

脳血管疾患は、日本人の死因の第 4 位に位置し、中でも脳梗塞による死因が高い。脳梗塞は、寝たきりの主要な原因となり、患者の QOL を著しく低下させることから、大きな社会問題として、その対策が急務となっている。一方、糖尿病は、世界の成人人口の約 3 億 6600 万人が抱える疾病であり、年間 460 万人以上が糖尿病の合併症で死亡している。これまでに、糖尿病併発時に虚血性脳障害が悪化すること [1]、さらに予後の不良や死亡率の増大をきたすことが報告されているものの、これらの詳細なメカニズムは明らかではない。

本研究は、糖尿病に一過性脳虚血を併発した際に生じる脳梗塞の増悪機序を明らかにし、その治療・予防に寄与できる機能的食品の評価とその有用性を提起することを目的とした。

第 1 章 糖尿病態時の虚血性脳障害

1 週間馴化した 5 週齢の SD ラットにストレプトゾトシン (50 mg/kg) を単回で腹腔内投与し、血糖値が 300 mg/dL 以上の動物を 5 週間飼育して糖尿病態 (DM) ラットとした。また、クエン酸緩衝液のみを投与した群を非糖尿病態 (non-DM) とした。脳組織の過酸化脂質含量は、non-DM 群と比べて、DM 群で有意に増加した。また、抗酸化酵素の活性は、DM 群で有意に低下していた。続いて、一過性脳虚血モデルは、ラットの中大脳動脈に塞栓糸を挿入して血管を閉塞 (MCAO) させ、2 時間後に栓糸を引き抜く中大脳動脈閉塞/再灌流 (MCAO/Re) 処置後、脳を摘出し、冠状切片の TTC 染色像から梗塞巣体積を測定した。その結果、non-DM では、MCAO/Re 後徐々に梗塞巣体積が増加したのに対し、DM 群では、再灌流早期から梗塞巣が確認された。そこで、障害悪化のメカニズムを推定するために、DNA マイクロアレイ法により解析した結果、DM の MCAO/Re 後の変動遺伝子数は、non-DM と比べて著しく増加していた。さらに、Real time RT-PCR 法により発現の推移を解析した。DM ラットでは、non-DM と比べて sham 群においてすでに TNF- α 、IL-1 β の発現が上昇しており、加えて、虚血/再灌流処置早期からこれらの発現が顕著に上昇した。

第 2 章 脳障害時のシグナル伝達因子の作用解析

虚血性脳障害後の炎症反応に着目し、high mobility group box 1 (HMGB1) を指標として、non-DM と DM ラットでの挙動と脳障害との関連を比較検討した。HMGB1 は、DNA 結合性非ヒストンタンパク質として細胞の核内に存在しているが、活性化したマクロファージやネクロースによって核内から細胞外へ放出される。遊離した HMGB1 は、receptor for advanced glycation end products (RAGE) あるいは toll-like receptor (TLR) を介して NF- κ B を活性化し、炎症反応を誘導する。本章では、DM ラットにおける一過性脳虚血後の障害悪化への HMGB1 の関与と細胞内シグナル伝達系の活性化について検討した。遊離した HMGB1 量の評価した結果、non-DM と DM 両群の sham において、HMGB1 はほとんど検出されなかったのに対して、non-DM 群で MCAO/Re 後経時的に増加した。一方、DM 群では、再灌流 1 時間後に急激に増加した。次に、RAGE および TLR4 量を解析した結果、DM ラットでは、MCAO/Re

後発現が増大した。続いて、細胞内のシグナル伝達因子の活性化状態を解析した。DM 群では ERK1/2、p38 リン酸化および NF-κB の核内移行は、虚血処置によって増加した。

第 3 章 エタネルセプト(ETN)を用いた虚血性脳障害改善作用の検討

ETN は、可溶性 TNF-α レセプターとして遊離の TNF-α を捕捉中和して炎症のカスケードを遮断する分子標的治療薬である。そこで本章では、ETN が MCAO/Re 初期に産生される TNF-α の作用を阻害して一連の炎症反応を抑制することで、脳障害の抑制効果が認められるか否かについて検討した。その結果、non-DM 群では、虚血前投与および虚血直後での 450 μg/kg 投与で有意に低下した。一方、DM 群では、non-DM 群で効果が認められた条件において改善は認められなかったが、反復投与群で改善傾向が認められた。

第 4 章 抗酸化能を有する食品・食品成分と医薬品による虚血性脳障害改善作用の検討

治療の概念から脳虚血以前の投薬は考えにくい。そこで、糖尿病が脳梗塞の危険因子であるとの理由が MCAO/Re 以前の炎症や酸化ストレス状態に起因し、その結果併発によって脳障害が増悪するとすれば、初期の炎症反応や酸化ストレスを低減させることで、脳障害を軽減できるのではないかと考えられる。本章では、薬剤の代替として日常的に摂取する食品により、脳障害の軽減が可能か否かを検討した。今回用いた霊芝菌糸体培養培地抽出物(MAK)は、抗酸化作用などの生理活性を持つ健康食品として知られている。MAK (1 g/kg/day) を 2 週間経口投与することによって、MCAO/Re による梗塞巣形成が顕著に抑制された。次に、MAK の脳保護効果を脳保護薬エダラボン (10 mg/kg/day) の単回投与群と比較検討した結果、non-DM 群では、両群ともに、再灌流 24、72 時間後において顕著な脳保護効果を示した。一方、DM の MAK 投与群では、再灌流 24 時間後では効果が認められたものの、72 時間後では著しい脳障害が観察された。また、エダラボン投与群においては両時間とも改善効果は認められなかった。そこで、MAK を投与したラットに MCAO/Re 後エダラボンを投与して、MAK とエダラボンの併用効果を検討した結果、non-DM 群では梗塞巣が確認されず、さらに DM 群においても、再灌流 72 時間後の脳障害が著しく改善した。

結論

本研究では、遺伝子の網羅的発現解析を通して、虚血性脳障害メカニズムの全体像を明らかにすることができた。特に、糖尿病態下で脳虚血を併発した際の脳障害の増悪が酸化ストレスに起因し、遊離した HMGB1 量と炎症反応が相関して脳障害が促進されることを明らかにした。一方、脳障害の軽減を目的とした炎症反応のカスケードを遮断する薬物療法では、十分な改善作用は認められなかった。しかし、体内酸化ストレス度を軽減する食品・食品成分が、脳障害のリスク軽減に寄与する可能性を見出し [1]、脳保護薬との併用が患者の QOL 向上に極めて有効であるとする基礎的データを提供することができた。

引用文献

1. Iwata, N., Okazaki, M., et al., 2008. Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic Rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **61**, 119-127.

論文審査の結果の要旨

一過性脳虚血時には酸化ストレスが生じ、これを起因とする炎症関連因子などの発現が亢進することで脳障害が進行する。中でも、糖尿病態に脳虚血を併発した場合、脳障害が急激に悪化することが報告されているが、この障害に至る細胞内の現象を多面的に解析する研究はなされていない。

本論文では、ラットを用いて虚血時の脳障害メカニズムを遺伝子の網羅的な発現解析から検証するとともに、糖尿病併発時の脳梗塞の増悪機序を解明することを第一の目的としている。加えて、脳障害の軽減に食品の三次機能としての生体調節機能を利用することが有効であるとの考えから、抗酸化能を指標とした機能性食品による脳障害悪化のリスク低減効果を評価するとともに、既存の医薬品との併用による有効性を評価して、臨床応用へと発展させるために必要な実験動物での情報を得ることを第二の目的としている。

第一章では、一過性脳虚血時の酸化ストレス状態を評価するとともに、虚血後の経時的な脳細胞での遺伝子発現について、DNA マイクロアレイ解析を行っている。この網羅的な情報を用いて行ったクラスター解析、パスウェイ解析の結果から、虚血時の細胞内シグナル伝達系を詳細に明らかにした。さらに、ストレプトゾトシン投与による糖尿病態ラットで一過性脳虚血を誘導した際に生じる脳梗塞の増悪機序を、特異な遺伝子の発現パターンに基づいて推定している。その結果、虚血時には病態の有無に関らず脳組織が酸化ストレス状態に陥ること、特に糖尿病態ではその状態が著しいことを見出した。加えて、糖尿病態では虚血処置前から体内酸化ストレスが亢進しており、脳組織内の抗酸化酵素の活性低下にともない過酸化脂質量が増加すること、同時に炎症反応も亢進していることを明らかにしている。この状況下で、続く虚血/再灌流を刺激としてさらなる炎症反応や細胞死のシグナルが付加されて血液脳関門が破綻し、結果として糖尿病態では非糖尿病と比べて脳障害が著しく悪化すると結論付けている。

第二章では、虚血性脳障害に酸化ストレスや炎症関連因子による細胞死が深く関与するとした第一章の知見に基づき、非糖尿病と糖尿病態間で脳細胞内外の現象を詳細に比較・検討した。その結果、糖尿病態での脳障害の増悪にネクロシスの関与が推定された。そこで、この経路のメディエーターである High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の作用機序に注目した結果、細胞内の局在変化が障害の悪化と相関していることを見出した。即ち、糖尿病態では、虚血性脳障害の早期に神経細胞などから HMGB1 が放出され、種々のサイトカインの誘導とも相まって炎症反応を惹起して悪循環を引き起こすとするもので、細胞外

HMGB1 の急激な増加が糖尿病態時の虚血性脳障害の悪化要因として、虚血中心部に加えて周辺部のペナンプラに重篤な細胞死を誘導すると結論している。

第三章では、虚血性脳障害の作用メカニズムに基づいて、炎症関連因子の中でもシグナル伝達の上流に位置する Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) に注目して、エタネルセプトを用いた治療効果を判定した。本薬物は、可溶性TNF- α レセプターとして遊離のTNF- α を捕捉中和して炎症のカスケードを遮断することで、抗リウマチ作用や抗炎症作用を発揮する生物学的製剤として使用されている。その結果、本薬物が虚血/再灌流初期に産生されるTNF- α の作用を阻害して一連の炎症反応を抑制することで、限定的ではあるものの脳障害を軽減することが明らかとなった。尚、この実験では、非糖尿病および糖尿病態ラットに対してエタネルセプトの投与時期、投与方法、投与量の種々組合せの中で効果を示す最適な条件を見出しているが、脳虚血時の治療薬としての適用の可能性については検討の余地があることを考察している。

第四章では、脳梗塞時の障害のリスク低減を目的として、機能性食品の評価とその有効性を食品単独摂取時と脳保護薬エダラボンとの併用時で検討している。その結果、虚血処置前に継続して抗酸化食品（霊芝菌糸体培養培地抽出物）を摂取することで虚血時の脳障害を一部抑制できること、さらに虚血直後にエダラボンを投与することで遅延型脳障害の悪化を著しく軽減できることを明らかにしている。特に、糖尿病態ラットにおいて抗酸化食品の継続的な摂取は、単独での効果に比べて薬物治療の併用が極めて有効であると結論している。

現在の脳梗塞治療は、選択薬の少なさや適用時期も限られているのが現状であり、脳細胞の脆弱性と低い再生能から治療の困難さは否めず、おのずと一次予防の重要性が想像できる。本論文の意義は、虚血脳障害メカニズムのみならず糖尿病態時の増悪メカニズムを解明するとともに、食品による障害時のリスク低減効果と薬物療法の有効性を証明するもので、これらの知見は脳梗塞による脳障害患者に対して Quality of Life (QOL) の低下を抑制する点で貢献できるものである。

以上、本研究結果は、日本のみならず近い将来世界規模に拡大する超高齢社会において、脳血管疾患による患者の QOL 低下に歯止めをかける対策として食事設計の概念を取り入れた代替療法とこれまでの薬物療法の融合が極めて有効であるとする知見である。従って、新規性が認められる本論文は、その独創性および研究意義の観点から、本研究科において課程によらない博士（薬学）の論文に十分値するものであると判断した。