

脳内の抗うつ薬アナログを見る新しい方法の開発



研究ノート

笠井 淳 司*

Direct visualization of an antidepressant analog in the brain

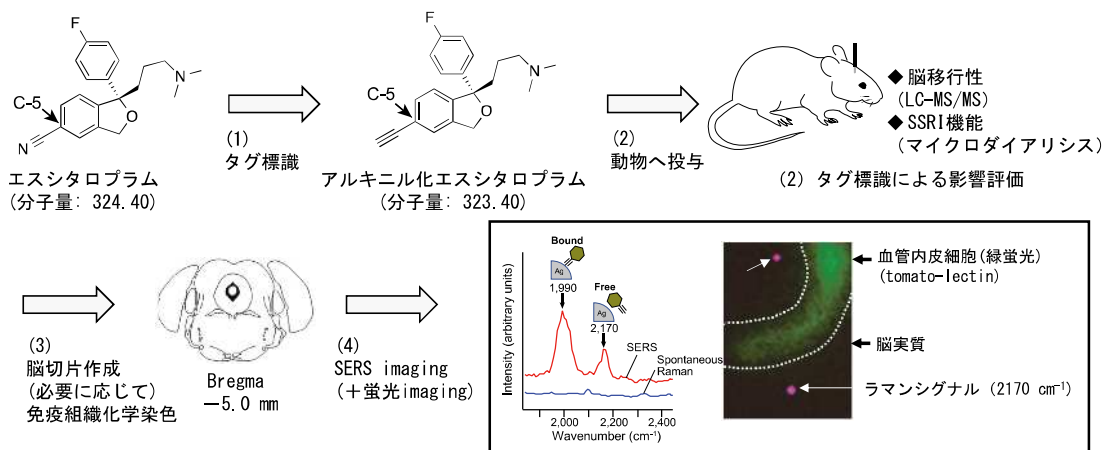
Key Words : antidepressant, surface-enhanced raman scattering, imaging, SSRI

1. はじめに

精神疾患により医療機関にかかる患者数は、年々増加しており、平成 29 年には 419 万人を超えました(1)。その中でも、うつ病の患者数は、増加が著しく大きな問題になっています。うつ病の第一選択薬は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) ですが、治療効果の発現に数週間要することが知られており、作用機序についても不明な点が多く詳細は明らかになっていません。

脳は高度に分化した組織であり、ヒトの大脳皮質半球は解剖学的に 180 領域に細分化されているこ

とから(2)、SSRI の作用機序を解明するためには、脳内分布を理解することが重要です。最近、セロトニントランスポーターの立体構造が明らかになり(3)、SSRI との結合様式がシミュレーションできるようになりましたが、高い空間解像度で低分子化合物を直接可視化することは困難で、詳細な脳内分布は不明でした。そこで筆者らは、エスシタロプラムに小さなタグをつけ、表面増強ラマン散乱 (SERS) を用いたイメージング法を用いて、脳内のエスシタロプラムを直接可視化する方法を開発しました(4)。本稿では、その研究について紹介します。



本研究の概要図



* Atsushi KASAI

1977年12月生まれ
大阪大学 大学院薬学研究科 博士後期課程 (2007年)
現在、大阪大学 大学院薬学研究科 准教授 博士(薬学) 専門/神経薬理学
TEL : 06-6879-8182
FAX : 06-6879-8182
E-mail : kasai@phs.osaka-u.ac.jp

2. 表面増強ラマン散乱

化学結合固有に生じるラマン散乱光を捉えることで分子を直接検出しイメージングする手法としてラマンイメージングがあります。多くの官能基はラマン散乱光を示すものの、ほとんどが指紋領域にピークを示すため判別することが不可能でした。しかしながら、アルキニル基 (-C≡CH) は通常ピークが観察されないサイレント領域 (1800-2800 cm^{-1}) に

において約 2100 cm^{-1} シフトしたところに特徴的な散乱光を示します (5)。さらに生体に存在しない化学基であることから、特異的に検出できる標識分子として用いられています。例えば、アルキニル基を導入したチミジンアナログ EdU を用いて、細胞核および細胞分裂の様子が可視化されています (6)。しかし、自発的なラマン散乱は弱く、アルキニル基の検出限度も約 15 mM と、低濃度で存在する分子の検出は困難でした。そこで、ラマン散乱を増強する手法の一つとして、貴金属ナノ粒子を用いた表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman Scattering, SERS) が登場しました (7)。SERS とは、ナノ粒子に官能基が吸着、あるいは近傍に存在することで、ラマン散乱光が 10^4 - 10^{10} 倍も増大する現象のことです。in vitro においてアルキニル基で標識されたペプチドの検出感度が 100 fmol の報告 (7) があったことから、低濃度で存在する分子の検出にも応用できると考えました。

3. アルキニル化エスシタロプラム

アルキニル基は、分子量が 25 と小さいため、導入された低分子化合物の動態や機能にほとんど影響しないと考えられます。また、エスシタロプラムの 5 位の炭素は、化学基を導入しても、セロトニントランスポーターへの親和性がほとんど変化せず、構造的にもセロトニントランスポーターへの結合性に影響がほとんどないことが報告されていました (8)。また、エスシタロプラムは、5 位の炭素に、ニトリル基を有し、窒素元素を炭素元素に置換するだけでアルキニル基の導入が可能でした。そこで、エスシタロプラムから分子量が 1.0 減少しただけのアルキニル化エスシタロプラムを合成しました。

次に、アルキニル化エスシタロプラムの、薬物動態や薬効への影響を調べました。アルキニル化エスシタロプラムの脳移行性を評価するため、分子を質量によって区別し定量ができる液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析法を用いました。同量のエスシタロプラムとアルキニル化エスシタロプラムを同時にマウスに投与し、1 時間後に脳を取り出し、線条体や背側縫線核に移行した両化合物の量を計測しました。その結果、両化合物の脳移行量には差はなく、アルキニル化エスシタロプラムの薬物動態は、エスシタロプラムと同様であるとわかりました。ま

た、アルキニル化エスシタロプラムが実際に SSRI の作用を維持しているか、マイクロダイアリシス法を用いて、前頭前皮質の細胞外セロトニン量を経時的に測定しました。その結果、両化合物のタイムコースに有意な差はありませんでした。これらのことから、アルキニル化は、エスシタロプラムの薬物動態や薬効にほとんど影響なく、アルキニル化エスシタロプラムの脳内分布も、エスシタロプラムの脳内分布と同様であると考えられます。

4. 脳組織におけるアルキニル化エスシタロプラムの SERS イメージング

次に、SERS を用いてアルキニル化エスシタロプラムのイメージングを行いました。SERS のための貴金属ナノ粒子として、一般的に金および銀が用いられています。そこでまず、in vitro において、金および銀のナノ粒子存在下でアルキニル化エスシタロプラムのラマン散乱光を測定しました。その結果、銀ナノ粒子 ($\phi=40\text{ nm}$) が金ナノ粒子 ($\phi=50\text{ nm}$) より 30 倍ラマン散乱光を増強させることが分かりました。また、構造解析の結果からセロトニントランスポーターへのアクセス性を考慮し、新たに直径 23 nm の銀ナノ粒子を合成し、濃縮してラマン散乱光を測定したところ、 400 pM のアルキニル化エスシタロプラムを検出することに成功しました。

直径 23 nm の銀ナノ粒子を用いて、アルキニル化エスシタロプラムを投与したマウスの脳片上のラマン散乱光を測定しました。背側縫線核は、セロトニントランスポーターが多く発現することが報告されているため、背側縫線核を含む脳切片に銀ナノ粒子を添加し SERS を測定した結果、複数の輝点が観察されました。さらに、観察された輝点のラマンスペクトルを解析した結果、すべてにおいてサイレント領域にある 2171 cm^{-1} シフトした位置に特徴的なピークが観察されました。このピークはアルキニル基由来のものであり、ラマン散乱光のピークが 1960 cm^{-1} にシフトしなかったことから、遊離後にナノ粒子に吸着したアルキニル化エスシタロプラムではなく、標的に結合しているアルキニル化エスシタロプラムの検出に成功したことが示唆されます。

SERS イメージングは、可視域の蛍光イメージングとも同時に利用できます。そこで最後に、アルキニル化エスシタロプラムの脳内への移行性を調べ

るため、血管内皮細胞を蛍光標識し、SERS イメージングと蛍光イメージングのマルチモーダルなイメージングを行いました。その結果、血管から脳実質に分布するアルキニル化エスチタロプラムを可視化することに成功しました。以上の結果は、小さな化学修飾と SERS を用いることにより、低分子化合物の脳移行性を直接可視化できることを実証したといえます。SERS と蛍光顕微鏡を組み合わせると、薬物が送達されるニッチな脳領域に関する新しい情報を提供し、SSRI を含む中枢疾患治療薬の根本的なメカニズムの解明に役立つ可能性があります。

5. おわりに

本原稿を執筆中の現在、新型コロナウイルス対応の医療従事者の約3割がうつ状態にあるという報道もありました。感染への不安や周囲からの偏見など様々な精神的ストレスに曝されていることが原因と考えられます。このような状態では、薬効発現まで数週間かかる SSRI などの既存の抗うつ薬ではなく、即効性かつ持続的に抗うつ効果を示す抗うつ薬が求められます。即効性抗うつ薬として、欧米で認可されたケタミンは有望ではありますが、その作用機序は、いくつかの仮説があり未だ統一した理解には至っていません。本稿では、SSRI の可視化法を紹介しましたが、即効性抗うつ薬ケタミンにも適用し、両者の分布や結合様式を比較することによって、抗うつ効果発現のメカニズムの解明、そして新たな抗うつ薬開発に繋がることを期待されます。

謝辞

本稿で紹介した研究は、科学研究費補助金、AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (JP19am0101084)、持田記念医学薬学振興財団、武田科学振興財団の助成により行われたものである。また、本研究の遂行に際し、ご指導、ご助言を頂いた大阪大学工学研究科教授、藤田克昌先生、薬学研究科教授、橋本均先生、ならびに共同研究者の方々に深謝いたします。

参考文献

1. 厚生労働省平成 29 年患者調査.
2. Glasser MF, Coalson TS, Robinson EC, Hacker CD, Harwell J, Yacoub E, et al. A multi-modal parcellation of human cerebral cortex. *Nature*. 2016;536(7615):171-8.
3. Coleman JA, Green EM, and Gouaux E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature*. 2016;532(7599):334-9.
4. Tanuma M, Kasai A, Bando K, Kotoku N, Harada K, Minoshima M, et al. Direct visualization of an antidepressant analog using surface-enhanced Raman scattering in the brain. *JCI Insight*. 2020;5(6):e133348.
5. Wei L, Chen Z, Shi L, Long R, Anzalone AV, Zhang L, et al. Super-multiplex vibrational imaging. *Nature*. 2017;544(7651):465-70.
6. Yamakoshi H, Dodo K, Okada M, Ando J, Palonpon A, Fujita K, et al. Imaging of EdU, an alkyne-tagged cell proliferation probe, by Raman microscopy. *J Am Chem Soc*. 2011;133(16):6102-5.
7. Ando J, Asanuma M, Dodo K, Yamakoshi H, Kawata S, Fujita K, et al. Alkyne-Tag SERS Screening and Identification of Small-Molecule-Binding Sites in Protein. *J Am Chem Soc*. 2016;138(42):13901-10.
8. Zhang P, Cyriac G, Kopajtic T, Zhao Y, Javitch JA, Katz JL, et al. Structure-activity relationships for a novel series of citalopram (1-(3-(dimethylamino)propyl)-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile) analogues at monoamine transporters. *J Med Chem*. 2010;53(16):6112-21.