

令和元年6月27日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12915

研究課題名(和文)新規抗うつ薬創製を目指した末梢性BDNF産生促進作用を有する食品成分の探索

研究課題名(英文) Identifying food substances with a BDNF-upregulating effect in peripheral tissues for use in the development of new antidepressants

研究代表者

中島 健輔 (Nakajima, Kensuke)

長崎国際大学・薬学部・助教

研究者番号：90762162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)の産生を促進する物質は、うつ病の改善に有用であると考えられており、その探索が行われてきた。しかし、BDNFは脳組織にて作用を示す神経栄養因子であるため、これまでのところ、末梢組織を対象としたBDNF産生促進物質の探索研究は見当たらない。本研究では、末梢性BDNF産生促進物質の探索に有用なin vitroアッセイ系の構築に成功した。さらに、構築したアッセイ系を用いて、葉酸、ルチン、クロシンおよび抗てんかん薬・ガバペンチンなどのBDNF産生促進作用を明らかにした。本研究の成果は、末梢性BDNF産生促進作用を機序とする新規抗うつ薬の創製につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した「BDNF産生促進物質の探索アッセイ系」は、ヒト肺がん細胞を用いているため、中枢移行性の低い物質も探索の対象とすることができる。さらに、本研究は以下のような医学的意義を有している。

効果発現の早い抗うつ薬の開発：BDNFの単回投与は、速やかな抗うつ作用を示すと報告されており、BDNF産生促進物質の探索は、効果発現の早い抗うつ薬の開発につながると期待される。

難治性うつ病の克服：既存薬の奏功しない難治性うつ病に用いられる電気けいれん療法は、BDNF上昇作用により抗うつ効果を示す。そのため、BDNF産生促進物質は難治性うつ病の治療に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have attempted to identify brain-derived neurotrophic factor (BDNF) up-regulators, which may help ameliorate depression. However, as BDNF acts on brain tissues to exert anti-depressant effects, no study has thus far attempted to locate BDNF-production promoters in peripheral tissues. In this study, we succeeded in developing an in vitro screening method that can be used to detect peripheral BDNF up-regulators. Furthermore, we clarified the BDNF up-regulating activity of folic acid, rutin, crocin, and gabapentin (antiepileptic drug) using this screening method. The results of this study are expected to lead to the creation of new antidepressants that act by promoting BDNF production in peripheral tissues.

研究分野：農芸化学・健康科学

キーワード：うつ病 新規抗うつ薬 BDNF 末梢組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病は重大な健康被害をもたらす精神疾患であるが、有効な予防方法はなく、モノアミン仮説に基づく既存の抗うつ薬では改善しない症例も多い。さらに、既存薬には効果発現が遅いという問題点がある。従って、うつ病予防手段の確立および新規抗うつ薬の開発が待ち望まれている。

1997年、「神経細胞の新生を担う脳由来神経栄養因子 (BDNF) の減少が、うつ病の発症につながる」という神経可塑性仮説が提唱された (Duman et al. Arch. Gen. Psychiatry 1997)。その後、うつ病の主要な発症原因であるストレスにより海馬の BDNF 濃度が低下すること、ならびに脳内への BDNF の単回投与は速やかな抗うつ作用を示すことが報告され、脳内における BDNF 濃度の上昇は、うつ病の予防および速やかな改善につながると考えられるようになった。また、BDNF は「脳由来」という名称ながら、脳だけでなく、種々の末梢組織においても産生され、血液脳関門を通過することが知られている (Pan et al. Neuropharmacology 1998, Sartorius et al. Pharmacopsychiatry 2009)。

これらの背景から研究代表者は、末梢組織にて BDNF の産生を促進する物質 (以下、末梢性 BDNF 産生促進物質) は、脳内 BDNF 濃度の上昇をもたらす、うつ病の予防・改善効果を示すのではないかと、この着想を得た。しかし、BDNF は脳にて作用を示す神経栄養因子であるため、BDNF 産生促進物質の探索研究は、脳組織を対象としたものしか見当たらない。そこで研究代表者は、新規作用機序を有する抗うつ薬開発の足掛かりとして、末梢性 BDNF 産生促進物質に着目し、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、末梢性 BDNF 産生促進作用を機序とする抗うつ薬創製を目的として、末梢性 BDNF 産生促進物質の探索に有用な *in vitro* アッセイ系の構築、構築したアッセイ系を用いた BDNF 産生促進作用を有する食品・医薬品成分の探索、ラット血中 BDNF 濃度に及ぼす食品成分の影響の検討、BDNF 産生促進機序の解明を行った。

3. 研究の方法

(1) 末梢性 BDNF 産生促進物質の *in vitro* 探索アッセイ系の構築

BDNF 産生能を有する末梢組織由来細胞の同定

構築するアッセイ系の仕組みは、BDNF を産生する末梢組織由来細胞の培地に被験物質を添加し、一定時間培養後の培地中 BDNF 濃度を測定することにより、被験物質の BDNF 産生促進作用を評価するものである。このアッセイ系の構築には、BDNF を産生する末梢組織由来細胞の同定が必要である。その同定のため、ヒト膀胱がん細胞 T24、ヒト肺がん細胞 A549、ヒト膵がん細胞 MIA Paca-2 およびヒト肝がん細胞 Hep G2 における BDNF の mRNA 発現を RT-PCR 法により調べた。続いて、BDNF の mRNA 発現がみられた候補細胞を 1×10^5 、 2×10^5 および 4×10^5 個/well にて播種し、24 時間培養後の培地中 BDNF 濃度を ELISA にて測定することで候補細胞の BDNF 産生能を評価した。

BDNF のプロセッシングに関与する因子の発現確認

プロ BDNF から成熟 BDNF へのプロセッシングに関与する因子として、*furin*、PC1、PC5、PC7 および PACE4 などのプロタンパク質転換酵素が知られている。BDNF の産生が明らかとなった末梢組織由来細胞におけるこれらのプロタンパク質転換酵素の mRNA 発現を RT-PCR 法により調べた。

(2) BDNF 産生促進作用を有する食品・医薬品成分の探索

BDNF 産生能を有する末梢組織由来細胞の生存率に及ぼす被験物質の影響を MTT アッセイにて調べた。細胞生存率に影響を及ぼさなかった濃度の被験物質を BDNF 産生細胞の培地に添加し、24 時間培養した。その後、培地を回収し、培地中 BDNF 濃度を ELISA にて測定し、被験物質の BDNF 産生促進効果を判定した。

(3) ラット血清 BDNF 濃度に及ぼす被験物質の影響

6 週齢の雄性 SD ラットに 8 週間、被験物質を混餌投与し、採血を行った。採取した血液を 2 時間静置し、 4°C 、 $1,200 \times \text{g}$ にて 10 分間遠心分離した上清を血清サンプルとした。その後、ELISA キットにて、血清 BDNF 濃度を測定した。本課題の動物に係る実験は、長崎国際大学薬学部研究等倫理委員会の承認を得て (承認番号: 第 139 号)、長崎国際大学薬学部動物実験指針に基づき行った。

(4) BDNF 産生促進機序の検討

In vitro にて BDNF 産生促進作用を示した被験物質を BDNF 産生細胞の培地に添加し、24 時間培養後、トリゾール試薬にて、RNA を抽出した。その後、逆転写により得た cDNA を用いて、リアルタイム PCR を行い、BDNF 産生に関与するプロタンパク質転換酵素の mRNA 発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 末梢性 BDNF 産生促進物質の *in vitro* 探索アッセイ系の構築

BDNF 産生能を有する末梢組織由来細胞を見出すため、T24、A549、MIA Paca-2 および HepG2 細胞における BDNF の mRNA 発現を調べた。その結果、T24 および A549 細胞にその発現がみられた (図 1A)。続いて、T24 および A549 細胞を 1×10^5 、 2×10^5 および 4×10^5 個/well にてプレートに播種し、24 時間培養後の培地中 BDNF 濃度を測定したところ、A549 細胞において、播種細胞数に依存した BDNF 産生量の増加が認められた (図 1B)。また、A549 細胞が furin、PC1、PC5、PC7 および PACE4 の mRNA を発現しているか否かを検討したところ、furin、PC5、PC7 および PACE4 の mRNA 発現が認められた (図 1C)。

以上の結果から、A549 細胞は BDNF 産生促進物質の探索に有用な細胞であることが明らかとなった。BDNF 産生促進物質の探索は、A549 細胞を 4×10^5 個/well にてプレートに播種し、行うこととした。

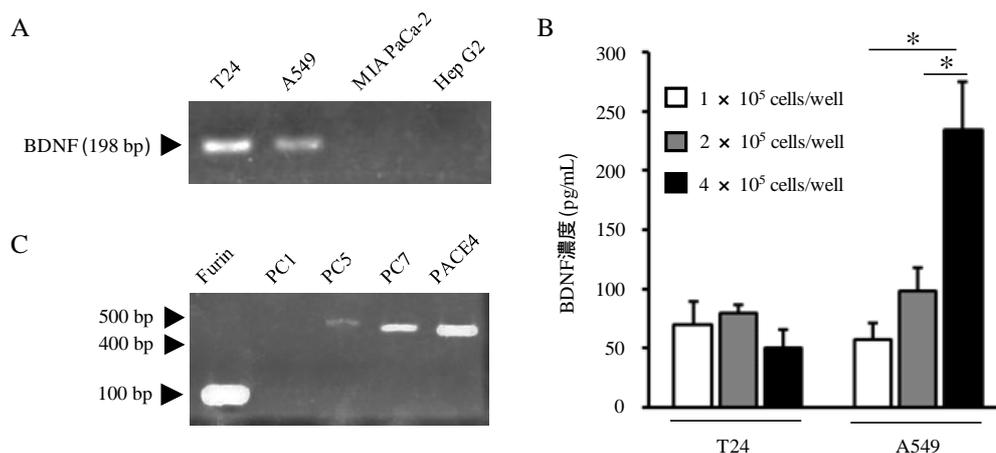


図1 末梢性BDNF産生促進物質の*in vitro*探索アッセイ系の構築

(A) 末梢組織由来細胞におけるBDNFのmRNAの発現, (B) T24およびA549細胞における24時間培養後の培地中BDNF濃度 (n=6, * $P < 0.05$), (C) A549細胞におけるプロタンパク質転換酵素のmRNAの発現

(2) A549 細胞の BDNF 産生に及ぼす食品・医薬品成分の影響

細胞生存率に影響を及ぼさない濃度の被験物質を A549 細胞の培地に添加し、BDNF 産生促進物質の探索を行ったところ、葉酸、ルチン、クロシンおよびガバペンチンは、BDNF 産生促進作用を示した (図 2)。また、代表的な緑茶カテキンであるエピガロカテキン没食子酸 (EGCG) は有意に BDNF の産生を抑制した (data not shown)。

本研究により、葉酸、ルチン、クロシンおよびガバペンチンは、A549 細胞の BDNF 産生を促進することが明らかとなった。これらの物質は末梢性 BDNF 産生促進作用を機序とする新規抗うつ薬のシーズになると期待される。

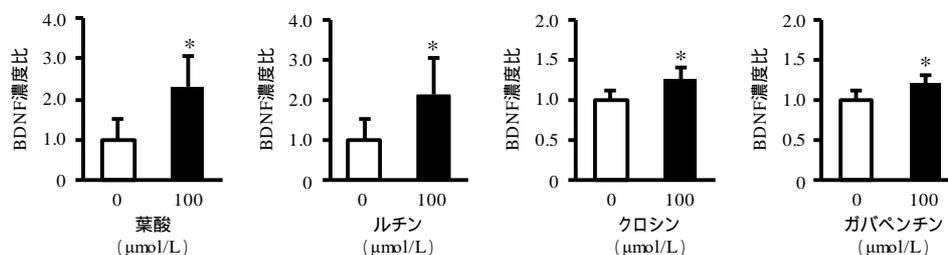


図2 A549細胞のBDNF産生に及ぼす被験物質の影響 (n=6, * $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$)

(3) ラット血清 BDNF 濃度に及ぼす EGCG の影響

EGCG は A549 細胞の培養培地中 BDNF 濃度を顕著に減少させた (data not shown)。そこで、A549 細胞を用いて見出された、BDNF の産生に影響を及ぼす物質が、生体内においても血中 BDNF に同様の影響を及ぼすか否かを、ラットに EGCG を投与することにより検討した。

6 週齢の雄性 SD ラットに 8 週間にわたり、TEAVIGO[®] (EGCG を 94% 以上含有) を粉末飼料に重量比 1% にて混合し与えたところ、血清 BDNF 濃度は低下傾向を示した (図 3)。今回の検討では、血清 BDNF 濃度に有意な影響はみられなかったが、低下傾向を示した。この結果は、

本実験で構築した *in vitro* 探索アッセイ系の有用性を示すものと考えられる。

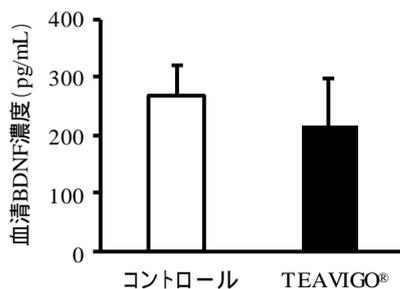


図3 ラット血清BDNF濃度に及ぼすTEAVIGO®の影響 (n=5)

(4) BDNF 産生促進機序の検討

葉酸の BDNF 産生促進機序を検討するため、BDNF および BDNF のプロセッシングに關与するプロタンパク質転換酵素 (furin、PC5、PC7 および PACE) の mRNA 発現量に及ぼす葉酸の影響をリアルタイム PCR にて調べた。葉酸は、それらの mRNA 発現に有意な影響を及ぼさなかった (図 4)。この結果から、葉酸の BDNF 産生促進作用にこれらの因子の mRNA の発現上昇の關与はないと考えられた。BDNF の開口分泌には、CAPS2 が促進的に作用することが知られている。今後、CAPS2 などの BDNF の分泌に關与する因子に着目した検討を行っていく予定である。

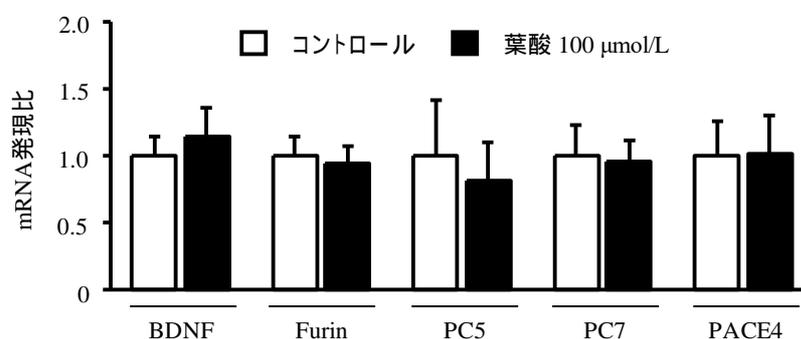


図4 A549細胞のプロタンパク質転換酵素のmRNA発現に及ぼす葉酸の影響 (n=6)

5. 主な発表論文等

〔その他〕

ホームページ等

長崎国際大学 薬学部

<https://www1.niu.ac.jp/course/pharmacy/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：仮屋 園 博子

ローマ字氏名：KARIYAZONO hiroko

研究協力者氏名：大磯 茂

ローマ字氏名：OISO shigeru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。