

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700376

研究課題名(和文)ピレスロイド系殺虫剤成分デルタメトリンをリード化合物とした新規抗うつ薬の開発

研究課題名(英文)Development of new antidepressants from pyrethroid insecticide deltamethrin.

研究代表者

高崎 一郎 (Takasaki, Ichiro)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・准教授

研究者番号：00397176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ピレスロイド系殺虫剤成分のひとつであるデルタメトリン(以下DM)が抗うつ様作用を示すかどうか、マウスを用いた強制水泳試験法により検討した。マウスにDMを腹腔内投与したところ、強制水泳試験において無動時間の短縮、すなわち抗うつ様作用が見られた。DM投与マウスの脳海馬において、BDNF mRNAの発現上昇し、DMによる抗うつ様作用は、BDNF受容体trkBの阻害剤であるK252aの脳室内前処置により抑制された。以上の結果から、DMの抗うつ様作用には海馬におけるBDNF/trkB系が関与していることが示唆される。デルタメトリンは新しい精神神経疾患治療薬のリード化合物となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the antidepressant-like effect of type II pyrethroid deltamethrin (DM) in mice. The effects of DM were assessed using the forced swimming test (FST) and were compared with those of type I pyrethroid permethrin (PM). Intraperitoneal administration of DM (5 and 10mg/kg) increased the expression of BDNF mRNA in the hippocampus. DM significantly decreased the immobility time in the FST, and did not affect locomotor activity and motor coordination, suggesting that DM has an antidepressant-like effect. This effect of DM was inhibited by intracerebroventricular injection of K252a, which is an inhibitor of the BDNF receptor TrkB, indicating that the antidepressant-like effects of DM are mediated by BDNF/TrkB signaling pathways. The results of the present study suggest that DM possesses antidepressant-like properties, and may be a possible source for the development of drugs to treat neurodegenerative and psychiatric disorders including depression.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学，神経化学・神経薬理学

キーワード：抗うつ薬 脳由来神経栄養因子 デルタメトリン

1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病と抗うつ薬

「うつ病」は、気分障害の一種であり、抑うつ気分や不安・焦燥、精神活動の低下、食欲低下、不眠症などを特徴とする精神疾患である。うつ病は日本人の15人に1人が一生のうちで一度はかかるとされ、ストレス社会の現代においてうつ病のもたらす社会的影響は大きく、経済的損失は計り知れない。我が国では、年間3万人以上の人々が自殺によりその命を落としている。自殺の背景には、経済的苦痛、病苦、社会的孤立などさまざまな要因があるが、その大半は過度のストレスに伴う抑うつ状態や衝動性の亢進が直接的なきっかけと考えられている。

うつ病の治療には適切な薬物療法が必須である。うつ病の治療薬は、セロトニンやノルアドレナリンといったモノアミンを増加させる薬物が中心であるが、臨床においては抗うつ効果発現までには数週間の慢性投与を必要とするため、うつ病治療は長期化し、大きな問題となっている。また適切に治療しても既存の抗うつ薬の有効性は6-7割であり、抗うつ薬に反応しない難治性のうつ病も存在することから、新しい抗うつ薬の開発が求められている。

(2) うつ(ストレス)と海馬神経新生

記憶・学習機能に重要なはたらきを示す海馬歯状回などの脳の特定領域に神経幹/前駆細胞が存在し、成体脳においても神経新生が起こることが明らかとなってきた。強度の心理的ストレスが加わると、海馬神経細胞の脱落あるいは萎縮が起こる。ストレス負荷により、海馬歯状回における神経前駆細胞の増殖が減少し、海馬CA3錐体細胞の樹状突起の長さや数が減少する(Nestler et al., Neuron 2002)ことから、ストレスによる海馬の萎縮は神経新生の減少によるものであることが示唆されている。フルオキセチンなどの抗うつ薬は海馬の萎縮を抑制し、海馬における神経新生を促進する(Santarelli et al., Science 2003)。またX線照射により海馬神経新生を阻害すると抗うつ薬の効果がなくなる(Santarelli et al., Science 2003)ことから、抗うつ薬の作用発現には海馬における神経新生が重要な役割を果たすことが示唆されている。

