

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21330

研究課題名(和文) 糖尿病と一過性脳虚血併発時の障害悪化に対する硝酸塩/亜硝酸塩の改善効果の解析

研究課題名(英文) Effects of nitrite/nitrate on ischemia/reperfusion-induced cerebral injury in diabetic rats

研究代表者

岩田 直洋 (Iwata, Naohiro)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号：50552759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ストレプトゾトシン誘発糖尿病態(DM)ラットに一過性脳虚血処置した併発モデルラットを用いて脳障害悪化のメカニズムを明らかにするとともに食餌由来の硝酸塩/亜硝酸塩が医薬品の代替として有効か否かを明らかにすることを目的とした。非糖尿病態(non-DM)ラットでは、虚血直後に亜硝酸塩を静脈内投与することで脳保護効果を確認した。一方、DMラットでは検討したすべての条件で脳保護効果が見られなかったことから、単回投与による保護は病態時において消失した。しかしながら、DM群において硝酸塩の長期経口摂取では梗塞巣が減少し、生存率が上昇したことから虚血性脳障害による保護効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether nitrite exerts neuroprotective effects against cerebral injury induced by middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion (MCAO/Re) in DM rats. We found that infarct volume, edema, and the number of apoptotic cells in the brain determined after the reperfusion were reduced by nitrite at a dose of 12.5 $\mu\text{mol/kg}$, but not at the other doses in the non-DM rats or at any doses of nitrite when nitrite was administered at the start of reperfusion. Moreover, no significant improvement in the injury was observed in the DM rats at any doses or infusion timings of nitrite. These results suggest that early treatment with nitrite relieves the cerebral ischemia-reperfusion injury presumably by NO-mediated restoration of the cerebral blood flow. Augmented oxidative stress in DM state might disturb the protection.

研究分野：食品科学

キーワード：糖尿病 一過性脳虚血 酸化ストレス 硝酸塩 亜硝酸塩 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

現在、日本国内において糖尿病患者は、予備軍を加えると 2100 万人に上る。糖尿病による高血糖の持続は、微小血管および大血管に障害を与え、特に脳血管疾患に対して発症率を数倍に増加させる危険因子であり、また、糖尿病に脳虚血を併発した場合、脳障害が急速に悪化することも報告されているがそのメカニズムは未だ明らかではない。申請者はこれまでに、糖尿病と一過性脳虚血の両疾患において酸化ストレスと炎症の関与に注目し、医薬品の代替として疾病の軽減を目的とした食品を探索し、それらの有効性及び安全性について検証してきた。数十種類の食品・食品成分の中から候補を探索した結果、抗酸化や抗炎症作用を有するアスコルビン酸(研究業績: Iwata *et al.* 2010, 2014) や霊芝菌糸体培養培地抽出物に脳保護効果があることを見出し(研究業績: Iwata *et al.* 2008, 2012)、日常的な食品摂取による予防が重要であることを示してきた。

また、抗酸化食品とは作用機序の異なる硝酸塩は緑葉野菜などに多く含まれており、口腔内の細菌によって亜硝酸塩に還元される。亜硝酸塩は生理的に不活性であり、これまでは一酸化窒素(NO)の単なる代謝産物であると考えられてきたが、近年、体内に貯蔵された亜硝酸塩が低酸素や虚血により化学的にNOに変換され、虚血性NOドナーとして作用することが報告された。NOは、血管の拡張作用による血流の増加に寄与し、また、アポトーシスの抑制因子としての働きを持つ。申請者は、亜硝酸塩が非糖尿病態ラットで脳組織障害を軽減することを明らかにしている、一方、糖尿病併発モデルラットにおいてはその効果が減弱し、脳内におけるNO産生・放出の相違が関与している可能性が示唆されている。NOは、自らがラジカルとして細胞に障害を与えることも報告されており、NOの作用は二面性を有することが知られるが糖尿病と脳虚血併発におけるNOの影響やNOドナーによる予防効果は明らかではない。

以上のような背景から本研究は、糖尿病と脳虚血併発における障害の増悪機序についてNO経路に注目して解析するとともに、亜硝酸塩/硝酸塩投与における脳組織内のNO合成酵素の発現量やNO産生量を病態間で明らかにし、糖尿病モデルラットに対する亜硝酸塩/硝酸塩の脳保護効果を示す条件を明らかにする。また、緑葉野菜など食餌由来の硝酸塩が医薬品の代替として有効か否かを明らかにするため、継続的に緑葉野菜あるいは硝酸塩を摂取させた後に一過性脳虚血を処置して脳保護効果を判定することを計画した。

2. 研究の目的

本研究では硝酸塩/亜硝酸塩投与時におけるラット脳内のNO産生メカニズムを明らかにする。また、糖尿病態時に脳虚血を併発し

た際の脳障害悪化のメカニズムとNO産生量との関係を見出すとともに、硝酸塩/亜硝酸塩の貯蔵体である緑葉野菜の継続的な摂取による脳障害の軽減効果を実験的に証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

Sprague-Dawley系雄性ラット(5週齢)に50 mg/kgでストレプトゾトシン(STZ)を腹腔内投与し、1週間後の血糖値が300 mg/dL以上の個体をさらに4週間飼育し、糖尿病態(DM)ラットとして実験に用いた。STZは、50 mMクエン酸緩衝液(pH 4.5)に用時調整して使用した。また、クエン酸緩衝液のみを投与し、同様に飼育したものを非糖尿病態(non-DM)ラットとした。

(2) 酸化ストレス度評価

血中の酸化ストレスは、d-ROMs test kit (Wismerll)を用い、活性酸素・フリーラジカル自動分析装置(F.R.E.E.; Free Radical Elective Evaluator)にてヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した。酸化ストレス単位1 CARR U.は、0.08 mg/dLの過酸化水素に相当する。抗酸化力測定は、BAP test kit (Wismerll)を用いた。脳組織における過酸化脂質をTBA法により評価し、また、抗酸化酵素(SOD、Catalase、GPx)活性についても評価した。

(3) NO合成酵素の発現評価

虚血/再灌流後に採取した脳皮質ペナンプラのサンプルからRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてTotal RNAを抽出した。逆転写後、iCycler thermal cycler (Bio-Rad)を用いてNO合成酵素遺伝子(iNOS、eNOS、nNOS)の発現を解析した。また、Western blot法を用いてタンパク質の発現を評価した。

(4) NO量の測定

ラットの大脳皮質内(Bregma:-2.6 mm, lateral:3.0 mm, depth:4.0 mm)にNO電極をイソフルラン麻酔下で挿入した後、300分間のNO量を測定した。

(5) 中大脳動脈閉塞/再灌流(MCAO/Re)モデルの作製

ラットをイソフルランで麻酔し、仰臥位に固定後、頸部を正中切開し、右総頸動脈から内頸動脈分岐部を露出し、総頸動脈と外頸動脈、さらに内頸動脈の翼口蓋枝を結紮した。先端を丸くした4-0外科用ナイロン糸製の塞栓子を右総頸動脈から内頸動脈を経て中大脳動脈起始部まで挿入し、血管を閉塞した。MCAO処置から120分後、ラットを再度イソフルラン麻酔し、塞栓子をゆっくりと引き抜き、血液を再灌流(Re)させた。その後、切開部を縫合し、餌および水が自由に摂取できる環

境で飼育した。また、擬似手術処置 (sham) 群には、正中切開のみを行った。手術処置が一定に行われていることを確認するため脳血流量を Laser-Doppler flowmetry を用いて測定した。

(6) 亜硝酸塩/硝酸塩処置

亜硝酸塩 (1.25、12.5、25.0 $\mu\text{mol/kg}$) は、ラットに MCAO/Re 処置し、虚血直前または再灌流直後の 2 種類でタイミングで静脈内に単回投与した。硝酸塩/亜硝酸塩 (1.25 mmol/kg/day) は、DM 群において 8 週齢から 10 週齢の 2 週間胃ゾンデを用いて強制的に経口投与した。

(7) 脳梗塞巣体積の測定

摘出した脳組織をステンレス製ブレインマトリックスを用いて、脳冠状切片を作成した。梗塞巣体積を評価するために 2% 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) で染色し、脳梗塞領域は、画像解析ソフト (Scion Image 1.62) を用いて算出した。

