

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07376

研究課題名（和文）脳内炎症抑制に着目した漢方薬のうつ予防戦略に向けた基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on Kampo formula focusing on inhibition of neuroinflammation for preventive effects on depression

研究代表者

伊藤 直樹 (Ito, Naoki)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：00370164

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）：近年、ストレスや老化に加え、感染症罹患が精神疾患の発症や増悪に深く関わることで臨床上問題になっている。本研究課題で我々は、単独飼育ストレス負荷老化促進モデルマウス並びにLPS誘発擬似感染症モデルマウスを用いて、ノビレチン高含有陳皮配合香蘇散の事前反復投与がうつ様行動の発症を抑制し、その作用メカニズムに脳海馬領域の抗炎症型ミクログリアの増強を介した脳内炎症の抑制が関与することを明らかにした。これらの成果は、抗炎症型ミクログリアの増強がストレスや加齢、感染症に伴ううつ発症の予防に有効である可能性を示しており、今後うつ発症予防に向けた分子メカニズムの解明に関する研究に役立てられることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病などの精神疾患の罹患率は年々増加の一途を辿っており、その克服は急務の課題となっている。最近ではコロナ後遺症の一つにうつも含まれるなど、感染症もストレスや老化と同様にうつ病のリスクファクター認識されつつある。本研究では、ストレスや老化、感染症に伴ううつに対して、漢方薬の事前投与がその発症を防ぐ可能性を複数のモデルマウスで示し、そのメカニズムの一つに抗炎症型ミクログリアの増強による脳内炎症の抑制が関与することを明らかにした。この成果は、漢方薬を利用することによってうつの予防が可能であることを示唆しているのみならず、うつ予防戦略における新たなターゲット分子の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the recent years, in addition to stress and aging, the occurrence of infection has become a clinical issue due to its involvement in the onset and exacerbation of mental disorders. Using the isolation stress-loaded senescence-accelerated model mice and LPS-induced pseudo-infection model mice, this study demonstrated that repeated pretreatment with nobiletin-rich kososan, a Kampo formula, prevents the onset of depression and neuroinflammation, presumably mediated by the increase in the population of anti-inflammatory microglia in the hippocampus. These findings suggest that the enhanced population of anti-inflammatory microglia may be effective in preventing depression associated with stress, aging, and infection. It is also expected that this will contribute to future research aimed at elucidating the molecular mechanisms involved in the prevention of depression.

研究分野：漢方薬理学、精神医学

キーワード：漢方薬 香蘇散 脳内炎症 うつ ミクログリア

## 1. 研究開始当初の背景

近年、医学の発展により生活習慣病や一部の感染症などが制御可能になったことで人類の平均寿命は大幅に延長し、人生 100 歳社会が実現しつつある。一方で、昨今のストレス社会や超高齢社会が招いた精神疾患の増加や認知症の若齢化などは社会問題となっており、それに伴う生物学的寿命と健康寿命の乖離は、人々が心身ともに豊かな人生を実現することを困難にしている。この問題解決にはうつ病などの精神疾患の克服が大いに貢献すると考えられており、その予防法や治療法の早期確立を目指した研究が進められている。そのような状況の中、近年脳内で起こる炎症（脳内炎症）がうつ病発症に深く関わることが注目されており、脳内炎症を標的としたうつ病制御研究が活発になってきた。

脳内炎症に中心的な役割を果たすグリア系細胞のミクログリアには、2つのタイプ（炎症型と抗炎症型）が存在することが知られているが、うつ病治療研究においては炎症型ミクログリアの機能抑制に着目した研究が多い。一方、抗うつ様効果の発揮には炎症型ミクログリアから産生される炎症性因子産生を脳内で抑制するだけでは不十分とする研究報告もあることから<sup>1)</sup>、抗炎症型ミクログリアの制御にも注目した研究が求められている。

