

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 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500803

研究課題名（和文） 脳外傷後の緑茶飲料による神経保護作用及び神経再生促進効果の研究

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

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

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 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) であり、抗酸化作用を有することが報告されている。今回、ラット脳外傷モデルを用いて EGCG 飲料による脳外傷後の神経保護作用と脳機能の改善効果を組織学的、生化学的及び行動学的手法を用いて調べた。Wistar rats に 0.1%EGCG(EGCG 群)または water(water 群)を与えて飼育し、10 週齢で脳外傷を受傷させた。脳外傷後に water 飲料群において EGCG 飲料群に比較し 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。さらに外傷後 EGCG 飲料群で water 飲料群に比較し NeuN 陽性細胞数で有意な増加を認めた。外傷後の脳機能評価において EGCG 飲料群では water 飲料群に比較し、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。緑茶飲料は脳外傷の治療に非常に有効であることが示された。

研究成果の概要（英文）：A major component of green tea, a widely consumed beverage, is (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), which has strong antioxidant properties. In this study, we investigated the effects of EGCG on cerebral function and morphology following traumatic brain injury (TBI). Six-week-old 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 at 10 weeks of age. 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 patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：脳外傷、緑茶飲料、神経保護作用、酸化ストレス、EGCG

1. 研究開始当初の背景

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や神経障害の後遺症を有する患者が激増している。このように脳外傷は社会的影響の極めて大きい傷害であり、脳外傷後の脳障害や神経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

本研究では緑茶成分エピガロカテキンガレート (EGCG) による脳外傷部局所における脳障害と記憶障害の改善効果を組織学的、生化学的及び運動学的に明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 群分け

EGCG 群; Wistar ラット(♂)6 週齢を用いて飲料水の代わりに 0.1%EGCG 溶液を与えて 10 週齢まで飼育し、10 週齢で脳外傷を受傷させ、さらにラットを屠殺するまで 0.1%EGCG を自由摂取させた。

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。

sham 群; 飲料水を自由摂取させた脳外傷がない sham operate 処置を行ったラットを用いた。sham 群は water maze test 及び過酸化脂質量測定に用いた。

(2) モデル動物の作製

Pneumatic control injury device を用いて Wistar ラット (10 週齢♂) に脳外傷を与え、脳外傷ラットを作製した。

(3) 免疫組織染色

損傷後 1、3、及び The Morris water maze 試験終了直後 (7 日後) に water 群及び 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 8-OHdG、4-HNE、ssDNA 及び NeuN 抗体で免疫染色し、損傷周囲に発現しているそれぞれの陽性細胞数を対物 20 倍の顕微鏡下で計数した。

(4) ssDNA と NeuN に関する二重染色

損傷後 3 日の water 群及び EGCG 群の切片を用いて ssDNA と NeuN の蛍光二重染色を行った。その後、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、評価を行った。

(5) The Morris water maze 試験

損傷後、7 日後に The Morris water maze 試験を行った。The Morris water maze 試験は

Elvander の方法を改良して行った。

(6) 過酸化脂質量測定

損傷後 1、3、The Morris water maze 試験終了直後 (7 日後) に water 群、EGCG 群および sham 群のラット脳の損傷部位を中心に大脳皮質部分を取り出し malondialdehyde (MDA) 量を測定した。

4. 研究成果

(1) 8-OHdG 陽性細胞数の変化

water 群では損傷後に核及び細胞質に 8-OHdG 陽性を認める多数の神経細胞と考えられる大型の 8-OHdG 陽性細胞が認められた (図-1a)。しかし EGCG 群では少数であった (図-1b)。損傷 1、3、7 日後で water 群では EGCG 群に比較し 8-OHdG 陽性細胞の有意な増加を認めた ($P < 0.001$, 図-1c)。

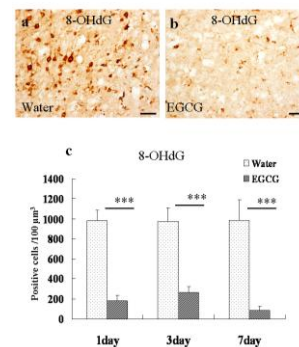


図-1. 8-OHdG の発現

(2) 4-HNE 陽性像及び陽性細胞数

water 群では損傷後に細胞質に 4-HNE 陽性を認める多数の神経細胞と考えられる大型の 4-HNE 陽性細胞が認められた (図-2a)。しかし EGCG 群では少数であった (図-2b)。しかし損傷 1、3 日後で EGCG 群において water 群に比較し 4-HNE 陽性細胞の有意な減少を認めた ($P < 0.001$, 図-2c)。

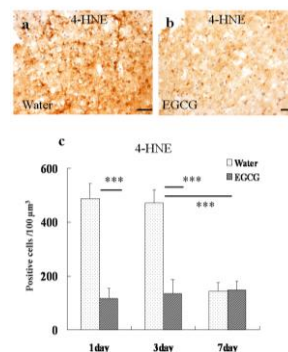


図-2. 4-HNE の発現

(3) ssDNA 陽性像及び陽性細胞数

water 群では損傷後に損傷周囲に大型の細胞質を有する神経細胞と考えられる ssDNA 陽性を核に認める多数の ssDNA 陽性細胞が見られた(図-3a)。しかし ECGC 群では少数の ssDNA 陽性細胞が認められた(図-3b)。損傷 1, 3, 7 日後で water 投与群に比較し ECGC 群では ssDNA 陽性細胞の有意な減少を認めた($P < 0.05$, 図-3c)。

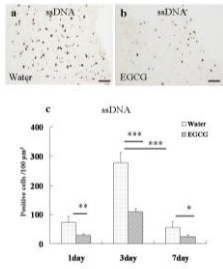


図-3. ssDNA の発現

(4) ssDNA と NeuN の蛍光二重染色

water 群(図-4a)及び ECGC 群(図-4d)では多数の NeuN 陽性細胞が認められた。さらに water 群では ssDNA 陽性細胞(図-4b)が多数認められ、その大半が NeuN 陽性細胞と一致を示した(図-4c)。また ECGC 群では少数の ssDNA 陽性細胞(図-4d, e)が認められたが、それらのほとんどは NeuN 陽性を示さなかった(図-4f)。

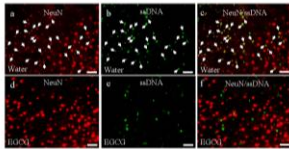


図-4. ssDN と NeuN の二重染色

(5) Malondialdehyde (MDA)測定結果

損傷後 1, 3 日で water 群は sham 群に比較し MDA 量の有意な増加を認めた($p < 0.01$, 図-5)。ECGC 群では sham 群に比較し MDA 量の有意な増加を認められなかった。損傷後 7 日では各群間に差を認めなかった。損傷後 1, 3 日で water 群と比較し ECGC 群で MDA 量の有意な減少が認められた($p < 0.05$, 図-5)。

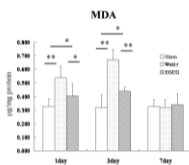


図-5. MDA の発現

(6) NeuN 陽性像及び陽性細胞数

water 群および ECGC 群では細胞質と突起に NeuN を有している大型の NeuN 陽性の神経細胞が認められた(図-6a, b)。NeuN 陽性細胞数において ECGC 群で water 群に比較し、有意(図-6c)。

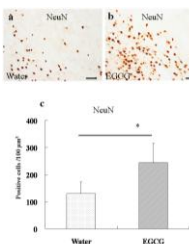


図-6. NeuN の発現

(7) Water maze 試験

損傷 7 日後で sham 群に比較し、water のプラットフォームへの到着時間に有意な増加を認めた($P < 0.05$, 図-7)。しかしながら、ECGC 群では sham 群に比較し、プラットフォームへの到着時間に差を認めなかった(図-7)。さらに、ECGC 群では water 群に比較し、損傷 7 日後のプラットフォームへの到着時間では有意な減少を認めた($P < 0.05$, 図-7)。

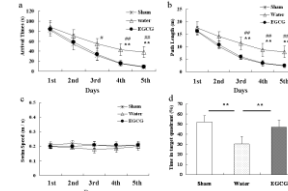


図-7. Water maze 試験

(8) 考察

本実験において、water 群に比較し ECGC 投与群で 8-OHdG、4-HNE 陽性細胞数や MDA 量の有意な減少が見られた。脳障害後に発生する $O_2\cdot$ や $\cdot OH$ などのフリーラジカルにより組織中の不飽和脂肪酸から MDA が産生され、その産生された MDA 測定は細胞や組織の酸化ストレスの指標になることが報告されている[Ates, 2007 #102]。さらに我々の最近の報告において脳外傷により発生したフリーラジカルにより脳内の 8-OHdG、4-HNE 陽性細胞数が有意に増加することや MDA 量や過酸化脂質量が有意に増加することを報告した[1,2]。これらのことから脳外傷モデルにおいて ECGC が脳外傷後に発生するフリーラジカルの産生抑制や吸収を行うことにより、8-OHdG および 4-HNE 陽性細胞数の減少や MDA 量の有意な減少が認められたものと考えられた。このことは ECGC が脳外傷後に外傷局所で発生するフリーラジカルの除去に有効に作用することを意味すると考えられた。

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ーである ssDNA 陽性細胞数が ECGC 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 ECGC 群は water 群に比較し NeuN 陽性細胞が有意に増加していた。Sugawara et al [3]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、カスパー 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の放出抑制やカスパーシス依存性アポトーシスカスケード抑制をすることによりアンチアポトーシ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、アポトーシスを誘導するBaxの発現を抑制し、神経細胞やグリア細胞のアポトーシスを減少させ、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シ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[2,11]。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。

(9)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う。さらにECGC群は脳外傷後のフリーラジカルによる神経細胞のアポトーシ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。

(10)参考文献

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Loren DJ, Seeram NP, Schulman RN, Holtzman DM. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res* 2005; **57**: 858-864.
5. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; **348**: 334-336.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Xiong Y, Mahmood A, Lu D, Qu C, Kazmi H, Goussev A, *et al.* Histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice null for the erythropoietin receptor in the central nervous system. *Brain Res* 2008; **1230**: 247-257.
11. 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 9 件)

- ① Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, Increased apoptotic neuronal cell death and cerebral dysfunction after traumatic brain injury in aged rats, *Brain Struct Func*, 査読有, inpress, 2012, DOI: 10.1007/s00429-012-0394-5
- ② Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the number of neural stem cells around the damaged area after rat traumatic brain injury, *J Neural Transm*, 査読有, inpress, 2012, DOI: 10.1007/s00702-011-0764-9
- ③ Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, (-)-epigallocatechin-3-gallate protects against neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats, *Neuromol Med*, 査読有, 13 巻, 2011, 300-309, DOI: 10.1007/s12017-011-8162-x
- ④ Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury, *J Neural Transm*, 査読有, 118 巻, 2011, 1263-1272, DOI: 10.1007/s00702-011-0629-2
- ⑤ 伊藤龍生, 脳の病態病理, 若さの栄養学雑誌, 査読有, 147 巻, 2011, 2-9
- ⑥ Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury, *J Neural Transm*, 査読有, 118 巻, 2011, 193-202, DOI:10.1007/s00702-010-0495-3
- ⑦ Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Imano M, Hashimoto S, Ito H. Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats, *Neurochem Res*, 査読有, 35 巻, 2010, 348-355, DOI: 10.1007/s11064-009-0061-2
- ⑧ Itoh T, Satou T, Takemori K, Hashimoto S, Ito H. Neural stem cells and new neurons in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats after stroke, *J Mol Neurosci*, 査読有, 41 巻, 2010, 55-65, DOI: 10.1007/s12031-009-9279-3

[学会発表] (計 6 件)

- ① 伊藤龍生, 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) 大脳における脳卒中発症後の神経再生への SDF-1a/CXCR4 系の関与に関する検討, 第 47 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2011 年 9 月 6 日発表, 札幌市
- ② 佐藤隆夫, ラット脳損傷モデルへの抗アミロイド前駆蛋白質抗体投与による脳機能および組織学的変化の検討, 第 52 回日本神経病理学会総会, 2011 年 6 月 2 日発表, 東京
- ③ 佐藤隆夫, ラット脳損傷局所への抗アミロイド前駆体蛋白質抗体投与による脳組織への影響, 第 100 回日本病理学会総会, 2011 年 4 月 29 日発表, 横浜市
- ④ 伊藤龍生, 脳卒中発症後の神経幹細胞の出現への SDF-1a/CXCR4 系の関与に関する検討, 第 100 回日本病理学会総会, 2011 年 4 月 29 日発表, 横浜市
- ⑤ 伊藤龍生, 脳の病態病理, 第 40 回栄養学連続講義, 2010 年 7 月 24 日発表, 大阪市
- ⑥ 伊藤龍生, ラット脳外傷後の Edaravone 投与における神経幹細胞の出現に関する研究, 第 53 回神経化学学会大会, 2010 年 9 月 4 日発表, 神戸市

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/patho/gyous eki2009.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆夫 (TAKAO SATOU)
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 (TATSUKI ITOH)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：40330245

(3) 連携研究者

()

研究者番号：