

令和元年6月14日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10515

研究課題名(和文)水溶性 リポ酸誘導体の脳保護効果と抗酸化能：スピン共鳴解析による検討

研究課題名(英文)Antioxidative and neuroprotective activity of alpha-lipoic acid derivatives: spin resonance analyses

研究代表者

徳丸 治 (Tokumar, Osamu)

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：40360151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大分大学では抗酸化作用や抗炎症作用があるとされる リポ酸とさまざまなアミノ酸との複合体(リポ酸誘導体)を共同開発した。我々は、電子スピン共鳴法により リポ酸誘導体は複数種のフリーラジカルに対して、用量依存的に直接的な消去作用をもつことを示した。このことより、複数種のフリーラジカルを直接的に消去することが リポ酸誘導体の抗酸化作用の機序の一つであることが示唆された。また我々は、質量分析イメージングを応用してマウス脳切片のエネルギー代謝の状態を高空間分解能で解析する手法も開発した。しかし、この手法による リポ酸誘導体のエネルギー代謝の側面からみた脳保護作用の検討には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リポ酸は活性酸素種や酸化ストレスによる種々の病態における治療効果が期待されてきた。その抗酸化作用の機序はフリーラジカル消去能にあるといわれてきたが、どのフリーラジカルを直接消去するのか、用量依存性はあるのか等の詳細は不明であった。本課題はその機序の一端を明らかにしたことに学術的意義がある。

リポ酸誘導体の作用機序が解明され、より効果の高い誘導体が選別できれば、比較的早期に臨床応用が期待できる。脳梗塞の血栓溶解療法の補助療法や、心肺停止蘇生後患者、脳神経外科手術患者、人工心肺使用患者など脳虚血の可能性の高い患者への予防的投与など、臨床応用への可能性を探ることに、本研究の社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We synthesized α -lipoic acid derivatives which are shown to have antioxidative and anti-inflammatory activity. Using electron spin resonance spectrometry (ESR), we demonstrated that α -lipoic acid derivatives directly scavenged multiple kinds of free radicals in a dose-dependent manner. It is speculated that antioxidative activity of α -lipoic acid derivatives may be attributable to their direct scavenging activity against multiple free radical species. We have also developed an experimental protocol for mass spectroscopic imaging of high-energy phosphates (ATP, ADP, AMP) in mice brain. The present project did not accomplish application of such imaging technique to an evaluation of neuroprotective effect of α -lipoic acid derivatives.

研究分野：生理学，スピン解析学

キーワード：抗酸化作用 フリーラジカル消去作用 水溶性 リポ酸誘導体 電子スピン共鳴法 質量分析イメージング 高エネルギーリン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳組織は虚血 - 再灌流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体温療法などの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。

α リポ酸はミトコンドリア内に存在する補酵素であり、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が知られている。 α リポ酸が還元されたジヒドロリポ酸は強力な抗酸化能を有し、活性酸素種、酸化ストレスによる種々の病態における治療効果が示唆されている。脳虚血 - 再灌流傷害への効果も *in vivo* ラットで検討されている。しかし、ジヒドロリポ酸は空气中で容易に酸化されるため、静脈内投与等の迅速な目的臓器への投与が不可能であり、薬物製剤としての使用が困難であった。大分大学ではこの α リポ酸の欠点を克服するために、 α リポ酸とアミノ酸などの複合体を亜鉛でキレートした化合物を合成し、水溶性化した複数種類の水溶性 α リポ酸誘導体亜鉛キレート物 (以下、 α リポ酸誘導体という) をオガリサーチ (<http://www.oga-research.co.jp/index.htm>) と共同開発した。動物実験によりその抗酸化作用や、抗炎症作用、抗癌作用、脱毛抑制作用などの効果が確認されている。我々は、既にその中からジヒドロリポイル-ヒスチジン亜鉛キレート化合物 (DHL-His.Zn) の虚血-再灌流傷害に対する脳保護効果と複数種のフリーラジカルに対する直接的消去能を報告している。しかし、DHL-His.Zn 以外の α リポ酸誘導体については、その抗酸化作用や作用機序、特に、誘導体による直接的なフリーラジカル消去能については全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、脳虚血 - 再灌流傷害に対する水溶性 α リポ酸誘導体の脳保護効果とその機序を、エネルギー代謝および抗酸化作用、特にフリーラジカル消去能の観点から、網羅的に明らかにすることを目的として実施した。

3. 研究の方法

【ESR による α リポ酸誘導体のラジカル消去作用の測定】

虚血 - 再灌流負荷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が、これらは非常に不安定であり生体内での検出は非常に困難である。そこで、スーパーオキシドアニオンやヒドロキシルラジカルなど 8 種類のフリーラジカルを *in vitro* で発生させ、スピントラップ剤により捕捉して ESR により測定した。この発生系に α リポ酸誘導体を添加し、その直接的なラジカル消去能を網羅的に評価した。これにより、 α リポ酸誘導体の脳保護作用がフリーラジカルの直接的な消去作用によるものであるかどうか解析した。

対象としたフリーラジカル (発生系, 捕捉系)

ヒドロキシルラジカル $\cdot\text{OH}$ (希過酸化水素に UV 照射, *g*-CYPMPO)

スーパーオキシドアニオン $\text{O}_2^{\cdot-}$ (濃過酸化水素に UV 照射, *g*-CYPMPO または DMPO)

tert-ブチルペルオキシラジカル *t*-BOO \cdot (*tert*-ブチルヒドロペルオキシドに UV 照射, *g*-CYPMPO)

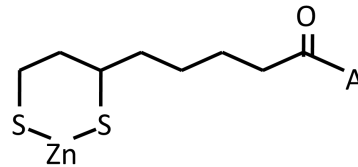
アスコルビルフリーラジカル AFR (アスコルビン酸ナトリウムに DMSO 添加, なし)

DPPH (15 μM DPPH, なし)

一酸化窒素 NO (NOC7, carboxy-PTIO)

評価した α リポ酸誘導体

DHL-Tau-Zn	A: Taurine, Na
DHL-Pen-Zn	A: Penicillamine, Na
DHL-Glu-Zn	A: Glutamic acid, Na
DHL-Nleu-Zn	A: Norleucine, Na
DHL-Ant-Zn	A: Anthranilic acid, Na
DHL-Zn	A: ONa



ESR 測定

日本電子製 ESR 分光器 (JES-RE1X)。主な設定は以下の通り: 周波数 9.45 GHz, 出力 1-10 mW, 中心磁場 335.6 mT, 掃引幅 7.5 mT, 掃引時間 1 分, 室温にて測定。

【質量分析イメージングによる脳エネルギー代謝の測定】

虚血 - 再灌流負荷の前後の脳内のエネルギー代謝の状態を詳細に観察するために、マウス脳スライスの ATP および ADP の質量分析イメージングを行った。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法による飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF/MS)

AXIMA RESONANCE (島津製作所, 大分大学所有) および Rapiflex (Bruker Daltonics, 浜松医科大学所有) を利用した。

虚血再灌流モデル

防衛医科大学校生理学講座が保有する小動物用遠心負荷装置（トミー精機）によりマウス（C57BL）に頭→尾方向の過重力負荷を 30 秒間与えて脳血流を遮断し、脳虚血モデルとした。

試料作製

マウスをウレタン麻酔後、頭皮を切開し、イソペンタン + プロパン混合寒剤（-193°C）にて頭蓋を急速に冷却した。頭蓋骨を開き大脳を摘出後、クライオトーム（CM3050, Leica）にて 10 μm に薄切、ITO 導電性スライドガラスに貼り付けて、ディープフリーザー内で乾燥させた。

質量分析イメージング

イオン化補助剤（マトリックス）として 9-aminoacridine (9-AA) を塗布した後、大脳皮質および海馬場の質量分析を行った（測定範囲 300 < m/z < 1000）。オフラインにて解析ソフトウェア Biomap を用いて、ATP (m/z = 506)、ADP (m/z = 426)、AMP (m/z = 346) のイメージを作成した。

【³¹P-NMR および ¹H-NMR による脳エネルギー代謝の測定】

当初の計画では、水素原子（¹H）およびリン原子（³¹P）を観測核とする核磁気共鳴法（NMR）を用いて生理的条件下のラットの脳スライス中のクレアチンリン酸や ATP 等の高エネルギーリン酸化合物を経時的に連続して定量し、脳エネルギー代謝を評価する予定であった。しかし、大分大学が保有する NMR 分光器（DRX-300wb, Bruker Biospin）老朽化により測定不可能となった。このため、この測定は行うことができなかった。

4. 研究成果

【ESR による α リポ酸誘導体のラジカル消去作用】

7 種類の α リポ酸誘導体はのうち、DHL-His-Zn は、対象とした 6 種類全てのフリーラジカルに対して用量依存的な消去作用を示した。それ以外の 6 種類の α リポ酸誘導体は、アスコルビルフリーラジカル以外の 5 種類のフリーラジカルに対して用量依存的な消去作用を示した。ESR スペクトルと用量 - 反応曲線を図 1 に、IC₅₀ を表 1 に、IC₅₀ から推定したヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン、一酸化窒素に対する α リポ酸誘導体の反応速度定数を表 2 に示す。

【質量分析イメージングによる脳エネルギー代謝の評価】

図 2 にマウス脳の高エネルギーリン酸（ATP, ADP, AMP）の MS スペクトルの一例を示す。各ピクセルにおける ATP の信号によるイメージングの一例を図 3 に示す。海馬 CA1 から CA3 の錐体細胞層と歯状回の顆粒細胞層に沿って、ATP 濃度の高い点が線状に分布している。

質量分析イメージングによって脳組織内のエネルギー状態を評価することが可能となったが、α リポ酸誘導体によるエネルギー代謝の保護効果については、研究期間内に遂行することができなかった。今後、継続して実施する予定である。

表 1 リポ酸誘導体のフリーラジカルに対する IC₅₀

IC ₅₀ (mM)	DHL-Ant-Zn	DHL-Glu-Zn	DHL-His-Zn	DHL-Nleu-Zn	DHL-Pen-Zn	DHL-Tau-Zn	DHL-Zn
•OH	0.5	0.3	1 × 10	0.8	0.7	3	0.3
O ₂ ^{•-}	2	7*	2	0.5	8	1 × 10	0.7
t-BOO•	6	2	9	2	3	4	2
AFR	-	-	9	-	-	-	-
DPPH	0.2	0.07	0.1	0.2	0.03	0.07	0.08
NO	0.2	0.1	0.009	0.1	0.05	0.5	0.1

表 2 リポ酸誘導体のフリーラジカルに対する反応速度定数

k (M ⁻¹ s ⁻¹)	DHL-Ant-Zn	DHL-Glu-Zn	DHL-His-Zn	DHL-Nleu-Zn	DHL-Pen-Zn	DHL-Tau.Zn	DHL-Zn
•OH	2.0 × 10 ¹⁰	3.6 × 10 ¹⁰	1.1 × 10 ⁹	1.4 × 10 ¹⁰	1.4 × 10 ¹⁰	3.4 × 10 ⁹	3.1 × 10 ¹⁰
O ₂ ^{•-}	7.7 × 10	1.9 × 10	6.0 × 10	2.2 × 10 ²	1.5 × 10	1.2 × 10	1.7 × 10 ²
NO	6.7 × 10 ⁴	1.3 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁵	2.7 × 10 ⁵	2.4 × 10 ⁴	1.1 × 10 ⁵

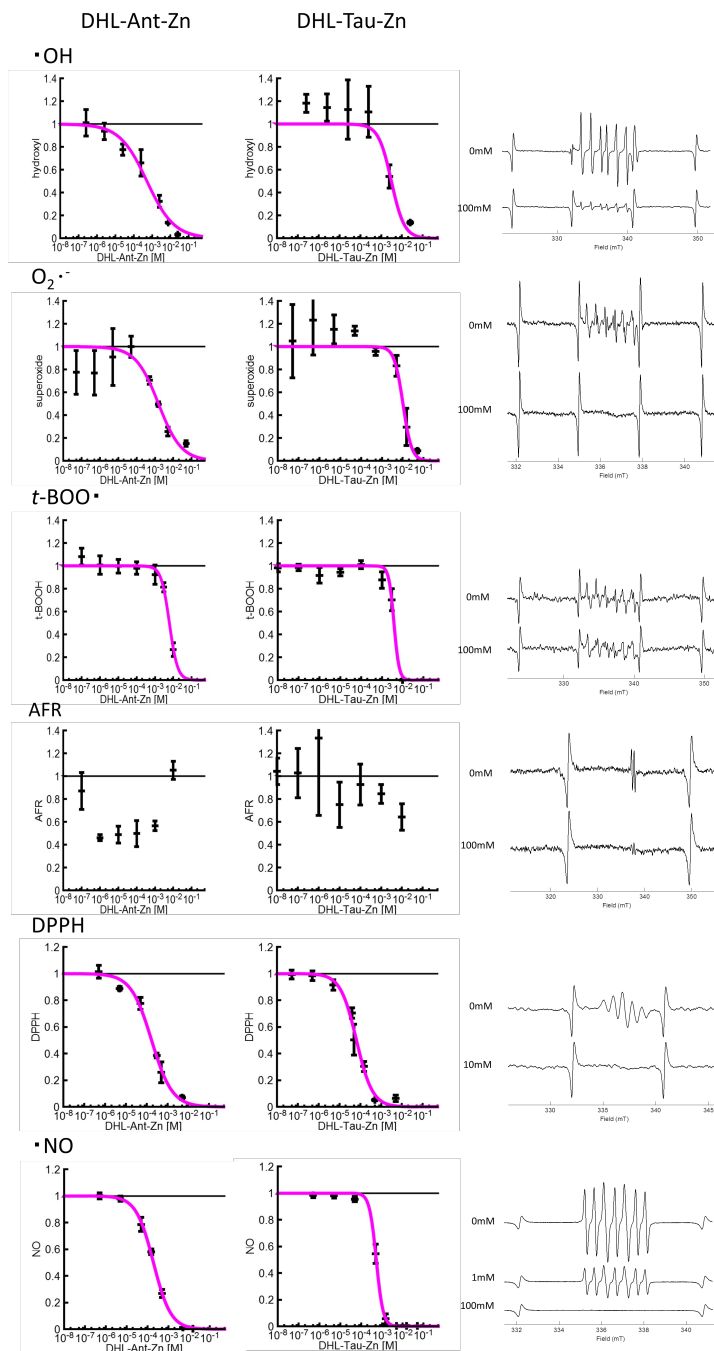


図1 フリーラジカルのESRスペクトル(右)と、DHL-Ant-ZnおよびDHL-Tau-Znの用量反応曲線(左、平均 ± 95%信頼区間)。AFR以外のフリーラジカルに対して、用量依存的な消去作用を示した。

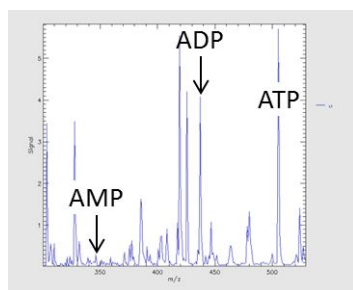


図2 マウス脳スライスのMSスペクトルの一例。AMP ($m/z = 346$), ADP ($m/z = 426$), ATP ($m/z = 506$)のピークが認められる(AXIMA RESONANCEにて測定)。

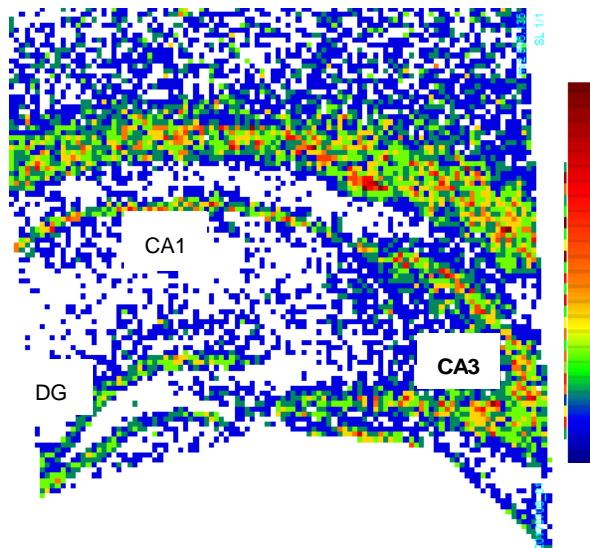


図3 マウス海馬のATPイメージングの一例。CA1からCA3の錐体細胞層と歯状回(DG)の顆粒細胞層に沿って、ATP濃度の高い点が認められる(Rapiflexにて測定,空間分解能20 μ m)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. Umeda R, Takanari H, Ogata K, Matsumoto S, Kitano T, Ono K, Tokumaru O. Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 64(1):20-26, 2019. DOI: 10.3164/jcbrn.18-48 査読あり
2. Tokumaru O, Shuto Y, Ogata K, Kamibayashi M, Bacal K, Takei H, Yokoi I, Kitano T. Dose-dependency of multiple free radical scavenging activity of edaravone. *Journal of Surgical Research* 228:147-153, 2018. DOI: 10.1016/j.jss.2018.03.020 査読あり

〔学会発表〕(計 11件)

1. Tokumaru O, Yoshida K, Ogata K, Takanari H, Kitano T. Dose-response relationship of free radical scavenging activity of dexmedetomidine. The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (2019.3.28-31, Kobe)
2. Tokumaru O, Goto M, Abe S, Hiruma M, Maruyama S, Kemuriyama T, Ogata K, Kitano T, Nishida Y. Changes in correlations of energy status among cerebral regions after high +Gz acceleration. 89th Annual Scientific Meeting of Aerospace Medical Association (2018.5.4-11, Dallas, TX, USA)
3. Tokumaru O, Matsumoto S, Mizoguchi T, Kawashima T, Ogata K, Miyamoto S, Kitano T. Direct observation of ascorbyl free radicals (vitamin C radicals) in blood of perioperative animals. 第95回日本生理学会大会(2018.3.28-30, 高松)
4. Tokumaru O, Abe S, Goto M, Tandai-Hiruma M, Kemuriyama T, Maruyama S, Kanamaru Y, Ogata K, 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)
5. 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, 浜松)
6. 松本重清, 和田伸介, 栗林由英, 牧野剛典, 小山淑正, 古賀寛教, 山本俊介, 内野哲哉, 新宮千尋, 西田欣弘, 徳丸治, 北野敬明. 救急重症患者における血症ビタミンCラジカルのリアルタイム測定法の検討. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会(2016.08.30-31, 仙台)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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 (June 27-30, 2015, Vancouver, Canada)

11. 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 $\beta 1$ 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, 鹿児島)

〔その他〕

ホームページ等

<http://oitauniv-soran.ad.oita-u.ac.jp/profile/ja.4baf4ee04fa448fa520e17560c007669.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：北野 敬明

ローマ字氏名：Kitano, Takaaki

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20211196

研究分担者氏名：新宮 千尋

ローマ字氏名：Shingu, Chihiro

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30295191

研究分担者氏名：松本 重清

ローマ字氏名：Matsumoto, Shigekiyo

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：90274761

研究分担者氏名：江島 伸興

ローマ字氏名：Eshima, Nobuoki

所属研究機関名：京都大学

部局名：高大接続・入試センター

職名：特定教授

研究者番号(8桁)：20203630

研究分担者氏名：西田 育弘

ローマ字氏名：Nishida, Yasuhiro

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：医学教育部医学科専門課程

職名：教授

研究者番号(8桁)：90172668

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。