

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591807

研究課題名（和文） フルクトース 1,6-2 リン酸の脳保護作用の検討（ ^{31}P -NMR を用いて）研究課題名（英文） Neuroprotective effect of fructose 1,6-diphosphate: a ^{31}P -NMR 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

研究成果の概要(和文):

解糖系の中間代謝産物でありラジカルスカベンジャーでもあるフルクトース 1,6-二リン酸(FDP)の脳保護効果について、リンを観測核とする核磁気共鳴法を用いて、エネルギー代謝の側面から検討した。FDP の灌流液への添加により、脳虚血-再灌流負荷後のエネルギー代謝の回復が有意に良好であった。この脳保護効果の機序として、FDP が解糖系にエネルギー基質として直接入るとともに、ラジカルスカベンジャーとして働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文):

Fructose 1,6-diphosphate is an intermediate substrate of glycolysis. It is a known neuroprotectant and acts as energy metabolite and a radical scavenger. The neuroprotective capacity of FDP was studied using ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{31}P -NMR). The state of energy metabolism during ischemia-reperfusion insult was evaluated by ^{31}P -NMR. The recovery of phosphocreatine, energetic buffer of ATP in living cells, was significantly higher when brain slices were superfused with 5 mM FDP. The series of our experiments, including ^{31}P -NMR and electron spin resonance spectroscopy, indicated that FDP functions as a neuroprotectant not only as an energy metabolite of glycolysis but also as a radical scavenger.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野: 麻酔学, 神経生理学, 医学教育学

科研費の分科・細目: 外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード: 病態生理学, 核磁気共鳴法, 脳虚血, 脳保護, 電子スピン共鳴法, フルクトース 1,6-二リン酸, クレアチンリン酸, ATP

1. 研究開始当初の背景

脳は虚血障害に対し、非常に脆弱である。これは、脳組織の高エネルギーリン酸の予備能が限られており、虚血や低酸素環境における酸化代謝の障害により、容易にアデノシン三リン酸(ATP)が枯渇するからである。解糖系の中間代謝産物であるフルクトース 1,6-二リン酸(fructose-1,6-diphosphate, FDP)は高エネルギー化合物であり、中枢神経系や心筋の虚血に対する保護作用があることが、種々の動物実験のデータにより示されている。動物の脳虚血モデルでは、FDPを虚血負荷の前後に静注すると、生存率、行動スコアともに改善し、脳波活動の変化や病理学的変化も少ないことが示されている。また、血流再開時の脳組織中のグルコースや pyruvate の濃度および pyruvate/lactate 比を上昇させ、虚血時および血流再開時に細胞内のエネルギーの予備能を高めることが推測されている。FDPにより phosphofructokinase が活性化され解糖が促進されることや、FDP自身が解糖系の中間代謝産物でありグルコースに替わるエネルギー源として利用される(1分子のFDPから4分子のATPが生成される)ことから、虚血環境下でのエネルギー代謝を助ける機能をもつといわれてきた。また、FDPは虚血および再灌流時に好中球によって活性化されるスーパーオキシドアニオンラジカル(スーパーオキシド)の産生を抑制することによっても、組織障害を防ぐと推測されてきた。

しかし、従来の報告では、虚血時の脳組織における高エネルギーリン酸がFDPによって温存されることは直接示されていない。また、FDPにより脳組織中のスーパーオキシドの活性が抑制されていることを直接示した報告はない。

2. 研究の目的

大分大学 脳・神経機能統御講座では、 ^{31}P を観測核種とする核磁気共鳴スペクトロスコピー(^{31}P -NMR)により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(phosphocreatine, PCr)を測定する実験系が確立している。我々の実験系では4分程度の時間分解能でPCrを連続測定することができ、細胞内の高エネルギーリン酸を定量するとともにエネルギー状態を経時的に観測することができる。我々はこれまでに灌流液の停止による脳虚血モデルや高カリウム溶液の灌流による脱分極性負荷を用いて、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。

本研究では、灌流液にFDP(1 ~ 5 mM)を加えることにより、脳虚血負荷に対する耐性が改善するか否か、 ^{31}P -NMRによるPCrの測定により検討することを目的とした。また、解糖系を介した脳細胞のエネルギー代謝にグリア細胞が関与していることが示されている。このためグリア細胞に対する選択的毒性をもつ fluorocitrate を含む

灌流液により予めグリア細胞を死滅除去したスライスを用いることにより、FDPの脳虚血に対する保護作用へのグリア細胞の関与についても検討した。

さらに、フリーラジカルの量を電子スピン共鳴法(ESR)により定量し、FDPによるスーパーオキシド除去能についても解析した。

3. 研究の方法

(1) ^{31}P -NMRによる脳エネルギー代謝の測定

- ① エーテル麻酔下にラットを断頭し、大脳を摘出した。速やかに脳スライスを作成し、酸素化した灌流液(10 mM ブドウ糖加人工脳脊髄液, 95% O_2 + 5% CO_2 で飽和)で灌流した。
- ② 十分に回復させた後、NMR装置(DRX-300, Bruker社)にセットし、 ^{31}P のNMRスペクトルを測定した。スペクトルの曲線下面積から、脳スライス中の ^{31}P を含む高エネルギーリン酸化合物を定量的に測定した。

(2) 脳虚血-再灌流負荷モデルによるFDPによる神経保護作用の検討

脳組織の虚血-再灌流負荷のモデルとして、灌流を停止することにより脳スライスを虚血条件下に一定時間置いた後、再び灌流を行った。虚血-再灌流負荷の前後に、FDPを含む灌流液(1 mM, 5 mM)による灌流を行った群と対照群とで、虚血に向かう過程および虚血からの回復過程をエネルギー代謝の側面から比較検討した。

(3) 神経細胞のエネルギー代謝過程とグリア細胞の役割

アストロサイトに対する選択的毒性をもつフルオロクエン酸(flurocitrate, FC)によりアストロサイトを除去し(neuron-richスライス)、同様の ^{31}P -NMRの実験を行うことにより、神経細胞そのもののエネルギー代謝過程とアストロサイトのエネルギー代謝過程における役割を検討することができる。これにより、FDPの神経保護作用がアストロサイトによるピルビン酸/乳酸産生機能の保護によるのか否かを検討した。

(4) 電子スピン共鳴法(ESR)によるFDPのスーパーオキシド除去能の測定

紫外線照射により発生させたヒドロキシルラジカルのFDPによるスカベンジング能をESRにより計測し、FDPの EC_{50} を推定した。スピントラップ剤として、CYPMPOを用いた。

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、無機リン酸を測定することができる (図 1)。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、APCr 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。

(2) 脳虚血-再灌流負荷時の FDP による神経保護作用の検討

①PCr の回復の検討再灌流 2 時間後の PCr の回復は FDP の濃度に依存して有意に改善した ($p = 0.0014$, 図 2)。

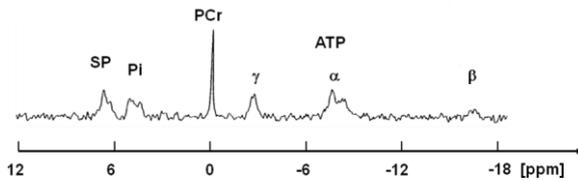


図 1 脳スライスの ^{31}P -NMR スペクトル

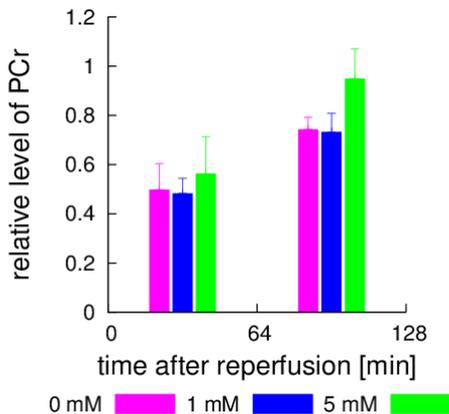


図 2 虚血-再灌流負荷後の PCr の回復と FDP の濃度 (0, 1, 5 mM)

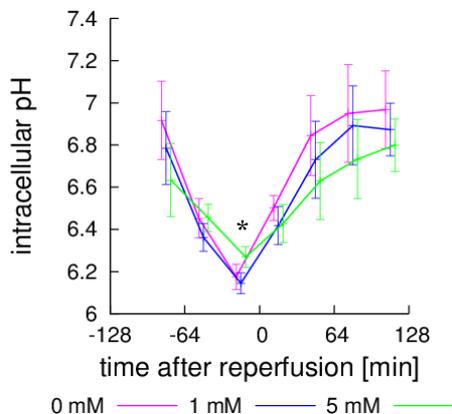


図 3 虚血再灌流負荷に伴う細胞内 pH の変化 (* $p < 0.01$, corrected (1 mM vs 5 mM))

②脳虚血-再灌流負荷時の細胞内 pH の変化
虚血負荷時には細胞内 pH は酸性側に变化したが、5 mM FDP を添加すると、その変化は有意に小さくなった (1 mM vs 5 mM, $p < 0.01$, corrected)。虚血負荷時の細胞内 pH が大きい程、再灌流 2 時間後の PCr の回復は良好であった ($R^2 = 0.4224$, $p = 0.007$)。

③虚血-再灌流負荷に伴う FDP の変化

FDP はリン酸基をもっているため、 ^{31}P -NMR スペクトル上で見ることができる。FDP の化学シフトの値は、pH によって变化した。逆に、以下の式により FDP の化学シフトから pH を推定することができ、Pi の化学シフトから推定される pH (Petroff, 1985) とよく一致した。

$$\text{pH} = 6.33 + \log\{(\delta - 3.83)/(6.99 - \delta)\}$$

虚血負荷により FDP のピークは 5.6ppm (pH 6.4) に移動した。再灌流開始とともにこのピークとは別に 6.6ppm (pH 7.2) のピークが出現し、5.6ppm のピークは徐々に小さくなっていった (図 4) このとき Pi から推定された細胞内 pH は 6.2 であったことから、FDP は細胞内ではなく脳スライスの間質液中にある FDP を反映していると考えられる
一方、虚血-再灌流負荷後に、サンプル中の FDP が減少した (図 5)。このことより、FDP はニューロン内に入って消費されていることが示唆された。

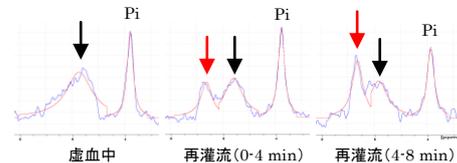


図 4 再灌流時にみられた異なる pH 環境における FDP の 2 つのピーク。虚血中のピーク (黒矢印) とは別のピークが再灌流後に見られ (赤矢印)、徐々に大きくなっていった。

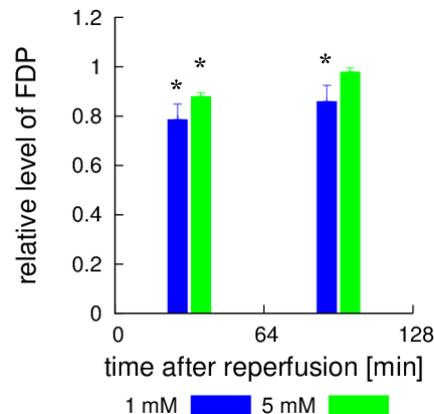


図 5 再灌流後の脳スライス中の FDP の減少 (* $p < 0.05$, 負荷前と比較)

(3) 神経細胞のエネルギー代謝過程とグリア細胞の役割

再灌流2時間後のPCrの回復はFDPの濃度に依存して有意に改善した(p=0.0089, 図6)。

(4) 電子スピン共鳴法(ESR)によるFDPのスーパーオキシド除去能の測定

FDPにはラジカルスカベンジ能が認められ、EC₅₀ = 21.6 mMであった。

$$y = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{21.6}\right)^{0.91}}$$

FDP濃度が1mMではほとんどスカベンジ能は認められず、5mMでは21%のスカベンジ能が観測された(図7)。

(5) 結論

①解糖系の中間代謝産物でありラジカルスカベンジャーでもあるFDPの脳保護効果について、エネルギー代謝の側面から検討した。

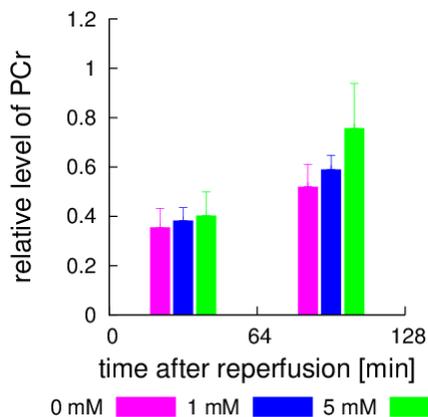


図6 neuron-rich スライスでのPCrの回復。アストロサイトの機能を抑制しても、FDPの脳保護効果が認められた。

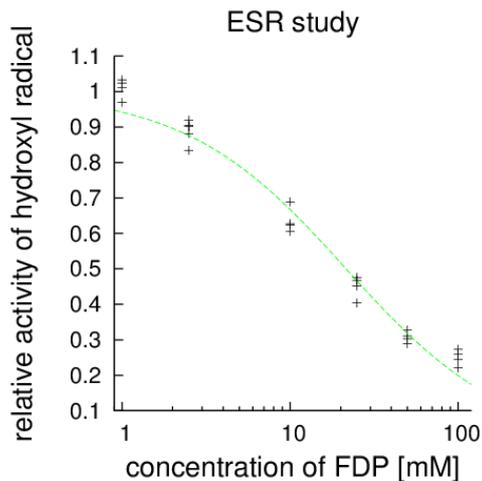


図7 ラジカルスカベンジ能の測定

②FDPの灌流液への添加により、脳虚血-再灌流負荷後の脳エネルギー代謝の回復が有意に良好であった。

③Neuron-rich スライスでも、この効果が認められた。このことから、脳保護効果の一部はニューロン内にて作用していることが示唆された。

④FDPは脳スライスの間質液中に届いていることがFDPの化学シフトのpH依存性より確認された。また、虚血負荷中および再灌流後のスライス中のFDP量の減少より、FDPが脳組織によって消費されていることが示唆された。虚血負荷中は酸素欠乏の状態にあるため、解糖系によって利用されていると思われる。

⑤ESRにより、FDPのラジカルスカベンジ能が示唆された。エネルギー代謝に対して保護効果が認められた5mMでは21%のスカベンジ能が認められたのに対し、エネルギー代謝に対する効果が認められなかった1mMではラジカルスカベンジ能もほとんど認められなかった。

⑥以上の所見より、FDPは解糖系にエネルギー基質として直接入るとともに、ラジカルスカベンジャーとして、脳虚血-再灌流負荷に対して、保護作用を示すことが³¹P-NMRによる研究によって示唆された。

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)

- Osamu Tokumaru, Chihiro Kuroki, Noriko Yoshimura, Tetsuro Sakamoto, Hidehiro Takei, Kazue Ogata, Takaaki Kitano, Naoko Nisimaru, Isao Yokoi
Neuroprotective effects of ethyl pyruvate on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion injury: a ³¹P-nuclear magnetic resonance study
Neurochemical Research 34(4):775-785, 2009 (査読有)

[学会発表] (計25件)

- Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T,

- Yokoi I. Neuroprotective effects of fructose-1,6-diphosphate on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion insult –a ^{31}P -NMR study– XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism (2011.05.25-28, Barcelona, Spain)
2. 北野敬明, 徳丸治, 黒木千尋, 古賀寛教, 野口隆之, 横井功. 脳虚血再灌流における fructose-1,6-diphosphate の脳保護効果について (^{31}P -NMR 実験). 日本麻酔科学会第 58 回学術集会 (2011.05.19-21, 神戸)
 3. Tokumar O, Kuroki C, Ogata K, Yada T, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effect of fructose-1,6-diphosphate on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion insult -a ^{31}P -NMR study-. 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会・全国学術集会 合同大会 (2011.03.28-30, 誌上開催)
 4. 徳丸治, 黒木千尋, 北野敬明, 横井功 fructose-1,6-diphosphate の脳保護効果に関する ^{31}P -NMR による検討. 第 37 回日本脳科学会 (2010.10.17-18, TianJin, China)
 5. Tokumar O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Fundamental consideration of ^{31}P -NMR study on brain energy metabolism: effects of temperature, [glucose], and $[\text{K}^+]$ of superfusate. 7th World Stroke Congress (2011.10.13-16, Seoul, Korea)
 6. Tokumar O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Fundamental consideration of ^{31}P -NMR study on brain energy metabolism: effects of temperature, [glucose], and $[\text{K}^+]$ of superfusate. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第 33 回日本神経科学大会) (2010.9, 神戸)
 7. Tokumar O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Depolarizing high- $[\text{K}^+]$ load model of rat brain energy metabolism: a ^{31}P -NMR study. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第 32 回日本神経科学大会) (2009.9, 名古屋)
 8. Tokumar O, Kuroki C, Ogata K, Koga H, Kitano T, Yokoi I. Fundamental consideration of ^{31}P -NMR study of brain energy metabolism. 36th International Congress of physiological sciences (2009.7, Kyoto, Japan)
 9. Tokumar O, Kuroki C, Ogata T, Kitano T, Yokoi I. Fundamental consideration of ^{31}P -NMR study on brain energy metabolism XXIVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (2009.6, Chicago, IL, USA)
 10. Tokumar O. Energy metabolism of rat brain measured by ^{31}P -NMR spectroscopy. Symposium on “Advances in cerebrovascular diseases” (2008.08.22, Nagpur, India)
- [その他]
ホームページ等
<http://www.med.oita-u.ac.jp/seiri1/>
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・医学部・准教授

研究者番号：40360151

横井 功 (YOKOI ISAO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80150366