

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日

研究種目:	基盤研究 (C)
研究期間:	2007 年～2008 年
課題番号:	19580157
研究課題名(和文)	カルニチンによる虚血性脳障害に対する神経細胞保護作用と神経機能改善に関する研究
研究課題名(英文)	The Effects of Carnitine on the Protection of Neuronal Damages under Ischemic Condition
研究代表者	田中康一 (TANAKA YASUKAZU) 財団法人 東京都高齢者研究・福祉事業財団 東京都老人総合研究所、研究員 研究者番号: 40101258

研究成果の概要：加齢とともに罹病危険率が増加する脳血管性認知症は脳血管の梗塞、栓塞、出血等が原因となるが、本研究では、これらの脳血管性脳機能障害の予防方策および改善方策を探ることを目的としている。カルニチンは脂肪酸からのエネルギー産生に重要な働きをする生体物質である。脳も含めた体内カルニチンレベルは老齢で低下するが、カルニチンの補充が正常老化における神経機能や認知機能を活性化することを明らかにして来た。本研究ではカルニチンのアセチル誘導体であるアセチル-L-カルニチン(ALCAR)の虚血傷害による神経細胞死抑制効果と、虚血回復後の神経細胞回復への同生体物質の効果を初代培養神経細胞を用いて明らかにするとともに、その効果のメカニズムを明らかにすることを目標とした。ラット脳の初代培養神経細胞を低酸素・低グルコース状態に曝し、その後、脳虚血後の血流再開を模すために通常の酸素とグルコース濃度を含む培地で培養を続けた時の神経細胞生存に与えるALCARの効果を調べた。低酸素・低グルコース処理3日前から培養メディアウムにALCARを添加することにより細胞内カルニチンレベルを上昇させるとカルニチンが脳虚血時の神経細胞死を抑制し、かつ血流再開後のグリオーシスを促進することで脳梗塞等の外的傷害による脳傷害を抑制する有益な効果を有することを強く示唆する結果を得た。ウエスタンブロットによって脳虚血時にカルニチン存在下で発現が変化するタンパク質を解析したところ、Heat Shock Protein 72とHeme Oxygenase1が増加し、Bcl-2およびGRP75が減少した。ALCARがこれらのタンパク質の発現変化を誘導し脳虚血時の細胞死を抑制している可能性が示唆された。老齢期にカルニチンを補充し脳のカルニチンレベルを上昇させることは脳梗塞等の脳虚血疾患による脳神経組織破壊の予防、回復に有効な手段である。

交付額

(金額単位：円)

年 度	直接経費	間接経費	合 計
2007年	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年	1,300,000	390,000	1,690,000
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：虚血、カルニチン、培養神経細胞、神経細胞死、熱ショックタンパク質、

1. 研究開始当初の背景

L-カルニチンはミトコンドリアでの脂肪酸のβ酸化によるエネルギー産生に必須な生体物質として知られている。カルニチンの生合成は主に肝臓で行われるが、大部分は肉や魚等の動物性の食餌から供給されることから重要な栄養素の一つといえる。近年、本物質にはエネルギー代謝への関与以外に多様な生理活性があることが明らかになりつつある。特に、カルニチンがアルツハイマー痴呆の改善薬として注目され、1980年代から今日までヒトへ投与試験がいくつか報告されている。その有効性についてはコンセンサスは得られていない。しかし、本物質が初代培養神経細胞のアポトーシスによる細胞死を防ぐこと、また、ラット皮質ニューロンやヒト神経芽細胞のアミロイドβタンパク質による細胞死を抑制すること等、L-カルニチンのニューロン生存に関する報告がなされている。

我々は、若齢と老齢のラットを用いて脳機能とカルニチンの加齢変化について以下の点を明らかにしている。①脳、骨格筋、心筋のカルニチンレベルが老齢で減少し、カルニチンの経口投与でこれらが若齢レベルに回復する。②アセチル-L-カルニチン（カルニチンのアセチル化誘導体）を長期間投与すると老齢脳のコリン作動性シナプス機能が活性化し、迷路学習テストの学習効率を改善する。これらの結果は、老齢で減少する脳内カルニチンレベルをサプリメントとして補充することで老化に伴う脳機能低下が改善され得ることを示すものである。また、最近の我々は初代培養神経細胞において脳虚血を模した低酸素-低グルコース条件下での神経細胞死を抑制することを見いだした。これらの知見は、「カルニチンが脳虚血性疾患による脳機能障害を予防・改善する」との作業仮説を提起させるものである。

2. 研究の目的

本研究では、食品栄養としてのカルニチンによる虚血性脳疾患による神経細胞死の予防や機能改善への効果とメカニズムを行動学的ならびに神経化学的に明らかにすることを目的とした。そのためラット胎仔大脳皮質より調製した初代培養神経細胞を用いるモデル実験系で、①虚血性脳神経細胞傷害に対するカルニチンの保護作用の特性を神経化学的に明らかにするとともに、②カルニチンによる発現修飾を含めたタンパク質変化と細胞死保護作用のメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

1) ラット胎児大脳皮質から神経細胞の調製と培養: 妊娠ラット(Wistar, E18)より胎児を摘出し、その大脳皮質をDispaseを入れた60 mmディッシュに移し、37°C、5分間インキュベートした。パスツールピペット trituration で細胞の解離させた後、さらに37°C、10分間インキュベートし細胞が完全に分散させた。神経細胞をDMEM (serum free) で洗浄し、1,000 g、5分間の遠心で細胞を集め、再びDMEMを2 mlを加えて神経細胞分散液を得た。細胞分散液を defined Hormone Mixture を添加した MEM/F12 で希釈し Polyethyleneimine をコートした 48 ウェルプレートと 4 ウェルプレートに細胞密度が $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ になるように播種した。defined Hormone Mixture の組成は以下の通りである。0.6% glucose, 3 mM NaHCO₃, 2 mM glutamine, 5 mM HEPES, 25 ug/ml insulin, 20 nM progesterone, 1 fM estradiol, 30 nM selenium, 60 μM putrescin, 1 mg/ml transferrin。培養3日目と6日目に、培養メディウムの1/2を4%のFBSを含む上記DMEM/F12 メディウムと交換した。培養9日目以降は、2%のFBSを含むDMEM/F12にALCARを最終濃度が10, 100 μMになるように添加した。

2) 低酸素・低グルコースの暴露: 培養14日目に、DMEM/F12 メディウムを回収し、ウェルをPBS(-)で1回洗浄した。窒素ガスを30分間バブリングし酸素を置換したグルコースを含まない Krebs-Ringer 溶液を添加し、窒素ガスインキュベーター内に2時間インキュベートした。グルコースを含む Krebs-Ringer 溶液で、CO₂インキュベーターでインキュベートした細胞をコントロールとした。低酸素・低グルコース状態でインキュベートした後、先に回収したメディウムと2% FBSを含む新鮮なDMEM/F12を1:1に混合し各ウェルに加え、CO₂インキュベーターでさらに24時間インキュベートした。

3) 細胞生存率の測定: WST8 assay: 10%のWST8試薬を含むDMEM/F12をウェルに250 μlずつ加えCO₂インキュベーターで3時間インキュベートした。各ウェルのメディウムを110 μlずつ吸光度測定用の96ウェルプレートに移し、さらに1% SDSを10 μlずつ添加し反応を停止させた。反応液の450 nmにおける吸光度をAmersham Biotrak IIを用いて測定した。

4) 細胞染色による生存細胞数の測定: 虚血実験終了後メディウムを取り除き、細胞を Krebs-Ringer 溶液で2回洗浄した後、4% paraformaldehydeを加え30分室温に放置し細胞を固定した。細胞を固定した後、ウェルをブロッキングするために5%ウマ血清を含むPBSを加え4°Cで3時間放置した。一次抗体として抗MAP2抗体と抗GFAP抗体を2.5%馬血清と0.05% Tween 20を含むPBSでそれぞれ1/1000に希釈して各ウ

エルに加え 4°Cで一晩放置した。翌日 PBS で 10 分間ずつ 5 回洗浄した後、二次抗体として horse radish peroxidase を結合させた抗マウス IgG と抗ウサギ IgG を PBS (2.5% ウマ血清, 0.05% Tween 20) にそれぞれ 1/250 に希釈して各ウェルに加え室温で 3 時間放置した。その後再び PBS で 10 分間ずつ 5 回ウェルを洗浄した。洗浄終了後 diaminobenzidine tetrahydro-chloride (Sigma) を添加し室温で 15 分間反応させた。顕微鏡で染色状態を確認し、PBS で 3 回洗浄した。この時一次抗体を添加せずに染色した細胞をコントロールとした。

5) ストレスタンパク質およびアポトーシス関連タンパク質のウェスタンブロッティングによる発現解析: 脳組織あるいは培養神経細胞から調製した試料を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて分離後、PVDF膜に転写する。転写PVDF膜をブロッキング後、特異抗体で抗原抗体反応を行った。熱ショックタンパク質の発現は、抗HSP70抗体、抗GRP75抗体、抗ヘムオキシゲナーゼ-1抗体、抗KDEL抗体 (GRP78とGRP94) を用いて調べた。③1次抗体反応後のPVDF膜を洗浄し、HRPで標識した2次抗体を反応させる。④PVDF膜を洗浄後、Immobilon Western (Millipore) と反応させた。生じた化学発光をイメージアナライザーで検出し、目的タンパク質の量的変化を測定した。

4. 研究成果

1) カルニチンの神経細胞保護作用

本実験では胎生 18 日のラット胎児から調製した培養神経細胞を脳虚血に模したプロトコールで処理した。即ち、培養神経細胞を一定時間、低酸素・低グルコース状態に曝し、その後、脳虚血後の血流再開を模するために通常の酸素とグルコース濃度を含む培地で培養を続けた時の神経細胞生存に与える ALCAR の効果を調べた。

抗 MAP2 抗体、並びにヘマトキシリンで虚血暴露後の細胞をみると、カルニチン欠乏状態では細

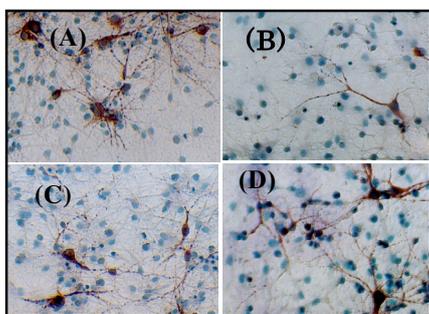


図1 ラット初代培養神経細胞の低酸素・低グルコース (OGD) に対するカルニチンの効果 (A) Normoxia (Control), (B) OGD, (C) OGD + 10 μ M ALCAR, (D) OGD + 100 μ M ALCAR

胞死が顕著であるのに対して、ALCAR を添加した細胞では細胞死が抑制された (図 1)。

神経細胞マーカーである NF68 抗体で Western blot を実施し神経細胞の生存率を測定したところ、図 2 に示すように ALCAR 無添加のカルニチン欠乏神経細胞では低酸素・低グルコース暴露によって細胞生存率は約 10%であった。一方、低酸素・低グルコース処理 3 日前から培養メディアウムに ALCAR を添加することにより細胞内カルニチンレベルを上昇させると、神経細胞の低酸素・低グルコース暴露後の生存率が大幅に増加した。細胞生存率の増加は 50 μ M の ALCAR を培養メディアウムに添加したときよりも 100 μ M ないし 200 μ M の ALCAR を添加したときの方が有意に高かったことから、ALCAR の神経細胞生存への効果は濃度依存的といえる。

実際の脳梗塞治療現場では血栓溶解療法による血流再開が行われている。一時的な血流過剰により神経細胞死がさらに誘導される危険性も示唆されている。そこで、脳虚血後の血液の再灌流を模して細胞を低酸素・低グルコース暴露した後、通常の状態 (酸素、グルコース存下) でさらに 48 時間、72 時間培養した場合の細胞生存率を WST-8 で測定した。図 3 に示すように、低酸素低グルコース暴露後、細胞を通常のメディアウムで培養を続けると、細胞の増殖がみられる。これは GFAP 陽性細胞、即ちグリア細胞の増殖によるグリオシスと呼ばれる現象と考えられる。このグリア細胞の増殖がカルニチン欠乏状態に比べてカルニチン補充すると促進されていることが明らかとなった。これらの結果は、老齢期にカルニチンを補充し脳のカルニチンレベルを上昇させることは脳虚血傷害時に神経細胞死を抑制しつつ、再灌流後の障害回復に有益な効果をもたらすものと考えられる。

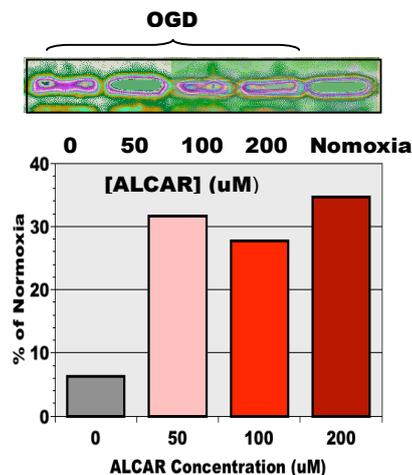


図2 Western blot (抗 NF68 抗体) によるラット初代培養神経細胞の低酸素・低グルコース (OGD) に対するカルニチンの効果の判定結果

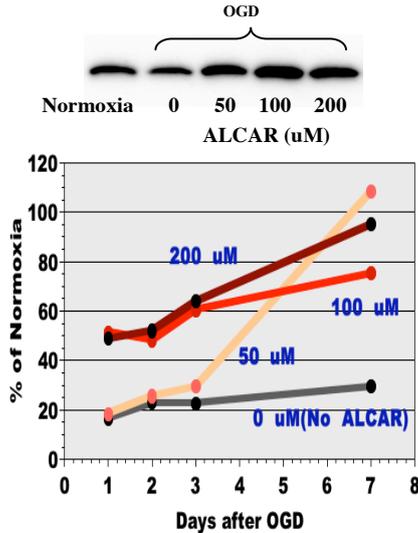


図3 Western blot (抗 GFAP 抗体) によるラット初代培養神経細胞の低酸素・低グルコース (OGD) 後のグリア細胞の増殖に対するカルニチンの効果

2) カルニチンによるストレスタンパク質の発現

一般に、ストレスタンパク質と呼ばれる一群のタンパク質は様々な神経傷害が発生した後に誘導される。その中で Heat Shock Protein-70 (HSP70) は *in vitro* でニューロンをグルタミン酸の毒性から守るストレスタンパク質である。またこのタンパク質は、短時間の致死以下の虚血条件下で形成される虚血耐性に関与し、再度の致死的な虚血アタックから海馬を守るタンパクと考えられている。多くの耐性モデルを用いた研究で HSP70 が短期間の虚血後に発現されることが報告されている(1)。抗 HSP70 抗体や非特異的な HSP 合成阻害剤が虚血に対する耐性形成を阻害する(2)。

本研究で示された ALCAR による低酸素・低グルコース時の神経細胞死の抑制効果の発揮にこのようなストレスタンパク質の発現が関与している可能性が考えられた。そこで Western blot を用いて、低酸素・低グルコース暴露後 24 時間のタンパク質発現変化を調べた。図 4(A) に示すように低酸素・低グルコース暴露前にカルニチンを添加した細胞では HSP70 の発現が有意に増加した。この結果は、カルニチンが脳虚血ストレスに応答し HSP70 の誘導を促進したことを示唆する。また、Heme oxygenase-1 は脳に限らず肝臓や腎臓で虚血などの刺激によって誘導される。図 4 (B) に示すように、培養神経細胞においても虚血暴露によって誘導されるが、カルニチンがその誘導を促進した。HO-1 は hemoglobin を分解し一酸化炭素を産生する。種々のストレス時に HO-1 が誘導され血液循環調節因子の一酸化炭素が産生されることで虚血傷害を抑制する役割を持つものと考えられるが、カルニチンはこの点においても有益な効果を有すると思われる。

虚血傷害による細胞死はネクローシスとアポトシスの二つのモードが関与する。ミトコンドリアに局在するタンパク質である Bcl-2 はネクローシスとアポトシスの両モードの細胞死を抑制する因子として知られているため、カルニチンによってその発現が増加することが期待された。しかしながら、本実験ではカルニチン処理によってむしろ発現が抑制される結果を得た。細胞死抑制機能を有するため変性疾患の治療への応用の観点からも注目されている。図 4 (C) と (D) に示すようにこれら二つのミトコンドリアタンパク質は低酸素・低グルコース暴露の際、カルニチンによってむしろその発現が抑制される結果を得た。脳虚血傷害時のカルニチンによる神経細胞死の抑制効果はカルニチンによっていくつかのタンパク質の発現の変化を伴うものであることが本研究によって明らかとなった。

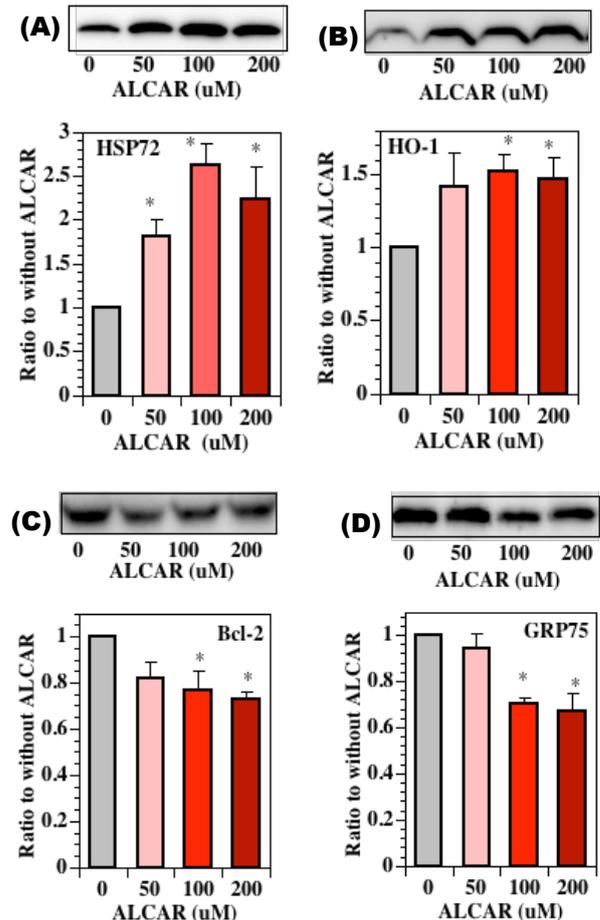


図4 低酸素・低グルコース (OGD) 暴露したラット初代培養神経細胞におけるシャペロンタンパク質の発現に対するカルニチンの効果

A: HSP72; B: Heme Oxygenase 1; C: Bcl-2; D: GRP75

さらに、Glucose Related Protein-75 (Grp75)もミトコンドリア内膜に存在するタンパク質で、ミトコンドリアマトリックス内へタンパク質を輸送する役割を担う。hsp70と同族体であり、かつ、低酸素や低血糖によってupregulateされて細胞ダメージの際して防御的役割を果たすとされる。しかし、図4Dに示すように本タンパク質もBcl-2と同様にカルニチン処理でその発現が減少した。これらの結果は予想に反するものであるが、タンパク質の発現のタイムラグが影響している可能性が考えられるため、今後、本研究で注目した虚血傷害を防ぐと考えられるタンパク質群の発現のタイムコースを知る必要がある。

参考文献

1) Kirino T, Tsujita Y, Tamura A (1991) Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:299-307.

2) Nakata N, Kato H, Liu Y, Kogure K (1992) Effects of pretreatment with sublethal ischemia on the extracellular glutamate concentrations during secondary ischemia in the gerbil hippocampus evaluated with intracerebral microdialysis. *Neurosci Lett* 138:86-88.

5. 主な発表論文等

(1)原著論 (計1件)

(1) Furusawa H, Sato Y, Tanaka Y, Inai Y, Amano A, Iwama M, Kondo Y, Handa S, Murata A, Nishikimi M, Goto S, Maruyama N, Takahashi R, Ishigami A.
Vitamin C is not essential for carnitine biosynthesis in vivo: verification in vitamin C-depleted senescence marker protein-30/gluconolactonase knockout mice., *Biol Pharm Bull.*, 2008; 31(9):1673-1679.

(2)学会発表 (計6件)

1) 古澤元、後藤佐多良、高橋良哉、田中康一、丸山直記、石神昭人、「カルニチン合成へのビタミンC関与の検討」第30回 日本基礎老化学会 北海道厚生年金会館、6月20-22日、2007

2) 田中康一、岩本真知子、脇 初枝、小林 悟、「カルニチンの老齡脳機能改善効果と神経細胞保護効果」第16回 日本脂質栄養学会 ウェルシティ島根、9月1-2日、2007

3) 戸田年総、中村 愛、岩本真知子、森澤 拓、廣田三佳子、「比較セクレトーム解析を目的とした二次元ディファレンシャルゲル電気泳動(2D-DIGE)の実施法と最適化と PDQuest による定量的比較分析法の検討」第80回 日本生

化学大会合同大会、パシフィコ横浜、2007、12月11-16日、

4) 深見裕之、立元秀樹、岸 幹也、加賀孝之、小林 悟、脇 初枝、田中康一
酢酸菌脂質の脳機能改善効果、第17回 日本脂質栄養学会 2008、9月5-6日

5) 戸田年総、中村愛、森澤拓、岩本真知子
シアニン系蛍光標識試薬を用いたタンパク質内フリーチオールレベルの定量分析法に関する基礎的検証、第59回日本電気泳動学会総会 2008、11月15-16日

6) 深見裕之、立元秀樹、岸 幹也、加賀孝之、小林 悟、脇 初枝、田中康一
酢酸菌脂質の脳機能改善効果、第1回 セラミド研究会 学術集会、2008、11月21日

研究組織

研究代表者：田中康一（東京都老人総合研究所、老化ゲノム機能主任研究員）

研究分担者：小林 悟（東京都老人総合研究所、老化ゲノム機能研究員）

研究分担者：岩本真知子（東京都老人総合研究所、老化ゲノム機能研究員）