

# Repeated Glucose Spikes and Insulin Resistance Synergistically Deteriorate Endothelial Function and Bardoxolone Methyl Ameliorates Endothelial Dysfunction

著者	小木曾 和磨
ファイル(説明)	博士論文全文 博士論文要旨 最終試験結果の要旨 論文審査の要旨
別言語のタイトル	グルコーススパイクとインスリン抵抗性は相乗的に内皮機能を障害しバルドキシロンメチルは内皮障害を減弱する
学位授与番号	17701甲総研第660号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10232/00032018">http://hdl.handle.net/10232/00032018</a>

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 660 号	学位申請者	小木曾 和磨
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	大石 充	副査 宮田 昌明
	副査	井上 博雅	副査 堀内 正久

主査および副査の5名は、令和4年4月12日、学位申請者 小木曾 和磨 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

**質問1) 実験モデルと臨床的にみられるグルコーススパイクの違いはあるのか。**

(回答) 実験では腹腔内投与のため、臨床に比べてスパイクの持続時間は短く頂値は高くなっている。

**質問2) 高カロリー食給餌によるインスリン抵抗性はどのように評価したか。**

(回答) インスリン低血糖試験とHOMA-IRで評価した。

**質問3) 臨床的にはグルコーススパイクが糖尿病の初期にみられやすいのはなぜか。**

(回答) グルコーススパイクは早期のβ細胞機能低下であるインスリン初期分泌の低下とインスリン抵抗性による肝臓および骨格筋による糖取り込み低下により生じる。インスリン欠乏がさらに進行すると空腹時血糖が上昇し慢性高血糖状態となる。したがってグルコーススパイクを形成するためにはβ細胞機能がある程度保たれている必要があるため、糖尿病初期にみられやすい。

**質問4) 一過性高血糖と慢性高血糖に対する内皮機能への影響の違いはあるのか。**

(回答) 慢性高血糖の場合は内皮細胞の抗酸化酵素の発現が誘導されやすいため高血糖による酸化ストレスに対し比較的適応が可能となる。一過性高血糖の場合はこの抗酸化酵素の発現が十分に誘導されないため、活性酸素種により内皮機能が障害されやすい。ただし慢性高血糖でも程度や暴露時間によっては代償機構の破綻により内皮機能は障害される。

**質問5) 高血糖チャンパーによる弛緩障害は内皮機能が低下しているのか、高血糖による活性酸素種の産生による反応なのか。**

(回答) 正常グルコース条件下(5.5 mM)では弛緩障害はみられていないため、一過性高血糖による活性酸素種の産生亢進によりNO利用能が低下した結果であると考えられる。

**質問6) グルコーススパイクとインスリン抵抗性はどちらが内皮機能への影響が大きいのか。特に臨床ではどちらが重要と考えられるか。**

(回答) 今回は両者の組み合わせが重要であったが、グルコーススパイクもインスリン抵抗性も刺激条件によっては単独で内皮機能障害を起こすと考えられる。臨床的にはインスリン抵抗性状態のままグルコーススパイクだけを改善するのは難しいため、減量などインスリン抵抗性の改善にアプローチするほうが妥当と考えられる。

**質問7) CDDO-Meに注目した理由はなにか。NOX2やミトコンドリアを標的とした化合物を投与してもよかったのではないか。**

(回答) ラジカルソースと推定されるNOX2やミトコンドリアを標的とした抗酸化剤を投与すれば、内皮障害の薬理的機序を明らかにする点で有用であったかもしれない。今回は今後糖尿病性腎症の治療薬として臨床応用が期待されるCDDO-Meの抗酸化作用による血管保護効果の有無に注目して実験を行った。

**質問8) CDDO-Meの投与量はどのように決めたのか。**

(回答) 予備実験として、CDDO-Me 0, 0.3, 1, 3, 15 mg/kgの用量設定試験を行った。その結果、最も内皮保護効果を認めた3 mg/kgを採用した。

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) NOS の発現をどのようにチェックしたか。CDDO-Me の弛緩反応の改善からは NOS 発現あるいは NO 産生量が亢進しているのではないか。

(回答) eNOS の mRNA 発現量では群間差はなかった。NO 自体の産生量は評価していない。CDDO-Me 投与による抗酸化酵素発現の誘導により活性酸素種の産生量が減少しており、その結果 NO 利用能の低下が改善し弛緩反応も改善したと考えられる。

質問 10) DHE 染色のどのようなメカニズムか。血管壁全体が染色されているのはなぜか。

(回答) DHE 染色はジヒドロエチジウムがスーパーオキシドと反応し酸化型エチジウムとして赤色蛍光を発する。今回は標本を固定しておらず血管外に発光を認める例もあったため、洗浄の過程で発光の局在性は消失していると考えられている。

質問 11) 飽和脂肪酸の影響を受けにくい胸部大動脈を使用したのはなぜか。

(回答) 分岐が少なく実験に使用しやすい点と、ラットではこれ以上細い血管では内皮機能の評価が難しいため胸部大動脈を用いた。

質問 12) CDDO-Me について今回は予防実験であるが治療実験をしたらどうなるか。

(回答) 予備実験でグルコーススパイクと同時に CDDO-Me を投与した場合十分な内皮保護効果は得られなかったことから、抗酸化酵素発現の誘導が間に合わなかったかもしれない。この点からは内皮機能障害の予防薬であると考えられるが、活性酸素種の除去で改善するレベルの内皮障害であれば治療効果もあるかもしれない。

質問 13) コントロール食(CD)群とウェスタン食(WTD)群のベースラインや生理食塩水を投与したときの閾値グルコース値の差はあるのか。インスリン抵抗性に差があるにもかかわらずグルコース値に差がないのはなぜか。

(回答) ベースライン、ピークとも両群に差はなかった。通常の Wistar ラットを用いたため、耐糖能が非常に高いことがグルコース値に差がなかった理由であると考えられる。

質問 14) 明期と暗期のグルコース値の違いはあるのか。暗期の方が摂食行動によりグルコース値が高くなるのではないか。

(回答) 今回は明期と暗期でベースラインの差はなく、むしろ暗期の方が低値であった。この理由として暗期の方が活動性が高かった可能性がある。

質問 15) ACh による血管弛緩反応が L-NAME でほとんど消失している。NO 以外の弛緩因子はないのか。

(回答) 弛緩作用は一般的に血管径の大きい動脈ほど NO に起因し、小動脈になるほど他の因子(過分極因子、PGI<sub>2</sub> など)の寄与が大きくなる。今回使用した胸部大動脈は NO による弛緩作用が主であったと考えられる。

質問 16) CD と WTD でコレステロール含量に差はあるのか。

(回答) コレステロール含量は WTD で高い (CD 0.15%、WTD 1.25%)。

質問 17) 二元配置分散分析について、交互作用を認めた場合は 4 群間の差を比較したほうがよいのではないか。

(回答) 交互作用を認めた場合 Bonferroni 補正で 4 群間比較を行っているが、表記の仕方が不適切であった。今後改善したい。

質問 18) 結論として血管内皮細胞 NO 産生障害ではなく血管平滑筋細胞の NO 感受性が低下したとしたほうが良いのではないか。ONOO<sup>-</sup> (peroxynitrite) が障害するのは内皮細胞ではなく平滑筋細胞ではないか。

(回答) NO 産生量を評価していないため、平滑筋細胞の NO 感受性が低下している可能性がある。ただし SNP の用量反応実験では低用量でも 4 群間に平滑筋の弛緩反応に差はみられなかったため、血管平滑筋の NO 感受性には差がないと考えられた。

質問 19) pair-fed をどのように行ったか。

(回答) WTD 群の摂餌量を測定し、それに合わせて CD 群の給餌量を設定した。通常は 1 週間に 2 回、グルコースの腹腔内投与時は毎日摂餌量を測定した。

質問 20) CDDO-Me 15 mg/kg (高用量) で内皮機能の改善効果が消失している理由は何か。

(回答) 高用量 CDDO-Me はミトコンドリアの脱共役によりミトコンドリア膜電位が低下すること、および活性酸素種の産生が亢進し内皮機能を障害することが報告されており、今回も同様の機序が考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。