

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09320

研究課題名(和文) 社会的ストレス誘発うつ症状に対する漢方薬の再発予防効果および未病制御の基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for preventive effects of a Kampo medicine on social stress-induced recurrent depression and pre-symptomatic state for emotional disorders

研究代表者

伊藤 直樹 (Ito, Naoki)

北里大学・東洋医学総合研究所・上級研究員

研究者番号：00370164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題で我々は、社会的ストレス誘発うつ様モデルマウスにおいて、香蘇散がうつ様の再発防止並びに既存の抗うつ薬ミルナシブランとの併用で抗うつ様効果の増強を発揮し、その作用機序として脳内炎症抑制が一部関与していることを明らかにした。また、老化促進マウスSAMP8が未病モデルマウスとして利用できることを見出し、そのモデルマウスに対して香蘇散は加齢により出現するうつ様行動や概日リズム異常、脳内炎症を抑制する可能性が示された。以上の成果は、再発うつや未病に対して香蘇散が有用であることを示し、うつを未然に防ぐ新たな治療戦略に役立つものと期待する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今のストレス社会ではうつ病などの精神疾患による経済的損失が甚大であることから、その克服は喫緊の課題となっている。また、うつ病治療の困難さには、うつは再発しやすいことがその背景に存在する。本研究は、これまであまり検討されてこなかったうつの予防に焦点を絞り、漢方薬がうつの予防に有用である可能性を様々なモデルを用いて明らかにした点で学術的な意義が大きい。そして、漢方薬の事前服用でうつを未然に防ぐことが可能であることが初めて示された本研究成果は、今後うつ病克服に向けた医療社会に漢方薬による治療が充分貢献できる可能性を示し、将来的には国民の心の健康維持、さらには健康寿命の延伸に繋がるものと期待したい。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that kososan, a Kampo medicine, prevents recurrent depression and enhances antidepressant-like effects in combination with an antidepressant milnacipran via attenuating neuroinflammation in social stress-induced depression-like model mice. We also found that senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice can serve as an animal model of a pre-symptomatic state for emotional disorders with aging, and that kososan prevents depressive-like behaviors, circadian rhythm disruption and neuroinflammation in SAMP8 mice. These results indicate that kososan has beneficial effects on recurrent depression and pre-symptomatic state for depression. These findings would be also expected to create novel therapeutic strategies for obviating the risk of depression in the future.

研究分野：漢方薬理学、精神医学

キーワード：漢方薬 香蘇散 社会的ストレス 再発うつ 未病 脳内炎症

1. 研究開始当初の背景

北里大学東洋医学総合研究所 (以下、東医研) では、科学的根拠が乏しい漢方薬を中心にトランスレーショナル・リサーチ (基礎研究から臨床へのフィードバック) を推進しており、その枠組みの中で我々は、漢方薬「香蘇散」の抗うつ効果並びにその作用機序について基礎研究を行っている。

これまでに我々は、環境ストレス負荷モデルや社会的ストレス負荷モデルによるうつ様モデルマウスを駆使し、香蘇散の抗うつ様効果を明らかにし、またその抗うつ様作用メカニズムに脳内オレキシン・ニューロペプチド Y 神経系制御、海馬神経新生並びに脳内炎症抑制が深く関与していることを見出している。

うつ病治療において再発うつは、患者の生活の質の低下やそれに伴う経済的損失に甚大な影響を与えるため社会問題になっている。また近年、病気を未然に防ぐ未病制御が注目されるようになったことから考えると、うつ病の再発の防止や未病段階で病気を食い止める取り組みは、医療費高騰に歯止めを掛けることにも繋がり、うつ病から波及する様々な社会問題の解決にも大いに貢献出来る可能性が考えられる。しかし近年、新たな作用機序を有するうつ病治療薬の研究開発は盛んに行われている一方で、うつ病の再発の予防や未病制御に関する研究はほとんど行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究課題では社会的ストレスモデルとして汎用されている chronic social defeat stress (CSDS) モデルマウス並びに老化促進マウス(SAMP8 マウス)を利用し、香蘇散のうつ症状に対する有用性が再発うつ病の予防や未病制御にまで及ぶかどうかについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) CSDS モデルマウスを用いた再発うつに対する漢方薬の予防効果

試験動物に BALB/c マウス (8 週齢, 雄性) を用い、5 日間 social defeat stress (SDS, 5 分間/日) を負荷することにより CSDS モデルマウスを作製した。Day 6 に自動行動解析装置 EthoVision を用いて social interaction (SI) 試験 (SI1) で現れる忌避行動によりうつ様マウスを選別した。香蘇散 (1 g/kg/日) 又はミルナシبران (既存の抗うつ薬, 60 mg/kg/日) は、うつ様マウスに連日経口投与した (Day 7-32)。抗うつ様効果は、Day 30 の SI 試験 (SI2) により評価した。また、Day 30 の SI 試験で忌避行動を示さなくなったマウス (回復マウス) に対して、Day 31 に再び SDS を単回負荷し (5 分間) Day 32 の SI 試験 (SI3) により忌避行動の再発を評価した。また、Day 34 に脳および血清を採取し、メカニズムの解析を行った。

(2) CSDS モデルマウスを用いた漢方薬と抗うつ薬の併用効果

試験動物に BALB/c マウス (8 週齢, 雄性) を用い、(1) と同様にうつ様マウスを選別した。香蘇散 (1 g/kg/日) 投与群、ミルナシبران (60 mg/kg/日) 投与群及び併用群に分け、薬物は 12 日間経口投与した (Day 7-18)。抗うつ様効果は、Day 17 の SI 試験並びに Day 18 の強制水泳試験 (FST) により評価した。Day 19 に灌流固定を施し、抗 Iba1、抗 NPY 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

(3) SAMP8 マウスを用いた未病評価系モデルの構築

試験動物に SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウス (正常老化マウス) を用い、8 並びに 17 週齢にうつ様行動、不安様行動、概日リズムを行動薬理的に評価した。また、炎症の評価は、血清、マウス脳における炎症関連蛋白の発現解析、またマウス脳から単離した microglia を用いた LPS 刺激炎症反応応答により行った。

(4) 未病評価系モデルを用いた漢方薬の未病に対する効果

SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウスに対して、8 週齢から香蘇散 (0.5 g/kg/日) を連日自由摂取させ、18 週齢の時点で不安様行動やうつ様行動を評価した。概日リズムは 8, 11, 13, 15, 18 週齢に評価した。また、脳内炎症の評価は行動試験後に単離 microglia を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 再発うつに対する漢方薬の予防効果

前回の科研費 (2014-2016 年度) の最終年度で、水又はミルナシبران投与ではストレスの再負荷によりうつ病の再発が認められたのに対し、香蘇散投与ではその再発が認められなかった結果を得ている。そこで、本研究課題ではそのメカニズムを調べた。Day 34 に血清中のストレスホルモンであるコルチコステロン (CORT) 量を測定したところ、香蘇散 (KS) 投与群ではミルナシبران (MIL) 投与群に比べて CORT 量の低下が認められた (図 1)。これは、香蘇散によるうつ病再発防止にストレスホルモンの抑制が一部関与している可能性を示している。

また、マウス脳の海馬領域による遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析したところ、KS と MIL で逆の動きをした遺伝子が幾つか見つかった (データ未提示)。これらにつ

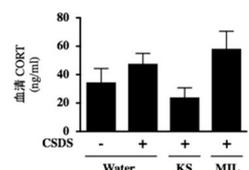


図 1 血清CORTレベル (平均±標準誤差 (n = 8-12))

いては、脳内炎症や行動変化との関連性を現在解析中である。

(2) 漢方薬と抗うつ薬の併用効果

CSDS モデルマウスを用いて、KS と MIL の併用効果を調べたところ、それぞれ単独では効果がなかったが、併用により忌避感などのうつ様行動が抑制された(図2A)。また、無気力感などのうつ様行動は、MIL 単独と併用群で抑制された(図2B)。

また、脳海馬領域において脳内炎症に深く関与する microglia (Iba1 陽性細胞) を免疫組織化学染色で解析したところ、MIL 単独と併用群で microglia 数が減少した(図3A)。一方、抗うつ活性や神経保護作用などが知られている神経ペプチド NPY に関しては、併用群でのみ NPY 陽性細胞の増加が認められた(図3B)。

以上の結果から、忌避行動に対する KS と MIL の併用効果には、海馬の NPY 神経系の制御が関与していることが示唆された。

(3) 未病評価系モデルの構築

当初は、CSDS を利用して未病評価系モデルの構築を計画していたが、実験条件を一定に揃え、かつモデル系の安定化が極めて困難であることが判明した。そこで、それに代わるモデル系として、老化促進兆候を示す SAMP8 マウスを利用し、加齢に伴う未病評価系の構築に取り組んだ。

まず、脳内炎症の開始時期を探るため、週齢の異なるマウス脳から単離した microglia を用いて、LPS 刺激による炎症反応性を調べた。その結果、4、8 週齢では差がなかったが、17 週齢に達すると、SAMR1 マウスに比べ SAMP8 マウスで、IL-6 や IL-1β の炎症性サイトカインレベルの上昇が認められた(図4)。

また、LPS 投与後の脳内炎症関連因子 NLRP3 発現量をウェスタンブロットで、ストレスホルモンレベルを血清中の CORT 量で解析したところ、8 週齢では差がなかったが、17 週齢で SAMR1 マウスと比べて SAMP8 マウスで増加が認められた(データ未提示)。

そこで次に、8 週齢と 17 週齢の比較を行動レベルで解析した。その結果、8 週齢ではほとんど差は認められなかったが、17 週齢でうつ様行動、不安様行動並びに概日リズムの異常が観察された(データ未提示)。以上の結果から、SAMP8 マウスは 17 週齢に達すると、脳内炎症や全身炎症を始め、うつや不安、概日リズム異常を呈することが示唆され、それより前の時期を未病期とすることができると考えられた(図5)。

(4) 漢方薬の未病に対する効果

構築した未病評価系モデルマウスに対して、8 週齢からの KS の事前長期投与が加齢性の情動異常などの病態を制御できるか調べた。

その結果、18 週齢の時点で不安様行動に対する KS の効果は認められなかったが、無気力などのうつ様行動に対しては有効性が発揮された(図6)。また、15 週齢の時点では、SAMP8 マウスで認められた概日リズム異常(暗期と明期の活動量の差の消失)が KS 投与によって、一時的に改善した(図7)。

脳内炎症反応についての解析では、SAMP8 マウス由来 microglia の LPS 刺激で増強された IL-6 レベルの増加は KS 投与群では認められなかった(図8)。

以上の結果から、未病期からの香蘇散の投与によって、加齢に伴って現れるうつ様行動や脳内炎症が抑制され、また概日リズム異常が一部改善した。

本研究課題では、CSDS モデルマウスを利用し、香蘇散投与で認められた再発うつに対する防止効果に、ストレスホルモンへの作用が関与すること、および脳内の様々な遺伝子の動きを捉えることができた。また、漢方薬と既存の抗うつ薬の併用によって、抗うつ効果の増強が得られ、そのメカニズムの一部も明らかにした。これらの成果は、うつ症状に対して漢方薬が予防的かつ補助的に作用する可能性を示し、再発うつも含めた今後のうつ病治療戦略に役立てられるものと期待する。そして、新たに構築した未病評価系モデルを用いて、これまでほとんど明らかにされていなかった未病に対する漢方薬の効果の科学的なエビデンスは、予防医学に注目が集まっている現代において、大いに活かされることが予想され、将来的には健康寿命の延伸に役立てられることが期待できる。

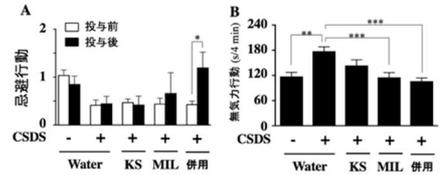


図2 うつ様行動への影響 A, S1試験における忌避行動, B, FSTにおける無気力行動 平均±標準誤差 (n=5-17) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

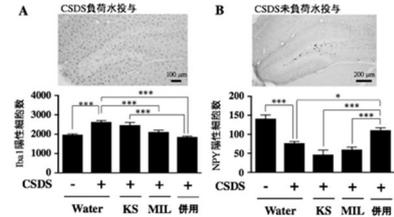


図3 免疫染色の結果 A, 脳海馬領域におけるIba1陽性細胞, B, 脳海馬領域におけるNPY陽性細胞 平均±標準誤差 (n=5-17) *P<0.05, ***P<0.001

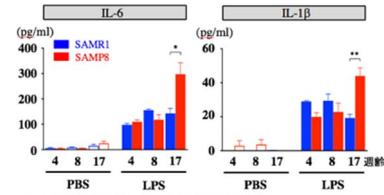


図4 LPS刺激によるmicrogliaの炎症反応応答性 平均±標準誤差 (n=3-4) *P<0.05, **P<0.01



図5 SAMP8マウスを用いた未病評価系モデル

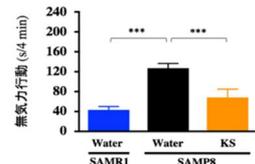


図6 無気力行動に及ぼすKSの効果 平均±標準誤差 (n=10-12) ***P<0.001

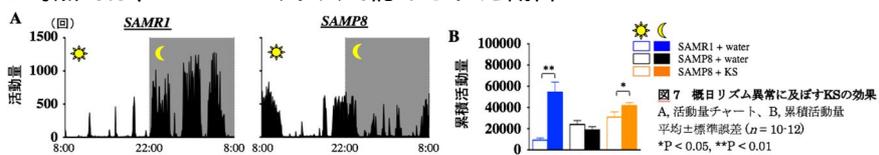


図7 概日リズム異常に及ぼすKSの効果 A, 活動量チャート, B, 累積活動量 平均±標準誤差 (n=10-12) *P<0.05, **P<0.01

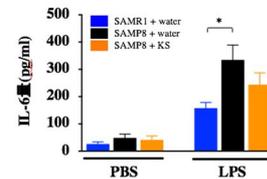


図8 LPS刺激炎症応答に対するKSの効果 平均±標準誤差 (n=4) *P<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoki Ito, Eiji Hirose, Tatsuya Ishida, Atsushi Hori, Takayuki Nagai, Yoshinori Kobayashi, Hiroaki Kiyohara, Tetsuro Oikawa, Toshihiko Hanawa and Hiroshi Odaguchi	4. 巻 14
2. 論文標題 Kososan, a Kampo medicine, prevents a social avoidance behavior and attenuates neuroinflammation in socially defeated mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-017-0876-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤直樹、竹元裕明、長谷川綾那、杉山千佳、藤田里奈、小口晴美、永井隆之、小林義典、清原寛章、及川哲郎、小田口浩
2. 発表標題 SAMP8マウスを利用した未病評価モデルとしての可能性
3. 学会等名 第34回SAM学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤直樹、長谷川綾那、杉山千佳、永井隆之、清原寛章、及川哲郎、小田口浩
2. 発表標題 老化促進マウスを用いた香蘇散の未病制御
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 うつ症状に対する漢方薬の再発予防効果および未病制御の基礎研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 ストレスおよび加齢モデル動物を用いた薬効および病態評価系～うつ症状に対する漢方薬の薬効解析～
3. 学会等名 食・触コンソーシアム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤直樹、竹元裕明、長谷川綾那、杉山千佳、永井隆之、小林義典、清原寛章、及川哲郎、小田口浩
2. 発表標題 老化促進マウスを利用した未病動物モデルとしての可能性
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤直樹、廣瀬栄治、永井隆之、清原寛章、及川哲郎、小田口浩
2. 発表標題 漢方方剤「香蘇散」の社会的ストレス誘発うつ様行動の再発防止効果
3. 学会等名 第34回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 ストレス社会における漢方方剤の位置づけ -ストレスモデル動物を用いた基礎研究から見てきた漢方方剤「香蘇散」の役割-
3. 学会等名 日本生薬学会第64回年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤直樹, 廣瀬栄治, 長谷川綾那, 永井隆之, 清原寛章, 及川哲郎, 小田口浩
2. 発表標題 社会的ストレス誘発うつ様行動に対する漢方方剤「香蘇散」と抗うつ薬の併用による治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永井 隆之 (NAGAI Takayuki)		