

学内グラント 報告書

平成21-22年度 学内グラント終了時報告書

2型糖尿病における脳内酸化ストレスの動態と
その制御による認知機能障害への効果

研究代表者 菅 理江(医学部 生理学)

研究分担者 島津 智一¹⁾, 井上 郁夫²⁾

緒 言

糖尿病とその合併症は認知機能障害の危険因子として注目されている^{1,2)}。糖尿病患者は同年齢健常者と比較して、高次認知機能の低下が指摘され、認知症を引き起こしやすい³⁾。1型2型とも糖尿病は認知機能障害を引き起こすが、2型ではその障害が特に学習・記憶に影響する^{2,4)}。動物病態モデルを用いた研究では糖尿病由来の学習障害が、高血糖やその結果引き起こされる酸化ストレスによる動脈硬化や代謝異常と関連することが示唆されている^{5,6)}。糖尿病による組織損傷には酸化ストレスが大きな役割を果たし⁵⁾、脳組織の酸化ストレスによる損傷は認知機能障害をもたらす⁷⁾。しかし、2型糖尿病が学習障害をもたらすメカニズムは未だ明らかではない。

我々はこれまで2型糖尿病モデルラット Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)を用いて、視覚弁別課題・迷路課題における学習障害と、それに伴う脳内抗酸化酵素の増加を示し、脳内酸化ストレスの学習障害への寄与を示してきた^{8,9)}。同時に、認知機能障害の抑制効果が報告されているペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ アゴニスト¹⁰⁾の一つであるピオグリタゾンの学習障害への効果を検討したが、糖尿病症状が顕著化する25-30週齢においては、投薬による血糖値のコントロールや抗酸化酵素の抑制は可能であるが、学習課題成績の改善は見られなかった⁹⁾。このことは高血糖の持続による血管障害だけがこの学習障害の要因ではないことをしめしており、高血糖をもたらすメカニズムそのものが機能不全を引き起こすとするれば、認知機能障害の要因は糖尿病発症の初期に見いだせると考えられる。

そこで本研究では、OLETFの発症期である20-25週

齢よりも前の時期に着目し、10, 15, 20週齢の学習能力と脳内抗酸化酵素の変化を検討した。認知症をはじめとした認知機能障害の鍵となる脳部位である海馬に焦点をあて、海馬依存型学習課題の一つである放射型迷路課題を用いて、2型糖尿病初期の学習障害の週齢による変化を示した。

材料と方法

本研究は埼玉医科大学動物実験委員会によって承認され(21M09-201, 22M15-373)、埼玉医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

被験体：OLETFおよびその対照動物 Long Evans Tokushima (LETO) ラット(オス)各36個体を被験体とした。被験体は大塚製薬徳島研究所より4週齢にて提供され、埼玉医科大学中央研究施設実験動物部門にて飼育された。OLETFおよびLETOは4週齢時の体重を元に各群の体重の平均値に差がないようにそれぞれ10, 15, 20週齢群の3群に分けられた。飼育室は23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cに維持され、照明は12:12 hの明暗サイクルに固定し、行動実験・脳・血液サンプルの採取はすべて明期に行われた。被験体は各週齢より個別ケージで飼育され、体重を測定した後に学習実験のためこの時の測定体重の85%になるように餌量を制限した。餌制限の1日目は空腹時血糖を測定するために12時間以上の断食とし、翌朝10時より簡易測定器によって尾静脈血の血糖値を測定した。飲水の摂取制限は行わなかった。

迷路課題：被験体は餌制限開始日から5日間放射状迷路と実験用餌ペレット(45 mg, Bio Serve)への馴化訓練を行った。迷路学習課題としては海馬依存型でありEpisodic型記憶のテストになると考えられているWin-Shift型課題を用いた^{11,12)}。実験は訓練とテストの2フェーズからなり、訓練では8つのアームのうち4アームのみが選択可能になっており、4つのアーム全

1) 医学部 神経内科, 埼玉精神神経センター 神経内科

2) 医学部 内分泌・糖尿病内科

ての餌を採ることでフェーズが終了する。残りの4つのアームはギロチン式ドアが降ろしてあり、被験体はアームに入ることができない。テストフェーズでは全てのアームに入ることができるが、そのうち訓練時にあった場所以外の4つのアームのみに餌がある。つまり訓練時に餌があった場所には餌は無く、そのアームに入るとはエラーと判定される。また一度入ったアームに再び進入した場合もエラーとなる。テストフェーズにおける総エラー数、完了までの総アーム進入数、総走行距離と速度が測定された。

抗酸化酵素の測定：行動実験終了後、被験体はペントバルビタール (150 mg/kg) 麻酔後、血液サンプルを採取し、リン酸緩衝食塩水 (0.1 M pH 7.4) で灌流後、脳サンプルを摘出した。脳組織は皮質、海馬、線条体から採取され、細胞質からタンパクを抽出した (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Pierce)。各 20 μ g のタンパクを 12% アクリルアミドゲルにて泳動し、ブロッティングした。Glutathione peroxidase (GPx), Cu^{2+} - Zn^{2+} superoxide dismutase (CuZn-SOD) manganese SOD (Mn-SOD) の3つの抗酸化酵素に対する抗体を用い、HRP 標識抗体および化学発光法によって検出・測定した。ハウスキーピングタンパクとして GAPDH の測定も行い、各酵素の GAPDH に対する相対的光学濃度を用いて比較を行った。

結果

体重と血糖値の変化

10 週齢の時点から OLETF は LETO に比較して有意に体重が重く、20 週齢の時点では平均で LETO 439 g に対し OLETF 585 g と大きく差が開いていた ($P < 0.001$, Figure 1A)。空腹時血糖については 10, 15 週齢では有意な差は見られず、20 週齢でのみ OLETF の血糖値が LETO に対して有意に高かった ($P = 0.023$, Figure 1B)。このように OLETF では 2 型糖尿病の一つの特徴である肥満は早くから発現しているが、血糖値がはつきりと高くなるのは 20 週齢からであると言える。

学習課題

課題完了までの総エラー数を指標にとると、10 週齢においては LETO, OLETF の間に差はみられなかった。しかし、15 週齢、20 週齢においては OLETF のエラー数は有意に多く、顕著な学習障害がみられた。

抗酸化酵素の変化

簡易的な解析のみではあるが、10 週齢の OLETF の海馬で GPx の増加が見られた ($P = 0.026$)。他の週齢および脳部位の変化については現在解析をすすめているところである。

考察

2 型糖尿病ラット OLETF において、迷路学習課題の学習障害が 15 週齢以降に顕著化することが明らか

になった。10 週齢においては LETO との差が見られなかったことから、10-15 週齢の間に何らかの学習障害につながる脳機能不全が生じていると考えられる。今回用いた Win-Shift 型迷路課題は海馬依存型の学習であるということが知られており、特に海馬の不全が予想されるが、結論は学習実験の他のパラメータの詳細な検討と今回の実験と並行して採取した海馬歯状回の神経細胞新生の検討のための脳サンプルの解析 (現在解析中) によって明らかになるであろう。また簡易的な解析ではあるが 10 週齢の海馬で見られた抗酸化酵素の上昇は海馬における早期の変性を予期させるが、

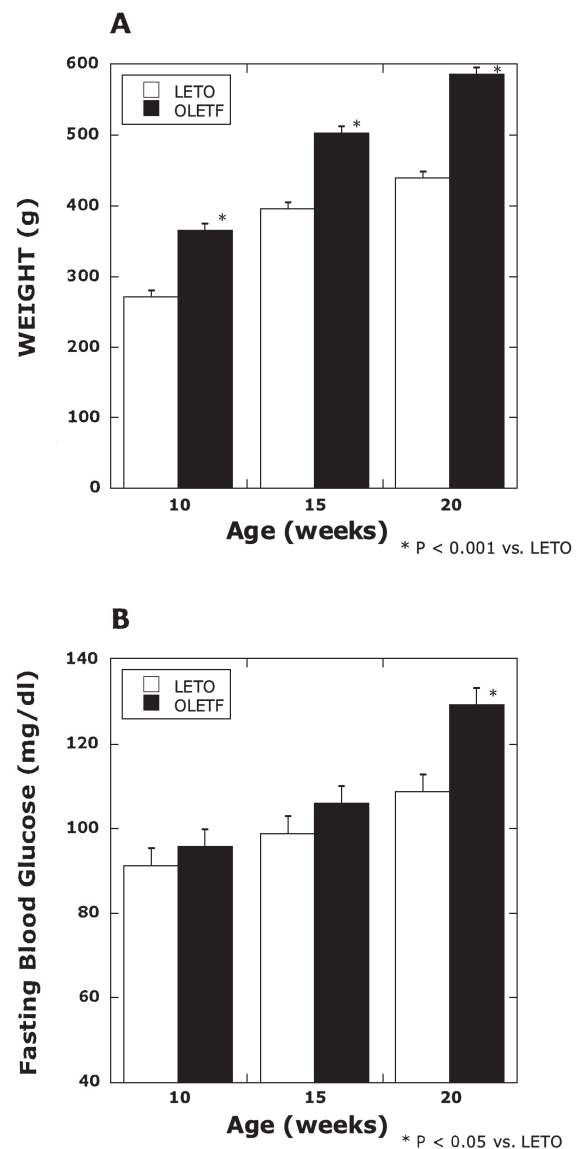


Figure 1. 週齢による体重と血糖値の変化。A) LETO (□) および OLETF (■) の週齢による体重の増加を示す。10 週齢より OLETF の体重は LETO より重く、それは実験期間を通して変わらなかった。* $P < 0.001$ (LETO との比較) B) LETO (□) および OLETF (■) の週齢による空腹時血糖の変化を示す。全般に OLETF は LETO と比較して高い血糖値を示すが、20 週齢で初めて有意な差異を示した。* $P < 0.05$ (LETO との比較)。

それが糖尿病症状とそれに関連した学習障害と本当に関連しているのかという点で、個体ごとの学習結果や生理指標との関連性を注意深く検討する必要がある。血糖値と体重の比較から、15週齢ではOLETFの体重増加は明らかではあるが、明確な血糖値の上昇は見られていない。このことからこの学習障害は、血糖値の上昇そのものによる脳の変性に由来するものではないと言える。今後まだ解析の終わっていない抗酸化酵素の変化や脂質酸化のマーカー、およびインスリンをはじめとした血液サンプルの解析が、10-15週齢に起こる脳変性の手がかりになると考えている。

文 献

- 1) Ryan CM, Geckle MO, Orchard TJ. Cognitive efficiency declines over time in adults with Type 1 diabetes: effects of micro- and macrovascular complications. *Diabetologia* 2003;46:940-8.
- 2) Stewart R, Liolitsa D. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet Med* 1999;16:93-112.
- 3) Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5:64-74.
- 4) Awad N, Gagnon M, Messier C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol* 2004;26:1044-80.
- 5) Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, et al. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol* 2005;187:37-44.
- 6) Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;537:106-10.
- 7) Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:168-75.
- 8) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫他. 糖尿病モデルラットにおける認知機能障害と酸化ストレス, 第68回日本動物心理学会大会, 平成20年9月, 水戸
- 9) Suge R, Shimazu T, Hasegawa H, Inoue I, Hayashibe H, Watanabe S-I, et al. Effect of oxidative stress on learning in the early stages of type II diabetes in OLETF rats. *FENS Forum* 2008, 2008, Jul, Geneva, Switzerland
- 10) Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, et al. Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2005;13:950-8.
- 11) Packard MG, McGaugh JL. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 1996;65:65-72.
- 12) Sakamoto T, Okaichi H. Use of win-stay and win-shift strategies in place and cue tasks by medial caudate putamen (MCPu) lesioned rats. *Neurobiol Learn Mem* 2001;76:192-208.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫, 島津邦男, 片山茂裕, 野村正彦. 2型糖尿病ラットにおける学習障害に伴う脳内抗酸化酵素の増加, 第69回日本動物心理学会大会, 平成21年9月, 岐阜
- 2) Suge R, Shimazu T, Hasegawa H, Inoue I, Watanabe S-I, Araki N, Shimazu K, Katayama S, Nomura M. Cerebral anti-oxidant enzymes increased with learning deficit in the OLETF, European Brain and Behaviour Society 40th Annual Meeting, 2009, Sept, Rhodes, Greece
- 3) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫, 島津邦男, 片山茂裕, 野村正彦. 2型糖尿病ラットの学習障害に伴う脳内抗酸化酵素の部位特異的増加, 第87回日本生理学会大会, 平成22年5月, 盛岡
- 4) Suge R, Shimazu T, Hasegawa H, Inoue I, Watanabe S-I, Araki N, Shimazu K, Katayama S, Nomura M. Glutathione peroxidase increase in hippocampus and cortex but not striatum with discrimination learning deficit in type 2 diabetes model rats, *FENS Forum* 2010, 2010, Jul, Amsterdam, The Netherlands
- 5) 菅理江, 島津智一, 長谷川元, 井上郁夫, 渡辺修一, 荒木信夫, 島津邦男, 片山茂裕, 野村正彦. 2型糖尿病ラットにおける発症初期の学習障害, 日本動物心理学会第70回大会, 平成22年8月, 東京