

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790463
 研究課題名 (和文) 香蘇散の抗うつ様作用メカニズム -脳内オレキシンと神経新生との
 関連性-
 研究課題名 (英文) A possible mechanism underlying an antidepressive-like effect of
 kososan -A association of orexin-A with neurogenesis-
 研究代表者
 伊藤 直樹 (ITO NAOKI)
 北里大学・東洋医学総合研究所・研究員
 研究者番号：00370164

研究成果の概要：本研究課題で我々は、新たな生理的な活性として、OX-A に海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用を介した抗うつ様作用が存在する可能性を初めて示唆した。このことは新たな作用機序を有する抗うつ薬の開発に役立つものと考えられる。またこれまでに、漢方方剤である香蘇散が脳内 OX-A 発現挙動に対して作用を示した結果が得られていることから、本研究課題で得られた結果は、香蘇散の抗うつ様作用メカニズムの探索に役立つと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	420,000	3,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード：香蘇散、抗うつ様作用メカニズム、オレキシン、神経新生

1. 研究開始当初の背景

当研究所では、古くからうつ症状を呈する患者に対して気剤を中心とした治療を行っており、一定の臨床効果を上げている。これまで気剤のうつ症状に対する効果を示した EBM はほとんどなかったが、最近我々は動物モデルを用いた基礎研究において、代表的な気剤である香蘇散が抗うつ様作用を示し、さらにその作用メカニズムの可能性を初めて報告した。本研究は、すでに臨床で有効性が示唆されているにも関わらず、その EBM が乏しい漢方処方を対象に、その科学的根拠を基礎実験で明らかにすることを大きな枠組みとしている。その中で我々は、香蘇散のう

つ症状に対する作用及びその作用メカニズムの解明をテーマに研究を行っている。

2. 研究の目的

これまでに、香蘇散の抗うつ様作用メカニズムの一つとして視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis) の過剰亢進の抑制及び脳内神経新生の促進作用を示してきた。また、近年うつ病との関連性が示唆されている脳内神経ペプチドである orexin-A (OX-A) 発現挙動に対しても香蘇散が作用した結果が得られている。HPA axis と神経新生及び HPA axis と OX-A の関連性を示した報告は数多くあるが、神経新生と OX-A の関連性については全く報告がない。則ち、それを明らかにするこ

とによって香蘇散によって認められた OX-A 発現挙動が、香蘇散の抗うつ様作用メカニズムにどのように関与しているかが明らかになるものと考えられる。そこで、神経新生と OX-A の関係を明らかにするために、(1) 神経新生が促進されている状態として知られている副腎摘出モデルマウスを用いた OX-A 発現への影響及び (2) OX-A 脳室内投与 (単回投与) における神経新生への影響を検討した。また、当初の計画では、平成 20 年度では OX-A 脳室内投与 (反復投与) における神経新生への影響も検討する予定であったが、19 年度の OX-A 脳室内投与 (単回投与) で得られた結果を踏まえた上で、さらにその作用メカニズムの詳細を解明することの方が重要かつ先決であると判断し、(3) OX-A 脳室内投与 (単回投与) における増殖性細胞の分化に与える影響、(4) OX-A 誘導抗うつ様効果に対するオレキシン受容体 (OXR1) 阻害剤の影響、(5) OX-A 誘導細胞増殖促進作用に対する OXR1 阻害剤の影響、及び (6) 初代培養神経系前駆細胞の増殖能に対する OX-A の影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 副腎摘出モデルマウスを用いた OX-A 発現への影響

吸入麻酔下、ddY 系雄性マウスを用いて副腎摘出モデルマウスを作製した。作製後 8 日後に採血し、血中コルチコステロン量を ELISA 法にて測定した。また、作製後 7、8 日目に、神経系前駆細胞のような増殖性細胞のマーカとなる bromodeoxyuridine (BrdU) (100 mg/kg) を腹腔内投与し、最終投与 4 時間後及び 27 日後に灌流固定を施し、脳を採取した。固定脳を 50 μm に薄切し、BrdU 及び OX-A に対する抗体を用いて免疫染色した後、海馬における BrdU 及び視床下部外側野における OX-A 陽性細胞数をカウントした。

(2) OX-A 脳室内投与 (単回投与) における神経新生への影響

ネブタール麻酔下、定位固定装置を用いて ddY 系雄性マウスに OX-A (14, 140 pmol/2 μL) を脳室内投与した。投与 4 日後に強制水泳試験による無動時間及びオープンフィールド試験による自発運動量を測定することにより、抗うつ様効果を評価した。投与 3、4 日後に BrdU (100 mg/kg) を腹腔内投与し、最終投与 3 時間後に採血及び灌流固定を施し、脳を採取した。血中コルチコステロン量は ELISA 法にて測定した。固定脳を 50 μm に薄切し、BrdU に対する抗体を用いて免疫染色した後、海馬における BrdU 陽性細胞数をカウントした。また、海馬に OXR1 が発現しているかどうかを免疫染色にて確認した。

(3) OX-A 脳室内投与 (単回投与) における増殖性細胞の分化に与える影響

ddY 系雄性マウスに OX-A (140 pmol/2 μL) を脳室内投与した翌日に BrdU (200 mg/kg) を腹腔内投与し、14 日後に灌流固定を施し、脳を採取した。固定脳を 50 μm に薄切し、BrdU 並びに DCX (未熟ニューロンのマーカー) に対する抗体を用いて発色二重染色し、海馬における BrdU/DCX 陽性細胞数をカウントした。

(4) OX-A 誘導抗うつ様効果に対する OXR1 阻害剤の影響

ddY 系雄性マウスに OX-A (140 pmol/2 μL) を脳室内投与する 1 時間前及び 24 時間後に OXR1 特異的阻害剤 SB-334867 (30 mg/kg) を腹腔内投与した。OX-A 投与 3 日後にオープンフィールド試験による自発運動量、及び OX-A 投与 4 日後に強制水泳試験による無動時間を測定した。

(5) OX-A 誘導細胞増殖促進作用に対する OXR1 阻害剤の影響

ddY 系雄性マウスに OX-A (140 pmol/2 μL) を脳室内投与する 1 時間前及び 24 時間後に OXR1 特異的阻害剤 SB-334867 (30 mg/kg) を腹腔内投与した。また、OX-A 投与 3、4 日後に BrdU (100 mg/kg) を腹腔内投与し、最終投与 3 時間後に灌流固定を施し、脳を採取した。固定脳を 50 μm に薄切し、BrdU 及び neuropeptide Y (NPY) に対する抗体を用いて免疫染色した後、海馬における BrdU 及び NPY 陽性細胞数をカウントした。

(6) 初代培養神経系前駆細胞の増殖能に対する OX-A の影響

ラット胎児脳より調製した神経系前駆細胞に OX-A (終濃度 0.1, 1.0, 20, 100 ng/mL) を添加し、5%CO₂, 37 °C で 2 日間培養した。2 日後、Alamar Blue 試薬を用いて、神経系前駆細胞の増殖能を測定した。また、神経系前駆細胞に OXR1 タンパク質が発現しているかどうかを Western blot 法にて確認した。

4. 研究成果

(1) 副腎摘出モデルマウスを用いた OX-A 発現への影響

コルチコステロンは副腎から分泌されており、様々な生体反応に関与している。その中で、過剰量のコルチコステロンは、脳内の海馬で起きている神経新生を低下させることが知られている。副腎を摘出することによってその神経新生が促進されることが報告されていることから、本研究では副腎摘出で神経新生が促進しているマウスを用いた時に脳内の OX-A 発現挙動がどのような影響を受けるかを検討した。

副腎摘出 8 日後のマウス (ADX) の血中コルチコステロン量は、sham 群 (コントロール群) と比べて有意に減少した (図 1)。

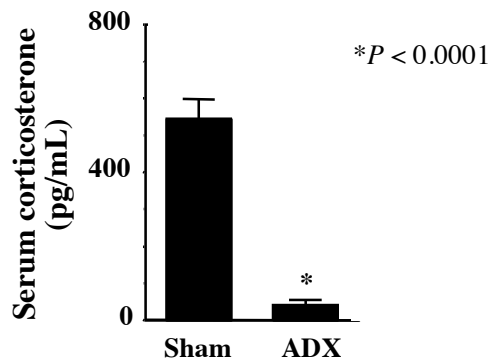


図 1 血中コルチコステロン量

また、副腎摘出 8 日後及び 35 日後の海馬 BrdU 陽性細胞数は、sham 群と比べて増加した。これらのことから、副腎摘出モデルマウスが作製できたと考えられた (図 2)。

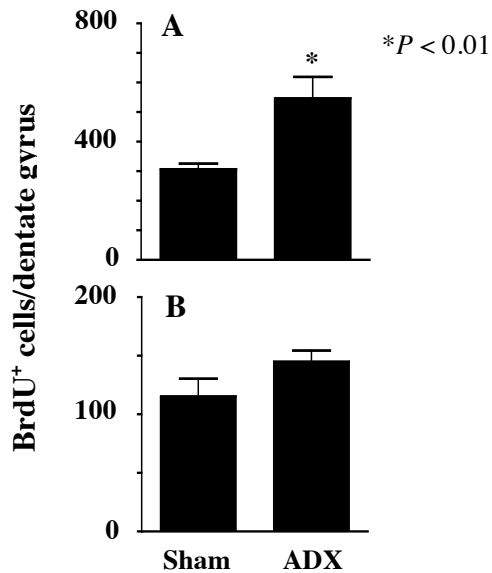


図 2 海馬 BrdU 陽性細胞数 (A, 8 日後; B, 35 日後)

この副腎摘出モデルマウスを用いて、脳内視床下部外側野の OX-A 発現挙動を検討したところ、sham 群と比べて OX-A 陽性細胞数に差は認められなかった。これらのことから、神経新生促進状態では、OX-A 発現挙動は影響を受けない可能性が示唆された。

(2) OX-A 脳室内投与 (単回投与) における神経新生への影響

強制水泳試験は、抗うつ薬のスクリーニング法として頻用されている試験法である。抗うつ薬又はカフェインや覚醒剤のような自律神経系を興奮されるような薬物は強制水泳試験で観察される動物の無動状態 (泳ぐ事

を止め、ただ水に浮いているだけの状態) の時間を短縮させる。また、オープンフィールド試験は、自発運動量を測定する試験であり、自律神経系を興奮されるような薬物は自発運動量を亢進させるが、抗うつ薬にはそのような作用はない。則ち、抗うつ薬又は抗うつ効果を有する薬物は一般的に自発運動量に影響を与えることなく、強制水泳試験による無動時間を短縮させる作用を有する必要がある。したがって、OX-A が抗うつ様効果を有するかどうかを検証するために、OX-A 投与 4 日後に強制水泳試験及びオープンフィールド試験を行った。

強制水泳試験において、OX-A (140 pmol) 投与群は生理食塩水 (saline) 投与群と比べて、無動時間の有意な短縮が認められた (図 3)。一方、オープンフィールド試験においては、OX-A (14, 140 pmol) 投与群と saline 投与群では、総移動距離及び総移動時間に差は認められなかった (図 4)。これらの結果は、OX-A が抗うつ様効果を発揮する可能性があることを初めて示唆した。

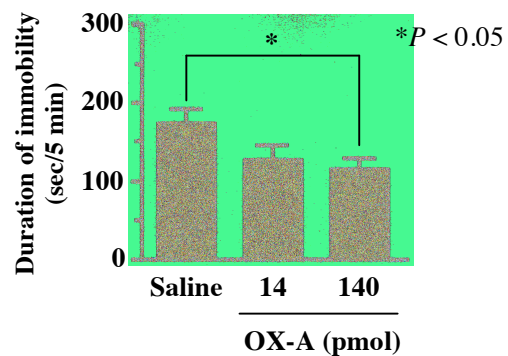


図 3 OX-A の強制水泳試験における無動時間への影響

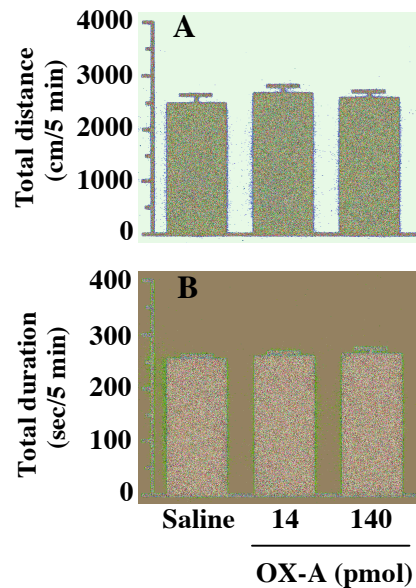


図 4 OX-A のオープンフィールド試験における (A) 総移動距離及び (B) 総移動時間への影響

抗うつ薬の作用メカニズムの一つとして、近年抗うつ薬の海馬神経新生促進作用の関与が注目を集めている。そこで、OX-A の抗うつ様作用メカニズムを探索するために、脳内の海馬領域における神経新生に与える OX-A の影響を検討した。

神経新生とは、新たに生まれた細胞が増殖し、機能的に働く細胞（ニューロン、グリア細胞）に分化することを意味する。本研究では、先ず OX-A の細胞増殖に与える影響を増殖性の細胞の DNA に速やかに取り込まれる BrdU を用いて検討した。

その結果、OX-A (140 pmol) 投与群では saline 投与群と比べて、海馬歯状回における BrdU 陽性細胞の有意な増加が認められた(図 5)。このことから、OX-A は神経系前駆細胞のような増殖性細胞の増殖を有意に促進することが示唆された。

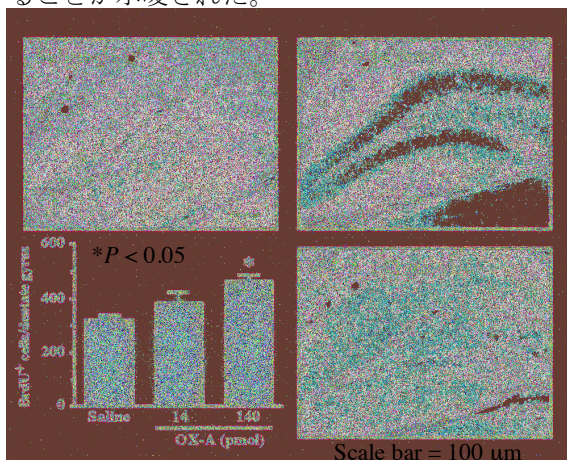


図 5 OX-A の BrdU 陽性細胞数に与える影響

また、OX-A の血中コルチコステロン量に与える影響を検討したところ、OX-A 投与群と saline 投与群ではその量に差は認められなかった(図 6)。このことは、OX-A で認められた細胞増殖促進作用が、血中コルチコステロン量の減少を介する作用でないことを示唆する。

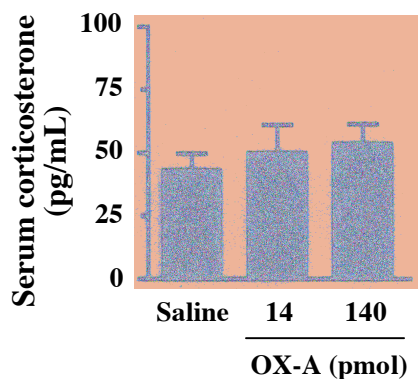


図 6 OX-A の血中コルチコステロン量に与える影響

海馬における OXR1 は、CA1~3 領域だけでなく、神経新生が盛んに起こっている歯状回の hilus 及び顆粒細胞層 (GCL) 付近に存在する細胞上に多く発現していた(図 7)。このことは、OX-A 投与で認められた抗うつ様効果及び細胞増殖促進作用が海馬領域に発現している OXR1 を介して発揮されている可能性を示唆している。

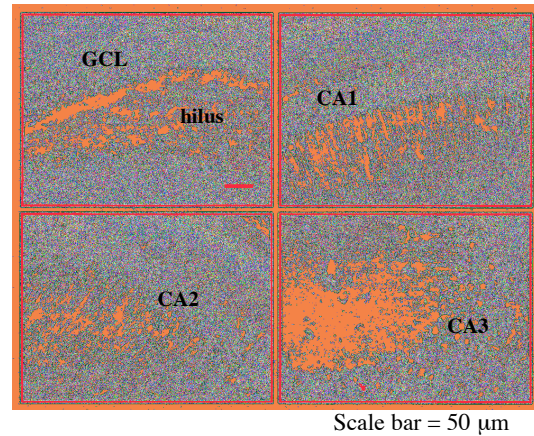


図 7 OX-A の BrdU 陽性細胞数に与える影響

(3) OX-A 脳室内投与(単回投与)における増殖性細胞の分化に与える影響

次に、OX-A が海馬における増殖性細胞の分化にどのような影響を与えるかを検討した。

その結果、OX-A 投与 15 日後に未熟なニューロンに分化した細胞数(BrdU/DCX 陽性細胞数)は、saline 投与群と比べてほとんど差はなかった(図 8)。このことから、OX-A は増殖性細胞の分化には影響を与えないことが示唆された。

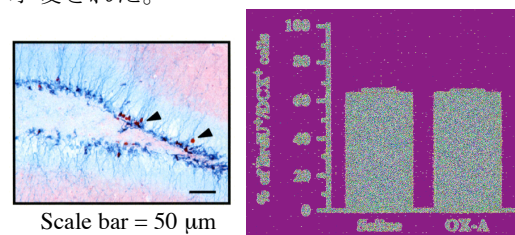


図 6 OX-A の増殖性細胞の分化に与える影響

茶褐色; BrdU 陽性細胞
青色; DCX
矢印; BrdU/DCX 陽性細胞

(4) OX-A 誘導抗うつ様効果に対する OXR1 特異的阻害剤の影響

OX-A 投与によって認められた抗うつ様効果が OXR1 の阻害剤である SB-334867 投与によって、どのような影響を受けるかを強制水泳試験及びオープンフィールド試験を用いて検討した。

その結果、OX-A 投与で認められた強制水泳試験における無動時間短縮作用は、SB-334867 投与によって完全に阻害された (図 7A)。しかし、オープンフィールド試験における総移動距離及び総移動時間は、どの群間においても差は認められなかった (図 7B, C)。これらのことから、OX-A の抗うつ様効果は、OXR1 を介して発揮されることが示唆された。

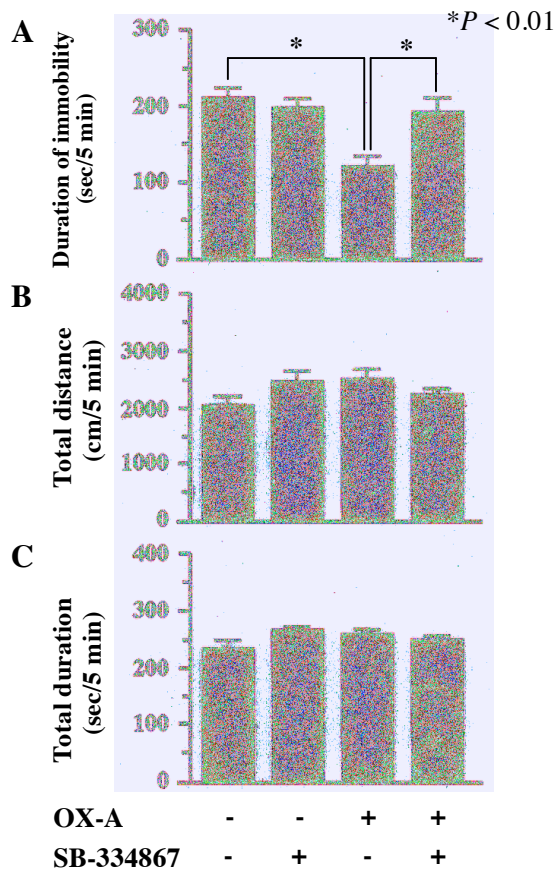


図 7 OX-A 誘導抗うつ様効果に対する OXR1 阻害剤の影響
(A) 無動時間 (強制水泳試験)
(B) 総移動距離 (オープンフィールド試験)
(C) 総移動時間 (オープンフィールド試験)

(5) OX-A 誘導細胞増殖促進作用に対する OXR1 阻害剤の影響

OX-A 投与によって認められた細胞増殖促進作用が SB-334867 投与によって、どのような影響を受けるかを検討した。

その結果、OX-A 投与で認められた細胞増殖促進作用は、SB-334867 投与によって完全に阻害された (図 8)。これらのことから、OX-A の細胞増殖促進作用は、OXR1 を介して発揮されることが示唆された。

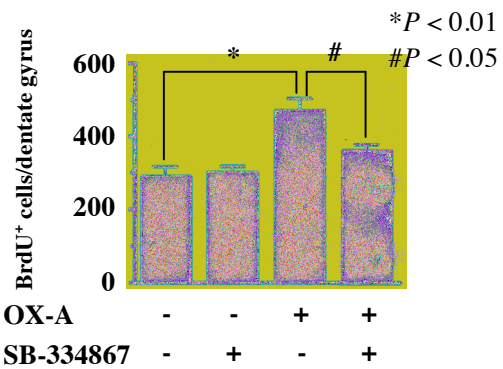


図 8 OX-A 誘導細胞増殖促進作用に対する OXR1 阻害剤の影響

これまで OX-A の抗うつ様効果及び海馬の細胞増殖促進作用を報告したものはほとんどなかったが、OX-A と同じような生理活性 (摂食促進作用) を有し、OX-A によって活性化される神経ペプチドである NPY は、抗うつ様効果及び海馬の細胞増殖を促進する作用を有することが数多く報告されている。また、NPY 産生ニューロンは弓状核だけでなく、海馬にも存在する。そこで、OX-A が海馬の NPY 発現挙動に影響を与えるかどうかを検討した。

その結果、OX-A 投与群で saline 投与群と比べて、海馬 hilus 領域における NPY 陽性細胞数の有意な増加が認められた。また、その増加作用は SB-334867 投与によって完全に阻害された (図 9)。これらのことから、OX-A は OXR1 を介して海馬の NPY 発現量を増加させることが示唆された。また、この作用を介して、OX-A は抗うつ様効果及び海馬の細胞増殖促進作用を示すのかもしれない。

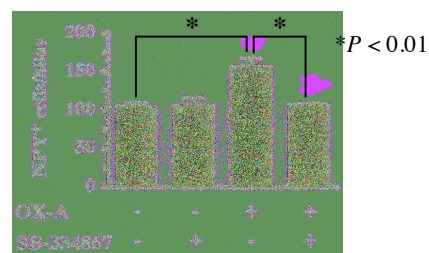
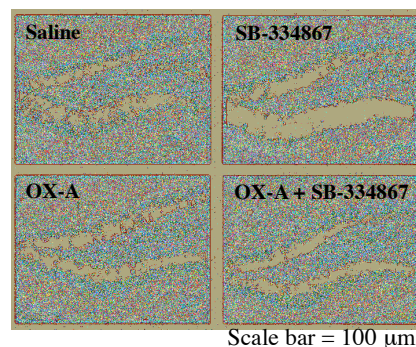


図 9 OX-A の海馬 NPY 陽性細胞数に対する作用及び OXR1 阻害剤の影響

また、NPY の摂食促進作用は、視床下部に投射している NPY 産生ニューロンの軸索密度の上昇が関与している。そこで、OX-A によって増加した海馬 NPY 発現量の増加が、視床下部での NPY 産生ニューロン軸索密度の上昇にまで影響が及ぶかどうかを検討した。

その結果、NPY 産生ニューロン軸索密度は OX-A 投与によって影響を受けなかった (図 10)。このことから、OX-A は海馬の NPY 発現挙動に対して特異的に作用することが示唆された。

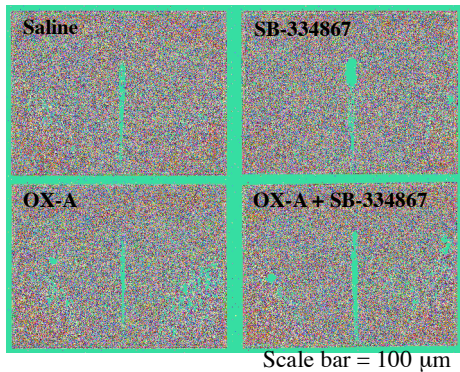


図 10 OX-A の視床下部 NPY 産生ニューロン軸索密度に対する影響

(6) 初代培養神経系前駆細胞の増殖能に対する OX-A の影響

これまで、OX-A が海馬の NPY 発現挙動を介して細胞増殖促進作用を発揮する可能性を示してきた。そこで次に、OX-A 自体に直接的な細胞増殖促進作用があるのかどうかを初代培養神経系前駆細胞を用いた *in vitro* 系で検討した。

その結果、ポジティブコントロールで用いた EGF (10 ng/mL) 添加では神経系前駆細胞の顕著な増殖促進作用が認められたのに対し、OX-A 添加ではいずれの濃度においても神経系前駆細胞の増殖には影響を与えなかった (図 11)。

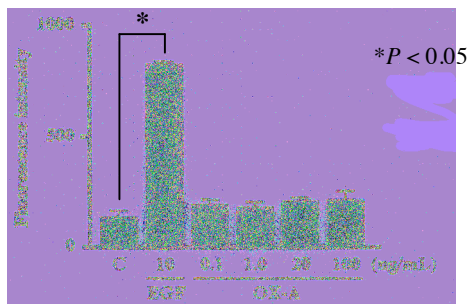


図 11 初代培養神経系前駆細胞の増殖能に対する OX-A の影響

また、初代培養した神経系前駆細胞を用いて OXR1 タンパク質の発現を western blot 法で検討したところ、その発現は全く認められなかった (図 12)。これらのことから、OX-A は神経系前駆細胞上に OXR1 が発現していないため、その増殖には直接作用しないことが示唆された。



図 12 Western blot 法による OXR1 タンパク質発現の検討

NPCs ; 初代培養神経系前駆細胞
AMB ; マウス脳抽出物 (ポジティブコントロール)

以上のことから、OX-A は神経新生の結果増加するものではなく、OX-A 自体に間接的な抗うつ様効果及び海馬における細胞増殖を促進させる作用があることが初めて示された。また、OX-A のこれらの作用に NPY 神経系の調節作用が一部関与している可能性が示唆されたが、その詳細は今後の課題である。

本研究課題で我々は、OX-A の新たな生理活性として、海馬細胞増殖促進作用を介した抗うつ様作用を提言できたと考えられた。このことは新たな作用機序を有する抗うつ薬の開発に役立つと考えられる。またこれまでに、香蘇散が脳内 OX-A 発現挙動に対して影響を与えた結果が得られていることから、本研究課題で得られた結果を香蘇散の抗うつ様作用メカニズムの、より詳細な解明に役立てていく予定である。

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 1 件)

Ito N., Yabe T., Gamo Y., Nagai T., Oikawa T., Yamada H. and Hanawa T., I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation. *Neuroscience*, **157**, 720-732, 2008. (査読 有)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 伊藤直樹, Orexin A の抗うつ様作用メカニズムの解析—Neuropeptide Y の関与—, 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会、2008/8/1-3、品川

② 伊藤直樹、Orexin A 脳室内投与の神経幹細胞挙動及びマウス行動に与える影響、第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会合同年会、2007/7/11-13、札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 直樹 (ITO NAOKI)

北里大学・東洋医学総合研究所・研究員

研究者番号：00370164

(2)研究協力者

花輪 壽彦 (HANAWA TOSHIHIKO)

北里大学・東洋医学総合研究所・所長

研究者番号：40164892

及川 哲郎 (OIKAWA TETSURO)

北里大学・東洋医学総合研究所・部長

研究者番号：10370165

山田 陽城 (YAMADA HARUKI)

北里大学・北里生命科学研究所・所長

研究者番号：60096691

矢部 武士 (YABE TAKESHI)

北里大学・北里生命科学研究所・講師

研究者番号：40239835

永井 隆之 (NAGAI TAKAYUKI)

北里大学・北里生命科学研究所・講師

研究者番号：172487