

9. インスリンシグナル伝達における ROS 作用機序

杉森 慎 (医学部 医学科 3年)

指導教員

金子 周一 (医学系研究科 恒常性制御学講座 教授)

1. 背景と研究目的

近年の食生活の欧米化、飽食、運動不足といったライフスタイルの変化を背景に、肥満者は増加し、糖尿病、高脂血症、高血圧などの症状が混在化した、いわゆるメタボリックシンドローム（内臓肥満症候群）が蔓延しつつある。平成 19 年度 国民健康・栄養調査によると、日本では 40 歳から 74 歳までの男性の約 2 人に 1 人、女性の 5 人に 1 人がメタボリックシンドロームに該当し、糖尿病が強く疑われる人（約 890 万人）や可能性を否定できない「予備群」（1320 万人）該当者は、10 年前の同調査の約 1.3 倍にあたる 2210 万人と推計され、増加の一途を辿っている(1)。また、メタボリックシンドロームはわが国の死因の第 1 位を占める動脈硬化性疾患（心筋梗塞、脳梗塞など）の大きな要因となることも指摘されている。

こうしたメタボリックシンドロームの根幹には「インスリン抵抗性」が存在する。生体はインスリンという膵臓から分泌されるホルモンの働きにより、骨格筋、脂肪組織へと糖を取り込み、また肝臓での糖産生を抑制することで高血糖状態を回避しているが、インスリン抵抗性とは、こうしたインスリンによる血糖降下作用が十分に発揮されない状態を指す。インスリン抵抗性が存在すると、膵臓β細胞機能が保たれている限りにおいては代償性の高インスリン血症が誘導され、この高インスリン血症が高血圧や高脂血症などメタボリックシンドロームを構成する種々の病態の発症、進展に寄与する。このような糖・脂質代謝異常、高血圧の共通の背景因子として存在するインスリン抵抗性はメタボリックシンドロームの中核をなす病態であり、主要な治療標的であると言える。

そして、肝臓におけるインスリン作用は他のインスリン標的組織にもまして、極めて重要である。エネルギー代謝の中核器官である肝臓は、蓄えたグリコーゲンを分解してグルコースとして循環血中へ放出する糖新生臓器であるだけでなく、生体内最大の脂質合成器官である故、肝臓におけるインスリン抵抗性は肝糖産生を亢進し、代償性高インスリン血症を引き起こし、さらにこの高インスリン血症により肝臓における脂質合成が亢進し、全身の脂質代謝異常を引き起こす。

また肝臓は、消化管を通過し吸収された栄養分を豊富に含む門脈血が流入しており、過栄養状態に真っ先に曝される臓器であると言え、肥満、糖尿病病態において特徴的な脂肪肝（肝臓に中性脂肪が蓄積した状態）は、インスリン抵抗性と密接に関連した病態であることが明らかとなっており、本学医学系研究科恒常性制御学講座においても、肝の脂肪化が非アルコール性脂肪肝患者のインスリン抵抗性を予知する独立因子の 1 つであること、また、遺伝的に糖尿病肥満病態を形成する OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットを用いた研究により、肝臓の脂肪化がインスリン抵抗性と密接に関与すること (2) が明らかにされている。しかしながら、肝の脂肪化が代謝障害の原因なのか、あるいは結果なのかに関しては未だ明らかではない。

このような肝臓におけるインスリン抵抗性、脂肪肝、そして肥満を結びつける重要な因子のひとつとして FFA（遊離脂肪酸）が考えられる。門脈を介して肝臓に高濃度に流入した内臓脂肪由来の FFA は、脂肪肝を引き起こし、肝インスリン抵抗性を誘導する可能性がある。実際に、高脂肪食負荷などの実験系により *in vivo* で高 FFA 血症が肝臓にインスリン抵抗性を誘導するメカニズムを検討した報告がいくつか存在する(3-7)。確かに *in vivo* 実験で得られるデータは生理的なものではあるが、先に述べた高血糖や代償性高インスリン血症といった高 FFA 血症に付随して生じる様々な生体反応を反映しているため、FFA が肝臓にインスリン抵抗性を誘導する直接的な作用機序を解明するためには他の実験系を構築して検討する必要があると思われる。

そこで本研究では、培養肝細胞の系を用いて FFA が肝細胞におけるインスリンシグナル伝達を障害する直接的なメカニズムについて検討を行い、その障害メカニズムが活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS)

を紹介したものであることを明らかにし、さらに外因性の ROS として H₂O₂ を処置することにより、ROS のインスリンシグナルにもたらす影響について検討を行った。本研究がインスリンシグナルに対する ROS の作用機序解明の一助となることを願う。

2. 研究方法

① 細胞株及び培養条件

i) 細胞株

細胞株としてラット肝癌由来細胞 H4IIEC3 を用いた。H4IIEC3 は正常肝細胞に近い糖脂質代謝能を有し、糖新生能および培養液中への糖放出能を有する数少ない細胞株の 1 つで、糖脂質代謝分野にて汎用されている細胞株である (8, 9)。

ii) 培養条件

培養液には 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin を含む Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) を用い、37°C、飽湿、5% CO₂-incubator 内で培養を行った。

② 脂肪酸、過酸化水素、インスリン処置

i) 脂肪酸処置

生体内で、脂肪酸はミトコンドリア内へ取り込まれβ酸化により代謝されるが、その脂肪酸のもたらす生体への影響は、その化学構造によって異なることが知られている。中でも特に、二重結合の有無による違い、すなわち飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸（動物性脂肪と植物性脂肪）の作用の違いについては、アポトーシス誘導作用 (10-12)、炎症作用 (13) など多々報告されている。代謝分野でも動物実験において、動物性脂肪（飽和脂肪酸主体）あるいは大豆脂肪（不飽和脂肪酸主体）を負荷したラットを比較すると、動物性脂肪負荷群は明らかにインスリン感受性が低下していること (14)、また細胞レベルでも筋細胞におけるインスリンシグナル障害は不飽和脂肪酸では起こらず、飽和脂肪酸でのみ誘導されることが報告されている (15, 16)。そこで本研究では、飽和脂肪酸として palmitate (C16: 0)、不飽和脂肪酸として oleate (C18: 1) を用い、脂肪酸の構造の違いが肝臓インスリン抵抗性に及ぼす影響についても検討した。なお、これらの脂肪酸 palmitate, oleate は高等動植物に最も多く含まれる一般的な脂肪酸である。

まず各脂肪酸塩 (Sodium palmitate, Sodium Oleate) を 50% ethanol で溶解した 100 mM ストック溶液を調製し、これを FFA-free bovine serum albumin を 2% 含むよう 10% FBS/DMEM で調整した溶液で希釈し、ボルテックス後、45°C で 5 分間加温し、37°C に冷却、これを処置培養液として 6 well plate あるいは 10 cm dish 上で 80~90% コンフルエントに培養した細胞に、37°C、飽湿、5% CO₂-incubator 内で 16 時間の処置を行った。

なお、培地中の FFA 濃度は NEFA C-テストワコーを用いて適宜確認を行った。

ii) 過酸化水素処置

30% 過酸化水素を原液として用い、要時、10mM H₂O₂/DMEM を調整した後、10 倍希釈を繰り返し行って目的の濃度へと調整したものを処置培養液とし、12well plate で 80~90% コンフルエントに培養した細胞に、37°C、飽湿、5% CO₂-incubator 内で所定時間の処置を行った。

なお、自己酸化還元反応により H₂O と O₂ へと分解する H₂O₂ の濃度は、H₂O₂ の定量法の一つであるチタン法を用いることにより、適宜確認を行った。

iii) インスリン処置

各脂肪酸処置後、1 ng/mL の insulin を含む 0.5% FBS/DMEM に培地交換し、37°C、飽湿、5% CO₂-incubator

内で15分間のインキュベーションを行った。

③H2O2の定量法 チタン法

96Wellプレートにて、1M硫酸チタン30 μ L、20%(W/V)硫酸50 μ L、H2O2溶液160 μ Lを加え、シェイカーで10min混和した後、波長405nmで吸光度を測定し、モル吸光係数=750を用いてH2O2濃度を算出した。

④ウエスタンブロット法

i) サンプル調製

処置後培地を除去して冷PBSで1回洗浄後、氷上で冷やしたcell lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 mM Na₄P₂O₇, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail] を添加し、セルスクレイパーを用いて細胞を1.5 mLチューブに回収、ソニケーション後、15,000 rpm、4°Cで10分間遠心し、上清を回収した。

その後BSAを標準タンパクとして、Lowry法に従いDC protein assay kitを使用して定量し(17)、タンパク量の補正を行ったものをサンプルとした。

ii) 免疫沈降法

IRS-2、IRチロシンリン酸化体の検出は、i)に続き免疫沈降法を用いて泳動サンプルの調製を行った。サンプルの一部を1.5 mLチューブに400 μ g protein / 400 μ Lとなるよう調整し、phospho-tyrosine antibodyを4 μ L加え4°Cで1時間反応させた。そこにCell lysis bufferで平衡化し、50% v/vに調製したProtein G Sepharoseを20 μ L加え、さらに4°Cで1時間反応させた後、Cell lysis buffer 500 μ Lで4回、10,000 rpm、4°Cで30秒遠心することにより洗浄し、洗浄後のペレットを泳動サンプル調製に用いた。

iii) ウエスタンブロットニング

i)、ii)で調製したサンプルにsample buffer solutionを加え、95°C、5分間加熱後に氷上で冷却、泳動用サンプルとした。泳動バッファー [25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS] にて4-20% gradient gelで、SDS-PAGEを行い、その後、バッファータンク転写装置により電気的にタンパクをpolyvinylidene fluoride (PVDF)膜に転写した(転写バッファー [25 mM Tris, 200 mM glycine, 20% methanol])。転写後PVDF膜を5%スキムミルク溶液 [5% skim milk in Tris buffered saline-0.1% Tween-20 (TBS-T)] で室温にて1時間ブロッキングし、TBS-Tにて3回洗浄後、各1次抗体をハイブリバッグを用いて1時間ハイブリダイゼーションさせ、再度TBS-Tで3回洗浄後に5%スキムミルク溶液で室温にて1時間ブロッキングした。TBS-Tにて3回洗浄後、2次抗体を30分間ハイブリダイゼーションさせた。反応後TBS-Tで3回洗浄し、ECL Plus Western Blotting Detection ReagentsにPVDF膜を浸し、生ずる化学発光をLuminescent Image Analyzerにて検出した。バンドの数値化は画像処理解析ソフトScion Imageを用いて行った。

④細胞内ROS量の測定

細胞内ROS量は2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA)を用いて測定した。H₂DCFDAは酸化により強い緑色蛍光の2',7'-dichlorofluoresceinを生じ、細胞内ROS量の測定に広く用いられている試薬である。

2 \times 10⁵個/mLになるように調整した細胞懸濁液をblack-wall 96-well plateに100 μ Lずつ播き、37°C、飽湿、5% CO₂-incubator内で24時間培養後、各脂肪酸を8時間処置を行い、各wellの培養液を除去後、PBSで1回洗浄、遮光下にてPBSで希釈した10 μ M H₂DCFDAを100 μ L添加し、37°C、飽湿、5% CO₂-incubator内で30分間インキュベーション後、発する蛍光をFluorescent Plate Readerにて測定した(excitation: 485 nm, emission: 530 nm)。

3. 研究成果と考察

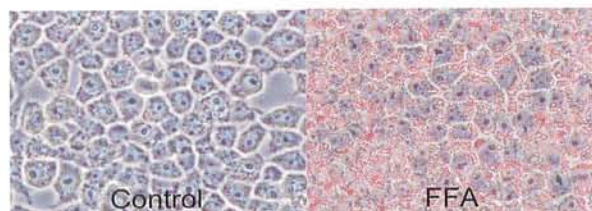
i) H4IIEC3 培養肝細胞に、飽和脂肪酸である Palmitate (C16: 0)、不飽和脂肪酸である Oleate (C18: 1) を 16h 処置し、インスリンシグナルに及ぼす影響について検討を行った。

脂肪酸を処置すると細胞内に赤い油滴が見られ、脂肪化する様子が確認された。(Fig1)

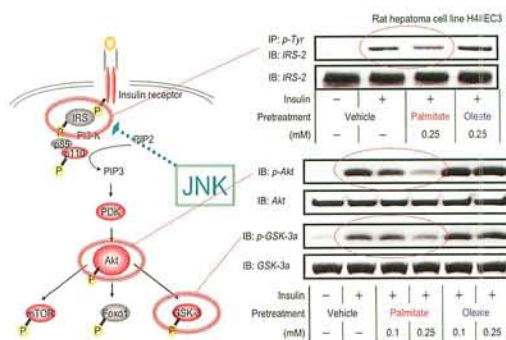
細胞内インスリンシグナル伝達については、次のようなメカニズムが知られている。インスリンの細胞膜上のインスリン受容体 (insulin receptor : IR) への結合により、 β サブユニットのチロシンキナーゼが活性化され、チロシン残基の自己リン酸化が起き、活性化されたチロシンキナーゼによりインスリン受容体基質 (insulin receptor substrate : IRS) のチロシン残基がリン酸化される (18)。IRS には 4 つアイソフォームが存在し、筋肉、脂肪組織においては IRS-1、肝臓、膵臓においては IRS-2 がインスリンシグナルの伝達に重要とされている (19)。IRS のリン酸化後、リン酸化したチロシンを認識してホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-K) が結合し活性化、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-トリスリン酸産生を介して下流のセリンスレオニンキナーゼである Akt をリン酸化、活性化する。この Akt はインスリン作用の分岐点とされ、Akt がさまざまな因子をリン酸化することによりインスリンの多様な作用が発揮される。Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) のリン酸化はグリコーゲン合成に、forkhead transcription factor FKHR (FOXO-1) のリン酸化は糖新生の抑制に、mammalian target of rapamycin (mTOR) のリン酸化はタンパク合成に関わる。(Fig2)

脂肪酸処置後の IRS-2, Akt, GSK のリン酸化レベルをウエスタンブロッティング及び免疫沈降法を用いて調べたところ、Palmitate 処置により IRS-2Tyr のリン酸化レベルでインスリンシグナルに障害が生じ、Akt, GSK-3 β においてもそのリン酸化が障害されていることが判明した。なお、Oleate 処置群ではインスリンシグナル伝達障害は確認されなかった。(Fig2)

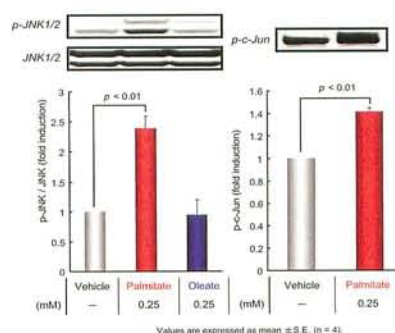
このような IRS-2Tyr レベルでインスリンシグナルを障害するものとしてストレス応答キナーゼ JNK (c-Jun N-terminal kinase) の存在が知られている。JNK は IRS-Ser をリン酸化し、IRS の立体構造を変化させることで、IRS-Tyr のリン酸化を阻害すること (20)、JNK は動物レベルの実験においても肝臓インスリン抵抗性に関わること (21)、また FFA で活性化されることが報告されている (22)。そこで同様の処置のもと、JNK のリン酸化レベルをウエスタンブロッティングにて確認したところ、Palmitate 処置により JNK のリン酸化が有意に亢進し、これに関連して c-Jun のリン酸化亢進が確認された。(Fig3)



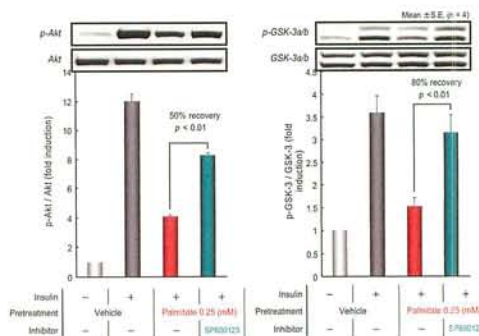
(Fig1): 脂肪酸 16h 処置後の H4IIEC3 細胞



(Fig2)



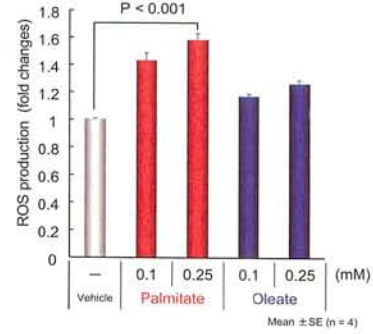
(Fig3)



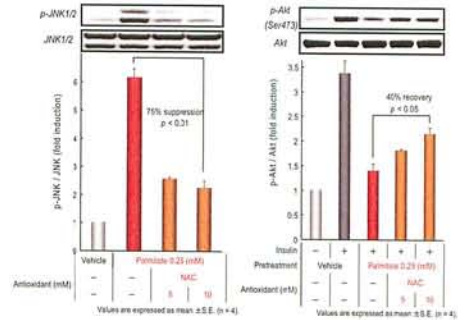
(Fig4)

さらに、Palmitate 処置によるインスリンシグナルの障害が JNK を介したものであることを明らかにするため、JNK の阻害剤である SP600125 を処置し、同様の脂肪酸処置を行ったところ、Palmitate 処置により抑制された Akt, GSK-3 セリンリン酸化は濃度依存的に回復した。(Fig4)

ii) JNK を活性化する因子の 1 つとして活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) が知られている (23)。近年、糖尿病、肥満病態における酸化ストレス亢進、酸化ストレスとインスリン抵抗性との関連性については数多く報告されており (24, 25)、さらに FFA により ROS が産生されることも各組織において報告されている (25-29)。そこで、続いて Palmitate 処置肝細胞におけるインスリン抵抗性への ROS の関与を検討するため、ROS 測定用蛍光プローブである 2', 7' -dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (30) を用いて FFA 処置 8 時間後の細胞内 ROS を検出したところ Palmitate, oleate 処置ともに、濃度依存的な細胞内 ROS 産生の亢進が認められた。(Fig5)



(Fig5)



(Fig6)

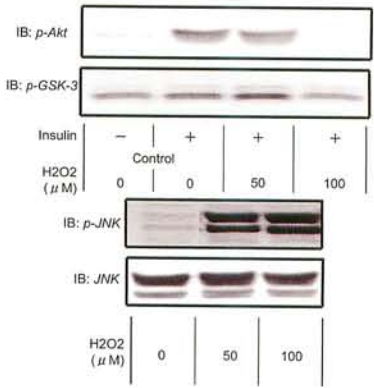
iii) 活性酸素を消去する抗酸化剤として知られる N-acetyl-L-cysteine (NAC) を Palmitate と同時処置すると、Palmitate により誘導される JNK リン酸化の亢進が濃度依存的に抑制され (Fig6)、また Palmitate による Akt のリン酸化の抑制が濃度依存的に回復された。(Fig6)

iv) 細胞内で発生しうる活性酸素種としては、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルといったフリーラジカルや過酸化水素の存在が知られており、酸化された蛋白、脂質、DNA が生体に悪影響を与えることが注目されてきた。中でもフリーラジカル種は、

不対電子を持つという構造上、反応性に富み、細胞傷害性が強く不安定である。一方、過酸化水素は、電荷を持たないため細胞膜透過性を有するとともに、フリーラジカル種に比べ安定であり、生体内での細胞分化、細胞増殖、免疫反応、炎症反応などにおいて、生体が利用する一つの因子として機能していることが、近年、NADPH オキシダーゼ (Nox) の研究により明らかになってきた (31)。

そこで今回、様々な濃度と時間のもと、外因性の ROS として H₂O₂ を処置し、インスリンシグナルを検討したところ、50, 100 μM の H₂O₂ を 3 時間処置することにより、Palmitate 処置同様、ストレス応答キナーゼである JNK のリン酸化の亢進と、Akt および GSK のリン酸化の抑制が確認された。(Fig7)

今後、H₂O₂ を用いた実験系を構築し、インスリンシグナルへの ROS の作用機序の更なる解明を進めていきたいと考えている。



(Fig7)

4. 結論

- ラット肝癌由来細胞 H4IIEC3 において、飽和脂肪酸である Palmitate はストレス応答キナーゼ JNK 活性化を介して、IRS-2Tyr リン酸化レベルでインスリンシグナルを障害することが JNK 阻害剤を用いた実験などにより明らかとなった。
- Palmitate による JNK の活性化は、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) によるものであり、抗酸化剤 NAC を処置することで JNK のリン酸化が抑制され、インスリンシグナルの改善が認められた。
- 抗酸化剤、JNK 阻害剤が Palmitate によるインスリンシグナル障害を改善させたことから、これらの作用を持つ薬物が、肥満患者における肝臓インスリン抵抗性への有効な治療薬となりうると考えられる。
- さらに、外因性の ROS として H2O2 を様々な条件のもとで処置することにより、JNK を介したインスリンシグナルの障害を誘導できた。このメカニズムの更なる解明に向け、今後更なる検討を予定している。

参考文献

1. 厚生労働省 平成19年 国民健康・栄養調査
2. Ota, T., Takamura, T., Kurita, S., Matsuzawa, N., Kita, Y., Uno, M., Akahori, H., Misu, H., Sakurai, M., Zen, Y., Nakanuma, Y., and Kaneko, S., Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis, *Gastroenterology*, **132**, 282 (2007).
3. Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yamamoto, T., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., Toyoshima, H., Fukamizu, A., and Yamada, N., SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver, *Nat Cell Biol*, **6**, 351 (2004).
4. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, **306**, 457 (2004).
5. Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., and Ruderman, N., Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver, *Diabetes*, **54**, 3458 (2005).
6. Lam, T. K., Yoshii, H., Haber, C. A., Bogdanovic, E., Lam, L., Fantus, I. G., and Giacca, A., Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C- δ , *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**, E682 (2002).
7. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G. S., A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature*, **420**, 333 (2002).
8. Zhou, H., Song, X., Briggs, M., Violand, B., Salsgiver, W., Gulve, E. A., and Luo, Y., Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 793 (2005).
9. Barthel, A., Schmolli, D., Kruger, K. D., Bahrenberg, G., Walther, R., Roth, R. A., and Joost, H. G., Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 897 (2001).
10. Eitel, K., Staiger, H., Brendel, M. D., Brandhorst, D., Bretzel, R. G., Haring, H. U., and Kellerer, M., Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, **299**, 853 (2002).
11. Malhi, H., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., and Gores, G. J., Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopoptosis, *J Biol Chem*, **281**, 12093 (2006).
12. Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F., and Pagliassotti, M. J., Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E275 (2006).
13. Lee, J. Y., Sohn, K. H., Rhee, S. H., and Hwang, D., Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4, *J Biol Chem*, **276**, 16683 (2001).
14. Dobbins, R. L., Szczepaniak, L. S., Myhill, J., Tamura, Y., Uchino, H., Giacca, A., and McGarry, J. D., The composition of dietary fat directly influences glucose-stimulated insulin secretion in rats, *Diabetes*, **51**, 1825 (2002).
15. Chavez, J. A., Knotts, T. A., Wang, L. P., Li, G., Dobrowsky, R. T., Florant, G. L., and Summers, S. A., A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids, *J Biol Chem*, **278**, 10297 (2003).
16. Dimopoulos, N., Watson, M., Sakamoto, K., and Hundal, H. S., Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells, *Biochem J*, **399**, 473 (2006).
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, **193**, 265 (1951).
18. Saltiel, A. R., and Kahn, C. R., Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, **414**, 799 (2001).
19. Rother, K. I., Imai, Y., Caruso, M., Beguinot, F., Formisano, P., and Accilli, D., Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes, *J Biol Chem*, **273**, 17491 (1998).
20. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., and White, M. F., The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307), *J Biol Chem*, **275**, 9047 (2000).
21. Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Hatazaki, M., Miyatsuka, T., Matsuoka, T. A., Kajimoto, Y., Matsuhisa, M., Yamasaki, Y., and Hori, M., Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status, *J Biol Chem*, **279**, 45803 (2004).
22. Malhi, H., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., and Gores, G. J., Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopoptosis, *J Biol Chem*, **281**, 12093 (2006).
23. Kaneto, H., Kawamori, D., Nakatani, Y., Gorogawa, S., and Matsuoka, T. A., Oxidative stress and the JNK pathway as a potential therapeutic target for diabetes, *Drug News Perspect*, **17**, 447 (2004).
24. Houstis, N., Rosen, E. D., and Lander, E. S., Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance, *Nature*, **440**, 944 (2006).
25. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J Clin Invest*, **114**, 1752 (2004).
26. Chinen, I., Shimabukuro, M., Yamakawa, K., Higa, N., Matsuzaki, T., Noguchi, K., Ueda, S., Sakanashi, M., and Takasu, N., Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats, *Endocrinology*, **148**, 160 (2007).
27. Du, X., Edelstein, D., Obici, S., Higham, N., Zou, M. H., and Brownlee, M., Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation, *J Clin Invest*, **116**, 1071 (2006).
28. Miller, T. A., LeBrasseur, N. K., Cote, G. M., Trucillo, M. P., Pimentel, D. R., Ido, Y., Ruderman, N. B., and Sawyer, D. B., Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 309 (2005).
29. Carlsson, C., Borg, L. A., and Welsh, N., Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro, *Endocrinology*, **140**, 3422 (1999).
30. Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W., Knapp, W., and Zlabinger, G. J., A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, *J Immunol Methods*, **156**, 39 (1992).
31. Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J., et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase, *Cell*, **113**, 343 (2003).