

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750366

研究課題名(和文) 中枢-末梢臓器間連関を介したエポックメイキングな脳梗塞治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of epoch-making cerebral stroke treatment through 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、視床下部を介して末梢組織での糖代謝を制御する神経ペプチド orexin-A の迷走神経を介した虚血後高血糖ならびに神経障害発現に及ぼす影響について検討した。

本研究から、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。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消失したことから、それには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。

研究成果の概要(英文)：Past studies have also suggested that hyperglycemia and/or glucose intolerance following stroke may be associated with greater mortality and reduced functional recovery. In a focal cerebral ischemic model, post-ischemic glucose intolerance is one of the triggers of ischemic neuronal damage. However, the mechanisms remain unclear. The aim of this study was to determine the involvement of the hepatic vagus nerve on hypothalamic orexin-A-mediated suppression of post-ischemic glucose intolerance development and ischemic neuronal damage. I clearly found that the hepatic branch vagus nerve projecting from the medulla oblongata plays an important role in the recovery of post-ischemic glucose intolerance and mediates a neuroprotective effect by hypothalamic orexin-A. In conclusion, these findings provide some insight into the therapeutic effectiveness of this endogenous neuropeptide for its communication between brain and peripheral tissues via the autonomic nervous system.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：脳虚血ストレス 耐糖能異常 orexin-A 中枢末梢臓器間連関

1. 研究開始当初の背景

我が国の三大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。

現在、脳卒中の発症に関与する因子は数多く報告されているが、その中でも、糖尿病または高血糖状態が重要な危険因子であることはよく知られている。さらに最近では、糖尿病の既往歴のない人でも、脳卒中発症後に高血糖を呈し、それをインスリンにより厳格に制御することにより死亡率が抑制されるという報告がなされている。これに関し、申請者は、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肝臓におけるインスリン抵抗性を介した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; J. Pharmacol. Sci., 2011)。

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。そこで本申請者は、脳虚血ストレス負荷後の血糖値変化を制御できる内因性生理活性ペプチドを探索することを目的として、近年中枢末梢臓器間連関により、視床下部を介して末梢組織での糖代謝を制御することが報告された神経ペプチド orexin-A の関与に着目した。

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を解明する。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。さらに、中枢-末梢臓器間連関を担う生理活性神経ペプチドである orexin-A その受容体である orexin 受容体そのストレスセンサーとなる可能性についても明らかにし、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、局所脳虚血モデルは、2 時間の中大脳動脈閉塞法 (MCAO)、vagotomy 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。Orexin-A (5 pmol/mouse) は、MCAO 直後に単回視床下部内局所投与した。Orexin-1 受容体拮抗薬である SB334867 (200 pmol/mouse) は、orexin-A 投与 30 分前に延髄内に局所投与した。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、insulin 受容体 (InsR)、リン酸化 InsR (p-InsR)、糖新生関連酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) ならびに glucose-6-phosphatase (G6Pase) のタンパク質発現の変化は western blot 法によって解析した。さらに延髄弧束核における神経活性マーカーである c-Fos、orexin-1 受容体および迷走神経のマーカーである choline acetyltransferase の発現変化は蛍光免疫染色法を用いて評価した。

4. 研究成果

Orexin-A は、MCAO 1 日後の FBG の上昇、肝臓における InsR および p-InsR の発現減少ならびに PEPCK および G6Pase の発現上昇、および MCAO 3 日後の梗塞巣形成、行動障害ならびに学習・記憶障害発現を有意に抑制した。これらの作用は、延髄への SB334867 処置 または、肝臓枝迷走神経の切除によって有意に消失した。また迷走神経の起始核である延髄弧束核において、orexin-A の視床下部内投与によって上昇する c-Fos と choline acetyltransferase、および orexin-1 受容体と choline acetyltransferase の共局在が認められた。

以上の結果から、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インスリン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、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。このように、中枢領域における内因性生理活性ペプチドの活性調節や全身性の耐糖能異常の改善が脳梗塞に対する

新たな治療戦略の 1 つとして有用である可能性がある。

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 8 件)

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. Shigeyuki Tamiya, Yuki Yoshida, Shinichi Harada, Kazuo Nakamoto, Shogo Tokuyama, Establishment of a central post-stroke pain model using global cerebral ischemic mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 65, 615-620, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1111/jphp.12007
3. Shinichi Harada, Yui Yamazaki, Hiroki Nishioka, Shogo Tokuyama, Neuroprotective effect through the cerebral sodium-glucose transporter on the development of ischemic damage in global ischemia, *Brain Res.*, 1541, 61-8, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.brainres.2013.09.041
4. Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Sodium-glucose transporter type 3 mediated neuroprotective effect of acetylcholine suppress the development of cerebral ischemic neuronal damage, *Neuroscience*, 269C, 134-142, 2014.(査読有り)
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.046
5. Shinichi Harada, Yui Yamazaki, Shuichi Koda, Shogo Tokuyama, Hepatic branch vagus nerve plays a critical role in the recovery of post-ischemic glucose intolerance and mediates a neuroprotective effect by hypothalamic orexin-A, *PLoS One*, 9, e95433, 2014. (査読有り)
DOI: 10.1371/journal.pone.0095433
6. Shinichi Harada, Yuka Haruna, Fuka Aizawa, Wataru Matsuura, Kazuo Nakamoto, Takuya Yamashita, Fumiyo Kasuya, Shogo Tokuyama, Involvement of GPR40, a long-chain free fatty acid receptor, in the production of central post-stroke pain after global cerebral ischemia, *Eur. J. Pharmacol.*, 744, 115-123, 2014. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.09.036.
7. 原田慎一, 山崎由衣, 徳山尚吾, 脳血管障害誘導性耐糖能異常の発現における中枢-末梢臓器間連関機構の関与, 日本

薬理学雑誌, 142, 4-8, 2013. (査読有り)
DOI: 10.1254/fpj.142.4

8. 原田慎一, 脳虚血性耐糖能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, *YAKUGAKU ZASSHI*, 134, 1055-1060, 2014. (査読有り)
DOI: 10.1248/yakushi.14-00171

[学会発表](計 47 件)

(国内学会)

1. 山崎由衣, 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の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter 3 の関与, 第 123 回日本薬理学会近畿部会, 2013 年 7 月 12 日(愛知)
2. 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 を介した神経障害発現機序の解明, 第 24 回霧島神経薬理フォーラム, 2013 年 8 月 17 日 - 18 日(大分)
3. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血誘導性耐糖能異常を介した神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 3 の役割, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013, 2013 年 8 月 31 日(熊本)
4. 春名柚佳, 原田慎一, 中本賀寿夫, 徳山尚吾, 長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した脳卒中後疼痛制御機構の解明, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013, 2013 年 8 月 31 日(熊本)
5. 原田慎一, 中本賀寿夫, 森隆治, 徳山尚吾, 脳虚血性学習・記憶障害に対するチヨロギの効果, 第 23 回日本医療薬学会, 2013 年 9 月 21 日 - 22 日(仙台)
6. 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性耐糖能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, 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2013 年 10 月 12 日(京都)
7. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血後高血糖誘導性神経障害の発現増悪における sodium-glucose transporter の役割, 第 124 回日本薬理学会近畿部会, 2013 年 11 月 1 日(京都)
8. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血後高血糖を介した神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 3 の関与, 第 7 回日本薬局学会学術総会, 2013 年 11 月 23 日 - 24 日(大阪)
9. 春名柚佳, 原田慎一, 中本賀寿夫, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛に対する長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の関与, 第 7 回日本薬局学会学術総会, 2013 年 11 月 23 日 - 24 日(大阪)
10. 原田慎一, 徳山尚吾, Orexin-A の虚血

- 性耐糖能異常および神経障害発現に対する迷走神経の関与, 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2014 年 3 月 18 日 (仙台)
11. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 3 を介した脳保護作用の解明, 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2014 年 3 月 18 日 (仙台)
 12. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Suppressive effect of orexin-A on the development of post-ischemic glucose intolerance-induced neuronal damage mediated hypothalamus-medulla oblongata-vagus nerve axis, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日 - 21 日 (仙台)
 13. Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, The involvement of cerebral sodium-glucose transporter type 3 on focal cerebral ischemia, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日 - 21 日 (仙台)
 14. 荻原沙知, 西岡宏記, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 全脳虚血誘発神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter を介した保護作用, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 - 30 日 (熊本)
 15. 原田慎一, 山崎由衣, 徳山尚吾, 脳虚血性耐糖能異常および神経障害発現に対する視床下部-迷走神経を介した orexin-A の抑制作用, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 - 30 日 (熊本)
 16. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, Sodium-glucose transporter type 3 を介した脳虚血誘導性神経障害の発現抑制作用に対するアセチルコリン神経の関与, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 - 30 日 (熊本)
 17. 春名柚佳, 松浦涉, 原田慎一, 中本賀寿夫, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛に対する長鎖脂肪酸受容体 GPR40 およびアストロサイトの関与, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 - 30 日 (熊本)
 18. 小野安紀子, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 酸化ストレスによる細胞死に対する SGLT の関与と AMPK による制御, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 - 30 日 (熊本)
 19. 辻田司, 木村麻希, 原田慎一, 森隆治, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷による学習・記憶障害に対するチョコロギの保護効果, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 - 30 日 (熊本)
 20. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血誘導性耐糖能異常を介した神経障害発現に対する脳内 sodium-glucosetransporter type 1 の関与, 第 125 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 6 月 20 日 (岡山)
 21. 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性耐糖能異常および神経障害発現における視床下部 orexin-A の役割, 第 25 回霧島神経薬理フォーラム, 2014 年 8 月 15 日 - 17 日 (愛媛)
 22. 小野安紀子, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 過酸化水素 / グルコース負荷後の神経細胞死発現における AMPK を介した SGLT による制御の解明, 生体機能と創薬シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 28 日 - 29 日 (大阪)
 23. 春名柚佳, 原田慎一, 中本賀寿夫, 徳山尚吾, 脳卒中後疼痛制御機構における長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の関与, 生体機能と創薬シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 28 日 - 29 日 (大阪)
 24. 辻田司, 原田慎一, 森隆治, 徳山尚吾, 脳虚血およびスコポラミン誘発性学習・記憶障害に対するチョコロギの予防効果, 生体機能と創薬シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 28 日 - 29 日 (大阪)
 25. 木村麻希, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 虚血性神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 3 の acetylcholine 神経系を介した脳保護作用, 生体機能と創薬シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 28 日 - 29 日 (大阪)
 26. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血後高血糖誘導性の神経障害の発現増悪に対する脳内 sodium-glucose transporter type 1 の役割, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014, 2014 年 8 月 30 日 (大阪)
 27. 原田慎一, 徳山尚吾, Orexin-A による迷走神経を介した脳虚血後の糖代謝制御および神経障害発現への影響, 第 126 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 10 月 24 日 (和歌山)
 28. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血後高血糖に起因する神経障害の進展に対する脳内 sodium-glucose transporter type 1 の関与, 第 126 回日本薬理学会近畿部会, 2014 年 10 月 24 日 (和歌山)
 29. Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, The involvement of cerebral sodium-glucose transporter type 1 on focal cerebral ischemia, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 日 - 20 日 (名古屋)
 30. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Suppressive effect of orexin-A through vagus nerve on the development of post-ischemic glucose intolerance-induced neuronal damage, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 日 - 20 日

