

アクロレイン毒性除去物質の探索及びその脳機能改善薬としての応用

申請代表者 柏木 敬子 千葉科学大学 薬学部 教授

■背景・目的

ポリアミン（プトレスシン，スペルミジン，スペルミン）はほとんどすべての生物に存在する細胞増殖必須因子である。ポリアミンの中でも特にスペルミンは細胞障害時にポリアミン酸化酵素により酸化分解され，アクロレイン及び過酸化水素が同時に生じ，強い毒性を示す。その中でアクロレイン（ $\text{CH}_2=\text{CH}\cdot\text{CHO}$ ）は不飽和アルデヒドであり，非常に反応性の高い毒性物質である。我々はアクロレインが過酸化水素よりも数倍毒性の強い化合物であることを細胞培養実験で明らかにした（Sharmin, S. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 228-235, 2001）。また，脳梗塞患者で血中のポリアミン酸化酵素と蛋白質抱合型アクロレイン（PC-Acro）が上昇しており，IL-6, CRP 等の炎症マーカーと同時に測定することにより無症候性脳梗塞を高感度・高特異度で同定できることを報告した（Tomitori, H. *et al., Stroke* **36**, 2609-2613, 2005; Yoshida, M. *et al., Atherosclerosis* **203**, 557-562, 2009; Yoshida, M. *et al., Atherosclerosis* **211**, 475-479, 2010）。更に，脳梗塞モデルマウスを用いて，脳梗塞部位で PC-Acro が上昇すること，及び，血中 PC-Acro 並びにポリアミン酸化酵素活性が上昇することを見出した（Saiki, R. *et al., Stroke* **40**, 3356-3361, 2009）。また，アクロレイン除去剤である *N*-ベンジルヒドロキシルアミンの投与により，脳梗塞モデルマウスの脳梗塞巣の大きさが縮小することを見出した。これらの結果から，ポリアミンから生じるアクロレインの毒性を除去する物質が，脳機能改善薬としての可能性を有する事を明らかにした。従って本研究では，生薬由来化合物セット，及び生薬エキスセット中より細胞増殖に対するアクロレインの毒性を除去する物質の探索を行い，脳機能改善薬の候補化合物として有用であるかどうかの検討を行う。

■結果・考察

・動物細胞培養系におけるアクロレイン毒性除去物質の探索

当初の計画では浮遊細胞を使用して1次スクリーニングを行う予定だったが，使用する化合物を必要最小限にするため，接着細胞であるマウス神経芽細胞種 Neuro 2A 細胞を 96well プレートで培養する実験系を構築した。この細胞培養系にアクロレインと化合物を添加し，アクロレイン添加による細胞増殖阻害が回復するか否かを 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) アッセイにより評価した。アクロレインは終濃度 $6\mu\text{M}$ ，各化合物は終濃度 $10\mu\text{M}$ となるよう添加した。なお，MTT アッセイとはテトラゾリウム塩の1種を培養細胞に添加し，その代謝物であるホルマザンの量を吸光度測定により定量する方法であり，その吸光度は細胞増殖の程度や細胞の生存率に比例することが知られている。

培養スケールが小さいため，安定したデータを得るのに苦労したが，現在までに化合物 80 種のうち 50 種について1次スクリーニングが終了した。その結果，ergosterol を添加した細胞では，アクロレインの毒性が有意に減少しているのが確認された（図1）。一方，coptisine chloride, dehydrocorydaline, dehydrocostuslactone 及び [6]-gingerol はアクロレインの細胞増殖阻害効果

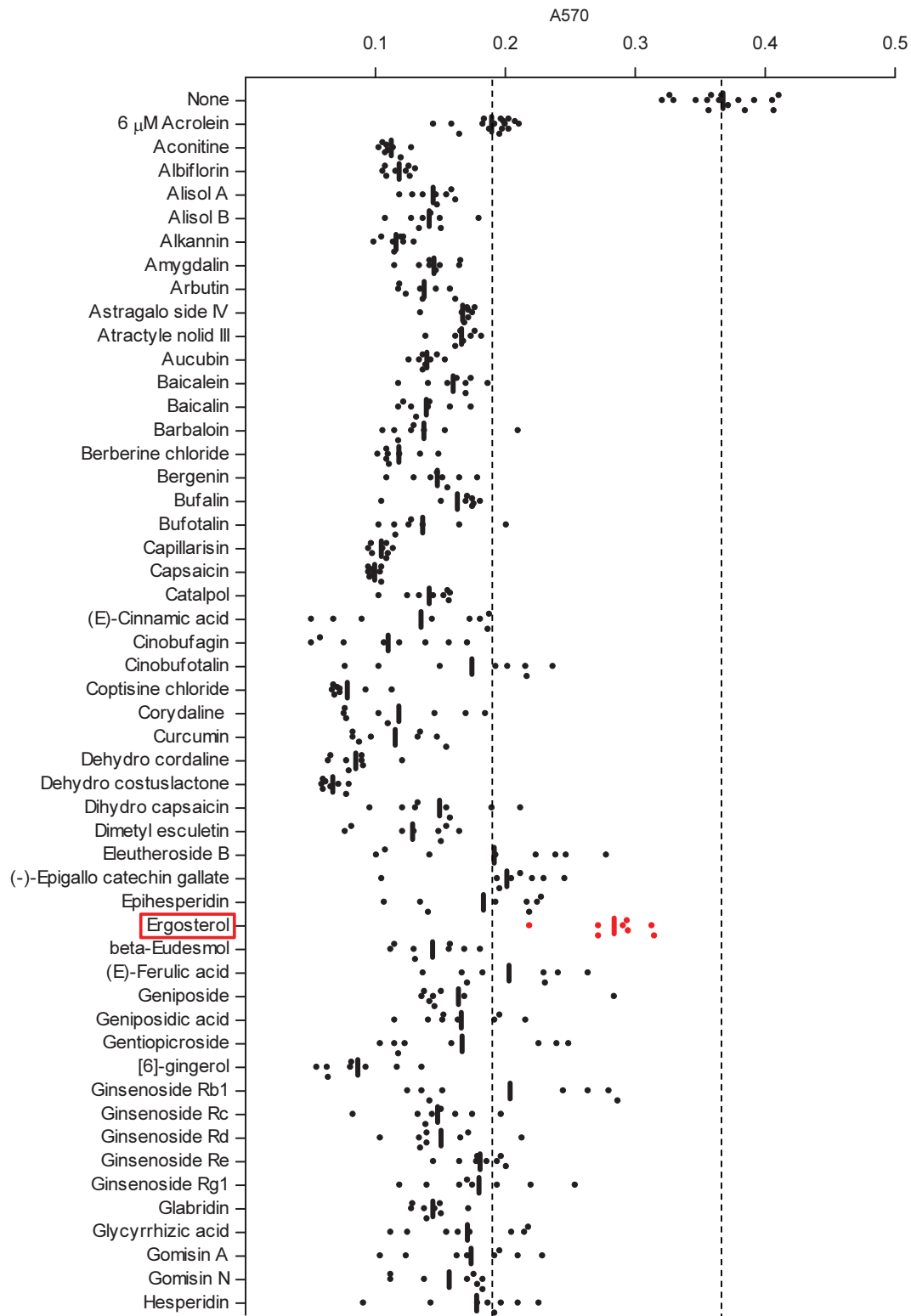


図1 各種生薬化合物添加によるアクロレイン毒性の除去作用の検討

“None”以外は培地中に終濃度 6 μM のアクロレインを添加し、培養した。各々の生薬化合物は終濃度が 10 μM となるように添加した。培養開始 3 日後の細胞にテトラゾリウム塩を添加し、産生されたホルマザンを溶解して 570 nm の吸光度を測定した。赤で示した ergosterol のみ有意な細胞増殖の回復が認められた。

に加え、著しい細胞増殖阻害効果を示した。Coptisine chloride はモノアミノキシダーゼ阻害作用があり、細胞増殖を阻害することが知られている。[6]-Gingerol, dehydrocorydaline もまた細胞増殖阻害作用が知られている (Satou, T. et al. *Biol Pharm Bull.* **25**, 1651-1654, 2002 他)。Dehydrocostuslactone はアポトーシス誘導作用が報告されている (Hsu, Y.L., Wu, L.Y., Kuo, P.L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **329**, 808-819, 2009) 一方、酸化ストレスからの細胞保護作用も報告されている (Choi, E.M., Kim, G.H., Lee, Y.S. *Toxicol. In Vitro.* **23**, 862-867, 2009) ことから、添加濃度を下げて再検討する必要がある。

現在、残り 20 種の化合物及び 120 種のエキスについて精力的にスクリーニングを行っている。また今後は、ergosterol のアクロレイン毒性除去作用の詳細なメカニズムを解明する予定である。化合物及びエキスのスクリーニングが終了し、候補化合物が得られたら、脳梗塞モデルマウスを用いた動物実験を行う予定である。

■結論

本研究では生薬化合物 50 種を用い、アクロレインの細胞毒性作用を除去する化合物の 1 次スクリーニングを行なった。その結果、ステロールの 1 種である ergosterol にアクロレインの毒性を除去する作用があることが示唆された。