

厚生労働科学研究費補助金

循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業

各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管病進展予防効果の
総合的検討に関する研究

平成 16~18 年度総合研究報告書

主任研究者 井口昭久

平成 19 (2007) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告

各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管病進展予防効果の総合的検討に 関する研究	1
--	---

名古屋大学大学院医学系研究科老年科学 井口 昭久

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	5
--------------------	---

III. 研究成果の刊行物・別冊	9
------------------	---

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
総合研究報告書

主任研究者 井口 昭久（名古屋大学大学院医学系研究科老年科学 教授）

研究要旨 各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管病進展予防効果と作用機序を検討した。

1) 代謝内分泌学,循環器学,老年学,臨床薬理学専門医 14 名,12 施設,40 関連病院からなる研究班を結成した。17 年 3 月末までに自立している糖尿病患者 4014 名を登録した。prospective cohort 試験として,虚血性心疾患発症,死亡/同入院,CVD,ASO 発症総死亡をエンドポイントに検討した。

2) 登録時プロフィール 平均 67.4±9.1 歳、男女比 1.105, 血清総コレステロール 203.1mg/dl, HbA1C7.53±1.12%, 脂質異常者 75.9%、高脂血症薬服薬者 60.7%,高血圧合併者 77.6%, を認めた。18 年 3 月、19 年 1 月に登録後平均 1 及び 1.9 年間の成績を回収し、解析をすすめた(追跡率初年度 98.8、2 年度 92%)。心血管病発症率(虚血性心疾患 IHD,脳血管障害 CVD)は年 2.2%であった。

3) 1 年経過時成績の解析結果抜粋。女性の発症率は男性に匹敵、心脳血管病 (IHD+CVD) 発症率が登録時の血中 LDL 濃度(80 mg/dl 未満から 140mg/dl 以上まで 20mg/dl 毎に分類)に有意に比例した。心不全、突然死,末梢血管病等を加えると低 LDL 濃度群での発症率が上昇し,心血管病に起因しないその他の死亡は低 LDL 濃度群に多い,但し、高脂血症薬使用群は認めなかった。この傾向は前期高齢者に顕著で若年者は中性脂肪高値でメタボリック症候群合併例が多かった。LDL 濃度低値者と高値者ではスタチン等の高脂血症薬服薬群に発症率が低かった。一方,心脳血管病は HDL 濃度(40mg/dl 未満から 60mg/dl 以上まで 20mg/dl 毎に分類)に反比例し,差は約 4 倍に及んだ。HDL 濃度に関しては心不全、突然死,末梢血管病,更には,心血管病に起因しないその他の死亡を加えても同様であった。高脂血症薬使用例も,低 HDL 血症者の発症率は高かった。

4) 1.9 年経過時成績解析結果抜粋。IHD,CVD 各々に LDL,HDL 濃度,HbA1C 別、高脂血症薬(特にスタチン)使用の有無で解析ができた。上記の成績は全て IHD に該当し、CVD は HDL 濃度での差は有意だが LDL 濃度での差は小さかった。登録時 HbA1C5.8 未満の群には発症がなく、それ以上では有意差は認めなかった。

5) 医療経済学的解析結果抜粋：一年次成績からの推計では現行の LDL 濃度(平均 120mg/dl)を 90mg/dl に下げると、虚血性心疾患発症率,10 年後の罹患者総数とも約 40%減少する可能性が示唆され、脳血管障害も発症率を約 24%,10 年後罹患者数を約 25%減少させる可能性が示唆された。本邦最大規模の糖尿病コホート研究として多彩な成果が今後期待される。

A. 研究目的

背景) 本邦においては糖尿病罹患者が増加しており,高脂血症合併例の増加及び心血管合併症のリスクとしての大きさが注目されている。加齢そのものによっても高脂血症患者の頻度は増大する。糖尿病性心血管病変は耐糖能異常の段階から進行し,長期罹患者が増加している。糖尿病患者の死因としては心血管合併症によるものが最も多く予防法確立が急務である。一方、糖尿

病合併高脂血症の治療効果は血糖降下療法を凌駕する可能性も欧米の大規模臨床試験で報告され、日本動脈硬化学会は糖尿病罹患者は血清LDL-Cholesterolの管理目標値をB3以上 120 mg/dl以下としている。さらに米国では100mg/dl以下と推奨している。さらに、スタチン製剤をはじめとする高脂血症薬には血管への直接作用がある可能性が報告されている。複数の生活習慣病を合併する患者,心・脳血管障害合併者の増加に伴

う治療方策が必要となっている。本研究は代謝内分泌学、循環器学、老年学、臨床薬理学医により研究班を結成し、エビデンスに基づく高脂血症合併糖尿病心血管病予防指針策定を目標とする。

B & C. 研究方法と結果

対象は04年度登録した、全国12ヶ所、40関連病院の共同研究機関より、当初計画より多い**糖尿病罹患**者4014名である。原則として外来通院者等の自立した成人であるが**高齢罹患**者、自立した心筋梗塞、脳梗塞罹患患者も含めた。プロフィールは糖尿病群では平均年齢(64.5歳)、男女比(1.12)、HbA1C7.2%、TC 206.3、TG 144.1、HDL-C 55.5mg/dlであった。当該年度より年齢階層別(65歳以上49%)、性別、薬剤別<スタチン製剤(約84%)、フィブラート製剤(9%)等>、更に到達脂質濃度別(日本動脈硬化学会基準達成度、総コレステロール値で32.2%)に各々分類しnested case control cohort studyとして評価検討を行った。虚血性心血管病(心、脳血管障害、ASO)発症、入院等をend pointとし、一般所見、脂質等の冠危険因子治療経過を追う。75才以上の高齢者(登録時自立)は自立度の変化も評価した。初年度及び2年度イベント発症率は2.3%、2.2%と高値であった。安全管理モニター(名大鍋島、浜医大中島両教授)の管理を頂いた。18年12月に登録後平均1.9年間の成績を解析し、19年1月より解析をすすめた(追跡率初年度98.8、2年度92%)。心血管病発症率(虚血性心疾患 IHD、脳血管障害 CVD)は全糖尿病例では年2.2%と比較的高かった。2006年3月末までの、1年経過時成績の解析結果を列挙する。**女性の発症率は男性に匹敵、心脳血管病(IHD+CVD)発症率が登録時の血中LDL濃度(80 mg/dl未満から140mg/dl以上まで20mg/dl毎に分類)に有意に比例した。**心不全、突然死、末梢血管病等を加えると低LDL濃度群での発症率が上昇し、心血管病に起因しない**その他の死亡は低LDL濃度群**に多い、但し、高脂血症薬使用群は認めなかった。この傾向は**前期高齢者**に顕著で**若年者**は中性脂肪高値で**メタボリック症候群合併例**が多かった。LDL濃度低値者と高値者では**スタチン等の高脂血症薬服薬群に発症率が**

低かった。これは高脂血症薬に**血管壁への直接作用**も示唆する可能性がある。一方、心脳血管病は**HDL濃度(40mg/dl未満から60mg/dl以上まで20mg/dl毎に分類)に反比例**し、その差は約**4倍**に及んだ。HDL濃度に関しては心不全、突然死、末梢血管病、更には、心血管病に起因しないその他の死亡を加えても同様であった。高脂血症薬使用例も、低HDL血症者の発症率は高かった。スタチン及びフィブラート製剤間には使用後の血清脂質プロフィールに差を認めず、また心脳血管病等の発症率に有意差はなかった。予め薬剤の作用による使い分けを医療者側が行っている可能性が示唆された。2年次の成績を加えると**IHD、CVD各々にLDL、HDL濃度、HbA1C別、高脂血症薬(特にスタチン)使用の有無で解析**ができた。上記の成績は全てIHDに該当し、CVDはHDL濃度での差は有意だがLDL濃度での差は小さくなった。1.9年間の解析では登録時HbA1C5.8未満の群には発症がなかった。それ以上では有意な差は認めなかった。医療経済学的解析も施行し、今回の一年次成績からの概略的推計では現行のLDL濃度(平均120mg/dl)を90mg/dlに下げると、虚血性心疾患発症率、10年後の罹患患者総数とも約40%減少する可能性が示唆された。さらに脳血管障害も発症率を約24%、10年後罹患患者数を約25%減少させる可能性が示唆された。

個別検討項目では上記の発症推計学に加え、データの解析法として粗発生率を用い、overall effectをdirect effectとindirect effectにわけて評価する方法について推計していただき、standard mortality ratioが推奨され今後この方向での解析を期待している。さらに以下のようなものが報告されている。血管内皮機能の新しい障害マーカーとしてNO合成酵素の補酵素BH4、及びその酸化産物BH2の比BH4/BH2比が血管内皮機能と相関しており有用である事が報告された。また同様に血管内皮機能に関してカフェインが血圧上昇作用と内皮機能改善作用という相反する作用が認められ生活習慣との関連で注目される。

さらに生活習慣の関連で歯牙の状態との検討がなさ

れ高齢者の生命予後を左右する重要性が報告され、今後糖尿病患者の特性を明らかにしていく必要性が示唆された。

高脂血症薬に関連しては、個体間の応答性相違に関連した因子の解析がスタチン治療抵抗性の観点から行われ女性、ステロイド併用が認められ、さらにスタチン間の相違が薬物代謝酵素CYP 3Aに起因するところが大きい事が報告された。同様に注目を集めるメタボリック症候群におけるスタチン間の検討がなされ、ストロングスタチンと称されるピタバスタチンとアトロバスタチンの間にも、LDL-C低下率、HDL-C上昇率、non-HDL-C低下作用に差異が認められる事が報告され今後の解析の一助ともなった。糖尿病は認知症との関連も報告されており高齢者を多く含む当該研究でも主要なテーマであるが、正常血糖insulin clamp法によるinsulin抵抗性とminimal state examination法による検討で、相関関係が示された。その他、本邦を代表する有名な糖尿病研究であり、一部コホートを当該研究にも使用させていただいているJDCS、JEDITとの対比からも貴重な成績を報告頂いた。

(倫理面への配慮)

いずれの研究も、研究対象者となる協力者に対してインフォームドコンセントを徹底し、協力者の利益が損なわれる事がないように十分に留意した。本研究は名古屋大学医学部附属病院をはじめ共同研究者が所属する施設の倫理委員会に申請、承認後に施行された。被験者には同意を書面で頂き、いつでも取り消しが可能である事を明記し、認知機能障害のある方は対象外とした。プライバシーは匿名化を行い個人名が特定化されないよう細心の注意をはかっている。

D&E. 考察と結論

本研究の意義は具体的な糖尿病、高脂血症の治療指針の策定にあるが、更に、長寿社会、日本で増加する生活習慣病自体の合併、心及び脳血管障害合併者の診療、二次予防は、総合診療学、老年科学の領域でも重要と考え、代謝内分泌学、循環器学、老年学、

臨床薬理学の専門家により、研究班を結成した。具体的な成果及び今後の発展は全体研究では、1) 糖尿病患者の重症度別評価に加え、高脂血症患者はメタボリック症候群罹患者、前期高齢者、閉経後女性(閉経後脂質上昇)等の層別の、目標脂質濃度、推奨薬剤を設定できる可能性を探る。当該研究で明らかになりつつ有るのは、糖尿病罹患者の血糖コントロールは高齢者ではむしろ良好に推移している(加齢による腎機能低下の影響か)点であり、血清脂質コントロールの意義がイベント数の現れる可能性がある。Nested case control cohort という手段をとり、症例数を4000まで増やした事で、イベントに対する各種高脂血症薬の単独作用と、脂質低下作用におうところを直接、間接作用として解析できる可能性が示唆されている。一方、実態として欧米基準はおろか本邦の学会ガイドラインでさえ40%以下の準拠率である事が判明した。糖尿病合併高脂血症患者の心脳血管イベント発症率は部分集計では3.5%強に上り、一昨年末報告されたMEGA、JELISの約0.5%に比し、リスクの大きさ、逆に言えば制御する必要性が示唆される。個別報告にも有るようにスーパースタチンは単剤でも目標値達成の可能性はあるが、部分集計では50%前後に留まった。適応症例がかなり重症高脂血症患者に偏っている可能性も示唆される。医療経済学的には当該研究の医療経済効果の検討をお願いし興味深い成績を得た。個別研究では高齢者の自立度及びQOL改善に対する高脂血症薬治療の有効性の可能性を探りたい。バイオマーカーの分析により、高リスク群のスクリーニング及び治療効果の判定に応用が期待された。高脂血症薬の作用機序として、脂質低下作用に加え、NO利用化による血管内皮機能改善を直接的抗動脈硬化作用の一つとして推測している。糖尿病合併時の高脂血症薬の作用機序を臨床面から提示し、エビデンスに基づく診療指針を患者層別、薬剤別に具体的に明らかにする可能性があるコホート研究に育っていると考える。

F. 健康危険情報

現在のところは認めない。

G. 知的財産権の出願、登録状況

特になし

研究組織

①研究者名	②分担する研究項目	③最終卒業学校・ 卒業年次・学位 及び専攻科目	④所属機関及び 現在の専門 (研究実施場所)	⑤所属機関 における 職名
井口 昭久	研究の統括	名古屋大学医学部医学科	名古屋大学大学院・	教授
林 登志雄	前向き大規模臨床研究 診療実態の調査	昭和45年卒・医学博士 信州大学医学部医学科	医学系研究科老年科学 名古屋大学医学部・	講師
井藤 英喜	前向き大規模臨床研究	昭和59年卒・医学博士	附属病院老年科	院長
山田 信博	大規模臨床研究組み入れ 前向き大規模臨床研究	京都大学医学部医学科 昭和48年卒・医学博士	多摩北部医療 センター	教授
川嶋 成乃亮	診療実態の調査 前向き大規模臨床研究	東京大学医学部医学科 昭和53年卒・医学博士	筑波大学大学院・ 臨床医学群代謝内科	副院長
久保田 潔	研究成果統計解析 臨床研究メタアナリシス	神戸大学医学部 昭和53年卒, 医学博士	中津済生会病院総合 診療科	助教授
佐藤 貴一郎	医療経済学的解析 研究成果統計解析	北海道大学大学院医学研 究科昭和55年卒, 医学博士	東京大学大学院・医学 系研究科薬剤疫学	教授
渡邊 裕司	診療実態の調査 前向き大規模臨床研究	慶応義塾大学大学院昭47 年卒, 経済学博士	国際医療福祉大学・ 医療経営学	教授
服部 良之	診療実態の調査 前向き大規模臨床研究	北海道大学医学部医学科 昭和58年卒、医学博士	浜松医科大学医学部 臨床薬理学	教授
吉栖 正生	診療実態の調査 前向き大規模臨床研究	独協大学医学部 昭和59年卒, 医学博士	独協医大医学部・ 内分泌内科	教授
大類 孝	内皮機能研究 前向き大規模臨床研究	東京大学医学部 昭和56年卒, 医学博士	広島大学大学院医歯 薬研究科循環病態学	助教授
遠藤 英俊	診療実態の調査 前向き大規模臨床研究	東北大学医学部 昭和59年卒, 医学博士	東北大学大学院医学 研究科老年科学	部長
横手 幸太郎	診療実態の調査 前向き大規模臨床研究	名古屋大学大学院医学研 究科, 昭62年卒, 医学博士	国立療養所中部病院 包括医療部	講師
梅垣 宏之	診療実態の調査 前向き大規模臨床研究	千葉大学医学部 昭和63年卒, 医学博士	千葉大学大学院医学 研究院分子内科	助手
野村 秀樹	診療実態の調査 関連研究メタアナリシス	名古屋大学医学部医学科 平成2年卒・医学博士	名古屋大学医学部・ 附属病院老年科	部長
		名古屋大学大学院医学科, 平成5年卒、医学博士	名古屋北病院 在宅医療部	

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ding QF, Hayashi T, Packiasamy ARJ, Miyazaki A, Fukatsu A, Shiraishi H, Nomura T, Iguchi A	The effect of high glucose on NO and O ₂ through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase	Life Sciences	75	3185-3194	2004
Hayashi T, Packiasamy ARJ, Matsui-Hirai H, Miyazaki A, Fukatsu A, Funami J, Iguchi A, Ignarro LJ	L-citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits	PNAS	102	13681-13686	2005
Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding Q, Kamalanathan S, Hattori Y, Ignarro LJ, Iguchi A	Endothelial Cellular Senescence is inhibited by nitric oxide: Implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes	PNAS	103	17018-17023	2006
Osawa M, Hayashi T, Nomura H, Funami J, Miyazaki a, Ignarro LJ, Iguchi A	Nitric oxide (NO) is a new clinical biomarker of survival in the elderly patients and its efficacy might be nearly equal to albumin	Nitric Oxide	16	157-163	2007
Araki A, Nakano T, Oba K, Ito C, Mori S, Ishibashi S, Umeda F, Abe R, Kojima H, Kikkawa R, Kawamori R, Ito H	Low well-being, cognitive impairment and visual impairment associated with functional disabilities in elderly Japanese patients with diabetes mellitus	Geriatr Gerontol Internat	4	15-24	2004
Toshitsugu Ishikawa, Hideki Ito, Yasuyoshi Ouchi, Yasuo Ohashi, Yasushi Saito, Haruo Nakamura, Hajime Orimo	Increased Risk for Cardiovascular Outcomes and Effects of Cholesterol-Lowering Pravastatin Therapy in Patients with Diabetes Mellitus in the Pravastatin Anti-atherosclerosis Trial in the Elderly (PATE)	Current Therapeutic Research	66	48-65	2005
Sone H, Tanaka S, Ishibashi S, Yamasaki Y, Oikawa S, Ito H, Saito Y, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N, for the Japanese Diabetes Complications Study (JDCS) group	The new worldwide definition of metabolic syndrome is not a better diagnostic predictor of cardiovascular disease in Japanese diabetic patients than existing definitions - Additional analysis from the Japan Diabetes Complication Study-	Diabetes Care	29	145-147	2006
Sone H, Yoshimura Y, Ito H, Ohashi Y, Yamada N	Energy intake and obesity in Japanese patients with type 2 diabetes	The lancet	363	248-249	2004
曾根博仁、山田信博、JDCS グループ	日本人の糖尿病治療の前向き研究	内科	97	16-21	2006
Akasaki T, Sakurai T, Takata T, Umegaki H,	Cognitive dysfunction associates with white matter hyperintensities and subcortical atrophy on magnetic	Diabetes Metab Res Rev	22	376-384	2006

Araki A, Mizuno S, Tanaka S, Ohashi Y, Iguchi A, Yokono K, Ito H	resonance imaging of the elderly diabetes mellitus Japanese elderly diabetes intervention trial(J-EDIT)				
Sone H, Kawai K, Takagi H, Yamada N, Kobayashi M	Outcome of one-year specialist care of patients with type 2 diabetes: a multi-center prospective survey(JDDM2)	Internal Medicine	45	589-97	2006
Kawashima S, Yokoyama M	Dysfunction of endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis	Arterioscler thromb Vasc Biol	24	998-1005	2004
川嶋成乃亮	特集-動脈硬化研究の最前線を探る：一酸化窒素の抗動脈硬化作用を探る	Vascular Medicine	2	26-32	2006
Takaya T, Kawashima S, Shinohara M, Yamashita T, Toh R, Sasaki N, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M	Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses superoxide production and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice	Atherosclerosis	186	402-410	2006
Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, Cai Shijie, Adlam D, Rockett K, Yokoyama M, Kawashima S, Channon K	Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression	Circ Res.	97	864-71	2005
Watanabe H, Kosuge K, Nishio S, Yamada H, Uchida S, Satoh H, Hayashi H, Ishizaki T, Ohashi K	Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between simvastatin and diltiazem in patients with hypercholesterolemia and hypertension	Life Sciences	76	281-292	2004
内田信也、渡邊裕司、後藤満寿美、前田利夫、橋本久邦、中野眞汎、大橋京一	HMG-CoA 還元酵素阻害薬 Pravastatin 服用患者におけるリスクファクターと血清脂質値に関する調査	臨床薬理	36	81-87	2005
Yamada H, Tateishi M, Harada K, Ohashi T, Shimizu T, Atsumi T, Komagata Y, Iijima H, Komiyama K, Watanabe H, Hara Y, Ohashi K	A randomized clinical study of tea catechin inhalation effects on methicillin-resistant staphylococcus aureus in disabled elderly patients	J Am Med Dir Assoc	7	79-83	2006
渡邊裕司	スタチン治療における海外と国内のエビデンスの比較	循環器専門医	14(2)	283-289	2006
Hattori Y, Kasai K, Gross SS	NO suppresses while peroxynitrite sustains NF- κ B: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO	Cardiovasc Res	63	31-40	2004
Hattori Y, Aki moto K, Gross SS,	AngiotensinII-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinae-	Diabetologia	48	1066-1074	2005

Hattori S, Kasai K	mia in rats				
Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M	Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia	Circulation	109	1215-1218	2004
Noma K, Goto C, Nishioka K, Hara K, Kimura M, Umemura T, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y	Smoking, endothelial function, and Rho-kinase in humans	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	25(12)	2630-5	2005
Uemura T, Ueda K, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Jitsuiki D, Soga J, Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y	Effects of acute administration of caffeine on vascular function	Am J Cardiol	98(11)	1538-41	2006
Noma K, Goto c, Nishioka K, Jitsuiki D, Uemura M, Ueda K, Kimura M, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M, Liao JK, Higashi Y	Roles of rho-associated kinases and oxidative stress in the pathogenesis of aortic stiffness	J Am Coll Cardiol	49(6)	698-705	2007
Horiuchi H, Matsuzawa Y, Mabuuchi H, Itakura H, Sasaki J, Yokoyama M, Ishikawa Y, Ypkoyama S, Mori S, Ohru T, Akishita M, Hayashi T, Yamane K, Egusa G, Kita T	Strategy for treating elderly Japanese with hypercholesterolemia	Geriatr Gerontol Internat	4	152-156	2004
Ohru T, Tnaka K, Chiba K, Matsui t, Ebihara S, He M, Arai H, Sasaki H	Cognitive decline in patients with long-term domiciliary oxygen therapy	Tohoku J Exp Med	206	347-352	2005
Ohru T, Matsui T, Yoshida M, et al	Dental status and mortality in institutionalized elderly people	Geriatr Gerontol	6	470-474	2006

		Internat			
Yasuda H, Okinaga S, Yamaya M, Ohru T, et al	Association of susceptibility to the development of pneumonia in older Japanese population with the haem oxygenase-1 gene promotor polymorphism	J Med Genet	43	e17	2006
Kawamura H, Yokote K, Asanuma S, Kobayashi K, Fujimoto M, Maezawa Y, Saito Y, Mori S	High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via rho/rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells	Arterioscler Thromb Vasc Biol	24	276-281	2004
Hashimoto N, Hatanaka S, Yokote K, Kurosawa H, Yoshida T, Iwai R, Takahashi H, Yoshida T, Iwai R, Takahashi H, Yoshida K, Horie A, Sakkurai K, Yagui K, Saito Y, Yoshida S	A patient with Werner syndrome and adiponectin gene mutation	Diabetes Resw Clin Pract	75	27-29	2007
横手幸太郎	Werner 症候群とメタボリックシンドローム	日本臨床	64	742-746	2006
Yamamoto S, Mogi N, Umegaki H, Suzuki Y, Ando F, Shimokata H, Iguchi A	The clock drawing test as a valid screening method for mild cognitive impairment	Dement Geriatr cogn Disord	18	172-179	2004
Fujishiro H, Umegaki H, Suzuki Y, Oohara-Kurotani S, Yamaguchi Y, Iguchi A	Dopamine D ₂ receptor has a role in memory function. Implications for dopamine-acetylcholine interaction in the ventral hippocampus	Psychopharmacology	182	253-261	2005
Umegaki H, Iguchi A	Cognitive function in the elderly with diabetes mellitus	J Clin Biochem Nutr	38	19-24	2006
Suzuki M, Umegaki H, Uno T, Oyon O, Mogi N, Maeno H, Yamanouchi K, Iguchi A, Sato Y	Association between insulin resistance and cognitive function in elderly diabetic patients	Gerotr Intr.	6	254-259	2006

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別冊



The effect of high glucose on NO and O₂⁻ through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase

Qun Fang Ding^{a,b}, Toshio Hayashi^{a,*}, AR Juliet Packiasamy^a, Asaka Miyazaki^a, Akiko Fukatsu^a, Hiroaki Shiraishi^c, Takahide Nomura^c, Akihisa Iguchi^a

^aDepartment of Geriatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Shawa-ku, Nagoya, 466-8550, Japan

^bDepartment of Geriatrics, the First University Hospital of West China University of Medical Sciences, Chengdu, China

^cDepartment of Pharmacology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan

Received 25 December 2003; accepted 17 June 2004

Abstract

Although endothelial dysfunction deteriorates diabetic angiopathy, the mechanisms are obscure. We revealed that high glucose augmented eNOS through stimulation of eNOS mRNA in cultured BAECs. NO was decreased and O₂⁻ was increased simultaneously. NOS inhibitor, inhibited O₂⁻ release, so did NADPH oxidase inhibitor. The effects were synergistic. Both intracellular BH₄ level and GTPCH1 activity were decreased by high glucose, in line with decrease of GTPCH1 mRNA. HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin increased GTPCH1 mRNA and activity, and BH₄ level. Conclusively, high glucose leads to eNOS dysfunction by inhibiting BH₄ synthesis and atorvastatin stimulate BH₄ synthesis directly, and it may work as atherogenic process.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: eNOS dysfunction; Superoxide anion; L-NAME; Apocynin; Aminoguanidine; BH₄; GTPCH1 activity; HMG-CoA reductase inhibitors

Introduction

The acceleration of atherosclerosis in diabetes mellitus results in higher risks of cardiovascular events. Growing clues showed that an impairment of diabetic endothelial function exhibited crucial

* Corresponding author. Tel.: +81 52 744 2364; fax: +81 52 744 2371.

E-mail address: hayashi@med.nagoya-u.ac.jp (T. Hayashi).

roles. Endothelial NOS plays an important role in vascular endothelium functions by producing NO, an important anti-atherosclerotic agent. Recent studies also showed that eNOS has a dual effect on atherosclerosis (Robert et al., 1998). eNOS itself could be an important source of endothelial superoxide production in hypercholesterolemia (Kirkwood et al., 1995). In diabetic vessels of human, the endothelium was found to be an additional net source of superoxide production because of eNOS dysfunction (Tomas et al., 2002). On the other hands, study of insulin-resistant rat aorta revealed a decreased aortic BH₄ contents as well as increased BH₂ (7,8-dihydrobiopterin) levels, when compared with normal and non-insulin-resistant diabetic groups (Shinozaki et al., 1999). They reported that insulin resistance is the pathogenic factor of eNOS dysfunction and BH₄ deficiency. Other study showed that the balance between reduced and oxidized BH₄ is a key redox switch controlling superoxide formation from eNOS (Vasquez-Vivar et al., 2002). Exogenous administration of BH₄ leads to an acute amelioration of endothelium-dependant relaxation in DM rats (Pieper, 1997). Intravenous administration of sepiaptrin, which is an ancestor of BH₄, could improve the endothelial-dependent vasodilatation of diabetic patients clinically (Heitzer et al., 2000). There is little evidence that shows the relationship among high glucose, eNOS dysfunction and BH₄. Hyperglycemia is an independent risk factor for ischemic heart disease proved by clinical studies such as UKPDS. The current study is aimed to reveal the mechanisms of eNOS dysfunction leading by high glucose in an in vivo model.

Materials and methods

Cells

BAECs were isolated from fetal calf as described previously (Hayashi et al., 1995a) and cultured in DMEM with 10% (v/v) of CS, 100 u/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, 2 mM glutamine. Cells were allowed to the confluent of 80%, and then stimulated with different concentration of D-glucose (5.5, 12.5, 25 and 50 mM) as well as other reagents in DMEM with 2% CS and phenol red free for 24 hours. Mannitol was used as control to rule out the effect of osmotic pressure.

Measurement of NO_x (nitrite and nitrate)

Measurement of NO_x (nitrite and nitrate) in supernatant was performed as described in previous study (Yamada and Nabeshima, 1997). Briefly, the supernatant were taken for the measurement of NO_x by HPLC (ENO10, Eicom Co, Kyoto, Japan), where nitrate was converted to nitrite in an in-line copper coated cadmium reduction column (NO-RED), and then nitrite was detected based on Griess reaction.

Western blot analysis of eNOS protein

Determination of eNOS protein expression were performed as described in our previous study (Hayashi et al., 1995b). Protein concentration was determined by Dc protein assay kit (Bio-Rad, CA). 15 µg protein was loaded. Primary anti-eNOS monoclonal antibody (Anti-mouse IgG1

monoclonal antibody, Transduction Laboratories, CA) was incubated in the ratio of 1:2000, overnight. HRP-linked anti-mouse IgG antibody (Cell signaling) was used as second antibody. Bands of eNOS protein were developed in dark on the film (Fuji Medical X-ray Film, Japan). Band densities were analyzed densitometrically by the National Institutes of Health IMAGE program.

RT-PCR analysis of eNOS and GTPCH1 mRNA

Total RNA was isolated from BAECs with TRIZOL reagent according to the manufacturer's protocol (GIBCO BRL, Life Technologies). eNOS mRNA were analyzed by reactions with RNA PCR kit (One step RNA PCR Kit, Takara, Japan) as described in our previous study (Kano et al., 1999). The programmed cycles for eNOS RT PCR were as follows: 1 cycle of 50 °C × 30 minutes and 94 °C × 2 minutes; 30 cycles of 94 °C × 30 seconds, 60 °C × 30 seconds, and 72 °C × 30 seconds. Bands were visualized on dual intensity transilluminator. RT-PCR of GTPCH1 mRNA were carried on such a programmed cycles: 1 cycle of 50 °C × 30 minutes and 94 °C × 2 minutes; 30 cycles of 94 °C × 30 seconds, 60 °C × 30 seconds, and 72 °C × 1 minutes. Sequence of bovine GTPCH1 primer is as follows: sense: 5' CCGCCTACTCGTCCATCCTGA 3', antisense: 3'ACCTCGCATTACCATACACAT 5'.

Measurement of intracellular superoxide by FACS

At the end of treatment period, cells were washed with PBS, 2 µl of 5 mM DCFH-DA was added and then incubated in 37 °C for 30 minutes. Cells were detached with trypsin, and centrifuged at 4 °C, 15000 rpm for 5 minutes. Cell suspensions in PBS were transferred into 5 ml polystyrene round-bottom tubes with cell-strainer caps (Becton Dickinson lab ware, Becton Dickinson and company, France). And they were kept on ice for immediate measurement by FACS (Fluorescence-activated cell sorter, BD Biosciences).

Determination of intracellular BH₄ level and GTPCH1 activity

Cells were harvested with trypsin and pelleted by centrifugation and frozen at –80 °C. BH₄ measurements were performed by HPLC procedure described by Fukushima and Nixon (Constrino et al., 1997). Intracellular BH₄ levels were expressed in terms of pmoles per mg protein of the cell pellet. GTPCH1 activity was assayed based on the quantification of D-erythro-neopterin by HPLC after conversion of enzymatically formed D-erythro-7,8-dihydroneopterin triphosphate into D-erythroneopterin by sequential reaction of iodine oxidation and dephosphorylation.

Statistics

Data were reported as mean ± SD, and represent three independent experiments. Comparisons between the two groups were made based on the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Significant differences were accepted when $P < 0.05$.

Results

Effects of high glucose on eNOS protein and mRNA expression

After exposure to high glucose for 24 hours, eNOS proteins were increased significantly, and in accordance with it, expression of eNOS mRNA were also enhanced (Fig. 1A, B). As mannitol treatment did not affect the expression of eNOS protein or eNOS mRNA, these results attributed to high glucose itself, not to osmolality.

Effects of high glucose on NO_x produced by eNOS

After stimulated by high glucose (12.5 mM, 25 mM) for 24 hours, NO_x production was significantly decreased compared with control (5.5 mM), but there were no significant different between the two high glucose groups (12.5 mM, 25 mM) (Fig. 2A). As mannitol treatment did not affect the concentration of NO_x, the effect attributed to high glucose itself, not to osmotic pressure.

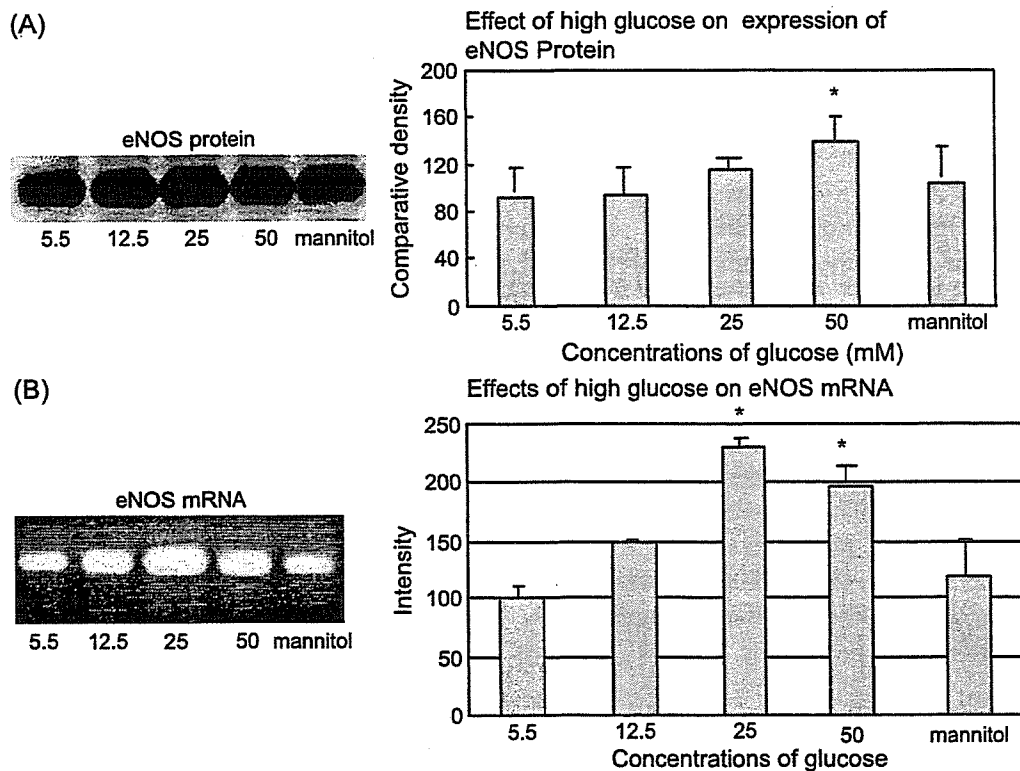


Fig. 1. The effects of high glucose on eNOS expression. Western blot and RT-PCR analysis of eNOS protein (A) and mRNA expression (B) after 24 hours exposure to different concentrations of glucose. Data represents the mean \pm SEM of three separated experiments. The effects of high glucose on NO_x production (A) *P < 0.05 vs control.

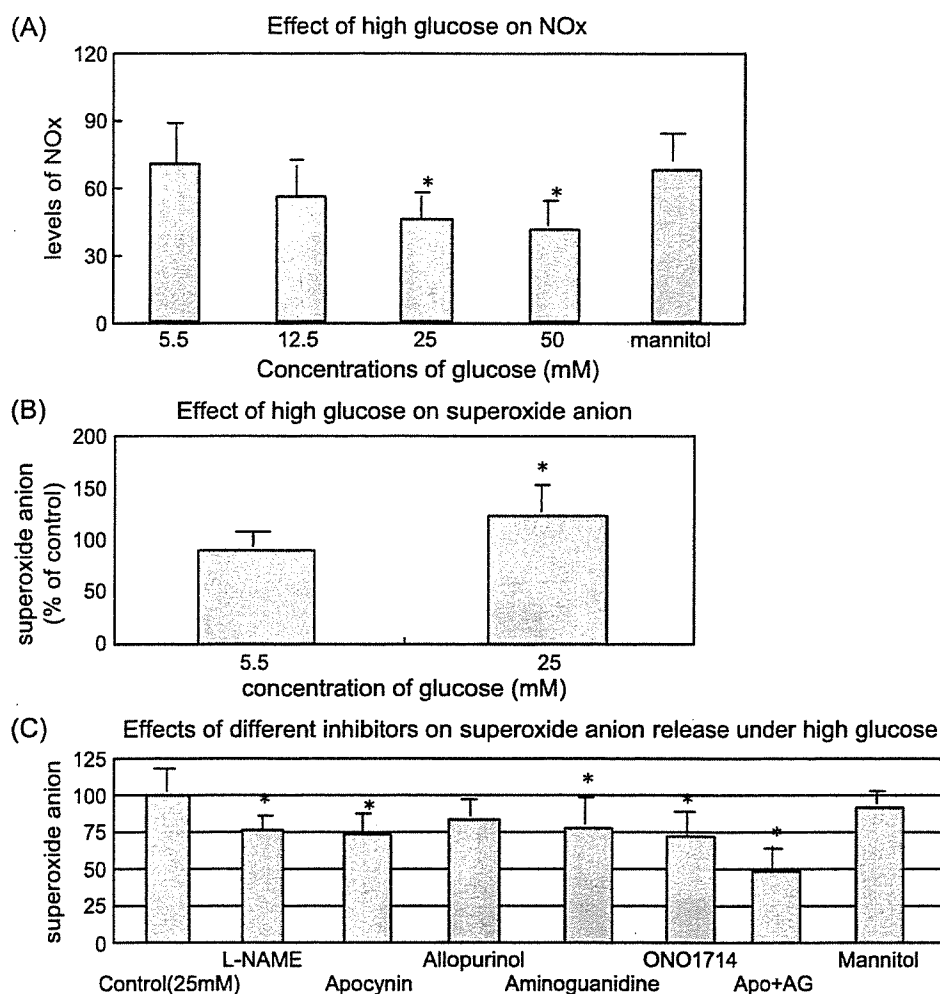


Fig. 2. The effects of high glucose on NOx production (A), superoxide anion (B). Effects of different inhibitors on superoxide anion under the stimulation of high glucose (C). Data represents the mean \pm SEM. *P < 0.05 vs control.

Effects of high glucose on intracellular superoxide anion and possible route of superoxide production

The intracellular superoxide anion was largely increased by the stimulation of high glucose (25 mM), compared with control (5.5 mM), after 24 hours exposure (Fig. 2B). And the stimulatory effects of high glucose could be abolished by L-NAME(100 μ M) and apocynin(10 μ M), respectively (Fig. 2C). However, the effect of allopurinol (10 μ M), aminoguanidine(10 μ M), or ONO 1714 was relatively limited, and mannitol did not affected superoxide production (Fig. 2C).

Effects of high glucose on intracellular BH4 levels and GTPCH1 activities

As showed in Fig. 3A and B, both of intracellular BH₄ levels and GTPCH1 activities were decreased significantly by high glucose exposure.

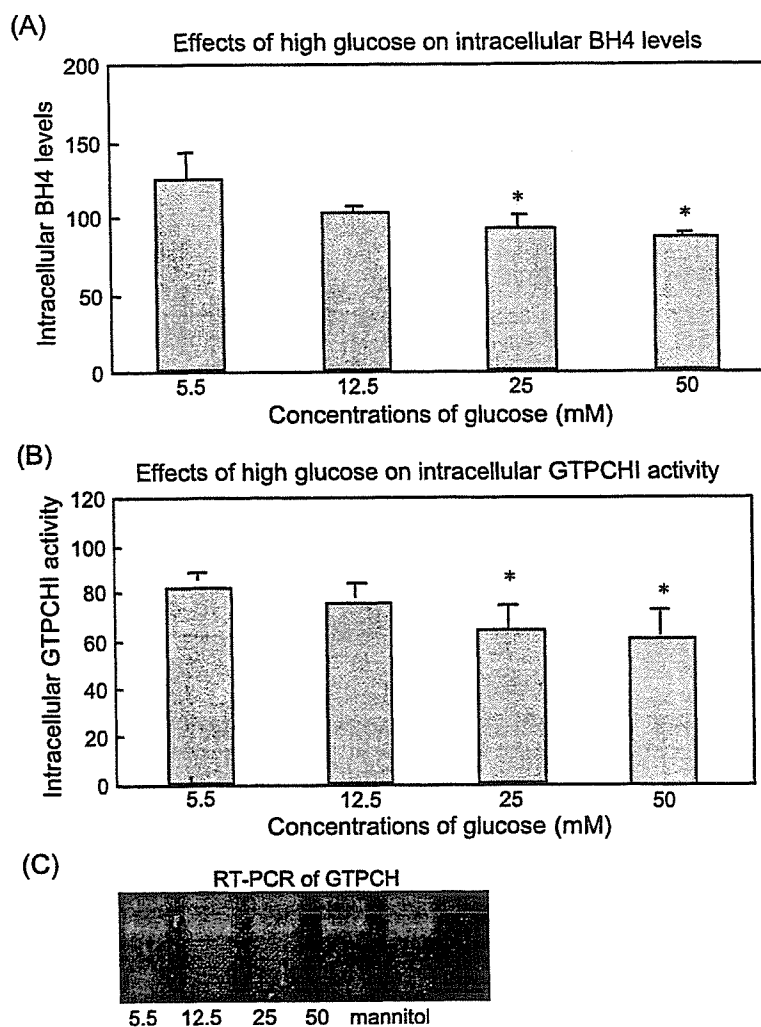


Fig. 3. The effects of high glucose on intracellular BH₄ levels (A), GTPCHI activities (B) and GTPCHI mRNA expression (C).

Effects of high glucose on expression of GTPCHI mRNA

As revealed in Fig. 3C, in accordance with the inhibition of intracellular GTPCHI activities, the expression of GTPCHI mRNA abundance was also decreased by exposure to high glucose. It tended to correlate with GTPCHI protein and activities (data not shown).

Effect of HMG-CoA reductase inhibitor on intracellular GTPCHI activity and BH₄ level

Atrovastatin exhibited a stimulatory effect on intracellular BH₄ accumulation (Fig. 4A) and GTPCHI activities (Fig. 4C) and it was shown in a time- and concentration-dependent manner (part of data not shown).

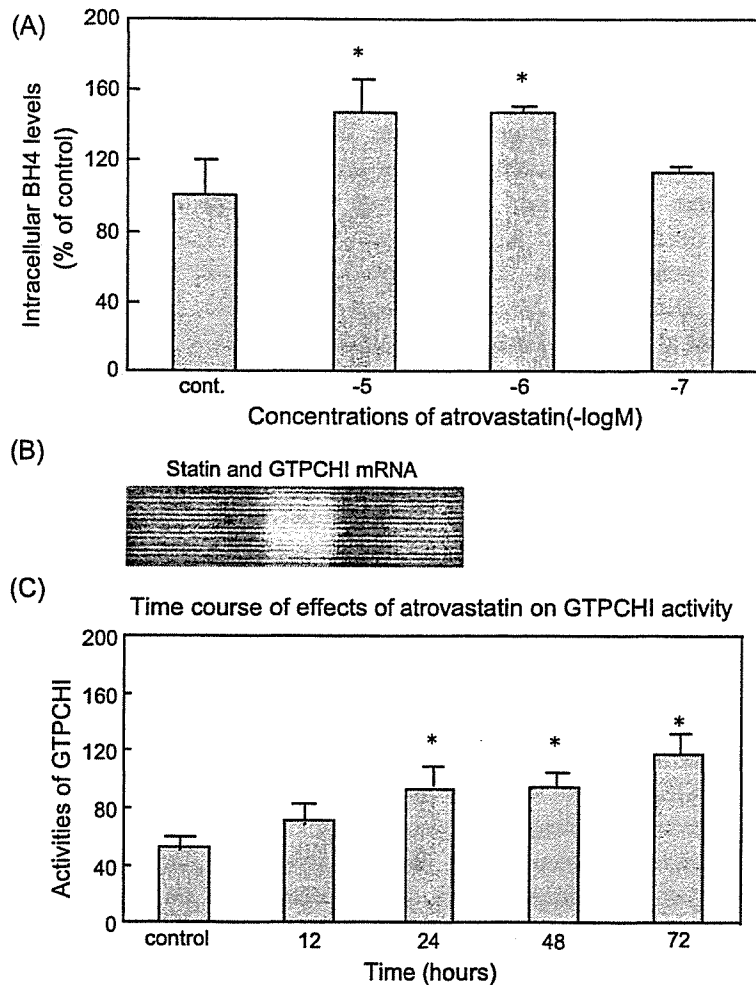


Fig. 4. Effects of different concentrations on atorvastatin on intracellular BH₄ levels (A) and GTPCH1 mRNA (B). Time-course of effects of atorvastatin on intracellular GTPCH1 activities (C). Data represents the mean \pm SEM of three independent experiments. *P < 0.05 vs control.

HMG-CoA reductase inhibitors and expression of GTPCH1 mRNA

In accordance with the stimulatory increase of intracellular GTPCH1 activities and BH₄ accumulations, expression of GTPCH1 mRNA was also augmented by atorvastatin (Fig. 4B).

Discussions

This study demonstrated that in bovine aortic endothelial cells, the expression of eNOS was increased by exposure to high glucose (Fig. 1A). This may be the result of augmentation of eNOS mRNA expression by high glucose (Fig. 1B). Although, the effect of high glucose on eNOS protein

was dose dependent, the maximum level of eNOS mRNA expression was maximum between 25 and 50 mM glucose. We cannot elucidate the mechanism in the difference of effective concentration between protein and mRNA levels. In the preliminary experiment of 72 hours exposure to high glucose, eNOS expression was maximum between 25 and 50 mM glucose. We speculate that the difference of effective glucose concentration between eNOS protein and mRNA is due to the difference of time course. It exhibited confusions to the reasonable hypothesis that, the eNOS abundance should be decreased by high glucose, which is based upon the clues of impaired endothelium-dependent relaxation in diabetic vessels of both human and animal experiments (Constrino et al., 1997; Ding et al., 2000; Johnstone et al., 1993; Makimattila et al., 1996; Noyman et al., 2001; Steinberg et al., 1996). Further, measurement of NOx revealed a marked decrease when cells were allowed to grow in high glucose (Fig. 2). Two possible explanations could be applied: one comes from the rapid reaction between NO and superoxide, while another one means the possibility of a virtually decreased capacity of NO production by eNOS. One possible clue for eNOS dysfunction caused by high glucose gives rise to the hypothesis that increased abundance of eNOS caused by high glucose could not produce NO in proportion to that under normal glucose.

It is now generally agreed that oxidative stress plays a crucial role in the formation and deterioration of atherosclerosis (Tomas et al., 2002; Chen et al., 1995). In order to clarify the dysfunction of eNOS, we also studied the production of superoxide anion after exposure of high glucose by FACS. As shown in Fig. 2, high glucose increased intracellular superoxide anion significantly. In order to identify the sources of superoxide, different kinds of inhibitors which are related to possible pathways of superoxide were applied. It is amazingly to find that L-NAME, which is the specific inhibitor of NOS, exhibited a strong inhibitory effect on superoxide production and restored superoxide anion to almost the same level as control. It means that eNOS becomes an important source of superoxide anion in high glucose. From this point of view, high glucose could lead to dysfunction of eNOS.

Since increased superoxide anion could also be inhibited partially by apocynin, but not by allopurinol and aminoguanidine independently, it confirmed that in case of high glucose, NADPH oxidase, but neither xanthine oxidase nor iNOS is not the possible source of superoxide production as well as eNOS. The mechanisms underlying these phenomena are still unknown. Evidences from diabetic animal models and human studies showed cofactor of eNOS, tetrahydrobiopterin (BH₄), may be the redox of NO or superoxide production of eNOS (Heitzer et al., 2000; Pieper, 1997). We further focused on the effects of high glucose on intracellular BH₄ level and activity of GTPCH1—the rate-limiting enzyme in the de novo biosynthesis of BH₄, which is the most important pathway under physiological conditions. BH₄ is absolutely required for eNOS activity (Chen et al., 1995; Hattori et al., 2003). By acting as a cofactor of eNOS, evidences showed that it is involved in: 1) stabilization of eNOS in its dimeric form, which is pivotal for eNOS to function normally; 2) electron transfer from the reductase domain to oxidase domain; 3) active site integrity. And in some pathological situations, it could even help overcome ‘paradoxical deficiency’ of L-arginine. As it is shown in Fig. 3, both intracellular BH₄ levels and activities of GTPCH1 were markedly decreased by the exposure to high glucose comparing with control. It has been revealed that BH₄ reacts with superoxide rapidly, thus decreasing BH₄ accumulation in cells. Results of the present study show that in case of high glucose, the decreased activity of GTPCH1 could also be an important reason for the decreased BH₄ levels. So it is reasonable to think that it is the combination of the two possibilities that lead to an absolute shortage of intracellular BH₄, and accordingly, the dysfunction of eNOS arises. But it is still difficult to identify which one plays a more important role.