

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14941

研究課題名(和文)モノアミン神経系とエピジェネティクスに着目した漢方薬の抗うつ作用メカニズム解析

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism underlying the antidepressant-like effects of Kampo medicines focusing on the monoamine nervous system and epigenetics

研究代表者

荒木 良太 (Araki, Ryota)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：90710682

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)：精神症状に使用される漢方薬である加味温胆湯は、マウスにおいて抗うつ様作用と細胞外セロトニン量増加作用を示した。こうした加味温胆湯の作用は構成生薬の竹ジョ\*を除くことで消失した。しかしながら、竹ジョ\*単体では細胞外セロトニン量増加作用が見られなかったことから、細胞外セロトニン量増加作用には、竹ジョ\*と他の生薬との組み合わせが重要であることが示唆された。また、精神症状に対して用いられる多くの漢方薬においてセロトニン5-HT1A受容体刺激作用が認められた。以上の結果から、精神症状に用いられる漢方薬の多くは、セロトニン神経系を介して薬効を発揮している可能性が示された。(ジョ\*は竹かんむりに如)

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経精神領域において、漢方薬が有効性を示す例が多数報告されている。しかしながら、いわゆる西洋薬とは異なり、漢方薬は作用機序の科学的根拠に乏しいことから、エビデンスに基づく治療を重視する現代医療において漢方薬の使用は十分に進んでいない。本研究により、漢方薬の作用に関する基礎的知見を集積することで、漢方薬の適切な使用を促し、治療効果が高く副作用の少ない神経精神症状の治療に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Kamiuntanto (KUT), a kampo medicine prescribed for neuropsychiatric disorders, showed antidepressant-like effects and increased the extracellular serotonin levels in mice. These effects of KUT were abolished by excluding Bambusae Caulis (BC), which is one of the medicinal components of KUT. However, BC itself did not increase the extracellular serotonin levels, suggesting that the combination of BC with other herbal components is important for the increasing extracellular serotonin levels. In addition, several kampo medicines prescribed for neuropsychiatric disorders stimulated 5-HT1A receptors. These results indicate that several kampo medicines prescribed for neuropsychiatric disorders such as KUT may exert their medicinal effects via the serotonin nervous system.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：漢方薬 精神疾患 うつ病 セロトニン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、うつ病などの気分障害の患者数は著しく増加しており、最新の調査結果における本邦の気分障害患者数は127.6万人と過去最高である(平成29年厚生労働省「患者調査」)。世界に目を向けてみても、最近10年間でうつ病の患者数が18%増加するなど、うつ病患者の急増は国際的に大きな健康問題となっている。

一般的に「うつ病は抗うつ薬により治療可能」と認識されており、実際に抗うつ薬が一定の治療効果を示す。しかしながら、うつ病患者が急増している現状に鑑みると、抗うつ薬による治療だけでは十分でないことが伺える。現に、抗うつ薬は8人に1人程度しか効果がないこと、副作用による治療の中断が多いこと、寛解と再発を繰り返して病態が慢性化することなど、抗うつ薬による治療が抱える問題点は少なくない(Cochrane Database Syst Rev., 2009.)。

一方で、比較的軽度なうつ病の治療において漢方薬が用いられることがあり、実際に有効例が報告されている。我々が行った行動薬理学的検討からも、実験動物のうつ/不安様行動に対する漢方薬の有効性が確認されている(Traditional & Kampo medicine, 2, 93-96, 2015; Biol Pharm Bull., 39, 289-294, 2016; J Tradit Complement Med., 8, 81-88, 2017; BMC Complement Altern Med., 17, 195, 2017.)。また、漢方薬には抗うつ薬と比べて副作用が軽度であるといった利点もあり、うつ病治療における選択肢の1つとして有用であるものと考えられる。しかしながら、いわゆる西洋薬である抗うつ薬とは異なり、漢方薬は作用機序の科学的根拠に乏しいことから、エビデンスに基づく治療を重視する現代医療において漢方薬の使用は十分に進んでいない。こうした背景から、漢方薬の作用に関する基礎的知見の集積が、うつ病治療における漢方薬の適切な使用を促し、治療効果が高く副作用の少ないうつ病治療の実現に貢献できるものと考えられる。

### 2. 研究の目的

現在、臨床現場で用いられている抗うつ薬はすべて、「脳内モノアミン神経系の機能不全がうつ病の発症分子基盤である」とするモノアミン仮説に基づくものであり、モノアミンの輸送体や受容体を標的として作用する。一方で基礎研究から、漢方薬の抑肝散に含まれる成分がセロトニン5-HT<sub>1A</sub>受容体に作用することが報告されるなど(Neuroscience, 207, 124-136, 2012.)。作用機序に不明な点が多い漢方薬においても、モノアミン神経系に作用する成分が含まれることが知られてきている。こうした知見から、漢方薬の抗うつ作用はモノアミン仮説で少なくとも部分的に説明できる可能性が考えられる。そこで本研究では、漢方薬のモノアミン神経系における作用を追究し、漢方薬の抗うつ作用の一端を科学的に明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 実験動物

実験には、3週齢のddY系雄性マウスを用いた。マウスは透明なケージ(24×17×12 cm<sup>3</sup>)において5匹で集団飼育、あるいは壁が灰色の同じ大きさのケージにおいて1匹で隔離飼育し、9週齢時に実験に用いた。飼育環境は室温:23±1°C、照明時間:1日12時間(8:00~20:00)とし、水と固形飼料は自由に摂取させた。動物実験は「摂南大学動物実験に関する規定」に準拠して倫理的に行った。

#### 2) 漢方薬のエキスの作成

漢方薬の構成生薬3日分に水を1000 ml加え、60分間煎出した後に吸引濾過し、凍結乾燥したものを実験に供した。薬物は行動実験の1時間前に経口投与した。

#### 3) 新奇環境下における多動の解析

マウスを測定用の新奇ケージ(30×30×30 cm<sup>3</sup>)に入れ、30分間の移動距離をANY-maze video tracking software(Stoelting Company, Wood Dale, IL, USA)にて解析した。

#### 4) 他のマウスと遭遇した際の多動の解析

金網で仕切ったアクリルケージ(30×30×30 cm<sup>3</sup>)を用いて、仕切られた片側の区画に解析マウスを入れ、2時間馴化させた。その後、相手マウスとして同週齢のddY系雄性マウスをもう片側の区画に入れた後、20分間ビデオ録画し、解析マウスの運動時間を測定した。

#### 5) 強制水泳試験

ビーカー(高さ27 cm、直径18 cm)に水温25±1°Cの水を13 cmの深さまで満たし、その中で試験マウスを6分間泳がせビデオに録画し、最後の4分間における無動時間を測定した。

#### 6) In vivo 脳微小透析法による細胞外モノアミン量の測定

マウスの大脳皮質前頭前野(ブレグマより1.9 mm前方、0.5 mm右側方、頭蓋表面より深さ0.8 mm)にガイドカニューレ(4.0 mm: Eicom)を挿入固定した。術後、マウスに鎮痛薬としてBuprenorphine(0.01 mg/kg, i.p.)を投与し個別ケージにて飼育した。測定時は透析プローブ(膜長3.0 mm: Eicom)をガイドカニューレに挿入し、リンゲル液(147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>)を流速1.0 µl/minで灌流した。サンプルは20分単位で回収し、直ちに高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器(HPLC/ECD)システムに連続自動インジェクションし、ノルア

ドレナリン、ドパミンおよびセロトニン量を HPLC/ECD システムで測定した。

#### 7) ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

CHO-K1 細胞 ( 理研バイオリソースセンターより提供 ) に pCRE-Luc Vector、pRL-TK Vector および pCMV-mouse 5-HT<sub>1A</sub> の 3 つのプラスミドをトランスフェクションし、24 時間後に評価する薬剤を添加し、5 時間後に測定を行った。ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼの発光は、Dual Glo Reagent および GloMax 20/20 Luminometer ( Promega, Madison, WI, USA ) を用いて測定した。評価する薬剤を添加する 30 分前に、アデニルシクラーゼ刺激剤である forskolin を添加した。バックグラウンドを減算した後、トランスフェクション効率の違いを補正するために、各サンプルのホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性に補正した。5-HT<sub>1A</sub> 受容体に対する刺激作用は、 $100 \times ( 1 - \text{ルシフェラーゼ活性}_{\text{薬物}} / \text{ルシフェラーゼ活性}_{\text{forskolin}} )$  として計算した。

### 4. 研究成果

#### 1) 行動薬理学的解析による加味温胆湯と西洋薬の作用比較

漢方薬の加味温胆湯は、半夏、陳皮、茯苓、甘草、生姜、竹筴、枳実、遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参の 13 種類の生薬で構成される漢方処方であり、古来より不安や不眠症に対して用いられてきた。これまでに臨床研究から、認知機能障害や気分変動を伴う患者のうつ症状および倦怠感に対して加味温胆湯が有効であることが報告されている ( *J. Am. Geriatr. Soc.*, **54**, 869-71, 2006; *Integr. Med. Insights*, **5**, 1-6, 2010. )。また前臨床研究から、加味温胆湯が脳内のアセチルコリン神経系の機能を増強することや、神経栄養因子の放出を増加させることなどが報告されている ( *J Trad Med.*, **12**, 54-60, 1995; *Phytomedicine*, **2**, 41-6, 1995; *Phytomedicine*, **3**, 361-7, 1997. )。

そこでまず、加味温胆湯が実験動物においても精神症状に対して改善作用を示すかを確認するために、隔離飼育マウスを用いた行動薬理学的解析を行った。隔離飼育マウスは多動、うつ様行動、不安様行動といった異常行動を示す。これら異常行動は抗精神病薬、抗不安薬、抗うつ薬により改善することから、ヒト精神疾患の一部を反映したものと考えられている。解析の結果、加味温胆湯は隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動に対して、改善作用を示した。西洋薬と作用を比較することを目的に、選択的セロトニン再取り込み阻害薬である抗うつ薬 fluoxetine およびドパミン D<sub>2</sub>/セロトニン 5-HT<sub>2</sub> 受容体遮断作用を有する抗精神病薬である risperidone においても同様の検討を行った。その結果、fluoxetine、risperidone とともに、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動を有意に抑制した ( 図 1 )。

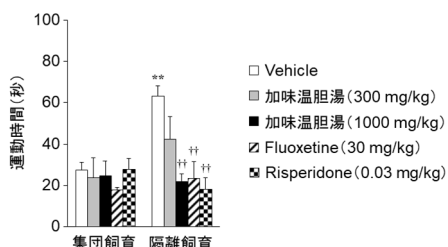


図 1. 隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動に対する加味温胆湯および西洋薬の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、他のマウスと遭遇した際に多動が見られた。この多動は、加味温胆湯 ( 1000 mg/kg )、fluoxetine ( 30 mg/kg )、risperidone ( 0.03 mg/kg ) により有意に抑制された。n=4-11. \*\*P < 0.01 vs. 集団飼育マウス。††P < 0.01 vs. vehicle 投与マウス。

加味温胆湯は、強制水泳試験における無動時間の増加に対しても改善作用を示した。加味温胆湯と同様に fluoxetine も無動時間の増加に対しても改善作用を示した。一方で、risperidone は無動時間の増加に対しては改善作用を示さなかった ( 図 2 )。

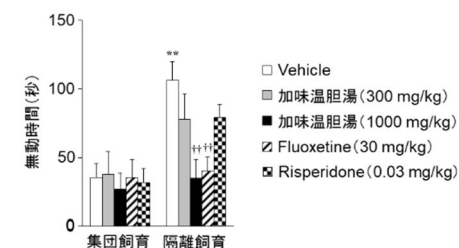


図 2. 隔離飼育マウスが示す強制水泳試験における無動時間の増加に対する加味温胆湯および西洋薬の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、無動時間の増加が見られた。この無動時間の増加は、加味温胆湯 ( 1000 mg/kg )、fluoxetine ( 30 mg/kg ) により有意に抑制されたが、risperidone ( 0.03 mg/kg ) は無動時間に影響を及ぼさなかった。n=6-11. \*\*P < 0.01 vs. 集団飼育マウス。††P < 0.01 vs. vehicle 投与マウス。

しかしながら加味温胆湯は、新奇環境下における多動を抑制しなかった。加味温胆湯と同様に fluoxetine も新奇環境下における多動を抑制しなかった。一方で、risperidone は新奇環境下における多動を有意に抑制した ( 図 3 )。

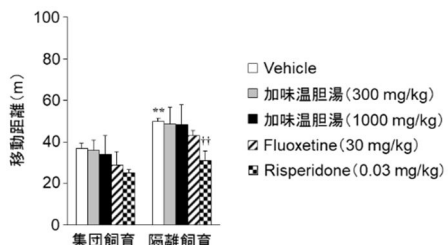


図 3. 隔離飼育マウスが示す新奇環境下における多動に対する加味温胆湯および西洋薬の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、新奇環境下における多動が見られた。この多動は、加味温胆湯 ( 1000 mg/kg )、fluoxetine ( 30 mg/kg ) では抑制されなかったが、risperidone ( 0.03 mg/kg ) により有意に抑制された。n=6-13. \*\*P < 0.01 vs. 集団飼育マウス。††P < 0.01 vs. vehicle 投与マウス。

以上の結果より、加味温胆湯は隔離飼育マウスの異常行動の一部を改善すること、またその改善作用のパターンは抗うつ薬である fluoxetine とは類似しているが、抗精神病薬である risperidone とは異なることが明らかとなった。

## 2) 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する加味温胆湯の作用

行動薬理的解析より、加味温胆湯の作用は抗うつ薬である fluoxetine と類似していることが明らかになったことから、加味温胆湯は fluoxetine と同様にセロトニン神経系に作用する可能性が考えられた。そこで、*in vivo* 脳微小透析法を用いて、大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす加味温胆湯投与の影響について解析を行なった。その結果、加味温胆湯を経口投与すると40分後をピークとした細胞外セロトニン量の増加が観察された。一方で、細胞外のノルアドレナリン量やドパミン量には変化は認められなかった(図4A-C)。細胞外セロトニン量の変化を Net-AUC で評価したところ、加味温胆湯による有意な細胞外セロトニン量の増加が認められた(図4D)。以上の結果より、加味温胆湯は fluoxetine と同様に、細胞外セロトニン量の増加を介して異常行動を改善する可能性が考えられた。

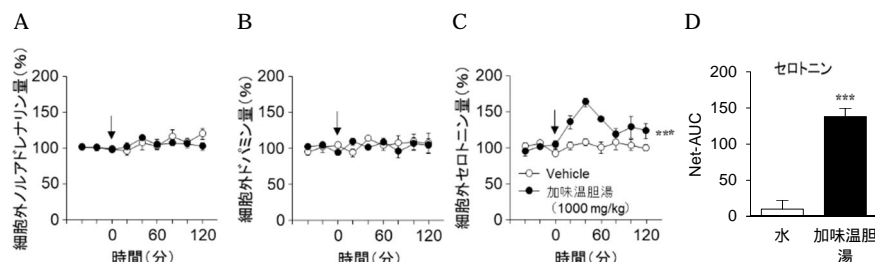


図4. 加味温胆湯が大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

図の矢印で示した位置で加味温胆湯の経口投与を行った。加味温胆湯(1000 mg/kg)は、細胞外ノルアドレナリン量(A)、細胞外ドパミン量(B)には影響を及ぼさなかったが、細胞外セロトニン量(C,D)を有意に増加させた。n=5。

## 3) 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する加味温胆湯の一味抜きエキスの作用

前項までの結果から、加味温胆湯に細胞外セロトニン量増加作用が見出された。そこで次に、13種類の加味温胆湯の構成生薬のうちいずれの生薬が作用発現に関与するかを明らかにするために、加味温胆湯の一味抜きエキスを調整し、細胞外モノアミン量に及ぼす影響を解析した。投与後から1時間における細胞外モノアミン量の変化を Net-AUC で評価したところ、加味温胆湯で見られた細胞外セロトニン量の増加作用は加味温胆湯竹筴抜きエキスにおいて著しく減少した(図5A-C)。

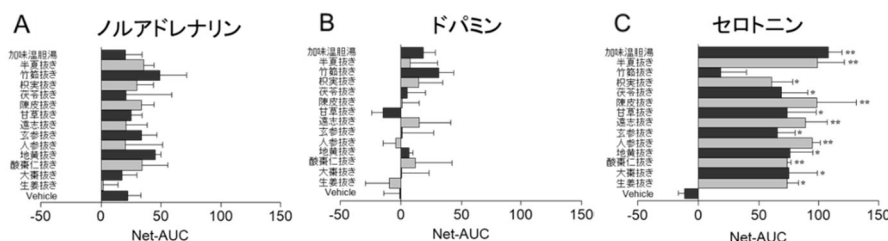


図5. 加味温胆湯の一味抜きエキスが大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

投与後から1時間における細胞外モノアミン量の変化を Net-AUC で評価した。いずれの加味温胆湯一味抜きエキス(1000 mg/kg)も、細胞外ノルアドレナリン量(A)、細胞外ドパミン量(B)には影響を及ぼさなかった。一方で、加味温胆湯竹筴抜きエキス(1000 mg/kg)では、加味温胆湯で見られた細胞外セロトニン量の増加が著しく減少していた(C)。n=3-5。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  vs. vehicle。

## 4) 隔離飼育マウスの異常行動に対する加味温胆湯竹筴抜きエキスの作用

加味温胆湯竹筴抜きエキスでは細胞外セロトニン量増加作用が減弱することから、構成生薬から竹筴を除くことにより、異常行動に対する加味温胆湯の作用にも変化が見られる可能性が考えられる。そこで、隔離飼育マウスの異常行動に対する加味温胆湯竹筴抜きエキスの作用について解析した。その結果、加味温胆湯竹筴抜きエキスでは、加味温胆湯で見られた隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動(図6)や強制水泳試験における無動時間の増加(図7)に対する改善作用が消失した。

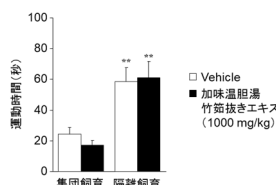


図6. 加味温胆湯竹筴抜きエキスが他のマウスと遭遇した際に示す多動に及ぼす影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、他のマウスと遭遇した際に多動が見られた。この多動は、加味温胆湯竹筴抜きエキス(1000 mg/kg)では抑制されなかった。n=10-12。\*\* $P < 0.01$  vs. 集団飼育マウス。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiraki Y, Araki R, Fujiwara H, Ago Y, Tanaka T, Toume K, Matsumoto K, Yabe T.	4. 巻 139
2. 論文標題 Kamuntanto increases prefrontal extracellular serotonin levels and ameliorates depression-like behaviors in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 72-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2018.11.008	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 Araki R, Fujiwara H, Matsumoto K, Toume K, Yabe T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Polygalae Radix extract ameliorates behavioral and neuromorphological abnormalities in mice treated chronically with corticosterone.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tradit Kampo Med.	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/tkm2.1198	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木良太、榎本太一、田中翔斗、安淵頭、池谷真里那、村瀬仁章、中谷尊史、矢部武士
2. 発表標題 フェルラ酸は5-HT1A受容体部分作動薬活性により精神機能異常を改善する
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船間貴博、榎本太一、荒井雄樹、吾郷由希夫、藤原博典、當銘一文、松本欣三、中谷尊史、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 加味温胆湯は細胞外セロトニン量増加作用と抗うつ様作用を示す
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安淵顕、田中翔斗、池谷真里那、河合健太郎、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 フェルラ酸の認知症周辺症状改善作用 - 5-HT1A受容体の関与 -
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木良太、榎本太一、田中翔斗、安淵顕、池谷真里那、村瀬仁章、河合健太郎、中谷尊史、矢部武士
2. 発表標題 フェルラ酸は5-HT1A受容体の部分作動薬活性により異常行動を改善する
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安淵顕、榎本太一、田中翔斗、池谷真里那、東和佳、村瀬仁章、河合健太郎、中谷尊史、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 フェルラ酸の認知症周辺症状（BPSD）改善作用における5-HT1A受容体の関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芝野成美、安淵顕、池谷真里那、方城千尋、荒木良太、中谷尊史、矢部武士
2. 発表標題 1H-NMRスペクトルによる加味温胆湯エキスおよび一味抜き製剤エキス成分のメタボリック・プロファイリング
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒木良太
2. 発表標題 フェルラ酸のBPSD改善作用に関する基礎的検討 - 5-HT1A受容体部分刺激活性の関与 -
3. 学会等名 第6回認知症治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林尚迪、板原優、土屋友美、稲富由香、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 生薬オンジの脳機能活性成分の探索
3. 学会等名 日本生薬学会第65年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林佑至、榎本太一、林尚迪、板原優、稲富由香、中谷尊史、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 グリア細胞株由来神経栄養因子GDNFの発現を誘導する生薬オンジ成分の探索
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019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