

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：35403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15266

研究課題名(和文) マルチプレックス分析を応用した虚血再灌流障害形成機序の神経化学的解明

研究課題名(英文) Neurochemical studies of brain ischemia and the action of alcohol

研究代表者

吉本 寛司 (Yoshimoto, Kanji)

広島工業大学・生命学部・教授

研究者番号：70111903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：実験 ペプチドYY及び -アミリンは投与後0.5時間に増加ピークを示し以後減少した。グルカゴンとレプチジンの変化は認められなかった。実験 視床下部外側野灌流液中のグレリン、レプチン量変化に有意差は認められなかった(検出限界)。実験 血漿レプチン量は4V0時及び断頭時直後に有意に増加した。Wistar系ラットへ2 g/kg i.p.アルコール投与し、30、60、90及び120分後の血漿グレリンをELISA法で測定した。投与後60分に最大値を示しその後減少した。血漿 -アミロイドは、アルコール投与により投与後60分後に最高値を示した。120分には投与前の値に減少した。

研究成果の概要(英文)： Changes of peptides in the in vivo accumbal perfusion with the administration of alcohol. Insulin and leptin increased in the accumbal perfusates with the administration of alcohol. Peptide YY and -amylin were increased at 0.5 h and then decreased to the control levels. After the injection of alcohol, plasma ghrelin decreased at 1, 2, and 4 hrs later significantly and returned to the control levels at 8 hrs later. 4 vessels occlusion- and decapitation-induced plasma leptin significantly increased as compared with the sham-control. Plasma -amyloid indicated at the peak of 60 min later after alcohol administration. This peak time of -amyloid levels induced by alcohol injection coincide with the peak time of alcohol absorption in the body. Amounts of accumbal insulin and leptin in the perfusates increased after the administration of alcohol. This result warned aged persons about the caution of the binge alcohol drinking risk.

研究分野：法医学

キーワード：虚血 グレリン レプチン -アミロイド インスリン アルコール

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えたわが国では、高次脳機能維持、脳血管障害の予防と治療は社会的に重要な課題である。脳梗塞や狭心症のような虚血性心疾患は、1995年以降ほぼ横ばいで推移している（引用文献、  
）。脳虚血は脳に栄養を供給する血管の閉塞や狭窄、心停止により脳組織への血流が障害される結果発生する。虚血に対して脆弱な神経細胞群に神経細胞死が生じる。選択的脆弱性部位は、海馬 CA1 領域の錐体細胞、小脳 Purkinje 細胞、大脳皮質 3,5 層錐体細胞、線条体背外側部が広く知られている。

虚血による神経細胞死は、脳の障害による神経脱落症状を起し最も一般的な病態であるが、その機序は未だ詳細に解明されておらず、神経科学、神経病理学及びアルコール生物学での永遠の研究テーマである。

## 2. 研究の目的

ヒト虚血の質的程度差は、血管閉塞の位置、原因、閉塞形成の速度、持続時間、対応組織の感受性により異なることが臨床的に多く報告されている。特に脳虚血は、酸素欠乏と栄養障害を惹起し、ATP 産生障害を介して細胞壊死をきたす。この細胞死機序は、グルタミン酸 - カルシウム説が広く支持されている。しかし、一次のグルタミン酸放出カルシウム流入増加による各種ペプチド、ホルモンその他の機能性生体分子の変動は未だ詳細な検討はない。今回マルチプレックス法や各種ペプチド ELISA 法を応用して虚血時及び急性アルコール単回投与による 6 種類のペプチド、食因子グレリン、レプチン及び  $\beta$ -アミロイドの定量変動を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 急性アルコール単回投与によるマウス脳側坐核灌流液中各種ペプチド変動：マウス C57BL/6J 雄マウスへペプチド回収プローブガイドカニューレを側坐核に挿入固定し、術後回復良好な個体にアルコール 2 g/kg i.p. 投与した。投与後 0.5, 1.0, 1.5 時間

の灌流液と血漿へ 6 種類抗体結合ビーズを加え、混合攪はん後遠心分離した。上清をマルチプレックス分光分析器にて a: グルカゴン(血糖上昇膵臓ホルモン、肝臓グリコーゲン分解とアミノ酸からの糖新生を促し血糖上昇させる) b: インスリン(血糖値を下げる膵臓ホルモン、細胞分泌) c: レプチン(脂肪細胞分泌、エネルギー消費促進ペプチドホルモン) d: PYY(ペプチド YY、NPY を調節する膵臓ポリペプチド、食欲抑制作用もある) e: レシチジン(アディポカイン、レプチンを含むサイトカイン) f: アミリン(膵臓細胞分泌、インスリン類似作用)の 6 種を選択し、アルコール投与(2 g/kg, i.p.)後の変動を迅速同時分析した(灌流液中各サンプルは略検出限界であった)。

(2) 急性アルコール単回投与によるラット血漿グレリン変動: Wistar 系雄ラットにアルコール 2 g/kg i.p. 投与した。0.5, 1, 2, 4 及び 8 時間後のグレリン量を ELISA 法で検討した。

(3) ラット虚血モデルにおけるレプチン変動: プルシネリ法に準じて虚血負荷動物モデルを作成した。脳内ペプチド微小透析膜法を応用し虚血時の視床下部外側野の神経活動の抵抗性変化及び血漿中のレプチン量を比較検討した。体重 280 - 310 g の Wistar 系雄ラットを用いた。脳内ペプチド微小透析膜用ガイドカニューレを視床下部外側野に挿入しデンタルセメントで固定した。手術回復 2 - 3 日後脳虚血処理を施した。ガイドカニューレを挿入したラットに麻酔を施し、脳定位固定装置に再度固定した。プルシネリの 4 血管閉塞(4V0)法に準じ第一頸椎翼状孔に電気メスチップを接触固定させ両側椎骨動脈の電氣的焼灼を行った。処理良好なラットについて、同時に両側総頸動脈を露出し、マイクロ血管クリップで両側総頸動脈を 30 分間閉塞した。なお両側椎骨動脈の電氣的焼灼のみを行い総頸動脈を露出したのみの非虚血群を Sham 対照群とした。脳微小ペプチド用脳透析膜プローブをガイドカニューレに沿って視床下部外側野へ挿入し人工脊髄液灌流し灌流液をマイクロ遠沈管に 1 時間間隔で回収(1 $\mu$ L/min)した。

(4) 急性アルコール単回投与及び虚血時の  $\beta$ -アミロイド(A $_{1-42}$ )の変動:Wistar系雄ラットを用い、実験 同様にペプチド回収プローブガイドカニューレを視床下部外側野に固定した。ラットに2g/kg i.p. アルコール投与し、30, 60, 90及び120分後の血漿グレリンをELISA法で測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 急性アルコール単回投与による側坐核灌流液ペプチド変動:インスリンは、生体の代謝に与する最重要ホルモンで、膵ランゲルハンス島細胞で合成される。インスリンは分子量約6,000, 21個のアミノ酸の直鎖ペプチド(A鎖)と30個の直鎖ペプチドをS-S結合で連結し、六量体として存在する。インスリンは動物による種差が少ない。レプチンは、脂肪細胞にて合成・分泌され、視床下部に働き摂食中枢に与する。またレプチンは細胞表面に存在するレプチン受容体に結合してその作用を発現する。血中レプチン濃度は体重,BMI (body mass index) や体脂肪量と良好な正の相関関係を示し、絶食により低下する。側坐核灌流液中インスリンとレプチンは、アルコール投与後増加した。特にインスリン量の増加は著名であった(図1と2)。

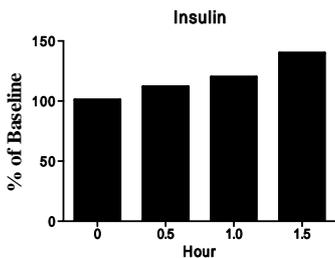


図1 側坐核灌流液中インスリン量

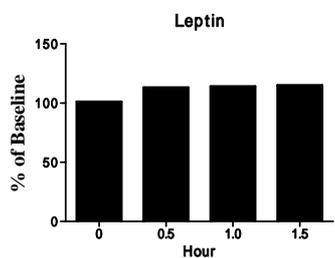


図2 側坐核灌流液中レプチン量

飲酒後の一過性低血糖症状と一致する結果である。

ペプチドYY(PYY)は、消化管から分泌されるペプチドでニューロペプチドYのレセプターY2のアゴニストで食欲を抑制する作用がある。一方アミリンは(または膵ラ島アミロイドタンパク:IAPP)は2型糖尿病患者の膵ラ島に沈着しているアミロイドの主要構成成分として分離同定された37アミノ酸残基よりなる生理活性様ペプチドである。ペプチドYY及び $\beta$ -アミリンは投与後0.5時間に増加ピークを示し以後減少した(図3と4)。

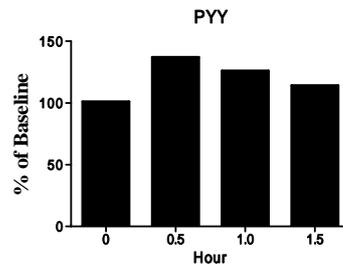


図3 側坐核灌流液中ペプチドY量

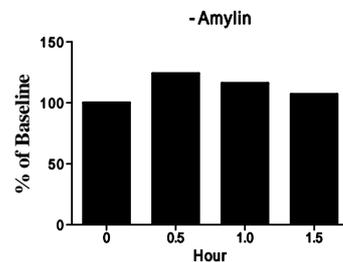


図4 側坐核灌流液中 $\beta$ -アミリン量

アミロイド沈着を示さないげっ歯類のアミリンの存在については、未だ解決されていない問題が多い。

グルカゴンは、主として膵A細胞より分泌される血糖上昇ホルモンであり、近年膵以外にも消化管、脳にもその存在が報告されている。29のアミノ酸残基よりなる分子量は3,485である。グルカゴンはその主な標的器官である肝細胞の受容体と結合し、アデニールサイクラーゼを活性化してATPよりサイクリックAMPへの転換生成を増大させ、セカンドメッセンジャー系の活性に与する。一方レシチンは、脂胞が分泌するアディポカインの一つで、インスリン抵抗性を上昇させる活性があるとされる。グルカゴンとレシチンの変化は認められなかった(図5と6)。

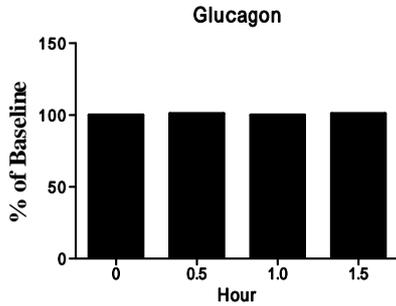


図5 側坐核灌流液中グルカゴン量

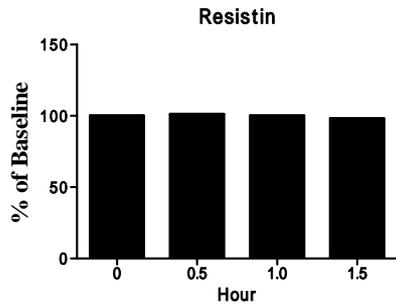


図6 側坐核灌流液中レシチジン量

血中グルカゴンを抑制する遊離脂肪酸がアルコール投与により増加したことが示唆される。

(2) 急性アルコール単回投与によるラット血漿グレリン変動：グレリンは、エネルギー代謝に関する脳腸ペプチドである。空腹時に胃から分泌され視床下部弓状核に作用して摂食を促進させる。また成長ホルモン分泌促進因子(GRH)受容体に結合して、成長ホルモン分泌を促進させる。我々の研究においても脳報酬系に作用してドパミン、セロトニン神経系と協調している(引用文献)。アルコール投与後、0.5, 1, 2, 4 及び 8 時間後のグレリン量を ELISA 法で検討した。投与後 2 時間に最低値を示し( $p < 0.05$ )8 時間後に回復した(図7)。

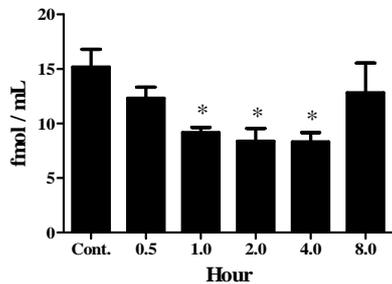


図7 血漿グレリン量

(3) ラット虚血モデルにおけるレプチン変動：アル

コール投与による視床下部外側野灌流液中レプチン量に有意な変化は認められなかったが(図2) 血漿レプチン量は4V0時( $p < 0.05$ )及び断頭時( $p < 0.005$ )直後に有意に増加した(図8と9)。

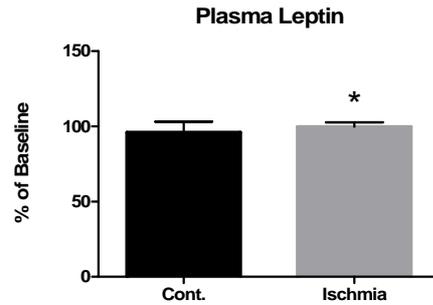


図8 虚血時血漿レプチン量

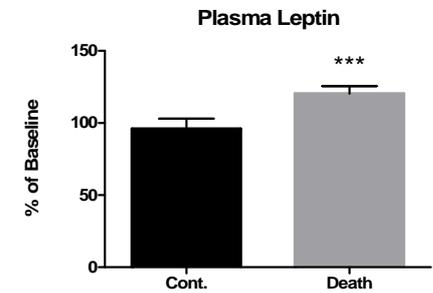


図9 断頭時血漿レプチン量

(4) 急性アルコール単回投与及び虚血時の  $\beta$ -アミロイド(A $\beta$  1-42)の変動：アミロイドは、繊維状タンパク質であり、1種類のものではなく多種多様なタンパク質である。特に今回測定した  $\beta$ -アミロイドタンパク質は、老化やアルツハイマー病に伴い脳内に蓄積される。構造をとり繊維状不溶物(アミロイド線維)を形成する。視床下部外側野灌流液における4V0群の  $\beta$ -アミロイド放出量は、Sham 対照群に比較して一部増加傾向を示したが個体数が少なく、個体差も大きく統計的有意差は認められなかった。血漿  $\beta$ -アミロイドは、アルコール投与とアルコール吸収により投与後 60 分後に最高値を示した( $p < 0.05$ )。120分には投与前の値に減少した(図10)。

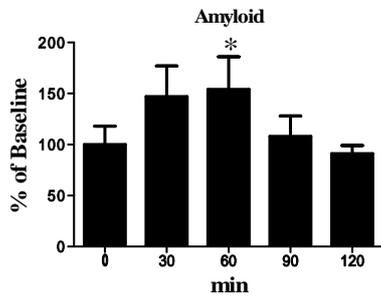


図 10 アルコール投与後の - アミロイド量  
高次脳機能障害に関与する - アミロイドのアルコ  
ール誘導を認め、高齢者等への飲酒指導啓蒙に重要  
な資料である。

#### <文献>

国民衛生の動向・厚生指標 増刊・第 64 巻第  
9号 2017

みる よむ わかる 精神医学入門 医学書院  
2017、184 - 217

Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M and Kimura  
M: Serotonin2C receptors in the nucleus accumbens  
are involved in enhanced alcohol-drinking behavior.  
Eur. J. Neurosci 35: 1368-1380 (2012)

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Matsui F, Hecht P, Yoshimoto K, Watanabe Y,  
Morimoto M, Fritsche K, Will M, Beversdorf D:  
DHA mitigates autistic behavior accompanied by  
dopaminergic change in a gene/prenatal stress  
mouse model. Neuroscience 371: 407-419 (2018)  
査読有

Matsuda W, Ehara A, Nakadate K, Yoshimoto K, Ueda  
S: Effects of environmental enrichment on the  
activity of the amygdala in microencephalic rats  
exposed to a novel open field. Congenit Anom  
(Kyoto) doi: 10. 1111/cga. 12228 査読有

Yoshimoto K, Nagao M, Watanabe Y, Yamaguchi T,  
Ueda S, Kitamura Y, Nishimura K, Inden M,  
Marunaka Y, Hattori H, Tokaji M, Murakami K.  
and Ochi K.: Enhanced alcohol-drinking behavior  
associated with active ghrelinergic and  
serotonergic neurons in the lateral hypothalamus  
and amygdala. Pharmacol. Biochem. Behav.  
153:1-11 (2017) 査読有

Arima Y, H. Shiraishi, A. Saitoh, Yoshimoto K,  
Namera A, Murata R, Makita R, K. Imaizumi and  
Nagao M. The saline-like organophosphorus  
agent bis(isophyl methyl) phosphonate induces ER  
stress in human astrocytoma cell. J. Toxicol. Sci.,  
141(5) 617-625 (2016) 査読有

Arima Y, Yoshimoto K, Namera A, Murata R, Makita R  
and Nagao M. The sarin-like organophosphorus  
agent bis (isopropyl methyl) phosphonate induces  
apoptotic cell death and COX-2 expression in  
SK-N-SH cells. Hiroshima J Med Sci 65(1) 1-8  
(2016) 査読有

Aoki M, Watanabe Y, Yoshimoto K, Tsujimura A,  
Yamamoto T, Kanamura N, Tanaka M.  
Involvement of 5-HT2c R RNA editing in accumbal  
NPY expression and behavior despair. Eur J  
Neurosci 43: 1219-1228 (2016)  
doi:10.1111/ejn.13233 査読有

Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Yamaguchi T,  
Ueda S, Hiraga Y, Nagao M, Ochi K. Habitual  
alcohol drinking behavior associated with active  
ghrelin and serotonin neurons in the amygdala and  
lateral hypothalamus. Eur Neuropsychopharm 25 (2)  
s597-598 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Yoshimoto K, Hiraga Y, Murakami M, Tokaji M, Takeuchi K, Maeda K, Ochi K.: Alcohol-drinking behavior associated with active ghrelinergic and serotonergic neurons in the lateral hypothalamus and amygdala. 40<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Research Society on Alcoholism, Jun 24-28, 2017, Denver, Colorado, USA

吉本寛司:長期アルコール摂取は、グレリンと視床下部外側野セロトニン放出を特異的に増加させる。第33回日本法医学会学術中四国地方集会 広島大学 広仁会館、平成28年10月1日、日法医誌 71(2) 159 (2017)

山本景子、高田和幸、堀井 流、吉本寛司、細木誠之、戸田侑紀、丸中良典、芦原英司:糖尿病とアルツハイマー病の関連性解明に向けた糖尿病モデルラットでの血糖値、脳内pH 及び A 量の解析。次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017.京都薬科大学 弓行館、平成29年8月26日、京都

## 6 . 研究組織

(1) 吉本 寛司 (YOSHIMOTO, Kanji)

広島工業大学・生命学部・教授

研究者番号 : 70111903