

# 血管作動物質とインスリン／インスリン抵抗性の相互作用およびカルシウム摂取の効果

— 中間報告 —

東京大学医学部老年病学教室 大内 尉 義

## 研究テーマ

血管作動物質とインスリン／インスリン抵抗性の相互作用およびカルシウム摂取の効果——細胞内 $Ca^{++}$ 代謝からの検討

## はじめに

高血圧と肥満、耐糖能異常ないし糖尿病が高頻度に合併することはよく知られており、この病態がSyndrome Xとして注目されているが、その機序は不明であった。これらはいずれも動脈硬化の危険因子であるが、それらが併存していると心筋梗塞、脳梗塞などのリスクが飛躍的に高まることから、その病態を解明することはきわめて重要と考えられる。最近、高血圧者に高頻度に糖代謝異常の存在することが明らかにされ、高インスリン血症が共通の病因として注目されている。また肥満が高インスリン血症を伴うこともよく知られている。インスリンが昇圧的に働く機序については、腎尿管での $Na^+$ の再吸収の亢進、交感神経活動の亢進、細胞膜の $Na^+-H^+$ 交換の亢進など種々の説が提出されているが、いまだ十分解明されていない。

一方、この高インスリン血症は組織レベルでインスリン抵抗性が存在することを示すものであるが、インスリン自体ではなく、このインスリン抵抗性の存在が高血圧との関連で重要である可能性もある。そこで、本研究は、インスリンおよびインスリン抵抗性の、高血圧の発症、維持における役割とその機序を主として血管作動物質の血管壁細胞内 $Ca^{++}$ 代謝に及ぼす影響という観点から検討し、さらにカルシウム摂取など食餌によるinterventionが、それらにどのような影響を及ぼすかを検討することを目的としている。

## 研究 I : インスリンの血管弛緩作用とその機序

### 【目 的】

まず、インスリンが血管収縮および血管平滑筋細胞内Ca濃度 ( $[Ca^{++}]_i$ ) に対してどのような作用を有するのか、またその機序について検討した。

### 【方 法】

ラット大動脈ラセン条片にFura-2を負荷し、平滑筋あるいは内皮細胞内  $[Ca^{++}]_i$  と張力を同時測定した。

(1)内皮保存および剥離標本を用い、静止時およびnor-epinephrine(NE)  $5 \times 10^{-8}M$ 存在下でインスリンを投与し、 $[Ca^{++}]_i$  と収縮張力を同時測定した。(2)内皮依存性弛緩については、インドメサシン前処理、およびEDRF合成酵素阻害剤のL-NG-monomethyl-arginine(L-NMMA)の後投与の作用を検討した。

### 【結 果】

(1)内皮保存および剥離のいずれの標本でも、NEによる収縮はインスリン1~100mUの累積投与により濃度依存性に弛緩した。インスリン投与約20分後の弛緩の程度を比較したところ、内皮剥離標本でのインスリン100mUによる弛緩は約18%であったのに比べ、内皮保存標本では約72% ( $p < 0.001$ ) と有意に大であった。これらの弛緩作用は平滑筋  $[Ca^{++}]_i$  の減少を伴っていた。静止状態の内皮保存標本にインスリン200mUあるいはAcetylcholine  $10^{-5}M$ を投与したところ、内皮の  $[Ca^{++}]_i$  の上昇および静止張力の下降を認めたが、内皮剥離標本ではいずれの反応も認めなかった。(2)インドメサシン15分前処理により、内皮依存性弛緩は変化しなかった(前76%、後80%)。さらにインスリン投与10分後にL-NMMA  $10^{-5}M$ を投与すると弛緩反応は完全に消失した。しかし、インスリン投与40分後にL-NMMAを投与すると約20%の回復しか見られず、インスリンの投与後、時間経過と共に血管平滑筋に対する直接抑制作用が強くなることが示唆された。

## 【総括】

本研究より、(1)インスリンは内皮依存性および非依存性の血管弛緩作用の両方を有すること、(2)インスリンの内皮依存性弛緩作用は内皮細胞Ca濃度の増加とEDRFの遊離を介すること、(3)インスリンの血管弛緩作用は平滑筋細胞内Ca量の減少を伴うことが示された。

## 研究Ⅱ：インスリン持続投与ラットにおける血管平滑筋細胞内Ca濃度および発生張力に関する検討

### 【目的】

研究Ⅰにより、インスリンは内皮依存性および非依存性の血管拡張作用を有することが判明したが、この実験で用いたインスリンの濃度は生理的範囲を大きく逸脱しているため、実際に生体内で起こり得る濃度のインスリンが血管平滑筋細胞内Ca濃度および発生張力にどのような影響を及ぼすかを検討した。

### 【方法】

5週齢の雄性Wistarラット20匹を2群に分け、インスリン投与群(I群)に3U/kg/dayのインスリンを浸透圧ミニポンプにて4週間皮下に持続投与し、対照群(C群)に同量のBalanced salt solution + 1% BSAを投与した。投与後、経時的に体重、血圧(tail-cuff法)、血糖値、血中immunoreactive insulin(IRI)濃度を測定した。インスリン投与4週後に胸部大動脈を摘出、内皮を剝離後、ラセン条片を作製し、Fura-2を負荷後、 $[Ca^{++}]_i$ と収縮張力を同時に測定した。

### 【結果】

(1)インスリン投与4週後の体重、血圧は両群で同等であった。血糖値はI群で若干低い傾向があったが有意差を認めなかった( $102 \pm 2$  vs.  $96 \pm 1$  mg/dl)。血中IRI濃度はC群に比べI群で有意に高かった( $21 \pm 6$  vs.  $135 \pm 9$   $\mu$ U/ml)。(2)静止時 $[Ca^{++}]_i$ はC群に比しI群で軽度ながら有意に低かった( $35.8 \pm 2.8$  vs.  $30.5 \pm 2.0\%$ ,  $p < 0.05$ )。

25mM KClによる  $[Ca^{++}]_i$  の上昇は  $59.3 \pm 3.4\%$  に対し  $50.2 \pm 2.2\%$ 、収縮張力は  $43.2 \pm 2.4\%$  に対し  $25.6 \pm 1.8\%$  ( $p < 0.05$ ) と I 群で有意に低かった。Phenylephrine(PE) による反応については、I 群で発生張力の減弱 ( $ED_{50}$ ;  $1.47 \pm 0.38 \times 10^{-8} M$  vs.  $5.17 \pm 0.51 \times 10^{-8} M$ ) とともに、 $[Ca^{++}]_i$  の上昇も低下した。このように、これらの用量作用曲線は右に偏位したが、 $[Ca^{++}]_i$ -張力関係は変化しなかった。

### 【総括】

インスリンの持続投与により生体実際に起こり得る程度に増加した IRI 濃度でも、血管平滑筋内の静止時  $[Ca^{++}]_i$  の減少、また、KCl、PE による  $[Ca^{++}]_i$  上昇と発生張力の抑制が起こることが示された。さらに、PE に関しては、インスリンは血管平滑筋収縮蛋白の  $Ca^{++}$  感受性などその収縮機構に影響せず、PE による  $[Ca^{++}]_i$  上昇を低下させることにより発生張力を抑制することが示唆された。

### 研究Ⅲ：インスリン抵抗性を有する Zucker 肥満ラットにおける血管平滑筋細胞内 Ca 濃度および発生張力に関する検討

#### 【目的】

研究Ⅱにより、生理的に起こり得る濃度の高インスリン血症では、血管平滑筋内の静止時  $[Ca^{++}]_i$  の減少、また、KCl、PE による  $[Ca^{++}]_i$  上昇と発生張力の抑制が起こることが示されたので、次に、インスリン抵抗性を有する Zucker 肥満ラットにおける血管平滑筋細胞内 Ca 濃度および発生張力に関する検討を行なった。

#### 【方法】

20週齢の雄性 Zucker 肥満 (fatty) ラット (ZF 群) の大動脈ラセン条片に研究Ⅰ、Ⅱと同様に Fura-2 を負荷し、KCl、PE、セロトニン (5-HT) 投与による平滑筋内  $[Ca^{++}]_i$  と張力の変化を同時測定した。対照として同週齢の Zucker lean ラット (Z-L 群) を用いた。一部のラットについては18時間絶食の後、 $3 g/kg$  のグルコースを経口負荷することにより糖負荷試験 (OGTT) を行なった。

## 【結 果】

(1)ZF群はZL群に比べ、体重は有意に大であり(450±11 vs. 257±7 g、 $p < 0.001$ )、観血的に測定した平均血圧もわずかであるが有意に高かった(117±3 vs. 103±2 mm Hg、 $p < 0.01$ )。 (2)ZF群の空腹時血糖、血漿IRI濃度はZL群に比べ有意に高く(それぞれ129±3 vs. 85±3 mg/dl、 $p < 0.001$ ; 308±47 vs. 13±1  $\mu$ U/ml、 $p < 0.001$ )、OGTTでもZF群のそれらは著しく高値を示した。 (3)ZF群のラットの大動脈の、KCl (5.4-65.4 mM)、PE ( $10^{-9}$ - $10^{-55}$ M)、5-HT ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$ M)による発生張力および $[Ca^{++}]_i$ の上昇の程度は、ZL群に比べ著しく亢進し、用量作用曲線は左に偏位していた。それぞれの最大反応の程度は両群で同等であった。また、 $[Ca^{++}]_i$ -張力関係はいずれも変化しなかった。

## 【総 括】

以上の結果より、Zucker肥満ラットでは、高インスリン血症があるにもかかわらず、研究Ⅱで得られた結果とは逆に、種々の血管作動物質に対して、張力発生、平滑筋内 $[Ca^{++}]_i$ 上昇とも亢進していた。したがって、高インスリン血症よりもむしろインスリン抵抗性の存在が、Syndrome Xにおける高血圧の発症機序に重要であると考えられた。

なお、Zucker肥満ラットの入手が予想以上に時間がかかり、また、数も限られていたため、研究計画Ⅳ：Ca摂取のZucker肥満ラットにおけるインスリン抵抗性におよぼす効果に関する検討は、次にZuckerラットが入手できる本年7月に行なう予定である。