

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07121

研究課題名（和文）オータプス神経モデルを用いた女性ホルモン依存性疾患に対する漢方薬の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of Kampo medicines for female hormone-dependent diseases using the autaptic neuron model

研究代表者

窪田 香織（Kubota, Kaori）

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：60380557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：女性ホルモンの顕著な変動は、受容体の発現変化やシナプス数減少などによる神経形態変化などを引き起こし、月経前症候群、更年期障害などの発症に関与する。これらの詳細な神経形態・機能変化を解析するため、プロゲステロンより脳内で合成されるTHDOCを処置した単一ニューロン共培養モデル細胞系の作成を目指したが、現条件でのモデル構築は難しいことが分かった。婦人科処方漢方薬に多く含有される生薬によるニューロステロイド合成酵素、NGF、BDNFなどニューロン形態関連因子の挙動変化を解析したところ、当帰などの構成生薬にNGFの発現誘導作用が認められた。これら因子の挙動を反映した処置条件等の再検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性ホルモン変動関連疾患に処方されている漢方薬やその有効成分の神経機能における機序解明を目的として、網羅的かつスピーディーに解析できる女性ホルモン変動神経モデルシステムの構築を目指して本研究を実施したが、モデルの構築には至らなかった。今後も継続して取り組む必要がある。また、当帰芍薬散、加味逍遙散、桂枝茯苓丸をはじめとする婦人科処方の漢方薬に多く含まれる当帰などに神経栄養因子NGFの誘導作用が認められたことから、これらの生薬が女性疾患症状の改善効果の中心を担う可能性が示唆された。継続して女性疾患処方漢方薬の精神神経作用の機序を解明することで、漢方薬の臨床応用を拡大することに寄与できるだろう。

研究成果の概要（英文）：Prominent fluctuations in female hormones cause neuromorphological changes due to altered receptor expression and reduced synapse number, which are involved in the development of pre-menstrual syndrome, menopause and other disorders. To analyse these detailed neuronal morphological and functional changes, we aimed to create a single-neuron co-culture model cell system treated with THDOC, which is synthesised in the brain from progesterone, but found it difficult to construct a model under current conditions. Analysis of the expression of factors related to neuronal morphology, such as neurosteroid synthase, NGF and BDNF, by herbal medicines showed that Touki and others induced the expression of NGF. Further investigation of model cell systems reflecting changes in the expression of these factors is needed.

研究分野：漢方薬理学

キーワード：漢方薬 オータプス培養 THDOC プロゲステロン うつ 神経障害

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

月経前や産後、更年期など女性ホルモンが顕著に変動している時期の女性の脳内では、受容体のサブタイプの発現変化やシナプス数の変化などの神経形態変化や、受容体の感受性の変化などによる神経伝達効率の低下など神経機能変化が生じ、月経前症候群(PMS)、産後うつ、更年期障害、記憶障害など脳機能低下につながっていると考えられている。しかし、多くの女性にとって身近かつ重要な疾患であるにもかかわらず、これらの疾患の詳細な病態は不明で、これらの詳細な神経形態・機能変化は解析されていない。

薬物療法としては、腹痛・頭痛にはNSAIDsなどの鎮痛剤、むくみに対しては利尿剤や抗アルドステロン療法、情緒不安定・不安には精神安定剤、うつ状態にはSSRI(Selective Serotonin Reuptake Inhibitor)などの西洋薬が使われる。しかし、精神安定剤による眠気やSSRIによる不安、めまいなどの副作用が認められ、抵抗感のある患者も多い。その中で当帰芍薬散、加味逍遙散、桂枝茯苓丸、桃核承気湯、女神散、抑肝散などの漢方薬が、臨床で多く処方されている。しかし、これらの治療法はいずれも対症療法であり、確立した治療法は存在しない。薬理作用機序の十分なエビデンスがあるとは言えず、漢方薬を用いた女性特有疾患に対する相補・代替療法の確立が求められている。

2. 研究の目的

女性ホルモン変動に伴って発症する多くの疾患の治療において漢方薬のニーズが臨床医、患者両方から高まっているが、作用機序が複雑でエビデンスが少なく処方につながっていない現状がある。これら漢方薬の科学的エビデンスを得るために効率的に解析できるハイスループット女性ホルモン変動神経細胞モデルを構築し、多くの漢方薬や生薬由来成分の神経機能の解析を行うことを目的とした。

(1) 婦人科系疾患を反映した女性ホルモン暴露培養モデルの構築

女性ホルモンの顕著な変動は、多くの女性にPMS、産後うつ、更年期障害、記憶障害などを引き起こす。女性ホルモンのうちプロゲステロンは、脳内において神経ステロイドを合成し、GABA神経に作用する。神経ステロイドは、様々な生理的状態(ストレス、妊娠、老化)、心理的状態(うつ)、神経障害(月経随伴性てんかん)に関与しており、抗不安作用、鎮痛作用、抗けいれん作用、鎮静作用、催眠作用および麻酔作用があると言われている。そこで本研究では神経ステロイドがGABA神経およびグルタミン酸神経に及ぼす影響についてアストロサイト・単一ニューロン共培養系を用いて形態学的に解析し、PMSモデルとしての妥当性を検討した。

(2) 漢方薬・生薬のニューロン形態関連因子への影響

臨床では多くの漢方薬が女性ホルモン変動関連疾患に用いられているが、それぞれの作用機序の差異や、作用の中心を成す構成生薬や有効成分などの詳細は不明である。そこで当帰芍薬散、加味逍遙散、桂枝茯苓丸をはじめとする婦人科処方の漢方薬や多くの精神神経症状改善に用いられる人参養栄湯や加味帰脾湯などの漢方薬やそれらに含まれる生薬をアストロサイト・単一ニューロン共培養系に処置し、ニューロステロイド合成酵素(5 α reductase)、神経栄養因子(NGF, BDNF)などニューロン形態関連因子の挙動を解析した。

3. 研究の方法

(1) 婦人科系疾患を反映した女性ホルモン暴露培養モデルの構築

女性ホルモンプロゲステロンやプロゲステロンより合成される神経ステロイドを諸々の条件において暴露したアストロサイト・単一ニューロン共培養標本を作製した。生後0-1日齢ICRマウスの大脳皮質から単離したアストロサイトを培養後、スライドガラス上にドット状に培養する。さらに1週間培養後、生後0-1日齢ICRマウスニューロン(海馬由来興奮性(グルタミン酸作動性)ニューロンや線条体由来抑制性(GABA作動性)ニューロン)を播種した。神経ステロイド処置後、培養標本を固定処置し、モデル細胞の神経学的特性を、ニューロン形態変化(軸索退縮など)や、シナプスの形成およびシナプス密度、足場タンパク質などについてイメージング法で解析した。ニューロンの樹状突起をMAP2抗体、シナプスをVGlut1抗体やVGAT抗体、GABA神経に関しては足場タンパク質Gephyrinで免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察した。Sholl analysis法により、ニューロンに投射するシナプスの形成部位、シナプスのサイズ、樹状突起の伸展程度を定量化した。また、MAP2に対するGephyrin発現比をImageJを用いて定量化した。

(2) 漢方薬・生薬のニューロン形態関連因子への影響

臨床では多くの漢方薬が女性ホルモン変動関連疾患に用いられている。これらの漢方薬やこれらに多く含まれる生薬について、影響を与える神経栄養因子(NGF, BDNF)やニューロステロ

イド合成酵素 (5a reductase) の発現の変化について RT-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 婦人科系疾患を反映した女性ホルモン暴露培養モデルの構築

アストロサイト・単一ニューロン共培養標本は、多様な脳内ニューロン・グリア連関を再現できる再構成系ニューロン培養モデルである。通常のニューロン分散培養では、ニューロン同士が複雑に軸索や樹状突起を伸展して互いにシナプスを形成するため、一つのニューロンに着目した軸索やシナプス解析が難しい。そこで、ガラス基板上にドット状にアストロサイトを培養してニューロン接着領域を区分化し、そのアストロサイト層上に単一ニューロンを独立して培養した。生後 0-1 日齢 ICR マウス的大脑皮質から単離したアストロサイトを培養後、スライドガラス上にドット状に培養した。さらに 1 週間培養後、生後 0-1 日齢 ICR マウスニューロン (海馬由来興奮性 (グルタミン酸作動性) 神経や線条体由来抑制性 (GABA 作動性) 神経) を播種した。このようにして、グルタミン酸作動性神経単一培養標本ならびに GABA 作動性神経単一培養標本を構築した (図 1)。

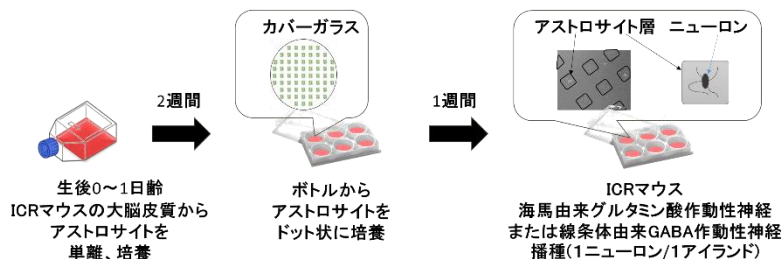


図1 単一ニューロン培養標本作成法

始めに、黄体ホルモンであるプロゲステロンが変動する時期に PMS 症状が発現することに加え、プロゲステロンが GABA 神経を変化させることより、プロゲステロンと GABA 神経の関係に着目し女性ホルモン暴露培養モデル構築を試みた。プロゲステロンは、脳内において神経ステロイドを合成し、GABA 神経に作用することが知られている。数ある神経ステロイドの中でも、 $3\alpha, 21$ -Dihydroxy- 5α -pregnan- 20 -one (THDOC) は $GABA_A$ 受容体調節物質であり、 $GABA_A$ 受容体が強く応答する。そこで、 $GABA_A$ 受容体調節物質である THDOC が GABA 神経に及ぼす影響について形態学的に検討した。線条体由来 GABA 作動性神経の樹状突起の進展や VGAT 陽性シナプス数の変化、グリシン受容体および $GABA_A$ 受容体の局在関連因子である Gephyrin の変化を免疫染色法で検討した。

Control、100 nM THDOC を 2 日間暴露し wash 後 1 日休薬させることで、ホルモンの急激な減少 (PMS の発症時期) を想定した 2 日間暴露後 1 日休薬群、THDOC 3 日間暴露の 3 群を作製した。これら 3 群を比較することで、ホルモンの変動によって GABA 神経にどのような変化が起きているのか形態学的に検討した。神経形成期モデルでは、ニューロン播種 1 日後に試薬を添加、神経成熟期モデルではニューロン播種 11 日後に試薬の添加を行った。それぞれ試薬の添加 1 日後に固定し免疫染色を行った。

線条体由来 GABA 神経の神経形成期モデルならびに神経成熟期モデルいずれも Ctrl、2 日処置群、3 日処置群の 3 群間において、THDOC 添加による MAP2 陽性神経突起の変化は見られなかった (図 2)。神経成熟期の VGAT 陽性シナプス数にも変化がなかった。

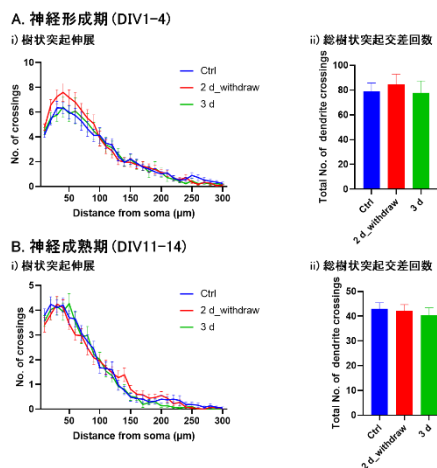


図2 線条体由来GABA神経樹状突起に対するTHDOCの影響

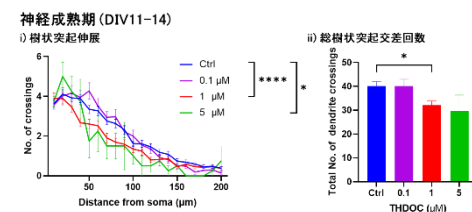


図3 線条体由来GABA神経樹状突起に対するTHDOCの影響

THDOC 100 nM の 3 日間暴露で GABA ニューロンの細胞形態への変化が見られなかったため高濃度 THDOC の効果を同様の方法で検討した。THDOC 1 μ M 処置によって樹状突起障害が認められ、5 μ M 処置ではニューロン数の減少 (細胞死) が生じた (図 3)。しかし、この影響は細胞死によるものか、神経ステロイドによる樹状突起退縮か不明であるため、その機序を明らかにするためにさらに解析が必要である。

同様の方法で作成した海馬由来グルタミン酸作動性神経の神経成熟期モデルに対して THDOC を処置したところ、若干の樹状突起交差数の減少がみられたが、GABA 神経と比較して影響が小さいことが示された (図 4)。

Gephyrin は、抑制性シナプス後膜における足場タンパク質であり、GABA_A 受容体のシナプス局在に関わっている。したがって、Gephyrin の局在を見ることで、間接的に受容体の局在を見ることができると考え、検討したが、THDOC による変化はいずれも認められなかった。以上の結果より、THDOC は、受容体の局在やシナプス形成よりも樹状突起の進展に影響を与える可能性が示唆された。

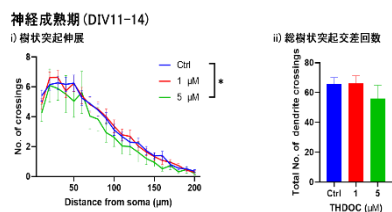


図4 海馬由来グルタミン酸作動性神経樹状突起に対するTHDOCの影響

本研究において THDOC 100 nM~100 μM の範囲で3日間処置したが、GABA 作動性神経、グルタミン酸作動性神経において THDOC 添加による神経ステロイドの機能変化による有意な形態学的変化を解明することはできなかった。プロゲステロンについても同様に検討を進めたが、グルタミン酸作動性神経、GABA 作動性神経ともに有意な形態学的変化は観察できなかった。本条件での単一ニューロン共培養系をもちいた PMS モデルの構築は難しいことが明らかとなった。モデルの構築のため、処置条件等の再検討が必要となった。

(2) 漢方薬・生薬のニューロン形態関連因子への影響

臨床では多くの漢方薬が女性ホルモン変動関連疾患に用いられている。そこで、当帰芍薬散、加味逍遙散、桂枝茯苓丸をはじめとする婦人科処方漢方薬や多くの精神神経症状改善に用いられる人参養榮湯や加味帰脾湯などの漢方薬に多く含まれる生薬(図5)が、神経栄養因子(NGF, BDNF)やニューロステロイド合成酵素(5α reductase)の発現にどのような影響を与えるか RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、当帰、蒼朮(白朮)、人参などの生薬において神経栄養因子の mRNA の発現が誘導されることが示された。一方で、ニューロステロイド合成酵素である 5α reductase の発現に有意な影響を与える生薬は今回の検討では認められなかった。

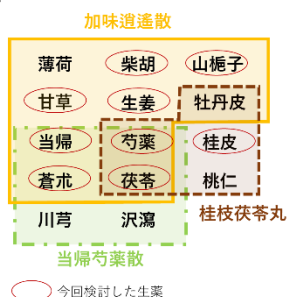


図5 ニューロン形態関連因子に影響を与える候補生薬について

その結果、当帰、蒼朮(白朮)、人参などの生薬において神経栄養因子の mRNA の発現が誘導されることが示された。一方で、ニューロステロイド合成酵素である 5α reductase の発現に有意な影響を与える生薬は今回の検討では認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Egashira Nobuaki, Goto Yu, Iba Hikari, Kawanaka Rikako, Takahashi Ryota, Taniguchi Chise, Watanabe Takuya, Kubota Kaori, Katsurabayashi Shutaro, Iwasaki Katsunori	4. 巻 281
2. 論文標題 Kamishoyosan potentiates pentobarbital-induced sleep in socially isolated, ovariectomized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 114585 ~ 114585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jep.2021.114585	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 -
1. 著者名 Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K	4. 巻 9
2. 論文標題 Ninjinyoeito reduces -amyloid25-35-induced axon damage via nerve growth factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 89-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tkm2.1320	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 -
1. 著者名 Iba-Tanaka H, Watanabe T, Harada K, Kubota K, Katsurabayashi S and Iwasaki K	4. 巻 2801784
2. 論文標題 Kamishoyosan alleviates anxiety-like behavior in a premenstrual syndrome rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/2801784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Egashira Nobuaki, Goto Yu, Iba Hikari, Kawanaka Rikako, Takahashi Ryota, Taniguchi Chise, Watanabe Takuya, Kubota Kaori, Katsurabayashi Shutaro, Iwasaki Katsunori	4. 巻 281
2. 論文標題 Kamishoyosan potentiates pentobarbital-induced sleep in socially isolated, ovariectomized mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 114585 ~ 114585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jep.2021.114585	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 窪田香織	4. 巻 5
2. 論文標題 オートプス病態モデル細胞を用いた漢方薬の薬理学的解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 63~64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iba H, Watanabe T, Motomura S, Harada K, Uesugi H, Shibahara T, Kubota K, Katsurabayashi S, Iwasaki K	4. 巻 145
2. 論文標題 A Japanese herbal medicine attenuates anxiety-like behavior through GABAA receptor and brain-derived neurotrophic factor expression in a rat model of premenstrual syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 140-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.11.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 下田代響佳, 石橋久美香, 平田悠衣, 窪田香織, 永松拓海, 渡辺拓也, 桂林秀太郎, 岩崎克典
2. 発表標題 人参養栄湯と加味帰脾湯の共通構成生薬による神経障害改善作用の機序解明
3. 学会等名 第40回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永松拓海, 窪田香織, 石田恵理奈, 渡辺拓也, 桂林秀太郎, 岩崎克典
2. 発表標題 加味帰脾湯のNGFを介した軸索障害に対する改善効果
3. 学会等名 第24回七隈アルツハイマー病パーキンソン病研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田香織、永松拓海、岡村尚幸、坂本真由、石田恵理奈、渡辺拓也、桂林秀太郎、岩崎克典
2. 発表標題 人參養栄湯のA 25-35誘導神経突起障害に対する改善効果の解明
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤宗一朗、渡辺拓也、長尾昌紀、有松真綾、大森洸耶、波多江旺信、足立雅弥、平田茉莉花、谷口知世、松井一磨、細井愛奈、志賀遼介、宮路えりか、窪田香織、桂林秀太郎、岩崎克典
2. 発表標題 マウスのうつ症状様行動に対する人參養栄湯の予防効果に関する行動薬理学的研究
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田香織、松田拓也、岡村尚幸、坂本真由、大藪康平、渡辺拓也、桂林秀太郎、岩崎克典
2. 発表標題 神経変性モデル細胞を用いた加味帰脾湯の神経突起障害に対する改善効果
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------