

予備審査の学位論文の要旨
（又は、学位論文の要旨）

No. 1

論文題名	
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	
氏名	山崎 由衣
	（学籍番号若しくは 9413102 所属機関名）
主論文	
<p>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. <i>Neuroscience</i>, 269, 134-142 (2014).</p> <p>2. Yamazaki Y., Harada S., Tokuyama S., Relationship between cerebral sodium-glucose transporter and hyperglycemia in cerebral ischemia. <i>Neurosci. Lett.</i>, 604, 134-139 (2015).</p> <p>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. <i>Neuroscience</i>, 310, 3674-3685 (2015).</p> <p>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. <i>J. Pharm. Pharmacol.</i>, 68, 922-931 (2016).</p>	
要旨	
<p>【背景】</p> <p>脳卒中をはじめとする脳血管疾患は、世界の主要な死因のひとつであると同時に、麻痺などの運動障害や記憶障害、うつなどの様々な後遺症が生じることが問題視されており、新たな脳梗塞治療薬の開発が急務となっている。脳血管疾患の危険因子として、糖尿病などの高血糖状態が知られているが、糖尿病の既往歴のない患者が脳血管疾患発症後に高血糖状態が生じ、その死亡率が増加することが報告されている。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によって、脳虚血ストレス負荷後早期に耐糖能異常が生じることや、この高血糖状態を正常血糖値まで低下させることで、脳虚血性神経障害発現が改善することを報告してきた。さらに、虚血後の高血糖と神経障害を繋ぐ因子として、糖輸送体のひとつである sodium-glucose transporter (SGLT) に着目した検討も行ってきた。</p> <p>SGLT はグルコースとナトリウムを細胞内へ共輸送する二次性能動輸送体で、1～6 のアイソフォームが存在する。SGLT は全身に広く分布しており、脳内では SGLT-1、3、4 および 6 が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。研究室において、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が、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。</p>	

【方法】

In vitro の検討では、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y)、または、胎生 17 日齢のマウスから作製した初代培養大脳皮質神経細胞を用いた。細胞内ナトリウム濃度は、ナトリウム指示薬である SBF1 の蛍光強度を蛍光画像解析装置 ARUGAS-50 を用いて測定することによって評価した。初代培養大脳皮質神経細胞は、培養開始 5 日後に各種薬物処置を行い、その 1 日後に WST-8 試験を用いて細胞生存活性を評価あるいは western blot 法を用いてタンパク質発現解析を行った。

In vivo の検討では、5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO、2 時間) を施し、一過性局所脳虚血モデルマウスとした。MCAO 1 日後に空腹時血糖値変化、MCAO 1 または 3 日後に神経障害発現の評価として梗塞巣形成および行動異常を解析した。タンパク質発現は、蛍光免疫染色法および western blot 法を用いて解析した。脳内 SGLT-1 ノックダウンマウスに MCAO を施し、12 時間後の大脳皮質における SGLT-1 の下流遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法によって解析した。

【結果および考察】

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

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 を阻害した結果、phlorizin の再灌流 6 時間後投与でのみ、MCAO 3 日後における梗塞巣形成ならびに行動異常は有意に抑制された。よって、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。また、再灌流 12 時間後の phlorizin 投与は、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と考えられる。さらに、高血糖状態の有無が脳虚血性神経障害発現に与える影響を検討するため、*in vitro* 系を用いて検討した結果、100 μM H_2O_2 による有意な細胞生存率の低下は phlorizin によって抑制されなかったが、17.5 mM glucose 単独処置ならびに *in vitro* の虚血後高血糖モデルである 100 μM H_2O_2 /8.75 mM glucose 共処置による神経細胞死の誘導を有意に抑制した。このことから、脳内 SGLT は、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。

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

脳内に存在する SGLT アイソフォームの中でも、MCAO 1 日後の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を確認している、SGLT-1 に着目し検討を行った。脳内 SGLT-1 をノックダウンすることによって、MCAO 3 日後の梗塞巣形成ならびに行動異常は有意に改善された。すなわち、脳内 SGLT-1 は脳虚血性神経障害発現を増悪する可能性が示された。また、SGLT-1 は脳内で神経上に発現するが、アストロサイト上には発現しなかったことから、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考えられた。脳虚血ストレス負荷後の脳内 SGLT-1 増加機序を解明するため、末梢において SGLT-1 の発現誘導への関与が示唆されている 5'-adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) に着目し検討した。その結果、100 μM H_2O_2 /8.75 mM glucose 共処置によって SGLT-1 発現および AMPK のリン酸化率は有意に上昇しており、これらは、AMPK 阻害剤である compound C によって有意に抑制された。このことから、脳虚血ストレス負荷後の脳内 AMPK の活性化が、脳内 SGLT-1 の発現誘導に関与する可能性が示された。

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

脳虚血ストレスによって活性化されることが知られている mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は、末梢において SGLT-1 の発現を誘導することが報告されている。そこで、MAPK 経路の中でも脳虚血性神経障害発現の形成に関与する c-Jun N-terminal kinases (JNK) および p38 が脳虚血後の SGLT-1 発現誘導に及ぼす影響について検討した。MCAO 3 時間後において、大脳皮質 JNK および p38 の活性は有意に上昇した。MCAO 後の JNK の活性化を抑制することによって、MCAO 12 時間後の大脳皮質 SGLT-1 の増加は有意に抑制された。一方、p38 は SGLT-1 の発現増加に関与しなかった。以上から、脳虚血ストレス負荷後の SGLT-1 発現誘導機序の一部に JNK 経路が関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

虚血後高血糖によって、脳内 SGLT-1 を介したナトリウムが脳虚血性神経障害発現を増悪させると考え、非代謝性のグルコースアナログであり、SGLT 特異的な細胞内へのナトリウム流入を生じさせることが知られている α -methyl-D-glucopyranoside (α -MG) を用いて検討を行った。実際に、 α -MG 負荷は細胞内ナトリウム濃度を増加させた。すなわち、 α -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。100 mM α -MG 単独処置ならびに 100 μ M H_2O_2 /0.01 mM α -MG 共処置による有意な細胞生依存率の低下、あるいは α -MG の脳室内投与は MCAO による神経障害発現を有意に増悪は phlorizin 処置または神経 SGLT-1 のノックダウンによって有意に改善された。以上の結果から、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ことによって、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。また、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 2 倍以上上昇した遺伝子は 23 個、減少した遺伝子は 5 個同定された。この中でも特に、fast twitch 1 や calsequestrin 1 などの細胞内カルシウム濃度調節に関与する因子が変動することが示された。脳虚血時は、細胞内カルシウム濃度の上昇が神経細胞死を誘導することが知られていることから、脳内 SGLT-1 はこれらの因子を介して神経障害を増悪している可能性が考えられた。

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

SGLT-1 以外の脳内 SGLT アイソフォームであり、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 SGLT-3 に着目した。その結果、脳内 SGLT-3 は予想に反して脳保護的に機能することが示された。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、コリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジル投与を用いて脳内アセチルコリン量を増加させることによって、完全に抑制された。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。

【総括】

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 を介したナトリウムの流入が関与する可能性が示された。

本研究では脳血管疾患と高血糖を繋ぐ因子として、新たに SGLT を脳虚血ストレスのセンサー分子としてとらえた着眼点は全く新しく、独創性が高い。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、本研究の遂行は、新規脳血管疾患治療薬の開発に貢献できると期待される。