

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11523

研究課題名(和文)ダブルコンジェニックSHRSP/Izmを用いた柑橘成分の脳機能障害防御機構の解析

研究課題名(英文)Protection mechanism of citrus components against brain dysfunction using double congenic SHRSP/Izm

研究代表者

奥山 聡 (Okuyama, Satoshi)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：40550380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)の第1、18染色体上に存在すると示唆されている食塩感受性「量的形質遺伝子座」(QTL)を、SHRSP/IzmとSHR/Izmの間で交配を重ね両方同時に交換したダブルコンジェニック系統(SHRpch1_18)に対し、柑橘果皮に含有されるheptamethoxyflavone(HMF)とnaringin(NGI)の脳保護作用について検討した。脳線条体における解析で、高濃度食塩負荷群で見られたミクログリア活性化と神経細胞数の減少が、特にNGI群で改善されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食塩感受性QTLのダブルコンジェニックラット(SHRpch1_18)を用いた。我々はこれまで、柑橘果皮に含有されるheptamethoxyflavone(HMF)とnaringin(NGI)の脳保護作用に着目し研究を進めてきたことから、本研究ではSHRpch1_18に高食塩負荷を行い、HMFとNGIの効果について解析し、特にNGIで脳線条体のミクログリア活性化抑制作用と神経細胞死抑制作用を確認した。脳卒中病態を引き起こす可能性が示唆されている食塩感受性QTLに対し、改善効果が見込まれる化合物を示唆できたことは、脳卒中予防を考える上でも非常に有意義な知見である。

研究成果の概要(英文)：The salt-sensitive "quantitative trait locus" suggested to be present on chromosomes 1 and 18 of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) was crossed between SHRSP/Izm and SHR/Izm, and a double congenic line (SHRpch1_18) was established. We investigated the cerebroprotective effects of heptamethoxyflavone (HMF) and naringin (NGI) contained in citrus peel on SHRpch1_18. Analysis in the brain striatum showed that the microglial activation and decrease in the number of neurons seen in the high salt-loaded group was ameliorated in the NGI group.

研究分野：神経薬理学

キーワード：SHRSP 脳卒中 柑橘成分

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat) は、重度の高血圧に加え、脳血管障害を高率に自然発症するヒト本態性高血圧・脳血管疾患モデルラットであり、脳卒中を自然発症する病体モデル動物として広く使われている。ヒト本態性高血圧モデルラットである SHR (spontaneously hypertensive rat) と SHRSP は、高血圧および脳卒中が遺伝的な要因により発症することを強く示唆する存在であるが、どのような遺伝的異常が脳卒中発症の原因であるかについては明らかでない。また、SHRSP には神経細胞やアストロサイト、脳血管および血液脳関門などに脆弱性が認められている。島根大学医学部の並河らは、SHR および SHRSP の高血圧関連遺伝子の探索を行っており、これまでの研究により、SHRSP の第 1 染色体と第 18 染色体上にストレス感受性や食塩感受性高血圧の遺伝子が存在する領域を見出している。これらの遺伝子領域はまた、脳卒中の発症や悪化との関連の可能性も示唆されていることから、並河らは高血圧ならびに脳卒中発症メカニズムへの関与を調べるために、SHR の第 1 染色体と第 18 染色体の特定領域を SHRSP の同領域と入れ替えた SHRpch1_18 と、その逆の SHRSPrch1_18 ダブルコンジェニックラットを開発した。その後の解析により、SHRSP アストロサイトの機能障害にこの領域の関連が深いことが明らかになっている。

2. 研究の目的

SHRSP に対して一過性全脳虚血手術を施すと、脳海馬における遅発性神経細胞死が顕著に起こることから、脳梗塞急性期における神経細胞障害のモデルとしても有用である。我々はこれまでに、柑橘果皮の含有成分である 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF) と naringin (NGI) が、一過性全脳虚血手術を施した SHRSP の海馬で起こる神経細胞死を抑制すること、さらに未処置の SHRSP に HMF を長期摂取させたところ、SHRSP が示す記憶障害の低下を抑制する作用があることをこれまでに明らかにしてきた。このことから本研究では、SHRSP と SHRpch1_18 を用いて高濃度食塩負荷により引き起こされる脳血管障害に対し、HMF および NGI が脳機能障害抑制作用を示すかどうかを検討した。

3. 研究の方法

雄性 10 週齢の両ラットに対し対照群を CON 群、1%食塩水を自由摂取させた群を NaCl 群、1%食塩水と HMF 0.125%添加食を与えた群を HMF 群、1%食塩水と NGI 0.25%添加食を与えた群を NGI 群として飼育した。12 週齢で行動実験を行い、13 週齢で脳を免疫組織化学染色およびウエスタンブロットにより解析した。行動試験では、空間・作業記憶評価試験の一つである Y 字型迷路試験を実施し、移動距離や軌跡について解析した。

4. 研究成果

SHRSP に対する作用

Y 字型迷路試験の結果、NaCl 群は CON 群と比べ、頭部の移動距離が減少傾向にあったが、HMF 群、NGI 群共に減少抑制効果は認められなかった。本モデルラットは脳線条体で障害が強く認められることから、線条体での解析を中心に行った。免疫組織化学染色による解析では、CON 群に対し、NaCl 群では有意なミクログリア (Iba1 陽性細胞) の増加が認められた。それに対し、HMF 群には抑制効果は認められなかったが、NGI 群では有意な抑制作用が認められた。神経細胞 (NeuN

陽性細胞)は、NaCl 群で減少傾向が認められたが、HMF 群、NGI 群共にその減少を抑制していた【図 1】。脳由来神経栄養因子 (BDNF) の解析では、CON 群に対し NaCl 群では減少していたが、HMF 群および NGI 群では産生が増加しており、特に HMF 群で顕著であった。HMF の神経細胞死抑制には BDNF 産生促進効果が関与している可能性が示唆された。また NGI には抗酸化作用が報告されており、本実験におけるミクログリア活性化抑制作用と併せ、NGI 群の神経細胞死抑制には抗酸化作用が関与している可能性が示唆された。血液脳関門を構成する細胞間密着結合関連タンパク質の 1 つである occludin について、ウエスタンブロット法による解析を行ったところ、NaCl 群では減少傾向が認められたが、HMF 群、NGI 群共にその減少を抑制しており、特に HMF 群で強い作用が見られた。本モデルラットにおいては血液脳関門の脆弱性が報告されていることから、これらの化合物による血液脳関門機能の保護作用も、神経細胞死抑制に関与するものと考えられた。

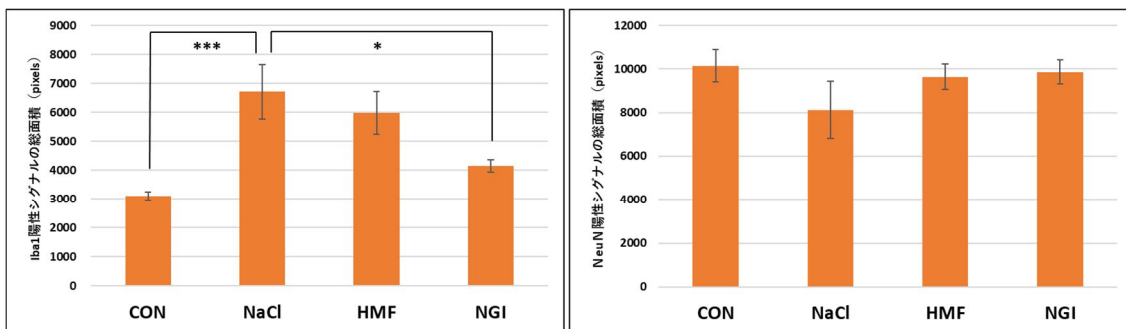


図 1. SHRSP の線条体における Iba1 および NeuN 陽性シグナルの総面積

SHRpch1_18 に対する作用

Y 字型迷路試験の結果、NaCl 群は CON 群と比べ、頭部の移動距離が減少傾向にあったが、HMF 群および NGI 群で有意な減少抑制効果を示した。本モデルラットについても SHRSP 同様に線条体での解析を中心に行い、比較した。免疫組織化学染色による解析では、CON 群に対し、NaCl 群では有意なミクログリア (Iba1 陽性細胞) の増加が認められた。それに対し、HMF 群、NGI 群共に増加抑制の傾向が認められた。神経細胞 (NeuN 陽性細胞) は、NaCl 群で有意な減少が認められたが、NGI 群のみその減少を抑制していた【図 2】。脳由来神経栄養因子 (BDNF) の解析では、CON 群に対し NaCl 群では減少していたが、HMF 群で産生が増加していた。しかし、NGI 群では大きな変化は認められなかった。本モデルにおいても、HMF の BDNF 産生促進効果が確認できたが、神経細胞死抑制は認められなかった。NGI では、SHRSP 同様に BDNF による作用よりも抗酸化作用の関与が強い可能性が示唆される。ウエスタンブロット法による occludin 解析では、SHRSP と同様に NaCl 群では減少傾向が認められたが、HMF 群でその減少を抑制していた。

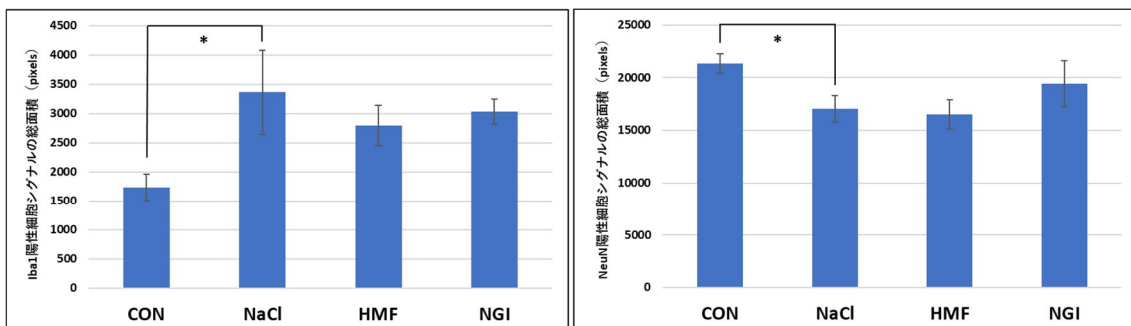


図 2. SHRpch1_18 の線条体における Iba1 および NeuN 陽性シグナルの総面積

SHRSP に高濃度食塩負荷を施すと、これまでに示唆されていたように、脳線条体でのミクログリア活性化、神経細胞死、occludin 量の減少が認められた。SHRpch1_18 の結果と比較しながら考察すると、SHRSP の食塩感受性高血圧の遺伝子が存在する領域として同定された第 1 染色体と第 18 染色体上の一部の遺伝子領域であるが、SHRSP と同様に線条体でのミクログリア活性化、神経細胞死、occludin 量の減少が認められた。このことから、これらの遺伝子領域は高血圧による脳への障害を引き起こすと共に、様々な面で脳卒中病態悪化にも関与が深い遺伝子領域である可能性を明らかにすることができた。

これら両モデルの変化に対し、HMF と NGI は BDNF 産生促進など共通点も多いが、一部それぞれ異なるメカニズムで脳機能障害に対して改善効果を示す可能性が示唆された。HMF と NGI の脳保護効果が SHRSP で確認されたことは重要な知見であるが、SHRpch1_18 においても HMF と NGI の作用が確認されたことの意義は大きく、今後も引き続き、脳の幅広い部位と作用メカニズムについて解析を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥山聡、二宮風雅、大久保優、玉那覇アリサ、永井美穂子、澤本篤志、中島光業、古川美子
2. 発表標題 脳卒中中易発症ラットの一過性全脳虚血障害に対する河内晩柑果皮成分の神経細胞保護作用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥山聡、島崎結子、奥迫優奈、大原浩貴、並河徹、大政俊樹、澤本篤志、中島光業
2. 発表標題 SHRSP/1zmおよびダブルコンジェニックSHRSP/1zmに対する柑橘果皮成分の作用解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	並河 徹 (Nabika Toru) (50180534)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・特任教授 (15201)	
研究分担者	中島 光業 (Nakajima Mitsunari) (70311404)	松山大学・薬学部・教授 (36301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	澤本 篤志 (Sawamoto Atsushi) (70760388)	松山大学・薬学部・准教授 (36301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関