

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790213

研究課題名（和文）

脳卒中後の糖代謝異常による疼痛発現機構の解明とその緩和を目指した基礎的研究

研究課題名（英文）

The development of mechanical hyperalgesia under cerebral ischemic stress and its alleviation

研究代表者

濱邊 和歌子 (Hamabe Wakako)

神戸学院大学薬学部・助教

研究者番号：30382328

研究成果の概要(和文)：

脳血管疾患ではその障害部位や程度に依存した麻痺や学習記憶障害などの合併症の発症が患者の QOL を低下させる。中でも「中枢性疼痛」はその有効な治療薬が少なく難治性であることから、新たな発症機序の解明と治療戦略の開発が望まれている。以前より研究代表者らは、脳血管障害による神経障害の発現機序において脳虚血ストレス負荷後の糖代謝異常がその引き金の一因となることを示してきた。よく知られるように、高血糖状態は神経機能に障害を与え疼痛を誘発することが知られる。そこで本研究では、脳虚血ストレス誘発性糖代謝異常の発現機序解明に取り組むとともに、それに引き続いて生じる可能性のある中枢性疼痛に着目し、脳卒中モデルマウスにおける一次知覚神経の感受性変容や痛覚閾値の変容について検討した。

動物は 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、脳卒中モデルは 2 時間の左中大脳動脈閉塞法 (MCAO) により作成した。梗塞巣形成は TTC 染色法、行動障害は neurological deficit score (NDS) を用いて評価した。インスリン負荷試験、グルコース負荷試験を用いて糖代謝異常の発現について解析し、血中インスリン濃度、血中アディポネクチン濃度は ELISA 法により測定した。さらに、脳、肝臓や骨格筋における AMPK の活性変容は western blot 法により解析した。マウス後肢における知覚閾値の測定には、neurometer を、痛覚閾値の測定には、von Frey filament を用いた。

MCAO 1 および 3 日後において、偽手術 (sham) 群と比較して、左脳領域に明らかな梗塞巣の形成が確認され、有意な行動障害の発現も観察された。それに先行して、一過性の有意な空腹時血糖値の上昇が認められ、同時に糖負荷後血糖値の上昇、血中アディポネクチン濃度の低下、インスリン感受性の低下が観察された。このとき、肝臓における AMPK は何ら変化を示さなかった。一方、AMPK の活性化剤による肝臓 AMPK の活性化条件下では、虚血ストレス誘発性の糖代謝異常の発現は完全に消失し、同時に神経障害の発現も有意に抑制された。

一次知覚神経の応答性解析では、A δ および A β 線維の刺激に対する左右両側の後肢における知覚閾値に、MCAO 前と比較して MCAO 3 日後で有意な低下が観察された。その一方で、C 線維応答にはなんら変化は認められなかった。痛覚閾値の測定では、MCAO 1 日後において虚血側であ

る左後肢に痛覚閾値の低下が観察され、3 日後では有意であった。一方、虚血反対側である右後肢では有意な差は観察されなかった。また sham 群では、両側ともに痛覚閾値に変化は認められなかった。さらに、MCAO 3 日後に認められた左後肢における痛覚閾値の低下は、morphine 投与により抑制された。

以上の知見より、本 MCAO モデルにおいて発現する糖代謝異常には、肝臓における AMPK の変動は関与しないことが示唆された。興味深いことに、さらなる肝臓 AMPK の活性化は虚血ストレス誘発性糖代謝異常の発現を有意に抑制できることも明らかとなった。この糖代謝異常の発現と同時に、虚血ストレス負荷により、一次知覚神経応答において両側性の過敏反応が観察された。この応答変化は無髄 C 線維よりもむしろ、有髄 A 線維の感受性増大に起因するものであると推測された。さらに、左後肢では機械的刺激に対する痛覚過敏反応が観察され、このモデル動物ではオピオイドに対する感受性が保たれていることが示唆された。

研究成果の概要(英文):

