

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592304

研究課題名(和文)カルニチンエステルの脳保護作用：スピン解析による検討

研究課題名(英文)Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine against ischemia-reperfusion injury:  
a spin resonance study

研究代表者

徳丸 治 (Tokumaru, Osamu)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40360151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳組織は血流の途絶(虚血)に対し非常に脆弱である。脳の虚血傷害に対してさまざまな脳蘇生療法が導入されつつあるが、いまだその効果は限定的であり、新たな治療方法の開発が必要である。アセチル-L-カルニチン(ALCAR)は生体内に存在する化合物であり、クエン酸回路へのエネルギー源の供給と抗酸化作用によって脳保護効果を有するといわれている。

本研究課題は、ALCARの脳エネルギー代謝への効果を核磁気共鳴法によって、抗酸化能を電子スピン共鳴法によって評価した。虚血負荷からの回復時の脳エネルギー代謝の改善と直接的なフリーラジカル消去能が、ALCARの脳保護効果の機序であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuroprotective effect of acetyl-L-carnitine (ALCAR) on rat brain slices after ischemia/reperfusion injury was investigated by  $^{31}\text{P}$ -NMR and ESR spectroscopy. Energetically, ALCAR was neuroprotective in normal brain slices. ALCAR demonstrated antioxidative activity against some free radical species, but it also showed rather prooxidative activity against others at higher concentrations. Those findings suggest that ALCAR acts as energy substrate and antioxidant in protecting brain tissue from ischemia/reperfusion injury, but may act as prooxidant at higher concentration.

研究分野：生理学

キーワード：アセチル-L-カルニチン、脳保護、核磁気共鳴法、電子スピン共鳴法、フリーラジカル、抗酸化能、ラジカル消去能、高エネルギーリン酸

### 1. 研究開始当初の背景

脳組織は虚血傷害に対し非常に脆弱であり、心肺停止蘇生後の脳虚血傷害に対して脳低温療法などの脳蘇生療法が導入されつつある。しかし、いまだ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。多くの薬剤はその副作用のために十分な脳保護作用を得ることが難しく臨床応用に至っていない。

Acetyl-L-carnitine (ALCAR) は、生体内に存在するグアニジノ化合物であり、副作用を避けて十分な量を投与することが可能といわれている。ALCAR を虚血 - 再灌流負荷時に投与すると、(1) TCA 回路への acetyl-CoA の供給、(2) 抗酸化能による過酸化抑制、(3) 興奮毒性の抑制の3つの機序により脳保護効果を示すといわれている (Zanelli et al., 2005)。

我々は、リンを観測核とした核磁気共鳴法 ( $^{31}\text{P}$ -NMR) を用いてラットの脳スライス中の creatine phosphate (PCr) や ATP 等の高エネルギーリン酸を経時的に連続して定量し、各種薬剤の脳保護効果について脳エネルギー代謝の観点から報告してきた (Kitano et al., 2002; Kitano et al., 2003; Tokumaru et al., 2006; Tokumaru et al., 2009)。また、フリーラジカル種を直接測定する唯一の手段である電子スピン共鳴法 (ESR) により、それら薬剤のラジカルスカベンジ能の評価も合わせて行ってきた (Yokoi et al., 2006; Matsumoto, Koga, Yokoi et al., 2010)。

### 2. 研究の目的

本研究は、虚血 - 再灌流負荷に対する ALCAR の脳保護作用について想定される3つの機序のうち、脳組織のエネルギー代謝および抗酸化能という2つの側面から評価した。即ち、 $^{31}\text{P}$ -NMR によりエネルギー代謝を、ESR によりフリーラジカル除去能を検証し、ALCAR の脳保護作用の機序を明らかにすることを目的として実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 虚血再灌流負荷時の脳エネルギー代謝の  $^{31}\text{P}$ -NMR による評価

大分大学神経生理学講座と麻酔科学講座は、 $^{31}\text{P}$ -NMR を用いて生理的条件下のラットの脳スライス中の PCr や ATP 等の高エネルギーリン酸を経時的に連続して定量し、脳エネルギー代謝を測定する実験系を共同で確立した (Kitano et al., 2002; Kitano et al., 2003; Tokumaru et al., 2006; Tokumaru et al., 2009)。我々のシステムでは、4 分の時間分解能で同一試料中の高エネルギーリン酸を連続的に定量し、そのエネルギー状態を 8 時間以上にわたって安定的に観測できる。

Wistar 系ラット (♂, 6 週齢) をエーテル深麻酔下に断頭し、速やかに大脳を摘出し、冷やした (4°C) 10 mM ブドウ糖加工脳脊髄液 (ACSF) 中で冷却した。ピプラトームを用いて 400  $\mu\text{m}$  厚の脳スライスを作成し、ACSF で灌流 (27.5°C) しながら、NMR 分光

器 (Bruker 社 DRX-300wb) により、 $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルを測定した (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) を与え、虚血負荷中および再灌流による回復過程における高エネルギーリン酸の動態を経時的に連続して測定した。灌流液に ALCAR を濃度を変化させて添加し、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 分で記録した。

(2) ALCAR の直接的ラジカルスカベンジ能の ESR による評価

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 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), ビタミン C ラジカル (VC), *t*-ブチルペルオキシラジカル (*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 ( $\cdot\text{NO}$ ), または人工安定ラジカルである DPPH を試験管内で発生させ、ESR 分光器 (JES-REIX, 日本電子) により直接測定した。反応液中に種々の濃度の ALCAR を添加することにより、ALCAR 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<sub>50</sub> を算出した。

(3) 組織の過酸化に対する ALCAR の抗酸化能の評価

ラット脳組織のホモジネートにラジカル発生系 ( $\cdot\text{OH}$ , 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させ、チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) として定量した (TBARS アッセイ)。反応液中に種々の濃度の ALCAR を加え、過酸化の抑制を定量し、IC<sub>50</sub> を算出した。

### 4. 研究成果

(1) 虚血 - 再灌流負荷時の脳エネルギー代謝

$^{31}\text{P}$ -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)。このうち PCr は、ローマン反応により 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枯渇した。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。再灌流後の PCr の回復は、ALCAR の濃度に依存し、0.1 mM のときに対照群と比較して有意に良好な回復を示した (図 2)。0.01 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 50% にまで回復したが、対照群と ALCAR 群との間に有意な差は認められなかった (図 3)。

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 6.2-6.3 にまで

低下し、再灌流により 6.9-7.0 に復した。両群の間で差を認めなかった (図 4)。

(2) 神経細胞のエネルギー代謝過程とグリア細胞の役割

グリアに対して選択的毒性をもつフルオロクエン酸を灌流液に添加した neuron-rich スライスでは、再灌流 2 時間後の PCr や ATP の回復に有意な差は認められなかった (図 5, 6)。

Pi の化学シフトから推定された負荷前の細胞内 pH は、ALCAR 群が 6.7 であったのに対し対照群は 6.9 で有意な差を認めた。虚血負荷中及び再灌流後には両群の間で差を認めなかった (図 7)。

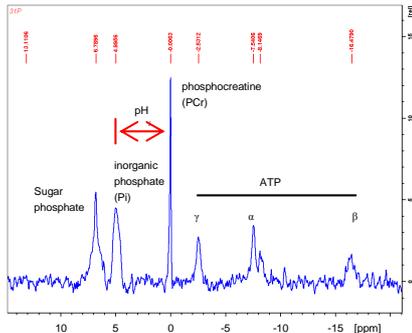


図 1 ラット脳の  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトル

左より、糖リン酸 (SP), 無機リン酸 (Pi), クレアチンリン酸 (PCr), ATP の 3 つのリン酸基 ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) が分離して検出された。

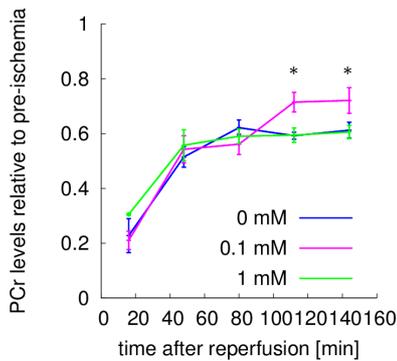


図 2 虚血 - 再灌流負荷後の PCr の回復過程

0.1 mM ALCAR 添加により、有意に良好な回復が認められた (\* $p < 0.05$ )。

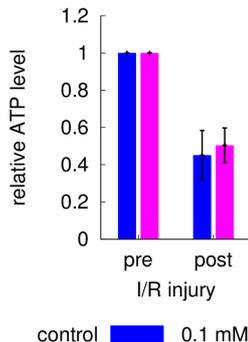


図 3 虚血 - 再灌流負荷後の ATP の回復

ALCAR 添加による回復の改善は認められなかった。

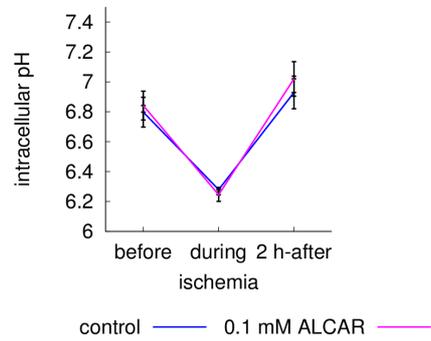


図 4 虚血 - 再灌流負荷に伴う細胞内 pH の変化 ALCAR 添加による差は認められなかった。

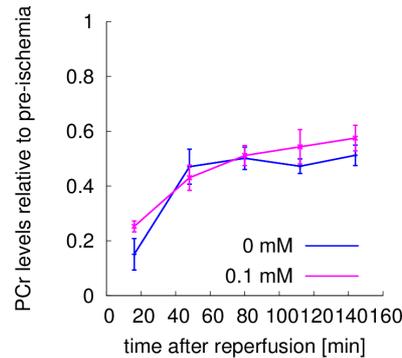


図 5 Neuron-rich スライスでの虚血 - 再灌流負荷後の PCr の回復過程 ALCAR による保護効果は認められなかった。

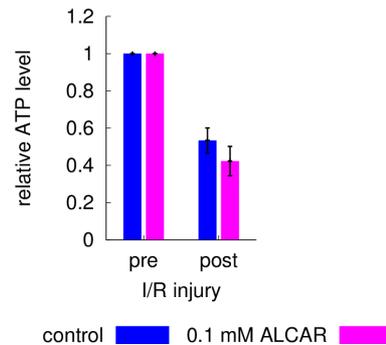


図 6 Neuron-rich スライスでの虚血 - 再灌流負荷後の ATP の回復 ALCAR 添加による回復の改善は認められなかった。

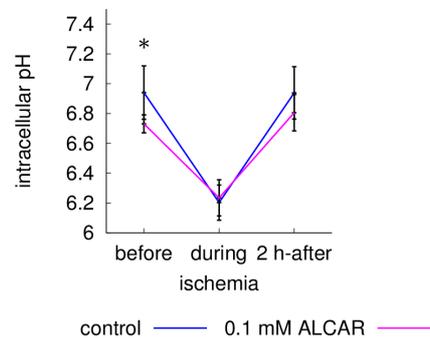


図 7 Neuron-rich スライスでの虚血 - 再灌流負荷後の細胞内 pH の変化 ALCAR 添加により負荷前の細胞内 pH は有意により酸性に傾いた (\* $p < 0.05$ )。

(3) ESRによるALCARのフリーラジカル消去能の測定

ALCARは、検討した7種類のフリーラジカル種のうちVC ( $IC_{50}$  0.3 mM, 図8),  $\cdot CH_3$  ( $IC_{50}$   $8 \times 10$  mM, 図9),  $\cdot NO$  ( $IC_{50}$   $2 \times 10$  mM, 図10)に対して有意なラジカル消去能を示した。0.5 mM以上のALCARはDPPHを有意に消去したが、 $IC_{50}$ を推定することはできなかった(図11)。

$\cdot OH$  (図12),  $O_2^{\cdot -}$  (図13),  $t-BuOO\cdot$  (図14)に対しては、ラジカル消去能を示さなかった。

