

## 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 5月31日現在

機関番号:17501

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2009~2011

課題番号:21591976

研究課題名(和文) エネルギー代謝とラジカルスカベンジ能からみた CV-159 の脳保護作用

研究課題名(英文) Neuroprotective effects of CV-159 viewed from energy metabolism and radical scavenge capacity

研究代表者

徳丸 治(TOKUMARU OSAMU)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号:40360151

研究成果の概要(和文):

ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬 CV-159 は L 型  $Ca^{2+}$  チャネルの阻害作用ならびにカルモジュリン阻害作用、ラジカルスカベンジ能があるとされる。そ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。CV-159 の灌流液への添加 (10 nM - 10  $\mu$ M) による脳虚血 - 再灌流負荷後のエネルギー代謝の回復には変化が認められなかった。しかし、CV-159 腹腔内投与 (120  $\mu$ g/kg) により、脳虚血 - 再灌流負荷後のエネルギー代謝の回復は有意に良好であった。

研究成果の概要(英文):

CV-159 is a selective blocker of  $Ca^{2+}$ /calmodulin and a free radical scavenger. Neuroprotective effects of CV-159 on energy metabolism of rat brain were investigated by phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy. CV-159 was added to superfusate (10 nM - 10  $\mu$ M, *in vitro* application), or was administered intraperitoneally (120  $\mu$ g/kg) to male Wistar rats 1 hr before decapitation (*in vivo* application). The recovery level of phosphocreatine, energetic buffer of ATP in living cells, 1 h after the reperfusion was significantly higher in intraperitoneally CV-159-administered rats than in the control. But with *in vitro* application, no neuroprotective effect was observed when brain slices were superfused with ACSF containing CV-159.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:神経生理学, スピン解析学

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, CV-159, クレアチンリン酸, ATP

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は日本人の死因の第三位である。昭和40年代をピークに減少傾向にあったが近年は横ばいの傾向がみられ、生活習慣病の終末像のひとつと位置づけられている。このようなリスクをもった人の多い高齢者では、

全身麻酔時に低酸素血症に対する耐性が低いといわれている。高齢化社会を迎えて、今後ますます高齢者の手術症例が増加すると予想されており、術中・術後における低酸素血症や脳虚血に対する予防法や治療法の開発は極めて重要な課題である。

虚血による脳障害においては、①フリーラジカルの発生、②エネルギー基質の枯渇、および③炎症反応がその病態に多大な影響を与えるといわれている。このうち、フリーラジカルは虚血—再灌流に際して大量に発生し、生体膜の脂質を過酸化し組織に障害を与えるとされる。このフリーラジカルを捕捉するラジカルスカベンジャーを虚血時、特に再灌流時に投与すれば、脳組織に対する障害を軽減することができると考えられる。

フリーラジカル消去剤 edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, ラジカット®) は世界で初めて脳保護剤として承認された。Edaravone は hydroxyl radical 等の有害なフリーラジカルを消去して脂質の過酸化を抑制し、脳を酸化的障害から保護する抗酸化作用を薬理作用機序として有するとされる (Watanabe et al., 1997)。

CV-159 (1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid) はわが国で開発された 1,4-ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬である。CV-159 は L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの阻害作用ならびにカルモジュリン阻害作用が報告されているが、CV-159 自体にラジカルスカベンジ能があるされている (矢島ら, 2002)。これまでに、虚血心筋障害や肝虚血再灌流障害に対する保護作用が報告されている (Imai et al., 1987; Watanabe et al., 2008; Kobayashi et al., 2008)。脳虚血に対する保護作用についても in vivo モデルで報告されているが (Miyazaki et al., 1999), その作用は L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの阻害作用ならびにカルモジュリン阻害作用に因るものとされ、ラジカルスカベンジ能については言及されていない。

## 2. 研究の目的

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。

大分大学 神経生理学講座では、 $^{31}P$  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高エネルギーリン酸 (ATP やクレアチンリン酸 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、CV-159 の投与により脳虚血負荷

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。

## 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 (400  $\mu$ m 厚) 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 (4 ml/min, 27.5°C, 図 1)。

② 脳スライスを十分に回復させた後、NMR 分光装置 (DRX-300, Bruker 社) にセットし、 $^{31}P$  の NMR スペクトルを測定した (図 2)。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 CV-159 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 (64 分間) 置いた後、再び灌流を行った (128 分間)。虚血—再灌流負荷の前後に、CV-159 投与群と対照群とで、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。CV-159 の投与は以下の 2 通りの方法で行った。

