

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790039
研究課題名（和文）レドックス反応に基づくグルタミン酸神経機能イメージング法の開発
研究課題名（英文）Noninvasive assessment of the brain redox status in chronic kidney disease mouse using overhauser-enhanced magnetic resonance imaging

研究代表者

大和 真由実（YAMATO MAYUMI）

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：30380695

研究成果の概要（和文）：腎不全で蓄積した尿毒素は、グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体を活性化し、グルタミン酸神経の機能異常を示すことが示唆されている。本研究では、Overhauser-enhanced MRI（核・電子間の 2 重共鳴法；OMRI）を用いた、腎不全モデルマウス脳内におけるレドックスイメージングを行った。

腎臓摘出後 2、4 および 8 週間後のマウスについて評価を行った。脳内酸化ストレスの指標としては、腎不全マウス（8 週）のみ、脳内 8-OHdG の蓄積が認められた。放射状水迷路による脳機能の評価では、摘出 8 週において学習障害が認められたが、2 及び 4 週においては正常マウスと同等の学習能力を示した。また、OMRI を用いて脳レドックスイメージングを行ったところ、4 週において造影剤である methoxycarbonyl-PROXYL のレドックス反応亢進が認められたが、8 週においては正常レベルであった。

以上の結果から、OMRI による脳機能評価では、行動変化や酸化物蓄積に先立つ病態変化をとらえることが出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Urea toxin is suggested to be induced the glutamatergic neuronal damage mediated by the activity of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. In this study, we aimed to demonstrate brain redox alterations in chronic kidney disease mouse noninvasively, using overhauser-enhanced magnetic resonance imaging (OMRI).

The reduction rate of 3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (methoxycarbonyl-PROXYL), a redox-sensitive contrast agent, was used as an index of the redox status in vivo. No changes were seen in the 8-OHdG (8-Hydroxydeoxyguanosine) or the memory disturbance at 2 or 4 weeks after CKD onset, but after 4 weeks of CKD, the methoxycarbonyl-PROXYL reduction rate, calculated from continuous images, had increased significantly. At 8 weeks after CKD onset, we observed an increase in the number of 8-OHdG-immunopositive cells and the disturbance in the memory. Thus, the noninvasive imaging of the brain redox alterations was associated with the initial stages of CKD cause brain injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：イメージング

1. 研究開始当初の背景

老化に伴い進行する脳機能低下や血管変性は、脳梗塞、認知症、アルツハイマー病等の脳疾患発症のリスクファクターであり、少子高齢化が急速に進む中、これら脳疾患の罹患率も平行して増加している。脳疾患を早期・軽度な段階で診断する為の手段としての脳イメージング法は、構造の情報だけでなく、近年では機能的な情報をあたえる技術として注目されている。イメージング技術によって脳内の生理的な活性（機能）を視覚化することにより、各部位がどのような機能を担っているのか、どこかの部位が傷害されているのかを明らかにすることが出来る。一方、現在の脳機能イメージングは、脳血流動態や、神経細胞の電気活動を指標として行われているが、種々の疾患における複雑な病的過程を考えると、既存の手法のみで脳機能部位や傷害部位を描出できるとは言い難い。

近年、「酸化・還元（レドックス）反応」のバランスの破綻が、脳の老化過程や脳疾患の成因や進展に関与することが報告されている。例えば、脳梗塞モデルラットの脳血管近傍にてフリーラジカルによる酸化反応が促進しており、それが傷害の一因となる（Yamato et al: FRBM 2003）。このような背景のもと、我々は、疾患モデル動物における脳機能イメージングの指標として、脳内レドックス反応に着目し研究を行ってきた。その際の脳画像化装置としては、Overhauser-enhanced MRI（核・電子間の2重共鳴法；OMRI）を、造影剤としてニトロキシラジカルを用いている。ニトロキシラジカルは、生体内レドックスに感受性があることから多くの *in vivo* 実験に用いられ、生体内酸化ストレス機序解明の“探索針”として有用性を発揮してきた。

一方で、脳機能や脳疾患に深く関わる機能分子として、グルタミン酸があげられる。グルタミン酸は中枢神経系において興奮性シナプス伝達を担う主要な神経伝達物質として機能しており、記憶・学習等の高次脳機能に重要な役割を果たしている（Nakanishi S et al: Brain Res Rev 1998）。しかし、その反面、過剰なグルタミン酸は神経細胞障害性を有し、さまざまな脳疾患に伴う神経細胞死の原因となることが報告されている（Obrenovich et al: Prog Neurobiol 1997）。グルタミン酸神経の機能異常を示す病態として、腎不全が知られている。慢性腎不全患者においては、記憶や学習などの高次脳機能が障害されており、その機序として、腎不全で蓄積した尿毒素が、グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体を活性化すると考えられている（D Hooge R et al: Neuropharmacology 1996）。また、グルタミン酸過剰状態では、過酸化水素の放出が報告されていることから（Asai et al: Neuroreport 1996）尿毒素によりグルタミン酸神経系を介しレドックスバランスが破綻する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、グルタミン酸神経機能に基づく脳内レドックス変化が画像解析することが出来れば、多くの疾患における病的過程を明らかにすることが出来ると考え、その画像化法の開発を目的とした。具体的には、以下の点について明らかにする。

- (1) 腎不全モデルマウスにおけるグルタミン酸神経変性過程でどのようなレドックス変化が惹起されるかを明らかにする。
- (2) 項目 1 で明らかとなったレドックス反応をニトロキシルラジカルによって捉えることで、OMRI を用いたグルタミン酸神経機能イメージングの開発を行う。

3. 研究の方法

本実験においては、腎不全モデルマウス (C57BL/6J 雌、8 週齢：5/6 腎摘) を用いて行う。研究項目については、以下に示す。

- (1) 腎不全マウス脳内におけるレドックスバランスの評価
腎不全マウス脳内における神経傷害は、行動学的・組織学的に評価する。摘出脳における酸化物蓄積 (TBARs 法) やアスコルビン酸等の還元物質の変動 (HPLC/ECD 法) も併せて評価する。
- (2) NMDA 型グルタミン酸受容体を介した尿毒素によるレドックス反応の評価
尿毒素によるグルタミン酸神経系へ直接的な作用を検討するために、慢性腎不全マウスから得られた血清を徐タンパクした後、マイクロダイアリス法にて脳内灌流し、グルタミン酸動態や過酸化物蓄積を評価する。
- (3) 腎不全モデルマウスにて生成する活性種とニトロキシルラジカル反応性の検討
見出されたレドックス関連物質により、ニトロキシルラジカルの常磁性が変化するか否かについて、電子スピン共鳴法を用いて「試験管内」および「腎不全マウス脳内」での反応性を検討し、画像化のコンセプトを確立する。
- (4) OMRI を用いたグルタミン酸神経機能の画像解析
OMRI 造影剤には、脳画像化に適した methoxycarbonyl-PROXYL を随時合成し用いる。組織学評価と OMRI による機能イメージングと比較検討する。

4. 研究成果

- (1) 腎不全マウス脳内におけるレドックスバランスの評価

腎不全マウス脳内の酸化ストレスは、DNA の酸化物である 8-OHdG の免疫染色によって評価した。腎摘出後、2、4 及び 8 週間経過したマウスの脳を摘出し、8-OHdG の免疫染色したところ、8 週群において脳内 8-OHdG の蓄積が認められた。

また、血漿中においても脂質過酸化物の蓄積や過酸化水素の上昇が認められた。

- (2) NMDA 型グルタミン酸受容体を介した尿毒素によるレドックス反応の評価

尿毒素によるグルタミン酸神経系へ直接的な作用を検討するために、慢性腎不全マウスから得られた血清を徐タンパクした後、マイクロダイアリス法にて脳内灌流し、グルタミン酸動態や過酸化物蓄積を評価した。

血清の脳内灌流においては、グルタミン酸及び過酸化水素の変動は認められなかった。この原因として、毒性を發揮する尿毒素の濃度が低いことが考えられた為、これまでに中枢性に障害を与えると報告されている尿毒、Methylguanidine 及び Guanidinosuccinic acid を、マイクロダイアリス法を用いて脳内灌流した (てんかん発作を誘発することが知られている濃度：各 1 mM)。脳内グルタミン酸濃度は、いずれの化合物についても灌流時に低下が認められた。また、Methylguanidine 灌流時においては、過酸化水素の生成がベースラインの 1.5 倍程度の上昇を示した。以上の結果から、尿毒素の種類によっては、脳内において過酸化水素を生成し酸化ストレスを惹起する可能性が示唆された。

- (3) 腎不全モデルマウスにて生成する活性種とニトロキシルラジカル反応性の検討

項目(2)の研究結果から、腎不全モデルマウスの脳内において過酸化水素を生成する可能性が示唆された。我々は、酸化ストレスモデルマウスにおいて過酸化水素が生成した場合、さらにヒドロキシルラジカルが生成すること、その際に生体内でニトロキシルラジカルと反応し、ニトロキシルラジカルがヒドロキシルアミン体へと変換することを明らかにした。

(4) OMRI を用いたグルタミン酸神経機能の画像解析

尿毒症モデルマウスにおける脳機能は、腎摘出 2、4、及び 8 週後に放射状水迷路によって評価した。摘出 8 週において学習障害が認められたが、2 及び 4 週においては正常マウスと同等の学習能力を示した。一方で、OMRI を用いて脳レドックスイメージングを行ったところ、4 週において造影剤である methoxycarbonyl-PROXYL のレドックス反応亢進が認められたが、8 週においては正常レベルであった。フリーラジカル反応については、L-band ESR を用いたスペクトル解析についても同様に検討を行った。その結果、OMRI 測定と同様に、腎臓摘出 4 週間群のみにて、フリーラジカル反応の亢進が認められた。

前年度に行った 8-OHdG 免疫染色による酸化ストレスの評価では、8 週群において DNA 酸化物の蓄積が認められている。以上の結果から、OMRI による脳機能評価では、行動変化や酸化物蓄積に先立つ病態変化をとらえることが出来る可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大和 真由実 (YAMATO MAYUMI)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：30380695

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：