

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21591984

研究課題名（和文）

ラット前脳虚血モデルにおけるプロピルガレートの脳保護効果に関する研究

研究課題名（英文）

Effects of n-propyl gallate on neuronal survival after forebrain ischemia in rats

研究代表者

河野 安宣 (KAWANO YASUNOBU)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90423920

研究成果の概要（和文）：

虚血耐性獲得のメカニズムの一つとして HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor) の関与が報告されている。抗酸化剤であるプロピルガレートは低酸素状態でなくとも HIF-1 $\alpha$  を誘導することが可能であり、プロピルガレート投与による脳虚血に対する脳保護効果に関する研究を行った。ラット前脳虚血モデルにおいて、重度虚血では脳保護効果は認められなかったが、中等度虚血では脳保護効果があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recent evidence indicated that n-propyl gallate (PG), a synthetic antioxidant, activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) under normoxic conditions in cultured cells. The present study was conducted to test the hypothesis that the administration of PG may attenuate neuronal injury in a rat model of forebrain ischemia. The results indicated that intraperitoneal administration of n-propyl galate may have neuroprotective effects in a model of moderate(8min), but not severe(10min), forebrain ischemia in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：蘇生学、脳虚血

## 1. 研究開始当初の背景

心停止などによる脳傷害発生は、未だ大きな問題であり、蘇生までの時間短縮のための社会的環境整備に加え、患者自身の虚血耐性獲得法や治療の手段の確立が重要である。また、周術期においては、低血圧、心停止、脳血管遮断などあらかじめ脳血流低下に対する方策が要求される場合も多く、その確立した対応策が望まれる。虚血耐性獲得の一手段として、あらかじめ軽度の虚

血負荷を与える ischemic preconditioning が知られており、ischemic preconditioning の虚血耐性獲得のメカニズムとして hypoxia inducible factor(HIF)-1 (低酸素誘導因子) の関与が報告されている。低酸素負荷自身の生体への侵襲は大きく危険を伴うため、低酸素負荷以外の方法での HIF-1 の蓄積法が検討されている。これには二価鉄イオンに対するキレート剤や PHD や FIH-1 などの水酸化酵素を不活化する方法が考えられる。連

携研究者である広田喜一が polyphenol 類である n-propyl gallate(nPG)が非低酸素状態であつても HIF-1 $\alpha$ を蓄積させることを発見し報告してきた。

## 2. 研究の目的

nPG の投与により HIF-1 $\alpha$ の蓄積がおこり、虚血耐性獲得に作用するのではないかという仮説をたて、nPG の脳保護効果とそのメカニズムについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) n-propyl ganate の投与によるラット脳での HIF-1 の蓄積および downstream の蛋白・遺伝子の発現変化についての検討

300-350g の SD ラットを n-propyl gallate 30mg/kg 投与群、100mg/kg 投与群、300mg/kg 投与群、及び vehicle 群の 4 群に無作為に割り付ける。n-propyl gallate の投与は腹腔内投与で 4 日間施行し、4 日目に断頭し、脳組織を採取する。蛋白量はエライザ法、およびウエスタンブロット法にて測定し、遺伝子発現の定量は RT-PCR 法を用いて行う。

(2) n-propyl gallate 前投与による脳保護効果についての検討

300-350g の SD ラットでの前脳虚血モデルを用いる。前脳虚血モデルはイソフルランで麻酔導入し、気管挿管したあと、人工呼吸管理する。尾動脈にて動脈圧の連続モニターを行い、総頸動脈確保、および右外頸静脈にカテーテルを挿入する。前脳虚血は外頸静脈からの脱血により平均血圧が 35mmHg になった時点で、両総頸動脈を遮断する。遮断時間は 8 分および 10 分で、時間終了後に遮断を解除し、脱血した血液を返血する。体温は直腸温、および側頭筋温を測定し 37.5 $^{\circ}$ C を目標に維持する。ラットを、虚血操作を行わない sham 群と虚血再還流を行う群とに分け、後者をさらに n-propyl gallate 100mg/kg で前処置した群、および vehicle 群とに無作為に振り分けた。n-propyl gallate は 100mg/kg を 4 日間にわたり腹腔内投与を行い、その 4 日目に上記の前脳虚血を施行する。虚血再還流 7 日目に 4%パラホルムアルデヒドを用いて心還流を行い、脳切片を作成する。HE 染色にて海馬 CA1 領域の傷害細胞数(the number of necrotic neuron)をカウントし、n-propyl gallate の脳保護効果の関連性について検討する。

## 4. 研究成果

(1)n-propyl gallate の投与によるラット

脳での HIF-1 の蓄積および downstream の蛋白・遺伝子の発現変化についての検討

nPG の腹腔内投与により、脳組織中に HIF- $\alpha$  の発現、およびその下流の蛋白である EPO ( Erythropoietin ) や VEGF (Vascular endothelial growth factor) が発現することが確認できた

また、nPG の投与量別にみた結果、300mg/kg 群は体重減少が激しく投与量としては適切ではないと判断した。

(2) n-propyl gallate 前投与による脳保護効果についての検討

上記研究に基づき、nPG の投与量を 100mg/kg 投与とし、前脳虚血モデルを用いて検討を行った。

すべての群間で、ラットの体重、生理学的なパラメーター (体温、脈拍数など) に有意差はなかったが、虚血中の平均血圧だけ、シャム群と比較して虚血を実施した群で有意に低かった。

また、すべての群間で、虚血実施前後 10 分の時点での血液ガスデータ (pH、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>、BS、Hct など) にも有意差はみられなかった

虚血再還流施行 7 日後の脳の海馬・CA1 領域の正常神経細胞数を図 1 に示す。虚血を実施した群 (V-1-10, PG-1-10, V-1-8, PG-1-8) はシャム手術群 (V-S, PG-S) と比較し有意に正常細胞数が少なかった。

また、10 分虚血群では nPG 群も Vehicle 群も正常細胞数は同程度に少なかったが、8 分虚血群では nPG で前処置をした群のほうが有意に正常細胞数は多いという結果となった。

nPG が脳保護効果に寄与している可能性を示唆する所見であると考えられた。

図 1

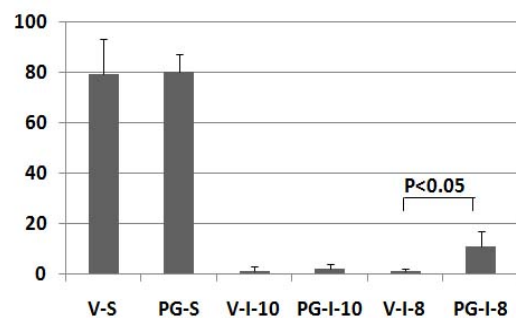
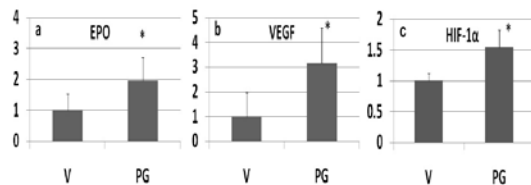


図2にEPO、VEGF、HIF- $\alpha$ -mRNA、それぞれの逆転写PCRプロトコールでの発現量を示す。nPGで前処置された群では有意に高いレベルで発現されていた。

図2



これらの結果から、nPG (100mg/kg) の腹腔内投与により、ラットの脳内に HIF- $\alpha$ 、EPO、VEGF の mRNA の発現レベルが増加することで、8 分間の前脳虚血に対する脳保護効果をもたらすことができたと考察できる。

一方、この研究では 10 分間の虚血時間ではこの効果はみられなかった。nPG の投与後、60 分間の虚血時間で研究した報告では、梗塞領域を減少させる効果はみられなかった、ということからも、severe な虚血では脳保護効果は乏しく、moderate な虚血に対しては nPG の脳保護効果が期待できる可能性が示唆された。

nPG の脳保護効果のメカニズムについては、この研究からは、HIF-1 $\alpha$  の下流の蛋白であり、造血促進因子である EPO や、血管新生の主なメディエーターである VEGF などにより HIF-1 $\alpha$  の活性化によるものが考えられる。EPO や VEGF は局所的、全脳的な脳保護効果をもたらすという報告もあり、本研究においても nPG の投与により、脳内にそれぞれ発現レベルが増加していることを確認できた。

ただ、HIF-1 $\alpha$  の活性化により hypoxic preconditioning として EPO や VEGF 以外の因子による脳保護効果の可能性も今回は検討できていないため、否定はできない。

最後に本研究に関するこれからの検討課題を示す。

nPG の投与量として 100mg/kg での単一容量での検討であったが、容量に依存して脳保護効果が増加するのか、は不明である。

nPG の投与タイミングについて、本研究では、虚血前の投与で検討を行ったが、臨床上虚血イベントが予期せぬタイミングで生じてしまう事もあり、虚血後の投与により脳保

護効果は得られるのかという視点は非常に興味深い。

nPG (100mg/kg) の腹腔内投与により、8 分間の前脳虚血に対する脳保護効果をもたらすことが認められた。そのメカニズムの一部分として、ラットの脳内に HIF-1 $\alpha$ 、EPO、VEGF の mRNA の発現レベルが増加していることが関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kawano Y, Kawaguchi M, Hirota K, Kai S, Konishi N, Furuya H. Effects of n-propyl gallate on neuronal survival after forebrain ischemia in rats. Resuscitation Vol. 83, No 2, 2011, 249-52

[学会発表] (計 2 件)

① Masahiko Kawaguchi, Yasunobu Kawano, Hiichi Hirota, Hitoshi Furuya. Effects of n-Propyl Gallate on Neuronal Survival after Forebrain Ischemia in Rats. The 38th Annual Meeting of Neurosurgical Anesthesia and Critical Care. 2010. 10. 14-15

② Masahiko Kawaguchi, Yasunobu Kawano, Hiichi Hirota, Hitoshi Furuya. Effects of n-Propyl Gallate on Neuronal Survival after Forebrain Ischemia in Rats. American Society of Anesthesiologists, 2010 annual meeting. 2010. 10. 16-20

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 安宣 (KAWANO YASUNOBU)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90423920

### (2) 研究分担者

井上 聡己 (INOUE SATOKI)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50295789

川口 昌彦 (KAWAGUCHI MASAHIKO)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60275328

佐々岡 紀之 (SASAKA NORIYUKI)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70364073

古家 仁 (FURUYA HITOSI)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70183598

(3)連携研究者

広田 喜一 (HIROTA KIICHI)  
京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  
研究者番号：00283606