

令和元年5月24日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08315

研究課題名(和文) 神経栄養因子様作用を有する漢方薬・抑肝散の神経変性に対する有効性の検証

研究課題名(英文) Efficacy of yokukansan, a traditional Chinese medicine with neurotrophic factor-like effects, on neurodegeneration

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抑肝散には神経栄養因子様作用があり、神経保護や神経突起(軸索)伸展・神経新生作用を持つ可能性が示唆されていたが、変性神経に対する保護・機能改善効果の詳細は未だ不明であった。そこで当研究では、ニューロン・アストロサイト共培養系オータプス培養標本を用いてA_β処置による神経変性モデル、Sema3A処置による軸索特異的変性モデルなどの新規神経変性モデルを構築した。次にこの神経変性モデルを用いて神経変性や軸索伸展に対する抑肝散の効果を確認した。抑肝散には軸索変性に対して改善作用があることが示唆された。さらにこの効果には神経栄養因子BDNF、NGFのほか軸索伸張阻害因子Sema3Aの関与も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方薬「抑肝散」は、認知症の諸症状を改善し、神経保護や神経突起(軸索)伸展・神経新生作用を持つ可能性が示唆されたが、詳細は不明であった。そこで当研究では、脳内細胞構成を反映した新規神経変性モデルを用いて、神経変性や軸索伸展に対する抑肝散の『神経栄養因子様作用』を検証し、抑肝散を認知症治療薬として確立させることを目的に研究を遂行した。我々の研究で抑肝散以外にも、同様の『神経栄養因子様作用』をもつ漢方薬が明らかとなっている。今回構築した新規神経変性モデルを用いて認知症をはじめとする神経変性疾患に対する新規予防・治療法の探索が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Yokukansan (YKS) has a neurotrophic factor-like effect, and it has been suggested that it may have neuroprotection, neurite extension and neurogenesis. However, the details of the protective effects of YKS on neurodegeneration were unknown. Therefore, we constructed a new neurodegenerative model such as an axon-dendrite degeneration model by A_β treatment and an axon-specific degeneration model by Sema3A treatment using the neuron-astrocyte co-culture system. Next, using this model, the effects of YKS on neurodegeneration and axonal extension were confirmed. It was suggested that YKS has an improving effect on axonal degeneration rather than dendrites, and the neurotrophic factors BDNF, NGF and the axonal elongation inhibitor Sema3A also contribute to these effects. Furthermore, using the new neurodegenerative model constructed in this study, it became possible to search for new prevention and treatment methods for neurodegenerative diseases including dementia.

研究分野：神経薬理学

キーワード：漢方薬 オータプス培養 アミロイド Sema3A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病など神経変性、神経細胞死を病態の特徴とする神経変性疾患や、うつ病などの神経精神疾患の研究では、神経保護作用を有する神経栄養因子とのかかわりが注目されている。神経栄養因子は神経細胞の生存や機能維持に重要な働きを担っているが、認知症やうつ病などでは脳内の神経栄養因子 (NGF、BDNF など) が減少し、神経細胞保護や神経新生の低下、神経機能障害が生じる。神経栄養因子の脳内注入による認知機能改善等の治療効果は、ある程度認められているが、一方で、末梢からの神経栄養因子の投与では、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、神経栄養因子様作用もしくは神経栄養因子誘導作用を持つ薬物が、経口投与が難しい神経栄養因子の代替としてアルツハイマー病などの神経変性疾患や精神神経疾患の治療薬として期待されている。

2. 研究の目的

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。一方で根治的治療法は確立しておらず、患者の ADL (日常生活動作) を低下させない新しい認知症治療薬が求められている。その中で、ADL を低下させずに認知症の諸症状を改善する漢方薬「抑肝散」が脚光を浴びている。我々は、漢方薬の認知症治療薬としての科学的背景を明らかにする事が現代医療の中で必須と考え、薬理学的手法を用いて研究を推進してきた。抑肝散はセロトニン神経系やアセチルコリン神経系を賦活して認知機能障害など認知症の諸症状を改善すること、これらの作用には神経保護効果が寄与することを報告してきた。さらに、抑肝散には神経の分化・再生など神経の機能維持に重要な神経栄養因子と類似した作用あることを見出した。

このように抑肝散には神経栄養因子様作用があり、神経保護や神経突起 (軸索) 伸展・神経新生作用を持つ可能性が示唆されたが、変性神経に対する保護・機能改善効果の詳細は未だ不明である。そこで本研究では、脳内細胞構成を反映した新規神経変性モデルを用いて、神経変性や軸索伸展に対する抑肝散の『神経栄養因子様作用』を検証し、抑肝散を新たな認知症治療薬として確立させることを目的とした。

3. 研究の方法

オータプス培養標本を用いて神経機能低下や神経形態変化等の神経変性過程の各状態を反映した新規神経変性モデルを構築し、漢方薬・抑肝散の神経変性に対する改善効果を検証した。

(1) オータプス培養細胞系を用いた新規神経変性モデルの開発

シナプス数減少などの神経機能低下や軸索退縮などの神経形態変化を反映するニューロン・アストロサイト共培養系オータプス培養標本を確立した。さらに構築したそれぞれのモデル細胞の神経学的特性を、ニューロン形態変化 (軸索退縮など) や、シナプスの形成およびシナプス密度についてイメージング法で解析した。ニューロンの樹状突起を MAP2 抗体、軸索を Tau 抗体、シナプスを VGlut1 抗体、アストロサイトを GFAP 抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察した。Sholl analysis 法により、ニューロンに投射するシナプスの形成部位、シナプスのサイズ、樹状突起と軸索の伸展程度を定量化した。

(2) 神経変性モデルを用いた抑肝散の神経変性改善効果の検証

(1) において開発したモデルを用いて神経変性に対して抑肝散の神経栄養因子様作用が改善効果を示すか、ニューロン形態を免疫染色法で検討した。ニューロン形態・機能変化を示した神経変性モデルに、抑肝散 (ならびにその構成生薬) を処置し、ニューロン形態や機能に対する影響を検討した。さらに、神経栄養因子 (BDNF、NGF など) や Sema3A 等ニューロン形態関連因子の挙動も併せて解析し (RT-PCR 法) 認知症をはじめとする神経変性疾患に対する新規予防・治療法に繋げる。

4. 研究成果

(1) オータプス培養細胞系を用いた新規神経変性モデルの開発

はじめに、シナプス数減少などの神経機能低下や軸索退縮などの神経形態変化を反映するニューロン・アストロサイト共培養系オータプス培養標本の構築を行った。通常のニューロン分散培養では、ニューロン同士が複雑に軸索や樹状突起を伸展して互いにシナプスを形成するため、一つのニューロンに着目した軸索やシナプス解析が難しい。そこで、ガラス基板上にドット状にアストロサイトを培養してニューロン接着領域を区分化し、そのアストロサイト層上に単一ニューロンを独立して培養した。複雑な神経回路を簡素化して解析することが可能となった。また、ニューロンやアストロサイトの種類や混成比を制御することもできるようになった。

さらに、この培養標本に各処置を施し、軸索退縮やシナプス機能低下などの神経変性を反映させたモデルの構築を行った (図 1)。

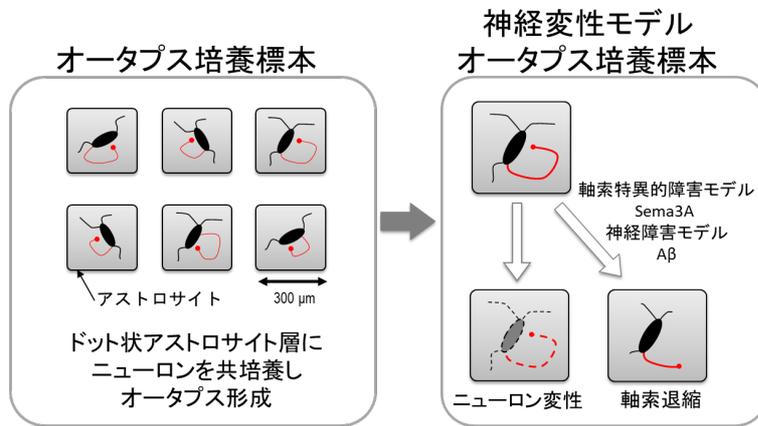


図1 本研究で構築した新規神経変性モデル培養標本

まず神経伸長阻害作用をもつセマフォリン 3A(Sema3A)を用いて神経障害モデルを作成した。Sema3A は、セマフォリンファミリーに属する軸索の伸長を制御する因子の一つで、特に強い神経伸長阻害作用をもつ反発性ガイダンス因子である。成体の中枢神経系においても強く発現し、中枢神経の再生にも寄与が考えられ、損傷した軸索の再生治療のターゲットとしても注目されている。

Sema3A 処置群では、軸索の起始部にあたる内側において、著しい交差数の減少が認められ、Sema3A が軸索の伸展・分岐を特異的に阻害した。一方で、樹状突起には影響を及ぼさなかった。このように Sema3A 処置によって軸索伸展が特異的に阻害される神経変性単一ニューロンモデルが構築できた。

アルツハイマー病(AD)患者の脳内では、アミロイド(A β)の蓄積により樹状突起・軸索の変性、シナプスの現象が引き起こされ、認知機能障害を発症すると考えられている。そこでA β 暴露による神経突起退縮やシナプス機能低下などの神経変性を反映させたモデルの構築を行った。今回用いる共培養系においては、ニューロン播種後約2週間で神経機能が成熟するため、ニューロン播種4日後(DIV4)を形成期、14日後(DIV14)を成熟期としてそれぞれの時期におけるA β 暴露の影響を検討した。

DIV4においてA β 1 μ M以上の暴露で、濃度依存的に樹状突起・軸索共に有意な障害が見られた。なお、形成期(DIV4)においては、神経突起が伸長する時期であり、シナプスは未成熟である。一方、DIV14においても、A β 1 μ M以上の暴露で、濃度依存的に樹状突起に有意な障害が見られた。また、vGLUT1陽性シナプスも、濃度依存的に有意な減少が見られた。このようにニューロン形成期ならびに成熟期にA β を暴露することによって神経突起、シナプスいずれも障害する神経変性モデルが構築できた。

神経変性モデルでは、Sema3A は、樹状突起には影響を与えず軸索のみに障害をもたらした。一方A β 暴露による神経変性モデルでは、軸索のみならず樹状突起やシナプス形成も障害された。神経変性疾患治療候補薬についてこの2つのモデル培養系を用いて評価が可能となった(投稿準備中)。

(2) 神経変性モデルを用いた抑肝散の神経変性改善効果の検証

A β やSema3A 処置による神経変性モデルにそれぞれ漢方薬である抑肝散を処置し、ニューロン形態変化(軸索退縮など)や、シナプスの形成およびシナプス密度に対する影響を解析した。

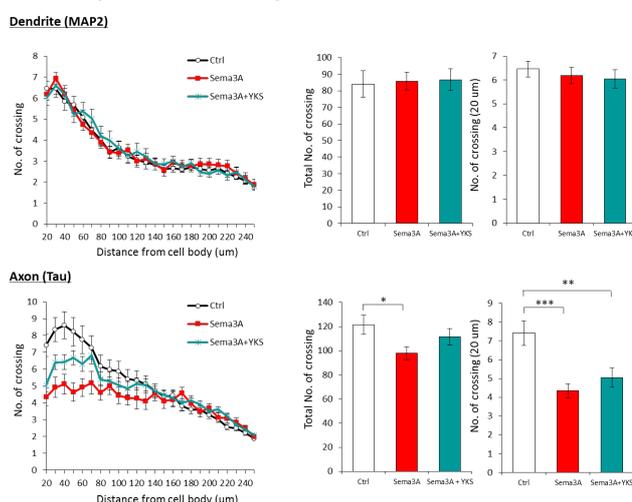


図2 Sema3A 暴露軸索変性モデルに対する抑肝散の効果

Sema3A 暴露軸索変性モデルに対して、ニューロン播種1日後にSema3Aと共に抑肝散を処置し、同様の方法で樹状突起ならびに軸索を解析した。Sema3A は、樹状突起に影響を与えなかったが、抑肝散も同様に影響を与えなかった。一方で、Sema3A による軸索の障害を抑肝散によって改善する傾向が示された(図2)。

また、A β 暴露による神経変性モデルに対しても同様に抑肝散を処置し、形態学的検討を行ったところ、軸索障害が改善する傾向が認められた。今後も検討を継続し、

効果を確定する予定である。以上の結果、いずれのモデルにおいても、神経変性に対する抑肝散の改善効果の傾向が認められた。

さらに、神経栄養因子 (BDNF, NGF) や Sema3A 等ニューロン形態関連因子に対する抑肝散の効果をウエスタンブロット法や RT-PCR 法によって検討した。その結果、抑肝散には神経栄養因子受容体 Trk の直接アゴニスト作用はないが、神経栄養因子と同様なシグナル経路の活性化作用があり、初代培養アストロサイトにおいて、抑肝散の BDNF や NGF の発現誘導作用が認められた (投稿準備中)。

我々の研究室では、抑肝散以外にも認知症や向精神作用を目的に臨床で適応されている漢方薬についても研究を実施している。その漢方薬の中に、抑肝散と同様に神経障害を改善する効果を示すものがあることも明らかにしている。この漢方薬についても投稿を予定している。抑肝散や、これらの漢方薬に含まれる構成生薬や有効成分に着目することで、神経障害の改善機序の詳細や、新たな漢方由来治療薬の提案につながるものと期待している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Extract of Yokukansan improves anxiety-like behavior and increases serum brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischemia combined with amyloid- 42 peptide.

Nogami-Hara A, Kubota K, Takasaki K, Watanabe T, Egahira N, Iba H, Fujikawa R, Katsurabayashi S, Hatip FB, Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K. J Tradit Chin Med, 39/1,5 0-58 (2019) 査読有

The Japanese Angelica acutiloba root and yokukansan increase hippocampal acetylcholine level, prevent apoptosis and improve memory in a rat model of repeated cerebral ischemia.

Nogami-Hara A, Nagao M, Takasaki K, Egashira N, Fujikawa R, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Hatip FB, Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K. J Ethnopharmacol., 214/,190-196 (2018) 査読有

Astrocytes with previous chronic exposure to amyloid -peptide fragment 1-40 suppress excitatory synaptic transmission.

Kawano H, Oyabu K, Yamamoto H, Eto K, Adaniya Y, Kubota K, Watanabe T, Hirano-Iwata A, Nabekura J, Katsurabayashi S, Iwasaki K. Journal of Neurochemistry, 143/6,624-634 (2017) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

単一ニューロン培養標本を用いた神経変性モデルの作製と抑肝散の効果検討

平島沙希、山口純生、窪田香織、井上良馬、植木 哲、栗山桃子、大藪康平、渡辺拓也、桂林秀太郎、岩崎克典

第 34 回和漢医薬学会学術大会

2017 年 8 月 26 ~ 27 日、福岡、福岡市

神経栄養因子様作用を介した漢方由来認知症治療薬の開発

窪田香織、渡辺拓也、桂林秀太郎、岩崎克典

第 90 回日本薬理学会年会

2017 年 3 月 15 ~ 17 日、長崎、長崎市

〔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)研究分担者

なし

(2)連携研究者

連携研究者氏名：桂林 秀太郎
ローマ字氏名：Shutaro Katsurabayashi

連携研究者氏名：岩崎 克典
ローマ字氏名：Katsunori Iwasaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。