

糖尿病性血管合併症におけるインスリンと酸化ストレスについて

小林 恒雄

**Possible Involvement of Insulin and Oxidative Stress in
Vascular Dysfunction of Diabetic Mellitus**

Tsuneo KOBAYASHI

*Department of Physiology and Morphology, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University,
2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan*

(Received March 13, 2008)

Macro- and microvascular disease states currently represent the principal causes of morbidity and mortality in patients with type I or type II diabetes mellitus. Abnormal vasomotor responses and impaired endothelium-dependent vasodilation have been demonstrated in various animal models of diabetes and in humans with type I or type II diabetes. The principal mediators of diabetes-associated vascular dysfunction are increases in glucose, oxidized low-density lipoprotein, endothelin-1, angiotensin II, insulin, or growth factors. An accumulating body of evidence indicates that abnormal production of oxidative stress may be one of several factors contributing to vascular dysfunction in diabetes. It is possible that in diabetic states, hyperinsulinemia initiates oxidant stress, leading to vascular dysfunction at a later stage. We and others have demonstrated that in models of hyperinsulinemia and hyperglycemia, $\cdot\text{NO}$ production and/or $\cdot\text{NO}$ responsiveness are impaired in aortic strips. Several recent studies have shown that the formation of nitrotyrosine and/or peroxynitrite impairs vascular $\cdot\text{NO}$ responsiveness and $\cdot\text{NO}$ production. Our findings suggest that the coexistence of a high insulin level and an established diabetic state may lead to the excessive generation of peroxynitrite, and that this may in turn trigger an impairment of endothelium-dependent relaxation *via* a decrease in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase function. This review summarizes the results of our recent studies on the involvement of insulin and oxidative stress in the blood vessels of diabetic animals.

Key words—diabetes; oxidative stress; insulin; contraction; endothelium-dependent relaxation

1. はじめに

糖尿病は種々の合併症を誘発し患者の QOL を著しく損ない、かつ医療費の莫大な増加の一因ともなっており、わが国においては、糖尿病になると寿命が約 10 年短くなることが知られている。近年、日本人のライフスタイルの変化（高脂肪食の摂取や運動不足など）及び高齢化社会に伴い、糖尿病患者は激増しており、もはや社会問題となりつつあり、マスコミ誌上にもしばしば取り上げられるほどである。特に合併症は深刻な問題であり、中でも網膜症、腎症、神経症は三大合併症と呼ばれ、細小血管障害によると考えられている。また、大血管障害の

頻度も著しく高く、その主要な症状は、冠動脈、脳動脈、下肢動脈のアテローム性動脈硬化である。これら糖尿病状態における共通の合併症は、インスリンの絶対的不足あるいは作用の低下による高血糖状態を中心とした各種代謝異常や、血液学的異常から生じた循環器障害が原因で誘発される。一方、糖尿病時における治療効果を考える上で、インスリンによる血糖コントロールは重要である。最近の研究では、インスリンには血糖の低下作用のほかに様々な作用があることが明らかになりつつある。一般的に、糖尿病患者における正確なインスリン投与による血糖のコントロールは、血管合併症の進行を防ぐが、一度発症した心血管イベントへの改善効果は少ないと考えられている。さらに、2 型糖尿病初期やインスリン投与によって増加する高値の血中インスリン値は、血圧や動脈硬化の悪化にも関与していることは知られており、¹⁾ 血中のグルコース値とも

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態研究室（〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41）

e-mail: tkoba@hoshi.ac.jp

本総説は、平成 19 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

にインスリン値のコントロールも重要である。

糖尿病時において誘発された危険因子は、生体の酸化ストレス増加を介して、血管障害を生じるとする仮説は、古くから、そして現在においても多くの研究者に指示されている。糖尿病時の酸化ストレスとして、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) が古くから報告されているが、これは、高血糖、脂質、低比重リポタンパク (LDL)、酸化 LDL、アンジオテンシン、エンドセリンなどによって増加することが報告されている。血管障害における酸化ストレスの1つである O_2^- の増加は、血管内皮細胞から産生される nitric oxide (NO) を不活化し、内皮細胞における血管弛緩機能を直接低下させることが知られている。そして、近年では、この O_2^- と NO が反応して産生されたパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) もまた、血管弛緩機能を低下させることが報告され、動脈硬化などの血管障害に強く関わっていることが明らかにされている。このように、糖尿病性血管障害における酸化ストレスは、古くからそして現在においても主要な因子として研究が進められている。本総説は、筆者らがこれまでに行ってきた研究成果を中心に、糖尿病性血管合併症におけるインスリンと酸化ストレスの因果関係を中心に紹介する。

2. 糖尿病性血管内皮機能障害と酸化ストレス

一般的に多くの糖尿病動物において、血管弛緩反応の低下が報告されているが、その作用機序は、様々な条件によって異なる。糖尿病動物における減弱した内皮依存性弛緩反応は、強力な弛緩因子である NO の合成や、その活性によって影響を受けているとは限らない。しかし、内皮依存性弛緩反応はほとんどの血管において、NO が弛緩に強く関与していることを考えると、やはり NO の合成や活性に焦点が絞られる。事実、糖尿病ラット胸部大動脈においては、この内皮由来弛緩因子 (EDRF) としての NO の機能低下、内皮依存性弛緩反応の減弱が報告されている (Fig 1)。²⁾ 筆者は、1型、2型糖尿病動物における血管内皮細胞のアセチルコリン刺激による弛緩反応は、様々な機序を介して糖尿病時において低下していることを報告している。²⁻⁵⁾ また、1型糖尿病ラット大動脈を用いてアセチルコリン刺激時における NO の代謝産物である NO_2^- 、 NO_3^- の測定を行った。⁶⁾ その結果、糖尿病ラットの $NO_2^- + NO_3^-$ の産生量は、コントロールラットに比べ、有

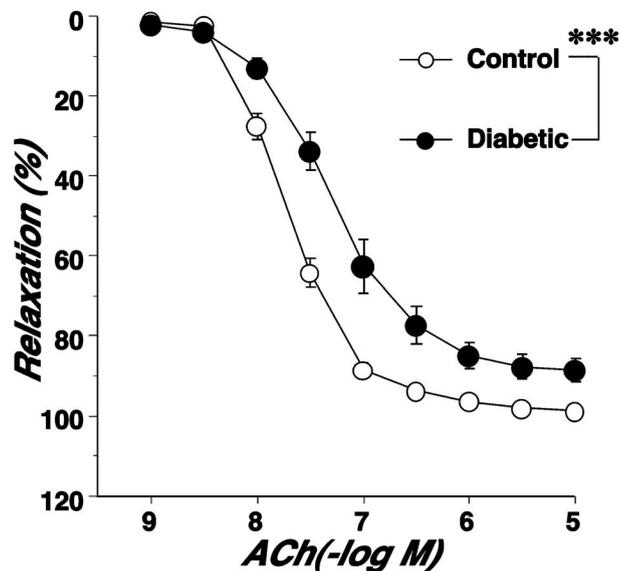


Fig. 1. Concentration-response Curves for ACh-induced relaxation of Aortic Strips Obtained from Age-matched Controls, Diabetic Rats

The ordinate shows the relaxation of aortic strips as a percentage of the contraction induced by an equieffective concentration of noradrenaline (5×10^{-8} – 3×10^{-7} M). Each data point represents the mean \pm S.E. of 6–8 experiments; the S.E. is included only when it exceeds the dimension of the symbol used. *** $p < 0.01$, diabetic vs. control.

意な差はみられなかった。このことは、内皮細胞における NO の産生量には変化がないことが考えられる。さらに、構成型 NO 合成酵素である endothelial NO synthase (eNOS) の mRNA を測定した。その結果、糖尿病時においては、 $NO_2^- + NO_3^-$ の産生量と同様に eNOS 発現も変化は認められなかった。また本実験において、糖尿病血管においては、 NO_2^- 産生は少なく、 NO_3^- の増加が認められた。NO は、自然酸化により NO_2^- を生じ、一方、 O_2^- などの酸化ストレスにより NO_3^- を生じることが知られているので、糖尿病時には O_2^- の増加により NO が酸化されていると考えられる (Fig 2)。また Hink らは、糖尿病ラットの大動脈において、電子スピン共鳴法による NO の半減期の低下と、eNOS 発現の増加を報告した。⁷⁾ さらに間接的ではあるが、多くの摘出血管を用いた実験において、NO は活性酸素 (O_2^- 等) によって不活化されることが知られているが、 O_2^- の scavenger である superoxide dismutase (SOD) の処置が、NO の不活化を遅延し、糖尿病時の減弱した血管内皮機能を完全に改善することを報告している。⁸⁾ 筆者はさらに、糖尿病病態において、SOD の発現が低下していることを

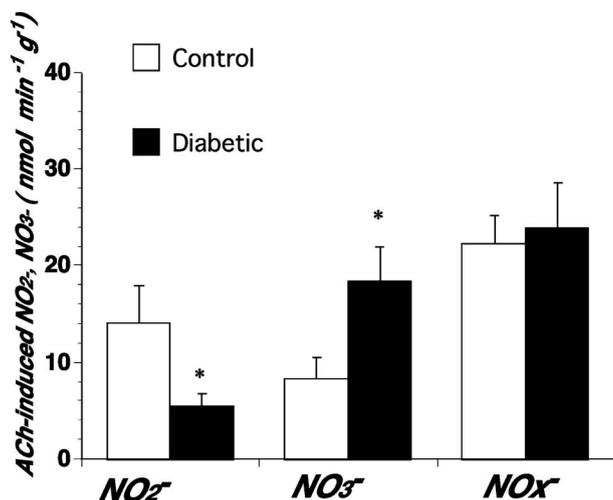


Fig. 2. ACh (10^{-7})-Stimulated Release of NO_2^- , NO_3^- and NO_x as Measured in the Perfusate from Aortic Strips

Each column represents the mean \pm S.E. of 6–8 experiments. * $p < 0.05$ diabetic vs. control.

報告し,⁹⁾ また、糖尿病時において、 O_2^- の産生増加の原因として、NADPH oxidase の活性、及び構成サブユニットの発現の増加によることが報告されている。⁷⁾ 以上のことは、1型糖尿病時におけるEDRF作用の減弱は、内皮細胞内でのeNOSによるNOの産生から平滑筋細胞内でのグアニル酸シクラーゼまでの間に存在する、つまりNOの不活化に焦点が絞られる。糖尿病時のこれら酸化は、生体内における様々な細胞において認められ、血管細胞においても例外ではなく、その1つとして、low density lipoprotein (LDL) コレステロールは、生体内の活性酸素等により酸化され、生じた酸化LDLは、血管内皮機能に強く作用し、NO機能を抑制することが古くから知られている。¹⁰⁾ STZ糖尿病モデルにおいては、血中LDLの増加、LDL中の過酸化脂質の増加、変性LDLの酸化のし易さ、など報告され、これらが血管内皮機能障害の原因であることが示されている。¹¹⁾ さらに、われわれの経時的変化の追跡実験では、ストレプトゾトシン (STZ) 投与後によって糖尿病の発症後4週間でLDLコレステロールの増加が生じるが、内皮機能の変化は認められない。しかし、10週齢のSTZ糖尿病ラットでは、過酸化脂質の増加と弛緩反応の減弱が生じることを報告した。¹²⁾ このことは、なんらかの活性酸素の増加がLDLを酸化し、また酸化されたLDLは、活性酸素を増加するような悪循環を生じていることが

考えられる。そして、活性酸素も酸化LDLもSTZ糖尿病ラットの血管内皮機能の減弱において、強い影響を及ぼしていることが示されている。エンドセリン (ET) やアンジオテンシン (Ang) は、昇圧ペプチドであり内皮細胞由来収縮因子 (EDCF) の1つであるが、血管壁を含む様々な細胞にて産生される。現在多くの研究がされ、これら収縮物質が内皮細胞の弛緩因子に影響することが示され、糖尿病血管における内皮機能についても研究が進んでいる。これらJ-104132 (ET_A/ET_B受容体阻害薬) や、テモカプリル (Ang変換酵素阻害薬) の慢性投与は、STZ糖尿病動物における血管内皮弛緩反応の減弱を改善する。¹³⁾ 糖尿病ラットの血管では、NAD(P)H oxidase が過剰に発現しており、また O_2^- の産生も著明に増加している。このラットにET-1の拮抗薬 (J-104132) を慢性投与すると、 O_2^- の産生が著明に低下し、内皮細胞の機能は著明に改善する。つまり、糖尿病病態では、ET-1がNAD(P)H oxidase の発現を誘導し、 O_2^- を過剰に産生し、この O_2^- がNOを不活化することによって内皮細胞の機能を低下することになる。糖尿病病態では、PPAR α , γ の発現が著明に低下しているが、ベザフィブラートを慢性投与すると、PPAR α , γ ともに増加する。興味深いことに、ベザフィブラート慢性投与は血中ET-1濃度を著明に減少するので、prepro ET-1の発現を測定したところ、著明に減少し、さらにNAD(P)H oxidaseの過剰発現も抑制されていた。以上の事実から、糖尿病 (1型) ではPPAR α , γ の発現が低下し、これがET-1の発現を促進し、ET-1がNAD(P)H oxidase の発現を促進し、活性酸素が過剰に産生されることによって内皮細胞の機能が低下することが考えられる。¹⁴⁾

3. インスリンや成長因子による血管障害と活性酸素

インスリンには血糖の低下作用のほかに様々な作用があることが明らかになりつつある。さらにインスリンが作用する受容体として血管細胞には、インスリン受容体と、その他にインスリン様成長因子-1 (IGF-1) 受容体が存在する。IGF-1は、その名の通りインスリンと似た性質を持ち、それぞれ受容体も共有する。つまり血中に存在するインスリンは、IGF-1受容体にも結合し、その作用をする。Bornfeldtらの報告では、インスリンによる動脈硬化誘

導には、IGF-1 受容体を介して作用していると考えられ、¹⁵⁾ 近年の研究においても、その説を唱える論文は多い。筆者の研究により、高濃度のインスリンの慢性投与による高インスリン血症は、血圧増加、血管収縮増強作用があることが示されたが、¹⁶⁾ 1つ疑問が生じている。通常の正常動物によるインスリン慢性投与では、糖尿病ラットに観察された収縮、血圧の増加を生じない (Fig. 3)。このことは、血中に存在するインスリンの増加のみが、一連の生理作用を生じているとは考え難い。実際、高インスリン血症を生じる *insulinoma* (インスリンを分泌する膵島細胞腺腫) の患者においては、高血圧や動脈硬化を生じない。¹⁷⁾ つまり、われわれの結果は、糖尿病状態に特異的に生じる生理学的、及び血管への作用であることが推察され、糖尿病血管において、

IGF-1 の感受性が変化していると考えた。RT-PCR 及び Western blotting 法における IGF-1 受容体、IGF-binding protein (IGF-BP) 発現を比較したところ、糖尿病血管において、IGF-1 受容体の増加、IGF-BP-4、-5 の低下が観察された。IGF-BP-4 は、IGF の作用に拮抗することが報告されているので、以上の結果は、糖尿病血管においては、IGF-1、インスリンの作用の感受性が増加していることを示している。さらにこの発現は、インスリンを慢性投与した糖尿病群においても改善しない。これらの結果から、糖尿病状態、つまりインスリン欠乏や逆に高インスリン血症状態は、血管における IGF-1 受容体の増加、IGFBPs の低下を生じる。そしてこれが、インスリン投与における血管収縮の増加、血圧の増加を生じる原因であるかもしれない。^{18,19)} 近年

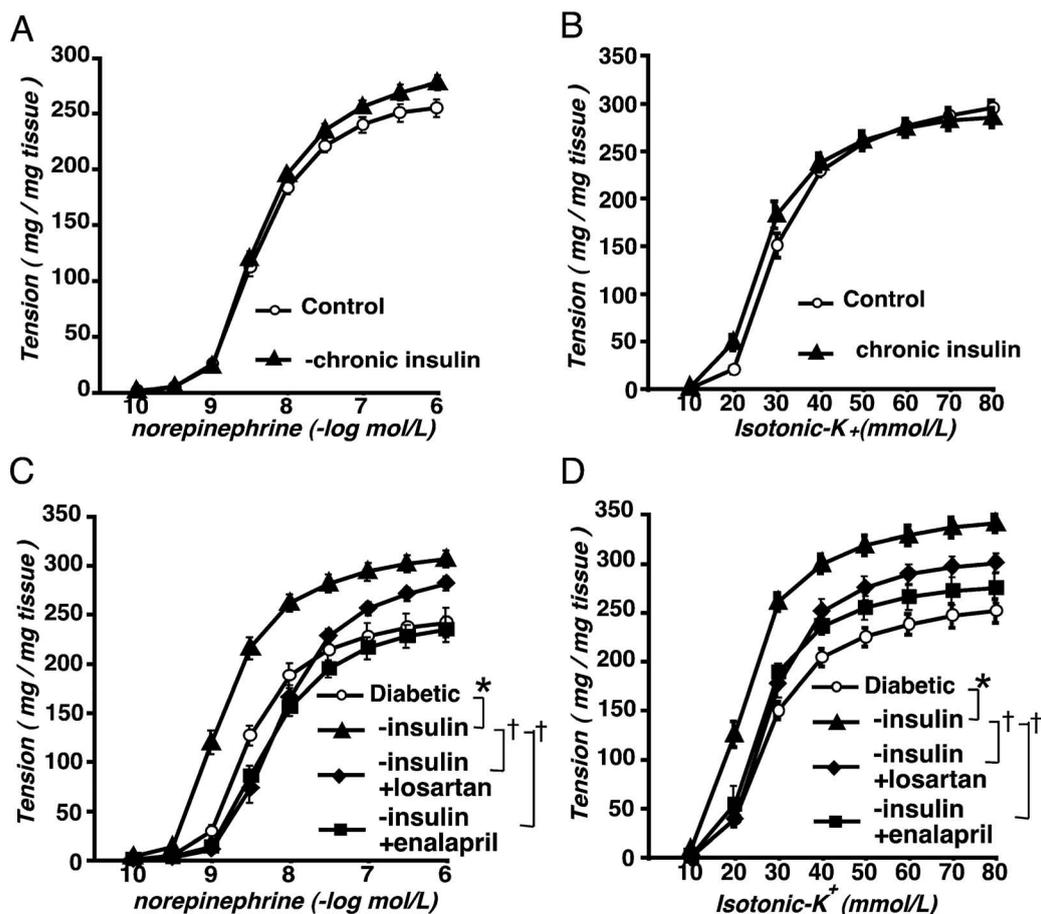


Fig. 3. Concentration-response Curves for Norepinephrine-induced (A, C) and Isotonic-K⁺-induced (B, D) Contractions in Endothelium-denuded Strips of Rat Aortas

The strips were obtained from: (A, B) age-matched controls, and (C, D) untreated diabetic rats, and chronic insulin-treated (insulin), insulin + losartan-treated (insulin + losartan), or chronic insulin + enalapril-treated (insulin + enalapril) diabetic rats. Ordinate shows increase in tension (expressed in mg tension mg tissue⁻¹) measured at the peak of the response. Each data-point represents the mean \pm S.E. from 8–10 experiments; the S.E. is included only when it exceeds the dimension of the symbol used. * $p < 0.05$, insulin-treated vs. untreated diabetic. † $p < 0.05$, vs. insulin-treated diabetic.

のヒト内皮細胞の培養実験によって、インスリンには、NOの産生促進作用、NO合成酵素(NOS)発現の増加作用があることが明らかにされた。²⁰⁾しかし一方では、ラットへの外因的な高インスリン血症は、胸部大動脈の O_2^- を増加することも報告された。²¹⁾さらに培養細胞においては、インスリンは、NADPH oxidaseを活性化し、 O_2^- を増加することが報告された。²²⁾また、この O_2^- の増加には、PI3-kinaseが関与していることが報告され、インスリン-PI3-kinase-NADPH oxidase- O_2^- 増加の一連のpathwayが存在することが考えられる。最近筆者は、高インスリン血症ラットにおいて、PI3-kinaseのsubunitであるp110 δ タンパク発現の増加によって、PI3-kinase活性が増加していることを報告した。²³⁾さらに、この高インスリン血症動物において、血中のAng II増加が認められ、Ang type I-受容体阻害薬であるlosartan慢性投与によって、PI3-kinaseの活性増加の低下が認められた(Fig. 4)。つまり、生体内においては、高インスリン血症は、直接作用だけではなく、Ang IIなどの他の因子を介して、酸

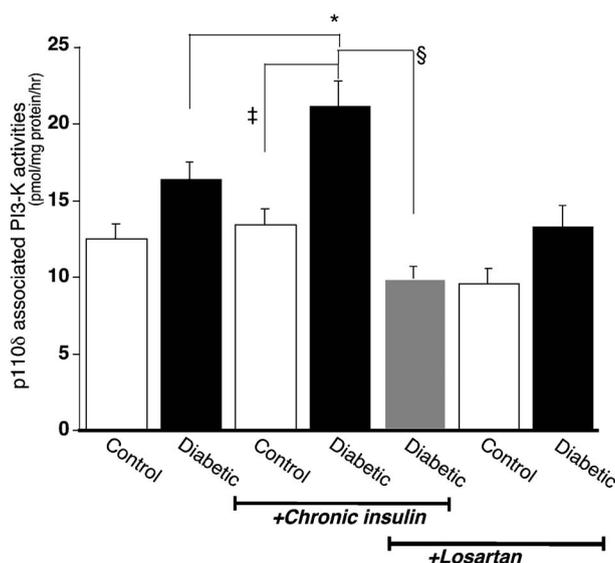


Fig. 4. p110-associated PI3-K Activity Levels following Norepinephrine (NE)-stimulation in Aortas from Control, Diabetic, Insulin-treated Control (Control+Chronic insulin), Insulin-treated Diabetic (Diabetic+Chronic insulin), Insulin+losartan-treated Diabetic (Diabetic+Chronic insulin+Losartan), and Losartan-treated Control or Diabetic (+losartan) Rats

All aortic strips were stimulated with NE (10^{-8} mol/l) for 5 min. The aortic lysate was immunoprecipitated with p110 antibody. Amount of PIP3 produced by PI3-K was detected using a competitive ELISA. Values are each the mean \pm S.E. from 8 determinations. * $p < 0.05$, insulin-treated vs. untreated diabetic. † $p < 0.05$, insulin-treated diabetic vs. insulin-treated control. § $p < 0.05$, insulin-treated vs. insulin+losartan-treated diabetic.

化ストレスを増加している可能性は高い。

4. インスリンによる血管内皮機能障害と ONOO⁻の関与

2型糖尿病時の初期や、糖尿病時のインスリン処置時には、高インスリン血症が生じ、その結果酸化ストレスによる血管障害を生じる可能性がある。一般的に血管内皮細胞におけるインスリンの効果は、インスリン受容体、PI3-K/Aktなどを介しNO合成酵素を活性化し、NO産生をすることによって血管弛緩作用を有する。フルクトースを慢性的に負荷することによって作成するフルクトース負荷モデルは、高インスリン血症、インスリン抵抗を生じ、比較的安易に作成できる動物モデルとして報告されている。²⁴⁾このフルクトース負荷マウスを用いた胸部大動脈において、アセチルコリンの弛緩反応の減弱が報告され、またアセチルコリン刺激によって産生されるNOx量も低下が認められた。しかし、クロニジンによる α_2 -作動薬による内皮依存性弛緩反応とNO産生は、アセチルコリン刺激と異なり、フルクトース負荷マウスにおいて増加している。²⁵⁾この実験と同様に、自然発症2型糖尿病モデルのGKラットにおいて、初期時の12週齢では、胸部大動脈 α_{2B} -受容体のmRNA発現増加と作動薬刺激によるNOx産生の増加が認められたが、36週齢ではNO産生、弛緩反応の減弱が認められる。²⁶⁾このことから、糖尿病初期に認められるインスリンによる過剰なNO産生は、血管障害の重要な因子であると考えられる。また、Pieperらは、初期の糖尿病状態において、NO scavengerであるNOX101を慢性投与することによって、終期の血管弛緩反応の減弱を予防できることを報告している。²⁷⁾先の記述のように、糖尿病には多くの因子によって O_2^- は増加する。つまり、糖尿病時には、過剰な O_2^- とNOが反応し、ONOO⁻を生じることによって、血管障害を生じている仮説が考えられる。最近の研究では、ONOO⁻は直接の作用により、NO産生、NOの平滑筋への弛緩機能の障害をすることによって、血管内皮細胞依存性の弛緩反応を減弱することが報告された。特に興味深い研究として、高脂血症動物において、ONOO⁻の増加によって、血管平滑筋細胞における筋小胞体Ca-ATPase(SERCA)を阻害することによって、細胞内カルシウムの低下が抑制され、弛緩反応が減弱することが報告されている。²⁸⁾

さらに、筆者は糖尿病ラット胸部大動脈の器官培養法を用いて、インスリンによる ONOO^- の増加によって弛緩反応が減弱することを報告した.²⁹⁾ これは、糖尿病血管においては、インスリンによって過剰な O_2^- と NO が産生し、その結果生じる ONOO^- が増加する。この ONOO^- は SERCA をニトロ化し、平滑筋のカルシウム取り込みを阻害することによって、内皮細胞依存性の弛緩機能障害を生じることを報告した (Fig. 5)。この実験の興味深い点として、正常動物より摘出した血管においては、インスリンは、弛緩反応、 ONOO^- の増加に関与していないことである (Fig. 6)。このことは、糖尿病時においてのみ、インスリンの高濃度の状態が続くと血管障害を誘発する可能性を裏付けている。さらに、糖尿病ラットに、Ang 変換酵素阻害薬である

enalapril を慢性投与すると、糖尿病時における弛緩反応の減弱は改善し、SERCA 機能の改善、 ONOO^- の産生が低下することを報告した.³⁰⁾ このことから、糖尿病時には、Ang II もまた、 ONOO^- の増加を生じ血管機能を傷害する可能性を示している。

5. おわりに

インスリンは、生理的条件下で血糖値を下げるほとんど唯一のホルモンである。糖尿病は、インスリンの作用不足により高血糖を来す症候群であり、同時に糖尿病合併症の予防においても、血糖値を低下させることが主要である。しかし、この血糖値のコントロールは非常に難しく、さらに、血糖値だけでは、血管合併症を予防することはできないとされている。この血糖値以外の因子についても、われわれ

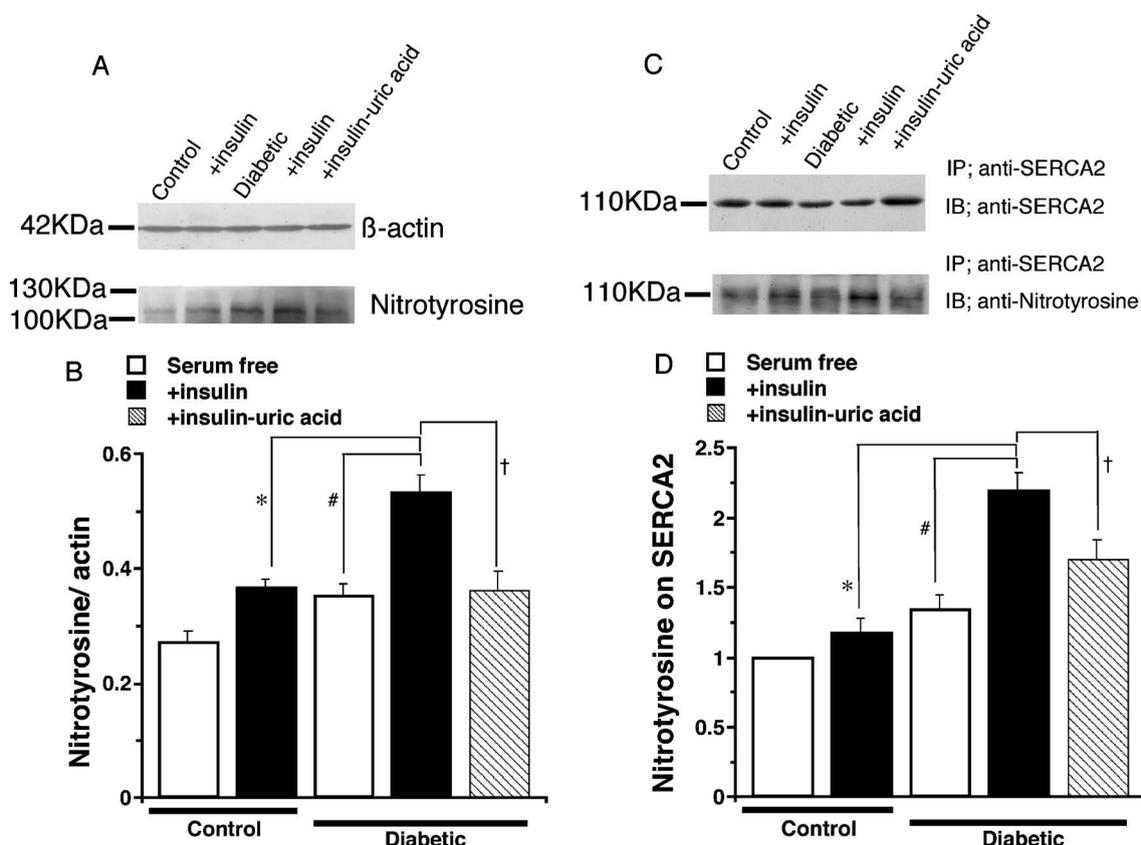


Fig. 5. Expression of Nitrotyrosine (A, B) or Nitrotyrosine in SERCA2 Protein (C, D) in Aortic Strips Cultured either in Serum-free Medium or in the Presence of Insulin with or without Uric Acid

Strips obtained from controls and diabetic rats were cultured in one of three ways: in serum-free medium, in the presence of insulin alone (+insulin) (50 ng/ml), or in the presence of insulin plus uric acid (0.5 mM) (+insulin+uric acid). (A, B), Expression of nitrotyrosine assayed by immunoblotting (IB). (C, D), For detection of nitrotyrosine in SERCA protein (C, top), an immunoprecipitate (IP) was obtained using anti-SERCA2 antibody, then immunoblotted with anti-SERCA2 antibody. (C, bottom), an IP was obtained using anti-SERCA2 antibody, then immunoblotted with anti-nitrotyrosine antibody. (B, D), Quantitative analysis of nitrotyrosine by scanning densitometry. Control or diabetic aortas in serum-free medium (open columns), with insulin (closed columns), or with insulin plus uric acid (hatched columns). Each value is mean + S.E. from 6–8 experiments. * $p < 0.05$ vs. control aortas cultured in presence of insulin. † $p < 0.05$ vs. diabetic aortas cultured in serum-free medium. # $p < 0.05$ vs. diabetic aortas cultured in presence of insulin.

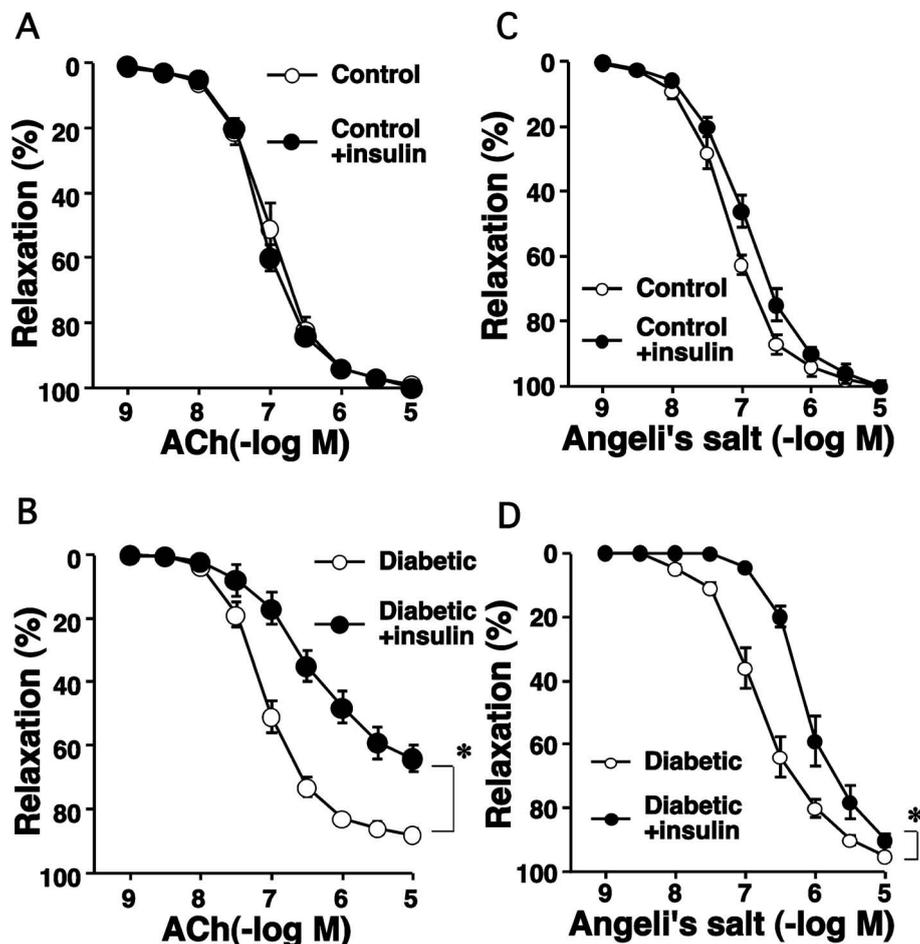


Fig. 6. Concentration-response Curves for the ACh (A, B)- and Angeli's Salt (C, D)-induced Relaxations of Aortic Strips after Organ Culture

Strips obtained from control rats (A, C) and diabetic rats (B, D) were cultured in serum-free medium or in the presence of insulin (50 ng/ml). In C and D, the endothelium was removed after culture. Ordinates show relaxation as a percentage of the contraction induced by an equieffective concentration of NE (10^{-8} – 5×10^{-8} M). Each data-point represents the mean + S.E. from 8–10 experiments (S.E. is included only when it exceeds the dimension of the symbol used). * $p < 0.05$ vs. diabetic aortas cultured in serum-free medium.

れを含め多くの研究者が検討を行っている。中でも、本総説のインスリンによる血管への影響は、他の因子に比べ作用が強いのではないだろうか。インスリンは、自身が成長因子であるとともに、様々な成長因子を誘導する。特に、血中インスリン値、及びインスリン動態が正常値ではない状態、つまり糖尿病時において、明らかに異常が認められた。糖尿病時の血管においてのみ、血圧、血管収縮力の増加、 α_1 -受容体の増加、ONOO⁻の増加、SERCAのニトロ化の増加、弛緩機能の低下が認められた (Fig. 7)。また注意しなくてはならないのは、血管を1つの器官として捉えたとき、インスリンによる血管に“よい”“悪い”作用が、それぞれにおいて相反する作用をし、強い作用がトータルの血管の作用として現れていることである。このバランスの乱れがどの

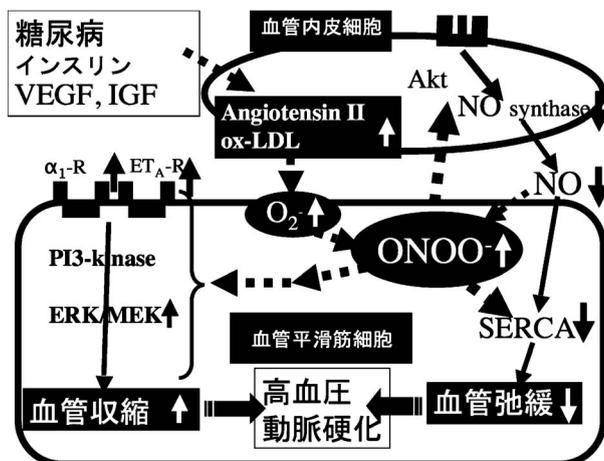


Fig. 7. Scheme Showing the Sequence Described in the Text between Insulin and Oxidative Stress Production (leading to vascular dysfunction) in Diabetes

ように血管合併症において作用するのかいまだ明らかではないが、このことが最も重要であるのかもしれない。その1つとして古くから研究が盛んな酸化ストレスが原因であり、この酸化ストレスを増加させる因子も Ang, 高血糖, LDL など古くから報告がある因子がメインになり、連鎖することによって糖尿病性血管障害を生じていると考えられる。今後、これらの不明な点を明らかにしていくことで、糖尿病性血管合併症の発症機序、予防薬の開発が進んでいくことを期待する。

謝辞 本研究は、星薬科大学機能形態研究室で行われた研究であり、終始、御指導頂きました鎌田勝雄教授に心から感謝申し上げます。また、本研究を行うに当たり、御協力と御助言賜りました、松本助教、並びに同研究室の皆様深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Standley P. R., Bakir M. H., Sowers J. R., *Am. J. Kidney Dis.*, **21**, 39–46 (1993).
- 2) Kobayashi T., Matsumoto T., Kamata K., *J. Smooth Muscle Res.*, **41**, 283–302 (2005).
- 3) Kobayashi T., Oishi K., Hayashi Y., Matsumoto T., Kamata K., *Atherosclerosis*, **185**, 47–57 (2006).
- 4) Kobayashi T., Taguchi K., Yasuhiro T., Matsumoto T., Kamata K., *Hypertension*, **44**, 956–962 (2004).
- 5) Kobayashi T., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H1761–H1768 (2002).
- 6) Kobayashi T., Kamata K., *Atherosclerosis*, **155**, 313–320 (2001).
- 7) Hink U., Li H., Mollnau H., Oelze M., Matheis E., Hartmann M., Skatchkov M., Thaiss F., Stahl R. A., Warnholtz A., Meinertz T., Griendling K., Harrison D. G., Forstermann U., Munzel T., *Circ. Res.*, **88**, E14–E22 (2001).
- 8) Tesfamariam B., *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 383–391 (1994).
- 9) Kamata K., Kobayashi T., *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 583–589 (1996).
- 10) Kugiyama K., Kerns S. A., Morrisett J. D., Roberts R., Henry P. D., *Nature*, **344**, 160–162 (1990).
- 11) Kobayashi T., Matsumoto T., Kamata K., *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 231–238 (2000).
- 12) Kobayashi T., Kamata K., *Eur. J. Pharmacol.*, **367**, 213–222 (1999).
- 13) Pieper G. M., Siebeneich W., *Eur. J. Pharmacol.*, **403**, 129–132 (2000).
- 14) Kanie N., Matsumoto T., Kobayashi T., Kamata K., *Br. J. Pharmacol.*, **140**, 23–32 (2003).
- 15) Bornfeldt K. E., Arnqvist H. J., Capron L., *Diabetologia*, **35**, 104–108 (1992).
- 16) Kobayashi T., Kamata K., *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 835–842 (1999).
- 17) Hall J. E., Brands M. W., Zappe D. H., Galicia M. A., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **208**, 317–329 (1995).
- 18) Kobayashi T., Kaneda K., Kamata K., *Br. J. Pharmacol.*, **140**, 285–294 (2003).
- 19) Kobayashi T., Matsumoto T., Kamata K., *J. Endocrinol.*, **186**, 367–376 (2005).
- 20) Kuboki K., Jiang Z. Y., Takahara N., Ha S. W., Igarashi M., Yamauchi T., Feener E. P., Herbert T. P., Rhodes C. J., King G. L., *Circulation*, **101**, 676–681 (2000).
- 21) Kashiwagi A., Shinozaki K., Nishio Y., Maegawa H., Maeno Y., Kanazawa A., Kojima H., Haneda M., Hidaka H., Yasuda H., Kikkawa R., *Am. J. Physiol.*, **277**, E976–E983 (1999).
- 22) Ceolotto G., Bevilacqua M., Papparella I., Baritono E., Franco L., Corvaja C., Mazzoni M., Semplicini A., Avogaro A., *Diabetes*, **53**, 1344–1351 (2004).
- 23) Kobayashi T., Hayashi Y., Taguchi K., Matsumoto T., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **291**, H846–H853 (2006).
- 24) Reaven G. M., *Diabetes Care*, **14**, 195–202 (1991).
- 25) Kamata K., Kanie N., Inose A., *Eur. J. Pharmacol.*, **428**, 241–249 (2001).
- 26) Kobayashi T., Matsumoto T., Ooishi K., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H135–H143 (2004).
- 27) Pieper G. M., Dembny K., Siebeneich W., *Diabetologia*, **41**, 1220–1226 (1998).
- 28) Adachi T., Matsui R., Xu S. Q., Kirber M., Lazar H. L., Sharov V. S., Schoneich C., Cohen R. A., *Circ. Res.*, **90**, 1114–1121 (2002).
- 29) Kobayashi T., Taguchi K., Takenouchi Y.,

Matsumoto T., Kamata K., *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 431–443 (2007).

30) Taguchi K., Kobayashi T., Hayashi Y., Mat-

sumoto T., Kamata K., *Eur. J. Pharmacol.*, **556**, 121–128 (2007).