

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09395

研究課題名（和文）軽度外傷性脳損傷に対するジンセノサイドRb1と誘導体の治療効果に関する研究

研究課題名（英文）A Verification of the effects of ginsenoside Rb1 (gRb1) and dihydroginsenoside Rb1 (dgRb1) on the mild traumatic brain injury.

研究代表者

阪中 雅広 (sakanaka, masahiro)

愛媛大学・医学部・研究員

研究者番号：60170601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は軽度外傷性脳損傷(MTBI)に対する紅蔘成分ジンセノサイドRb1(gRb1)及びその誘導体ジヒドロジンセノサイドRb1(dgRb1)の治療効果とその作用機構を確認した。生理食塩液を投与したMTBIモデルマウス（対照群）に比べると、gRb1/dgRb1を投与したMTBIモデルマウス脳内の炎症因子発現とグリア細胞活性化が抑制され、MTBI後の自発運動亢進と空間認知障害が改善された。更に6か月後、gRb1/dgRb1を投与したMTBIモデルマウス脳内P-Tauの増加が対照群に比べて有意に抑えられた。慢性外傷性脳症(CTE)の発症もgRb1/dgRb1の投与により抑えられることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軽度外傷性脳損傷(MTBI)による高次脳機能障害と続発する慢性外傷性脳症(CTE)が大きな社会問題となっているが、その経過は未だに不明である。我々の研究では、gRb1/dgRb1の投与によりMTBIモデルマウスの高次脳機能障害症状が改善された。更に約6ヶ月間の長期実験で、gRb1/dgRb1を投与されたMTBIモデルマウス脳内のタウタンパク質の蓄積量が対照群より減少した。これらの結果より、MTBIによる高次脳機能障害と続発する慢性外傷性脳症(CTE)に対するgRb1/dgRb1の治療効果が明らかになった。本研究成果は、今後新たな治療法開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：We have proved that the intravenous administration of ginsenoside Rb1 (gRb1) or dihydroginsenoside Rb1 (dgRb1) improves executive function disorders caused by mild traumatic brain injury (MTBI) in mice. Compared to mice treated with saline (vehicle), mice treated with gRb1/dgRb1 showed reduction of proinflammatory cytokine expressions and suppression of glial cell activation in the brain after MTBI. As a result, the administration of gRb1/dgRb1 to mice with MTBI alleviated hyperlocomotion and spatial cognition dysfunction when compared to vehicle infusion. A less Phospho-Tau expression in gRb1/dgRb1-treated mice at 6 months after MTBI as compared to vehicle-infused mice indicates that the onset of chronic traumatic encephalopathy (CTE) is postponed in gRb1/dgRb1 treated mice.

研究分野：神経損傷、救急医療

キーワード：軽度外傷性脳損傷（mTBI） ジンセノサイドRb1 高次脳機能障害 慢性外傷性脳症（CTE）

## 1. 研究開始当初の背景

外傷性脳損傷の中でも、受傷時の意識障害が軽度である場合は、軽度外傷性脳損傷(Mild Traumatic Brain Injury, MTBI)として区別される。MTBI の症状として記憶障害、注意障害、社会的行動障害などの高次脳機能障害が目立ちやすい。 病理解剖所見と MTBI 動物モデルを用いた研究によると、軸索の変性、Microgliosis、Astrogliosis 並びに微小管結合蛋白タウ (Tau) の凝集、蓄積病変が報告されている( Brain. 136;43-64.2013; Mol Cell Neurosci.66:91-98.2015 )。 MTBI では、神経細胞の変性より神経炎症が目立ち、高次脳機能障害が時間と共に進展する。これらの病理変化、特に軸索損傷と MAP2 染色性の減少などは我々の脊髄損傷モデル動物でも確認されている( J Neurotrauma. 24-6:1037-54.2007; Int J Neurol Neurother.2:1-7.2015 )。従って、前記の脊髄損傷モデル動物に対して、優れた治療効果を示す gRb1( C54H92O23, MW 1109.46 ) や dgRb1 が、MTBI 動物モデルに対しても好ましい効果を示す可能性は高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は脊髄損傷モデル動物や脳梗塞モデル動物を用いて、gRb1 と dgRb1 が神経組織内の VEGF と Bcl-xl の発現増強を介して神経細胞を保護することを証明した( J.Cereb.Blood Flow Metab.26:708-721,2006; J Neurotrauma. 24-6:1037-54.2007; Int J Neurol Neurother.2:1-7.2015 )。さらに我々は、gRb1 を含有する紅蓼エキスの経口投与が損傷神経組織内グリア細胞の活性化を抑制して、神経炎症による白質への二次損傷も軽減することを脊髄損傷モデル動物において証明した( Evid Based Complement Alternat Med. 2017;2017:1265464. )。一方、我々は本研究の予備実験において Kane MJ,et al の方法( J Neurosci Methods. 203:41-9.2012)を用いて MTBI モデルマウスを作製した。マウスの頭に衝撃を繰り返し与えた結果、当初は明確な神経細胞損傷が見られなかったが、その後記憶障害、認知能力の低下と共に脳内グリア細胞の活性化が見られた。以上のことより、MTBI モデルマウスに対して紅蓼成分 gRb1 とその誘導体 dgRb1 が効果を示し得ると期待して、その検証を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### ( 1 ) 動物

本実験には 12 週齢の C57BL/J マウスを用いた。実験動物を一定の明暗サイクル及び温度( 22 ±1 ) 条件下で飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行われた。

### ( 2 ) 軽度外傷性脳損傷( MTBI ) 動物モデルの作成

Kane MJ, et al の方法( J Neurosci Methods. 203:41-9.2012)を用いて MTBI マウスモデルを作製した。吸入麻酔下で 100 グラムの錘を 1 メートルの高度からマウスの頭部に自由落下させることにより脳損傷を与えた。その後麻酔から覚醒していることを確認後、マウスを飼育ケージに戻した。各マウスに一日一回、10 日間で合計 10 回錘の落下により損傷を与えた。一部の動物ではコントロール群(Sham 群)として麻酔のみを行い、錘の落下を実施しなかった。

### ( 3 ) gRb1/dgRb1 の連続静脈内投与

アルゼット浸透圧ポンプ( Model No.2004 )を用いて、gRb1 又は dgRb1 を含む生理食塩液を 1

0 回目の MTBI を受けたマウスの静脈内に連続 4 週間投与した(gRb1 群(6  $\mu$ g/day)、dgRb1 群(0.6  $\mu$ g/day) )。対照群のマウスには、生理食塩液を連続 4 週間投与した。

#### (4) マウスの活動性と空間認知能力の評価

MTBI 後 1, 4 週目と 2 4 週目に Open field 試験を実施した。60cmx60cm 四方の亚克力箱に 60 分間マウスを入れ環境に順応させた。そして引き続き 20 分間マウスの活動性を 5cm 間隔で配置した赤外線センサーにて計測した。空間認知能力を検討するために、MTBI 後 4 週目に Morris water maze test を行った。半径 100cm の円形プールに高さ 20 cmまで水を入れた後、一か所にプラットフォーム(逃避台)を水面下 2cm に設置した。プールに入れられたマウスが逃避台に到達するまでの時間(escape latency)を計測した。

#### (5) ELISA とウェスタンブロッティング

Open field test 又は Morris water maze test 実施後にマウスを安楽死させ全脳を摘出して、ELISA キットにより脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した。さらにウェスタンブロッティングによって、脳内 Phospho-tau の発現を確認した。

#### (6) 免疫組織化学染色

Open field test 又は Morris water maze test 実施後に深麻酔下でマウスを 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定してから、脳を摘出した。後固定した脳組織をパラフィン包埋後に、薄切して染色用に供した。

免疫組織化学染色：脳組織切片を脱パラフィン処理し、抗原賦活化処理後、10% normal goat serum にて 30 分間ブロッキングした。一次抗体(抗 GFAP)を切片に加えて反応させた後、VECTASTAIN ABC キットを用いて発色させ、光学顕微鏡で観察、撮影した。

#### (7) 統計解析

2 群の実験データを比較する場合は Student T 検定を行い、それ以外の実験データを統計解析する場合は One way 又は Two way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test を用いた。p 値が 0.05 未満を有意とした。全てのデータは mean  $\pm$  SD にて表記した。

### 4. 研究成果

(1) 対照群(担体投与群)に比べて、gRb1/dgRb1 を投与した MTBI モデルマウスの自発運動亢進が軽減され、空間認知障害が改善された。

MTBI 後 1、4 週目と 2 4 週目に Open field test を実施した。その結果、MTBI 後 1 週目から、Sham 群に比して、MTBI を受けたすべてのマウス(MTBIx10)の自発運動が有意に増加した。MTBI 後 2 週目で、gRb1 群と dgRb1 群の自発運動が対照群と比較して有意に減少した。空間認知能力を検討するため、MTBI 後 4 週目に Morris water maze test を行った。その結果、訓練 2 日目から、逃避台に辿りつく時間(escape latency)は、MTBI を受けた全てのマウスが Sham 群より長かった。訓練 5 日目で、対照群のマウスより gRb1 群と dgRb1 群マウスの escape latency は有意に短縮された。

(2) 対照群に比べて、gRb1 群と dgRb1 群の マウス脳内炎症因子発現増加が抑制された。

ELISA キットを用いて、MTBI 後の脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した ( 図 1 )。

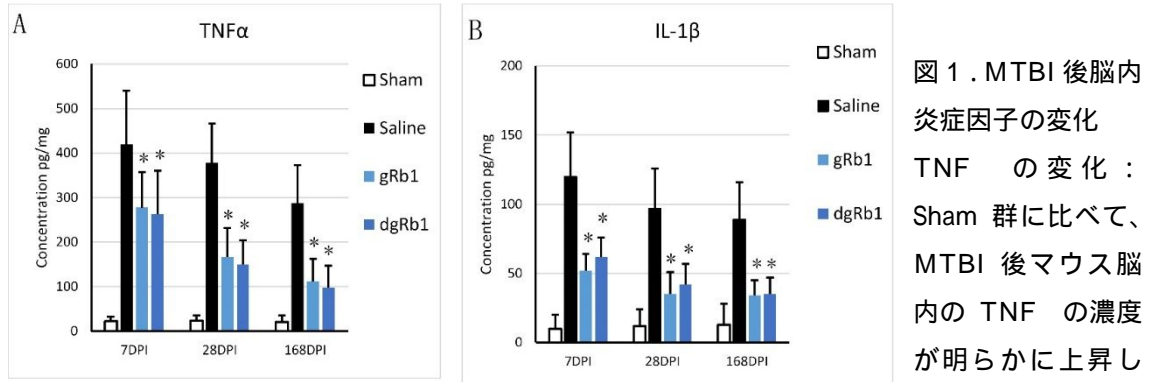


図 1 . MTBI 後脳内炎症因子の変化  
TNF の変化 : Sham 群に比べて、MTBI 後マウス脳内の TNF の濃度が明らかに上昇し

たが、gRb1 群と dgRb1 群では MTBI 後 1 週目 ( 7 DPI ) から 24 週目 ( 168 DPI ) まで対照群よりその程度は有意に軽微であった ( 図 1A ; \* : P < 0.05 )。

IL-1 の変化 : Sham 群に比べて、MTBI 後マウス脳内の IL-1 の濃度が明らかに上昇したが、gRb1 群と dgRb1 群では MTBI 後 1 週目 ( 7 DPI ) から 24 週目 ( 168 DPI ) まで対照群よりその程度は有意に軽微であった ( 図 1B ; \* : P < 0.05 )。

( 3 ) 対照群マウスに比べて、MTBI 後 gRb1 群と dgRb1 群のマウス脳内アストログリア細胞活性化が抑制された。

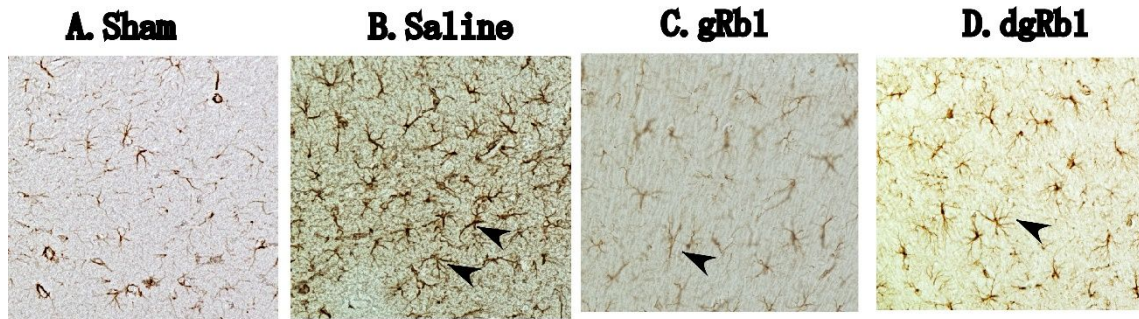


図 2 . MTBI 後脳内のグリア細胞の変化。

Anti-GFAP 抗体を用いて、アストロサイトの状態を確認した。Sham 群 ( 図 2A ) に比べて、MTBI を受けたマウス脳内では活性化されたアストロサイトが数多く確認されたが ( 図 2B ) gRb1 群 ( 図 2C ) と dgRb1 群 ( 図 2D ) では対照群よりアストロサイトの活性化が明らかに抑制された。( 黒い矢頭 : Activated Astrocytes )

( 4 ) MTBI 後 24 週目で、対照群に比べて、gRb1 群と dgRb1 群の脳内 Phospho-Tau 発現増加が有意に抑制された。

MTBI 後 24 週目にマウス脳内の Phospho-Tau ( P-Tau ) の発現をウェスタンブロッティングで調べた。その結果、sham マウスに比べて、MTBI モデルマウス ( Saline ) の脳内 Phospho-Tau 発現が有意に増加した。対照群 ( Saline ) マウスに比べて、gRb1 群と dgRb1 群の脳内 Phospho-Tau 発現増加が有意に軽減された ( 図 3、\* : P < 0.05 )。

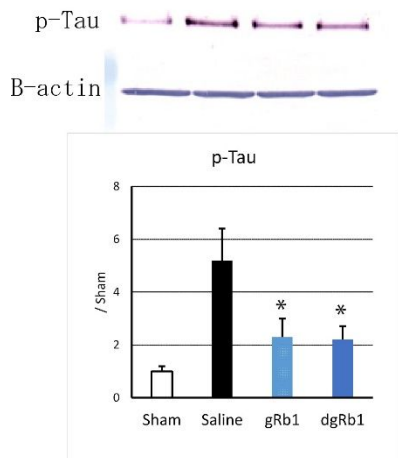


図3 . MTBI 後 2 4 週目の脳内 Phospho-Tau 発現変化

( 5 ) 結語

軽度外傷性脳損傷 ( MTBI ) 実験において、gRb1/dgRb1 を投与したマウスでは、MTBI 後 2 週目から自発運動の亢進が有意に抑制され、更に 4 週目には空間認知障害の改善も見られた。脳内炎症因子の発現を調べた結果、MTBI 後 1 週目から、gRb1/dgRb1 を投与されたマウス脳内の TNF と IL-1 濃度が対照群に比して有意に低かった。また対照群に比べて、MTBI 後 gRb1/dgRb1 を投与されたマウス脳内のアストロサ

イト活性化が抑制された。MTBI 後 24 週目で、対照群に比べて、gRb1/dgRb1 を投与されたマウス脳内 Phospho-Tau の発現増加が有意に軽減した。以上の結果から、gRb1/dgRb1 の投与により、MTBI 後に脳内炎症因子の発現とグリア細胞活性化が抑制され、二次損傷が抑えられた結果、高次脳機能障害が改善されたと考えられる。更に、MTBI 後に gRb1/dgRb1 を投与されたマウス脳内 Phospho-Tau の増加が抑えられたことから、gRb1/dgRb1 の投与が CTE の発症を防ぐことも明らかになった。

( 引用文献 )

1. McKee AC, et.al. The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. Brain. 2013 Jan;136(Pt 1):43-64. doi: 10.1093/brain/aws307.
2. Brody DL, et.al. The pathophysiology of repetitive concussive traumatic brain injury in experimental models; new developments and open questions. Mol Cell Neurosci. 2015 May;66(Pt B):91-8. doi: 10.1016/j.mcn.2015.02.005.
3. Masahiro S. et.al.. Intravenous infusion of dihydroginsenoside Rb1 prevents compressive spinal cord injury and ischemic brain damage through upregulation of VEGF and Bcl-XL. J Neurotrauma. 2007 Jun;24(6):1037-54. doi: 10.1089/neu.2006.0182.
4. Pengxiang Zhu et.al.. Intravenous Infusion of Ginsenoside Rb1 Ameliorates Compressive Spinal Cord Injury through Upregulation of Bcl-xL and VEGF. Int J Neurol Neurother 2015, 2:1 DOI: 10.23937/2378-3001/2/1/1017
5. Bo Zhang et.al.. Prevention of ischemic neuronal death by intravenous infusion of a ginseng saponin, ginsenoside Rb(1), that upregulates Bcl-x(L) expression. J Cereb Blood Flow Metab. 2006 May;26(5):708-21. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600225.
6. Pengxiang Zhu, et.al.. Oral Administration of Red Ginseng Extract Promotes Neurorestoration after Compressive Spinal Cord Injury in Rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2017; 2017: 1265464. doi: 10.1155/2017/1265464.
7. Kane MJ, et.al. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. J Neurosci Methods. 2012 Jan 15;203(1):41-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.09.003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhu Pengxiang, Sakanaka Masahiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Effects of Red Ginseng on Neural Injuries with Reference to the Molecular Mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J	6. 最初と最後の頁 116 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/j2020009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	朱 鵬翔  (zhu pengxiang)  (40380216)	愛媛大学・医学系研究科・助教     (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関