

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592147

研究課題名(和文) 2型糖尿病合併脳梗塞における虚血性細胞障害増悪のメカニズムの追求と新規治療の試み

研究課題名(英文) The mechanisms of brain ischemic cell damage with type 2 diabetes and new therapeutic approaches.

研究代表者

桂 研一郎 (Ken-ichiro, Katsura)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：50297892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで糖尿病の脳梗塞モデルは確立されたものが存在していない。そこで再現性のある脳梗塞モデルを作成するために、一側中大脳動脈90分閉塞および、対側の内頸動脈を15分、30分、45分閉塞するモデルを作成したところ、一側90分中大脳動脈閉塞および15分総頸動脈閉塞がもっとも再現性がよく適度な脳虚血が作成されることが判明した。脳保護効果をもつと推察されるバルプロ酸に着目し、まずその脳保護効果を確認するために、脳虚血後に時間をかえて投与し、虚血90分後に投与しても脳保護効果が存在することを示し、骨髄単核球移植との併用における保護効果を、抗アポトーシス作用、抗酸化作用、抗炎症作用の点から検討した。

研究成果の概要(英文)：We tried to explore the appropriate transient middle cerebral artery occlusion model with type 2 diabetic rats. We tried to compare the 90 min occlusion of middle cerebral artery, together with the common carotid artery for 15min, 30min, and 45 min, individually. Ninety min occlusion of middle artery occlusion with 15 min common carotid artery occlusion model was appeared to be best in our condition. We also explore the brain protective mechanisms of valproic acid, and explored the combination effects with bone marrow mononuclear cell transplantation therapy, from the points of view of anti-apoptotic, anti-oxidative damage, and anti-inflammatory effects.

研究分野：脳卒中学

キーワード：脳梗塞 糖尿病 骨髄単核球移植 バルプロ酸 併用療法 虚血モデル

1. 研究開始当初の背景

脳虚血分野の研究は主に正常血糖ラットを用いて行われてきており、脳梗塞を増悪させる糖尿病状態における研究はあまり行われてこなかった。正常血糖時と高血糖時の脳虚血の病態は異なる可能性があり、その細胞障害メカニズムを明らかにしなければ、治療法の開発にも障害がでる可能性があった。

2. 研究の目的

急性高血糖モデルやストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット(主に1型糖尿病モデル)において脳虚血を行うと細胞障害が増強することはこれまで報告されてきたが、2型糖尿病(インスリン非依存型)のモデル動物でありインシュリン抵抗性もある2型糖尿病ラット(GKラット)モデルをつかった脳虚血の研究はかぎられており、2型糖尿病脳梗塞モデルにおける細胞死のメカニズムが、正常血糖モデルと同様であるかどうかは不明であり、まずこれについて第一に検討する。次に、正常血糖ラットにおいて有効であると報告されている治療(骨髄単核球移植、pioglitazone, GLP-1 agonist など)が GK ラット脳梗塞モデルに有効であるか確認する。さらに、臨床への応用を考え、脳梗塞急性期の血糖コントロールが有効であるかどうかも検討する。

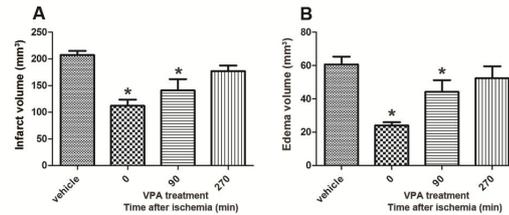
3. 研究の方法

GKラット一過性局所脳虚血モデルを用い、急性期の血糖の変化を観察する(虚血前、再灌流直前、再灌流後30分、1、3、6、24時間後に観察)、正常血糖群における血糖の推移と比較する。次に、GKラット群の血糖をインスリンなどによりコントロールすることにより果たして予後が良くなるかどうかを検討する。通常血糖ラットで有効とされたインスリンの血管内投与、glucagon-like peptide-1(GLP-1:エキセナチド)の静脈内投与、PPAR-agonistであるpioglitazoneの腹腔内投与により、虚血後の血糖の推移がどのように影響されるかを観察し、一週間後に神経徴候を観察したのち灌流固定し、ペナンプラにおける細胞死についてBcl-2, Bax, Tunel, caspase-3,などを染色し、apoptosisと抗酸化作用、抗炎症作用との関与を観察し、正常血糖群と比較する。

