

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2013

課題番号：21249047

研究課題名(和文) うつ病のすべてがわかる和漢薬：発病機序の分子的解明から新規抗うつ薬開発まで

研究課題名(英文) Studies for the detail mechanisms of depression onset and the development of novel antidepressants based on "the Wakan-yaku, Sino-Japanese traditional medicine, theory"

研究代表者

東田 道久 (Tohda, Michihisa)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：20207525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,800,000円、(間接経費) 9,540,000円

研究成果の概要(和文)：和漢薬の根底に流れる理論に基づき、抗うつ効果が期待される各種の和漢薬を利用して、うつ病の細分化と有効性の高い薬物処置法の確立、新規抗うつ薬開発のための基礎的知見の提供を目指した研究を実施した。実験では、画像解析法に基づくヒト脳での薬物応答や、うつ病モデル動物を作製しての同実験、その動物を用いた作用機序の全身的視点での検討、培養細胞による遺伝子発現変化の検討、3D-HPLCによる精製と電気生理学的手法を組み合わせた微量成分アッセイ、等を行った。本各種手法を深めて行くことにより、うつ病治療のための新たな視点と、治療法・治療薬開発の新基盤を得ることが出来ることを示唆する数多の知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The Wakan-yaku is systematized medical care that has been practiced for several hundred years in Japan. Based on the theories of Wakan-yaku and using various Wakan-yaku prescriptions for depression treatment, the experimental studies for 1) novel-classification of depressive disorders, 2) establishment of highly effective drug treatment including the Wakan-yaku prescriptions, and 3) to supply of novel basic knowledge for development of new antidepressants were carried out. The following results were obtained; Wakan-yaku effects in the brain of drug-sensitive/-insensitive human and depression-model mice by image analytical method (MRI), the integrated viewpoint of the action mechanism using the model animal, identification and the significance of genes which changes the expression by Wakan-yaku or the constitutions in cultured cells, and the bioassay of active compounds by using the combined methods of electrophysiological technique with 3D-HPLC analysis/purification.

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

キーワード：和漢薬 統合薬理学 MRI 病態モデル 遺伝子発現 機能性精神疾患 3D-HPLC テーラーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病が猛威を振るっている。うつ病は患者の社会活動を減退させ、周囲の気遣いも大きな負担となる。また年間3万人を超える自殺者のほとんどはうつ病を経由してことに及んでいる。すなわちうつ病は「死に至る重篤な病」である。一方、うつ病は、アルツハイマー病などの不可逆的器質変化の「神経変性疾患」とは異なり、「機能的な精神疾患」であり、機能の回復により完全治療が可能な疾患である。有効な治療薬が必要だ。ところが、その病態および治療薬の概念としては「アミンの再取り込み」がその分子標的として50年来君臨しており、そのあまりにも広範囲な関連作用と様々な副作用が、シャープできめ細やかな治療を行いにくしている。

(2) 和漢薬の概念では「気」が重視されている。和漢処方中には抗うつ効果が期待させる薬物が多く存在し、独自の理論と経験則に従った細やかな使い分けがなされている。うつ病に有効な処方に男女差があることさえ知られている。また近年、生体イメージング技術の応用により、神経ネットワークからみた「うつ病の病態メカニズム」が検討されつつある。

2. 研究の目的

(1) 上述の背景に基づき、和漢薬理論に立脚したより細やかなうつ病治療戦略と抗うつ薬の開発を目指して研究を行った。和漢薬は歴史に裏打ちされた確かな情報を蓄積していることに加えて、安全性が担保されていることから、一定条件下でヒトに投与して情報を得ることが可能である。また、画像解析法は対象を傷つけることなく情報を得ることが出来る。ヒトでの画像解析知見とうつ病モデル動物との結果を比較し、それに基づきモデル動物を用いて作用機序に関するヒトではできない実験を実施した。さらに、細胞系を用いた遺伝子発現解析や電気生理学的検討による分子機序に関する実験を行い、新たなうつ病発症に関連する生体内因子を明らかにすることを目的とした。加えて抗うつ和漢薬処方の生薬構成の意義を解析することで、新たな抗うつ作用概念を生み出すとともに、使い分けについても考察する。

3. 研究の方法

以下の実験手法を用いて、研究を推進した。

- (1) ヒト MRI
- (2) うつ病モデル動物の作製
- (3) 小動物 MRI
- (4) 3D-HPLC による成分分析・単離
- (5) 遺伝子導入ツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的検討
- (6) 培養細胞系を用いた遺伝子発現解析・生化学的検討
- (7) 摘出臓器を用いた薬理的検討。

4. 研究成果

(1) うつ病モデル動物の作製とそれを用いた和漢薬処方・補中益気湯の抗うつ効果の証明：うつ病モデル動物として「学習性無気力動物」を作製した。マウスに嫌悪を感じる程度の軽度の電気刺激を、そこから逃れることの出来ない状態下で繰り返し、学習させる。その後、逃れることの出来る環境下に移し、電気刺激の前に音と光による警告をおこなって、そこから逃れる行動(逃避行動)の有無によりうつ病の程度を評価する方法である。本モデルマウスを用いた実験より、典型的抗うつ薬イミプラミンと同様に、補中益気湯が用量に依存して逃避行動の頻度を回復させたことから、補中益気湯は抗うつ効果を有していることが実験的に立証された。

(2) MRI を用いたヒト脳中での補中益気湯応答の検討：研究に関する十分な理解と倫理上の手続きを経た後に、ヒトに補中益気湯を投与した際の脳内 MRI 解析を行った。本実験は、受託研究会社により実施した。補中益気湯に対し感受性を有しないと診断されているヒトでは、補中益気湯投与15分後ならびに60分後に、脳全体的に強いMRIシグナル上昇がみられた。一方、感受性のヒト(補中益気湯証)では、そのシグナル上昇の程度は弱かった。一見矛盾する本実験結果の意義については、以下の実験結果を含めて、後述する。

(3) うつ病モデル動物を用いた補中益気湯の脳内作用のMRI解析：(2)と同様の実験をうつ病モデル動物を用いて行った。(1)の実験ではマウスを用いたが、MRI解析を行うに足る大きさの脳が必要であったため、ここではラットを用いた。典型的抗うつ薬デシプラ

ミンは有意にうつ指標値を改善した。補中益気湯は改善傾向がみられたものの、群としては有意ではなかった。しかしながら、個々の数値を観察したところ、動物により感受性が異なっていることが認められた。そこで、感受性を有していた動物と有していなかった動物の双方各2匹ずつについて、MRI解析を行った(外部委託実験)。実験はメドミジン投与による鎮静状態下で行った。その結果、ヒトで得られたと同様の、非感受性動物での強いシグナル上昇と、感受性動物でのその上昇の抑制が観察された。より感度の高い装置を用いて補中益気湯感受性ラット脳中での効果を同様に検討したところ、薬物投与20分後において、脳幹部におけるシグナルの増強が観察された。また、メドミジン鎮静下での動物において、薬物投与直後に著しい呼吸抑制が検討された。

(4) 結論 : ここまでの結果より、補中益気湯は、感受性脳においては、まず脳幹部のどこかに強く作用し、その後そこからの神経支配によって脳全体に抑制性のシグナルを伝達しているものと推定した。一方、非感受性脳では、脳幹部での感受性が弱いため、脳全体へは抑制性のシグナルは伝達せず、補中益気湯が持つ興奮性の作用のみが伝わるのではないかと推定された。

(5) 補中益気湯のセロトニン 2C 受容体 (5-HT_{2CR}) 刺激作用 : 電気生理学的検討 : 抗うつ薬の多くは、5-HT_{2CR} に対し遮断薬として作用することが知られている。補中益気湯の 5-HT_{2CR} に対する作用を電気生理学的検出法により検討した。ツメガエル卵母細胞に試験管内合成した 5-HT_{2CR} mRNA を移入し発現する受容体に対する補中益気湯の作用を検討したところ、抗うつ薬とは逆に、受容体活性化作用を示した。

(6) 和漢薬処方生薬群構成の意義に関する検討 (電気生理) : 補中益気湯とならんで抗うつ効果の期待される和漢薬処方として十全大補湯、帰脾湯がある。この3者は10種および12種の生薬より構成されているが、そのうち5種を共有している。そこでツメガエル卵母細胞系をもちいて、処方および生薬的観点からの検討を行った。補中益気湯は、

前述の様に、5-HT_{2CR} 刺激作用をもたらしたが、十全大補湯はほとんど作用しなかった。また共通する5種の構成生薬(共通5種)は電流応答を示さなかったが、補中益気湯にのみ用いられる5種(特有5種)では、補中益気湯よりも強くかつ安定した電流応答惹起作用が認められた。さらに、その5種の生薬それぞれについて検討を加えたところ、升麻に特に強い作用が認められた。その活性本体の単離を HPLC を用いて試み、活性を有する微量成分中を単離した(非公開)。しかしながら、升麻ならびにこの微量成分は抗うつ効果には関連しないと思われる。なぜならば、生薬の薬性として升麻は補気薬ではなく、「益気」の効果が期待できないからである。抗うつ効果の期待される成分は共通5種の中に含まれると推定した。典型的な抗うつ薬は 5-HT_{2CR} 遮断薬として作用することなどから推定して、共通5種の 5-HT_{2CR} 遮断作用を検討したところ、弱い抑制効果が観察された。その効果が弱いのは活性部位が保護されているからではないかと想像している。脳で作用するために物質は、腸内細菌による代謝や、小腸での吸収、肝臓での代謝や脳・血液関門の透過などのさまざまな作用を受けなくてはならない。直接細胞に薬物を作用させる本実験手法ではこれらの影響を評価することはできず、代謝を受けていない成分の直接作用しか評価できない。

(7) 補中益気湯および升麻の摘出腸管に対する作用 : 補中益気湯の名称中「補中」はお腹の機能を補うことを意味している。特有5種および升麻は消化器系に直接作用して「補中」効果を有しているものと考えられる。そこで、マウスの摘出腸管を用いて消化器系への作用を検討したところ、補中益気湯および升麻は腸管収縮作用を示すことが示された。

(8) 結論 : (5)~(7)の実験結果より、補中益気湯中には、共通5種中に代謝等により生ずるであろう抗うつ効果を有する 5-HT_{2CR} 遮断成分が含まれる可能性のあること、それとは逆に特有5種中に、消化器系で直接的にセロトニン受容体に刺激薬として作用する成分が存在している可能性のあることが認められた。すなわち1つの処方中に相反する作用を持つ成分が、修飾を受けてうまく共存

していることが考えられる。またさらに、(1) ~ (4)の結果も総合して考えた場合、特有5種の消化器系活性化作用は、それにとどまらず、上行性神経を通じて視床下部に投射し、さらに脳に抑制性のシグナルを及ぼすことで、抗うつ効果に必要な作用のみを残す役割も担っているのかもしれない。これらの点については引き続き、モデル動物に戻ってMRIや神経支配についての検討を行うことで明らかに出来ると考えている。

(9) 補中益気湯により発現変化する遺伝子の同定と機能解析に関する研究：以前の科学研究費に基づく研究により、補中益気湯および抗うつ薬を株化神経細胞 NG108-15 細胞に長期間作用させると、BCL2/adenovirus E1B 19 kbp interacting protein 1 (BNIP-3) の mRNA 発現が上昇することを見出し、BNIP-3 mRNA 上昇と抗うつ薬作用との間に相関性がある可能性を報告している。そこで、共通5種と特異5種の BNIP-3 mRNA 発現作用を検討した。その結果、共通5種に強い作用が認められた。十全大補湯も非常に強い BNIP-3 mRNA 発現上昇をもたらした。次に「各種抗うつ和漢処方」が BNIP-3 mRNA 発現に及ぼす効果についての検討を加えた。その結果、四逆散、半夏厚朴湯は濃度に依存した発現上昇を引き起こしが、桂枝加竜骨牡蠣湯、柴胡加竜骨牡蠣湯には効果が認められなかった。うつ病のなかでも五行論分類の「心(木)」が関与するものには BNIP-3 は関与しないのかもしれない。「心(木)」に関与する遺伝子発現についての検討も同様に行ない、cAMP との関連性がある可能性を見出し、引き続き詳細を検討している。また甘草の作用についても検討し、甘草は濃度に依存して著しい BNIP-3 mRNA 発現上昇を引き起こすこと、甘草の主成分であるグリチルリチンは無効だったこと、グリチルリチンを抗体により除去した甘草エキスで BNIP-3 mRNA 発現増大傾向が観察されたことより、甘草中のグリチルリチン以外の成分が関与すると考えられた。そこで、甘草中の成分を3D-HPLCにより分画・分取し、それぞれの画分についての活性を、培養細胞系で検討し、liquiritin 骨格を有する化合物にその作用のある可能性を見出した。なお、liquiritin に関しては、既に抗うつ効果があることが報告されてい

る。

(10) γ -mangostin の抗うつ効果に関する検討：タイ国等に多生する果実マンゴスチンの果皮より抽出された γ -mangostin の抗うつ作用に関して、上記 5)、6) の 5-HT_{2C} 抑制効果ならびに 9) の BNIP-3 mRNA 発現上昇効果を指標にして検討したところ、 γ -mangostin は両作用を有することが認められた。 γ -mangostin は現時点では抽出物として微量しか得ることができないが、その状況下でも 5-HT_{2C} 抑制効果と BNIP-3 mRNA 発現上昇効果を調べることで、抗うつ効果の有無を推定することが出来、両指標は微量アッセイ法としての新規抗うつ薬開発にも役立つと思われた。次の段階としては、大量合成を経て、動物実験に供することとなるが、その前段階での両指標の検討は、実験に供する動物を減ずることにも貢献できる。

(11) 黄耆の低分子 RNA 発現に及ぼす影響：共通5種生薬の1つである黄耆の低分子 RNA 発現に及ぼす影響を検討し、mir-137 および mir-143 の発現が上昇することを見出した。両者は 5-HT_{2C} mRNA に結合域を有していることから、5-HT_{2C} 動態との関連性に注目している。

(12) まとめ：抗うつ薬開発のためのよって立つ分子基盤には「アミンの再取り込み」が半世紀にわたって君臨している。またうつ病は器質的変化がなく、例えば脳に腫瘍があったり穴があったりするわけではないため、これまでは病気の実態としては捉えにくかった。最近の画像解析手法の発展により、「機能性変化」を視覚化することが可能となってきたが、本研究はこの特徴を和漢薬の特徴と組み合わせることで、臨床との緊張関係のある基礎実験が出来ることを示している。また、うつ病といった時に、脳のみを眺めるだけでなく、全身的な視点からの脳機能の制御がなされていることも和漢薬を使った本実験結果から想定された。ストレスは胃に来るのではなく、胃がストレスを感じると脳につたえているのかもしれない。またさらに、本研究では、うつ病に関連する生体内因子として、5-HT_{2C}、BNIP-3、低分子 RNA などの関連を推定し、逆にそれを指標とすることでの新規抗

うつ薬候補の微量アッセイが出来る可能性を示した。今後の展開として、今回の研究結果と研究により生じた新たな課題に基づいて、多くの抗うつ和漢処方について、ヒトとモデル動物のMRIでの知見を得、和漢薬理論に基づいた処方・生薬効果の解析と、臨床知見として得られているうつ病MRI画像との比較検討を重ねて、うつ病の分類、有効な和漢薬の選択法の開発、新規抗うつ薬候補の創出を目指す。そのために現時点でもっと大きな障害となっているのは、MRI作像手法の確立と標準化である。「和漢薬」というと、なにか古めかしい前近代的で感覚的なものであるかのように響くかもしれないが、「和漢薬」こそが最先端の医療を提供する最も精緻で最も進んだ体系のひとつである。科学はまだまだ和漢薬の核心に切り込んでゆけるほど進歩していない。うつ病解明と治療薬開発において、和漢薬概念の力を借りて研究を進めてゆくことで、現代医療では太刀打ちできずにいる難治疾患・うつ病の克服がなされることであろう。和漢薬はこれほどまでに力強く、奥が深く、また面白い。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Tohda M. (2014) Changes in the expression of BNIP-3 and other neuronal factors during the cultivation period of primary cultured rat cerebral cortical neurons and an assessment of each factor's functions. Cell Signalling and Trafficking, 査読有, DOI: 10.7243/2054-1481-2-1, <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2054-1481-2-1.pdf>

Tohda M. and Mingmalairak S. (2013) Evidence of Antidepressive Effects of a Wakan-yaku, Hochuekkito, in Depression Model Mice with Learned-Helplessness Behavior. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 査読有, vol. 2013, Article ID 319073, doi:10.1155/2013/319073.

Tohda M. (2012) Clarification of generating mechanisms of various types of depression based on the *Wakan-yaku* theory for development of novel depressants. J. Trd. Med., 査読有, 29, 85-87.

Sukma M, Tohda M, Suksamran S, Tantisira B. (2011) -Mangostin increases serotonin 2A/2C, muscarinic, histamine and bradykinin receptor mRNA expression. J Ethnopharmacol. 査読有, 135, 450-454.

Tohda M, Hang PT, Kobayashi N, Matsumoto K. (2010) Serotonin 2C receptor (5-HT2CR) mRNA editing-induced

down-regulation of 5-HT2CR function in *Xenopus oocytes*: the significance of site C editing. J Pharmacol Sci. 査読有, 113, 362-367.

その他多数執筆および執筆準備中

[学会発表] (計 27 件) 海外発表分のみ記載

Kanzaki M. and Tohda M. (2011)

Participation of BNIP-3 in anti-depressive action: BNIP-3 participates in not only the cell death/survival but also neuronal activity. 第 41 回北米神経科学会, 2011 年 11 月 11-18 日 (米国, ワシントン DC)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東田 道久 (TOHDA, Michihisa)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 20207525

(2) 研究分担者

小松 かつ子 (KOMATSU, Katsuko)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号: 50225570

並木 隆雄 (NAMIKI, Takao): 平成 25 年度
千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 20312001

(3) 連携研究者

後藤 博三 (GOTO, Hirozou)

北聖病院(富山市)・医師

(申請時: 富山大学大学院・医学薬学研究部
(医学)・准教授)

研究者番号: 40313598

東田 千尋 (TOHDA, Chihiro)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 10272931

鄭 美和 (TEI, Miwa)

北里大学・北里生命科学研究所・特任助教
(申請時: 富山大学・和漢医薬学総合研究所・
助教)

研究者番号: 50464029

(4) 協力研究者

余川 隆 (YOKAWA, Takashi)

BioView 社・代表取締役

MONRUDEE, Sukma (モンルディ スクマ)

シラパコーン大学 (タイ国)・薬学部・助教