

令和元年5月22日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26460346

研究課題名(和文) 糖尿病におけるインスリン治療が引き起こす高血圧症の原因解明と回避方法に関する研究

研究課題名(英文) Mechanisms of insulin treatment-induced hypertension in diabetes mellitus

研究代表者

野部 浩司 (Nobe, Koji)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30276612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは唯一の血糖降下ホルモンであり、糖尿病における血糖コントロールに重要な役割を果たしている。このインスリン治療開始時に血圧上昇が起こる可能性が指摘されているが、その詳細については明らかとなっていない。本研究では、モデルマウスを用いてインスリン投与による血圧上昇現象を確認し、その反応が糖尿病病態下のみにおいて引き起こされることを見出した。さらにそのメカニズムについて検討を行い、末梢血管における血管平滑筋の過収縮が原因となっており、そこに細胞内の rho kinase 経路の活性化が関与する事を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、糖尿病治療で汎用されているインスリン治療が、患者の血圧を上昇させる可能性について着目しており、そのメカニズムを解明することにより、インスリン導入時の血圧上昇リスクを軽減することに貢献すると考えられる。特に糖尿病患者には高血圧症を併発している場合が多く、今後の高齢化社会においてその学術的価値は高まると予想される。

研究成果の概要(英文)：Insulin is widely used for a control of blood glucose level in diabetic patients. It is pointed out that a possibility of the insulin-treatment enhances blood pressure in diabetes, however, details of the mechanisms have not been understood. In this study, we confirmed the insulin-dependent enhances of blood pressure in streptozocin-induced diabetic mouse. This secondary-hypertension was detected only in diabetic mouse, time- and dose-dependent manners. As the mechanism of the enhancement, we revealed that the rho A mediated pathway is involved in the hypertension without mediating by dysfunctions of vascular endothelial cells and NO-mediated pathway. These findings suggests that the insulin influences an intercellular signaling pathway in vascular smooth muscle cells.

研究分野：薬理学

キーワード：糖尿病 高血圧症 インスリン 血管平滑筋 血管内皮細胞 rho A

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は国内外にかかわらず増加傾向を示しており、特に国内では糖尿病患者の高齢化や治療期間の長期化も進んでいる。インスリンによる血糖コントロールを目的とした治療は、1型糖尿病患者だけでなく、2型糖尿病患者においても用いられている。中でもインスリン分泌促進剤等を長期間服用することにより膵臓が疲弊してインスリン産生能が低下する患者には、インスリン投与が不可欠となっている。

## 2. 研究の目的

インスリンによる糖尿病患者の治療は、血糖コントロールに有益であるが、一部の糖尿病患者では血圧が上昇する現象が知られている (Kawasaki et al., 2000; Tseng, 2006)。このインスリンによる血糖上昇に関しては、明確な根拠やメカニズムについて明らかとされていない。

本研究の目的は、ヒトと同様にインスリン誘発の血圧上昇を引き起こすモデルを確立し、それを用いてインスリンによる血圧上昇メカニズムを解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

実験動物は ddY 系雄性マウス (5 weeks old) を使用した。動物の飼育は昭和大学動物管理室にて行った。飼育期間中は  $23 \pm 1$  °C、12 時間の明暗サイクル環境下で飼育した。飼料は一般飼育用飼料 (オリエンタル酵母社製) を制限無く与えた。順化期間中 (3 日~7 日間) は、水と飼料を制限無く与えた。

### (2) 実験的糖尿病モデルマウスの作成法

順化した ddY 系雄性マウス (5 weeks old) に 100 mg/Kg Streptozocin (STZ) を腹腔内投与した (Lai and Lo, 2013)。投与後 24 時間以降血糖値を測定した。測定にはヒト用グルコース測定キットであるメディセーフミニ (テルモ社製) を用いて行った。STZ 投与後 6 日後に血糖値が 400 mg/dL 以上を示す動物を糖尿病発症動物として使用した。

### (3) インスリン処置法

インスリン処置群には、インスリン (Humalin R 100) を生理食塩水に希釈し、 $0.1 \sim 1.0$  mUnits/g body weight となるように腹腔内投与した (27G 注射針使用)。投与は STZ 投与 6 日後より開始し、1 日 1 回行った。対照群 (Control mouse) には生理食塩水のみを投与した。

### (4) 血圧および血中インスリン濃度測定法

各処理を行ったマウスの血圧を定期的に測定した。収縮期および拡張期血圧の測定には、非観血血圧測定装置 (Softtron 社製 BP-98A-L) を使用し、尾部を用いて無麻酔条件下にて行った。

### (5) マウス由来の腸管脈動脈収縮応答測定法

マウスより腸間膜動脈第二分枝 (Mesenteric artery 2<sup>nd</sup> branch: MA2) を摘出し、生理的塩類溶液中 (PSS) 中で発生張力変化を測定した (Nobe et al., 2006)。PSS には、137 mM NaCl、4.73 mM KCl、1.2 mM MgSO<sub>4</sub>、0.025 mM EDTA、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>、11.1 mM glucose を含み、25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>、95 % O<sub>2</sub> および 5 % CO<sub>2</sub> の混合ガスの通気により pH 7.4 となるように調整し、 $37.0 \pm 0.2$  °C に恒温した。この組織を 30 分から 1 時間 PSS 中で平衡化して以後の測定に使用した。摘出した血管組織を、直径約 100 μm、幅 1.5 ~ 2 mm のリング標本として張力測定装置に懸垂した。この装置は血管内腔に差し込んだピックアップワイヤーの一端が張

カトランスデューサーに直結し、他方は三次元方向に動くマイクロマニピュレーターに直結した。ここで得られた信号はアンプ (ラボサポート、Osaka, Japan) で増幅され、Power Lab (Power Lab 4/25 ML845、ADInstruments) でアナログ信号をデジタル信号化後、Chart Software (AD Instrument Japan 社、Tokyo, Japan) にて検出・記録した。また、結果は血管組織の幅 1 mm 当たりの発生張力 (mN/mm tissue)を比較した。

#### (6) データー解析法

結果はすべて Ave  $\pm$  SEM で表示した。有意差の検定は、one-way analysis of variance (ANOVA) と SNK-test を用いて行った。危険率 5 % ( $p < 0.05$ ) 以下の場合を有意差とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 実験的糖尿病モデルマウスによるインスリン誘発血圧上昇現象の検出

ヒトで認められるとされるインスリン誘発の血圧上昇現象を実験的に再現することを目的とし、糖尿病モデルマウスを用いて検討を行った。検討には、STZ 誘発 1 型糖尿病モデルに加えて 2 型糖尿病マウスとして KK-Ay マウスや、*ob/ob* マウスを用いた。これらマウスについて、0.75 mUnits/g body weight のインスリン投与を 7 日間行ったところ、特に STZ 誘発糖尿病マウス (STZ mouse) で顕著な血圧上昇現象が認められた。対象となる正常マウス (ddY mouse) における平均血圧は、108.9  $\pm$  7.11 mmHg であり、インスリン投与を行っても変化が認められなかった (107.0  $\pm$  2.91 mmHg)。これに対して STZ mouse の平均血圧は、108.9  $\pm$  4.89 mmHg であり、インスリン投与を行った STZ mouse (STZ+Ins mouse) は、137.7  $\pm$  11.07 mmHg (n=5) に有意に増加した。この血圧上昇現象は、インスリン投与 2 日目以降から有意に認められた (Fig. 1-A)。また、インスリン投与量についても 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 mUnits/g body weight の範囲内において 0.75 mUnits/g body weight を最大とする用量依存性が認められた (Fig. 1-B)。これらの検討により、インスリン投与により血圧上昇現象が生じることが確認され、この血圧上昇は糖尿病病態下のみで生じることが明らかとなった。

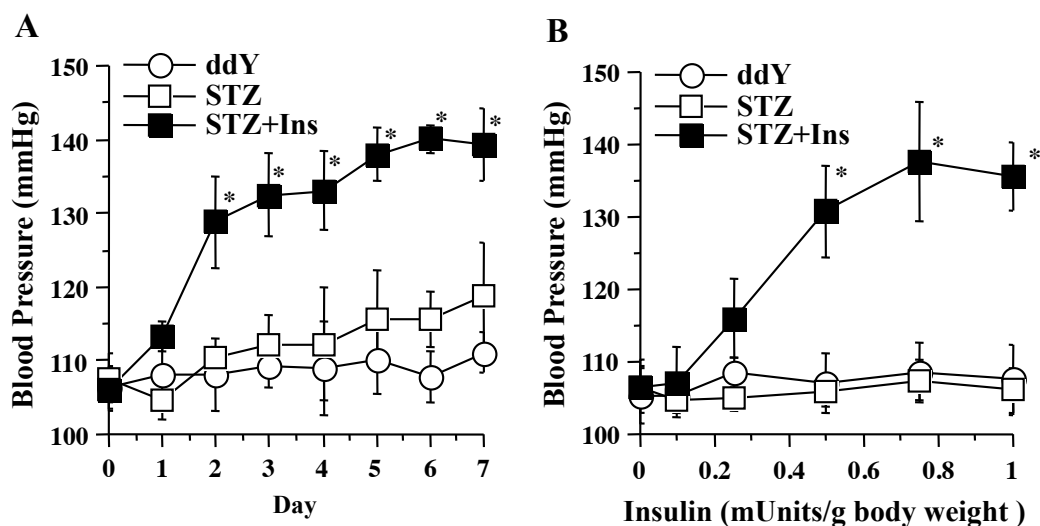


Fig. 1 インスリン処理による血圧への経時的・用量依存的影響

雄性 ddY マウス (O) に実験方法に従い、100 mg/Kg STZ 処理を行い糖尿病モデルマウス (□) を作成した。インスリンは、0.75 mUnits/g body weight (A)、もしくは 0.1~1.0 mUnits/g body weight (B) となるように 1 日 1 回腹腔内投与した (■)。各群のマウスの血圧を経時的 (A) および インスリン用量依存的 (B) に測定した。結果は、平均値  $\pm$  標準誤差 (n=5) で示し、ddY mouse に対して 5 % 以下の危険率を有意差とした。

## (2) インスリン誘発血圧上昇現象と末梢血管収縮応答の関連性

糖尿病病態下にて認められるインスリン誘発の血圧上昇現象について、糖尿病で生じることが報告されている血管内皮細胞の機能異常が関与しているか明らかにする目的で、各マウスより腸間膜動脈第二分枝を摘出してその収縮応答性を測定した。その結果、受容体刺激を介さない 50 mM KCl は、正常マウスにおいて静止状態 ( $1.10 \pm 0.10 \mu\text{N}/\text{mm tissue}$ ) から  $5.46 \pm 0.59 \mu\text{N}/\text{mm tissue}$  ( $n=5$ ) へ増加させたが、この上昇は STZ mouse においてもほぼ同様に認められ、さらに  $0.75 \text{ mUnits}/\text{g body weight}$  インスリン処理によっても影響を受けなかったことから、糖尿病およびインスリン処理は、腸間膜動脈の血管平滑筋に本質的なダメージを与えていないことが確認された。10  $\mu\text{M}$  phenylephrine (PE) 処理は、正常マウスの腸間膜動脈第二分枝において 50 mM KCl 誘発収縮を 100 % とすると  $121.7 \pm 8.8 \%$  ほど強い発生張力を引き起こしたが、この値はインスリン処理によって影響を受けなかった。STZ mouse においては、10  $\mu\text{M}$  PE 誘発張力上昇は  $132.0 \pm 9.0 \%$  であったが、インスリン処理を行った STZ mouse では  $204.7 \pm 14.8 \%$  と顕著に増加していた。この結果は、インスリン処理による血圧上昇現象と一致した変化であり、糖尿病病態下に認められる血圧上昇現象が、血管の過収縮によって引き起こされていることが示唆された。

## (3) インスリン誘発血圧上昇現象に対する血管内皮細胞機能障害の関与

糖尿病マウスにおけるインスリン誘発の血圧上昇現象への血管内皮細胞由来の NO を介した弛緩反応の関与について検討を行った (Goligorsky, 2017)。それぞれの処理を行ったマウスより、腸間膜動脈第二分枝を摘出し、10  $\mu\text{M}$  PE 誘発の持続的収縮に対して 1 nM~10  $\mu\text{M}$  ACh を累積的に適用して弛緩反応を比較した。しかしながら、ACh による弛緩反応について糖尿病およびインスリン処理により弛緩反応が著しく減弱する現象は認められなかった。従って、インスリンによる腸間膜動脈第二分枝の過収縮には、NO を介した弛緩経路の障害は含まれないと判断された。

## (4) インスリン誘発血圧上昇現象に対する細胞内情報伝達系の関与

インスリン処理による腸間膜動脈第二分枝の過収縮が発生するメカニズムを明らかにするため、血管平滑筋収縮に不可欠とされるカルシウムイオン動員機構について検討を行った。10  $\mu\text{M}$  PE 誘発の持続的収縮に対して 10 nM~1  $\mu\text{M}$  Nicardipine (Nic) を累積的に適用して弛緩反応を比較した。しかしながら、Nic による弛緩反応について糖尿病およびインスリン処理の影響は認められなかった。従って、インスリンによる過収縮状態では細胞内へのカルシウム動員機構に大きな影響は生じていないと考えられた。

血管平滑筋の収縮現象は、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) を介するミオシンリン酸化の経路 (収縮傾向) と、ミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) を介したリン酸化ミオシンの脱リン酸化反応 (弛緩傾向) のバランスによって調節されている。そこで MLCK 阻害薬である staurosporine (ST) および MLCP をリン酸化して不活化する rho kinase の阻害薬である Y27632 を用いて検討を行った (Fig. 2)。その結果、インスリン投与をした STZ mouse における過収縮現象は、ST および Y27632 により有意に抑制された。しかしながら、正常およびインスリン投与を行った ddY マウスでは、糖尿病病態下のような顕著な抑制は認められなかった。

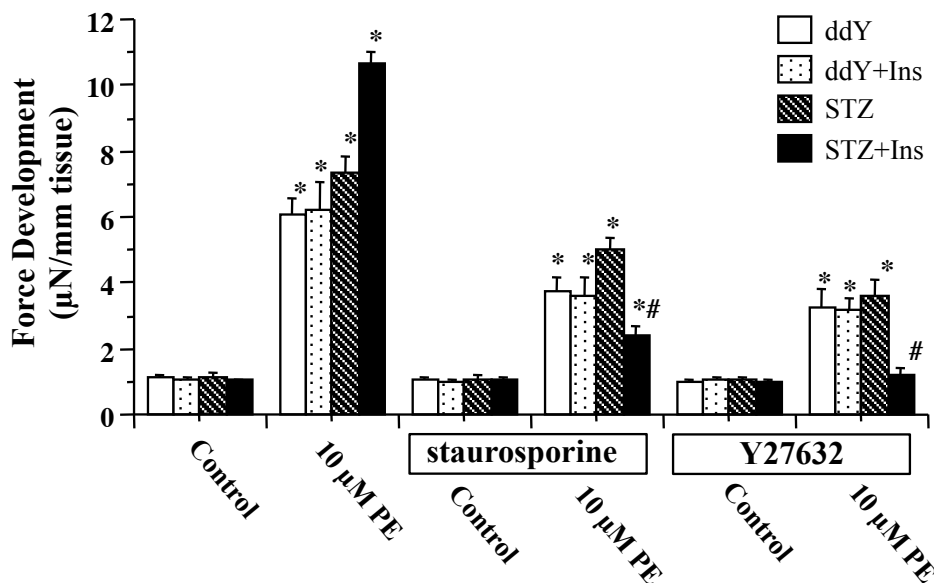


Fig. 2 インスリン誘発腸間膜動脈平滑筋過収縮への阻害薬処理の影響

実験方法に従い調整した各群のマウスより、腸間膜動脈第二分枝を摘出した。標本の応答性を 50 mM KCl にて確認後、1 μM staurosporine および 1 μM Y27632 存在、非存在下で 10 μM PE 刺激を行った。得られた発生張力より、血管組織 1 mm あたりの張力 (μN) を算出した。結果は、平均値 ± 標準誤差 (n=5) で示し、\* は、PE 無刺激時に対して、# は、阻害薬未処理の PE 刺激時に対して 5% 以下の危険率で有意差があることを示す。

特に Y27632 の前処理は、腸間膜動脈第二分枝の過収縮をほぼ完全に抑制したことから、糖尿病病態下におけるインスリンによる過収縮現象には、rho kinase を介した経路の過剰反応が原因となっている事が強く示唆された。同様に rho kinase 経路に関連するとされる protein kinase C (PKC) の阻害薬においても類似した結果が認められた。

#### (5) まとめ

本研究では、糖尿病病態下においてインスリン治療により引き起こされる血圧上昇反応を再現するモデル動物を設定し、この血圧上昇現象が糖尿病病態下においてのみ発生することを確認した。さらにこの現象には、糖尿病によりダメージを受ける事が知られている血管内皮細胞機能や血管平滑筋の基本的な収縮能、カルシウム動員機構などには影響していないことを見だし、血圧上昇の原因となる末梢血管の過剰収縮に細胞内の rho kinase 経路や MLCK を介した経路の変化が関与していることが示唆された。

これらの知見は、糖尿病患者で、特に高血圧症を併発している糖尿病患者へのインスリン治療開始時に、血圧上昇のリスクを改善するための基礎的知見になると考えられる。

#### <引用文献>

- Goligorsky MS (2017) Vascular endothelium in diabetes. *American journal of physiology Renal physiology* **312**:F266-f275.
- Kawasaki H, Kuroda S and Mimaki Y (2000) [Vascular effects of insulin]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **115**:287-294.
- Lai AK and Lo AC (2013) Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison.

*Journal of diabetes research* **2013**:106594.

Nobe K, Hagiwara C, Nezu Y and Honda K (2006) Distinct agonist responsibilities of the first and second branches of mouse mesenteric artery. *Journal of cardiovascular pharmacology* **47**:422-427.

Tseng CH (2006) Exogenous insulin use and hypertension in adult patients with type 2 diabetes mellitus. *Archives of internal medicine* **166**:1184-1189.

## 5. 主な発表論文等

現在、公表準備中である。

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 竹之内 康広

ローマ字氏名: (TAKENOUCHI, yasuihiro)

所属研究機関名: 城西大学

部局名: 薬学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 3240360323

研究分担者氏名: 加園 恵三

ローマ字氏名: (KASONO, keizo)

所属研究機関名: 城西大学

部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 3240360320

### (2) 研究協力者

なし