

機関番号：31305

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611014

研究課題名 (和文) 抗精神病作用を示すヒルスチンとその生体内代謝物の活性発現メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Study on antipsychotic activity of hirsutine and the metabolites

研究代表者

中澤 孝浩 (NAKAZAWA TAKAHIRO)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60296019

研究成果の概要 (和文)：釣藤鈎のアルカロイド成分・ヒルスチンは、マウスのアポモルヒネ誘発異常行動及び MK-801 による自発運動量の増加作用を減少させた。また、ヒルスチンはシグマ-1、D₂、5-HT_{2A} 受容体への結合親和性を示した。しかし、シグマ-2、D₁、NMDA、GABA、ベンゾジアゼピン受容体に対しては結合親和性を示さなかった。これらの結果から、ヒルスチンの抗精神病活性はシグマ-1、D₂、5-HT_{2A} 受容体を介して発現していると考えられた。

研究成果の概要 (英文)： Hirsutine, a major alkaloid in *Uncaria rhynchophylla*, was attenuated the apomorphine-induced climbing behavior and the MK-801-induced hyper-locomotion in mice. Hirsutine showed affinities to the σ_1 , D₂ and 5-HT_{2A} receptors, but not to the σ_2 , D₁, NMDA, GABA, and benzodiazepine receptors. The results suggest that the antipsychotic activity of hirsutine is mainly mediated through the σ_1 , D₂, and 5-HT_{2A} receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	0	0	0
2012年度	0	0	0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー
キーワード：

1. 研究開始当初の背景

現在臨床で用いられている抗精神病薬は、定型及び非定型の二つに分けることができる。定型抗精神病薬は幻覚、幻聴といった陽性症状には奏効するけれども、錐体外路障害を引き起こしやすいという欠点がある。また、非定型型抗精神病薬は錐体外路障害を引き起こしにくいとされるが、体重増加、血糖値上昇

などの新たな副作用が問題となっている。さらに、どちらの薬物を用いても自閉や感情鈍麻といった陰性症状に対する奏効性は十分ではない。この様な中、漢方薬の抑肝散が治療薬抵抗性の統合失調症、及び認知症の問題行動の治療に有効であることが報告された。我々は、抑肝散の主薬である釣藤鈎のアルカ

ロイド成分・ヒルスチンがマウスにおいて抗精神病様作用を示すことを明らかにした。また、ヒルスチンはマウスの自発運動量に対して影響を与えなかった。これらの結果から、ヒルスチンは抑肝散治療において、錐体外路障害を引き起こしにくいタイプの抗精神病薬として機能しているのではないかと考えるに至った。一方でヒルスチンは生体内において、11-ヒドロキシヒルスチン及びそのグルクロン酸抱合体へと代謝されることが解っていた。従って、ヒルスチンあるいはその代謝物の活性発現メカニズムを明らかにすることで、抑肝散が臨床で示した抗精神病効果を化学的に解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抑肝散の釣藤鈎由来アルカロイド成分・ヒルスチンの抗精神病作用発現メカニズムを明らかにすることで抑肝散が臨床で示す抗精神病効果を化学的に解明することである。

3. 研究の方法

ヒルスチン及びその生体内代謝物（以下ヒルスチン類）の各種脳内神経伝達物質受容体に対する結合能を検討するため以下の実験を行った。ラット及びモルモットの脳及び肝臓を採取、遠心分離機を用い各種受容体膜画分の精製を行った。その受容体膜画分と 10^{-12} ~ 10^{-3} Mに調整したヒルスチン及び各種受容体に対する特異的に結合する $[^3\text{H}]$ リガンドを一定時間反応させた後、受容体に結合している $[^3\text{H}]$ リガンドを液体シンチレーションカウンターで測定することで、 $[^3\text{H}]$ リガンドと受容体結合に対するヒルスチン類の阻害活性を算出した。阻害活性がみられた受容体に対しては、ヒルスチン類の結合能（ K_i 値）を算出した。またヒルスチン類が阻害活性を示した受容体については、ヒルスチンと同様に釣藤鈎由来

の主アルカロイド成分であるヒルスチン及びガイソシジンメチルエステルについても結合能を算出した。

(2) 行動薬理実験

①アポモルヒネ誘発マウス異常行動に対する抑制効果

ヒルスチンの生体内代謝物である11-ヒドロキシヒルスチンの抗精神病様作用を検討するため、以下の実験を行った。マウスの脳内に11-ヒドロキシヒルスチンを（2.0, 20, 75 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$, i.c.v.）投与、30分後アポモルヒネ（2.5 mg/kg, s.c.）を投与し、誘発されるマウスのステレンスケージ内でのよじ登り行動をスコア化して20分間測定した。

②ヒドロキシ-L-トリプトファン及びクロロギリン誘発 head twitch に対する抑制作用

ヒルスチンの5-HT_{2A}受容体に対する阻害効果を検討するため、以下の実験を行った。マウスにクロロギリン（1.0 mg/kg, i.p.）投与、その30分後にヒルスチン（30 mg/kg, i.p.）投与、さらにその30分後に5-ヒドロキシ-L-トリプトファン（75 mg/kg, i.p.）を投与することで誘発されるマウスのhead twitch反応回数について、10分間隔で90分間測定した。

③MK-801及びメマンチン誘発マウス自発運動量の増加に対する抑制効果

ヒルスチンのシグマ-1受容体阻害作用を確認するため以下の実験を行った。マウスにヒルスチン（30 mg/kg, i.p.）投与、30分後にメマンチン（25 mg/kg, i.p.）またはMK-801（0.5 mg/kg, i.p.）を投与、そのマウスをANIMEX（室町機械）装置に乗せて、自発運動量を2時間測定した。

(3)ヒルスチン投与後のマウス脳内ヒルスチン類の定量

末梢から投与したヒルスチンの脳内への移行性を確認するため、以下の実験を行った。マウスにヒルスチン投与、5分、10分、20分

後にそれぞれ断頭、脳を採取後、メタノールで抽出、その抽出液を ECD-HPLC を用いて、抽出溶液中のヒルスチンを定量した。

4. 研究成果

(1) ヒルスチン類のドパミン受容体に対する作用

ドパミン D_2 受容体のアゴニストであるアポモルヒネは脳内の D_2 受容体を活性化する。マウスにおいてアポモルヒネによる D_2 受容体活性化作用は、異常行動の発現及び自発運動量の増加を引き起こす。定型抗精神病薬の様な D_2 受容体のアンタゴニストはこれらの効果を抑制する。そこで、ヒルスチン及びその生体内代謝物 11-ヒドロキシヒルスチン及び 11-グルクロニルヒルスチンの D_2 アンタゴニスト作用を検討するため、ラットの線条体膜画分を用いて [^3H] スピペロンとの受容体結合置換実験を行った。ヒルスチンは D_2 受容体に結合親和性を示した。その親和性は K_i 値で $4.36 \times 10^5 \text{ nM}$ であった。11-ヒドロキシヒルスチン及び 11-グルクロニルヒルスチンは D_2 受容体に対して結合親和性を示さなかった。またヒルスチン類はいずれも D_1 受容体に対しては親和性を示さなかった。ヒルスチンと同様、釣藤鈎の主アルカロイド成分であるヒルスチン ($3.19 \times 10^5 \text{ nM}$) 及びガイソシジンメチルエステル ($1.54 \times 10^4 \text{ nM}$) も D_2 受容体に対して親和性を示すことが確認できた。しかし、これらの D_2 受容体に対する K_i 値は対照薬として用いた定型抗精神病薬のハロペリドール ($5.28 \times 10 \text{ nM}$) に比べ約 10000 倍大きかった。ハロペリドールがアポモルヒネ誘発異常行動を抑制する濃度は、評価方法によっても異なるが、単回の腹腔内投与では $0.0125 - 0.23 \text{ mg/kg}$ である。我々の実験では 0.125 mg/kg の容量で異常行動抑制効果を確認した。これに対してヒルスチンが

異常行動抑制効果を示す容量は 30 mg/kg である。この有効容量の違いが、受容体結合置換実験でのヒルスチンとハロペリドールの親和性の違いとなって反映されている可能性が考えられた。そして、その緩和な親和性がアポモルヒネで誘発される自発運動量の増加に変化を与えることなく、異常行動のみを選択的に抑制するというヒルスチンの薬理作用の特徴に関係していると考えられる。また、ドパミン神経の多くは、中脳から、線条体及び辺縁系と皮質に投射している。アポモルヒネの投与はマウスの脳全体に影響するため、自発運動量に関係する線条体路、異常行動に関係する辺縁系路両方に亢進作用を示す。ハロペリドールが自発運動量及び異常行動の両方を抑制するのに対し、ヒルスチンが異常行動を選択的に抑制することは、両化合物の脳内分布の違いも要因として考えられる。この可能性を検証するには、ヒルスチンの詳細な脳内分布に関する追加実験が必要である。

この様に、ヒルスチンが示す抗精神病様効果には、ヒルスチンの緩和な D_2 受容体阻害効果が関与していると考えられた。

(2) ヒルスチン類のセロトニン受容体に対する結合親和性

非定型抗精神病薬は 5-HT_{2A} 受容体阻害効果を主な薬理作用とする。そこでヒルスチンの 5-HT_{2A} 受容体に対する作用について検証した。ヒルスチン類の 5-HT_{2A} 受容体への結合能を [^3H] ケタンセリンを用いて検討した結果、ヒルスチン ($K_i = 4.61 \times 10^4 \text{ nM}$) 及び 11-ヒドロキシヒルスチン ($K_i = 7.45 \times 10^4 \text{ nM}$) には 5-HT_{2A} 受容体に結合親和性が認められた。また、ヒルスチン ($K_i = 2.31 \times 10^5 \text{ nM}$) 及びガイソシジンメチルエステル ($K_i = 3.18 \times 10^3 \text{ nM}$) にも結合親和性が認められた。しかしいずれの親和性も比較対照薬のケタンセリン ($K_i = 8.40 \times 10^{-3} \text{ nM}$) に比べると非常に

弱かった。また、ヒルスチンの 5-HT_{2A} 受容体への作用について、動物を用いて検証した。セロトニンアゴニストである 5-ヒドロキシ-L-トリプトファン及びクロルギリンをマウスに投与すると、head twitch 反応が誘発される。ポジティブコントロールとして用いた 5-HT_{2A} 受容体阻害薬のケタンセリンは head twitch 行動の回数を有意に抑制した。一方、ヒルスチンは head twitch 行動を減少させる傾向を示したが、有意ではなかった (図 1)。

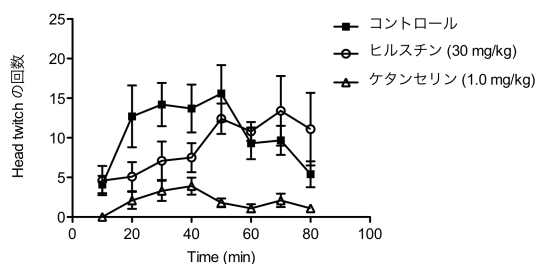


図 1. 5-HTアゴニストにより誘発される Head twitch 反応に対するヒルスチンの効果

ヒルスチンがそれ単独では有意な head twitch 抑制効果を示さない理由として、ヒルスチンの 5-HT_{2A} 受容体への親和性の低さが影響していると考えられる。

以上の結果から、ヒルスチンの 5-HT_{2A} 受容体阻害作用は、直接的に抗精神病様作用関係するのではなく、ヒルスチンの他の作用機序に対して補助的な役割を担っていると推測された。

(3) ヒルスチン類のグルタミン酸受容体に対する作用

グルタミン酸 NMDA 受容体を亢進されると GABA 神経が亢進され、GABA_A 受容体を介してドパミンの遊離が抑えられる。この様に、グルタミン酸受容体アゴニストあるいは GABA_A 受容体アゴニストは、ドパミン神経系の抑制を介して抗精神病作用を示すと考えられている。そこで、グルタミン酸受容体の

放射性リガンド [³H] CGP39653 及び [³H] MK-801 そして GABA 受容体の放射性リガンド [³H] ムシモール 及び [³H] TBOB を用いて、ヒルスチン類のそれら受容体へ結合親和性を調べた。結果、ヒルスチン類はグルタミン酸及び GABA 受容体に対して結合親和性を示さなかった。よって、ヒルスチンの抗精神病様作用はこれら受容体を介した作用ではないことが分かった。

(4) ヒルスチン類のシグマ受容体に対する結合親和性について

リムカゾールを始め、いくつかのシグマ-1 受容体アンタゴニスト (BD1047, BMY 14802, NE-100) はアポモルヒネ誘発異常行動を抑制する。これは、グルタミン酸 NMDA 及びドパミン受容体シグナル伝達がシグマ受容体によって制御されているためである。リムカゾールは、ヒルスチンと同様のインドールアルカロイドである。そのため、ヒルスチンの示す抗精神病様作用 (マウスでの異常行動抑制作用) は、リムカゾールと同じ作用機序を介して起きる抗精神病効果である可能性が考えられた。そこで、ヒルスチン類のシグマ受容体への親和性についての検討を行った。ヒルスチン及び 11-ヒドロキシヒルスチンはシグマ受容体 (-1及び -2) を含む膜画分への [³H] DTG の結合に対して阻害効果を示した。11-グルクロニルヒルスチンは阻害効果を示さなかった。これにより、ヒルスチン及び 11-ヒドロキシヒルスチンがシグマ受容体のリガンドである可能性が示唆された。次に、モルモットの皮質膜画分とシグマ-1 の選択的放射性リガンド [³H] ペンタゾシンを用いて、ヒルスチン及び 11-ヒドロキシヒルスチンのシグマ-1 受容体への結合能について検討した。結果、ヒルスチン及び 11-ヒドロキシヒルスチンはシグマ-1 受容体に結合親和性を示すことが明らかになった。それらの K_i 値はそれ

ぞれ 1.48×10^5 nM 及び 2.84×10^5 nM で、対照薬のリムカゾール ($K_i = 1.14 \times 10^5$ nM) とほぼ同等であった。一方、シグマ-2 受容体が多く分布するラット肝臓膜画分、及び [3 H] DTGを用いた結合置換実験の結果、ヒルスチン及び 11-ヒドロキシヒルスチンはシグマ-2 受容体に対しては結合しないことが明らかになった。この様に、ヒルスチン及び 11-ヒドロキシヒルスチンはシグマ-1 受容体のリガンドであることが明らかになった。ヒルステイン (1.98×10^5 nM) 及びガイソシジンメチルエステル (2.82×10^5 nM) もシグマ-1 受容体に対してヒルスチンとほぼ同等の結合親和性を示したことから、これらのアルカロイドもヒルスチンと同様の薬理効果を示すと考えられた。

シグマ-1 受容体はその細胞内シグナルが完全に明らかになっていない。そのため、ヒルスチンがシグマ-1 受容体に対して、アゴニストまたはアンタゴニストのどちらとして機能しているかについては、行動薬理実験で確認する必要がある。シグマ-1 のアンタゴニストと考えられているリムカゾールはマウス MK-801 誘発自発運動量の亢進を抑制する。

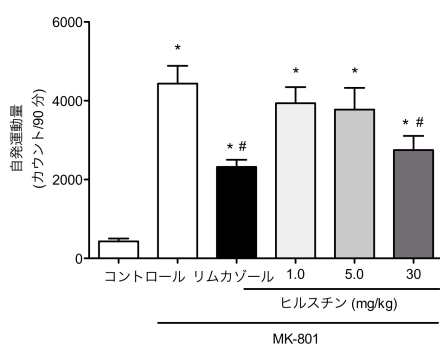


図2. MK-801により誘発されるマウス自発運動量増加に対するヒルスチンの効果

図2に示すように、ヒルスチンもリムカゾールと同様に MK-801 によるマウスの自発運動量の亢進を抑制することが確認できた。よ

って、ヒルスチンはシグマ-1 受容体のアンタゴニストであると考えられた。

(5) ヒルスチンの生体内代謝物 11-ヒドロキシヒルスチンの抗精神病作用について

アポモルヒネを投与することで誘発されるマウスの異常行動における11-ヒドロキシヒルスチンの抑制効果について検証した。11-ヒドロキシヒルスチンは 2.0~75 nmol/mouse の投与量において、異常行動をわずかに減少させる傾向がみられたが、いずれも有意ではなかった。即ちヒルスチン投与後にみられる異常行動の抑制効果には、11-ヒドロキシヒルスチンは関与していない可能性が高いことが明らかになった。

(6) ヒルスチン類の脳内移行性について

末梢から投与したヒルスチンあるいはその生体内代謝物の11-ヒドロキシヒルスチン及び11-グルクロニルヒルスチンが中枢の受容体に結合するには、血液脳関門を通過する必要がある。そこで、ヒルスチンをマウスの腹腔に投与後、脳を採取し、そのホモジネート溶液について分析を行った。ヒルスチン投与後、10 分後の脳ホモジネート溶液からヒルスチンを確認することができた。定量値からその量は投与量の約 0.01 %であることが分かった。しかしながら、代謝物については確認することができなかった(検出限界 0.01 μ g)。ヒルスチンを末梢投与した場合、約 1 % が未変化体として、25 % が代謝物として尿中から排泄される。この定量結果から我々は当初、ヒルスチンが示す薬理作用には代謝物が関与していると予想していた。実際に先の研究で、11-グルクロニルヒルスチンを脳内に20 nmol/mouse 投与するとことで、アポモルヒネ誘発異常行動が抑制されることが明らかになっていた。しかし今回、これら代謝物の脳内移行性は確認できなかった。このことから、末梢投与でみられるヒルスチンの抗精神病作

用には、11-ヒドロキシヒルスチン及び11-グルクロニルヒルスチン両代謝物は関与していないと考えられた。

以上の様に、釣藤鈎のアルカロイドであるヒルスチンがシグマ-1 のアンタゴニストとして機能することを明らかにした。また、同じ釣藤鈎アルカロイドであるヒルスチン及びガイソシジンメチルエステルについてもシグマ-1 のリガンドであることが確認できた。シグマ-1 アンタゴニストは、ドパミン神経系及びグルタミン酸神経系を調節することで抗精神病効果を発現する。よって、抑肝散の統合失調症及び認知症における問題行動に対する有効性は、釣藤鈎由来のモノテルペンインドールアルカロイドのヒルスチン、ヒルスチン及びガイソシジンメチルエステルがシグマ-1 受容体を阻害することにより、ドパミン神経系及びグルタミン酸神経系の異常を回復することによると考えられた。また、これらアルカロイドの緩やかな D_2 及び $5-HT_{2A}$ 受容体への作用が、抑肝散の統合失調症における陽性及び陰性症状の改善効果に補助的に作用しているのではないかと推測される。ヒルスチンの作用機序の模式図を図3に示した。

シグマ-1受容体リガンドは、次世代の抗精神病薬として期待されている。しかしながら、臨床での奏効性の低さや副作用の問題から、未だ医薬品として認可された薬剤はない。ヒルスチンは臨床応用されている漢方薬の成分であることから副作用の発現は低いと考えられる。また、シグマ-1受容体に加え D_2 及び $5-HT_{2A}$ 受容体に対しての結合親和性を示す、新しいタイプの多元受容体標的化抗精神病薬の一種である可能性がある。今後、ヒルスチンの構造を基に①脳内への移行性の向上、②代謝を受けにくくするための11位への置換基の導入、③シグマ-1、 D_2 及び $5-HT_{2A}$ 受容体への結合親和性の向上など薬剤としての最適

化計することで、新規な抗精神病薬開発に繋がることが期待される。

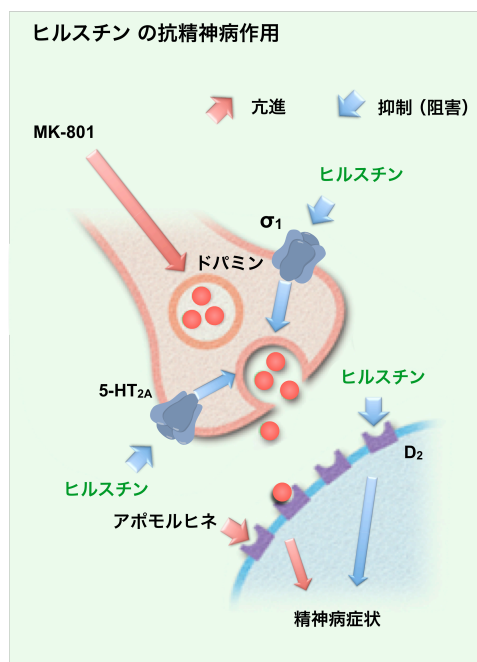


図3. ヒルスチンの抗精神病作用機序

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計3件）

1) 中澤孝浩、釣藤鈎由来インドールアルカロイド Hirsutine の抗精神病様作用の解析、日本薬学会、2011年3月31日、静岡

2) 中澤孝浩、Study on Antipsychotic Activity of Hirsutines、PacifiChem、2010年12月17日、ハワイ

3) 袴田達也ら、釣藤鈎由来インドールアルカロイド Hirsutine 及びその代謝物の抗精神病様作用の解析、2009年3月27日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 孝浩 (NAKAZAWA TAKAHIRO)
東北薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：60296019