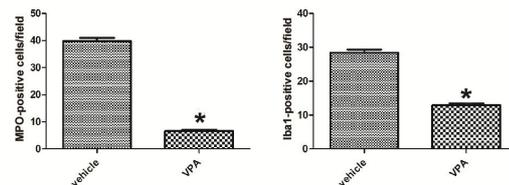
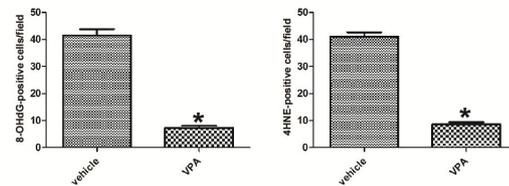
4. 研究成果

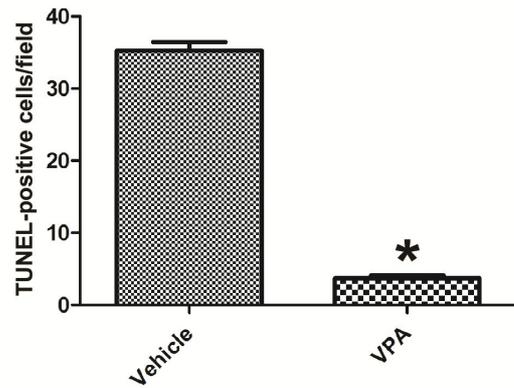
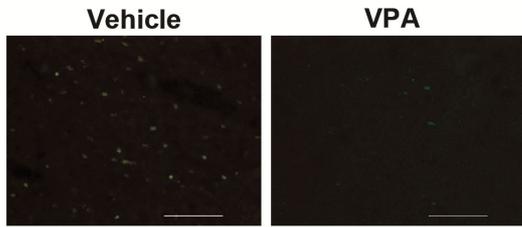
GKラットを使用して脳虚血を作成してみたところ、正常血糖ラット(SDラット)を用いて作成した場合とことなり、脳梗塞体積の大きさが不安定であり、通常の中大脳動脈一過性閉塞モデルでは適当でないことが判明した。そこで、一側中大脳動脈を90分間閉塞しさらに同側の総頸動脈を15分、30分、45分閉塞するモデルを作成し、虚血モデルの妥当性を検討した。その結果90分中大脳動脈閉塞および15分総頸動脈閉塞追加群が最

も再現性が高いモデルであることが判明した。それらの実験と平行して脳保護効果が報告されているバルプロ酸を虚血後に投与して虚血開始後の治療可能時間がどのくらいであるかを検討した。結果は虚血後90分後投与までは効果が見られたが、270分後に投与した場合は効果がみられなかった。



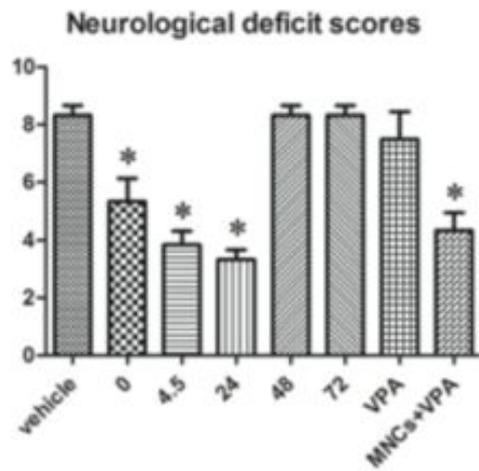
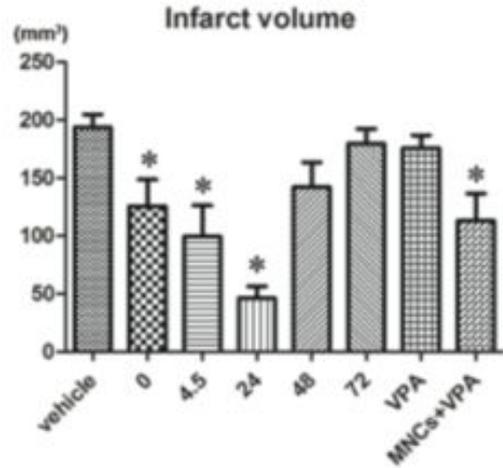
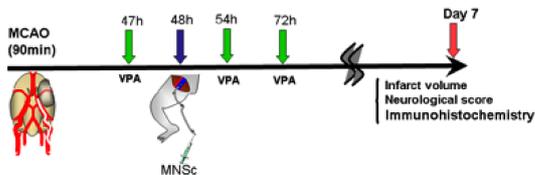
そのメカニズムとしては、抗酸化作用、抗炎症作用および抗アポトーシス作用がみとめられた。



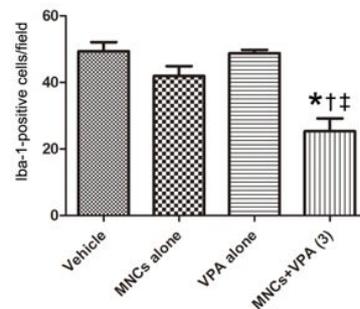
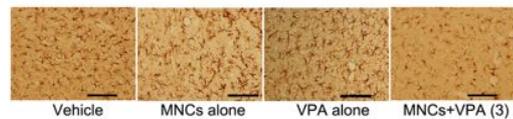


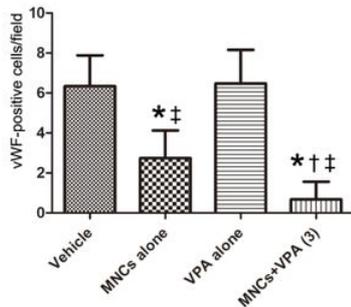
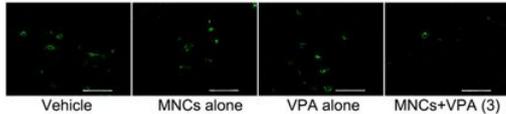
次に、骨髄単核球移植とバルプロ酸の併用療法について検討した。まず骨髄単核球単独投与の場合は、虚血後 24 時間までは効果がみられた。次にバルプロ酸を骨髄単核球投与の一時間前、5 時間後、24 時間後の 3 回投与を併用すると、単独では効果のなかった。虚血後 48 時間での骨髄単核球投与で有意の保護効果が得られた。

- Experimental group
 I) vehicle
 II) MNCs alone (1×10^7 cells)
 III) VPA alone (300mg/kg, 3 times)
 IV) MNCs plus VPA



そのメカニズムとしては、抗炎症作用および血管保護作用を増強することで保護効果を発揮したと考えられる。





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 2 件)

Suda, S., Katsura, K., Kanamaru, T., Saito, M., & Katayama, Y. (2013). Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2013 May 5;707:26-31. (査読有り)

Suda, S., Katsura, K., Saito, M., Kamiya, N., & Katayama, Y. (2014). Valproic acid enhances the effect of bone marrow-derived mononuclear cells in a rat ischemic stroke model. *Brain Research*, 1565, 74-81. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

桂 研一郎 脳保護療法の新しい試み
第 38 回日本脳卒中学会総会 2013 年 3 月東京

桂 研一郎 骨髄単核球移植およびバルプロ酸併用療法 第 26 回日本脳循環代謝学会総会 2014 年 11 月岡山

須田智、桂 研一郎ら
ラット一過性局所脳虚血モデルにおけるバルプロ酸の神経保護効果 2013 年 3 月東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂 研一郎 (KATSURA, Kenichiro)
国際医療福祉大学三田病院
予防医学センター・神経内科 教授
研究者番号：50297892

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：