

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591846

研究課題名（和文） 希少糖D-アロースの脳梗塞障害保護作用

研究課題名（英文） Protective effect of rare sugar D-allose on ischemic injuries occurred by brain embolism.

研究代表者

徳田 雅明（TOKUDA MASAAKI）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10163974

研究成果の概要（和文）：脳虚血再灌流モデルを用いた D-アロースの効果の検証を行った。SD ラット（♂、体重 350-400 g）を用いナイロン糸による中大脳動脈の 60 分間閉塞モデル（MCAO）に、50mg/kg～800mg/kg の間で D-アロース（in 生理食塩水）を持続投与した結果、酸化ストレスマーカーは、D-アロースにより著しい減少を示し、D-アロースにより脳梗塞を抑えることができることが判明した。D-アロースは濃度依存性に脳梗塞により生じる障害領域を縮小することが示された

研究成果の概要（英文）：We performed the experiment using a rat model with brain ischemia and reperfusion. Male SD rats weighing 350-400g were used. The ischemic model was made by placing a nylon thread in the mid brain artery for 60 min. D-allose reduces the impaired region of brain embolism in a dose dependent manner. D-allose (50mg/kg～800mg/kg) was administered intravenously. Oxidative stress markers were markedly reduced by D-allose. Thus, D-allose was revealed to reduce the impaired region of brain embolism in a dose-dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：(1)希少糖 (2) D-アロース (3)脳梗塞 (4) 血液脳関門 (5) 虚血再還流障害 (6)活性酸素

1. 研究開始当初の背景

虚血再環流障害の中でも脳梗塞は心筋梗塞とともに致命的危険性を伴う疾患であり、発症頻度も高い。早期に適切な治療を実施することが予後において非常に重要である。特に虚血後の再環流時に発生する大量の ROS

が病状を悪化し浮腫や神経細胞死を惹起するので、ROS の産生を抑えることは有効な治療となりうる。様々な治療法が開発されてきていはいるものの、まだまだ不十分であり、より安全で有効な治療薬の開発が望まれている。

2. 研究の目的

我々は希少糖の研究を長年行ってきた。希少糖とは自然界に微量にしか存在しない単糖の総称であり、数十種類以上の糖が知られている。希少糖の中で D-アロースは D-グルコースの C-3 エピマーであるが、我々は D-アロースに抗酸化作用があることを発見した (Murata et al. J Biosci Bioeng. 2003;96(1):89-91.)。この D-アロースを虚血再還流障害に適用することで有効に障害を予防したり、治療に応用できないかと考えた。例えば注射液により緊急時に静脈内投与することで病状の進行を有効に防ぐというような用途である。D-アロースを脳の虚血性疾患の予防薬・治療薬として応用することを目指す。この有効性をラット脳虚血再還流 (脳梗塞) モデルにおいて検証することを目的とする。

3. 研究の方法

研究の方法としては以下のような解析を行った。

(1) 脳虚血再灌流モデルを用いた D-アロースの効果の検証

SD ラット (♂、体重 350-400 g) を用いナイロン糸による中大脳動脈の 60 分間閉塞モデル (MCAO) に、50mg/kg ~800mg/kg の間で D-アロース (in 生理食塩水) を持続投与し、triphenyltetrazolium chloride (TTC)染色を行い、虚血梗塞巣の割合を測定する。発症前投与の他に、発症直後、発症から一定時間が経過してからの投与 (最大 48 時間程度まで) を行い効果判定を行う。

(2) 同様の作用を持つ他の薬物との効果の比較検討

D-アロース以外の希少糖 (特に一定の抗酸化作用が確認されている D-プシコース、アイトールなど) との比較を行う。また現在抗酸化の作用機序を有し治療に用いられているエダラボンをはじめ、SOD (スーパーオキシドディスムターゼ) やアロプリノールなどとの比較検討試験を実施する。

(3) 体内動態や安全性の検証

D-アロースを経静脈的あるいは経口的に投与時の、血液を含む各臓器における D-アロースの動態や代謝について、

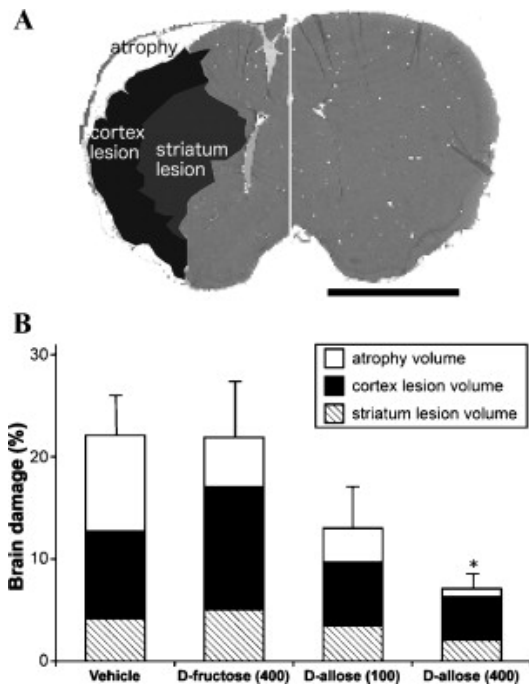
サンプルオキシダイザーによる分析やオートラジオグラフィーを用いて継続的に解析する。

(4) 抗酸化作用を中心とした作用メカニズムの解明

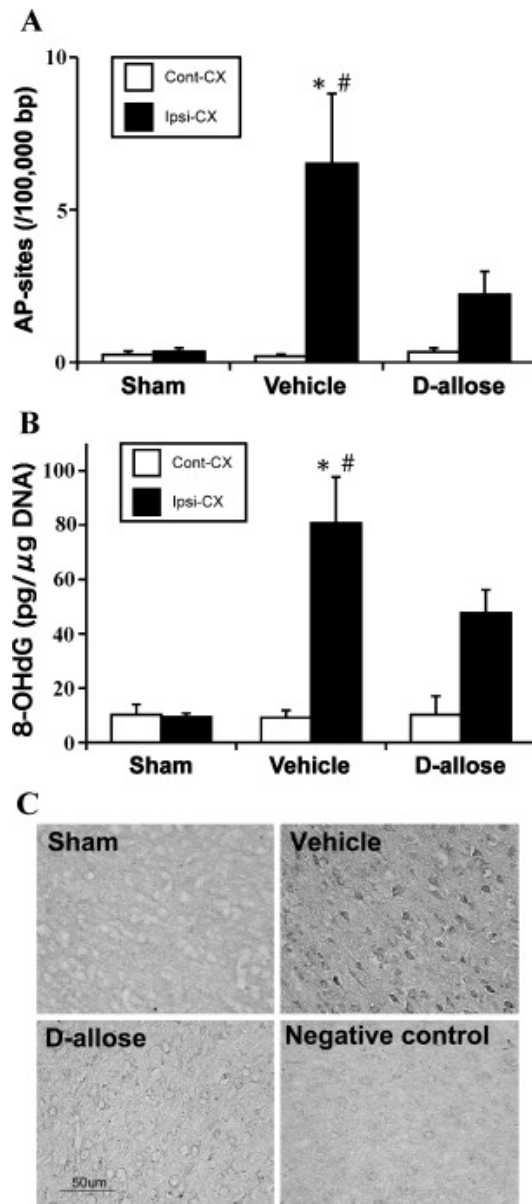
- ① 培養神経細胞系を用いて、D-アロースの濃度を様々に変えて¹⁴C-D-グルコースの取り込みを調べる。Competitive inhibitionがかかるかどうかを解析する。
- ② 虚血の際に上昇する NADPH オキシダーゼ活性、NADPH オキシダーゼの catalytic subunit である gp91(phox)の誘導について RT-PCR または Western blot により解析する。
- ③ グルタミン酸オキシダーゼ法により、グルタミン酸オキシダーゼ)酵素を固定化した微小グルタミン酸電極を用いて測定する。また Ca 濃度測定を共焦点レーザー顕微鏡を用い解析する。
- ④ D-アロースの存在下および非存在下での脳の切片において、TUNEL 染色法により、アポトーシスに陥っている細胞を検出する。
- ⑤ 脳の水分量を測定し浮腫の程度を測定し D-アロースによる抑制がかかるかどうかを検証する。
- ⑥ D-アロース投与により活性型の phospho-MEK 1/2 や phospho-ERK 1/2 の量を Western blot 解析する。

4. 研究成果

脳虚血再灌流モデルを用いた D-アロースの効果の検証を行った。SD ラット (♂、体重 350-400 g) を用いナイロン糸による中大脳動脈の 60 分間閉塞モデル (MCAO) に、50mg/kg~800mg/kg の間で D-アロース (in 生理食塩水) を持続投与し、triphenyltetrazolium chloride (TTC)染色を行い、虚血梗塞巣の割合を測定した。結果を下図に示す。D-アロースは著明に脳梗塞により生じる障害領域を縮小した。そしてこの効果には濃度依存性が認められた。一方 D-フラクトースでは効果が認められなかった。

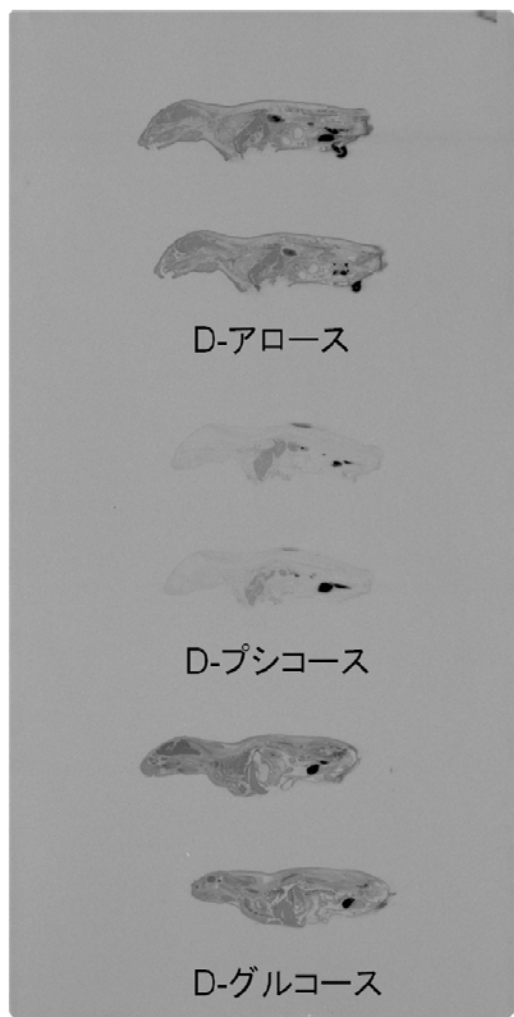


またこの系において、酸化ストレスマーカーの apurinic/aprimidic abasic sites (AP-sites)および 8-hydroxy-2'-deoxy guanosine (8-OHdG)を測定した。下図にその結果を示す。両マーカーともに、血液を遮断した側 Ips では、遮断していない健常側 Cont に比べて、大量の活性酸素が産生された。これに対して D-アロースを使用すると、著しい減少を示したことから、D-アロースは有効に酸化ストレスを改善することが判った。



次いで、体内動態や安全性の検証については、D-アロースが正常な脳血液関門を超えて脳内に入るかどうかを解析するため、D-アロースの ^{14}C アイソトープラベルした D-アロースをマウスに経静脈投与し、オートラジオグラフィーを用いて解析した。対照として、 ^{14}C アイソトープラベルした D-グルコースを用いた。正常ラットの脳において、D-アロースは D-グルコースに比べ脳血液関門の通過性は悪いが、一定程度脳内に入ることが判明した。D-アロースは虚血再還流障害に陥った脳では、正常よりも多く脳内に入ることが予想されるので、保護作用を果たすだけの脳内への取り込みがあると思われた。また虚血再還流障害に陥った脳では、正常脳よりも D-アロースは脳内に多く入ることが判った。これは障害により、脳血液関門に破綻が起き

ていることを示しているのではないかと思われた。一方対象として用いた希少糖 D-プシコースでは脳内に全く入らなかった。



虚血の際に上昇する NADPH オキシダーゼ活性、NADPH オキシダーゼの catalytic subunit である gp91(phox)の誘導について Western blot により解析し、D-アロースが誘導を抑えることが判明し、これが抗酸化作用のひとつだと思われた。

脳の水分量を測定し浮腫の程度を測定し D-アロースによる水分量の軽度抑制がかかることが判った。

また D-アロース投与により活性型の phospho-MEK 1/2 や phospho-ERK 1/2 の量を Western blot 解析したところ、リン酸化抑制の傾向が見られ、これら酵素の活性化を D-アロース抑制することが判明した。

以上の動物実験により、D-アロースの脳虚血により生じる障害に対する有効性が示された。

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)

- ① Nakamura T, Tanaka S, Hirooka K, Toyoshima T, Kawai N, Tamiya T, Shiraga F, Tokuda M, Keep RF, Itano T, Miyamoto O, Anti-oxidative effects of D-allose, a rare sugar, on ischemia-reperfusion damage following focal cerebral ischemia in rat. *Neurosci Lett.* 2011;487(1):103-6

[学会発表] (計 4 件)

- ① Masaaki Tokuda, How the New frontier of D-psicose world has been created in Kagawa. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011,
- ② Yuki Miyawaki, Masaaki Ueki, Takehiko Asaga, Masaaki Tokuda, Gotaro Shirakami, D-allose reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor- α . Rare Sugar Congress in Kagawa 2011
- ③ Fuminori Yamaguchi, Kana Yamada, Chisato Noguchi, Kazuyo Kamitori, Youyi Dong, Yuko Hirata, Mohammad A Hossain, Ikuko Tsukamoto, Masaaki Tokuda, Rare sugar D-allose strongly induces Thioredoxin interacting protein (TXNIP) and inhibits osteoclast differentiation in Raw264 cells. Rare Sugar Congress in Kagawa 2011
- ④ 徳田雅明、塚本郁子、希少糖の医薬品及び食品への利用、第 47 回生物物理学会年会

[図書] (計 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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kms.ac.jp/~physiol1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 雅明 (TOKUDA MASA AKI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10163974

(2) 研究分担者

山口 文徳 (YAMAGUCHI FUMINORI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：40271085

板野 俊文 (ITANO TOSHIFUMI)
香川大学・大学本部・理事
研究者番号：60145042

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：