

Title	Role of Endothelin-1 Induced by Insulin in the Regulation of Vascular Cell Growth
Author(s)	永井, 道子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43834">https://hdl.handle.net/11094/43834</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	なが い みちこ 永 井 道 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 6 1 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Role of Endothelin-1 Induced by Insulin in the Regulation of Vascular Cell Growth (インスリンによるエンドセリン-1 産生亢進の血管細胞増殖に対する役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 荻原 俊男  (副査) 教 授 三木 直正 教 授 網野 信行

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### (目的)

インスリン抵抗性は、多因子複合病である生活習慣病との関連性が広く報告され、動脈硬化促進にも関与することが示唆されている。この機序のひとつには、インスリン抵抗性で認める高インスリン血症の関与が考えられている。実際、インスリンには血管平滑筋細胞増殖作用があり、その機序の一部はアンジオテンシノーゼンの発現亢進によることが認められている。また、インスリンは血管内皮細胞に対して、血管収縮性物質であるエンドセリン-1 (ET-1) の発現を亢進させる一方、血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) の産生亢進に働くことも報告されている。さらに、NO の産生低下は ET-1 の産生亢進に働くことが知られており、ET-1、NO はインスリン抵抗性または高インスリン状態において、血管のトーンズや動脈硬化の進展に互いに複雑に作用していると考えられる。

本研究の目的は、インスリンによる血管内皮細胞での ET-1 と NO の産生調節、およびそれらの血管内皮細胞・平滑筋細胞増殖への寄与を明らかにし、高インスリン血症による動脈硬化の進展機序を検討することである。

##### (方法ならびに成績)

ヒト大動脈由来平滑筋細胞およびヒト大動脈由来内皮細胞を、サブコンフルエントの段階まで培養後、通常培地から無血清培地への変更により quiescent にして以下の実験に用いた。

- 1) 内皮細胞を 0、10、1000  $\mu$ U/mL のインスリンで 24 時間刺激し培養液中の ET-1 を測定した。100  $\mu$ U/mL 以上のインスリン刺激により最大 42% の有意な ET-1 産生亢進を認めたが、これは抗 IGF-1 受容体抗体 ( $\alpha$ IR3) の前処理によりほぼ完全に抑制された。また、産生亢進した ET-1 の内皮細胞増殖への影響を見るため、 $^3$ H-thymidine の取り込みを測定したところ、インスリンおよび非選択性 ET-1 受容体抗体 (TAK044) の前処理は、いずれも細胞増殖に影響を与えなかった。
- 2) インスリンにより産生亢進した内皮細胞由来の ET-1 が、平滑筋細胞増殖に与える影響を、培養上清を用いて検討した。平滑筋細胞増殖実験に用いる培養液として、内皮細胞の有無とインスリン投与 (1000  $\mu$ U/mL) の有無により 4 種類の異なった培養上清を用意した。平滑筋細胞を同一のインキュベーター内で 24 時間 quiescent で

静正し、回収した無血清内皮細胞培養上清にて、さらに 24 時間培養した。また、一部培養上清には、TAK044 を前投与し、それぞれの培養上清による平滑筋細胞の 24 時間の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みを測定した。内皮細胞と接触せず、インスリン刺激もされていない培養液による平滑筋細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine 取り込みを、細胞増殖のコントロールとすると、インスリン刺激されていない内皮細胞由来の培養上清では約 1.36 倍に亢進した。この際、TAK044 の有無による平滑筋細胞増殖に変化は認めなかった。一方、インスリン刺激後の内皮細胞培養上清による平滑筋細胞増殖は 1.78 倍まで亢進したが、TAK044 の前処理によりほぼコントロールレベルまで抑制された。

- 3) インスリンにより内皮細胞から NO が産生されるが、その半減期は短い。この NO が平滑筋細胞増殖に及ぼす影響を調べるため、内皮細胞と平滑筋細胞の共培養系を用いた。平滑筋細胞単独群ならびに内皮細胞との共培養群を、0、10、33、100、330、1000  $\mu\text{U/mL}$  のインスリンで刺激し、平滑筋細胞の増殖を測定した。さらに、共培養群の半数には NO 合成酵素阻害薬である L-NAME を投与し、その影響も観察した。平滑筋細胞単独群では、100  $\mu\text{U/mL}$  以上のインスリン刺激で濃度依存性に有意な平滑筋細胞増殖を認めた。一方、共培養群では 330  $\mu\text{U/mL}$  以上のインスリン刺激によってのみ平滑筋細胞増殖が亢進した。L-NAME 投与群では各濃度において 3 群中最大の細胞増殖亢進効果を認め、かつ 100  $\mu\text{U/mL}$  以上の刺激では有意であった。

(総括)

今回用いたインスリン濃度 (100  $\mu\text{U/mL}$  以上) は、特に食後などにおいて高度のインスリン抵抗性患者において観察しうる値である。このインスリン刺激により、血管内皮細胞において主に IGF-1 受容体を介して、平滑筋細胞増殖に働くレベルの ET-1 産生亢進が認められた。また、インスリンにより内皮細胞で産生亢進する NO は、インスリン刺激に伴う平滑筋細胞増殖を抑制していることが示された。つまり、動脈硬化の進展にはインスリンによる ET-1 産生亢進が寄与している一方で、健常内皮細胞による NO 産生亢進が、その進展抑制に働く可能性が示された。以上より、インスリン抵抗性に伴う動脈硬化進展において血管内皮細胞機能が主要な役割を果たしていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

インスリン抵抗性または高インスリン血症は、種々の疾患の危険因子として認識されている。また、インスリンは、血管収縮性物質であるエンドセリン-1 (ET-1)、血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) の両者に対し、共に産生亢進に働くことが報告されている。本研究では、インスリンによる血管内皮細胞での ET-1 と NO の産生調節、ならびに高インスリン血症自体による動脈硬化進展機序を検討した。

ヒト大動脈内皮細胞を 0-1000  $\mu\text{U/mL}$  のインスリンで 24 時間刺激したところ、100  $\mu\text{U/mL}$  以上の刺激では培養液中の ET-1 は最大 42% 産生亢進したが、抗 IGF-1 受容体抗体 ( $\alpha\text{IR}_3$ ) の前処置によりほぼ完全に阻害された。また、内皮細胞の  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みを測定して増殖の評価としたが、インスリンならびに非選択性 ET-1 受容体拮抗薬 (TAK044) の前処置は、いずれも細胞増殖に影響を与えなかった。また、インスリン刺激した内皮細胞培養上清でヒト大動脈平滑筋細胞を培養したところ、細胞増殖は一般培地による培養に比し、1.78 倍亢進したが、TAK044 の前処理によりその大部分が抑制された。次に、半減期の短い NO の働きを検討するために、内皮細胞と平滑筋細胞の共培養系を用いた。平滑筋細胞単独群は 100  $\mu\text{U/mL}$  以上のインスリン刺激に有意かつ最大 137% の細胞増殖亢進を示す一方、共培養群では、330  $\mu\text{U/mL}$  以上の刺激にのみ有意であった。なお、共培養群の一部に L-NAME を投与して、NO 合成酵素の阻害をした上でインスリン刺激したところ、すべての濃度において 3 群中最大の細胞増殖を示した (最大 180%)。

本研究によって動脈硬化の進展にインスリンによるエンドセリン-1 産生亢進が寄与している一方で、健常内皮細胞は NO 産生によりその進展抑制に働く可能性が示され、インスリン抵抗性に伴う動脈硬化進展において血管内皮細胞機能が重要な役割を果たしていることが示唆された。以上の点で、学位の授与に値すると考えられる。