

機関番号：32607

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790631

研究課題名 (和文) 香蘇散の抗うつ様効果におけるオレキシン及びニューロペプチドY神経系の関与

研究課題名 (英文) Involvement of orexin-A and neuropeptide Y in the antidepressant-like effect of kososan.

研究代表者

伊藤 直樹 (ITO NAOKI)

北里大学・東洋医学総合研究所・上級研究員

研究者番号：00370164

研究成果の概要 (和文)：本研究課題で我々は、オレキシン神経系からニューロペプチドY神経系へのシグナル伝達が香蘇散の抗うつ様効果発現に重要な役割を果たしている可能性を初めて示した。これらの知見は、香蘇散の抗うつ様効果が、オレキシン/ニューロペプチドY神経ネットワーク制御の影響を強く受けることを示唆しており、また既存の抗うつ薬の作用メカニズムとの相違を一部明らかにできたと考えられた。本研究成果はオレキシン/ニューロペプチドY神経系を標的とした新規抗うつ薬の開発に貢献できるものと期待する。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, our results raise the possibility that signal pathways from orexin to neuropeptide Y (NPY) system play crucial roles in an antidepressant-like effect of kososan. These findings suggest that the antidepressant-like effect of kososan is strongly associated with the regulation of orexinergic and NPYergic network, and we have partly uncovered the potential differences in the mechanisms underlying the antidepressant-like effects of kososan and of antidepressants. These findings may contribute to the development of antidepressants with novel mechanisms of action targeting the orexinergic and NPYergic system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード：香蘇散、抗うつ様効果、オレキシン、ニューロペプチド

1. 研究開始当初の背景

北里大学東洋医学総合研究所では、古くから抑うつ症状に対して気剤 (気の巡りを改善する漢方薬) を中心とした薬物治療を行っており、一定の臨床効果を上げているが、その科学的根拠は乏しい。本研究は、科学的根拠の蓄積が不十分な漢方処方を対象に、臨床での有用性を裏付ける科学的根拠を基礎研究

で明らかにし、そこで得られた知見を再び臨床にフィードバックさせること、則ちトランスレーショナル・リサーチの実施を大きな枠組みとしている。

2. 研究の目的

これまでに、動物モデルを用いた基礎研究において香蘇散が抗うつ様作用を示し、さらに香蘇散が視床下部-下垂体-副腎系機能の過

剩亢進抑制作用及び脳内神経新生促進作用を介して抗うつ様効果を発揮する可能性を示してきたが、それと同時に脳内ホルモンである orexin A (OX-A) の発現挙動に対して香蘇散が影響を及ぼした結果も得られている。しかし、近年 OX-A とうつ病との関連性が指摘されるようになったものの、その詳細についてはほとんど明らかとなっていない。そこで、平成 19-20 年度に科研費の支援を受け、OX-A の抗うつ様効果及びその作用メカニズム（神経新生に対する作用）に関する研究を行い、OX-A が間接的な海馬神経新生促進作用を介して抗うつ様効果を発揮することを初めて明らかとした。またその研究において、抗うつ様効果及び海馬神経新生促進に深く関与することが報告されている神経ペプチド neuropeptide Y (NPY) の発現挙動に OX-A が影響を及ぼすことも示した。このことから、香蘇散による脳内神経新生促進作用は、OX-A や NPY を介した作用である可能性が考えられる。これらの結果を踏まえて、本研究課題で我々は香蘇散の抗うつ様効果発現及び神経新生促進作用における OX-A 及び NPY の関与の重要性を検討することを主な目的とする。また、それらの研究と平行させて、OX-A の抗うつ様作用メカニズムの未だ不明な点についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 香蘇散の抗うつ様効果および海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用に対するオレキシン受容体阻害剤の影響

物理的なストレス（強制水泳、ケージ傾斜、汚物ケージ並びに振動）負荷により作製したうつ様モデルマウス（ストレス誘発うつ様モデルマウス）に、香蘇散（1 g/kg）またはポジティブコントロールとしてミルナシプラン（60 mg/kg）を 4 週間経口投与した。それと平行させて、オレキシン受容体（OXR1）阻害剤（15 mg/kg）を計 6 回腹腔内投与し、4 週間後に強制水泳試験（FST）を施し、無動時間を測定することにより抗うつ様効果を判定した。また、その翌日に還流固定を施し、脳を採取した。その固定脳を振動薄切機 vibratome で 50 μm にスライスし、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を行うことにより、OXR1 阻害剤の海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用に与える影響を検討した（BrdU は、DNA 合成期に DNA に取り込まれることによって神経系前駆細胞のような増殖性細胞を標識することができる物質である）。

(2) 海馬 NPY 発現挙動に及ぼす香蘇散の影響

ストレス誘発うつ様モデルマウスに、香蘇散またはミルナシプランを 4 週間経口投与、及び OXR1 阻害剤を腹腔内投与した後、上記と同様な方法で、脳を採取した。その後、

vibratome により脳スライスを作製し、抗 NPY 抗体を用いて免疫染色を行った。

(3) OX-A の抗うつ様効果に対する NPY 受容体阻害剤の影響

OX-A の脳室内投与 4 日後に、FST による抗うつ様効果に与える影響を検討した。NPY 受容体（Y1R）阻害剤は、OX-A と同時に脳室内投与した（0.3 nmol/匹）。また、Y1R 阻害剤の自発運動量に与える影響を脳室内投与 3 日後にオープンフィールド試験（OFT）により判定した。

(4) 香蘇散の抗うつ様効果に対する Y1R 阻害剤の影響

ストレス誘発うつ様モデルマウスに、香蘇散を 4 週間経口投与した。Y1R 阻害剤は、抗うつ様効果判定の 1 週間前から埋め込み型浸透圧ポンプを用いて持続的に脳室内投与した（0.3 nmol/day）。抗うつ様効果は、香蘇散投与 4 週間後に FST により判定した。また、別のマウス（非モデルマウス）を用いて、Y1R 阻害剤の浸透圧ポンプによる持続的脳室内投与の自発運動量および食餌・飲水量に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 香蘇散の抗うつ様効果および海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用に対するオレキシン受容体阻害剤の影響

これまでに我々は、ストレス誘発うつ様モデルマウスを用いて香蘇散投与により抗うつ様効果、海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用および脳内 OX-A 陽性細胞数の増加作用を示す結果を得ている。また、OX-A 自身が海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用を介して抗うつ様効果を発揮することも示してきた。そこで、香蘇散の抗うつ様効果および海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用がどの程度 OX-A 神経系の制御を受けているのかを調べるために、OXR1 阻害剤を用いて、行動薬理的、組織化学的に検討した。

その結果、ストレス誘発うつ様モデルマウスで認められた FST における無動時間の延長は、香蘇散の 4 週間投与により有意に短縮し、その効果は OXR1 阻害剤前投与により消失した（図 1）。一方、ミルナシプラン投与で認められた無動時間の短縮作用は OXR1 阻害剤前投与では阻害されなかった。これらのことから、香蘇散投与で認められた無動時間の短縮、則ち抗うつ様効果には、OXR1 シグナルを介した作用が深く関与していることが示唆された。

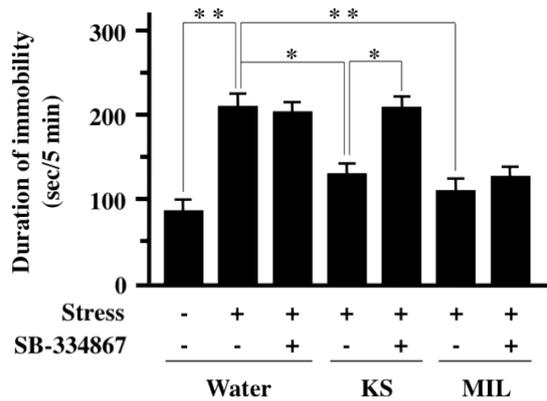


図1 香蘇散の抗うつ様効果に対するオレキシン受容体阻害剤の影響
SB-334867, OXR1 阻害剤; KS, 香蘇散; MIL, ミルナシブラン.
* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

また、ストレス誘発うつ様モデルマウスで認められた海馬における BrdU 陽性細胞数の減少は、香蘇散の4週間投与により有意に増加し、その効果は OXR1 阻害剤前投与により完全に阻害された(図2)。一方、ミルナシブラン投与で認められた BrdU 陽性細胞数の増加は OXR1 阻害剤前投与では阻害されなかった。これらのことから、香蘇散投与で認められた海馬 BrdU 陽性細胞数の増加、則ち海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用には、抗うつ様効果と同様に OXR1 シグナルを介した作用が深く関与していることが示唆された。

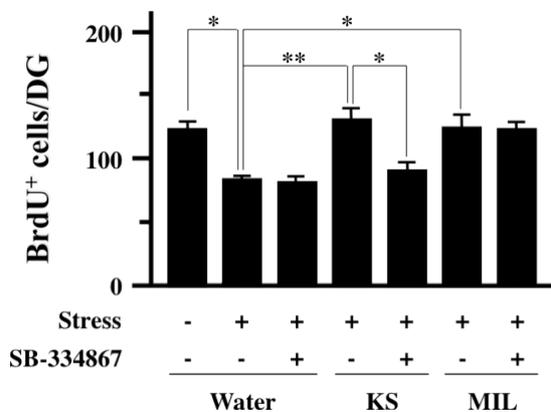


図2 香蘇散の海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用に対するオレキシン受容体阻害剤の影響
SB-334867, OXR1 阻害剤; KS, 香蘇散; MIL, ミルナシブラン.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

以上の結果から、香蘇散による抗うつ様効果および海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用は、OXR1 を介した OX-A 神経系の制御を強く受けている可能性が示された。一方で、ミルナシブランは、OX-A 神経系制御を介さない経路で、抗うつ様効果および海馬神経系

前駆細胞の増殖促進作用を発揮することが示唆された。

(2) 海馬 NPY 発現挙動に及ぼす香蘇散の影響

NPY は OX-A と同様に摂食調節に関与する神経ペプチドであるが、NPY の脳室内投与により抗うつ様効果および海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用を発揮することも報告されている。また、これまでの我々の検討においても、OX-A の脳室内投与により認められた抗うつ様効果および海馬神経系前駆細胞の増殖促進作用に NPY 神経系の調節が一部関与していることを報告している。そこで、香蘇散投与による海馬 NPY 発現挙動に及ぼす影響を、海馬 NPY 陽性細胞数を指標に検討した。

その結果、ストレス誘発うつ様モデルマウスで認められた海馬における NPY 陽性細胞数の減少は、香蘇散の4週間投与により有意に増加した(図3)。また、その増加は OXR1 阻害剤前投与により完全に阻害された。一方、ミルナシブラン投与では NPY 陽性細胞数の増加は認められなかった。

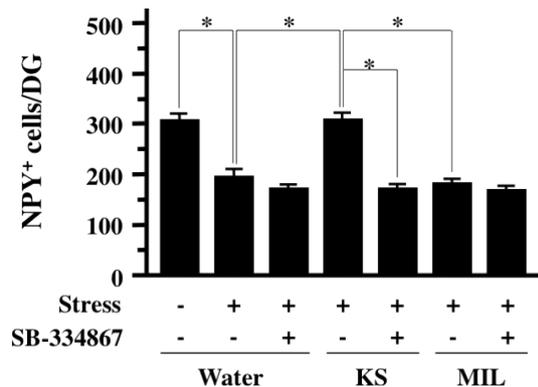


図3 海馬 NPY 発現挙動に及ぼす香蘇散およびオレキシン受容体阻害剤の影響
SB-334867, OXR1 阻害剤; KS, 香蘇散; MIL, ミルナシブラン.
* $p < 0.001$.

このことから、香蘇散投与で認められた海馬 NPY 陽性細胞数の増加は、香蘇散による OX-A 神経系制御機構が深く関与している可能性が示された。

(3) OX-A の抗うつ様効果に対する Y1R 阻害剤の影響

これまでに我々は、OX-A の脳室内投与が海馬 NPY 陽性細胞数を増加させることを報告している。しかし、その増加が OX-A の抗うつ様効果にどの程度関与しているかは不明であった。そこで、OX-A の抗うつ様効果が Y1R 阻害剤で影響を受けるかどうかを検討した。

その結果、OX-A の脳室内投与により認め

られた FST における無動時間の短縮は、Y1R 阻害剤投与により消失した (図 4)。

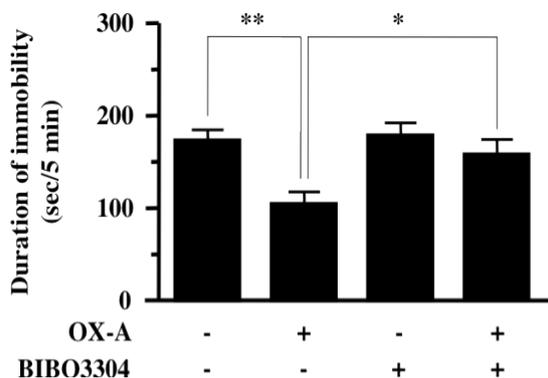


図 4 OX-A の抗うつ様効果に対する Y1R 受容体阻害剤の影響
BIBO3304, Y1R 阻害剤
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

また、この効果に Y1R 阻害剤自体の自発運動量に及ぼす効果が影響している可能性を探るために、OFT を用いて Y1R 阻害剤の自発運動量に及ぼす作用を検討したところ、Y1R 阻害剤は自発運動量 (総移動距離) に影響を及ぼさなかった (データ未提示)。

これらのことから、OX-A による抗うつ様効果には、Y1R を介した NPY 神経系が一部関与している可能性が示された。

(4) 香蘇散の抗うつ様効果に対する Y1R 阻害剤の影響

これまでの検討で香蘇散投与によって海馬 NPY 陽性細胞数の増加が認められていることから、この増加が香蘇散の抗うつ様効果にどの程度関与するのかを Y1R 阻害剤を用いて検討した。

その結果、香蘇散の 4 週間投与によって認められた抗うつ様効果は、Y1R 阻害剤によって消失した (図 5)。

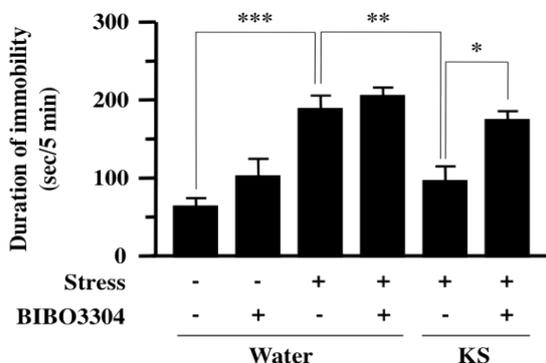


図 5 香蘇散の抗うつ様効果に対する Y1R 受容体阻害剤の影響
BIBO3304, Y1R 阻害剤; KS, 香蘇散.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

また、(3) の検討と同様に、Y1R 阻害剤の浸透圧ポンプによる持続脳室内投与による自発運動量および食餌・飲水量に及ぼす影響の有無を調べるために、別のマウス (非モデルマウス) を用いて検討したところ、Y1R 阻害剤は自発運動量および食餌・飲水量に影響を及ぼさなかった (データ未提示)。

これらの結果から、香蘇散投与で認められた海馬 NPY 陽性細胞数の増加は、香蘇散の抗うつ様効果に深く関与していることが示唆された。

以上の成果から、香蘇散の抗うつ様効果は、OX-A/NPY 神経ネットワークの制御の影響を強く受ける可能性が示され、OX-A 神経系から NPY 神経系へのシグナル伝達が香蘇散の効果に重要な役割を果たしている可能性が推定された。

本研究の成果は、これまでにない香蘇散の新たな抗うつ様作用メカニズムに関するエビデンスを提供するものであると同時に、OX-A/NPY 神経系の調節を標的とした新規作用メカニズムを有する抗うつ薬の開発に役立てられるものと期待する。

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 1 件)

Ito N., Yabe T., Nagai T., Oikawa T., Yamada H. and Hanawa T. A possible mechanism underlying an antidepressive-like effect of kososan, a Kampo medicine, via the hypothalamic orexinergic system in the stress-induced depression-like model mice. *Biol. Pharm. Bull.* **32**(10), 1716-1722, 2009. (査読 有)

[学会発表] (計 2 件)

Ito N., Intracerebroventricular injection of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation., Neuroscience 2010, SfN's 40th annual meeting, Nov. 13-17/2010, San Diego.

伊藤直樹、香蘇散の抗うつ様効果におけるオレキシン神経系の関与、第 26 回和漢医薬学会学術大会、2009/8/29-30、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 直樹 (ITO NAOKI)

北里大学・東洋医学総合研究所・上級研究員

研究者番号：00370164

(2) 研究協力者

花輪 壽彦 (HANAWA TOSHIHIKO)

北里大学・東洋医学総合研究所・所長
研究者番号：40164892
及川 哲郎 (OIKAWA TETSURO)
北里大学・東洋医学総合研究所・部長
研究者番号：10370165
山田 陽城 (YAMADA HARUKI)
北里大学・北里生命科学研究所・教授
研究者番号：60096691
矢部 武士 (YABE TAKESHI)
北里大学・北里生命科学研究所・講師
研究者番号：40239835
永井 隆之 (NAGAI TAKAYUKI)
北里大学・北里生命科学研究所・講師
研究者番号：172487