

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06620

研究課題名(和文)漢方薬を活用した新規適応障害治療薬開発のための基礎研究

研究課題名(英文)Basic research for the development of new adjustment disorder treatments using kampo medicine

研究代表者

宮岸 寛子(MIYAGISHI, Hiroko)

日本大学・薬学部・講師

研究者番号：30642417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抑肝散やストレス症状に用いられる漢方薬の詳細な作用メカニズムを解明することで、ストレス刺激が誘発する適応障害(適応反応症)に対して、安全性が高く、有効な薬物治療法の提唱を目的とする。マウス海馬神経細胞HT22細胞を用いて、ストレス負荷により脳内で上昇することが知られているコルチコステロンが誘発する神経毒性に対して、保護効果のある漢方薬の探索を行った。抑肝散を含むストレス症状に用いられている漢方薬のうち、半夏厚朴湯が、コルチコステロンによる細胞生存率の低下を抑制した。以上より、半夏厚朴湯はグルココルチコイドの上昇が関与する神経障害を抑制することで、適応障害を改善する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適応障害やうつ病、不安障害などのストレスと関連が深い精神疾患で医療機関を受診する患者数は近年増加している。現在、適応障害による抑うつや不安の治療に、抗うつ薬や抗不安薬が用いられるものの、抵抗性を示す例も多いのが現状である。漢方薬は、抵抗性を示す例に対して効果を示すことや、抗うつ薬や抗不安薬との併用投与により治療効果を増大することがある。しかしながら、漢方薬の作用メカニズムの詳細は一部を除いて明らかにされておらず、EBMが必須とされる現代医療においては、科学的な根拠の積み重ねが求められている。本研究をさらに発展させることにより、漢方薬の作用メカニズムの解明を行うことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the detailed mechanisms of action of Kampo drugs used to suppress stress symptoms and to advocate safe and effective drug treatments for stress-related adjustment disorders.

Here, we used HT22 cells to evaluate the neuroprotective potential of herbal medicines used in neuropsychiatry against corticosterone-induced hippocampal neuronal cell death. Among the herbal medicines clinically used for stress symptoms, Hangekobokuto suppressed corticosterone-induced decrease in cell viability. Therefore, our results suggest that Hangekobokuto may ameliorate the onset and progression of psychiatric disorders by suppressing neurological disorders associated with increased levels of glucocorticoids.

研究分野：薬理学

キーワード：ストレス 漢方薬

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代医療において治療が困難な疾患に対して、漢方薬が著効を示す場合があり、その存在は欠かすことが出来ないものである。神経精神科領域においても、様々な精神症状に対する漢方薬の有用性が認められており、なかでも抑肝散は認知症患者の精神・行動異常(興奮、易刺激性、攻撃性、幻覚、徘徊、抑うつ、不安など)の改善に用いられている。適応障害は、ICD-10(国際疾病分類第10版)により「ストレス因により引き起こされる情緒面や行動面の症状で、社会的機能が著しく障害されている状態」と定義され、仕事や学業、家事育児などその人の社会的機能が大きく阻害され、困難になっている状態である。その治療には、ストレス因を取り除くことが重要であるが、自然災害、家族や仕事に起因するものなどストレス因を完全に排除することは困難であるため、薬物治療が必須の場合が多い。

これまでに、研究代表者が所属するグループでは、マウスに1時間の拘束ストレスを14日間慢性負荷することで、情動行動に異常が認められないストレス適応モデルマウス(適応マウス)並びに4時間の拘束ストレスを14日間慢性負荷することで、情動行動に異常が認められるストレス適応障害モデルマウス(適応障害マウス)を作り分けることに成功している。また、研究代表者は、適応障害マウスへの抑肝散の投与が、情動行動の異常を改善することを見出し、この抑肝散の治療効果のメカニズムに、グルタミン酸トランスポーター(excitatory amino acid transporter; EAAT)のひとつであるEAAT2の発現減少の改善が関与することを報告した。しかしながら、伝承的に用いられてきた漢方薬の作用メカニズムの詳細は、一部を除いて明らかにされておらず、根拠に基づく医療が必須とされる現代医療においては、科学的根拠の積み重ねが求められている。

2. 研究の目的

適応障害は病態が複雑であり、病因や病態生理もいまだ不明な点が多く、治療法も非常に限定されている疾患である。これまでに、申請者らは、抑肝散が適応障害モデルマウスにおいて情動行動の異常を改善し、その治療効果にグルタミン酸トランスポーターのひとつであるEAAT2の発現減少の改善が関与することを明らかにしている。本研究ではこれまでの研究をさらに発展させ、抑肝散の詳細な作用メカニズムやストレス症状に用いられる漢方薬の作用メカニズムを解明することで、ストレス刺激が誘発する適応障害に対して、安全性が高く、有効な薬物治療法の提唱を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞

マウス海馬神経細胞由来のHT22細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)を含むDulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)で、5% CO₂/95% air、37℃、加湿条件下のインキュベーター内で培養した。

(2) 細胞死の評価

MTT法

薬物処理終了後、MTT(250 µg/mL)を添加し、37℃、3時間インキュベートした後、SDS溶解液(50% dimethylformamide、20% SDS、pH4.7)を加えた。室温で一晩静置した後、マイクロプレートリーダー(SH-1000 Lab Microplate Reader, Corona Electoric)により吸光度(吸光極大570nm、Reference 640 nm)を測定した。

LIVE/DEAD染色法

薬物処理終了前に、Calcein AMストック溶液およびEthD-1ストック溶液をmediumで終濃度がそれぞれ2 µM、4 µMになるように希釈した。この希釈した溶液をCover glass Chamber 8 wellに加え、37℃で40分間インキュベート後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(3) 使用動物

実験には、6週齢のICR系雄性マウス(日本エスエルシー(株))を使用した。動物は恒温恒湿室(23±1℃、50±5%)にてプラスチックケース内で複数飼育し、7:00点灯、19:00消灯の12時間サイクルの明暗条件下で飼育した。なお、摂餌および飲水はともに自由とした。

(4) 適応マウスおよび非適応マウスの作製

ICRマウスに内径3cm×全長15cmの筒を用いて1時間あるいは4時間の拘束ストレスを1日1回負荷し、適応マウスおよび非適応マウスを作製する。拘束ストレス刺激(1時間あるいは4時間)の単回負荷により誘発される種々のストレス反応が、慢性負荷により消失することをストレス適応の指標とし、依然としてストレス反応が認められることをストレス適応障害の指標とした。

(5) 行動評価

ホールボード試験

新奇環境におけるマウスの探索行動を、自動ホールボード試験装置(model ST-1、室町機械(株))を用いて定量評価した。マウスを床面の中央から等距離に4か所穴(直径3cm)を設けた灰白色角型のオープンフィールド(50×50×50cm)に入れ、装置内でマウスが示す種々の探索行動を5分間測定した。各探索行動は装置の上方に設置したデジタルカメラおよび壁面に設置した赤外線センサーにより検出した。

(6) タンパク質の発現解析

Western Blot 法

各処置後の脳部位は、RIPA buffer [150mM NaCl, 1%NonidetP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50mM Tris-HCl (pH8.0), 1%TritonX-100, 5mM EDTA]を用いて、細胞抽出液を作成した。2×Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いてSDS化した後、電気泳動を行った。電気泳動後、Immobilon™-P Transfer Membrane (millipore)に転写し、室温で1時間ブロッキングした。その後、各種一次抗体と4一晚反応させ、二次抗体(JacksonImmuno research Laboratories)と室温にて1時間振盪した。Luminol Reagent (Santa cruz biotechnology)またはECL prime(GE Healthcare)により化学発光させ、目的とするタンパク質をChemi Doc XRS(Bio-Rad Laboratories)にて検出した。

(7) mRNA の発現解析

各処置後の脳部位から定法により total RNA を抽出し、cDNA を作成した。遺伝子の発現量を real-time PCR 法により検討し、検量線法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) マウス海馬神経細胞由来 HT22 細胞を用いた検討

HT22 細胞にコルチコステロンを曝露すると、濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。また、グルココルチコイド受容体のアンタゴニストである RU486 の前処置は、コルチコステロンが誘発する細胞死を有意に抑制した。さらに、このコルチコステロン誘発細胞死は、抗酸化物質である N-Acetyl-L-cysteine によっても顕著に抑制されたため、コルチコステロンは、グルココルチコイド受容体依存的な酸化ストレスによる細胞死を誘導することが示唆された。次に、ストレス症状に用いられる抑肝散、加味帰脾湯、加味逍遙散、柴胡加竜骨牡蛎湯および半夏厚朴湯がコルチコステロン誘発細胞死に及ぼす影響を検討した。半夏厚朴湯は、コルチコステロン誘発細胞死を一部ではあるものの有意に抑制した。一方、抑肝散、加味帰脾湯、加味逍遙散、柴胡加竜骨牡蛎湯は細胞死に影響を及ぼさなかった。以上より、コルチコステロン誘発細胞死に対して、半夏厚朴湯は細胞保護作用を有することが示唆された。また、半夏厚朴湯は、抑肝散や加味帰脾湯とは異なり、ストレスホルモンであるグルココルチコイド増加が関与する神経障害を抑制することで精神疾患の治療薬・予防薬となる可能性が示された。

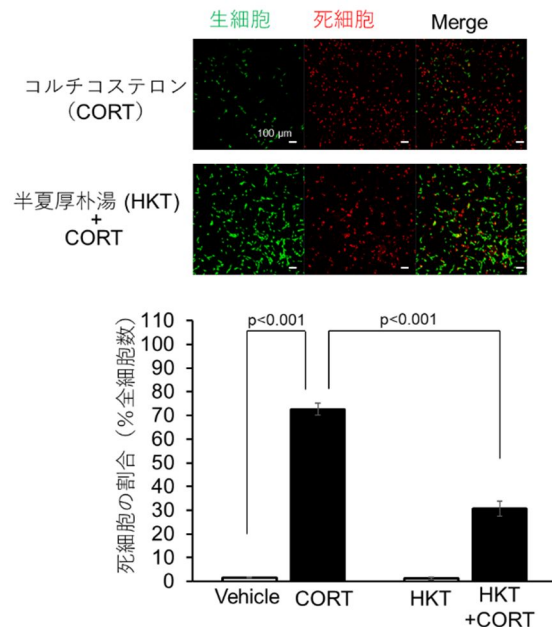


Fig. 1 半夏厚朴湯はコルチコステロン誘発細胞死を抑制する

(2) 適応マウス、適応障害マウスを用いた検討

1日1回1時間あるいは4時間の拘束ストレス刺激負荷による行動変化

マウスの情動行動の変化を確認するために、1日1時間のストレス負荷を14日間、または1日4時間のストレス負荷を14日間行った。マウスにストレスをかけた後、ホールボード試験を行ったところ、情動行動の指標である穴のぞき回数が、ストレス負荷1時間14日間のマウスにおいて非ストレス群と同程度となった。一方、ストレス負荷4時間14日間のマウスでは、穴のぞき回数が非ストレス群と比較して減少した。したがって、情動行動に異常が認められない適応マウス、情動行動に異常が認められる適応障害マウスを再現よく作り分けができることを確認した。

適応マウス、適応障害マウスの脳内 5-HT_{1A} 受容体の発現変化

これまでに、適応障害マウスの情動行動の低下に対して 5-HT_{1A} 受容体作動薬が抑制効果を示すことから、ストレス適応の形成機構において 5-HT_{1A} 受容体が重要な役割を担っていることを示唆してきた。そこで、適応マウスと適応障害マウスの脳内において 5-HT_{1A} 受容体の発現量を検討したところ、適応障害マウスの中脳では 5-HT_{1A} 受容体の発現量がタンパク質、mRNA とともに増

加した(Fig. 2A)

が、適応マウスでは変化が認められなかった。5-HT_{1A} 受容体の発現は、転写抑制因子である NUDR、Freud-1 により制御されていることが報告されている。そこで、5-HT_{1A} 受容体の発現量が増加した適応障害マウス中脳において、NUDR、Freud-1 の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で見たところ、どちらも発現量が減少した(Fig. 2BC)。したがって、過剰なストレスにより、中脳に分布する 5-HT_{1A} の転写抑制因子が減少することで、5-HT_{1A} の転写抑制が弱まり、5-HT_{1A} 受容体の発現が増加し、ストレスへの適応障害に関与する可能性が示唆された。今後、半夏厚朴湯が適応障害マウスの情動行動や中脳で発現上昇が認められる 5-HT_{1A} 受容体に影響を与えるか検証する予定である。

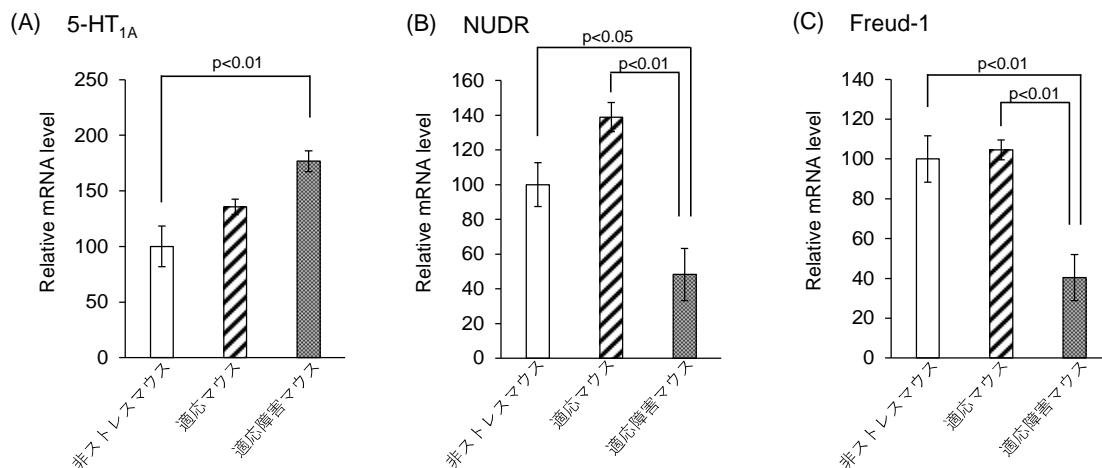


Fig. 2 5-HT_{1A}受容体とその転写抑制因子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Miyagishi Hiroko, Joyama Ami, Nango Hiroshi, Nagayama Koume, Tsuji Minoru, Takeda Hiroshi, Kosuge Yasuhiro	4. 巻 78
2. 論文標題 Cytoprotective effects of Hangekobokuto against corticosterone-induced cell death in HT22 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 255 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-023-01766-y	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 Tsuruta Komugi, Shidara Takato, Miyagishi Hiroko, Nango Hiroshi, Nakatani Yoshihiko, Suzuki Naoto, Amano Taku, Suzuki Toyofumi, Kosuge Yasuhiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Anti-Inflammatory Effects of Miyako Bidens pilosa in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Lipopolysaccharide-Stimulated BV-2 Microglia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13698 ~ 13698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241813698	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 Nango Hiroshi, Tsuruta Komugi, Miyagishi Hiroko, Aono Yuri, Saigusa Tadashi, Kosuge Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Update on the pathological roles of prostaglandin E2 in neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Neurodegeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40035-023-00366-w	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 Miyagishi Hiroko, Tsuji Minoru, Miyagawa Kazuya, Kurokawa Kazuhiro, Mochida-Saito Atsumi, Takahashi Kohei, Kosuge Yasuhiro, Ishige Kumiko, Takeda Hiroshi	4. 巻 1783
2. 論文標題 Possible role of transcriptional regulation of 5-HT1A receptor in the midbrain on unadaptation to stress in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147859 ~ 147859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2022.147859	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浜野 裕衣, 鶴田 こむぎ, 宮岸 寛子, 青野 悠里, 三枝 禎, 斎藤 稔, 小菅 康弘.
2. 発表標題 宮古ビデンス・ピローサエキスは筋萎縮性側索硬化症モデルマウスのA1型アストロサイトの増加を選択的に抑制する
3. 学会等名 第148回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 津宮美, 永山 恋梅, 安井 景子, 鶴田 こむぎ, 宮岸 寛子, 小菅 康弘.
2. 発表標題 クルクミン誘導体の神経細胞保護効果と筋萎縮性側索硬化症モデルマウスに及ぼす影響
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 津宮美, 鶴田 こむぎ, 永山 恋梅, 宮岸 寛子, David Schubert, 小菅 康弘.
2. 発表標題 クルクミン誘導体が筋萎縮性側索硬化症モデルマウスに及ぼす影響
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鶴田 こむぎ, 浜野 裕衣, 田中 津宮美, 宮岸 寛子, 小菅 康弘.
2. 発表標題 宮古ビデンス・ピローサエキスは筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの炎症性グリア細胞を選択的に抑制する.
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会2023年9月16日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮岸 寛子, 金沢 貴憲, 藏野 匠, 鈴木 直人, 鈴木 豊史, 小菅 康弘.
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスにおけるN-アセチル-L-システインの細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセル併用経鼻投与による治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鶴田 こむぎ, 佐藤 優成, 宮岸 寛子, 阪田 泰子, 石川 英明, 坪井 誠, 小菅 康弘.
2. 発表標題 Lipopolysaccharide刺激BV-2ミクログリア細胞におけるペンタデシルの抗炎症作用
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋 愛, 宮岸 寛子, 徐山 雅美, 石毛 久美子, 小菅 康弘
2. 発表標題 マウス海馬神経由来HT22細胞を用いた コルチコステロン誘発細胞死抑制作用を 有する漢方薬の探索
3. 学会等名 次世代を担う若手のための 創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徐山 雅美, 宮岸 寛子, 高橋 愛, 鶴田 こむぎ, 辻 稔, 武田 弘志, 小菅 康弘
2. 発表標題 マウス海馬神経由来HT22細胞において半夏厚朴湯はコルチコステロン誘発細胞死を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 愛、宮岸 寛子、石毛 久美子、小菅 康弘.
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症モデルマウス及び神経障害性疼痛モデルマウスにおける宮古ピデンス・ピローサエキスの治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴田 こむぎ、宮岸 寛子、鈴木 直人、石毛 久美子、廣瀬 大、鈴木 豊史、小菅 康弘
2. 発表標題 宮古ピデンス・ピローサは筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける活性化ミクログリアを抑制する.
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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 分 担 者	小菅 康弘 (Kosuge Yasuhiro) (70383726)	日本大学・薬学部・教授 (32665)	

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
---------	---------