

Morinda citrifolia による脳虚血性神経障害抑制作用における血糖値制御の関与

原田慎一,^a 藤田(濱邊)和歌子,^a 神谷浩平,^b 佐武紀子,^b 徳山尚吾^{*,a}

Involvement of Glycemic Control in the Inhibiting Effect of *Morinda citrifolia* on Cerebral Ischemia-induced Neuronal Damage

Shinichi HARADA,^a Wakako FUJITA-HAMABE,^a Kohei KAMIYA,^b
Toshiko SATAKE,^b and Shogo TOKUYAMA^{*,a}

^aDepartment of Clinical Pharmacy, and ^bDepartment of Pharmacognosy and Natural Product Chemistry,
School of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, 1-1-3 Minatojima,
Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan

(Received November 17, 2009)

Fruit juice of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae, Noni juice) is a well-known healthy drink and has various pharmacological properties including antioxidant and anti-inflammatory effects. We have hitherto found the protective effect of Noni juice on neuronal damage caused by ischemic stress in mice. In addition, we have also recently reported that suppression of post-ischemic glucose intolerance might be important for good prognosis. Here, we focused on the effect of Noni juice on the development of the post-ischemic glucose intolerance as a cerebral protective mechanism. Noni juice was obtained from the mature fruit grown in Okinawa (ONJ). Male ddY mice were given 10% ONJ in drinking water for 7 d. Then, mice were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO). We found that 10% ONJ treatment suppressed the development of neuronal damage after MCAO. Interestingly, glucose intolerance observed on 1 d after MCAO completely disappeared by 10% ONJ. Furthermore, 10% ONJ treatment significantly increased serum insulin levels much further than the control group on 1 d, while serum adiponectin levels were not affected at all. These results suggest that ONJ could facilitate insulin secretion and may attenuate the development of glucose intolerance under ischemic stress. These functions may contribute to the neuronal protective effect of ONJ against ischemic stress.

Key words—cerebral ischemia; *Morinda citrifolia*; glucose intolerance; insulin sensitivity

1. はじめに

脳卒中を始めとする脳血管疾患は、悪性腫瘍・心疾患とともに主要な死亡要因の一つである。脳卒中患者の大半は知能又は身体機能の障害（麻痺や記憶障害など）を後遺症として残すこと、さらに、要介護状態、いわゆる寝たきりになる最大の原因でもあり、いったん発症すると本人のみならずその周囲にとっても多大な負担を及ぼす。要介護者の増加は、医療の問題としてだけでなく、福祉を含めた社会問題となっており、脳卒中に対する治療法の開発は現在においてもなお、重要な課題とされている。脳卒中に対する治療薬に関して、動物実験レベルでの

基礎報告は多いものの、残念ながら臨床試験においては望ましい治療成績を出すことが難しく、現在までに臨床使用の認可にまで辿り着いた薬剤はエダラボンや血栓溶解薬である tissue plasminogen activator: t-PA 製剤の適用拡大を除き、1つもない。¹⁻⁵⁾ このように、臨床応用可能な脳卒中に対する治療薬の開発は、困難な状況である。

近年わが国は、超高齢化社会に伴った国民医療費の高騰を抑制するという観点に加え、国民自体の健康意識の高まりから“セルフメディケーション”が強く推進されており、各種疾病に対する“予防戦略の開発”が重要な課題とされている。日常的な健康管理に対する意識が高まっている中で現在注目されているのが健康食品やサプリメントである。健康食品は医薬品と異なり、安価で手に入れ易いなどというメリットがあり、消費者には受け入れ易い商品であるが、その反面、有効性に関するエビデンスが乏

^a神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室, ^b同生薬・天然物化学研究室 (〒650-8586 神戸市中央区港島 1-1-3)

*e-mail: stoku@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム GS5 で発表したものを中心に記述したものである。

しいものも多く、誤った使用による健康被害の発生が問題となっている。⁶⁾ エビデンスに基づいた安全な利用を促進していくためにも、その有効性の科学的根拠を示す重要性は高い。こうした観点からわれわれは、脳卒中予防作用を有する健康食品成分を探索し、その有効性を科学的に証明することを目的として、動物モデルを用いた薬理的解析を行ってきた。特に今回われわれは、健康飲料として現在広く使用されている *Morinda citrifolia* (*M. citrifolia*; Noni) に着目した。

Noni は、アカネ科の植物で、ポリネシア地方、ハワイ、タヒチ、東南アジア、オーストラリアなど熱帯から亜熱帯の広い地域に自生し、5-8 m 程になる常緑の灌木である。⁷⁾ その果実には、各種ビタミンやミネラルなど非常に多くの栄養素を含んでおり、糖尿病、高血圧又はがんなど多くの疾患の治療を目的として伝統的に民間薬として使用されている薬用植物である。⁷⁻⁹⁾ また Noni ジュースには、抗酸化作用や抗炎症作用を有することが明らかにされ、健康食品としての有用性、並びに疾病予防への応用が期待されている。⁷⁻⁹⁾ 興味深いことに、われわれのこれまでの研究により、Noni ジュースの一週間事前摂取は、一過性脳虚血ストレスにおける神経障害発現を有意に抑制することが明らかとなった。¹⁰⁾ しかしながら、その詳しい抑制メカニズムはいまだ解明されていない。

脳虚血性神経障害の発現に関与する因子は数多く報告されているが、「血糖値管理」は予後の改善のために临床上も有用とされている。¹¹⁻¹³⁾ すなわち、高血糖状態の動物に虚血ストレスを負荷することにより血管性の炎症、血液脳関門の透過性の促進、細胞膜の障害並びに組織のアシドーシスが促進され、脳虚血による神経障害が悪化するという知見が得られている。¹⁴⁻¹⁶⁾ その一方で、糖尿病の既往歴のない患者でも脳卒中後に新規に糖尿病を発症する可能性があること、並びにインスリン抵抗性による耐糖能異常を示す可能性があるとの臨床報告もある。¹¹⁾ さらに脳卒中後の血糖値上昇に対し、発作後 48 時間の血糖値を正常値で維持することで致死率などの予後改善に寄与することが報告されている。¹³⁾

本総説では、われわれが最近明らかにした一過性脳虚血ストレス負荷による耐糖能異常の発現と神経障害との関係についての話を含めながら、Noni ジュースによる脳保護作用について、血糖値制御という観点からまとめたい。

2. 脳虚血ストレスによる神経障害と Noni ジュースによるその抑制

2. 脳虚血ストレスによる神経障害と Noni ジュースによるその抑制

はじめにわれわれは、一過性脳虚血による神経障害発現への Noni ジュースの影響について検討した。一過性脳虚血モデルは、ddY 系雄性マウスに 2 時間の中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) を施すことにより作製した。虚血側の大脳半球において MCAO 3 日後をピークとし、5 日後まで持続する梗塞巣形成が認められた。¹⁷⁾ また、行動障害の指標となる neurological deficit score (NDS) の上昇並びに step-through 法による学習・記憶障害も 5 日後まで悪化し続けることが明らかとなった。¹⁷⁾ 既にわれわれが報告しているように、5 週齢の ddY 系雄性マウスに 3% 又は 10% 沖縄産 Noni ジュース (3% 又は 10% ONJ) を MCAO 前に一週間自由摂取させることで、MCAO 3 日後における梗塞巣形成は用量依存的に抑制され、10% ONJ 摂取群では行動障害も有意に抑制されることが明らかであった [Figs. 1 (A)-(C)].¹⁰⁾ さらに、10% ONJ を 3 日間のみ事前摂取させることでも、梗塞巣形成が有意に抑制されることを確認している (図には示していない)。なお、本実験において、10% ONJ 摂取による飲水量、摂餌量並びに体重への影響は認められないことを確認している [Figs. 1 (D)-(F)].¹⁰⁾ Noni ジュースの事前摂取による脳虚血性神経障害発現の抑制機序についてはいまだ不明な点が多いが、イリドイド骨格あるいはアントラキノン骨格を有する Noni ジュースの成分に抗酸化作用が示されることから、^{8,9)} Noni ジュースの摂取により、MCAO 後の酸化ストレスカスケードが抑制された可能性が考えられる。¹⁸⁻²⁴⁾ さらに、事前摂取により抗酸化因子が増加した可能性が示唆されるが、われわれのこれまでの知見では、少なくとも大脳皮質における Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) のタンパク



原田慎一

2006 年神戸学院大学薬学部卒業。2008 年同大学院薬学研究科修士課程修了。現在、同大学院食品薬品総合科学研究科博士後期課程 2 年在学中。2010 年 4 月より日本学術振興会特別研究員 (DC2)。研究テーマ：脳卒中における臓器間連関の変容の解明と新規治療戦略開発のための基盤研究。

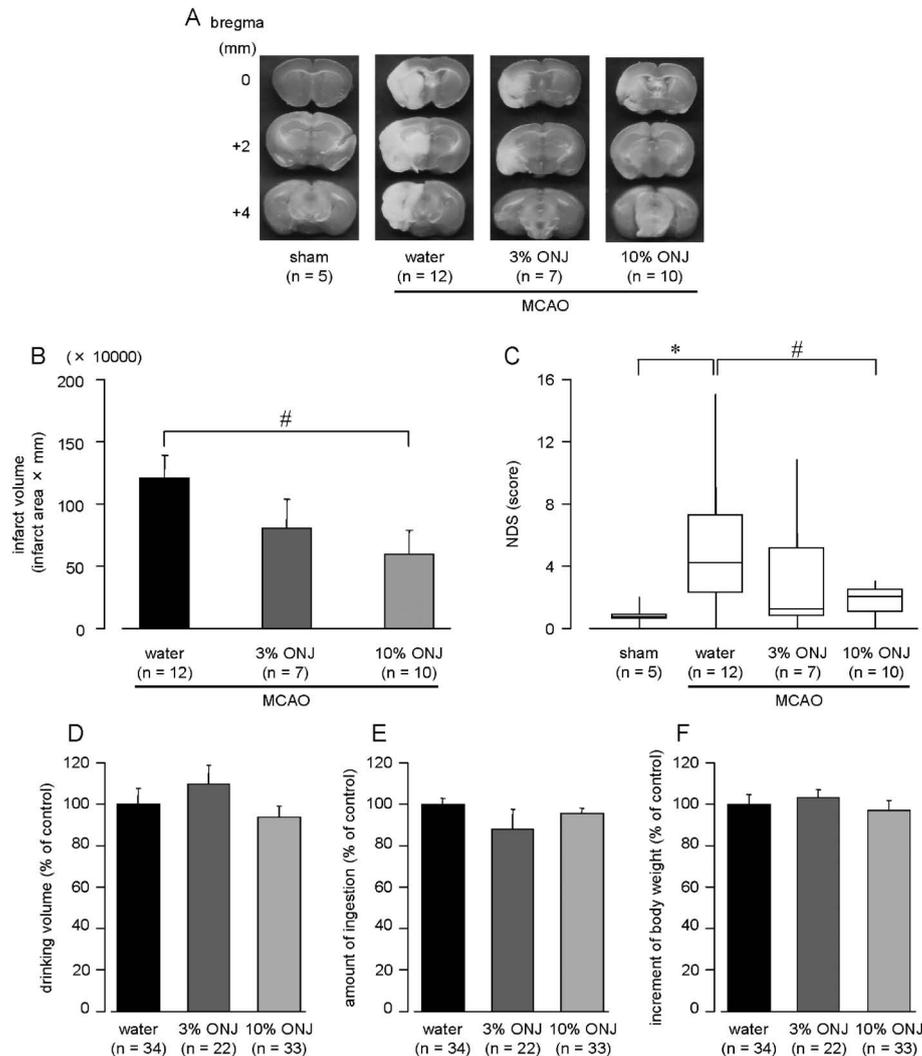


Fig. 1. Effect of ONJ on Infarct Volume, Behavioral Abnormality and Dietary Factors after MCAO

A: Representative photographs of infarction at 0, +2, +4 mm from the bregma in a coronal section stained with TTC on the 3 d after MCAO. B: Quantitative analysis of infarct volume. Results are expressed as mean ± S.E.M. * $p < 0.05$ vs. water-treated MCAO group, one-way ANOVA and Scheffe test. C: The result of the NDS on the 3 d after MCAO. Results are expressed as median (25% to 75%). * $p < 0.05$ vs. sham group, # $p < 0.05$ vs. water-treated MCAO group, Steel-Dwss test of post-hoc nonparametric multiple comparison tests. D: Drinking volume. E: Amount of ingestion. F: Increment of body weight.¹⁰⁾

質発現にはなんら変化が認められなかった。¹⁰⁾ 今後は活性成分の同定も望まれる。その他、Noni ジュースの摂取により、神経細胞における brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や nerve growth factor (NGF) などといった生存因子の発現を上昇させていた可能性、²⁵⁾ あるいは、細胞死に係わる分子 (caspase-3, cytochrome c など) の発現抑制など、今後の機序解明が望まれる。

3. 脳虚血ストレスによる耐糖能異常発現と Noni ジュースによるその抑制

糖尿病病態などの高血糖状態が脳虚血ストレスに対する脆弱性を高めることはよく知られているが、脳虚血ストレス負荷による血糖値上昇、すなわち耐

糖能異常の発現と、それが虚血性神経障害発現に及ぼす影響については、一部の臨床報告以外にあまり報告されていない。そこでわれわれは、脳虚血ストレス負荷後の血糖値変化に着目し検討を行った。Fig. 2(A) に示すように、空腹時血糖値は、MCAO 12 時間並びに 1 日後に sham 群に比較して MCAO 群で有意に上昇していた。¹⁷⁾ 同時に、MCAO 1 日後に有意な耐糖能異常が発現することを経口糖負荷試験 (OGTT) により明らかにした。¹⁷⁾

Noni ジュースには既に、インスリン様作用、又はインスリンの作用増強効果が報告されていることから、^{26,27)} われわれは脳虚血性耐糖能異常に対する Noni ジュースの作用を検討した。興味深いことに、

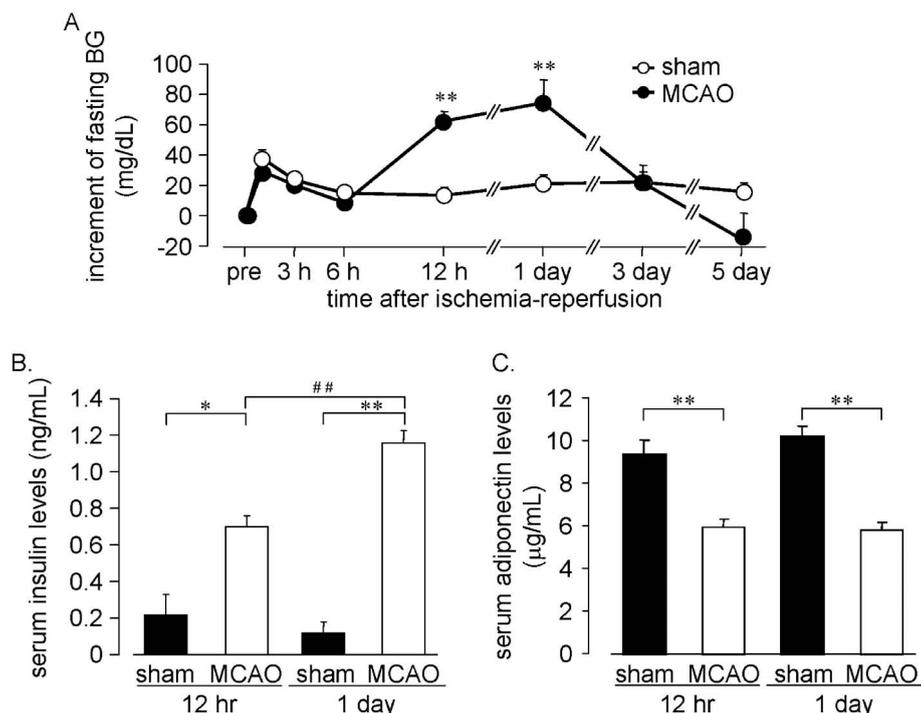


Fig. 2. Transient Increment of Fasting Blood Glucose, Serum Insulin Levels and Serum Adiponectin Levels in Early Phase of Cerebral Ischemic Stress

A: Increment of fasting blood glucose. Results are expressed as means \pm S.E.M. $**p < 0.01$ vs. sham, unpaired Student's *t*-test. B: Serum insulin, C: Serum adiponectin, Results are expressed as means \pm S.E.M. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs. sham, $\#p < 0.01$ vs. 12 h, one-way ANOVA and Scheffe test.¹⁷⁾

Table 1. Effect of ONJ on the Fasting Blood Glucose Levels (FBG), OGTT, Serum Insulin Levels and Serum Adiponectin Levels on 1 d after MCAO

group	sham	MCAO	
	water	water	10% ONJ
FBG (%)	100 \pm 67.7	956.3 \pm 188.2**	407.1 \pm 63.8##
OGTT (%)	100 \pm 17.5	240.4 \pm 45.0*	106.7 \pm 15.3##
insulin (%)	100 \pm 66.0	809.6 \pm 135.9**	1530.1 \pm 163.7##
adiponectin (%)	100 \pm 6.7	43.7 \pm 3.3**	53.5 \pm 3.3

Results are presented as the mean (% of water-treated sham group) with \pm S.E.M. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ vs. water-treated sham group, $\#p < 0.01$ vs. water-treated MCAO group, one-way ANOVA and Scheffe test. $n = 6-14$.

MCAO 1 日後における空腹時血糖値上昇は、10% ONJ により有意に抑制され、糖負荷後血糖値上昇 (OGTT) の発現も抑制された (Table 1). このことは、10% ONJ の一週間自由摂取により脳虚血ストレス負荷後の耐糖能異常発現が抑制されることを示唆している。以前のわれわれの検討により、インスリンを用いて、脳虚血ストレス負荷後の血糖値を正常レベルに維持したところ、MCAO 3 日後の梗塞巣形成、行動障害並びに学習記憶障害が抑制され

たことから、¹⁷⁾ 脳虚血後早期の耐糖能異常が虚血性神経障害発現の悪化に寄与することが示唆されている。本研究で認められた Noni ジュースによる虚血性神経障害抑制作用もまた、脳虚血後早期における耐糖能異常発現の抑制による可能性が示唆される。

4. 脳虚血ストレス負荷後の血中インスリン量変化に及ぼす Noni ジュースの影響

脳虚血性耐糖能異常発現の機序解明を目的として、血糖値制御因子の一つである血中インスリン量を ELISA 法を用いて測定したところ、MCAO 12 時間並びに 1 日後において sham 群に比較して MCAO 群で有意な上昇を示した [Fig. 2(B)].¹⁷⁾ 興味深いことに、血中インスリン量は 10% ONJ により更なる上昇が示された (Table 1). すなわち、膵 β 細胞からのインスリン分泌量が増加し、このことが 10% ONJ による脳虚血ストレス誘導性耐糖能異常発現の抑制に寄与した可能性が考えられる。^{28,29)} 興味深いことに、インスリン量に関して、脳虚血ストレスを負荷していない正常マウスにおいては、Noni ジュースとコントロール群とで変化がみられなかった (図には示していない).

5. 脳虚血ストレス負荷後のインスリン感受性低下に及ぼす Noni ジュースの影響

脳虚血ストレス負荷により、血糖値が上昇しているにもかかわらず、血中のインスリン量が増加していたことから、インスリン抵抗性が発現している可能性が考えられた。そこでわれわれは、MCAO 1 日後において insulin tolerance test を行い、脳虚血ストレスがインスリン感受性へ及ぼす影響を検討した。インスリンによる血糖値低下作用は sham 群に比較して有意に減少し、¹⁷⁾ 脳虚血ストレス負荷による、インスリン感受性の低下が明らかであった。よく知られるように、アディポカインの 1 つであるアディポネクチンは、インスリン感受性改善因子である。³⁰⁾ さらにアディポネクチンは、ストレス応答性の p38 や c-Jun N-terminal kinase などの活性化により脂肪細胞からの分泌が低下する性質を持っている。³¹⁾ そこでわれわれは、脳虚血ストレス負荷後の血中アディポネクチン量を測定した。Fig. 2 (C) に示すように、MCAO 12 時間並びに 1 日後における血中アディポネクチン量は、sham 群に比較して有意に減少していた [Fig. 2 (C)].¹⁷⁾ すなわち、虚血性耐糖能異常発現機序には、アディポネクチンの低下を介したインスリン感受性の低下が関与している可能性が示唆された。一方、Noni ジュースは、血中アディポネクチン量にはなんら影響を示さなかった (Table 1)。

以上の結果より、Noni ジュースによる脳保護作用には、脳虚血後のアディポネクチン量低下によるインスリン抵抗性の改善ではなく、少なくとも一部に脳虚血後のインスリン分泌促進を介した血糖上昇抑制作用が関与している可能性が示唆された。しかしながら、アディポネクチン受容体の下流に存在する AMP-activated protein kinase (AMPK) や peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ などインスリン感受性に関与する因子を直接活性化させることにより脳虚血性耐糖能異常を改善していた可能性も残されており、³⁰⁾ 今後の検討課題である。

6. まとめ

本研究結果から、Noni ジュースにより、虚血性神経障害の発現が抑制されるとともに、耐糖能異常の発現も抑制されることが明らかとなった。また、Noni ジュースによる虚血性耐糖能異常発現の抑制機序には、インスリン感受性の亢進というよりはむ

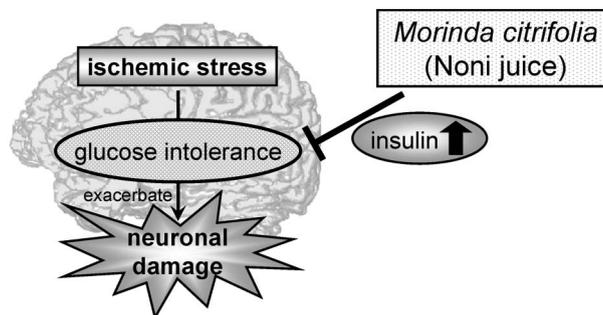


Fig. 3. Effect of Noni Juice on Post-ischemic Glucose Intolerance as Neuroprotective Mechanism

It is possible that Noni juice facilitates the insulin secretion and attenuates the development of glucose intolerance under ischemic stress.

しろ、インスリン分泌能の上昇が関与している可能性が示唆された (Fig. 3)。Noni ジュースの摂取により、膵臓の内分泌作用を制御する神経伝達経路が賦活化した可能性や、膵 β 細胞のグルコース感受性が亢進した可能性が考えられる。特にインスリン量に関して、脳虚血ストレスを負荷していない正常マウスにおいては、全く作用せず、脳虚血ストレスを負荷することにより初めて分泌量を増大させたことは、安全性の面でも臨床価値が高い。また、虚血性神経障害の抑制機序においてはこれまでに、血糖値制御を標的とした機序についての報告はなく、非常にユニークな知見である。脳卒中の予後改善のために、発作後の血糖値管理の有用性は臨床でも重要視されている。今後、活性本体の同定も含め、Noni ジュースによる血糖値制御機構の詳細な解明が望まれる。さらに詳細な神経障害保護作用機序を分子レベルで検討していくためには、*in vivo* だけではなく、*in vitro* の実験系を用いた検討も必要であろう。

7. おわりに

近年、セルフメディケーションが重視され、数多くの健康食品・サプリメント関連製品が市場に出回っている。健康食品には、特定保健用食品のように厚生労働省に保障されたものばかりではない。動物とヒトとの差はあるものの、科学的エビデンスを構築するための第一段階として本研究のような基礎実験の遂行は必要不可欠と考えられる。本研究により、健康飲料である Noni ジュースに脳卒中予防作用が期待されたことは、セルフメディケーションの観点からも社会的意義が非常に高いと思われる。今

後は、さらに詳細な機序解明に取り組み、その有効性を科学的エビデンスにより裏付ける必要があると考える。そして、動物における基礎研究結果をヒトにトランスレートしていくことが大切である。

REFERENCES

- 1) Shuaib A., Lees K. R., Lyden P., Grotta J., Davalos A., Davis S. M., Diener H. C., Ashwood T., Wasiewski W. W., *N. Engl. J. Med.*, **357**, 562–571 (2007).
- 2) Horn J., Limburg M., *Stroke*, **32**, 570–576 (2001).
- 3) Davis S. M., Lees K. R., Albers G. W., Diener H. C., Markabi S., Karlsson G., Norris J., *Stroke*, **31**, 347–354 (2000).
- 4) Grotta J., *Stroke*, **28**, 2338–2346 (1997).
- 5) Gelmers H. J., Hennerici M., *Stroke*, **21**, 81–84 (1990).
- 6) Nakadai A., Inagaki H., Minami M., Takahashi H., Namme R., Ohsawa M., Ikegami S., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 805–809 (2003).
- 7) Wang M. Y., West B. J., Jensen C. J., Nowicki D., Chen S. U., Palu A. K., Anderson G., *Acta Pharmacol. Sin.*, **23**, 1127–1141 (2002).
- 8) Su B. N., Pawlus A. D., Jung H. A., Keller W. J., McLaughlin J. L., Kinghorn A. D., *J. Nat. Prod.*, **68**, 592–595 (2005).
- 9) Kamiya K., Tanaka Y., Endang H., Umar M., Satake T., *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5843–5848 (2004).
- 10) Harada S., Hamabe W., Kamiya K., Satake T., Yamamoto J., Tokuyama S., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 405–409 (2009).
- 11) Matz K., Keresztes K., Tatschl C., Nowotny M., Dachenhausen A., Brainin M., Tuomilehto J., *Diabetes Care*, **29**, 792–797 (2006).
- 12) Nina T. G., Michael W. S., Tien H., Linda K. K., John G., *Acad. Emerg. Med.*, **13**, 174–180 (2006).
- 13) Gentile N. T., Seftchick M. W., Huynh T., Kruus L. K., Gaughan J., *Acad. Emerg. Med.*, **13**, 174–180 (2006).
- 14) Widmer H., Abiko H., Faden A. I., James T. L., Weinstein P. R., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **12**, 456–468 (1992).
- 15) Dietrich W. D., Alonso O., Busto R., *Stroke*, **24**, 111–116 (1993).
- 16) Folbergrová J., Memezawa H., Smith M. L., Siesjö B. K., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **12**, 25–33 (1992).
- 17) Harada S., Fujita (Hamabe) W., Shichi K., Tokuyama S., *Brain Res.*, **1279**, 174–181 (2009).
- 18) Hoxworth J. M., Xu K., Zhou Y., Lust W. D., Lamanna J. C., *Brain Res.*, **821**, 467–479 (1999).
- 19) Gilmore R. M., Stead L. G., *Neurocrit. Care*, **5**, 153–158 (2006).
- 20) Siesjö B. K., Katsura K. I., Kristin T., Li P. A., Siesjö P., *Acta Neurochir. Suppl.*, **66**, 8–14 (1996).
- 21) Kraig R. P., Petito C. K., Plum F., Pulsinelli W. A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **7**, 379–386 (1987).
- 22) Petito C. K., Kraig R. P., Pulsinelli W. A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **7**, 625–632 (1987).
- 23) Nedergaard M., *Adv. Neurol.*, **71**, 75–83 (1996).
- 24) Li P. A., Shuaib A., Miyashita H., He Q. P., Siesjö B. K., *Stroke*, **31**, 183–192 (2000).
- 25) Han B. H., Holtzman D. M., *J. Neurosci.*, **20**, 5775–5781 (2000).
- 26) Owen P. L., Martineau L. C., Caves D., Haddad P. S., Matainaho T., Johns T., *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **17**, 635–643 (2008).
- 27) Horsfall A. U., Olabiyi O., Aiyegbusi A., Noronha C. C., Okanlawon A. O., *Nig. Q. J. Hosp. Med.*, **18**, 162–165 (2008).
- 28) Buijs R. M., Chun S. J., Nijima A., Romijn H. J., Nagai K., *J. Comp. Neurol.*, **431**, 405–423 (2001).
- 29) Buijs R. M., Ia Fleur S. E., Wortel J., Van Heyningen C., Zuiddam L., Mettenleiter T. C., Kalsbeek A., Nagai K., Nijima A., *J. Comp. Neurol.*, **464**, 36–48 (2003).
- 30) Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y., Ito Y., Waki H., Uchida S., Yamashita S., Noda M., Kita S., Ueki K., Eto K., Akanuma Y., Froguel P., Foufelle F., Ferre P., Carling D., Kimura S., Nagai R., Kahn B. B., Kadowaki T., *Nat. Med.*, **8**, 1288–1295 (2002).
- 31) Jover-Mengual T., Zukin R. S., Etgen A. M., *Endocrinology*, **48**, 1131–1143 (2007).