

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870997

研究課題名(和文) 神経栄養因子の補充療法に替わる抑肝散による認知症治療法の構築

研究課題名(英文) Construction of new neurotrophic factor replacement therapy for dementia by yokukansan

研究代表者

窪田 香織 (KUBOTA, Kaori)

福岡大学・薬学部・助教

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)：抑肝散の神経栄養因子様の神経機能亢進作用や神経保護作用が、神経栄養因子補充療法の代替療法として有用ではないかと考え、神経栄養因子様の神経突起伸長作用、神経栄養因子の情報伝達系の活性化、神経栄養因子の生合成促進作用に着目し、その薬理作用メカニズムの解明やその作用を担う有効構成生薬の探索を行った。その結果、これら神経栄養因子様作用が確認できた。さらに認知症モデル動物内でも神経栄養因子に影響を与え、細胞保護や認知機能改善効果を示すことも明らかになった。本研究の結果から、抑肝散の認知症治療薬としての有用性がさらに期待された。

研究成果の概要(英文)：Neurotrophic factor-like activity of Kampo medicine Yokukansan (YKS) is considered useful as a neurotrophic factor replacement therapy. We were focused on the neurite outgrowth action, the activation of the signal transduction system of neurotrophic factors, and the biosynthesis promoting action of neurotrophic factor, and clarified the pharmacological mechanism of neurotrophic factor-like action on YKS and herbal components. As a result, these neurotrophic factor-like action of YKS was confirmed on cell-based researches. Furthermore, it was revealed that YKS affects the neurotrophic factors, and also indicate the cell protection and cognitive improvement in dementia model animals. From the results of this study, it has been further expected usefulness as a dementia treatment of YKS.

研究分野：分子薬理学

キーワード：神経栄養因子 認知症 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、認知症患者の増加が大きな問題である。アルツハイマー病をはじめとする認知症の症状は、①記憶障害を主とする中核症状と、②妄想・不安・徘徊などの行動・心理症状 (BPSD) に分けられる。中核症状に対しては、コリンエステラーゼ阻害薬など一部の対症療法薬のみが認可されている。一方、BPSD は比較的早期に発症して患者のみならず介護者の大きな負担となるが、BPSD の詳細な発症メカニズムは不明である。抗精神薬や抗不安薬などが対症療法薬として用いられているが、これらの薬物では、高齢認知症患者にとって重篤な副作用 (めまい、転倒など) が大きな問題となっている。このように認知症治療薬は、最新の治療薬でも症状の進行抑制が限界で根治的治療には遠く及ばないのが現状である。

そのような中で漢方薬が奏功する報告がなされ保険適用にもなってきた。しかし一般内科領域で漢方薬を適正使用するには、その機序の科学的背景を明らかにすることが必須である。

2. 研究の目的

漢方薬・抑肝散が認知症患者の BPSD を改善することが報告され、脚光を浴びている。抑肝散は、蒼朮、茯苓、川芎、釣藤鈎、当帰、柴胡、甘草の7つの生薬で構成され、神経症や不眠症など神経興奮状態を抑える作用がある漢方薬として知られていたが、近年、アルツハイマー病、脳血管障害、レビー小体病などによる認知症患者の BPSD に効果を示すことが臨床報告された。我々は、漢方薬・抑肝散の認知症治療薬としての臨床応用を見据え、作用機序の解明を行ってきた。抑肝散はセロトニン神経系を賦活することで妄想・不安・徘徊などの行動・心理症状 (BPSD) を改善し、加えてアセチルコリン神経系を賦活することで認知機能障害をも改善することを報告した。また、抑肝散には神経栄養因子様作用があることも報告した。神経栄養因子は、神経の分化・再生など神経の機能維持に重要で、さらに認知症やうつ病患者の脳内では、神経栄養因子が減少することから、神経栄養因子を用いた補充療法が試みられている。しかし脳内移行が悪いなど臨床応用に繋げるには問題が多く、現在のところ臨床応用の目途は立っていない。そこで、抑肝散ならびにその生薬成分を用いた神経栄養因子代替補充療法の開発を目指し研究を行い、従来薬では不可能であった予防や治療を目指した漢方薬による新たな治療戦略を構築しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 抑肝散および構成生薬の神経栄養因子様作用の同定

①抑肝散の神経栄養因子受容体ならびにシグナル経路の活性化の検討

PC12細胞 (ラット副腎髄質褐色細胞種) に、抑肝散及び各種阻害剤 (Trk:K252a, ERK:U0126 等) を処置し、神経突起の形態学的解析やウエスタン法を用いて抑肝散の神経栄養因子受容体やシグナル系に対する作用を検討した。

②抑肝散の神経栄養因子発現誘導作用の検討

抑肝散が、神経栄養因子の生合成を促進するか、各神経栄養因子 (NGF, BDNF, IGF など) の発現を、RT-PCR 法にて検討した。

③神経栄養因子様作用を担う構成生薬の同定と作用機序の検討

(1) ①と同様の方法で、抑肝散の神経栄養因子様作用を担う構成生薬を探索した。

(2) 抑肝散の神経栄養因子様作用の認知症治療への応用

①抑肝散による内因性神経栄養因子への影響

認知症モデル動物 (全脳虚血処置ならびにアミロイドβ注入ラット) に、抑肝散を7日間連続経口投与し、脳内 (海馬、大脳皮質など) での内因性神経栄養因子 (NGF, BDNF など) の動態を RT-PCR 法ならびに ELISA 法にて検討した。

②抑肝散による神経保護効果の検討

(2) ①の検討と並行して、組織学的手法により、抑肝散の神経細胞保護効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 抑肝散および構成生薬の神経栄養因子様作用の同定

①抑肝散の神経栄養因子受容体ならびにシグナル経路の活性化の検討

ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞は、神経栄養因子によって神経様の突起を伸長させ神経様細胞に分化するが、抑肝散処置によって神経様突起が伸長した (図 1)。

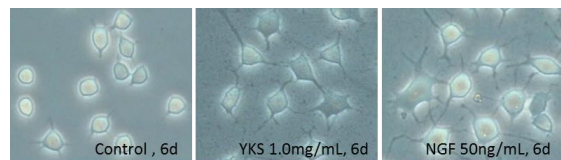


図 1 抑肝散の神経突起伸長作用

さらに抑肝散ならびに神経栄養因子関連シグナル経路阻害剤を用いた実験より、抑肝散には、神経栄養因子受容体 Trk の直接活性化作用はないが、神経栄養因子と同様な Erk 経路、PI3K/Akt 経路、PKC 経路、cAMP/PKA 経路の活性化作用があり (図 2)、下流の転写因子 CREB の活性化の結果神経様突起伸長作用を示すことも明らかにした。

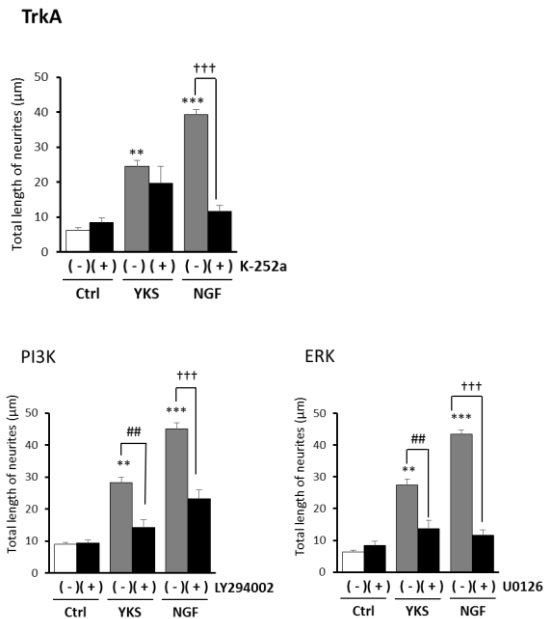


図2 抑肝散の神経栄養因子シグナル経路に対する活性化作用の検討

②抑肝散の神経栄養因子発現誘導作用の検討

マウス初代培養アストロサイトにて抑肝散を処置したところ、BDNFやNGFの発現量を増加させる作用が認められた(図3)。

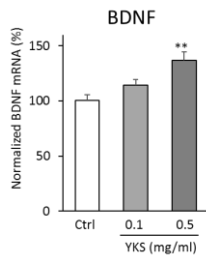


図3 抑肝散の神経栄養因子発現誘導作用

③神経栄養因子様作用を担う構成生薬の同定と作用機序の検討

抑肝散は7つの生薬から構成されており、抑肝散の各生薬の配合比に基づいた量で神経様突起伸長作用の検討を行ったところ、蒼朮、当帰、柴胡にその作用が認められた。これらの生薬の中に神経栄養因子様作用を示す成分が含有されていることが示唆された(図4)。

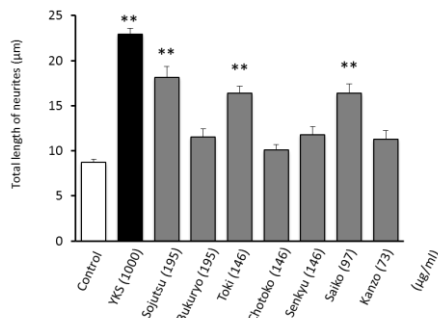


図4 抑肝散構成生薬の神経突起伸長作用

(2) 抑肝散の神経栄養因子様作用の認知症治療への応用

(1)の結果より、抑肝散には神経栄養因子様作用があることが明らかとなったため、神経保護や神経新生作用を持つ可能性が考えられた。よって、認知症モデル動物に抑肝散を投与し、以下の項目の検討を進めた。

①抑肝散による内因性神経栄養因子への影響

認知症モデル動物において抑肝散によるBDNFの発現の変化を調べた。虚血及びAβ投与開始後、1日、3日、5日後のサンプルを回収し、BDNF mRNA量をRT-PCR法で評価した。認知症モデルラットでは、BDNFのmRNA量が経時的に減少していくのに対し、抑肝散は増加させた(図5)。このようにin vitroだけでなくin vivoにおいても抑肝散に神経栄養因子の発現を誘導する作用があることが示された。

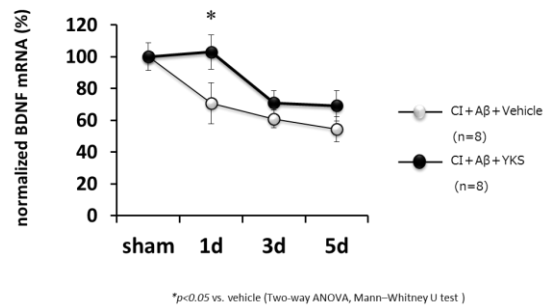


図5 脳内BDNF量に対する抑肝散の影響

②抑肝散による神経保護効果の検討

認知症モデル動物の海馬のCA1領域の標本を作製し、形態学的解析を行った。対照群では、海馬CA1領域の錐体細胞層が保持されているが、CI+Aβ処置によって細胞体の脱落、核の凝集が認められた。抑肝散を投与したところ、細胞の脱落が抑制され細胞層が保持された(図6)。このように抑肝散には細胞死抑制・細胞保護作用があることが明らかとなった。

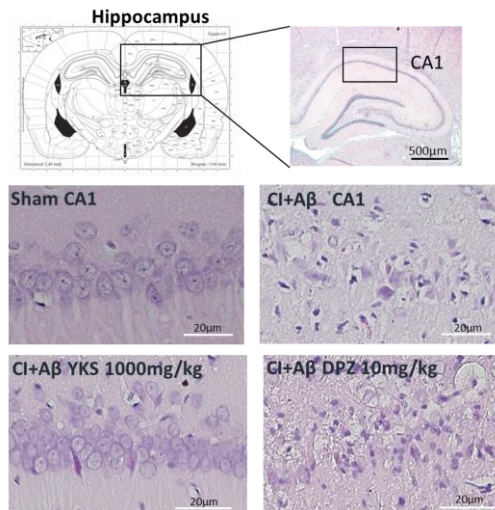


図6 認知症モデルラットの組織学的検討

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 4 件)

① 脳由来神経栄養因子の発現誘導作用を介した抑肝散のアルツハイマー病モデル動物の不安様行動に対する効果

高尾優那、窪田香織 (4 番目) ら 13 名
臨床と研究, 91/11, 128-128 (2014)
査読なし

② 抑肝散の認知症症状に対する薬理的検討

窪田香織 (筆頭) ら 7 名
日本薬理学雑誌, 143/3, 110-115 (2014)
査読なし

③ Effect of Yokukansan on memory disturbance in an animal model of cerebrovascular dementia.

Nogami A, Takasaki K, Kubota K (3 番目) ら 13 名
Journal of Traditional Medicines, 30, 164-175 (2013) 査読有

④ Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, promotes neurite outgrowth in PC12 cells through the activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt.

Kubota K (筆頭) ら 12 名
Journal of Traditional Medicines, 30, 102-113 (2013) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 抑肝散の神経栄養因子様作用について
窪田香織、高崎浩太郎、桂林秀太郎、岩崎克典

第 16 回応用薬理シンポジウム
2014 年 12 月 5-6 日、宮城、松島町

② PC12 細胞での H2O2 誘導細胞死に対する抑肝散の効果

古城戸綾、窪田香織 (2 番目) ら 5 名
第 67 回日本薬理学会西南部会
2014 年 11 月 23 日、福岡、北九州市

③ 抑肝散は脳内の神経成長因子を増加させて空間記憶障害を改善する

野上 愛、窪田香織 (5 番目) ら 10 名
第 31 回和漢医薬学会学術大会
2014 年 8 月 30~31 日、千葉、千葉市

④ 抑肝散の神経栄養因子様作用

中川廣輝、窪田香織 (3 番目) ら 10 名
第 31 回和漢医薬学会学術大会
2014 年 8 月 30~31 日、千葉、千葉市

⑤ アルツハイマー病モデル動物の神経成長因子生成量に対する抑肝散の効果

野上 愛、窪田香織 (6 番目) ら 9 名
第 125 回日本薬理学会近畿部会
2014 年 6 月 20 日、岡山、岡山市

⑥ 脳由来神経成長因子の発現誘導作用を介した抑肝散のアルツハイマー病モデル動物の不安様行動に対する効果

高尾優那、窪田香織 (6 番目) ら 10 名
第 16 回七隈アルツハイマー病・パーキンソン病研究会
2014 年 4 月 26 日、福岡、福岡市

⑦ Kampo prescription improved anxiety-like behavior via increase of brain-derived neurotrophic factor

Nogami A, Kubota K (3 番目) ら 12 名
第 87 回日本薬理学会年会
2014 年 3 月 19~21 日、宮城、仙台市

⑧ NGF 発現量増加を介した抑肝散の空間記憶障害改善作用

山本香織、窪田香織 (6 番目) ら 11 名
第 66 回日本薬理学会西南部会
2013 年 11 月 16 日、福岡、福岡市

⑨ アルツハイマー病と漢方薬

岩崎克典、窪田香織 (4 番目) ら 7 名
第 15 回応用薬理シンポジウム
2013 年 9 月 29 日、東京、港区

⑩ 脳由来神経栄養因子の発現誘導作用を介した抑肝散の抗不安作用

野上 愛、窪田香織 (6 番目) ら 10 名
第 30 回和漢医薬学会学術大会
2013 年 8 月 31 日、石川、金沢市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 香織 (KUBOTA, Kaori)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号: 60380557

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし