

原

著

低血糖脳症におけるグルコース再灌流障害による 神経細胞死に対する ALDH2 アゴニスト Alda - 1 の有効性

池 田 哲 彦

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻

分子情報医学講座神経内科学分野専攻

(主任：西澤正豊教授)

Effects of ALDH2 agonist, Alda - 1, on Hypoglycemic Neuronal Death Associated with Glucose Reperfusion Injury

Tetsuhiko IKEDA

*Niigata University Graduate School of Medicine and Dental Science/Course for Molecular
and Cellular Medicine/Molecular Neuroscience and Brain Disease/Neurology**(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)*

要 旨

低血糖脳症は、時に重篤な転帰となる疾患であるが、その治療は血糖補正以外にない。低血糖脳症の動物モデルとして、平坦脳波を長時間維持するモデル（低血糖昏睡モデル）と、平坦脳波に到達させないモデル（低血糖非昏睡モデル）が存在する。前者は高度の低血糖状態を長時間維持し、人工呼吸器を用いる点で、ヒトの低血糖脳症とは病態が異なる可能性がある。後者は平坦脳波に代わる指標が研究者により様々であり、いずれのモデルにも欠点がある。よって平坦脳波を低血糖負荷の指標としつつも、呼吸抑制が起きない程度の低血糖状態となる動物モデルを確立することが望ましい。一方、低血糖脳症の神経障害の機序としては、グルコース投与時に生じる酸化的ストレス（グルコース再灌流障害）が大きく関与することが知られている。また低血糖非昏睡モデルの検討にて、酸化的ストレスに伴い細胞傷害性アルデヒドである 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) が生成されることが報告されている。申請者は、1) 低血糖脳症の指標である平坦脳波を短時間にし、人工呼吸器を使用しない、より生理的な低血糖脳症動物モデルを確立すること、2) 同モデルにて酸化的ストレスの増加による 4-HNE 生成と神経細胞変性が生じることを確認すること、そして 3) 同モデルにて酸化的ストレスを抑制する

Reprint requests to: Tetsuhiko IKEDA
Department of Neurology Brain Research
Institute Niigata University
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951 - 8585 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学脳研究所神経内科学教室 池田 哲彦

ミトコンドリア酵素 ALDH2 (mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2) の活性を増加させる ALDH2 アゴニスト Alda-1 が、グルコース再灌流障害に対し保護的に作用するかを明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、平坦脳波を短時間にするにより、ヒトの臨床により近い生理的な低血糖状態を再現した低血糖脳症モデル (低血糖短時間昏睡モデル) を確立した。本モデルの検討で、グルコース再灌流後の大脳の前頭から頭頂・側頭の皮質 (軽度であるが海馬も) において 4-HNE 陽性細胞の出現と、神経細胞変性を示す Fluoro-Jade B 陽性細胞が出現することを確認した。また、グルコース再灌流時に Alda-1 (8.5 mg/kg) を投与することにより、4-HNE 陽性細胞数が有意に減少し ($P = 0.042$)、かつ Fluoro-Jade B 陽性細胞数も減少することを示した ($P = 0.007$)。以上より、平坦脳波時間を2分間に短縮した人工呼吸器を使用しないラットの低血糖脳症モデルが神経保護薬の開発に有用であること、ならびに Alda-1 が低血糖脳症に対する神経保護薬の候補となりうる可能性を示した。

キーワード：低血糖脳症、酸化ストレス、神経保護、再灌流障害、4-HNE, Alda-1

はじめに

低血糖脳症は、インスリンや経口血糖降下剤を用いて糖尿病を治療する際や、インスリンオマ、アルコール依存症、神経性食思不振症などで生じうる。多くの場合、適切な処置により回復するが、時には後遺症を生じたり、死に至るなど重篤となることがある¹⁾²⁾。しかし、低血糖脳症に対する治療は血糖補正 (グルコース投与) 以外にない、神経保護薬は開発されていない。

低血糖脳症の病態や新規神経保護薬の開発研究は、動物モデルを用いて行われている。従来の低血糖脳症の動物モデルとしては、平坦脳波を長時間維持するモデル (低血糖昏睡モデル)³⁾⁴⁾ と、平坦脳波前に安楽死させる、またはグルコースを投与するモデル (低血糖非昏睡モデル)^{5)–7)} が存在する。具体的には、前者としては Auer らのモデルや、その変法である Suh らのモデルが知られている。これらは血糖低下後に生じる平坦脳波を30分以上維持し、中枢神経に高度の低血糖状態を負荷するモデルである。低血糖に伴う脳神経の明瞭な変化を観察できる反面、呼吸停止は必発で、予め人工呼吸器の装着を行う。重篤な低血糖状態を長時間維持する点、および人工呼吸器を用いる点で、臨床で経験するヒトの低血糖脳症とは病態が異なる可能性がある。一方、後者では個体差が大きい低血糖負荷の反応の程度と経過を示す

指標として平坦脳波に代わるものが研究者によりさまざまであることが問題点として挙げられる。よって平坦脳波を低血糖負荷の指標としつつも、人工呼吸器を使用しない、より生理的な動物モデルを確立することが、低血糖脳症の病態を明らかにし、神経保護薬を開発するために望ましい。

低血糖脳症の病態としては動物モデルにおいて、グルコース投与後に生じる酸化ストレスによって引き起こされる神経細胞変性が報告されている⁴⁾⁸⁾⁹⁾。この現象はグルコース再灌流障害と呼ばれ、補正後の血糖値が高くなるほど障害が高度となることも判明している⁹⁾。また、低血糖脳症において酸化ストレスの評価には様々なバイオマーカーが使用されているが、生体脂質のうちアラキドン酸のような $\omega 6$ 系高度不飽和脂肪酸から細胞傷害性アルデヒドである 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) が生成され¹⁰⁾、ミトコンドリア障害をきたし神経細胞変性を引き起こしうること¹¹⁾も明らかにされている。

一方、低血糖脳症に対する神経保護薬の開発研究は、低血糖に伴う低エネルギー状態や、グルコース再灌流障害の酸化ストレスの抑制を標的として行われてきた。酸化ストレスのうち、特に 4-HNE については、心筋虚血において十分な検討が行われている。ミトコンドリア酵素 ALDH2 (mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2) の活性を増加させる ALDH2 アゴニスト Alda-1 (N-

(1, 3 - Benzodioxol - 5 - ylmethyl) - 2, 6 - dichlorobenzamide)¹²⁾¹³⁾ は、虚血後に 4 - HNE によりもたらされる心筋障害を阻害することが報告¹²⁾ されている。

以上を踏まえ、本研究では以下の 3 点を目的とした。1) 平坦脳波を低血糖脳症の指標とするものの、その持続時間を短時間にし、人工呼吸器の使用を行わない、より生理的な低血糖脳症動物モデルを確立すること（低血糖短時間昏睡モデルと名付ける）、2) 同モデルにて酸化的ストレスと神経細胞変性が生じることを確認すること、そして 3) 同モデルにて Alda-1 が、グルコース再灌流に伴う神経細胞変性に対し保護的に作用し、神経保護薬の候補となりうるか明らかにすることである。

材料と方法

1. 脳波測定

研究プロトコールは新潟大学動物実験倫理委員会に申請し、承認を受けた。さらに動物実験に関する ARRIVE ガイドライン¹⁴⁾ に従って実施した。オス Sprague-Dawley ラット (260-310 g, 8-10 週齢, 日本チャールス・リバー株式会社) を用い、除毛した頭部と前頸部の皮脂をアルコール綿にて清拭後、脳波電極用研磨剤 (スキンピュア, 日本光電工業株式会社) にて研磨した。そののち、脳波電極用ペースト剤 (エレフィックス, 日本光電工業株式会社) を塗布した脳波用皿電極 (LEAD110A, BIOPAC system Inc.) をラットの前頭部 (両眼窩の間) と後頭部 (両耳孔の間) の頭皮に装着し、脳波導出用電極とした。さらに前頸部にも皿電極を装着し、アースとして使用した。電極の装着後、それぞれの電極間接触抵抗が 10 k Ω 以下であること、および各電極の接触抵抗のばらつきが 3 k Ω 以下であることを交流抵抗測定器 (Model 1089ES Checktrode, UFI Inc.) を用いて確認した。脳波測定には脳波計 (EEG100C, BIOPAC system Inc.) を使用し、データの取り込みおよび解析には A/D 変換器 (MP100System, BIOPAC system Inc.) と波形解析ソフトウェア

(AcqKnowledge, BIOPAC system Inc., Version 3.7.2) を用いた。フィルタ設定は、脳波アンプによる 0.1 ~ 100 Hz のバンドパスを用い、A/D 変換のサンプリング周波数は 200 Hz にて行った。

2. 低血糖短時間昏睡モデル

前述のオス Sprague-Dawley ラットを用いた。食事は 1 匹当たり 1 日 20g¹⁵⁾ の食事量とし、3 日以上継続して制限を行い、手術前日のみ、水以外は一晩絶食させた。ケージ内の飼育数増減によるストレスのための摂食量の変化¹⁶⁾ を防ぐために、1 ケージの飼育数は 3 匹に固定し、1 日 1 回、給餌前に残量を計測し、摂食量に変化がないことを確認した。

低血糖負荷は、笑気 70 %, 酸素 30 % の混合ガスの流量に対し 1.0 ~ 1.5 % でハロタンを追加して麻酔を維持し、直腸温をモニターしながら行った。体温は、体温調節マットと送風機、および温熱ランプにて、37.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C に維持した。手術用顕微鏡の直視下に、左鼠径部を切開後、左大腿静脈を露出し、1 % ヘパリン生理食塩水を満たしたポリエチレン製カテーテル (INTRAMEDIC CLAY ADAMS ポリエチレンチューブ PE50, Becton Dickinson & Co.) を留置し、血糖測定の採血に用いた。血糖測定は血糖測定器 (Ascensia BREEZE 2, Bayer Health Care) を用いた。次に左頸部を切開後、左前顔面静脈を露出し、前述のチューブを留置し、グルコースなど薬剤投与に用いた。安静時脳波を記録後、速効型インスリン (ノボリン R 注 100 単位/mL, ファーマ株式会社) 15 IU/kg を腹腔内投与し、15 分毎に採血を行った。インスリン投与後、180 分を超えて脳波が平坦化しない場合は実験を中止した。平坦脳波の 2 分ないし 10 分後に 50 % グルコース 0.2 ml を静注した (図 1A)。引き続き 50 % グルコースを 2.2 ml/h で点滴静注し、5 分毎に 50 % グルコース 0.2 ml を 3 回静注した。さらに 15 分毎に採血を行い、低血糖脳症のグルコース再灌流障害を来す高血糖状態として、200 ~ 250 mg/dL⁹⁾ を目標血糖値として 3 時間保つよう、50 % グルコース 0.2 ml を適宜追加した。グルコース投与開始 3 時間後に皿

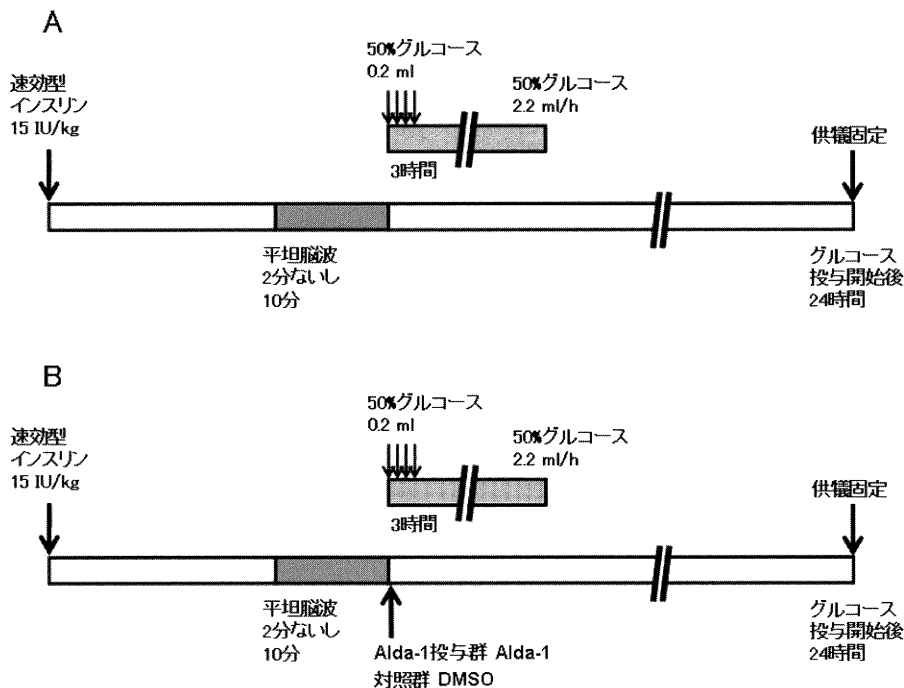


図1 低血糖短時間昏睡モデル

(A) 低血糖負荷およびグルコース再灌流のプロトコール

速攻型インスリン投与後、平坦脳波を2分ないし10分間持続し、50%グルコース静注による血糖の補正を3時間行う。グルコース投与開始後24時間で安楽死させる。

(B) Alda-1による治療プロトコール

(A)と同様のプロトコールにて行うが、50%グルコース静注による血糖補正の開始時にAlda-1ないしDMSOを静脈投与する。

電極およびカテーテルを除去し、皮膚を縫合した後、麻酔を中止し回復させた。

3. アルデヒド脱水素酵素活性化薬の経静脈的投与

アルデヒド脱水素酵素活性化薬であるALDH2アゴニスト (Alda-1, Merck KGaA) をジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) にて15 mg/mLに溶解した。平坦脳波終了時に、左前顔面静脈からグルコースとともに、Alda-1投与群にはAlda-18.5 mg/kg¹²⁾¹³⁾を投与し、対照群には同量のDMSOを投与した (図1B)。Alda-1の投与量は、ラット心筋虚血での報告¹²⁾¹³⁾にお

ける至適投与量に倣った。試薬の投与は無作為化して行った。

4. 脂質酸化物4-HNEに対する免疫染色

グルコース投与24時間後、ラットをハロタンにて安楽死させた。左心室より冷生理食塩水200 ml、および4%パラホルムアルデヒド (para-formaldehyde, PFA) 100 mlで灌流した。取り出した全脳を4% PFAにて4℃、12時間固定し、0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で洗浄後、15%スクロース/0.1 M PBS, 30%スクロース/0.1 M PBSの順で、それぞれ4℃で一晩浸漬し置換した。脳試料に3 mm 間

隔で割を入れ、前頭、中心前部、中心後部、後頭の四つの部分に分割し、OCT コンパウンド（ティシュー・テック、Sakura Finetek Inc.）にてイソペンタール凍結包埋処理し、 -80°C にて保存した。脳試料をクリオスタット（Cryotome E electronic cryostat, Thermo Shandon, Thermo Electron Co.）にて $20\mu\text{m}$ 厚に薄切し、スライドガラスに貼付し、2時間乾燥させた。100 %メタノールに溶解した0.3 %過酸化水素で30分浸漬し、ペルオキシダーゼ活性を阻害した。PBSで洗浄したのち、マウス・モノクローナル抗4-HNE抗体（HNEJ-2, JaICA, 1 : 50）を用いて、 4°C で一晩反応させた。PBSで洗浄後、500倍に希釈したビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体（#BA-2000, VECTOR LABORATORIES, INC.）を室温で2.5時間反応させたのち、ビオチン標識二次抗体キット（Vectastain ABC Kit, VECTOR LABORATORIES, INC.）で反応させ、ジアミノベンジジン-4塩酸塩にて染色した。標本の大脳の頭頂・側頭皮質（海馬のレベル）を光学顕微鏡（ECLIPSEE 600W, Nikon Co.）を用いて撮影した。4-HNE陽性細胞数は重複しない上記皮質を $500\mu\text{m}^2$ の範囲で計測した（ $N = 3$ ）。

5. Fluoro-Jade Bによる神経細胞変性の評価

$25\mu\text{m}$ 厚に薄切し、スライドガラスに貼付し乾燥させた試料を0.1M PBSに浸漬し、30分間、 50°C 以上で乾燥し、1 % NaOHを含む80 %エタノール溶液に浸漬し、続いて70 %エタノール溶液に2分間、精製水に2分間浸漬した。さらに10分間、0.06 %過マンガン酸カリウム溶液に浸漬した後、精製水で2分間洗浄した。変性神経細胞結合性蛍光誘導体染色液（Fluoro-Jade B, Histo-Chem Inc., 0.0004 %）¹⁷⁾ に20分間浸漬した後、精製水による1分間の洗浄を3回繰り返し、 50°C で15分乾燥させた。エタノールとキシレンに浸し、脱水し封入した。蛍光顕微鏡（励起波長：480 nm, 蛍光波長：525 nm）にて大脳の頭頂・側頭皮質（海馬のレベル）の神経細胞を観察した。Fluoro-Jade B陽性細胞数は重複しない上記皮質を $500\mu\text{m}^2$ の範囲で計測した（ $N = 3$ ）。

6. 統計解析

測定値は平均±標準偏差で示した。t-検定にて検定し、P値が0.05未満を統計学的有意とした。

結 果

1. インスリン投与前後の血糖変化

インスリン投与前の血糖値は 112.4 ± 26.1 mg/dLであった。インスリン投与後、徐々に血糖は低下し、インスリン投与60分後以降では20 mg/dL前後で安定化した。グルコース投与後は、速やかに血糖値は上昇し、グルコースを投与開始した30分後以降は230 ~ 270 mg/dL程度を推移した（図2）。インスリン投与後、180分を超えて脳波が平坦化せず実験を中止したものは、平坦脳波2分でグルコースを投与する群（平坦脳波2分群）では30匹中3匹、平坦脳波10分でグルコースを投与する群（平坦脳波10分群）では48匹中4匹であった。

2. 脳波所見と神経学的所見の変化

インスリン投与前に観察される安静時脳波は、振幅10 ~ $50\mu\text{V}$ 、周期4 ~ 8 Hzの波形であった。血糖値は 112.4 ± 26.1 mg/dL、瞳孔に異常はなく、対光反射は迅速であった。高振幅徐波（振幅100 ~ $200\mu\text{V}$ 、周期0.1 ~ 4 Hz）はインスリン投与後 69 ± 29 分に出現し、このとき、血糖値は 21.4 ± 4.9 mg/dL、瞳孔径は拡大し、対光反射は緩慢であった。その後、脳波は徐々に振幅、周波数ともに低下し、平坦脳波がインスリン投与後 92 ± 33 分で出現した。このとき、血糖値は 18.3 ± 7.8 mg/dL、対光反射は消失、瞳孔は散大した。平坦脳波時間の延長により、痙攣や呼吸停止を合併した。平坦脳波を10分間維持したのちグルコース投与を行うと安静時と同様の脳波（回復脳波）が出現した。このとき、血糖値は 245.8 ± 92.7 mg/dL、対光反射は迅速で、瞳孔散大も消失した（図3）。

3. 平坦脳波時間と痙攣、死亡頻度

平坦脳波2分群では、痙攣が21匹中11匹

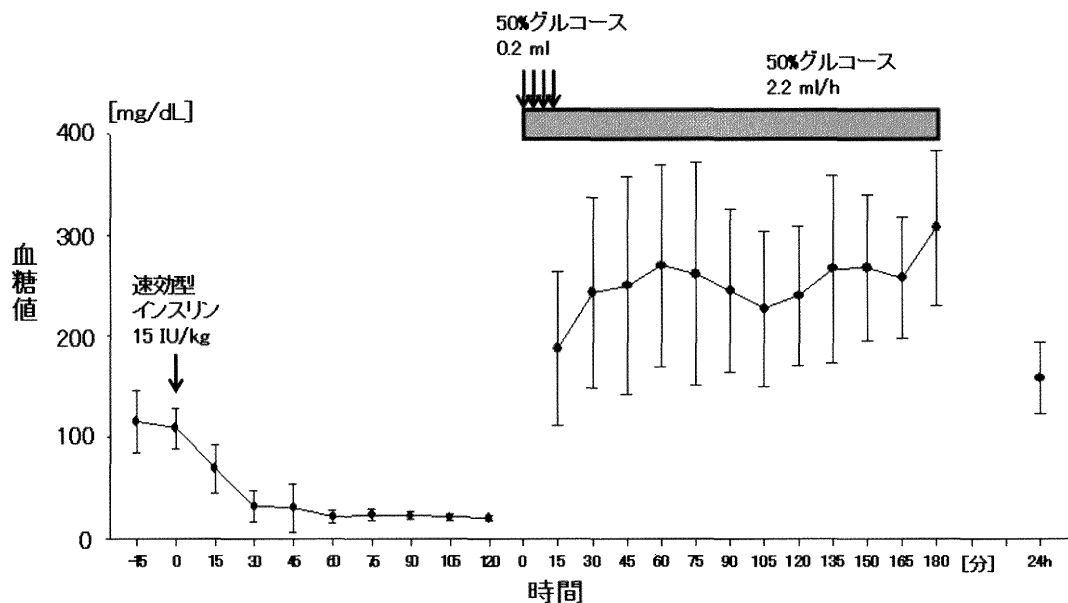


図2 インスリン投与後の血糖変化

横軸は、インスリン投与からの経過時間と、グルコース投与始後の経過時間を示す。

(インスリン投与からグルコース投与開始まで $N = 48$, グルコース投与開始以降は $N = 9$)

	脳波	インスリン 投与後 経過時間 [分]	血糖値 [mg/dL]	神経学的所見		
				対光反射	瞳孔散大	痙攣
安静時脳波 (インスリン投与前)		N/A	112.4 ± 26.1	迅速	—	—
高振幅徐波 (血糖降下時)		69 ± 29	21.4 ± 4.9	緩慢	+ / —	—
平坦脳波 (血糖高度低下時)		92 ± 33	18.3 ± 7.8	消失	+	+ / —
回復脳波 (グルコース投与後)		117 ± 53	245.8 ± 92.7	迅速	—	— / +

図3 脳波所見と神経学的所見の変化

N/A ; 該当せず. ± ; データの記載は平均±標準偏差で表した.

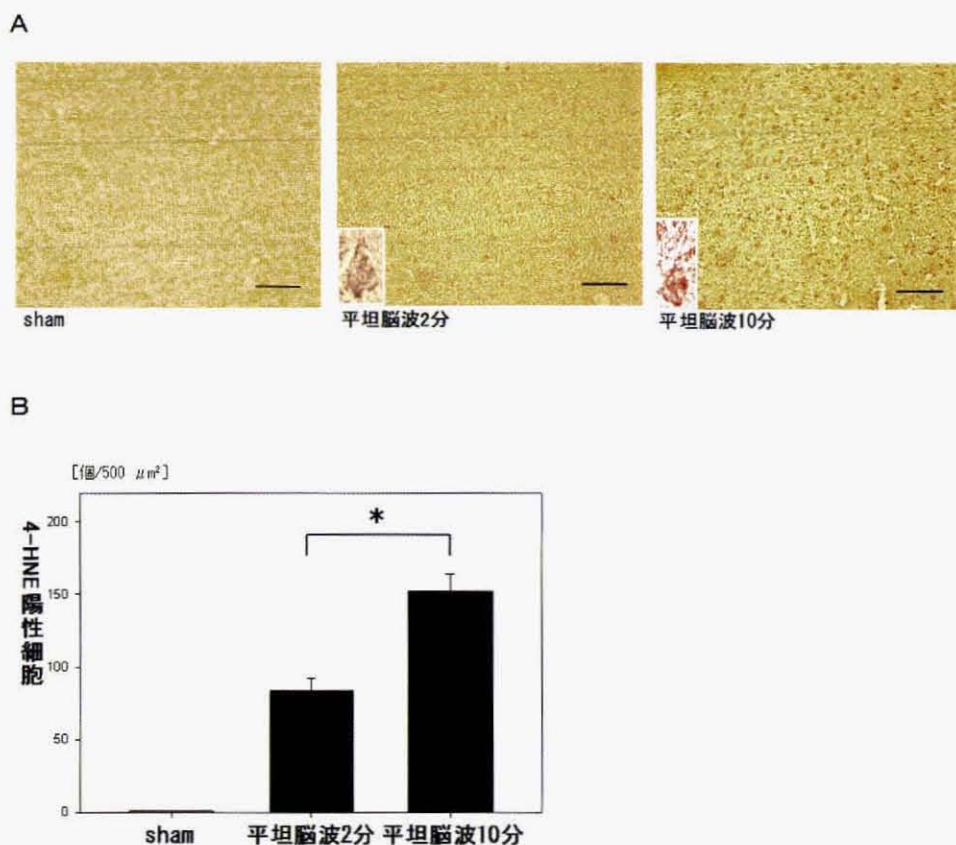


図4 低血糖短時間昏睡モデルにおける4-HNE陽性細胞の評価

(A) sham群, 平坦脳波2分群, 平坦脳波10分群における4-HNE陽性細胞の比較. 枠内は4-HNE陽性細胞の強拡大を示す. Scale bar: 100 μm

(B) 4-HNE陽性細胞数の定量.

エラーバーは標準偏差を示す (N = 3). * P = 0.001.

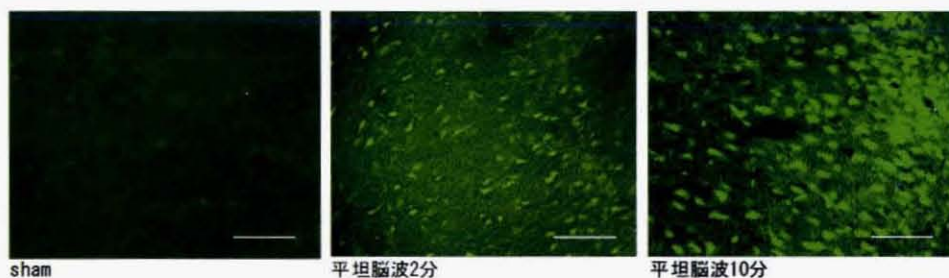
(52.4%)で観察され, 平坦脳波10分群では, 平坦脳波中に全例が痙攣した (26匹中26匹). グルコース投与後24時間における生存率は, 平坦脳波2分群では21匹中10匹 (47.6%), 平坦脳波10分群では26匹中6匹 (23.1%)であった.

4. 低血糖短時間昏睡モデルにおける4-HNE陽性細胞の評価

インスリン投与を行わない sham群, 平坦脳波2分群, 平坦脳波10分群における4-HNE陽性細胞数を比較した (図4). 3群間に体重・食事

量・実験前後の血糖値における有意差はなかった. sham群では4-HNE陽性細胞は認められなかった. 平坦脳波2分群では4-HNE陽性細胞の出現が, 大脳の前頭から頭頂・側頭の皮質で認められた. 海馬における4-HNE陽性細胞の増加は大脳皮質と比較し軽度ながら認められた. 海馬レベルの頭頂・側頭皮質で出現頻度を計測すると 83.7 ± 8.5 個/500 μm^2 であった. 平坦脳波10分群ではさらに出現頻度は増加し (152.3 ± 11.7 個/500 μm^2), 両者の比較では平坦脳波10分群で有意に出現頻度は高かった (P = 0.001).

A



B

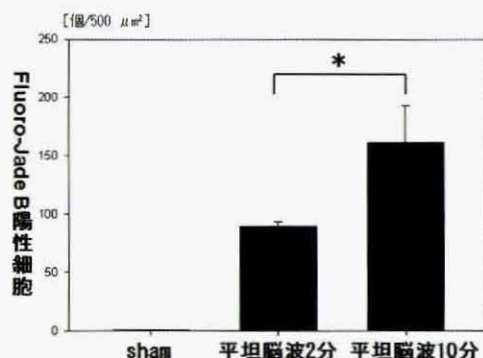


図5 低血糖短時間昏睡モデルにおける Fluoro-Jade B 陽性細胞の評価

(A) sham 群, 平坦脳波 2 分群, 平坦脳波 10 分群における Fluoro-Jade B 陽性細胞の比較. Scale bar: 100 μm

(B) Fluoro-Jade B 陽性細胞数の定量.

エラーバーは標準偏差を示す (N = 3). * P = 0.018.

5. 低血糖短時間昏睡モデルにおける Fluoro-Jade B 陽性細胞の評価

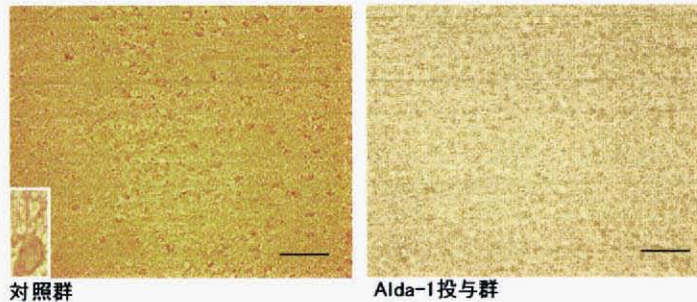
sham 群, 平坦脳波 2 分群, 平坦脳波 10 分群における Fluoro-Jade B 陽性細胞数を比較した (図 5). sham 群では Fluoro-Jade B 陽性細胞は認められなかった. 平坦脳波 2 分群では Fluoro-Jade B 陽性細胞の出現が脳の前頭から頭頂・側頭の皮質で認められた. 海馬レベルの頭頂・側頭皮質で出現頻度を計測すると 90.0 ± 3.6 個/ $500 \mu\text{m}^2$ であった. 平坦脳波 10 分群ではさらに出現頻度が増加し (161.3 ± 31.4 個/ $500 \mu\text{m}^2$), 両者

の比較では平坦脳波 10 分群で有意に出現頻度が高かった (P = 0.018).

6. Alda-1 の 4-HNE 陽性細胞への効果

Alda-1 がグルコース再灌流に伴う 4-HNE 発現に及ぼす効果を検討するため, 平坦脳波 2 分後に Alda-1 を投与した群 (Alda-1 投与群) と溶媒である DMSO を投与した群 (対照群) の 4-HNE 陽性細胞数を比較した. 2 群間に体重・食事量・血糖値における有意差はなかった. 対照群と比較し, Alda-1 投与群の 4-HNE 陽性細胞数は

A



B

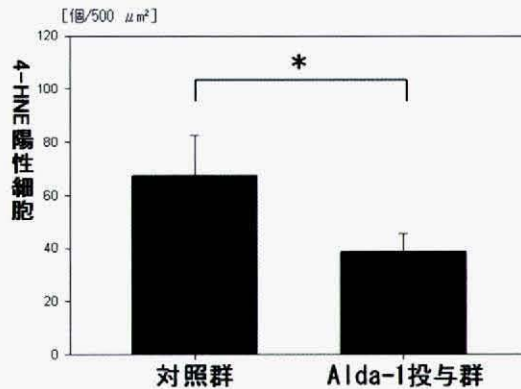


図 6 Alda-1 の 4-HNE 陽性細胞への効果

(A) 対照群と Alda-1 投与群の 4-HNE 陽性細胞の比較. 枠内は 4-HNE 陽性細胞の強拡大を示す. Scale bar: 100 μm

(B) 4-HNE 陽性細胞数の定量.

エラーバーは標準偏差を示す (N = 3). * P = 0.042.

有意に減少した (67.3 ± 15.3 vs 38.7 ± 7.0 個/ $500 \mu\text{m}^2$; P = 0.042) (図 6).

P = 0.007) (図 7).

考 察

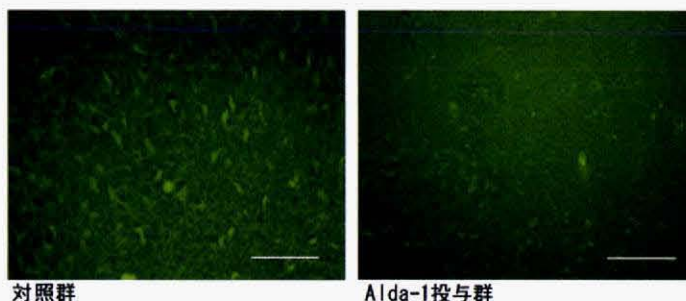
7. Alda-1 の Fluoro-Jade B 陽性細胞への効果

さらに Alda-1 がグルコース再灌流に伴う神経障害に対し保護的に作用するか明らかにするため, Alda-1 投与群と対照群の Fluoro-Jade B 陽性細胞数を比較した. 対照群と比較し, Alda-1 投与群の Fluoro-Jade B 陽性細胞数は有意に減少した (68.0 ± 9.2 vs 36.7 ± 5.0 個/ $500 \mu\text{m}^2$;

1. 低血糖短時間昏睡モデルの特徴と利点

本研究では, 平坦脳波を短時間に維持し, 人工呼吸器を使用しない低血糖短時間昏睡モデルの作成を試みた. 平坦脳波時間を従来の低血糖昏睡モデルで行われる 30 分から 2 分ないし 10 分に短縮した. 平坦脳波 10 分群では痙攣が全例で生じ, 生

A



B

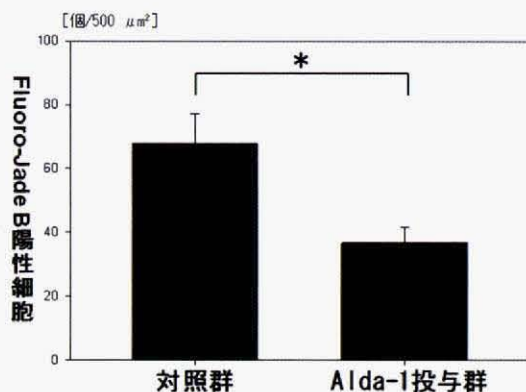


図7 Alda-1のFluoro-Jade B陽性細胞への効果

(A) 対照群とAlda-1投与群のFluoro-Jade B陽性細胞の比較.

Scale bar: 100 μm

(B) Fluoro-Jade B陽性細胞数の定量.

エラーバーは標準偏差を示す (N = 3). * P = 0.007.

存率も23.1%と低かったが、平坦脳波2分群では、生存率が47.6%にまで上昇した。痙攣は平坦脳波～再灌流中に出現したが、脳波の波形には殆どモニターされなかった。ラットの低血糖時の痙攣については、脳波波形に現れない深部（皮質下や脳幹）が原因であろうという報告¹⁸⁾があり、本研究でも同様の理由であったと考えた。

本モデルは、人工呼吸器を使用せず、生理的な低血糖状態を検討でき、今後、低血糖脳症の病態解明や神経保護薬開発に有用なモデルと考えられ

た。しかし、なお生存率は低いことから、今後、平坦脳波時間をさらに短くした場合の生存率や痙攣の頻度、脳における4-HNEの生成や神経細胞変性について検討を進める必要がある。

2. 低血糖脳症での4-HNE生成と神経細胞変性

本研究では、平坦脳波時間が2分間であっても、中枢神経に4-HNE陽性細胞が出現することを明らかにした。Wistarラットを用いた低血糖非昏睡モデルの検討では、ウェスタンブロットを用い

た海馬のみの評価ながら、4-HNE が有意に増加したことが報告されているが⁵⁾、本研究では、免疫組織染色を用いた評価で、大脳皮質においても4-HNE 陽性細胞が著明に増加することを明らかにした。海馬での4-HNE 陽性細胞の増加は比較的軽度であった。さらに本研究では、Fluoro-Jade B 陽性細胞の著明な増加も認めていることから、従来の平坦脳波が30分以上の低血糖昏睡モデルと同様に、十分な酸化ストレスと神経細胞変性が生じているものと考えられた。

また本研究ではAlda-1の投与は低血糖による4-HNEの増加抑制および神経細胞変性を抑制することを示し、Alda-1によるALDH2経路の活性化が低血糖脳症の治療標的分子のひとつとなる可能性を示した。4-HNEは心筋虚血における治療標的と考えられているほか¹²⁾¹³⁾、アルツハイマー病、白内障、動脈硬化、糖尿病、腫瘍などの疾患の病態に関わっていることも知られている¹⁹⁾。糖尿病モデルラットの検討で、酸化ストレスとして4-HNEは種々の細胞に発現するが、とくに神経細胞に強く発現することが知られている²⁰⁾。また4-HNEによる神経障害の機序としては、培養細胞レベルでの検討では、イオン輸送性ATPaseの障害や、グルコースおよびグルタミン酸輸送障害、GTP結合蛋白の障害を介することが知られている²¹⁾²²⁾。今後、低血糖脳症における4-HNEの役割についての検証を進める必要がある。

3. Alda-1による低血糖脳症の神経保護治療の可能性

これまで低血糖脳症に関する検討で、低体温療法²³⁾、ピルビン酸投与²⁴⁾、乳酸投与²⁵⁾²⁶⁾、亜鉛キレート剤投与²⁷⁾、NO合成酵素阻害剤投与²⁸⁾、NADPH oxidase 阻害剤投与⁹⁾が、神経保護効果をもつ可能性が指摘されている。ピルビン酸投与²⁴⁾はグルコース再灌流時のグルタミン酸興奮毒性による神経細胞死の抑制を目的とし、亜鉛キレート剤投与²⁷⁾はグルコース再灌流時の小胞性亜鉛の放出がもたらすDNA損傷による神経細胞死の抑制を目的とする。また乳酸投与²⁵⁾²⁶⁾はグルコー

ス欠乏時の神経細胞の乳酸利用による高次機能保持を目的としている。一方、グルコース再灌流障害に伴う酸化ストレスの緩和を目的としたものが、低体温療法²³⁾、NO合成酵素阻害剤投与²⁸⁾、NADPH oxidase 阻害剤投与⁹⁾である。本研究でも酸化ストレスの緩和を目的とし、とくに細胞傷害性アルデヒドである4-HNEの生成に伴う神経細胞変性を抑制することを目指した。上述の通り、4-HNEにより引き起こされる細胞障害については、心筋虚血において十分な検討が行われており、さらにAlda-1は虚血後に4-HNEによりもたらされる心筋障害を阻害することが報告¹²⁾されている。今回の検討で、われわれは心筋虚血と同様、Alda-1は4-HNEの生成を抑制し、Fluoro-Jade Bで評価した神経細胞変性に有効である可能性を示した。Alda-1はグルコース投与と同時に静脈投与することによって神経保護作用を有する神経保護薬となる可能性がある。

4. 研究の限界

Alda-1の投与濃度は心筋虚血に対する既報¹²⁾¹³⁾に倣ったが、今後、低血糖脳症における至適濃度を決定する必要がある。その上で、痙攣の発現や生存率への影響を確認する必要がある。また今後、Alda-1が静脈投与により血液脳関門を通過すること、Alda-1の投与により脳でのALDH2活性が上昇することを確認し、さらにAlda-1による神経保護作用の分子機序を明らかにする必要がある。

結 論

インスリン投与後、2分間の平坦脳波を確認したのちグルコース投与を行う低血糖短時間昏睡モデルを確立した。同モデルにて、酸化ストレスに伴う4-HNE陽性細胞の出現と神経細胞変性を確認した。さらに同モデルを用いて、ALDH2アゴニストであるAlda-1が、4-HNE生成を抑制し、神経細胞変性に対し保護的に作用することを示した。Alda-1は低血糖脳症に対する神経保護薬の候補となりうる可能性がある。

謝 辞

本研究全般にわたり、ご指導、ご助言をいただきました新潟大学脳研究所 神経内科教授 西澤正豊先生、同准教授 下畑享良先生、同助教 高橋哲哉先生、新潟大学脳研究所統合脳機能センター 中田 力センター長教授、新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター 生体磁気共鳴学分野教授 五十嵐博中先生、同センター 脳機能解析学分野助教 伊藤浩介先生に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Fischer KF, Lees JA and Newman JH: Hypoglycemia in hospitalized patients. Causes and outcomes. *N Engl J Med* 315: 1245 - 1250, 1986.
- 2) Seltzer HS: Drug - induced hypoglycemia. A review of 1418 cases. *Endocrinol Metab Clin North Am* 18: 163 - 183, 1989.
- 3) Auer RN, Olsson Y and Siesjo BK: Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: a quantitative study. *Diabetes* 33: 1090 - 1098, 1984.
- 4) Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J and Swanson RA: Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly (ADP - ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 23: 10681 - 10690, 2003.
- 5) Haces ML, Hernandez - Fonseca K, Medina - Campos ON, Montiel T, Pedraza - Chaverri J and Massieu L: Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Exp Neurol* 211: 85 - 96, 2008.
- 6) Haces ML, Montiel T and Massieu L: Selective vulnerability of brain regions to oxidative stress in a non - coma model of insulin - induced hypoglycemia. *Neuroscience* 165: 28 - 38, 2010.
- 7) Tkacs NC, Pan Y, Raghupathi R, Dunn - Meynell AA and Levin BE: Cortical Fluoro - Jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1645 - 1655, 2005.
- 8) de Courten - Myers GM, Xi G, Hwang JH, Dunn RS, Mills AS, Holland SK, Wagner KR and Myers RE: Hypoglycemic brain injury: potentiation from respiratory depression and injury aggravation from hyperglycemic treatment overshoots. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 82 - 92, 2000.
- 9) Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH and Swanson RA: Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117: 910 - 918, 2007.
- 10) Mattson MP: Roles of the lipid peroxidation product 4 - hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* 44: 625 - 633, 2009.
- 11) Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce - Keller AJ, Hutchins JB and Mattson MP: Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neuronal apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 18: 687 - 697, 1998.
- 12) Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD and Mochly - Rosen D: Activation of aldehyde dehydrogenase - 2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 321: 1493 - 1495, 2008.
- 13) Perez - Miller S, Younus H, Vanam R, Chen CH, Mochly - Rosen D and Hurley TD: Alda - 1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat Struct Mol Biol* 17: 159 - 164, 2010.
- 14) Kilkenney C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M and Altman DG: Animal research: reporting in vivo experiments - the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 991 - 993, 2011.
- 15) Cathy A and Johnson - Delaney LH: Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians Zoological Education Network, 500, 1996.
- 16) Hughes RN and Syme LA: The role of social isolation and sex in determining effects of chlor -

- diazepoxide and methylphenidate on exploratory behaviour. *Psychopharmacologia* 27: 359 - 366, 1972.
- 17) Schmued LC and Hopkins KJ: Fluoro - Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874: 123 - 130, 2000.
- 18) Del Campo M, Abdelmalik PA, Wu CP, Carlen PL and Zhang L: Seizure - like activity in the hypoglycemic rat: lack of correlation with the electroencephalogram of free - moving animals. *Epilepsy Res* 83: 243 - 248, 2009.
- 19) Zarkovic N: 4 - hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* 24: 281 - 291, 2003.
- 20) Arnal E, Miranda M, Barcia J, Bosch - Morell F and Romero FJ: Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin - induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience* 166: 271 - 278, 2010.
- 21) Blanc EM, Kelly JF, Mark RJ, Waeg G and Mattson MP: 4 - Hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, impairs signal transduction associated with muscarinic acetylcholine and metabotropic glutamate receptors: possible action on G α (q/11). *J Neurochem* 69: 570 - 580, 1997.
- 22) Kruman I, Bruce - Keller AJ, Bredesen D, Waeg G and Mattson MP: Evidence that 4 - hydroxynonenal mediates oxidative stress - induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 17: 5089 - 5100, 1997.
- 23) Shin BS, Won SJ, Yoo BH, Kauppinen TM and Suh SW: Prevention of hypoglycemia - induced neuronal death by hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 390 - 402, 2010.
- 24) Suh SW, Aoyama K, Matsumori Y, Liu J and Swanson RA: Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment. *Diabetes* 54: 1452 - 1458, 2005.
- 25) Maran A, Cranston I, Lomas J, Macdonald I and Amiel SA: Protection by lactate of cerebral function during hypoglycaemia. *Lancet* 343: 16 - 20, 1994.
- 26) Maran A, Crepaldi C, Trupiani S, Lucca T, Jori E, Macdonald IA, Tiengo A, Avogaro A and Del Prato S: Brain function rescue effect of lactate following hypoglycaemia is not an adaptation process in both normal and type I diabetic subjects. *Diabetologia* 43: 733 - 741, 2000.
- 27) Suh SW, Garnier P, Aoyama K, Chen Y and Swanson RA: Zinc release contributes to hypoglycemia - induced neuronal death. *Neurobiol Dis* 16: 538 - 545, 2004.
- 28) Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Sheline CT, Chan PH and Swanson RA: Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1697 - 1706, 2008.

(平成 24 年 1 月 16 日受付)