我々はこれまでに、ストレス負荷モデル動物のうつ様行動発症に対する漢方薬の予防効果には、炎症型ミクログリアを抑制するよりも抗炎症型ミクログリアを増強させることの方がより効果的である可能性を示唆した知見を得ている<sup>2)</sup>。また、加齢に伴う脳内炎症誘導には抗炎症型 microglia の機能低下が関与しており、そのことが脳内炎症関連病態からの回復を遅らせている可能性も報告されている<sup>3)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、抗炎症型ミクログリアの機能増強がうつ様行動の発症予防に効果的であることを検証するために、漢方薬の薬効を利用して複数のモデルマウスを用いた検討を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) うつ様行動発症予防における抗炎症型ミクログリアの関与（単独飼育ストレス負荷老化促進モデルマウスを用いた検討）

単独飼育条件下で老化促進モデルマウス（SAMP8 マウス、雄性）にノビレチン高含有陳皮配合香蘇散（N 香蘇散, 1 g/kg/day）または蒸留水を 7 週齢から 13 週間経口投与した。正常老化マウス（SAMR1 マウス、雄性）には蒸留水を同期間投与した。その後、LPS (0.33 mg/kg) または生理食塩水を単回腹腔内投与し、翌日にうつ様行動の評価行動試験として尾懸垂試験を実施した。行動試験後に解析サンプルとして脳を採取した。脳サンプルからはドライアイス上で海馬領域を切り出し、western blot 法により炎症型ミクログリアマーカーの nod-like receptor family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) と抗炎症型ミクログリアマーカーの Arginase 1 (Arg1) のタンパク質発現量を解析した。

### (2) うつ様行動発症予防における抗炎症型ミクログリアの関与（LPS 誘発擬似感染症モデルマウスを用いた検討）

雄性 C57BL/6J マウスに N 香蘇散 (1 g/kg/day) または蒸留水を 10 週齢から 4 週間経口投与した。その後、擬似感染症モデルを作成するために、LPS を 3 日間漸増的に腹腔内投与した (0.21, 0.42, 0.84 mg/kg/day)。LPS 最終投与の 3 時間後にオープンフィールド試験を実施し、倦怠様行動を評価した。また、LPS 最終投与の 24 時間後に尾懸垂試験を実施し、うつ様行動を評価した。尾懸垂試験の 2 時間後に解析サンプルとして脳を採取した。脳サンプルからはドライアイス上で海馬領域を切り出し、western blot 法により NLRP3 と Arg1 のタンパク質発現量を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) うつ様行動発症予防における抗炎症型ミクログリアの関与（単独飼育ストレス負荷老化促進モデルマウスを用いた検討）

まず、本モデルマウスにおいて N 香蘇散の反復投与がうつ様行動発症に対して抑制効果を発揮するかを検討した。生理食塩水投与条件下では、SAMR1/マウス (R1/water) と比べて SAMP8 マウス (P8/water) で有意な無動時間の延長が認められた (図 1)。これに対して、N 香蘇散投与群 (P8/NKS) では、無動時間の延長が認められなかった。また、SAMP8 マウスでは LPS 投与によって無動時間の延長がさらに増強された。一方、N 香蘇散投与群ではその増強が観察されず、P8/water 群と P8/NKS 群の間に有意な差が認められた。このことから、単独飼育ストレス負荷および加齢に伴ううつ様行動、並びに

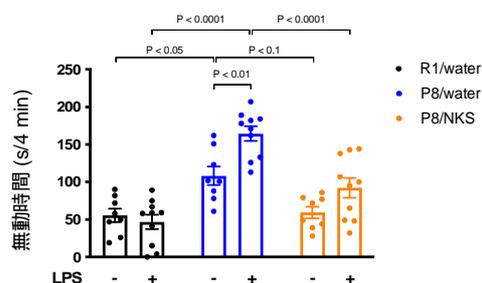


図 1 尾懸垂試験のうつ様行動に対する N 香蘇散の効果  
平均 ± 標準誤差 (n = 8-10)

LPS により炎症応答が刺激された条件でのうつ様行動増強に対して、N 香蘇散はそれらの発症を抑制する可能性が示された。

次に、そのうつ様行動発症抑制メカニズムに抗炎症型ミクログリアが関与するかを調べるために、うつ様行動に關与する脳内領域の海馬におけるミクログリアの炎症性および抗炎症性マーカータンパク質の発現パターンを比較検討した (図 2)。その結果、LPS 投与条件下において、P8/water 群で NLRP3 発現が有意に増加し、その増加は P8/NKS 群でも観察された。一方、Arg1 においては、P8/water 群と比べて P8/NKS 群で有意な発現増加が認められた。なお、生理食塩水投与条件下では群間に差はなかった。このことから、N 香蘇散の投与は、特に LPS による炎症応答増強時において、抗炎症型ミクログリアを増強する可能性が考えられた。

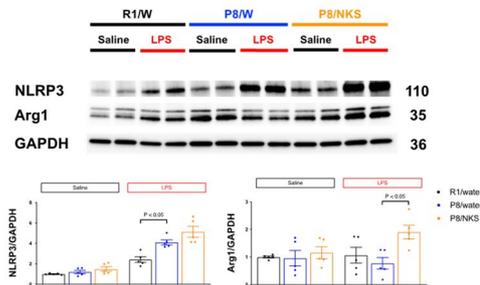


図 2 海馬におけるNLRP3およびArg1タンパク質発現に対するN香蘇散の効果  
平均±標準誤差 (n = 5)

## (2) うつ様行動発症予防における抗炎症型ミクログリアの関与 (LPS 誘発擬似感染症モデルマウスを用いた検討)

LPS を漸増的に投与して作成する擬似感染症モデルマウス<sup>4)</sup>を用いて、N 香蘇散のうつ発症に対する有効性およびそれに対する抗炎症型ミクログリアの関与を検討した。

まず、オープンフィールド試験により擬似感染症モデルマウスで起こる倦怠様行動について検討した。その結果、LPS 投与群では、生理食塩水投与群と比べて有意な総移動距離の減少が認められた (図 3)。しかし、これは N 香蘇散投与で抑制されなかった。このことから、N 香蘇散は擬似感染症モデルマウスの倦怠様行動には効果を示さないことが示唆された。

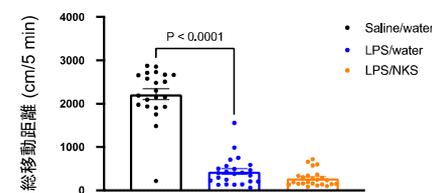


図 3 オープンフィールド試験の総移動距離に対するN香蘇散の効果  
平均±標準誤差 (n = 22-24)

オープンフィールド試験の翌日に尾懸垂試験によりうつ様行動に対する N 香蘇散の効果を検討した (図 4)。なお、オープンフィールド試験の翌日には、倦怠様行動は解消されていることを予備検討で確認している。LPS 投与群では、生理食塩水投与群と比べて有意な無動時間の延長が認められた。これに対して、N 香蘇散投与群では、無動時間の延長は認められなかった。このことから、N 香蘇散は擬似感染症モデルマウスで現れるうつ様行動に対して、抑制的に働く可能性が示された。

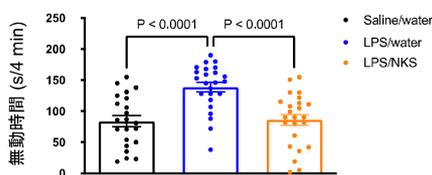


図 4 尾懸垂試験のうつ様行動に対するN香蘇散の効果  
平均±標準誤差 (n = 22-24)

続いて、そのうつ様行動発症抑制に抗炎症型ミクログリアが関与するかを NLRP3 と Arg1 発現を指標に検討した。その結果、LPS 投与で増加した NLRP3 発現は N 香蘇散投与によって影響を受けなかったが、Arg1 発現に関しては N 香蘇散投与により有意に増加した。それらの結果から、N 香蘇散の投与は、炎症型ミクログリアには作用せず、抗炎症型ミクログリアを増強する作用が強い可能性が考えられた。

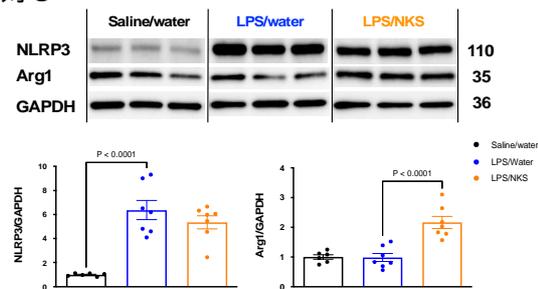


図 5 海馬におけるNLRP3およびArg1タンパク質発現に対するN香蘇散の効果  
平均±標準誤差 (n = 6-7)

以上の結果から、2つのモデルマウスにおいて、うつ様行動の発症予防に抗炎症型ミクログリアの増強が有効であること、そして N 香蘇散がうつ発症予防において効果的であることが検証された。N 香蘇散が抗炎症型ミクログリアを増強するメカニズムについては、今現在検討中であるが、予備検討において抗炎症性サイトカインの IL-4 に対する感受性が N 香蘇散投与によって増強される可能性が考えられた。また、本研究課題中に他のグループから、IL-4 により誘導された抗炎症型ミクログリアの増加が抗うつ様効果発現に關与する基礎研究報告<sup>5)</sup>がなされたことは、抗炎症型ミクログリアの増強がうつ予防にも有効に働く可能性を支持していると推察された。今後ミクログリアに対する IL-4 の作用に着目したさらなる検討を行うことにより、将来的には漢方薬の作用を利用した抗炎症型ミクログリア増強によるうつ予防戦略の構築に繋げたい。

## 【参考文献】

- 1) Zhang JC *et al.*, *Transl Psychiatry* 7:e1138 (2017).
- 2) Ito N *et al.*, *J Neuroinflammation* 14:98 (2017).
- 3) Huntula S *et al.*, *Cell Calcium* 82:102059 (2019).
- 4) Wickens RA *et al.*, *Behav Brain Res* 352:99-108 (2018).
- 5) Zhang J *et al.*, *Sci Adv* 7, doi:10.1126/sciadv.abb9888 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ito Naoki, Maruko Akiko, Oshima Kenshiro, Yoshida Masaaki, Honma Kengo, Sugiyama Chika, Nagai Takayuki, Kobayashi Yoshinori, Odaguchi Hiroshi, Okada Norihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Kampo formulas alleviate aging-related emotional disturbances and neuroinflammation in male senescence-accelerated mouse prone 8 mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 109 ~ 142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.203811	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10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤直樹、定光祐佳、三木理恵子、河田直也、永井隆之、花輪壽彦、小田口浩
2. 発表標題 加齢性の脳内炎症に対する漢方薬の抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 第 39 回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 ココロに効く漢方薬の薬効メカニズム解明への挑戦
3. 学会等名 第58回日本東洋心身医学研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河田直也、伊藤直樹、三木理恵子、定光祐佳、永井隆之、佐藤俊哉、小田口浩
2. 発表標題 LPS 誘発うつ様行動および炎症応答に対する N 香蘇散の抑制効果 -老化促進モデル SAMP8 マウスを用いた検討-
3. 学会等名 日本薬学会第 143 年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三木理恵子、伊藤直樹、河田直也、定光祐佳、永井隆之、小田口浩、西山和利
2. 発表標題 加齢性うつに対するN香蘇散の抑制効果と腸内細菌叢の関係性
3. 学会等名 日本薬学会第 143 年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤直樹、本間健悟、杉山千佳、定光祐佳、長谷川綾那、永井隆之、清原寛章、小田口浩
2. 発表標題 SAMP8マウスを用いた漢方薬の未病制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定光祐、伊藤直樹、本間健悟、杉山千佳、豊田淳、井上栄一、小田口浩、清原寛章
2. 発表標題 未病モデルマウスに対する福来（フクレ）ミカン果皮摂取の有効性の解析
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間健悟、定光祐佳、杉山千佳、伊藤直樹、小田口浩、清原寛章
2. 発表標題 LPS誘発sickness behaviorモデルマウスに対する漢方薬の作用の解析
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤直樹
2. 発表標題 精神症状発症要因としての脳内炎症応答に対する漢方薬の有効性
3. 学会等名 第19回日本疲労学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤直樹、三木理恵子、河田直也、吉田雅昭、小林義典
2. 発表標題 LPS誘発sickness behaviorおよび脳内炎症に対するnobilletin高含有陳皮配合香蘇散の有効性
3. 学会等名 日本薬学会第 144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三木理恵子、伊藤直樹、西山和利、小林義典
2. 発表標題 腸管粘膜固有層単核細胞（LPMCs）における免疫応答に対する半夏厚朴湯の作用
3. 学会等名 日本薬学会第 144年会
4. 発表年 2024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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------