

機関番号：33303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790479

研究課題名（和文）慢性疲労症候群の漢方治療における中枢神経系の再生機構

研究課題名（英文）Analysis of the brain pathophysiology in chronic fatigue syndrome.

研究代表者

守屋 純二 (MORIYA JUNJI)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：70460368

研究成果の概要（和文）：慢性疲労症候群（Chronic Fatigue Syndrome：CFS）は原因不明の微熱を伴う強い疲労感を主症状とし、著しく生活の質が損なわれる疾患群である。CFS の症状は中枢神経系の病理的変化を伴っていることが推測されているが詳細は不明であり、適切な動物モデルが確立していない疾患である。我々は *Brucella Abortus* 抗原を用いて 2 週間間隔で計 6 回の尾静脈内反復投与（0.2ml/回）を行い CFS のマウスモデルを作成。正常対照群と比較し持続した運動量の低下を示した。このモデルを用いて中枢神経系を構造的、機能的に分析した結果、脳萎縮の存在、脳内 Bcl-2、BDNF の遺伝子発現低下が判明し、モデルの活動性低下に伴う変化と考えられた。これに葡萄やピーナツに含まれるポリフェノールの一種で、抗老化遺伝子とされる Sirt1 活性化作用を有する Resveratrol (RSV) を治療に用いた結果、モデルの海馬には構造的、機能的な変化が存在しており、RSV による症状改善、細胞死抑制効果、神経新生誘導が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Several accompanying symptoms reported by chronic fatigue syndrome (CFS) patients, suggest that the central nervous system (CNS) may be involved in the pathophysiology of the syndrome. We established a mouse model of chronic fatigue by 6 times injection of *Brucella abortus* (BA) antigen every 2 weeks. We have found that brain atrophy and reduced mRNA levels for hippocampal Bcl-2 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA were accompanied by lower spontaneous activity in the model. Resveratrol (RSV), polyphenolic activator of sirtuin 1 (Sirt1) and active component of grapevines and peanuts, was used for the treatment of this model. So we hypothesized that hippocampal structural and/or functional defects existed in our mouse model of chronic fatigue. Furthermore, treatment with RSV may improve fatigue, and reverse the abnormalities by anti-apoptotic activity and promoting neurogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：東洋医学 慢性疲労症候群（Chronic Fatigue Syndrome） Resveratrol

## 1. 研究開始当初の背景

慢性疲労症候群 (Chronic Fatigue Syndrome: CFS) は原因不明の微熱を伴う強い疲労感を主症状とし、著しく生活の質が損なわれる疾患群である。原因不明の慢性疲労をいかに診療して行くかは医学的観点からのみならず経済学的観点からも大きな問題となってきた。本疾患の原因仮説は現在も様々であり、先行するウイルス感染や慢性的なストレスに暴露することによる内分泌系、神経系の変調などが起因している事などがあげられているが詳細は未だ不明である。治療法においても認知行動療法、漢方薬、ビタミン剤、抗ウイルス薬などが用いられているが効果は様々であり、治療法は確立していないのが現状である。

我々は先に 2 週間隔の Brucella Abortus 抗原を 6 回の尾静脈内反復投与 (0.2ml/回) を行う事により CFS のマウスモデルを作成した。モデルは慢性に経過し、9 ヶ月以上持続する活動性の低下、リンパ節腫脹 (脾臓重量増加)、微熱などヒトの同疾患における臨床診断基準に合致していた。本モデルにより CFS の病因、病態の解明及び漢方薬の有効性を確認する目的で、漢方薬 (補中益気湯; TJ-41) を投与した。治療により活動性の上昇、夜間運動量の改善、脾臓の IFN- $\gamma$  mRNA 発現の上昇が確認され、CFS の病態には免疫系の異常が関連し、漢方治療により症状の改善を認め、Th1/Th2 バランスを正常化させていることが示された。更にこのモデルでは脳重量は統計上有意差を示さなかったが、正常対照群と比較し減少傾向にあり、BDNF mRNA と Bcl-2 の mRNA 発現量が海馬領域で有意に低下していた (Moriya J. et al J. Kanazawa Med. Univ. 31:263-268, 2006)。また同疾患の近年の研究では、臨床症状に類似した点の多いヒトのうつ病でみられる脳内 BDNF、Bcl2 遺伝子発現の低下、それによるアポトーシスの誘導による海馬の容積減少、同部の血流低下による精神活動、認知機能の低下など中枢神経系における変化も推定されている (Sasaki T. et al J. Neurosci. Res. Nov 1;84(6):1187-96 2006)。中枢神経系の変化を CFS マウスモデルを用いてさらに詳細な病態を解析し、漢方薬を用いてその治療効果を確認することは同疾患の解明に有用であると考えた。

## 2. 研究の目的

慢性疲労症候群の多様な臨床症状や現在までの研究から、その病態は中枢神経系、免疫系の変調が関与しているものと考えられている。しかし確立した治療法がないため漢方薬など生薬による治療効果の検証とその作用機序の解明を目標に、CFS マウスモデルを用いて中枢神経系の変化を形態的、機能的

に解析する。同疾患で脳障害があるとの仮説により、MRI を用いた画像分析による容積変化など、形態変化を評価する。また脳由来神経栄養因子 (BDNF) や cAMP 応答配列結合タンパク (Creb 系) に注目し、海馬における遺伝子発現を確認する。CFS マウスモデルを用いて治療を行い、活動レベルへの効果、脳形態改善、BDNF/Creb 系の主要分子の発現修飾によるアポトーシス抑制、神経新生効果を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

8 週齢雌の Balb/c マウスを用いて Brucella Abortus 抗原 (0.2ml/回) を 2 週間隔で計 6 回の尾静脈内投与し、CFS マウスモデルを作成する。このモデルと正常対照群と比較し、回転式運動量測定装置を用いて自発的な運動量を観察する。2 週間の観察期間においてモデルの慢性に持続した運動量の低下を確認した後、MRI にて中枢神経系、特に認知機能中枢である海馬領域の形態的な変化を確認する。さらに機能的変化を分析するため脳内 BDNF/CREB 系における遺伝子発現がどう活性化、または制御を受けるかを解析し、CFS の中枢神経系の病態を更に詳細に解析する。その後、マウスモデルに漢方薬や生薬を用いた治療を行い、中枢神経系の障害が軽減されるかを検討する。作成した CFS マウスモデルの治療として、赤ワインやブドウ果皮などに含まれるポリフェノールであり抗酸化作用や遺伝子突然変異抑制効果があるとされる Resveratrol (RSV) を治療に用いた。これは近年認知症などの中枢神経症状、動脈硬化予防などに有効であると報告されており (Baur JA. et al 2006. Nature 444:337-342)、素材としてタデ科植物のイタドリ (*Polygonum cuspidatum*) があり、漢方薬として利用されている。CFS は意欲や集中力の低下など認知機能の障害を伴い、組織的にも脳萎縮を来す疾患である事など、うつ病や認知症に類似した点が多いことから同薬の治療効果を期待し選択した。

CFS モデル群 (n=7)、CFS モデル治療群 (n=8)、正常対照群 (n=8) の 3 群に分け、治療群では 4 週間の期間 40mg/kg/day の RSV を経口投与した。RSV を用いた治療による中枢神経系への改善効果を MRI で確認し、また脳内 BDNF と受容体発現誘導からの脳再生作用を確認する。さらにアポトーシス抑制因子の Bcl-2 の抑制効果を脳内で明らかにする。脳内 BDNF と受容体発現誘導と共に、関連する複数の転写活性因子を測定しその発現の変化を確認する。方法は海馬領域の組織内遺伝子発現、免疫組織染色を用いる。

#### 4. 研究成果

CFS マウスモデルに対して RSV 投与した結果：作成した治療群では他群と比較し、マウスモデルの自発的運動量は有意な差を示して改善した。また MRI における萎縮した海馬容積の改善を認め、海馬重量の有意差からも確認できた。海馬領域の BDNF、Sirt1 遺伝子発現が亢進し、P53 のアセチル化が抑制されていた。海馬組織の病理的变化として、BrDU ラベリング、TUNEL 染色を行い解析した結果、CFS モデル群では TUNEL 染色にてアポトーシスの亢進、BrDU ラベリングでは神経新生が他群間の比較でみられ、治療群ではアポトーシス低下、神経新生亢進が認められた。この変化は海馬における Sirt1 活性促進による P53 脱アセチル化の亢進による効果が推測された。CFS マウスモデルを解析する事により、CFS は中枢神経系の形態的、機能的な変化をきたす疾患であり、RSV 投与はその病態や症状を改善させる治療となる可能性が示唆された。以上の成果を論文として報告した (Moriya J et al. Biol Pharm Bull 34 (3): 354-359, 2011)。

今後の展望として、マウスモデルを用いた更なる CFS の中枢神経系における病態解明、確立した治療法のない CFS に対する治療の有効性を脳活性化の分野から更に検討を進めていき、また RSV などこれらに有効と推測される治療法についての検証が重要な課題であると考えられる。以上より、今後は CFS と臨床症状、病態的に類似する点の多い認知症、うつ病などに対し、漢方薬および SSRI など臨床的に用いられる治療による効果を比較、検証し、脳再生による CFS の有効な治療法となる可能性を検討する。CFS における詳細な病態が解明され、有効な治療が広く社会に普及し患者の症状が改善することによる ADL の向上、そして早期の社会復帰が可能となることが本研究の目的であり、また比較的安価である漢方薬や生薬を用いることによる経済効果も期待できる。

#### 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 6 件)

① J. Moriya, R. Chen, J. Yamakawa, K. Sasaki, Y. Ishigaki, T. Takahashi: Resveratrol improves hippocampal atrophy in chronic fatigue mice by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells., Biol. Pharm. Bull., 査読有, 34 (3): 354-359, 2011.

② R. Chen, J. Moriya, J. Yamakawa, T. Takahashi, T. Kanda: Traditional chinese medicine for chronic fatigue syndrome., Evid. Based Complement. Alternat. Med., 査読有, 7:3-10, 2010.

③ R. Chen, J. Moriya, X. Luo, J. Yamakawa, T. Takahashi, K. Sasaki, F. Yoshizaki: Hochu-ekki-to combined with interferon-gamma moderately enhances daily of chronic fatigue syndrome mice by increasing NK cell activity, but not neuroprotection., Immunopharmacol. Immunotoxicol., 査読有, 31:238-245, 2009.

④ J. Yamakawa, Y. Ishigaki, F. Takano, T. Takahashi, J. Yoshida, J. Moriya, T. Takata, T. Tatsuno, K. Sasaki, T. Ohta, T. Takegami, F. Yoshizaki: The kampo medicines orengedokuto, bofutsushosan and boiogito have different activities to regulate gene expressions in differentiated rat white adipocytes: comprehensive analysis of genetic profiles., Biol. Pharm. Bull., 査読有, 31:2083-2089, 2008.

⑤ R. Chen, F. Liang, J. Moriya, J. Yamakawa, T. Takahashi, L. Shen, T. Kanda: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their agonists for hypertension and heart failure: Are the reagents beneficial or harmful?. Int. J. Cardiol., 査読有, 130: 131-139, 2008.

⑥ R. Chen, F. Liang, J. Moriya, J. Yamakawa, H. Sumino, T. Kanda, T. Takahashi: Chronic fatigue syndrome and the central nervous system, J. Int. Med. Res., 査読有, 36(5): 867-874, 2008.

[学会発表] (計 3 件)

① J. Moriya, J. Yamakawa, Y. Motoo: Resveratrol improves hippocampal atrophy in mice with chronic fatigue by enhancing neurogenesis and inhibiting apoptosis of granular cells, The 9th Meeting of the Consortium for Globalization of Chinese Medicine 2010, (Hong Kong, 2010.08.23).

② 守屋純二, 山川淳一, 竹内健二, 元雄良治: 慢性疲労症候群マウスモデルの Resveratrol (RSV) 投与における中枢神経系への効果, 第 61 回日本東洋医学会学術総会, (名古屋, 2010.06.05). 日本東洋医学雑誌講演要旨集, 61:274, 2010.

③ J.Moriya, J.Yamakawa, Y.Motoo :  
Resveratrol improves hippocampal atrophy  
in mice with chronic fatigue by enhancing  
neurogenesis., The 15th International  
Congress of Oriental Medicine, (Makuhari,  
2010.02.26-02.28).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守屋 純二 (MORIYA JUNJI)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20790478