

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590086

研究課題名 (和文) フラボノイドの記憶増強作用

研究課題名 (英文) Memory-enhancing effects of flavonoids

研究代表者

阿部 和穂 (ABE KAZUHO)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：60202660

研究成果の概要 (和文) : 高齢化社会を迎え、認知症に対する対策が迫られている。本研究では、認知症の記憶障害を改善する新薬を創出するために、フラボノイドの薬効研究を行い、フラボノイドの一種フィセチンが cAMP を介さず ERK を活性化し海馬のシナプス可塑性の促進ならびに記憶向上作用を示すことを見出した。またフラボノイドの構造活性研究から、フィセチンよりも高い効力で海馬シナプス可塑性を促進する新規化合物を見出すことに成功した。

研究成果の概要 (英文) : To find a new therapy for treatment of memory impairment in patients with senile dementia, this study investigated mechanisms underlying the memory-enhancing effect of fisetin, a flavonoid, and found that fisetin promoted hippocampal synaptic plasticity by activating ERK signal in a cAMP-independent manner. In addition, a structure-activity study provided a new compound that promotes hippocampal synaptic plasticity with higher potency than fisetin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：フラボノイド、フィセチン、海馬、長期増強、MAP キナーゼ、ERK、記憶、認知症

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩に伴い多くの疾患が克服されてきた一方で、高齢化により発症する疾患が社会問題となってきた。とくに認知症の患者数は増加の一途をたどっているが、いまだに

確実な治療法はなく、治療薬の開発は急務の課題である。

認知症の中核症状は記憶障害である。記憶のメカニズムは十分解明されていないが、脳内で海馬とよばれる部位が記憶形成に関与

することが明らかになっており、認知症では海馬の神経細胞が脱落するために記憶障害が生じると考えられている。海馬はとくに思い出などの出来事記憶の形成に関与しているため、海馬が機能しなくなると、新たに体験した出来事が覚えられないという前向き健忘が起こる。こうした認知症の記憶障害を改善する治療薬を開発するためには、海馬における記憶形成のメカニズムを解明するとともに、その機能を賦活させる方法を見出さなければならない。

海馬における記憶形成の分子メカニズムに関する研究は近年めざましく進展し、記憶形成の基本過程と考えられる長期増強現象 (long-term potentiation; LTP) が見出されている。海馬神経系のシナプス前線維に高頻度刺激を与えると、興奮性シナプス伝達効率が増大し、しかもその状態が数時間以上持続する現象である。特定の情報入力に対して LTP が生じると、雑多な情報の中からその特定の情報が選択・強化され、短期記憶が長期記憶へと固定されていくと考えられる。海馬 LTP は、NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化とそれに続くシナプス後膜細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が引き金となり、さらに Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) や extracellular signal-regulated kinase (ERK)、cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) の活性化によって生じることが明らかになっている。したがって、海馬 LTP の誘導に関わるこれらのシグナル分子を賦活させる薬物が見つければ、認知症患者の記憶障害を改善することが可能になると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、認知症の治療に有用な新規化合物を見出すことである。

前項で述べた背景に基づいて、海馬の興奮性シナプスにおける NMDA 受容体の活性化やシナプス後細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を促すような薬物が開発されているが、過剰な NMDA 受容体の活性化は神経細胞に対して興奮毒性を生じることが知られており、認知症の治療薬とはなり得ない。そこで次に考えられるのは、海馬 LTP の形成に関わる CaMKII、ERK、CREB などの細胞内シグナル分子に直接作用して賦活する薬物であるが、そのような薬物は従来まったくなかった。

本研究の代表者である阿部和穂は、米国ソーグ研究所との共同研究により、天然に存在する多数の生理活性化合物の中から、海馬の CaMKII、ERK または CREB を活性化し海馬 LTP を促進する可能性のあるものを探索した。その結果、植物に含まれるフラボノイドの一種、フィセチンに薬効を見出した。フィセチンは ERK と CREB を活性化し海馬 LTP の形成を促進

した。またマウスを用いた物体再記憶テストでは、通常のマウスが前日に見た物体を 24 時間後に忘れているのに対して、フィセチンを経口投与されたマウスはきちんと覚えているという成績が得られた。多くのフラボノイドには抗酸化作用があり老化予防に役立つと一般的に言われてきたが、新たに発見されたフィセチンの薬効は、抗酸化作用とは異なる。また、特定の化合物が記憶のメカニズムに直接働きかけて記憶力を増すという例は過去にはほとんどなく、また経口投与で有効な化合物は皆無であった。

本研究では、この新奇なフィセチンの記憶増強作用について詳細な解析を進めるとともに、フィセチン以外のフラボノドからさらに強力な記憶増強作用を有する化合物の探索をめざした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

一部の実験で、常法により継代培養された PC12 細胞を用いた。

また 18 日齢のラット胎児より無菌操作下で海馬を取り出し、酵素処理によって細胞を単離した。ポリリジンでコートした 48 穴ウェルプレートに細胞を播種し、初日だけ 10% ウシ胎児血清を含む培養液中で培養し細胞を器材に接着させた。次いで無血清培地に交換して 2~7 日間細胞を育て、安定した神経細胞培養が得られた時点で実験に供した。

(2) 海馬スライス標本

7~9 週齢の Wistar 系雄性ラットから海馬を摘出し、スライサーを用いて厚さ 400 μ m のスライス標本を作製した。95% O_2 -5% CO_2 を通気し 30°C に温めた生理的塩類溶液 ACSF 中でスライスを維持した。

(3) シグナル伝達の解析

培養細胞または海馬スライス標本に薬物処理を行った後、細胞溶解液を添加して細胞を可溶化し回収した。細胞抽出液中のタンパク質を SDS-PAGE によって分離し、抗リン酸化 ERK 抗体を用いたウェスタン・ブロットを行い、リン酸化 ERK の増加を ERK 活性化の指標として解析した。

cAMP 濃度の変化については、市販の ELISA キットを用いて定量した。

(4) in vitro における LTP の解析

ACSF を灌流したチャンバーにラット海馬スライスを入れ、CA3 錐体細胞から発する Schaffer 側枝に双極性刺激電極をあてて刺激を加え、シナプス伝達の結果生じる場の興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を記録した。安定した fEPSP が記録できたら、弱い高頻度刺激 (100 Hz, 15 pulses) を与え、その後でのシナプス応答の変化を測定した。30 分以上経過してもシナプス応答の増強が持続した場合に LTP が形成されたと判定した。被

検薬物は灌流液中に添加して与えた。

NMDA 受容体を介したシナプス応答を記録する際には、ACSF 中の Mg^{2+} を除き、GABA 受容体チャネル遮断薬の picrotoxin を添加した条件で測定した。

(5) in vivo における LTP の解析

7~9 週齢の Wistar 系雄性ラットにウレタンと α -クロラロースの混合液を腹腔内注射して深麻酔をかけた。脳定位固定装置に固定し、脳地図に従って海馬 CA3 と CA1 に相当する場所に刺激および記録電極を刺入し、場の興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を測定した。LTP の誘導と解析は上述の in vitro 実験と同様に行った。被検薬物は、予め動物の胃内に挿入したカニューレを介して与えた (経口投与)。

4. 研究成果

平成 19 年度では、記憶形成に関わる海馬のシナプス伝達可塑性の指標となる LTP をフィセチンが促進するときに、どのような分子メカニズムが関与するかを検討した。過去の研究から、フィセチンには細胞内情報伝達分子 MAP キナーゼのひとつ ERK の活性化 (リン酸化) を促進する作用があることを見出しているが、どのようにして ERK 活性化を促進するかは不明だった。ひとつの可能性として、cAMP の増加を介して ERK 活性化をもたらすことが考えられたので、ラット海馬スライスにフィセチンを適用して cAMP の変化を生化学的に検討したところ、フィセチンは単独では cAMP 濃度に影響を与えず、アデニル酸シクラーゼ活性化薬フォルスコリンによる cAMP 濃度上昇にも影響を及ぼさなかった。第二の可能性として、NMDA 受容体の機能増強による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介することが考えられたので、ラット海馬スライス標本を用いた電気生理学的検討を行い、NMDA 受容体を介したシナプス伝達に対する効果を検討したところ、フィセチンは NMDA 受容体機能に何ら影響を及ぼさないことが明らかとなった。異常の結果から、フィセチンは cAMP や NMDA 受容体を介さない形で ERK 活性化をもたらすと結論された。

以前の研究成果として、海馬スライスを用いた実験でフィセチンが海馬 LTP の形成を促進し、行動実験 (物体再認試験) で経口投与したフィセチンが記憶形成を促進することが示されたが、これら in vitro と in vivo のデータの関連性は必ずしも明確ではなかった。その橋渡しをするため、平成 20 年度の前半では、経口投与したフィセチンが in vivo で海馬の LTP 形成に及ぼす影響を検討した。麻酔したラットを脳定位固定装置に固定して海馬歯状回の興奮性シナプス電位を記録し、5~25 mg/kg のフィセチンを経口投与

したところ、通常のシナプス伝達に変化は認められなかったが、高頻度刺激適用による LTP の誘導が有意に促進された。有効用量は 10~25 mg/kg であり、物体再認試験における記憶促進に有効だった経口投与用量と一致していたことから、フィセチンによる海馬 LTP の促進が記憶向上につながるという考えが支持された。また、ERK 活性化の阻害薬 U0126 を脳室内投与したところ、経口投与されたフィセチンの LTP 促進効果は消失した。この結果から、フィセチンは消化管から吸収されて脳に移行し海馬の ERK 活性化を介して記憶増強作用を発揮すると考えられた。

さらに、同様にして他のフラボノイドについて検討したところ、ケルセチン (5~25 mg/kg) の経口投与では海馬 LTP に何ら影響がなかったため、LTP 促進作用はフィセチンに特異な作用と考えられた。

平成 20 年度後半~平成 21 年度前半においては、フィセチンよりも高活性の記憶増強化合物を見出すために、培養細胞にいくつかの入手可能なフィセチン類縁化合物を与え、ERK 活性化を指標にした構造活性研究を行った。具体的には、培養 PC12 細胞および培養ラット海馬神経細胞に数種のフィセチン類縁化合物 (0.1~10 μ M) を与え、30 分~24 時間後に細胞を回収してウェスタン・ブロット法により ERK リン酸化レベルを調べた。その結果、フィセチンのフラボン構造 A 環 7 位の水酸基を欠いた化合物 (3,3',4'-trihydroxyflavone) とフィセチンよりも B 環に水酸基が多い化合物 (3,3',4',5'-tetrahydroxyflavone) がフィセチンよりも強力に ERK リン酸化を促進することが明らかとなった。

平成 21 年度後半においては、新たに見出された高活性フィセチン誘導体 3,3',4',5'-tetrahydroxyflavone の海馬 LTP 誘導に対する効果を検討した。海馬スライス標本に同化合物を与えたところ、通常のシナプス伝達に影響はなかったが、高頻度刺激適用による LTP 誘導が促進された。その有効濃度は 0.1 μ M であり、フィセチンよりも効力が高かった。

以上の研究より、フィセチンの記憶増強作用の一部が明らかになり、構造活性研究からフィセチンよりも高活性のフラボノイドを見出すことができた。フィセチンの ERK 活性化作用ならびに記憶増強作用に A 環 7 位の水酸基は必要なく、合成化学的には A 環 7 位に置換基を導入することは比較的容易であることから、今後は 3,3',4',5'-tetrahydroxyflavone の 7 位に置換基を導入した化合物を検討して、さらに高活性の記憶増強薬の創出につなげたいと考えている。

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1件)

Akaishi T, Morimoto T, Shibao M, Watanabe S, Sakai-Kato K, Utsunomiya-Tate N & Abe K, Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid beta protein. Neuroscience Letters. 査読有, 444: 2008, 1419-1424.

〔学会発表〕(計2件)

阿部和穂、フィセチンの経口投与は麻醉ラットの海馬CA1領域における長期増強を特異的に促進する、第82回日本薬理学会年会、平成21年3月17日、パシフィコ横浜(横浜)

赤石樹泰、フィセチンはアミロイドβ蛋白凝集阻害作用と海馬長期増強をあわせもつ、第116回日本薬理学会関東部会、平成19年6月2日、日本大学カザルスホール(東京都千代田区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 和穂 (ABE KAZUHO)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：60202660

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし