

脳虚血ストレスによる高血糖と神経障害発現に及ぼす 抗糖尿病治療薬メトホルミンの有効性

藤田(濱邊)和歌子, 原田 慎一, 徳山 尚吾*

Effectiveness of Metformin in Prevention of Development of Hyperglycemia and Neuronal Damage Caused by Ischemic Stress

Wakako FUJITA-HAMABE, Shinichi HARADA, and Shogo TOKUYAMA*

Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University,
1-1-3 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan

(Received October 13, 2010)

Hyperglycemia is a known exacerbating factor in ischemic stroke. It has been reported that hyperglycemia and post-ischemic glucose intolerance can develop after stroke and be involved in the development of neuronal damage, as we described previously. Here, we focus on the effectiveness of metformin, a hypoglycemic drug, in preventing the development of neuronal damage using the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model mice. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine/threonine kinase that plays a key role in the hypoglycemic effects of metformin. Recently, it has been reported that centrally activated AMPK is involved in the development of ischemic neuronal damage, while the effect of peripherally activated AMPK on ischemic neuronal damage is not known. In the liver, AMPK activity was not affected by MCAO, while the administration of intraperitoneal metformin (250 mg/kg), an AMPK activator, significantly activated hepatic AMPK and suppressed both the development of post-ischemic glucose intolerance and ischemic neuronal damage without alteration of central AMPK activity. On the other hand, the administration of intracerebroventricular metformin (100 μ g/mouse) significantly exacerbated the development of neuronal damage observed on day 1 after MCAO. These effects were significantly blocked by compound C, a specific AMPK inhibitor. These results suggest that central AMPK is activated by ischemic stress *per se*, although peripheral AMPK is not altered. Furthermore, the regulation of post-ischemic glucose intolerance by metformin-induced activation of peripheral AMPK contributes to the reduction of cerebral ischemic neuronal damage.

Key words—metformin; cerebral ischemia; glucose intolerance; 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK); liver; cortex

1. はじめに

脳卒中は死因の第3位ということのみならず、発症率も高く、要介護者の原因疾患として第1位であることからその予防と治療が重要であると考えられている。これまでに脳卒中発作により誘導される虚血性神経障害の発症機序については多くの基礎報告があるにもかかわらず、それに基づく治療薬候補のほとんどが実用化に至っていない。¹⁾ こうした背景から、発作後の神経障害に対する新規治療薬の開発に加え、脳卒中発症リスクとなり得る各種疾病に対する既存の治療薬の、機能予後への有効性に関する

エビデンスの集積も求められている。以前より高血圧は、発症・再発の危険因子として重要視され、脳卒中ガイドラインでも発作後の厳格な血圧目標値の設定と、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬など高血圧治療薬の有効性が述べられてきた。²⁾ このように、リスク因子となる各種疾病の治療薬は脳卒中予後改善のために有効利用できる可能性を秘めている。

最近の久山町研究により、高血糖状態は脳卒中発症リスクを上昇させることが明らかにされた。³⁾ 加えて、脳卒中急性期患者の2-5割に高血糖が認められることも知られている。⁴⁾ これまでにわれわれも、脳卒中モデルマウスを用いた一連の基礎実験から、脳虚血ストレス負荷後にインスリン抵抗性と有意な空腹時血糖値の上昇が一時的に観察されること

神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 (〒650-8586 神戸市中央区港島一丁目1-3)

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

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S47 で発表したものを中心に記述したものである。

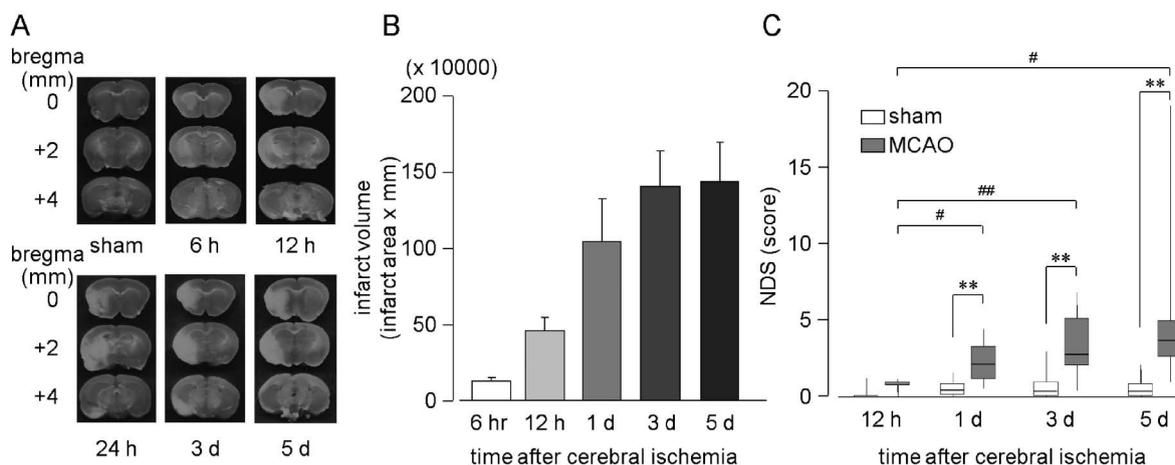


Fig. 1. Development of Infarction and Behavioral Abnormality after Cerebral Ischemic Stress

A: Representative photographs of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. B: Quantitative analysis of the infarct volume. Results are expressed as means \pm S.E.M. $n=8-17$. C: Neurological examination was performed using the NDS. The boxes contain the values between the 25th and 75th percentile, the lines across the boxes represent the medians, the whiskers extend to the highest and lowest values. ** $p<0.01$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Kruskal-Wallis test followed by the Wilcoxon-Mann-Whitney U test. Sham group: $n=6-11$, MCAO group: $n=8-17$. (modified from Ref. 5)

を明らかにした。⁵⁾ 加えて一部の臨床報告では、入院時血糖値が 154 mg/dl 以上では死亡率や機能予後ともに不良であること、⁶⁾ 並びに、発作後のインスリンによる血糖コントロールが生存率を高めることも明らかにされている。⁷⁾ しかしながら、わが国のガイドラインに発作後の血糖値の明確な目標は設けられておらず、その重要性についてはいまだ議論の渦中にある。今後、既存の抗糖尿病薬の有効性も含め、血糖管理の重要性に対するエビデンスの集積は必要であろう。

インスリンに加え、ピグアナイド系抗糖尿病薬であるメトホルミンは、二次予防への有効性が示唆されている薬物の 1 つである。⁸⁾ その標的分子である AMP 活性化プロテインキナーゼ [AMP kinase (AMPK)] は、細胞内エネルギー恒常性の主たる制御因子として、重要な役割を担う分子である。^{9,10)} AMPK は、ATP/AMP 比の低下、すなわち、細胞内エネルギーの低下時に活性化し、肝臓では糖新生抑制や脂肪酸合成抑制作用、骨格筋では糖取り込み促進作用を担い、視床下部では摂食行動の促進作用を示す。^{9,10)} メトホルミンによる血糖降下作用は AMPK の活性化に起因すると報告されている。¹¹⁾ 一方で、AMPK は脳神経細胞にも発現し、脳虚血ストレス負荷時に活性化することが報告されている。この脳内 AMPK 活性化の神経細胞における作用は議論されているところであるが、虚血ストレス誘導性のエネルギー欠乏による細胞死を促進さ

せているようである。¹²⁾ これらの知見を考え合わせると、メトホルミン投与の予後改善に対する有効性には疑問が残される。

本総説では、われわれが明らかにしてきた虚血後の耐糖能異常発現と神経障害発現についての知見、並びに、これらに対する全身投与と脳室内投与のメトホルミンの影響についての検討結果を紹介し、抗糖尿病薬としてのメトホルミン投与の脳卒中予後改善における有効性について考察したい。

2. 脳虚血ストレスによる神経障害と耐糖能異常の発現

これまでにわれわれは、ddY 系雄性マウスに 2 時間の中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) を施すことにより一過性脳虚血モデルマウスを作製し、神経障害を評価してきた。この方法では、虚血側の脳半球において 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 [Fig. 1 (A) and (B)].⁵⁾ また、行動障害の指標となる neurological deficit score (NDS)



藤田 (濱邊) 和歌子

2004 年 3 月長崎大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。2004~2006 年和歌山県立医科大学薬理学教室助手。2006 年 4 月より神戸学院大学薬学部助教。現在に至る。研究テーマ：オピオイドによる鎮痛効果とその変容、脳虚血性神経障害の発症機序の解明、糖尿病病態時における薬物動態変容とその機序の解明、など。

の上昇も5日後まで悪化し続けることを明らかにした [Fig. 1(C)].⁵⁾ 興味深いことに、空腹時血糖値はこれらの神経障害発現に先行して上昇し、MCAO 1日後においてピークとなりその後消失した。同時に、インスリン負荷試験や糖負荷試験の結果から、MCAO 1日後では一時的なインスリン感受性の低下/耐糖能異常が生じていることも明らかであった (Fig. 2).⁵⁾ さらに、外来性インスリンのMCAO直後から48時間にわたる反復投与が、1日

後における空腹時血糖値上昇と、3日後に認められる梗塞巣形成を完全に抑制したことから (Fig. 3), われわれは脳虚血ストレス負荷後初期における空腹時血糖値の上昇 (耐糖能異常) が、その後の神経障害発現誘導因子の1つになると考えている (Fig. 4). 事実、1型糖尿病モデルマウスを用いた検討からも、高血糖状態が神経細胞の脳虚血ストレスに対する脆弱性を高めることを明らかにしている (図には示していない).

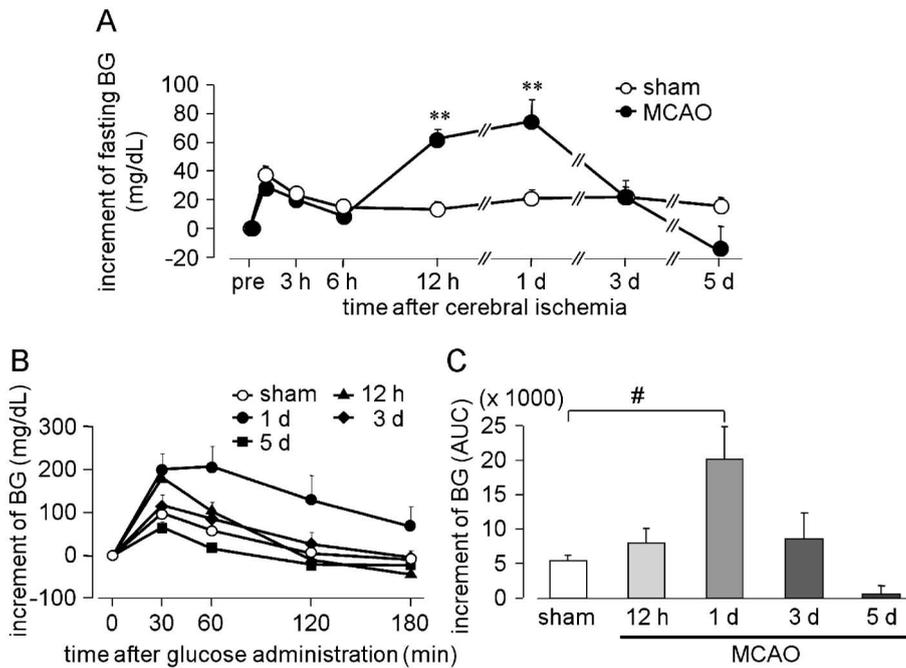


Fig. 2. Transient Increment of Fasting Blood Glucose Levels (FBG) and Glucose Intolerance in the Early Phase of Cerebral Ischemic Stress

A: The FBG after cerebral ischemic stress. Sham group: $n=9-16$, MCAO group: $n=8-17$. B: Time course of oral glucose tolerance tests (OGTTs). C: Quantitative evaluation of OGTT results. $n=7-14$. The area under the curve in Fig. 2B was calculated. Results are presented as the means \pm S.E.M. $**p<0.01$ vs. sham (12 h and 1 day), unpaired Student's t -test, $^{\#}p<0.05$, one-way ANOVA and Dunnett's test. (modified from Ref. 5)

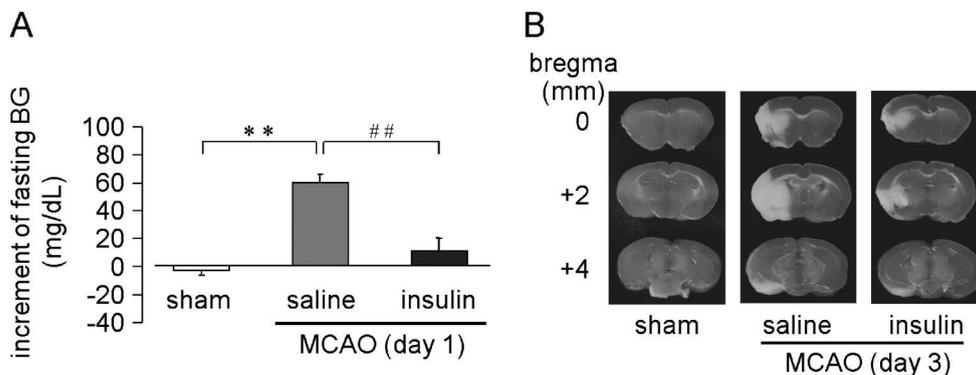


Fig. 3. Suppression of the Development of Glucose Intolerance and Neuronal Damage by Insulin

A: The increment of FBG on day 1. $**p<0.01$, $^{\#}p<0.01$, one-way ANOVA and Scheffe's test. B: Representative photographs of infarct volume. The continuous administration of intermediate-acting insulin was performed during the first 48 h after MCAO by the following schedule: day 1: 5 U/kg, i.p., three times per day, and day 2: 2.5 U/kg, i.p., three times per day. (modified from Ref. 5)

3. メトホルミン全身投与による脳虚血性神経障害の抑制

虚血後の耐糖能異常を抑制することを目的とし

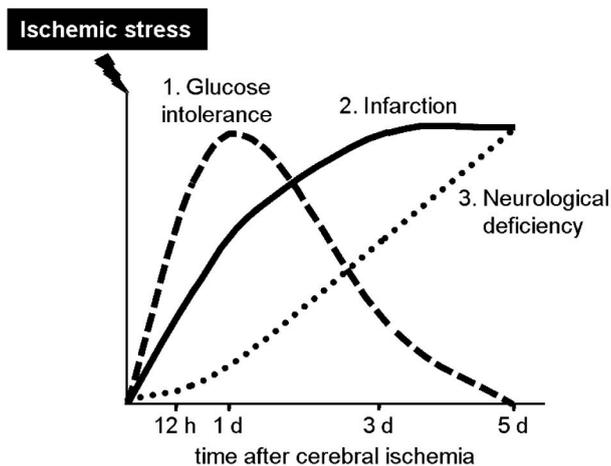


Fig. 4. Schematic Illustration of Time Course of Development of Glucose Intolerance and Neuronal Damage after Exposure to Cerebral Ischemic Stress

て、メトホルミン (250 mg/kg, i.p.) を MCAO 直後から 8 時間間隔で 1 日 3 回 2 日間全身投与した。MCAO 単独では肝臓における AMPK になんら影響を及ぼさなかったが、メトホルミン全身投与により有意なリン酸化の亢進が認められた [Fig. 5 (A)].¹³⁾ 骨格筋における AMPK には、MCAO 並びにメトホルミン全身投与の両者ともになんら影響を及ぼさなかった。また、大脳皮質における AMPK のリン酸化にもメトホルミン全身投与は影響を及ぼさなかった (図には示していない)。メトホルミン全身投与により MCAO 1 日後における空腹時血糖値の上昇は完全に抑制され、同時に 3 日後における梗塞巣形成、行動異常の発現も有意に抑制された [Figs. 5 (B)–(D)].¹³⁾ これらのメトホルミンの作用は、AMPK の特異的阻害剤である compound C (1 mg/kg, i.p.) により完全に拮抗された [Figs. 5 (B)–(D)].¹³⁾ これらの知見から、脳虚血ストレス負荷は肝臓並びに骨格筋における AMPK になんら影響

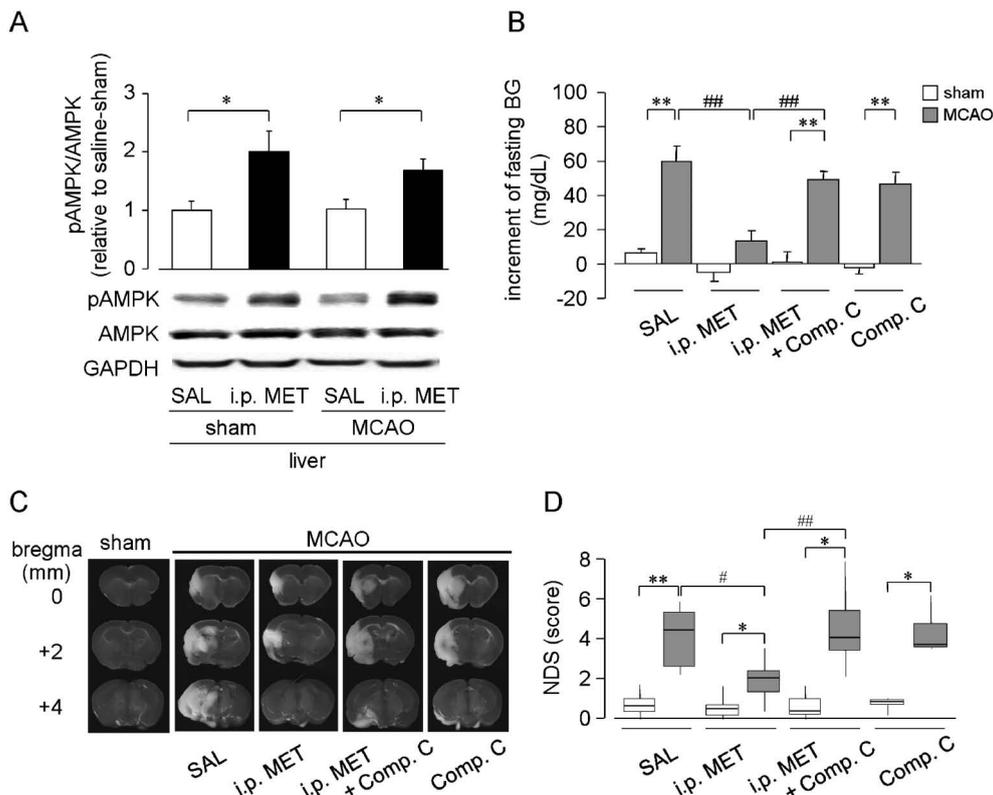


Fig. 5. Effect of Systemic MET Treatment on the Levels of pAMPK/AMPK in Liver and on Neuronal Damage after Cerebral Ischemic Stress

Mice were treated with MET (250 mg/kg, three times per day, i.p.) immediately after MCAO. A: Representative western blots showing AMPK, pAMPK and GAPDH levels. Relative levels were analyzed by determining the ratio of AMPK/GAPDH and pAMPK/GAPDH 1 h after the final MET administration on day 1 after MCAO. * $p < 0.05$, $n = 8-13$. B: The increase in FBG on day 1. ** $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, $n = 6-12$. C: Representative photographs of TTC staining on day 3. D: Results of the NDS on day 3 after MCAO. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 6-12$. SAL; saline, i.p. MET; intraperitoneal metformin, Comp. C; compound C (1 mg/kg, i.p.). (modified from Ref. 13)

を及ぼさないことが明らかとなった。一方で、メトホルミン全身投与による、肝臓における AMPK の活性化が虚血後耐糖能異常の改善と神経障害の軽減に寄与することを示唆している。

4. メトホルミン脳室内投与による脳虚血性神経障害の悪化

脳内 AMPK の活性化が虚血性神経障害に及ぼす影響を観察することを目的として、メトホルミン (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, i.c.v.) を MCAO 直後から 8 時間間隔で 1 日 3 回 2 日間脳室内投与した。MCAO 1 日後における大脳皮質 AMPK のリン酸化レベルは、MCAO 単独でも有意に上昇したが、メトホルミン脳室内投与はそれを有意に亢進した [Fig. 6(A)].¹³⁾ MCAO 1 日後における空腹時血糖値上昇に対し、メトホルミンの脳室内投与はなんら影響を及ぼさなかったが、梗塞巣形成、並びに、行動異常の発現は

有意に上昇した [Figs. 6(B)–(D)].¹³⁾ これらのメトホルミンの作用は、compound C (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, i.c.v.) により完全に拮抗された (Fig. 6).¹³⁾ これらの知見は、過剰な脳内 AMPK の活性化が虚血性神経障害の増悪因子になることを示している。さらにこの神経障害の悪化は血糖値の変化とは独立して生じると考えられる。

5. まとめ

本研究から、抗糖尿病薬であるメトホルミンの脳内投与による脳内での過剰な AMPK の活性化は脳虚血性神経障害を悪化させることが明らかとなったが、メトホルミンの全身投与は脳内 AMPK に影響を及ぼすことなく虚血性の耐糖能異常を抑制できること、また、これが予後の改善に寄与できる可能性が示された。肝臓における AMPK の標的分子としてのグルコース 6 脱リン酸化酵素やグルコース輸送

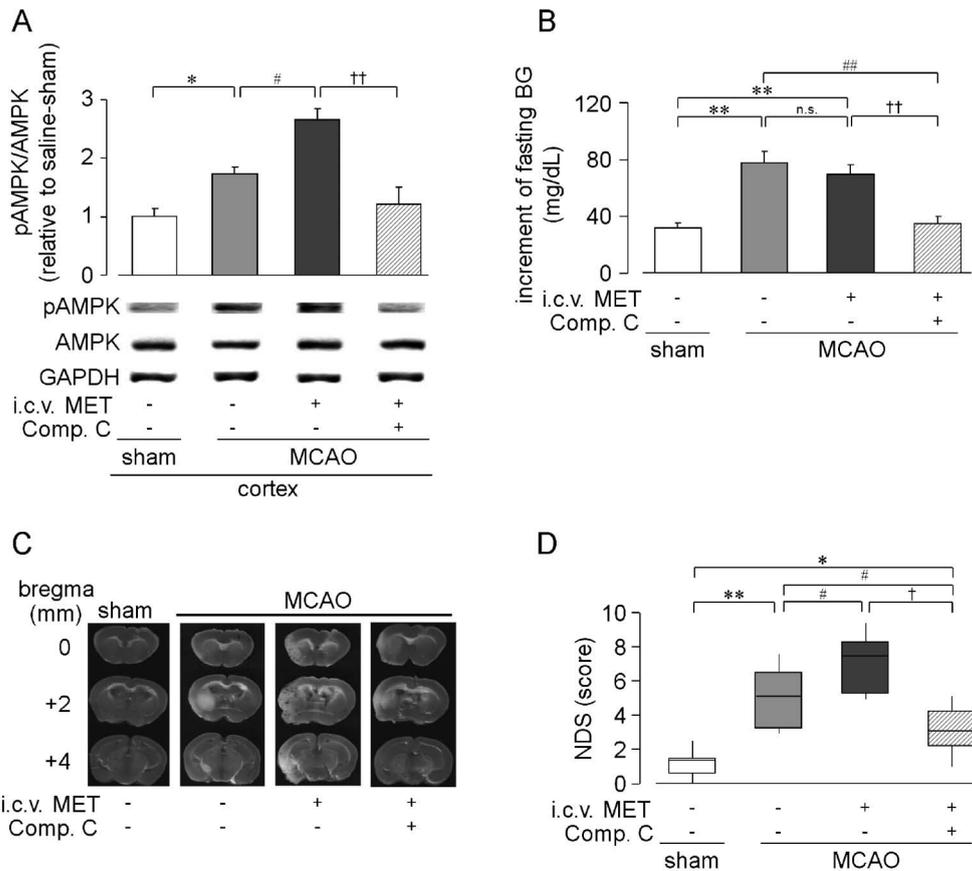


Fig. 6. Effect of the Intracerebroventricular (i.c.v.) MET on the Levels of pAMPK/AMPK in Cortex and on Neuronal Damage after Cerebral Ischemic Stress

Mice were treated with MET (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, three times per day, i.c.v.) immediately after MCAO. A: Representative western blots showing cortical AMPK, pAMPK and GAPDH levels. Relative levels were analyzed by determining the ratio of AMPK/GAPDH and pAMPK/GAPDH 1 h after the final MET administration on day 1 after MCAO. * $p < 0.05$, $^{\#}p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 7-12$. B: The increase in FBG on day 1. ** $p < 0.01$, $^{\#}p < 0.01$, ** $p < 0.01$, $n = 7-11$. C: Representative photographs of TTC staining on day 1. D: NDS results on day 1. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $^{\#}p < 0.05$, $^{\dagger}p < 0.05$, $n = 7-11$. i.c.v. MET; intracerebroventricular metformin, Comp. C; compound C (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, i.c.v., administered 1 h before MET treatment). (modified from Ref. 13)

体4は、脳内には極めて少なく、むしろ脳内ではその下流で細胞死シグナルの活性化を促すようである。その標的分子はいまだ明らかとされていないが、メトホルミンの虚血後耐糖能異常改善を介した神経障害抑制作用における投与経路依存性は、標的組織におけるAMPKの作用分子の発現の違いに起因するのかもしれない。¹²⁾

6. おわりに

厚生労働省による新薬の開発促進事業は進んでいるものの、患者へ提供されるまでにはやはり数年から十数年の歳月が必要とされている。最近では、かかるコストと時間の削減のためにも政府が承認した医薬品からの新規作用探索の重要性が注目されている。本研究において脳卒中急性期における抗糖尿病薬の投与の脳卒中予後改善への有効性を示したことは、このような観点からも意義があったと考える。そして本研究が、臨床応用を目指したトランスレーショナルリサーチの一助となれば幸いである。

REFERENCES

- 1) Shuaib A., Hussain M. S., *Eur. Neurol.*, **59**, 4–14 (2008).
- 2) “Japanese Guidelines for the Management of Stroke 2009,” eds. by Shinohara Y., Ogawa A., Suzuki N., Katayama Y., Kimura A., Kyowa Kikaku Ltd., Tokyo, 2009, pp. 21–24.
- 3) Doi Y., Ninomiya T., Hata J., Fukuhara M., Yonemoto K., Iwase M., Iida M., Kiyohara Y., *Stroke*, **41**, 203–209 (2010).
- 4) Sako K., “Pharma Navigator Nosocchu hen,” ed. by Ibayashi S., Medical Review Co., Ltd., Tokyo, 2006, pp. 456–459.
- 5) Harada S., Fujita W. H., Shichi K., Tokuyama S., *Brain Res.*, **1279**, 174–181 (2009).
- 6) Fuentes B., Castillo J., San Jose B., Leira R., Serena J., Vivancos J., Davalos A., Nunez A. G., Egado J., Diez-Tejedor E., *Stroke*, **40**, 562–568 (2009).
- 7) Gentile N. T., Seftchick M. W., Huynh T., Kruus L. K., Gaughan J., *Acad. Emerg. Med.*, **13**, 174–180 (2006).
- 8) Guyomard V., Jamieson E. I., Myint P. K., *Curr. Top. Med. Chem.*, **9**, 1261–1277 (2009).
- 9) Hardie D. G., Hawley S. A., Scott J. W., *J. Physiol.*, **574**, 7–15 (2006).
- 10) Viollet B., Foretz M., Guigas B., Horman S., Dentin R., Bertrand L., Hue L., Andreelli F., *J. Physiol.*, **574**, 41–53 (2006).
- 11) Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N., Hirshman M. F., Goodyear L. J., Moller D. E., *J. Clin. Invest.*, **108**, 1167–1174 (2001).
- 12) Li J., McCullough L. D., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 480–492 (2010).
- 13) Harada S., Fujita-Hamabe W., Tokuyama S., *Brain Res.*, **1351**, 254–263 (2010).