

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 24 年 4 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500338

研究課題名（和文）虚血性白質障害におけるインスリン抵抗性の関与と抗酸化ペプチドの保護作用

研究課題名（英文）Insulin resistance and protective role for antioxidative peptide in ischemic white matter damages

研究代表者

ト部貴夫（URABE TAKAO）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60291663

研究成果の概要（和文）：本研究では抗酸化ペプチドであるアドレノメデュリン（AM）が cAMP-PKA シグナル伝達系を促進することで酸化ストレスを制御し、脳虚血下で AM が欠損した状態では酸化ストレスが増強し、脳梗塞が進展・増悪することを明らかにした。また、慢性脳虚血下で AM が欠損していると、酸化ストレスおよび炎症反応が増強し、白質障害が進展することを確認した。AM の補充もしくは活性化が酸化ストレスを抑制し脳保護効果を発揮することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study showed that adrenomedullin (AM), which is reported as antioxidative peptide, has an important protective function against oxidative stress through the cyclic AMP-protein kinase A pathway. We indicated that downregulation of AM results in high levels of reactive oxygen species (ROS) and enhanced progression of infarction area after transient focal ischemia in mice. In chronic cerebral hypoperfusion of AM deficient mice, oxidative stress and inflammatory response enhanced progression of white matter damages. It suggest that augmentation or activation for AM may be suppressed oxidative stress and shown the brain protective effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：脳神経科学，神経解剖学・神経病理学

キーワード：アドレノメデュリン，抗酸化ペプチド，慢性脳低灌流，虚血性脳白質障害，酸化ストレス，インスリン抵抗性，認知障害，脳保護作用

1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン（adrenomedullin：AM）はヒト副腎由来の褐色細胞腫から単離された循環調節ペプチドであり、降圧作用のみならず臓器保護作用を有することが明らかにされてきた。AM の臓器保護作用に関しては、酸化ストレスに対し内因性の抗酸化作

用を有するペプチドであることや、インスリン抵抗性を改善する作用を担っていることが明らかにされている。しかしながら脳虚血における AM の関与の詳細は十分に検討がなされていない。われわれはマウス脳低灌流による慢性脳虚血モデルシステムを確立しており、慢性脳虚血により学習記憶能力の低下

が観察され、大脳白質における酸化ストレスと炎症反応による血管内皮細胞障害とオリゴデンドロサイトの細胞死が強く関わることを明らかにしている。またインスリン抵抗性を基盤とする糖尿病自然発症ラットの高齢群においては、大脳白質での酸化ストレスの増強と白質障害の進展が明らかであった。このように虚血脳や加齢脳における大脳白質障害はインスリン抵抗性と高血糖が酸化ストレスと強く関与することで発症・進展し、認知機能障害の重要な病態を形成していることが明らかにされつつある。

2. 研究の目的

本研究は慢性虚血による白質障害と認知機能の障害メカニズムに関して、抗酸化ペプチドであるアドレノメデュリンを標的分子として酸化ストレス、高血糖、インスリン抵抗性の病態との関連を解明し、ペプチドを利用した防御法の確立を目指して立案した。さらには将来的な臨床治療への応用に向け白質容量の多いミニプタでの検討を加え、ペプチドの有効な投与方法としてナノテクノロジーなどを利用した効率のよいデリバリーシステムの導入も検討する。本研究の目標達成により、血管病としての認知症の治療のみならず発症予防に寄与することを確信している。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* 脳虚血モデルでの病理組織学的検討：野生型マウスおよびアドレノメデュリンノックダウン (AM+/-) マウスの急性脳虚血・再灌流モデルおよび慢性脳低灌流モデルを用いて、アドレノメデュリンおよびその受容体の脳内における変動を比較検討する。その際には、酸化ストレス、高血糖及びインスリン抵抗性に関連する cyclic AMP を介する細胞内シグナル伝達系の評価をタンパク質および mRNA レベルで検討する。

(2) 学習・記憶能力に与える影響については行動生理学的に評価する。

(3) 高齢 AM+/-マウスを用いた検討：AM+/-マウスは加齢とともに肥満と高血糖を認めインスリン抵抗性を示すようになるため、高齢 AM+/-マウスを用いた検討を行う。

(4) 白質における血管内皮およびオリゴデンドロサイトの再生の検討

(5) 抗酸化ペプチド *in vivo* 投与方法の検討
以上の項目を検討する。

4. 研究成果

(1) 急性脳虚血モデルでの検討：野生型マウスに比較して AM+/-マウスでは、脳梗塞体積が有意に増大することを見出した。さらに AM+/-マウスでは梗塞周辺部での脂質過酸化代謝産物蓄積と酸化的 DNA 障害が増強してい

ることを明らかにした。脳虚血下において AM+/-マウスでは、cAMP と proteinkinase A (PKA) が野生型に比べ有意に低下することを確認した。以上のことから AM は cAMP-PKA シグナル伝達系を促進することで酸化ストレスを制御しており、特に脳虚血下で AM が欠損した状況では酸化ストレスが増強し、脳梗塞が進展・増悪することを明らかにした。以上の結果については、Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 誌に報告し掲載された。

(2) 慢性脳低灌流モデルでの検討：マウスの慢性脳低灌流モデルを作成し、白質障害について検討した。さらに AM 欠損に加えて加齢による白質障害進展も検討した。その結果では野生型マウスに比較して AM+/-マウスでは、経時的にオリゴデンドロサイトが減少する傾向をみとめ、白質障害(脱髄、軸索障害)が有意に発症・進展することを見出した。さらに、AM+/-マウスでは大脳白質での脂質過酸化代謝産物蓄積と酸化的 DNA 障害が増強していることを明らかにした。炎症性マーカーである iNOS の免疫染色の結果、野生型では虚血早期の血管内皮に発現を認め、時間経過とともにグリア細胞にも軽度の発現を確認した。一方 AM+/-では iNOS は血管内皮細胞のみならずグリア細胞系にも虚血後早期から大量に発現することを確認した。さらに AM+/-は野生型に比べて CD31 陽性の血管内皮細胞が減少傾向にあり、AM+/-マウスでは慢性脳低灌流状態における血管新生能が障害されていることが示唆された。加齢により白質障害は進展し、AM+/-は野生型に比して白質における酸化ストレスおよび炎症反応による白質障害が増強することを確認した。

以上のことから AM 欠損は慢性脳低灌流における酸化ストレス、炎症反応を増強し、虚血性白質障害を有意に増強させ、その障害は加齢によりさらに増強することを明らかにした。

(3) 得られた成果の国内外におけるインパクトと位置づけ：本研究成果は脳虚血の中でも認知機能障害と関係のある虚血性大脳白質障害とアドレノメデュリンの抗酸化作用との関連を明らかにした点で、世界をリードする内容である。

(4) 今後の展望：本研究の最終段階である臨床応用に向けた抗酸化ペプチドの投与実験を遂行していく。

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 5 件)

1. Miyamoto N, Tanaka R, Shimosawa T,

Yatomi Y, Fujita T, Hattori N, Urabe T: Protein kinase A-dependent suppression of reactive oxygen species in transient focal ischemia in adrenomedullin-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1769-1779, 2009. 査読有

2. Yatomi K, Miyamoto N, Komine-Kobayashi M, Liu M, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T: Pathophysiological dual action of adiponectin after transient focal ischemia in mouse brain. *Brain Res* 1297: 169-176, 2009. 査読有
3. Miyamoto N, Tanaka R, Shimura H, Watanabe T, Mori H, Onodera M, Mochizuki H, Hattori N, Urabe T: Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 299-310, 2010. 査読有
4. Yamashiro K, Milsom AB, Duchene J, Panayiotou C, Urabe T, Hattori N, Ahluwalia A: Alterations in nitric oxide and endothelin-1 bioactivity underlie cerebrovascular dysfunction in ApoE-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 1494-1503, 2010. 査読有
5. Teramoto S, Miyamoto N, Yatomi K, Tanaka Y, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T: Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 1696-1705, 2011. 査読有

[学会発表] (計1件)

宮元伸和, 田中康貴, 柳 美子, 卜部貴夫, 服部信孝: マウス慢性脳低灌流モデルにおける白質の細胞死と再生に関する検討. 2010年5月22日, 第51回日本神経学会総会, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

卜部貴夫 (URABE TAKAO)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 60291663

(2) 研究分担者

下澤達雄 (SIMOSAWA TATSUO)
東京大学・医学部・講師
研究者番号: 90231365