

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15902

研究課題名(和文) 抗うつ作用を有するフェルラ酸誘導体の探索

研究課題名(英文) Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of a novel curcumin derivative CUD003

研究代表者

松崎 広和 (MATSUZAKI, HIROKAZU)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：80582238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現代のストレス社会において、うつ病は誰もが罹患する可能性のある精神疾患であり、その予防法および有効な治療薬が求められている。本研究では、クルクミンをリード化合物として合成した新規クルクミン誘導体CUD003の抗うつ効果について検討した。CUD003は社会的敗北ストレスによるうつ様行動に対して比較的強いうつ様症状の改善効果を示した。またストレス負荷による副腎の肥大に対しても、著名な改善効果が確認された。その抗うつ効果の一部には5-HT神経系が関与すること、その受容体として5-HT1A、5-HT2A、および5-HT3受容体が関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病は様々な病因仮説が提唱されていることから、一つの機序のみを特異的に増強した薬物では効果に限界があり、複数の作用をバランスよく有していることが重要であると考えられる。本研究では、強い抗酸化作用や抗炎症作用を示す新規誘導体から候補化合物を絞り込み、強い抗うつ作用を有するCUD003を発見できた。本研究によって得られる知見により、将来的に既存の抗うつ薬とは作用機序の異なる、より優れた抗うつ作用を示す化合物の創出が可能になると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the antidepressant-like effect of a novel synthetic derivative of curcumin CUD003 and the possible mechanism of its action. Treatment with CUD003 (3 mg/kg, p.o.) decreased the immobility time in the forced swim test (FST) without affecting locomotor activity in the open field test. CUD003 was more effective than curcumin in the FST. The antidepressant-like effect of CUD003 was abolished by the pretreatment with pCPA (a tryptophan hydroxylase inhibitor), WAY-100635 (a 5-HT1A antagonist), ketanserin (a 5-HT2A/C antagonist), or ondansetron (a 5-HT3 antagonist). Moreover, social defeat stress-induced depressive behaviors as evidenced by an increased immobility time in the FST, and a decreased grooming time in the sucrose splash test were attenuated by the treatment of CUD003. These results suggest that CUD003 has more potent antidepressant-like effect than curcumin, which may be mediated by the serotonergic systems through 5-HT1A, 5-HT2A/2C and 5-HT3 receptors.

研究分野：神経薬理学

キーワード：抗うつ効果 フェルラ酸誘導体 クルクミン誘導体 抗酸化作用 5-HT神経系

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病は、抑うつ気分や興味・喜びの喪失などの精神症状を主症状とする疾患である。現代のストレス社会において、その患者数は増加しており、予防および治療対策が望まれている。現在、臨床で汎用されている抗うつ薬は、選択的セロトニン(5-HT)再取り込み阻害薬、5-HT・ノルアドレナリン(NA)再取り込み阻害薬や三環系抗うつ薬など、シナプス間隙の5-HTやNA濃度を上昇させる、いわゆる「モノアミン仮説」に基づいた薬物である。しかしながら、これらの薬物によるシナプス間隙のモノアミン濃度上昇は比較的短時間に生じるにもかかわらず治療効果が発現するまでには数週間かかること、約3割の患者にはこれらの薬物が無効であること、またすべてのモノアミン再取り込み阻害薬が抗うつ効果を発揮するわけではないといった、モノアミン仮説だけでは説明できない問題も存在している。

うつ病患者では、血中のIL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6などの炎症性サイトカインやCRP値の上昇、単球や好中球の増加、体内酸化ストレスの増大が見られ、これらがうつ状態の改善と共に正常化することが報告されている。また、ストレス負荷によりうつ病様行動を示すモデル動物においても、脳内酸化ストレスの増大が生じること、脳内ミクログリアの活性化によるIL-1 $\beta$ の上昇、神経新生の抑制が見られ、IL-1の中和抗体の投与によってこれらの変化が改善することなどから、近年、うつ病の病因にもサイトカインや免疫細胞が関与しているとする「神経炎症仮説」が注目されている。

米ぬか等に含まるフェルラ酸は、桂皮酸誘導体の一種であり、4位水酸基から芳香環、オレフィン、カルボン酸に広がる共役系のラジカル消去作用が強いことから、古くから抗酸化物質として知られている。近年では、血糖降下作用や血圧降下作用を示すほか、抗酸化作用や抗炎症作用など複数の薬理作用を介して抗認知症効果を示すことから注目されている健康食品成分の一つである。その他にも、動物モデル実験から脳内MAO-A活性の阻害による5-HTおよびNA濃度の増加、脳内抗酸化システムの増強やPKA、ERKやPI3Kなど神経新生に関与するシグナル経路の活性化など様々な作用により抗うつ作用を示すことが報告されている。申請者の行った予備的な検討においても、フェルラ酸の抗うつ効果が確認されたが、その効果は緩徐であった。また、フェルラ酸は水溶性が低い体内への吸収率が低いとされる。そのため、ヒトへの応用を視野に入れた場合、安定でかつ吸収性に優れ、さらに有効性の高い化合物が望まれる。

これまでに申請者らは、協力研究者である本学 医薬品化学講座 坂本武史教授より供与を受けた30数種類の新規フェルラ酸誘導体について、抗酸化活性の評価を行ってきた。その結果、各化合物の置換基の種類やその位置の違いにより、抗酸化活性が大幅に変化すること、培養実験系での毒性試験においても毒性の強弱が変化することを明らかとした。この中でフェルラ酸よりも高活性・低毒性を示した化合物について、過酸化水素処置による酸化ストレス障害に対する保護効果を培養細胞を用いて検討したところ、この化合物がFAよりも強い細胞保護効果を示すことを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

上記のような背景から、新規フェルラ酸の中から抗うつ作用に着目してスクリーニングを行い、より優れた抗うつ効果を示す化合物を探索すること、およびうつ症状発症に対する予防・改善のメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞を用いた誘導体の酸化ストレス、炎症性ストレスに対する細胞保護効果の評価

PC12細胞に酸化ストレスとして過酸化水素処置、炎症性ストレスとしてLPS処置を行い、細胞障害に対する誘導体の効果をATP法による細胞生存率から評価した。細胞保護効果の高い誘導体を候補化合物として、抗うつ効果を評価した。

#### (2) 誘導体の抗うつ効果の評価

クルクミン(Cur:3、10、30および100 mg/kg)および誘導体CUD003(0.3、1、3および10 mg/kg)を経口投与し、1時間後に強制水泳試験またはオープンフィールド試験を行い、抗うつ効果を評価した。

#### (3) 誘導体の抗うつ効果のメカニズムの検討

5-HT合成阻害薬p-chlorophenylalanine(pCPA)、5-HT<sub>1A</sub>受容体拮抗薬WAY-100635、5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体拮抗薬ketanserinまたは5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬ondansetronを前処置し、強制水泳試験における無動時間に対する影響から薬物の抗うつ効果の5-HT神経系の関与について評価した。

#### (4) 社会的敗北ストレスによるうつ様行動に対する誘導体の抗うつ様効果の検討

5週齢雄性C57BL/6Jマウスを10週齢雄性ICRマウスに10分間接触させ身体的ストレスを与え、23時間50分は間に仕切りを入れて感覚的ストレスを与えた。この操作を10日間繰り返し、社会的敗北ストレスによるうつ様行動を引き起こさせた。その後、誘導体を1週間経口投与し、抗うつ効果をsucrose preference試験、splash試験、強制水泳試験により評価した。試験終了後に副腎を摘出し重量を測定した。

(5) 反復拘束ストレス負荷による睡眠障害に対する誘導体の効果の検討

拘束ストレス負荷として、SD ラットをビニール製の拘束衣で1日3時間3日間拘束し、これを2サイクル行った。CurまたはCUD003(0.1または1 mg/kg)は拘束ストレス負荷1時間前に経口投与した。各サイクルの前後に、脳波および頸筋の筋電図の測定を行い、これらのデータをもとに睡眠解析ソフトを用いて、睡眠導入潜時、覚醒・NREM・REM睡眠の割合、および各睡眠ステージの平均持続時間を計測した。

4. 研究成果

(1) 誘導体の神経細胞保護効果の評価

フェルラ酸誘導体の一つFAD012が、FAと同様に細胞毒性が低く、過酸化水素による細胞障害に対してFAよりも強い細胞保護効果を示した。しかし、FAD012の抗うつ効果はFAと同程度であった。FADの2分子をメチレンでつないだクルクミン型モデルの一つであるCUD003が細胞毒性が低く、酸化ストレスおよび炎症性傷害に対して、クルクミン(Cur)よりも顕著に強い細胞保護効果を示した。

(2) 誘導体の抗うつ効果の評価

クルクミンは30 mg/kgの用量で強制水泳試験における無動時間が有意に減少した(Fig. 1A)。一方、誘導体CUD003は3 mg/kgで、無動時間を有意に減少させた(Fig. 1B)。これらの用量はオープンフィールド試験での行動量に影響を与えなかった。

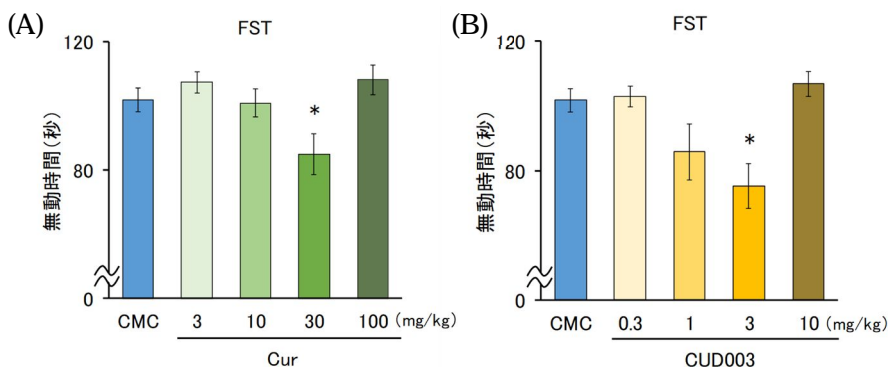


Fig. 1 強制水泳試験における無動時間に対する Cur (A)、CUD003 (B) の影響

(3) 誘導体の抗うつ効果のメカニズムの検討

5-HT合成阻害薬であるpCPAの前投与によりCur(30 mg/kg)またはCUD003(3 mg/kg)の投

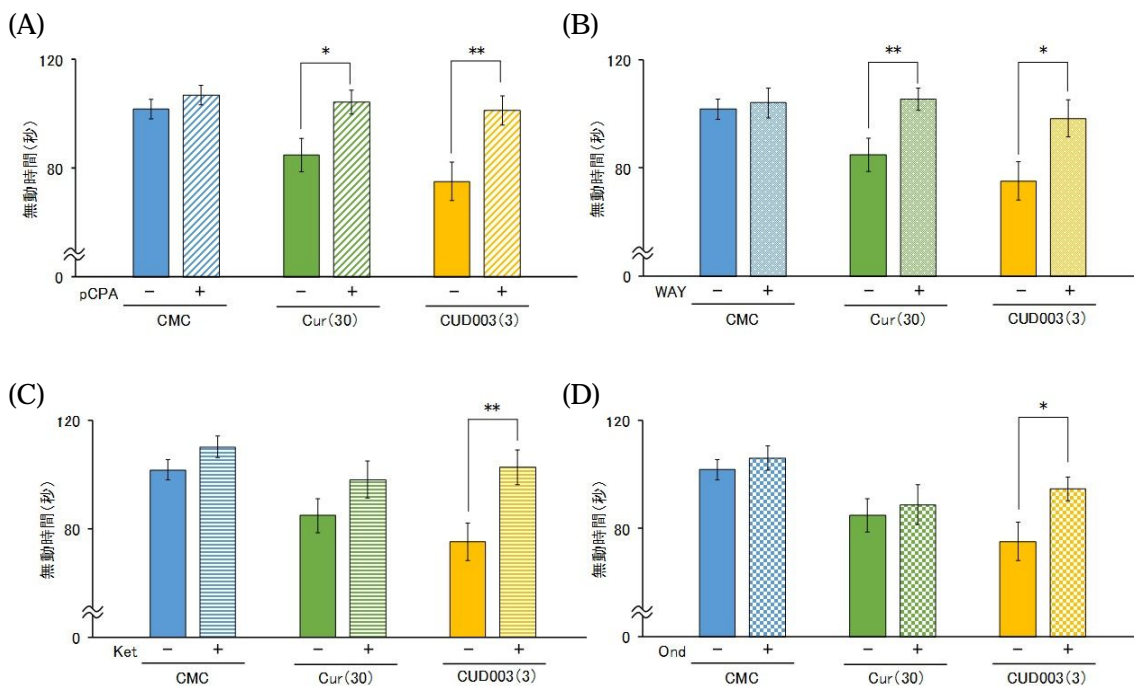


Fig. 2 5-HT合成阻害薬pCPA(A) 5-HT<sub>1A</sub>受容体拮抗薬WAY(B) 5-HT<sub>2A/2C</sub>受容体拮抗薬Ket(C) 5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬Ond(D)存在下での強制水泳試験における無動時間に対するCurとCUD003の影響

