

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

脳内 sodium-glucose transporter を介した  
虚血後高血糖による神経障害増悪機序の解明

2017 年 1 月

山 崎 由 衣



# 目次

略語一覧

序論 ..... 1

本論

第一章 虚血後高血糖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

1-1. 緒言 ..... 3

1-2. 実験材料および方法 ..... 4

1-2-1. 実験動物

1-2-2. 一過性脳虚血モデルマウスの作成

1-2-3. 塞栓子の作成

1-2-4. 空腹時血糖値の測定

1-2-5. 梗塞巣形成の評価

1-2-6. 行動異常の評価

1-2-7. Phlorizin の投与方法

1-2-8. 使用細胞 (SH-SY5Y、大脳皮質神経初代培養細胞)

1-2-9. 細胞抽出液の調製、および western blot 用サンプル調製

1-2-10. SDS-PAGE および western blot 法 (SGLT-1)

1-2-11. SH-SY5Y 細胞内のナトリウム濃度測定

1-2-12. 薬物処置と細胞生存率の評価

1-2-13. 統計学的処理

1-3. 結果 ..... 10

1-3-1. Phlorizin 投与が脳虚血性神経障害へ及ぼす継続的な影響

1-3-2. 高グルコース負荷による細胞内ナトリウム濃度変化

1-3-3. 酸化ストレス誘導性の細胞死に対する phlorizin 処置の影響

1-3-4. 高グルコース処置および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/グルコース処置による細胞死に対する phlorizin の影響

1-4. 考 察 .....	14
第二章 脳内 sodium-glucose transporter type 1 が脳虚血性神経障害の発現増悪に及ぼす影響	
2-1. 緒 言 .....	16
2-2. 実験材料および方法 .....	17
2-2-1. 脳 8 部位における組織抽出液の調製、および western blot 用サンプル調製	
2-2-2. SDS-PAGE および western blot 法 (SGLT-3、AMPK)	
2-2-3. SGLT-1 siRNA の調整ならびに処置方法 ( <i>in vivo</i> 、 <i>in vitro</i> )	
2-2-4. 脳組織切片の作製	
2-2-5. 免疫組織染色	
2-3. 結 果 .....	20
2-3-1. 脳内 SGLT-1 発現分布と SGLT-1 siRNA 脳室内投与の影響	
2-3-2. 脳内 SGLT-1 ノックダウンによる脳虚血性神経障害発現への影響	
2-3-3. 大脳皮質における脳虚血ストレス負荷後の SGLT-1 発現分布	
2-3-4. 線条体における脳虚血ストレス負荷後の SGLT-1 発現分布	
2-3-5. 脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-1 発現の継時的変化	
2-3-6. 大脳皮質神経初代培養細胞における SGLT-1 発現と SGLT-1 siRNA 処置の影響	
2-3-7. 神経 SGLT-1 ノックダウンによる細胞生存率への影響	
2-3-8. <i>In vitro</i> 虚血後高血糖モデルにおける SGLT-1 発現の誘導機序に対する AMPK の関与	
2-4. 考 察 .....	29
第三章 脳虚血ストレス負荷後の脳内 sodium-glucose transporter type 1 発現誘導機序に対する mitogen-activated protein kinase の関与	
3-1. 緒 言 .....	31
3-2. 実験材料および方法 .....	32
3-2-1. SDS-PAGE および western blot 法 (MAPK)	

3-3-2.	MAPK 阻害剤処置の方法	
3-3.	結 果	33
3-3-1.	脳虚血ストレス負荷後の脳内 MAPK 活性の継時的変化	
3-3-2.	脳虚血性神経障害発現に対する MAPK 阻害剤投与の影響	
3-3-3.	脳虚血ストレス負荷後の MAPK 活性に対する MAPK 阻害剤の影響	
3-3-4.	MAPK 阻害剤が脳虚血ストレスによる脳内 SGLT-1 発現誘導に及ぼす影響	
3-3-5.	Phlorizin 投与が脳内 MAPK 活性に及ぼす影響	
3-4.	考 察	39
第四章 脳内 sodium-glucose transporter を介したナトリウム流入が脳虚血性神経障害の発現増悪に及ぼす影響		
4-1.	緒 言	41
4-2.	実験材料および方法	42
4-2-1.	大脳皮質神経初代培養細胞内のナトリウム濃度測定	
4-2-2.	$\alpha$ -MG および phlorizin 処置の方法	
4-2-3.	マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現変化の検討	
4-3.	結 果	43
4-3-1.	$\alpha$ -MG 処置後の細胞内ナトリウム濃度変化の観察	
4-3-2.	SGLT を介したナトリウムの過剰流入が神経細胞生存率に及ぼす影響	
4-3-3.	脳虚血性神経障害の発現増悪に対する脳内 SGLT-1 を介したナトリウム流入の影響	
4-3-4.	神経 SGLT-1 を介したナトリウム流入が <i>in vitro</i> 虚血後高血糖モデルの細胞生存率へ与える影響	
4-3-5.	脳虚血性神経障害の発現増悪に対する脳内 SGLT-1 を介したナトリウム流入が及ぼす影響	
4-3-6.	マイクロアレイ解析による脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-1 下流シグナルの探索	
4-4.	考 察	49

## 第五章 脳内 sodium-glucose transporter type 3 による脳保護作用機序の解明

5-1. 緒 言 .....	51
5-2. 実験材料および方法 .....	52
5-2-1. SGLT-3 siRNA の調製ならびに投与方法	
5-2-2. ドネペジルの投与方法	
5-3. 結 果 .....	53
5-3-1. 脳内 SGLT-3 発現分布と SGLT-3 siRNA 脳室内投与の影響	
5-3-2. 脳内 SGLT-3 ノックダウンによる脳虚血性神経障害発現への影響	
5-3-3. 脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-3 発現の継時的変化	
5-3-4. 脳虚血性神経障害発現に対するドネペジルの影響	
5-3-5. 脳内 SGLT-3 による脳保護作用へのコリン作動性神経系の関与	
5-3-6. 大脳皮質のコリン作動性神経における SGLT-3 発現	
5-3-7. 線条体のコリン作動性神経における SGLT-3 発現	
5-4. 考 察 .....	60
総 括 .....	62
謝 辞 .....	64
引用文献 .....	65
主論文 .....	74
副論文 .....	75

## 略語一覽

AraC	: cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside
$\alpha$ -MG	: $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside
AMPK	: 5'-adenosine monophosphate-activated kinase
BPB	: bromophenol blue
BSA	: bovine serum albumin
ChAT	: choline acetyltransferase
control siRNA	: ON-TARGET <i>plus</i> Nontargeting pool
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DIV	: day <i>in vitro</i>
DMEN	: dulbecco's modified Eagle's medium
DPZ	: donepezil
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
FBG	: fasting blood glucose
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	: glial fibrillary acidic protein
GLUT	: glucose transporter
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: hydrogen peroxide
HRP	: horseradish peroxidase
i.c.v.	: intracerebroventricular
JNK	: c-Jun N-terminal kinases
MAP2	: microtubule-associated protein 2
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MCAO	: middle cerebral artery occlusion
NDS	: neurological deficit score
NeuN	: neuronal nuclear antigen
NMDG	: N-methyl-D-glucamine
n.s.	: not significant
pAMPK	: phospho-AMPK
PBS	: phosphate buffered saline
PFA	: paraformaldehyde
pERK	: phospho-ERK
p-JNK	: phospho-JNK
p-p38	: phospho-p38
PHZ	: phlorizin

PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
SBFI	: sodium-binding benzofuran isophthalate
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	: standard error of the mean
SGLT	: sodium-glucose transporter
SGLT-1 siRNA	: SGLT-1 ON-TARGET <i>plus</i> SMART pool
SGLT-3 siRNA	: SGLT-3 ON-TARGET <i>plus</i> SMART pool
Sp1	: specificity protein 1
STD	: standard
TBS	: Tris buffered saline
TTC	: 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride
veh	: vehicle
WST-8	: 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H-tetrazolium, monosodium salt



## 序 論

脳血管疾患は、生活習慣病の 1 つであり、長年にわたり、我が国の死因第 1 位に位置していたことから、古くからその対策が行われてきた。1960 年代には、脳血管疾患の増悪因子のひとつである高血圧への対策強化によって、脳血管疾患による死亡数は減少し、現在では悪性新生物、心疾患、肺炎に次いで死因の第 4 位となっている。しかしながら、平成 26 年度の脳血管疾患の総患者数（継続的な治療を受けていると推測される患者数）は 117 万 9 千人にのぼるとされている（厚生労働省発表、「平成 26 年 患者調査の概況」）、依然として、脳血管疾患によって苦しむ患者は多い。特に、65 歳以上における要介護者になった主要な原因として、「脳血管疾患」が 17.2% と最も多く、次いで「認知症」16.4%、「高齢による衰弱」13.9%、「骨折・転倒」12.2%となっている（厚生労働省、平成 25 年度「国民健康基礎調査」）。認知症の原因の一部は脳血管疾患であり、これは「認知症」の 16.4% に中に含まれることから、脳血管疾患によって要介護者になった患者数は実際には 17.2% 以上となり、脳血管疾患が患者の予後に与える影響ははかりしれない。脳血管疾患治療薬としては、2001 年 4 月のフリーラジカル消去剤エダラボンに続いて、2005 年 10 月には遺伝子組み換え組織型プラスミノゲン・アクティベータ（recombinant tissue-type plasminogen activator）が承認され、2012 年にその適応時間が発症後 3 時間以内から 4.5 時間以内に拡大された<sup>1)</sup>。しかしながら、治療選択薬の少なさ、有効治療時間域の狭さ、虚血再灌流障害や後遺症、副作用等の問題があることから、脳血管疾患の新規治療戦略の開発は急務の課題とされている。

脳血管疾患の危険因子は数多く知られているが、その中でも特に「高血糖」は重要な因子の一つである<sup>2-5)</sup>。これまでに、糖尿病患者では、脳血管疾患の発症リスクが 2~2.5 倍に増加することや、生じる神経障害が顕著に増悪することが報告されている<sup>2)</sup>。さらに、糖尿病の既往歴のない患者においても脳血管疾患発症後に高血糖状態が生じることや、この血糖値上昇を糖尿病治療薬によって、正常血糖値になるように厳格に制御することで、死亡率が減少することも報告されており、脳血管疾患と血糖値の関連が注目されている<sup>6,7)</sup>。本研究室の先行研究においても、一過性局所脳虚血モデルマウスを用いた検討から、脳虚血ストレス負荷後にインスリン感受性低下を介した高血糖状態が生じ、これを、糖尿病治療薬であるインスリンまたはメトホルミンを用いて制御することによって、脳虚血性神経障害発現が改善されることを確認している<sup>8,9)</sup>。さらに筆者は、脳虚血ストレス負荷によって誘導された糖の作用点や、神経障害発現の増悪機序を明らかにするため、糖輸送体のひとつである sodium-glucose transporter (SGLT) の検討を行ってきた<sup>10,11)</sup>。

SGLT は、ナトリウムポンプによって形成された細胞内外のナトリウム濃度勾配を駆動力として、ナトリウムと糖を細胞内へ共輸送する二次性能動輸送体であり、1~6 のアイソフォームが存在する<sup>12-17)</sup>。SGLT は全身に広く分布しており、生体内の糖輸送において重要な役割を担う。特に、腎臓に発現している SGLT-2 は腎尿細管での糖の再吸収に関与し、

小腸に発現している SGLT-1 は食物中の糖の吸収に関与することが知られている。また、SGLT ファミリー特異的阻害剤である phlorizin の全身投与によって、腎臓や小腸の SGLT を阻害することで、血糖値が低下することが報告されている<sup>12,18,19)</sup>。さらに、2014 年 4 月から、SGLT-2 阻害薬が新規糖尿病治療薬として販売され、現在は 6 成分 7 製剤が臨床使用されており、末梢における SGLT の基礎研究ならびに臨床研究は活発に行われている<sup>20-22)</sup>。一方で、中枢においては、SGLT-1、3、4 および 6 が脳内に存在することが報告されているが、その機能についてはほとんど解明されていなかった<sup>12,14)</sup>。我々の先行研究において、phlorizin の腹腔内投与によって、虚血後高血糖を抑制し、脳虚血性神経障害発現が改善することを明らかにしている<sup>11)</sup>。さらに、特異的に脳内 SGLT を阻害することによって、虚血後高血糖状態には影響せずに、脳虚血性神経障害が改善することを見出し、脳虚血後に増加した糖が、脳内 SGLT を介して脳虚血性神経障害の発現を増悪させている可能性を報告している<sup>10,11)</sup>。しかしながら、脳内 SGLT と虚血後高血糖との詳細な関連や、脳内 SGLT の各アイソフォームの関与、脳内 SGLT による脳虚血性神経障害の発現増悪機序は不明なままであった。そこで、本研究では、脳血管疾患の予後改善のための新たな治療戦略を提案することを目的として、これらの解明を行った。

## 本 論

### 第一章

#### 虚血後高血糖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

##### 1-1. 緒 言

糖は、生体の重要なエネルギー源であり、細胞の機能維持や修復等に欠かせない物質である。事実、低血糖状態では認知機能の低下や脳神経細胞死が生じることが知られている<sup>23-26</sup>。さらに、糖尿病病態においては、動脈硬化の促進や代謝異常などが生じ、様々な疾患を併発することから、高血糖状態の是正は健康維持に必須と考えられる<sup>27-29</sup>。一方、脳血管疾患においても、発症後の血糖値制御は重要とされている。脳血管疾患発症後、血糖値が高すぎても、低すぎても神経障害の発現は増悪することが報告されており、正常血糖値を維持することが重要であると考えられている<sup>30-32</sup>。我々の先行研究においても、一過性局所脳虚血モデルマウスを用いた検討から、脳虚血ストレス負荷 6 時間後から空腹時血糖値は上昇し始め、12 時間および 1 日後には有意な空腹時血糖値の上昇が生じ、その後の神経障害発現を増悪することを報告している<sup>8</sup>。この血糖値の上昇は、脳虚血ストレス負荷によって活性化された交感神経系からのカテコラミンおよび糖質コルチコイドの分泌増加や、肝臓・筋組織におけるインスリン感受性の低下によって誘導されることが明らかにされている<sup>8</sup>。さらに、この虚血後高血糖による脳虚血性神経障害の発現増悪機序の一部に、脳内 SGLT が関与する可能性も明らかにしている<sup>10,11</sup>。しかしながら、虚血後高血糖の形成に対して、脳内 SGLT が影響する時間的タイミングを確定するには至っていなかった。そこで、SGLT ファミリー特異的阻害剤である phlorizin の継時的作用変化を検討することで、これらの解析を試みた。また、脳虚血後高血糖と脳内 SGLT の詳細な関連を検討するため、*in vitro* の虚血後高血糖モデルを樹立し、これを解析した。

---

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

1. Yamazaki Y., Harada S., Tokuyama S., Relationship between cerebral sodium-glucose transporter and hyperglycemia in cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.*, **604**, 134-139 (2015).
2. Yamazaki Y., Harada S., Wada T., Yoshida S., Tokuyama S., Sodium transport through the cerebral sodium-glucose transporter exacerbates neuron damage during cerebral ischaemia. *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 922-931 (2016).

## 1-2. 実験材料および方法

### 1-2-1. 実験動物

体重 24 – 25g の ddY 系雄性マウスおよび妊娠 16 日齢の ddY 系雌性マウスは日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) から購入した。マウスは温度 24℃、湿度 55 ± 5% の環境下において明暗サイクルが 12 時間 (AM 8:00 点灯、PM 8:00 消灯) の室内にて飼育した。なお、固形飼料 (オリエンタル酵母、東京、日本) と水は自由に摂取させた。実験には、体重が 25 – 30g になったもの、もしくは、妊娠 17 日齢のマウスを実験に供した。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、また、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った (承認番号:A15-12、16-10)。

### 1-2-2. 一過性局所脳虚血モデルマウスの作成

一過性局所脳虚血モデルマウスの作成は、Harada らの方法に従った<sup>8)</sup>。具体的には、体重が 25 – 30g になったマウスに対し、イソフルラン (アボットジャパン、大阪、日本) によって全身麻酔 (導入: 2%、維持: 1%) を施し、中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion、MCAO) 法を用いて作成した。術中の体温は小動物用体温コントローラー (ATC-101B、ユニークメディカル、大阪、日本) を用いて測定し、ヒーターマット (FH-100、ユニークメディカル) を用いて 37 ± 0.5℃ に維持した。導入麻酔後、マウスの前歯に固定板の糸をかけ、仰臥位に固定した。頸部を正中線で切開し、組織を丁寧に剥離し虚血側である左側頸部の筋肉を外に引き出し、動脈クレンメで固定した。次に、総頸動脈を剥離・軟質縫合糸 (株式会社夏目製作所、東京、日本) で結紮した。引き続き、外頸動脈を剥離・結紮した後、少し手前へ引き出した内頸動脈を剥離し、縫合糸を内頸動脈の下側に通し結紮せずに斜め右上に固定し、総頸動脈の分岐点下方に切り込みを入れ、塞栓子を内頸動脈に向けて挿入することで中大脳動脈を閉塞した (虚血)。次に、内頸動脈を結紮し、切開部を 1 針縫合し、ホームケージに戻した。虚血 2 時間後、再度イソフルランによってマウスに麻酔をかけ、塞栓子をシリコン樹脂部分が内頸動脈起始部に来るまで引き出し、中大脳動脈に血流を回復させ (再灌流)、これを一過性局所脳虚血ストレス負荷とした。頸部の切開部を 3 針縫合し、マウスをホームケージに戻した。対照群である偽手術 (sham) は塞栓子を挿入しないものとし、その他は MCAO と同様に行った。MCAO を施すことで、脳血流量が 40% 低下し、再灌流によってほぼ 100% まで回復することは、以前報告している<sup>8)</sup>

### 1-2-3. 塞栓子の作成

8-0 ナイロン縫合糸 (シラカワ、福島、日本) を 1.1 cm の長さで切り口が斜めになるように切り、その半分を黒く塗りつぶした。色を塗っていない端から 4 mm のところまでをシリコン樹脂 [PROVIL<sup>®</sup> novo Meadium BASE (HeraeusKulzer、Wehrheim、Germany)、PROVIL<sup>®</sup> novo Meadium CATALYST (HeraeusKulzer)] で紡錘状に薄くコーティングした。

#### 1-2-4. 空腹時血糖値の測定

マウスを活動期（夜間）をはさんで 15 時間以上絶食した後、約 1.5  $\mu\text{L}$  の血液をマウスの尾静脈から採取し、小型血糖値測定器グルコース・パイロット（Aventir Biotech、CA、U.S.A.）ならびに、グルコースパイロットテストストリップ（Aventir Biotech）を用いて測定した。空腹時血糖値の増加量は次の式で算出した: Fasting blood glucose (FBG) level change = FBG after MCAO – FBG before MCAO (pre-MCAO FBG)。pre-MCAO FBG は MCAO の 48-96 時間前に測定した。

#### 1-2-5. 梗塞巣形成の評価

MCAO 1 または 3 日後に、マウスを頸椎脱臼によって安楽死させた後に断頭を行い、脳を摘出した。Bregma から尾側方向に、0、+2、+4 mm で切断した 2 mm 厚の冠状新鮮脳切片を 3 枚作成し、2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma-Aldrich、MO、U.S.A.) 溶液で 37°C、10 分間染色を行った。染色後、脳切片を 2 時間室温にて 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich) で固定し、phosphate buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich) 液で置換した。脳切片は、スキャナーで画像として取り込み、TTC によって染色されていない白い部分を梗塞巣とした。また、梗塞巣面積以外にも、細胞死の程度を表す梗塞巣の白色の度合いも評価項目とし、白色の度合いが高いほど障害の程度が大きいと判断した。梗塞巣の面積及び白色の度合いは画像解析ソフト Image J (Wayne Rasband、Bethesda、MD、U.S.A.) を用いて測定し、両者の積算値から得られた各脳切片の梗塞巣の面積 (infarct area) と bregma からの距離を用いて、梗塞巣体積 [infarctvolume ( $\text{mm}^3$ )] を求めた。

#### 1-2-6. 行動異常の評価

行動異常の評価は、Harada らの方法に従い、行動異常の程度別分類 (neurological deficit score、NDS) を用いて評価した (Table 1)<sup>8)</sup>。MCAO マウスあるいは sham マウスと無処置の正常マウス (control) をホームケージから新しいケージに 1 匹ずつ入れ、1 時間行動を観察した。評価項目として、意識、歩き方、四肢緊張度、痛覚反射の 4 項目についてそれぞれ点数化し行動異常の程度を観察した。これら 4 項目の合計点を NDS とし、点数の高い方がマウスの行動異常の程度が大きいと評価した。それぞれの項目についての点数を、意識 (0: 正常、1: 落ち着きがない、2: 無気力、3: 昏迷、4: 発作、5: 死亡)、歩き方 (0: 正常、1: 前足内転、2: アンバランス歩行、3: 旋回、4: 立てない、5: 動かない)、四肢緊張度 (0: 正常、1: 痙攣、2: 弛緩) とし、痛覚反射は、tail flick test (侵害性熱刺激) によって評価した。Tail flick test には、tail flick 式鎮痛効果測定装置 (MK-330B、室町機械、東京、日本) を用い、組織の損傷を防ぐため、カットオフは 10 秒とした。痛覚反射の点数は、MCAO 後における反応潜時と MCAO 処置前の反応潜時との差とした。

項目 \ 点数	0	1	2	3	4	5
意識	正常 (normal)	落ち着きがない (restless)	無気力 (lethargic)	昏迷 (stuporous)	発作 (seizures)	死亡 (death)
歩き方	正常 (normal)	前足の内転 (paw)	アンバランス歩行 (undaianced walking)	旋回 (circling)	立てない (unable to stand)	動かない (no movement)
四肢緊張度	正常 (normal)	痙攣 (spastic)	弛緩 (flaccid)	—	—	—
痛覚反射	Tail Flick 反応潜時の差 (秒) = MCAO 処置後の反応潜時 (秒) - MCAO 処置前の反応潜時 (秒)					

**Table 1 - Neurological deficit score after MCAO.**

#### 1-2-7. Phlorizin の投与方法

SGLT family 特異的阻害薬である phlorizin (東京化成工業株式会社、東京、日本) は再灌流直後あるいは 6、12 時間後に脳室内 (intracerebroventricular: i.c.v., 40 µg/mouse) 単回投与した。対照群には 4% dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich) を投与した。I.c.v. は、Haley and McCormic の方法に従って行った<sup>33)</sup>。27 ゲージの注射針の先端が 2.5 - 3.0 mm になるよう加工し、脳地図に従いながら、bregma から尾側に 1 mm、外側に 1 mm の脳室内に 10 µL 投与した。

#### 1-2-8. 使用細胞 (SH-SY5Y、大脳皮質神経初代培養細胞)

ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) は、penicillin (100 units/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), streptomycin (100µg/ml, Invitrogen) および 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France) を含む high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: 和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を用いて培養した。SH-SY5Y 細胞の継代期間は約 7 日である。細胞の分化は血清濃度を 1% に落とすことで誘導した。継代後 7~8 日目の細胞を実験に用いた。細胞内ナトリウム濃度の測定には 35 mm glass bottom culture dishes (松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) に播種した細胞を用いた。

大脳皮質神経初代培養細胞は胎生 17 日齢のマウス脳から採取した。具体的には、麻酔した妊娠マウスを開腹し子宮を摘出した。クリーンベンチ内で子宮内から胎児およびその全脳を取り出し、氷上に準備した Leiboviz's L-15 Medium (Life Technologies Inc., CA, U.S.A.) の入ったシャーレに入れた。実態顕微鏡の下で全脳から脳膜を剥離し大脳皮質を単離した。空のディッシュに移してメスで細断し、0.01% deoxyribonuclease (Sigma-Aldrich) および 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich) を含む PBS (Sigma-Aldrich) 溶液に加え、37°C で 12 分間、時々攪拌しながらインキュベートした。その後、trypsin inhibitor soybean (Life Technologies Inc.) を 0.05% となるように加え、氷上で冷却し反応を停止させた。駒込ピペットを用いて細胞をほぐし、1,000 rpm で 5 分遠心した。上清を吸引し、PBS (Sigma-Aldrich) で再度細

胞をほぐした後に 1,000 rpm で 3 分遠心した。上清吸引後、5% heat-inactivated fetal bovine serum (Biowest) および 5% heat-inactivated horse serum (Invitrogen) 、100 U/mL Penicillin-0.1 mg/mL Streptomycin, Liquid (Invitrogen) を加えた DMEM/Ham's F-12 with L-Gln, Sodium Pyruvate and HEPES, liquid (Nacalai Tesque、京都、日本) を用いて細胞をほぐした。細胞を分散させた培地を濾過し、細胞塊を取り除き、血球計算盤を用いて細胞数を数えた。細胞は、あらかじめ poly-D-ornithine (100 µg/mL、Sigma-Aldrich) でコーティングしておいたプレートに  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> となるように播種した。播種 48 時間後 [second day *in vitro* (DIV 2)] に、cytosine-β-D-arabinofuranoside (AraC、Sigma-Aldrich) を添加し、その 24 時間後に除去した。播種 5 日目 (DIV 5) に各種薬物を処置し、その 1 日後に western blot 用のサンプル調製および細胞生存活性の評価を行った。

#### 1-2-9. 細胞抽出液の調製、および western blot 用サンプル調製

6 well プレートに播種した大脳皮質神経初代培養細胞および SH-SY5Y 細胞は、PBS で 2 回洗浄し、homogenize buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、120 mM NaCl、4% tween 20、2 mM β-mercaptoethanol、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、5 mM benzamidine、20 mM NaF、1 mM p-nitrophenyl phosphate、5 mM imidazole] 150 mL に 50 µg/mL trypsin inhibitor、50 µg/mL leupeptine、50 µg/mL aprotinin、5 mg/mL pepstatin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を加えた溶液を添加し、セルスクレーパーでこすり取った。その後、ソニケーションによってタンパク質を抽出し、遠心分離 (15,000 ×g、4°C、5 min) によって得られた上清を回収した。上清は 10 倍に希釈し、Lowry 法によってタンパク質量を測定した。その結果をもとに粗タンパク質量として 10 µg を分取し、3 × sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [0.15 M Tris-HCL (pH6.8)、6% SDS、18% β-mercaptoethanol、30% glycerol、0.004% bromophenol blue (BPB)] を混合し、これを 97°C で、3 分間加温し速やかに氷冷したものを western blot 用サンプルとした。

#### 1-2-10. SDS-PAGE および western blot 法 (SGLT-1)

タンパク質は 10 µg/lane を 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって分離した。泳動条件として、120 V、90 分、マーカールとして Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories、Berkeley、CA、U.S.A.) を用いた。電気泳動後、タンパク質は semi-dry transfer 法によって 15 V、50 分の条件で nitrocellulose 膜に転写した。SGLT-1 の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [Tris Buffered Saline (TBS)-T {20 mM Tris-HCL (pH7.6)、150 mM NaCl、0.1% tween20} + 5% bovine serum albumin BSA (Sigma-Aldrich)] の中で、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [TBS-T (TBS、0.1% tween20) + 5% スキムミルク (和光純薬工業株式会社) の中で 1 時間室温において振盪させた後、rabbit anti-mouse SGLT-1 polyclonal antibody (1:1,000、MEC Millipore、Darmstadt、Germany) および

mouse anti-GAPDH monoclonal antibody (1:20,000, Chemicon, CA, U.S.A.) を 4°C で一晩反応させた。室温で 1 時間インキュベートした後、nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。続いて二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP)-labeled affinity purified antibody to rabbit IgG + IgM (H + L) (1:1,000, Kirkegaard and Perry Laboratories, Guildford, UK)、HRP-labeled affinity purified antibody to mouse IgG + IgM (H + L) (1:10,000, Kirkegaard and Perry Laboratories) を室温で 1 時間反応させた。その後、nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。Pierce Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific inc., IL, U.S.A.) の No.1 液と No.2 液を等量混和した溶液を用いて発色させ、Light-Capture (ATTO) で撮影した。バンドの強度は、CS-Analyzer ver. 3.0 (ver. 3.0, ATTO) を用いて解析した。得られた SGLT-1 のバンドは GAPDH のバンドにて補正した。

#### 1-2-11. SH-SY5Y 細胞内のナトリウム濃度測定

細胞内ナトリウム濃度は、蛍光ナトリウム指示薬である sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) の蛍光強度を倒立顕微鏡 (DIAPHOTO 300, Nikon, 東京, 日本) および蛍光画像解析装置 ARUGAS-50 Hamamatsu Photonics, 浜松, 日本) を用いて、10 秒に 1 回測定した。細胞内ナトリウム濃度は 340/380 nm 比から算出した。SH-SY5Y 細胞は、10  $\mu$ M SBFI および 0.02% pluronic F-127 (detergent) を含む standard (STD) solution [140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5.56 mM glucose (pH 7.4)] を遮光下 37°C で 1 時間反応させた。細胞外液を 2 ml/min の速さで灌流することで薬物を添加した。ナトリウムフリー溶液として N-methyl-D-glucamine (NMDG) solution [140 mM NMDG, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.56 mM glucose (pH 7.4)]を用いた。

#### 1-2-12. 薬物処置と細胞生存率の評価

96 ウェルプレートに播種した大脳皮質神経初代培養細胞に、hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 50, 100, 200  $\mu$ M; Santoku Chemical Industries Co., 東京, 日本)、phlorizin (0.5, 5, 50, 500  $\mu$ M; 東京化成工業株式会社)、D-(+)-glucose (8.75, 17.5, 70 mM; Nacalai Tesque)、mannitol (77 mM; Sigma-Aldrich) を単独あるいは共処置した。その 1 日後に培地交換を行い、生細胞数測定試薬である 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-8; Nacalai Tesque) を 10  $\mu$ L ずつ添加し、3 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で呈色反応を行った。反応後、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定した。

#### 1-2-13. 統計学的処理

多次元分散分析 (ANOVA) 解析あるいは、F 検定を行った後に、Scheffe multiple comparison test、unpaired Student's *t*-test、Turkey multiple comparison test を用いて統計的解析を行った。全ての結果は平均  $\pm$  標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表現し

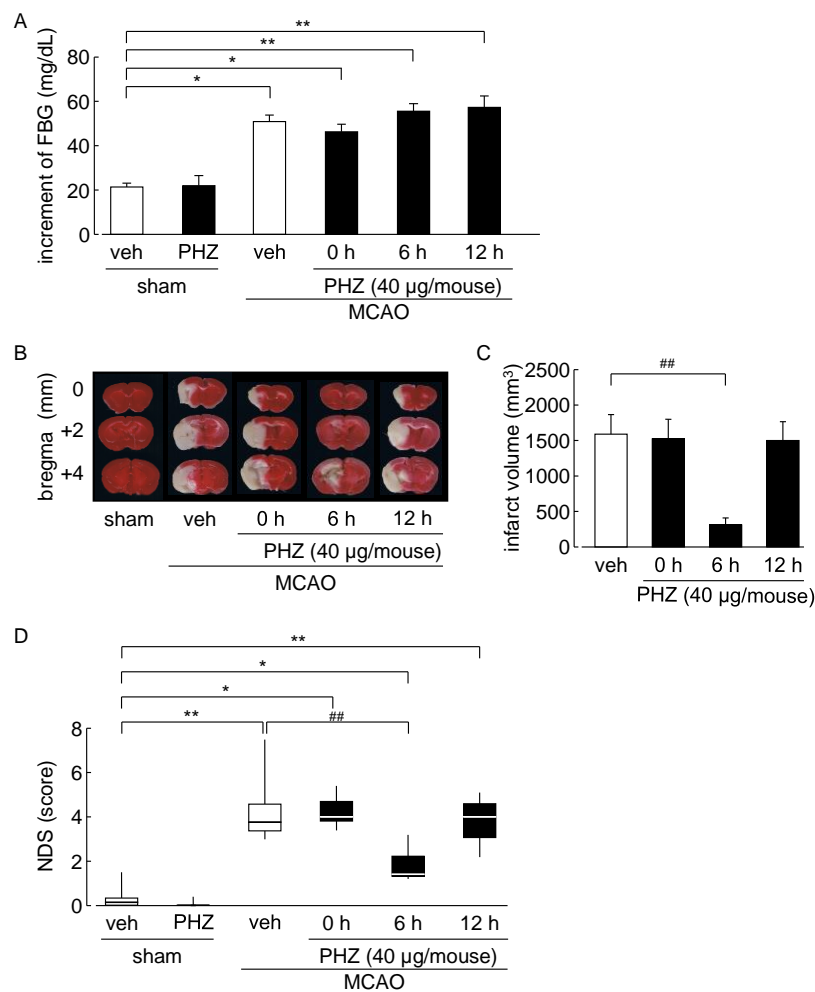


た。行動異常ならびに学習・記憶障害の結果に関しては、Steel-Dwass test of post-hoc nonparametric multiple comparison test を行った。結果は箱ひげ図で表し、箱中の横線が中央値、箱の上辺が第 3 四分点、下辺が第 1 四分点、ひげは最高値と最小値を表した。有意差は、危険率 5% を基準とした。

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. Phlorizin 投与が脳虚血性神経障害へ及ぼす継時的な影響

MCAO 1 日後における FBG は、sham 群と比較して有意に上昇した (Fig. 1A)。また、この上昇は phlorizin の脳室内投与によってなんら影響を受けなかった (Fig. 1A)。一方で MCAO 3 日後における梗塞巣形成は、phlorizin の再灌流直後または 12 時間後の脳室内投与では vehicle 群と変わらなかったが、phlorizin の再灌流 6 時間後投与によって有意に抑制された (Fig. 1B and C)。同様に、MCAO 3 日後における行動異常は、phlorizin の再灌流直後または 12 時間後の脳室内投与によって抑制されなかったが、phlorizin の再灌流 6 時間後投与によって有意に改善された (Fig. 1D)。

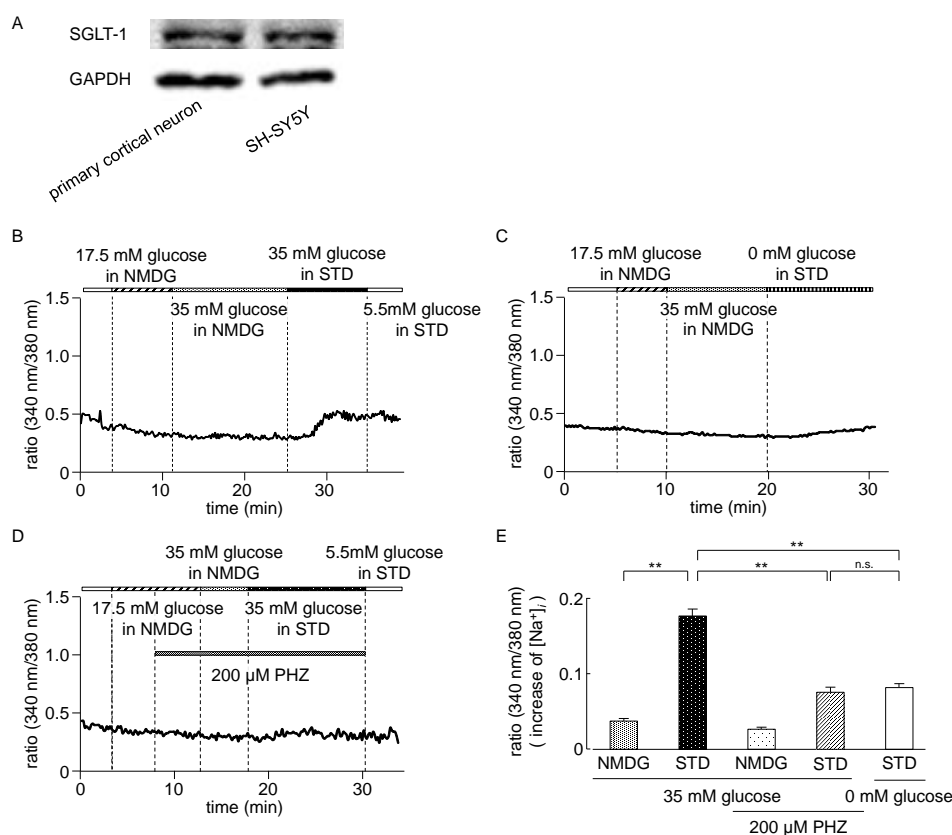


**Fig. 1 Time dependently effect of phlorizin on the development of cerebral ischemic neuronal damage.**

(A) Fasting blood glucose levels on day 1 after MCAO. (B) Representative photographs of TTC staining on day 3 after MCAO. (C) Quantitative analysis of the infarct volume. (D) Neurological deficit scores on day 3 after MCAO. Vehicle-treated sham, PHZ-treated sham, PHZ-treated (at 6 h after reperfusion) MCAO, and PHZ-treated (at 12 h after reperfusion) MCAO groups: n = 8. Vehicle-treated MCAO group: n = 12. PHZ-treated (at 0 h after reperfusion) MCAO group: n = 7. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ### $P < 0.01$ . Veh: vehicle, PHZ: phlorizin.

### 1-3-2. 高グルコース負荷による細胞内ナトリウム濃度変化

大脳皮質神経初代培養細胞および SH-SY5Y 細胞において、SGLT-1 タンパク質発現が確認された (Fig. 2A)。SH-SY5Y 細胞における細胞内ナトリウム濃度は、17.5 mM glucose in NMDG 溶液に置換することでゆるやかに減少した (Fig. 2B)。また、35 mM glucose in NMDG 溶液への置換によって、細胞内ナトリウム濃度にはなんら変化がなかったが、35 mM glucose in STD 溶液への置換によって、細胞内ナトリウム濃度は明らかに増加した (Fig. 2B and E)。一方、35 mM glucose in NMDG 溶液から、0 mM glucose in STD 溶液への置換は細胞内ナトリウム濃度のわずかな上昇を示した。 (Fig. 2C and E)。さらに、35 mM glucose in STD 溶液による細胞内ナトリウム濃度の増加は、200  $\mu$ M phlorizin によって有意に抑制された (Fig. 2D and E)。

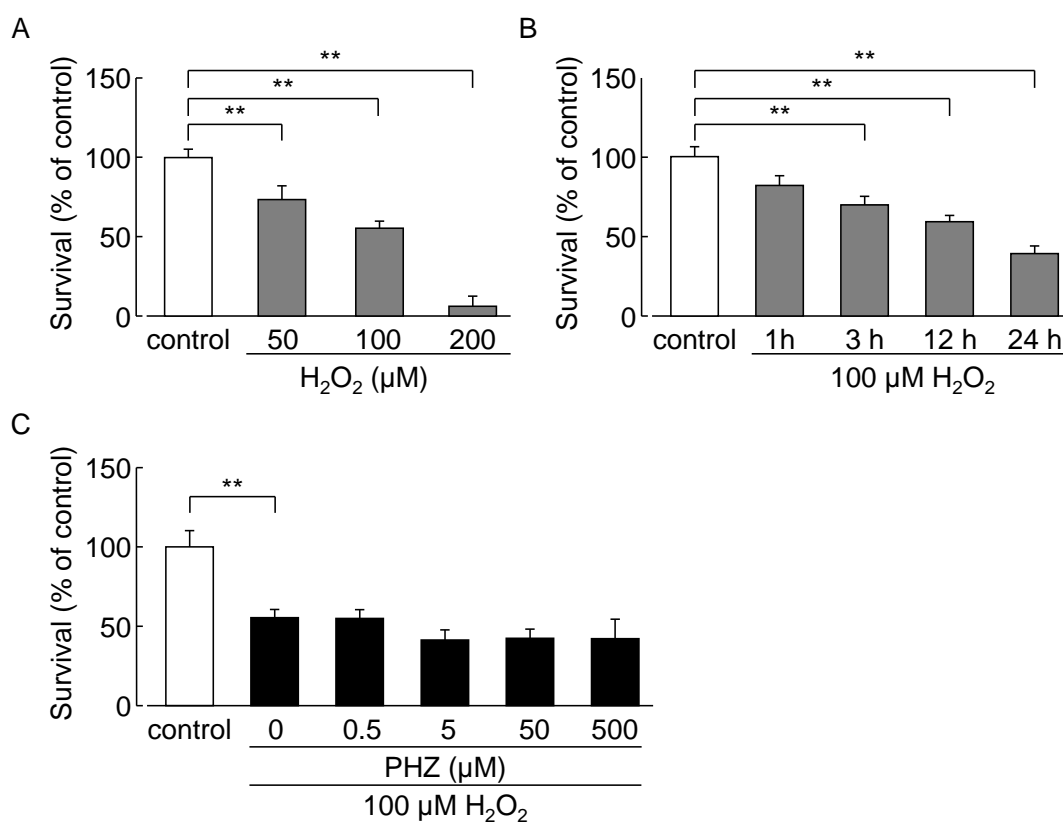


**Fig. 2. High concentration glucose treatments increase intracellular sodium influx via SGLT.**

(A) Representative Western immunoblots of SGLT-1 in primary cortical neuron and SH-SY5Y cells. (B–D) A representative ratiometric recording of  $[Na^+]_i$  from a single SH-SY5Y cell. Perfusates were replaced with the indicated experimental solutions. (B) Changes in intracellular sodium concentrations following treatment with 35.0 mM glucose. (C) Changes in intracellular sodium concentrations in the absence of glucose. (D) Effects of 200.0  $\mu$ M phlorizin on 35.0 mM glucose-induced increases in intracellular sodium concentrations. (E) Effects of phlorizin blockade on average responses to 35.0 mM glucose in SH-SY5Y cells. (B–E) 70–118 cells in 2–5 independent experiments. \*\*  $P < 0.01$ ; Data presented as means  $\pm$  SEM; n.s.: not significant. PHZ: phlorizin.

### 1-3-3. 酸化ストレス誘導性の細胞死に対する phlorizin 処置の影響

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50、100、200 μM; 24 時間) 処置によって、用量依存性的かつ有意な細胞生存率の低下が認められた (Fig. 3A)。100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置後の細胞生存率は、時間依存性的かつ有意に減少した (Fig. 3B)。100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の 24 時間処置によって有意に減少した細胞生存率は、phlorizin (0.5、5、50、500 μM) の共処置によってなんら影響を受けなかった (Fig. 3C)。

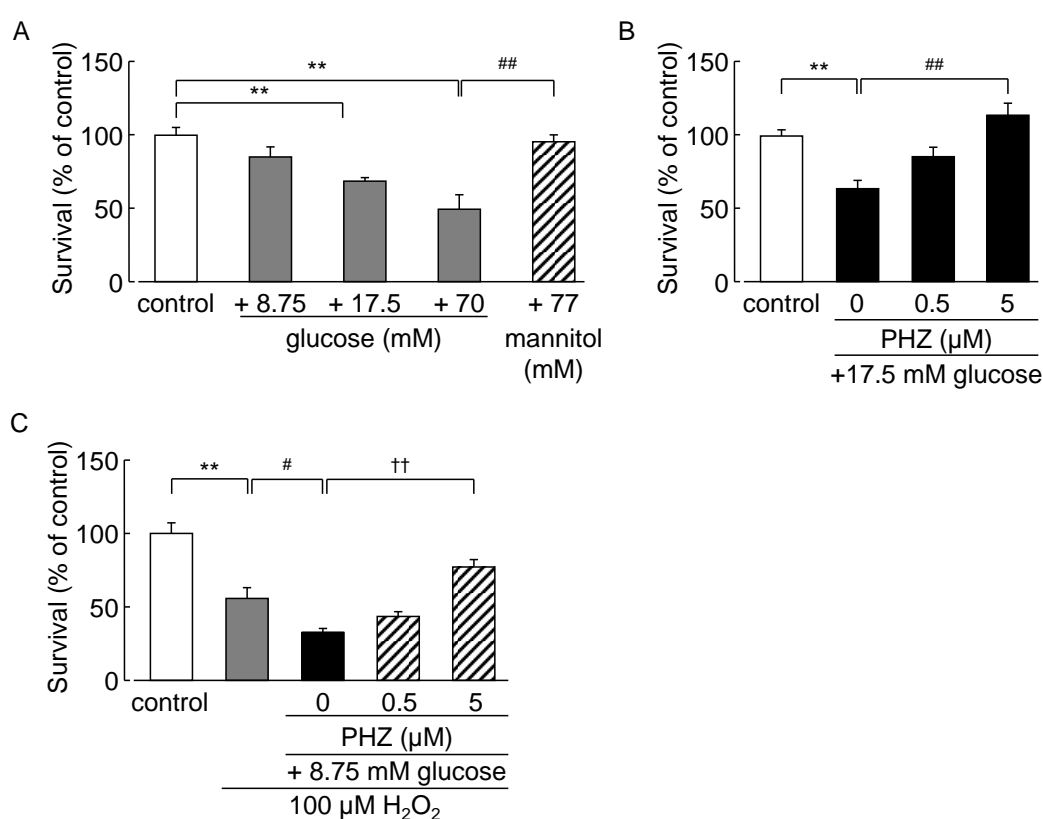


**Fig. 3. Effect of phlorizin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in cultured cortical neurons.**

Survival rate was measured by the WST-8 reduction assay. (A) Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cultured mouse cortical neurons (control: n = 5; 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 7; 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 7; and 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 7). Survival rate was measured at 24 hours after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. (B) Time course of survival after 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (n = 14). (C) Effect of PHZ on decreased survival rate after 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (control: n = 9; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 9; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.5 μM PHZ: n = 8; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 5 μM PHZ: n = 12; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50 μM PHZ: n = 12; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 500 μM PHZ: n = 5). Survival rate was measured at 24 hours after components treatment. (A-C) \*\**P* < 0.01. PHZ: phlorizin.

#### 1-3-4. 高グルコース処置および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/グルコース処置による細胞死に対する phlorizin の影響

8.75 mM glucose 処置は細胞生存率になんら影響を及ぼさなかったが、17.5 および 70 mM glucose 処置は用量依存的かつ有意な細胞生存率の低下を誘導した (Fig. 4A)。77 mM mannitol 処置では細胞生存率に変化なかった (Fig. 4A)。17.5 mM glucose 処置による有意な細胞生存率の低下は、5  $\mu$ M phlorizin の共処置によって有意に抑制された (Fig. 4B)。100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による有意な細胞生存率の低下は、8.75 mM glucose を共処置することによって有意に増悪された (Fig. 4C)。さらにこの増悪は、phlorizin の共処置によって用量依存的に抑制され、5  $\mu$ M phlorizin によって有意に改善された (Fig. 4C)。



**Fig. 4. Phlorizin reduced glucose-induced and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/glucose-induced cell death in cultured cortical neurons.**

The survival rate was measured by the WST-8 reduction assay. (A) Effect of added glucose in cultured mouse cortical neurons (control: n = 6; +8.75 mM glucose: n = 6; +17.5 mM glucose: n = 4; +70 mM glucose: n = 4; +77 mM mannitol: n = 11). (B) Effect of PHZ on decreased survival rate after +17.5 mM glucose treatment (n = 8). (C) Effect of PHZ on decreased survival rate after concomitant treatment with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and +8.75 mM glucose (control: n = 6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 12; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and +8.75 mM glucose: n = 14; 0.5  $\mu$ M PHZ: n = 6; 5  $\mu$ M PHZ: n = 6). (D) Effect of  $\alpha$ -MG in cultured mouse cortical neurons (control and 0.1, 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MG: n = 10; 10  $\mu$ M  $\alpha$ -MG: n = 9). (A-D) WST-8 reduction assay was performed at 24 h after WST-8 treatment. #*P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, ##*P* < 0.01, ††*P* < 0.01. PHZ: phlorizin.

#### 1-4. 考 察

第一章では、脳内 SGLT と虚血後高血糖との詳細な関連について、*in vivo* および *in vitro* の脳虚血モデルを用いて検討した。本研究で用いた *in vivo* の脳虚血モデルは、脳虚血ストレス負荷後早期から虚血側の脳皮質、線条体および海馬で梗塞巣が形成され、MCAO 3 日後で最大となり、5 日後まで持続することを報告している<sup>8)</sup>。よって、薬物処置による脳虚血性神経障害の発現改善を観察するために、MCAO 3 日後のマウスを用いて評価を行った。まず初めに、SGLT ファミリー特異的阻害剤である *phlorizin* を用いて、虚血後高血糖が生じる前の段階である“再灌流直後”、虚血後高血糖が生じ始める段階である“再灌流 6 時間後”、既に虚血後高血糖が生じている段階である“再灌流 12 時間後”において脳内 SGLT を阻害し、脳内 SGLT を介した脳虚血性神経障害の発現増悪と虚血後高血糖への関与について継時的に検討した。虚血後高血糖が生じていない段階では、*phlorizin* は効果がなく、空腹時血糖値の上がり始めでの脳内 SGLT の抑制によって改善効果が得られたことから、正常血糖では、脳内 SGLT は脳虚血性神経障害の発現増悪に関与しないが、高血糖状態ではこの増悪に関与する可能性が示唆された。これらは我々の先行研究と一致して<sup>11)</sup>、*phlorizin* の脳室内投与では血糖値低下作用を介さずに神経障害発現に関与したことから、脳虚血後に増加した糖が脳内 SGLT に直接的に作用していることが考えられる。また、空腹時血糖値が有意に増加している段階での脳内 SGLT の抑制は、既に脳内 SGLT を介した脳虚血性神経障害の発現増悪が惹起されていたため、改善効果を得られなかった可能性が考えられる。

SGLT によるグルコースの輸送には、ナトリウムが不可欠であり、また、SGLT を介したナトリウム流入は、細胞外のグルコース濃度に依存することが知られている<sup>13,34)</sup>。実際に、SH-SY5Y 細胞においても、ナトリウム存在下では高グルコース負荷によって細胞内のナトリウム濃度は有意に上昇し、*phlorizin* でこれが抑制されたことから、SGLT を介したナトリウム流入が確認された。また、ナトリウムとグルコースの両方が存在する条件からナトリウムはあるがグルコースはない条件下に変えた場合に、細胞内ナトリウム濃度はわずかに上昇しなかったことから、細胞外液中のナトリウムの有無は細胞内ナトリウム濃度にほとんど影響しないことが示された。細胞内ナトリウム濃度は様々な細胞膜たんぱく質によって恒常的に保たれている。今回の検討では、細胞内ナトリウム濃度変化を観察しやすくするため、細胞外液をナトリウム非存在条件にし、細胞内ナトリウム濃度をわずかに減らしてから高グルコース条件にしている。ナトリウム非存在条件によってわずかに減少した細胞内ナトリウムが、ナトリウムを再び供給することで細胞の恒常性を保とうとしたため、グルコース非存在下でもわずかに細胞内ナトリウム濃度が上昇したと考えられる。以上から、虚血後高血糖は、脳内 SGLT を介したナトリウムの細胞内流入を過剰にする可能性が示されたことから、これが脳虚血性神経障害発現を増悪すると考えられる。

*In vitro* の検討では脳虚血ストレスとして、酸化ストレスを誘導する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた。酸化ストレスは脳虚血による神経細胞死の主要な原因であることが知られており、*in vitro* 系

における脳虚血の検討で汎用されている<sup>35-41)</sup>。本研究では、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の用量依存的あるいは時間依存的な細胞生存率の検討によって、 $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  を 24 時間処置を基準とした。100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死に phlorizin は何ら作用もみられず、酸化ストレスによる神経細胞死には SGLT は関与しない可能性が示された。次に、培地中の glucose 終濃度が、培地原液中に含有される glucose 濃度の、それぞれ 1.5 倍 (+8.75 mM)、2 倍 (+17.5 mM)、5 倍 (+70 mM) になるように処置したところ、高濃度 glucose 負荷によって誘導される神経細胞死に、SGLT が関与している可能性が示唆された。高濃度の glucose 負荷による神経細胞死に、浸透圧は影響しないことが、77 mM mannitol 処置によって確認された。また、100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  による細胞死が、単独では神経細胞死を誘導しなかった +8.75 mM glucose を共処置することによって増悪することを見出し、これを *in vitro* の虚血後高血糖モデルとした。*In vitro* の虚血後高血糖モデルにおける神経細胞死の増悪において、SGLT の関与が認められ、脳内 SGLT は、酸化ストレスによる神経細胞死には関与しないが、高血糖状態においてのみ、神経細胞死を誘導あるいは増悪させる可能性が示された。以上の結果から、脳内 SGLT による脳虚血性神経障害の発現増悪に、高血糖状態が必須であることが示された。

本章では、脳内 SGLT と虚血後高血糖の関係性を明らかにした。*In vivo* および *in vitro* のどちらの検討においても脳内 SGLT は、通常の glucose 濃度では脳虚血性神経障害発現の増悪因子とならないが、通常よりも高い glucose 濃度ではこれを増悪する可能性が示された。臨床において、脳血管疾患を発症した非糖尿病患者の約 6 割が虚血後高血糖状態を呈することが報告されている<sup>6,42,43)</sup>。本研究の遂行は、虚血後高血糖による神経障害発現の増悪を抑制するための新規治療薬の開発に寄与することができると期待される。

## 第二章 脳内 sodium-glucose transporter type 1 が脳虚血性神経障害の発現増悪に及ぼす影響

### 2-1. 緒言

第一章から、脳内 SGLT が虚血後高血糖を介して脳虚血性神経障害の発現を増悪させることを見出した。しかしながら、脳内に存在するとされている SGLT-1、3、4 および 6 のアイソフォームの役割は不明なままである。本研究室の先行研究において、MCAO 1 日後の虚血コア領域である大脳皮質および線条体において、SGLT-1 の発現が有意に増加することを明らかとしている<sup>11)</sup>。また、SGLT-1 は神経上に発現していることが知られている<sup>16)</sup>。以上から、脳内 SGLT-1 が脳虚血性神経障害の発現増悪に関与している可能性が高いと考え、脳内 SGLT-1 に着目し検討を行った。

また、MCAO 後の脳内 SGLT-1 発現誘導機序も明らかとなっていない。末梢において、エネルギー代謝センサーとして知られている 5'-adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) が SGLT-1 の発現誘導に関与することが報告されている<sup>44-46)</sup>。AMPK は栄養不足や低酸素のようなストレス条件下において、細胞内 ATP レベルが減少し、細胞内 AMP レベルが上昇した条件下において、リン酸化することによって活性化を示すセリン/スレオニンキナーゼである<sup>47)</sup>。また、脳虚血ストレス負荷によって脳内 AMPK が活性化することが報告されている<sup>9,48)</sup>。したがって、脳虚血ストレス負荷後の AMPK の活性化が、SGLT-1 の発現誘導に及ぼす影響についても併せて検討した。

---

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

1. Yamazaki Y., Ogihara S., Harada S., Tokuyama S., Activation of cerebral sodium-glucose transporter type 1 function mediated by post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemia. *Neuroscience*, **310**, 3674-3685 (2015).
2. Yamazaki Y., Harada S., Wada T., Hagiwara T., Yoshida S., Tokuyama S., Sodium influx through cerebral sodium-glucose transporter type 1 exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage. *Eur. J. Pharmacol.*, (in press).



## 2-2. 実験材料および方法

第一章 (1-2) と同様の実験材料および方法に従った。

### 2-2-1. 脳 8 部位における組織抽出液の調製、および western blot 用サンプル調製

マウスを頸椎脱臼によって安楽死させた後に断頭を行い、脳を摘出し、氷冷下で Glowinski & Iversen の方法に従って大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、嗅球、延髄、小脳ならびに中脳を分取した<sup>49)</sup>。分取した各脳部位は homogenize buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、120 mM NaCl、4% tween 20、2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、5 mM benzamide、20 mM NaF、1 mM p-nitrophenyl phosphate、5 mM imidazole] 150 mL に 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trypsin inhibitor、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptine、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin、5 mg/mL pepstatin、1 mM PMSF を添加した溶液中で均質化し (800 rpm、25 stroke)、遠心分離 (15,000  $\times$  g、4°C、5 min) によって得られた上清を回収した。回収した上清を、大脳皮質は 50 倍、その他の脳部位は 10 倍に希釈し、Lowry 法によってタンパク質量を測定した。その結果をもとに粗タンパク質量として 10 または 40  $\mu\text{g}$  を分取し、等量の 2 $\times$  SDS sample buffer [0.1 M Tris-HCL (pH6.8)、4% SDS、12%  $\beta$ -mercaptoethanol、20% glycerol、0.004% BPB] を混合し、これを 97°C で、3 分間加温し速やかに氷冷したものを western blot 用サンプルとした。

### 2-2-2. SDS-PAGE および western blot 法 (SGLT-3、AMPK)

SGLT-3 の検出では、40  $\mu\text{g}/\text{lane}$  のタンパク質を 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて、AMPK および phospho-AMPK (pAMPK) の検出では、40  $\mu\text{g}/\text{lane}$  のタンパク質を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE によって分離した。電気泳動および転写条件は第一章 (1-2) と同様に行った。SGLT-3 の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [PBS-T (PBS、0.1% tween20) + 5% スキムミルク (GE Healthcare、little-chalfont、UK)] の中で、AMPK および pAMPK の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [TBS-T (TBS、0.1% tween20) + 5% BSA (Sigma-Aldrich)] の中で 1 時間室温において振盪させた後、rabbit anti-mouse SGLT-3b antibody (1:200、Alpha Diagnostic Intl Inc.、San Antonio、TX、U.S.A.) および rabbit anti-AMPK monoclonal antibody (1:1,000; Cell Signaling Technology、Danvers、MA、U.S.A.)、rabbit anti-pAMPK monoclonal antibody (1:1,000; Cell Signaling Technology) を 4°C で一晩反応させた。室温で 1 時間インキュベートした後、nitrocellulose 膜を PBS-T あるいは TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。続いて二次抗体として、HRP-labeled affinity purified antibody to goat IgG + IgM (H + L) (1:1,000、Kirkegaard and Perry Laboratories)、HRP-labeled affinity purified antibody to rabbit IgG + IgM (H + L) (1:1,000、Kirkegaard and Perry Laboratories) を室温で 1 時間反応させた。その後、nitrocellulose 膜を PBS-T あるいは TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。バンドの検出および補正は第一章 (1-2) に従った。

### 2-2-3. SGLT-1 siRNA の調製ならびに処置方法 (*in vivo*、*in vitro*)

*In vivo* の検討では、SGLT-1 ON-TARGET *plus* SMART pool (SGLT-1 siRNA; Thermo Fisher Scientific) および ON-TARGET *plus* Nontargeting pool (control siRNA; Thermo Fisher Scientific) は、*in vivo* jet-PEI (Polyplus transfection, Illkirch, France) と共に 10% glucose 溶液に溶解した後、最終濃度 5% glucose になるように滅菌水を加え調製した。薬液は、10  $\mu$ L [N/P 比 (*in vivo* jet-PEI の窒素残基数 / DNA のリン酸化残基数) = 6, RNA 量は 2.5  $\mu$ g, *in vivo* jet-PEI 量として 0.3  $\mu$ L を含む] の用量で 1 日 2 回、脳室内に投与した。siRNA 投与 4 日後のマウスに MCAO を施した。*In vitro* の検討では、SGLT-1 siRNA (Thermo Fisher Scientific) および control siRNA (Thermo Fisher Scientific) は、Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Life technologies Inc.) と共に DMEM/Ham's F-12 with L-Gln, Sodium Pyruvate and HEPES, liquid (Nacalai Tesque) に溶解し、DIV 3 の大脳皮質神経初代培養細胞に添加した (RNA 量 40 nM、Lipofectamine RNAiMAX Reagent 量 15  $\mu$ L)。

### 2-2-4. 脳組織切片の作製

マウスをエーテル麻酔下にて開腹し、駆血した。その後、4% PFA (Sigma-Aldrich) で灌流固定を行った。駆血した脳を摘出し、Bregma から尾側方向に 0、+2、+4、で切断した 2 mm 厚の冠状脳切片を作成し、4°C において 4% PFA (Sigma-Aldrich) に 2 時間、10% スクロース (Nacalai Tesque) に 3 時間、20% スクロース (Nacalai Tesque) に一晩漬けおき、浸漬固定した。固定した脳切片を Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek、東京、日本) を用いて包埋した。包埋後、クリオスタット (Leica Microsystems、東京、日本) を用いて、-20°C に冷却しながら、厚さ 20  $\mu$ m の脳組織切片を作製した。作製した脳組織切片は、15 分間風乾させた後、-80°C にて保存した。

### 2-2-5. 免疫組織染色

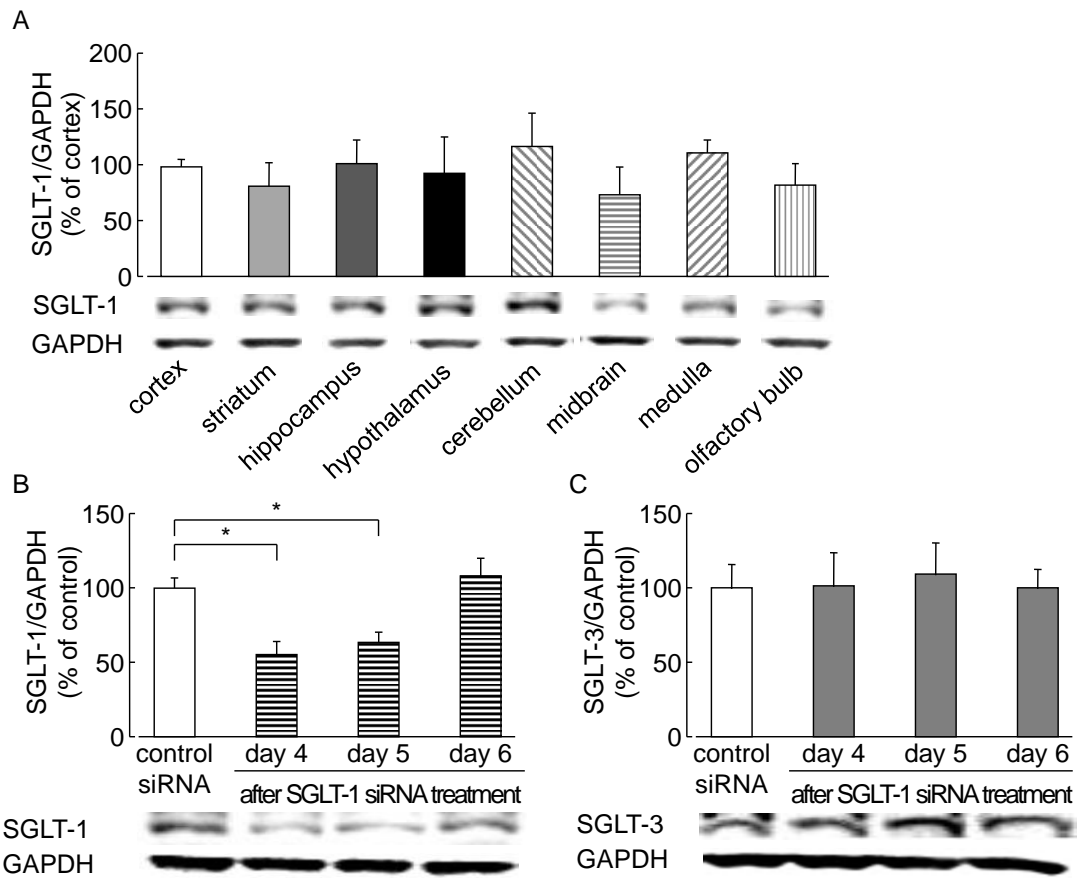
*In vivo* の検討では、凍結保存した切片を室温にて 20 分間風乾した後、4% ホルマリン溶液 (和光純薬工業株式会社) にて、15 分間の後固定を行った。後固定後、PBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行った。続いて組織切片周辺を撥水ペン (Dako pen、ダコ・ジャパン株式会社、東京、日本) で囲い、3% BSA (Sigma-Aldrich) にて、1 時間のブロッキングを行った。*In vitro* の検討では、DIV 4 の大脳皮質神経初代培養細胞は、PBS で 2 回洗浄し、-20°C の 100% methanol (Nacalai Tesque) で 15 分間固定した。固定後、PBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行った。3% BSA (Sigma-Aldrich) を添加し、1 時間のブロッキングを行った。ブロッキング後、rabbit polyclonal anti-SGLT-1 (1:50; Abcam, Cambridge, U.K.) を添加し、4°C で一晩反応させた。1 時間室温で反応させた後、PBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行い、二次抗体 (1:200、Alexa fluoro 488、donkey polyclonal anti-rabbit IgG; Life Technologies Inc.) を添加し、遮光下で室温にて 2 時間のインキュベーションを行った。続いて、遮光下にて、PBS-T で 5 分ごとの洗浄を 3 回行い、再度 3% BSA (Sigma-Aldrich) にて、1 時間のブロ

ッキングを行った。ブロッキング後、monoclonal anti-mouse neuronal nuclear antigen (NeuN, 1:1,000; Millipore) または mouse monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1,000; Millipore)、chicken polyclonal anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2, 1:2,500; Abcam) を添加し、4°C で一晩反応させた。1 時間室温での反応後、PBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行い、二次抗体 (1:200、Alexa fluoro 594, goat polyclonal anti-mouse IgG または Alexa fluoro 594, chicken polyclonal anti-mouse IgG; Life Technologies Inc.) を添加し、遮光下で室温にて 2 時間のインキュベートを行った。それぞれの一次抗体、二次抗体は 1% BSA (Sigma-Aldrich) を含む PBS 溶液中にてそれぞれ希釈した。続いて、遮光下にて PBS-T で 5 分ごとの洗浄を 3 回行った後、室温にて 10 分間 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、Boster Immunoleader, Pleasanton, CA, U.S.A.) を処置することによって核を染色し、Fluoromount/Plus (Dianostic Biosystems, Pleasanton, Camada) と MAS-coated glass slide (松浪硝子工業株式会社) または microcoverglass (13 mm; 松浪硝子工業株式会社) を用いて封入を行った。その後、4°C で 1 日風乾させた後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000、OLYMPUS、東京、日本) を用いて観察を行った。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 脳内 SGLT-1 発現分布と SGLT-1 siRNA 脳室内投与の影響

SGLT-1 のタンパク質発現は脳皮質、線条体、海馬、視床下部、小脳、中脳、延髄および嗅球において広く確認された (Fig. 5A)。SGLT-1 siRNA の投与 4 ~ 5 日後に脳皮質 SGLT-1 発現の有意な減少が認められ、これは投与 6 日後に回復した (Fig. 5B)。脳皮質 SGLT-3 発現は SGLT-1 siRNA の投与によって、なんら影響を受けなかった (Fig. 5C)。

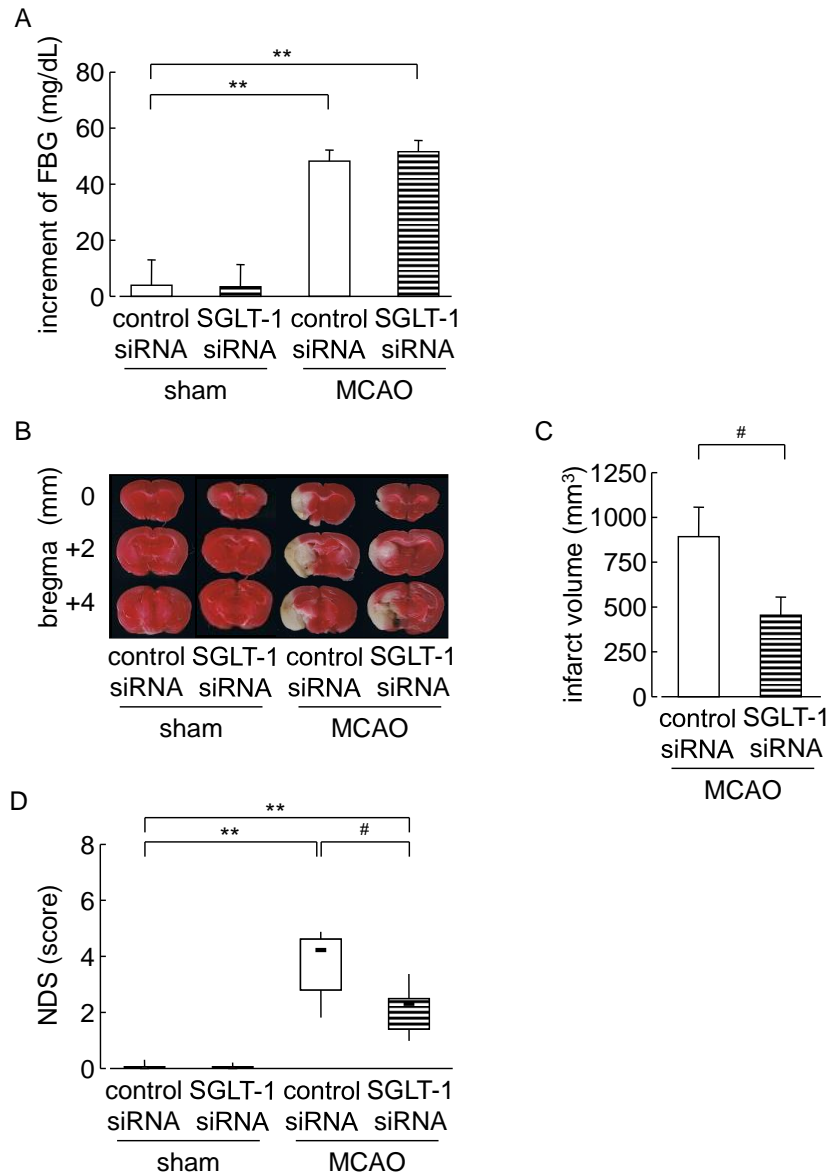


**Fig. 5. Distribution of SGLT-1 and the effect of SGLT-1 siRNA administration on the expression levels of SGLT-1 and -3 in naive mouse brains.**

(A) Representative Western immunoblots of SGLT-1 in brain lesions (cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, cerebellum, midbrain, medulla, and olfactory bulb) ( $n = 3$ ). Representative Western immunoblots from mice administered (i.c.v.) SGLT-1 siRNA (2.5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ , twice daily), showing the time course of changes in the expression of cortical SGLT-1 (B) and SGLT-3 (C). Control siRNA-treated group (day 4):  $n = 9$ ; SGLT-1 siRNA-treated (day 4, 6) group:  $n = 4$ ; SGLT-1 siRNA-treated (day 5) group:  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ . Data represented as mean  $\pm$  SEM.

### 2-3-2. 脳内 SGLT-1 ノックダウンによる脳虚血性神経障害発現への影響

MCAO 1 日後における有意な FBG の上昇は、SGLT-1 siRNA 投与によってなんら影響を受けなかった (Fig. 6A)。それに対して、MCAO 3 日後における梗塞巣形成は、SGLT-1 siRNA 投与によって有意に抑制された (Fig. 6B and C)。さらに、MCAO によって生じた行動異常も、SGLT-1 siRNA 投与によって有意に改善された (Fig. 6D)。

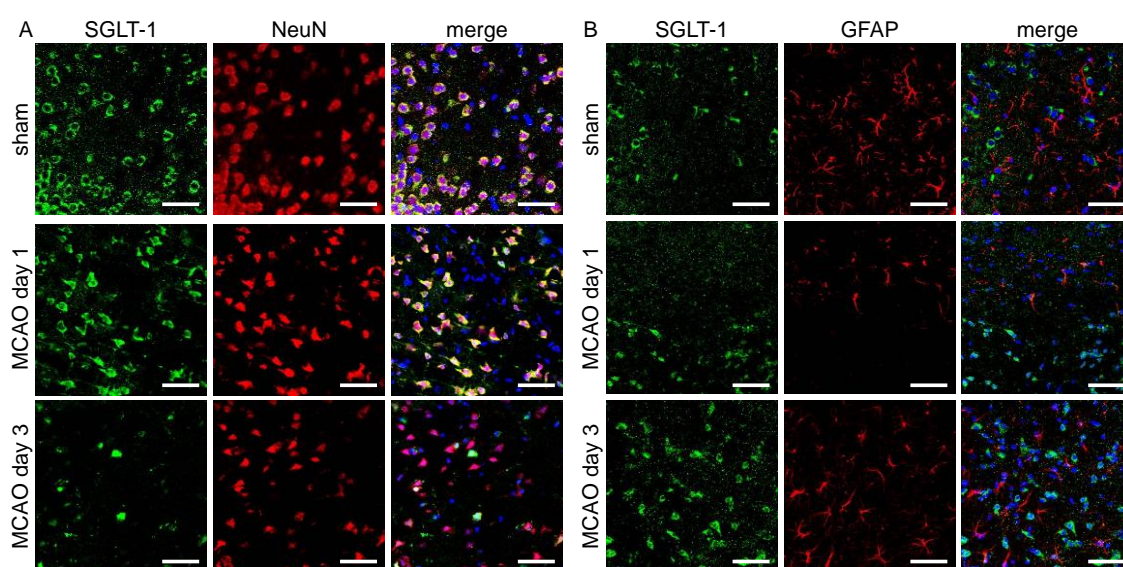


**Fig. 6. Effect of SGLT-1 siRNA treatment on the development of cerebral ischemic neuronal damage.**

(A) Fasting blood glucose levels on day 1 after MCAO. (B) Representative photographs of TTC staining on day 3 after MCAO. (C) Quantitative analysis of the infarct volume. (D) Neurological deficit scores on day 3 after MCAO. Control siRNA-treated sham group: n = 6; SGLT-1 siRNA-treated sham group: n = 6; control siRNA-treated MCAO group: n = 10; SGLT-1 siRNA-treated MCAO group: n = 9. #*P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. Data represented as mean ± SEM.

### 2-3-3. 大脳皮質における脳虚血ストレス負荷後の SGLT-1 発現分布

大脳皮質において、sham 群、MCAO day 1 群および MCAO day 3 群のいずれの群においても、SGLT-1 は神経のマーカである NeuN と共局在していた (Fig. 7A)。なお、SGLT-1 はいずれの群においても、アストロサイトのマーカである GFAP とは共局在しなかった (Fig. 7B)。

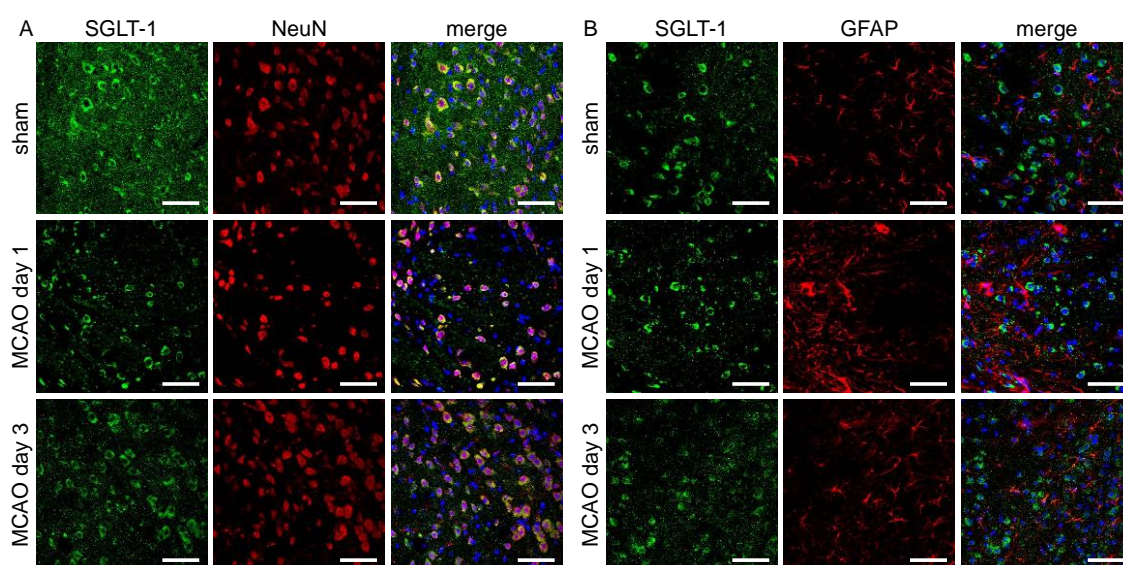


**Fig. 7. Localization of SGLT-1 within neurons and astrocytes in the cortex after cerebral ischemic stress.**

Double immunofluorescence of SGLT-1 and NeuN (a neuronal marker) or GFAP (an astrocytic marker) in the cortex. Representative photographs of SGLT-1 and NeuN or GFAP in sham operated mice on day 1 and 3 after MCAO. Green: SGLT-1; red: NeuN or GFAP; blue: DAPI. Scale bar = 50  $\mu$ m.

#### 2-3-4. 線条体における脳虚血ストレス負荷後の SGLT-1 発現分布

線条体の SGLT-1 は、sham 群、MCAO day 1 群および MCAO day 3 群のいずれの群においても、NeuN と共局在していた (Fig. 8A)。なお、SGLT-1 と GFAP はいずれの群においても、共局在しなかった (Fig. 8B)。

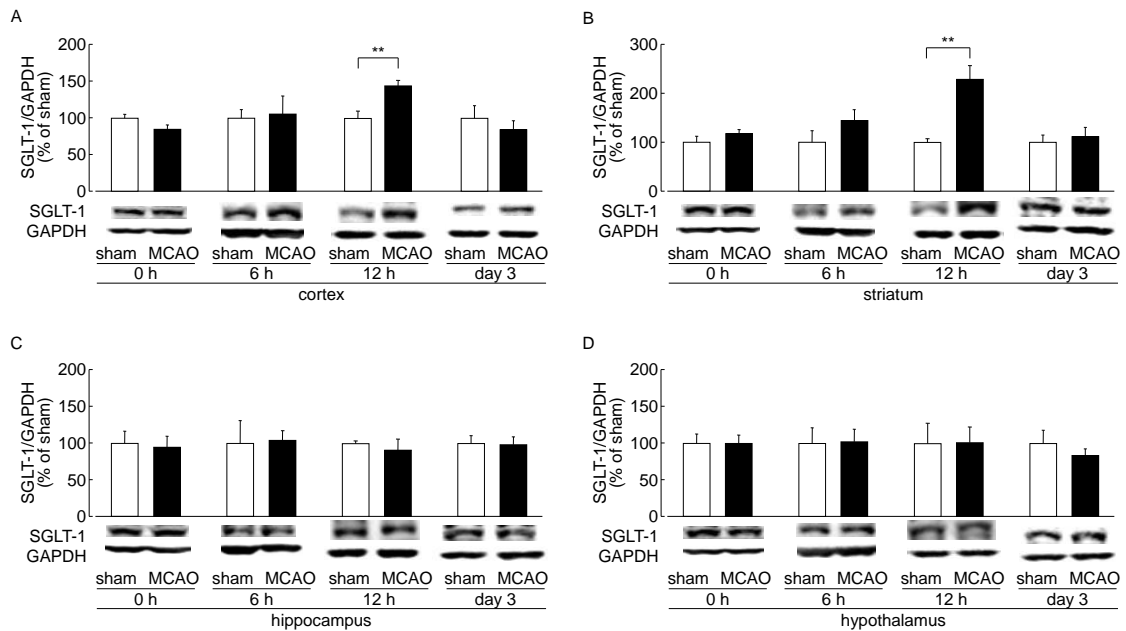


**Fig. 8. Localization of SGLT-1 within neurons and astrocytes in striatum after cerebral ischemic stress.**

Double immunofluorescence of SGLT-1 and NeuN (a neuronal marker) or GFAP (an astrocytic marker) in the striatum. Representative photographs of SGLT-1 and NeuN or GFAP in sham operated mice on day 1 and 3 after MCAO. Green: SGLT-1; red: NeuN or GFAP; blue: DAPI. Scale bar = 50  $\mu$ m.

### 2-3-5. 脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-1 発現の継時的変化

MCAO 12 時間後の大脳皮質および線条体において、SGLT-1 のタンパク質発現は sham 群と比較して有意に増加したが、その他の時間では変化がなかった。(Fig. 9A and B)。海馬および視床下部では、いずれの時間においても、sham 群と比較して SGLT-1 のタンパク質発現に変化はなかった (Fig. 9C and D)。



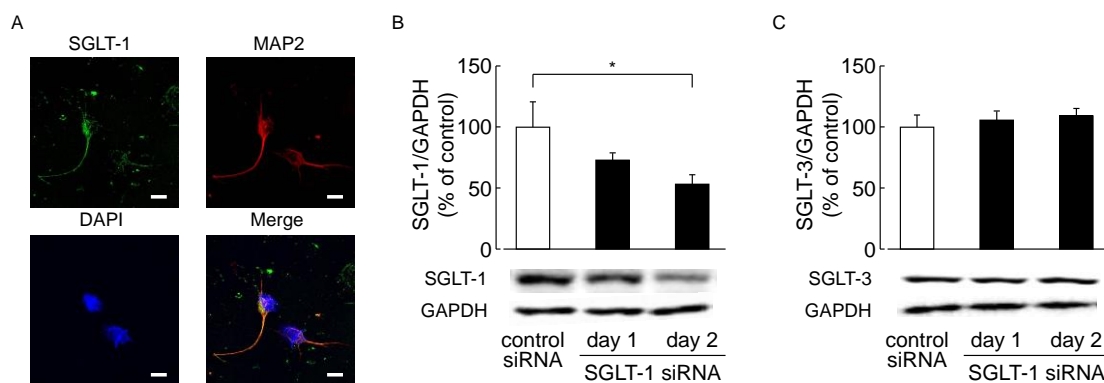
**Fig. 9. Changes in the expression levels of cerebral SGLT-1 after cerebral ischemic stress.**

Representative western immunoblots of SGLT-1 in the cortex (A), striatum (B), hippocampus (C), and hypothalamus (D) at 0 h, 6 h, 12 h, and on day 3 after MCAO (sham group: n = 4; MCAO group: n = 8). \*\* $P < 0.01$  vs. sham. Data represented as mean  $\pm$  SEM.



### 2-3-6. 大脳皮質神経初代培養細胞における SGLT-1 発現と SGLT-1 siRNA 処置の影響

大脳皮質神経初代培養細胞の樹状突起や細胞表面において、SGLT-1 の発現が確認された (Fig. 10A)。Control siRNA 処置群と比較して、SGLT-1 タンパク質発現は SGLT-1 siRNA 処置 2 日後に有意に減少した (Fig. 10B)。一方、SGLT-3 タンパク質発現は、SGLT-1 siRNA 処置によって変化しなかった (Fig. 10C)。

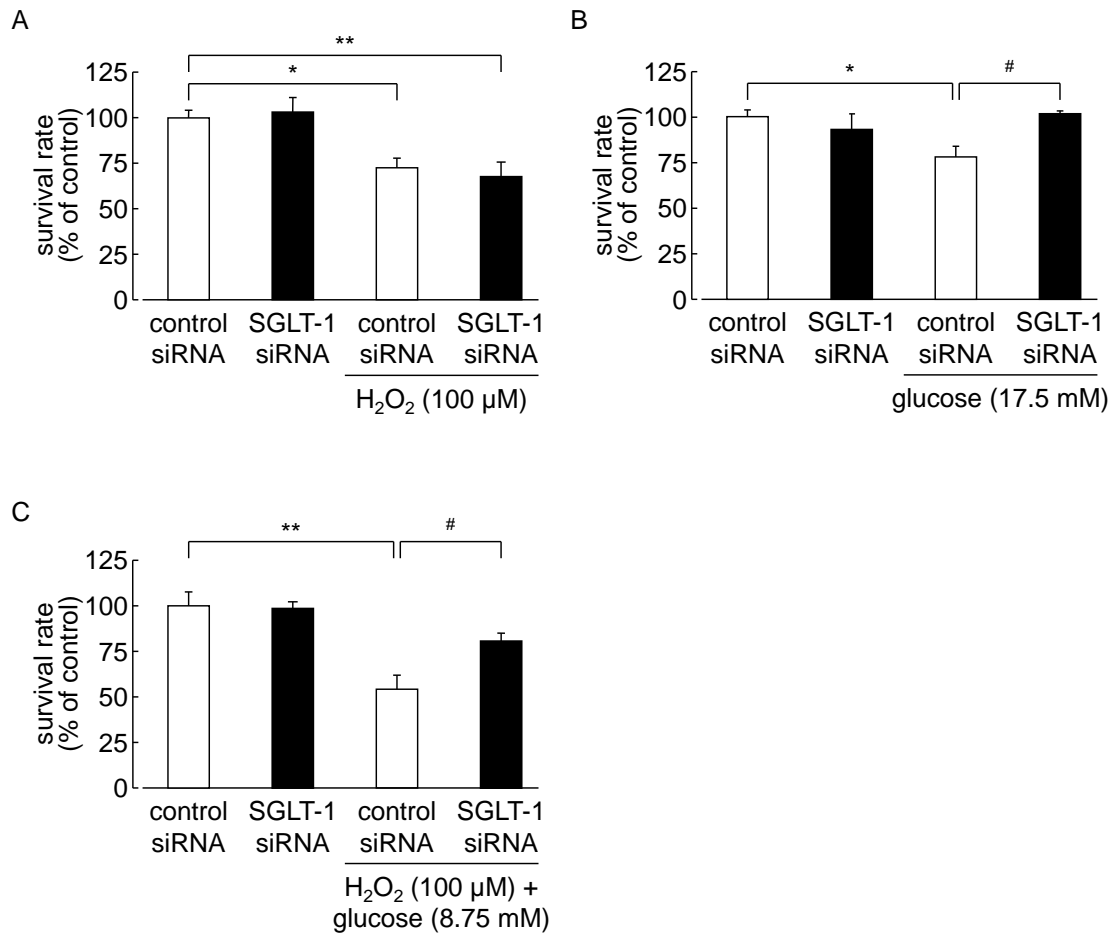


**Fig. 10. Expression of SGLT-1 in primary cortical neuron and the effect of SGLT-1 siRNA treatment on the expression levels of SGLT-1 and -3 in primary cortical neuron.**

(A) Fluorescent immunostaining of SGLT-1 and MAP2 (neuronal marker) and DAPI (nucleus) in primary cortical neuron. Representative photographs of SGLT-1, MAP2, DAPI and merge. Green: SGLT-1, red: MAP2, blue: DAPI. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Representative western immunoblots from primary cortical neurons treated SGLT-1 siRNA (40 nM), showing the time course of changes in the expression of neuronal SGLT-1. Control siRNA-treated group: n = 9, SGLT-1 siRNA-treated (day 1) group: n = 8, SGLT-1 siRNA-treated (day 2) group: n = 9. \* $P$  < 0.05. Data represented as mean  $\pm$  SEM. (C) Representative western immunoblots from primary cortical neurons treated SGLT-1 siRNA (40 nM), showing the time course of changes in the expression of neuronal SGLT-3. Control siRNA-treated group: n = 9, SGLT-1 siRNA-treated (day 1) group: n = 8, SGLT-1 siRNA-treated (day 2) group: n = 9. Data represented as mean  $\pm$  SEM.

### 2-3-7. 神経 SGLT-1 ノックダウンによる細胞生存率への影響

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による有意な細胞生存率の減少は、SGLT-1 siRNA 処置によって影響を受けなかった (Fig. 11A)。一方で、SGLT-1 siRNA 処置は、17.5 mM glucose 処置による有意な細胞生存率の減少を有意に抑制した (Fig. 11B)。さらに、100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/8.75 mM glucose 共処置による有意な細胞生存率の低下は、SGLT-1 siRNA 処置によって有意に改善された (Fig. 11C)。

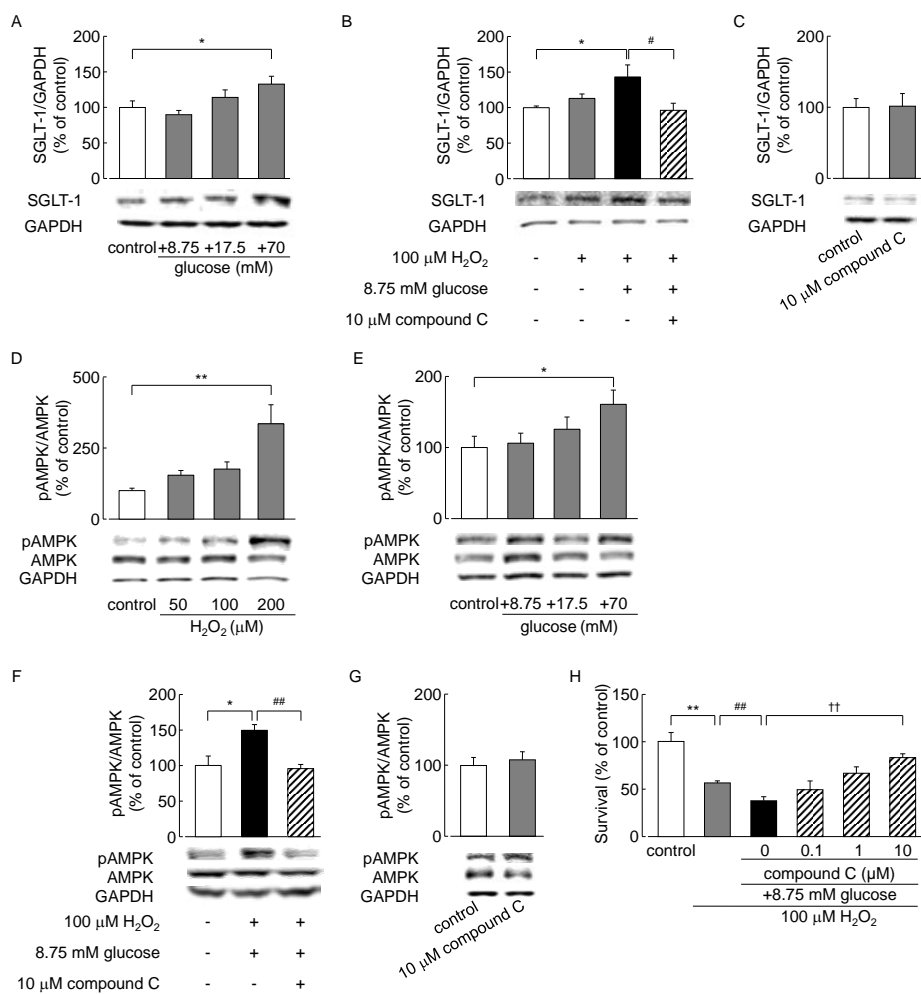


**Fig. 11. Effect of SGLT-1 siRNA treatment on the neuronal survival rate.**

The survival rate was measured by the WST-8 reduction assay on day 1 after components treatment. Data are presented as mean ± SEM. (A) Effect of neuronal SGLT-1 knock down on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment-induced neuronal cell death. \*\**P* < 0.01, \**P* < 0.05. All groups: n = 10. (B) Effect of neuronal SGLT-1 knock down on additional glucose treatment-induced decline of neuronal survival rate. \**P* < 0.05, #*P* < 0.05. All groups: n = 10. (C) Effect of neuronal SGLT-1 knock down on decline of neuronal survival rate after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/glucose concomitant treatment. \**P* < 0.05, #*P* < 0.05, \*\**P* < 0.01. All groups: n = 12.

### 2-3-8. *In vitro* 虚血後高血糖モデルにおける SGLT-1 発現の誘導機序に対する AMPK の関与

70 mM グルコース処置によって、control 群と比較して SGLT-1 タンパク質発現は有意に増加した (Fig. 12A)。Control 群と比較して、100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /8.75 mM glucose 共処置群では SGLT-1 タンパク質発現の有意な増加が認められ、この増加は AMPK 阻害薬である 10  $\mu\text{M}$  compound C の共処置によって有意に抑制された (Fig. 12B)。10  $\mu\text{M}$  compound C 単独では、SGLT-1 のタンパク質発現になんら影響を与えなかった (Fig. 12C)。pAMPK/AMPK 比は control 群と比較して 50、100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  処置群では変化しなかったが、200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  処置群において有意に上昇した (Fig. 12D)。また、control 群と比較して、70 mM glucose 処置によって、pAMPK/AMPK 比は有意に上昇したが、8.75 および 17.5 mM glucose 処置では変化しなかった (Fig. 12E)。Control 群と比較して、pAMPK/AMPK 比は 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /8.75 mM glucose 共処置によって有意に上昇し、この上昇は 10  $\mu\text{M}$  compound C 処置によって有意に抑制された (Fig. 12F)。10  $\mu\text{M}$  compound C 単独処置では、pAMPK/AMPK 比に変化は認められなかった (Fig. 12G)。100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  によって誘導された有意な細胞生存率の低下は、8.75 mM glucose 処置によって有意に増悪された (Fig. 12H)。この細胞死は compound C 処置によって用量依存的に抑制され、10  $\mu\text{M}$  compound C によって有意に抑制された (Fig. 12H)。



**Fig. 12. Involvement of AMPK in the up-regulation of SGLT-1 and neuronal cell death.**

(A–C) Representative western blots of SGLT-1 in primary neuronal cultures. SGLT-1 expression was measured 24 h after components treatment. (A) Control, glucose (8.75, 17.5, 70 mM):  $n = 11$ . (B) Control, 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, concomitant treatment with 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 8.75 mM glucose, concomitant treatment of 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 8.75 mM glucose and 10  $\mu\text{M}$  compound C:  $n = 8$ . (C) Control, 10  $\mu\text{M}$  compound C treatment;  $n = 6$ . (D–G) Representative western blots of pAMPK and AMPK in primary neuronal cultures. The relative expression levels were analyzed by determining the ratio of pAMPK and AMPK (pAMPK/AMPK) at 24 h after components treatment. (D) Control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50, 100, and 200  $\mu\text{M}$ ) treatment:  $n = 3$ . (E) Control, glucose (8.75, 17.5, and 70 mM) treatment:  $n = 11$ . (F) Control, concomitant treatment with 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 8.75 mM glucose, concomitant treatment of 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 8.75 mM glucose and 10  $\mu\text{M}$  compound C:  $n = 10$ . (G) Control, 10  $\mu\text{M}$  compound C treatment;  $n = 6$ . (H) Effect of compound C on decreased survival rate after concomitant treatment with 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 8.75 mM glucose (control:  $n = 9$ ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $n = 10$ ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 8.75 mM glucose:  $n = 10$ ; 0.1  $\mu\text{M}$  compound C:  $n = 9$ ; 1  $\mu\text{M}$  compound C:  $n = 10$ ; 10  $\mu\text{M}$  compound C:  $n = 4$ ). The survival rate was measured by the WST-8 reduction assay, which was performed at 24 h after treatment with reagents.  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.01$ ,  $^{##}P < 0.05$ ,  $^{††}P < 0.01$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## 2-4. 考 察

第一章の検討結果から、脳内 SGLT が脳虚血性神経障害の発現増悪に関与する可能性を明らかにした。しかしながら、脳内に存在する各 SGLT アイソフォームの関与は不明なままであった。そこで、脳内 SGLT アイソフォームの中でも、神経上に発現し、MCAO 後にその発現が上昇する SGLT-1 に着目し検討を行った。

本研究において SGLT-1 は、梗塞巣形成部位である大脳皮質、線条体、海馬ならびに、糖代謝や血糖値制御を担う領域である視床下部などで発現が認められ、脳内の幅広い領域に存在することが示された。次に、SGLT-1 siRNA を用いたノックダウンによる検討から、脳内 SGLT-1 は脳虚血性神経障害の発現増悪に関与する可能性が明らかとなった。一方、脳内 SGLT-1 ノックダウンは虚血後高血糖には、影響を与えなかったことから、血糖値制御には脳内 SGLT-1 は関与しないことが示された。これらの結果は、第一章で示した phlorizin による脳内 SGLT 阻害の検討と同様の結果であり、脳内 SGLT アイソフォームの中でも、特に SGLT-1 が脳虚血性神経障害の発現増悪を誘導する可能性が示された。また、脳内 SGLT-1 siRNA の投与は他の脳内 SGLT アイソフォームのひとつである SGLT-3 の発現には影響を与えないことを確認しており、今回の結果に他のアイソフォームは関与しないことを確認している。さらに、SGLT-1 の脳内局在の解析から、SGLT-1 は MCAO 後においてもグリア細胞には発現しておらず神経に発現していたことから、SGLT-1 は脳虚血時に神経に対して直接的に影響している可能性が示唆された。

我々の先行研究において、MCAO 1 日後の大脳皮質および線条体において、SGLT-1 の発現が有意に増加することを報告しているが<sup>11)</sup>、その他の時間帯での発現変化は明らかとなっていなかった。MCAO 後の継時的な SGLT-1 発現変化について、虚血コア領域である大脳皮質および線条体、虚血ペナンプラ領域である海馬、糖代謝に関与する領域である視床下部に着目し検討したところ、虚血コア領域では MCAO 12 時間後に SGLT-1 の発現が有意に上昇しており、脳虚血性神経障害の発現増悪には、この SGLT-1 の発現増加が関与する可能性が考えられた。

SGLT-1 は、大脳皮質神経初代培養細胞の細胞体表面や樹状突起上に発現することが確認された。また、SGLT-1 siRNA 処置 2 日後において、SGLT-3 発現には影響せずに SGLT-1 発現は有意に減少したことから、薬物処置は SGLT-1 siRNA 処置の 2 日後に行った。第一章の phlorizin の検討結果と同様に、神経 SGLT-1 は、酸化ストレスによる神経細胞死には影響しない可能性が示され、通常よりもグルコース濃度が高い条件下で神経細胞死を増悪することが示唆された。高グルコース条件下では、SGLT-1 を介したナトリウムおよびグルコースの細胞内流入が増加していることが考えられ、その結果、神経細胞死が誘導されたと考えられる。

SGLT-1 は 2 分子のナトリウムイオンと共に、1 分子のグルコースを細胞内へ輸送する<sup>50,51)</sup>。腎尿細管において、SGLT-2 と共に、糖の再吸収に関与するほか、小腸における糖の吸収に関与する事が知られている<sup>13,14,52,53)</sup>。糖尿病病態時などの高血糖状態において、小腸

および腎尿細管の SGLT-1 発現が増加することが報告されている<sup>54,55)</sup>。今回の検討において、大脳皮質神経初代培養細胞への 70 mM glucose 処置によっても、SGLT-1 の有意な発現増加が示されており、中枢神経系においても高血糖状態時に SGLT-1 の発現が誘導される可能性が示された。また、心筋や小腸において、AMPK の活性化が SGLT-1 の転写を誘導し、膜発現を上昇させ、その輸送能の増大が生じることが報告されている<sup>44,46,55,56)</sup>。加えて、我々の先行研究において、MCAO 1 日後に大脳皮質の AMPK が活性化することを明らかにしている<sup>9)</sup>。以上から、MCAO 後に脳内 AMPK が活性化することによって、SGLT-1 の発現が増加する可能性が考えられた。*In vitro* 系においても、虚血後高血糖ストレスによって、SGLT-1 の発現が誘導されることが示された。またこの時、AMPK の有意なリン酸化率の上昇も認められており、AMPK の活性化が SGLT-1 の発現を誘導する可能性が示された。また、compound C 単独処置によって、SGLT-1 発現や AMPK の活性化は影響されないことを確認している。最後に、compound C 処置によって、100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/8.75 mM glucose 共処置による神経細胞死は抑制されており、この改善効果の一部には、SGLT-1 発現誘導の抑制が関与していると考えられる。

SGLT-1 のプロモーター領域に対する specificity protein 1 (Sp1) の結合が SGLT-1 の転写を誘導することが報告されている<sup>57)</sup>。この Sp1 は酸化ストレス条件下や低酸素状態といった虚血状態において、mRNA 発現が増加し、活性化されることが知られている<sup>58-62)</sup>。また、Sp1 のプロモーター領域への結合能は AMPK によるリン酸化によって増加することが知られている<sup>63)</sup>。よって、脳虚血ストレス負荷後に活性化された AMPK が Sp1 を介して、SGLT-1 の転写を誘導した可能性が考えられる。また、脳虚血ストレスや高血糖状態によって活性化されることが知られている p-38 や extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 によって Sp1 による転写誘導が増加することが報告されている<sup>64-67)</sup>。また、p-38 や ERK および同じ mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーに属する c-Jun N-terminal kinases (JNK) が NF- $\kappa$ B シグナルを介して SGLT-1 の転写を促進し、膜発現を増加させ、糖の取り込みを増やすことが報告されている<sup>68,69)</sup>。今後、脳虚血後の SGLT-1 発現誘導機序に対する MAPK の関与について検討する必要があると考えられる。

第二章では、脳内 SGLT アイソフォームの中でも、神経上に発現している明らかであった SGLT-1 が脳虚血性神経障害の発現増悪に関与する可能性が示された。また、脳内 SGLT-1 の発現誘導機序のひとつとして、脳虚血ストレス負荷後の脳内 AMPK の活性化の関与が考えられた。

### 第三章 脳虚血ストレス負荷後の脳内 sodium-glucose transporter type 1 発現誘導機序に対する mitogen-activated protein kinase の関与

#### 3-1. 緒言

第二章において、脳内 SGLT-1 は脳虚血性神経障害の発現増悪に関与することが明らかとなり、さらに脳虚血ストレス負荷後に虚血コア領域である大脳皮質および線条体において、その発現が増加することが示された。脳虚血ストレス負荷後の脳内 AMPK の活性化が、SGLT-1 の発現を誘導する可能性を見出しているが、第三章では、脳虚血ストレス負荷後の SGLT-1 誘導因子のさらなる解明を行った。

MAPK 経路は MAPKKK-MAPKK-MAPK という 3 種類のタンパク質リン酸化酵素によって構成されるシグナル伝達モジュールであり、JNK 経路、p38 経路、ERK 経路の 3 種類の経路が存在する<sup>70)</sup>。成長因子やサイトカイン、酸化ストレスなどの暴露によって活性化され、細胞の成長、増殖、分化やアポトーシスといった、様々な細胞シグナルの制御を行う<sup>71)</sup>。脳虚血ストレスによっても活性化されることが知られており、JNK および p-38 の活性化は脳虚血性神経障害発現を増悪すること、一方で ERK の活性化は脳虚血性神経障害の発現を改善することが知られている<sup>72,73)</sup>。さらに、腎尿細管細胞を用いた検討において、MAPK の活性化が NF- $\kappa$ B シグナル経路を介して SGLT-1 の膜発現の増加や転写促進を誘導することが報告されている<sup>68,69)</sup>。

よって、第三章では、脳虚血ストレスによって活性化された MAPK が、脳虚血後の SGLT-1 の発現誘導に関与すると仮定し検討を行った。

---

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した

1. Yamazaki Y., Harada S., Wada T., Yoshida S., Tokuyama S., Sodium transport through the cerebral sodium-glucose transporter exacerbates neuron damage during cerebral ischaemia. *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 922-931 (2016).
2. Yamazaki Y., Arita K., Harada S., Tokuyama S., Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 after cerebral ischemia upregulates cerebral sodium-glucose transporter type 1. *J. Pharmacol. Sci.*, (in press).

## 3-2. 実験材料および方法

第一章 (1-2) および第二章 (2-2) と同様の実験材料および方法に従った。

### 3-2-1. SDS-PAGE および western blot 法 (MAPK)

Phosphor-JNK (p-JNK) および JNK、phospho-p38 (p-p38) および p38、10  $\mu\text{g}/\text{lane}$  のタンパク質を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、phospho-ERK (pERK) および ERK の検出では AMPK および pAMPK の検出では、20  $\mu\text{g}/\text{lane}$  のタンパク質を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離した。電気泳動および転写条件は第一章 (1-2) と同様に行った。これらのタンパク質の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [TBS-T + 5% BSA (Sigma-Aldrich)] の中で 1 時間室温において振盪させた後、rabbit anti-p-JNK monoclonal antibody (1:2000; Cell Signaling Technology) および rabbit anti-JNK monoclonal antibody (1:2000; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-p-p38 monoclonal antibody (1:3000; Cell Signaling Technology) および rabbit anti-p38 monoclonal antibody (1:3000; Cell Signaling Technology) を 4°C で一晩反応させた。室温で 1 時間インキュベートした後、nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。続いて二次抗体として、HRP-labeled affinity purified antibody to rabbit IgG + IgM (H + L) (1:1,000、Kirkegaard and Perry Laboratories) を室温で 1 時間反応させた。その後、nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。GAPDH の検出およびバントの検出、補正は第一章 (1-2) に従った。

### 3-2-2. MAPK 阻害剤処置の方法

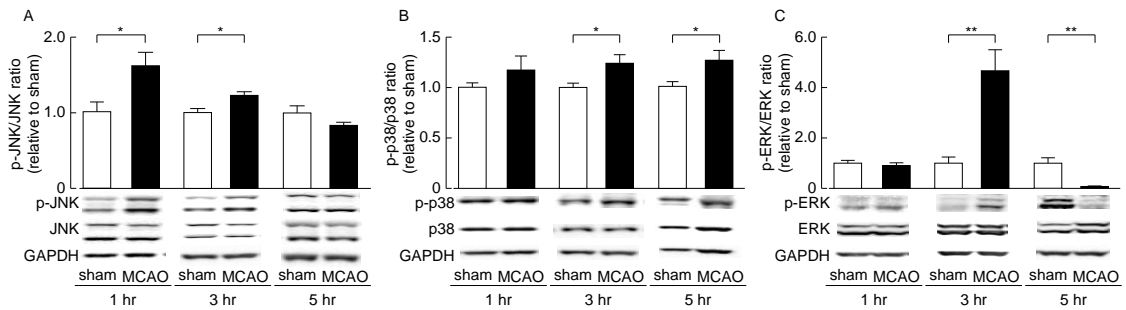
JNK 阻害薬である SP600125 (100  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ ; Abcam)、p38 阻害薬 である SB203580 (100  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ ; Abcam) および ERK の上流因子である MAPK/ERK kinase 阻害剤である PD98059 (200  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ ; Abcam) は、再灌流直後に脳室内投与した。



### 3-3. 結 果

#### 3-3-1. 脳虚血ストレス負荷後の脳内 MAPK 活性の継時的変化

MCAO 1 および 3 時間後の大脳皮質において、JNK のリン酸化率は有意に上昇した (Fig. 13A)。大脳皮質 p38 のリン酸化率は MCAO 3 および 5 時間後に有意に上昇した (Fig. 13B)。大脳皮質における ERK のリン酸化率は MCAO 3 時間後に有意に増加し、MCAO 5 時間後に有意に減少した (Fig. 13C)。

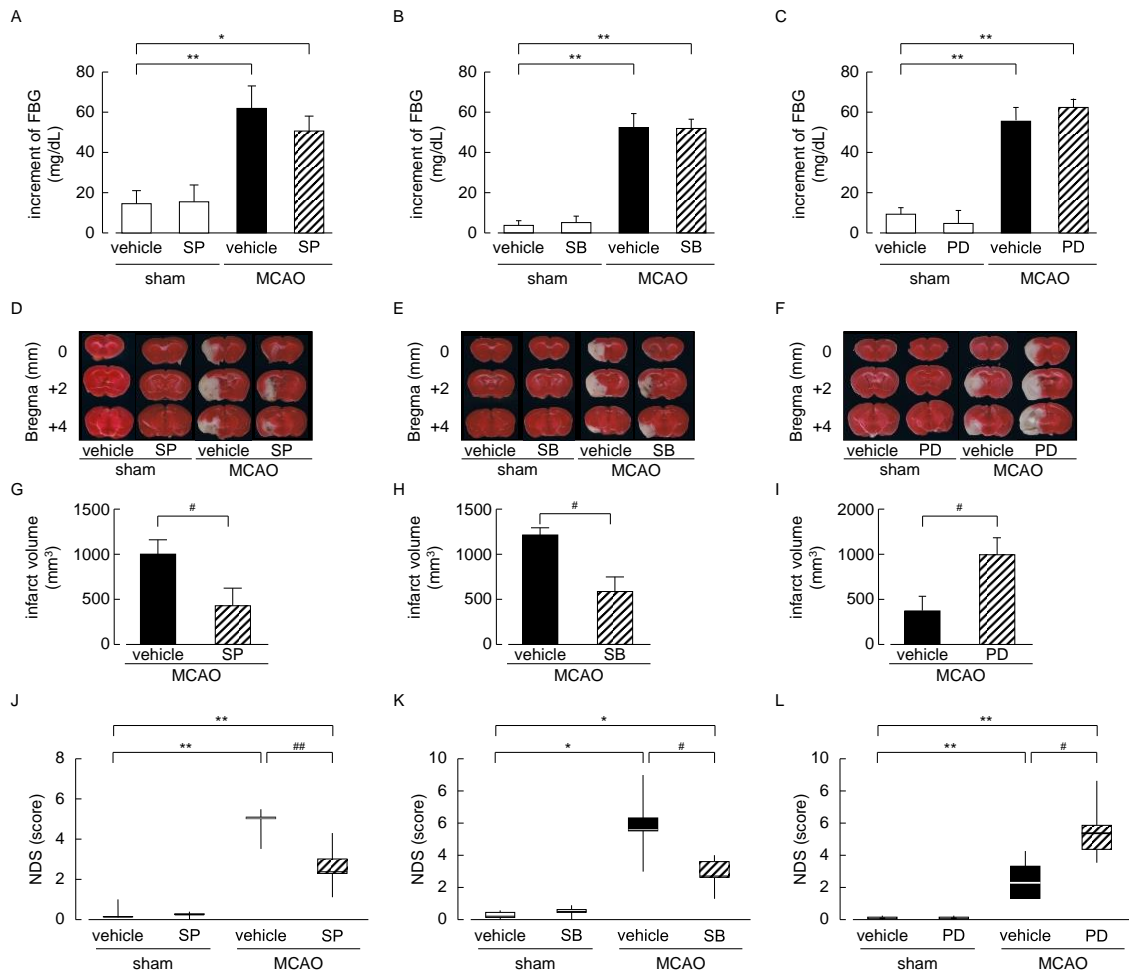


**Fig. 13. Changes in the expression levels of MAPK after MCAO.**

(A) Representative western immunoblots of p-JNK and JNK 1 h (n = 6), 3 h (n = 5), and 5 h (n = 10) after MCAO in the cortex. (B) Representative western immunoblots of p-p38 and p38 at 1, 3, and 5 h after MCAO in the cortex (n = 5–6 for each group). (C) Representative western immunoblots of p-ERK and ERK at 1, 3, and 5 h after MCAO in the cortex (n = 5–6 for each group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Data are represented as the mean  $\pm$  SEM.

### 3-3-2. 脳虚血性神経障害発現に対する MAPK 阻害剤投与の影響

SP600125、SB203580 あるいは PD98059 の脳室内投与は、MCAO 1 日後における有意な FBG の上昇になんら影響を与えなかった (Fig. 14A-C)。MCAO 3 日後の梗塞巣形成は SP600125 あるいは SB203580 の脳室内投与によって、有意に改善された (Fig. 14D, F, G, H)。一方で、PD98059 の脳室内投与は MCAO 1 日後における梗塞巣形成を有意に増悪した (Fig. 14F and I)。SP600125 あるいは SB203580 の脳室内投与は MCAO 3 日後の行動異常を有意に改善したが、PD98059 の脳室内投与は MCAO 1 日後における行動異常を有意に増悪した (Fig. 14J-L)。

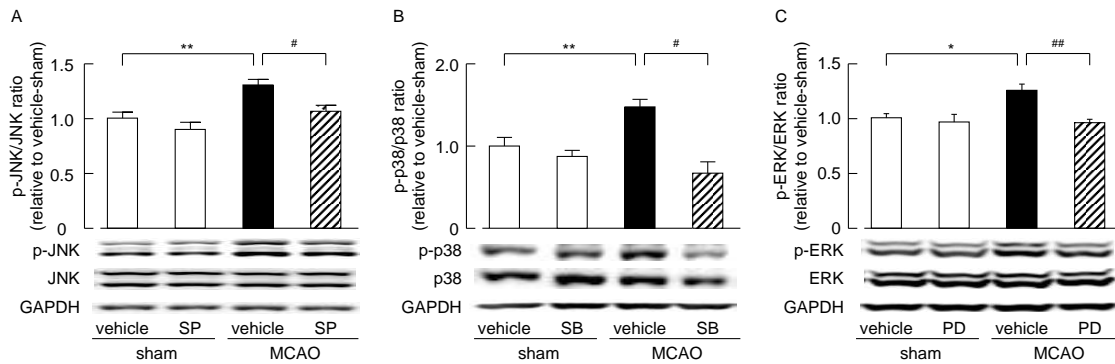


**Fig. 14. Effect of MAPK inhibitor treatment on the development of cerebral ischemic neuronal damage.**

SP600125, SB203580, and PD98059 were administrated via an i.c.v. injection immediately after reperfusion. (A-C) FBG levels on day 1 after MCAO. (D and E) Representative photographs of TTC staining on day 3 after MCAO. (F) Representative photographs of TTC staining on day 1 after MCAO. (G-I) Quantitative analysis of the infarct volume. (J and K) Neurological deficit scores on day 3 after MCAO. (L) Neurological deficit scores on day 1 after MCAO. (A, D, G, J) Vehicle-treated sham group and JNK inhibitor-treated sham group: n = 7, vehicle-treated MCAO group: n = 7, JNK inhibitor-treated MCAO group: n = 8. (B, E, H, K) Vehicle-treated sham group and p38 inhibitor-treated sham group: n = 7, vehicle-treated MCAO group: n = 5, p38 inhibitor-treated MCAO group: n = 6. (C, F, I, L) Vehicle-treated sham group and MEK inhibitor-treated sham group: n = 6, vehicle-treated MCAO group, MEK inhibitor-treated MCAO group: n = 8. \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ## $P < 0.01$ . Data are represented as the mean  $\pm$  SEM. SP: SP600125, SB: SB203580, PD: PD98059.

### 3-3-3. 脳虚血ストレス負荷後の MAPK 活性に対する MAPK 阻害剤の影響

MCAO 3 時間後の JNK の有意なリン酸化率の上昇は、SP600125 の脳室内投与によって有意に抑制された (Fig. 15A)。SB203580 の脳室内投与は、MCAO 3 時間後の有意な p-38 リン酸化率の上昇を有意に抑制した (Fig. 15B)。MCAO 3 時間後における ERK の有意な活性化は PD98059 の脳室内投与によって有意に抑制された。

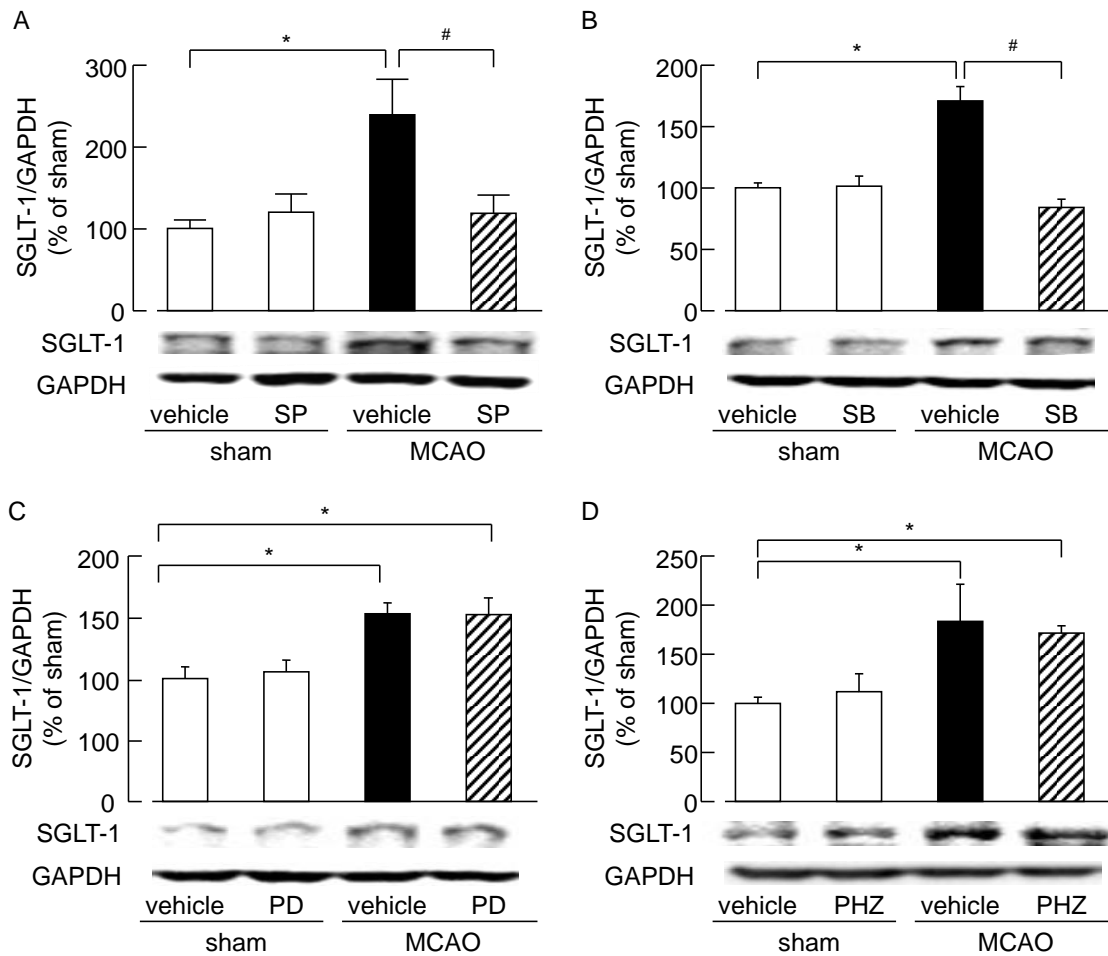


**Fig. 15. Effect of MAPK inhibitor on the expression levels of MAPK after MCAO.**

SP600125, SB203580, and PD98059 were administrated via an i.c.v. injection immediately after reperfusion. (A) Representative western immunoblots of p-JNK and JNK 3 h after MCAO in the cortex (n = 12 per group). (B) Representative western immunoblots of p-p38 and p38 3 h after MCAO in the cortex (n = 12 per group). (C) Representative western immunoblots of p-ERK and ERK 3 h after MCAO in the cortex (n = 5 per group). \*\* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$  Data are represented as the mean  $\pm$  SEM. SP: SP600125, SB: SB203580, PD: PD98059.

### 3-3-4. MAPK 阻害剤が脳虚血ストレスによる脳内 SGLT-1 発現誘導に及ぼす影響

大脳皮質 SGLT-1 は MCAO 12 時間後に有意に増加し、この増加は SP600125 あるいは SB203580 の脳室内投与によって有意に抑制された (Fig. 16A and B)。一方で、MCAO 12 時間後の大脳皮質 SGLT-1 の増加は PD98059 の脳室内投与によってなら影響を受けなかった (Fig. 16C)。Phlorizin の脳室内投与は、MCAO 12 時間後における SGLT-1 の有意な発現上昇に影響を及ぼさなかった (Fig. 16D)。

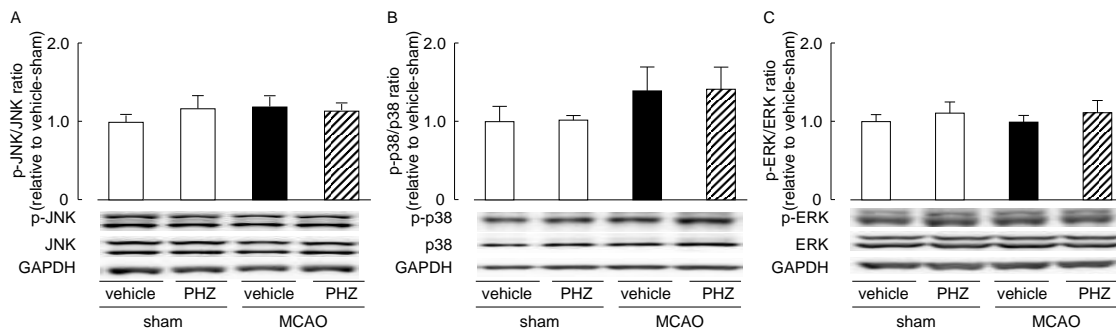


**Fig. 16. Effect of MAPK inhibitor on the expression levels of SGLT-1 after MCAO.**

SP600125 (A), SB203580 (B), and PD98059 (C) were administered via an i.c.v. injection immediately after reperfusion. Phlorizin (D) was administered via i.c.v. injection 6 h after reperfusion. (A-D) Representative western immunoblots of SGLT-1 12 h after MCAO in the cortex (n = 8 per group). \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ . Data are represented as the mean  $\pm$  SEM. SP: SP600125, SB: SB203580, PD: PD98059.

### 3-3-5. Phlorizin 投与が脳内 MAPK 活性に及ぼす影響

大脳皮質 p-JNK/JNK 比、p-p38/p38 比および p-ERK/ERK 比は MCAO 7 時間後において、sham 群と比較してなんら変わりがなかった (Fig 17A-C)。また、再灌流 6 時間後の phlorizin 脳室内投与は大脳皮質 p-JNK/JNK 比、p-p38/p38 比および p-ERK/ERK 比に影響を与えなかった (Fig. 17A-C)。



**Fig. 17. Effect of phlorizin administration on changes in the MAPK expression after MCAO.**

Phlorizin was administered via an i.c.v. injection 6 h after reperfusion. (A) Representative western immunoblots of p-JNK and JNK 7 h after MCAO in the cortex (n = 6 per group). (B) Representative western immunoblots of p-p38 and p38 7 h after MCAO in the cortex. Vehicle- and phlorizin-treated sham groups and vehicle-treated MCAO group: n = 6, phlorizin-treated MCAO group: n = 7. (C) Representative western immunoblots of p-ERK and ERK 7 h after MCAO in the cortex (n = 6 per group). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM. PHZ: phlorizin.

### 3-4. 考 察

第二章では、脳内 SGLT-1 が脳虚血性神経障害の発現を増悪すること、さらに、脳虚血後の AMPK の活性化が脳内 SGLT-1 の発現を誘導することを見出した。AMPK の他に、様々な細胞内シグナル伝達を担うことが知られている MAPK 経路が、SGLT-1 の発現誘導に関与することが報告されている<sup>68,69)</sup>。MAPK 経路は JNK、p38 および ERK の 3 つの経路が存在する<sup>70,71)</sup>。JNK および p38 経路は、ストレス応答 MAPK 経路とも呼ばれ、紫外線や放射線、酸化、熱ショック、高浸透圧といった多様な環境ストレス刺激によって活性化され、ストレスを被った細胞にアポトーシスを惹起させる<sup>74,75)</sup>。また、炎症性サイトカインや感染によっても活性化され、免疫応答や炎症の制御に中心的な役割を担うことが知られている<sup>74,75)</sup>。一方で、ERK 経路は主に増殖因子によって活性化され、細胞増殖や分化を制御する<sup>74,75)</sup>。これら、MAPK 経路は脳虚血ストレスによって活性化されることが知られており、特に JNK 経路および p38 経路は脳虚血性神経障害の形成に関与すること、さらに ERK 経路は神経障害発現に対して脳保護的に作用することが報告されている<sup>72,73)</sup>。そこで、脳虚血ストレス負荷によって活性化した MAPK 経路が SGLT-1 の発現へ及ぼす影響について検討した。

既存の報告通り、JNK および p38 は脳虚血ストレスによって脳内で活性化され、これらが虚血後高血糖に関与せずに脳虚血性神経障害の形成に関与することが示された。MCAO 後の JNK および p38 の活性化を阻害することによって、SGLT-1 の発現誘導は抑制されたことから、脳虚血ストレス負荷後の JNK および p38 の活性化が脳内 SGLT-1 発現を増加させている可能性が示された。一方で、ERK は脳虚血後一過性に上昇し、その後、有意な活性の低下が示された。これは、脳虚血ストレスから脳を保護するために ERK は活性化したが、その後神経障害が進行したことで保護効果が見えなくなってしまった可能性が考えられた。脳虚血後の ERK の活性化は、神経障害発現に対して保護的に作用し、SGLT-1 の発現誘導には関与しないことが示唆された。3 つの MAPK 経路間でシグナル伝達の混線は起こらないとされており<sup>76)</sup>、実際に、今回の検討結果においても、JNK および p38 経路と ERK 経路では SGLT-1 に対する反応性が異なるという結果が得られた。また、JNK と p38 では、MCAO によって活性化される時間が異なっており、このわずかな時間差が脳内 SGLT-1 発現誘導への関与に違いをもたらした可能性も考えられる。また、JNK および p38 阻害剤の投与は脳虚血性神経障害発現を抑制したことから、神経障害発現の抑制によって SGLT-1 の発現誘導が生じなかった可能性が考えられた。そこで、第一章において、脳保護効果が認められた phlorizin 脳室内投与後の SGLT-1 発現について検討をしたところ、脳虚血性神経障害発現の改善は SGLT-1 の発現誘導に影響を与えないことが示された。よって、JNK および p38 経路は脳虚血性神経障害発現の形成とは別に、SGLT-1 誘導に関与する可能性が示された。

脳虚血ストレスによって活性化された JNK および p38 経路は、アポトーシスを誘導することで神経障害の発現に関与すると知られていることから<sup>72,73)</sup>、脳内 SGLT の下流で

これらの経路が活性化される可能性が考えられた。また、脳保護作用が認められた ERK 経路は SGLT-1 の下流で不活化される可能性が考えられたことから、第一章で脳虚血性神経障害発現の改善効果が認められた phlorizin の再灌流 6 時間後投与を行い、その 1 時間後における JNK、p38 および ERK 活性を評価した。その結果、MAPK 経路は脳内 SGLT-1 の下流シグナルではないことが示された。よって、脳虚血時、MAPK 経路は脳内 SGLT による神経障害発現の増悪機構とは別に機能しているが、JNK および p38 経路は脳内 SGLT-1 発現を増加することで、脳内 SGLT-1 による脳虚血性神経障害の発現増悪に一部寄与する可能性が示された。



## 第四章 脳内 sodium-glucose transporter を介したナトリウム流入が脳虚血性神経障害の発現増悪に及ぼす影響

### 4-1. 緒言

第一章および第二章から、脳虚血後高血糖が脳内 SGLT、特に脳内 SGLT-1 を介して、脳虚血性神経障害の発現を増悪させる可能性が示された。この増悪機序には、虚血後高血糖によって、SGLT-1 によるグルコースあるいはナトリウムの細胞内流入が過剰になることが関与すると考えられる一方、その詳細は不明なままである。

脳虚血ストレス負荷時には、神経細胞膜の脱分極が生じ、電位依存性カルシウムチャネルの活性化やグルタミン酸放出による  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid 受容体および N-methyl-D-aspartate 受容体を介した細胞内カルシウムイオン濃度の上昇や細胞内イオンバランスの崩壊が生じる<sup>77-81)</sup>。また、この細胞内カルシウム濃度の上昇が種々の酵素の活性化やミトコンドリアの機能不全を誘導することで、神経障害が生じると考えられている<sup>79-83)</sup>。一方で、SGLT を介したナトリウムの流入が、膜脱分極や、細胞内カルシウム濃度の上昇を誘導することが報告されている<sup>13,84)</sup>。このことから、脳虚血後に高血糖状態となることによって、脳内 SGLT を介したナトリウム流入が過剰となり、さらなる膜脱分極や細胞内カルシウム濃度の上昇が生じ、脳虚血性神経障害発現を増悪させる可能性が考えられた。そこで、脳内 SGLT を介したナトリウム流入を過剰にした時の脳虚血性神経障害発現について検討した。

---

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

1. Yamazaki Y., Harada S., Tokuyama S., Relationship between cerebral sodium-glucose transporter and hyperglycemia in cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.*, **604**, 134-139 (2015).
2. Yamazaki Y., Harada S., Wada T., Yoshida S., Tokuyama S., Sodium transport through the cerebral sodium-glucose transporter exacerbates neuron damage during cerebral ischaemia. *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 922-931 (2016).
3. Yamazaki Y., Harada S., Wada T., Hagiwara T., Yoshida S., Tokuyama S., Sodium influx through cerebral sodium-glucose transporter type 1 exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage. *Eur. J. Pharmacol.*, (in press).

## 4-2. 実験材料および方法

第一章 (1-2)、第二章 (2-2) および第三章 (3-2) と同様の実験材料および方法に従った。

### 4-2-1. 大脳皮質神経初代培養細胞内のナトリウム濃度測定

SGLT を介したナトリウム流入は  $\alpha$ -methyl-D-glucopyranoside ( $\alpha$ -MG) によって誘導した。 $\alpha$ -MG は非代謝性のグルコースアナログであり、SGLT によって特異的に輸送され、細胞内へのナトリウム流入を生じさせる<sup>13,85)</sup>。細胞内ナトリウム濃度の測定は、第一章 (1-2-11) に従った。大脳皮質神経初代培養細胞は、10  $\mu$ M SBF1 および 0.02% pluronic F-127 (detergent) を含む standard solution [140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5.56 mM glucose (pH 7.4)] を遮光下 37°C で 30 分間反応させた。

### 4-2-2. $\alpha$ -MG および phlorizin 処置の方法

$\alpha$ -MG (2.5, 5.0  $\mu$ g/mouse または 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ M; 東京化成工業株式会社) および phlorizin (40  $\mu$ g/mouse または 50, 100  $\mu$ M; 東京化成工業株式会社) は第一章 (1-2-7 および 1-2-12) の方法に従って処置した。

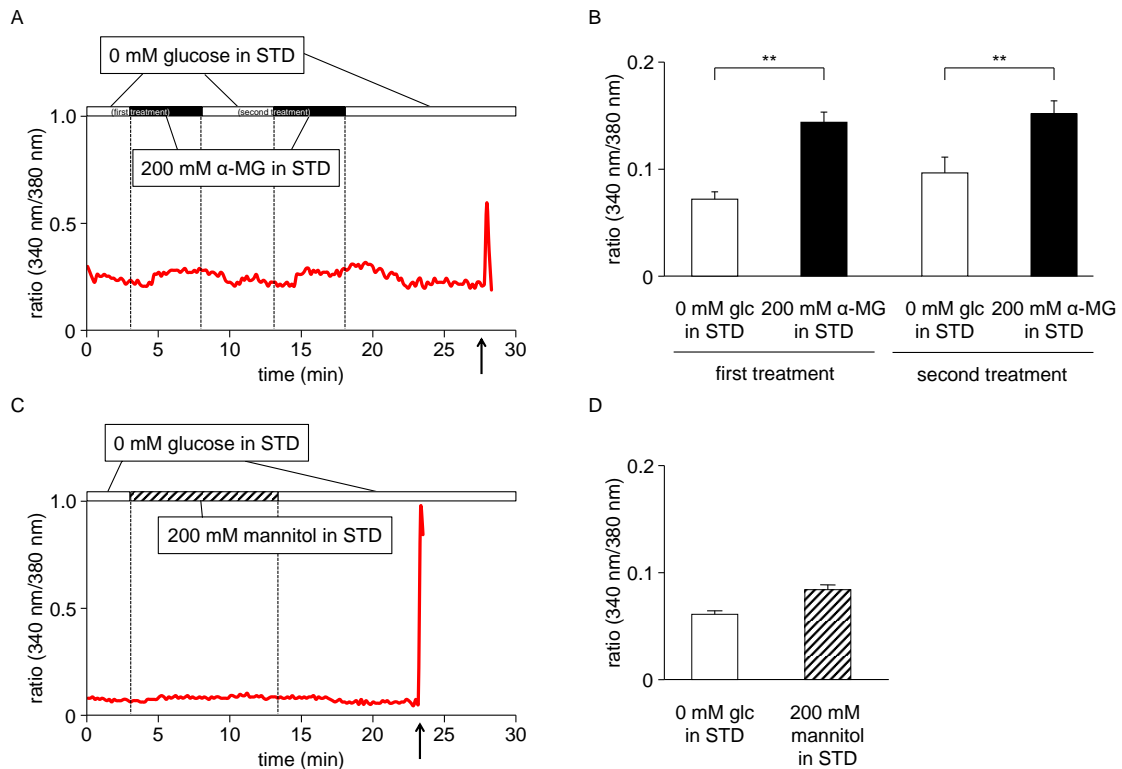
### 4-2-3. マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現変化の検討

2-2-3 の方法に従って、脳内 SGLT-1 ノックダウンマウスを作成し、MCAO を施した 12 時間後の大脳皮質を採取した。RNeasy<sup>®</sup> Mini kit (Qiagen、東京、日本) を用いて RNA の抽出を行い、Filgen (愛知、日本) の DNA マイクロアレイ受託解析サービスを利用し、GeneChip<sup>®</sup> WT PLUS Reagent Kit による全転写産物発現解析を行った。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. $\alpha$ -MG 処置後の細胞内ナトリウム濃度変化の観察

200 mM  $\alpha$ -MG によって、細胞内ナトリウム濃度は明らかに上昇し、この上昇は 200 mM  $\alpha$ -MG を除去することで回復した (Fig. 18A and B)。さらに、再度 200 mM  $\alpha$ -MG を添加することで細胞内ナトリウム濃度は明らかに増加した (Fig. 18A and B)。一方で、200 mM mannitol では細胞内ナトリウム濃度のわずかな上昇しか認められなかった (Fig. 18C and D)。

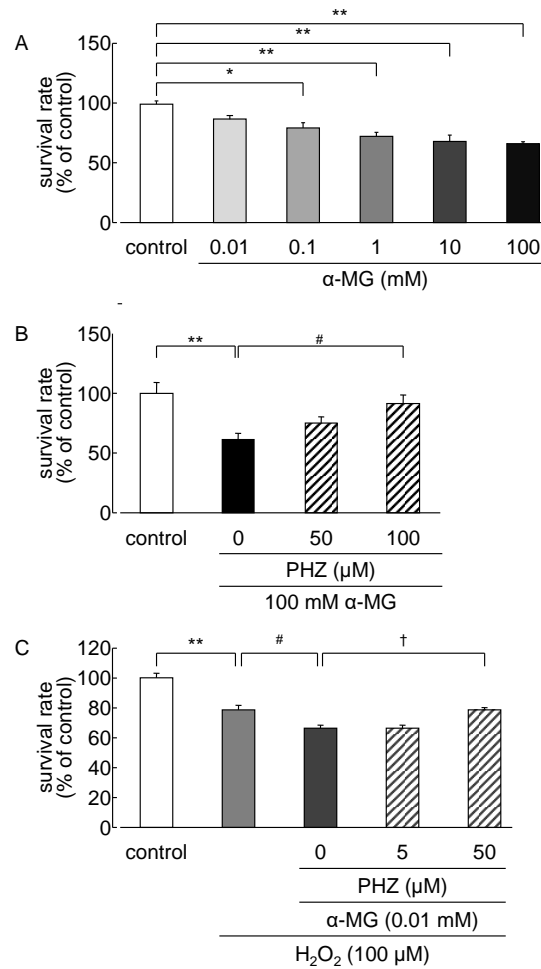


**Fig. 18.  $\alpha$ -MG treatments increase intracellular sodium influx through SGLT.**

(A) Representative ratiometric recording of intracellular sodium ion concentration from a single primary cortical neuron. 200 mM  $\alpha$ -MG in STD solution were incubated for 5 min in twice. Monensin (sodium ionophore) treatment is indicated by means of an arrow. (B) Changes in intracellular sodium concentrations following treatment with 200 mM  $\alpha$ -MG. (C) Representative ratiometric recording of intracellular sodium ion concentration from a single primary cortical neuron. 200 mM mannitol in STD solution were incubated for 10 min. Monensin (sodium ionophore) treatment is indicated by means of an arrow. (D) Changes in intracellular sodium concentrations following treatment with 200 mM mannitol. \*\* $P < 0.01$ . Data presented are mean  $\pm$  SEM.

#### 4-3-2. SGLT を介したナトリウムの過剰流入が神経細胞生存率に及ぼす影響

$\alpha$ -MG 処置は用量依存性的かつ 0.1 mM 以上の濃度では有意な細胞生存率の低下を誘導した (Fig. 19A)。100 mM  $\alpha$ -MG 処置による有意な細胞生存率の低下は、phlorizin の共処置によって用量依存的に改善し、100  $\mu$ M phlorizin のでは有意に改善した (Fig. 19B)。0.01  $\mu$ M  $\alpha$ -MG/100  $\mu$ M  $H_2O_2$  共処置は、100  $\mu$ M  $H_2O_2$  単独処置による有意な細胞生存率の低下を有意に増悪した (Fig. 19C)。さらに、この増悪は phlorizin の共処置によって抑制され、50  $\mu$ M phlorizin の共処置によって有意に改善した (Fig. 19C)。

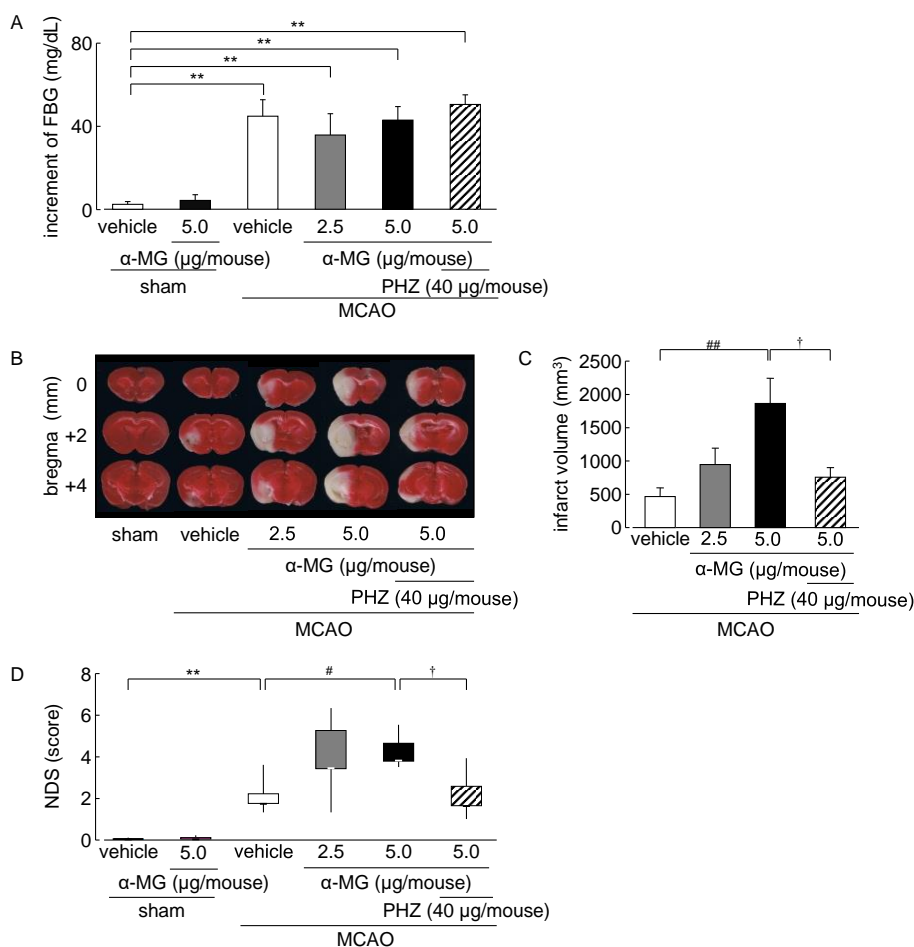


**Fig. 19. Effects of  $\alpha$ -MG-induced sodium influx on neuronal survival rates.**

Survival rates were measured using WST-8 reduction assays at 24 h after cell treatments. (A) Effects of  $\alpha$ -MG in primary cortical neurons (control, n = 11; 0.1 mM  $\alpha$ -MG, n = 8; 0.01, 1, 10, 100 mM  $\alpha$ -MG, n = 12). (B) Effect of phlorizin on decreases in survival after 100 mM  $\alpha$ -MG treatment (control, n = 14; 100 mM  $\alpha$ -MG, n = 8;  $\alpha$ -MG and 50  $\mu$ M phlorizin, n = 12;  $\alpha$ -MG and 100  $\mu$ M phlorizin, n = 9). (C) Effects of phlorizin on decreases in survival after treatment with 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  and 0.01 mM  $\alpha$ -MG (control, n = 11;  $H_2O_2$ , n = 10;  $H_2O_2$  and 0.01 mM  $\alpha$ -MG, n = 9; 5  $\mu$ M phlorizin, n = 12; 50  $\mu$ M phlorizin, n = 10). (A–C) \*\* $P$  < 0.01, \* $P$  < 0.05, # $P$  < 0.05, † $P$  < 0.05. Data are presented as means  $\pm$  SEM; PHZ, phlorizin.

#### 4-3-3. 脳虚血性神経障害の発現増悪に対する脳内 SGLT-1 を介したナトリウム流入の影響

MCAO 1 日後における FBG の有意な上昇は、 $\alpha$ -MG および phlorizin の再灌流直後および再灌流 6 時間後の脳室内 2 回投与によってなんら影響を受けなかった (Fig. 20A)。MCAO 1 日後における梗塞巣形成は、 $\alpha$ -MG の脳室内投与によって用量依存的に増悪し、5.0  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  の用量で有意に増悪した (Fig. 20B and C)。また、この増悪は phlorizin の脳室内同時投与によって有意に改善された (Fig. 20B and C)。同様に、MCAO による行動異常は 5.0  $\mu\text{g}/\text{mouse}$   $\alpha$ -MG の脳室内投与によって有意に増悪され、これは phlorizin の脳室内同時投与によって有意に抑制された (Fig. 20D)。

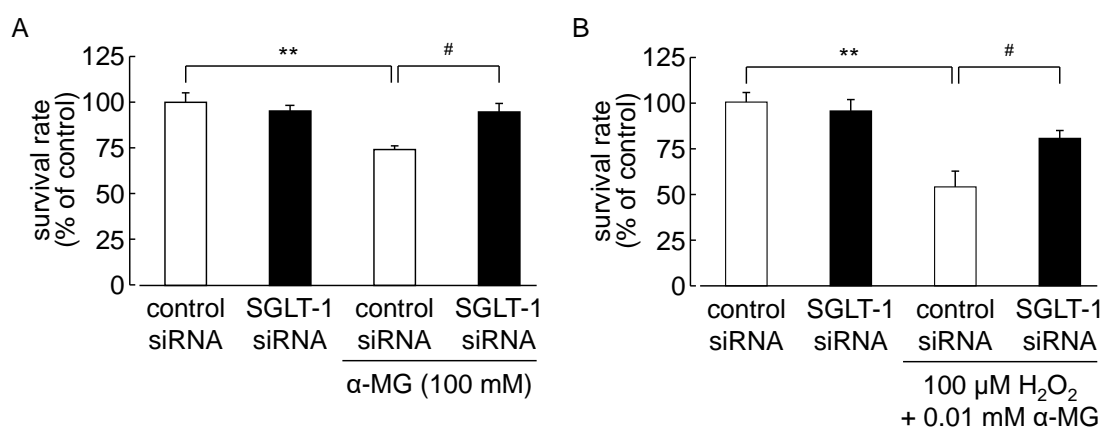


**Fig. 20. Effects of  $\alpha$ -MG in brain regions on the development of cerebral ischemic neuronal damage.**

Vehicle,  $\alpha$ -MG, and PHZ were administered via i.c.v. injections immediately and at 6 h after reperfusion. (A) Fasting blood glucose levels on day 1 after MCAO; (B) Representative photographs of TTC staining on day 1 after MCAO; (C) Quantitative analysis of infarct volumes; (D) Neurological deficit scores on day 1 after MCAO; Vehicle-treated sham group, n = 8; 2.5  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -MG-treated sham group, n = 8; vehicle-treated MCAO group, n = 13; 2.5  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -MG-treated MCAO group, n = 10; 5.0  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -MG-treated MCAO group, n = 8; 5.0  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -MG and 40  $\mu\text{g}$  phlorizin-treated MCAO group, n = 10. \*\* $P < 0.01$ , ## $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ , † $P < 0.05$ ; Data presented as means  $\pm$  SEM; PHZ, phlorizin.

#### 4-3-4. 神経 SGLT-1 を介したナトリウム流入が *in vitro* 虚血後高血糖モデルの細胞生存率へ与える影響

100 mM  $\alpha$ -MG 処置による有意な細胞生存率の低下は、SGLT-1 をノックダウンしておくことによって有意に抑制された (Fig. 21A)。SGLT-1 ノックダウンは、100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および 0.01 mM  $\alpha$ -MG 共処置による有意な細胞生存率の減少を有意に抑制した (Fig. 21B)。

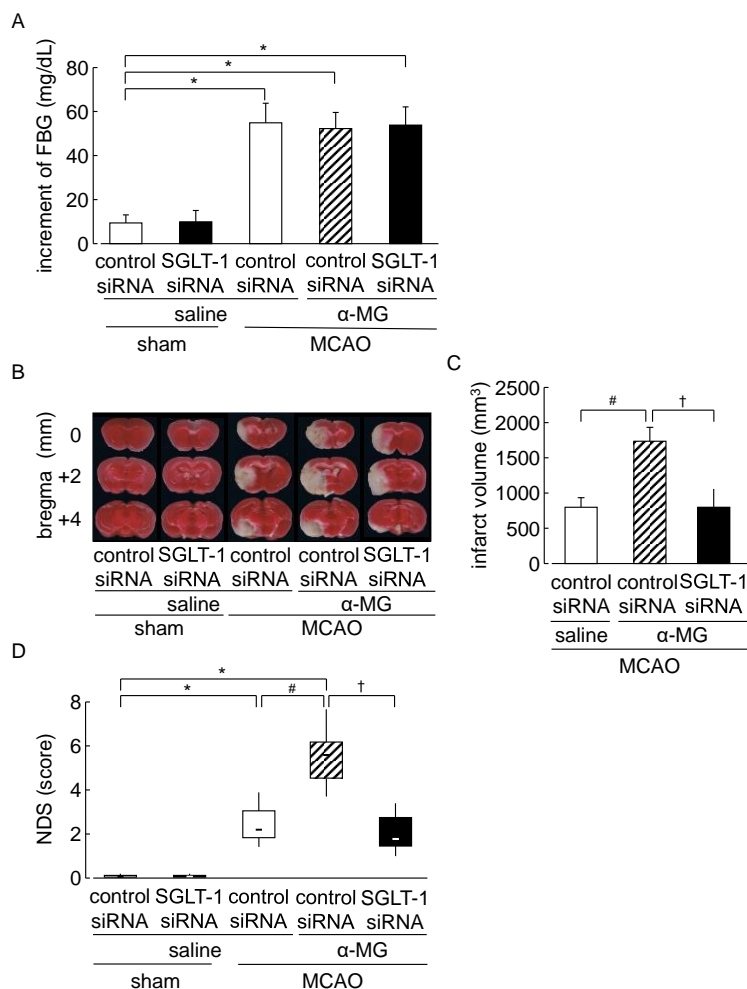


**Fig. 21. Effect of SGLT-1 siRNA and  $\alpha$ -MG treatment on the neuronal survival rate.**

The survival rate was measured by the WST-8 reduction assay on day 1 after components treatment. SGLT-1 siRNA or control siRNA was treated on day 2 before  $\alpha$ -MG and/or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. (A) Effect of neuronal SGLT-1 knock down on  $\alpha$ -MG treatment-induced neuronal cell death. \*\* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ . All groups:  $n = 11$ . (B) Effect of neuronal SGLT-1 knock down on decline of neuronal survival rate after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ $\alpha$ -MG concomitant treatment. \*\* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ . Control siRNA treated group, SGLT-siRNA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ $\alpha$ -MG concomitant treated group:  $n = 11$ , SGLT-1 siRNA treated group, control siRNA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ $\alpha$ -MG concomitant treated group:  $n = 8$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

4-3-5. 脳虚血性神経障害の発現増悪に対する脳内 SGLT-1 を介したナトリウム流入が及ぼす影響

MCAO 1 日後の有意な FBG の増加は、脳内 SGLT-1 のノックダウンや  $\alpha$ -MG の脳室内投与では変化しなかった (Fig. 22A)。MCAO 1 日後における梗塞巣形成は、 $\alpha$ -MG の脳室内投与によって有意に増大し、これは脳内 SGLT-1 のノックダウンによって有意に縮小された (Fig. 22B and C)。行動異常においても同様に、 $\alpha$ -MG 脳室内投与による有意な増悪は、脳内 SGLT-1 のノックダウンによって有意に改善された (Fig. 22D)。



**Fig. 22. Effect of the excessive inflow of sodium ions through cerebral SGLT-1 on the development of the cerebral ischemic neuronal damage.**

(A) Fasting blood glucose levels on day 1 after MCAO. (B) Representative photographs of TTC staining on day 1 after MCAO. (C) Quantitative analysis of the infarct volume. (D) Neurological deficit scores on day 1 after MCAO. Control siRNA-treated sham group: n = 8, SGLT-1 siRNA-treated sham group: n = 8, control siRNA and saline-treated MCAO group: n = 7, control siRNA and  $\alpha$ -MG-treated MCAO group: n = 7, SGLT-1 siRNA and  $\alpha$ -MG-treated MCAO group: n = 6. \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ , † $P < 0.05$ . Data represented as mean  $\pm$  SEM.

#### 4-3-6. マイクロアレイ解析による脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-1 下流シグナルの探索

マイクロアレイ解析の結果、control siRNA-treated MCAO group と比較して SGLT-1 siRNA-treated MCAO group において、2 倍以上増加した遺伝子は 23 個、減少した遺伝子は 5 個同定された。このうち、最も増加した因子の上位 3 つは myosin、fast twitch 1 および calsequestrin 1 であった (Table. 1)。一方、最も減少した因子の上位 3 つは tumor necrosis factor (TNF)、transthyretin および interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) であった (Table. 1)。

<2 down>				
No.	Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description	ratio
1	NM_001278601	Tnf	tumor necrosis factor	0.42
2	NM_013697	Ttr	transthyretin	0.44
3	NM_008361	Il1b	interleukin 1 beta	0.45
4	NM_134066	Akr1c18	aldo-keto reductase family 1, member C18	0.48
5	ENSMUST00000103332	Igkv4-92	immunoglobulin kappa variable 4-92	0.49
<2 up>				
No.	Gene Accession	Gene Symbol	Gene Description	ratio
1	NM_010855	Myh4	myosin, heavy polypeptide 4, skeletal muscle	12.92
2	NM_007504	Atp2a1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	4.69
3	NM_009813	Casq1	calsequestrin 1	4.15
4	NM_001163664	Tnnt3	troponin T3, skeletal, fast	3.77
5	NM_013456	Actn3	actinin alpha 3	3.58
6	ENSMUST00000079237	Zfp125	zinc finger protein 125	3.12
7	ENSMUST00000090269	Actc1	actin, alpha, cardiac muscle 1	2.95
8	NM_010889	Neb	nebulin	2.90
9	NM_011854	Oas12	2-5 oligoadenylate synthetase-like 2	2.88
10	NM_011652	Ttn	titin	2.70
11	NM_011582	Thbs4	thrombospondin 4	2.68
12	NR_028061	Gm8615	glucosamine-6-phosphate deaminase 1 pseudogene	2.62
13	NM_001272041	Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	2.57
14	NM_009780	C4b	complement component 4B (Chido blood group)	2.42
15	NM_007710	Ckm	creatine kinase, muscle	2.34
16	NM_146189	Mybpc2	myosin binding protein C, fast-type	2.31
17	NM_011331	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	2.25
18	ENSMUST00000087445 // ENSMUST00000087445	Tuba3b // Tuba3a	tubulin, alpha 3B // tubulin, alpha 3A	2.24
19	NM_001033450	Mnda	myeloid cell nuclear differentiation antigen	2.22
20	NM_133871	Ifi44	interferon-induced protein 44	2.20
21	NM_029726	Trdn	triadin	2.17
22	NM_053098	Lmod2	leiomodulin 2 (cardiac)	2.02
23	NM_009394	Tnnc2	troponin C2, fast	2.00

**Table. 1 Identification of altered DNA at 12 hr after MCAO in cerebral SGLT-1 knock down mice.**

The expression levels of large numbers of genes simultaneously measured by DNA microarrays. 2 up- or 2 down-regulated genes were listed.



#### 4-4. 考 察

第四章では、脳内 SGLT を介した脳虚血性神経障害の発現増悪機序を解明するために、脳内 SGLT を介したナトリウムに着目した検討を行った。脳虚血ストレス負荷時には、神経細胞膜の脱分極や細胞内カルシウム濃度の上昇が生じることで、神経障害が生じるとされている<sup>13,84)</sup>。さらに、SGLT を介したナトリウム流入が、膜脱分極や細胞内カルシウム濃度の上昇を生じさせることが知られている<sup>13,84)</sup>。以上から、脳虚血後高血糖によって脳内 SGLT を介したナトリウム流入が過剰となることによって、脳虚血ストレス負荷による脱分極や細胞内カルシウム濃度上昇を助長させ、脳虚血性神経障害発現を増悪させていると仮定し検討を行った。

第一章において、高グルコース負荷によって SGLT を介して細胞内ナトリウム濃度が増加することを示した。 $\alpha$ -MG は SGLT によって特異的に輸送される非代謝性のグルコースアナログである。 $\alpha$ -MG 負荷は高グルコース負荷と同様に細胞内ナトリウム濃度を増加させており、 $\alpha$ -MG 負荷によって SGLT を介したナトリウムの直接的作用を確認できることが示された。Glucose による影響を無くすため、全ての実験で glucose を含まない STD 溶液を 3 分間灌流した後に次の溶液へ置換している。また、mannitol の検討から、浸透圧の影響はほとんどないことを確認している。

次に、 $\alpha$ -MG を用いて、SGLT を介した過剰なナトリウムの細胞内流入が、神経細胞死を誘導することが示された。また、 $\alpha$ -MG 単独では神経細胞死を誘導しない 0.01 mM  $\alpha$ -MG を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と共処置した結果から、SGLT を介したナトリウム流入が通常よりも過剰となることで、酸化ストレスによる神経細胞死が増悪する可能性が示された。In vivo の検討でも同様に、脳内 SGLT による過剰なナトリウム流入が脳虚血性神経障害の発現を増悪することが示された。また、in vitro および in vivo の SGLT-1 ノックダウンの検討でも plorizin と同様の検討結果が得られており、脳内 SGLT アイソフォームの中でも、脳内 SGLT-1 を介したナトリウムの過剰流入が脳虚血性神経障害の発現増悪に強く関与すると考えられた。以上のことから、脳虚血後高血糖によって、脳内 SGLT、特に脳内 SGLT-1 を介したナトリウム流入が過剰となると、神経細胞死の誘導や脳虚血性神経障害の発現増悪が生じる可能性が示された。

高血糖状態では、グルコースの細胞内への過剰流入によってミトコンドリアで活性酸素種が産生され、神経細胞死が誘導されることが知られている<sup>86,87)</sup>。また、この活性酸素種はミトコンドリアの機能不全を起こすことも知られている<sup>87-89)</sup>。よって、脳虚血後高血糖によって、細胞内へのグルコース過剰流入が生じることで脳虚血性神経障害発現が増悪する可能性が考えられる。一方で、SGLT 以外の糖輸送体としては glucose transporter (GLUT) が知られているが、脳虚血ストレス負荷時には、血液脳関門に存在する GLUT1 や脳神経に発現する GLUT3 の発現が増加すること、さらに、GLUT 阻害剤やノックアウト動物を用いた検討から、脳虚血時に脳保護的に機能することが知られている<sup>90,91)</sup>。このことから、脳虚血後に増加した血糖値は、作用する輸送体によって脳虚血性神経障害発現に及ぼす影

響が異なる可能性が考えられる。グルコースは生体にとっては必要不可欠のエネルギー源であることから、脳虚血ストレス負荷後にグルコースは傷ついた細胞を修復しようとして上昇してくる。しかしながら、脳内 SGLT によってグルコースと共にナトリウムが細胞内に流入してしまうために、神経障害発現を増悪させるかもしれない。

マイクロアレイ解析の結果、脳虚血時に脳内 SGLT-1 の下流で変動する因子が明らかとなった。脳内 SGLT-1 のノックダウンによって増加した因子のひとつである myosin は近年、神経突起の伸長を促すことが報告されている<sup>92)</sup>。これは脳脊髄損傷後の神経回路の修復機構として寄与することが期待されており、脳内 SGLT-1 をノックダウンによる myosin の増加は脳保護的に作用したと考えられる。また、fast twitch 1 は筋小胞体カルシウム ATPase ポンプをコードする遺伝子であり、これは ATP 加水分解によるエネルギーを利用して濃度勾配に逆らって、細胞質中に放出されたカルシウムを筋小胞体内腔へと輸送する膜タンパク質である<sup>93)</sup>。また、calsequestrin 1 は、高結合量/低親和性のカルシウム結合タンパク質であり、筋小胞体内のカルシウム維持に重要であることが知られている<sup>94)</sup>。脳虚血ストレス負荷時には、細胞内カルシウム濃度の上昇が神経障害発現の形成に関与することから、脳虚血状態において、脳内 SGLT-1 は fast twitch 1 または calsequestrin 1 の機能を阻害し、細胞内カルシウム濃度の恒常性を破綻させることで、脳虚血性神経障害発現を増悪させている可能性が考えられた。また、SGLT を介したナトリウム流入による細胞内カルシウム濃度の上昇機序は不明であったが<sup>13,84)</sup> これらの因子を介している可能性が考えられた。一方で、脳内 SGLT-1 のノックダウンによって減少した因子には、炎症性サイトカインである TNF や IL-1 $\beta$  が含まれており、脳内 SGLT-1 ノックダウンによる脳虚血性神経障害発現の改善が脳内炎症を抑制したと考えられた。さらに、transthyretin は脳脊髄液中に高濃度に含まれる血清タンパク質で、脳脊髄関門の破綻によって脳実質へ漏出することが知られている<sup>95,96)</sup>。脳内 SGLT-1 ノックダウンによって、脳虚血ストレスによる血液脳関門の破綻が抑制されたことから、transthyretin 発現が減少したのかもしれない。

本章では、脳内 SGLT 特に SGLT-1 を介したナトリウムの流入が脳虚血性神経障害の発現に与える影響について検討を行った。その結果、脳内 SGLT-1 を介したナトリウム流入が虚血後高血糖によって過剰となることで、神経細胞死や神経障害発現の増悪を誘導する可能性が示された。また、脳内 SGLT-1 の下流シグナルには、細胞内カルシウム濃度を調節する因子が関与する可能性が示された。

## 第五章 脳内 sodium-glucose transporter type 3 による脳保護作用機序の解明

### 5-1. 緒言

SGLT-3 は他の SGLT アイソフォームと異なり、糖は輸送せず、ナトリウムのみを輸送する糖のセンサーとして機能することが知られている<sup>12,18,34,84,97,98</sup>。末梢では、小腸や平滑筋、骨格筋、コリン作動性神経上に発現していることが知られている<sup>34,84,97</sup>。脳内では視床下部のグルコース感受性神経上に発現し、この神経のグルコースによる活性化に関与することが報告されている<sup>84</sup>。また、細胞外のナトリウム濃度あるいはグルコース濃度に依存して内向き電流が生じ、脱分極することが報告されている<sup>97,99,100</sup>。第二章において、脳内 SGLT アイソフォームの中でも、SGLT-1 が脳虚血性神経障害の発現増悪に関与することを示したが、他の脳内 SGLT アイソフォームの関与は不明であった。そこで本章では、SGLT-1 以外の脳内 SGLT アイソフォームのひとつとして、他のアイソフォームとは異なる性質を有する SGLT-3 に着目し検討を行った。

---

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

1. Yamazaki Y., Harada S., Tokuyama S., Sodium-glucose transporter type 3-mediated neuroprotective effect of acetylcholine suppresses the development of cerebral ischemic neuronal damage. *Neuroscience*, **269**, 134-142 (2014).

## 5-2. 実験材料および方法

第一章 (1-2) および第二章 (2-2)、第三章 (3-2)、第四章 (4-2) と同様の実験材料および方法に従った。

### 5-2-1. SGLT-3 siRNA の調製ならびに投与方法

SGLT-3 ON-TARGET *plus* SMART pool (SGLT-3 siRNA; Thermo Fisher Scientific) および ON-TARGET *plus* Nontargeting pool (control siRNA; Thermo Fisher Scientific) は、*in vivo* jet-PEI (Polyplus transfection) と共に 10% glucose 溶液に溶解した後、最終濃度 5% glucose になるように滅菌水を加え調製した。薬液は、10  $\mu$ L (N/P 比= 6, RNA 量は 1.0  $\mu$ g, *in vivo* jet-PEI 量として 0.12  $\mu$ L を含む) の用量で脳室内に単回投与した。

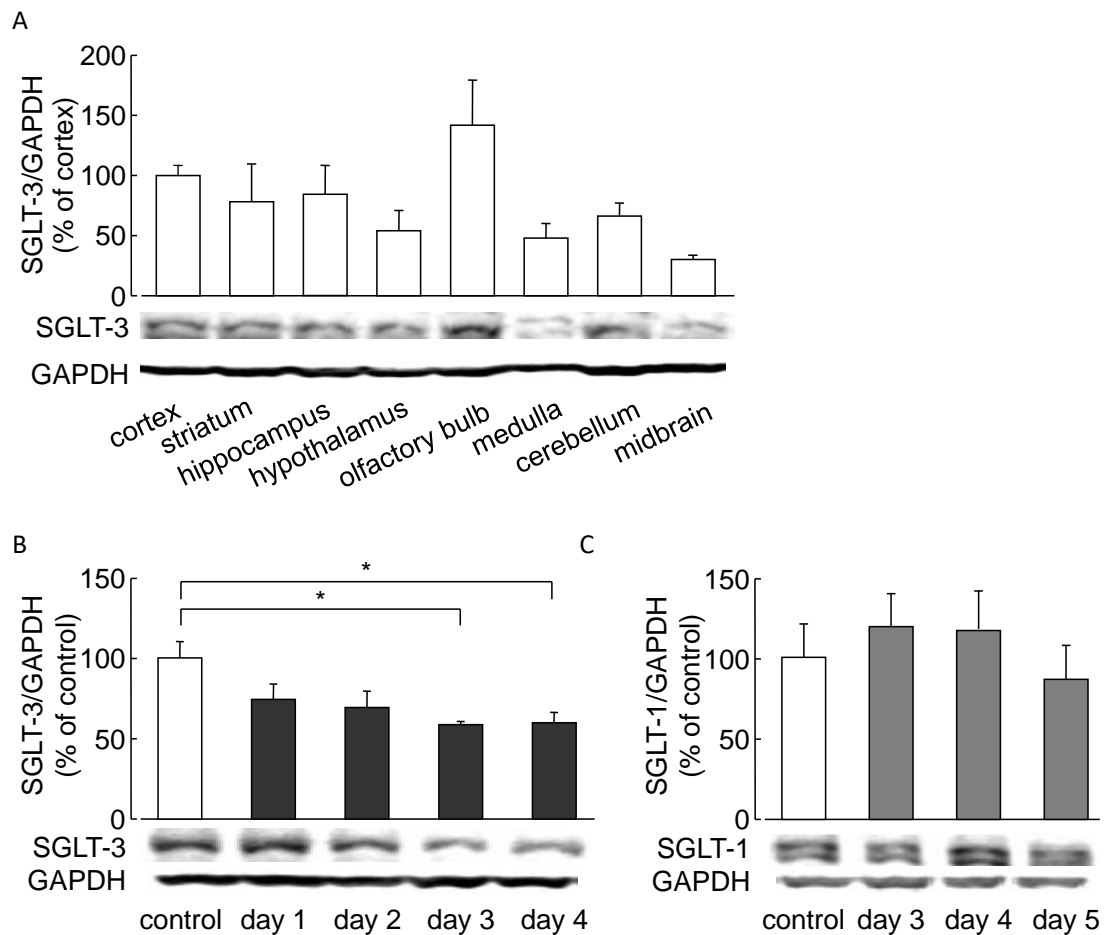
### 5-2-2. ドネペジルの投与方法

コリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジル (Sigma-Aldrich) は再灌流直後に腹腔内 (intraperitoneal, i.p.; 1, 3, 5 mg/kg) 投与した。対照群には saline (大塚製薬株式会社、大阪、日本) を投与した。

### 5-3. 結果

#### 5-3-1. 脳内 SGLT-3 発現分布と SGLT-3 siRNA 脳室内投与の影響

SGLT-3 タンパク質発現は、大脳皮質、線条体、海馬、視床下部、嗅球、延髄、小脳および中脳に広く分布しており、特に嗅球において多く認められた (Fig. 23A)。SGLT-3 siRNA の脳室内投与 3~4 日後において、大脳皮質 SGLT-3 タンパク質発現は有意に減少した (Fig. 23B)。一方で、SGLT-3 siRNA の脳室内投与は、大脳皮質 SGLT-1 の発現には影響を与えなかった (Fig. 23C)。

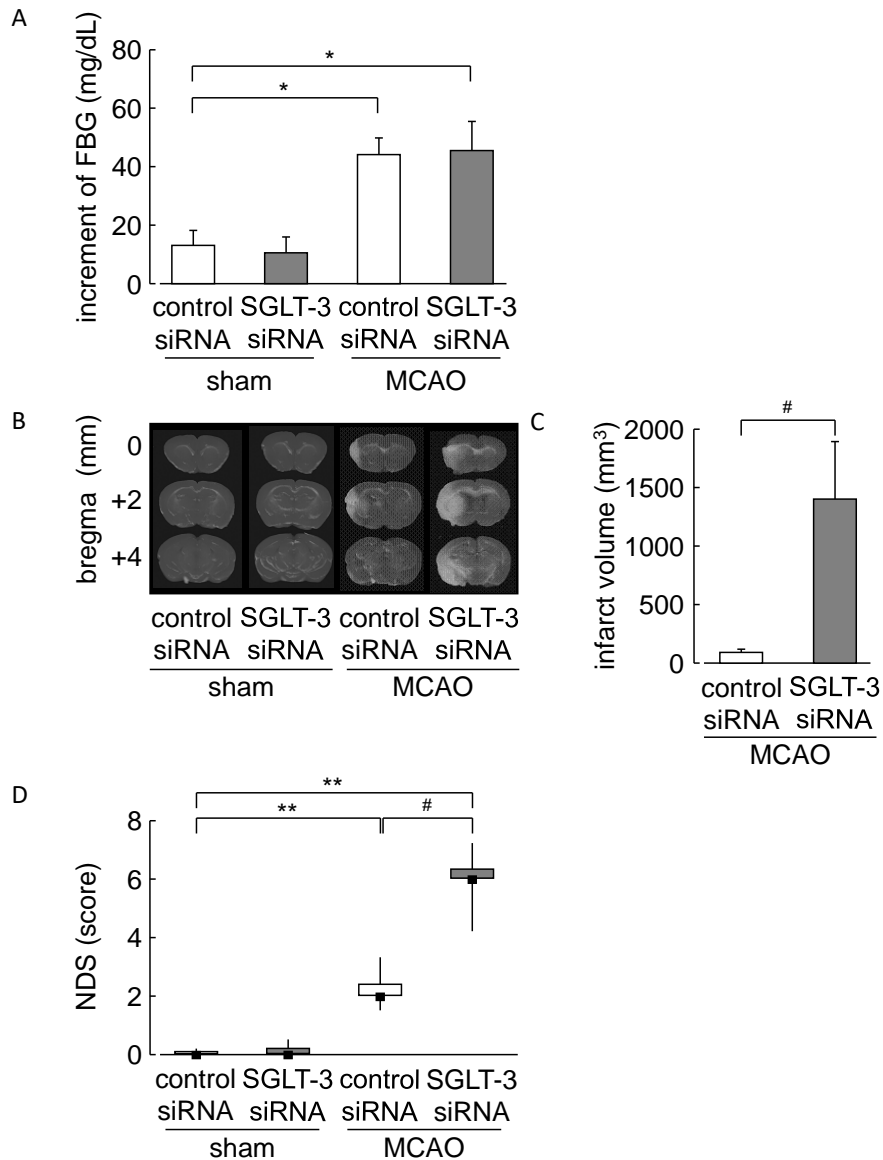


**Fig. 23. Localization of SGLT-3 in the brain and the effect of SGLT-3 siRNA administration on the expression levels of SGLT-3 and -1 in naive mice.**

(A) Representative western immunoblots of SGLT-3 in brain lesions (n = 3). (B, C) Representative western immunoblots from mice administered (i.c.v.) with SGLT-3 siRNA (1  $\mu$ g/mouse), showing the time course of cortical SGLT-3 (B) and -1 (C) (control group: n = 3, day 1 group: n = 3, day 2 group: n = 3, day 3 group: n = 5, day 4 group: n = 5). \* $P < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

### 5-3-2. 脳内 SGLT-3 ノックダウンによる脳虚血性神経障害発現への影響

MCAO 1 日後において FBG は有意に上昇し、この上昇は脳内 SGLT-3 をノックダウンしても変わらなかった (Fig. 24A)。MCAO 1 日後の梗塞巣形成は、脳内 SGLT-3 をノックダウンすることで有意に増大した (Fig. 24B and D)。また、脳内 SGLT-3 ノックダウンによって、MCAO 1 日後の行動異常も有意に増悪した (Fig. 24D)。

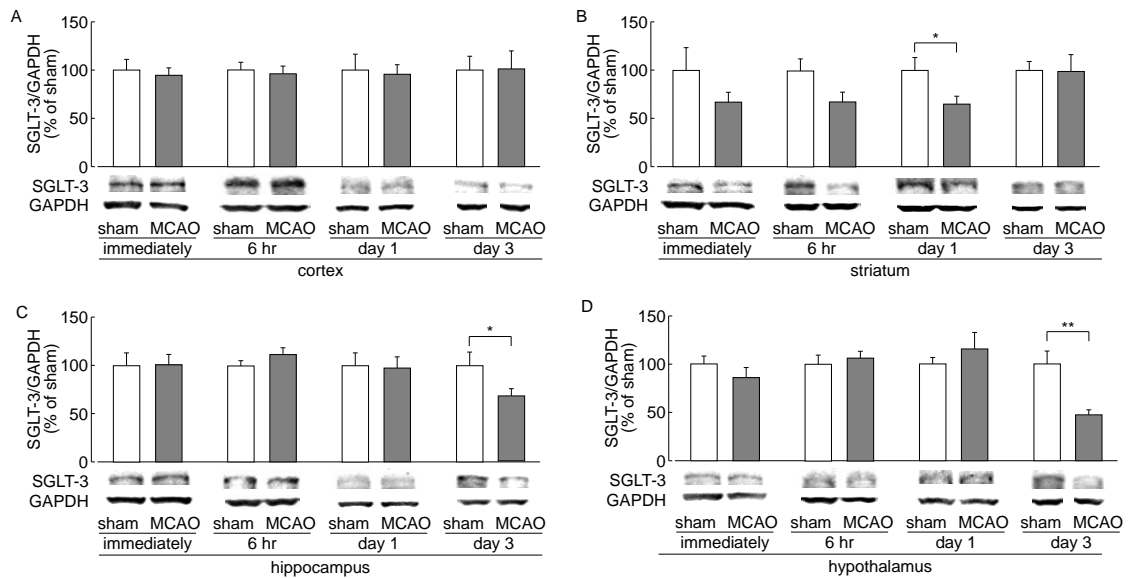


**Fig. 24. Effect of SGLT-3 siRNA on cerebral ischemic stress-mediated neuronal damage.**

(A) Fasting blood glucose (FBG) levels on day 1 after MCAO. (B) Representative photographs of TTC staining on day 1 after MCAO. (C) Quantitative analysis of the infarct volume. (D) NDS on day 1 after MCAO (control siRNA-treated sham group: n = 9, SGLT-3 siRNA-treated sham group: n = 9, control siRNA-treated MCAO group: n = 7, SGLT-3 siRNA-treated MCAO group: n = 6). \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

### 5-3-3. 脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-3 発現の継時的変化

大脳皮質の SGLT-3 タンパク質発現は MCAO によって変化しなかった (Fig. 25A)。MCAO 1 日後において、線条体の SGLT-3 タンパク質発現は有意に減少した (Fig. 25B)。海馬および視床下部において、SGLT-3 タンパク質発現は MCAO 3 日後のみ有意に低下した (Fig. 25C and D)。

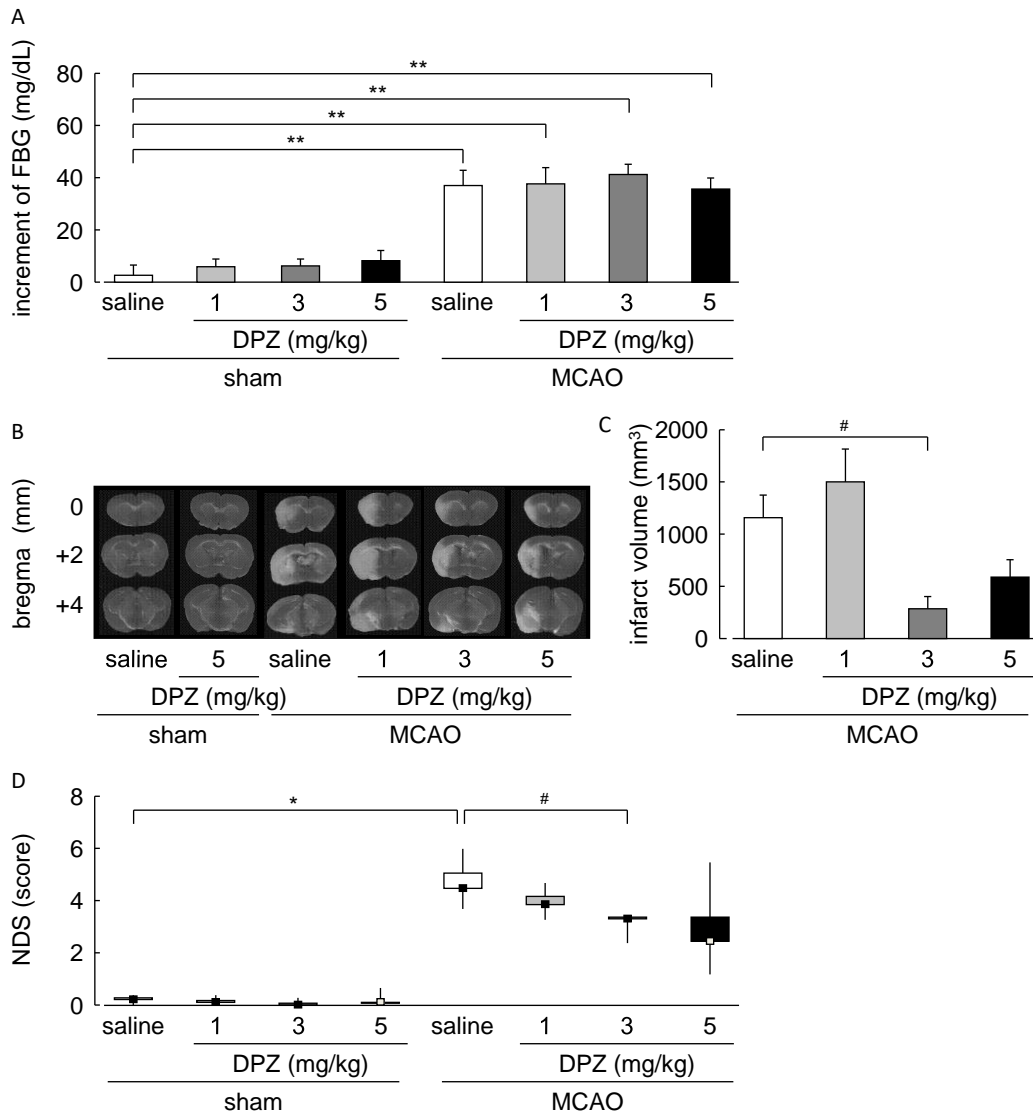


**Fig. 25. Changes in the expression levels of cerebral SGLT-3 after cerebral ischemic stress.**

Representative western immunoblots of SGLT-3 in cortex (A), striatum (B), hippocampus (C), and hypothalamus (D) at 6 h, day 1, and day 3 after MCAO (sham group: n = 8, MCAO group: n = 12 -13). \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs. sham the group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

#### 5-3-4. 脳虚血性神経障害発現に対するドネペジルの影響

MCAO 1 日後における FBG の有意な増加は、ドネペジルの腹腔内投与によってなんら変わらなかった (Fig. 26A)。MCAO 3 日後における梗塞巣形成は、3 mg/kg のドネペジル投与によってのみ有意に改善した (Fig. 26B and C)。同様に、3 mg/kg のドネペジル投与は MCAO 3 日後における行動異常を有意に抑制した (Fig. 26D)。



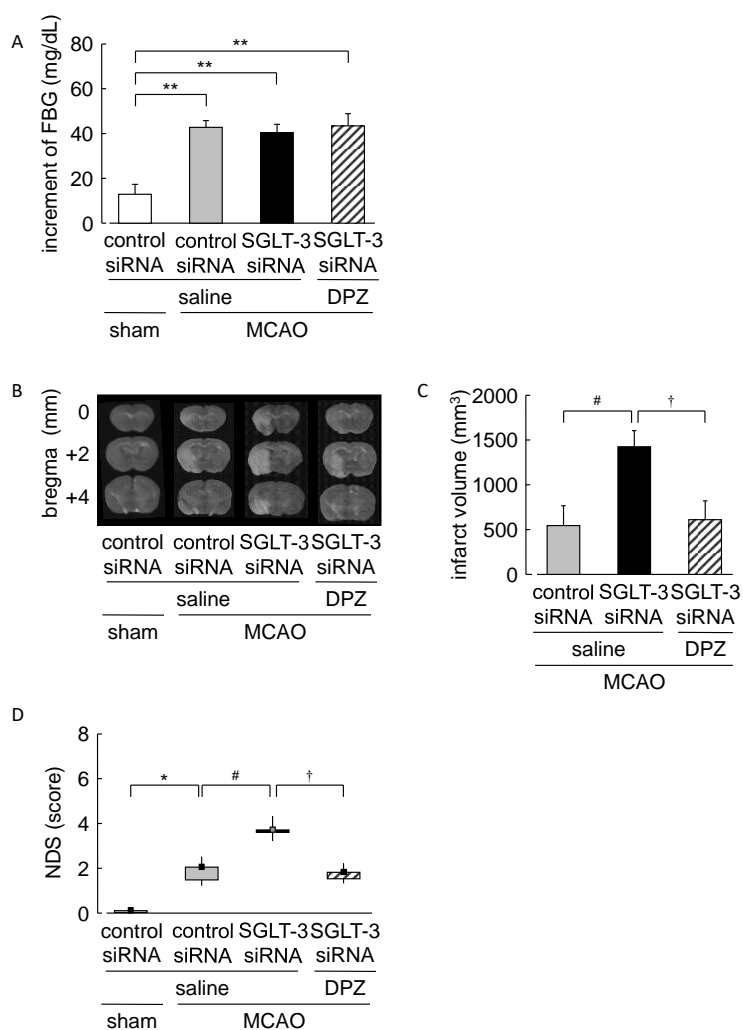
**Fig. 26. Effect of donepezil (DPZ) on cerebral ischemic stress-mediated neuronal damage.**

(A) FBG levels on day 1 after MCAO. (B) Representative photographs of TTC staining on day 1 after MCAO. (C) Quantitative analysis of the infarct volume. (D) NDS on day 1 after MCAO (saline-treated sham group: n = 9, 1 mg/kg DPZ-treated sham group: n = 5, 3 mg/kg DPZ-treated sham group: n = 9, 5 mg/kg DPZ-treated sham group: n = 9, saline-treated MCAO group: n = 8, 1 mg/kg DPZ-treated MCAO group: n = 6, 3 mg/kg DPZ-treated MCAO group: n = 7, 5 mg/kg DPZ-treated MCAO group: n = 8). \* $P < 0.05$ , # $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM. DPZ: donepezil.



### 5-3-5. 脳内 SGLT-3 による脳保護作用へのコリン作動性神経系の関与

脳内 SGLT-3 のノックダウンおよびドネペジルの投与は、MCAO 1 日後における FBG の有意な増加に影響を与えなかった (Fig. 27A)。MCAO 1 日後において、脳内 SGLT-3 のノックダウンによって有意に増大した梗塞巣形成は、ドネペジルの腹腔内投与によって有意に抑制された (Fig. 27B and C)。行動異常においても、脳内 SGLT-3 のノックダウンによって有意に増悪された行動異常は、ドネペジルの腹腔内投与によって有意に改善された (Fig. 27D)。

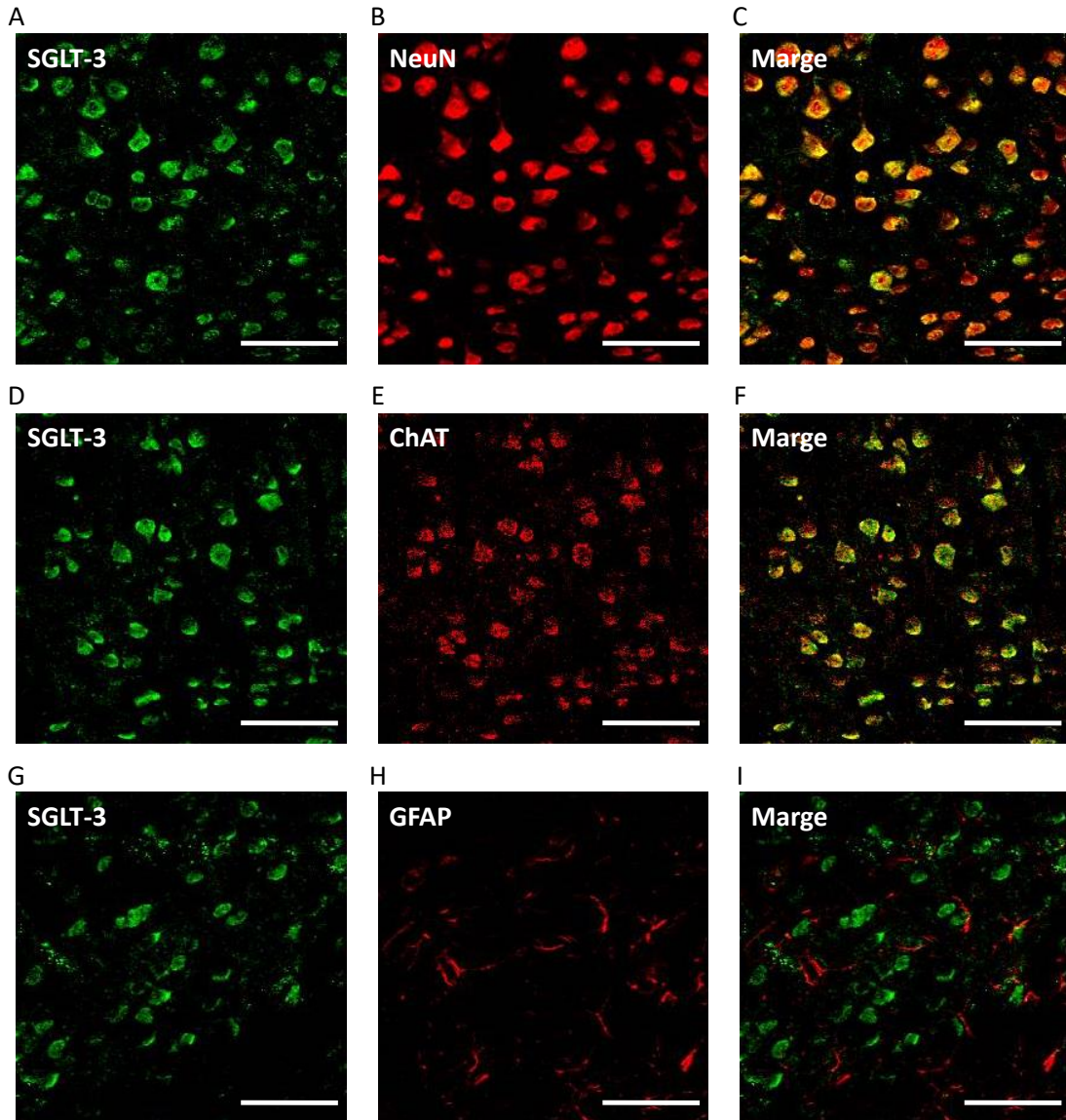


**Fig. 27. Effect of DPZ on the exacerbation of cerebral ischemic stress-mediated neuronal damage in SGLT-3 knockdown mice.**

(A) FBG levels 1 day after MCAO. (B) Representative photographs of TTC staining 1 day after MCAO. (C) Quantitative analysis of the infarct volume. (D) Results of the NDS on day 1 after MCAO (control siRNA and saline-treated sham group:  $n = 7$ , control siRNA and saline-treated MCAO group:  $n = 6$ , SGLT-3 siRNA and saline-treated MCAO group:  $n = 6$ , SGLT-3 siRNA and 3 mg/kg DPZ-treated MCAO group:  $n = 5$ ).  $\#P < 0.05$ ,  $\dagger P < 0.05$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

### 5-3-6. 大脳皮質のコリン作動性神経における SGLT-3 発現

大脳皮質において、SGLT-3 は NeuN および ChAT と共局在した (Fig. 28A-F)。一方、大脳皮質の SGLT-3 は、GFAP とは共局在しなかった (Fig. 28G-I)。

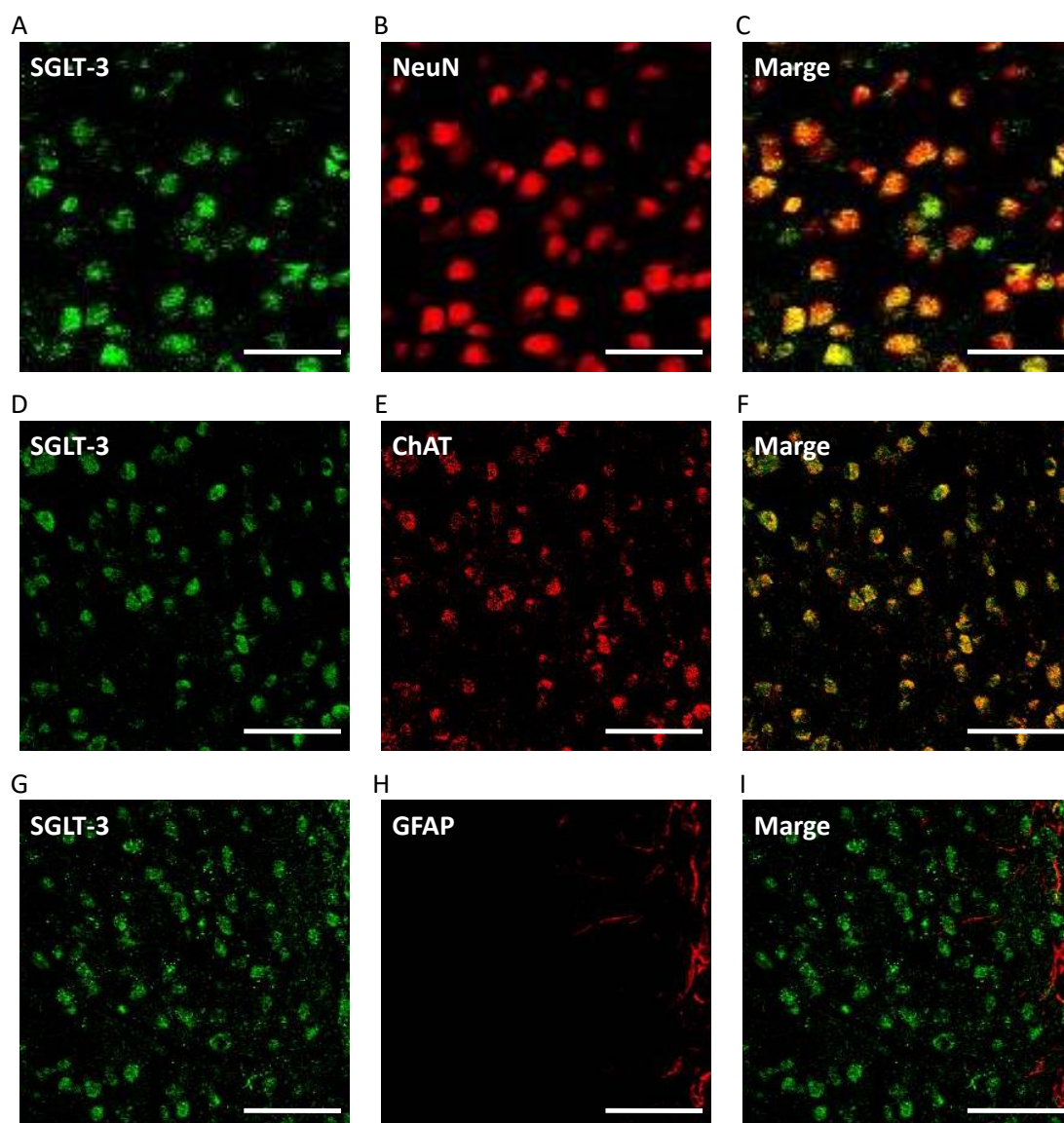


**Fig. 28. Co-localization of SGLT-3 with neurons, including cholinergic neurons, but not with astrocytes in the cortex.**

Double immunofluorescence of SGLT-3 and NeuN (neuronal marker), choline acetyltransferase (ChAT) (cholinergic marker), or glial fibrillary acidic protein (GFAP) (astrocytic marker) in the cortex of normal mice. Representative photographs of SGLT-3 (A, D, G) and NeuN (B), ChAT (E), or GFAP (H). (C, F, I) Merged pictures of SGLT-3 and NeuN (C), ChAT (F), or GFAP (I). Scale bar = 50  $\mu$ m. ChAT: choline acetyltransferase.

### 5-3-7. 線条体のコリン作動性神経における SGLT-3 発現

線条体における SGLT-3 は、NeuN および ChAT と共局在を示したが、GFAP とは共局在しなかった (Fig. 29A-I)。



**Fig. 29. Co-localization of SGLT-3 with neurons, including cholinergic neurons, but not with astrocytes in the striatum.**

Double immunofluorescence of SGLT-3 and NeuN, ChAT, or GFAP in the striatum of normal mice. Representative photographs of SGLT-3 (A, D, G) and NeuN (B), ChAT (E), or GFAP (H). Merged pictures of SGLT-3 and NeuN (C), ChAT (F), or GFAP (I). Scale bar = 50  $\mu$ m.

#### 5-4. 考 察

第二章から、脳内に存在する SGLT-1、3、4、6 のうち、SGLT-1 は虚血後高血糖を介して脳虚血性神経障害の発現を増悪することが示されている。しかしながら、SGLT-1 以外の脳内 SGLT アイソフォームが脳虚血性神経障害の発現に与える影響は明らかとなっていない。そこで、他のアイソフォームと異なり、糖輸送能を有さず、糖のセンサーとして働くことが知られている SGLT-3 に着目し検討を行った。

SGLT-3 は虚血コア領域である大脳皮質および線条体、虚血ペナンプラ領域である海馬、グルコース感受性神経が存在する視床下部にも発現しており脳内に広く分布していた。SGLT-3 siRNA の脳室内投与 3 日から 4 日後において、大脳皮質 SGLT-3 発現は有意に減少したことから、MCAO は投与 3 日後のマウスに行った。また、神経障害の発現増悪に関与する SGLT-1 の発現に対して SGLT-3 siRNA 投与は影響を与えないことを確認している。脳内 SGLT-3 をノックダウンすることによって、脳虚血性神経障害の発現が増悪したことから、Phlorizin や脳内 SGLT-1 ノックダウンの検討結果に反して、脳内 SGLT-3 は脳保護的に機能する可能性が示された。このことから、脳内 SGLT の各アイソフォームで脳虚血性神経障害発現に対する反応性が異なることが考えられる。Phlorizin の検討結果では、脳内 SGLT アイソフォームすべてを阻害すると、脳虚血性神経障害発現は改善されている。これは、脳内 SGLT-3 を阻害した際の脳保護効果よりも、脳内 SGLT-1 を阻害した際の神経障害の発現増悪効果が勝ったためと考えられる。また近年、phlorizin は SGLT-3 よりも SGLT-1 に対して強い阻害効果を示すことが報告されており、phlorizin のアイソフォームに対する阻害効果の違いによって、phlorizin では神経障害発現が増悪する方向性が示されたと考えられる<sup>101)</sup>。MCAO 1 日後の線条体、あるいは MCAO 3 日後の海馬および視床下部において SGLT-3 の有意な発現減少が示されており、脳保護的に機能する SGLT-3 が脳虚血ストレスによって減少することが示された。また、MCAO による梗塞巣形成は虚血コア領域から虚血ペナンプラ領域へ徐々に伸展し、3 日後にピークに達することを報告している<sup>8)</sup>。よって、MCAO 後の SGLT-3 発現は梗塞巣の伸展に伴い減少したと考えられる。

脳虚血時、アセチルコリンは脳保護的に作用することが報告されている<sup>102)</sup>。コリン作動性神経系の活性化は、大脳皮質の脳血流量を増加させることで、脳虚血ストレスによる神経細胞死を抑制する<sup>103)</sup>。さらに、末梢において、SGLT-3 がコリン作動性神経上に発現すること、SGLT-3 にグルコースが作用することで脱分極が生じることが報告されている<sup>52)</sup>。以上の知見から、脳虚血後に増加したグルコースが、脳内コリン作動性神経上に発現している SGLT-3 に作用することで、アセチルコリン神経系の活性化を介して脳保護的に機能していると考えた。コリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジル投与によって脳内アセチルコリン量を増加させることによって、脳虚血性神経障害発現は有意に改善されることが示された。このことから、アセチルコリンが脳保護的に作用することが確認された。また、脳内 SGLT-3 ノックダウンによる脳虚血性神経障害発現の有意な増悪は、ドネペジル投与によって完全に抑制されたこと、さらに SGLT-3 が脳内においてもアセチルコリン神経に

発現していることが確認されたことから、脳内 SGLT-3 による脳保護作用にコリン作動性神経系が関与している可能性が示された。

第四章では、SGLT-1 以外の脳内 SGLT アイソフォームのひとつである、SGLT-3 が脳虚血性神経障害発現に及ぼす影響について検討した。その結果、予想に反して脳内 SGLT-3 は脳保護的に作用することが示され、この保護作用はアセチルコリン神経系の活性化を介する可能性が明らかとなった。今後、脳内の SGLT-3 特異的に作用する、あるいは脳内へ選択的に移行する SGLT-3 刺激薬が開発されれば、新たな脳血管疾患治療戦略へと繋がるかもしれない。

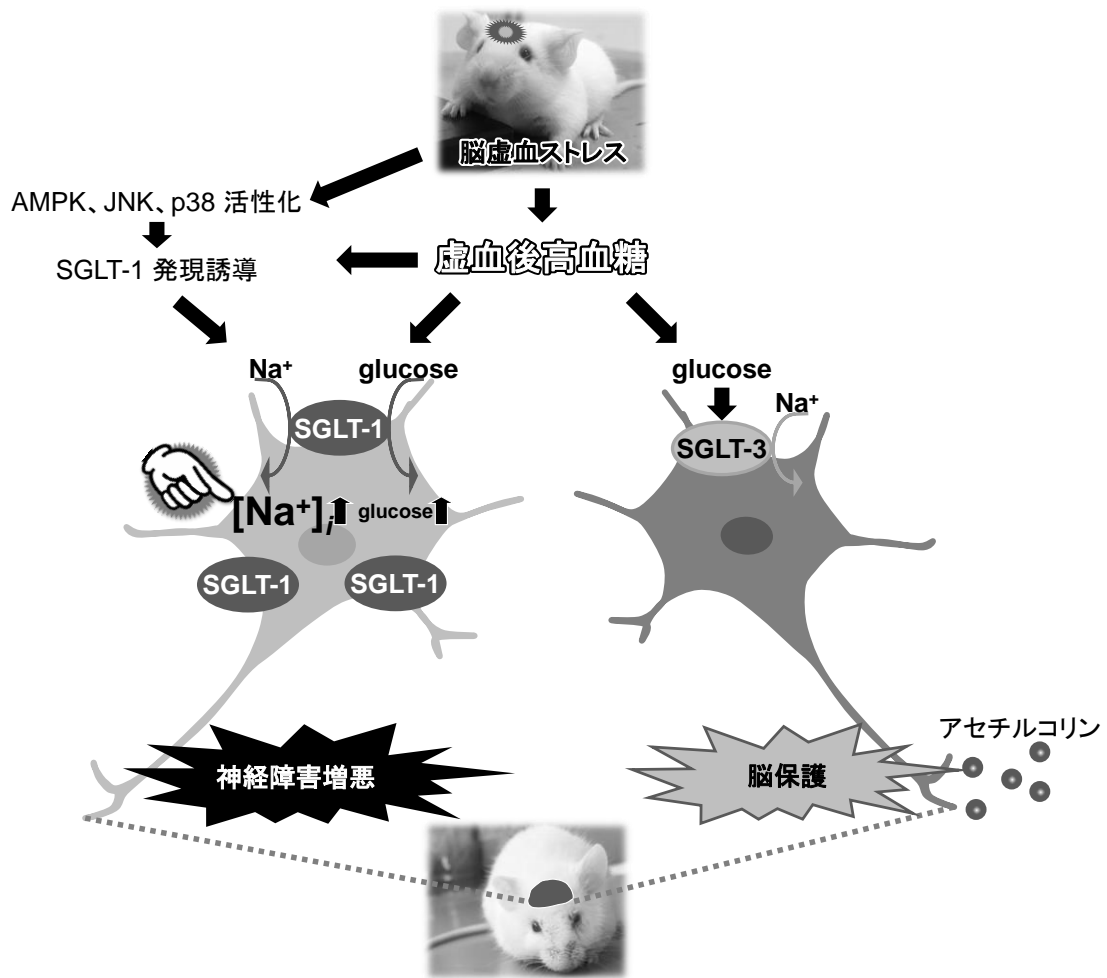
## 総 括

本研究では、虚血後高血糖によって脳虚血性神経障害発現が悪化するという本研究室の先行研究の結果を受け、この増悪機序解明を目的とした。糖と神経障害を繋ぐ因子として脳内 SGLT に着目し、その関与および増悪機序の一部を検討し、以下の結果を得た。

1. 脳虚血ストレスが負荷されている状態に、高血糖状態が併発する場合としない場合に分けて検討を行い、通常よりも血糖値が高い状態でのみ、脳内 SGLT が脳虚血性神経障害の発現を増悪する可能性を見出した。
2. 脳内 SGLT アイソフォームの中でも、神経障害発現への関連が強く示唆されていた SGLT-1 に着目し、*in vitro* および *in vivo* の脳虚血モデルを用いた検討を行った結果、脳内 SGLT-1 が脳虚血性神経障害の発現増悪に関与することが示唆された。
3. 脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-1 発現誘導機序の一部に AMPK、JNK および p38 経路が関与する可能性が明らかとなった。
4. 脳内 SGLT-1 を介した脳虚血性神経障害発現の増悪機序を解明するため、脳内 SGLT-1 を介したナトリウム流入が脳虚血性神経障害発現に及ぼす影響について検討し、脳内 SGLT-1 を介したナトリウムの過剰流入が増悪機序の一部である可能性が認められた。
5. 脳内 SGLT-1 以外の脳内 SGLT アイソフォームであり、他のアイソフォームとは異なる性質を持つ SGLT-3 に注目して検討を行い、脳内 SGLT-1 による作用とは異なり、脳内 SGLT-3 がコリン作動性神経系の活性化を介して、脳虚血性神経障害に対して保護的に機能することが明らかとなった。

以上、本研究から、脳虚血後高血糖を介した脳虚血性神経障害の発現増悪に、脳内 SGLT-1 を介した神経細胞へのナトリウムの過剰流入が関与する可能性が示された。

脳血管疾患は治療を施してもなお、後遺症が残ることが問題視されている。本研究では、脳血管疾患の新たな治療戦略として糖輸送体のひとつである SGLT に着目しており、脳内 SGLT がこれまでに報告されている脳血管疾患における神経細胞死の機序を増強する因子と捉えているところに大きな特色がある。本研究の遂行によって、脳血管疾患の治療戦略の開発研究において新たな概念を導入することとなり、医療の進歩に寄与したことが考えられる。また、中枢における SGLT の役割はほとんど明らかとなっておらず、脳血管疾患に対する脳内 SGLT の役割を解明することは、SGLT 研究の発展にも多いに貢献したと考えられる。



**Fig. 30. The outline of this study through illustrations.**

Cerebral ischemic stress induces hyperglycemic condition. This condition activates AMPK, JNK and p38 activity, which activation up-regulates neuronal SGLT-1 expression levels. Excessive influx of sodium ions through neuronal SGLT-1 exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage. In contrast, neuronal SGLT-3 exist in cholinergic neuron and has neuroprotective effect through activation of cholinergic neuron.

## 謝 辞

本研究は、著者が神戸学院大学大学院薬学研究科博士課程在学中に、同大学薬学部臨床薬学研究室 徳山 尚吾 教授の指導のもとに行ったものである。

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 徳山 尚吾 教授に心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、ご校閲ならびにご助言を賜りました神戸学院大学 屋山 勝俊 教授、同大学薬学部 角田 慎一 准教授、理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能動的イメージング部門 生体機能評価研究チーム チームリーダー 尾上 浩隆 博士に謹んで深謝致します。

細胞内ナトリウム濃度の測定ならびに、電気生理学的検討に際し、実験方法をご教授頂きました近畿大学薬学部 和田 哲幸 准教授、近畿大学理学部 吉田 繁 教授に深く感謝を申し上げます。

本研究の遂行ならびに論文作成に際し、多大なるご指導、ご助言を賜りました、神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 小畑 友紀雄 講師、中本 賀寿夫 講師、原田 慎一 レクチャーに心から御礼申し上げます。

また、実験に協力して頂いた後輩達を始め、共に研究室生活を過ごし、共に苦楽を分かち合った本研究室の皆様および卒業生の皆様に心から感謝申し上げます。

末筆になりましたが、これまで大変な心配とご苦勞をおかけしたにも関わらず、温かく見守り、多大なるご支援を頂きました家族に心より感謝の意を表します。



## 引用文献

1. Watanabe T, Tanaka M, Watanabe K, Takamatsu Y, Tobe A. Research and Development of the Free Radical Scavenger Edaravone as a Neuroprotectant. *YAKUGAKU ZASSHI*, **124**, 99–111 (2004).
2. Doi Y, Ninomiya T, Hata J, Fukuhara M, Yonemoto K, Iwase M, Iida M, Kiyohara Y. Impact of glucose tolerance status on development of ischemic stroke and coronary heart disease in a general Japanese population: the Hisayama study. *Stroke*, **41**, 203–209 (2010).
3. Olsson T, Viitanen M, Asplund K, Eriksson S, Hägg E. Prognosis after stroke in diabetic patients. A controlled prospective study. *Diabetologia*, **33**, 244–249 (1990).
4. Sarwar N, Gao P, Seshasai SRK, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CDA, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*, **375**, 2215–2222 (2010).
5. Vijayan M, Reddy PH. Peripheral biomarkers of stroke: Focus on circulatory microRNAs. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1862**, 1984–1993 (2016).
6. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke*, **32**, 2426–2432 (2001).
7. Matz K, Keresztes K, Tatschl C, Nowotny M, Dachenhausen A, Dachenhausenm A, Brainin M, Tuomilehto J. Disorders of glucose metabolism in acute stroke patients: an underrecognized problem. *Diabetes Care*, **29**, 792–797 (2006).
8. Harada S, Fujita WH, Shichi K, Tokuyama S. The development of glucose intolerance after focal cerebral ischemia participates in subsequent neuronal damage. *Brain Res.*, **1279**, 174–181 (2009).
9. Harada S, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. The importance of regulation of blood glucose levels through activation of peripheral 5'-AMP-activated protein kinase on ischemic neuronal damage. *Brain Res.*, **1351**, 254–263 (2010).
10. Harada S, Yamazaki Y, Nishioka H, Tokuyama S. Neuroprotective effect through the cerebral sodium-glucose transporter on the development of ischemic damage in global ischemia. *Brain Res.*, **1541**, 61–68 (2013).
11. Yamazaki Y, Harada S, Tokuyama S. Post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage through the cerebral sodium-glucose transporter. *Brain Res.*, **1489**, 113–120 (2012).
12. Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.*, **447**,

- 510–518 (2004).
13. Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol. Rev.*, **91**, 733–794 (2011).
  14. Scheepers A, Joost H-G, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr.*, **28**, 364–371 (2004).
  15. Sabino-Silva R, Mori RC, David-Silva A, Okamoto MM, Freitas HS, Machado UF. The Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters: from genes to therapy. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **43**, 1019–1026 (2010).
  16. Poppe R, Karbach U, Gambaryan S, Wiesinger H, Lutzenburg M, Kraemer M, Witte OW, Koepsell H. Expression of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J. Neurochem.*, **69**, 84–94 (1997).
  17. Matsuoka T, Nishizaki T, Kisby GE. Na<sup>+</sup>-dependent and phlorizin-inhibitable transport of glucose and cycasin in brain endothelial cells. *J. Neurochem.*, **70**, 772–777 (1998).
  18. Pérez López G, González Albarrán O, Cano Megías M. Sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors (SGLT2): from familial renal glucosuria to the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nefrologia*, **30**, 618–625 (2010).
  19. Ghezzi C, Wright EM. Regulation of the human Na<sup>+</sup>-dependent glucose cotransporter hSGLT2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **303**, 348–354 (2012).
  20. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thévenet J, Beaucamps C, Delalleau N, Popescu I, Malaisse WJ, Sener A, Deprez B, Abderrahmani A, Staels B, Pattou F. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat. Med.*, **21**, 512–517 (2015).
  21. Jojima T, Tomotsune T, Iijima T, Akimoto K, Suzuki K, Aso Y. Empagliflozin (an SGLT2 inhibitor), alone or in combination with linagliptin (a DPP-4 inhibitor), prevents steatohepatitis in a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis and diabetes. *Diabetol. Metab. Syndr.*, **8**, 45 (2016).
  22. Tahara A, Takasu T, Yokono M, Imamura M, Kurosaki E. Characterization and comparison of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: Part 2. Antidiabetic effects in type 2 diabetic mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **131**, 198–208 (2016).
  23. Ennis K, Tran P V, Seaquist ER, Rao R. Postnatal age influences hypoglycemia-induced neuronal injury in the rat brain. *Brain Res.*, **1224**, 119–126 (2008).
  24. Rooijackers HMM, Wiegers EC, Tack CJ, van der Graaf M, de Galan BE. Brain glucose metabolism during hypoglycemia in type 1 diabetes: insights from functional and metabolic neuroimaging studies. *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 705–722 (2016).
  25. Tkacs NC, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Presumed apoptosis and reduced arcuate nucleus

- neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA in non-coma hypoglycemia. *Diabetes*, **49**, 820–826 (2000).
26. Wang W, Xiao Z-D, Li X, Aziz KE, Gan B, Johnson RL, Chen J. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat. Cell Biol.*, **17**, 490–499 (2015).
  27. Bhatti AB, Usman M. Drug Targets for Oxidative Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy. *Curēus*, **7**, e393 (2015).
  28. de Leeuw AE, de Boer RA. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition: cardioprotection by treating diabetes—a translational viewpoint explaining its potential salutary effects. *Eur. Hear. J. Cardiovasc. Pharmacother.*, **2**, 244–255 (2016).
  29. Miranda-Díaz AG, Pazarín-Villaseñor L, Yanowsky-Escatell FG, Andrade-Sierra J. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy with Early Chronic Kidney Disease. *J. Diabetes Res.*, **2016**, 7047238 (2016).
  30. Gentile NT, Seftchick MW, Huynh T, Kruus LK, Gaughan J. Decreased mortality by normalizing blood glucose after acute ischemic stroke. *Acad. Emerg. Med.*, **13**, 174–180 (2006).
  31. Stöllberger C, Exner I, Finsterer J, Slany J, Steger C. Stroke in diabetic and non-diabetic patients: course and prognostic value of admission serum glucose. *Ann. Med.*, **37**, 357–364 (2005).
  32. Agrawal N, Jamshed N, Aggarwal P, Ekka M. Severe hypoglycemia masquerading as cerebellar stroke. *J. Fam. Med. Prim. care*, **3**, 440–442 (2014).
  33. Haley TJ, McCormick WG. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **12**, 12–15 (1957).
  34. Díez-Sampedro A, Barcelona S. Sugar binding residue affects apparent Na<sup>+</sup> affinity and transport stoichiometry in mouse sodium/glucose cotransporter type 3B. *J. Biol. Chem.*, **286**, 7975–7982 (2011).
  35. Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. The involvement of cleavage of neural cell adhesion molecule in neuronal death under oxidative stress conditions in cultured cortical neurons. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 624–628 (2012).
  36. Hu J, Luo CX, Chu WH, Shan YA, Qian Z-M, Zhu G, Yu YB, Feng H. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF-κB and JNK pathways. *PLoS One*, **7**, e50764 (2012).
  37. Holmes S, Abbassi B, Su C, Singh M, Cunningham RL. Oxidative stress defines the neuroprotective or neurotoxic properties of androgens in immortalized female rat dopaminergic neuronal cells. *Endocrinology*, **154**, 4281–4292 (2013).
  38. Tajés M, Ill-Raga G, Palomer E, Ramos-Fernández E, Guix FX, Bosch-Morató M, Guivernau B, Jiménez-Conde J, Ois A, Pérez-Asensio F, Reyes-Navarro M, Caballo C,

- Galán AM, Alameda F, Escolar G, Opazo C, Planas A, Roquer J, Valverde MA, Muñoz FJ. Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, 826143 (2013).
39. Nuñez-Figueroa Y, Ramírez-Sánchez J, Delgado-Hernández R, Porto-Verdecia M, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Marin-Prida J, González-Durruthy M, Uyemura SA, Rodrigues FP, Curti C, Souza DO, Pardo-Andreu GL. JM-20, a novel benzodiazepine–dihydropyridine hybrid molecule, protects mitochondria and prevents ischemic insult-mediated neural cell death in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, **726**, 57–65 (2014).
  40. Su C, Sun F, Cunningham RL, Rybalchenko N, Singh M. ERK5/KLF4 signaling as a common mediator of the neuroprotective effects of both nerve growth factor and hydrogen peroxide preconditioning. *Age (Dordr.)*, **36**, 9685 (2014).
  41. Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Luo C, Zhou S, Sirianni AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. *J. Neurosci.*, **34**, 2967–2978 (2014).
  42. Yao M, Ni J, Zhou L, Peng B, Zhu Y, Cui L. Elevated Fasting Blood Glucose Is Predictive of Poor Outcome in Non-Diabetic Stroke Patients: A Sub-Group Analysis of SMART. *PLoS One*, **11**, e0160674 (2016).
  43. Kiers L, Davis SM, Larkins R, Hopper J, Tress B, Rossiter SC, Carlin J, Ratnaik S. Stroke topography and outcome in relation to hyperglycaemia and diabetes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **55**, 263–270 (1992).
  44. Banerjee SK, Wang DW, Alzamora R, Huang XN, Pastor-Soler NM, Hallows KR, McGaffin KR, Ahmad F. SGLT1, a novel cardiac glucose transporter, mediates increased glucose uptake in PRKAG2 cardiomyopathy. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **49**, 683–692 (2010).
  45. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell*, **30**, 214–226 (2008).
  46. Sopjani M, Bhavsar SK, Fraser S, Kemp BE, Föller M, Lang F. Regulation of Na<sup>+</sup>-coupled glucose carrier SGLT1 by AMP-activated protein kinase. *Mol. Membr. Biol.*, **27**, 137–144 (2010).
  47. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 774–785 (2007).
  48. Li J, McCullough LD. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 480–492 (2010).
  49. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H]dopamine and [<sup>3</sup>H]dopa in various regions of the

- brain. *J. Neurochem.*, **13**, 655–669 (1966).
50. Zeuthen T, Meinild AK, Loo DD, Wright EM, Klaerke DA. Isotonic transport by the Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J. Physiol.*, **531**, 631–644 (2001).
  51. Loo DD, Eskandari S, Boorer KJ, Sarkar HK, Wright EM. Role of Cl<sup>-</sup> in electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 37414–37422 (2000).
  52. Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM, Koepsell H. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 11753–11758 (2003).
  53. Wright EM. Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.*, **280**, 10–18 (2001).
  54. Malatiali S, Francis I, Barac-Nieto M. Phlorizin prevents glomerular hyperfiltration but not hypertrophy in diabetic rats. *Exp. Diabetes Res.*, **2008**, 305403 (2008).
  55. Krimi RB, Letteron P, Chedid P, Nazaret C, Ducroc R, Marie J-C. Resistin-like molecule-beta inhibits SGLT-1 activity and enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport. *Diabetes*, **58**, 2032–2038 (2009).
  56. Hirsch JR, Loo DD, Wright EM. Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14740–14746 (1996).
  57. Martin MG, Wang J, Solorzano-Vargas RS, Lam JT, Turk E, Wright EM. Regulation of the human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter gene, SGLT1, by HNF-1 and Sp1. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, **278**, 591–603 (2000).
  58. Lee M, Bikram M, Oh S, Bull DA, Kim SW. Sp1-dependent regulation of the RTP801 promoter and its application to hypoxia-inducible VEGF plasmid for ischemic disease. *Pharm. Res.*, **21**, 736–741 (2004).
  59. Miki N, Ikuta M, Matsui T. Hypoxia-induced activation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha4 gene by an interaction between hypoxia-inducible factor-1 and Sp1. *J. Biol. Chem.*, **279**, 15025–15031 (2004).
  60. Ryu H, Lee J, Zaman K, Kubilis J, Ferrante RJ, Ross BD, Neve R, Ratan RR. Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *J. Neurosci.*, **23**, 3597–3606 (2003).
  61. Lee J, Kosaras B, Aleyasin H, Han JA, Park DS, Ratan RR, Kowall NW, Ferrante RJ, Lee SW, Ryu H. Role of cyclooxygenase-2 induction by transcription factor Sp1 and Sp3 in neuronal oxidative and DNA damage response. *FASEB J.*, **20**, 2375–2377 (2006).
  62. Yeh SH, Yang W Bin, Gean PW, Hsu CY, Tseng JT, Su TP, Chang WC, Hung JJ. Translational and transcriptional control of Sp1 against ischaemia through a hydrogen peroxide-activated internal ribosomal entry site pathway. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5412–5423 (2011).

63. Hahn SS, Tang Q, Zheng F, Zhao S, Wu J, Chen J. Repression of integrin-linked kinase by antidiabetes drugs through cross-talk of PPAR $\gamma$ - and AMPK $\alpha$ -dependent signaling: role of AP-2 $\alpha$  and Sp1. *Cell. Signal.*, **26**, 639–647 (2014).
64. Chen J-H, Kuo H-C, Lee K-F, Tsai T-H. Global proteomic analysis of brain tissues in transient ischemia brain damage in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 11873–11891 (2015).
65. Grell A-S, Thigarajah R, Edvinsson L, Samraj AK. Regulatory mechanism of endothelin receptor B in the cerebral arteries after focal cerebral ischemia. *PLoS One*, **9**, e113624 (2014).
66. Jiang M, Li J, Peng Q, Liu Y, Liu W, Luo C, Peng J, Li J, Yung KKL, Mo Z. Neuroprotective effects of bilobalide on cerebral ischemia and reperfusion injury are associated with inhibition of pro-inflammatory mediator production and down-regulation of JNK1/2 and p38 MAPK activation. *J. Neuroinflammation*, **11**, 167 (2014).
67. Kiss K, Baghy K, Spisák S, Szanyi S, Tulassay Z, Zalatnai A, Löhr J-M, Jesenofsky R, Kovalszky I, Firneisz G. Chronic hyperglycemia induces trans-differentiation of human pancreatic stellate cells and enhances the malignant molecular communication with human pancreatic cancer cells. *PLoS One*, **10**, e0128059 (2015).
68. Lee YJ, Han HJ. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3 $\beta$ , Snail1, and  $\beta$ -catenin in renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **298**, 1263–1275 (2010).
69. Lee YJ, Suh HN, Han HJ. Effect of BSA-induced ER stress on SGLT protein expression levels and alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **296**, 1405–1416 (2009).
70. Low HB, Zhang Y. Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. *Immune. Netw.*, **16**, 85–98 (2016).
71. Kyosseva S V. Targeting MAPK Signaling in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol. Eye. Dis.*, **8**, 23–30 (2016).
72. Berends AC, Luiten PGM, Nyakas C. A review of the neuroprotective properties of the 5-HT1A receptor agonist repinotan HCl (BAYx3702) in ischemic stroke. *CNS Drug Rev.*, **11**, 379–402 (2005).
73. Sun K, Fan J, Han J. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage. *Acta. Pharm. Sin. B.*, **5**, 8–24 (2015).
74. Darling NJ, Cook SJ. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1843**, 2150–2163 (2014).
75. Javadov S, Jang S, Agostini B. Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives. *Pharmacol. Ther.*, **144**, 202–225

- (2014).
76. Takekawa M, Tatebayashi K, Saito H. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol. Cell*, **18**, 295–306 (2005).
  77. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.*, **17**, 439–447 (2011).
  78. Murphy TH, Li P, Betts K, Liu R. Two-photon imaging of stroke onset in vivo reveals that NMDA-receptor independent ischemic depolarization is the major cause of rapid reversible damage to dendrites and spines. *J. Neurosci.*, **28**, 1756–1772 (2008).
  79. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**, 552–565 (2003).
  80. Wang X, Ma Z, Fu Z, Gao S, Yang L, Jin Y, Sun H, Wang C, Fan W, Chen L, Zheng Q-Y, Bi G, Ma C-L. Hydroxysafflor Yellow A Protects Neurons From Excitotoxic Death through Inhibition of NMDARs. *ASN Neuro*, **8**, 1759091416642345 (2016).
  81. Zheng L-S, Ishii Y, Zhao Q-L, Kondo T, Sasahara M. PDGF suppresses oxidative stress induced Ca<sup>2+</sup> overload and calpain activation in neurons. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, 367206 (2013).
  82. Jiang Y-Q, Chang G-L, Wang Y, Zhang D-Y, Cao L, Liu J. Geniposide Prevents Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis in H9c2 Cells: Improvement of Mitochondrial Dysfunction and Activation of GLP-1R and the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.*, **39**, 407–421 (2016).
  83. Quintanilla RA, Jin YN, von Bernhardi R, Johnson GVW. Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Mol. Neurodegener.*, **8**, 45 (2013).
  84. O'Malley D, Reimann F, Simpson AK, Gribble FM. Sodium-coupled glucose cotransporters contribute to hypothalamic glucose sensing. *Diabetes*, **55**, 3381–3386 (2006).
  85. Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F. A Novel Glucose-Sensing Mechanism Contributing to Glucagon-Like Peptide-1 Secretion From the GLUTag Cell Line. *Diabetes*, **52**, 1147–1154 (2003).
  86. Costa GN, Vindeirinho J, Cavadas C, Ambrósio AF, Santos PF. Contribution of TNF receptor 1 to retinal neural cell death induced by elevated glucose. *Mol. Cell Neurosci.*, **50**, 113–123 (2012).
  87. Chen C, Wang Y, Zhang J, Ma L, Gu J, Ho G. Contribution of neural cell death to depressive phenotypes of streptozotocin-induced diabetic mice. *Dis. Model Mech.*, **7**, 723–730 (2014).
  88. Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzl E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and

- ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.*, **16**, 899–909 (2009).
89. Makino A, Scott BT, Dillmann WH. Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*, **53**, 1783–1794 (2010).
  90. Shi J, Zhang YQ, Simpkins JW. Effects of 17beta-estradiol on glucose transporter 1 expression and endothelial cell survival following focal ischemia in the rats. *Exp. brain Res.*, **117**, 200–206 (1997).
  91. Lawrence MS, Sun GH, Kunis DM, Saydam TC, Dash R, Ho DY, Sapolsky RM, Steinberg GK. Overexpression of the glucose transporter gene with a herpes simplex viral vector protects striatal neurons against stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 181–185 (1996).
  92. Wada F, Nakata A., Tatsu Y., Ooashi N., Fukuda T., Nabetani T., Kamiguchi H. Myosin Va and Endoplasmic Reticulum Calcium Channel Complex Regulates Membrane Export during Axon Guidance. *Cell Rep.*, **15**, 1329–1344 (2016).
  93. Pan Y, Zvaritch E, Tupling AR, Rice WJ, de Leon S, Rudnicki M, McKerlie C, Banwell BL, MacLennan DH. Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice. *J. Biol. Chem.*, **278**, 13367–13375 (2003).
  94. Wang Y, Xu L, Duan H, Pasek DA, Eu JP, Meissner G. Knocking down type 2 but not type 1 calsequestrin reduces calcium sequestration and release in C2C12 skeletal muscle myotubes. *J. Biol. Chem.*, **281**, 15572–15581 (2006).
  95. Blyth B. J., Farhavar A., Gee C., Hawthorn B., He H., Nayak A., Stöcklein V., Bazarian J. J. Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, **26**, 1497–1507 (2009).
  96. Marchi N., Fazio V., Cucullo L., Kight K., Masaryk T., Barnett G., Volgelbaum M., Kinter M., Rasmussen P., Mayberg M. R., Janigro D. Serum transthyretin monomer as a possible marker of blood-to-CSF barrier disruption. *J. Neurosci.*, **23**, 1949–1955 (2003).
  97. Díez-Sampedro A, Eskandari S, Wright EM, Hirayama BA. Na<sup>+</sup>-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **280**, 278–282 (2001).
  98. Barcelona S, Menegaz D, Díez-Sampedro A. Mouse SGLT3a generates proton-activated currents but does not transport sugar. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **302**, 1073–1082 (2012).
  99. Voss AA, Díez-Sampedro A, Hirayama BA, Loo DDF, Wright EM. Imino sugars are potent agonists of the human glucose sensor SGLT3. *Mol. Pharmacol.*, **71**, 628–634 (2007).
  100. Bianchi L, Díez-Sampedro A. A single amino acid change converts the sugar sensor SGLT3 into a sugar transporter. *PLoS One*, **5**, e10241 (2010).
  101. Raja M, Kinne RKH. Identification of phlorizin binding domains in sodium-glucose cotransporter family: SGLT1 as a unique model system. *Biochimie*, **115**, 187–193 (2015).



102. Winters A, Taylor JC, Ren M, Ma R, Liu R, Yang S-H. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cerebral vasculature dysfunction in a rodent experimental stroke model. *Transl. Stroke Res.*, **3**, 279–285 (2012).
103. Hotta H, Uchida S, Kagitani F. Effects of stimulating the nucleus basalis of Meynert on blood flow and delayed neuronal death following transient ischemia in the rat cerebral cortex. *Jpn. J. Physiol.*, **52**, 383–393 (2002).

## 主論文

1. Yamazaki Y., Harada S., Tokuyama S., Sodium-glucose transporter type 3-mediated neuroprotective effect of acetylcholine suppresses the development of cerebral ischemic neuronal damage. *Neuroscience*, **269**, 134-142 (2014).
2. Yamazaki Y., Harada S., Tokuyama S., Relationship between cerebral sodium-glucose transporter and hyperglycemia in cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.*, **604**, 134-139 (2015).
3. Yamazaki Y., Ogihara S., Harada S., Tokuyama S., Activation of cerebral sodium-glucose transporter type 1 function mediated by post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemia. *Neuroscience*, **310**, 3674-3685 (2015).
4. Yamazaki Y., Harada S., Wada T., Yoshida S., Tokuyama S., Sodium transport through the cerebral sodium-glucose transporter exacerbates neuron damage during cerebral ischaemia. *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 922-931 (2016).
5. Yamazaki Y., Harada S., Wada T., Hagiwara T., Yoshida S., Tokuyama S., Sodium influx through cerebral sodium-glucose transporter type 1 exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage. *Eur. J. Pharmacol.*, (in press).
6. Yamazaki Y., Arita K., Harada S., Tokuyama S., Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 after cerebral ischemia upregulates cerebral sodium-glucose transporter type 1. *J. Pharmacol. Sci.*, (in press).

## 副論文

1. Harada S., Nozaki Y., Matsuura W., Yamazaki Y., Tokuyama S., Cerebral ischemia-induced elevation of hepatic inflammatory factors accompanied by glucose intolerance suppresses hypothalamic orexin-A-mediated vagus nerve activation. *Brain Res.*, (in press).
2. Harada S., Yamazaki Y., Koda S., Tokuyama S., 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).
3. Harada S., Yamazaki Y., Nishioka H., Tokuyama S., Neuroprotective effect through the cerebral sodium-glucose transporter on the development of ischemic damage in global ischemia. *Brain Res.*, **1541**, 61-68 (2013).
4. Harada S., Yamazaki Y., Tokuyama S., Orexin-A suppresses postischemic glucose intolerance and neuronal damage through hypothalamic brain-derived neurotrophic factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **344**, 276-285 (2013).
5. Yamazaki Y., Harada S., Tokuyama S., Post-ischemic hyperglycemia exacerbates the development of cerebral ischemic neuronal damage through the cerebral sodium-glucose transporter. *Brain Res.*, **1489**, 113-120 (2012).
6. 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)