

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390293

研究課題名（和文）

デセン酸エステル誘導体の脊髄損傷修復作用とその医学的応用に関する研究

研究課題名（英文）

A study of the ameliorative activity of 2-decenoic acid ester derivatives on the spinal cord injury and its medical application

研究代表者

古川 昭栄（FURUKAWA SHOEI）

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90159129

研究成果の概要（和文）：

生体内での安定性を高める目的で 2-デセン酸エステルのエステル部分をアミド結合に変換した新規 2-デセン酸アミド化合物を合成し、重篤なモデルである脊髄全切断モデルラットに経口投与すると、2 週間後から運動機能が改善し、3 週間後には後肢で体重を支えて歩行するまでに回復した。対照群は 2 点程度であり後肢の関節は全く動かないままであった。本研究の目標である経口投与による脊髄損傷のモデル動物の治療がおおむね達成された。

研究成果の概要（英文）：

Oral administration of (E)-N-2-(dimethylamino) ethyl dec-2-enamide, a novel 2-decenoic acid compound, to the rats with a complete transection of the spinal cord injury, markedly improved locomotor activity after 3 weeks. The animals treated with the compound could nearly walk sustaining their weight in hind limb, but the control ones without treatment remained unchanged, demonstrating that the locomotor function impaired following the spinal cord injury could be markedly recovered by oral administration of the 2-decenoic acid derivatives.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷、軸索再生、運動機能回復、デセン酸誘導体、神経栄養因子、シグナル伝達、培養神経細胞

1. 研究開始当初の背景

脊髄は末梢組織と脳の知覚、運動神経情報の伝導路であり、傷害されると運動麻痺や知覚障害に陥る。有効な治療法はなく、完治はおろか部分的な機能再建も望めない。中枢神経系にはもともと軸索再生能力があるのにそれを妨げる拒絶的環境が存在する。例えば

「神経栄養因子の欠乏」は中枢神経の軸索再生を困難にしている理由の一つである。これを補うため損傷患部へ種々の神経栄養因子を投与する研究が行われたが効果は部分的であった。その理由として、(1) 神経栄養因子がタンパク質であり外的に投与されると早期に分解される、(2) 仮に軸索が再生

しても、注入された高濃度の神経栄養因子に引き寄せられてその周辺にとどまり、損傷部を通過できないなどの理由が考えられている。

そこで我々は、安定で、脳へ移行性があり、神経栄養因子様のシグナルを発生する活性分子を探し、2-デセン酸誘導体にこの活性を見出した。そこで、ラット胸部脊髄を切断し後肢が完全に麻痺したラットに 2-デセン酸エチルエステル (DAEE) を腹腔内投与したところ運動機能が著明に改善することを見出した。この結果は、(1) 脊髄の全切断損傷(重篤な損傷)での機能回復であること、(2) 食習慣があり安全性の高い中鎖脂肪酸の誘導体であること、(3) 投与は、脊髄損傷部位ではなく腹腔内である点など、前例のない画期的な治療効果を示していた。

2. 研究の目的

2-デセン酸エステル誘導体による脊髄損傷後の運動機能の改善が軸索再生に基づくことを実証し、損傷修復に至るメカニズムを分子・細胞レベルで解明する。さらにこれをもとに、「顕著な薬効を示し、安全で、経口投与の可能な」脊髄損傷治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 脊髄損傷モデルの作製と薬効評価：麻酔下、ラットの第 12 胸椎の椎弓を切除後、同部位にて鋭利な刃物で横断的に半分又は全部の脊髄を切断した。薬剤を 1 日 1 回、モデル動物に腹腔内又は経口投与し BBB スケール (Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. *J Neurotrauma* 1995; 12:1-21) に基づいて運動機能の評価した。
- (2) 軸索再生の検証：再生軸索で発現の高い GAP43 の抗体を用いた免疫組織化学的手法で軸索再生を検証した。
- (3) 損傷部位における遺伝子発現変化：神経栄養因子や炎症に係る因子の mRNA 発現変化を RT-PCR で検討した。
- (4) 経口投与に最適な 2-デセン酸誘導体の創製と活性評価：①生体内で加水分解されにくい分子構造のデザイン (S や N の導入など) と化学合成、②アルコール構造部分を改変、修飾した化合物の合成、③2-デセン酸構造部分を改変、修飾した化合物の合成を実施した。

4. 研究成果

新たに合成した 2-デセン酸化合物のうち典型的な 3 種類の化合物 (E)-2-(diethyl amino) ethyl dec-2-enoate (化合物 A : エステル化合物)、(E)-N-2-(dimethyl amino)ethyl dec-2-enamide (化合物 B : アミド化合物) 及び (E)-S-(dimethylamino) ethyl dec-2-enethionate (化合物 C : チオエステル化合物) について、オリジナル化

合物である 2-デセン酸エチルエステル (DAEE) と比較しつつ、(1) 培養大脳皮質ニューロンの ERK1/2 分子に対するリン酸化増強活性、(2) 脊髄の半切断損傷モデルの運動機能回復に及ぼす経口投与の影響、(3) 化合物は経口投与による損傷部位の遺伝子発現変化、(4) 脊髄の全切断損傷モデルの運動機能回復に及ぼす経口投与の化合物の効果について調べた。

(1) ERK1/2 のリン酸化作用の強さは、化合物 C > 化合物 B = DAEE >> 化合物 A = 無添加コントロールという順であった。

(2) 半切断モデルの切断側の後肢の運動機能回復作用は、化合物 C は 500 及び 2500 µg/kg の投与用量で回復が早まったが最終的な回復レベルはコントロールと差がなかった。化合物 A も同様に 100 及び 500 µg/kg の投与用量で回復が早まったが最終的な回復レベルは効果がなかった。しかし化合物 B は 500、2500 µg/kg の用量で回復が早まり、回復レベルも有意に高値であった。すなわち回復効果は、化合物 B >> 化合物 A = 化合物 C

(3) 損傷部位での神経栄養因子 (BDNF) の発現は化合物 B と C の投与で有意に高かった。又炎症誘導因子である誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現を有意に抑制した。しかし化合物 A ではこの効果は認められなかった。すなわち、遺伝子発現を有利に導く活性は、化合物 B = 化合物 C >> 化合物 A の順であった。

(4) 化合物 B が最も強い脊髄損傷修復効果を示し、その背景には損傷部位における遺伝子発現を軸索再生に有利な方向に誘導する作用があると考えられた。そこでさらに重篤な脊髄損傷モデルである脊髄の全切断モデルに対する効果を検討した。その結果、化合物 B を 200 µg/kg で経口投与すると、本来全く回復しない運動機能が、曲がりなりにも歩行できるレベルにまで回復した。組織化学的な検討により損傷部位を再生軸索が走行する様子が観察された。

以上、薬物の経口投与によって脊髄損傷モデル動物を治療することが可能となった。今後は、作用メカニズムの詳細について解明を進めながら、ヒトの脊髄損傷治療薬の開発に向けた研究を展開していきたい。

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 16 件)

- 1) Hara T, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S, Injury-induced accumulation of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rostral part of the injured rat

- spinal cord. *Int J Mol Sci*, 查読有, 13, 13484-13500, 2012, doi: 10.3390/ijms131013484.
- 2) Tanaka Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Yoshimura S, Iwama T, Furukawa S. 2-Decenoic acid ethyl ester, a compound that elicits neurotrophin-like intracellular signals, facilitating functional recovery from cerebral infarction in mice. *Int J Mol Sci*, 13, 4968-4981, 2012, doi: 10.3390/ijms 13044968.
 - 3) Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. Knockdown of pre-mRNA cleavage factor Im 25kDa promotes neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*, 425, 848-853, 2012, doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.164. Epub 2012 Aug 7.
 - 4) Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction. *Biomed Res*, 32, 1-7, 2011.
 - 5) Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises development of upper-layer but not deeper-layer neurons of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res*, 89, 1342-1350, 2011. doi: 10.1002/jnr.22636. Epub 2011 Jun 14.
 - 6) Soumiya H, Fukumitsu H, Furukawa S. Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex. *J Neurosci Res*, 89, 1575-1585, 2011. doi: 10.1002/jnr.22704. Epub 2011 Jul 5.
 - 7) Ito S, Nitta Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Ikeno K, Nakamura T, Furukawa S. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, a unique unsaturated fatty acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;139140, 2012; Epub 2011 Jul 24.
 - 8) Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. A superoxide anion-scavenger, 1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. *Toxicol Appl Pharmacol*, 257, 388-395, 2011
 - 9) Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Favero F, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. 3-(2,6-Dimethylphenyl)-2-selenoxo-1,3-thiazolidin-4-one suppresses hydrogen peroxide-induced cytotoxicity on PC12 cells via activation of MAPK. *Int J Toxicol*, 30, 690-699, 2011
 - 10) Furukawa Y, Urano T, Minamimura M, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S. 4-Methylcatechol-induced heme oxygenase-1 exerts a protective effect against oxidative stress in cultured neural stem/progenitor cells via PI3 kinase/Akt pathway. *Biomed Res* 31, 45-52, 2010
 - 11) Kasai M, Jikoh T, Fukumitsu H, Furukawa S. FGF-2-responsive and spinal cord-resident cells improve locomotor function after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2010 Mar 3 [Epub ahead of print]
 - 12) Nakajima H, Uchida K, Yayama T, Kobayashi S, Guerrero AR, Furukawa S, Baba H. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. *Spine*, 35, 497-504, 2010
 - 13) Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa S. Ethanol extract of chinese propolis facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011. pii: 749627. Epub 2010 Sep 8.
 - 14) Hirakawa A, Shimizu K, Fukumitsu H, Soumiya H, Iinuma M, Furukawa S. 2-Decenoic acid ethyl ester, a derivative of unsaturated medium-chain fatty acids, facilitates functional recovery of locomotor

activity after spinal cord injury. *Neuroscience*. 171, 1377-1385, 2010 doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.004. Epub 2010 Oct 8. 2010 Oct 8.

- 15) Okada M, Makino A, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S, Furukawa Y. Estrogen Stimulates Proliferation and Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells through Different Signal Transduction Pathways. *Int J Mol Sci* 11, 4114-4123, 2010
- 16) Makino A, Iinuma M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S. 2-Decenoic acid ethyl ester possesses neurotrophin-like activities to facilitate intracellular signals and increase synapse-specific proteins in neurons cultured from embryonic rat brain. *Biomed Res*, 31, 379-386, 2010

[学会発表] (計 15 件)

- 1) 柴田翔洋ら：コルチコステロン慢性投与によるうつ病モデル動物の作製とそれを用いたデセン酸誘導体の活性評価。日本薬学会第 133 年会 (横浜) 平成 25 年 3 月 30 日
- 2) 影山耕太ら：手がかり学習における脳由来神経栄養因子の役割に関する研究。日本薬学会第 133 年会 (横浜) 平成 25 年 3 月 28 日
- 3) 古川昭栄：プロポリスによる脊髄損傷の修復。第 1 回ファイトケミカル研究会－機能性食品への展開－ (岐阜)、平成 25 年 3 月 2 日
- 4) 古川昭栄：神経栄養因子シグナルの活性化に基づく新規アルツハイマー病治療薬 (新規デセン酸誘導体)。創薬シーズ・基盤技術アラアンスネットワーク疾患別商談会 (大阪) 平成 25 年 2 月 1 日
- 5) 古川昭栄ら：カフェイン酸フェネチルエステル (CAPE) の抗うつ作用。第 3 回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会 (岐阜) 平成 24 年 12 月 1 日
- 6) 荒磯ひろみら：生後直後の感覚入力遮断がマウスの社会性行動と情動機能に及ぼす影響。日本病院薬剤師東海ブロック・

日本薬学会東海支部合同学術大会 2012 (岐阜) 平成 24 年 11 月 18 日

- 7) Ushiro D et al.:Amelioration of locomotor dysfunction after spinal cord injury by orally-administered 2-decenoic acid derivatives. 第 55 回日本神経化学会 (神戸) 平成 24 年 11 月 5 日
- 8) 後大輔ら：2-デセン酸誘導体による脊髄損傷修復について。日本薬学会第 132 年会 (札幌) 平成 24 年 3 月 30 日
- 9) 森大輔、古川昭栄：ピーナツ渋皮抽出物の抗うつ様作用。日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都) 平成 24 年 3 月 23 日
- 10) 樹下洋輔ら：大豆ソヤサポニンによる脊髄損傷修復。第 2 回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会 (岐阜) 平成 23 年 11 月 26 日
- 11) 森大輔ら：ピーナツ渋皮抽出物のアルツハイマー病予防作用に関する研究。第 2 回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会 (岐阜) 平成 23 年 11 月 26 日
- 12) 虎谷厚志ら：PQQ の脳内マップキナーゼ活性化作用と抗うつ効果。第 2 回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会 (岐阜) 平成 23 年 11 月 26 日
- 13) 樹下洋輔ら：大豆成分ソヤサポニンの腹腔内投与による脊髄損傷修復。第 84 回日本生化学会 (京都) 平成 23 年 9 月 23 日
- 14) Kasai M et al.:FGF-2 induced fibronectin-positive cells retained the potential to repair spinal cord injury through several passages. 第 53 回日本神経化学会 (神戸) 平成 22 年 9 月 3 日
- 15) Itoh S et al.:Therapeutic effects of soybean isoflavone equol on depression of animal model via the activation of brain MAP kinases. 第 53 回日本神経化学会 (神戸) 平成 22 年 9 月 3 日

[図書] (計 2 件)

Furukawa S, Kasai M, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y :Propolis: Implications for the treatment of spinal cord injuries.

in “Beneficial effects of propolis on human chronic diseases” Eds :Tahira Farooqui, Akhlaq A. Farooqui, Nova Science Publishers (2012)

古川昭栄、福光秀文、古川美子：5. 増殖因子4) Neurotrophins. 臨床免疫・アレルギー科、サイトカインのすべて、第 57 巻 特別増刊号 (Suppl. 21) pp. 523-530 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：PCT 出願「トランス-2-デセン酸誘導体及びこれを含有する医薬」

発明者：飯沼宗和、古川昭栄

権利者：中部 TLO

種類：PCT/JP

番号：PCT/JP2011/075228

出願年月日：平成 23 年 11 月 1 日

国内外の別：国際出願

○取得状況 (計 3 件)

名称：トランス-2-デセン酸誘導体及びこれを含有する医薬

発明者：飯沼宗和、古川昭栄、内木充、松元智規、杉本八郎

権利者：中部 TLO、日本臓器株式会社

種類：特願 2012-513796

番号：特許第 5044059

取得年月日：平成 24 年 7 月 20 日

国内外の別：国内

名称：抗がん剤による末梢神経障害の予防又は治療剤

発明者：飯沼宗和、古川昭栄、内木充、岡田智行、松元智規、澤田和好

権利者：中部 TLO、日本臓器株式会社

種類：特願 2012-516241

番号：特許 50009451

取得年月日：平成 24 年 6 月 8 日

国内外の別：国内

名称：鎮痛剤

発明者：飯沼宗和、古川昭栄、内木充、岡田智行、松元智規、澤田和好

権利者：中部 TLO、日本臓器株式会社

種類：特願 2012-516240

番号：特許 5009450

取得年月日：平成 24 年 6 月 8 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

<http://www.gifu-pu.ac.jp/research/resea>

[rch_bunsei.html](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 昭栄 (FURUKAWA SHOEI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90159129

(2) 研究分担者

福光 秀文 (FUKUMITSU HIDEFUMI)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00308280

宗宮 仁美 (SOUMIYA HITOMI)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20548713

古川 美子 (FURUKAWA YOSHIKO)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：20219110

飯沼 宗和 (IINUMA MUNEKAZU)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70082298