

学位論文題名

Effect of Insulin on Impaired Antioxidant Activities  
in Aortic Endothelial Cells from Diabetic Rabbits

(糖尿病家兎に於ける大動脈血管内皮細胞の抗酸化機能障害  
に対するインシュリン治療の効果に関する検討)

学位論文内容の要旨

I 研究目的

血管内皮細胞は、血管内腔を覆う一層の細胞であり、血球細胞を含めた血液成分と末梢組織との関門として存在し、同時に血管壁の恒常性を維持する上でも重要な役割を担っている。血管内皮細胞の主要な機能として、抗血栓性・組織修復性・血管の緊張性などがある。活性酸素などの酸化ストレスを受けたとき、血管内皮細胞は独自の生体防御機構によって細胞構成成分を守り、細胞機能を維持しようとする。

殆どの細胞は、還元型グルタチオン (GSH) を有し、その関連酵素とともに生体防御に働いているが、血管内皮細胞に於けるそれらの代謝は知られていない。糖尿病患者では赤血球に於いて、GSH の減少・酸化型グルタチオン (GSSG) の上昇がみられ、酸化侵襲に対する防御機構が低下するという報告がある。一方、血管内皮細胞も糖尿病をはじめ種々の疾患時に起こる血液成分の変化や有害代謝産物による影響を直接受けることが考えられる。そこで本研究では、1. 血管内皮細胞には、酸化ストレス時に防御機構が存在するかどうか、2. 糖尿病状態で血管内皮細胞及び肝臓・腎臓の防御機構に変化があるかどうか、3. インシュリン治療により防御機構に変化があるのかを検討した。

II 方 法

体重約3.0kgの雄の家兎にアロキサンを初日150mg/kg、2日目100mg/kgを生食にて溶解し耳静脈より投与した。経時的に採血し、常に血糖値が300mg/dl以上17日間持続した例を実験的糖尿病発症の家兎 (n=10) とした。アロキサンの投与によって高血糖を呈し、更に、インシュリンによる血糖コントロールが不良な群 (糖尿病治療A群, n=10) ・血糖コントロールが良好な群

(糖尿病治療B群, n = 8) を作成し, 正常群 (n = 10) と比較した。血管内皮細胞は, 家兔を麻酔下で脱血死させた後, 胸部と腹部の大動脈をトリプシンで処理して調整した。内皮細胞の同定は, Voyta らの方法によった。肝臓・腎臓の組織標品は, 破碎後遠沈した上清を採取した。

Catalase (CAT), GSH peroxidase (GPX), GSH S-transferase (GST), GSH reductase (GR),  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) の活性は, Beutler の方法で測定した。得られた結果は, mg蛋白当りの活性値で表した。

Cu, Zn-SOD 活性測定法は, Beauchamp と Fridovich の方法に準拠し, 酵素による50%抑制を1単位としてmg蛋白当りの活性値で表した。Mn-SOD は, 2 mM KCN を添加して測定した。

GSH は内皮細胞浮遊液を冷却した10%トリクロル酢酸を加えて除蛋白した後, Owens と Belcher の方法にて測定し, GSH 量はmg蛋白当りで表した。蛋白量の測定は, Lowry 法にて測定した。得られたデータは mean $\pm$ SD で表し, 有意差検定は Student's t-test によった。

### III 結 果

アロキサン投与により; 500mg/dl 以上の高血糖状態が得られ, 1日2回のインシュリンを投与した糖尿病治療B群では, 正常群と同等の血糖値が得られた。また, 糖尿病群では, 体重の減少を認めたが, インシュリン治療により正常に復した。

糖尿病群で低下した血管内皮細胞の Cu, Zn-SOD 活性 (172.9 $\pm$ 20.2units/mg蛋白 vs62.7 $\pm$ 11.0units/mg蛋白; 以下 mean $\pm$ SD) は, インシュリン治療により糖尿病治療A群では142.6 $\pm$ 18.2units/mg蛋白と回復し, 糖尿病治療B群では162.9 $\pm$ 16.2units/mg蛋白と正常化した。更に, 血管内皮細胞での GSH 量や CAT, GPX 活性などの低下がみられインシュリン治療により糖尿病治療A群で回復し, 糖尿病治療B群で正常化した。Mn-SOD, GST, GR 活性は変化を認めなかった。肝臓の GSH 量, Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, CAT,  $\gamma$ -GCS 活性の低下もインシュリン治療で正常化した。腎臓に於いては, 各抗酸化酵素の変動を認めなかった。

### IV 考案ならびに結語

Meister らは, GSH 合成阻害剤を用いた研究で GSH 低下によって細胞構成成分の障害を明らかにしており, GSH の重要性を示している。SOD は, 2種類のアイソザイムを有し, Cu, Zn-SOD は細胞質・核に存在し, Mn-SOD はミトコンドリアに存在し, superoxide radical の scavenger としての主要な位置を占めている。また, GPX や CAT も解毒機構に関与している。

今回の研究で、大動脈血管内皮細胞の GSH 量は、肝臓の30%・腎臓の200%の値を有することがわかった。アロキサソ投与糖尿病家兎の大動脈血管内皮細胞・肝臓のGSH量やCu, Zn-SOD, CAT活性の低下は、インシュリン治療で回復した。γ-GCS活性は、血管内皮細胞では、測定感度以下であったが、肝臓では、GSH量に依存して変動した。腎臓では、糖尿病状態で防御機構に抵抗性を示した。血管内皮細胞に於いても、赤血球と同様に糖尿病状態でグルタチオン代謝異常を来しているものと思われた。

近藤らは、赤血球内に存在する carbonic anhydrase - I (CA - I) の glycation を研究し、糖尿病患者赤血球に於いてヘモグロビンばかりでなく他の酵素蛋白も glycation を受けることを報告している。新井らも、ヒト赤血球から精製したCu, Zn-SOD に於いて in vitro での glycation を証明している。血管内皮細胞に於いても、肝臓や赤血球と同じような酵素の glycation が糖尿病での酵素活性低下に関与しているものと思われる。

これらの結果から、血管内皮細胞自体が高濃度のグルタチオンや高いSOD活性を有しており、活発な抗酸化機構を有していることが示された。また、糖尿病状態で血管内皮細胞の各抗酸化能は低下したが、インシュリン治療で正常化し、生体全体の恒常性を保つために重要な役割を演じていることが示唆された。

以上より、グルタチオンを中心とする抗酸化機構の障害が、糖尿病の血管内皮細胞および肝臓で認められ、本疾患にみられる多臓器障害の一因ではないかと推測された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和  
副 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 武 市 紀 年

目的：血管内皮細胞は、血管内腔を覆う一層の細胞であり、血球細胞を含めた血液成分と末梢組織との関門として存在し、同時に血管壁の恒常性を維持する上でも重要な役割を担っている。血管内皮細胞も糖尿病をはじめ種々の疾患時に起こる血液成分の変化や有害代謝産物による影響を直接受けることが考えられる。

本論文は、1. 血管内皮細胞には、酸化ストレス時に防御機構が存在するか、2. 糖尿病状態で血管内皮細胞及び肝・腎の防御機構に変化があるか、3. インシュリン治療により防御機構

に変化があるかを検討したものである。

方法：体重約3.0kgの雄の家兎にアロキサンを投与し、常に血糖値が300mg/dl以上17日間持続した例を実験的糖尿病発症の家兎（n=10）とした。アロキサン投与によって高血糖を呈し、更に、インシュリンによる血糖コントロールが不良な群（糖尿病治療A群，n=10）・血糖コントロールが良好な群（糖尿病治療B群，n=8）を作成し、正常群（n=10）と比較検討した。血管内皮細胞は、胸部と腹部の大動脈をトリプシンで処理して調整した。内皮細胞の同定は、変性LDLの取り込み能を測定するVoytaらの方法によった。肝・腎の組織標品は、破碎後遠沈した上清を採取した。抗酸化酵素として、Catalase (CAT), GSH peroxidase (GPX), GSH S-transferase (GST), Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD), Mn-SOD,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS), GSH reductase (GR)の活性を測定し、還元型グルタチオン (GSH) も測定した。得られた結果は、mg蛋白当りの活性値およびGSH量で表した。蛋白量の測定は、Lowry法にて測定した。

結果：アロキサン投与により高血糖状態が得られ、1日2回のインシュリンを投与した糖尿病治療B群では、正常群と同等の血糖値が得られた。糖尿病群で低下した血管内皮細胞のGSH量やCu, Zn-SOD, CAT, GPX活性などの低下は、インシュリン治療により糖尿病治療A群で回復し、糖尿病治療B群で正常化した。Mn-SOD, GST, GR活性は変化を認めなかった。肝のGSH量, Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, CAT,  $\gamma$ -GCS活性の低下もインシュリン治療で正常化した。腎では、各抗酸化酵素の変動を認めなかった。

まとめ：1. 大動脈血管内皮細胞のGSH量は、肝の30%・腎の200%の値を有することがわかった。2. 糖尿病家兎の大動脈血管内皮細胞・肝のGSH量やCu, Zn-SOD, CAT活性の低下は、インシュリン治療で回復した。 $\gamma$ -GCS活性は、血管内皮細胞では、測定感度以下であったが、肝臓では、GSH量に依存して変動した。3. 血管内皮細胞に於いても、赤血球と同様に糖尿病状態でグルタチオン代謝異常を来しているものと思われた。4. 腎では、糖尿病状態で防御機構に抵抗性を示した。血管内皮細胞に於いても、肝や赤血球と同じような酵素のglycationが糖尿病での酵素活性低下に関与しているものと思われた。

結論：1. 血管内皮細胞自体が高濃度のグルタチオンや高いSOD活性を有しており、活発な抗酸化機構を有していることが示された。2. 糖尿病状態で血管内皮細胞の各抗酸化能は低下していたが、インシュリン治療で正常化し、血管内皮細胞が生体全体の恒常性を保つために重要な役割を演じていることが示唆された。3. グルタチオンを中心とする抗酸化機構の障害が、糖尿病の血管内皮細胞および肝臓で認められ、本疾患にみられる多臓器障害の一因ではないかと推測された。

口頭発表に当り武市教授から内皮細胞の分離法，肝・腎を調べた意味，接着分子とフリーラジカルの意義について，石橋教授からラジカルの強力なものを調べたか，内皮細胞は実際にラジカルを出しているか，肝・腎のミトコンドリア分画について，小山教授から Mn - SOD に変化がない理由，その機序，アロキサンを使った理由について，菅野教授から EDRF の作用はどうか，体重減少の影響について質問があったが，申請者は的確に答えたと思う。また，武市教授，石橋教授からは個別に審査を受け合格との御返事をいただいている。

これまで糖尿病に於ける血管内皮細胞のグルタチオンを中心とする抗酸化機構の障害は知られておらず，意義あるものと考えられ，よって本論文は博士（医学）の学位に相当するものと認めた。