

令和元年6月19日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11407

研究課題名(和文) ジンセノサイドRb1及びその化学的誘導体の神経外傷治療効果に関する研究

研究課題名(英文) Research regarding the effects of ginsenoside Rb1 and its chemical derivative on neurotrauma.

研究代表者

阪中 雅広 (sakanaka, masahiro)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60170601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経外傷では、一次損傷に続発する炎症反応が損傷を悪化させることが知られている。一方、紅蔘とその成分が神経保護作用を示すことが多くの研究で証明された。そこで本研究では神経外傷モデル動物を用いて、紅蔘とその成分が脊髄損傷と軽度外傷性脳損傷(MTBI)に及ぼす効果を検討した。その結果、ジンセノサイドRb1(gRb1)を含有する紅蔘エキス又は紅蔘末の経口投与により、神経炎症が有意に抑えられ、脳脊髄機能障害が改善された。更に、紅蔘末の長期経口投与により、MTBI後の脳内Phospho-tauの蓄積が軽減された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷や外傷性脳損傷などの神経外傷により脳脊髄機能障害が発症し、それが時に患者の社会復帰を妨げる。我々は紅蔘エキス又は紅蔘末の経口投与により脊髄損傷後及びMTBI後の脳内炎症因子の発現が抑制され、脳脊髄機能障害が改善することを確認した。更に、紅蔘末の長期経口投与により、MTBI後の脳内Phospho-tauの蓄積が軽減された。これまで治療法がほとんどなかった脊髄損傷やMTBIに対する紅蔘の治療効果を確認できたことが、学術的にも社会的にも意義深い。

研究成果の概要(英文)：In cases of neurotrauma, ensuing inflammatory responses are known to cause the secondary neuronal damage. Red ginseng and its ingredients are reported to protect the nervous tissue from a variety of damages. We investigated the effects of red ginseng extract and powder on spinal cord injury and mild traumatic brain injury (MTBI), using animal models. As a result, red ginseng extract and powder containing ginsenoside Rb1 suppressed neuronal inflammation and attenuated the dysfunction of the spinal cord and brain. Moreover, the accumulation of phospho-tau after MTBI was inhibited by the treatment with red ginseng powder. These findings suggest that red ginseng is a hopeful candidate drug for the treatment of neurotrauma.

研究分野：神経生物学、神経外科

キーワード：軽度外傷性脳損傷(MTBI) 紅蔘 神経炎症 phospho-tau ジンセノサイド Rb1 脊髄損傷

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

## 1. 研究開始当初の背景

交通事故、転落、スポーツなどで発症する神経外傷は、脊髄損傷と脳損傷に大別される。頭部に強い衝撃が加わって、脳全体にダメージを受けることを外傷性脳損傷 (TBI) という。

病理解剖のデータから、TBI 患者の脳の軸索が広範囲に損傷を受けていることが確認された (Lancet. 344, 1055-1056.1994)。このびまん性軸索損傷 (Diffuse axonal injury, DAI) が TBI の高次脳機能障害の原因と考えられる。軽度の TBI を繰り返して受ける患者の場合は、軸索変性に加えて、微小管結合蛋白タウ (Tau) の凝集、アミロイド前駆体蛋白 (APP) の凝集、沈着も報告されている (J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 57,419-425;1994)。その他、TBI 動物モデルを用いた研究では、MAP2 染色性の異常、Microgliosis、Astrogliosis も報告されている。これらの病理変化、特に軸索損傷と MAP2 染色性の減少などは我々の脊髄損傷動物モデルでも確認されている。従って、前記の脊髄損傷モデル動物に対して、優れた治療効果を示す gRb1 や化学的誘導体が、TBI ならびにより重篤な脳挫傷モデル動物に対しても好ましい効果を示す可能性は高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 脊髄損傷モデル動物及び TBI モデル動物に対する紅蓼とその成分の効果と作用メカニズムを解明: 作成した動物モデルに紅蓼エキス又は紅蓼末を経口投与した後、行動試験結果と脳脊髄の病理組織像を分析し、治療効果の有無を判定する。さらに、ELISAとウェスタンブロッティング法により炎症因子と細胞死関連蛋白質の発現を調べて、紅蓼の作用メカニズムを明らかにする。

(2) TauとAPPの凝集、蓄積病変に対する紅蓼とその成分の効果と作用メカニズムを解明: TBI モデル動物を用いて、長期間に渡って神経組織の病理変化を観察し、TauとAPPの凝集、蓄積病変の過程を解明する。更に、紅蓼末を投与して、その病理過程に対する改善効果があるかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

本研究には雄 SD ラット及び雄 C57BL/6J マウスを用いた。実験動物を一定の明暗サイクル及び温度 ( $22 \pm 1$ ) 条件下で飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行われた。

(2) SD ラットを用いた脊髄損傷実験については発表論文<sup>2</sup>を参照されたい。

### (3) 軽度外傷性脳損傷 (MTBI) 動物モデルの作成

Kane MJ, et al の方法 (J Neurosci Methods.203:41-9.2012) を用いて MTBI マウスモデルを作製した。吸入麻酔下で 100 グラムの錘を 1メートルの高度からマウスの頭部に自由落下させることにより脳損傷を与えた。その後麻酔から覚醒していることを確認後、マウスを飼育ケージに戻した。同じマウスに一日一回、五日間で合計五回錘の落下により損傷を与えた。一部の動物ではコントロール群 (sham) として麻酔のみを行い、錘の落下は実施しなかった。

### (4) MTBI モデルマウスに対する紅蓼末経口投与

MTBI 一日目からモデルマウスの餌を CE - 2 餌 (vehicle 群, n=10) と 1% (高濃度群 1, n=10) と 0.1% (低濃度群 1, n=10) の紅蓼末を含む CE-2 餌に変えた、また他のマウスでは MTBI 後 7 日目からモデルマウスの餌を 1% (高濃度群 2, n=10) と 0.1% (低濃度群 2, n=10) の紅蓼末を含む CE-2 餌に変えて、実験終了まで与え続けた。

### (5) マウスの活動性と空間認知能力の評価

MTBI 後 1, 4 週目と 24 週目に Open field 試験を実施した。60cmx60cm 四方の亚克力箱

に 60 分間マウスをいれ環境に順化させた。そして引き続き 20 分間マウスの活動性を 5cm 間隔で配置した赤外線センサーにて計測した。空間認知能力を検討するため、MTBI 後 4 週目に Morris water maze test を行った。直径 100cm の円形プールに高さ 20cm まで水を入れた後、プラットフォーム (逃避台) を水面下 2cm に設置した。プールに入れられたマウスが逃避台に到達するまでの時間 (escape latency) を計測した。

#### (6) ELISA とウェスタンブロットティング

Open field test 又は Morris water maze test が行われた後にマウスを安楽死させ、全脳を取り出した。ELISA キットを用いて、脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した。さらにウェスタンブロットティングによって、脳内 phospho-tau の発現を確認した。

#### (7) 統計解析

2 群の実験データを比較する場合は Student T 検定を行い、それ以外の実験データを統計解析する場合は One way 又は Two way analysis of variance followed by Bonferroni 's multiple comparison test を用いた。P 値が 0.05 未満を有意とした。すべてのデータは mean ± SD にて表記した。

### 4. 研究成果

(1) 脊髄損傷実験効果については発表論文 2 を参照されたい。

(2) 紅蔘末の経口投与により軽度外傷性脳損傷 (MTBI) 後の活動性と空間認知障害が改善

MTBI 後 1, 4 週目と 24 週目に Open field 試験を実施した。その結果、vehicle 群に比して、MTBI 一日目から 1% 紅蔘末入り CE-2 餌を与えられたマウス (高濃度 1 群) は MTBI 4 週目 (MTBI 4weeks) と 24 週目 (MTBI 24weeks) で自発運動の増加が有意に抑制された (図 1 A、\* : P<0.05)。空間認知能力を検討するため、MTBI 後 4 週目に Morris water maze test を行った。その結果、訓練五日目 (D5) で、逃避台に辿りつく時間 (escape latency) は、高濃度 1 群の方は、vehicle 群より短縮傾向が見られたが、有意差がなかった。(図 1 B)。

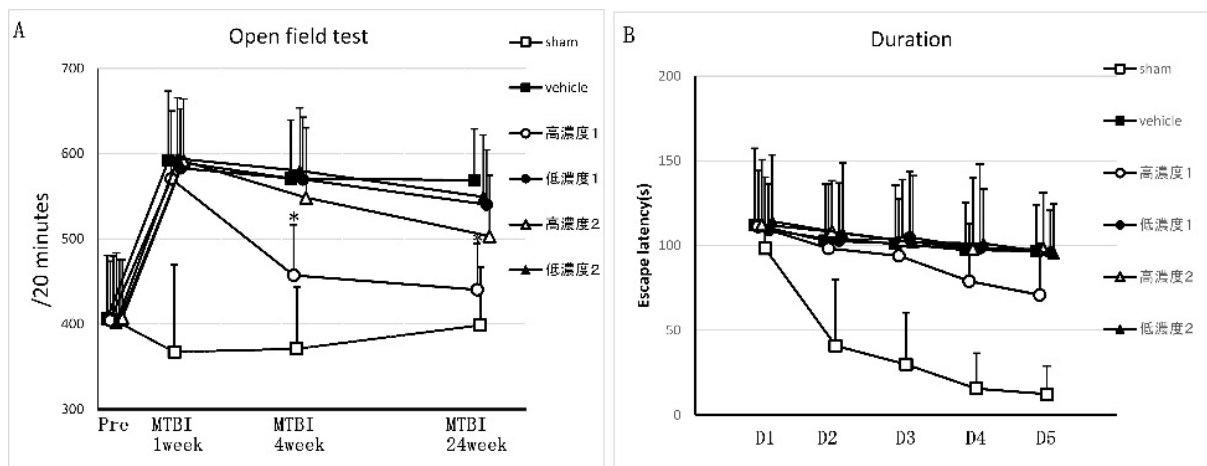


図 1. 紅蔘末の投与による MTBI 後の活動性と空間認知障害の変化。

(3) 紅蔘末の経口投与により MTBI 後に脳内の炎症因子の発現が抑制された

MTBI 後の脳内炎症因子濃度に対する紅蔘の影響を調べるため、MTBI 後 1 週目、4 週目と 24 週目の脳組織の TNF と IL-1 の濃度を測定した (図 2)。

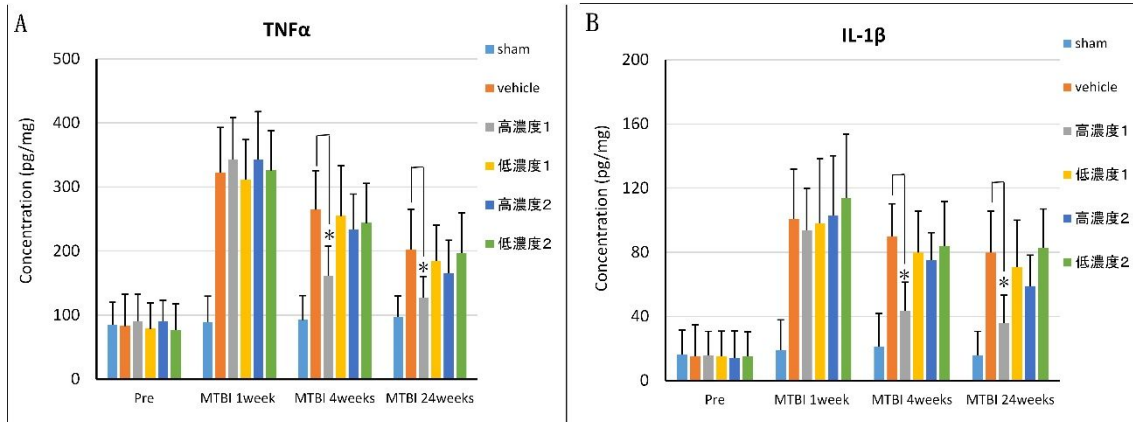


図2 . 紅蔘末経口投与による MTBI 後脳内炎症因子の変化

TNF の変化: MTBI 前(Pre)に比して、MTBI 後マウス脳内の TNF の濃度が明らかに上昇したが、高濃度 1 群の方が MTBI 後 4 週目 (MTBI4weeks) と 24 週目 (MTBI24weeks) で vehicle 群よりその程度は有意に低かった (図 2A ; \* : P<0.05 )

IL-1 の変化: MTBI 前(Pre)に比して、MTBI 後マウス脳内の IL-1 の濃度が明らかに上昇したが、高濃度 1 群の方が MTBI 後 4 週目 (MTBI4weeks) と 24 週目 (MTBI24weeks) で vehicle 群よりその程度は有意に低かった (図 2B ; \* : P<0.05 )

( 4 ) 紅蔘末の経口投与により MTBI 後 24 週目の脳内 phospho-tau の発現増加が減少した。

MTBI 後 24 週目にマウス脳内の phospho tau の発現をウェスタンブロッティングで確認した。その結果、sham マウスに比べて、MTBI モデルマウスの脳内 phospho-tau の発現が有意に増加した。Vehicle 群に比べて、高濃度 1 群の脳内 phospho-tau の発現増加が有意に抑制された (図 3 ; \* : P<0.05 )

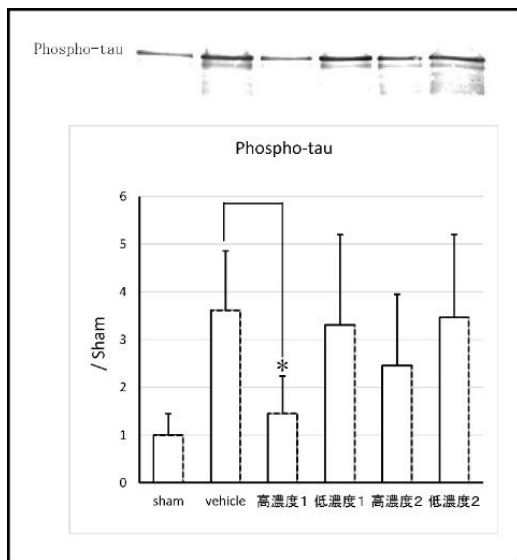


図3 . 紅蔘末経口投与による MTBI 後脳内 phospho-tau の発現変化

( 5 ) 結語

軽度外傷性脳損傷 (MTBI) 実験において、MTBI 一日目から 1% 紅蔘末入り餌を経口投与されたマウス (高濃度 1 群) では紅蔘末を含まない餌を投与されたマウス (vehicle 群) に比べて、MTBI 後 4 週目と 24 週目で活動性の増加が有意に抑制された。更に空間認知障害の改善傾向も見られた。脳内炎症因子の発現を調べた結果、MTBI 後 4 週目から、高濃度 1 群の脳内 TNF と IL-1 濃度が vehicle 群に比して有意に低かった。MTBI 24 週目で、高濃度 1 群の脳内 phospho-tau の発現増加は vehicle 群に比して有意に減少した。以上の研究結果から、紅蔘の経口投与が MTBI 後の脳内炎症因子の増加を抑制することによって、高次脳機能障害を改善し、phospho-tau の蓄

積を防ぐことが明らかになった。

<引用文献>

<sup>1</sup> Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, Wainwright H, Simpson DA, McLean AJ. Staining of Amyloid Precursor Protein to Study Axonal Damage in Mild Head-Injury. Lancet, 344(8929), 1994, 1055-6.

<sup>2</sup> Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 57(4), 1994, 419-25.

<sup>3</sup> Kane MJ, Angoa-Pérez M, Briggs DI, Viano DC, Kreipke CW, Kuhn DM. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. J Neurosci Methods. 203, 2012, 41-9.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

<sup>1</sup> Zhu Pengxiang, Sakanaka Masahiro, Effects of Red Ginseng on Neural Injuries with Reference to the Molecular Mechanisms, J, 査読有, 巻2,2019, 116-127.

doi:10.3390/j2020009

<sup>2</sup> Pengxiang Zhu, Keiichi Samukawa, Hiroko Fujita, Hidemasa Kato, and Masahiro Sakanaka, Oral Administration of Red Ginseng Extract Promotes Neurorestoration after Compressive Spinal Cord Injury in Rats, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 査読有, 巻 2017, Article ID 1265464, 10 pages.

<https://doi.org/10.1155/2017/1265464>

〔学会発表〕(計1件)

<sup>1</sup> 朱 鵬翔, Oral Administration of Red Ginseng Extract Promotes Neurorestoration after Compressive Spinal Cord Injury in Rats. 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2017.

〔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:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 英政

ローマ字氏名：( Kato Hidemasa )

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 50292123

研究分担者氏名：朱 鵬翔

ローマ字氏名：( Ju Pensyan )

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号 ( 8 桁 ): 40380216

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