

37

助成番号 0137

塩分感受性高血圧に伴うインスリン抵抗性の機序と治療法の開発

東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

浅野 知一郎、片桐秀樹、佃 克則、小野 啓、藤城 緑

Tomoichiro Asano, Hideki, Katagiri, Katsunori Tsukuda, Hiraku Ono,
Midori, Fujishiro

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

近年、糖尿病患者に高血圧の合併頻度が高いこと、また糖尿病患者の予後に高血圧のコントロールが非常に重要であることが知られている。そこで、我々は食塩感受性高血圧とインスリン抵抗性を結びつける分子機構を解明するために(1) Dahl ラットに高食塩を負荷したモデル、および(2) アンギオテンシンを持続注入した SD ラットを作製した。両モデルとも高血圧を呈するとともに、グルコースクランプ法によってインスリン抵抗性の状態であることが証明された。また、単離した筋肉においてもインスリン依存性の糖取り込みが減少しており、これらの塩分感受性高血圧モデルでは、筋肉と肝臓の両方にインスリン抵抗性が存在することが明らかとなった。そこで、インスリンの細胞内シグナル伝達がどのように変化しているかを明らかにするため、麻酔下に開腹し、門脈よりインスリンを注入した後の肝臓、筋肉、脂肪の各臓器におけるインスリンの細胞内シグナル伝達を検討した。その結果、驚くことに、これらの高血圧モデルではインスリン抵抗性状態であるにも関わらず、インスリンによる IRS 蛋白のリン酸化、PI 3-キナーゼの活性化、Akt のリン酸化などは、いずれも正常以上に顕著に亢進していた。すなわち、これらのモデルにおけるインスリン抵抗性は Akt の活性化以降の下流に障害が存在することが示唆された。次に、我々は高血圧では酸化ストレスが増加することに着目し、酸化ストレスがインスリン抵抗性の機序に関与している可能性を考慮した。血中の酸化脂質の定量を行なったところ、アンギオテンシンを持続注入した SD ラットでは酸化ストレスが顕著に増加していることを認めた。このモデルに SOD の mimicker である tempol を投与すると、酸化ストレスの蓄積が正常と同程度煮まで改善されると共に、インスリン感受性もほぼ正常まで改善され、過剰に亢進していたインスリンのシグナル伝達も正常化された。これらの結果より、塩分感受性高血圧に伴うインスリン抵抗性では、酸化ストレスが原因として関与しており、それによる障害は PI 3-キナーゼや Akt の活性化以降の段階にあることが示唆された。また、酸化ストレスは血管障害の進展にも関与している可能性が高く、酸化ストレスを改善する薬物治療が、血管障害およびインスリン抵抗性の改善に有効であることが推測された。

1

助成番号 0137

塩分感受性高血圧に伴うインスリン抵抗性の機序と治療法の開発

東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

浅野 知一郎、片桐秀樹、佃 克則、小野 啓、藤城 緑

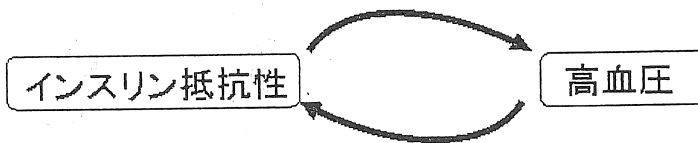
Tomoichiro Asano, Hideki, Katagiri, Katsunori Tsukuda, Hiraku Ono,
Midori, Fujishiro

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

1. インスリン抵抗性と高血圧

糖尿病と高血圧の合併は臨床上重要な問題である。英国の臨床研究である UKPDS によると、新しく2型糖尿病と診断された患者の30%以上が高血圧とのことである1)。また、フィンランドでは糖尿病患者は正常者に比べ8年間で2倍多く高血圧を発症したことが報告されている2)。一方、高血圧患者は正常血圧者に比べると、糖尿病の発症率が2.5倍高いという報告もある3)。糖尿病の根底にインスリン抵抗性が存在することから上記の臨床研究の結果を解釈すると、「インスリン抵抗性は高血圧を引き起こし、逆に高血圧はインスリン抵抗性をもたらす」と言えるのではないだろうか(図1)。

インスリン抵抗性は、
①NO産生の低下に伴う血管収縮
②高インスリン血症に伴う血管平滑筋の増殖、
腎でのNa再吸収亢進、交感神経亢進
などの機序を介して、高血圧を引き起こす



①高食塩食負荷ラット
②Angiotensin II持続注入ラット
③Dahl食塩感受性高血圧ラット
などを用いた検討により、高血圧が
インスリン抵抗性をもたらす
機序が明らかになりつつある

図1 インスリン抵抗性は高血圧を引き起こし、
高血圧はインスリン抵抗性をもたらす。

前者の「インスリン抵抗性が高血圧を引き起こす」メカニズムはいくつかの原因が想定されている。すなわち、インスリンは血管内皮での NO 産生を介して血管拡張をもたらす作用があるため、インスリン抵抗性の状態では血管での NO 産生が低下し、血管収縮が起こったり、インスリン抵抗性の状態での高インスリン血症により、腎で Na 再吸収が亢進したり、交感神経亢進が起こったりすることにより血圧が上昇するといったメカニズムが知られている。一方、後者の「高血圧に伴ってインスリン抵抗性が起きる」原因についてはよく分かっていないのが現状である。われわれは後者の原因のうち、主に食塩の過剰摂取に伴うインスリン抵抗性の発症に注目し、下記に述べるいくつかのモデル動物を用いて検討を行った。

2. 高食塩食負荷ラットのインスリン抵抗性

食事の食塩摂取量が高血圧発症に関連することはよく知られている 4)。また、ヒトに食塩を過剰に摂取させた場合にインスリン抵抗性をきたすという報告もある 5)。われわれは、実験的に正常ラットに高食塩食 (8%NaCl) を 2-8 週間負荷した高食塩食モデルラットを作成した。このラットは正常対照群と比較して、血圧の軽度上昇 (133 ± 2 vs. 117 ± 2 mmHg, $p < 0.001$) を認め、空腹時に軽度の高血糖 (108.5 ± 2.8 vs. 97.8 ± 2.5 mg/dl, $p = 0.01$)、高インスリン血症 (0.86 ± 0.07 vs. 0.61 ± 0.06 ng/ml, $p = 0.026$) を認めた。これらのラットに対して、高インスリン正常血糖クランプ法を用いてインスリン抵抗性の程度を評価した。その結果、クランプにおけるグルコース注入速度が 52.7%に低下し、肝臓での糖放出が 196%に上昇した (図 2)。

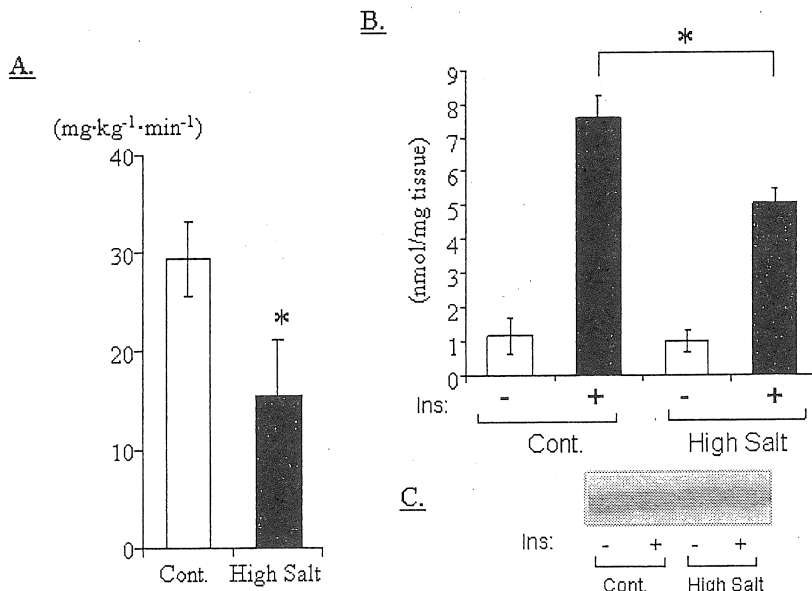


図2 高食塩食負荷ラットにおけるインスリン抵抗性
 (A) 高インスリン正常血糖クランプ、(B) 単離筋糖取り込み、
 (C) 骨格筋での GLUT 4 蛋白発現量

また単離骨格筋におけるインスリンによるグルコース取り込みが 66.4%に低下し、肝臓におけるインスリンによるグリコゲン合成酵素の活性化は 44.5%に低下した。これらの結果から、高食塩食負荷に伴って全身および肝臓・骨格筋におけるインスリン抵抗性が増大することが示された。

次にこの高食塩食負荷が、インスリンシグナル伝達系に及ぼす影響について検討した。具体的には、高食塩食負荷ラットの肝臓や筋肉でのインスリン受容体や IRS-1、IRS-2 のリン酸化(図 3)や、PI 3-キナーゼの活性化(図 4)を調べた。

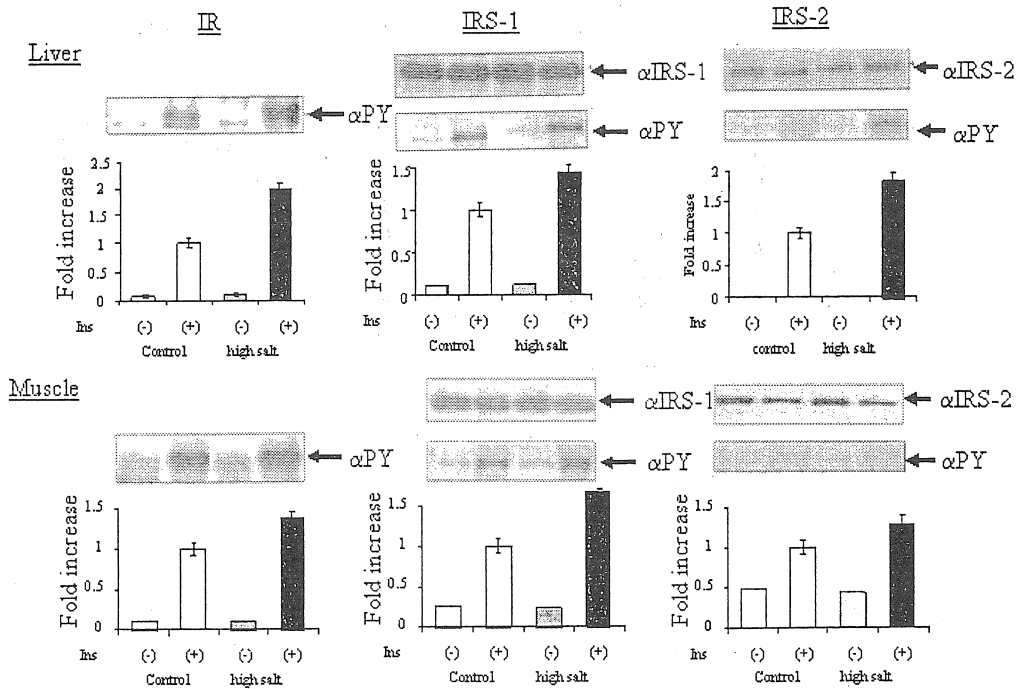


図3 高食塩食負荷ラット肝・筋肉におけるIR, IRS-1, IRS-2tyrosineリン酸化の亢進

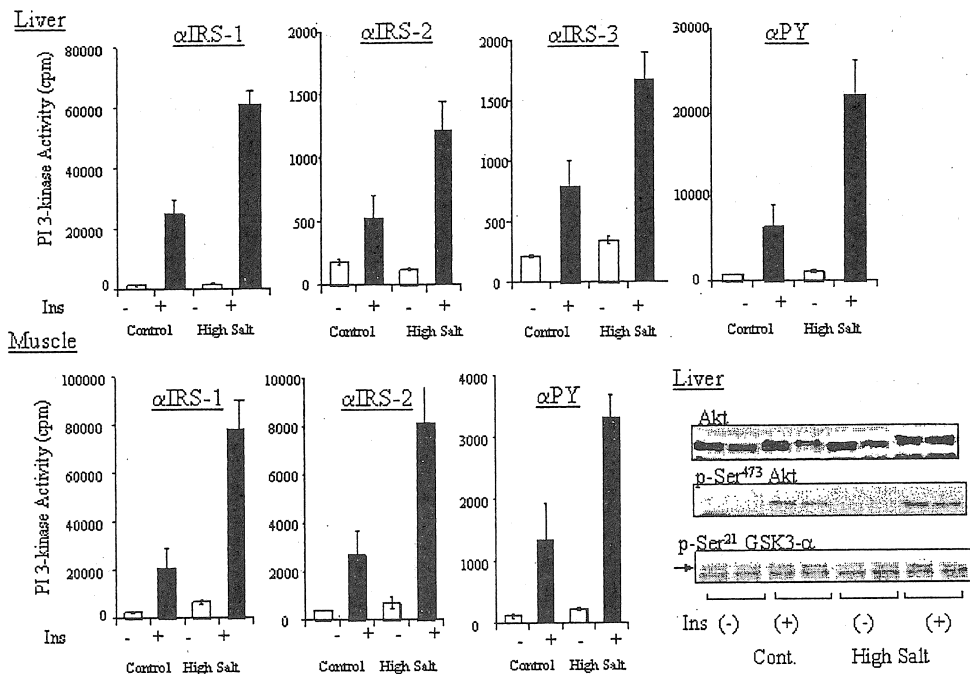


図4 高食塩食負荷ラット肝・筋肉におけるPI3-キナーゼ活性化、Aktリン酸化の亢進

これらのIRS蛋白のリン酸化やPI 3-キナーゼ活性化はインスリン作用の発現には不可欠と考えられている。実際、従来からのインスリン抵抗性モデル動物6)、高脂肪食負荷7)、加齢、ステロイド投与などではインスリンによるPI 3-キナーゼ活性化が大きく障害されていることが報告されてきた。ところが、高食塩食負荷ラットでは、インスリン抵抗性があるにも関わらず、肝臓や筋肉でのPI 3-キナーゼ活性化は逆に大きく亢進していた8)。すなわち、肥満や高脂肪食負荷など他のインスリン抵抗性とは細胞内シグナル伝達の障害部位が異なり、PI 3-キナーゼ以降の段階であることが示唆された。さらにPI 3-キナーゼ活性化以降のシグナル伝達、すなわちAktリン酸化やGSK-3のリン酸化が高食塩食負荷によってどのように変化しているかについても検討した。その結果、筋肉・肝臓においてインスリンによるAktリン酸化は高食塩食負荷によって亢進が認められ、GSK-3のリン酸化についても肝臓で亢進していた。これらのインスリンシグナル伝達の亢進は、さらにその下流のシグナルの障害により代償的に増加している可能性を示唆するものである。

このように、肥満や高脂肪食負荷と高血圧におけるインスリンシグナル伝達の障害部位の違いは、インスリン抵抗性の治療に対する反応性にも影響する可能性がある。例えば、インスリン抵抗性改善剤であるチアゾリジン系薬剤は、肥満ラットや高脂肪食負荷ラットにおいて障害されたPI 3-キナーゼ活性を改善することが知られている。これに対し、本研究では高食塩食負荷ラットに0.02% pioglitazoneを食餌に混ぜて投与し、インスリン抵抗性の改善が認められるかどうか検討を行った。この

pioglitazone の投与量は、代表的な肥満ラットである Zucker fa/fa ラットのインスリン抵抗性を改善するのに十分な量である。クランプおよび単離骨格筋糖取り込み実験の結果、pioglitazone は高食塩食負荷ラットのインスリン抵抗性を改善しなかった (図 5)。

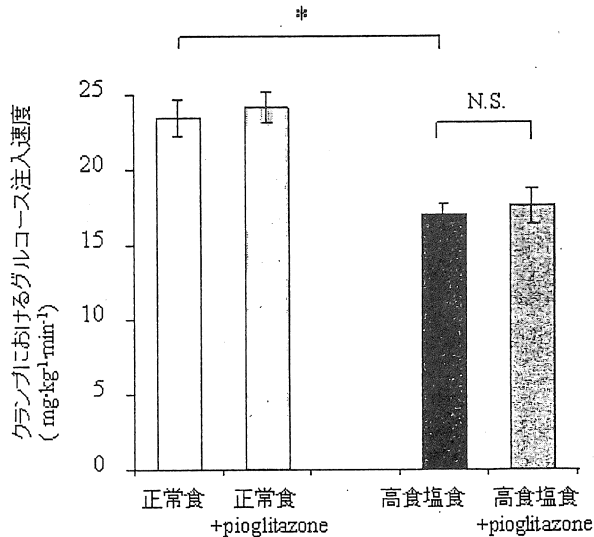


図 5 高食塩食に伴うインスリン抵抗性に対する pioglitazone の影響

この結果から、高食塩食負荷に伴うインスリン抵抗性は、治療の面でも肥満などとは異なるアプローチが必要になると考えられた。

本研究では、ラットを用いて高食塩食負荷がインスリン抵抗性を起こしうることを示した。また、この高食塩食に伴うインスリン抵抗性では、肥満などの他の原因によるインスリン抵抗性と比較して、細胞内インスリンシグナル伝達障害の部位が異なること、そのため薬剤の効果が異なることなどが示唆された (図 6)。

細胞内インスリンシグナル伝達

想定されるインスリンシグナル伝達の障害部位

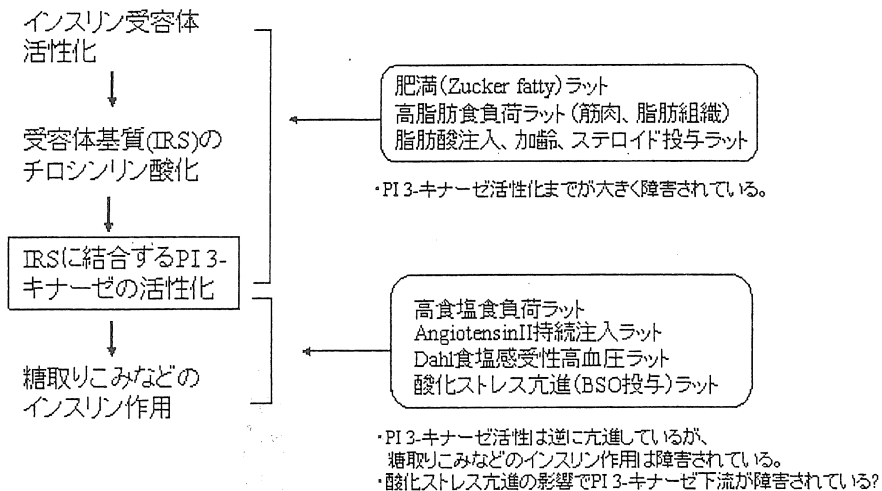


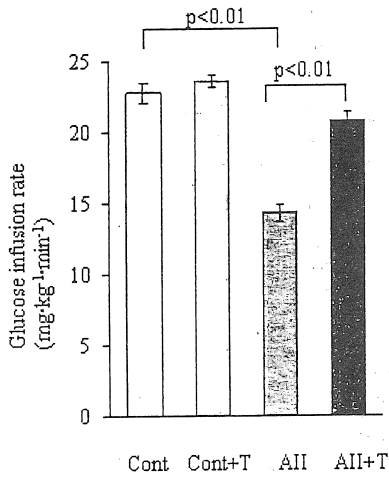
図6 インスリン抵抗性の原因の違いによる細胞内インスリンシグナル伝達障害部位の多様性

高血圧と糖尿病・インスリン抵抗性の合併については、臨床的によく知られているが、本研究における動物モデルを使った検討によってその機序が一部明らかになったと考えられる。

3. アンジオテンシン II 持続注入ラットのインスリン抵抗性

アンジオテンシン II (AII) もインスリン抵抗性への関与が想定されている。われわれは、正常ラットに AII を 12 日間持続注入した場合のインスリン抵抗性の評価を行った。その結果 AII 注入群では、血圧上昇 (127±5 vs. 158±3 mg/dl, p<0.01) に伴い高インスリン正常血糖クランプにおいてインスリン抵抗性を示した (9)。さらに、単離した骨格筋・脂肪細胞の糖取り込みはそれぞれ 62.5%、79.3%に減少した。このラットでもインスリン刺激による PI 3-キナーゼ活性化は亢進していた。AII 注入ラットでは血圧の食塩感受性亢進が知られている (10)。そこで AII 注入ラットに高食塩食を負荷したところ、血圧上昇、インスリン抵抗性および PI 3-キナーゼ活性化亢進の傾向は増大した (図 7)。

高インスリン正常血糖クランプ



単離ヒラメ筋のブドウ糖取りこみ

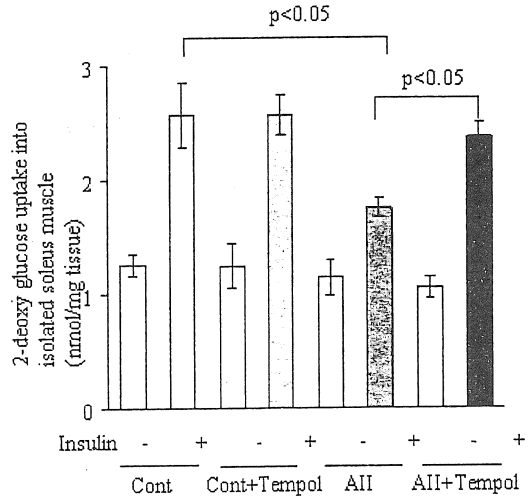


図7 AII持続注入ラットにTempol (Superoxide Dismutase mimetic) を投与した場合のインスリン抵抗性の改善

また、AII注入ラットでは活性酸素産生が亢進し高血圧を引き起こすメカニズムが報告されている(11)。そこで、AII注入ラットにSuperoxide dismutase mimeticとしてスピントラップ剤であるtempolを投与し、活性酸素の除去を試みた。この薬剤を投与した場合の血漿の一次酸化生成物(cholesteryl ester hydroperoxide; CEOOH)を測定したところ、血漿CEOOH量はAII注入に伴って2倍に上昇したが、tempol投与により正常レベルまで低下した。tempolを投与したAII注入ラットでは、上記のAII注入ラットと比較して血圧の軽度低下と全身および筋肉でのインスリン抵抗性の改善が認められた(図8)。

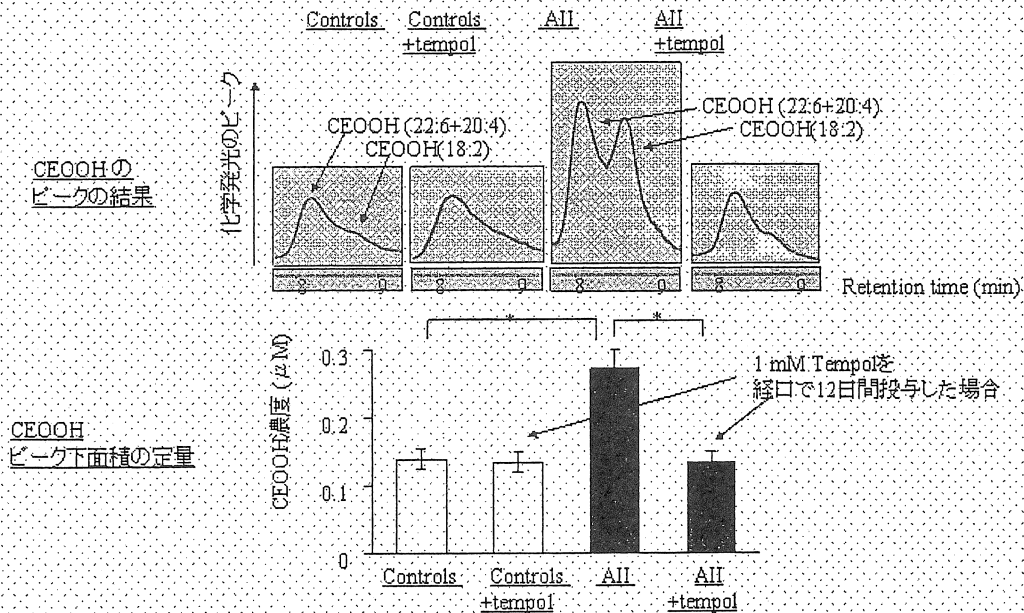


図8 AII注入ラットにおける血漿 CE00H の増加、Tempol 投与による改善

この結果から、AII 注入に伴うインスリン抵抗性の原因の一つとして、活性酸素産生による酸化ストレスの亢進が想定される。

4. Dahl 高血圧ラットのインスリン抵抗性

次に食塩負荷がインスリン抵抗性を起こすのは、血圧の食塩感受性とどのような関係があるのだろうか？われわれは Dahl 食塩感受性 (DS) ラットと食塩抵抗性 (DR) ラットにそれぞれ正常食および高食塩食を負荷し、インスリン抵抗性の有無を検討した。その結果、DS ラットは高食塩食により著明な血圧上昇 (130 ± 2 vs. 182 ± 4 mmHg, $p < 0.01$) を来すのに伴って、インスリン抵抗性を生じた。しかし、DR ラットでは高食塩食を負荷しても、血圧 (122 ± 4 vs. 120 ± 4 mmHg) とインスリン抵抗性に大きな変動はなかった (図9)。

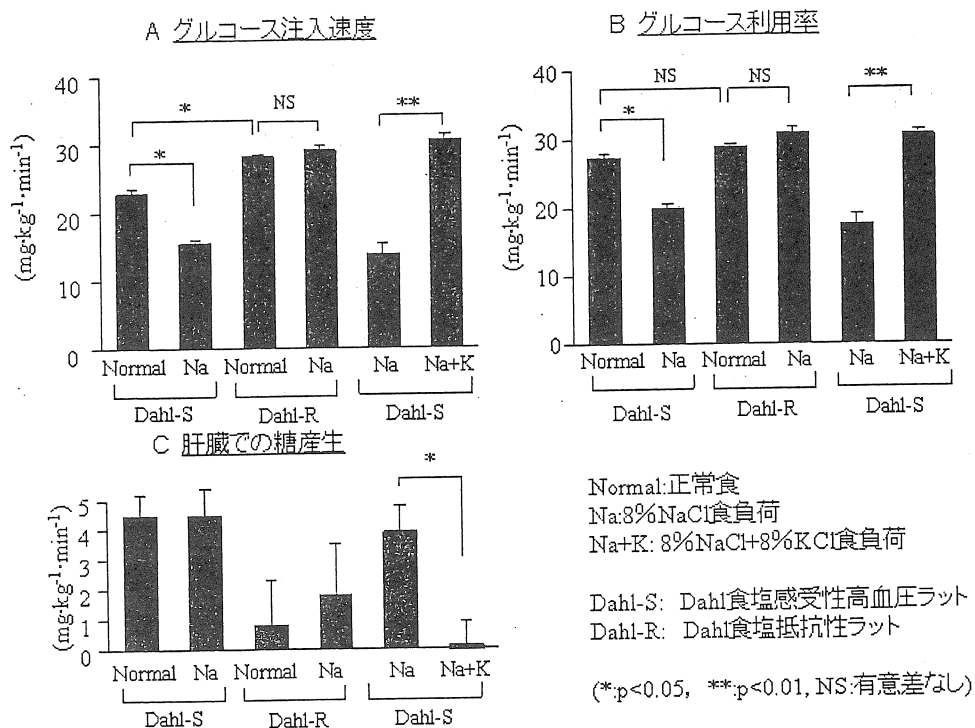


図9 Dahl食塩感受性高血圧ラットのインスリン抵抗性と高カリウム食による改善

したがって、食塩感受性高血圧に伴ってインスリン抵抗性が生じることが示唆される。DSラットでは、肝臓・筋肉でのインスリンによるPI 3-キナーゼ活性化はやはり亢進していた¹²⁾。このDSラットにもtempolを投与すると、血圧には大きな影響はないが、インスリン抵抗性は大きく改善されるため、DSラットにおいてもインスリン抵抗性のメカニズムとして酸化ストレス亢進の影響が示唆された。

なお、興味深いことに、Dahlラットに8%NaClに加え8%KClを含む高食塩・高カリウム食を負荷すると、高食塩食のみを負荷した時に比べ、血圧の軽度低下(196±3 vs. 172±2 mmHg, p<0.01)とインスリン抵抗性の改善が認められた¹²⁾(図9)。以前、食塩感受性に高血圧をきたす患者に高カリウムを補充したところ、血圧の低下を認めたことがFujitaらにより報告されている¹³⁾。また、Tobianらによれば、高食塩食を負荷したDSラットに高カリウムを補充すると、血圧の低下とは独立して腎障害・脳血管障害の頻度が低下するという¹⁴⁾。このように、カリウムの補充には食塩感受性高血圧に対する防御作用が指摘されているが、今回のわれわれの検討では、高食塩食に伴うインスリン抵抗性も高カリウム食によって改善しうることが示された。高食塩食や高血圧がインスリン抵抗性をきたすメカニズムは明らかではないが、このような酸化ストレスの除去や高カリウム食などにより、インスリン抵抗性の増加を防止できる可能性があることが分かった。

5. 今後の方向性

上記の検討から、正常個体にアンジオテンシンIIを注入したり、食塩感受性高血圧をきたす個体に食塩を負荷した場合、血圧上昇に伴って、インスリン抵抗性が亢進することが明らかになった。このメカニズムの一部は、Tempolを用いた実験から考えて何らかの酸化ストレス亢進の関与が想定されるが、さらに分子レベルでの検討が必要であろう(図10)。

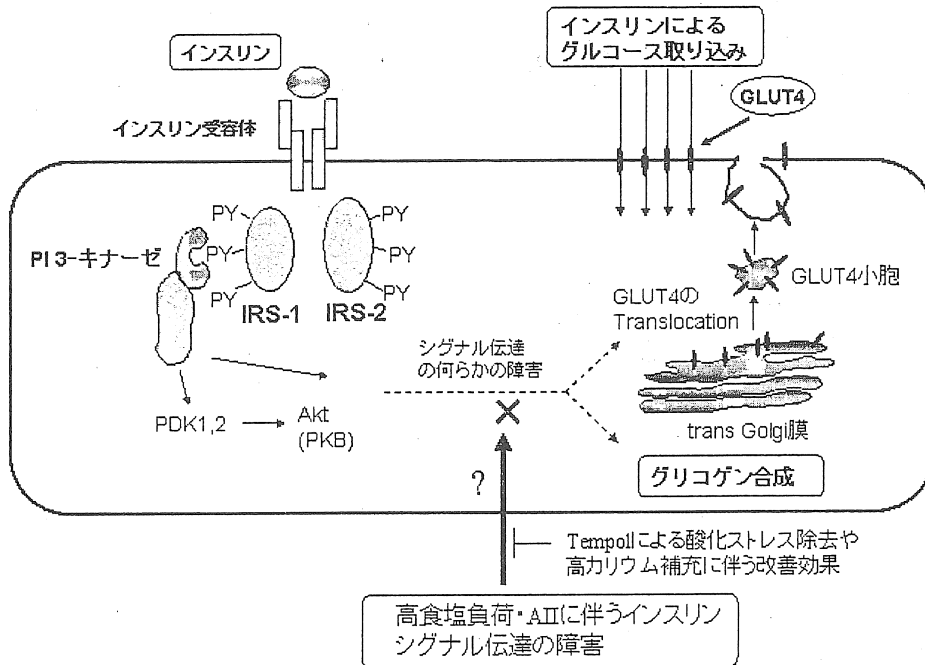


図10 筋肉・肝臓・脂肪組織などの細胞内インスリンシグナル伝達に対する高食塩負荷・AII注入の影響

高食塩負荷に伴うさまざまな臓器障害が報告されているが、インスリン抵抗性の発症もそのひとつに加えられるべきではないかとわれわれは考えている。さらに、インスリン抵抗性の治療に関しても、高カリウム負荷による高食塩食の影響の軽減や酸化ストレスの抑制などもターゲットに含めた新しい治療が今後期待される場所である。

文献

- 1) The Hypertension in Diabetes Study Group: Hypertension in Diabetes Study (HDS): I. Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications. J Hypertens 11: 309, 1993
- 2) Salomaa VV, et al: Glucose tolerance and blood pressure: long term follow up in middle aged men. BMJ 302: 493, 1991

- 3) Gress TW, et al: Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study. N Engl J Med 342:905, 2000
- 4) Fujita T, et al: Factors influencing blood pressure in salt-sensitive patients with hypertension. Am J Med 69:334, 1980
- 5) Donovan DS, et al: Effect of sodium intake on insulin sensitivity. Am J Physiol 264:E730, 1993
- 6) Anai M, et al: Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. Diabetes 47:13, 1998
- 7) Anai M, et al: Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high-fat-fed rats. Diabetes 48:158, 1999
- 8) Ogihara T, et al. Insulin Resistance with Enhanced Insulin-Signaling in High-Salt Diet-Fed Rats. Diabetes 50, 573-583, 2001
- 9) Ogihara T, et al. Angiotensin II-Induced Insulin Resistance Is Associated with Increased Oxidative Stress and Enhanced Insulin-Signaling (論文投稿中)
- 10) Ando K, et al: Salt sensitivity in hypertensive rats with angiotensin II administration. Am J Physiol 259: R1012. 1990
- 11) Rajagopalan S, et al: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin Invest 97: 1916, 1996
- 12) Ogihara T, et al. A High-Salt Diet Enhances Insulin Signaling and Induces Insulin Resistance in Dahl-S rats. Hypertension (in press) 2002
- 13) Fujita T, Ando K. Hemodynamic and endocrine changes associated with potassium supplementation in sodium-loaded hypertensives. Hypertension 6:184-192. 1984
- 14) Tobian L. The protective effects of high-potassium diet in hypertension, and the mechanisms by which high-NaCl diet produce hypertension- A personal view. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management, Second Edition, Reaven Press, Ltd., New York, 1995

Elucidation of the molecular mechanism underlying insulin resistance related to salt-sensitive hypertension

Tomoichiro Asano, Hideki, Katagiri, Katsunori Tsukuda, Hiraku Ono,
Midori, Fujishiro
Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

S u m m a r y

A high-salt diet, which is known to contribute to the pathogenesis of hypertension, is also reportedly associated with insulin resistance. We have investigated the effects of a high-salt diet on insulin sensitivity and insulin signaling in salt-sensitive (Dahl-S) and salt resistant (Dahl-R) strains of Dahl rat as well as the Sprague-Dawley rats constitutively infused with angiotensin II. Evaluation of hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies and glucose uptake into isolated soleus muscle revealed that salt loading (8% NaCl) for 4 weeks induced hypertension and significant insulin resistance in Dahl-S rats, whereas no significant effects were observed in Dahl-R rats. Similarly, insulin resistance was observed in the AII-infused rats. Despite the presence of insulin resistance, insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrates, activation of phosphatidylinositol 3-kinase, and phosphorylation of Akt were all enhanced in Dahl-S rats fed a high-salt diet and AII-infused rats. The mechanism underlying this form of insulin resistance thus differs from that previously associated with obesity and dexamethasone, and is likely due to impairment of one or more metabolic steps situated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activation. Interestingly, supplementation of potassium (8% KCl) ameliorated the changes in insulin sensitivity in Dahl-S rats fed a high-salt diet, associated with a slight, but significant, decrease in blood pressure. Furthermore, treatment with tempol, a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic, reversed upregulated cholesteryl ester hydroperoxide levels in plasma of AII-infused rats and the AII-induced insulin resistance, restoring normal levels. Taken together, these results suggest that increased oxidative stress, possibly through the impaired insulin signaling located downstream from PI 3-kinase activation, is likely to be involved in AII-induced insulin resistance.