

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617036

研究課題名(和文) 気分障害の予防薬及び治療薬としてのフィトケミカルの可能性を評価するための基礎解析

研究課題名(英文) Basic analysis for evaluating the possibility of phytochemicals as a therapeutic and prophylactic agent for mood disorders

研究代表者

豊平 由美子 (TOYOHIRA, Yumiko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90269051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：古くから抗酸化物質として知られているレスベラトロールが抗うつ薬の標的タンパク質であるノルアドレナリントランスポーター(NAT)機能に及ぼす作用と機序を検討した。レスベラトロールはSK-N-SH細胞におけるノルアドレナリン(NA)取込みを、低濃度では促進し、高濃度では抑制した。NA取込みにおけるレスベラトロールの作用は最大取込み能の変化によるもので、みかけ上のMichaelis定数値に変化は見られなかった。NATへのニソキセチン結合実験のScatchard解析において、レスベラトロールは解離定数、最大結合能共に変化させなかった。レスベラトロールはNAT機能を二相性に修飾していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Resveratrol has attracted wide attention because of its antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects. We have previously reported that resveratrol inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis through suppressing ion influx in cultured bovine adrenal medullary cells. In this study, we examined the effect of resveratrol on noradrenaline (NA) transporter, which is also known to be the cellular targets of antidepressants. Resveratrol stimulated NA uptake by SK-N-SH cells at low concentration, it was inhibited NA uptake at high concentration against this. Kinetics analysis of the effect of resveratrol on NA transport in SK-N-SH cells indicated that they decreased the  $V_{max}$  of NA transport with little or no change in  $K_m$ . Scatchard analysis of nisoxetine binding to plasma membranes showed that resveratrol did not affect the  $B_{max}$  and the  $K_d$ . The present findings suggest that resveratrol plays a biphasic role in the regulation of neuronal NA transport.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：フィトケミカル ポリフェノール 気分障害 カテコールアミン ノルアドレナリントランスポーター セロトニントランスポーター チロシン水酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

植物栄養素とも呼ばれるフィトケミカル (phytochemical) は植物由来の化合物を指し、必須栄養素とは異なり、通常の代謝には必要ではなく、摂取しなくとも欠乏症が起こることはないので通常の身体機能維持には必要ではないが、病気の予防や健康維持には重要な役割を演じていると考えられている。フィトケミカルの多くは果物や野菜の色素や辛味成分であり、抗酸化物質として知られている。フィトケミカルの中でもポリフェノールは極めて種類が多く、生理機能として抗酸化作用の他に、生体内酸化ストレス抑制、抗炎症作用、血小板凝集の抑制、癌、心疾患、糖尿病などの疾病に対する抑制、予防作用などが疫学調査や動物実験により次々と報告されている。

ストレスが起因となる不安障害、反応性うつ病、不眠症等の精神疾患は生活習慣病と並んで昨今問題となっている。数々のハーブはうつ病や不安障害等の気分障害に民間療法として用いられている。ハーブには機能成分として多くのポリフェノールが含まれている。例えば、セント・ジョーンズ・ワート (西洋弟切草) の抽出物はうつ病や不安障害に用いられている。セント・ジョーンズ・ワートが機能する機構は正確には不明であるが、抗うつ作用の主要な有効成分はハイパフォリンとヒペリシンだと考えられている。ハイパフォリンは、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、グルタミン酸の取込みを阻害することが示されている。ジャーマンカモミールは抗炎症作用とともに鎮痙作用、鎮静作用があるとされて広く使われている。ジャーマンカモミールのフラボノイドのひとつであるアピゲニン、GABA の活性化による  $Cl^-$  の細胞内流入を濃度依存的に抑制する。他にもパッションフラワーは不安や緊張を和らげ、それらに因る不眠を改善するとされている。ハルマンやハルモールなどのインドールアルカロイド、アピゲニンなどのフラボノイドが効能の要因成分であることが考えられている。ローズマリーエキスはモノアミン系の神経伝達に関与して、抗うつ作用を発現している。レモンガラス精油は抗不眠、抗不安、抗痙攣作用を示すことがマウスの行動実験において示唆されている。

## 2. 研究の目的

フィトケミカルはその機能が再評価され、特定保健用食品として注目を集めているものが多く存在している。古くからハーブにはうつ病や不安障害等の気分障害に民間療法として用いられているものがある。ストレス軽減効果の有る予防薬や気分障害の治療薬としてメディカルハーブ機能成分のフィトケミカルが適用できるかの可能性について評価することを目的としている。メディカルハーブ成分のフィトケミカルについて、カテコールアミン神経系へ作用するものを細胞レベルで同定

し、動物実験系で生体における気分障害への影響を解析し、神経機能への有効性と作用機序を、併せて経口摂取した場合の有効摂取量、危険な作用を及ぼしうる許容限界摂取量についても、多角度から検討していく。

## 3. 研究の方法

初代培養副腎髄質細胞、ヒト神経芽 (SK-N-SH) 細胞やセロトニントランスポーターを発現させた HEK-293 細胞等に対するフィトケミカルの直接作用を検討する。

(1) 培養ウシ副腎髄質細胞はアセチルコリン (ニコチン性アセチルコリン受容体刺激)、56mM High K (電位依存性 Ca チャネル活性化)、Veratridine (電位依存性 Na チャネル活性化) による刺激によって引き起こされるカテコールアミン分泌反応に対する各種フィトケミカルの影響を検討する。カテコールアミンは水酸化アルミニウム法にて分離濃縮し、エチレンジアミン法を用いて蛍光光度計 (Hitachi F-4010: 現有) にて測定する。各刺激時に、細胞内へ流入する  $^{45}Ca^{2+}$ 、 $^{22}Na^{+}$  を液体シンチレーションカウンターにて測定し、イオンチャネルへの影響を検討する。カルシウム蛍光指示薬 (Fura-2 AM) を細胞内に取り込ませて、カルシウム濃度の変化を細胞内  $Ca^{2+}$  濃度画像解析システムを用いて測定する。

(2) カテコールアミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素活性は  $l$ - $^{14}C$ -tyrosine を用いた酵素反応により、カテコールアミン生合成は  $L$ -[U- $^{14}C$ ]tyrosine を基質として、生成される  $^{14}C$ -カテコールアミンを測定する。

(3) ノルアドレナリントランスポーター (NAT) やセロトニントランスポーター (SERT) 機能への影響は [ $^3H$ ]Noradrenaline (NA) や [ $^3H$ ]Serotonin (5-HT) の細胞内への取り込みを測定して検討する。細胞膜上 NAT や SERT の結合部位の解析は [ $^3H$ ]nisoxetine、 [ $^3H$ ]paroxetine を用いた結合実験にて検討する。

## 4. 研究成果

(1) ポリフェノールのカテコールアミン分泌に及ぼす影響

ノミリン、ケンフェロール、ノビレチンはアセチルコリン (ニコチン性アセチルコリン受容体刺激)、56mM High K (電位依存性 Ca チャネル活性化)、ベラトリジン (電位依存性 Na チャネル活性化) による刺激によって引き起こされるカテコールアミン (CA) 分泌と細胞内への  $^{45}Ca^{2+}$ 、 $^{22}Na^{+}$  流入を濃度依存的に抑制した。ケルセチン、シルマリンはアセチルコリン受容体、電位依存性 Na チャネル刺激による CA 分泌と細胞内への  $^{45}Ca^{2+}$ 、 $^{22}Na^{+}$  流入を濃度依存的に抑制した。アピゲニン、リモニン、オーラプテンはアセチルコリン受容体刺激による CA 分泌を抑制した。テアニン、カルノシン酸、ルチンやアントシアニン類は CA 分泌に影響を与えなかった。フラボノイド類の中にカテコールアミン神経系を修飾する可能性のあるポリフェノール (フィトケミカル) が多数あることも明らかにした。

(2)ポリフェノールのチロシン水酸化酵素(TH)に及ぼし影響

カモミールの成分であるアピゲニンは単独では TH のセリン 31, 40 をリン酸化することにより、TH を活性化した。アセチルコリン刺激時にはアピゲニンがニコチン性アセチルコリン受容体を抑制するので、Ca<sup>2+</sup>の流入が抑制されるため、セリン 31 のリン酸化が抑制され、TH 酵素活性の抑制が認められた。

(3)ポリフェノールのトランスポーター機能に及ぼす影響

大豆イソフラボンであるゲニステインは抗うつ薬の標的であるノルアドレナリントランスポーターやセロトニントランスポーターにおける [<sup>3</sup>H]NA, [<sup>3</sup>H]5-HT 取り込み能を低濃度では促進し、高濃度では抑制した。レスベラトロールは SK-N-SH 細胞における [<sup>3</sup>H]NE 取り込みを、低濃度(1 ~ 300 nM)では促進し、高濃度(1 ~ 100 μM)では抑制した(Fig. 1)。

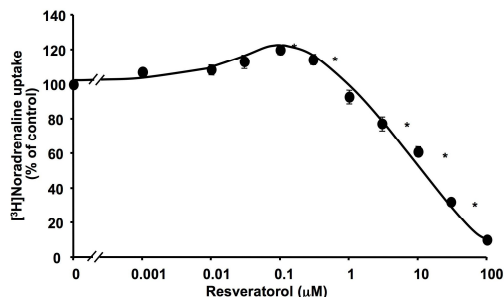


Fig. 1 SK-N-SH細胞への[<sup>3</sup>H]NA取り込み機能に及ぼすレスベラトロールの影響の濃度-反応曲線

イソフラボンのゲニステインや赤ワインポリフェノールであるレスベラトロールが抗うつ薬等の標的タンパク質であるノルアドレナリントランスポーターやセロトニントランスポーターの機能を二相性に調節することを明らかにした。これらは以前の研究でニコチン性アセチルコリン受容体を抑制することを明らかにしているため、中枢神経系機能を修飾する可能性が示唆された。

レスベラトロール(100 nM)による [<sup>3</sup>H]NA の取り込み促進作用は V<sub>max</sub> (最大取り込み能)の増加によるもので、みかけ上の K<sub>m</sub> (Michaelis 定数)値に変化は見られなかった。レスベラトロール(10 μM)による [<sup>3</sup>H]NA の取り込み抑制作用は V<sub>max</sub> (最大取り込み能)の減少によるもので、みかけ上の K<sub>m</sub> (Michaelis 定数)値に変化は見られなかった(Fig. 2)。

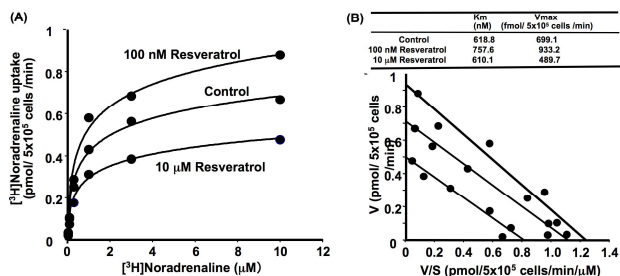


Fig. 2 SK-N-SH細胞への[<sup>3</sup>H]NA取り込み実験における基質濃度-反応速度の飽和曲線(A)とEadie-Hofsteeプロット(B)

SK-N-SH 細胞や細胞膜を用いた細胞膜 NAT への [<sup>3</sup>H]NIX 結合実験での Scatchard 解析において、レスベラトロール存在下で K<sub>d</sub> (解離定数) B<sub>max</sub> (最大結合能)は共に変化しなかった(Fig. 3)。

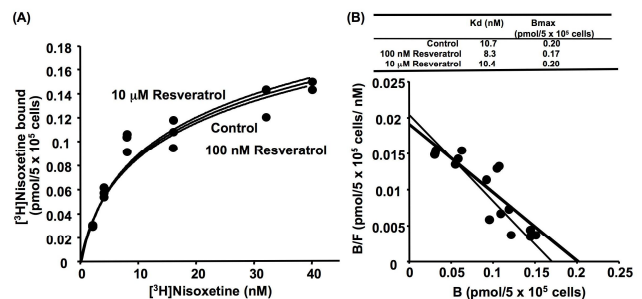


Fig. 3 SK-N-SH細胞への[<sup>3</sup>H]Nisoxetine結合実験における濃度-反応曲線(A)とScatchardプロット(B)

レスベラトロールによる NAT 機能の修飾は一酸化窒素合成酵素の阻害剤では抑制されなかった(Fig. 4)。

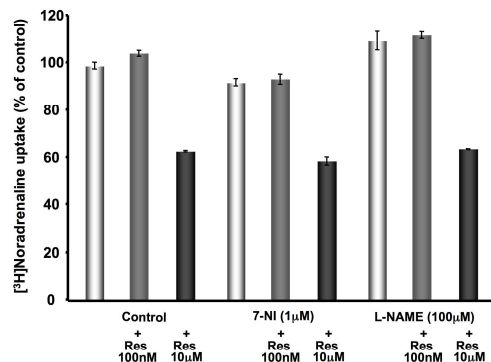


Fig. 4 レスベラトロールによる [<sup>3</sup>H]NA取り込み抑制作用に及ぼす一酸化窒素合成酵素阻害剤の影響

NATの機能調節に関与していることが知られているシグナル伝達系酵素 (PKC, PKA, MAPK, PI3K, CaMKII)の阻害剤でもレスベラトロールによる NAT 機能の抑制を回復させることは出来なかった(Fig. 5)。

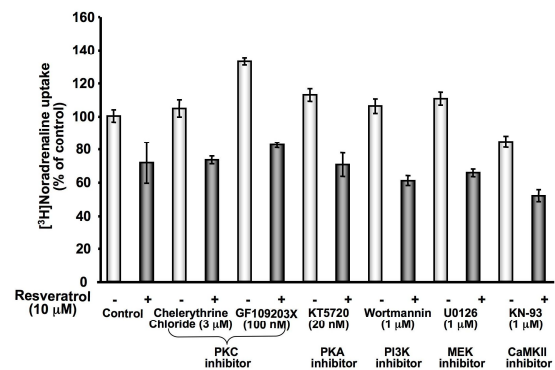


Fig. 5 レスベラトロールによる [<sup>3</sup>H]NA取り込み抑制作用に及ぼすPKC, PKA, PI3K, MAPK, CaMKII阻害剤の影響

以上の検討から、レスベラトロールの NAT 機能修飾の作用機序については NAT への直接作用ではなく、細胞内外の Na<sup>+</sup>濃度勾配、ATP 濃度や顆粒のモノアミントランスポーターへの影響等の可能性が考えられる。

(4)マウス行動実験でのポリフェノールの抗うつ効果の評価

マウスを用いた行動実験（強制水泳試験）ではレスベラトロール、ゲニステイン共に、有意な抗うつ効果を確認することが出来なかった。他の行動実験や投与方法、投与期間等の実験条件を再度検討する必要があると考える。また他の薬剤との併用による影響の検討も必要であると考えられる。今後の検討課題として、継続して研究を実施する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1. Yanagihara N, Zhang H, Toyohira Y, Takahashi K, Ueno S, Tsutsui M, Takahashi K. New insights into the pharmacological potential of plant flavonoids in the catecholamine system. *J Pharmacol Sci* 124:123-128, 2014, (査読有) <http://dx.doi.org/10.1254/jphs>.
2. Inagaki H, Toyohira Y, Takahashi K, Ueno S, Obara G, Kawagoe T, Tsutsui M, Hachisuga T, Yanagihara N: Effects of selective estrogen receptor modulators on plasma membrane estrogen receptors and catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci* 124: 66-75, 2014, (査読有) <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.13155FP>
3. Yoshimura M, Hagimoto M, Matsuura T, Ohkubo J, Ohno M, Maruyama T, Ishikura T, Hashimoto H, Kakuma T, Yoshimatsu H, Terawaki K, Uezono Y, Toyohira Y, Yanagihara N, Ueta Y: Effects of food deprivation on the hypothalamic feeding-regulating peptides gene expressions in serotonin depleted rats. *J Physiol Sci* 64: 97-104, 2014, (査読有) doi: 10.1007/s12576-013-0296-1.
4. Zhang H, Yanagihara N, Toyohira Y, Takahashi K, Inagaki H, Satoh N, Li X, Goa X, Tsutsui M, Takahashi K. Stimulatory effect of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine synthesis through Ser19 and Ser 40 phosphorylation of tyrosine hydroxylase in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 387:15-22, 2014, (査読有) doi: 10.1007/s00210-013-0916-6.
5. Obara G, Toyohira Y, Inagaki H, Takahashi K, Horishita T, Kawasaki T, Ueno S, Tsutsui M, Sata T, Yanagihara N. Pentazocine inhibits norepinephrine transporter function by reducing its surface expression in bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci.* 121:138-47, 2013, (査読有) <http://dx.doi.org/10.1254/jphs>.
6. Satoh N, Toyohira Y, Itoh H, Zhang H, Ueno S, Tsutsui M, Takahashi K, Yanagihara N. Stimulation of norepinephrine transporter function by fasudil, a Rho kinase inhibitor, in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 385:921-31, 2012, (査読有) doi: 10.1007/s00210-012-0773-8.
7. Dong Q, Sugiura T, Toyohira Y, Yoshida Y, Yanagihara N, Karasaki Y. Stimulation of IFN-production by garlic lectin in mouse spleen cells: involvement of IL-12 via activation of p38 MAPK and ERK in macrophages. *Phytomedicine.* 18:309-16, 2011, (査読有) doi: 10.1016/j.phymed.2010.06.008.
8. Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohira Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H, Yanagihara N, Inoue K. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol Pain.* 14:7:50, 2011, (査読有) doi: 10.1186/1744-8069-7-50.
9. Furuno Y, Morishita T, Toyohira Y, Yamada S, Ueno S, Morisada N, Sugita K, Noguchi K, Sakanashi M, Miyata H, Tanimoto A, Sasaguri Y, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N, Tamura M, Tsutsui M. Crucial vasculoprotective role of the whole nitric oxide synthase system in vascular lesion formation in mice: Involvement of bone marrow-derived cells. *Nitric Oxide.* 25:350-9, 2011, (査読有) doi: 10.1016/j.niox.2011.06.007.

