

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16533

研究課題名(和文)脳梗塞治療に対するorexin-Aの中枢-末梢臓器間連関機構を介した役割

研究課題名(英文)Role of orexin-A for cerebral stroke through the communication system between brain and peripheral tissues

研究代表者

原田 慎一 (Harada, Shinichi)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：60633443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血ストレス負荷後の肝臓における insulin 感受性の低下を介した糖新生の亢進による血糖値上昇が、orexin-A の視床下部内投与によって抑制されることが明らかとなった。さらに、これらの作用が、肝臓枝迷走神経の切除によって有意に肝臓に対する効果が消失したことから、orexin-A による中枢領域(視床下部)から末梢組織へのシグナル伝達に延髄から投射している迷走神経が関与していることが示唆された。また、脳虚血の肝臓における炎症性サイトカインの誘導は、肝臓での糖代謝異常の発現に関与し、それは、視床下部のorexin-A による迷走神経の活性化によって制御できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have reported that hypothalamic orexin-A-induced activation of vagus nerve recovered the development of post-ischemic glucose intolerance and mediates a neuroprotective effect. The aim of this study was to determine the involvement of orexin-A and vagus nerve on the changes in cerebral ischemia-induced inflammatory signaling. Male ddY mice were subjected to 2 hr of middle cerebral artery occlusion (MCAO). Intrahypothalamic OXA (5 pmol/mouse) administration significantly suppressed the development of post-ischemic glucose intolerance on day 1 after MCAO. In the liver, MCAO-induced increase in TNF- α , IL-1 β , c-Jun N-terminal kinase and serine-phosphorylated insulin receptor substrate on day 1 was recovered to control levels by OXA, and which was reversed by hepatic vagotomy. These results suggest that hypothalamic orexin-A-induced activation of vagus nerve may play an important role in the regulation of post-ischemic changes in hepatic inflammatory signaling.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：脳虚血 耐糖能異常 orexin-A 迷走神経 炎症性サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の主要な死因の一つである脳卒中は、死亡原因であるだけでなく、麻痺や記憶障害など重篤な後遺症の発症が問題とされている。加えて、高齢化に伴った要介護者の増大の原因疾患の第1位としても知られ、医療費の高騰という経済的側面からも脳卒中に対する治療ならびに機能予後の改善は重要な社会的課題とされている。とくに外科的治療以外に有効な治療薬の少ない現在において、治療ウインドウの長い薬剤や、新たな治療戦略の開発は急務の課題とされている。これまでに、本申請者は、脳卒中の新規治療戦略の開発という観点から、脳虚血ストレス誘導性の耐糖能異常が神経障害を悪化させることを明らかとしてきた。さらに、この耐糖能異常の発現には、脳虚血ストレス負荷後の肝臓におけるインスリン感受性の低下が関与していることを見出してきた (Brain Res., 2009; J. Pharmacol. Sci., 2011; J. Pharmacol. Sci., 2012)。

最近、糖代謝制御は、肝臓を含む個々の末梢臓器における制御のみではなく、視床下部を介した中枢末梢臓器間連関による神経支配を受けることが注目されている。加えて、近年の創薬研究においては、安全性および治療後の高いQOLを可能とする治療戦略の開発を目的に、内因性生理活性ペプチドを用いたトランスレショナルリサーチと画期的な治療法の確立が注目されている。本申請者は、まず脳虚血後の糖代謝異常発現機序の一つとして、視床下部を介した中枢末梢臓器間連関に着目して、脳虚血ストレス負荷が中枢末梢臓器間連関に及ぼす影響ならびに、それが神経障害の発現に及ぼす影響について、視床下部から産生される神経ペプチドであり、中枢末梢臓器間連関の主要な実行分子をして注目されている orexin-A の関与について検討してきた。これまでに本申請者は、orexin-A やそれと同じく中枢末梢臓器間連関を担う因子の一つである brain-derived neurotrophic factor を脳室内または視床下部内局所投与することによって、肝臓や骨格筋におけるインスリンシグナル系の賦活化を介し、脳虚血後の血糖値上昇が抑制されることで、神経障害の発現が抑制される知見を得てきている。

2. 研究の目的

本研究では、脳卒中の新規治療戦略の開発という観点から、中枢神経系に影響を及ぼす中枢末梢臓器間連関に着目して、脳虚血ストレス負荷が中枢末梢臓器間連関に及ぼす影響、ならびにそれが神経障害の発現に及ぼす影響について、特に迷走神経および炎症性サイトカインに注目した検討を行った。

