

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462340

研究課題名(和文)水溶性ビタミンE誘導体の脳保護作用の検討(スピン共鳴解析を用いて)

研究課題名(英文)Neuroprotective effect of vitamin E derivatives: a spin resonance 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンE誘導体(ETSGS, EPCK1)の虚血再灌流傷害に対する脳保護作用は従来から知られている。ラット脳スライス標本のエネルギー状態の変化を、リンを観測核とする核磁気共鳴法によって経時的・即時的に観察し、虚血再灌流傷害後のエネルギー状態の回復がビタミンE誘導体添加により有意に良好であることを示した。また、電子スピン共鳴法によってビタミンE誘導体の直接的フリーラジカル消去能の評価を行い、ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオン、一酸化窒素など複数のフリーラジカル種に対して有意な消去能をもつことを明らかにした。ビタミンE誘導体の脳保護作用はフリーラジカル消去能に因ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been known that vitamin E derivatives (ETSGS, EPCK1) are neuroprotective against ischemia-reperfusion injury (IRI). In the present project, ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy revealed that the recovery of the energy status in the rat brain slices after IRI was significantly better with the addition of the vitamin E derivatives. Direct free radical scavenging capacity of the derivatives were also demonstrated against multiple free radical species including hydroxyl radical, superoxide anion and nitric oxide by using electron spin resonance spectroscopy. It was suggested that the possible neuroprotective mechanisms of the vitamin E derivatives include direct radical scavenging capacity against multiple free radical species.

研究分野：医歯薬学

キーワード：虚血再灌流傷害 脳エネルギー代謝 抗酸化能 フリーラジカル消去能 ビタミンE誘導体 核磁気共鳴 電子スピン共鳴 スピン共鳴解析

1. 研究開始当初の背景

脳組織は虚血傷害に対し非常に脆弱である。心肺停止蘇生後の脳虚血傷害に対して、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。ビタミンEとビタミンCのリン酸エステルであるEPCK1やビタミンEとグルタチオンをタウリンで結合した構造をもつETSGSは、脂溶性のラジカルスカベンジャーであるビタミンEと水溶性のラジカルスカベンジャーであるビタミンCおよびグルタチオンの両者を併せ持ち、細胞膜および細胞質内の両者において、抗酸化作用を有するといわれている。EPCK1やETSGSを虚血再灌流負荷時に投与すると、組織保護効果が報告されているが、その機序はその抗酸化能による脂質、タンパク質、核酸等の酸化抑制にあるとされている(Narahiro et al., 1997; Kato et al, 2003; Koga et al, 2012; Shingu et al., 2011)。

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 (^{31}P -NMR) を用いて、ラット脳スライス中の高エネルギーリン酸(ATP, ADP, AMP 及びPCr)の動態を *ex vivo* で測定してきた。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)、エチルピルビン酸、フルクトース1,6-二リン酸、水溶性 α リポ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)。

2. 研究の目的

【 ^{31}P -NMRによる脳エネルギー代謝の経時的測定】

大分大学医学部麻酔科学講座を中心とする本研究グループは、 ^{31}P -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を測定する実験系を確立し、研究を続けている。 ^{31}P -NMRスペクトルを長時間にわたって連続測定し、細胞内の高エネルギーリン酸を定量しエネルギー状態を経時的に観測することができるシステムであり、灌流液の停止と再開による脳虚血・再灌流負荷を用いて、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。本研究課題期間の途中にNMR分光器の不具合が発生したため、課題の後半においては解析方法を ^1H -NMRメタボロミクスに一部変更した。

【ESRによるビタミンE誘導体のラジカルスカベンジ能の測定】

虚血・再灌流により発生するスーパーオキシドアニオンやヒドロキシルラジカルは、他のフリーラジカルやサイトカインによる炎症反応を惹起する因子である。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($\cdot\text{OH}$)、スーパーオキシドアニオン($\text{O}_2^{\cdot-}$)、アスコルビルフリー

ラジカル(AFR)、*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ビタミンE誘導体を添加することにより、ビタミンE誘導体による直接的なラジカル除去能を評価し、それぞれのラジカル種に対する IC_{50} を算出し、ビタミンE誘導体の脳保護作用がフリーラジカルのスカベンジ能によるものかどうかを解析した。

3. 研究の方法

【 ^{31}P -NMRによる脳エネルギー代謝の経時的測定】

セボフルラン深麻酔下にWistar系ラット(♂, 6週齢)を断頭し、速やかに大脳を摘出し、人工脳脊髄液中で冷却した(4°C)。ピプラトームを用いて400 μm 厚の脳スライスを作成し、10mMブドウ糖加人工脳脊髄液で灌流(27.5°C)しながら、NMR装置(Bruker社DRX-300wb)にセットした。

NMR装置により測定した ^{31}P -NMRスペクトルの代表的なスペクトルを図1に示す(加算回数64回, 時間分解能4分)。各々のピーク下面積を計測することにより、脳組織内の高エネルギーリン酸化合物を定量した。

虚血・再灌流負荷(灌流ポンプの停止・再灌流)に伴う高エネルギーリン酸化合物の動態を経時的に連続測定した。灌流液にEPCK1またはETSGSを添加(100, 10, 1 μM)し、上記負荷に対するエネルギー代謝の応答を時間分解能4分で解析し、ビタミンE誘導体の脳保護効果をエネルギー代謝の側面から検討した。

【ビタミンE誘導体のラジカルスカベンジ能の *in vitro* での測定】

ESRを用いて、以下のフリーラジカルに対するEPCK1及びETSGSによる直接のラジカルスカベンジ能を測定し、 EC_{50} を求めた。検討したフリーラジカルは以下の通りである。
酸素ラジカル: ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、スーパーオキシドアニオン($\text{O}_2^{\cdot-}$)、アスコルビルフリーラジカル(AFR)、*t*-ブチルペルオキシルラジカル(*t*-BuOO \cdot)
炭素ラジカル: メチルラジカル($\cdot\text{CH}_3$)
窒素ラジカル: 一酸化窒素(NO), DPPHラジカル

【 ^1H -NMRメタボロミクス解析】

本研究課題の最終年度に上記NMR分光器に不具合が生じ、長期間に渡って測定が不可能な時期が生じた。このため、最終年度は虚血再灌流負荷に伴う経時的な高エネルギーリン酸の測定を断念した。それに代えて、虚血再灌流負荷後の脳組織を採取し、組織中の代謝物、特に高エネルギーリン酸の質量分析イメージングを試みた。

4. 研究成果

(1) ^{31}P -NMR による脳エネルギー代謝の測定
 ^{31}P -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1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1の2段目)、やがて枯渇した(図1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1の下4段)。再灌流後のPCrの回復は、EPCK1とETSGSの両誘導体ともに濃度に依存性を示し、0.1 mMで対照群と比較して有意に良好な回復を示した(図2)。

ATPは再灌流2時間後に負荷前の約60%にまで回復したが、対照群とビタミンE誘導体との間に有意な差は認められなかった。

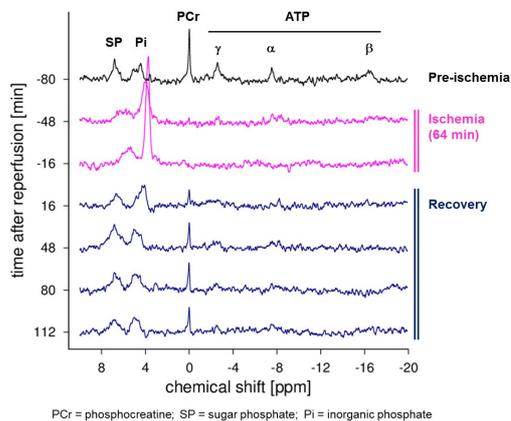


図1 虚血 - 再灌流負荷に伴う ^{31}P -NMR スペクトルの変化。虚血負荷に伴いATPやPCrが消失した。再灌流後に再びピークが出現したが、負荷前の水準には戻らなかった。

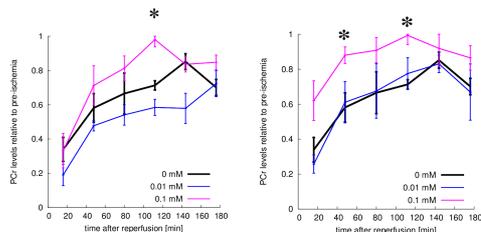


図2 虚血 - 再灌流負荷後のPCrの回復過程。0.1 mMのEPCK1(左)およびETSGS(右)添加により、有意に良好な回復が認められた。 $p < 0.05$ (0.1 mM vs. 0 mM)

