

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462366

研究課題名(和文)新規抗酸化物質ETS-GSを用いた次世代脳保護薬の開発

研究課題名(英文)Development of a cerebroprotective agent with ETS-GS, a novel antioxidant

研究代表者

古賀 寛教(KOGA, HIRONORI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50468013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ETS-GSは、生体内抗酸化物質であるビタミンE、グルタチオン、タウリンが化合した新規抗酸化物質である。我々は、ETS-GSが虚血再灌流に伴う脳障害を軽減できるかどうかを検討した。in vitroでは、ETS-GSの物質特性について、ヒドロキシルラジカルをはじめ、各種ラジカルの消去作用を確認した。また、毒性試験に関しても、治療用量での臓器障害は認めなかった。一方、ラット蘇生モデルを用いて脳保護効果を検討した結果、呼吸停止による蘇生モデルの血行動態の安定化に難渋し、脱血モデルへのプロトコルの修正を余儀なくされた。今後、さらなるモデル確立と、ラジカル消去能の病態改善効果検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：ETS-GS is a novel antioxidant, consisting of vitamin E, glutathione and taurine. We investigated whether ETS-GS had the neuroprotective effect against cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury resulting from arrest and recovery in rats. In vitro, we investigated some radical scavenging ability of ETS-GS and found out that ETS-GS could scavenge hydroxyl radical and some radicals. Additionally, toxicity test revealed ETS-GS had no toxicity characteristics with the dose for treatment. On the other hand, we could not establish the stable respiratory arrest-recovery model in rats because of hemodynamic instability. Therefore, we needed to modify the protocol of resuscitation. Much more experimental studies are needed to reveal the improvement effect of some clinical setting.

研究分野：麻酔・集中治療

キーワード：抗酸化物質 虚血再灌流障害 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

### -ETS-GS の抗酸化作用、抗炎症作用-

ETS-GS は、生体内抗酸化物質である、ビタミン E、グルタチオン、タウリンが化合した新規抗酸化物質である。我々は、ETS-GS を投与することで、各種虚血再灌流障害（脊髄、肝、腎）を軽減させることを、動物モデルを用いて明らかにしてきた。この治療効果の機序として、ETS-GS の抗酸化作用（ラジカル消去、活性酸素種 ROS 抑制、ミトコンドリア保護）や抗炎症作用（細胞内シグナル制御による NF- $\kappa$ B 活性抑制など）が関わっていることを突き止めている。

### -脳保護薬としての可能性-

我々は、こうした虚血再灌流傷害の軽減効果が、脳蘇生モデルに応用できないかと考え、予備実験としてラット心肺停止・蘇生モデルを用いて検討した。その結果、蘇生率の改善、脳神経細胞アポトーシスの抑制効果を認め、ETS-GS の薬物作用として、我々が最も注目しているのが、グルタチオン供与体としての役割である。虚血再灌流障害では、細胞障害の主因として、ミトコンドリアを中心とする細胞内レドックス制御の崩壊によって生じる、活性酸素種（ROS）等の過剰産生と、グルタチオンに代表される生体内抗酸化物質の枯渇が挙げられる。現に、ROS 消去作用を持つ抗酸化物質の投与は、治療、予防薬として使用されており、エダラポンはその好例であろう。グルタチオンも抗酸化療法として治療効果を期待し、直接投与による検討がなされているが、一部の病態改善効果が報告されているだけで、治療薬として汎用されるには至っていない。原因としては、消化管や肝臓のグルタチオン分解酵素の介在によって、グルタチオン単独投与による標的細胞内移行が困難であることが分かっている。そこで、ETS-GS がグルタチオンを効果的に細胞内に届ける供与体として働いていれば、ドラッグデリバリーとしての役割が期待出来るが、我々は、その可能性を強く示唆する知見を得ている。それは、グルタチオンの枯渇が肝障害の要因であるアセトアミノフェン中毒モデルで、ETS-GS 投与により改善効果を示したことである。

本研究課題では、こうした背景をもとに、ETS-GS の脳保護効果をさらに検証し、その機序を解明することで、脳保護戦略における新規治療薬としての可能性を探る。

## 2. 研究の目的

本研究では、新規抗酸化物質 ETS-GS の脳保護作用に注目し、ラットの心肺停止・蘇生モデルを用いて、蘇生率、神経学的予後に与える影響を検討する。また、改善効果の機序解明のために、ESR（電子スピン共鳴）装置を用いた、酸化ストレスのリアルタイム評価

を行うとともに、グルタチオン供与体としての役割を検討するため、体内動態をモニタリングし、標的組織の濃度推移を明らかにする。このように多角的に効果、薬物動態を検証し、新規治療薬の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

1) ETS-GS の脳保護薬としての可能性を検討  
これまでの予備実験によって、ETS-GS が心肺停止・蘇生モデルでの蘇生率改善効果、脳神経保護効果を有する可能性を見出しており、さらに詳細な検討を行う。

a) ETS-GS の投与量、タイミング、投与経路を変えて、最も治療効果を有する投与法を確立する。

b) 神経学的予後判定として行動解析を行い、高次機能評価を行う。

c) ラットを用いた ETS-GS の毒性試験を実施し、安全性を確認する。

2) 治療効果の機序解明

a) グルタチオンの組織濃度を経時的に測定し、プロドラッグとしての働きを検証するとともに、ETS-GS 分子そのものの抗酸化作用、抗炎症作用の有無を明らかにしていく。

b) 経時的な酸化ストレス評価を行い、治療効果との関連性を明らかにしていく。その手法として、酸化ストレスマーカーの測定に加え、我々がこれまでに確立してきた ESR（電子スピン共鳴）装置を用いた抗酸化能の評価法も用いる。

3) 他の抗酸化物質との比較

活性酸素種の中で最も細胞傷害性の強いヒドロキシルラジカルの消去作用を持つエダラポンや生体内抗酸化物質であるアスコルビン酸など、既知の抗酸化物質との比較を行う

## 4. 研究成果

1) 蘇生モデルに関しては、呼吸停止蘇生モデル、および脱血による低灌流モデルを用いた検討を行った。ともに、コントロールとともに生存期間が短く、モデルとしての生存率、血行動態の安定化には至らず、ETS-GS による病態や生存率の改善効果は認めなかった。また、生存率が低いために、行動解析は施行できなかった。

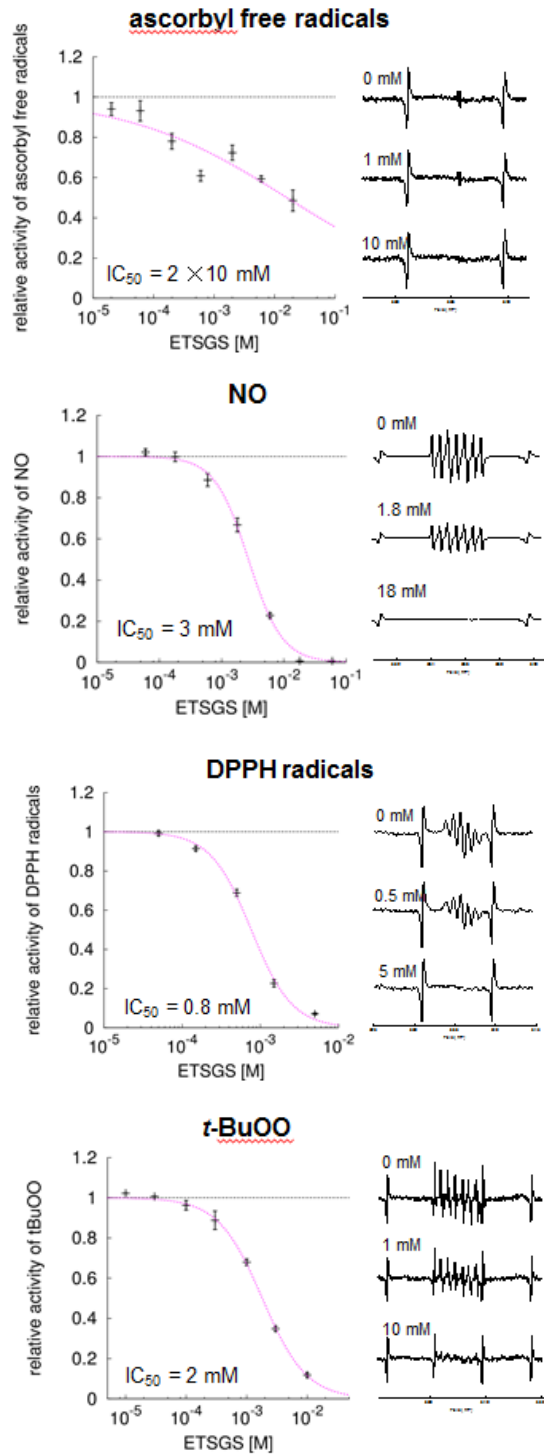
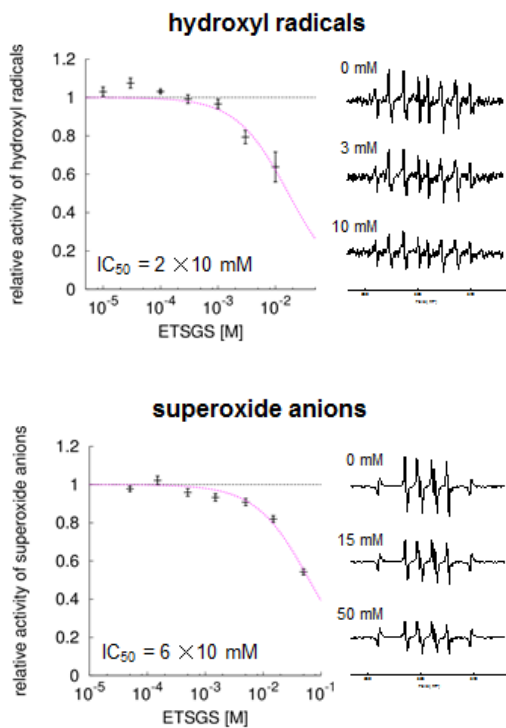
ETS-GS に関する毒性試験に関しては、10mg/kg を 1 日 2 回 1 週間連日投与群、および 100mg/kg ワンショット群の 4 週間観察プロトコルにおいて、呼吸データ、肝、腎機能データに変動はないことを確認した。以上より、検討治療用量における ETS-GS の生体に対する毒性の可能性は低いと考えられる。

2)

ESR を用いた抗酸化能の評価に関しては、

in vitro の実験で、ETS-GS の物質特性としての抗酸化能を検証した。まずは虚血再灌流傷害において、組織障害の主因とされるヒドロキシルラジカルについて消去能を検討した。1%過酸化水素に紫外線照射を行うことで人工的に発生させたヒドロキシルラジカルの消去能を測定し、濃度依存性に抗酸化作用を認めた。さらに、酸化ストレスの要因となるその他のフリーラジカルに対する消去能を測定した結果、同様に全てのラジカル種に対して濃度依存性に有意な消去能を示した。

また、その物質的な抗酸化効果が体内で維持され、効果を呈するかどうかについて、体外循環を確立し、リアルタイムでの血中の抗酸化効果測定を試みた。ESR の測定ユニットへの体外循環回路の接続を目指し、測定システムの確立を目指したが、回路が長くなることで脱血量増加し、血行動態も不安定となることからラジカル検出や消去能測定には至っていない。対処として、輸血や血流速度の調整による安定化を試みたが、効果的な測定は不可能であった。また、定点測定においても、ヒドロキシルラジカル検出を認めず、スピントラップ剤 CYPMPPO の体内での不安定性がラジカル検出に影響を与えている可能性や、ヒドロキシルラジカルのような非常に短命なラジカルを検出するための生体内での有効な検出感度がなかったことなどが挙げられる。



ETS-GS の各種フリーラジカル消去能

3) 抗酸化能の評価として、その他の抗酸化物質との比較には至っておらず、今後、他の薬剤、生体内物質との抗酸化能の評価を行い、ETS-GS の治療薬としての効能を推測するデータ収集を行う予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古賀 寛教 (Koga Hironori)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：50468013

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )