

平成21年 6月 26日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590154
 研究課題名（和文） 発想の転換から生まれた即効性、安全性の高い抗うつ薬開発へのアプローチ
 研究課題名（英文） The approach to a development of rapid-acting and high-safety antidepressants changed in thinking
 研究代表者
 櫻井 栄一（SAKURAI EIICHI）
 青森大学・薬学部・教授
 研究者番号：80167428

研究成果の概要：血液脳関門は従来から知られているトランスポーターによる脳への輸送系を制御するだけでなく、シトクローム P-450 (CYP) やフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) などの薬物代謝酵素による酵素的制御機構も備えていることがわかった。また、この血液脳関門における薬物代謝機構は肝細胞に匹敵する予想をはるかに超えた能力が備わっている可能性が強く示唆された。さらに、抗うつ薬の連続投与により血液脳関門に存在する薬物代謝酵素が誘導されることから、抗うつ薬の血液脳関門での薬物代謝の回避が、抗うつ薬の遅効性の改善につながり、うつ病に対する新たな薬物療法を生み出す可能性が期待できるものとする。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、血液脳関門、薬物代謝酵素、抗うつ薬、即効性

1. 研究開始当初の背景

ストレス社会そして高齢化社会の到来により、うつ病患者の数は年々増加してきており、現代日本の社会問題となっている。うつ病治療においては、早期に改善の必要なケースが多い。しかし、古くから抗うつ薬の遅効性が指摘され、抗うつ薬の即効性が要求されている。

2. 研究の目的

研究代表者は、薬物動態学観点から、遅効性の原因となりうる血液脳関門 (BBB) での薬物代謝能力に着目し、中枢への効率的な薬物

デリバリー戦略を構築することを目的とした。この研究成果は、高齢化社会の到来に伴う抗痴呆薬あるいはパーキンソン病治療薬などの開発にも貢献できるものと考えた。

3. 研究の方法

(1) イミプラミンおよびその代謝物 (イミプラミンの 2-水酸化体、デシプラミン、デシプラミン 2-水酸化体、イミプラミン N-酸化体) の HPLC による一斉分析法を開発した。

(2) 血液脳関門を構成するラット脳毛細血管内皮細胞の初代培養細胞 (BMECs) をホモジネートし、抗うつ薬であるイミプラミンの

代謝酵素活性を測定した。また、免疫蛍光染色による薬物代謝酵素のタンパク発現とその同定を行った。

(3) 培養液にイミプラミンを添加し、常に薬物に曝された状態で3週間培養する(培地の交換ごとに同じ濃度のイミプラミンを添加)。この細胞を用い、生成されたイミプラミンの代謝物を前述した分析方法を用い一斉分析し、抗うつ薬の繰り返し投与によるラット脳毛細血管内皮細胞に存在する薬物代謝酵素活性への影響を検討した。

(4) 離乳直後のマウスに社会的隔離ストレスを負荷(離乳直後のマウスを一匹ずつ個別のゲージで飼育する)し、うつ病モデル動物を作製した。

4. 研究成果

(1) イミプラミン及びその代謝物の細胞からの抽出と抽出された代謝物の HPLC による一斉分析法を開発することができた。図1はラット脳毛細血管内皮細胞の初代培養細胞をホモジネートし、イミプラミン 300 μ M を添加後に脳毛細血管内皮細胞で生成された代謝物のクロマトグラフを示したものである。イミプラミンのデシプラミン、イミプラミン 2-水酸化体、N-オキシド体への代謝固有クリアランスはそれぞれ、0.043, 0.030, 0.028 mL/min/mg protein であった。

また、ラット肝細胞におけるイミプラミンの代謝固有クリアランスはほぼ同じ値をとり、血液脳関門における薬物代謝能力が、肝臓に匹敵することがわかった。

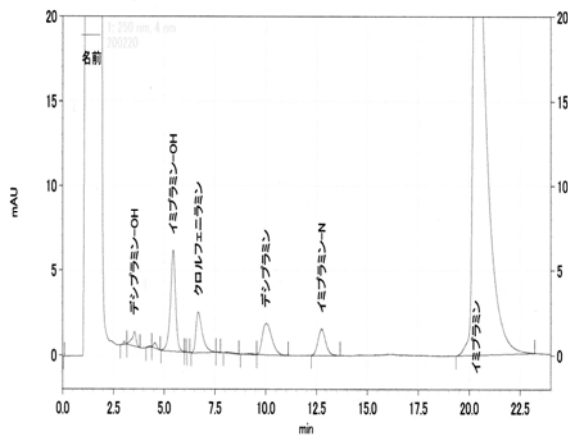


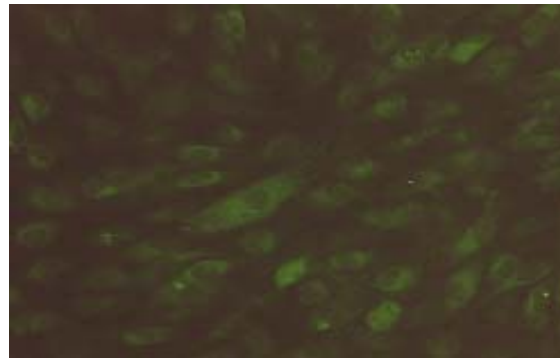
図1 反応後のイミプラミン代謝物の一斉分離と定量化

(2) 免疫蛍光染色による薬物代謝酵素のタンパク発現とその同定

シトクローム P-450 (CYP) の各分子種 (CYP2C11, CYP3A2) の抗体を用い、免疫蛍光染色法により、脳毛細血管内皮細胞に

CYP の 2C11 と 3A2 の酵素タンパク発現が観察された (図2)。

CYP2C11



CYP3A2

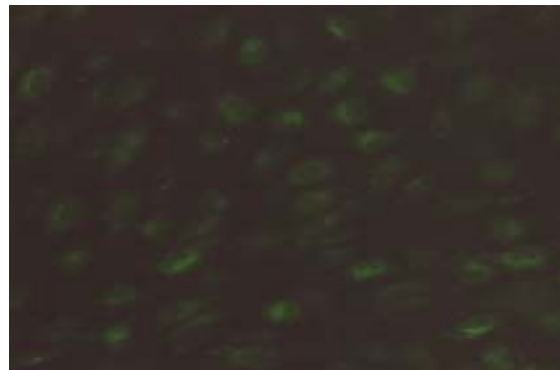


図2 ラット脳毛細血管内皮細胞の各 CYP の免疫蛍光染色

また、予備実験の段階であるが、ラット脳毛細血管内皮細胞に肝細胞には存在しない CYP2C13 を確認している。したがって、血液脳関門では肝臓とは別の CYP によって薬物の代謝が行われていることも予想される。現在、その確認を継続している。

さらにこれも、予備実験ではあるが、モノアミン酸化酵素 (MAO) に関して本来の基質であるドーパミンの血液脳関門での代謝能力が高いことがわかった。イミプラミンは第3級アミンであるが、われわれの実験から N-脱メチルを受け、第2級アミンであるデシプラミンに代謝されることから、デシプラミンがさらに酸化を受け第1級アミンになり、MAO により酸化的脱アミノ化をうける可能性が十分考えられる。そこで、イミプラミンの酸化的脱アミノ化体を合成中であり、その合成に成功しているが収率がかなり悪く、われわれの *in vitro* 代謝実験への供給には未だ至っていない。現在、合成法の改良を行い、血液脳関門における新しい代謝経路を模索するつもりである。

(3) 酵素反応液中に CYP の各抗体を添加し、イミプラミンの N-脱メチル化および N-酸化に対する抑制作用を検討した。免疫蛍光

染色で確認された (図 2) CYP2C11 および CYP3A2 の抗体の添加によって、N-脱メチル化反応は、それぞれ濃度依存的に抑制された (表 1)。

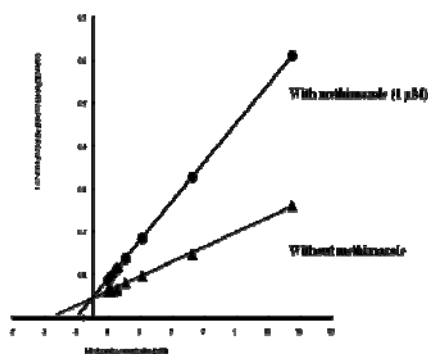
表 1 Immunoinhibition of the N-demethylation and N-oxidation of imipramine by rat BBB

Antibody	Amount (μL)	Imipramine (% of control)	
		N-demethylation	N-oxidation
Control	1	100	100
	5	100	100
	10	100	100
CYP1A1	1	100	100
	5	100	100
	10	100	100
CYP2B1	1	100	100
	5	95	100
	10	95	100
CYP2C11	1	85	100
	5	59	100
	10	49	100
CYP3A2	1	80	100
	5	72	100
	10	50	100

Values for the antibody-treated group are expressed as a percentage of those for the control group.

また、各 CYP 抗体を添加しても、いずれも、N-酸化に対する抑制効果はみられなかった。しかし、N-酸化を特異的に抑制するメチマゾールを添加したところ、競合的にイミプラミンの N-酸化反応が抑制された (図 3)。さらに、酵素反応液を pH 8.4 にしたところ、pH 7.4 に比べ、イミプラミンの N-酸化体への代謝固有クリアランスは大きくなり、この N-酸化は FMO により触媒されていることがわかった。

Lineweaver-Burk plots of N-oxidation of imipramine in the presence or absence of methimazole by BMECs



Each point represents the mean of three determinations.

図 3 メチマゾールによる N-酸化の抑制作用

(4) イミプラミンで常に暴露された状態で 3 週間培養した細胞を用いイミプラミンの代謝反応を見た。その結果、N-酸化体への代謝固有クリアランスは 0.042 mL/min/mg protein となり、FMO に対して約 1.5 倍の酵

素誘導がかかった。また、CYP による代謝固有クリアランスに有意差はないものの増加しており、N-脱メチル化および 2-位の水酸化反応を誘導することが観察された。

(5) 幼若期の社会的隔離ストレス負荷により野生型マウス (C57BL/6) では図 4 のように行動量が減少した。また、記憶・学習能も同様に、低下することが行動薬理学的実験から明らかになった (図 5)。なお、G は集団飼育、I は隔離飼育を、H1 はヒスタミン H1 受容体を、KO は受容体欠損を表す。

また、このようなマウスへの覚せい剤投与は、さらに記憶・学習能を低下させる結果を引き起こした。

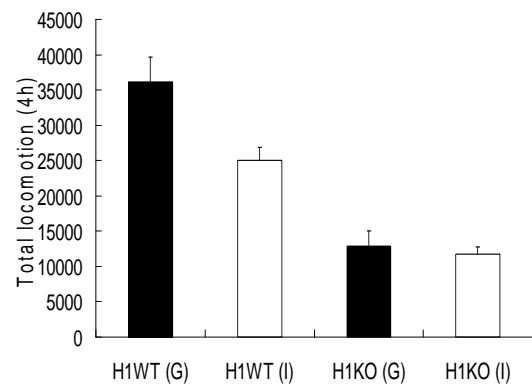


図 4 社会的隔離ストレスの行動に及ぼす影響

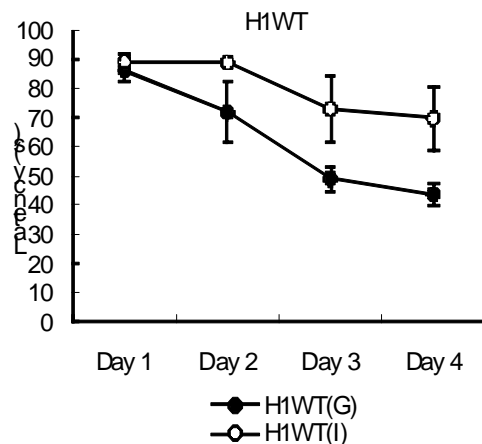


図 5 社会的隔離ストレスの記憶・学習に及ぼす影響

このように、乳直後のマウスに社会的隔離ストレスを負荷 (離乳直後のマウスを一匹ずつ個別のゲージで飼育する) することによりうつ病モデルをマウスにて作製することに成功した。しかし、研究分担者によるこのモデル作製はマウスにて作製されていることか

ら、現在、ラットへのシフトを検討中である。ラットのモデル作製が出来次第、脳毛細血管内皮細胞の培養に着手し、うつ病における血液脳関門の機能変化を検討する予定である。

結語

血液脳関門に P450 と FMO が存在することを見出した。同時に、血液脳関門には予想をはるかに超えた薬物代謝機構が備わっている可能性がかなり強いことがわかった。

それ故に、抗うつ薬の血液脳関門での薬物代謝の回避が、抗うつ薬の即効性、安全性に繋がる新たな薬物療法を生み出す可能性が期待できると考えている。本研究をさらに発展させる必要があると考える。

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 3 件)

- 1) H. Dai, K. Kaneto, H. Kato, S. Fujii, Y. Jing, E. Sakurai, M. Kato, N. Okamura, A. Kuramasu, K. Yanai. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. *Neuroscience Res.*, 57: 306-13, 2007. 査読有
- 2) K. Yanai, H. Dai, E. Sakurai, T. Watanabe. The roles of histamine H(1) receptors on cognition. *Inflamm. Res.*, 14: 1-2, 2008. 査読有
- 3) E. Sakurai, Eiko Sakurai, K. Yanai, T. Watanabe. Uptake of L-histidine and histamine biosynthesis at the blood-brain barrier. *Inflamm. Res.*, 58: 34-5, 2009. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- 1) E. Sakurai. Function of vascular endothelial cells as a metabolic barrier against drug: Metabolism of imipramine in rat aortic endothelial cells. 8th International ISSX Meeting. Sendai, Japan 10th October 2007.
- 2) E. Sakurai, A. Kuramasu, N. Okamura, K. Yanai. Effect of histamine receptors gene knockout on behavioral changes in mice. 第 81 回日本薬理学会年会 (横浜)、2008 年 3 月。
- 3) E. Sakurai, Eiko Sakurai, K. Yanai, T. Watanabe. Uptake of L-histidine and histamine biosynthesis at the blood-brain barrier. The 37th Meeting of the European Histamine biosynthesis at the blood-brain barrier. Stockholm, Sweden. 10th May 2008.

[図書] (計 3 件)

- 1) 櫻井栄一 (他 9 名)、廣川書店、「NEW パワーブック 物理薬剤学・製剤学」金尾義治編、頁 345-370 (2007)。
- 2) 櫻井栄一 (他 34 名)、南江堂、「標準薬剤学、改訂第 2 版」、渡辺善照編、頁 307-342 (2007)。
- 3) 櫻井栄一 (他 10 名)、廣川書店、「対話と演習で学ぶ 薬物速度論」、伊賀勝美編、頁 71-87, 161-178 (2008)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 栄一 (SAKURAI EIICHI)

青森大学・薬学部・教授

研究者番号：80167428

(2) 研究分担者

櫻井 映子 (SAKURAI EIKO) (平成 19 年度)

東北大学・医学部・助教

研究者番号：90153949

(3) 連携研究者

櫻井 映子 (SAKURAI EIKO) (平成 20 年度)

東北大学・医学部・准教授

研究者番号：90153949