

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008 年度～2010 年度
 課題番号：20390197
 研究課題名（和文） 漢方薬の抗認知症効果を担う脳内薬効メディエータに関する研究
 研究課題名（英文）
 Studies on endogenous neuronal mediator with responsibility for anti-dementia effect of Kampo medicine
 研究代表者
 松本 欣三（MATSUMOTO KINZO）
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
 研究者番号：10114654

研究成果の概要（和文）：本研究は、認知症モデル動物を用い、釣藤散、抑肝散および冠元顆粒の抗認知症効果を明らかにした。さらにこれらの薬物の効果には学習記憶に重要なコリン神経系や神経可塑性シグナリング系の亢進に加え、血管内皮細胞成長因子 VEGF や血小板由来栄養因子 PDGF 系が関与することが示唆された。VEGF/PDGF とそれらの受容体は、大脳皮質神経細胞中では NMDA 受容体と共発現していることも明らかになり、これらの因子が上記漢方薬の薬効メディエータとして働く可能性が推測された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have demonstrated the anti-dementia effects of chotosan, yokukansan, and kangenkaryu using animal models of cognitive deficits. We have also suggested that vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factors, as well as facilitation of central cholinergic systems and neuroplasticity systems, are involved in the action of these crude drugs. The present findings that VEGF/PDGF and their receptors are co-localized with NMDA-type glutamate receptors in the cerebral cortical neurons allowed us to infer that VEGF/PDGF may act as endogenous factors that mediate the anti-dementia effects of chotosan, kangen-karyu, and yokukansan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科一般（含心身医学）

キーワード：認知症モデル、漢方薬、メディエータ、脳虚血、加齢

1. 研究開始当初の背景

老年期認知症は、患者を介護する家族や社会の負担が極めて甚大な疾患であり、その負担は今後、益々増大していくと予想されている。従って、本疾患の発症機序の解明、有効で安全な予防薬・治療薬の開発、及び予防・

治療戦略の創出は焦眉の課題である。

近年、幾つかの漢方薬が脳血管性認知症（VD）等の老年認知症の治療に有効であることが報告されているが、それらの治療効果を病態動物モデルで実証した研究はほとんどなく、治療メカニズムに関わる脳内分子と神

経機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、釣藤散を中心に漢方薬の抗認知症効果に関わる脳内メディエータを同定し、その機能を解明することにより老年期認知症の臨床治療に「即応用」可能な新規の方法論を創出することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)動物モデル

認知症病態モデルとして主に、脳血管性認知症やアルツハイマー型認知症の重要な危険因子となる加齢に着目し、20週齢の雄性老化促進動物 SAMP8 を用いた。一部の実験では SAMP8 の両側総頸動脈を20分間結紮 (T2VO) することにより、加齢と脳血管性障害の因子を含む認知症モデル(SAMP8-T2VO) を作製した。対照群には偽手術群 (SAMP8-sham) および正常老化マウス SAMR1 を用いた。アルツハイマー型認知症モデルにはマウスの嗅球を摘除した嗅球摘出マウス (OBX) モデルを用い、偽手術群 (OBX-sham) を対照群とした。

(2)薬物投与

両側総頸動脈の一時結紮後、あるいは嗅球摘出处置後より釣藤散をはじめとする漢方薬の投与を開始し、基本的に実験期間中投与を継続した。

①学習記憶・情動行動評価：行動試験のうち、学習記憶行動は水迷路試験、新規物体認知行動試験、または改良型 Y-迷路試験で評価した。情動行動は高架式十字迷路試験で評価した。

②神経化学の実験：行動観察実験完了後、各マウスより脳を摘出し、神経化学の実験に供した。蛋白発現量変化は Western blotting 法により、また ex vivo アセチルコリンエステラーゼ活性は Ellman 法により比色測定した。

4. 研究成果

(1) 老化促進動物における漢方薬の抗認知症効果

SAMP8-sham 群及び SAMP8-T2VO 群は、新奇物体認知行動試験において SAMR1 群と比べ有意な学習記憶障害を示した。SAMP8-T2VO 群の学習記憶障害は、SAMP8-sham と比べて悪化傾向がみられたが、統計学的には有意差はなかった。水迷路試験によりこれらのモデル動物の空間学習行動を評価したところ、SAMP8-sham および-T2VO の何れの群も学習記憶障害を発現したが、SAMP8-T2VO 群の障害は SAMP8-sham 群に比べて有意に増悪しているこ

とが明らかになった。一方、釣藤散 (750mg/kg/day) 投与により、SAMP8-sham および SAMP8-T2VO 群の学習記憶障害は何れも有意に改善された。

漢薬の冠元顆粒エキス (KK) も基本的に釣藤散に極めて類似した作用を示し、新奇物体認知行動試験で評価した時の SAMP8 の学習記憶障害を有意に改善した (図 1)。

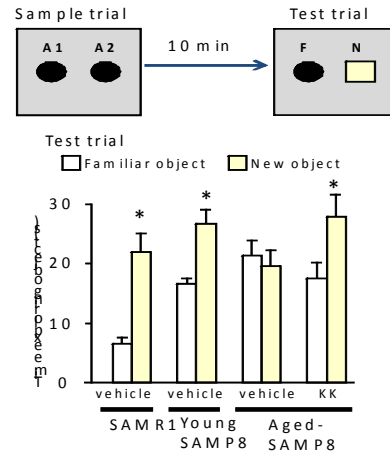


図 1 Effect of KK on novel object recognition performance of SAMP8
 KK: Kangen-karyu (100 mg/kg/day)
 Aged SAMP8: 20-week-old SAMP8
 Young-SAMP8: 8-week-old SAMP8
 SAMR1: 20-week-old
 *P<0.05 vs. familiar object

(2) 老化促進動物の情動障害と漢方薬の効果

SAMP8-sham および SAMP8-T2VO 群では SAMR1 と比べ、不安情動行動の有意な低下が認められた。不安情動レベルの低下は釣藤散 (750 mg/kg/day) 投与により改善されたが、漢方薬冠元顆粒 (100 mg/kg/day) は無効であった (図 2)。

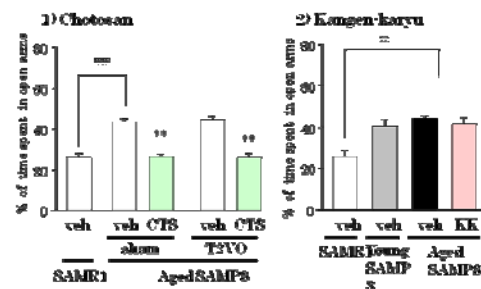


図 2 Effects of CTS and KK on elevated plus maze performance of young and aged SAMP8 mice
 CTS: Chotosan (750 mg/kg/day)
 KK: Kangen-karyu (100 mg/kg/day)
 ##P<0.01, **P<0.01 vs. vehicle-treated SAMP8

以上から、釣藤散は老年期認知症の中核症状や周辺症状にも有効である可能性が示唆され、釣藤散処置動物の脳組織を抗認知症効果の脳内メディエータの探索に利用可能と判断された。

(3) OBX マウスの学習記憶障害と漢方薬

OBX マウスの学習記憶能のうち、短期記憶については新奇物体認知行動試験および改良型 Y-迷路試験で、長期記憶については恐怖条件付け試験で評価した。その結果、何れの記憶行動についても Sham 群と比較して明らかな障害が認められた。一方、釣藤散を含む 7 種構成生薬から構成される抑肝散エキス (750 mg/kg/day) を OBX マウスに反復投与した結果、新奇物体認知試験および改良型 Y-迷路試験で評価した短期記憶障害は有意に改善されたが、恐怖条件付け試験で評価した長期記憶の障害には改善は認められなかった。

抑肝散の学習記憶障害改善効果は、抗コリン薬スコポラミン処理で消失したことから、中枢コリン神経系機能の亢進によって発現することが示唆された。一方、抑肝散投与は *ex vivo* における脳内アセチルコリン分解酵素アセチルコリンエステラーゼの活性には全く影響を及ぼさなかったことからコリン神経系の亢進はアセチルコリン分解酵素の阻害による可能性は低い。抑肝散に関する成績は、先に報告した釣藤散と良く類似することから、両方剤の認知障害改善効果には両方剤に共通する作用機序の存在が推測された。

(4) 脳内メディエー候補

① 神経可塑性に関わる因子

釣藤散処置により認知障害が改善された SAMP8 の脳組織を用い、学習記憶に重要な脳内神経可塑性に関与する因子、即ち NMDA 受容体 (NMDAR)、カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素 (CaMKII) 等のリン酸化、および血管内皮細胞増殖因子 VEGF とその受容体蛋白発現に及ぼす釣藤散の影響を検討した。対照動物 SAMR1 群と比べ、SAMP8 群では有意な認知障害と NMDAR, CaMKII, サイクリック AMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) のリン酸化及び脳由来神経栄養因子 (BDNF) レベルの低下が認められた。一方、釣藤散投与 (750mg/kg/日) は、SAMP8-sham 群および SAMP8-T2VO 群の脳内 NMDAR, BDNF, および CaMKII と CREB の両リン酸化レベルを何れも有意に回復させることが明

らかになった。

② VEGF ファミリー

SAMP8-sham 及び SAMP8-T 群では血管新生や神経再生に関与する血管内皮細胞増殖因子 VEGF とその受容体 VEGFR2 の発現量が有意に低下していることおよび釣藤散投与によって有意に回復させた。更に心血管系障害改善作用を有する漢薬の冠元顆粒 (100mg/kg/日) 投与でも釣藤散と類似した抗認知症効果と VEGF 系に対する改善作用が認められた。以上の成績から、漢方薬の抗認知症効果発現における薬効メディエータとして VEGF 系が重要な役割を担う可能性が示唆された。

更に VEGF ファミリーに属する血小板由来栄養因子 PDGF についてもその受容体 PDGFR α と併せて、脳内発現レベルを測定した。その結果、認知行動障害を呈した SAMP8 ではそれらの発現量も有意に低下しているおり、釣藤散 (750 mg/kg/日) 処置によって正常レベルまで有意に回復することが解った。これらの成績は、VEGF 及び VEGF 受容体 (VEGFR) に関する前年度の結果と一致し、釣藤散の抗認知症効果に VEGF 及び PDGF 系が関わる可能性を示唆する。

(5) 免疫組織化学的検討

VEGF (図 3) 及び PDGF は何れも NMDAR1 を発現する大脳皮質神経細胞中に共発現しているだけでなく、VEGFR 及び PDGFR α も NMDAR1 と共存していることが明らかになった。これらの成績から、釣藤散や冠元顆粒の抗認知症効果には VEGF/VEGFR 及び PDGF-A/PDGFR α (チロシンキナーゼ型受容体) シグナリング系を

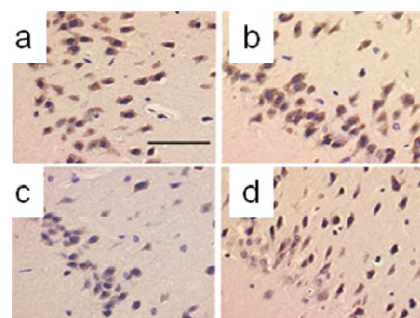


図 3

Representative photos of VEGF positive cells in the cerebral cortex obtained from SAMR1 (a), young SAMP8 (b), vehicle-treated aged SAMP8 (c), and KK (100 mg/kg per day)-treated aged SAMP8 mouse (d). After completing the behavioral experiments, the brains were dissected out for immunohistochemistry. The scale bar represents 100 μ m.

介した NMDA 受容体の機能修飾機構が存在する可能性が高いと推測された。

(6) 結論

本研究から、認知症モデル動物における釣藤散や冠元顆粒の抗認知症効果には神経可塑性に関わるシグナリングおよび VEGF/PDGF 系機能の改善が関与する可能性が明らかになった。更に VEGF/VEGFR 及び PDGF-A/PDGF α シグナリング系を介した NMDA 受容体の機能修飾機構の存在が示唆された。既に我々が明らかにしてきた成績と本研究成績とを考え合わせると、コリン神経系に加えて、血管内皮増殖因子および血小板由来栄養因子が釣藤散をはじめとする漢方薬の抗認知症効果の薬効メディエータとして働く可能性が高い。

本研究では、アルツハイマー型認知症の治療で有効性が報告されている抑肝散についても、釣藤散と同様にコリン神経系を介して学習記憶障害を改善することが明らかとなった。従ってコリン神経系と VEGFR/PDGF α 系との間の相互シグナリングについて今後、更に詳細に精査することにより薬効メディエータの機能がより明確になると期待される。

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 13 件)

- 1) Yamada M., Hayashida M., Zhao Q., Shibahara N., Tanaka K., Miyata T., Matsumoto K., Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice, *J Ethnopharmacol.* (査読有り) 2011, in press
- 2) Noh JS, Park CH, Kim HY, Zhao Q, Yamabe N, Matsumoto K., Yokozawa T., Chinese prescription Kangen-karyu prevents dyslipidaemia and oxidative stress in mouse model of type 2 diabetes, *J Pharm Pharmacol.* (査読有り) 63:111-119, 2011
- 3) Mingmalairak S, Tohda M, Murakami Y., Matsumoto K., Possible involvement of signal transducers and activators of transcription 3 system on depression in the model mice brain, *Biol. Pharm. Bull.* (査読有り) 33:636-640, 2010
- 4) Hang P.T.N., Tohda M., Tezuka Y., Matsumoto K., Influence of an adenosine deaminase inhibitor, erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine hydrochloride, on 5-HT₂CR mRNA editing in primary cultured cortical cells, *Biol. Pharm. Bull.* (査読有り) 33:527-529, 2010
- 5) Tohda M, Mingmalairak S, Murakami Y., Matsumoto K., Enhanced expression of BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 mRNA, a candidate for intrinsic depression-related factor, and effects of imipramine in the frontal cortex of stressed mice. *Biol. Pharm. Bull.* (査読有り) 33:53-57, 2010
- 6) Yamabe N, Kim HY, Kang KS, Zhao Q, Matsumoto K., Yokozawa T., Effect of Chinese prescription Kangen-karyu on lipid metabolism in type 2 diabetic db/db mice, *J Ethnopharmacol.* (査読有り) 129:299-305, 2010
- 7) Tohda M, Hang PT, Kobayashi N, Matsumoto K., Serotonin 2C Receptor (5-HT₂CR) mRNA editing-induced down-regulation of 5-HT₂CR function in *Xenopus Oocytes*: the significance of site C, *J Pharmacol Sci.* (査読有り) 113:362-367, 2010.
- 8) Zhao Q, Yokozawa T, Yamabe N, Tsuneyama K, Li X, Matsumoto K., Kangen-karyu improves memory deficit caused by aging through normalization of neuroplasticity-related signaling system and VEGF system in the brain, *J Ethnopharmacol.* (査読有り) 131: 377-385, 2010.
- 9) Cuia H-S., Murakami Y., Hori H., Zhao Q., Obi R., Matsumoto K., *Biol. Pharm. Bull.* (査読有り) 32:79-85, 2009.
- 10) Tohda M., Hang N.T.P, Matsumoto K., Developmental changes in serotonin 2C receptor mRNA editing in the rat cerebral cortex and primary cultured cortical neurons, *Biol. Pharm. Bull.* (査読有り) 32: 289-292, 2009.
- 11) 松本欣三, 趙 琦, 村上孝寿, 東田道久, 脳とくすりー脳血管性認知症と漢方薬を中心に, 脳 2 1 (査読無し), 12: 114-122, 2009.
- 12) Yokozawa T., Lee Y.A., Zhao Q., Matsumoto K., Cho E.-J., Persimmon oligomeric proanthocyanidins extend life span of senescence-accelerated mice, *J Med Food.* (査読有り) 12:1199-1205, 2009.
- 13) Zhao Q, Matsumoto K., Okada H, Ichiki H, Sakakibara I, Anti-hypertensive and anti-stroke effects of Chrysanthemum extracts in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *J. Traditional Medicine*(査読有り) 25:143-151, 2008.

〔学会発表〕(計 28 件)

- 1) Yamada M., Hayashida M., Zhao Q., Shibahara N., Miyata T., Matsumoto K., Ameliorative effect of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice used as an Alzheimer disease model, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 横浜
- 2) 稲田千香子, 山田麻利名, 趙 琦, 松本欣三, Anti-neurodegenerative effect of tacrine on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced neuronal cell death in organotypic hippocampal slice culture, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年, 横浜
- 3) Zhao Q., Yokozawa T., Park C.H., Tsuneyama K., Miyata T., Matsumoto K., Kangenkaryu, a herbal Chinese prescription, ameliorates dysfunction of central cholinergic systems in db/db mice, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011, 横浜
- 4) Yamada M., Hayashida M., Shibahara N., Miyata T., Matsumoto K., The 9th JSPS-NRCT Joint Semina: Natural Medicine Research for the Next Decade: New Challenges and Future Collaboration, 2010 年 12 月 8~9 日, Bangkok, Thailand
- 5) 山田麻利名, 林田未希, 柴原直利, 松本欣三, 嗅球摘出マウスの学習記憶障害に対する抑肝散の改善効果とその機序, 日本薬学会北陸支部第 122 回例会, 2010 年 11 月 21 日, 金沢
- 6) 松本欣三, 駆瘀血薬を応用した認知症治療戦略とその基礎的 EBM, 第 31 回研究所特別セミナー, 2010 年 10 月 22 日, 富山
- 7) Matsumoto K., Zhao Q., Yokozawa T., Tsuneyama K. (Invited), Kangen-karyu, a traditional Chinese prescription: experimental insight into its utility as an anti-dementia drug, The 2nd China, Japan and Korea International Conference for TCM & The 7th Sino-Russia Biomedical Forum, 2010 年 9 月 16~17 日, Harbin, China
- 8) 趙 琦, 横澤隆子, 宮田健, 常山幸一, 松本欣三, 2 型糖尿病モデルマウスの認知・情動行動障害に対する漢方薬釣藤散の改善効果, 第 61 回日本薬理学会北部会, 2010 年 9 月 10 日, 札幌
- 9) 東田道久, 松本欣三, ラット大脳皮質初代培養細胞の培養日数に伴う各種 mRNA 発現量変化とそれへの 5-HT₂CR RNA editing の影響, 第 61 回日本薬理学会北部会, 2010 年 9 月 10 日, 札幌
- 10) 山邊典子, 盧貞淑, 朴鏞欽, 姜奇成, 趙琦, 松本欣三, 横澤隆子, 糖尿病の脂質代謝異常における冠元顆粒の有用性, 第 27 回和漢医薬学会, 2010 年 8 月 28~29 日, 京都
- 11) 東田道久, 松本欣三, 和漢処方による BNIP-3 mRNA 発現上昇と抗うつ作用との関連性に関する検討, 第 27 回和漢医薬学会, 2010 年 8 月 28~29 日, 京都
- 12) 趙 琦, 横澤隆子, 宮田健, 常山幸一, 松本欣三, 老化促進モデルマウス SAMP8 の学習記憶障害及び脳内 VEGF/PDGF 系障害に対する釣藤散の改善作用, 第 27 回和漢医薬学会, 2010 年 8 月 28~29 日, 京都
- 13) Matsumoto K. (invited), Chotosan and Recognition Behavior, 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2010 年 7 月 17~23 日, コペンハーゲン, デンマーク
- 14) 堀仁美, 村上孝寿, Zhao Q., 東田道久, 松本欣三, 一過性脳虚血誘発のラット海馬グルタミン酸遊離増加に対する黄連解毒湯の作用, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16~18 日, 大阪
- 15) 林田未希, Salin Mingmalairak, 村上孝寿, Zhao Q., 東田道久, 松本欣三, マウスの嗅球摘出により誘発される記憶障害にないする抑肝散の改善効果, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16~18 日, 大阪
- 16) 東田道久, 小林直史, 小松かつ子, 松本欣三, 補中益気湯によるセロトニン 2C 受容体応答調節とその有効性成分解析, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16~18 日, 大阪
- 17) 松本欣三 (招待講演), 釣藤鈎の成分・薬理, 第 25 回生薬に関する懇談会, 2009 年 12 月 5 日, 東京
- 18) Matsumoto K., Zhao Q., Yokozawa T., Tsuneyama T., Tanaka K., Kangenkaryu improves aging-related memory deficit by normalizing NMDA receptor-mediated signaling in the brain, 第 1 回アジア神経精神薬理学会 2009 年 11 月 13~15 日, 京都
- 19) 小林直史, 東田道久, 松本欣三, 補中益気湯によるセロトニン 2C 受容体電流応答及びその活性成分の探索, 第 60 回日本薬理学会北部会, 2009 年 9 月 26 日, 富山
- 20) 松本欣三, 趙 琦, 嶋田豊, 釣藤散と認知症 - 認知症病態動物モデルでの作用と作用機構 - 招待講演, 東洋医学会関東甲信越支部新潟部会, 2009 年 9 月 13 日, 新潟
- 21) 村上孝寿, 山田麻利名, 東田道久, 柴原直利, 松本欣三, 恐怖条件付けによるマウスのフリージング行動に対する数種漢方方剤の影響, 第 26 回和漢医薬学会大会, 2009 年 8 月 29~30 日, 千葉
- 22) 趙 琦, 横澤隆子, 松本欣三, 老化促進

- マウスの認知及び不安情動行動に対する冠元顆粒の効果, 第 26 回和漢医薬学会大会, 2009 年 8 月 29~30 日, 千葉
- 23) 趙 琦, 松本欣三, 林田未希, 常山幸一, 慢性脳虚血マウスの空間認知障害に対する環境刺激の改善効果: VEGF 及び BDNF の関与, 第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 16~18 日, 横浜
- 24) Murakami Y., Cui H-S., Hori H., Zhao Q., Obi R., Matsumoto K., The 8th JSPS-NRCT Joint Seminar on "Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development", 2009 年 2 月 3~4 日, Bangkok, Thailand
- 25) Matsumoto K., Zhao Q., Tohda M., Obi R., TsuneYama K., The 8th JSPS-NRCT Joint Seminar on "Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development", 2009 年 2 月 3~4 日, Bangkok, Thailand
- 26) 村上孝寿, 崔虎山, 堀仁美, 小尾龍右, 松本欣三, 脳虚血に対するベルベリンの保護効果とその作用機序—海馬切片培養系及び脳内透析法による検討, 第 25 回和漢医薬学会大会, 2008 年 8 月 30~31 日, 大阪
- 27) 東田道久, 松本欣三, 釣藤散による細胞内 cAMP 濃度制御とその作用機序・生理的意義に関する検討, 第 25 回和漢医薬学会大会, 2008 年 8 月 30~31 日, 大阪
- 28) 崔虎山, 村上孝寿, 堀仁美, 趙 琦, 小尾龍右, 松本欣三, マウス海馬切片培養系における虚血性障害に対するベルベリンの影響, 第 81 回日本薬理学会年会, 2008 年 3 月 17~19 日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 欣三 (MATSUMOTO KINZO)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号: 10114654

(2) 研究分担者

常山 幸一 (TSUNEYAMA KOICHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授
研究者番号: 10293341

田中 謙 (TANAKA KEN)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 60418689

村上 幸寿 (MURAKAMI YUKIHISA)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教
研究者番号: 00377269

(3) 連携研究者

柴原 直利 (SIBAHARA NAOTOSHI)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号: 10272907