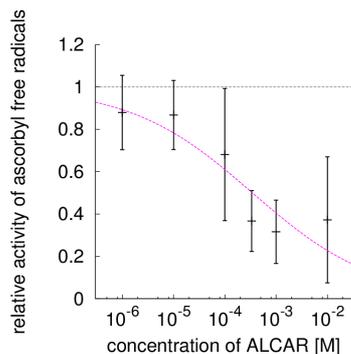


図8 ビタミンCラジカル消去能 濃度依存の消去能が認められた ( $IC_{50}$  0.3 mM)

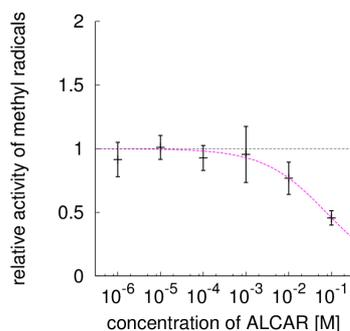


図9 メチルラジカル消去能 濃度依存の消去能が認められた ( $IC_{50}$   $8 \times 10$  mM)

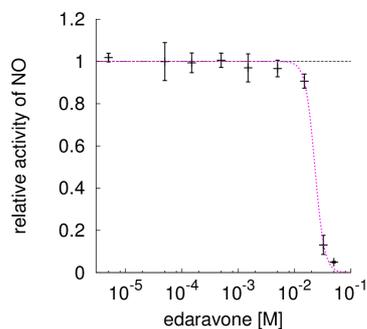


図10 一酸化窒素ラジカル消去能 濃度依存の消去能が認められた ( $IC_{50}$   $2 \times 10$  mM)

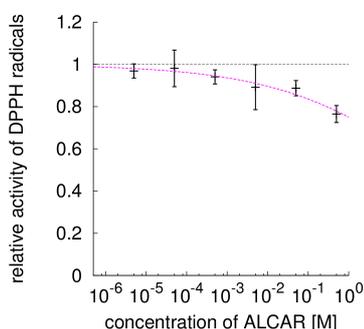


図11 DPPH消去能 人工安定ラジカルであるDPPHに対して、高濃度で濃度依存的な消去能が認められた。

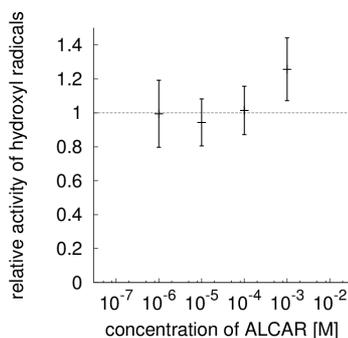


図12 ヒドロキシルラジカル消去能 消去能は認められなかった。

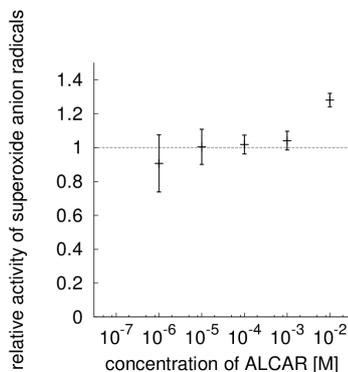


図13 スーパーオキサイドアニオン消去能 消去能は認められなかった。

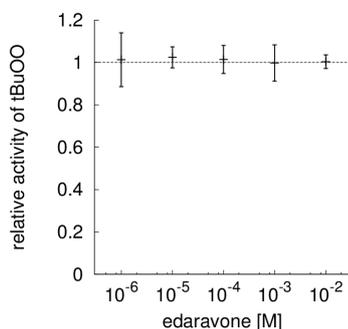


図14 t-ブチルペルオキシルラジカル消去能 消去能は認められなかった。

#### (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。 $\cdot\text{OH}$  をイニシエータとする脂質の過酸化に対して ALCAR は抗酸化能を示さなかった (図 15)。一方、炭素中心ラジカルをイニシエータとした場合、低濃度の ALCAR は抗酸化能を示したが、高濃度では過酸化の亢進が認められた。(図 16)。

#### (5) 研究結果のまとめ

ALCAR は、ラット脳組織への虚血 - 再灌流負荷に対して、ベル型の濃度依存的な脳保護効果を示した。

ALCAR は、ESR により検討した 7 種類のうち 4 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。しかし、 $\cdot\text{OH}$  や  $\text{O}_2^{\cdot-}$  などに対しては消去能を示さなかった。

ALCAR は、 $\cdot\text{OH}$  より始まる脂質過酸化の連鎖反応に対する抗酸化能を示さなかった。一方、炭素中心ラジカルより始まる連鎖反応に対しては低濃度では antioxidant としての、高濃度では prooxidant の性質を示した。

これらのことから、ALCAR による脳保護効果の機序として、クエン酸回路へのアセチル Co-A を供給するエネルギー源として機能していることに加えて、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。しかし、高濃度では prooxidant としてふるまうことから、脳保護効果はベル型の濃度 - 反応曲線を示すと考えられる。

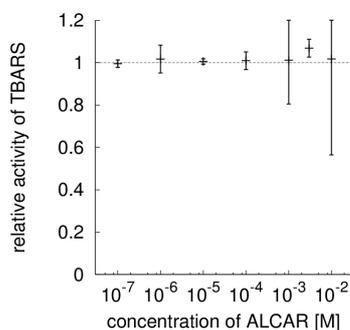


図 15 ヒドロキシルラジカルをイニシエータとする脂質過酸化に対する抗酸化能 抗酸化能は認められなかった。

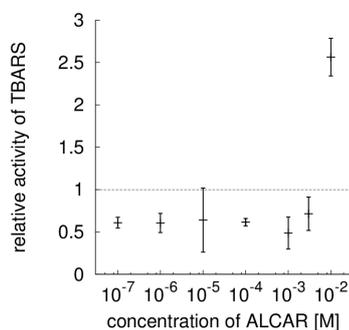


図 16 炭素中心ラジカルをイニシエータとする脂質過酸化に対する抗酸化能 低濃度では抗酸化能が認められたが、高濃度では過酸化の亢進が観察された。

#### 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] 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: $^{31}\text{P}$ -NMR による経時的検討. 日本生理学雑誌 75(5 Pt 2):31-33, 2013. 査読あり

[学会発表](計 13 件)

- [1] Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effect of CV159 on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion injury: a  $^{31}\text{P}$ -NMR study. 第 35 回日本神経科学大会 2012.9.18-21, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
- [2] Mizutani Y, Shimada M, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of a water-soluble  $\alpha$ -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, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区) J Physiol Sci 63:S151, 2013.
- [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. 第 90 回日本生理学会大会 2013.3.27-29, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区) J Physiol Sci 63:S151, 2013.
- [4] Tokumaru O, Kitano T, Yokoi I. Recovery of energy metabolism of rat brain after ischemia-reperfusion injury: a  $^{31}\text{P}$ -NMR study. 第 90 回日本生理学会大会 シンポジウム 2013.3.27-29, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

- J Physiol Sci 63:S97, 2013
- [5] Tokumaru O, Mizutani Y, Shimada M, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Water-soluble  $\alpha$ -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, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- [6] 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 (U.K.)
- [7] 徳丸治, 北野敬明, 横井功. 水溶性  $\alpha$  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  $\alpha$  リポ酸研究会 2013.11.16, 別府湾口イヤルホテル (大分県・日出町)
- [8] 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, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市) J Physiol Sci 64:S223, 2014
- [9] 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, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市) J Physiol Sci 64:S256, 2014
- [10] 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, パンフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- [11] 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  $\alpha$  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)
- [12] 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・展示場 (兵庫県・神戸市) J Physiol Sci 65(Suppl 1):S41, 2015
- [13] 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・展示場 (兵庫県・神戸市) J Physiol Sci 65(Suppl 1):S157, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
大分大学医学部神経生理学講座  
<http://www.med.oita-u.ac.jp/seiri1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳丸 治 ( TOKUMARU OSAMU )  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40360151

### (2) 研究分担者

北野 敬明 ( KITANO TAKAAKI )  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号: 20211196

横井 功 ( YOKOI ISAO )  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号: 80150366

古賀 寛教 ( KOGA HIRONORI )  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号: 50468013

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: