

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09319

研究課題名(和文)漢方方剤「香蘇散」煎剤の抗うつ様活性発現機序のプロテオーム解析を用いた解明

研究課題名(英文)Proteomic analysis of the mode of action of antidepressive-like effect of a Kampo (traditional Japanese) medicine "kososan" extract.

研究代表者

永井 隆之(NAGAI, Takayuki)

北里大学・大学院感染制御科学府・准教授

研究者番号：00172487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：対人ストレスのモデルである慢性社会的敗北ストレス(CSDS)誘発うつ様モデルマウスに漢方方剤「香蘇散」煎剤を経口投与し、抗うつ様活性について検討するとともに脳の海馬について安定同位体標識法によるプロテオーム解析を行った。

その結果、同モデルマウスに対して香蘇散煎剤が抗うつ様作用を示すこと、その発現に飼育飼料が関わっていることが明らかとなり、CSDSにより海馬で発現量が変化したタンパク質185種のうち、香蘇散煎剤投与により回復するタンパク質として精神疾患や炎症関連タンパク質を含む24種が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、社会的敗北ストレス(CSDS)誘発うつ様モデルマウスで漢方方剤「香蘇散」の抗うつ様活性が評価できることが明らかとなったことから、対人ストレスで惹起されるうつ症状に有効な漢方薬などの薬剤の評価に本モデルが有用であることが示された。

また、網羅的にタンパク質を解析できるプロテオーム解析により、うつ様症状に伴って脳(海馬)で発現量が変化し、香蘇散によるうつ様症状の改善によって発現量が正常状態に回復するタンパク質が同定されたことから、同解析法がうつ症状の発症機序や抗うつ薬の薬効機序の解明に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether "kososan", a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, affected social behavior in mice exposed to chronic social defeat stress (CSDS), an animal model of psychosocial stress, and then, proteomic analysis with stable isotope labeling was used to identify brain hippocampus proteins that are affected by kososan treatment.

As a result, oral administration of kososan extract alleviated social avoidance, a depression-like behavior, caused by CSDS exposure, and it was revealed that the animal feed was involved in its activity. The expression of 185 proteins was increased or decreased in the hippocampus of the model mice, but 24 proteins, including psychiatric disorder- and inflammation-related proteins, recovered on kososan treatment.

研究分野：漢方薬理学

キーワード：漢方薬 香蘇散 うつ 社会的ストレス マウスモデル 海馬 プロテオーム解析 安定同位体標識法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、うつ病患者の増加が社会的に問題となっており、「うつ」などのメンタルヘルスの不調を未然に防止するため、2015年12月から会社でストレスチェックの実施が法的に義務付けられた。また、うつ病の治療においては、既存の抗うつ薬が重度のうつ病に対して有効であるものの、軽度のうつ病に対しての有効性が乏しいことや(図1)、長期服用による基礎疾患への悪影響などが報告されており、その治療法の改善・改良が求められている。一方で、漢方薬の中には抑うつ症状に対して臨床的に有効性を示し、西洋薬に認められる副作用も少ないことから、種々の抑うつ症状の治療に利用されているものがある。その作用メカニズムには直接の中枢神経系に対する作用に加え、西洋薬にはないメカニズムも有している可能性が推定されているが、多くの不明な点が残されている。

研究代表者らはこれまでに、環境ストレス負荷の実験系で漢方方剤「香蘇散」煎剤が抗うつ様活性を示すことを明らかとしている。すなわち、強制水泳・傾斜ケージストレス・汚物ケージストレス・振動ケージストレスを慢性的に負荷して作成したうつ様モデルマウスにおいて、うつ様状態の指標である強制水泳試験における無動時間が有意に延長し、香蘇散煎剤を連日経口投与することによって無動時間が有意に短縮したことから、抗うつ様活性を示すことを明らかとした¹⁾。また、香蘇散煎剤の抗うつ様活性のメカニズムについて検討し、モデルマウスにおいて異常に活性化した視床下部-下垂体-副腎皮質系が香蘇散煎剤の投与によって正常状態に抑制されることを見出した¹⁾。さらに、免疫組織学的検討によりモデルマウスの脳の海馬歯状回で抑制された細胞増殖が、香蘇散煎剤の投与によって回復したことから、ストレス負荷によって低下した海馬歯状回における神経新生を香蘇散煎剤が回復させることを示唆した^{2,3)}。一方、研究代表者と研究分担者の小寺らの共同研究により、環境ストレス誘発うつ様モデルマウスの脳の視床下部についてアガロース2次元電気泳動法によるプロテオーム解析を行い、ストレス負荷により発現量が増加し、香蘇散煎剤の投与により回復するタンパク質として metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2) と 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) を見出した⁴⁾。研究代表者らはマウス脳の視床下部についてウェスタンブロッティングによりプロテオーム解析の結果を確認し、さらに免疫組織染色により mGluR2 の視床下部室傍核における発現量がモデルマウスで減少し、香蘇散煎剤の投与により回復することを明らかとした。また、CNPase の isoform 2 の脳弓における発現量がモデルマウスで増加し、香蘇散煎剤の投与によって減少することを明らかとした⁴⁾。しかし、電気泳動ベースのプロテオーム解析ではゲル上のスポットで発現量を測定するため、微量タンパク質の発現量の差異を検出することは困難であった。

研究分担者の伊藤らはこれまでに、社会的ストレス負荷の実験系で香蘇散煎剤が抗うつ様活性を示すことを明らかとしている。すなわち、テストマウスをアグレッサーマウスに攻撃させて作成した慢性社会的敗北ストレス誘発うつ様モデルマウスが、社会的相互作用試験において社会的接触行動を減少させ、香蘇散煎剤を連日経口投与することにより社会的接触行動が有意に回復することを明らかにしている⁵⁾。また、社会的ストレス負荷で誘発される脳内炎症反応を香蘇散煎剤が抑制することを明らかにしている⁵⁾。しかし、社会的ストレス誘発うつ様モデルマウスを用いたプロテオーム解析はそれまで行われていなかった。

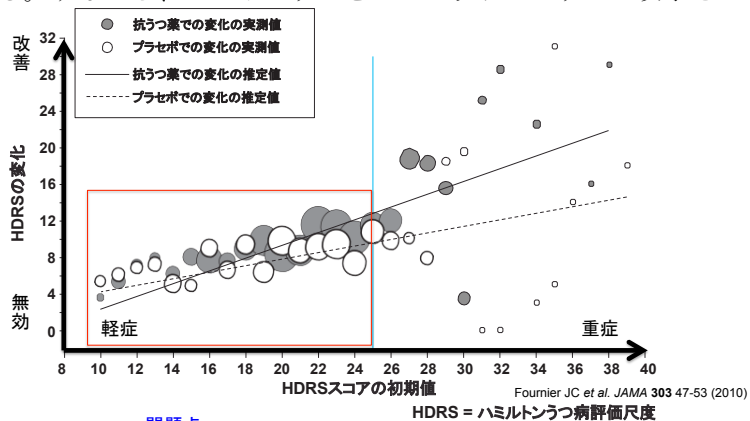


図1. 既存の抗うつ薬の問題点

2. 研究の目的

漢方方剤「香蘇散」は、臨床においてうつ様症状に一定の効果を示すとされており、これまでに研究代表者らは種々のストレス誘発うつ様モデルマウスでの免疫系機能変化、中枢神経系の病的変化を解析し、本漢方薬の抗うつ様効果やその作用メカニズムを一部明らかにしてきた。環境ストレス誘発うつ様モデルマウスを用いた研究では、視床下部-下垂体-副腎系の機能異常¹⁾、神経ペプチドであるオレキシンやニューロペプチド Y の制御の変調の回復が香蘇散の薬効発現に関与することを明らかにしている^{2,3)}。また、同モデルマウスの視床下部について2次元電気泳動法や安定同位体標識法によるプロテオーム解析により、mGluR2 や CNPase1 等のタンパク質の発現量の変化が香蘇散の薬効の一部関与していることも見出してきている⁴⁾。一方、うつ病態の発症には脳内や末梢の免疫系が関わっていることが報告されていることから、Th1 優位な C57BL/6 マウスを用いた慢性社会的敗北ストレス(CSDS)誘発うつ様モデルを用いた

研究を行い、香蘇散による抗うつ様活性に脳内炎症反応抑制が一部関与することを明らかにしている⁵⁾。一方、脳内炎症の進展には多数の因子が関与する可能性が考えられることから、原因因子や香蘇散による改善効果発現に関与する因子の解明には網羅的な因子の解析が重要となる。

そこで本研究では、香蘇散の作用機序の解明を目的とし、Th2 免疫応答も解析可能な BALB/c マウスを用いた CSDS 誘発うつ様モデルの確立を行うとともに、CSDS 負荷でうつ様行動が確認されたマウスの脳組織（海馬）を用い、安定同位体標識法による網羅的なタンパク質解析法であるプロテオーム解析を行うことで、脳内炎症をはじめ、香蘇散の抗うつ様活性に関連する微量タンパク質の推定研究を行った。

3. 研究の方法

(1) CSDS 誘発うつ様モデルマウスの作製及び評価

CSDS 誘発うつ様モデルは、BALB/c マウス（8 週齢、雄性）に対し、ICR マウス（リタイア、雄性）の攻撃によるストレスを 1 日 5 分間 5 日間連続で負荷することにより作製した。ストレス負荷によるマウスへの影響の評価方法として体重及び摂餌量の測定、実験開始 12 日目でのオープンフィールドテスト、13 日目での社会的行動試験(SIT)、14 日目での強制水泳試験を用いた検討を行った。

(2) 海馬におけるプロテオーム解析

採取したマウス脳の花馬からタンパク質を抽出後、安定同位体標識試薬 TMT (Tandem Mass Tag)を用いた LC-MS によるプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) CSDS 誘発うつ様モデルマウスの作製条件及び香蘇散の効果の検討

本研究の途上で、CSDS 誘発うつ様モデルマウスのうつ様行動は飼育環境など多くの外的・内的要因で不安定となることが判明した。このため、香蘇散の作用評価に適した飼育条件などを整えるための検討をまず行った。

初めにアルファルファ含有の CE-2 及び非含有の LabDiet5058 の 2 種類の飼料で飼育したマウスにおけるうつ様行動を検討した。その結果、2 群間での行動に特徴的な相違は認められなかったが、SIT において LabDiet5058 飼育マウスの方が接触行動異常を示した割合が CE-2 飼育マウスより高く (86%対 67%)、またマウス個体毎の変動係数 (CV 値) も低い値を示した (0.77 対 1.03)。そこで、2 種類の飼料を摂食させた条件下で香蘇散煎剤 (1 g/kg/day) を 14 日間経口投与し、うつ様行動を比較評価したところ、いずれの飼育条件下でも SIT においてストレス負荷群での社会的接触行動の減少及び忌避行動の増加のうつ様行動が認められたが、CE2 飼育マウスでは香蘇散煎剤投与による改善効果が観察されなかったのに対し、LabDiet5058 飼育マウスでは香蘇散煎剤投与による改善効果が確認され、飼育条件が確立できた (図 2)。

本研究で香蘇散の行動試験による抗うつ様作用の評価に適した飼育条件として選別した飼料 (LabDiet5058)には食物繊維成分としてアルファルファが含まれておらず、本成分の腸管免疫系に対する介入作用が香蘇散の評価に適していないと考えられた。

(2) 海馬におけるプロテオーム解析

健常およびうつ様行動マウスを選別し (図 2)、15 日目に採取したマウス脳の花馬についてプロテオーム解析を行った結果、比較可能なペプチドとして 29,498 種が検出された。これらのペプチド情報から同定し、ストレス負荷で発現量が変化したタンパク質 185 種のうち、香蘇散煎剤投与により統計学的に有意に回復したタンパク質は 24 種で、精神疾患や炎症に関連する phospholipase C-gamma 1 や peroxiredoxin 6, membrane protein MLC1 も含まれていた。また ストレス負荷で発現量が変化したペプチド 1,073 種のうち、香蘇散煎剤投与によって回復したペプチドは 171 種であった。そのうち 15 種のペプチドにおいて脱アミノ化や酸化などの翻訳後修飾が観察された。また、これらの 171 種のペプチドから同定されたタンパク質 154 種についてパスウェイ解析を行ったところ、シナプス小胞サイクルやアミロイド重合体による炎症カスケードを構成するタンパク質が含まれていた。

本モデルマウスを用いた海馬におけるプロテオーム解析で同定された phospholipase C-gamma 1 はうつ病関連タンパク質としても報告されており、ストレス負荷によって減少し香蘇散投与群で改善するとの変化は香蘇散煎剤による抗うつ様作用を一部反映しているものと推定された。

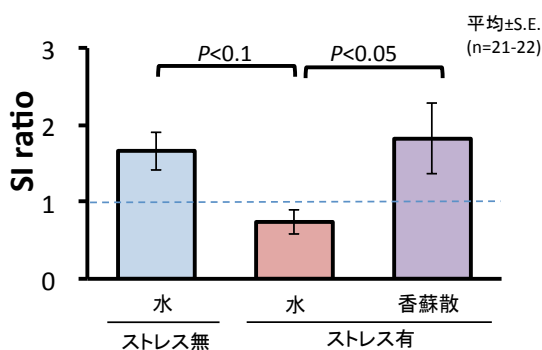


図2. 社会的接触行動におけるCSDS及び香蘇散の影響

<引用文献>

- ① Ito N., Nagai T., Yabe T., Nunome S., Hanawa T., Yamada H.: Antidepressant-like activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine, Koso-san (Xiang-Su-San), and its mode of action via the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Phytomedicine* **13**, 658-667 (2006).
- ② Ito N., Hori A., Yabe T., Nagai T., Oikawa T., Yamada H., Hanawa T.: Involvement of neuropeptide Y signaling in the antidepressant-like effect and hippocampal cell proliferation induced by kososan, a Kampo medicine, in the stress-induced depression-like model mice. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 1775-1783 (2012).
- ③ Ito N., Yabe T., Nagai T., Oikawa T., Yamada H., 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**, 1716-1722 (2009).
- ④ Nagai T., Hashimoto R., Okuda S.M., Koderu Y., Oh-Ishi M., Maeda T., Ito N., Hanawa T., Kiyohara H., Yamada H.: Antidepressive-like effect of a Kampo (traditional Japanese) medicine, kososan (Xiang Su San) in a stress-induced depression-like mouse model: Proteomic analysis of hypothalamus. *Trad. Kampo Med.* **2**, 50-59 (2015).
- ⑤ Ito N., Hirose E., Ishida T., Hori A., Nagai T., Kobayashi Y., Kiyohara H., Oikawa T., Hanawa T., Odaguchi H.: Kososan, a Kampo medicine, prevents a social avoidance behavior and attenuates neuroinflammation in socially defeated mice. *J. Neuroinflammation* **14**, 98 (2017).

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yun S, Reynolds RP, Petrof I, White A, Rivera PD, Segev A, Gibson AD, Suarez M, DeSalle MJ, Ito N, Mukherjee S, Richardson DR, Kang CE, Ahrens-Nicklas RC, Soler I, Chetkovich DM, Kourrich S, Coulter DA, Eisch AJ	4. 巻 24
2. 論文標題 Stimulation of entorhinal cortex-dentate gyrus circuitry is antidepressive.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 658-666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41591-018-0002-1	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 該当する

1. 著者名 Ito N, Hirose E, Ishida T, Hori A, Nagai T, Kobayashi Y, Kiyohara H, Oikawa T, Hanawa T, Odaguchi H	4. 巻 14
2. 論文標題 Kososan, a Kampo medicine, prevents a social avoidance behavior and attenuates neuroinflammation in socially defeated mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-017-0876-8	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 うつ症状に対する漢方薬の再発予防効果および未病制御の基礎研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤直樹、長谷川綾那、杉山千佳、永井隆之、清原寛章、及川哲郎、小田口 浩
2. 発表標題 老化促進マウスを用いた香蘇散の未病制御
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 角田貴樹、紺野 亮、板倉 誠、松井 崇、小寺義男
2. 発表標題 脳の機能状態モニタリングを目指した脳脊髄液の詳細な比較分析への取り組み
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤大晃、紺野 亮、福井朋也、松井 崇、長塩 亮、佐藤雄一、小寺義男
2. 発表標題 安定同位体標識法とGeLC-MS/MS法を組み合わせたタンパク質存在様式の比較分析法の確立と応用
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紺野 亮、伊藤大晃、樋口雅崇、松井 崇、佐藤俊哉、板倉 誠、小寺義男
2. 発表標題 水中拘束ストレスマウスの大脳皮質を対象とした包括的なタンパク質存在様式の比較分析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田黒晴樹、永井隆之、伊藤直樹、坂田幸治、緒方千秋、関根麻理子、若杉安希乃、小林義典、小田口 浩、清原寛章、平本忠浩
2. 発表標題 漢方基本処方の揮発性成分の解析
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川綾那、伊藤直樹、紺野 亮、小寺義男、永井隆之、清原寛章
2. 発表標題 社会的敗北ストレスモデルでのうつ様行動の評価と香蘇散の作用の解析
3. 学会等名 天然薬物研究方法論アカデミー第21回研究集会（蒲郡シンポジウム）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤直樹、廣瀬栄治、長谷川綾那、永井隆之、清原寛章、及川哲郎、小田口 浩
2. 発表標題 社会的ストレス誘発うつ様行動に対する漢方方剤「香蘇散」と抗うつ薬の併用による治療効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 ストレス社会における漢方方剤の位置づけ -ストレスモデル動物を用いた基礎研究から見てきた漢方方剤「香蘇散」の役割-
3. 学会等名 日本生薬学会第64回年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 ストレス誘発うつ様モデルマウスを用いた香蘇散揮発性成分の抗うつ様効果に関する解析
3. 学会等名 第34回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤直樹、廣瀬栄治、永井隆之、清原寛章、及川哲郎、小田口 浩
2. 発表標題 漢方方劑「香蘇散」の社会的ストレス誘発うつ様行動の再発防止効果
3. 学会等名 第34回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北里大学大村智記念研究所・大学院感染制御科学府ホームページ https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab25.html</p>

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
研究分担者	伊藤 直樹 (ITO Naoki) (00370164)	北里大学・東洋医学総合研究所・上級研究員 (32607)	
研究分担者	小寺 義男 (KODERA Yoshio) (60265733)	北里大学・理学部・教授 (32607)	
研究協力者	長谷川 綾那 (HASEGAWA Ayana)	北里大学・大学院感染制御科学府・大学院生(修士課程) (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小田口 浩 (ODAGUCHI Hiroshi) (40214150)	北里大学・東洋医学総合研究所・所長 (32607)	
連携研究者	清原 寛章 (KIYOHARA Hiroaki) (70161601)	北里大学・大学院感染制御科学府・教授 (32607)	