(3) うつ(ストレス)とBDNF

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、発達段階および成人において、神経回路網の形成や発達、生存に重要であり、さらにシナプス可塑性などにも関与し、記憶や学習の形成において重要な役割を果たしている。近年、ストレスに伴ううつ様症状、ならびに抗うつ薬の作用発現にBDNFが密接にかかわっていることが報告された。ヒトを用いた研究において、抗うつ薬を服用していた患者の

海馬においてBDNFが非服用患者と比較して有意に増加していることが報告されている(Chen et al., Biol Psychiatry 2001)。また、強制水泳ストレスなどにより惹起したうつ病の動物モデルにおいて、海馬におけるBDNFの発現が減少していること、抗うつ薬の慢性投与はストレスによる海馬BDNFの減少を改善させることが報告されている(Nibuya et al., J Neurosci 1995)。さらに、BDNFを海馬歯状回に直接投与すると、抗うつ作用が観察され、この効果はBDNFの受容体であるTrkB受容体の阻害薬K252aで消失する(Shirayama et al., J Neurosci 2002)。以上の研究成果は、BDNFが抗うつ作用を有すること、抗うつ薬の作用にBDNFが関与していることを示している。

(4) ピレスロイド系殺虫剤

ピレスロイドはキク科植物の一種、シロバナムシヨケギク(Chrysanthemum cinerariaefolium)から抽出された成分であるピレスリンを基に合成された化合物である。本邦においては、蚊取り線香や殺虫スプレーの有効成分として、日常的に使用されている。ピレスロイド系殺虫剤は、その化学構造から2つのタイプに分類され、シアノ基が存在しないものをI型、シアノ基が存在するものをII型として分類している。

(5) デルタメトリンによるBDNF遺伝子発現調節

以前に申請者のグループは、環境物質が神経系の遺伝子発現に及ぼす影響調査の中で、II型ピレスロイド系殺虫剤の成分のひとつであるデルタメトリンが、初代培養神経細胞において顕著なBDNF発現誘導を起こすことを見出した(Imamura et al., J Pharmacol Exp Ther 2006)。また最近、cDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、デルタメトリンはBDNF mRNAをはじめとする一連の神経可塑性に関連する遺伝子の発現を誘導することを確認した。またデルタメトリンをリード化合物として合成した誘導体化合物もBDNF誘導能を有することを確認している。さらにデルタメトリンが、初代培養神経細胞の突起進展を促しその生存率を上昇させること、神経幹細胞からの成熟神経細胞への分化(神経新生)を促進することを見出した(日本薬学会第130年会(2011年)にて公表)。

2. 研究の目的

以上のようなうつ病の病態、抗うつ薬に関する研究背景から、脳においてBDNF発現をより早く誘導し神経新生を促進する薬物は、効果発現の早い新しい抗うつ薬となる可能性がある。デルタメトリンは神経系においてBDNF mRNA発現誘導能が特に高く、また神経新生促進作用を有する(*in vitro*)。したが

って、プレスロイド系化合物は神経細胞の分化に対して遺伝子発現レベルを介して根幹的にはたらくことが示唆され、*in vivo*において抗うつ作用を含む脳機能の改善を促す可能性が極めて高い薬剤であることが期待される。そこで本研究では、以下の点について明らかにし、新しいタイプの抗うつ薬を開発することを目的とした。

デルタメトリンおよび誘導体化合物が抗うつ作用を有するかどうかを明らかにすること
デルタメトリンおよび誘導体化合物の抗うつ作用メカニズムを明らかにすること

3. 研究の方法

(1)デルタメトリンの抗うつ作用に関する研究(抗うつ薬としての薬効評価 - 強制水泳試験)

マウス(C57BL/6J, 雄性, 実験開始時6週齢)にデルタメトリンを投与(単回投与, 反復投与)し, 抗うつ薬のスクリーニングに汎用されている「強制水泳試験法」を行うことで, 抗うつ薬としての有効性を評価した。すなわち, 水を張ったビーカーにマウスを入れ, 逃避不可能な状況におけるマウスの無動時間を測定し, 無動時間の短縮を抗うつ様効果として評価した。対照薬として, I型プレスロイドのペルメトリン, ポジティブコントロールとしてイミプラミンなどの既存の抗うつ薬を用いた。

(2)デルタメトリンの自発運動量, 運動異常に及ぼす影響

デルタメトリンが自発運動量や運動に影響を及ぼすかどうかを検討する目的で, 自発運動量の測定と Rota-rod テストを行った。

(2)抗うつ作用発現メカニズムに関する研究
*in vivo*における BDNF 発現量の測定

海馬における BDNF 産生量はストレスにより減少する。前述したように, 初代培養神経細胞においてデルタメトリンは BDNF 遺伝子発現を強力に誘導する(Imamura et al., 2006)。そこで, *in vivo*においてもデルタメトリンが BDNF 発現を誘導するかどうか, すなわち抗うつ作用の発現に BDNF 産生亢進が関与しているかどうかを調べた。マウスから脳を取り出し, 海馬, 前頭前野, 扁桃体などの各機能的部位に分けた。各部位から total RNA およびタンパクを抽出し, 定量的リアルタイム PCR 法により, BDNF mRNA 発現量を測定した。

*in vivo*における BDNF 発現細胞の同定

マウスを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後, 脳組織を摘出・凍結し, クライオスタットで薄切する。ピオチン標識した BDNF 特異的 RNA プローブを用いて, *in situ*ハイ

ブリダイゼーションを行い, BDNF mRNA 発現細胞を同定した。

また, 抗 BDNF 抗体を用いた免疫組織染色により, BDNF 発現細胞の特定を試みた。さらに種々のマーカータンパク抗体(GFAP, Doublecortin, PSA-NCAM, Nestin など)との二重染色を行い, BDNF 発現細胞の特徴づけを行った。

4. 研究成果

(1)強制水泳試験におけるデルタメトリンの効果

まず, デルタメトリンが抗うつ様作用を有するかどうかを検討するために, 強制水泳試験を行った。マウスにデルタメトリン(5, 10 mg/kg)を腹腔内投与し, 投与後 2, 12, 24 時間後に試験を行った。投与後, 2 および 24 時間後においては無動時間の短縮は見られなかったが, 投与後 12 時間において用量依存的な無動時間の短縮が観察された。この効果はポジティブコントロールとして用いたイミプラミン(5 mg/kg, 腹腔内)と同程度であった。

以上の結果から, デルタメトリンが抗うつ様作用を有することが示唆された。

(2)海馬における BDNF mRNA の発現

次に, リアルタイム PCR 法により, 海馬における BDNF mRNA の発現を検討した。海馬はデルタメトリン投与後 2, 12, 24 時間後に摘出し, RNA を抽出した。

5 mg/kg のデルタメトリンはすべてのタイムコースにおいて BDNF mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。10 mg/kg のデルタメトリンを投与したマウスにおいては, 投与後 2, 24 時間後では BDNF mRNA 発現は変化しなかったが, 12 時間後において海馬にける BDNF mRNA の有意な発現の増大が見られた。

In situ ハイブリダイゼーションの結果, BDNF mRNA は海馬歯状回, CA3 および CA1 において発現が見られ, これらはデルタメトリンの投与により強く誘導されることが明らかとなった。

(3)デルタメトリンの抗うつ様作用に対する K252a の効果

デルタメトリンの抗うつ様作用に BDNF/trkB シグナリングが関与するかどうかを検討する目的で, trkB 受容体阻害薬の K252a の効果を検討した。K252a (1 nmol/mouse)は強制水泳試験の 30 分前に脳室内に投与した。K252a そのものは強制水泳試験において影響を及ぼさなかったが, デルタメトリンによる無動時間の短縮を有意に阻害した。

(4)強制水泳試験と BDNF mRNA 発現に及ぼすペルメトリンの効果

次に, タイプ プレスロイドであるペルメトリンの効果を検討した。以前にペルメトリ

ンは初代培養神経細胞において BDNF mRNA の発現に影響を及ぼさないことを報告している。ペルメトリン (5, 10 mg/kg) を腹腔内投与し、投与後 12 時間後に試験を行った。ペルメトリンは無動時間を短縮せず、また海馬における BDNF mRNA 発現にも影響を及ぼさなかった。

(5) デルタメトリン反復投与の効果

我々はまた、デルタメトリン反復投与の効果を検討した。デルタメトリン (5, 10 mg/kg) およびペルメトリン (10 mg/kg) を 1 日 1 回腹腔内投与し、最終投与の 12 および 24 時間後に強制水泳試験を行った。デルタメトリンは最終投与の 12 時間後において無動時間を短縮した。デルタメトリンのこの効果は最終投与の 24 時間後においても観察された。単回投与の 24 時間後では抗うつ作用が見られなかったことから、デルタメトリンは反復投与をすることで、抗うつ様効果が持続することが明らかとなった。一方で、ペルメトリンを反復投与しても無動時間を短縮しなかった。

(6) 運動機能に及ぼす効果

デルタメトリンによる無動時間の短縮が自発運動量の増大によるものではないことを示すために、オープンフィールドテストにより自発運動量を測定した。デルタメトリンおよびペルメトリンの単回および反復投与は自発運動量 (トータルの移動距離) に影響を及ぼさなかった。また Rota-rod テストにおいても差は認められなかったことから、デルタメトリンは運動に影響を及ぼさないことが示唆された。

以上の研究成果から、2 型ピレスロイドであるデルタメトリンが抗うつ様作用を有することを初めて明らかにし、その効果には海馬における BDNF および trkB 受容体が関与していることを明らかにした。

デルタメトリンはその構造中にシアノ基を有することから、生体内で代謝される際にシアン化水素が生成し、ミトコンドリア膜に存在するエネルギー (ATP) 合成経路を阻害する可能性があり、体への見えない影響が懸念される。したがって安全性の高い抗うつ薬の開発を目指すためには、デルタメトリンをリード化合物として類似体化合物を合成する必要がある。すでにいくつかの化合物の合成に成功し、BDNF 誘導能を有することを確認している。現在、これら化合物の抗うつ様作用を詳細に検討中である。

以上、デルタメトリンはうつ病をはじめとする精神疾患や神経変性疾患の治療薬開発におけるリード化合物となる可能性を有している。

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 2 件)

(1) Ihara D, Fukuchi M, Honma D, Takasaki I, Ishikawa M, Tabuchi A, Tsuda M. Deltamethrin, a type II pyrethroid insecticide, has neurotrophic effects on neurons with continuous activation of the Bdnf promoter. *Neuropharmacology* 62(2): 1091-1098, 2012. 査読有

(2) Takasaki I, Ose K, Otaki Y, Ihara D, Fukuchi M, Tabuchi A, Tsuneki H, Tabuchi Y, Kondo T, Saitoh A, Yamada M, Tsuda M. Type II pyrethroid deltamethrin produces antidepressant-like effects in mice. *Behav Brain Res* 257: 182-8, 2013. 査読有

[学会発表](計 2 件)

(1) 高崎一郎, 大瀬京平, 伊原大輔, 福地 守, 田淵明子, 齋藤顕宜, 山田光彦, 津田正明: タイプ II ピレスロイド Deltamethrin 投与による BDNF 遺伝子発現変化と抗うつ効果の解析. 日本薬学会第 132 年会, 2012, 3, 28-31, 札幌.

(2) 大瀧雄基, 高崎一郎, 伊原大輔, 福地 守, 田淵明子, 津田正明: 2 型ピレスロイド系殺虫剤デルタメトリンのマウス海馬 BDNF 発現に与える影響と抗うつ様効果についての解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013, 12, 3-6, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎一郎 (TAKASAKI ICHIRO)
富山大学・大学院理工学研究部 (工学)
研究者番号: 00397176

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし