





論文審査の要旨

平成28年2月23日

学籍番号	P12D03	申請者氏名	Vigneshwaran Pitchaimani
専攻	薬学	学位	博士(薬学)
学位論文題目	Mechanisms of hypoglycemic seizures in mice 低血糖発作のメカニズムの研究		
審査委員	主査	渡辺 賢一	
	副査	上野 和行	
	副査	坂爪 重明	
	副査	梨本 正之	
(論文審査の要旨) Vigneshwaran Pitchaimani 君の博士論文を要約すると下記のごとくである。 糖尿病治療でインスリンは重要な治療薬であるが、時に低血糖発作などの重大な副作用が生じる。 低血糖発作のメカニズム解明のために、 1) 絶食低血糖時の脳内各領域における BCL2 associated death promoter (BAD)・AKT 経路、 2) 絶食低血糖時の脳グルカゴンの関与、 3) 絶食低血糖持続時間と低血糖発作(痙攣)、 について C57BL6/J マウスを用いて検討した。 1) 絶食低血糖時の脳内各領域における BAD・AKT 経路。 「背景・目的」 インスリン作用臓器は肝臓・骨格筋・脂肪組織・脳などが知られている。インスリンは脳において、記憶・学習・摂食・エネルギー代謝調節・ニューロン新生などに関係し、アルツハイマー病・肥満・糖尿病性神経障害は脳のインスリン抵抗性が関係する。低血糖症状は手の震え・発汗・動悸・不安感などの交感神経緊張症状が出現し、空腹感・判断力低下・意識障害・痙攣・昏睡などの中枢神経機能症状も出現する。AKT はアポトーシス・生存・グリコーゲン合成・タンパク質合成・糖取り込みなど様々な作用があり、BAD もアポトーシス・グルコース代謝などに関与する。そこで本研究では、正常時と絶食低血糖時の各局所脳領域でのインスリンシグナルの変化を検討した。 「方法」 C57BL / 6J マウスを正常飼育群(n=6)・18~24 時間絶食群(n=4~6)に分け、前頭連合野・海馬・中脳・視床下部の p-BAD ^{ser155} と p-AKT ^{ser473} の蛋白発現量を比較検討した。			

論文審査の要旨

「結果・考察」 絶食低血糖時には、交感神経活性に関係する視床下部房室核-前頭連合野 (大脳皮質)のみ p-BAD^{ser155} と p-AKT^{ser473} 蛋白発現量が増加していた。前頭連合野は思考・認知・行動の選択などの中枢であり、低血糖をいち早く感知する領域と言える。AKTとBADの値が上昇していた前頭連合野ではアポトーシスが他の部位よりも頻繁に行われていたと示唆される。同時に、前頭連合野の方がグルコースによる影響や強いストレスの影響を受けやすいと考えられる。しかし、海馬では他の脳領域と同じような結果となった。これは海馬が大脳辺縁系に属し、大脳辺縁系が動物の原始的な行動の源であり、嗅覚・記憶・情動に関与する古い脳として生命維持に重要だと考えられるため、前頭連合野と同じ大脳皮質でもグルコース代謝の重要性に有意差が生じたと考えられた。また、前頭連合野よりも海馬の方がグルコース少量の状態でも維持できる仕組みが推定された。

「まとめ」 絶食低血糖時には、前頭連合野のみ p-BAD^{ser155} と p-AKT^{ser473} 蛋白発現量が増加し、前頭連合野が低血糖発作発生メカニズムの重要な領域であることが示唆された。

2) 絶食低血糖時の脳グルカゴンの関与。

「背景・目的」 膵臓の α 細胞からグルカゴンが放出される。視床下部・肝臓・腎臓・小腸等のグルカゴン受容体が刺激されると AMP- Protein kinase A (PKA)経路を通して肝糖生成が増加する。しかし、グルカゴンを投与しても肝糖生成を増加させるが、その増加は一過性である。低血糖発作時のグルカゴンや視床下部グルカゴンシグナルは重要であるが、不明点が多い。そこで、絶食 4・8・12・18・24・30・36・42 時間後の視床下部のグルカゴンシグナルと肝糖生成を p-PKA^{Ser/Thr} と phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK)で比較検討した。

「方法」 8 週齢雄 C57BL6/J マウスを正常飼育群(n=4)と 4・8・12・18・24・30・36・42 時間絶食8群(各群 n=5)の計 9 群に分け、視床下部のグルカゴン受容体・p-PKA^{Ser/Thr} と、肝臓のグルカゴン受容体・p-PKA^{Ser/Thr}・PEPCK のタンパク発現量をウエスタンブロットで検討した。

「結果・考察」 肝臓の PEPCK タンパク発現量は時間とともに増加した。しかし、視床下部のグルカゴンシグナル p-PKA^{Ser/Thr} は 18・42 時間絶食群で増加するが、肝臓の p-PKA^{Ser/Thr} が低下した。このためにグルカゴンを投与しても、持続的な肝糖生成増加につながらないことが明らかになった。

「まとめ」 視床下部のグルカゴンシグナルが増加しても肝臓内糖生成シグナルが低下するために、持続的な肝糖生成増加につながらないことが明らかとなった。

論文審査の要旨

3) 絶食の持続時間とインスリン誘発低血糖発作(痙攣)。

「背景・目的」 過剰なインスリンは低血糖から意識消失や痙攣を引き起こす。絶食は低血糖発作時の痙攣を軽減することもあり逆に重症化することもある。絶食時には血糖値が低下するが、一方で β -ヒドロキシブチレート等のケトン体が増加する。この β -ヒドロキシブチレートが低血糖痙攣と関係することが推定されているが詳細は不明である。絶食時間の違いに由来すると考え、6時間絶食又は24時間絶食マウスにインスリンを投与し比較検討した。

「方法」 8週齢雄 C57BL6/J マウスを正常飼育群(n=9)・6時間絶食群(n=10)・24時間絶食群(n=8)の3群に分け β -ヒドロキシブチレートを測定した。更に3群にインスリン 8U/kg(ip)を投与し、240分までの血糖値・痙攣発作出現時間を測定した。

「結果・考察」 β -ヒドロキシブチレートは、正常群と6時間絶食群に比し24時間絶食群で増加が見られた(それぞれ 0.30, 0.24, 2.64 mmol/L)。正常飼育群ではインスリン投与前・投与 30・60・90・120・180・240分後の血糖値は 161・52・39・23・<20・<20・26 mg/dL であり、低血糖が持続すると240分後に肝糖生成が起きていた。6時間絶食群では 121・26・<20・<20・<20・<20 mg/dL で、24時間絶食群では 75・23・<20・<20・<20・<20 mg/dL であり、2群共に肝糖生成は明かではなかった。正常飼育群・6時間絶食群・24時間絶食群の痙攣発作出現時間はインスリン投与後 110・47・165分で24時間絶食群が有意に遅くなった。これらから、6時間絶食では糖生成障害・自律神経障害が関与し、24時間絶食ではケトン体増加・脳代謝障害が関与することが示唆された。

「まとめ」 低血糖発作の発症には種々のメカニズムが関与することが示唆された。

以上の新知見を下記に発表した。

1. **Vigneshwaran P**, et al. Fasting mediated increase in p-BADser155 and p-AKTser473 in the prefrontal cortex of mice. *Neuroscience Letters*. 2014; 579,134-139.
2. Harima M, **Vigneshwaran P**, et al. Effect of carvedilol against myocardial injury due to ischemia-reperfusion of the brain in rats. *Exp Molec Path*. 2015; 98: 558-562.
3. **Vigneshwaran P**, et al. Continuous monophasic hypothalamic glucagon signaling after fasting hypoglycemia in mice. *Life Sciences*. 2016 (in press).