

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592259

研究課題名(和文) 水溶性 リポ酸誘導体の脳保護作用の検討(磷核磁気共鳴法を用いて)

研究課題名(英文) Neuroprotective effect of fructose water-soluble alpha-lipoic acid: a 31P-NMR study

研究代表者

北野 敬明 (Kitano, Takaaki)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：20211196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)： リポ酸の抗酸化作用、抗炎症作用は従来からよく知られていたが、その水への難溶性のため使用方法が限定されていた。本課題では、その欠点を克服するために開発された水溶性 リポ酸の脳保護効果について、リンを観測核とする核磁気共鳴法を用いて、エネルギー代謝の側面から検討した。水溶性 リポ酸の灌流液への添加により、脳虚血・再灌流負荷後のエネルギー代謝の回復が有意に良好であった。この脳保護効果の機序として、リポ酸が種々のフリーラジカル種に対してラジカルスカベンジャーとして働いていることが電子スピン共鳴法により示された。

研究成果の概要(英文)： Despite its strong antioxidative and anti-inflammatory activity, application of alpha-lipoic acid has been limited due to its water-insolubility. The neuroprotective effect of a newly-developed water-soluble derivative of alpha-lipoic acid was studied using 31P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. The recovery of high-energy phosphates, ATP and phosphocreatine (energetic buffer of ATP in living cells), was significantly higher when brain slices were superfused with water-soluble alpha-lipoic acid. The electron spin resonance spectroscopy indicated a wide range of free radical scavenging activity of the water-soluble alpha-lipoic acid.

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： リポ酸 脳保護 フリーラジカル 虚血再灌流負荷 核磁気共鳴法 電子スピン共鳴法 ラジカルスカベンジャー 高エネルギーリン酸

1. 研究開始当初の背景

脳組織は虚血障害に対し非常に脆弱である。心肺停止蘇生後の脳虚血障害に対して、脳低温療法など脳蘇生療法が導入されつつあるが、その効果は限定的であり、新たな治療方法の開発が強く求められている。αリボ酸は生体内に元来備わっているビタミン様の物質であり、生体内の好氣的代謝時の補助因子としての役割と、強力な抗酸化作用を持つことで、古くから知られている。ただ従来のαリボ酸は脂溶性で水に溶けにくく、薬物製剤としての使用が困難であり、その使用方法が限定されていた。

大分大学ではこのαリボ酸の欠点を克服した水溶性αリボ酸誘導体であるジヒドロリポイル-ヒスチジン亜鉛キレート化合物(Sodium zinc histidine dithiooctanamide, DM-HisZn, 図1)をオガリサーチ

(<http://www.oga-research.co.jp/index.htm>)およびユフリサーチ

(<http://www.yufuresearch.jp/index.html>)と共同開発し、抗酸化作用、抗炎症作用、抗癌作用、脱毛抑制作用などの効果を確認している。

我々の研究グループは、リンを観測核とする核磁気共鳴法(³¹P-NMR)を用いて、ラット脳スライス中の高エネルギーリン酸の動態を *ex vivo* で測定している。高時間分解能で、同一の標本を繰り返して生きたままの状態で測定できるNMRの特性を活用して、脳虚血耐性現象(虚血、呼吸性アシドーシス)、エチルピルピン酸、フルクトース1,6-二リン酸などの脳保護効果について検討を重ねてきた(基盤研究C 2001~現在)。

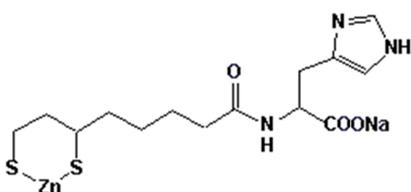


図1 水溶性αリボ酸誘導体 Sodium zinc histidine dithiooctanamide の構造 (MW 574.6)

2. 研究の目的

大分大学 麻酔科学講座と神経生理学講座では、³¹P-NMRにより生理的条件下のラットの脳スライス中の高エネルギーリン酸、即ちクレアチンリン酸(phosphocreatine, PCr)やATPを測定する実験系が確立している。我々の実験系では4分程度の時間分解能で³¹P-NMRスペクトルを長時間にわたって連続測定することができ、細胞内の高エネルギーリン酸を定量するとともに、エネルギー状態を経時的に観測することができる。我々はこれまでに灌流液の停止と再開による脳虚血-再灌流負荷や高カリウム溶液の灌流による脱分極性負荷を用いて、種々の条件下でのラットの脳スライスの虚血ストレスからの回復過程を検討してきた。また電子スピン共鳴法(ESR)を用いて、種々のフリーラジカル種を直接測定し、抗酸化作用をもつとされる薬剤による直接的なラジカル消去能を評価する実験系も確立している。

水溶性αリボ酸誘導体による脳虚血-再灌流負荷に対する保護作用に関し、³¹P-NMRによる研究は未だ報告されていない。そこで、本研究は、以下の項目を目的として実施した。

- (1) 灌流液に水溶性αリボ酸誘導体 DM-HisZn (0.01~1mM)を添加することにより、脳虚血-再灌流負荷に対する耐性が改善するか否か、³¹P-NMRにより検討する。
- (2) 試験管内で発生させた種々のフリーラジカル種をESRにより直接定量することによって、DM-HisZnによる直接的なフリーラジカル消去能を評価し、αリボ酸誘導体による抗酸化作用を解析する。

3. 研究の方法

(1) ³¹P-NMRによる脳エネルギー代謝の測定

エーテル麻酔下にラット(6週齢, ♂)を断頭し、大脳を摘出した。速やかに厚さ400μmの脳スライスを作成し、95% O₂ + 5% CO₂で酸素化した10mMブドウ糖加人工脳脊髄液(ACSF)で灌流した(27.5℃)。組織を十分に回復させた後、

NMR 分光器 (DRX-300, Bruker 社) にセットし、³¹P-NMR スペクトルを測定した。スペクトルの曲線下面積から、脳スライスに含まれる PCr 等の高エネルギーリン酸化合物を定量した。

(2) 脳虚血 - 再灌流負荷モデルによる

DM-HisZn の神経保護作用の検討

脳組織の虚血 - 再灌流負荷のモデルとして、灌流を一定時間停止して脳スライスに虚血負荷を与えた後、再び灌流を行った。DM-HisZn を添加した ACSF による灌流を行った群と対照群について、虚血 - 再灌流負荷の前後に

³¹P-NMR スペクトルを記録し、負荷に対する耐性をエネルギー代謝の側面から評価した。

(3) 神経細胞のエネルギー代謝過程とグリア細胞の役割

アストロサイトに対する選択的毒性をもつフルオロクエン酸 (fluorocitrate, FC) を添加した ACSF により脳スライスを灌流し (neuron-rich スライス), ³¹P-NMR スペクトルを測定した。これにより、神経細胞とアストロサイトのそれぞれのエネルギー代謝過程における役割を検討することができる。

(4) DM-HisZn のフリーラジカル消去能の ESR による評価

試験管内で発生させた酸素ラジカルであるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$), スーパーオキサイドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ビタミン C ラジカル (VC), *t*-ブチルペルオキシルラジカル (*t*-BuOO \cdot), メチルラジカル ($\cdot\text{CH}_3$), 窒素ラジカルである一酸化窒素 (NO), または人工安定ラジカルである DPPH を, ESR 分光器 (JES-RE1X, 日本電子) により直接測定した。反応液中に種々の濃度の Dm-HisZn を添加することにより, DM-HisZn による直接的なラジカル消去能を評価し, それぞれのラジカル種に対する IC₅₀ を算出した。

(5) 組織の過酸化に対する DM-HisZn の抑制効果の評価

ラット脳組織のホモジネートにラジカル発生系 (ヒドロキシルラジカル, 炭素中心ラジカル) を加えてインキュベートし, 脳組織中の脂質を過酸

化した。脂質過酸化の最終産物のひとつであるマロンジアルデヒドとチオバルピツール酸との付加物を 535 nm での吸光度により測定し, 過酸化の程度を定量した (TBARS アッセイ)。反応液に DM-HisZn を加えて, 過酸化の抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) ³¹P-NMR による脳エネルギー代謝の測定

³¹P-NMR のスペクトルにおいて, ATP, PCr, 糖リン酸 (SP), 無機リン酸 (Pi) などを測定することができる (図 2 の 1 段目のトレース)。このうち PCr は, ATP の濃度を一定に保つためのバッファとして, 高濃度に存在する。従って, PCr 濃度を脳組織のエネルギー状態の指標とみなすことができる。ATP と PCr は, 虚血負荷に伴って減少し (図 2 の 2 段目), やがて枯渇した (図 2 の 3 段目)。再灌流により再びピークが現れたが, 負荷前のレベルに 100% 回復することはなかった (図 2 の下 4 段)。再灌流後の PCr の回復は, DM-HisZn の濃度に依存し, 10 μM および 100 μM で対照群と比較して有意に回復を示した (図 3)。1 mM ではよい回復が認められる場合もあったが逆に劣る場合もありその分散が大きく, 有意な差は認められなかった。

ATP は再灌流 2 時間後に負荷前の約 60% にまで回復したが, 対照群と DM-HisZn 群の間に有意な差は認められなかった。

Pi の化学シフトから推定された負荷前・中・後の細胞内 pH は, 虚血負荷前に 6.8 であったものが, 虚血負荷中には 6.2 にまで低下し, 再灌流により 6.8 に復した。両群の間で差を認めなかった。

(2) 神経細胞のエネルギー代謝過程とグリア細胞の役割

灌流液に FC を添加した neuron-rich スライスでは, 再灌流 2 時間後の PCr の回復に有意な差は認められなかった (図 4)。

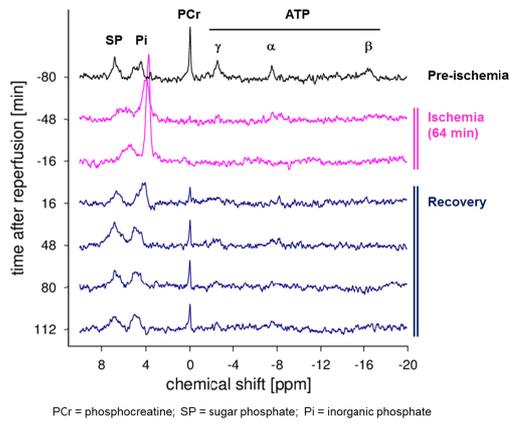


図2 虚血 - 再灌流負荷に伴う³¹P-NMR スペクトルの変化。虚血負荷に伴いATPやPCrが消失した。再灌流後に再びピークが出現したが、負荷前の水準には戻らなかった。

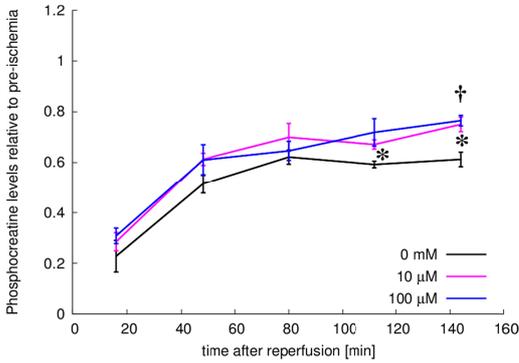


図3 虚血 - 再灌流負荷後のPCrの回復過程。10 μMおよび100 μM DM-HisZn添加により、有意に良好な回復が認められた。* p < 0.05 (10 mM vs. 0 mM), † p < 0.05 (100 mM vs. 0 mM)

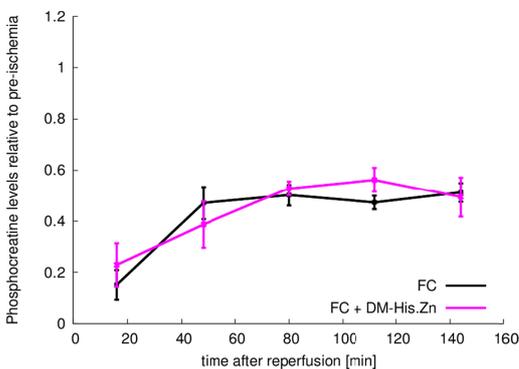


図4 Neuron-rich スライスでの虚血 - 再灌流負荷後のPCrの回復過程。DM-HisZnによる保護効果は認められなかった。

(3) ESRによるDM-HisZnのフリーラジカル消去能の測定

DM-HisZnは、検討した6種類(表)のうち5種類のフリーラジカル種に対して有意な消去能を示した。IC₅₀は以下の通りであった: •OH 10 mM (図5), O₂⁻ 2 mM, VC 0.2 mM, t-BuOO• 9 mM, DPPH 0.1 mM, NO 0.09 mM (図6)。しかし、•CH₃に対しては消去能を示さなかった。

表 フリーラジカルの発生法とスピン捕捉剤

- 対象としたフリーラジカル
 - 窒素ラジカル
 - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 安定な人エラジカル)
 - NO (NOC7法)
 - 酸素ラジカル
 - hydroxyl radicals (Fenton 反応または希H₂O₂ + UV照射法)
 - superoxide anion (濃H₂O₂ + UV照射法)
 - ascorbyl free radicals (DMSOを用いたMatsumoto法)
 - t-BuOO• (t-BuOOH + UV照射法)
 - 炭素ラジカル
 - Methyl radicals (DMSO + HO•)
- spin trapping reagent
 - DMPO または g-CYPMPO (Kamibayashi, 2007)
 - Carboxyl PTIO (NO)

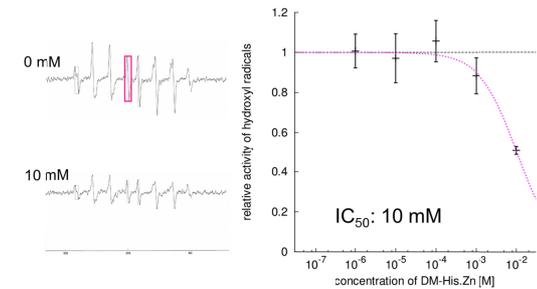


図5 ヒドロキシルラジカルの消去能

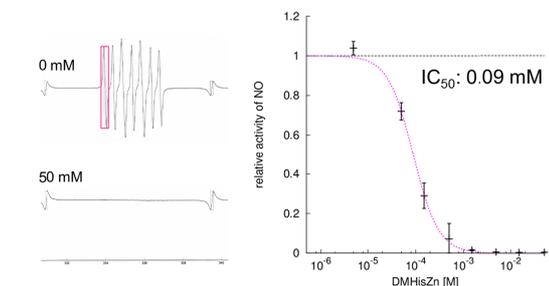


図6 NOの消去能

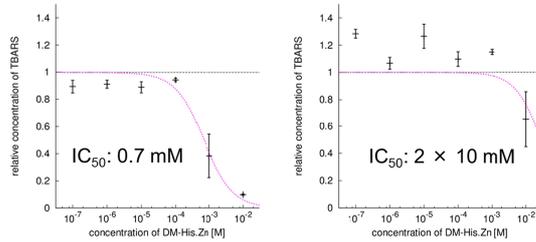


図7 ヒドロキシルラジカル(左)と炭素中心ラジカル(右)をイニシエータとする脂質過酸化のDM-HisZnによる抑制効果

(4) 脂質過酸化の阻害

TBARS アッセイにより、 $\cdot\text{OH}$ および炭素中心ラジカルをイニシエータとする脂質の過酸化を評価した。DM-HisZn は両者に対して脂質過酸化の抑制作用を示した(図7, IC_{50} はそれぞれ 0.7 mM, 2×10 mM)。

(5) 研究結果のまとめ

DM-HisZn は、ラット脳組織への虚血 - 再灌流負荷に対して、有意な保護効果を示した。

DM-HisZn は、ESR により検討した6種類のうち5種類のフリーラジカル種に対して、濃度依存的なラジカル消去能を示した。

DM-HisZn は、フリーラジカルによる脂質過酸化を濃度依存的に抑制した。

これらのことから、DM-HisZn による脳保護効果の機序として、直接的なフリーラジカル消去能が関与していることが示唆された。この消去能は、組織を傷害する作用が生体中で最も強いとされる $\cdot\text{OH}$ やそれ自身による過酸化作用は弱いながらその下流の連鎖反応で多くのフリーラジカル産生の源となる $\text{O}_2^{\cdot-}$ を含む複数のフリーラジカルに対して有意であった。DM-HisZn は、過酸化の連鎖反応の複数の箇所に対するラジカル消去能によって、虚血 - 再灌流負荷に対して保護的に作用していると考えられる。

Neuron-rich なスライスではDM-HisZn による脳保護効果が認められなかった。DM-HisZn は、アストロサイト中の抗酸化物質であるグルタチオ

ンを再生することが知られている。アストロサイトの機能が障害されたスライスでは、グルタチオン再生亢進による組織の抗酸化能の向上がみられない。このため、脳組織の虚血再 - 灌流傷害に対する保護効果が低下したと考えられる。

以上より、水溶性 リポ酸誘導体 DM-HisZn は、複数のフリーラジカル種に対する直接的なラジカル消去能とグルタチオン再生などによる間接的な抗酸化能により、虚血 - 再灌流負荷などの酸化ストレスに対する保護効果を示すことが示唆された。

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3件)

1. 徳丸治, 北野敬明, 横井功. 虚血 - 再灌流負荷に対するラットの脳エネルギー代謝の変化: ^{31}P -NMR による経時的検討日本生理学会雑誌 75(5) Pt2:31-33, 2013. (査読有)
2. Mizutani Y, Shimada M, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of a water-soluble α -lipoic acid derivative, DM-His.Zn, on rat brain tissue after ischemia-reperfusion injury: spin resonance analyses study J Physiol Sci 63:S151, 2013. (査読なし)
3. Shimada M, Mizutani Y, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on rat brain slices after ischemia-reperfusion injury: spin resonance analyses study. J Physiol Sci 63:S151, 2013 (査読なし)

(学会発表) (計10件)

1. Tokumaru O, Shuto Y, Ogata K, Yokoi I. Spectrum of dose-response relationship for

- radical scavenging activity of edaravone.
第 91 回日本生理学会大会 (2014.3.16-18, 鹿児島)
2. Suezumi K, Yamada K, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effect of water-soluble vitamin E derivatives as radical scavengers/antioxidants. 第 91 回日本生理学会大会 (2014.3.16-18, 鹿児島)
 3. 徳丸治, 北野敬明, 横井功. 水溶性 リポ酸誘導体 Dm-His.Zn のラジカル除去作用: ESR による検討. 第 4 回癌・炎症と リポ酸研究会 (2013.11.16, 大分・日出)
 4. Tokumaru O, Shimada M, Mizutani Y, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine against ischemia-reperfusion injury: a spin resonance study. 37th International Congress of physiological sciences (2013.7.21-26, Birmingham, UK)
 5. Tokumaru O, Mizutani Y, Shimada M, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Water-soluble α -lipoic acid derivative, DM-His.Zn, scavenges free radicals, inhibits peroxidation, and protects brain tissue from ischemia-reperfusion injury. 第 36 回日本神経科学大会 (2013.6.20-23, 京都)
 6. Tokumaru O, Kitano T, Yokoi I. Recovery of energy metabolism of rat brain after ischemia-reperfusion injury: a ^{31}P -NMR study. 第 90 回日本生理学会大会 シンポジウム (2013.3.27-29, 東京)
 7. Mizutani Y, Shimada M, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of a water-soluble α -lipoic acid derivative, DM-His.Zn, on rat brain tissue after ischemia-reperfusion injury: spin resonance analyses study. 第 90 回日本生理学会大会 (2013.3.27-29, 東京)
 8. Shimada M, Mizutani Y, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on rat brain slices after ischemia-reperfusion injury: spin resonance analyses study. 第 90 回日本生理学会大会 (2013.3.27-29, 東京)
 9. Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effect of CV159 on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion injury: a ^{31}P -NMR study. 第 35 回日本神経科学大会 (2012.9.18-21, 名古屋)
 10. Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of fructose-1,6-diphosphate on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion insult –a ^{31}P -NMR study–. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism (2011.05.25-28, Barcelona, Spain)
- {その他}
- ホームページ等
<http://www.med.oita-u.ac.jp/anesth/index.html>
<http://www.med.oita-u.ac.jp/seiri1/>
6. 研究組織
- 研究代表者
 北野 敬明 (KITANO TAKA AKI)
 大分大学・医学部・教授
 研究者番号: 20211196
- 研究分担者
 徳丸 治 (TOKUMARU OSAMU)
 大分大学・医学部・准教授
 研究者番号: 40360151
- 横井 功 (YOKOI ISAO)
 大分大学・医学部・教授
 研究者番号: 80150366