

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460910

研究課題名(和文)新規フェルラ酸誘導体の脳虚血性嚥下反射障害に対する予防・改善効果に関する基礎研究

研究課題名(英文)Preventive effects of novel ferulic acid derivatives on cerebral ischemia-induced swallowing dysfunction

研究代表者

岡崎 真理 (OKAZAKI, MARI)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：50272901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：嚥下障害は、脳梗塞等の脳血管障害に起因し、低栄養や誤嚥性肺炎のリスクを増大させる。本研究において我々は、天然物のフェルラ酸(FA)をシード化合物として、FAよりも優れた脳保護効果を有する誘導体(FAD)の創出を試みた。抗酸化能および細胞保護効果を指標としたスクリーニングにより、毒性が低く、FAよりも効果の強いFAD012を見出した。FAD012の長期経口投与は、ラットの慢性脳低灌流処置による脳血流量の減少を軽減し、嚥下反射潜時の延長および回数の減少を抑制した。これらの結果より、FAD012は、虚血時の脳血流を維持することにより脳障害を抑制し、嚥下反射機能障害を軽減することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dysphagia is a major complication of stroke and often leads to lethal aspiration pneumonia in the patients. In the present study, we investigated the effects of FAD012, a synthetic novel derivate of ferulic acid (FA), against the swallowing dysfunction induced by bilateral common carotid artery occlusion (2VO) in male Sprague-Dawley rats. Rats were continuously treated with FAD012 (3 or 10 mg/kg daily, p.o.) from one week before 2VO. Chronic pretreatment with FAD012 but not FA maintained the cerebral blood flow (CBF) in 2VO rats. 2VO rats had an attenuated swallowing reflux evoked by injection of stimulating solution (50  $\mu$ L of water or citric acid) into the pharyngolaryngeal region. FAD012 dose-dependently improved the swallowing reflux, and these effects were more potent than FA. These results suggest that FAD012 ameliorates the swallowing dysfunction in part via improvement of CBF in 2VO rats.

研究分野：神経薬理学

キーワード：フェルラ酸誘導体 慢性脳低灌流 脳虚血 脳血流維持作用 嚥下反射障害 ラット

## I. 研究開始当初の背景

嚥下障害は、特に高齢者においてその患者数が増加しており、社会的に大きな問題となっている。食事の経口摂取が困難になると、患者の QOL が低下するばかりでなく、栄養状態の悪化や窒息などのリスクが上昇する。さらに、嚥下障害は合併症として誤嚥性肺炎を引き起こす。肺炎は我が国の死亡原因の第 4 位を占めるが、その死亡者の 95%以上が 65 歳以上の高齢者であり、その多くは誤嚥性肺炎によるものである。このように、嚥下障害は、昨今の高齢社会の到来により医療的・社会的に深刻な負担をもたらしているにも関わらず、現在、適応を持つ有用な医薬品は存在せず、患者はもとより医療・介護現場においても、有効な予防・治療法の開発に対するニーズは極めて高くなっている。

嚥下障害の原因疾患として最も頻度の高いのは脳血管疾患であり、その他にパーキンソン症候群や認知症などの脳疾患があげられる。脳血管疾患やパーキンソン症候群を原因疾患とし誤嚥性肺炎を繰り返す患者では、大脳基底核の黒質・線条体におけるドパミン産生が減少しており、これに伴い上喉頭神経および舌咽神経の知覚枝から咽喉頭・気管粘膜に分泌されるサブスタンス P (SP) 量が減少していることが知られている。SP 分泌の減少は、咽喉頭・気管から延髄嚥下中枢・呼吸中枢への反射入力を減弱させ、嚥下反射や咳反射の機能を低下させる。この病態メカニズムに基づき、薬物療法として ACE 阻害薬やパーキンソン病治療薬が有効であることが報告されているものの、臨床適応を満たすエビデンスは得られていない。

これら嚥下障害の原因となる脳疾患の発症原因や病態には、酸化ストレスによる神経細胞障害の関与が明らかになっている。脳は、酸素消費量が多く活性酸素種が発生しやすいため、酸化ストレス障害を受けやすく、また、虚血に脆弱であり、脳梗塞に至る前段階の軽度の虚血であっても神経細胞にアポトーシスが誘導される。一方、米ぬかなどに含まれるフェルラ酸は、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。これまでの基礎研究から、フェルラ酸には抗認知症作用があることが報告されており、そのメカニズムとして抗酸化作用の他、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性、抗炎症作用など複数の薬理作用の関与が示唆されている。申請者らの研究グループは、これまでに慢性脳循環障害モデルラットを用いてフェルラ酸の長期経口投与の効果を予備的に検討したところ、フェルラ酸は虚血による脳組織障害を軽減し、また、このモデルにおける嚥下反射機能障害を予防・改善することを見出した。さらに、フェルラ酸を投与した群では、対照群と比較し黒質・線条体のドパミン含量の低下が有意に抑制さ

れることも明らかとなった。これらの実験結果は、フェルラ酸が虚血性脳障害による嚥下反射機能低下に対して有効である可能性を示している。しかし、フェルラ酸の効果は緩徐であり、ヒトへの応用を視野に入れる場合には、さらに有効性を高める必要がある。

## II. 研究の目的

上述のような背景から、フェルラ酸よりも安定でかつ吸収性に優れ、有効性が高い新規フェルラ酸誘導体を合成し、これらの嚥下反射機能予防・改善効果および作用メカニズムを、モデル動物を用いて検証することを目的とした。

## III. 研究の方法

1. 新規フェルラ酸誘導体の設計および合成  
吸収性と安定性を兼ね備えた新規フェルラ酸誘導体を下記の観点から新たに分子設計した。

### (1) フェルラ酸誘導体の合成

フェルラ酸の芳香環上にアルキル基、酸素官能基、ハロゲン等を導入した誘導体の分子設計を行った。次いで、それら誘導体を収率良く合成するため、3 種類の炭素-炭素二重結合形成反応 (Heck 反応、Heck-Matsuda 反応、Honer-Wadsworth-Emons 反応) を使い分け、13 種類の新規誘導体を合成した。

2. フェルラ酸誘導体の抗酸化作用および神経細胞保護作用の評価

### (1) 抗酸化能の評価

1 において合成した新規フェルラ酸誘導体について、活性酸素種 (スーパーオキシドラジカル、DPPH) 消去能および過酸化脂質産生抑制能を指標とし、抗酸化活性を評価した。

(2) 培養細胞を用いた酸化ストレス障害に細胞保護効果の評価

上記 (1) の結果を踏まえ、培養神経細胞を用いた評価を行った。PC12 細胞に、過酸化水素処理を行い、細胞傷害に対するフェルラ酸誘導体の効果を評価した。ATP 法による細胞生存率の評価、DCHF-DA を用いた細胞内活性酸素種の測定を行った。

3. モデル動物における誘導体の嚥下反射障害改善効果の検討

### (1) 実験動物

すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。麻酔下、ラットに両側総頸動脈永久結紮 (2VO) 処置を施し、慢性脳低灌流による嚥下障害モデルを作製した。雄性 SD ラット (10 週齢) を擬似手術 (Sham) 群、2VO 群、10 mg/kg または 30 mg/kg FA 投与群 (FA (10)、FA (30))、3 mg/kg または 10 mg/kg FAD012 投与群 (FAD012 (3)、FAD012 (10)) の 6 群に分けた。FA および FAD012 は、0.5% CMC で溶解し、ラットに 2VO 処置の 1 週間前から 2 週間後までの計 3 週間、連日経口投与した。投与開始から一週間後に、イソフルラン麻酔下でラットの両側総頸動

脈を永久結紮し、2VO モデルを作製した。また Sham 群には、総頸動脈結紮以外を同様に処置した。

#### (2) 嚥下反射機能の測定

ウレタン麻酔下で頸部を正中切開し、気管および食道にカニューレを挿入した。刺激液注入用チューブを咽頭口部の咽頭蓋近傍に挿入し、刺激液として水またはクエン酸 (1、3、10 mM) を、シリンジポンプを用いて注入し (3.3  $\mu$ l/sec、50  $\mu$ l)、嚥下反射を誘発した。

嚥下時が誘発されるまでの潜時、および刺激液注入から 45 秒間の嚥下回数を顎舌骨筋に挿した電極を介して、筋電図にて記録した。

#### (3) 体内酸化ストレス度の測定

生体内酸化ストレス度を d-ROMs テストキット (Diacron International) を用い、血中ヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した。

#### (4) ジヒドロエチジウム (DHE) 染色

組織におけるスーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) の産生量を DHE 染色にて評価した。麻酔下、ラットを 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、脳を摘出し、クリオスタットを用いて線条体または黒質を含む厚さ 10  $\mu$ m の冠状切片を作製した。

#### (5) チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 免疫染色

ドパミン神経系の障害を評価するために、線条体または黒質の TH 発現を免疫染色法により評価した。

### IV. 研究成果

#### 1. フェルラ酸誘導体の抗酸化能および神経細胞保護作用の評価

Fig. 1 のようにフェルラ酸誘導体 FAD001 ~ FAD013 を合成した。

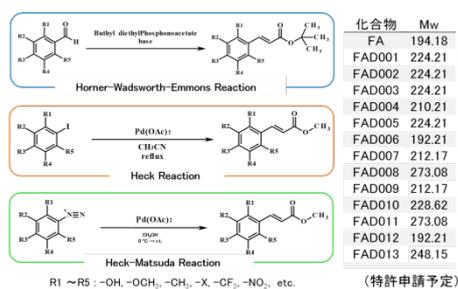


Fig. 1 FA 誘導体の合成

各誘導体の抗酸化活性を 50% 抑制濃度にて比較した結果、DPPH 消去能のみが高いもの、DPPH 消去能と過酸化脂質抑制能の両方について高い活性を示すものが見られた。しかし、FA より顕著に強いものはなかった (Table 1)。これらの誘導体のうち、DPPH 消去能と過酸化脂質産生抑制能の両方の活性が比較的高い FAD012 の細胞保護効果について検討することとした。

PC12 細胞に FA と FAD012 (1 nM ~ 3 mM) を添加して 48 時間培養し、MTT assay により細胞

生存率を評価した (Fig. 2)。その結果、FAD012 の毒性は、FA と同様に低く、1 mM の高濃度においても細胞生存率に影響しなかった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置 24 時間培養後の細胞生存率を ATP 法により評価した (Fig. 3)。FAD012 は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置 24 時間後の細胞生存率の低下を 10  $\mu$ M の低濃度から濃度依存的に抑制した。一方、FA には有意な細胞生存率の抑制効果は見られなかった。

Table 1 FA および FA 誘導体におけるフリーラジカル消去能と過酸化脂質産生抑制能

検体	Mw	DPPHラジカル消去能 (IC <sub>50</sub> )		過酸化脂質産生抑制能 (IC <sub>50</sub> )
		( $\mu$ M)		( $\mu$ M)
FA	194.18	76.55 $\pm$ 10.55		29.16
Trolox	250.29	71.35		32.06
NAC	163.19	217.56		
Vitamin C	176.12	74.88		1853.77
FAD001	224.21	65.52		24.87
FAD002	224.21	356.81		341.15
FAD003	224.21	62.19		32.11
FAD004	210.21	48.54		120.92
FAD005	224.21	679.38		53.74
FAD006	192.21	13731.30		222.56
FAD007	212.17	69.54		24.38
FAD008	273.08	116.04		38.51
FAD009	212.17	75.67		21.90
FAD010	228.62	73.30		20.44
FAD011	273.08	68.66		19.90
FAD012	192.21	65.15		23.57
FAD013	248.15	>30223		268.22

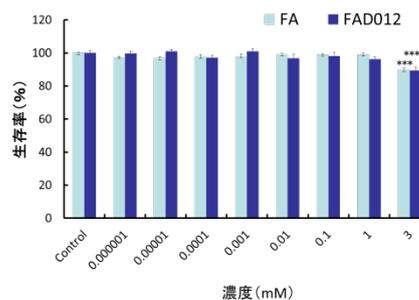


Fig. 2 FAD012 の細胞毒性の評価

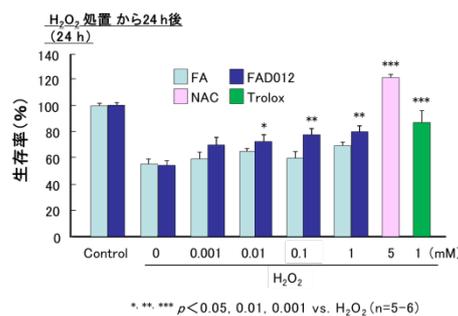


Fig. 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処置による細胞生存率低下に対する FA、FAD012 の細胞保護効果

#### 2. 2VO ラットの嚥下反射障害に対する FAD012 の改善効果

2VO 処置 3 日後のラットの生存率は、約 6 割であった。FA (10, 30) 群の生存率は、2VO 群と同程度であった。一方、FAD012 (3, 10) 群では、処置 2 週間後においても、約 8 割のラットが生存した (Fig. 4)。2VO 処置により、両半球の血流量は、処置前の約 45% 程度まで

減少した。FAD012 を投与した群では、2VO 処置直後の血流量の減少が有意に抑制され、2週間後まで脳血流の経時的な回復が認められた。FA はどの用量においても、効果を示さなかった (Fig. 5)。

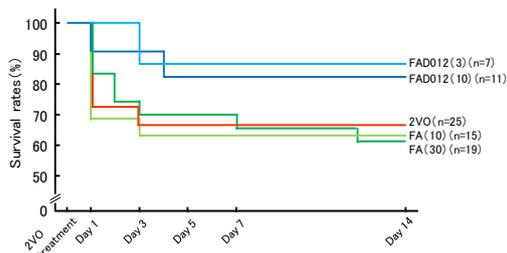


Fig. 4 生存率に対する FAD012 の効果

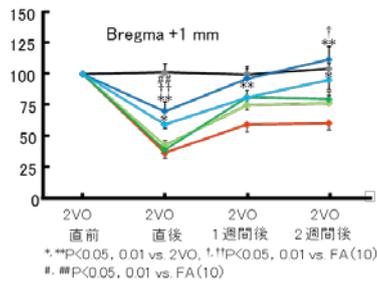


Fig. 5 2VO 前後の脳血流量の変化

2VO 群では Sham 群に比べ嚥下反射潜時の延長が見られた。一方、FAD012 (10) 群では 2VO 群と比較し、潜時が短縮した (Figs. 6A&B)。2VO 群では、Sham 群と比較し、刺激液によって誘発される嚥下回数が有意に減少した。一方、FAD012 (10) 群は 2VO 群と比較し、嚥下回数が有意に増加し、Sham 群と同程度の嚥下反射が認められた。また FA (10) 群と比較し、高い効果がみられた (Fig. 6C)。

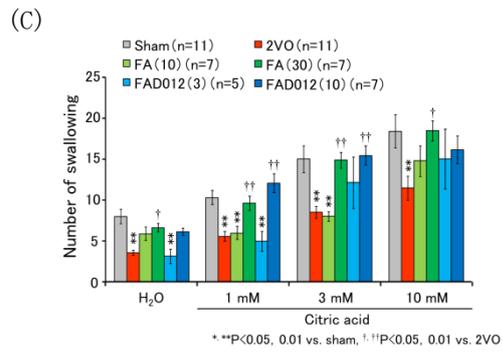
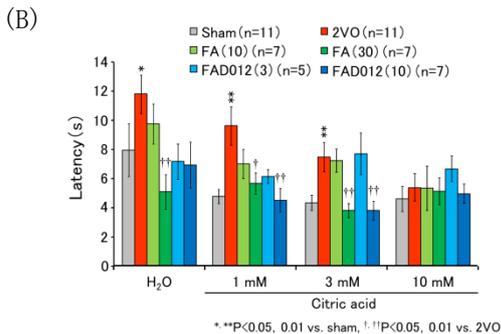
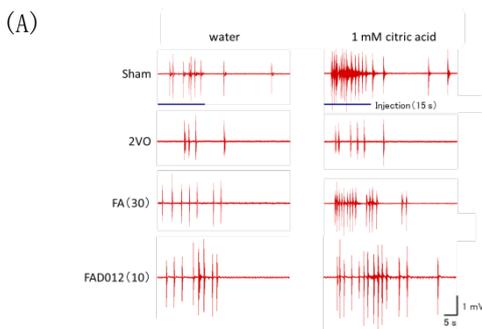


Fig. 6 顎舌骨筋の筋電図の典型例 (A)、嚥下潜時 (B) および回数 (C)

嚥下反射には、大脳基底核の黒質・線条体ドパミン神経系が関与していることが知られている。そこで、各群のこれら脳部位の  $O_2^-$  産生および TH 発現を、組織染色により評価した。2VO 群の黒質・線条体では、Sham 群に比べ、 $O_2^-$  産生の増大および TH 発現の低下が認められた。一方、FAD012 (10) 群ではこれらの変化が完全に抑制された。この効果は FA よりも顕著であった (Fig. 7)。

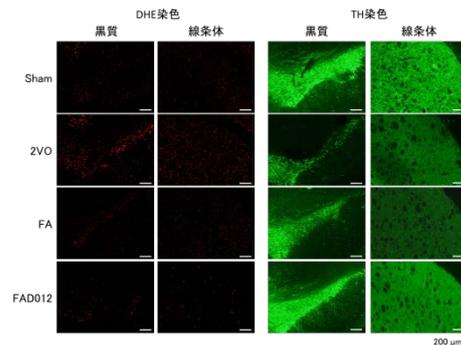


Fig. 7 黒質・線条体における  $O_2^-$  産生および TH 発現

以上の結果より、FAD012 は、虚血時の脳血流の低下を抑制し、黒質・線条体ドパミン神経の機能を保護することにより嚥下反射機能の低下を軽減したと考えられる。今後は、本研究で明らかになった FAD012 の脳保護効果メカニズムを解明するとともに、さらに安全性および脳保護効果に優れた化合物の創出を継続する必要があると考えられる。

## V. 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 2 件)

① Xuan M., Okazaki M., Iwata N., Asano S., Kamiuchi S., Matsuzaki H., Sakamoto T., Miyano Y., Iizuka H., Hibino Y. Chronic treatment with a water-soluble extract from the culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia (MAK) prevents apoptosis

and necroptosis in hypoxia/ischemia-induced injury of type 2 diabetic mouse brain. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015: 865986 (2015).

② Iwata N., Okazaki M., Kamiuchi S., Xuan M., Matsuzaki H., Sakamoto T., Hibino Y. Early release of HMGB1 may aggravate neuronal damage after transient focal ischemia in diabetic rat brain. International Journal of Diabetes and Clinical Research, 2:021 (2015).

〔学会発表〕(計 19 件)

① 浅野 昂志, 松崎 広和, 中田 由佳里, 横瀬 祐太, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットにおけるフェルラ酸の嚥下機能改善作用および神経メカニズム 第 16 回日本補完代替医療学会学術集会 2013 年 11 月 金沢

② 松崎 広和, 浅野 昂志, 中田 由佳里, 横瀬 祐太, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットの嚥下機能障害に対するフェルラ酸の改善作用 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 仙台

③ 浅野 昂志, 松崎 広和, 中田 由佳里, 横瀬 祐太, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットの嚥下機能障害に対するフェルラ酸の効果とその神経メカニズム 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 熊本

④ 友野 聖己, 玄 美燕, 林 浩輔, 亀川 真理子, 可児 大輔, 松崎 広和, 高山 淳, 坂本 武史, 岡崎 真理: 新規フェルラ酸誘導体の抗酸化活性評価と細胞保護効果の検討 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 熊本

⑤ 玄 美燕, 岡部 祥子, 林 浩輔, 松崎 広和, 高山 淳, 坂本 武史, 岡崎 真理: フェルラ酸誘導体の抗酸化活性評価と細胞保護効果の検討. 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 2014 年 10 月 4 日 (東京).

⑥ 松崎 広和, 高塚 麻実, 玄 美燕, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットの学習障害に対する eugenol の効果. 第 17 回日本補完代替医療学会学術集会, 2014 年 11 月 1, 2 日 (東京).

⑦ 浅野 昂志, 松崎 広和, 小井土 愛里, 松井 駿, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットの嚥下機能障害に対するオイゲノールの効果. 第 17 回日本補完代替医療学会学術集会, 2014 年 11 月 1, 2 日 (東京).

⑧ 玄 美燕, 岡部 祥子, 林 浩輔, 松崎 広和, 高山 淳, 坂本 武史, 岡崎 真理: 新規フェルラ酸誘導体の抗酸化活性評価と細胞保護効果の検討. 第 17 回日本補完代替医療学会学術集会 2014 年 11 月 1, 2 日 (東京).

⑨ 松崎 広和, 高塚 麻実, 玄 美燕, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットの学習障害に対するオイゲノールの効果. 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18~20 日 (名古屋).

⑩ 浅野 昂志, 松崎 広和, 小井土 愛里, 松井 駿, 玄 美燕, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットの嚥下機能障害に対するオイゲノールの効果, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18~20 日 (名古屋).

⑪ 松崎 広和, 山本 知佳, 玉井 伶奈, 日比野 康英, 岡崎 真理: ラットの反復拘束ストレス負荷による睡眠障害に対するフェルラ酸の効果. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25~28 日 (神戸).

⑫ 浅野 昂志, 松崎 広和, 小井土 愛里, 松井 駿, 玄 美燕, 日比野 康英, 岡崎 真理: 慢性脳低灌流ラットの嚥下反射機能障害に対する eugenol の効果. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25~28 日 (神戸).

⑬ 玄 美燕, 加藤 洋介, 荒野 舞, 木下 智史, 高山 淳, 坂本 武史, 日比野 康英, 松崎 広和, 岡崎 真理. PC12 細胞における新規フェルラ酸誘導体 FAD024 の酸化ストレス障害メカニズムの検討. Cytoprotective mechanism of a new ferulic acid derivative FAD024 against oxidative stress injury in PC12 cells. 第 136 回年会 日本薬学会, 2016 年 3 月 26 日~29 日 横浜.

⑭ 浅野 昂志, 松崎 広和, 玄 美燕, 林 浩輔, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理. 慢性脳低灌流ラットにおける新規フェルラ酸誘導体 FAD012 の嚥下反射機能改善メカニズムの検討. Ameliorating effects of a novel ferulic acid derivative against swallowing dysfunction in a rat chronic cerebral hypoperfusion model. 第 136 回年会 日本薬学会, 2016 年 3 月 26 日~29 日 横浜.

⑮ 玄 美燕, 加藤 洋介, 荒野 舞, 木下 智史, 高山 淳, 坂本 武史, 日比野 康英, 松崎 広和, 岡崎 真理: PC12 細胞における新規フェルラ酸誘導体 FAD024 の酸化ストレス障害抑制メカニズムの検討. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26~29 日 横浜.

⑯ 加藤 洋介, 松田 千代子, 辻村 和博, 玄 美燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 坂本 武史, 広澤 成美, 坂本 安: 新規フェルラ酸誘導体の MALDI マトリックスとしての評価とプロテオーム解析への応用. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26~29 日 横浜.

⑰ 松崎 広和, 田村 衣里, 玄 美燕, 林 浩輔, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理: 新規フェルラ酸誘導体 FAD012 の反復拘束ストレス負荷ラットにおける睡眠障害軽減効果. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9~11 日 横浜.

⑱ 浅野 昂志, 松崎 広和, 玄 美燕, 林 浩輔, 坂本 武史, 日比野 康英, 岡崎 真理: 新規フェルラ酸誘導体 FAD012 は慢性脳低灌流ラットの脳血流を増加し嚥下反射機能低下を改善する. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9~11 日 横浜.

⑲ 加藤 洋介, 福田 護, 松田 千代子, 玄 美

燕, 高山 淳, 岡崎 真理, 坂本 武史, 広澤  
成美, 坂本 安: 新規フェルラ酸誘導体の  
MALDI マトリックスへの応用と評価. 第 59  
回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12  
日 千葉.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡崎 真理 (OKAZAKI MARI)  
城西大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 50272901

### (2) 研究分担者

松崎 広和 (MATSUZAKI HIROKAZU)  
城西大学・薬学部・助手  
研究者番号: 80582238

坂本 武史 (TAKESHI SAKAMOTO)  
城西大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20187040

玄 美燕 (Meiyan Xuan)  
城西大学・薬学部・助手  
研究者番号: 50711751

日比野 康英 (HIBINO YASUhide)  
城西大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10189805

岩田 直洋 (IWATA NAOHIRO)  
城西大学・薬学部・助手  
研究者番号: 50552759