与に起因する無動時間の減少が消失した (Fig. 2A)。5-HT<sub>1A</sub> 拮抗薬である WAY の投与により Cur (30 mg/kg) または CUD003 (3 mg/kg) の投与に起因するマウスの無動時間の減少が消失した (Fig. 2B)。一方、5-HT<sub>2A/2C</sub> 拮抗薬 Ket および 5-HT<sub>3</sub> 拮抗薬 Ond の投与では、CUD003 (3 mg/kg) の投与に起因するマウスの無動時間の減少のみが消失した (Figs. 2C&D)。

(4) 社会的敗北ストレスによるうつ様行動に対する誘導体の抗うつ様効果の検討

・Sucrose preference 試験：社会的敗北ストレス (SDS) 負荷前ではショ糖選好度に有意差はみられなかった。SDS 負荷後では control 群と比較して全ての群でショ糖選好度が有意に減少した。薬物の経口投与後では curcumin (10 mg/kg)、CUD003 (3 および 10 mg/kg) 投与群で有意な回復が認められた (Fig. 3A)。

・Splash 試験：Control 群と比較して SDS 群では、首の後ろへの 10%スクロース溶液のを噴霧によるグルーミング累積時間が有意に減少し、CUD003 (3 および 10 mg/kg) 群で回復傾向が見られた (Fig. 3B)。

・強制水泳試験：Control 群と比較して SDS 群では無動時間が有意に増加した。また SDS 群と比較し、curcumin (10 mg/kg) 群および CUD003 (3 および 10 mg/kg) 群で有意に減少した (Fig. 3C)。

・副腎重量：Control 群と比較して SDS 群では副腎重量が有意に増加した。また SDS 群と比較し、curcumin (10 mg/kg) 群と CUD003 (3 および 10 mg/kg) 群の副腎重量は有意に減少した (Fig. 3D)。

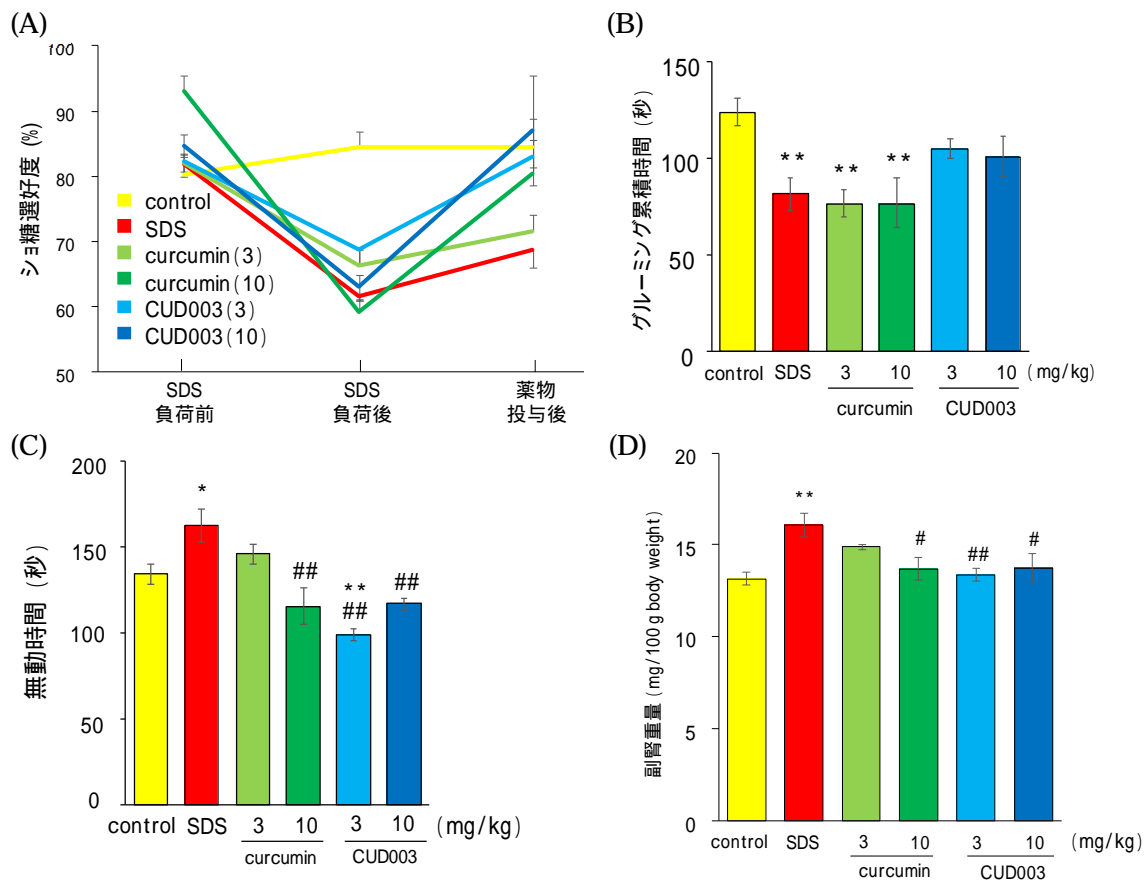


Fig. 3 社会的敗北ストレスによるうつ様行動に対する Curcumin と CUD003 の影響  
Sucrose preference 試験 (A)、 splash 試験 (B)、 強制水泳試験 (C)、 副腎重量 (D)

(5) 反復拘束ストレス負荷による睡眠障害に対する誘導体の効果

・睡眠ステージ割合の変化：Stress 群は Control 群と比較して、WAKE の有意な増加、NREM の有意な減少が認められた。Cur (0.1 mg/kg) 群においても、Stress 群と同程度の値を示した。Cur (0.1 および 1 mg/kg) 群と CUD003 (1 mg/kg) 群では、Stress 群と比較して有意な WAKE の減少、有意な NREM の増加が認められた (Figs. 4A&B)。NREM の平均持続時間は、Stress 群では Control 群と比較して有意に短縮した。Stress 群と比較して Cur (1 mg/kg) 群と CUD003 (0.1、1 mg/kg) 群ではこれが有意に延長し、Cur (0.1 mg/kg) 群では Stress 群と同程度の値を示した (Fig. 4C)。

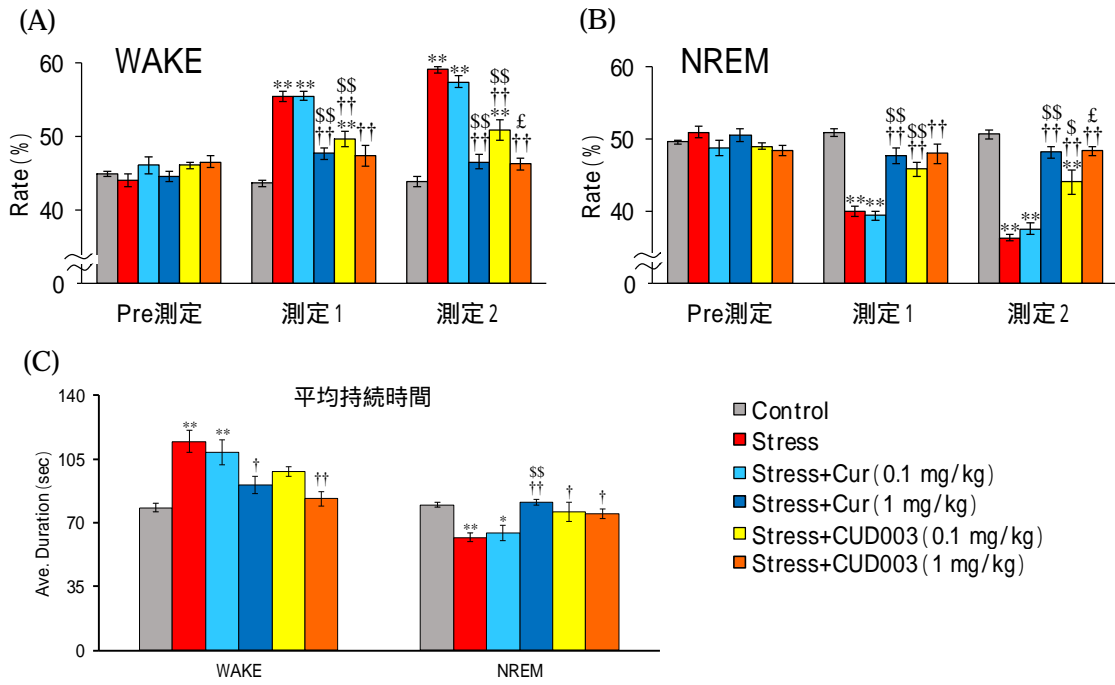


Fig. 4 反復拘束ストレス負荷による睡眠割合の変化に対する Curcumin と CUD003 の影響  
WAKE 割合 (A)、NREM 割合 (B)、WAKE および NREM の平均持続時間 (C) \*\*  $P < 0.01$  vs Control. ††  $P < 0.01$  vs Stress. \$, \$\$  $P < 0.05, 0.01$  vs Stress+Cur (0.1 mg/kg). £  $P < 0.05$  vs Stress+CUD003 (0.1 mg/kg).

・各種睡眠パラメータの変化: Stress 群は、Control 群と比較して睡眠導入潜時の有意な延長を認めた。Cur (0.1 mg/kg) 群においても、Stress 群と同程度の値を示した。Cur (1 mg/kg) 群と CUD003 (1 mg/kg) 群では、Stress 群と比較して有意な睡眠導入潜時の短縮が認められた。CUD003 (0.1 mg/kg) 群では、Stress 群と比較して睡眠導入潜時は短縮傾向を示し、測定 1 では短期覚醒回数の有意な減少が認められた (Fig.5 A)。短期覚醒回数では、Stress 群において増加傾向が見られた (Fig.5 B)。

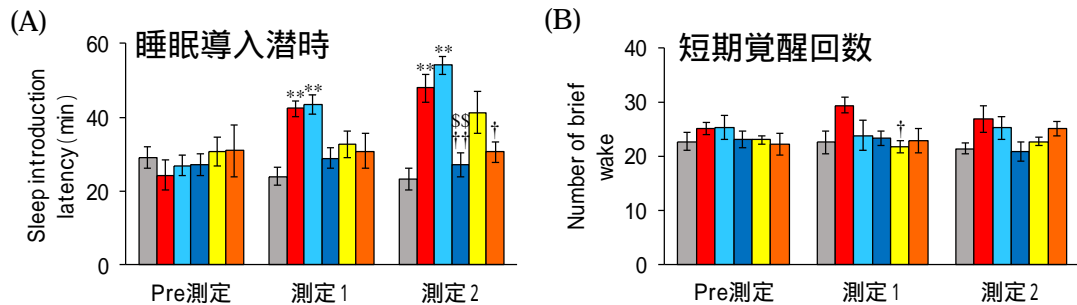


Fig. 5 反復拘束ストレス負荷による各種睡眠パラメータの変化に対する Curcumin と CUD003 の影響  
睡眠導入潜時 (A)、短期覚醒回数 (B) \*\*  $P < 0.01$  vs Control. ††  $P < 0.01$  vs Stress. \$, \$\$  $P < 0.05, 0.01$  vs Stress+Cur (0.1 mg/kg). £  $P < 0.05$  vs Stress+CUD003 (0.1 mg/kg).

以上の結果より、クルクミン誘導体 CUD003 は Cur より低用量で抗うつ作用を示し、そのメカニズムの一部には 5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>2A/2C</sub>、5-HT<sub>3</sub> 受容体が関与することが示唆された。しかし、高用量で薬効の減弱がみられるなど、至適用量やメカニズムなど不明な点も多いため、更なる研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松崎 広和、矢崎 渉、坂本 武史、日比野 康英、岡崎 真理
2. 発表標題 慢性拘束ストレス負荷マウスの回腸における炎症性反応と収縮機能異常に対するクルクミンの予防的投与の効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松崎 広和、端詰 由佳、松岡 遊史、玄 美燕、高山 淳、坂本 武史、袁 博、岡崎 真
2. 発表標題 新規クルクミン誘導体CUD003の抗うつ様効果におけるセロトニン神経系の関与
3. 学会等名 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎 広和、勅使河原 悠、平山 美玖、玄 美燕、高山 淳、坂本 武史、袁 博、岡崎 真理
2. 発表標題 反復拘束ストレス負荷ラットにおける新規クルクミン誘導体CUD003の睡眠障害軽減効果
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂本 武史  (SAKAMOTO TAKESHI)		