3. 研究の方法

5週齢の ddY 系雄性マウスを用い、局所脳虚血モデルは、2時間の中大脳動脈閉塞法 (MCAO)、vagusotomy モデルは、肝臓枝迷走神経を切除することによって作成した。OXA (5 pmol/mouse) は、MCAO 直後に単回視床下部内局所投与した。中枢移行性のないムスカリン受容体拮抗薬である N-ブチルスコポラミン (10 mg/kg) は、OXA 投与30分前に腹腔内投与した。神経障害発現は、梗塞巣形成、行動障害、ならびに学習・記憶障害を評価した。MCAO 後の血糖値変化として空腹時血糖値 (FBG) を測定し、タンパク質発現の変化は western blot 法によって、mRNA 量は qRT-PCR 法によって解析した。

4. 研究成果

1. Orexin-A による脳虚血後の糖代謝異常および神経障害発現の抑制作用に対する迷走神経の関与

MCAO 1日後において、FBG は、sham 群に比較して有意な増加が認められた。さらに MCAO 3日後において、梗塞巣形成、行動異常および学習記憶障害が有意に生じた。さらに、FBG が増加していると同時に、肝臓における InsR および p-InsR の発現は、sham 群に比較し、有意な減少を示し、一方糖新生関連酵素の PEPCK および G6Pase の発現は、sham 群に比較して有意な上昇を示した。これらの発現変化は、orexin-A の視床下部内局所投与によって有意に抑制された。さらに、この orexin-A による抑制作用は、N-ブチルスコポラミンの投与または vagotomy によって有意に消失した。すなわち、脳虚血ストレス負荷後早期に、肝臓における insulin 感受性の低下を介した糖新生の亢進による血糖値上昇が、orexin-A の視床下部内投与によって抑制されることが明らかとなった。すなわち、視床下部における orexin-A は末梢組織における insulin 感受性の改善に重要な役割を担っていると考えられる。さらに、これらの作用が、肝臓枝迷走神経の切除によって有意に肝臓に対する効果が消失したことから、orexin-A による中枢領域 (視床下部) から末梢組織へのシグナル伝達に延髄から投射している迷走神経が関与している可能性が示唆された。

2. 脳虚血後の炎症因子誘導性糖代謝異常に対する迷走神経の活性化を介した orexin-A の抑制作用

MCAO 1日後において、炎症サイトカインの一つである TNF- α ならびに IL-1 β およびマクロファージのマーカーである F4/80 の発現は、sham 群に比較して上昇し、これらは、orexin-A の視床下部内局所投与によって有意に抑制された。さらにこの orexin-A の作用は、N-ブチルスコポラミンの投与または、vagusotomy によって有意に消失した。脳虚血ストレス負荷に

よって惹起される肝臓における炎症性サイトカインは、肝臓での糖代謝異常の発現に関与し、それは、視床下部の orexin-A による迷走神経の活性化によって制御できる可能性を明らかにした。

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 11 件)

1. Shinichi Harada, Yudai Nozaki, Wataru Matsuura, Yui Yamazaki, Shogo Tokuyama, Cerebral ischemia-induced elevation of hepatic inflammatory factors accompanied by glucose intolerance suppresses hypothalamic orexin-A-mediated vagus nerve activation, *Brain Res.*, 1661, 100-110, 2017. (査読あり)
DOI: 0.1016/j.brainres.2017.02.018.
2. Yui Yamazaki, Kyoko Arita, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 after cerebral ischemia upregulates cerebral sodium-glucose transporter type 1, *J. Pharmacol. Sci.*, in press. (査読あり)
3. Shinichi Harada, Wataru Matsuura, Keyue Liu, Masahiro Nishibori, Shogo Tokuyama, Possible involvement of the HMGB1/RAGE signaling mechanism in the induction of central post-stroke pain induced by acute global cerebral ischemia, *Brain Res.*, 1646, 433-440, 2016. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.brainres.2016.06.028.
4. Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Tetsuya Wada, Shigeru Yoshida, Shogo Tokuyama, Sodium transport through the cerebral sodium-glucose transporter exacerbates neuron damage during cerebral ischaemia, *J. Pharm. Pharmacol.*, 68, 922-931, 2016. (査読あり)
DOI: 10.1111/jphp.12571.
5. Wataru Matsuura, Erika Kageyama, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Unique action mechanisms of tramadol in global cerebral ischemia-induced mechanical allodynia, *NeuroReport*, 27, 699-704, 2016. (査読あり)
DOI:10.1097/WNR.0000000000000600.
6. Wataru Matsuura, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Effects of adjuvant analgesics on cerebral ischemia-induced mechanical

allodynia, *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 856-862, 2016. (査読あり)

DOI: 10.1248/bpb.b15-01035.

7. Shinichi Harada, Wataru Matsuura, Masaoki Takano, Shogo Tokuyama, Proteomic profiling in the spinal cord and sciatic nerve in a global cerebral ischemia-induced mechanical allodynia mouse model, *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 230-238, 2016. (査読あり)
DOI: 10.1248/bpb.b15-00647.
8. Yui Yamazaki, Sachi Ogihara, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Activation of cerebral sodium-glucose transporter type 1 function mediated by post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemia, *Neuroscience*, 310, 674-685, 2015. (査読あり)
DOI:10.1016/j.neuroscience.2015.10.005.
9. Kei Miyagi, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Pancreatic changes in nerve growth factor/TrkA associated with insulin secretion in cerebral ischemia, *Biol. Pharm. Bull.*, 38, 1747-1751, 2015. (査読有り)
DOI: 10.1248/bpb.b15-00432.
10. Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Relationship between cerebral sodium-glucose transporter and hyperglycemia in cerebral ischemia, *Neurosci Lett.*, 604, 134-139, 2015. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.neulet.2015.08.004.
11. Shinichi Harada, Tsukasa Tsujita, Akiko Ono, Kei Miyagi, Takaharu Mori, Shogo Tokuyama, *Stachys sieboldii* (Labiata, Chorogi) protects against learning and memory dysfunction associated with ischemic brain injury, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 61, 167-174, 2015. (査読有り)
DOI: 10.3177/jnsv.61.167.

〔学会発表〕(計 37 件)

1. 野崎裕大, 原田慎二, 徳山尚吾, 脳虚血後の肝臓における炎症性サイトカインの増加に対する視床下部の orexin-A の抑制作用, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 1 月 25 - 27 日 (仙台)
2. 原田慎二, 増田風香, 景山絵理香, 松浦渉, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛における神経ペプチド orexin-A の役割, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 1 月 25 - 27 日 (仙台)

3. 松浦涉, 原田慎一, 鷹野正興, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) モデルを用いた脊髄に対するプロテオーム解析と CPSP に対する NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) の関与, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 1 月 25-27 日 (仙台)
4. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷後の sodium-glucose transporter type 1 の発現増加は c-Jun N-terminal kinase および p38 の活性化によって誘導される, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 1 月 25-27 日 (仙台)
5. 原田慎一, 徳山尚吾, Interaction between changes in hepatic inflammatory signalings after cerebral ischemia and hypothalamic orexin-A, 第 90 回 日本薬理学会年会, 2017 年 1 月 15-17 日 (長崎)
6. 松浦涉, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛発現時の脊髄での high mobility group box-1 関連受容体の役割とその機序におけるグリア細胞の関与, 第 90 回 日本薬理学会年会, 2017 年 1 月 15-17 日 (長崎)
7. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷後の mitogen-activated protein kinases の活性化は脳内 sodium-glucose transporter type 1 発現を誘導する, 第 90 回 日本薬理学会年会, 2017 年 1 月 15-17 日 (長崎)
8. 原田慎一, 松浦涉, 鷹野正興, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛に対する dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) の関与, 痛み研究会 2016, 2017 年 1 月 30-31 日 (愛知)
9. 松浦涉, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脊髄 high mobility group box-1 (HMGB1) を介した脳卒中後疼痛発症機序における脊髄 HMGB1 関連受容体とグリア細胞の関与, 痛み研究会 2016, 2017 年 1 月 30-31 日 (愛知)
10. 原田慎一, 野崎裕大, 徳山尚吾, 脳梗塞後の肝臓における炎症性サイトカインの増加に対する視床下部 orexin-A の関与, 第 69 回日本薬理学会西南部会, 2016 年 11 月 26 日 (愛媛)
11. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷後の c-Jun N-terminal kinases の活性化は脳内 sodium-glucose transporter type 1 の発現を誘導する, 第 69 回日本薬理学会西南部会, 2016 年 11 月 26 日 (愛媛)
12. 松浦涉, 原田慎一, 鷹野正興, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) モデルを用いた脊髄および坐骨神経に対するプロテオーム解析, 第 130 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年 11 月 19 日 (京都)
13. 松浦涉, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛に対する脊髄での high mobility group box-1 の関与, 第 3 回包括的緩和医療科学学術研究会・第 4 回 Tokyo 疼痛緩和次世代研究会, 2016 年 8 月 28 日 (東京)
14. 原田慎一, 徳山尚吾, 脳梗塞後の糖代謝異常に起因する神経障害発現に対する orexin-A の中枢末梢臓器間連関機構を介した役割, 生体機能と創薬シンポジウム 2016, 2016 年 8 月 25-26 日 (仙台)
15. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷後の c-Jun N-terminal kinase の活性化が脳内 sodium-glucose transporter type 1 の発現を誘導し神経障害発現を増悪する, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016, 2016 年 8 月 24 日 (仙台)
16. 松浦涉, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 全脳虚血誘導性機械的アロディニアに対する脊髄 High mobility group box - 1 の関与, 第 36 回鎮痛薬オピオイドペプチドシンポジウム, 2016 年 8 月 19-20 日 (北海道)
17. 野崎裕大, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血後の炎症因子誘導性糖代謝異常に対する迷走神経の活性化を介した orexin-A の抑制作用, 第 27 回霧島神経薬理フォーラム, 2016 年 8 月 19-21 日 (福岡)
18. 山崎由衣, 原田慎一, 和田哲幸, 吉田繁, 徳山尚吾, 脳梗塞治療の新たな可能性 脳内 sodium-glucose transporter の制御が脳梗塞を改善する, 第 27 回霧島神経薬理フォーラム, 2016 年 8 月 19-21 日 (福岡)
19. 松浦涉, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脊髄における high mobility group box-1 が全脳虚血誘導性機械的アロディニアに及ぼす影響, 第 46 回日本精神神経薬理学会年会, 2016 年 7 月 2-3 日 (ソウル)
20. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性神経障害発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 1 を介したナトリウム流入の影響, 第 11 回トランスポーター研究会年会, 2016 年 7 月 2 日 (京都)
21. 松浦涉, 景山絵理香, 原田慎一, 徳山尚吾, 全脳虚血誘導性機械的痛覚過敏に対する tramadol の抑制作用とその効果に対する機序の解明, 第 129 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年 6 月 24 日 (広島)
22. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷後の脳内 sodium-glucose transporter type 1 の発現上昇に対する JNK の関与, 第 129 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年 6 月 24 日 (広島)

23. 原田慎一, 松浦涉, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脊髄部位における high mobility group box-1 が脳卒中後疼痛に及ぼす影響, 第 10 回日本緩和医療薬学会年会, 2016 年 6 月 4-5 日(静岡)
24. 有田恭子, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳内 sodium-glucose transporter がアポトーシスを介した脳虚血性神経障害発現に及ぼす影響, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日(横浜)
25. 野崎裕大, 原田慎一, 徳山尚吾, 全脳虚血モデルを用いた脳卒中後うつ病に対する評価系の確立, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日(横浜)
26. 松浦涉, 景山絵理香, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛における脊髄部位での high mobility group box-1 の関与, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日(横浜)
27. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳内 sodium-glucose transporter type 1 を介したナトリウム流入が脳虚血性神経障害の発現に及ぼす影響, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日(横浜)
28. 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血後の肝臓における炎症因子の増加に対する orexin-A の影響, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27-29 日(横浜)
29. Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Cerebral sodium-glucose transporter type 1 exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage, 第 89 回 日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9-11 日(横浜)
30. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Suppressive effect of orexin-A through vagus nerve on the development of post-ischemic glucose intolerance caused by elevated inflammatory factors, 第 89 回 日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9-11 日(横浜)
31. 原田慎一, 松浦涉, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛の発現に対する脊髄 high mobility group box-1 の関与, 痛み研究会 2015, 2015 年 12 月 17-18 日(名古屋)
32. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳内 sodium-glucose transporter type 1 を介した細胞内ナトリウム流入が脳虚血性神経障害の発現増悪に及ぼす影響, 第 128 回 日本薬理学会近畿部会, 2015 年 11 月 20 日(大阪)
33. 原田慎一, 松浦涉, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, High mobility group box-1 が全脳虚血誘導性痛覚過敏に及ぼす影響, 第 127 回日本薬理学会近畿部会, 2015 年 11 月 20 日(大阪)
34. 原田慎一, 景山絵理香, 松浦涉, 徳山尚吾, 全脳虚血誘導性機械的痛覚過敏に対する各種鎮痛補助薬の影響, 第 9 回緩和医療薬学会年会, 2015 年 10 月 3-4 日(横浜)
35. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳内 sodium-glucose transporter を介した Na⁺ の細胞内流入は脳虚血性神経障害の発現を直接的に増悪する, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015, 2015 年 8 月 29 日(東京)
36. 松浦涉, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛における High mobility group box - 1 (HMGB1) の役割とその痛覚異常に対する各種鎮痛補助薬の効果, 第 26 回霧島神経薬理フォーラム, 2015 年 8 月 16-18 日(鹿児島)
37. 山崎由衣, 和田哲幸, 原田慎一, 徳山尚吾, 酸化ストレス/高グルコース誘導性の神経細胞死の対する sodium-glucose transportor 機構を介した細胞内カルシウムの関与, 第 127 回日本薬理学会近畿部会, 2015 年 6 月 26 日(岐阜)

〔図書〕(計 0 件)

特記事項なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

特記事項なし

取得状況(計 0 件)

特記事項なし

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 慎一 (HARADA Shinichi)

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号: 60633443

(2) 研究分担者

特記事項なし

(3) 連携研究者

特記事項なし

(4) 研究協力者

特記事項なし