

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590700
 研究課題名（和文）糖尿病による中枢神経障害の分子メカニズムと新規抗酸化食品の改善効果
 研究課題名（英文）Protective mechanisms of water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic state

研究代表者
 岡崎 真理 (OKAZAKI MARI)
 城西大学・薬学部・准教授
 研究者番号：50272901

研究成果の概要（和文）：糖尿病は体内の酸化ストレスを増大させ、虚血性脳障害を増悪させることが報告されている。本研究の目的は、糖尿病の中枢神経障害を予防・改善する優れた抗酸化作用をもつ食品を探索し、その有効性と安全性とを科学的に検証することである。また、糖尿病における中枢神経細胞の脆弱性形成メカニズムを明らかにし、抗酸化食品の有効性を明らかにすることを目的とした。糖尿病態モデル動物（DM）に一過性脳虚血処置を行い、健康食品である霊芝菌糸体培養培地抽出物（MAK）の効果を検討した結果、DM では体内の酸化ストレス度の上昇、脳虚血後の運動機能障害の悪化および脳梗塞巣の増大が認められたが、MAK を経口投与した DM では、酸化ストレス度が正常レベルに維持され、脳障害の増悪がほぼ完全に抑制された。以上の結果から、MAK は糖尿病における酸化ストレス状態を改善し、一過性脳虚血に対する強い脳保護効果を示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Diabetic Mellitus (DM) have been shown to enhance oxidative stress leading to aggravation of cerebral ischemic injury following stroke. In this study, we examined the effects of oral administration of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (MAK) on blood glucose level (BG), total plasma oxidative stress, and activity of antioxidant enzymes in DM animals. Furthermore, neuroprotective effects of MAK against exacerbation of neuronal damage induced by cerebral ischemia/reperfusion in the DM animals were investigated. DM animals had increased BG and decreased activity of antioxidant enzymes in the brain. DM animals treated with MAK had significantly lower BG and normal activity of the antioxidant enzyme. Treatment of MAK remarkably improved aggravated neurological deficits and cerebral injury induced by ischemia/reperfusion in diabetic animals. These results show that daily intake of MAK relieves the exacerbation of cerebral ischemic injury in a diabetic state, which may be attributed to improvement of augmented oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,400,000	720,000	3,120,000
20年度	700,000	210,000	910,000
21年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）・代替医療

キーワード：酸化ストレス；糖尿病；霊芝菌糸体培養培地抽出物（MAK）；一過性脳虚血；炎症性サイトカイン；グルタミン酸トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病の患者数は、生活習慣や社会環境の変化、および国民人口の高齢化に伴って急激に増加している。糖尿病に関しては、それ自身の発症を未然に防ぐことはもちろん、合併症の予防および治療対策が急務となっている。このような生活習慣病の増加を背景に国民の健康志向の気運が高まる中、民間療法や健康食品などの代替医療サービスや商品が盛んに普及しているが、個々の有効性の科学的検証は充分とはいえない段階で市場に出回っているのが現状である。

糖尿病では全身の血管が侵され、脳梗塞や虚血性心疾患、腎症、網膜症、神経障害など様々な合併症が誘発される。神経障害は自律神経や感覚神経などの末梢神経系だけでなく、脳においても生じ、糖尿病患者では記憶や学習機能が低下することが報告されている。また、糖尿病態による動脈硬化の進展は、脳虚血や脳梗塞を引き起こし、特に脳梗塞は半身の運動麻痺などの後遺症をもたらす、患者のQOLを著しく低下させる。脳の神経細胞はきわめて虚血に脆弱であり、脳梗塞に至る前段階の非常に軽い虚血であっても、記憶や運動に重要な海馬や小脳のブルキンエ細胞にアポトーシスが誘導されることが知られている。また、糖尿病態では、脳の神経細胞はよりダメージを受けやすい状況にあるとともに、その結果もたらされる身体的障害も重篤化しやすい。これらの根底にある共通の病因として、酸化ストレスが注目されている。糖尿病では、高血糖下での血管内皮細胞におけるAGEs（Advanced glycation end products：終末糖化産物）合成の際の活性酸素種（ROS）の発生、グルタチオン系などの酸化・還元調節機能の低下によるROSの消去能低下など、強い酸化ストレス状態が血管障害を引き起こし、梗塞による虚血状態がもたらされると考えられている。また、ラットの中大脳動脈を人為的に閉塞し一過性脳虚血を誘導すると、正常血糖ラットと比較し、糖尿病ラットでは著明に脳障害が増悪することが報告されている。このことから、糖尿病態では酸化ストレスによる神経細胞の脆弱性形

成メカニズムが存在すると推測され、糖尿病の中枢神経障害を予防・改善するために、抗酸化食品の摂取は有用であると考えられることから、すぐれた抗酸化作用をもつ食品を探索し、その有効性と安全性とを科学的に検証するという今回の研究を発想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病の中枢神経障害を予防・改善する優れた抗酸化作用をもつ食品を探索し、その有効性と安全性とを科学的に検証することである。また、糖尿病における中枢神経細胞の脆弱性形成メカニズムを明らかにし、抗酸化食品の有効性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 霊芝菌糸体培養培地抽出物の調製法

本研究に用いた霊芝菌糸体培養培地抽出物（MAK）は、野田食菌工業（株）において製造されたものであり、その調製法は次に示すとおりである。バガス（砂糖キビ搾汁残渣）と脱脂した米糠の混合固体培地にマンネンタケ菌糸体ペレットを接種し、子実体発生直前まで約3.5ヶ月間培養した後、培地を破碎し、60℃の温水で16時間抽出した。得られた抽出液を0.45 μmのメンブランにて濾過滅菌し、凍結乾燥したものをMAKとした。

(2) PC12細胞を用いた検討

神経成長因子（NGF）により分化させたPC12細胞にMAKを1時間添加し、その後MAKの存在下で100 μM過酸化水素（H₂O₂）処理を行い、酸化ストレスによって誘導されるネクローシスおよびアポトーシスに対するMAKの効果をMTT assay およびTUNEL染色により評価した。

(3) 低酸素脳虚血（H/I）モデルを用いた検討

ハロタン麻酔下でマウス（C57BL/6J）の右総頸動脈を二重結紮し、3時間後に低酸素ガス（8%O₂/92%N₂、35.5℃）を30分間負荷した。負荷後24時間の体内酸化ストレス度、神経症状、脳過酸化脂質含量、梗塞巣体積に対するMAK（1 g/kg）の単回（acute）および慢性（chronic：7日間）投与の影響を検討す

るとともに、ペナンブラ領域の一部である海馬 CA1 野および大脳皮質体性感覚野の神経細胞のアポトーシスに対する MAK の作用を組織化学的手法 (TUNEL 染色および Cleaved Caspase-3 の免疫染色) により検討した。

すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。

(4) 1 型糖尿病モデルマウスを用いた検討

マウス (ICR, ♂, 4 週齢) にストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内投与し、1 型糖尿病態マウスとして実験に用いた。正常血糖 (non-DM) および STZ マウスをさらに対照群と MAK 投与群の 2 群に分け、対照群には蒸留水を、MAK 群には MAK (1 g/kg) を 1 日 1 回、9 週間経口投与し、1 あるいは 2 週間毎に非絶食時下において尾静脈から採血し血糖値を測定した。

(5) STZ 糖尿病ラットの一過性脳虚血障害 (中大脳動脈閉塞/再灌流) モデルを用いた検討

STZ 糖尿病態ラットを用い、一過性脳虚血処置による脳障害に対する MAK の効果を検討した。non-DM および DM ラットに、MAK (1 g/kg) または蒸留水を 1 日 1 回 2 週間経口投与した後、体内の酸化ストレス度、脳組織中の過酸化脂質含量および抗酸化酵素 (カタラーゼ: CAT, スーパーオキシドジスムターゼ: SOD, グルタチオンペルオキシダーゼ: GPx) の活性を測定した。また、ラットに 2 時間の中大脳動脈閉塞術および 24 時間の再灌流 (MCAO/Re) 処置を行い、神経症状の評価および脳梗塞巣体積の測定を行った。さらに、脳組織サンプルを用いて炎症関連因子およびグルタミン酸トランスポーターの発現解析を行った。

4. 研究成果

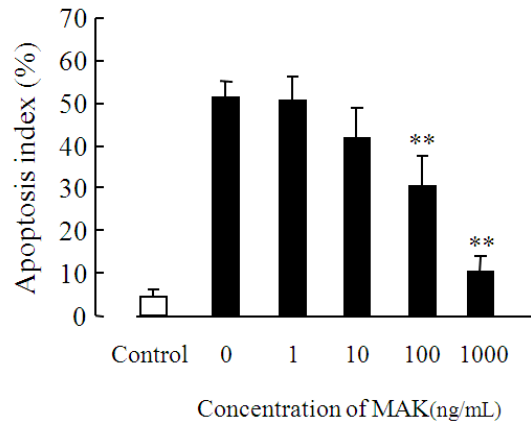
(1) 食品の抗酸化効果の測定と比較

抗酸化食品の探索および糖尿病態モデル動物における酸化ストレスおよび神経障害に対する抗酸化食品の改善効果の評価を計画した。まず、30 種類以上の天然物について抗酸化活性を測定し、霊芝菌子体培養培地抽出物 (MAK) が強い活性を有することを見出した。MAK は濃度依存的な O₂ 消去能および過酸化脂質産生抑制能を示し、過酸化脂質産生抑制能はビタミン C の約 2 倍であった。

(2) PC12 細胞における MAK の保護効果

神経成長因子 NGF により神経細胞に分化させた PC12 細胞を用いて、MTT assay を行った。PC12 細胞を 100 μM H₂O₂ で 1 時間処理することにより、酸化ストレスによる細胞死

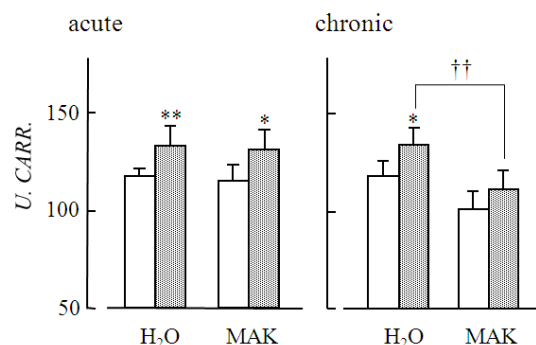
が引き起こされ、細胞生存率は 50.9±5.3% となった。一方、MAK を処理した PC12 細胞の生存率は濃度依存的 (100-10000 ng/mL) に上昇し、TUNEL 染色による解析では、MAK はアポトーシス陽性細胞数を濃度依存的に減少させ、100 ng/mL から有意なアポトーシス抑制効果を示した。



(3) 低酸素脳虚血マウスを用いた MAK の脳保護効果

① 低酸素脳虚血処置による酸化ストレスに対する MAK の抑制効果

蒸留水または MAK (1g/kg) を単回 (acute) あるいは 7 日間 (chronic) 経口投与したマウス各群において、血中ヒドロペルオキシド濃度を指標とした体内酸化ストレス度を d-ROMs テストにより測定した。蒸留水単回投与群では、H/I 処置前に比べ、H/I 処置 24 時間後の体内酸化ストレス度が有意に増大した。MAK 単回投与群においても同様の酸化ストレス度の変化が見られ、蒸留水投与群との差は認められなかった。これに対して、MAK を 7 日間経口投与した群では、H/I 処置による酸化ストレス度の増大が認められず、また、蒸留水投与群と比較し低酸素負荷 24 時間後の酸化ストレス度が有意に減少した。



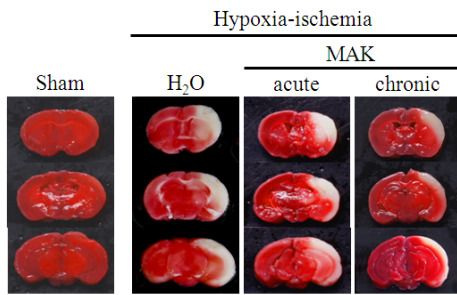
さらに、H/I 処置 24 時間後の脳組織中の過酸化脂質含量を測定したところ、MAK 単回投与群と蒸留水投与群との間に差はなかったが、MAK 慢性投与群では蒸留水投与群と

比較し有意な過酸化脂質含量の低下が認められた。

②低酸素脳虚血による脳梗塞巣形成に対する MAK の保護効果

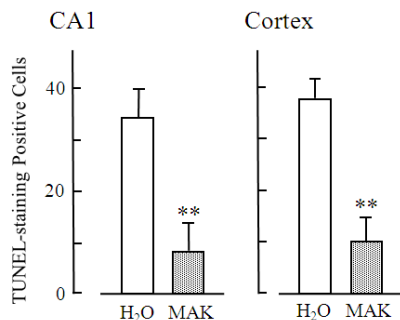
H/I 処置 24 時間後における MAK 単回投与群の神経症状スコアは、対照の蒸留水投与群との間に有意差はみられなかったが、MAK を 7 日間経口投与した群では、蒸留水投与群 (H₂O) と比較し、H/I 処置による神経症状の悪化が有意に抑制された。

次に、H/I 処置 24 時間後の摘出脳を TTC 染色し、梗塞巣体積を測定した。擬似手術のみを行った Sham 群の脳には梗塞は確認されなかったが、蒸留水投与群では、30 分間の H/I 処置により同側の皮質、線条体、および海馬の広範囲にわたって梗塞巣が形成され、その体積は 56.4±6.16%であった。MAK 単回投与群においても蒸留水投与群と同様の梗塞巣 (47.9±7.50%) がみられたが、MAK を慢性投与した群における梗塞巣の形成は皮質および線条体の一部分に局限していた。MAK 慢性投与群の梗塞巣体積は 31.7±9.9% であり、蒸留水投与群 (55.3±5.63%) と比較し有意な減少が認められた。



③低酸素脳虚血による脳細胞のアポトーシスに対する MAK の抑制効果

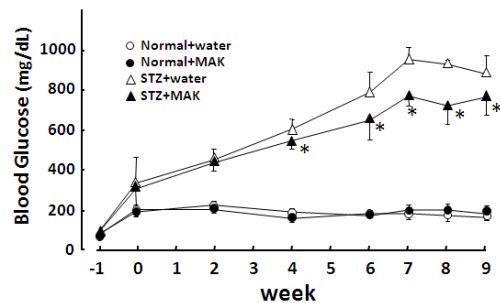
H/I によって誘発された神経細胞のアポトーシスに対する MAK の効果を組織化学的に検討するために、慢性投与群のマウス脳の冠状切片を用い、TUNEL 染色を行った。その結果、対照群では H/I 処置によりペナンプラ領域である海馬 CA1 および大脳皮質体性感覚野において多数の TUNEL 陽性細胞が認められたが、これと比較し、MAK を慢性投与した群では TUNEL 陽性細胞数が有意に減少した。



さらに、アポトーシスを促進するカスパーゼ系の活性化の指標である Cleaved Caspase-3 陽性細胞は、TUNEL 陽性細胞と類似の分布を示し、TUNEL 染色の結果と同様に MAK を投与した群では蒸留水投与群と比較し、陽性細胞数が有意に減少していることが確認された。

(4) MAK による糖尿病態改善効果

1 型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病マウスを用い、MAK の効果を検証した。MAK 投与群では対照群に比べ血糖値および血中酸化ストレス度の有意な低下が認められた。

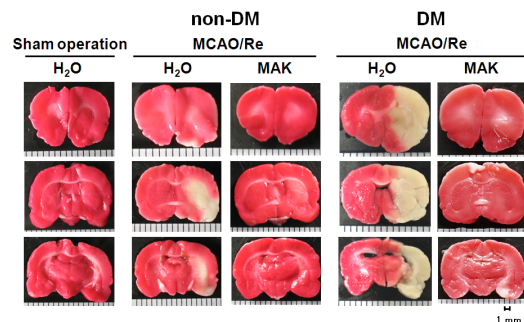


また、MAK は腎臓および肝臓の過酸化脂質含量および抗酸化酵素活性を正常血糖群と同レベルに維持した。2 型糖尿病他モデルマウス KKAY においても、同様の結果が得られた。

(5) 糖尿病態モデル動物の一過性脳虚血障害に対する MAK の保護効果

STZ 糖尿病態ラットを用い、中大脳動脈閉塞術/再灌流 (MCAO/Re) 処置による脳障害に対する MAK の効果について検討した。まず、STZ ラットでは体内の酸化ストレス度の上昇、脳組織中の過酸化脂質含量の増加および抗酸化酵素 (CAT, SOD, GPx) 活性の低下が見られたが、MAK を投与した STZ ラットでは、これらが正常レベルに維持されていた。

また、STZ ラットでは、正常血糖群と比較し、MCAO/Re 後の神経症状の悪化および脳梗塞巣体積の顕著な増大が認められたが、MAK の投与により、脳障害の増悪がほぼ完全に抑制された。



(6) 糖尿病態における一過性脳虚血障害の増悪メカニズムと MAK の効果

① 炎症関連因子の関与

糖尿病態における虚血性脳障害の増悪メカニズムを解明するため、炎症関連因子の遺伝子発現を解析したところ、糖尿病態ラットの皮質では、炎症関連因子である IL-1 β , TNF- α および脳浮腫に関与する matrix metalloproteinase-9 の mRNA 量が有意に増加していることが明らかとなった。また、糖尿病態群では虚血再灌流によってこれら炎症関連因子の発現が著しく増強された。さらに、糖尿病態の虚血再灌流後早期における炎症反応の増強に、DNA 結合蛋白質である HMGB1 が関与している可能性が示された。虚血処置前に MAK を経口投与したラットでは、これら炎症関連因子の発現が抑制されていた。以上の結果から、糖尿病ラットの脳組織では持続的高血糖下の酸化ストレスによって炎症反応が惹起されており、このことが一因となって虚血再灌流による障害の増悪が生じることが示唆された。MAK は、糖尿病態における酸化ストレスおよび炎症関連因子の発現を低下させることにより、強い脳保護効果を表すことが示された。

② グルタミン酸トランスポーターの関与

グルタミン酸トランスポーターについては、EAAT3 (EAAC1) の mRNA 発現量が糖尿病態マウスおよびラットの海馬、大脳皮質において 50%以下にまで有意に減少していることが明らかになった。EAAC1 はグルタミン酸だけでなく、生体内抗酸化物質グルタチオンの成分であるシステインの細胞内への輸送に関わっていることから、EAAC1 の減少が酸化ストレスの増大に寄与している可能性がある。EAAT1 および EAAT2 については、虚血再灌流後 3~12 時間の mRNA 発現量が糖尿病において正常の 50%以下にまで減少した。MAK の投与は *eaac1* 発現に対して顕著な影響を及ぼさなかった。今後、酸化ストレスによるグルタミン酸トランスポーター転写制御の分子メカニズムの検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Hypoglycemic effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in type 2 diabetic mice. Kamiuchi S, Hatta Y, Miyazato A, Okazaki M, Kawahara Y, Tanaka A, Shindou Y, Xuan M, Suzuki F, Iizuka H, Hibino Y, Jpn. J. Comp. Alter. Med. 7:

35-42 (2010)

- ② Antioxidant properties of a water-soluble extract from cluture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia and antidiabetic effects in streptozotocin-treated mice. Okazaki M, Tanaka A, Hatta Y, Kawahara Y, Kamiuchi S, Iwata N, Asano S., Suzuki F., Iizuka H., and Hibino Y. Japanese Journal of Complementary and Alternative Medicine, 5: 209-218 (2008)
- ③ Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after hypoxia-ischemia in mice. Okazaki M, Iwata N, Horiuchi S., Kamiuchi S, Suzuki F., Iizuka H., and Hibino Y. Japanese Journal of Complementary and Alternative Medicine, 5: 153-162 (2008)
- ④ Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic rats. Iwata, N, Okazaki, M, Kasahara, C., Kamiuchi, S, Suzuki, F., Iizuka, H, and Hibino Y. Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science, 61: 119-127 (2008)
- ⑤ Usui, T., Okazaki, M, Kamiuchi, S, Suzuki, F., Iizuka, H., and Hibino, Y. Inhibitory effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia on postprandial blood glucose elevation in mice and additional effect with α -glucosidase inhibitor. Joournal of Japanese Society of Nutrition and Food Science, 60, 249-255 (2007)

[学会発表] (計 25 件)

- ① Involvement of early release of HMGB1 in aggravation of neuronal damage after transient focal ischemia in diabetic rat brain: Iwata Naohiro, Okazaki Mari, Kasahara Chisato, Kamiuchi Shinya, Hibino Yasuhide, XXXVIth International Union of Physiological Sciences, July 30, 2009, Kyoto
- ② 2 型糖尿病態モデルマウスの低酸素脳虚血障害に対する霊芝菌糸体培養培地抽出物の脳保護効果: 玄美燕, 岡崎真理, 岩田直洋, 神内伸也, 鈴木史子, 飯塚博, 日比野康英: 第 130 年会 日本薬学会 2010 年 3 月 29 日 岡山
- ③ 糖尿病態ラットにおける一過性脳虚血後の炎症関連遺伝子の発現増強: 岩田直洋, 岡崎真理, 神内伸也, 日比野康英: 第 130 年会 日本薬学会 2010 年 3 月 30 日 岡山

- ④ 糖尿病態ラットの虚血性脳障害に対する
 霊芝菌糸体培養培地抽出物の脳保護作用メ
 カニズムの解明：中野理加，岡崎真理，岩
 田直洋，神内伸也，鈴木史子，飯塚博，日
 比野康英：第130年会 日本薬学会 2010年
 3月30日 岡山
- ⑤ 糖尿病態ラットにおける中大脳動脈閉塞
 /再灌流処置後の脳障害と霊芝菌糸体培養
 培地抽出物(MAK)の脳保護効果：笠原知里，
岡崎真理，岩田直洋，神内伸也，鈴木史子，
 飯塚博，日比野康英：第11回日本補完代
 替医療学会 2008年11月8日 横浜
- ⑥ 糖尿病態ラット脳におけるHMGB1の発現
 増強および一過性脳虚血後の細胞質移行の
 促進：岩田直洋，岡崎真理，笠原知里，神
 内伸也，日比野康英：第82回日本薬理学会
 年会 2009年3月17日 横浜
- ⑦ 2型糖尿病モデルマウスにおける霊芝菌
 糸体培養培地抽出物(MAK)の血糖上昇抑制
 作用：宮里朱音，神内伸也，岡崎真理，八
 田侑子，川原由紀子，田中愛子，鈴木史子，
 飯塚博，日比野康英：日本薬学会第129年
 会 2009年3月27日 京都
- ⑧ 糖尿病ラットにおける虚血再灌流誘発脳
 障害に関する経時的解析：笠原知里，岡崎
 真理，岩田直洋，神内伸也，日比野康英：
 日本薬学会第129年会 2009年3月28日
 京都
- ⑨ 糖尿病態ラットの一過性脳虚血における
 HIF-1 α およびRAGEの発現増強：岩田直洋，
岡崎真理，笠原知里，神内伸也，日比野康
 英：日本薬学会第129年会 2009年3月28
 日 京都
- ⑩ 糖尿病態ラットの一過性脳虚血による脳
 障害に対する霊芝菌糸体培養培地抽出物
 (MAK)の保護作用：岩田直洋，岡崎真理，
神内伸也，鈴木史子，飯塚博，日比野康英：
 第61回日本栄養・食糧学会，2007年5月
 20日 京都
- ⑪ マウス低酸素脳虚血障害に対する霊芝菌
 糸体培養培地抽出物(MAK)の保護作用：岡
 崎真理，岩田直洋，堀内重紀，神内伸也，
 鈴木史子，飯塚博，日比野康英：日本薬学
 会第128年会 2008年3月26日 横浜
- ⑫ 糖尿病モデルマウスにおける霊芝菌糸体
 培養培地抽出物(MAK)の血糖上昇抑制効果：
 八田侑子，岡崎真理，川原由紀子，田中愛
 子，神内伸也，鈴木史子，飯塚博，日比野
 康英：日本薬学会第128年会 2008年3月
 26日 横浜
- ⑬ 2型糖尿病モデル動物における糖負荷後
 の血糖上昇に対する霊芝菌糸体培養培地抽
 出物(MAK)の効果：川原由紀子，岡崎真理，
神内伸也，田中愛子，八田侑子，鈴木史子，
 飯塚博，日比野康英：日本薬学会第128年
 会 2008年3月26日 横浜
- ⑭ 霊芝菌糸体培養培地抽出物の抗酸化活性

とストレプトゾトシン糖尿病態マウスにお
 ける改善効果：田中愛子，岡崎真理，八田
 侑子，川原由紀子，神内伸也，鈴木史子，
 飯塚博，日比野康英：日本薬学会第128年
 会 2008年3月26日 横浜

⑮ 培養細胞および4血管閉塞脳虚血ラット
 を用いた椎茸菌糸体培養培地抽出物(LEM)
 の神経保護作用の評価：堀内重紀，岡崎真
 理，神内伸也，鈴木史子，飯塚博，日比野
 康英：日本薬学会第128年会 2008年3月
 27日 横浜

⑯ 糖尿病態ラットの一過性脳虚血による脳
 障害に対する霊芝菌糸体培養培地抽出物
 (MAK)の保護作用：岩田直洋，岡崎真理，
神内伸也，鈴木史子，飯塚博，日比野康英：
 日本薬学会第128年会 2008年3月26日
 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 真理 (OKAZAKI MARI)
 城西大学・薬学部・准教授
 研究者番号：50272901

(2) 研究分担者

日比野 康英 (HIBINO YASUhide)
 城西大学・薬学部・教授
 研究者番号：10189805

神内 伸也 (KAMIUCHI SHINYA)
 城西大学・薬学部・助教
 研究者番号：80433647

岩田 直洋 (IWATA NAOHIRO)
 城西大学・薬学部・助手
 研究者番号：50552759