#### ① in vitro での投与

CV-159 (10 nM - 10  $\mu$ M) を灌流液に加えて、虚血—再灌流負荷を行った。

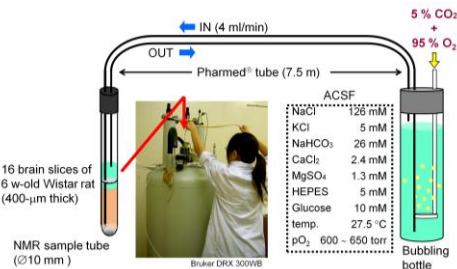


図 1 脳スライスの灌流装置

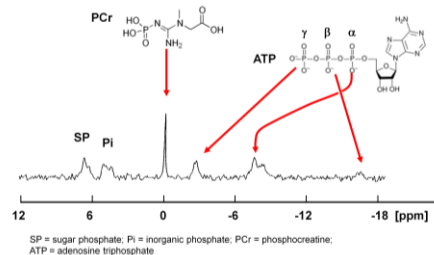


図 2  $^{31}P$ -NMR スペクトル

② *in vivo* での投与

CV-159 (120 µg/kg)を腹腔内投与し、1時間後に脳スライスを作成し、虚血-再灌流負荷を行った。

(3)神経細胞のエネルギー代謝過程とグリア細胞の役割

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。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 (fluorocitrate, FC)によりアストロサイトを除去し (neuron-rich スライス), 同様の <sup>31</sup>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、CV-159の神経保護作用がアストロサイトによるピルビン酸/乳酸産生機能を介するか否かを検討する。

(4)電子スピン共鳴法(ESR)による CV-159 のスーパーオキシド除去能の測定  
灌流液に紫外線を照射して発生させたヒドロキシルラジカルの CV-159 によるスカベンジング能を、G-CYPMPO をスピントラップ剤として用いた ESR により計測し、CV-159 の EC<sub>50</sub> を推定する。

4. 研究成果

(1)脳虚血-再灌流モデルを用いたCV-159による神経保護作用の検討

① *in vitro* での投与

人工脳脊髄液に10 nM~10 µM のCV-159を添加した群と対照群とで、虚血-再灌流負荷前後の脳スライス中のPCrの回復を比較した。10 nM~10 µM のいずれの濃度においても、CV-159添加によってPCrの回復に変化は認められなかった(図3)。CV-159は水に難溶性であり、灌流用チューブや試験管に吸着しやすいことから、灌流液に加えたCV-159の濃度が想定していたよりも低かった可能性が考えられる。

② *in vivo* での投与

上記 *in vitro* での投与が無効であったため、投与方法を *in vivo* に切り替えた。CV-159 (120 µg/kg)腹腔内投与した群(投与群)と対照群とで、脳スライスに対する虚血-再灌流負荷前後の脳スライス中のATPおよびPCrの回復を比較した。虚血負荷によりPCr、ATPともに検出できないレベルに減少したが、再灌流により一定のレベルまで回復した。灌流再開1時間後のPCrは、投与群で虚血負荷前の67.0 ± 5.5%, 対照群で50.8 ± 3.6%に回復していた(図4, p < 0.05)。負荷後のATPのレベルや虚血負荷中の細胞内pHには差が認められなかった。

(2)形態学的検討

透過型電子顕微鏡により、CV-159添加人工脳脊髄液中で灌流した脳スライスの海馬

(CA1)および大脳皮質(一次体性感覚野)の超微細形態を観察した。神経細胞およびグリア細胞の核、細胞小器官、細胞膜のいずれにも変化は認められなかった(図5)。

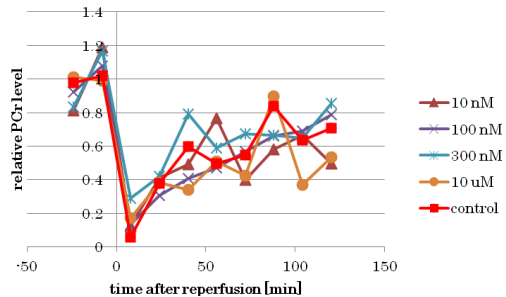


図3 虚血-再灌流負荷に伴うPCrの変化:  
*in vitro* でのCV-159投与

いずれの濃度でも脳保護効果は認められなかった。

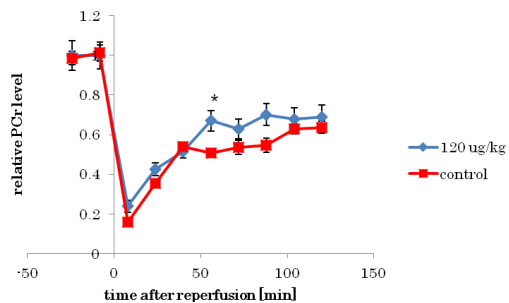


図4 虚血-再灌流負荷に伴うPCrの変化:  
*in vivo* でのCV-159投与

再灌流1時間後に脳保護効果が認められた。

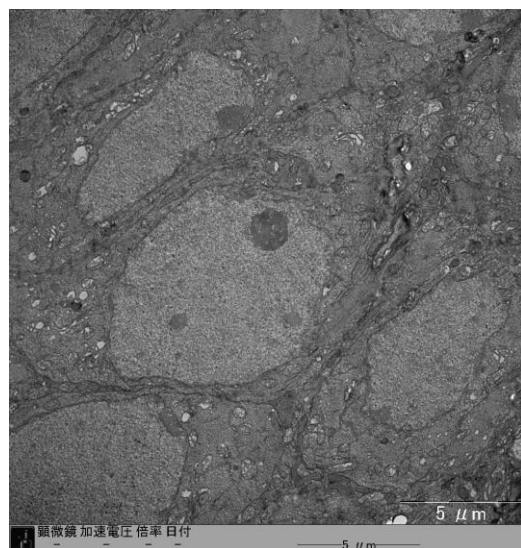


図5 CV-159添加人工脳脊髄液中で灌流したラット海馬CA1領域

(3) 今後の展望

① *in vitro* での投与におけるCV-159の至適濃度の決定に当初見込んだ以上の時間を費やしてしまったために、FCによりアストロサイトを除去したneuron-richスライスによる実験を完了することができなかった。現在、実験を継続してデータ取得中である。

② 電子スピン共鳴法によるCV-159のラジカルスカベンジ能の測定

CV-159は水に難溶性であり容器に付着し易いため、ラジカルスカベンジ能の測定には工夫を要した。このため、平成23年度中に実験を完了できなかったが、現在引き続き、CV-159のhydroxylラジカルスカベンジ能をESRにより測定中である。

③ ルシフェリン／ルシフェラーゼ法によるATPの測定

高エネルギーリン酸であるATPは<sup>31</sup>P-NMRにより定量できるが、脳組織中の含有量がPCrと比較して少ないため、スペクトルのS/N比が小さく、PCrと比較して定量が困難である。そこで代替手段としてルシフェリン／ルシフェラーゼ法のキットによる脳スライス中のATPの測定を導入した。健常組織での測定を行い、妥当性を確認した。CV-159腹腔内投与群と対照群の間に、虚血再灌流負荷後の組織中のATPの量の差は認められなかった。

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2件)

1. Tokumaru O, Kuroki C, Yoshimura N, Sakamoto T, Takei H, Ogata K, Kitano T, Nisimaru N, Yokoi I. Neuroprotective effects of ethyl pyruvate on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion injury: a <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance study. *Neurochemical Research* 34(4):775-785, 2009 (査読有)

[学会発表] (計24件)

1. 徳丸治, 黒木千尋, 上林将人, 尾方和枝, 北野敬明, 横井功. 虚血一再灌流負荷に対するCV159の脳保護作用:<sup>31</sup>P-NMRによるエネルギー代謝からの検討. 第32回グアニジン化合物研究会(2011.10.29, 酒田)

2. 徳丸治, 黒木千尋, 尾方和枝, 北野敬明, 横井功. 虚血再灌流負荷に対するフルクトース1,6-リン酸の脳保護作用. 第62回西日本生理学会(2011.10.14-15, 佐賀)
3. Tokumaru O, Kuroki C, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effect of fructose-1,6-diphosphate on brain energy metabolism after ischemia-reperfusion insult: a <sup>31</sup>P-NMR study. 第34回日本神経科学大会(2011.9.14-17, 横浜)
4. 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 <sup>31</sup>P-NMR study- XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism (2011.05.25-28, Barcelona, Spain)
5. Kuroki C, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of hydrogen gas on brain in three types of stress models: a <sup>1</sup>H/<sup>31</sup>P-NMR and ESR study. XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism (2011.05.25-28, Barcelona, Spain)
6. 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(<sup>31</sup>P-NMR実験). 日本麻酔科学会第58回学術集会(2011.05.19-21, 神戸)
7. Tokumaru 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 <sup>31</sup>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)  
Journal of Physiological Sciences 61(Suppl 1): S113, 2011
8. 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  $^{31}\text{P}$ -NMR による検討. 第 37 回日本脳科学会 (2010.10.17-18, TianJin, China)
  9. Kuroki C, Tokumaru O, Ogata K, Koga H, Yokoi I. Neuroprotective effects of hydrogen gas on brain: a  $^{31}\text{P}$ -NMR and ESR study. 7<sup>th</sup> World Stroke Congress (2011.10.13-16, Seoul, Korea)
  10. Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Fundamental consideration of  $^{31}\text{P}$ -NMR study on brain energy metabolism: effects of temperature, [glucose], and  $[\text{K}^+]$  of superfusate. 7<sup>th</sup> World Stroke Congress (2011.10.13-16, Seoul, Korea)
  11. Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Fundamental consideration of  $^{31}\text{P}$ -NMR study on brain energy metabolism: effects of temperature, [glucose], and  $[\text{K}^+]$  of superfusate. 第 33 回日本神経科学大会 (2010.9, 神戸)  
Neurosci Res 68(Suppl. 1):e208, 2010
  12. Kuroki C, Tokumaru O, Ogata K, Koga H, Yokoi I. Neuroprotective effects of hydrogen gas on brain in three types of stress models: a  $^{31}\text{P}$ -NMR and ESR study. 第 33 回日本神経科学大会 (2010.9, 神戸)  
Neurosci Res 68(Suppl. 1):e320, 2010
  13. Tokumaru O, Kuroki C, Kenai H, Nagatomi H, Yokoi I. Preconditioning with gamma ray irradiation induces neuroprotection against ischemia-reperfusion insult: a  $^{31}\text{P}$ -NMR study. 15<sup>th</sup> International Meeting of Leksell Gamma Knife Society (2010.05.16-20, Athens, Greece)
  14. 大森春, 川野由紀枝, 西田欣広, 檜原久司, 黒木千尋, 徳丸治, 横井功.  $^{31}\text{P}$ -NMR を用いたラット子宮平滑筋のエネルギー代謝測定. 第 30 回グアニジン化合物研究会 (2009.10, つくば)
  15. Kuroki C, Tokumaru O, Ogata K, Koga H, Yokoi I. Neuroprotective effects of hydrogen gas on brain in three types of stress models: a  $^{31}\text{P}$ -NMR study. 第 32 回日本神経科学大会 (2009.9, 名古屋) Neuroscience Research 65 (Suppl.):S124, 2009
  16. Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Depolarizing high- $[\text{K}^+]$  load model of rat brain energy metabolism: a  $^{31}\text{P}$ -NMR study. 第 32 回日本神経科学大会 (2009.9, 名古屋) Neuroscience Research 65 (Suppl.):S128, 2009
  17. Kuroki C, Tokumaru O, Ogata K, Koga H, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of hydrogen gas on brain in ischemia-reperfusion model: a  $^{31}\text{P}$ -NMR study. 36<sup>th</sup> International Congress of physiological sciences (2009.7, Kyoto, Japan) Journal of Physiological Sciences 59(Suppl 1): S371, 2009
  18. Tokumaru O, Kuroki C, Ogata K, Koga H, Kitano T, Yokoi I. Fundamental consideration of  $^{31}\text{P}$ -NMR study of brain energy metabolism. 36<sup>th</sup> International

Congress of physiological sciences (2009.7,  
Kyoto, Japan) Journal of Physiological  
Sciences 59(Suppl 1): S525, 2009

19. Tokumar O, Kuroki C, Ogata K, Kitano T,  
Yokoi I. Fundamental consideration of  
<sup>31</sup>P-NMR study on brain energy metabolism.  
XXIVth International Symposium on  
Cerebral Blood Flow, Metabolism and  
Function (2009.6, Chicago, IL, USA)
20. Kuroki C, Tokumar O, Koga H, Kitano T,  
Yokoi I. Neuroprotective effects of hydrogen  
gas on brain in three types of stress models:  
a <sup>31</sup>P-NMR study. XXIVth International  
Symposium on Cerebral Blood Flow,  
Metabolism and Function (2009.6, Chicago,  
IL, USA)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/seiri/>

報道関連情報

FM 大分「BUNDAI Radio ACADEMY」(平成  
24年6月7日放送)にて研究概要を紹介

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

徳丸 治 (TOKUMARU OSAMU)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号：40360151

### (2)研究分担者

黒木 千尋 (KUROKI CHIHIRO)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：20211196  
(2011.11.25 辞退)

北野 敬明 (KITANO TAKAAKI)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：20211196

横井 功 (YOKOI ISAO)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：80150366

古賀 寛教 (KOGA HIRONORI)

大分大学・医学部・助教  
研究者番号：50468013

(3)連携研究者  
なし