

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 16 日現在

機関番号： 36301

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2011 ~ 2012

課題番号： 23659699

研究課題名（和文） 柑橘由来成分の脊髄損傷修復への応用

研究課題名（英文） Effect of citrus components on the injured spinal cord

研究代表者

古川 美子 (FURUKAWA YOSHIKO)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号： 20219108

研究成果の概要（和文）：本研究では、損傷脊髄に及ぼす柑橘特有のポリメトキシフラボン、3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF)の作用を検討した。HMFは手術直後から4週間にわたり、毎日1回腹腔内投与した。その結果、BBBスコアで測定した運動機能はわずかに改善するが、組織染色しても脳由来神経栄養因子(BDNF)発現に変化が認められないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF), one of the *Citrus* polymethoxyflavone (PMF), on the injured spinal cord. HMF was *i.p.* injected immediately after the surgery once a day for 4 weeks. We successfully observed that HMF ameliorated the locomotive activity (assessed by BBB score), but BDNF expression (assessed by immunohistochemistry) was not induced by HMF in the spinal cord.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脊髄/脊椎疾患学

キーワード：ヘプタメトキシフラボン、脊髄損傷モデル動物、BBBスコア、柑橘化合物

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の治療法として、急性期の神経保護に働く薬物はあるものの損傷軸索を再生させる抜本的な薬物は開発されていない。申請者らは、これまでに脊髄損傷により運動麻痺に陥ったマウスの腹腔内に投与すると著明に運動機能を改善させる化合物（4-メチルカテコールや 2-デセン酸エチルエステルなど）を見出してきたが、これらの化合物は神経細胞内の基幹シグナル伝達分子 mitogen-activated protein kinase (MAPK)ファミリー-ERK1/2を活性化する。柑橘由来化合物の多くは脂溶性で中枢神経系に移行しや

すく、複素環式化合物で側鎖が多く誘導体を合成して医薬品とするのが容易である。そこで、柑橘由来化合物について ERK1/2 活性化を指標とする *in vitro* スクリーニングを実施したところ、複数の候補化合物を見出すことができた。その内ヘプタメトキシフラボン(HMF)については脳虚血マウスにおいて神経保護作用を示すことを明らかにした。すなわち、脳虚血モデルマウスに HMF を投与すると、脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現が亢進されること、BDNF を発現しているのはアストロサイトであることを明らかにした。これらの結果から、HMF は損傷

脊髄の治療にも有効ではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、柑橘由来化合物 HMF を脊髄損傷モデルマウスに投与し、その効果を解析することである。また、その作用機序を、アストロサイトなどの培養細胞を用いて解析することである。

## 3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷モデル動物は、マウス (C57BL/6, 9 週齢♂) を用いて作製した。麻酔下、脊部を正中切開し、傍脊柱筋を鈍的に剥離、第 10 胸椎の椎弓を切除後、同部位にて鋭利な刃物で全脊髄を切断した。切断 1 日後に対象の後足麻痺を確認できた個体を実験に用いた。

(2) HMF はオレンジオイルより調製した。HMF は手術直後より 4 週間にわたって毎日腹腔内投与した(50mg/kg/day)。

(3) 運動機能は、BBB スコア (実験動物の後肢の運動機能を評価するシステム。オープンフィールドでの動物の動きを複数の観察者が目視で観察し、その機能を 0 [完全麻痺] ~21 [正常] の 21 段階で測定、記録し評価するもの。) を測定することで評価した。

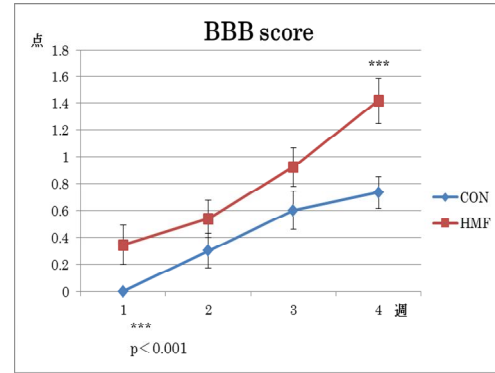
(4) 組織化学的解析は、手術 4 週間後に切断部周辺の組織を摘出し、抗 BDNF 抗体を用いて行った。

(5) アストロサイトは、1~2 日齢のマウスの脳より培養し、1 回継体して実験に供した。

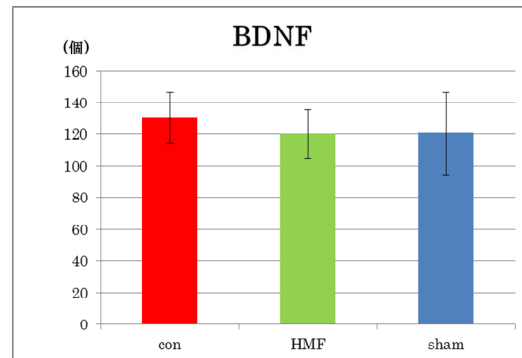
(6) mRNA 発現量の測定は、Isogen を用いて総 RNA を抽出し、RT-PCR 法に供することで行った。

## 4. 研究成果

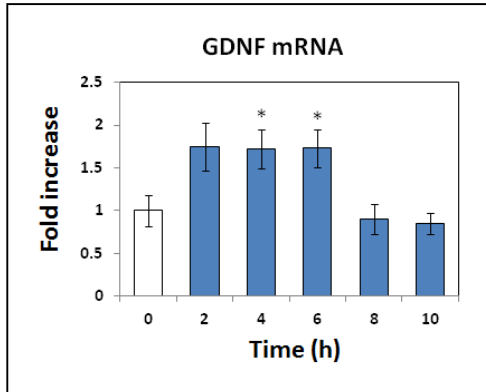
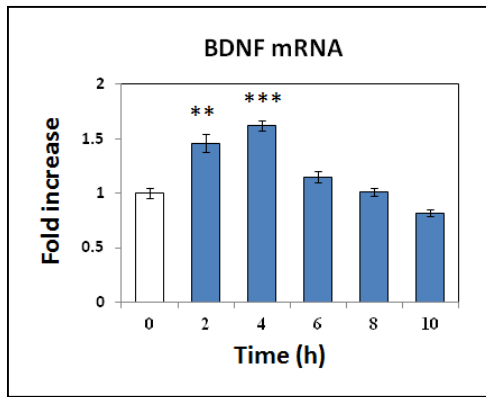
(1) 脊髄損傷を受けたマウスの運動機能は、損傷直後、完全に失われた。運動機能の BBB スコアによる評価は 1 週間ごとに実施したが、手術 + HMF 投与群 (HMF) の値は手術群 (CON) に比べ、1 週間後からわずかではあるが改善傾向を示し、4 週間後には有意に (\*\*\*)  $p < 0.001$  改善効果が認められた。しかし、その値は低いものであり、HMF の効果を見るには 4 週間の投与期間は充分でない可能性を示唆するものであった。今後は、2~3 ヶ月の長期にわたって投与し、効果を見る予定である。



(2) 我々は、すでに脳虚血モデルマウスに対する HMF の作用を解析し、HMF を投与すると BDNF の発現が亢進されること、BDNF を発現しているのはアストロサイトであることを明らかにした。そこで、脊髄でも同様の現象がみられるかどうかを検討するため、手術 4 週間後の脊髄組織を組織染色法で解析した。その結果、脊髄においては、無処理群 (CON)、手術群 (sham)、手術 + HMF 投与群 (HMF) の三者間で BDNF の発現に差は認められなかった。脊髄ではもともと BDNF 発現は低く、損傷治療への関与は低い可能性がある。そこで、現在、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) など他の神経栄養因子の発現を解析しているところである。



(3) 培養液に 50 $\mu$ M の HMF を添加し、各時間 (0, 2, 4, 6, 8, 10 時間) 培養した脳由来アストロサイトより抽出した総 RNA を、RT-PCR 法に供した。その結果、BDNF mRNA 発現量は 2~4 時間後に、GDNF mRNA 発現量は 4~6 時間後に、それぞれ有意に亢進すること (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) が明らかになった。今後は、アストロサイトや線維芽細胞は脊髄より培養し、同様の検討を行う予定である。また、種々のキナーゼ阻害薬を加えることで、HMF の作用発現機序を明らかにしていく予定である。



以上の結果より、これまで脳虚血モデルマウスにおいて見出していたような HMF の効果は、脊髄損傷モデルマウスでは認められなかった。今後は、HMF の投与を長期にする・発現解析の対象を替えるなどで、さらに解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

(1) Okuyama S, Minami S, Shimada N, Makihata N, Nakajima M, Furukawa Y.

Anti-inflammatory and neuroprotective effect of auraptene, a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice. *Eur.J.Pharmacol.* 査読有(2013) 699: 118-123.

DOI : 10.1016/j.ejphar.2012.11.043

(2) 天倉吉章、好村守生、奥山聡、古川美子. 愛媛県特産柑橘類の果皮成分解析と脳活性化作用. *FFI Journal* (2013) 218(1): 28-35.

(3) Nakajima M, Tsuruta M, Mori H, Nishikawa C, Okuyama S, Furukawa Y.

A comparative study of axon-surrounding cells in the two nasal nerve tracts from mouse olfactory epithelium and vomeronasal organ. *Brain Res.* (2013) 1503: 16-23.

DOI : 10.1016/j.brainres.2013.01.053.

(4) Nakajima M, Mori H, Nishikawa C, Tsuruta M, Okuyama S, Furukawa Y.

Psychiatric disorder-related abnormal behavior and habenulo-interpeduncular pathway defects in Wnt1-cre and Wnt1-GAL4 double transgenic mice. *J. Neurochem.* (2013) Jan;124(2): 241-9. DOI : 10.1111/jnc.12085

(5) Hara T, Fukumitsu H, Soumiya H, Furukawa Y, Furukawa S. Injury-induced accumulation of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rostral part of the injured rat spinal cord.

*Int. J. Mol. Sci.* 査読有(2012) 13: 13484-13500. DOI : 10.3390/ijms131013484.

(6) Furukawa Y, Watanabe S, Okuyama S, Nakajima M.

Neurotrophic effect of citrus auraptene: neuritegenic activity in PC12 cells.

*Int. J. Mol. Sci.* 査読有(2012) 13: 5338-5347.

DOI : 10.3390/ijms13055338.

(7) Furukawa Y, Okuyama S, Amakura Y,

Watanabe S, Fukata T, Nakajima M, Yoshimura M, Yoshida T. Isolation and characterization of activators of ERK/MAPK from *Citrus* plants.

*Int. J. Mol. Sci.* 査読有(2012) 13: 1832-1845.

DOI : 10.3390/ijms13021832.

(8) Okuyama S, Shimada N, Kaji M, Morita M, Miyoshi K, Minami S, Amakura Y,

Yoshimura M, Yoshida T, Watanabe S, Nakajima M,

Furukawa Y. Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice.

*Neurosci. Lett.* 査読有(2012) 528, 190-195.

DOI : 10.1016/j.neulet.2012.08.079.

(9) Furukawa Y, Watanabe S, Okuyama S,

Amakura Y, Yoshimura M, Yoshida T, Nakajima M.

Effect of citrus polymethoxyflavones on neuritegenesis in neuroblastoma cells.

*Biointerface Res. Applied Chem.* 査読有(2012)

2; 432-437.

ISSN 2069-5837

〔学会発表〕 (計 9 件)

① 奥山聡、守田麻由、加地未来、中島光業、古川美子 「柑橘由来成分 auraptene の神経系に及ぼす作用(2)脳虚血疾患モデルに対する脳保護効果」日本薬学会第133年会(2013年03月28日～2013年03月30日) 横浜市

② 古川美子、奥山聡、渡辺苑、中島光業 「柑橘由来成分 auraptene の神経系に及ぼす作用(1)培養神経細胞およびPC12細胞に対する作用」

日本薬学会第133年会(2013年03月28日～2013年03月30日)横浜市

③奥山聡、島田直子、天倉吉章、好村守生、中島光業、古川美子「柑橘果皮由来成分へブタメトキシフラボンの全脳虚血モデルマウスにおけるBDNF産生ならびに神経新生促進作用」第86回日本薬理学会年会(2013年03月21日～2013年03月23日)福岡市

④奥山聡、島田直子、渡辺苑、天倉吉章、好村守生、中島光業、古川美子「『河内晩柑』果皮含有成分の脳虚血障害に対する脳保護作用」第3回宇和島薬剤師会学術大会(2012年12月16日)宇和島市

⑤守田麻由、奥山聡、加地未来、中島光業、古川美子「柑橘由来成分aurapteneの脳虚血疾患に対する脳保護効果」第51回日本薬学会中四国支部学術大会(2012年11月10日～2012年11月11日)松江市

⑥三好和浩、奥山聡、西川祐貴、天倉吉章、好村守生、吉田隆志、中島光業、古川美子「柑橘由来成分heptamethoxyflavoneの中樞神経系における抗炎症作用の検討」第51回日本薬学会中四国支部学術大会(2012年11月10日～2012年11月11日)松江市

⑦奥山聡、南仙雅、島田直子、巻幡奈保美、天倉吉章、好村守生、吉田隆志、中島光業、古川美子「柑橘由来脳活性化物質の探索(2)脳虚血障害におけるオーラプテンの脳保護作用」日本薬学会第132回年会(2012年03月28日～2012年03月30日)札幌市

⑧古川美子、奥山聡、渡辺苑、深田貴大、中島光業、天倉吉章、好村守生、吉田隆志「柑橘由来脳活性化物質の探索(1)」日本薬学会第132回年会(2012年03月28日～2012年03月30日)札幌市

⑨津村優一、奥山聡、天倉吉章、好村守生、吉田隆志、中島光業、古川美子「愛媛特産柑橘果皮由来成分の脳における抗炎症作用」第50回日本薬学会中四国支部学術大会(2011年11月12日～2011年11月13日)高松市

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：脳神経疾患治療、脳神経疾患予防または脳機能改善のための組成物

発明者：古川美子・吉田隆志・天倉吉章・奥山聡・中島光業

権利者：古川美子

種類：特許

番号：特願 2011-213795 号

出願年月日：2011年9月28日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古川美子 (FURUKAWA YOSHIKO)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：20219108

### (2)研究分担者

中島光業 (NAKAJIMA MITSUNARI)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：70311404

奥山 聡 (OKUYAMA SATOSHI)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：40550380

天倉吉章 (AMAKURA YOSHIAKI)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：50321857

吉田隆志 (YOSHIDA TAKASHI) H23のみ

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：20025696

好村守生 (YOSHIMURA MORIO) H24のみ

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：80454891

古川昭栄 (FURUKAWA SHOEI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90159129

福光秀光 (FUKUMITSU HIDEMITSU)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00308280