(3) ESR による ETSGS のフリーラジカル消去能の測定

ETSGSは、検討した6種類のフリーラジカル種全て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： $\cdot\text{OH}$ 2×10^{-4} mM (図3)； $\text{O}_2^{\cdot-}$ 6×10^{-4} mM, AFR 2×10^{-4} mM, *t*-BuOO \cdot 2 mM, DPPH 0.8 mM, NO 3 mM。

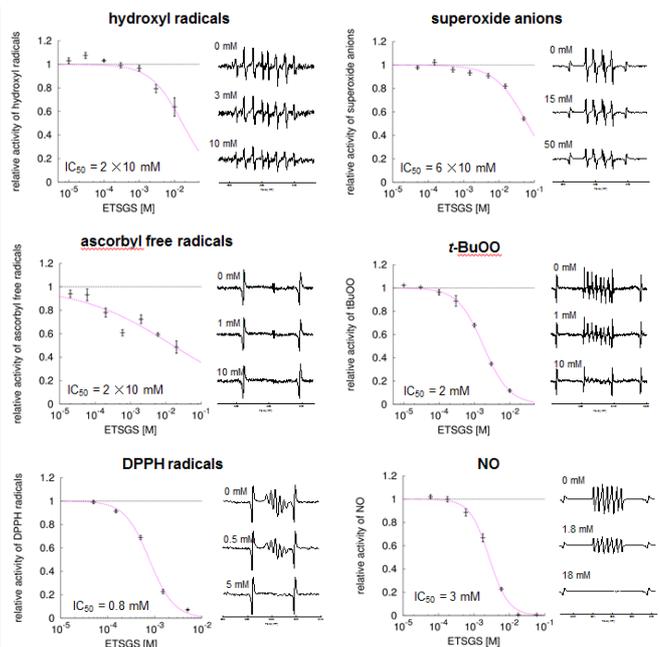


図3 ETSGSの各種フリーラジカル消去能

(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。ETSGSは $\cdot\text{OH}$ をイニシエータとする脂質の過酸化の抑制作用を示した(IC₅₀は8 mM)。炭素中心ラジカルをイニシエータとした場合にも過酸化抑制作用が認められたがIC₅₀は算出できなかった。

(5) NMR メタボロミクス

大分大学工学部が保有するNMR分光器を用いて、虚血再灌流負荷に伴う脳スライス中の ^1H -NMRメタボロミクス解析の準備を進めた。他の研究経費により購入済みの解析ソフト用データベースを関連する研究課題の助成金と合わせて導入した。最適のNMRのパルスシーケンスの選択(水消し処理等)を行い、試験的なスペクトル取得に成功したが、虚血再灌流負荷に伴う脳組織中の高リン酸化合物の解析には至らなかった。

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 5 件)

(1) Tokumaru O, Abe S, Goto M, Tandai-Hiruma M, Kemuriyama T, Maruyama S, Kanamaru Y, Ogata Y, Nishida Y. The dynamics of energy metabolism in brain after ischemia/reperfusion injury: an animal model study using high-Gz acceleration. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 37(1_suppl):461, 2017.

<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0271678X17695990> (査読なし)

(2) Abe S, Kumatani J, Nagai S, Minamikawa Y,

Tokumaru O, Hiruma M, Kemuriyama T, Maruyama S, Ono K, Nishida Y. The dynamics of blood circulation and high energy phosphates in ischemia/reperfusion injury caused by applying high gravity in mouse brain. *J Physiol Sci* 67(Suppl 1):S147, 2017. (査読なし)

(3) Goto M, Shimura F, Tokumaru O, Kemuriyama T, Hiruma M, Maruyama S, Ogata K, Hanada R, Nishida Y. The dynamics of blood circulation and high energy phosphates in ischemia/reperfusion injury in mouse brain. *J Physiol Sci* 66(Suppl 1):S182, 2016. (査読なし)

(4) Wakayama A, Mizutani Y, Shimada M, Tokumaru O, Ogata K, Uchino T, Kitano T, Yokoi I. Multiple free-radical scavenging activity of alpha lipoic acid derivatives: an ESR study. *J Physiol Sci* 65(Suppl 1):S157, 2015. (査読なし)

(5) Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Hypoperfusion-reperfusion injury and reactive oxygen species: spin resonance analyses. *J Physiol Sci* 65(Suppl 1):S41, 2015. (査読なし)

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) Tokumaru O, Abe S, Goto M, Tandai-Hiruma M, Kemuriyama T, Maruyama S, Kanamaru Y, Ogata Y, Nishida Y. The dynamics of energy metabolism in brain after ischemia/reperfusion injury: an animal model study using high-Gz acceleration.

28th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, 2017.4.1-4, Berlin (Germany)

Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 37(1 suppl):461, 2017.

<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0271678X17695990>

(2) Abe S, Kumatani J, Nagai S, Minamikawa Y, Tokumaru O, Hiruma M, Kemuriyama T, Maruyama S, Ono K, Nishida Y. The dynamics of blood circulation and high energy phosphates in ischemia/reperfusion injury caused by applying high gravity in mouse brain.

第 94 回日本生理学会大会, 2017.3.28-30, アクティシティ浜松 (静岡県・浜松市)

(3) 梅田涼平, 高成広起, 松本重清, 北野敬明, 徳丸治, 小野克重. 水溶性スタチン, フルバスタチンの持つフリーラジカル消去能の検証, 第 7 回癌・炎症と抗酸化能研究会, 2016.11.25-26, ホテル別府パストラル (大分県・別府市)

(4) 河島毅之, 岡本啓太郎, 溝口貴之, 松本重清, 西田欣広, 宮本伸二, 徳丸治, 北野敬明. 周術期の血液に検出されるアスコルビン酸フリーラジカル. 第 7 回癌・炎症と抗酸化能研究会, 2016.11.25-26, ホテル別府パストラル (大分県・別府市)

(5) 徳丸治, 松本重清, 岡本啓太郎, 溝口貴之, 尾方和枝. 北野敬明. 周術期の血液から

検出されるアスコルビン酸フリーラジカルについて. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016.08.30-31, 仙台国際センター会議棟 (宮城県・仙台市)

(6) Goto M, Shimura F, Tokumaru O, Kemuriyama T, Hiruma M, Maruyama S, Ogata K, Hanada R, Nishida Y. The dynamics of blood circulation and high energy phosphates in ischemia/reperfusion injury in mouse brain. 第 93 回日本生理学会大会, 2016.3.22-24, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

(7) Tokumaru O, Matsumoto S, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Dose-response relationship of the selective ultra short-acting β 1 blocker, ONO-1101, as a free radical scavenger. 第 38 回日本神経科学大会, 2015.7.28-31, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

(8) Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Evaluation of scavenging activity against multiple species of free radicals by electron spin resonance spectroscopy. XXVIIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, 2015.6.27-30, Vancouver (Canada)

(9) 徳丸治, 松本重清, 尾方和枝, 北野敬明, 横井功. 超短時間作用型 β 1 選択的遮断剤ランジオロールのフリーラジカル消去能. 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2015.6.11-12, かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

(10) Wakayama A, Mizutani Y, Shimada M, Tokumaru O, Ogata K, Uchino T, Kitano T, Yokoi I. Multiple free-radical scavenging activity of alpha lipoic acid derivatives: an ESR study. 第 92 回日本生理学会大会, 2015.3.21-23, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

(11) Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Hypoperfusion-reperfusion injury and reactive oxygen species: spin resonance analyses. 第 92 回日本生理学会大会, 2015.3.21-23, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

(12) 若山愛海, 徳丸治, 尾方和枝, 内納智子, 松本重清, 北野敬明, 横井功. 水溶性 α リポ酸誘導体 DHL-Tau.Zn のラジカル消去能: ESR による検討. 第 5 回癌・炎症と抗酸化研究会 シンポジウム, 2014.11.14, 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市)

(13) Tokumaru O, Shuto Y, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Edaravone, a radical scavenger, may behave as a prooxidant. 第 37 回日本神経科学大会, 2014.9.11-13, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 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

(2)研究分担者

徳丸 治 (TOKUMARU, Osamu)

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：40360151

古賀 寛教 (KOGA, Hironori)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50468013

江島 伸興 (ESHIMA, Nobuoki)

京都大学・高大接続・入試センター・特定
教授

研究者番号：20203630