

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00898

研究課題名(和文) 緑茶が及ぼす加齢ラット脳外傷後の脳機能改善効果及び神経再生促進効果に関する研究

研究課題名(英文) (-)-epigallocatechin-3-gallate protects against neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in aged rats

研究代表者

佐藤 隆夫 (SATO, Takao)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70162443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：緑茶は世界で広く飲用されており、その主成分はEGCGであり、抗酸化作用を有する。今回、老齢ラット脳外傷モデルを用いてEGCG飲料による脳外傷後の脳機能の改善効果を調べた。24か月齢のwistar ratsに0.1%EGCG(EGCG群)またはwater(water群)を受傷前4週より与え受傷させた。脳外傷後にwater飲料群はssDNA、8-OHdG、4-HNE陽性細胞及び過酸化脂質量の有意な増加を認めた。EGCG飲料群でNeuN陽性細胞数で有意な増加を認めた。脳機能評価でEGCG飲料群で有意な改善効果が認められた。脳外傷後に起こる脳機能不全をEGCG飲料群は有意な改善効果をしめした。

研究成果の概要(英文)：A major component of green tea, a widely consumed beverage, is EGCG, which has strong antioxidant properties. In this study, we investigated the effects of EGCG on cerebral function and morphology following TBI. 24-month-old rats male Wistar rats that had access to normal drinking water, or water containing 0.1% (w/v) EGCG ad libitum, received TBI with a pneumatic controlled injury device for 4 weeks. Immunohistochemistry and lipid peroxidation studies revealed that at 1, 3 and 7 days post-TBI, the number of 8-OHdG-, 4-HNE- and ssDNA-positive cells, and the levels of MDA around the damaged area after TBI, significantly decreased in the EGCG treatment group compared with the water group. In addition, there was a significant increase in the number of surviving neuronal cells and an improvement in cerebral dysfunction after TBI in the EGCG treatment group compared with the water group. In summary, consumption of green tea may be an effective therapy for TBI aged patients.

研究分野：神経病理学

キーワード：緑茶 高齢者 脳外傷 神経保護 酸化ストレス EGCG

1. 研究開始当初の背景

脳外傷は全米の疫学的調査によれば毎年150万人が受傷し、米国人口の約2%、530万人が脳外傷を原因とした障害を持って生活しているとされている[1]。日本では交通事故や不慮の事故による脳外傷による死亡は年3.9万人であり死亡総数の4.1%を占める[1]。さらに受傷者の2/3以上は高齢者である。高齢者の受傷者では救命はされたものの高度な認知症、言語障害、運動障害などの高度高次脳機能障害を発症する症例が死亡者数よりはるかに多く、死亡者数の約10倍以上の外傷後遺症を有する高齢者患者が存在すると推測されている³⁾。このように高齢者の脳外傷は社会的影響の極めて大きい傷害であり、高齢者の高度な高次脳機能障害の軽減を目指す臨床的アプローチの開発は非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

申請者らは加齢ラット脳外傷モデルで外傷後の外傷局所で神経幹細胞の出現と高度な高次脳機能障害を発症することを明らかにした[1]。更に申請者らは緑茶カテキン(エピガロカテキンガレート、EGCG)による脳外傷後の高次機能障害発症を改善することを報告した[2]。加齢ラット脳外傷モデルにおいてEGCG飲料が外傷後に出現する神経幹細胞数の増加や神経幹細胞から成熟神経細胞への分化・生存・維持を促進し、脳外傷後に起こる高次脳機能障害を改善するであろうと考えた。

3. 研究の方法

(1) 群分け

EGCG群; Wistar ラット(♂)24ヶ月齢を用いて飲料水の代わりに脳外傷受傷4週間前より0.1%EGCG溶液を屠殺まで自由摂取させた。

water群; 飲料水のみを自由摂取させ脳外傷受傷後も屠殺まで飲料水を自由摂取させたラットを用いた。

(2) モデル動物の作製

Pneumatic control injury deviceを用いて上記二群のラットに対して脳外傷を与え、脳外傷ラットを作製した。

(3) 記憶学習の回復効果

損傷後7日後にwater群及びEGCG群についてwater maze試験を行った。

(4) 免疫組織染色

損傷後1,3,7日後にwater群およびEGCG群のラットを4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、脳を取り出し、損傷最大径の部分より20 μ mの連続切片を作製した。連続切片3枚ずつを脳外傷部位の大きさを測定した。更にアポトーシス及び神経細胞の免疫染

色を行い、顕微鏡下で倍率200倍、任意の5カ所にて計数を行った。

(5) 神経細胞のアポトーシスに関する二重染色

損傷後3日の運動群及び非運動群の切片を用いてアポトーシスと神経細胞の蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察及び写真撮影を行い、water群及びEGCG群の評価を行った。

4. 研究成果

(1) EGCG飲料による加齢ラットの記憶学習改善

到達時間においてwater群に比較しEGCG群で有意に減少した($P<0.05$, 図1-A)。泳いだ距離においてはEGCG群に比較しwater群で有意に増加した($P<0.05$, 図1-B)。泳ぐ速度では群間において差が見られなかった(図1-C)。記憶試験ではEGCG群は、water群に比較し記憶が保持されていた($P<0.05$, 図1-D)。

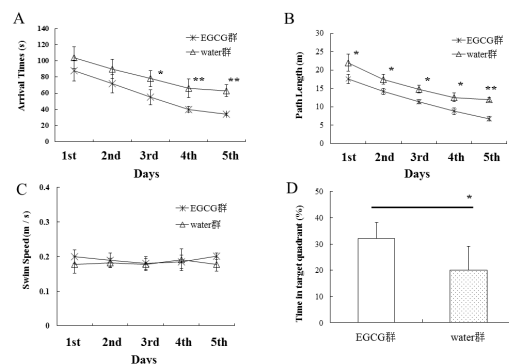


図-1 加齢ラット脳外傷後のEGCG飲料による記憶・学習改善効果

(2) EGCG飲料による加齢ラットの脳外傷部位の変化

加齢ラットのwater群及びEGCG群における損傷後7日の損傷部位を図-2に示した。HE像を比較するとwater群(図-2A)に比較し、EGCG群(図-2B)では損傷部位の有意な損傷面積の減少が見られた($P<0.01$, 図-2C)。

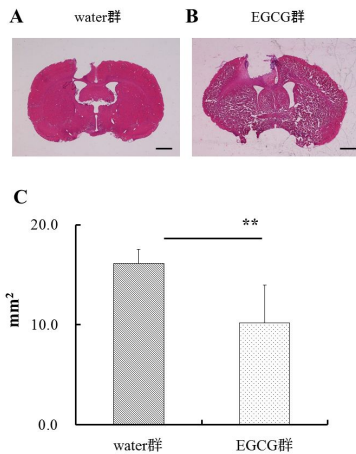


図-2 EGCG 飲料による加齢ラットの脳外傷部位の減少効果 *Scale bar 2 mm*

(3) EGCG 飲料による加齢ラットの脳外傷周囲組織のアポトーシス抑制効果

損傷後 3 日において water 群ではアポトーシスを起こしている大型の神経細胞が損傷部位周囲組織に多数見られた (図-3A)。しかしながら EGCG 群ではアポトーシス陽性細胞は少数見られた (図-3B)。損傷後 1,3,7 日において EGCG 群で water 群に比較しアポトーシスを起こしている細胞の有意な減少が認められた($P < 0.05$, 図-3C)。

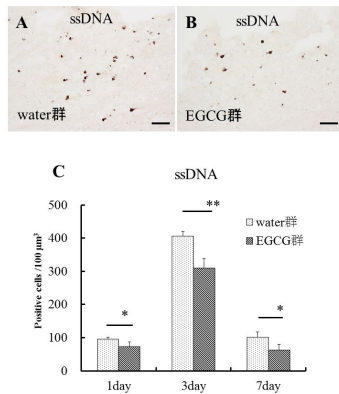


図-3 EGCG 飲料による損傷周囲におけるアポトーシス発現抑制 *Scale bar 50 µm*

(4) EGCG 飲料による加齢ラット脳外傷後の神経細胞数の変化

損傷後 7 日において water 群では少数の小さな神経細胞が損傷部位周囲組織に認められた(図-4A)。しかしながら EGCG 群では一部に小型の障害を受けた神経細胞が散見されたが、ほとんどが大型の神経細胞が多数認められた(図-4B)。損傷後 7 日において water 群に比較し、EGCG 群では神経細胞数の有意な増加が認められた($P < 0.01$, 図-4C)。

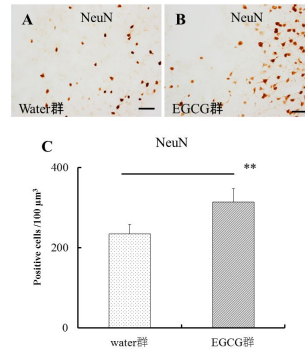


図-4 EGCG 飲料による加齢ラット神経保護作用 *Scale bar 50 µm*

(5) EGCG 飲料による加齢ラット損傷周囲組織における神経細胞のアポトーシス抑制効果

water 群では損傷周囲組織で多数の神経細胞のアポトーシスが見られた(図-5C)。しかしながら EGCG 群では神経細胞のアポトーシスが抑制されていた (図-5F)。

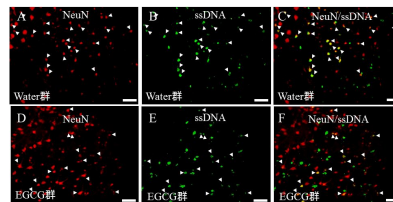


図-4 加齢ラットの EGCG 飲料による脳外傷周囲組織の神経細胞アポトーシス抑制効果(損傷 7 日後) *Scale bar 50 µm*

(5) 考察

脳外傷後早期に損傷部位周で発現しているアポトーシスのマーカである ssDNA 陽性細胞数が EGCG 群で water 群に比較して有意に減少した。さらに ssDNA と NeuN 二重染色陽性細胞数が water 群に比較し、減少していた。加えて、損傷後 7 日で EGCG 群は water 群に比較し NeuN 陽性細胞が有意に増加していた。脳外傷後早期から損傷部位周においてアポトーシス陽性細胞数が water 群で EGCG 群に比較して有意に減少した。さらに water 群のアポトーシス陽性細胞のほとんどは神経細胞で有り、EGCG 群ではその数は、減少していた。加えて、損傷後 7 日で EGCG 群は water 群に比較し神経細胞が有意に増加していた。脳損傷後の神経細胞は損傷早期にカスパー 3 の活性化が見られ、アポトーシスが引き起こされると報告されている[2]。さらに、最近の報告により我々は脳外傷後の損傷早期において損傷周囲部位の神経細胞はアポトーシスにより神経細胞死を起こすこと報告した[1]。加えて、EGCG 投与で脳外傷後に引き起こされる 8-OHdG、4-HNE 陽性細胞数の増加や MDA 量の増加を有意に減少させ、ア

ポトーススを減少させることを報告した[3,4]。Sugawara et al [5]は脳虚血3日後に海馬CA1の神経細胞やグリア細胞のミトコンドリアが活性化されフリーラジカルが産生され、さらに活性化されたミトコンドリアからのシトクロムC放出によりカスプース3の活性化が見られ、アポトーススが引き起こされると報告している[3]。脳虚血後のECGCの投与は海馬や大脳皮質神経細胞やグリア細胞質内のミトコンドリアでのフリーラジカルの産生を抑制し、カスプース3の活性化を有意に阻害することにより神経細胞死を抑制することが知られている[4]。

一方、Bcl-2はO₂-の産生抑制、シトクロムCの放出抑制やカスプース依存性アポトーススカスケード抑制をすることによりアンチアポトースス因子として知られている[5]。Bcl-2の過剰発現はBcl-2ノックアウトマウスの虚血実験から神経保護作用を有することが報告されている[6,7]。ECGCはBcl-2の発現を有意に増加させ、アポトーススを誘導するBaxの発現を抑制し、神経細胞やグリア細胞のアポトーススを減少させ、神経保護作用を有することが報告された[8,9]。これらのことからECGCが損傷後に発生したフリーラジカルによる神経細胞のアポトーススを阻害することにより、ECGC群で神経細胞数が増加したと考えられた。本実験においてもECGCは脳外傷後の神経細胞死に対し神経保護作用を有することが示された。

本実験で用いたwater maze試験は海馬の記憶・学習機能効果を評価するものであるが、最近の報告では大脳の機能が評価できることが報告[10]され、我々の最近の報告においてもまた脳外傷後の脳機能不全の改善効果を評価できることを報告した[11]。本実験においてプラットフォームへの到着時間がECGC群で損傷群の到達時間に比較して、有意に短縮した。本実験ではECGC群が脳外傷後に起こるフリーラジカルによる神経細胞死を抑制し、神経細胞が多数生存することを示した。このことからプラットフォームへの到着時間がECGC群で損傷群に比較して、有意に短縮したと考えられた。さらに本実験の結果により外傷後にECGC群により細胞死から保護され、生存している多数の神経細胞は正常な機能を有することが示された。これらのことからECGC群は脳外傷後に起こる脳機能不全を改善することが示唆された。

本実験において、高齢者においてEGCG飲料は脳外傷後に起こされる損傷周囲組織の神経細胞アポトーススを抑制することにより神経保護作用を示し、脳外傷後に出現する脳機能不全を改善させると考えられた。

(6)まとめ

本実験において、ECGC群は脳外傷後に発生するO₂-やOHなどのフリーラジカルの産生抑制や直接的にラジカル吸収を行い、神経細胞のアポトーススを抑制することによ

り神経保護作用を示し、脳外傷後に出現する脳機能不全を改善させると考えられた。緑茶飲料は脳外傷の治療に有効なであることが示された。

(7)参考文献

- . Itoh, T., et al., Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats. *Neurochem Res*, 2010. 35(2): 348-55.
- . Wang, X., et al., Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate*, 2001. 79(3-4): 172-9.
- . Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito H. The novel free radical scavenger, edaravone, increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury. *Neurotox Res* 2009; **16**: 378-389.
- . Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Imano M, Hashimoto S, et al. Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats. *Neurochem Res* 2010; **35**: 348-355.
- . Sugawara T, Noshita N, Lewen A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci* 2002; **22**: 209-217.
- . Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334-336.
- . Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994; **13**: 1017-1030.
- . Hata R, Gillardon F, Michaelidis TM, Hossmann KA. Targeted disruption of the bcl-2 gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury. *Metab Brain Dis* 1999; **14**: 117-124.
- . Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, et al. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals* 2005;

14: 46-60.

. Levites Y, Amit T, Youdim MB, Mandel S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 2002; **277**: 30574-30580.

. Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito H. Improvement of cerebral function by anti-amyloid precursor protein antibody infusion after traumatic brain injury in rats. *Mol Cell Biochem* 2009; **324**: 191-199.

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 5 件)

. Heart-bound adiponectin, not serum adiponectin, inversely correlates with cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, Inoue I, Takemori K, Mizuguchi N, Kimura M, Chikug T, Satou T, Hagiwara M, Itoh T, *Exp Physiol*, 査読有, 102, 1435-1447, 2017, DOI: 10.1113/EP086407

. Contributions of MET activation to BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia cells, Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Sakai K, Itoh T, Imano M, Nakayama T, Nishio K, Satou T, Nishida S, *Oncotarget*, 査読有, 8, 38717-38730, 2017, DOI: 10.18632/oncotarget.16314

. Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, Park AM, Kanai K, Itoh T, Sato T, Tsukui T, Inagaki Y, Selman M, Matsushima K, Yoshie O, *Plos One*, 査読有, 11, e0148998, 2016,

DOI:10.1371/journal.pone.0148998

. Statins inhibited the MIP-1 expression via inhibition of Ras/ERK and Ras/Akt pathways in myeloma cells, Tsubaki M, Mashimo K, Takeda T, Kino T, Fujita A, Itoh T, Imano M, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S, *Biomed Pharmacother*, 査読有, 78, 23-29, 2016, DOI: 10.1016/j.biopha.2015.12.017

. RANK-RANKL interactions are involved in cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cell lines, Tsubaki M, Takeda T, Yoshizumi M, Ueda E, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S, *Tumour Biol*, 査読有, 37, 9099-9110, 2016, DOI:

10.1007/s13277-015-4761-8

[学会発表](計 5 件)

. 吉田原規、伊藤龍生、橋本重夫、土手健作、佐藤隆夫、運動による脳外傷後の脳機能改善効果の検討、第106回日本病理学会総会、2017年4月、27~29日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)

. 藪口友暉、小倉あづき、蒲尚子、藤原隆史、福田麻美、金田雅大、水口信行、田淵正樹、佐藤隆夫、伊藤龍生、妊娠高血圧がラット胎仔神経幹細胞の発達・分化に及ぼす影響、第55回日本栄養食糧学会、2016年10月、22日、帝塚山学院大学泉ヶ丘キャンパス(大阪府、堺市)

. 藤原隆史、吉田大亮、福田麻美、藪口友暉、金田雅大、森万優加、小倉あづき、足立夏実、水口信行、佐藤隆夫、伊藤龍生、妊娠期高血糖曝露差がラット胎仔神経幹細胞分化に及ぼす影響、第55回日本栄養食糧学会、2016年10月、22日、帝塚山学院大学泉ヶ丘キャンパス(大阪府、堺市)

. 佐藤隆夫、伊藤龍生、土手健作、橋本重夫、外傷的脳損傷の損傷局所に及ぼす運動の影響について、第104回日本病理学会総会、2015年4月30~5月2日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

. 伊藤龍生、橋本重夫、佐藤隆夫、運動による実験的脳外傷後に出現する神経幹細胞への影響、第104回日本病理学会総会、2015年4月30~5月2日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/patho>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆夫 (SATOU, Takao)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70162443

(2) 研究分担者

伊藤 龍生 (ITO, Tatsuki)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40330245

井上 敬夫 (INOUE, Takao)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：441006

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()