

—平成14年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

インスリン抵抗性改善薬・塩酸ピオグリタゾンのレドクス 恒常性維持機構

足立哲夫

1. 緒言

糖尿病は21世紀にその対策が最も急がれる生活習慣病と位置づけられている。特に、高齢化社会の到来と共にインスリン抵抗性から糖尿病に移行する比率が高まり、本疾患に対する医療費は爆発的に増大することが予想されている。平成9年に発売されたインスリン抵抗性改善薬トログリタゾン¹は、本疾患患者の福音となったが、副作用として重篤な肝障害による死亡例が報告され、平成12年3月に自主的販売停止に至っている。そのため、現在では塩酸ピオグリタゾンが唯一のインスリン抵抗性改善薬として使用されている。インスリン抵抗性は脂肪細胞の肥大化や萎縮により発症することが知られており¹⁾、その脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンがインスリン抵抗性の診断の指標になることが報告されている。また、このアディポネクチンが糖尿病合併症である動脈硬化症などの血管系傷害の発症を抑制すること²⁾、逆にサイトカインの一種である腫瘍壊死因子(TNF- α)はインスリン抵抗性を進展させること³⁾が発表され注目されている。

一方、高血糖病態下では、グリケーション反応の亢進、炎症性細胞の活性化などにより活性酸素の産生が亢進しており、それが糖尿病性血管系傷害に繋がっていることが知られている⁴⁾。また、活性化された血管内皮細胞、平滑筋細胞、好中球やマクロファージから過剰に発生する活性酸素はインスリン抵抗性発症の一因にもなっている^{5,7)}。それ故に、血管内皮細胞表面に結合して血管系で発生する活性酸素の除去に関わっている extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD)とインスリン抵抗性との関連性には興味を持たれる。EC-SODは、糖鎖を持つ分泌タンパクであり⁸⁾、ヘパリン様物質⁹⁾や血管内皮細胞表面のグリコサミノグリカン¹⁰⁾に対しての親和性を有する。本酵素は、血管壁に広く分布すると同時に¹¹⁾、血管腔においては、血漿中に存在する遊離型と血管内皮細胞表面に局在する結合型の間で平衡状態を保って存在している¹²⁾。EC-SODは血管内皮細胞表面に結合して存在することで、ゾーンデフェンスラインとして、内皮細胞を酸化ストレスから効率よく防御し、レドクス恒常性の維持に寄与していると考えられている。

Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR γ)や

CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β)などの転写因子が脂質代謝や糖代謝に関連しているタンパクの発現を調節していることは良く知られており^{13,14)}、最近、これらの転写因子が抗炎症作用や抗動脈硬化作用の発現にも関連していることが報告された^{15,16)}。そこで、本研究では、(1)インスリン抵抗性病態時およびインスリン抵抗性改善薬・塩酸ピオグリタゾン治療による血漿中 EC-SOD レベルの変動、(2)レドクス恒常性の維持に寄与している EC-SOD の発現に対するチアゾリジン誘導体 (PPAR γ リガンド)あるいはプロラクチン (C/EBP β エンハンサー)の影響について検討した。

2. 実験方法

1. 対象患者

(1)血漿中クレアチニン濃度が正常範囲 (1.1 mg/dL 以下)であり、インスリン療法、塩酸ピオグリタゾン投与を受けていない糖尿病患者 122 名を無作為抽出し、血漿中 EC-SOD 濃度を測定し、他の臨床検査値と比較した。(2)12 名のインスリン抵抗性患者において塩酸ピオグリタゾン投与開始前と開始後の血漿中 EC-SOD 濃度の変動について検討した。

2. 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中で培養した。コンフルエントになった後、培地を 10%仔ウシ血清 (CS) を含む DMEM に交換した。24 時間後、培地を新しい 10%CS-DMEM に交換し、試薬を添加し所定の時間培養した。培地を回収後、細胞を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、mRNA 分析に供した。

3. EC-SOD の測定

血漿中および培地中の EC-SOD 濃度は、ELISA にて測定した^{17,18)}。EC-SOD mRNA レベルは RT-PCR 法にて測定した。

3. 結果

1. 糖尿病患者の血漿中 EC-SOD レベル

糖尿病患者の血漿中 EC-SOD 濃度は 89.5 ± 27.5 ng/mL で

あり、その内、女性患者 (104.4±33.2 ng/mL) では男性患者 (81.9±20.8 ng/mL) に比べ高値を示した。また、血漿中 EC-SOD 濃度は、空腹時血糖値、body mass index (BMI)、インスリン抵抗性指数 (HOMA-R) との間に有意な負の相関性を示し、一方、血漿中アディポネクチン濃度との間には有意な正の相関性を示した。

2. 塩酸ピオグリタゾン治療による血漿中 EC-SOD レベルの変動

12名の患者において、塩酸ピオグリタゾン治療開始2ヶ月～6ヶ月後には、血漿中 EC-SOD 濃度は有意に上昇した。また、血漿中アディポネクチン濃度も有意に上昇した。

3. EC-SOD 発現に及ぼす転写因子リガンドの影響

C/EBPβエンハンサーであるプロラクチンの添加により、線維芽細胞における EC-SOD の発現は有意に亢進した。この効果は、プロラクチン 1 µg/mL の場合に最大であり、10, 50 µg/mL の場合は亢進作用が低下した。一方、PPARγリガンドであるトログリタゾン、シグリタゾン (2, 10 µM) を添加しても EC-SOD 発現は変化しなかった。さらに TNF-α (5 ng/mL) の添加は EC-SOD 発現を有意に抑制した。

4. 考察

著者は、TNF-αにより EC-SOD 発現が抑制されること^{19,20)}、EC-SOD が動脈硬化抑制作用を示すこと^{21,22)}などの報告から、インスリン抵抗性病態時の EC-SOD 発現の変動に注目した。その結果、糖尿病患者において、インスリン抵抗性を示す患者ほど、血漿中 EC-SOD レベルが低いものの、塩酸ピオグリタゾン投与による薬物療法に従い上昇することが判明し、この変動は、インスリン抵抗性の指標とされているアディポネクチンの変動と同様であった。しかし、*in vitro* 培養細胞系実験においては、PPARγリガンドはヒト皮膚線維芽細胞における EC-SOD の発現を変化させなかった。一方、インスリン抵抗性発現に関係することが報告されている転写因子 C/EBPβ のエンハンサーであるプロラクチンは EC-SOD の発現を有意に亢進した。EC-SOD の 5'調節領域には C/EBPβ response element はみられるものの、PPARγ response element は認められないことから、塩酸ピオグリタゾン投与による血漿中 EC-SOD レベルの上昇は、PPARγ非依存性の作用である可能性、塩酸ピオグリタゾンが TNF-αなどによる EC-SOD 発現抑制作用の解除に働いている可能性などが考えられた。

5. 引用文献

- 1) 山内敏正, 門脇 孝, *実験医学*, **19**, 2301-2305 (2001).
- 2) Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Maeda K., Kuriyama H., Okamoto Y., Hotta K., Nishida M., Takahashi M.,

- Nakamura T., Yamashita S., Funahashi T., Matsuzawa Y., *Circulation*, **100**, 2473-2476 (1999).
- 3) Hotamisligil G.S., Shargill N.S., *Science*, **259**, 87-91, (1993).
- 4) Faure P., Rossini E., Wiernsperger N., Richard M.J., Favier A., Halimi S., *Diabetes*, **48**, 353-357 (1999).
- 5) Nishikawa T., Edelstein D., Du X.L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M.A., Beebe D., Oates P.J., Hammes H.-P., Giardino I., Brownlee M., *Nature*, **404**, 787-790 (2000).
- 6) Kashiwagi A., Shinozaki K., Nishio Y., Okamura T., Toda N., Kikkawa R., *Diabetes Res. Clin. Prac.*, **45**, 199-203 (1999).
- 7) Bertelsen M., Ånggård E.E., Carrier M.J., *Diabetologia*, **44**, 605-613 (2001).
- 8) Marklund S.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7634-7638 (1982).
- 9) Adachi T., Marklund S.L., *J. Biol. Chem.*, **264**, 8537-8541 (1989).
- 10) Adachi T., Yamada H., Yamada Y., Morihara N., Yamazaki N., Murakami T., Futenma A., Kato K., Hirano K., *Biochem. J.*, **313**, 235-239 (1996).
- 11) Strålin P., Karlsson K., Johansson B.O., Marklund S.L., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**, 2032-2036 (1995).
- 12) Adachi T., Yamada H., Futenma A., Kato K., Hirano K., *J. Biochem.*, **117**, 586-590 (1995).
- 13) Nanbu-Wakao R., Fujitani Y., Masuho Y., Muramatsu M., Wakao H., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 307-316 (2000).
- 14) Hamm J.K., El Jack A.K., Pilch P.F., Farmer S.R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **892**, 134-145 (1999).
- 15) Pasceri V., Wu H.D., Willerson J.T., Yeh E.T.H., *Circulation*, **101**, 235-238 (2000).
- 16) Jackson S.M., Parhami F., Xi X.-P., Berliner J.A., Hsueh W.A., Law R.E., Demer L.L., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 2094-2104 (1999).
- 17) Adachi T., Nakamura M., Yamada H., Futenma A., Kato K., Hirano K., *Clin. Chim. Acta*, **229**, 123-131 (1994).
- 18) Adachi T., Ohta H., Hirano K., Hayashi K., Marklund S.L., *Biochem. J.*, **279**, 263-267 (1991).
- 19) Marklund S.L., *J. Biol. Chem.*, **267**, 6696-6701 (1992).
- 20) Strålin P., Marklund S.L., *Atherosclerosis*, **151**, 433-441, (2000).
- 21) Takatsu H., Tasaki H., Kim H.N., Ueda S., Tsutsui M., Yamashita K., Toyokawa T., Morimoto Y., Nakashima Y., Adachi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 84-91 (2001).
- 22) Laukkanen M.O., Lehtolainen P., Turunen P., Aittomäki S., Oikari P., Marklund S.L., Ylä-Herttuala S., *Gene*, **254**, 173-179 (2000).