteric arteries from acts at chronic stage of type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 329:324-334, 2009. 査読有
- ⑤ Takenouchi Y, Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. Possible involvement of Akt activity in endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. *J Pharmacol Sci*. 106:600-608, 2008. 査読有
- ⑥ Matsumoto T, Kakami M, Kobayashi T, Kamata K. Gender differences in vascular reactivity to endothelin-1 (1-31) in mesenteric arteries from diabetic mice. *Peptides*. 29:1338-1346, 2008. 査読有
- ⑦ Matsumoto T, Noguchi E, Ishida K, Kobayashi T, Yamada N, Kamata K. Metformin normalizes endothelial function by suppressing vasoconstrictor prostanoids in mesenteric arteries from OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295:H1165-H1176, 2008. 査読有
- ⑧ Matsumoto T, Noguchi E, Ishida K, Nakayama N, Kobayashi T, Kamata K. Cilostazol improves endothelial dysfunction by increasing

- endothelium-derived hyperpolarizing factor response in mesenteric arteries from Type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 599:102-109, 2008. 査読有
- ⑨ Kobayashi T, Nogami T, Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K. Diabetic state, high plasma insulin and angiotensin II combine to augment endothelin-1-induced vasoconstriction via ETA receptors and ERK. *Br J Pharmacol*. 155:974-983, 2008. 査読有
- ⑩ Kamata K, Ozawa Y, Kobayashi T, Matsumoto T. Effect of long-term streptozotocin-induced diabetes on coronary vasoconstriction in isolated perfused rat heart. *J Smooth Muscle Res*. 44: 177-188, 2008. 査読有
- ⑪ Matsumoto T, Kakami M, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K. Imbalance between endothelium-derived relaxing and contracting factors in mesenteric arteries from aged OLETF rats, a model of Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H1480-H1490, 2007. 査読有
- ⑫ Kobayashi T, Taguchi K, Takenouchi Y, Matsumoto T, Kamata K. Insulin-induced impairment via peroxynitrite production of endothelium-dependent relaxation and sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase function in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 43:431-443, 2007. 査読有
- ⑬ Matsumoto T, Kobayashi T, Wachi H, Seyama Y, Kamata K. Vascular NAD(P)H oxidase mediates endothelial dysfunction in basilar arteries from Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Atherosclerosis*. 192:15-24, 2007. 査読有
- ⑭ Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K. Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 42:993-1007, 2007. 査読有

[学会発表] (計 27 件)

1. 松本貴之、各務実花、小林恒雄、鎌田勝雄 2 型糖尿病ラット腸間膜動脈における内皮由来因子の不均衡性 第 49 回日本平滑筋学会総会 2007. 7. 4-6 橿原ロイヤルホテル (奈良)
2. 小林恒雄、田口久美子、松本貴之、鎌田勝雄 高インスリン血症によって誘発される血圧、ET-1 収縮増加に関する血中 AngII と糖尿病の影響 第 49 回日本平滑筋学会総会

2007. 7. 4-6 榎原ロイヤルホテル(奈良)
3. 松本貴之、各務実花、小林恒雄、鎌田勝雄 糖尿病ラット摘出腸間膜動脈の内皮機能不全に対する酸化ストレスの関与 第51回日本薬学会関東支部大会 2007. 10. 6 星薬科大学
  4. 各務実花、松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 糖尿病マウス腸間膜動脈におけるエンドセリン-1収縮に対する性差の影響 第51回日本薬学会関東支部大会 2007. 10. 6 星薬科大学
  5. 竹之内康広、小林恒雄、松本貴之、鎌田勝雄 2型糖尿病モデルマウスの胸部大動脈における simvastatin 慢性処置による内皮細胞機能の検討 第51回日本薬学会関東支部大会 2007. 10. 6 星薬科大学
  6. 小林恒雄、田口久美子、竹之内康広、松本貴之、鎌田勝雄 糖尿病血管を用いたインスリンによるニトロ化 SERCA の増加と弛緩反応の減弱 第17回日本循環薬理学会 2007. 11. 30 大阪大学医学部銀杏会館
  7. 松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 2型糖尿病ラット腸間膜動脈の内皮機能障害に対する AMP-activated protein kinase の関与 第17回日本循環薬理学会 2007. 11. 30 大阪大学医学部銀杏会館
  8. 松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 2型糖尿病ラット腸間膜動脈における内皮細胞機能変化に対する AMP キナーゼ刺激効果 第81回日本薬理学会年会 2008. 3. 17-19 パシフィコ横浜
  9. 竹之内康広、小林恒雄、松本貴之、鎌田勝雄 2型糖尿病モデルマウスの内皮障害に対する losartan、simvastatin 慢性処置による改善メカニズムの違い 第81回日本薬理学会年会 2008. 3. 17-19 パシフィコ横浜
  10. 各務実花、松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 糖尿病マウス腸間膜動脈におけるエンドセリン収縮に対する性差の影響 第81回日本薬理学会年会 2008. 3. 17-19 パシフィコ横浜
  11. 小林恒雄、田口久美子、松本貴之、鎌田勝雄 糖尿病ラットとインスリン処置における胸部大動脈の血管弛緩反応の変化と Akt pathway の関与について 第81回日本薬理学会年会 2008. 3. 17-19 パシフィコ横浜
  12. 松本貴之、小林恒雄、山田信博、鎌田勝雄 2型糖尿病ラット摘出腸間膜動脈の血管内皮細胞機能変化に対する AMP キナーゼ刺激効果 第51回日本糖尿病学会年次学術集会 2008. 5. 22-24 東京国際フォーラム
  13. 竹之内康広、小林恒雄、松本貴之、鎌田勝雄 2型糖尿病モデルマウスにおける血管障害に対する治療 第118回日本薬理学会関東支部会 2008. 6. 7-8 星薬科大学
  14. 松本貴之 Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. 第50回日本平滑筋学会総会 2008. 7. 2-4 ホテルニューキャッスル(青森県弘前市)
  15. 小林恒雄、田口久美子、根本真吾、松本貴之、鎌田勝雄 糖尿病時のインスリン欠乏と過剰時における血管弛緩反応の変化を Akt/NOS pathway の関与について 第50回日本平滑筋学会総会 2008. 7. 2-4 ホテルニューキャッスル(青森県弘前市)
  16. 竹之内康広、小林恒雄、松本貴之、鎌田勝雄 糖尿病性血管障害に対する losartan 及び simvastatin による治療効果 第50回日本平滑筋学会総会 2008. 7. 2-4 ホテルニューキャッスル(青森県弘前市)
  17. 石田恵子、松本貴之、中山直亮、高岡絵里、小林恒雄、鎌田勝雄 2型糖尿病モデルラット腸間膜動脈における endothelin-1 収縮の増強メカニズム 第119回日本薬理学会関東支部会 2008. 10. 4 主婦会館プラザエフ(千代田区)
  18. 松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 エイコサペンタエン酸慢性投与は2型糖尿病ラット腸間膜動脈の内皮由来因子のバランス異常を改善する 第18回日本循環薬理学会 2008. 11. 21 京成ホテルミラマーレ(千葉市)
  19. 小林恒雄、根本真吾、田口久美子、松本貴之、鎌田勝雄 高インスリン血症糖尿病動物における PDK1/Akt/NOS pathway の低下とロサルタン慢性投与の影響 第38回日本心脈管作動物質学会 2009. 2. 6 岡山大学創立五十周年記念館
  20. 松本貴之、石田恵子、小林恒雄、鎌田勝雄 2型糖尿病モデルラット腸間膜動脈における endothelin-1 収縮に対する MEK/ERK pathway の関与 第38回日本心脈管作動物質学会 2009. 2. 6 岡山大学創立五十周年記念館
  21. 松本貴之、中山直亮、石田恵子、小林恒雄、鎌田勝雄 EPA 慢性投与は2型糖尿病ラット腸間膜動脈における内皮細胞機能障害を改善する 第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18 パシフィコ横浜
  22. 小林恒雄、田口久美子、根本真吾、松本貴之、鎌田勝雄 ロサルタンは高インスリン血症糖尿病動物における PDK/Akt pathway を介した血管弛緩反応の減弱を改善する 第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18 パシフィコ横浜
  23. 石田恵子、松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 2型糖尿病モデルラット腸間膜動脈における endothelin-1 収縮の増強メカニズム 第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18 パシフィコ横浜
  24. 小澤遊太、松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 糖尿病ラット摘出心臓灌流標本を用いた冠動脈収縮反応の検討 第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18 パシフィコ横浜
  25. 根本真吾、小林恒雄、田口久美子、松本貴之、鎌田勝雄 糖尿病時の内皮依存性血管弛緩反応における PDK1/Akt/eNOS pathway の関与と血中インスリン値の影響 第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18 パシフィコ横浜
  26. 高岡絵里、松本貴之、小林恒雄、鎌田勝雄 2型糖尿病ラット腸間膜動脈の内皮機能障害に対する トロンボキサン合成酵素阻害薬慢性投与の影響 第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18 パシフィコ横浜
  27. 竹之内康広、小林恒雄、松本貴之、鎌田勝雄 マウス摘出胸部大動脈における加齢による血管内皮機能の性差 第82回日本薬理学会年会 2009. 3. 16-18 パシフィコ横浜
6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 貴之 (MATSUMOTO TAKAYUKI)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号 30366835

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者