(8) 組織染色

摘出した脳組織サンプルを用いて、脳細胞におけるアポトーシスを TUNEL 染色、好中球の浸潤の指標とされるミエロペルオキシダーゼ (MPO) の発現とタンパク質のニトロ化の指標であるニトロチロシン (3-NT) は、免疫染色で評価した。さらに、スーパーオキシド産生は、DHE 染色より評価した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病態ラットにおける酸化ストレス度評価

non-DM ラットと比較して DM ラットでは、体内酸化ストレス度は約 2 倍の高値を示した。同様に血漿サンプルを用いて BAP テストキットより抗酸化力を測定した結果、non-DM 群と比較して DM 群では、抗酸化力が有意に低値を示した。脳を摘出した後、脳皮質における抗酸化酵素活性 (SOD、catalase、GPx) を測定した結果、DM 群において顕著な活性の低下が認められた。また、TBA 法にて過酸化脂質量を測定した結果、non-DM 群と比較して DM 群で約 1.5 倍有意に高値を示した。

(2) 脳皮質における NO 合成酵素の発現

脳皮質における NO 合成酵素の遺伝子発現を解析した結果、non-DM および DM の両群における nNOS、eNOS、iNOS すべての NOS の遺伝子発現に変化は認められなかった。

一方、NOS タンパク質の発現量を Western blot 法で解析した結果、p-nNOS/nNOS は non-DM と比較して DM 群で約 2.5 倍有意に高値を示した (Fig. 1)。iNOS 発現も non-DM 群と比較して DM 群で増加が見られた。p-eNOS/eNOS は、non-DM 群と比較して DM 群

で減少が認められた。

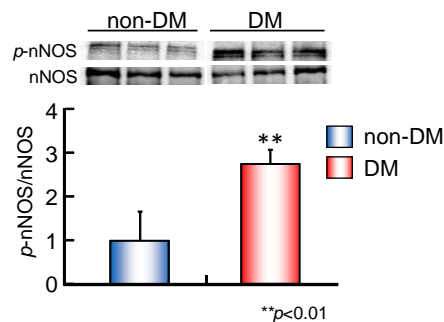


Fig. 1 脳皮質におけるnNOSの発現

(3) 脳皮質における NO 量

non-DM および DM 群の大脳皮質内に NO 電極を刺入し、NO 量を測定した結果、non-DM 群に比べて DM 群で約 1.3 倍有意に高値を示した。

以上のことから、糖尿病態の脳皮質では抗酸化酵素活性の低下によって酸化傷害が増加していた。また、DM では神経型や誘導型の NOS タンパク質の発現上昇が見られ、non-DM に比べて NO 量の顕著な増加が認められた。さらに、血管内皮細胞に発現する eNOS の活性型である p-eNOS の発現が DM で減少傾向を示したことから、血管保護効果の減弱が示唆された。

(4) 虚血性脳障害に対する亜硝酸塩の効果

non-DM では、虚血直後に亜硝酸塩を静脈内投与すると、12.5 $\mu\text{mol/kg}$ の用量においてのみ梗塞巣体積の減少が認められた (Fig. 2)。また、同用量の亜硝酸塩は、TUNEL 陽性細胞数を顕著に減少させた。一方、DM の Control 群では、non-DM のそれと比べて梗塞巣が約 2 倍増大した。また、non-DM 群で効果が認められた 12.5 $\mu\text{mol/kg}$ の亜硝酸塩を投与しても DM 群では効果が消失した。さらに、虚血/再灌流直後での亜硝酸塩投与の効果についても検討したが、non-DM および DM の両群においてすべての条件で効果を示さなかった。

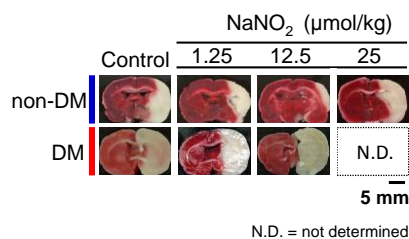


Fig. 2 MCAO/Re処置による脳梗塞巣と亜硝酸塩投与の効果

(5) MPO 発現に対する効果

non-DM 群において脳保護効果が認められた虚血直後の亜硝酸塩 12.5 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群の脳組織を用いて、MPO 発現を染色し、DM 群と比較検討した結果、non-DM 群では、擬似手

術群である Sham で MPO はほとんど観察されなかったが、虚血処置によって MPO の発現増加が認められた。しかし、亜硝酸塩を投与したラットでは、この発現が顕著に減少した。一方、DM 群では Sham においてすでに MPO の発現が確認され、虚血後によってその発現が顕著に増加した。しかし、DM 群では亜硝酸塩を投与しても、non-DM 群のような改善は認められなかった。

(6) スーパーオキシド産生に対する効果

スーパーオキシド (O_2^-) 産生量を DHE 染色によって評価した結果、non-DM 群では、Sham で O_2^- はほとんど観察されなかったが、虚血処置によって O_2^- の発現が約 1.7 倍増加した。しかし、亜硝酸塩投与によって、この発現増加が抑制された。一方、DM 群では Sham においてすでに O_2^- の発現が確認され、虚血後では、その発現が顕著に増加した。しかし、DM 群では亜硝酸塩を投与しても、non-DM 群のような O_2^- の発現の減少は認められなかった。

(7) タンパク質のニトロ化に対する効果

ペルオキシナイトライトによるタンパク質ニトロ化修飾物であるニトロチロシン (3-NT) の発現量を免疫染色によって評価した結果、non-DM の Sham 群で 3-NT はほとんど観察されなかったが、虚血処置によって 3-NT の発現が約 4 倍に増加した。しかし、亜硝酸塩投与によって、この発現増加が抑制された。一方、DM 群では Sham においてすでに 3-NT の発現が non-DM と比べて約 2 倍確認され、虚血後によって、その発現が顕著に増加した。しかし、DM 群では亜硝酸塩を投与しても、non-DM 群のような 3-NT の発現の減少は認められなかった。

(8) 亜硝酸塩投与後の脳組織内の NO 濃度および血流量の変化

NO 電極を麻酔下で刺入し、non-DM 群で脳保護効果が認められた 12.5 $\mu\text{mol/kg}$ の亜硝酸塩を静脈内投与して、脳組織内の NO 濃度および血流量の変化を比較検討した。non-DM 群における NO 濃度は、亜硝酸塩投与後 30 分以降徐々に上昇し、約 2 時間後に投与前の約 6 倍となり、定常状態に達した。因みに、NO 量は、5 時間後も低下することなく安定していた。一方、DM 群では亜硝酸塩を投与しても上昇は認められなかった。non-DM 群では、血流量においても亜硝酸塩投与後約 30 分から徐々に増加する傾向が認められ、5 時間後においても投与前の約 1.2 倍の血流量が維持されており、脳組織内の NO 量と血流量の変化は、ほぼ同調していた。一方、DM 群では NO 量同様に血流の変化は認められなかった。

(9) 糖尿病態ラットへの亜硝酸塩/硝酸塩長期投与による脳保護効果の検討

DM ラット (8 週齢) に亜硝酸塩あるいは硝酸塩をそれぞれ 1.25 mmol/kg/day の用量で

胃ゾンデを用いて 2 週間経口投与した。これらラットに MCAO/Re 処置し、再灌流 24 時間後に TTC 染色にて梗塞巣を評価した結果、亜硝酸塩を投与した群では Control 群と比べて梗塞巣体積に変化は見られず、約 80% の梗塞巣体積であった。一方、硝酸塩投与によって Control 群と比べて梗塞巣は約 44% 減少した。また、再灌流 24 時間後までの死亡率を評価した結果、Control 群および亜硝酸塩投与群ともに約 80% が生存できないのに対し、硝酸塩投与群では、30% まで顕著に死亡率が減少した (Fig. 3)。

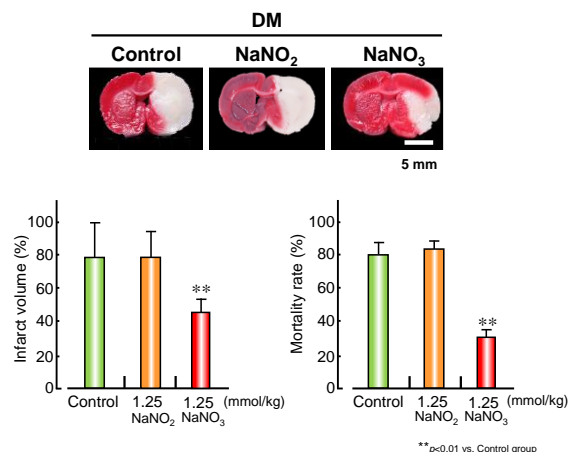


Fig. 3 糖尿病態ラットへの亜硝酸/硝酸塩長期投与による脳保護効果の検討

non-DM ラットの脳虚血/再灌流では、12.5 $\mu\text{mol/kg}$ の亜硝酸塩を虚血直後に静脈内投与することにより、再灌流後の脳梗塞巣の形成および脳浮腫が減少するとともにアポトーシスや白血球の浸潤、スーパーオキシド産生、ニトロ化タンパク質の生成が抑制された。さらに、脳保護効果を示す亜硝酸塩には投与量に最適値が存在することが明らかになった。一方、DM では今回用いた亜硝酸塩のすべての濃度で脳保護効果は認められず、ミエロペルオキシダーゼやニトロチロシンの生成を抑制しなかった。

NO 電極を用いて虚血部位に相当する大脳皮質内の NO 濃度を測定したところ、non-DM では亜硝酸塩投与 30 分後から上昇傾向を示し、約 2 時間後にピークに達し、5 時間後も低下することなく推移することが明らかになった。同時に測定した脳血流量は、NO 量とほぼ同調して増加した。一方、DM では亜硝酸塩投与後も NO 量および血流量ともに変化は認められなかった。

以上の結果から、非糖尿病態では有効量の亜硝酸塩を虚血直後に投与した場合には、亜硝酸塩から生成する NO が血管を拡張し、ペナンプラの血流の確保に寄与して脳障害を軽減したと考えられる。一方、糖尿病態では平常時から活性酸素種が増大しており、さらに虚血/再灌流によって大量に産生した活性酸素と NO が反応し、フリーラジカルとして傷害性の強いペルオキシナイトライト

(ONOO⁻) が産生されることにより、脳保護作用が認められなかったと考えられる。また、糖尿病態時では長期亜硝酸塩投与においても虚血性脳障害を軽減させず、死亡率も減少しなかった。一方、硝酸塩投与では、糖尿病態時における虚血性脳障害を顕著に軽減し、生存率を上昇させた。これら糖尿病態時における長期の硝酸塩/亜硝酸塩投与による脳保護効果の相違については、今後さらに検討する必要がある。

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 1 件)

Iwata N., Takayama H., Xuan M., Kamiuchi S., Matsuzaki H., Okazaki M., Hibino Y. Effects of etanercept against transient cerebral ischemia in diabetic rats. *BioMed Research International*, 査読有, 2015: 189292 (2015). doi: 10.1155/2015/189292.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 岩田 直洋, 岡崎 真理, 高村 恵美子, 玄美燕, 神内 伸也, 日比野 康英: ラットの虚血性脳障害に対する亜硝酸ナトリウムの効果、第 60 回日本薬学会関東支部大会 2016 年 9 月 17 日 東京大学本郷キャンパス
- ② 岩田 直洋, 今井 十夢, 高村 恵美子, 神内 伸也, 岡崎 真理, 日比野 康英: 糖尿病態ラットの脳虚血障害に対する亜硝酸ナトリウムの効果、第 61 回日本薬学会関東支部大会 2017 年 9 月 16 日 慶應義塾大学 芝共立キャンパス
- ③ 岩田 直洋, 岡崎 真理, 高村 恵美子, 今井 十夢, 神内 伸也, 日比野 康英: 糖尿病態ラットの虚血性脳障害に対する亜硝酸ナトリウムの効果、第 138 回日本薬学会 2018 年 3 月 26 日 金沢駅 もてなしドーム
- ④ 今井 十夢, 岩田 直洋, 神内 伸也, 岡崎 真理, 日比野 康英: 糖尿病態ラット脳皮質の NO 産生、第 138 回日本薬学会 2018 年 3 月 26 日 金沢駅 もてなしドーム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 直洋 (IWATA NAOHIRO)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号: 50552759