

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 6 月 3 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500683

研究課題名（和文）

脳虚血ストレスセンサーとしてのグルコース受容体及びオレキシン神経の新規役割の解明

研究課題名（英文）

Novel role of glucose receptor and orexin neuron as sensor of cerebral ischemia

研究代表者

徳山 尚吾 (TOKUYAMA SHOGO)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70225358

研究成果の概要（和文）：

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その解明を試みた。とくに中枢における神経機能を変容させる臓器間連関の実行分子・標的分子を明らかにすることを目的に行った。その結果、上位中枢における内因性生理活性ペプチドであるオレキシン-A およびオレキシン神経系の活性調節によって、脳卒中病態が改善することを明らかとし、脳卒中治療領域における新たな概念を提唱した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we determined the effects of intra-hypothalamic administration of orexin-A on the development of post-ischemic glucose intolerance, including changes in insulin signaling and ischemic neuronal damage.

In conclusion, regulation of post-ischemic glucose intolerance by intra-hypothalamic administration of orexin-A significantly suppressed cerebral ischemic neuronal damage. These findings provide some insight into the therapeutic effectiveness of the use of this endogenous neuropeptide. These results from the present study may be helpful for the development of new agents and strategies for clinical treatment of cerebral stroke.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：生活習慣病、orexin 神経、グルコース受容体、脳卒中、血糖値

1. 研究開始当初の背景

全世界の主な死因の第三位である脳卒中は、我が国のみならず世界的にその罹患者数は増加し、世界保健機関の推計では、毎年

1,500 万人が脳卒中を発症し、500 万人に永続的な身体障害が残るとされる。また、高い再発率から、予防も重要視されている。有効な治療ならびに予防のための新規薬物の開

発は推進され、2001年のエダラボンの開発を転機とし、2005年には急性期の血栓溶解剤が保険適応され、最近では血栓溶解剤とフリーラジカルスカベンジャーを組み合わせた治療効果が期待されている。しかしながら有効治療可能時間域の狭さからその恩恵に与る症例は数少なく、その他にも多数の薬剤に対して臨床試験が試みられたものの有効な治療薬は未だ少ない。こうした背景から本研究では、脳卒中の新規治療戦略の開発を目指し、研究を遂行する。

以前より、脳卒中の危険因子として「高血糖」は重要視されてきた。すなわち、糖尿病の既往歴のある患者では脳卒中の発症リスクが2-3倍に増加する。発症リスクだけでなく、高血糖状態では、生じる神経障害が著しく増大することが明らかとされ、脳卒中発症の予防において、血糖値制御の重要性は以前より唱えられてきた。重要なことに、近年臨床では、脳卒中の治療においても、脳卒中発症後の厳格な血糖値制御が重要な役割を果たすことが報告されている。これに関し、最近申請者らは、動物モデルを用いた研究により、脳虚血ストレス負荷時において一過性の耐糖能異常が発症し、この血糖値上昇が、学習・記憶障害などの予後の悪化に関与することを明らかとしてきた (Brain Res., 2009)。

高血糖はこれまでに、血管障害に伴う血流低下・酸素欠乏や、タンパク質の糖化・ポリオール系の亢進などの代謝異常を誘発することにより神経障害を合併するほか、脳虚血性神経障害発症率も増大することが報告されている。そのシグナル受容分子として、最近細胞膜表面におけるグルコース受容体の存在が報告され、受容体の活性化と細胞内シグナルを介して、特異的に機能することが明らかになってきた。代謝性疾患の発現機序においてもその受容体の役割が注目されつつある。

一方、生理活性ペプチドであるオレキシンは摂食だけでなく睡眠覚醒や、情動など中枢神経活動に対して重要な役割を果たしていることが報告されている。さらに最近、オレキシン受容体の活性化により、交感神経を介して骨格筋における糖代謝が調節されると報告された。しかしながら、中枢性脳虚血ストレスと糖代謝異常との関連性については不明な点も多く、それにおけるオレキシン神経の関与を解明することは、他に類を見ない独創的な発想に基づくものである。これまで不明であった虚血ストレスの受容分子を明らかにできるという点でも、当該分野の発展に多に貢献できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、脳卒中性の脳高次機能の低下について、ストレス受容を担う神経を明らか

にすることを目的としている。とくに、脳卒中による脳高次機能の低下が「血糖値制御機構の破綻」に因るとする我々のこれまでの研究成果を踏まえ、それを制御する神経系として中枢において血糖値制御を担うオレキシン神経の役割について明らかにしたい。さらには、最近発見された「グルコース受容体」がそのストレスセンサーとなる可能性についても解明し、脳虚血性ストレスの受容体分子を明らかにする。本研究を遂行することにより、脳卒中性の神経障害発現に対する受容分子を明らかとすること、ならびに、新たな治療標的分子の提案を最終目標とする。

3. 研究の方法

5週齢の ddY 系雄性マウスを用い、中大脳動脈閉塞 (MCAO, 2 hr) により一過性脳虚血モデルを作成した。神経障害発現は、梗塞巣形成、行動障害、ならびに学習・記憶障害の評価をそれぞれ、2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride 染色、神経学的欠損スコア、ならびに step-through 法により評価した。MCAO 後の血糖値変化 (耐糖能異常) の指標として、空腹時血糖値 (FBG) について解析した。

Orexin-A (脳室内投与 250 pmol/mouse, 視床下部内局所投与 5 pmol/mouse) は、MCAO 後に単回投与した。MCAO 後の insulin 受容体 (InsR) ならびにそのリン酸化体 (p-InsR)、糖新生関連酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) ならびに glucose-6-phosphatase (G6Pase) 、および orexin-1 (OX1) 受容体の発現変化は western blot 法により解析した。SGLT ファミリーの広範な阻害薬である phlorizin は虚血再灌流直後に単回腹腔内投与 (200 mg/kg)、または、虚血再灌流直後および 6 時間後に脳室内投与 (40 µg/mouse) した。

4. 研究成果

一過性脳虚血ストレス負荷による虚血後耐糖能異常発現と連動して、肝臓におけるインスリン受容体の活性化量低下と、糖新生関連酵素の発現上昇が生じることが明らかとなった。また、虚血ストレス負荷により、肝臓内インスリン受容体量そのものが減少していたことから、これがインスリン受容体活性化量の減少の引き金になったと考えられる (J. Pharmacol. Sci., 2011)。

脳虚血ストレス負荷後早期において、orexin-A 産生部位である視床下部外側野における orexin-A の発現量が偽手術群に比較して有意に減少していた。一方で、orexin-A の受容体である orexin-1 受容体の発現には何ら影響していなかった。この条件下において、orexin-A の脳室内または視床下部内局所投与によって、肝臓におけるインスリンシグナル系の賦活化による脳虚血後の血糖値上

昇が抑制されることで、神経障害の発現抑制に寄与する知見を得た (J. Pharmacol. Sci., 2011 and 2012; J. Pharmacol. Exp. Ther., 2013)。さらに、脳虚血ストレス負荷後の耐糖能異常および神経障害発現に対する SGLT の影響を検討するために、SGLT の阻害剤である phlorizin を用いて検討したところ、脳虚血ストレス負荷後の耐糖能異常に対し、phlorizin 腹腔内投与は有意な抑制作用を示したが、phlorizin 脳室内投与は、何ら影響を及ぼさなかった。一方、脳虚血ストレス負荷後の梗塞巣形成、および行動障害発現は、phlorizin 腹腔内投与及び脳室内投与により有意に抑制された (Brain Res., 2012)。

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 9 件)

(原著論文)

1. Shinichi Harada, Yui Yamazaki, Shogo Tokuyama, Orexin-A suppresses post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage through hypothalamic brain-derived neurotrophic factor, J. Pharmacol. Exp. Ther., 344, 276-285, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1124/jpet.112.199604
2. Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage through the cerebral sodium-glucose transporter, Brain Res., 1489, 113-120, 2012. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.brainres.2012.10.020
3. Shinichi Harada, Maya Kishimoto, Mana Kobayashi, Kazuo Nakamoto, Wakako Fujita-Hamabe, Hwei-Hsien Chen, Ming-Huan Chan, Shogo Tokuyama, Honokiol suppresses the development of post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage in mice, J. Nat. Med., 66, 591-599, 2012. (査読有り)
DOI: 10.1007/s11418-011-0623-x
4. Shinichi Harada, Wakako Fujita-Hamabe, Shogo Tokuyama, Ameliorating effect of hypothalamic brain-derived neurotrophic factor against impaired glucose metabolism after cerebral ischemic stress in mice, J. Pharmacol. Sci., 118, 109-116, 2012. (査読有り)
DOI: 10.1254/jphs.11164FP
5. Kanako Shichi, Wakako Fujita-Hamabe, Shinichi Harada, Hiroyuki Mizoguchi, Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima, Shogo Tokuyama, Involvement of matrix metalloproteinase-mediated proteolysis of

neural cell adhesion molecule in the development of cerebral ischemic neuronal damage, J. Pharmacol. Exp. Ther., 338, 701-710, 2011. (査読有り)

DOI: 10.1124/jpet.110.178079

6. Shinichi Harada, Wakako Fujita-Hamabe, Shogo Tokuyama, Effect of orexin-A on post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage, J. Pharmacol. Sci., 115, 155-163, 2011. (査読有り)
DOI: 10.1254/jphs.10264FP

(原著論文)

1. Shinichi Harada, Wakako Fujita-Hamabe, Shogo Tokuyama, Ischemic stroke and glucose intolerance: a review of the evidence and exploration of novel therapeutic targets, J. Pharmacol. Sci., 118, 1-13, 2012. (査読有り)
DOI: 10.1254/jphs.11R04CR
2. 徳山尚吾, 原田慎一, 藤田 (濱邊) 和歌子, 脳梗塞治療における新たなアプローチー脳虚血障害発症後の耐糖能異常制御の観点からー, 医療薬学, 37, 515-520, 2011. (査読有り)
DOI: 10.5649/jjphs.37.515
3. 藤田 (濱邊) 和歌子, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレスによる高血糖と神経障害発現に及ぼす抗糖尿病薬メトホルミンの有効性, YAKUGAKU ZASSHI, 131, 533-538, 2011. (査読有り)
DOI: 10.1248/yakushi.131.533

[学会発表] (計 33 件)

(国内学会)

1. 原田慎一, 山崎由衣, 徳山尚吾, 視床下部-延髄系を介した Orexin-A による脳虚血性耐糖能異常および神経障害の発現抑制機構, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日 - 30 日 (横浜)
2. 山崎由衣, 西岡宏記, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性耐糖能異常を介した神経障害発現の増悪に対する脳内 sodium-glucose transporter の関与, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日 - 30 日 (横浜)
3. 西岡宏記, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 全脳虚血モデルにおける神経障害発現に対する sodium-glucose transporter の関与, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日 - 30 日 (横浜)
4. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Influence of hepatic vagotomy on the recovery of post-ischemic glucose intolerance and neuroprotective effect induced by intra-hypothalamic orexin-A, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21 日 - 23 日 (福岡)
5. 原田慎一, 徳山尚吾, Orexin-A による脳虚

- 血後の糖代謝制御に対する視床下部-延髄系の関与, 第 122 回日本薬理学会近畿部会, 2012 年 11 月 16 日 (大阪)
6. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血誘導性高血糖状態における神経障害の発現と脳内 sodium-glucose transporter の関与, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012, 2012 年 9 月 1 日 (神戸)
 7. 原田慎一, 徳山尚吾, 視床下部における orexin-A が脳虚血性耐糖能異常および神経障害の発現に及ぼす影響, 第 121 回日本薬理学会近畿部会, 2012 年 6 月 29 日 (徳島)
 8. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, Orexin-A による脳虚血性耐糖能異常発現抑制における視床下部 BDNF の関与, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日 - 31 日 (北海道)
 9. 山崎由衣, 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, 脳虚血性神経障害発現に対する脳内 sodium-glucose transporter の関与, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日 - 31 日 (北海道)
 10. Shinichi Harada, Wakako Fujita-Hamabe, Shogo Tokuyama, Involvement of hypothalamic orexin-A and/or BDNF in the development of post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage, 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 14 日 - 16 日 (京都)
 11. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, 脳虚血後高血糖および神経障害発現に対する視床下部 orexin-A の影響, 第 21 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2012 年 3 月 13 日 (京都)
 12. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, 脳虚血性神経障害に対する BDNF の視床下部を介した糖代謝制御の影響, 第 120 回日本薬理学会近畿部会, 2011 年 11 月 11 日 (京都)
 13. 藤田和歌子, 志智加奈子, 原田慎一, 溝口博之, 山田清文, 鍋島俊隆, 徳山尚吾, 酸化ストレス誘発神経細胞死における MMP-9 による NCAM 分解の関与, 第 120 回日本薬理学会近畿部会, 2011 年 11 月 11 日 (京都)
 14. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, 脳虚血後の耐糖能異常に伴う神経障害発現に対する神経ペプチド orexin-A の役割, 第 61 回日本薬学会近畿支部大会, 2011 年 10 月 22 日 (神戸)
 15. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, BDNF 視床下部内局所投与による脳虚血後の糖代謝制御を介した神経保護作用, 生体機能と創薬シンポジウム 2011, 2011 年 9 月 1 日 - 2 日 (東京)
 16. 原田慎一, 岸本真弥, 中本賀寿夫, 藤田和歌子, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷後の糖代謝異常と神経障害発現に対する Honokiol の影響, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011, 2011 年 8 月 31 日 (東京)
 17. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, 脳虚血後高血糖および神経障害発現に対する orexin-A 視床下部内局所投与の影響, 第 119 回日本薬理学会近畿部会, 2011 年 7 月 8 日 (名古屋)
 18. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, Orexin-A による脳虚血誘導性耐糖能異常発現の抑制機序における BDNF の関与, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日 - 31 日 (静岡)
 19. 藤田和歌子, 志智加奈子, 原田慎一, 徳山尚吾, 酸化ストレス負荷による神経細胞死と NCAM 180 の分解, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日 - 31 日 (静岡)
 20. Shinichi Harada, Wakako Fujita-Hamabe, Shogo Tokuyama, Effect of orexin-A on post-ischemic glucose intolerance and the ischemic neuronal damage, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22 日 - 24 日 (横浜)
 21. 藤田和歌子, 志智加奈子, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷による神経細胞死—MMP-9 を介した NCAM-180 分解の関与, 第 20 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2011 年 3 月 21 日 (東京)
 22. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, Orexin-A による脳虚血後高血糖および神経障害発現の抑制, 第 118 回日本薬理学会近畿部会, 2010 年 11 月 19 日 (大阪)
 23. 原田慎一, 藤田和歌子, 中本賀寿夫, 徳山尚吾, 血糖値制御因子を介した虚血後高血糖抑制による神経障害への影響, 第 21 回霧島神経薬理フォーラム, 2010 年 8 月 20 日 - 22 日 (神戸)
 24. 原田慎一, 藤田和歌子, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷による耐糖能異常発現ならびに糖代謝制御部位における BDNF 発現量変化, 第 117 回日本薬理学会近畿部会, 2010 年 7 月 8 日 (徳島)
- (国際学会)
1. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Suppressive effect of brain-derived neurotrophic factor on the development of post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage, NEUROSCIENCE 2012, October 13-17, 2012, New Orleans, USA.
 2. Shogo Tokuyama, Yui Yamazaki, Shinichi

- Harada, Glucose intolerance and neuronal damage through cerebral sodium-glucose transporter after ischemic stress, NEUROSCIENCE 2012, October 13-17, 2012, New Orleans, USA.
3. Shinichi Harada, Wakako Fujita, Shogo Tokuyama, Suppressive effect of orexin-A on the development of post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage, NEUROSCIENCE 2011, November 12-16, 2011, Washington DC, USA.
 4. Shogo Tokuyama, Kanako Shichi, Shinichi Harada, Wakako Fujita-Hamabe, Hiroyuki Mizoguchi, Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima, Involvement of matrix metalloproteinase-mediated proteolysis of neural cell adhesion molecule in the development of cerebral ischemic neuronal damage, NEUROSCIENCE 2011, November 12-16, 2011, Washington DC, USA.
 5. Shinichi Harada, Wakako Fujita, Shogo Tokuyama, Effect of peripheral and central AMP-activated protein kinase activation on post-ischemic hyperglycemia and on ischemic neuronal damage, NEUROSCIENCE 2010, November 13-17, 2010, San Diego, USA.
 6. Shogo Tokuyama, Shinichi Harada, Wakako Fujita, Alteration of BDNF and TrkB in the regions regulating glucose metabolism after cerebral ischemic stress, NEUROSCIENCE 2010, November 13-17, 2010, San Diego, USA.

(シンポジウム)

1. 原田慎一, 山崎由衣, 徳山尚吾, 脳血管障害発症における危険因子としての耐糖能異常, 生体機能と創薬シンポジウム 2012, 2012年8月30日—31日(神戸)
2. Shinichi Harada, Yui Yamazaki, Shogo

- Tokuyama, The development of post-ischemic glucose intolerance induced by cerebral neuronal damage and the involvement of communication system between brain and peripheral tissues, 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21日—23日(福岡)
3. Wakako Fujita, Shinichi Harada, Hiroyuki Mizoguchi, Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima, Shogo Tokuyama, The involvement of matrix metalloproteinase and its target molecule, neural cell adhesion molecules, in the development of brain brain infarction, 第85回日本薬理学会年会, 2012年3月14日—16日(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳山 尚吾 (Tokuyama Shogo)
神戸学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 70225358

(2) 研究分担者

中本 賀寿夫 (Nakamoto Kazuo)
神戸学院大学・薬学部・講師
研究者番号: 30432636

藤田 (濱邊) 和歌子 (Fujita-Hamabe Wakako)
神戸学院大学・薬学部・講師
研究者番号: 30382328
2010-2011年度 (2012年度退職のため)