

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 - 2012

課題番号：22591720

研究課題名：高血糖の脳虚血白質傷害における最終糖化産物受容体の関与とその治療に関する研究

研究課題名：Involvement of receptor for advanced glycation end products for hyperglycemia-induced aggravation of white matter damage by cerebral ischemia

研究代表者：中尾慎一（NAKAO SHINICHI）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号（10207714）

## 研究成果の概要（和文）：

急性糖負荷によるラット急性高血糖モデル（2g/kg のブドウ糖液を腹腔内投与）を用いて、5 分間の心肺停止・蘇生を行い 2 週間後に脳スライスを作成した。心肺停止・蘇生により 2 週間後までに、海馬 CA1 領域にミクログリアの活性化、神経細胞の傷害、神経軸索の傷害と最終糖化産物受容体（RAGE：receptor for advanced glycation end products）の発現が認められた。が、非糖負荷群との有意差は確認できなかった。また神経学的機能検査でも、シャム手術群や非糖負荷群と糖負荷群との間に差異は認められなかった。その理由として、十分な標本数でないことや糖負荷をしなくても心肺停止・蘇生のみで血糖がかなり上がることで、などが考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Global cerebral ischemia was induced by 5 min of cardiac arrest and resuscitation (CAR) in male rats with or without acute glucose administration (2g/kg i. p.). Two weeks after the CAR, the brain was extracted and brain slices were prepared. Microglial activation, neuronal and axonal injuries, and RAGE (receptor for advanced glycation end products) expression were detected in the hippocampal CA1 region in both groups, i.e., a glucose-administered group and a vehicle-administered group, but the statistically significant differences of those were not detected between the two groups. Neurologic deficit scores, which can detect functional damage in the brain, were similar in the both groups. I assume that the reason is due to the fact that sample size was not enough or that CAR alone caused rather hyperglycemia.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔科学

キーワード：全脳虚血、高血糖、脳白質、活性酸素、

糖化最終産物、RAGE (receptor for advanced glycation end products)

## 1. 研究開始当初の背景

脳白質は脳神経機能に深く関与しているため、脳虚血において、全脳保護（神経細胞体を主体とする脳灰白質のみならず脳白質傷害に対しても保護を行う）の重要性が指摘されている。白質は神経軸索とオリゴデンドロサイトを主とするグリアから構成されていて脂質に富み、過酸化脂質産生の危険性があり、活性酸素による傷害に対し灰白質同様脆弱である可能性がある（Eur J Pharmacol 1999; 375: 41-50）。われわれは、すでにラット全脳虚血モデル（心肺停止・蘇生モデル）を用いて、心肺蘇生後1週間でミクログリアの活性化と海馬CA1錐体細胞の細胞死が認められること、2週間後には1週間後では認められなかったCA1や脳梁などの神経軸索の顕著な傷害が生じること、これらの傷害を抗酸化薬エダラボンが、虚血・再灌流6時間後投与でもコントロールレベルまで抑制することを報告した（Brain Res 2009; 1279: 139-46）。

高血糖は、粥状硬化など全身血管の機能的・構造的変化を引き起こす慢性の高血糖状態（糖尿病）のみならず、急性の高血糖状態でも、脳虚血による神経傷害を増悪させることが報告されている（J Cereb Blood Flow Metab 1999; 19: 288-97）。この理由として、高血糖状態は、活性酸素産生経路の活性化のみならずスーパーオキシドジスムターゼなどの活性酸素消去経路が糖化により低下した、酸化ストレス亢進状態であると考えられている。活性酸素産生系の一つとして、過剰の糖によりタンパクやアミノ酸が非酵素的に糖化された最終糖化産物（advanced glycation end product: AGE）とその受容体（receptor for AGE: RAGE）、さらにはRAGEの他のリガンドであるHMGB1（high mobility group box 1）の深い関与が指摘されている。AGEsは細胞外マトリックス構成分子と架橋形成による不可逆的細胞構造変化を引き起こすと同時に、RAGEとの結合により細胞内シグナルを動かし、NF- $\kappa$ Bを活性化し、炎症性サイトカインや活性酸素の産生分泌を亢進し細胞傷害へと導く。HMGB1もいわゆるアラミンの一種であり、AGEにより産生・分泌が増強され炎症性サイトカインとして働き細胞傷害を促す。

実際糖尿病患者では、脳梗塞などの局所脳虚血および心肺停止・蘇生という全脳虚血後の脳傷害が、それ以外の患者に比べて重篤であることが認識されているが、高血糖の直接の影響、脳白質に対する影響は調べられていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、高血糖状態において脳虚

血時の脳傷害増悪作用のメカニズムを調べるとともに、その傷害を、神経細胞体（灰白質）と神経軸索（白質）傷害に分けて調べることである。実際には、急性および慢性の高血糖（糖尿病）状態を作成し、全脳虚血（心肺停止・蘇生）では神経細胞体を主体とする灰白質のみならず神経軸索を主体とする広義の白質病変も増悪するか否かを調べ、その増悪機序に活性酸素やRAGEおよびHMGB1の関与が認められるかどうかを調べることである。

## 3. 研究の方法

ラット慢性（糖尿病）・急性高血糖モデルを用いて、心肺停止・蘇生による全脳虚血一定期間後に脳スライスを作成し、神経細胞と神経軸索の傷害程度、傷害部位におけるRAGEsの発現やミクログリアの活性化、さらには脳神経機能をコントロール（正常血糖ラット）と比較した。また、高血糖および非高血糖のシャム手術群（手術は行うが心肺停止はしない）も作成した。

### \*慢性高血糖ラットモデル作成

雄ウィスターラット（250-300 g）を用いた。高血糖ラットはすい臓 $\beta$ 細胞を破壊するストレプトゾシン 50 mg/kgを皮下投与し作成した。毎日血糖変化を観察し、投与一週間後に高血糖ラットとして使用した。正常血糖ラットはストレプトゾシンの代わりに生理的食塩水を投与した。

### \*急性高血糖ラットモデル作成

雄ウィスターラット（250-300 g）を用いて、心肺停止導入1時間前に2g/kgのブドウ糖液を腹腔内へ投与した。シャム群では人工呼吸導入後に同量のブドウ糖を負荷した。

### \*ラット心肺停止モデル

糖非負荷シャム手術群、糖非負荷心肺停止蘇生群、糖負荷シャム手術群および糖負荷心肺停止蘇生群の4群に分けた。心肺停止・蘇生モデルは、イソフルラン麻酔下に気管内挿管し人工呼吸に乗せ、尾静脈・大腿動脈にカニューレシオンを行った。ベクロニウム（1 mg/kg 静注）投与し、人工呼吸停止とエスマロール（6 mg）投与により一過性に心臓を停止させた。5分後に100%酸素換気し、ヘパリン、重炭酸、エピネフリンの混合液を注入し心拍を再開させた（Kubo & Nakao, et al., Brain Res 2009; 1279: 139-46）。心肺停止後日々の体重変化および、手術2週間後に神経学的機能検査（Neurologic deficit scoring）を行った後に過量の麻酔薬を投与し脳を取り出し脳スライス作成を行った。灰白質（神経細胞体）傷害の評価としてクレシ

ルバイオレット染色もしくは Klüver-Barrera 染色、神経軸索病変は  $\beta$  amyloid precursor protein ( $\beta$ -APP) の免疫組織染色で観察した。さらには、ミクログリア (Iba1) の活性化と RAGE 発現 (抗 RAGE 抗体使用) の観察を行った。

\* 神経学的機能検査 (Neurologic deficit scoring)

5種類の検査項目:

全般 (意識、呼吸)

脳神経 (嗅神経、視覚、角膜反射、ほおひげ運動、聴覚)

運動 (四肢と尾)

感覚 (四肢と尾)

共同性

0 から 500 までのスコアを付け、異常の全くない 500 点が最高点である。

#### 4. 研究成果

##### (1) 慢性高血糖モデル

慢性糖尿病モデルでは、1週間後に有意に血糖が上昇するとともに有意な体重減少が認められた。この段階で約2割のラットが死亡した。さらに、心肺停止後に蘇生できるラットは非常に少なく、蘇生成功ラットの多くもほとんどが数日以内に死亡したため、このモデルを使つての研究を断念した。この結果より、すい臓  $\beta$  細胞を完全に破壊する糖尿病モデルでは、インスリン治療を行わない限り、そのみで早期に致死性であるばかりでなく、心肺停止に至った場合には蘇生率は非常に低く、いったん蘇生できたとしても生存はほぼ不可能であることが確認できた。

##### (2) 急性高血糖モデル

術前の体重変化は4群間で差は無く、心肺停止・蘇生後も有意な体重差はなかった。摂食量にも差は無かった。血糖値も、ブドウ糖負荷前はすべての群で大きな差は無かった。非糖負荷シャム手術群では血糖値平均 106 g/dl、糖負荷シャム群では糖負荷前血糖値平均 161 g/dl から 30 分後に 393 g/dl へ上昇、非糖負荷心肺停止・蘇生群では血糖値平均 150 g/dl から蘇生後 270 g/dl へ、糖負荷心肺停止・蘇生群では糖負荷前血糖値平均 101 g/dl から 273 g/dl、心肺停止後 361 g/dl へ上昇していた。以上の結果より、急性の糖負荷で血糖値の有意で顕著な上昇が認められることが確認できたとともに、心肺停止・蘇生というストレスでも有意な血糖値の上昇が認められることが示された。

##### (3) 神経学的検査

本研究で行った neurologic deficit scoring では各群に差は認めず、すべての

群でほぼ満点 (500 点) 近くであった。すなわち、高血糖・非高血糖心肺停止・蘇生群でも神経学的スコアの低下がほとんどなかったことによる。この検査は海馬 CA1 障害を調べるためのものと言われているが、感度が悪いのかもしれない。

##### (4) 組織検査

クレシルバイオレット染色もしくは Klüver-Barrera 染色により、心肺停止・蘇生ラットのみで 2 週間後に海馬 CA1 領域の錐体細胞傷害が認められた。糖負荷群の方が非負荷群より傷害の度合いは強いように思われたが、有意差は得られていない。

2 週間後には心肺停止・蘇生ラットのみでミクログリアの活性化が CA1 領域に認められ、これも糖負荷群の方が活性化が強い傾向があったが有意差は得られていない。

神経軸索傷害を表す  $\beta$  APP 発現は、心肺停止・蘇生群のみで CA1 領域の海馬放射層などに認められたが、糖負荷群と非糖負荷群との有意差は認められなかった。

RAGE 発現も、脳虚血・蘇生群で CA1 領域に少量認められたが、糖負荷群と非糖負荷群の比較はできなかった。

以上、すい臓  $\beta$  細胞を破壊する糖尿病ラットでは、そのみですでに致死性であり、再現性良く心肺停止・蘇生モデルを作成することはできないことが分かった。2g/kg のブドウ糖液を腹腔内へ投与する急性高血糖モデルで、血糖値の有意な上昇が得られることが確認できたが、心肺停止・蘇生というストレスだけでも有意な血糖上昇が認められることが分かった。また、心肺停止・蘇生によりミクログリアが活性化され、海馬 CA1 錐体細胞傷害と軸索傷害が引き起こされた。その際に RAGE の発現も認められた。が、高血糖そのものによる細胞傷害・軸索傷害の増悪やミクログリア活性化および RAGE 発現の増加については今後の検討課題となった。これは、各群の標本数が十分でなかったことと、心肺停止・蘇生のみで糖負荷をしなくても有意な血糖値上昇が起こるためかもしれない。

#### 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 4 件)

- ① 中尾慎一、脳虚血における脳白質傷害、近畿大医誌、2011; 36: 3-7、査読有
- ② 中尾慎一、脳虚血における脳白質傷害と高血糖、臨床麻酔、2011; 35: 775-781、査読有

- ③ Iwamoto T, Takasugi Y, Higashino H, Ito H, Koga Y, Nakao S. Antinociceptive action of carbamazepine on thermal hypersensitive pain at spinal level in a rat model of adjuvant-induced chronic inflammation. J Anesth 2011; 25: 78-86、査読有
- ④ Nakao S, Hatano K, Sumi C, Sakamoto S, Masuzawa M, Ikeda S, Shingu K. Sevoflurane causes greater QTc interval prolongation in elderly patients than in younger patients. Anesth Analg 2010; 110: 775-779、査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中尾慎一、予期せぬ術中致死的不整脈—不整脈の原因と治療法を知ろう！(ブルガダ症候群、QT延長症候群、冠動脈攣縮)、日本臨床麻酔学会第32回大会、2012年11月1日、郡山
- ② 中尾慎一、高血糖はなぜ健康に悪いのか？(脳虚血傷害増悪を中心に、終末糖化産物や high-mobility group box 1 (HMGB1)、そしてその受容体 RAGE の関与、第58回日本麻酔科学会関西支部学術集会、2012年9月1日、大阪
- ③ 中尾慎一、高齢者の泌尿器ガン手術—麻酔科医の視点から—、第39回尿路悪性腫瘍研究会、2012年7月21日、東京
- ④ Nakao S. Edaravone, a radical scavenger, suppresses microglial activation and consequently inhibits perikaryal and axonal damage following global cerebral ischemia induced by cardiac arrest and resuscitation in rats. 24th ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) Annual Congress, 2011年10月4日、Berlin,

Germany

[図書] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中尾 慎一 (NAKAO SHINICHI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10207714