

令和元年5月20日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19321

研究課題名(和文)長期漢方薬投与における意欲的行動評価系の確立とアパシーに対する漢方薬の有効性評価

研究課題名(英文) Establishment of a motivated behavior assessment system for long-term administration of Kampo medicine and application of Kampo medicine in treating apathy

研究代表者

濱口 卓也 (Hamaguchi, Takuya)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70770684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず、マウス研究において長期漢方薬投与における意欲評価に適した行動評価系を確立した。続いて、この行動評価系を用いてアルツハイマー病モデルであるAppNL-G-F/NL-G-Fマウスの意欲評価を39週齢まで行った結果、一部のマウスで意欲低下を認めた。組織学的検討では、有芯アミロイド斑が線条体に多く沈着しているほど意欲が低下することを発見した。また、ウエスタンブロット解析で線条体を含む皮質下ドパミントランスポーターが低下していることを発見した。これらの結果は、線条体における有芯アミロイド斑沈着がドパミントランスポーターの障害を介して意欲低下を引き起こす可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病モデルマウスで見られる意欲低下が、線条体における有芯アミロイド斑の沈着と相関することを新たに発見した。このことは、アルツハイマー病における意欲低下の治療において、有芯アミロイド斑に着目した治療法が有効である可能性を示唆する。新たな治療法開発のため、アルツハイマー病モデルマウスに対し漢方薬を含めた薬剤介入を行い、有芯アミロイド斑沈着を減少させ意欲低下を回復させる治療法の探索が行われることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established a motivated behavior assessment system to study the effect of Kampo medicine in mice. Using this system, we evaluated the motivated behavior of AppNL-G-F/NL-G-F mice, an Alzheimer's disease model, until they were 39 weeks old. Motivated behavior in some mice decreased. Histological analysis of the AppNL-G-F/NL-G-F mice at 39 weeks old showed that an increased number of cored amyloid plaques in the striatum coincided with decreased motivated behavior. Western blotting analysis of the AppNL-G-F/NL-G-F mice at 9 months old showed decreased dopamine transporter levels in the subcortical tissue, including the striatum. These results suggest a pathway through which cored amyloid plaques damage the dopamine transporter and result in impaired motivated behavior.

研究分野：神経化学・神経薬理学

キーワード：意欲 アパシー オペラント 漢方薬 アルツハイマー 線条体 アミロイド斑 ドパミントランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 背景：高齢化社会に伴い、神経変性疾患は増加している。アパシー（意欲低下）は神経変性疾患であるアルツハイマー型認知症の約 60%、パーキンソン病やハンチントン病の約 40% にみられる。アパシーは日常生活動作に影響を与え、また患者本人だけでなく介護者の負担を大きくする要因でもある。治療薬の探索のため臨床介入研究が行われているが、アパシーに対する抗うつ薬の効果は限定的で、未だ有効な治療法の確立には至っていない。
- (2) 動機：漢方診療に携わる中で、意欲低下に対する漢方薬治療の可能性を考えた。意欲低下に対する漢方治療の報告は、臨床においては認知症に伴い生じた意欲低下が漢方薬投与によって改善した報告があり、抑肝散や抑肝散加陳皮半夏、釣藤散が挙げられる。しかしながら依然エビデンスは少なく、また、基礎研究においては未だ意欲低下を改善する漢方薬の報告はない。

2. 研究の目的

神経変性疾患は呈する症状が多彩かつ進行性であり、多彩な症状に多成分を含む漢方薬が有効であると評価することこそ漢方の醍醐味ではあるが、意欲低下に対して本当に漢方薬が効果を発揮するのかどうかを純粋に評価するのは困難である。本研究では意欲低下を呈するモデルマウスを用いて、疾患の進行度合いを一定のレベルで固定し、さらに病理を限局した脳の病変に絞って、意欲低下を改善する可能性のある漢方薬を探求する。

3. 研究の方法

- (1) 長期漢方薬投与における意欲的行動評価系の確立：意欲低下に対する治療効果をマウスで評価するには意欲の定量評価が必要である。意欲の定量にはレバー押し行動課題を用いる。1 回の報酬を得るのに押さなければならないレバー数が段階的に増えていく課題を与え、1 回の報酬を得るためにどれだけ頑張ってレバーを押したか（Break point）で意欲を評価する。レバー押し行動課題は毎日 1 回の課題を行い、薬剤投与による効果を短期間評価するために用いられるのが一般的で、長くても 2 週間である。しかし、本研究で行う漢方薬投与は月単位を想定しており、例えば 1 ヶ月であれば毎日課題を行うことも可能かもしれないが、6~10 ヶ月という長期に渡って行うことは現実的ではない。そこで、マウスが学習を完了してから、週に何回の課題を行えば記憶が維持されるか、例えば週に 4 回は必要なのか、それとも 2 回でも十分なのか、を明らかにし、それを長期漢方薬投与における意欲的行動評価系として確立する。レバー押し行動課題の前日は餌制限を行い、その他の日は自由摂食とした。
- (2) 野生型マウスでの漢方薬が意欲へ及ぼす効果の検討：野生型マウスに 16 週齢から 39 週齢まで漢方薬を投与し、長期漢方薬投与における意欲的行動評価系を用いて意欲評価を行う。
- (3) $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスでの長期意欲評価：意欲低下モデルマウスとしてアルツハイマー病モデルである $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスを用いる。 $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスは 2 ヶ月齢からアミロイド斑の沈着を認める一方で、その生涯にわたり神経原線維変化や神経細胞脱落を認めないという特徴を持つ。この特徴は、アミロイド斑沈着そのものによる行動変化への影響を純粋に評価することを可能とする。野生型マウスと $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスとに 16 週齢から 39 週齢まで長期漢方薬投与における意欲的行動評価系を与えてその意欲を評価する。
- (4) $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスの病理組織学的検討： $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスの 39 週例における意欲とアミロイド斑沈着との関係を病理組織学的に検討する。病理組織学的検討では各個体の脳切片を作成し、意欲に関連する脳部位におけるアミロイド斑沈着の程度を定量評価する。意欲に関連する脳部位として、前帯状皮質、前頭前皮質、線条体、淡蒼球、腹側被蓋野の 5 領域を選択する。
- (5) 意欲低下に対する漢方薬の有効性評価： $App^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスに漢方薬を投与し、意欲変化を観察する。

4. 研究成果

- (1) 長期漢方薬投与における意欲的行動評価系の確立：野生型マウスにおいて週 1~6 回のレバー押し行動課題を試験した。週 1 回ではレバーを押さなくなるマウスが見られたが、週 2 回では 1 ヶ月間の観察期間で全てのマウスが安定した Break point を記録した。そこで、週 2 回のレバー押し行動課題を長期漢方薬投与における意欲的行動評価系として確立した。
- (2) 野生型マウスでの漢方薬が意欲へ及ぼす効果の検討：野生型マウスに 16 週齢から 39 週齢まで抑肝散および抑肝散加陳皮半夏を投与し、普通餌と比較して意欲の指標である Break point に変化が見られるかを長期漢方薬投与における意欲的行動評価系により評価した。抑肝散や抑肝散加陳皮半夏は意欲低下を改善する効果のある漢方薬として臨床報告があ

るものである。39 週齢までの観察では、抑肝散および抑肝散加陳皮半夏を与えた両群とも安定した Break point を記録し、野生型マウスと比較して意欲に差は認めなかった (Hamaguchi et al., 2017)。漢方薬は正常な状態から逸脱した状態を改善する方向に働くと考えられており、野生型マウスの意欲に変化を及ぼさなかったことは妥当な結果であったと考えられる。

- (3) *App*^{NL-G-F/NL-G-F}マウスでの長期意欲評価：8 匹の野生型マウスと 11 匹の *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスとに 16 週齢から 39 週齢まで普通餌を与え、長期漢方薬投与における意欲的行動評価系により Break point を評価した。結果 野生型マウスと *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスとに明らかな Break point の差は認めなかった。しかしながら 11 匹の *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの中には意欲低下を認めるマウスが見られ、群内でサブ解析を行うこととした。
- (4) *App*^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの病理組織学的検討：39 週齢 11 匹の *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳切片を作成し、前帯状皮質、前頭前皮質、線条体、淡蒼球、腹側被蓋野のそれぞれの領域におけるアミロイド斑と意欲との関連性を重回帰分析により検討した。アミロイド斑の染色では、A 抗体による総アミロイド斑と、チオフラビン S による有芯アミロイド斑とを染色した。アミロイド斑は大きく分けてびまん性アミロイド斑と有芯アミロイド斑とに分けられるが、チオフラビン S で染色される芯を持つアミロイド斑の方がより毒性が高いとされる。結果、線条体における有芯アミロイド斑数と意欲低下とに有意な逆相関関係が見られた。つまり、線条体により多くの有芯アミロイド斑が沈着しているほど意欲が低下するという結果であった。さらに有芯アミロイド斑が意欲低下を引き起こす機序の検討のため、9 ヶ月齢の 5 匹の野生型マウスと 5 匹の *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを用意し、線条体を含む皮質下の DAT レベルをウエスタンブロットにより比較した。結果、*App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスにおいて DAT レベルの有意な低下が見られた。本研究からは有芯アミロイド斑数と意欲低下の相関、DAT レベル低下と意欲低下の相関が示された。DAT レベル低下と有芯アミロイド斑数との関連性は未だ報告がなく不明であるが、本研究結果からは有芯アミロイド斑が意欲低下を引き起こす機序として、DAT の障害が関係している可能性が示唆された (Hamaguchi et al., 2019)。
- (5) 意欲低下に対する漢方薬の有効性評価：本研究助成金期間内には行うことができなかったが、今後 *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスに漢方薬を投与し、長期における意欲評価と、エンドポイントにおける線条体有芯アミロイド斑に着目した病理組織学的検討を行うことを予定している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Takuya Hamaguchi, Iku Tsutsui-Kimura, Masaru Mimura, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Kenji F. Tanaka. *App*^{NL-G-F/NL-G-F} mice overall do not show impaired motivation, but cored amyloid plaques in the striatum are inversely correlated with motivation. *Neurochemistry International* 2019. DOI: 10.1016/j.neuint.2019.104470. 査読有り

Takuya Hamaguchi, Iku Tsutsui-Kimura, Kenji F. Tanaka, Masaru Mimura. *Yokukansankachimpihange* Increased Body Weight But Not Food-Incentive Motivation in Wild Type Mice. *Nagoya J Med Sci.* 2017; 79: 351-362. DOI: 10.18999/nagjms.79.3.351. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

Takuya Hamaguchi, Iku Tsutsui-Kimura, Marina Tsukamoto, Masaru Mimura, Kenji F. Tanaka. Long-term Effect of *Yokukansankachimpihange* on Motivation in wild-type mice. Poster Presentation. 30th Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP), 2016.

Takuya Hamaguchi, Iku Tsutsui-Kimura, Marina Tsukamoto, Masaru Mimura, Kenji F. Tanaka, Yuko Horiba, Kenji Watanabe. Potential Use of *Yokukansankachimpihange* to Increase Motivation. Poster Presentation. International Congress on Integrative Medicine and Health (ICIMH), 2016.

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：田中 謙二

ローマ字氏名：TANAKA, Kenji

研究協力者氏名：木村 生
ローマ字氏名：KIMURA, Iku

研究協力者氏名：西道 隆臣
ローマ字氏名：SAIDO, Takaomi

研究協力者氏名：齊藤 貴志
ローマ字氏名：SAITO, Takashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。