

インスリン急性投与によるラット腸間膜動脈の 拡張反応と内皮由来過分極因子の関与

大久保具明 久代登志男 高橋敦彦 上松瀬勝男

Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in insulin-induced vasodilation
in rat mesenteric artery

Katsuaki OKUBO, Toshio KUSHIRO, Atsuhiko TAKAHASHI, and Katsuo KANMATSUSE

The 2nd Department of Internal Medicine, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) as a factor in blood pressure regulation has received attention recently. However, its role in insulin-induced vasodilation is not clear. We investigated the mechanism of vasodilation induced by insulin *in vitro* using mesenteric arteries isolated from normotensive rats.

The 2nd branch of the mesenteric artery was isolated from male Sprague-Dawley rats (12~14 weeks old), mounted on microcannules in a chamber and perfused with Krebs solution.

The diameter of this segment was measured continuously with a video system under the following conditions : intraluminal insulin administration (10 and 100 mU/ml) with and without pretreatment by denudation, N^ω-methyl-L-arginine methyl ester (L-NAME), indomethacin, tetrabutylammonium (TBA, non-specific Ca²⁺ activated K channel blocker), charybdotoxin (ChTx, large-conductance Ca²⁺ activated K channel blocker), apamin (small-conductance Ca²⁺ activated K channel blocker) or Na⁺/k⁺-ATPase blocker (ouabain).

Insulin treatment induced dose-dependent vasodilation. The effects of insulin were significantly suppressed by denudation, TBA, apamin, and ChTx. L-NAME, indomethacin and ouabain did not influence the insulin-induced vasodilation.

Results suggested that insulin dilates small arteries by activating the Ca²⁺ activated K channel.

Jpn J Nephrol 1999 ; 41 : 685-691.

Key words : insulin, EDHF, mesenteric artery, vasodilation, Ca²⁺ activated K channel

緒 言

高血圧と動脈硬化性疾患に共通した病因としてインスリンの作用異常が指摘され、心臓血管系疾患の一次予防を達成するうえでインスリンの作用異常を是正する意義が注目されている¹⁻³⁾。疫学的には本態性高血圧とインスリン抵抗性が伴いやすい病態であることが知られている⁴⁾。インスリン感受性自体を多数例で測定することは困難なため、疫学調査では血中インスリン濃度と心臓血管系疾患有病率の関連から論じられている⁵⁾。

インスリンは交感神経機能亢進、細胞増殖促進、腎臓でのナトリウム再吸収促進作用を有しており、この作用亢進が高血圧、あるいは動脈硬化性疾患に関連すると考えられる⁶⁾。しかし、インスリンの急性投与はヒト⁷⁾、ラット⁸⁾において血管拡張による降圧をもたらす。ゆえに、インスリン抵抗性に伴うインスリン作用不足が昇圧性に作用し、高血圧に関連する可能性がある。インスリンの血管拡張作用機序については、主に内皮依存性であり nitric oxide (NO)、あるいは prostaglandin が関与することが報告されている^{9,10)}。内皮依存性血管拡張は大動脈などの血管径

が大きい場合には NO の関与が大きい、血圧調節に重要な役割を果たしている抵抗血管では endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) の関与が大きい^{11,12)}。しかし、抵抗血管におけるインスリンによる血管拡張反応機序についての報告はほとんどない。今回、血管径 300 μm 前後のラット腸間膜動脈におけるインスリン急性投与時の血圧反応性とその機序について検討した。

対象と方法

1. 対象

12~14 週齢の雄性 Sprague-Dawley rat (体重約 350 g, Charles River) を用いた。

2. 灌流標本作製

エーテル麻酔下に腹部正中切開を行い全腸管を取り出し、顕微鏡下で腸間膜動脈第 2 枝を 5~6mm の長さに切り出し、脂肪織および結合織を剥離した。この動脈片は Krebs 溶液 (組成: NaCl 118.3 mmol/l, KCl 4.7 mmol/l, CaCl₂ 2.5 mmol/l, MgSO₄ 1.2 mmol/l, KH₂PO₄ 1.2 mmol/l, NaHCO₃ 25 mmol/l, glucose 12 mmol/l) を満たした chamber (Living System Inst, USA)^{13,14)} 内に留置した。さらに、動脈片の両端にガラス製微小カニューレを挿入し外科糸で固定し、chamber を対物レンズとビデオカメラを装着した顕微鏡 (CK2, オリンパス) のステージに置いた (Fig. 1)。微小カニューレは内灌流および外灌流のシステムに接続した。内灌流、外灌流ともに酸素加 Krebs 溶液

(95%O₂, 5%CO₂) により行った。内灌流は 100 ml リザーバーを使用し、ホットプレートで 37°C に保持し、内灌流用 pump (Living System Inst, USA) により 100 μl /分 で灌流した。内灌流は chamber 前後に圧トランスデューサーを接続し連続的に灌流圧を測定した。薬剤投与は内灌流用カニューレの近位側に三方活栓を介してシリンジポンプより行った。外灌流は peristaltic pump (PST-100, 岩城硝子) を用い、近位側に配した恒温槽により 37°C で灌流した。動脈片は長軸方向で屈曲しないよう調節し、リークがないことを確認した。血管反応性は 30 mmHg の内灌流圧下で、video dimension analyzer (Living System Inst, USA) を用いて血管内腔径と両側壁径を連続測定した。前述の設定による灌流後少なくとも 1 時間後に観察し、安定した時点で、外灌流より、phenylephrine (Phe, Sigma, USA) 10⁻⁶, 3 \times 10⁻⁶, 10⁻⁵ および 10⁻⁴ M を累積投与し、最大収縮の約 60% をもたらす Phe 濃度 (EC₆₀) を求めた。これを以下の実験で前収縮として用いた。摘出血管の内皮反応性を確認するため、前収縮後、内灌流より acetylcholin (Ach, Sigma, USA) 10⁻⁶ M を投与し拡張反応を観察した。さらに、平滑筋の反応性を確認するため、前収縮後、外灌流より sodium nitroprusside (SNP, Sigma, USA) 10⁻⁶ M を投与し拡張反応を観察した。Ach および SNP により、Phe 投与前の血管径まで拡張することを確認した。

3. 実験

① Control 群 n=17: 前収縮後にレギュラーインスリン (Actrapid Insulin, Novo Nordisk, Denmark) を 10 mU/ml,

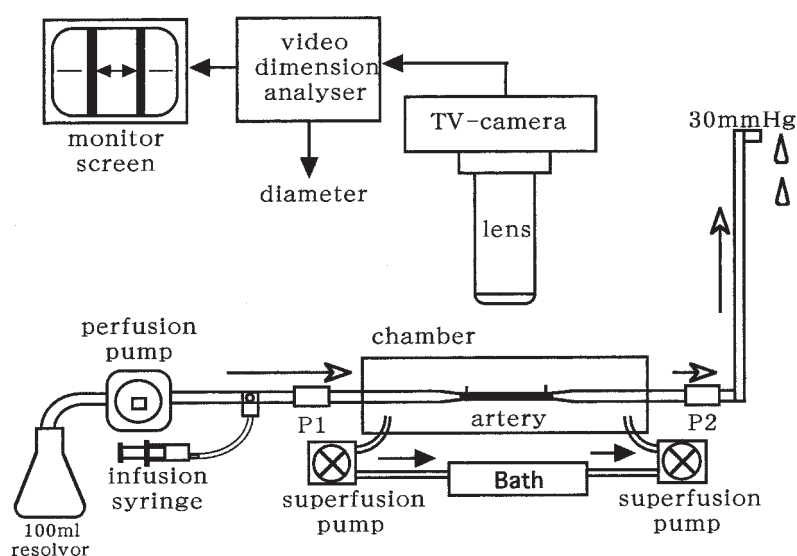


Fig. 1. Schematic illustration of the living system

P1 and P2: Pressure at afferent and efferent sides of perfusion. Pressure gradient between P2 and P1 was kept constant at 30 mmHg.

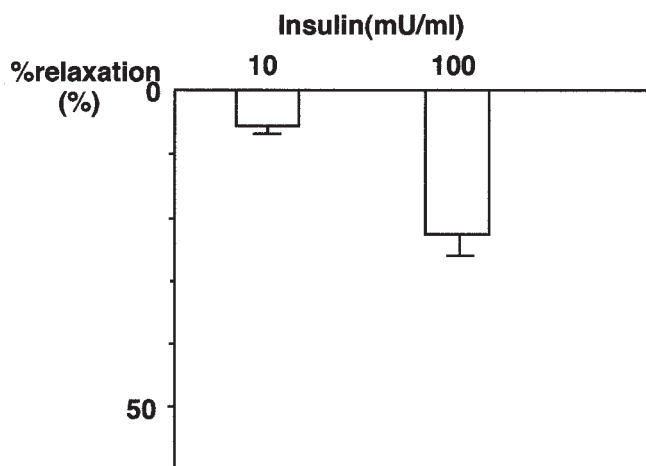


Fig. 2. Percent relaxation with insulin (10 and 100 mU/ml) in phenylephrine (EC₆₀) precontracted rat mesenteric artery

および 100 mU/ml の濃度で各々 10 分間投与した。なお、予備実験において同様のプロトコールで熱処理により不活化したインスリンを投与し、血管反応性が認められないことを確認した。

② 内皮除去群 n=7: 内皮除去のため、CHAPS(3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, Sigma, USA) 10⁻⁴M を内灌流より 90 秒間投与した。その後、Ach を 10⁻⁶M 投与し、血管拡張反応がないことを確認した。その後、前収縮後に 10 mU/ml および 100 mU/ml のインスリンを各々 10 分間投与した。

以下の薬剤を前処置として投与した。

③ L-NAME 群 n=7: N^ω-methyl-L-arginine methyl ester(L-NAME, Sigma, USA) 10⁻⁴M を内灌流側より実験終了まで持続投与した。投与開始 30 分後に前収縮させ、10 mU/ml および 100 mU/ml のインスリンを各々 10 分間投与した。

④ Indomethacin 群 n=6: indomethacin(Sigma, USA) 10⁻⁵M を内灌流側より実験終了まで持続投与した。投与開始 30 分後に前収縮をさせ、10 mU/ml および 100 mU/ml のインスリンを各々 10 分間投与した。

⑤ TBA 群 n=7: non-specific Ca²⁺ activated potassium channel blocker である tetrabutylammonium (TBA, Sigma, USA) 10⁻⁴M を内灌流側より実験終了まで持続投与した。投与開始 30 分後に前収縮をさせ、10 mU/ml および 100 mU/ml のインスリンを各々 10 分間投与した。

⑥ ChTx 群 n=8: large-conductance Ca²⁺ activated potassium channel blocker である charybdotoxin (ChTx, Sigma, USA) 10⁻⁷M を内灌流側より実験終了まで持続投

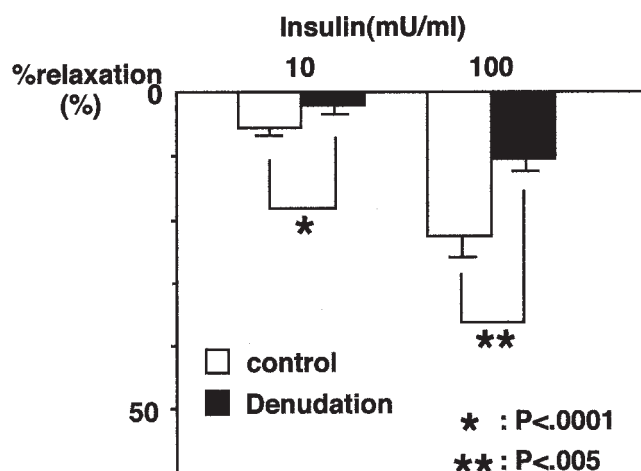


Fig. 3. Percent relaxation by insulin (10 mU and 100 mU/ml) with (closed column) and without (open column) CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 10⁻⁴M) in phenylephrine (EC₆₀) precontracted rat mesenteric artery

与した、投与開始 30 分後に前収縮をさせ、10 mU/ml および 100 mU/ml のインスリンを各々 10 分間投与した。

⑦ Apamin 群 n=7: small-conductance Ca²⁺ activated potassium channel blocker である apamin (Sigma, USA) 10⁻⁶M を内灌流側より実験終了まで持続投与した。投与開始 30 分後に前収縮をさせ、10mU/ml および 100mU/ml のインスリンを各々 10 分間投与した。

⑧ Ouabain 群 n=6: Na⁺/K⁺-ATPase の blocker として ouabain (Sigma, USA) 10⁻⁴M を外灌流側より実験終了まで持続投与した。投与開始 30 分後に前収縮をさせ、10 mU/ml および 100 mU/ml のインスリンを各々 10 分間投与した。

4. データ解析

Phe による前収縮後の血管径とインスリン投与後の血管径の差を Phe による前収縮後の血管径で除したものを % relaxation とした。成績は mean±SEM で示し、有意差の検定には ANOVA によって比較後 Dunnet test を用い、危険率 5%未満の有意水準とした。

結 果

今回使用した腸間膜動脈第 2 枝の血管内腔内径は、resting level で平均 318±17 μm であった。各群のインスリン投与による % relaxation を以下に示した。

① Control 群: インスリン 10, 100 mU/ml は各々 5.7±0.7%, 22.9±2.6% の用量依存性の拡張反応をもたらした

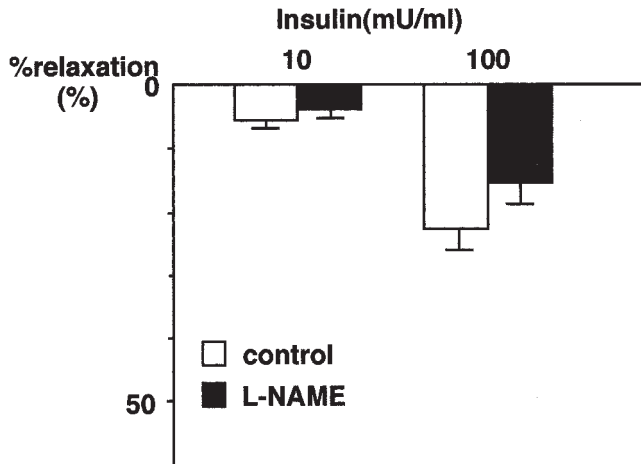


Fig. 4. Percent relaxation by insulin (10 mU and 100 mU/ml) with (closed column) and without (open column) L-NAME (N^{ω} -methyl-L-arginine methyl ester, 10^{-4} M) in phenylephrine (EC_{60}) precontracted rat mesenteric artery

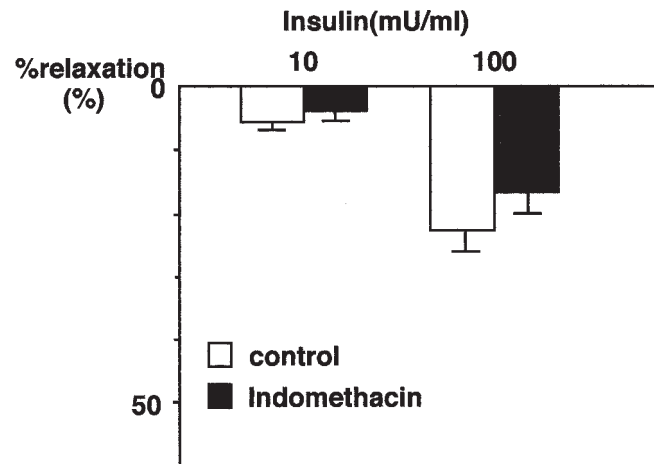


Fig. 5. Percent relaxation by insulin (10 mU and 100 mU/ml) with (close column) and without (open column) indomethacin (10^{-5} M) in phenylephrine (EC_{60}) precontracted rat mesenteric artery

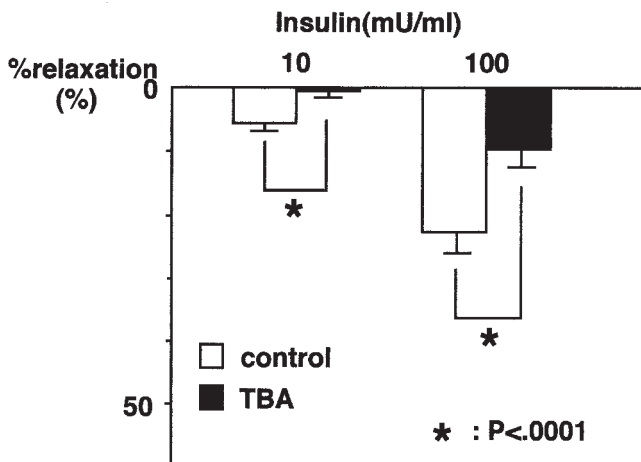


Fig. 6. Percent relaxation by insulin (10 mU and 100 mU/ml) with (closed column) and without (open column) TBA (tetrabutylammonium, 10^{-4} M) in phenylephrine (EC_{60}) precontracted rat mesenteric artery

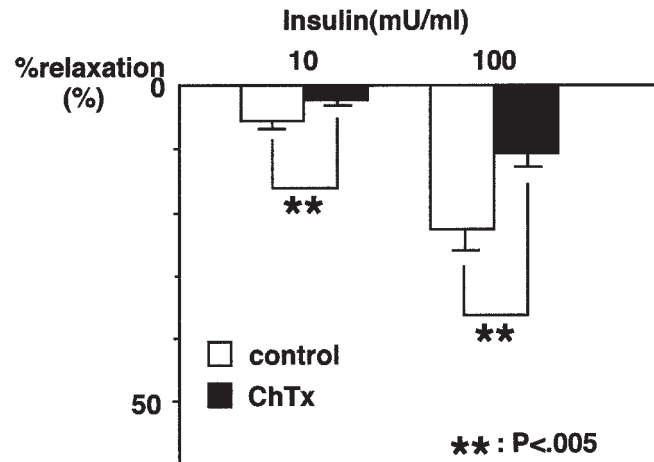


Fig. 7. Percent relaxation by insulin (10 mU and 100 mU/ml) with (closed column) and without (open column) ChTx (charybdotoxin, 10^{-7} M) in phenylephrine (EC_{60}) precontracted rat mesenteric artery

(Fig. 2)。

② 内皮除去群：インスリン 10, 100 mU/ml による% relaxation は $2.1 \pm 0.7\%$, $10.2 \pm 1.4\%$ であり, Control 群に比し低下していた (Fig. 3)。

③ L-NAME 群：インスリン 10, 100 mU/ml による% relaxation は $3.7 \pm 1.0\%$, $16.0 \pm 3.3\%$ であり, Control 群と有意差は認められなかった (Fig. 4)。

④ Indomethacin 群：インスリン 10, 100 mU/ml による% relaxation は $3.6 \pm 0.9\%$, $17.4 \pm 1.1\%$ であり, Control 群と有意差は認められなかった (Fig. 5)。

⑤ TBA 群：インスリン 10, 100 mU/ml による% relaxa-

tion は $0.7 \pm 0.5\%$, $10.1 \pm 2.8\%$ であり, Control 群に比し有意に低下していた (Fig. 6)。

⑥ ChTx 群：インスリン 10, 100 mU/ml による% relaxation は $2.6 \pm 0.7\%$, $11.5 \pm 1.9\%$ であり, Control 群にし比し有意に低下していた (Fig. 7)。

⑦ Apamin 群：インスリン 10, 100 mU/ml による% relaxation は $3.0 \pm 0.7\%$, $15.6 \pm 2.6\%$ であり, Control 群に比し有意に低下していた (Fig. 8)。

⑧ Ouabain 群：インスリン 10, 100 mU/ml による% relaxation は $6.6 \pm 1.4\%$, $22.2 \pm 2.8\%$ であり, Control 群と有意差はなかった (Fig. 9)。

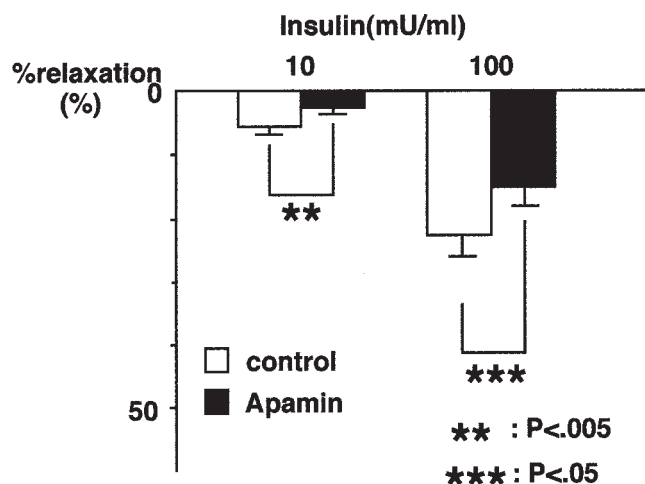


Fig. 8. Percent relaxation by insulin (10 mU and 100 mU/ml) with (closed column) and without (open column) apamin (10^{-6} M) in phenylephrine (EC_{50}) precontracted rat mesenteric artery

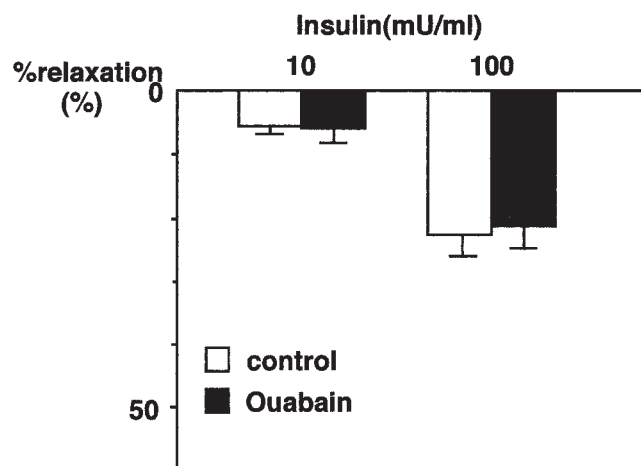


Fig. 9. Percent relaxation by insulin (10 mU and 100 mU/ml) with (closed column) and without (open column) ouabain (10^{-4} M) in phenylephrine (EC_{50}) precontracted rat mesenteric artery

考 察

インスリン抵抗性症候群におけるインスリン作用異常は抵抗性に伴う作用低下,あるいは代償性高インスリン血症による作用亢進の両面から説明されている。インスリンによる血管拡張は,骨格筋への血流を増加させ筋内へのグルコースの取り込みを増やす。インスリンの急性投与による血管拡張反応は,老年者¹⁵⁾,本態性高血圧患者¹⁶⁾で低下していることが報告されている。したがって,インスリンの血管拡張作用低下自体が本態性高血圧と糖代謝に対するインスリン感受性に関連する可能性がある。インスリンの血管に対する作用機序を解明することがインスリン抵抗性症候群の病態解明に重要と考えられる。

インスリンによる血管拡張作用機序は,主に内皮依存性であることが認められている。内皮依存性の血管拡張にはNO, prostacyclin(PGI_2), EDHFが関与するが,血管床により異なることが指摘されている。大動脈などの大血管ではNOの関与が大きい,血圧調節に重要な役割を果たしている抵抗血管ではEDHFの関与が大きいことが報告されている^{11,12)}。EDHFによる血管拡張反応は高血圧自然発症ラットで低下しており,高血圧の成因との関連が指摘されている。EDHFの本体は解明されていないが,アラキドン酸代謝経路からのP450代謝産物¹⁷⁾,あるいは K^+ ¹⁸⁾が重要視されている。また,EDHFはpotassium channel,特に Ca^{2+} activated potassium channelを介して細胞内過分極をもたらすことが指摘されている。しかし,EDHFの作用部位,あるいは細胞内情報伝達機構の詳細

は不明である。

今回用いたラット腸間膜動脈の第2枝の血管径は300 μ m前後であり,抵抗血管に近い。この血管においてもインスリンの急性投与は用量依存性の血管拡張をもたらし,内皮除去により反応が抑制されたことから,主に内皮依存性の拡張反応によると考えられる。インスリンによる拡張反応は,indomethacin,あるいはL-NAMEの前処置では抑制されず, PGI_2 およびNOの関与は少ないと考えられる。

インスリンによる拡張反応は非特異的 potassium channel blockerのTBA, small-conductance Ca^{2+} activated potassium channel blockerのapamin,およびlarge-conductance Ca^{2+} activated potassium channel blockerのChTxにより抑制された。ゆえに,インスリンは抵抗血管においてEDHFを放出させ, Ca^{2+} activated potassium channelを介して血管平滑筋の過分極をもたらし, Ca^{2+} 流入減少による血管拡張をもたらすと推測される。EDHFは血液粘性や血流速度の増大に伴うshear stress¹⁹⁾により増加するが,今回の実験では内灌流の流速および溶液の粘性を一定にしているので,この可能性はないと考えられる。インスリンがどのような機序でEDHFに作用するかは不明であり今後の検討が必要である。

今回,内皮除去群でもインスリンによる血管拡張反応は完全に阻止されなかったことから,内皮を介さない血管平滑筋への直接的作用の経路も否定できない。インスリンは Na^+/k^+ ATPase活性の増加をもたらすことが示されており,直接的に血管平滑筋 Na^+/k^+ ATPase活性に作用した

可能性がある²⁰⁾。しかし、今回、ouabain 前処置がインスリンによる拡張反応に影響しなかったことから、 Na^+/k^+ ATPase の関与は否定的である。現在、インスリンが内皮依存性以外の作用機序により血管拡張反応をもたらすとの報告はない。しかし、インスリン受容体が血管平滑筋細胞に存在するため、高濃度では直接的に作用する可能性がある。また、インスリンが、insulin-like growth factor-I 受容体刺激²¹⁾、直接的な Ca^{2+} channel 抑制、 Ca^{2+} ATPase 促進による Ca^{2+} 減少をもたらすことが報告されており、それらの関与について今後さらに検討する必要がある。また、正常のインスリン血中濃度はヒト²²⁾で $10\sim 100 \mu\text{U}/\text{ml}$ 、ラット²³⁾は $40\sim 50 \mu\text{U}/\text{ml}$ の範囲といわれている。インスリン抵抗性症候群における血中インスリン濃度は正常の数倍～数十倍の上昇である。しかし、生体において慢性の高インスリン血症は交感神経機能、ナトリウム代謝などに影響するため、インスリン自体が血管にどのような作用をもたらすかを知ることは困難である。インスリンの薬理作用を検討した幾つかの研究では、今回われわれが用いた高用量が用いられている²⁴⁾。本実験における高用量、急性投与による知見を、インスリン抵抗性症候群における慢性の高インスリン血症によりもたらされる病態と関連させることは慎重でなければならないが、インスリンの血管壁に対する薬理作用を知る手がかりになる。

今回の成績は、インスリンは正常血圧ラットの抵抗血管では主として EDHF を介する血管拡張をもたらす、降圧性に作用することを示唆している。今後、異なった血管床あるいは高血圧モデルにおける検討、およびインスリンが血管平滑筋に直接的に作用し血管拡張をもたらす機序について検討が必要である。

文 献

1. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (Syndrome X) : an expanded definition. *Ann Rev Med* 1993 ; 14 : 121-31.
2. DeFronzo RA. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Coronary Artery Disease ; A Complex Metabolic Web. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992 ; 20(Suppl 11) : S1-15.
3. Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, Lehtovirta M, Jacob S, Yki-Javinen H. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Blood Pressure. *Hypertension* 1997 ; 30 : 1144-9.
4. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities—The role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 374-81.
5. Ferrannini E, Mari A. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens* 1998, 16 : 895-906.
6. 久代登志男, 原澤信介, 上松瀬勝男. 高血圧とインスリン. *日内会誌* 1999 ; 88 : 223-9.
7. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Natali A, Ferrannini E, Salvetti A. Effects of Insulin on Acetylcholine-Induced Vasodilation in Normotensive Subjects and Patients with Essential Hypertension. *Circulation* 1995 ; 92 : 2911-8.
8. Wu Hy, Jeng YY, Yue CJ, Chyu KY, Hsueh WA, Chan TM. Endothelial-Dependent Vascular of Insulin and Insulin-Like Growth Factor I in the Perfused Rat Mesenteric Artery and Aortic Ring. *Diabetes* 1994 ; 43 : 1027-32.
9. Schroeder CA, Chen YL, Messina EJ. Inhibition of NO synthesis or endothelium removal reveals a vasoconstrictor effect of insulin on isolated arterioles. *Am J Physiol* 1997 ; 276 : H815-20.
10. Veen S, Chang PC. Prostaglandins and nitric oxide mediate insulin-induced vasodilation in the human forearm. *Cardiovasc Res* 1997, 34 : 223-9.
11. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada K, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A. The Importance of the Hyperpolarizing Mechanism Increases as the Vessel Size Decreases in Endothelium-Dependent Relaxations in Rat Mesenteric Circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996 ; 28 : 703-11.
12. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor. *Clin Experi Pharm Physi* 1996 ; 23 : 1082-90.
13. Halpern WG, Coy GS. Mechanical behavior of pressurized *in vitro* prearteriolar vessels determined with a video system. *Ann Biomed Engl* 1984 ; 12 : 463-79.
14. Dohi Y, Thiel MA, Buhler FR, Luscher TF. Activation of Endothelial L-arginine Pathway in Resistance Arteries. Effect of Age and Hypertension. *Hypertension* 1990 ; 15 : 170-9.
15. Hausberg M, Hoffman RP, Somert VK, Sinkey CA, Mark AL, Anderson EA. Contrasting Autonomic and Hemodynamic Effects of Insulin in Healthy Elderly Versus Young Subjects. *Hypertension* 1997 ; 29 : 700-5.
16. Imaizumi T. Effects of Intra-arterial Infusion of Insulin on Control of Forearm Vascular Resistance in Normotensive and Hypertensive Subjects. *Hypertens Res* 1996 ; 19(Suppl I) : S47-50.
17. Voorde JV, Vanheel B. Influence of Cytochrome P-450 Inhibitors on Endothelium-Dependent Nitro-L-Arginine-Resistant Relaxati Arteries. *J Cardiovasc Pharm* 1997 ; 29 : 827-32.
18. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998 ; 396 : 269-71.
19. Koller A, Sun D, Kaley G. Role of Shear Stress and Endothelial Prostaglandins in Flow- and Viscosity-Induced Dilatation of Arterioles *In Vitro*. *Circulation Research*

- 1993 ; 72 : 1276-84.
20. Smith JM, Paulson DJ, Solar SM. Na^+/K^+ -ATPase activity in vascular smooth muscle from streptozotocin diabetic rat. *J Cardiovasc Res* 1997 ; 34 : 137-44.
 21. Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. Hypertension, Hypertriglyceridemia, and Impaired Endothelium-dependent Vascular Relaxation in Mice Lacking Insulin Receptor Substrate-1. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 1784-8.
 22. Hofeldt FD, Lufkin EG, Hagler L, Block MB, Dippe SE, Davis JW, Levin SR, Forsham PH, Herman RH. Are Abnormalities in Insulin Secretion Responsible for Reactive Hypoglycemia? *Diabetes* 1974 ; 23 : 589-96.
 23. Tucker BJ, Anderson CM, Thies RS, Collins RC, Blantz RC. Glomerular hemodynamic alterations during acute hyperinsulinemia in normal and diabetic rats. *Kidney Int* 1992 ; 42 : 1160-8.
 24. Wambach GK, Liu D. Insulin attenuates vasoconstriction by noradrenaline, serotonin, and potassium chloride in rat mesenteric arterioles. *Clin Exp Hypertens* 1992 ; 14(4) : 733-40.