Cerebral ischemia is a leading cause of death and disability in the world. Furthermore, it is associated with severe complications such as memory disturbance, palsy and spasticity. Central post-stroke pain (CPSP) is also known as one of the ischemic complications and is clinically characterized by spontaneous pain, attacks of allodynia and dysesthesia, while the detailed mechanism has not been understood yet. Furthermore, there are few reports about CPSP in animal model. Hitherto, we have demonstrated that the glucose intolerance could be induced by ischemic stress *per se*, and normalization of blood glucose during the early phase of cerebral stroke decreased the neuronal dysfunction. Since hyperglycemia is known as one of the triggers of hyperalgesia or pain, we focused on the mechanism of development of post-ischemic glucose intolerance and its relationship with the development of CPSP using cerebral ischemic model mice.

Male ddY mice were subjected to 2 hr of left middle cerebral artery occlusion (MCAO). The development of neuronal damage was estimated by histological- and behavioral-analysis. The development of glucose intolerance was analyzed by measurement of blood glucose levels and serum insulin/adiponectin levels, and by insulin tolerance test and oral glucose tolerance test. On the other hand, the activities of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), a known serine/threonine kinase that plays a key role in energy homeostasis, were analyzed by western blot. Furthermore, alterations of sensitivity of primary afferent neurons were measured by neurometer. Paw withdrawal threshold (PWT) of hind paw was measured by von Frey filament test.

The development of infarction and behavioral abnormality was clearly observed on day 1 and 3 after MCAO that was preceded by the significant elevation of fasting blood glucose levels. In the liver tissue, the activities of AMPK did not show any alterations. On the other hand, AMPK activating agents completely suppressed the development of glucose intolerance and of neuronal damage after MCAO. In the estimation of peripheral neuronal activity, sensitivity of A δ and A β fibers was significantly increased on day 3 after MCAO, while sensitivity of C fiber did not altered at all. In addition, the PWT

in left hind paw was significantly decreased on day 3 after MCAO when compared with day 0, while that in right hind paw showed no significant difference. Subcutaneous administered morphine blocked the decrease of PWT in left hind paw.

In this study, we found that the development of post-ischemic glucose intolerance was not mediated by such alterations as down-regulation of hepatic AMPK. On the other hand, over activation of hepatic AMPK may accelerate the glucose metabolism after ischemic stress and ameliorate the neuronal damage. At the same time, we detected the development of hyperalgesia, one of the known symptoms of CPSP, in our cerebral ischemic model mice. This may be due to myelinated A fiber specific hypersensitivity under ischemic stress. Furthermore, the responsiveness to opioidergic system might be conserved in this ischemic stress-induced pain model.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2400000	720000	3120000
2009年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・薬理学一般

キーワード:疼痛, 脳卒中, 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は我が国における主要な死因であり、昨今の医療技術の進歩により死亡率は低下傾向にあるものの、発症そのものは依然増加傾向にある事から問題視されている。脳血管疾患の発症では、その障害部位や程度に依存して麻痺や痴呆が引き起こされる。この結果多くの患者が寝たきりなどの「要介護者」として認知され、患者自身のみならず介護者を含めた QOL の低下を引き起こす事になる。さらに慢性化により、血栓症を引き起こす事が知られており、これに対する有効な治療法は確立されていない。このような脳血管疾患後の血栓症では、発症以前に比べ血栓のできるリスクが増す事が経験的に理解されており、患者の多くが血栓溶解剤や血液凝固抑制剤を用いた再発の予防を行っていく。しかしながら多くの場合、この治療のみでは十分とは言えず、その後、初発部位以外の脳領域の傷害が誘導され、疼痛、うつ、痙攣発作と言った合併症を引き起こす事になる。この様な合併症

は血栓症との関連性が唱われてきたものの、その要因あるいは発現のメカニズムは十分に理解されていない。その一方で、糖尿病などの生活習慣病との関連が指摘されており、従来から糖尿病など高血糖状態の持続が、脳血管障害および脳神経傷害を引き起こすことが数多く報告されてきた。我々もこれまでの検討において、高血糖状態では脳血管障害が増大することを明らかにしてきた。さらに臨床では糖尿病の既往歴のない人でも脳卒中後に耐糖能障害を発症することが知られているが、見落とされる場合が多い。こうした耐糖能障害はそのまま放置することにより、脳血管障害を増悪させることが予想される。実際に、脳卒中後の厳密な血糖コントロールにより死亡率が軽減することや、梗塞巣形成を抑制することが報告されている。したがって、脳卒中後の糖代謝異常の解明は非常に重要と考えられる。しかしながら現在、脳卒中後の糖代謝異常の発症メカニズムは解明されておらず、その治療が予後へ及ぼす影響についてはまったく

明らかにされていない。加えて、近年、「緩和ケア医療」の充実化が求められ、がん患者への緩和ケアの治療方法が確立され始めているが、脳卒中後におきる“しびれ”などの疼痛に対する治療法はまだ確立していない。こうした背景から、本研究では、脳卒中後糖代謝異常と疼痛との関連について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、脳卒中後糖代謝異常と疼痛との関連について検討することを最終目標とし、脳卒中後における糖代謝異常のメカニズムを明らかにするとともに、予後の改善へむけた予防法、治療法の開発のための基盤となる基礎研究を行った。具体的には 1. 脳卒中後の糖代謝異常の分子基盤解明 2. 糖代謝異常に伴う慢性疼痛分子基盤の解明を行うこととした。

3. 研究の方法

動物として 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、脳卒中モデルは 2 時間の左中大脳動脈閉塞法(MCAO)により作成した。梗塞巣形成は TTC 染色法、行動障害は neurological deficit score (NDS) を用いて評価した。インスリン負荷試験、グルコース負荷試験を用いて糖代謝異常の発現について解析し、血中インスリン濃度、血中アディポネクチン濃度は ELISA 法により測定した。さらに、脳、肝臓や骨格筋における AMPK の活性変容は western blot 法により解析した。マウス後肢における知覚閾値の測定には、neurometer を、痛覚閾値の測定には、von Frey filament を用いた。

4. 研究成果

MCAO 1 および 3 日後において、偽手術(sham) 群と比較して、左脳領域に明らかな梗塞巣の形成が確認され、有意な行動障害の発現も観察された。それに先行して、一過性の有意な空腹時血糖値の上昇が認められ、同時に糖負荷後血糖値の上昇、血中アディポネクチン濃度の低下、インスリン感受性の低下が観察された(Harada et al., 2009)。このとき、肝臓における AMPK は何ら変化を示さなかった。一方、AMPK の活性化剤による肝臓 AMPK の活性化条件下では、虚血ストレス誘発性の糖代謝異常の発現は完全に消失した(投稿中)。

一次知覚神経の応答性解析では、A δ および A β 線維の刺激に対する左右両側の後肢における知覚閾値に、MCAO 前と比較して MCAO 3 日後で有意な低下が観察された。その一方で、C 線維応答にはなんら変化は認められなかった。痛覚閾値の測定では、MCAO 1 日後において虚血側である左後肢に痛覚閾値の低下が観察され、3 日後では有意であった。一方、虚血反対側である右後肢では有意な差は観察されな

かった。また sham 群では、両側ともに痛覚閾値に変化は認められなかった。さらに、MCAO 3 日後に認められた左後肢における痛覚閾値の低下は、morphine 投与により抑制された(未発表データ)。

以上の知見より、本 MCAO モデルにおいて発現する糖代謝異常には、肝臓における AMPK の変動は関与しないことが示唆された。興味深いことに、さらなる肝臓 AMPK の活性化は虚血ストレス誘発性糖代謝異常の発現を有意に抑制できることも明らかとなった。この糖代謝異常の発現と同時に、虚血ストレス負荷により、一次知覚神経応答において両側性の過敏反応が観察された。この応答変化は無髄 C 線維よりもむしろ、有髄 A 線維の感受性増大に起因するものであると推測された。さらに、左後肢では機械的刺激に対する痛覚過敏反応が観察され、この痛覚過敏はオピオイドに感受性があることが示唆された。

まとめとして、本研究により、世界に先駆けて脳虚血ストレス誘発性糖代謝異常の発現とそれに引き続く疼痛発現の機序解明に取り組むことができた。とくに一次知覚神経線維特異的な感受性変化を捉えることができた点は意義が高い。

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 3 件)

1. 原田慎一、藤田(濱邊)和歌子、神谷浩平、佐武紀子、徳山尚吾、*Morinda citrifolia* による虚血性神経障害抑制作用における血糖値制御の関与, YAKUGAKU ZASSHI 130 (5) 707-712, 2010(査読無し)
2. Shinichi Harada, Wakako Fujita Hamabe, Kanako Shichi, Shogo Tokuyama, The development of glucose intolerance after focal cerebral ischemia participates in subsequent neuronal damage. Brain Res. 1279, 174-181, 2009.(査読有り)
3. Shinichi Harada, Wakako Hamabe, Kohei Kamiya, Toshiko Satake, Junichiro Yamamoto, Shogo Tokuyama, Preventive effect of *Morinda citrifolia* fruit juice on neuronal damage induced by focal ischemia., Biol. Pharm. Bull., 32, 405-409, 2009(査読有り)

(学会発表)(計 10 件)

1. 高見一徳、藤田(濱邊)和歌子、志智加奈子、原田 慎一、徳山 尚吾、脳卒中モデルマウスにおける機械的刺激に対する痛覚過敏の発現, 第 130 回日本薬学会年会, 2010 年 3 月 28-30 日, 岡山

2. 原田慎一、藤田(濱邊)和歌子、徳山尚吾、脳および末梢組織におけるAMPKの活性化が虚血性神経障害へ及ぼす影響、第19回神経行動薬理若手研究者の集い、2010年3月28-30日、岡山
3. Shinichi Harada, Wakako Fujita (Hamabe), Shogo Tokuyama, Distinct roles of central and peripheral AMPK on ischemic neuronal damage, 第84回日本薬理学会年会, 2010年3月16-18日, 大阪
4. Shinichi Harada, Wakako Fujita (Hamabe), Kanako Shichi, Shogo Tokuyama, Ischemic stress-induced glucose intolerance as a trigger for aggravation of neuronal damage, The 39th SFN meeting 2009, 2009年10月19-21日, Chicago
5. Shinichi Harada, Wakako Hamabe, Shogo Tokuyama, Impairment of insulin response under cerebral ischemic stress, The 36th international congress of physiological Sciences, 2009年7月27日~8月1日, Kyoto
6. 原田慎一、藤田(濱邊)和歌子、徳山尚吾、メトホルミンによる血糖値制御を介した虚血性神経障害保護効果、第115回日本薬理学会近畿部会, 2009年6月26日, 金沢
7. 原田慎一、濱邊和歌子、徳山尚吾、脳虚血ストレスによるインスリン分泌変動による耐糖能異常の発現、第18回神経行動薬理若手研究者の集い, 2009年3月19日, 横浜
8. Shinichi Harada, Wakako Hamabe, Keiko Onishi, Saumi Hasegawa, Shogo Tokuyama, Cerebral ischemic stress induces the reduction of plasma insulin and adiponectin levels which leads to glucose intolerance, 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月28-30日, 横浜
9. 原田慎一、濱邊和歌子、志智加奈子、神谷浩平、徳山尚吾、脳虚血性耐糖能異常の改善による神経障害の抑制と回復、第19回霧島神経薬理フォーラム, 2008年8月29-31日, 大分
10. 原田慎一、濱邊和歌子、徳山尚吾、虚血誘導性耐糖能障害の抑制による神経保護効果、第113回日本薬理学会近畿部会, 2008年6月20日, 岡山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱邊 和歌子 (Hamabe Wakako)
神戸学院大学薬学部・助教
研究者番号: 30382328

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: