

平成10年度長寿科学総合研究事業
研究報告書

トランスジェニックマウスを用いた老化関連
代謝疾患の成因解明と、予防法に関する研究

主任研究者 江崎 治

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（総括）研究報告書

トランスジェニックマウスを用いた老化関連代謝疾患の成因解明と、予防法に関する研究

（主任）研究者 江崎 治 国立健康・栄養研究所臨床栄養部長

老化に伴い骨格筋量が減少し、内臓性脂肪が蓄積してくる。これに伴い、インスリン抵抗性が発症し、糖尿病、肥満、高脂血症、動脈硬化症といった疾患が増加する。この成因と予防法を明らかにするため、糖質／脂質代謝に影響を与える遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作成し、どの組織のどの遺伝子異常が個体レベルで糖脂質代謝にどのような影響を与えているか調べた。

〔研究組織〕

江崎 治（国立健康・栄養研究所 臨床栄養部 部長）
門脇 孝（東京大学医学部糖尿病・代謝内科 講師）
山田信博（東京大学医学部糖尿病・代謝内科 助教授）
山本徳男（東北大学遺伝子実験施設 教授）

A. 研究目的

高齢者になると骨格筋量が減少し、そのかわりに脂肪量が増加してくる。80代になると、30代の時に比べ、筋肉量が30～40%減少する。さらに悪いことに、脂肪の中でもたちの悪い内臓脂肪が増加することが知られていて、生活習慣病（糖尿病・高脂血症・高血圧症・動脈硬化症等）の主要な発症原因になっている。本研究では、これらの成因を明らかにするため、糖質／脂質代謝に影響を与える遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやノッ

クアウトマウスを作成し、どの組織のどの遺伝子異常が個体レベルで糖脂質代謝にどのような影響を与えているか明らかにする。これらの結果を基に、老化に多く認められる疾患の成因や予防法を明らかにする。糖代謝に関してインスリン分泌の面から門脇が、インスリン抵抗性の新しい治療法に関して江崎が、インスリン抵抗性に基づく脂質代謝異常に関しては山田が、高脂血症に関しては山本が、担当した。

B. 研究方法

1) 糖尿病

高齢者による耐糖能悪化の成因の1つにインスリン分泌能の低下が知られている。門脇は、膵β細胞におけるグルコースによるインスリン分泌亢進の作用機序を明らかにする目的で、GPシヤトルの律速酵素であるミトコンドリア・グリセロール3リン酸脱水素酵素（mGPDH）欠損マウスをジーンターゲットイング

の手法を用いて作製した。mGPDH欠損膵島に、MAシャトルの阻害剤であるアミノオキシ酢酸 (AOA) を併用することにより、両方のNADHシャトル機構を停止させた状態を膵島において実現し、NADHシャトル機構のグルコース応答性インスリン分泌における役割について検討した。

一方、筋肉、脂肪組織 (WAT、BAT) に特異的に発現している糖輸送体 (GLUT4) は、末梢組織での糖代謝の律速段階になっていて、この量の変化は、個体でのインスリン感受性に直接影響を与える。実際、高脂肪食による糖尿病の発症が糖輸送体 (GLUT4) の筋肉組織での2倍程度の過剰発現により完全に防止できるため、GLUT4蛋白の発現機序が明らかになり、GLUT4量を増加させることができれば寝たきり老人や、高齢者にとり、非常に有益である。運動 (筋肉) や、T3処理 (筋肉) により、GLUT4 mRNAは増加し、高脂肪食 (WAT)、絶食 (WAT)、糖尿病 (筋肉、WAT)、除神経 (筋肉) ではGLUT4 mRNAが減少する。江崎らは、各種ミニジーンGLUT4欠失ミュータントを持つ、トランスジェニックマウス (-7395, -3237, -2000, -1000, -700, -442, -423) を作成し、運動や高脂肪食に反応するシスエレメントや組織特異的発現調節エレメントを推定した。又、ゲルシフト、フットプリント法を用いて今年度はより細かい分析を行った。

2) 肥満/エネルギー代謝

Acyl-CoA合成酵素 (ACS) は組織での中性脂肪の蓄積を促すと考えられ、脱共役蛋白質 (UCP) は脂肪酸の化学的エネルギーを熱として放散し、脂肪蓄積量を減少させる可能性が示唆される。江崎は、これらの遺伝子を肝臓特異的なエンハンサー (アルブミンエンハンサー)、筋肉特異的なエンハンサー (ミオシ

ンライトチェインエンハンサー)、脂肪組織特異的なエンハンサー (aP2エンハンサー) をそれぞれに組み入れたコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを得た後、全身及び各組織の糖質・脂質代謝への影響を検討する。

3) 動脈硬化/高脂血症

高齢者に於いては、内臓性肥満の発症により、インスリン抵抗性が出現し、アテローム性のプラーク病変を形成することになる。肥満や高インスリン血症を伴う場合や、IGTから軽症の糖尿病では、インスリン抵抗性を共通の基礎病態として、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧を同時に共有していることが多い。このような危険因子の重積は、現代の循環器疾患の背景にある共通した代謝病態と考えられ、危険因子の重積が重症化すればする程、血管病態は重症化して、プラークを不安定化して虚血性心疾患を急速に発症させると考えられる。今回はインスリン抵抗性と冠危険因子との関係を明らかにする為に、高インスリン血症ラットモデルとインスリン抵抗性のモデル動物であるIRS-1欠損マウスを用いて解析を行った。

又、山本は、アポEを結合する特異的なレセプターを2つ同定した。1つはVLDLレセプター、もう一つはアポEレセプター2と名付け、これらのノックアウトマウスを作成し、その機序を明らかにした。

C. 研究結果

1) 糖尿病

グルコースによるインスリン分泌亢進作用の新規モデル

mGPDH欠損マウスは、正常耐糖能であり、膵島からのグルコース応答性インスリン分泌に

も障害は認めなかった。野生型マウス膵島にアミノオキシ酢酸 (AOA) を加え、リンゴ酸-アスパラギン酸 (MA) シャトルのみを阻害した状態でも、グルコース応答性インスリン分泌はほぼ保たれていた。しかし、mGPDH欠損マウス膵島にAOAを添加すると、グルコース応答性インスリン分泌はほぼ完全に廃絶した。また、mGPDH欠損マウス膵島で、グルコース刺激によるインスリン分泌が充分におきている状態で後からAOAを添加しても、分泌の廃絶が生じた。このようにNADHシャトル機構は、グルコース応答性インスリン分泌の開始および維持に必須であることが初めて明らかにされた。

次に、ミトコンドリアにおけるグルコース酸化を検討した。TCA回路におけるグルコース酸化をより正確に反映するとされる6-¹⁴C-glucoseの酸化は約50%に低下していた。また、グルコース刺激後のNAD(P)H産生も野生型膵島に比べて、約2割に低下しており、TCA回路での酸化が低下していることを裏付けていた。このように、TCA回路に由来するNADHとFADH₂産生が大幅に低下し、さらに両シャトルを介してのNADHとFADH₂産生が廃絶している状態で、ミトコンドリア内の呼吸鎖でのプロトン勾配の形成は正常の3割弱へと大きく低下していた。

GLUT4を介したインスリン抵抗性解除法の開発

江崎等は、高齢者に対して、GLUT4を増加させる方法を見出す目的で、運動に反応するシスエレメントの同定を行った。トランスジェニックマウス (各コンストラクト2系統づつ) にスイミング (30分間、4回/日) を約2週間行わせ、腓腹筋におけるミニジーン発現への運動の効果を、RNase protection法にて、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAとの

比較により検討した。-7395、-3237、-2000、-1000、-700、-550のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAの両方の増加が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウスでは内因性GLUT4mRNA量は運動によって増加したが、ミニジーンGLUT4mRNA量は増加しなかった。さらに、この-550~-442の領域で、F1: -550~-526、F2: -530~-501、F3: -505~-469、F4: -475~-438の4つのフラグメントを作成し、マウスの筋肉から抽出した核蛋白を用いてゲルシフト・競合アッセイを行った。その結果、F1とF2では弱いですが、F3とF4には強く結合する特異的な蛋白質が存在することを見出した。

高脂肪食に反応するシスエレメントが-700と-442の間に存在することがわかった。次に、高脂肪食に反応するシスエレメントが存在している-700~-442の領域内で、F1: -750~-551 (200bp) とF2: -593~-394 (200bp) の2つのフラグメントを作成し、マウスの脂肪組織から抽出した核蛋白を用いてフットプリントを行ったところ、F1のWF1: -706~-681とWF2: -675~-653に蛋白質の結合領域が認められた。又、F1を用いてゲルシフトを行ったところ、蛋白質の結合が認められ、WF1とWF2によって競合する特異的な結合であることが分かった。

又、T3投与に対するGLUT4mRNAの増減を調べると内因性のGLUT4mRNAは、-700、-442、-423のマウスで増加するのにに対し、ミニジーンGLUT4mRNAは、-700のみ増加し、-442、-423のマウスでは増加が認められなかった。すなわち-700と-442の間にT3に反応するエレメントが存在することが明らかになった。

2) 肥満/エネルギー代謝

サザンプロット法によりLiver-ACS、Muscle-ACS、FAT-UCP2、Muscle-UCP3トランスジェニックマウスの作成を確認した。現在、フェノタイプの変化を経時的に調べている。UCP2をWATに過剰発現したマウスでは、WATでの内因性のUCP2の発現量が低下し、UCP2が何らかの機能を有することが推定された。

3) 動脈硬化/高脂血症

高インスリン血症への影響

脾移植を行ったラットにおいてIVGTTを行ったところ、耐糖能は正常と有意差を認めなかったが、血中インスリン反応は正常に比較して約2倍であり、空腹時インスリン値も約2倍に増加していた。体重は増加傾向であり、血中中性脂肪値はむしろ低値であり、血圧に有意差を認めなかった。インスリンの血管壁への直接作用に関して検討したところ、このモデルでは血管の病理学的変化を認めなかったが、血管壁のコレステロール含量が有意に増加していた。血中インスリン値と血管壁のコレステロール含量との間には、有為な正の相関関係を認めた。

インスリン抵抗性の高血圧及び脂質代謝への影響

IRS-1欠損マウスにおいて有意な血圧の上昇を認めた。また、脈拍数や脈圧には差を認めなかった。IRS-1欠損マウスより得た動脈リングを用いて、内皮依存性弛緩反応を検討したところ、IRS-1欠損マウスにおける有意な低下を認めた。一方、内皮非依存性弛緩反応に異常は認めなかった。血中トリグリセリド値はIRS-1欠損マウスにおいて有意に上昇し、血中HDLコレステロール値は有意に低下していた。しかし血中コレステロール値やNEFA値に有意差を認めなかった。またヘパリン静注後のリポタンパクリパーゼ活性はIRS-1欠損マウス

において有意に低下していた。脂肪負荷時においては、IRS-1欠損マウスでは血中トリグリセリド値は約2倍に増加した。

VLDLレセプター機能の解析

野性型[VLDLR(+/+), LDLR(+/+)]及びVLDLレセプター欠損[VLDLR(-/-), LDLR(+/+)]、LDLレセプター欠損[VLDLR(+/+), LDLR(-/-)]、VLDLレセプター/LDLレセプターを共に欠損する[VLDLR(-/-), LDLR(-/-)]ノックアウトマウスの胎児より初代繊維芽細胞を調製し、実験に用いた。4種の遺伝型を持つマウス由来の初代繊維芽細胞を調製し、脂肪細胞へ分化能を解析した結果、VLDLレセプターとLDLレセプターの欠損はin vitroでの脂肪細胞への分化に全く影響を与えないことが示された。蛍光色素DiIで標識した β -VLDLの細胞内への取込みを解析した結果、VLDLレセプターとLDLレセプターのそれぞれの欠損は β -VLDLの細胞内への取込みに大きな影響を与えないが、両者が共に欠損するとほとんど取り込みが見られなくなることが示され、アポEリポタンパクとそのレセプターにより、脂肪細胞へ中性脂肪が供給されるメカニズムが明らかになった。

アポEレセプター2機能の解析

アポEレセプター2の役割を明らかにするために、ノックアウトマウスを作製した。マウス遺伝子を用いてターゲッティング・ベクターを作製し、ES細胞に導入したのちにアポEレセプター2遺伝子を部分欠損するES細胞を得、これを用いてキメラマウスを作製し、最終的にアポEレセプター2遺伝子を部分欠損するノックアウトマウスを作製し、確立することに成功した。アポEレセプター2の欠損はマウスの発生や成長、行動、外観、繁殖に大きな影響を与えないが、血中脂質の解析の結果、血中中性脂肪が若干増加することが示された。

現在、経時的に変化を測定中である。

D. 考察

これまで側副経路として認識されてきたNADHシャトル機構がグルコース応答性インスリン分泌に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。我々は、膵β細胞において以下のような新規なグルコース代謝モデルを提唱する。好氣的解糖により産生されたNADHの電子はNADHシャトル機構により効率的にミトコンドリアに運ばれ、それ自体がATP産生に大きく寄与するばかりでなく、ミトコンドリアのカルシウム濃度の上昇などをとおしてピルビン酸の酸化を亢進させ、分泌に十分なATP産生を保障する。一方、両NADHシャトルが停止すると、シャトル由来のATP産生がなくなるばかりでなく、ピルビン酸の酸化が半減する結果、ATP産生は大幅に減少し、分泌は廃絶する。グルコース特異的なインスリン分泌応答不全は2型糖尿病の中核をなす徴候で高齢者におけるインスリン分泌不全にもあてはまる。このため、NADHシャトル機構の障害を高齢者に於いても考慮する必要がある。

GLUT4の発現調節領域が狭められ、ゲルシフト、フットプリント法により運動に反応するシスエレメントの分析が進んだ。運動に反応するエレメントが-550と-442の間に存在することがわかり、転写因子を同定するためのシスエレメントをin vivoにおいて同定できることが明らかになった。又、運動によるGLUT4発現増加のシスエレメントと除神経に反応するシスエレメントが異なったことから、運動によるGLUT4発現増加への神経性因子の関与は否定的であると考えられた。さらに、T3によるGLUT4発現増加に関与するエレメントが、-700と-442の間にあることが推定され

た。

インスリンの血管壁への直接作用に関して、膵移植モデルを用いて高インスリン血症を複製して明らかにした。このモデルでは血管壁のコレステロール含量が有意に増加しており、高インスリン血症は血管壁に作用して、血管壁のコレステロール蓄積を促進させることにより、粥状動脈硬化症の進展に関与していると考えられた。

インスリン抵抗性と冠危険因子との関係については多くの報告があるが、今回はじめて、単一の遺伝子欠損によりインスリン抵抗性を示す動物モデルにおいて、インスリン抵抗性を原因として、種々の代謝異常を呈して、冠危険因子を重積することが明らかとなった。IRS-1はインスリンの情報伝達において重要な役割を果たし、その欠損マウスでは高インスリン血症および主として筋肉におけるインスリン抵抗性を示し、耐糖能は正常であることが知られている。本マウスにおける血圧、脂質代謝異常について検討したところ、高トリグリセリド血症および低HDL-コレステロール血症をみとめ、その成因としてリポタンパクリパーゼ活性の抑制を認めた。IRS-1欠損マウスでは高血圧を示し、その成因の一つとして内皮依存性血管弛緩反応の低下を認めた。

VLDLレセプターはほ乳動物において、脂肪細胞へのアポEリポタンパク由来の脂質の取り込みを担うことが示された。また、脳に発現するアポEレセプター2の異常はマイルドな高脂血症を引き起こすことが示され、脳への一般循環からの中性脂肪の輸送経路がアポEレセプターに担われる可能性とヒトにもミュータントが存在する可能性が示された。又、新規LDLレセプター類似タンパクLRP5は肝臓に発現する新しいアポE結合タンパクである可能性が

示された。

E. 結論

今年度は、発生工学的手法を用いて、高齢者の代謝異常の解明、治療法の開発に関し、顕著な進歩が認められた。インスリン分泌に関しては、NADHシャトル機構の重要な関与、インスリン抵抗性の予防に関してGLUT4発現調節領域の分析、インスリン抵抗性自体が及ぼす高血圧、脂質代謝への影響、脳に発現するアポEレセプター2のノックアウトマウスの作成など多くの進展があった。

トランスジェニックマウスを用いたGLUT4発現調節の解明と、糖尿病予防法に関する研究

（分担）研究者 江崎 治 国立健康・栄養研究所臨床栄養部長

GLUT4（糖輸送体）の発現調節機序を明らかにするため、新しくトランスジェニックマウスを作成し、運動、甲状腺ホルモン、除神経、高脂肪食に反応するシスエレメントのゲノム上の位置を推定した。又、このGLUT4トランスジェニックマウスは、筋肉での脱共役蛋白質（UCP3）を過剰発現することによりエネルギーを消費している可能性を示した。各組織（肝、筋肉、脂肪）での脂肪の蓄積したり、減少させたりした場合の個体レベルでの代謝への影響を調べるため、各種のトランスジェニックマウスを作成した。

A. 研究目的

糖輸送体蛋白の1つであるGLUT4は筋肉／脂肪組織に特異的に発現し、筋肉や脂肪組織における糖の取り込みの律速段階となっている。インスリンはGLUT4を細胞内プールから形質膜へ移動させることで、形質膜上のGLUT4量を増加させ、血中のグルコースを細胞内へ入れ、血糖値を低下させる¹⁾。このGLUT4mRNAの発現量は生理的、病的な条件で大きく変動する。例えば、糖尿病²⁾、肥満³⁾、除神経⁴⁾及び高脂肪食⁵⁾等によって減少し、逆に運動⁶⁾や甲状腺ホルモン（T3）⁷⁾により増加する。GLUT4mRNAの複雑な発現調節機構により、筋肉／脂肪組織の糖代謝はコントロールされていると想定されている。実際、軽度のGLUT4の増加により、db/dbマウス⁸⁾や高脂肪食⁹⁾による糖尿病の発症は完全に予防される。このため、GLUT4ミニジーン欠失ミュータントを導入したトランスジェニックマウスを用いGLUT4の選択的発現機構を明らかにし、原因に基づく予防法や新しい糖尿病の治療の開発をめざす。又、GLUT4を過剰発現させるとエネルギー代謝にど

のような影響を与えるか、酸素消費量や脱共役蛋白の発現量の変化を調べた。

生体膜の主要構成成分である脂質の変化や細胞内の脂質代謝異常は、糖尿病や高脂血症などの生活習慣病の発症に関与することが想定されている。組織特異的に中性脂肪蓄積の状態を変化させたトランスジェニックマウスを作成し、各組織での脂肪の蓄積量を変化させた場合の個体レベルでの糖／脂質代謝の変動を調べ、どの組織の変化が個体に対し強い変化を生じているか明らかにする。

B. 研究方法

1. GLUT4遺伝子の運動に反応するシスエレメントと高脂肪食に反応するシスエレメントが、転写開始点より上流の-700と-442の間に存在することをこれまでに明らかにしている。そこで、さらに狭い領域でのシスエレメントを同定することを目的とし、-550のトランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスに、スイミング運動を行い、-700～-550と-550～-442のどちらにシスエレメントが存在す

るのかを決定した。又、甲状腺ホルモン (T3) により、GLUT4の発現量が増加することが知られているが、-700、-442、-423のトランスジェニックマウスを用いて、3mg/Kg/日のT3を3日間投与し、内因性、外因性のGLUT4mRNAを測定することにより、どのエレメントが重要かinvivo研究により明らかにした。同定された領域のフラグメントとマウスの筋肉や脂肪組織より抽出した核蛋白を用いて、まずフットプリント法にて蛋白の結合する領域を狭め、次にゲルシフト法にてその領域に結合している蛋白質が、運動、高脂肪食により異なるか調べた。

2. 骨格筋に強く発現している熱産生ミトコンドリア脱共役タンパク質 (UCP3) のmRNAは、甲状腺ホルモン、飢餓、グルココルチコイドにより発現量が増加することが知られている。筋肉では甲状腺ホルモンや飢餓によって糖輸送体 (GLUT4) 量が増加することから、筋肉組織での糖質の代謝がUCP3の発現を増加させる可能性が考えられる。この仮説を証明するため、筋肉でGLUT4を強制発現させたトランスジェニックマウスを用いてUCP3の発現量が増えているか検討した。

3. 中性脂肪を蓄積すると考えられるAcyl-CoA合成酵素 (ACS)、又、エネルギー消費の律速段階となっているUncoupling Protein1, 2, 3 (UCP1, 2, 3) のcDNAをクローニングし、肝特異的なエンハンサー (アルブミンエンハンサー)、筋肉特異的なエンハンサー (ミオシンライトチェーンエンハンサー)、脂肪組織特異的なエンハンサー (ARF6) を持つコンストラクトに結合させ、トランスジェニックマウスを作成した。

C. 研究結果

1. ミニジーンGLUT4の発現の組織特異性を検討した。-7395、-3237、-2000、-1000、-700、

-550のトランスジェニックマウスでは、内因性と同様に、骨格筋・脂肪組織 (白色・褐色) ・心筋において発現が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウスでは、骨格筋・脂肪組織 (白色) ・心筋においては発現が認められたが、褐色脂肪組織での発現が認められなかった。よって、-550と-442の間に褐色脂肪組織に特異的なエンハンサーが存在することがわかった。-423では、筋肉における発現に必要であるとされるMEF2を含まないにも関わらず、筋肉での発現が認められた。

次に、運動に反応するシスエレメントの同定を行った。トランスジェニックマウス (各コンストラクト2系統づつ) にスイミング (30分間、4回/日) を約2週間行わせ、腓腹筋におけるミニジーン発現への運動の効果を、RNase protection法にて、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAとの比較により検討した。-7395、-3237、-2000、-1000、-700、-550のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAの両方の増加が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウスでは内因性GLUT4mRNA量は運動によって増加したが、ミニジーンGLUT4mRNA量は増加しなかった。さらに、この領域内で、F1: -550~-526、F2: -530~-501、F3: -505~-469、F4: -475~-438の4つのフラグメントを作成し、マウスの筋肉から抽出した核蛋白を用いてゲルシフト・競合アッセイを行った。その結果、F1とF2では弱いですが、F3とF4には強く結合する特異的な蛋白質が存在することが分かった。

又、これらのトランスジェニックマウスを用いて、高脂肪食に反応するシスエレメントの同定を行った。各トランスジェニックマウスをそれぞれ2群に分けて、高炭水化物食 (脂肪エネルギー比10%)、高脂肪食 (サフラワー油、脂

肪エネルギー比60%)で3カ月間飼育し、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAを別々に定量した。脂肪組織におけるGLUT4mRNA量の低下は、-7395、-3237、-2000、-1000、-700のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAともに認められた。しかし、-442のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA量が低下していたにもかかわらず、ミニジーンGLUT4mRNA量は低下しなかった。よって、高脂肪食に反応するシスエレメントが-700と-442の間に存在することがわかった。次に、高脂肪食に反応するシスエレメントが存在している-700~-442の領域内で、F1:-750~-551 (200bp)とF2:-593~-394 (200bp)の2つのフラグメントを作成し、マウスの脂肪組織から抽出した核蛋白を用いてフットプリントを行ったところ、F1のWF1:-706~-681とWF2:-675~-653に蛋白質の結合領域が認められた。又、F1を用いてゲルシフトを行ったところ、蛋白質の結合が認められ、WF1とWF2によって競合する特異的な結合であることが分かった。

又、T3投与に対するGLUT4mRNAの増減を調べると内因性のGLUT4mRNAは、-700、-442、-423のマウスで増加するのに対し、ミニジーンGLUT4mRNAは、-700のみ増加し、-442、-423のマウスでは増加が認められなかった。

2. 5'上流領域の長さの異なる5種類のマウスGLUT4ミニジーンコンストラクト(-3237、-2000、-1000、-700、-442)を遺伝子導入し、得られたトランスジェニックマウスのGLUT4とUCP3のmRNA発現量を検討した。その結果、腓腹筋でのGLUT4mRNA発現量の増加に比例してUCP3mRNAの発現量も増加した。次に、-1000GLUT4トランスジェニックマウスを同様に解析したところ、GLUT4のmRNA発現量は各組織で約1.6~3.1倍に増加しており、骨格筋のUCP3 mRN

A発現量は3.9~4.8倍に増加していた。酸素消費量は、ノントランスジェニックマウスに比べてトランスジェニックマウスでは、16~19%の増加を示した。トランスジェニックマウスでは、血糖が有意に低下し、乳酸は有意に増加していたが、インスリン、グルカゴン、コルチコステロン、遊離脂肪酸、ケトン体などには有意差は認められなかった。一方、血中の甲状腺ホルモンとレプチンのレベルはトランスジェニックマウスで有意に低下していた。尿中のカテコールアミン排泄量を測定したところ、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン、バニルマンデル酸すべてトランスジェニックマウスとノントランスジェニックマウス間に有意差は認められなかった。

3. サザンブロット法によりLiver-ACS、Muscle-ACS、FAT-UCP2、Muscle-UCP3トランスジェニックマウスの作成を確認した。現在、フェノタイプの変化を調べている。UCP2をWATに過剰発現したマウスでは、内因性のUCP2の発現量が低下し、UCP2が何らかの機能を有することが推定された。

D. 考察

GLUT4トランスジェニックマウスを用いた研究から、-423ミニジーンGLUT4の中に、筋肉及び白色脂肪組織特異的なシスエレメントが存在することがわかった。褐色脂肪組織特異的なエンハンサーが-550と-442の間に存在することがわかり、白色脂肪や筋肉特異的なエレメントと分離できた。運動に反応するエレメントが-550と-442の間に存在することがわかり、転写因子を同定するためのシスエレメントをin vivoにおいて同定できることが明らかになった。又、運動によるGLUT4発現増加のシスエレメントと除神経に反応するシスエレメントが異なったこ

とから、運動によるGLUT4発現増加への神経性因子の関与は否定的であると考えられた。さらに、T3によるGLUT4発現増加に関与するエレメントが、-700と-442の間にあることが推定された。

GLUT4が増加して細胞内に過剰に糖を取り込むような条件下では、骨格筋のUCP3は誘導を受けることが明らかとなった。UCP3は過剰な糖を消費する役割が考えられ、生体内エネルギーの調節に関与している可能性が強く示唆された。

E. 結論

GLUT4の発現調節領域が狭められ、ゲルシフト、フットプリント法により運動に反応するシスエレメントの分析が進んだ。又、GLUT4を過剰発現したマウスでは、筋肉でのエネルギー消費がUCP3を過剰発現することにより亢進し、グリコーゲンの蓄積を防止するように働いている可能性を示した。各組織別の脂肪蓄積への全身への影響を調べるため、アシルCoA合成酵素 (ACS) を肝、筋肉へ過剰発現させるトランスジェニックマウスを作成し、又、各組織別に脂肪蓄積を防ぐと思われる脱共役蛋白 (UCP) を過剰発現させるトランスジェニックマウスを作成した。

F. 引用文献

- 1) B. B. Kahn: Glucose transport: pivotal step in insulin action, *Diabetes*, Vol. 45, 1644-1654, 1996.
- 2) B. B. Kahn, L. Rossetti, et al: Decreased in vivo glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats, *J. Clin. Invest.*, Vol. 87, 2197-2206, 1991.
- 3) O. Pederson, C. R. Kahn, et al: Divergent regulation of the Glut1 and Glut4 glucose transporters in isolated adipocytes from Zucker rats, *J. Clin. Invest.*, Vol. 89, 1964-1973, 1992.
- 4) N. E. Block, D. R. Menick, et al: Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle, *J. Clin. Invest.*, Vol. 88, 1546-1552, 1991.
- 5) B. B. Kahn: Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle, *J. Nutr.*, Vol. 124, 1289S-1295S, 1994.
- 6) S. Ikemoto, K. S. Thompson, et al: Expression of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice: effect of exercise and role in glucose homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, 865-869, 1995.
- 7) T. Shimokawa, M. Kato, et al: Effect of Triiodothyronine on muscle cell differentiation and blood glucose level in hyperglycemic KK mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 235, 790-793, 1997.

- 8) E.M.Gibbs, J.L.Stock, et al: Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4), *J. Clin. Invest.*, Vol.95, 1512-1518, 1995.
- 9) S.Ikemoto, K.S.Thompson, et al: High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.92, 3096-3099, 1995.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Kim, H. and Ezaki, O. Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
- 2)Tsuboyama-Kasaoka, N., Tsunoda, N., Maruyama, K., Takahashi, M., Kim, H., Cooke, D. W., Lane, M. D. and Ezaki, O. Overexpression of GLUT4 in mice causes up-regulation of UCP3 mRNA in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
- 3)Tsuboyama-Kasaoka, N., Tsunoda, N., Maruyama, K., Takahashi, M., Kim, H., Ikemoto, S. and Ezaki, O. Up-regulation

of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 247: 498-503.

4)Tsunoda, N., Ikemoto, S., Takahashi, M., Maruyama, K., Watanabe, H., Goto, N. and Ezaki, O. High-monounsaturated fat diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism.* 1998 47:724-730.

5)Shimokawa, T., Kato, M., Ezaki, O. and Hashimoto, S. Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 246:287-292.

2. 学会発表

- 1)N. Tsunoda, D. W. Cooke, K. Maruyama, N. Tsuboyama, H. Kim, M. Takahashi, S. Ikemoto, M. D. Lane and O. Ezaki Up-regulation of GLUT4 by exercise training and down-regulation of GLUT4 by denervation is mediated by different cis-element(s) of GLUT4 gene. 8th International Congress on Obesity 1998
- 2)N. Tsuboyama, N. Tsunoda, K. Maruyama, M. Takahashi, H. Kim, S. Ikemoto and O. Ezaki Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and GLUT4 overexpression and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles; parallel relations

hip between GLUT4 and UCP3 in mice.
8th International Congress on Obesity
1998

3) N. Tsuboyama-Kasaoka, N. Tsunoda and O.
Ezaki Regulation of uncoupling protein
3 (UCP3) mRNA in skeletal muscles.
第19回日本肥満学会 1998

4) 角田伸代、坪山宜代、池本真二、江崎治
GLUT4 遺伝子の発現調節部位の解析：運
動及び除神経による発現調節機序の検討
第41回日本糖尿病学会年次学術集会
1998

5) 坪山宜代、角田伸代、池本真二、江崎治
Uncoupling protein3 (UCP3) の発現調
節：GLUT4 の発現増加によるUCP3 m
RNA のUp-regulation 第41回日本糖尿
病学会年次学術集会 1998

トランスジェニックマウスを用いた老化関連
代謝疾患の成因解明と、予防法に関する研究

分担研究者 門脇 孝 東京大学大学院医学系糖尿病・代謝内科 講師

研究要旨

グリセロールリン酸シャトルの律速酵素であるミトコンドリア・グリセロール3リン酸脱水素酵素を欠損したマウスを作製した。その腓島にもう一つのNADHシャトルであるリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルの阻害剤、アミノオキシ酢酸を併用することにより、両NADHシャトル機能が停止した腓島モデルを樹立した。この際、解糖系代謝は障害されなかったが、グルコース応答性のNAD(P)H自家蛍光産生、ミトコンドリア電位形成、ミトコンドリア・カルシウム濃度上昇、ATP産生は大きく障害され、インスリン分泌は廃絶した。ミトコンドリアへの、NADHシャトル機構を介した電子の供給を、ピルビン酸の供給と並ぶ解糖系由来の代謝シグナルとする新規のグルコース応答性インスリン分泌モデルを提唱する。

A. 研究目的

膵β細胞は細胞外のグルコース濃度に応じて、インスリンを分泌する。この際にグルコースの代謝過程が決定的に重要な役割を果たす。解糖系で産生されるADHの電子は、NADHシャトル機構によりミトコンドリア内に輸送されてNADHまたはFADH₂を生成し、呼吸鎖に直接的に電子を供給することにより、ATP産生を活性化する。NADHシャトル機構は、グリセロールリン酸(GP)シャトルとリンゴ酸-アスパラギン酸(MA)シャトルから構成される。今回、グルコース応答性インスリン分泌におけるNADHシャトル機構の役割を発生工学的手法を用いて検討した。

B. 研究方法

我々は、GPシャトルの律速酵素であるミトコンドリア・グリセロール3リン酸脱水素酵素(mGPDH)欠損マウスをジーンターゲットイングの手法を用いて作製した。mGPDH欠損腓島に、MAシャトルの阻害剤であるアミノオキシ酢酸(AOA)を併用することにより、両方のNADHシャトル機構を停止させた状態を腓島において実現し、NADHシャトル機構のグルコース応答性インスリン分泌における役割について検討することが可能となった。

C. 研究結果

mGPDH欠損マウスは、正常耐糖能であり、膵島からのグルコース応答性インスリン分泌にも障害は認めなかった。野生型マウス膵島にAOAを加え、MAシャトルのみを阻害した状態でも、グルコース応答性インスリン分泌はほぼ保たれていた。しかし、mGPDH欠損マウス膵島にAOAを添加すると、グルコース応答性インスリン分泌はほぼ完全に廃絶した。また、mGPDH欠損マウス膵島で、グルコース刺激によるインスリン分泌が充分におきている状態で後からAOAを添加しても、分泌の廃絶が生じた。このようにNADHシャトル機構は、グルコース応答性インスリン分泌の開始および維持に必須であることが初めて明らかにされた。では、NADHシャトル機構が廃絶するとなぜ、グルコース応答性インスリン分泌は廃絶するのであろうか。従来の説によれば、解糖系のグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素による反応に必要な NAD^+ がNADHに還元されたのち、シャトル機能の停止によって再酸化が不可能あるいは不十分となり、その結果、解糖系の流れが阻害されるためとも考えられた。しかし、 $5\text{-}^3\text{H}\text{-glucose}$ からの $^3\text{H}_2\text{O}$ 産生を指標として、解糖系でのグルコース利用を検討したが、障害は認められなかった。従って、インスリン分泌廃絶は、解糖系の阻害では説明できないことが判明した。次に我々は、ミトコンドリアにおけるグルコース酸化を検討した。 $\text{U-}^{14}\text{C}\text{-glucose}$ の酸化は、両シャトル機能が停止した状態でも有意な低下は認められず、ピルビン酸のミトコンドリアへの供給までの経路には大きな異常が生じていないと考えられた。ところが、TCA回路におけるグルコース酸化をより正確に反映するとさ

れる $6\text{-}^{14}\text{C}\text{-glucose}$ の酸化は約50%に低下していた。また、グルコース刺激後のNAD(P)H産生も野生型膵島に比べて、約2割に低下しており、TCA回路での酸化が低下していることを裏付けていた。このように、TCA回路に由来するNADHと FADH_2 産生が大幅に低下し、さらに両シャトルを介してのNADHと FADH_2 産生が廃絶している状態で、ミトコンドリア内の呼吸鎖でのプロトン勾配の形成は正常の3割弱へと大きく低下していた。

両シャトル機能が停止した際に、TCA回路での酸化が障害される理由として、ミトコンドリア内へのカルシウム流入阻害が想定された。カルシウムはTCA回路の構成酵素である NAD^+ -イソクエン酸脱水素酵素や α -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性を正に制御することが知られており、さらに、ミトコンドリア内へのカルシウム流入を制御している内膜上のカルシウムユニポーターを阻害するルテニウムレッドを用いた研究から、ミトコンドリアのカルシウム濃度上昇が、グルコース応答性インスリン分泌に必須であることが提唱されているためである。実際、AOA添加時のmGPDH欠損マウス膵島において、グルコース刺激後のミトコンドリアカルシウム濃度上昇がまったく観察されなかった。このことが、ピルビン酸のミトコンドリアへの供給が正常であってもTCA回路での酸化が半減してしまうことの、少なくとも一因と想定される。

さて、NADHシャトルは、TCA回路の活性化を介してはじめてインスリン分泌を刺激し得るのであろうか。それとも、シャトルを介したエネルギー産生単独だけでもインスリン分泌には充分なのであろうか。モノフルオロ酢酸はTCA回路をアコニターゼの段階で阻害することが知られ

ている。野生型膵島にモノフルオロ酢酸を投与し、TCA回路でのグルコース酸化を約5割阻害した条件下でも、インスリン分泌はまったく影響されなかった。このことは、NADHシャトル機能停止時の分泌廃絶は、TCA回路の約5割の阻害のみでは説明されないこと、ひるがえっては、NADHシャトル機構自体に重要な役割があることを明確に物語っている。

D. 考察

これまで側副経路として認識されてきたNADHシャトル機構がグルコース応答性インスリン分泌に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。上記のデータから、我々は、膵β細胞において以下のような新規なグルコース代謝モデルを提唱したい。好氣的解糖により産生されたNADHの電子はNADHシャトル機構により効率的にミトコンドリアに運ばれ、それ自体がATP産生に大きく寄与するばかりでなく、ミトコンドリアのカルシウム濃度の上昇などをとおしてピルビン酸の酸化を亢進させ、分泌に十分なATP産生を保証する。一方、両NADHシャトルが停止すると、シャトル由来のATP産生がなくなるばかりでなく、ピルビン酸の酸化が半減する結果、ATP産生は大幅に減少し、分泌は廃絶する。

E. 結論

グルコース特異的なインスリン分泌応答不全は2型糖尿病の中核をなす徴候であり、その成因の候補として、今回の研究によりその重要性が明らかにされたNADHシャトル機構の障害を今後は念頭に置く必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y., Kadowaki, T. Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283 : 981-985, 1999.

2. 学会発表

(1)第41回日本糖尿病学会年次学術集会

江藤一弘、寺内康夫、鏑本義治、門脇孝 グリセロールリン酸シャトルのグルコース応答性インスリン分泌における役割-mGPDH遺伝子欠損マウスを用いた検討- 糖尿病 第41巻臨時増感号 : 130, 1998.

(2)58th Scientific Session, American Diabetes Association

Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T. A pivotal role of NADH shuttle in glucose-induced insulin secretion from β cells revealed with mGPDH knockout mice. *Diabetes* 47 (supple 1) : A58, 1998.

(3)34th Annual Meeting, European Association for the Study of Diabetes.

Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T. A pivotal role of NADH shuttles in glucose-induced insulin secretion from β cells. Abstracts of 34th annual meeting of EASD : A22, 1998.

インスリン抵抗性と冠危険因子の重積 ：発生工学的手法を用いた解析

山田信博（東京大学医学部糖尿病・代謝内科助教授）

インスリン抵抗性や肥満を中心病態とする患者においては、高率に虚血性心疾患を合併することや、そのインスリン抵抗性の背景に高インスリン血症が存在することが知られ、高インスリン血症と耐糖能異常や、高脂血症、虚血性心疾患との関係が注目されるようになってきた。今回、インスリン抵抗性の動物モデルであるIRS-1欠損マウスの成績を報告する。本マウスでは高トリグリセリド血症および低HDL-コレステロール血症、高血圧を認めた。すなわち、単一の遺伝子異常に基づくインスリン抵抗性により冠危険因子が重複して出現することが明らかとなった。

キーワード：冠危険因子、インスリン抵抗性

A. 研究目的

現代の疾病構造をみると動脈硬化性疾患、特に虚血性心疾患などの循環器疾患が増加している。動脈硬化性疾患は勿論、加齢と共に発症するが、その基礎には遺伝的素因及び環境要因が重要であることはいままでのまではない。最近、動脈硬化症の背景となる環境要因は著しい変化をとげ、高カロリー、高脂肪の食生活、運動不足の時代に入っている。エネルギー摂取の増加とエネルギー消費の低下に伴う病態であり、エネルギー蓄積の結果として種々の代謝異常を来している。すなわち現代では冠危険因子である糖代謝異常、脂質代謝異常、肥満症などの代謝異常は遺伝的素因とともに、この環境要因を主要因として発症すると考えられる。この生活習慣病といわれる様な代謝病態では、しばしばインスリン抵抗性が存在し、アテローム性のプラーク病変を形成することになる。肥満や高インスリン血症を伴う場合や、IGTから軽症の糖尿病では、インスリン抵抗性を共通の基礎病態として、

個々の素因に偏りはあるものの、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧を同時に共有していることがしばしばである。このような危険因子の重積は、現代の循環器疾患の背景にある共通した代謝病態と考えられ、危険因子の重積が重症化すればする程、血管病態は重症化して、プラークを不安定化して虚血性心疾患を急速に発症させると考えられる。今回はインスリン抵抗性と冠危険因子との関係を明らかにする為に、高インスリン血症ラットモデルとインスリン抵抗性のモデル動物であるIRS-1欠損マウスを用いて解析を行った。

B. 研究方法

高インスリン血症の作用に関して、正常ラットに膵移植を行い、2個の膵臓を有する内因性の高インスリン血症ラットモデルを作成した。膵移植は門脈環流および静脈環流の2つの方法を用いた。

遺伝子ターゲティング法により作製されたIRS-1欠損マウスを用いた (Tamemoto, H. et al.

Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. Nature.372: 182-186, 1994)。このマウスにおいて、血中脂質および血圧を測定した。血圧はカフ法および動脈内直接法により測定された。ヘパリン静注後および脂肪組織におけるリポタンパクリパーゼ活性を測定した。内皮依存性および非依存性血管弛緩反応を動脈リングを用いて測定した。

C. 研究結果

高インスリン血症

脾移植を行ったラットにおいてIVGTTを行ったところ、耐糖能は正常と有意差を認めなかったが、血中インスリン反応は正常に比較して約2倍であり、空腹時インスリン値も約2倍に増加していた(図1)。体重は増加傾向であり、血中中性脂肪値はむしろ低値であり、血圧に有意差を認めなかった。

インスリンの血管壁への直接作用に関して検討したところ、このモデルでは血管の病理学的変化を認めなかったが、血管壁のコレステロール含量が有意に増加していた。血中インスリン値と血管壁のコレステロール含量との間には、有為な正の相関関係を認めた(図2)。

門脈環流と静脈環流との間で、血中インスリン反応に有意差を認めなかった。一方、血中中性脂肪およびコレステロール値は門脈環流群において有為に低値であった。

インスリン抵抗性

表1の様に、カフ法及び直接法ともにIRS-1欠損マウスにおいて有意な血圧の上昇を認めた。また、脈拍数や脈圧には差を認めなかった。IRS-1欠損マウスより得た動脈リングを用いて、内皮依存性弛緩反応を検討したところ、IRS-1欠損マウスにおける有意な低下を認めた。一方、内皮非依存性弛緩反応に異常は認めなかった。

血中トリグリセリド値はIRS-1欠損マウスにおいて有意に上昇し、血中HDLコレステロール値は有意に低下していた。しかし血中コレステロール値やNEFA値に有意差を認めなかった(表2)。

またヘパリン静注後のリポタンパクリパーゼ活性はIRS-1欠損マウスにおいて有意に低下していた。脂肪負荷時においては、IRS-1欠損マウスでは血中トリグリセリド値は約2倍に増加した。

D. 考察及び結論

ライフスタイルの急激な変化により、従来問題とはならなかった糖代謝や脂質代謝に関する病的素因が顕在化している。すなわちエネルギー摂取の増加とエネルギー消費の低下に伴う病態であり、体内において十分に消費し切れない栄養素が高脂血症や高血糖を招いている。エネルギー蓄積という代謝病態において、インスリン抵抗性が存在するが、これは過度なエネルギー蓄積を抑制しようという一種の生体防禦機構とも考えられる。インスリン抵抗性の発症要因としては、遺伝素因が大であるが、過食に伴う肥満や運動不足、加齢などの後天的要因によっても生じることが知られている。

インスリンの血管壁への直接作用に関して、脾移植モデルを用いて高インスリン血症を作製して明らかにした。このモデルでは血管壁のコレステロール含量が有意に増加しており、高インスリン血症は血管壁に作用して、血管壁のコレステロール蓄積を促進させることにより、粥状動脈硬化症の進展に関与していると考えられた。エネルギー蓄積の代謝状態では、高インスリン血症をしばしば示し、血管壁においてインスリン作用と共にコレステロールの沈着が始まることが示唆された。

インスリン抵抗性と冠危険因子との関係につ

いては多くの報告があるが、今回はじめて、単一の遺伝子欠損によりインスリン抵抗性を示す動物モデルにおいて、インスリン抵抗性を原因として、種々の代謝異常を呈して、冠危険因子を重積することが明らかとなった。IRS-1はインスリンの情報伝達において重要な役割を果たし、その欠損マウスでは高インスリン血症および主として筋肉におけるインスリン抵抗性を示し、耐糖能は正常であることが知られている。本マウスにおける血圧、脂質代謝異常について検討したところ、高トリグリセリド血症および低HDL-コレステロール血症をみとめ、その成因としてリポタンパクリパーゼ活性の抑制を認めた。IRS-1欠損マウスでは高血圧を示し、その成因の一つとして内皮依存性血管弛緩反応の低下を認めた。

インスリン抵抗性の病態では冠危険因子の重積を招くが、ReavenらはこれをシンドロームXと呼んでいる。1) 高インスリン血症、2) 耐糖能異常、3) 低HDL-コレステロール血症、4) 高トリグリセリド血症、5) 高血圧である。今回のIRS-1マウスを用いた検討より、インスリン抵抗性により肥満の有無に関わらず、これらの冠危険因子が出現することが明らかとなった。このようにインスリン抵抗性は冠危険因子の重積を生じて、動脈硬化症の進展に作用すると考えられる。臨床的見地より、UKPDS研究はNIDDMにおいて血糖コントロールとともに、血圧の管理の重要性や肥満糖尿病におけるピグアナイド剤の有用性を明らかにし、またCAREスタディや4Sスタディでは高脂血症治療の有効性が示され、各危険因子の管理の重要性が明らかにされつつある。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ① J Osuga, M Yonemoto, N Yamada, H Shimano, H Yagyu, K Ohashi, K Harada, T Kamei, Y Yazaki, S Ishibashi. Cholesterol lowering in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing apolipoprotein E. *J Clin Invest*, 102, 386-394, 1998
- ② K Ohashi, S Ishibashi, M Yamamoto, J Osuga, Y Yazaki, S Yukawa, N Yamada. A truncated species of apolipoprotein B (B-38.7) in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia associated with diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18,1330-1334, 1998
- ③ H Abe, N Yamada, K Kamata, T Kuwaki, M Shimada, J Osuga, F Shionoiri, N Yahagi, T Kadowaki, H Tamemoto, S Ishibashi, Y Yazaki, M Makuuchi. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest*, 101, 1784-1788, 1998

Table 1. Restrained and unrestrained arterial blood pressure and pulse rate of IRS-1 deficient and wild-type mice .

	Homozygous	Wild-type
Restrained study	(n=21)	(n=18)
Body weight	15.6 ± 2.5*	22.6 ± 5.6
Systolic BP	147 ± 11*	123 ± 24
unrestrained study	(n=16)	(n=18)
Body weight	18.8 ± 2.6*	26.1 ± 4.1
Systolic BP	132 ± 14#	119 ± 15
Diastolic BP	89 ± 16#	79 ± 12
Mean BP	110 ± 12*	99 ± 10
Pulse pressure	43 ± 19	40 ± 20
Pulse rate	634 ± 77	652 ± 41

Blood pressure was measured at a tail artery in 5 to 8-month-old mice in a restrained condition. Furthermore, pulsatile blood pressure was measured under conscious and unrestrained conditions in a quiet environment. Data were expressed as mean ± SD. * p < 0.01, # p < 0.05 vs wild-type

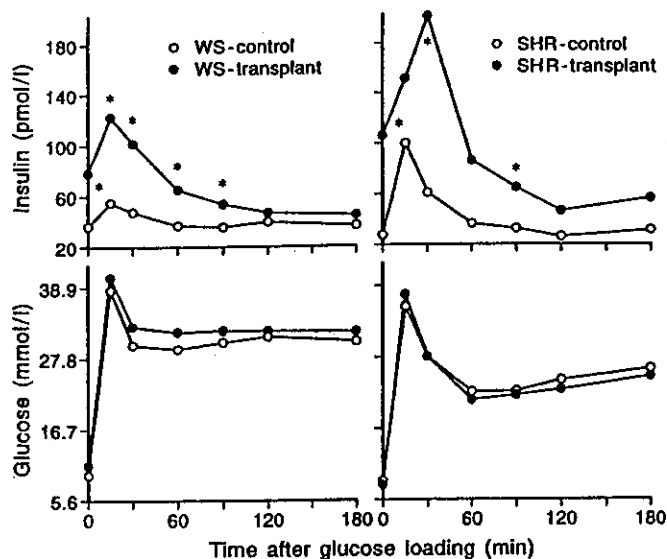


Fig. 1. Blood glucose and insulin responses during intravenous glucose tolerance test (IVGTT). Rats were fasted overnight and underwent an IVGTT at 6 months in WS rats (six sham-operated and six transplanted rats), and at 9 months in SHR rats (four sham-operated and four transplanted rats).