(名古屋)

31. 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性耐糖能異常および神経障害の発現に対する迷走神経を介した orexin-A の抑制作用, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
32. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳内 sodium-glucose transporter を介した Na⁺ の細胞内流入が脳虚血性神経障害発現に及ぼす影響, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
33. 荻原沙知, 小野安紀子, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 過酸化水素 / グルコース負荷後の神経細胞死発現に対する sodium-glucose transporter type 1 の関与, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
34. 宮城景, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス負荷後のインスリン分泌に対する TrkA の関与, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
35. 景山絵理香, 松浦涉, 原田慎一, 徳山尚吾, 全脳虚血誘導性痛覚過敏に対する各種神経障害性疼痛治療薬の影響, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
36. 元日田まりな, 辻田司, 原田慎一, 森隆治, 徳山尚吾, 脳虚血ストレス誘導性耐糖能異常および神経障害発現に対するチョコロギの影響, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
37. 松浦涉, 春名柚佳, 原田慎一, 劉克約, 西堀正洋, 徳山尚吾, 全脳虚血誘導性痛覚過敏に対する high mobility group box-1 の関与, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
38. 有田恭子, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter-1 の関与, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)
39. 平良美沙登, 荻原沙知, 小野安紀子, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, AMP-activated protein kinase が脳虚血性神経障害発現に及ぼす影響, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日 (神戸)

(国際学会)

1. Shogo Tokuyama, Shinichi Harada, Kazuo Nakamoto, Establishment of a central post-stroke pain model using global cerebral ischemic mice, The International Narcotics Research Conference 2013, July 14-19, 2013, Cairns, Australia.
2. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Interaction of orexin-A and BDNF in hypothalamus on the development of post-ischemic glucose intolerance and

neuronal damage, NEUROSCIENCE 2013, November 9-13, 2013, San Diego, USA.

3. Shogo Tokuyama, Yui Yamazaki, Shinichi Harada, Role of cerebral sodium-glucose transporter on the development of neuronal damage after focal and global ischemic stress, NEUROSCIENCE 2013, November 9-13, 2013, San Diego, USA.
4. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, The role of vagus nerve in the recovery of post-ischemic glucose intolerance and neuroprotective effect by hypothalamic orexin-A, NEUROSCIENCE 2014, November 15-19, 2014, Washington DC, USA.

(シンポジウム)

1. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳虚血性神経障害における新規治療ターゲットとしての脳内 sodium-glucose transporter の有用性, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 - 30 日 (熊本)
2. Shinichi Harada, Shogo Tokuyama, Involvement of communication system between brain and peripheral tissues on the development of post-ischemic glucose intolerance induced by cerebral neuronal damage, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 日 - 20 日 (名古屋)
3. 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾, 脳梗塞新規治療ターゲット - 脳内 sodium-glucose transporter の可能性 -, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日

(日本薬学会近畿支部奨励賞受賞講演)

1. 原田慎一, 脳虚血性耐糖能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 - 視床下部-延髄-迷走神経系が肝臓の糖代謝調節に対して担う機能 -, 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日 (京都)

〔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〕

日本薬学会近畿支部奨励賞 (2014 年 1 月)

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