[学会発表] (計36件)

1. 豊平由美子、小原剛、稲垣博英、高橋圭太、李曉佳、高橋浩二郎、柳原延章：ノルアドレナリントランスポーターの赤ワインポリフェノールによる機能調節 第87回日本薬理学会年会，仙台国際センター（仙台市），2014年3月16～21日
2. 稲垣博英、豊平由美子、高橋圭太、上野晋、小原剛、筒井正人、高橋浩二郎、李曉佳、蜂須賀徹、柳原延章：培養ウシ副腎髄質細胞における細胞膜エストロゲン受容体への結合とカテコールアミン生合成・分泌に及ぼすタモキシフェン・ラロキシフェンの影響 第87回日本薬理学会年会，仙台国際センター（仙台市），2014年3月16～21日
3. 豊平由美子、小原剛、稲垣博英、高橋圭太、高橋浩二郎、柳原延章：ノルアドレナリントランスポーター機能に対するレスベラトロールの作用 第13回日本NO学会学術集会，沖縄県医師会館（沖縄県南風原町），2013年6月28～29日
4. 豊平由美子、小原剛、稲垣博英、高橋圭太、高橋浩二郎、柳原延章：レスベラトロールによるノルアドレナリントランスポーター機能の

調節 第8回トランスポーター研究会年会,熊本大学薬学部(熊本市),2013年6月15~16日

5. 稲垣博英、豊平由美子、高橋圭太、高橋浩二郎、小原 剛、蜂須賀徹、柳原延章：カテコールアミン生合成・分泌に及ぼすタモキシフェン・ラロキシフェンの影響 第8回トランスポーター研究会年会,熊本大学薬学部(熊本市),2013年6月15~16日
6. 豊平由美子、小原剛、稲垣博英、高橋圭太、高橋 浩二郎、柳原 延章：レスベラトロールはノルアドレナリントランスポーター機能を2相性に調節する 第86回日本薬理学会年会,福岡国際会議場(福岡市),2013年3月21~23日
7. 小原 剛、豊平由美子、上野 晋、佐多竹良、柳原延章：ノルエピネフリントランスポーターに対する非麻薬性鎮痛薬ペンタゾシンの抑制作用 トランスポーター研究会第6回九州部会,福岡県歯科医師会館(福岡市),2012年9月1日
8. 稲垣博英、豊平由美子、小原 剛、蜂須賀徹、柳原延章：タモキシフェン・ラロキシフェンのカテコールアミン分泌に及ぼす影響 トランスポーター研究会第6回九州部会,福岡県歯科医師会館(福岡市),2012年9月1日
9. 佐藤教昭、豊平由美子、上野 晋、筒井正人、柳原延章：ノルエピネフリントランスポーター機能調節への Rho キナーゼの関与 第7回トランスポーター研究会年会,京都大学農学部(京都市),2012年6月9~10日
10. 坂巻路可、豊平由美子、高橋浩二郎、外山健二、柳原延章： $\beta$ -carboline 化合物によるカテコールアミン生合成・分泌の抑制 第7回トランスポーター研究会年会,京都大学農学部(京都市),2012年6月9~10日
11. 豊平由美子、小原 剛、稲垣博英、坂巻路可、高橋浩二、柳原延章：赤ワインポリフェノールのレスベラトロールがノルアドレナリントランスポーター機能に及ぼす影響 第85回日本薬理学会年会,国立京都国際会館(京都市),2012年3月14日

[図書](計0点)

[産業財産権](計0点)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

豊平 由美子 (TOYOHIRA, Yumiko)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90269051

### (2)連携研究者

坂巻 路可 (SAKAMAKI, Ruka)

西南女学院大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：80389486