

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790751

研究課題名（和文） 香蘇散の抗うつ様作用メカニズムにおけるオレキシン神経系制御の役割

研究課題名（英文） Role of orexinergic system in the mechanism underlying an 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・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、orexin A (OX-A) が neuropeptide Y (NPY) 産生促進作用を有することを海馬培養細胞を用いた検討により初めて明らかにした。またこれまでに我々は、漢方方剤「香蘇散」の抗うつ様効果に OX-A/NPY 神経系の制御が深く関与することを報告している。よって本課題における成果は、海馬において OX-A/NPY 神経ネットワークが存在する可能性を示すものであり、今後香蘇散の抗うつ様作用メカニズムのさらなる解明に役立つものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we first found orexin A (OX-A) increases the production of neuropeptide Y (NPY) from hippocampal cultured cells. Also, our previous study has shown that an antidepressant-like effect of kososan is linked in some way to the regulation of OX-A and NPY. Thus, the present findings highlight the presence of a network between OX-A and NPY in the hippocampus. This may be useful for our understanding the mechanism underlying kososan's antidepressant-like property.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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、neuropeptide Y

1. 研究開始当初の背景

北里大学東洋医学総合研究所（以下、東医研）では、抑うつ症状を呈する患者に対して東洋医学的な診断法に基づいた漢方治療を行っており、一定の臨床効果を上げているが、その有効性を裏付ける科学的根拠の不足が課題となっている。そのため東医研では、科学的根拠が乏しい漢方処方を中心にトランスレーショナル・リサーチ（基礎研究から臨床へのフィードバック）を推進しており、その枠組みの中で我々は、漢方方剤である「香蘇散」の抑うつ症状に対する効果およびその作用メカニズムについての基礎研究を行ってい

る。

オレキシンは、摂食行動や覚醒・睡眠の制御など、生体の恒常性の維持に深く関与している脳内神経ペプチドである。その機能異常はナルコレプシーやうつ病など、様々な神経・精神疾患の発症に関与することが近年報告されるようになった。我々もこれまでに、オレキシンが抗うつ様効果発現に関与することを報告している。一方、香蘇散は食欲不振や不眠、抑うつ症状等に対して処方され、生体の恒常性の維持に寄与すると考えられている。これらの背景から、我々は香蘇散の薬効におけるオレキシン神経系の関与に注目した。

2. 研究の目的

これまでに我々は、香蘇散の抗うつ様効果発現に脳内オレキシン (OX-A) 並びに neuropeptide Y (NPY) 神経系の制御が深く関わっていることを見出し、既存の抗うつ薬との作用機序の違いの一部を明らかにしてきた。しかし、香蘇散が脳内 OX-A 神経系をどのように制御して抗うつ様効果発揮に関与するのかについては未だ不明な点が多い。そこで本研究課題では、香蘇散が OX-A 神経系並びに OX-A の作用をどのように調節しているのかについて、海馬培養細胞の実験系に用いて検討した。また、それと平行させて、未だ明らかとなっていない、海馬の NPY 産生における OX-A の関与についての検討も行った。

3. 研究の方法

(1) OX-A 受容体 OXR1 発現量に及ぼす香蘇散の影響

本実験は、Wistar 系ラットの胎児脳由来海馬培養細胞を用いて検討を行った。添加サンプルとしては、香蘇散 (1g/kg/day) を 1 週間投与した Wistar 系ラットから採取された脳脊髄液を用いた。OXR1 タンパク質発現量は、western blot 法により行った。

(2) OXR1 に対する香蘇散の結合活性

本実験は、OXR1 を高発現させた株化細胞 (OXR1-HEK293 細胞) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法により実施した。添加サンプルとしては、香蘇散の凍結乾燥物をリン酸緩衝液 (PBS) で溶解させたものを用いた。

(3) 海馬培養細胞からの NPY 産生に及ぼす OX-A の影響

本実験は、(1) と同じく Wistar 系ラットの胎児脳由来海馬培養細胞を用いて検討を行った。OX-A 添加後の NPY 分泌・産生量は ELISA 法で測定した。OXR1 遮断薬 SB-334867 を用いて、OX-A 誘導 NPY 分泌・産生促進作用に対する阻害実験を行った。また、NPY 産生・分解に関与する酵素群の遺伝子発現に及ぼす OX-A の作用については、リアルタイム RT-PCR 法で測定した。

4. 研究成果

(1) OX-A 受容体 OXR1 発現量に及ぼす香蘇散の影響

OXR1 発現を免疫染色法により確認した海馬培養細胞 (図 1) を用いて、OXR1 タンパク質発現量を western blot 法により検討したが、香蘇散添加ではその発現量に変化は認められなかった。

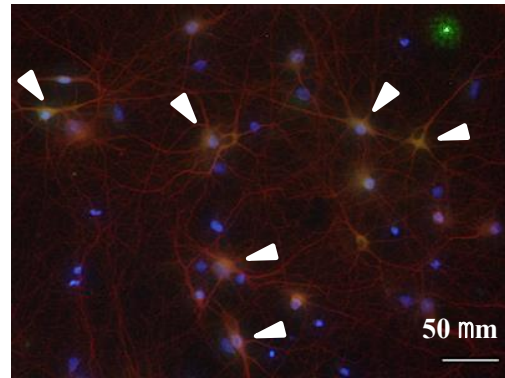


図 1 海馬培養細胞中の OXR1 発現神経細胞
Arrowhead は OXR1 発現神経細胞を示す。

(2) OXR1 に対する香蘇散の結合活性

香蘇散の添加による OXR1 に対する結合活性は認められなかった。

以上、(1) および (2) の結果から、香蘇散には OX-A の受容体数や感受性を調節する作用がないことが示唆された。

(3) 海馬培養細胞からの NPY 産生に及ぼす OX-A の影響

海馬培養細胞が NPY を産生していることを免疫染色法により確認した後 (図 2)、OX-A 添加による NPY 産生量を測定した。その結果、OX-A 添加により培養上清中の NPY 量の用量および時間依存的な増加が認められた (図 3, 4)。このことから、OX-A は海馬培養細胞上に存在する OXR1 を介して、NPY 産生量を促進させる作用を有する可能性が示された。

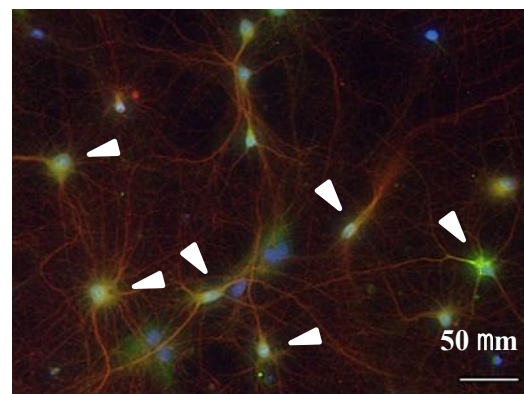


図 2 海馬培養細胞中の NPY 発現神経細胞
Arrowhead は NPY 発現神経細胞を示す。

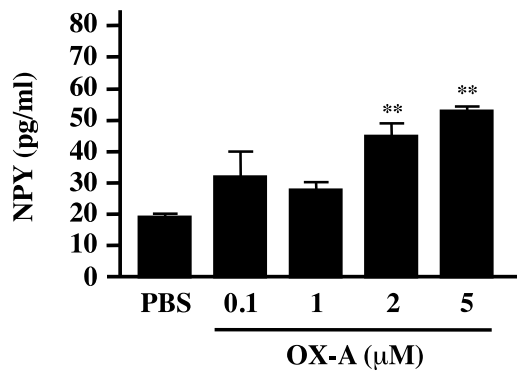


図3 OX-A添加時の海馬培養細胞上清中 NPY量(用量依存性の検討)
**P<0.01

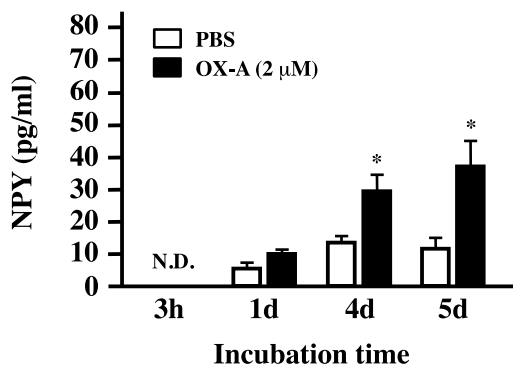


図4 OX-A添加時の海馬培養細胞上清中 NPY量(時間依存性の検討)
*P<0.05

次に、OX-A 添加により認められた NPY 産生促進作用が、OXR1 遮断薬 SB-334867 によって阻害されるかどうかを検討した。その結果、SB-334867 によって用量依存的な NPY 産生量の減少が認められた(図 5)。このことから、OX-A 添加による NPY 産生促進作用は OXR1 を介して発揮されることが示された。

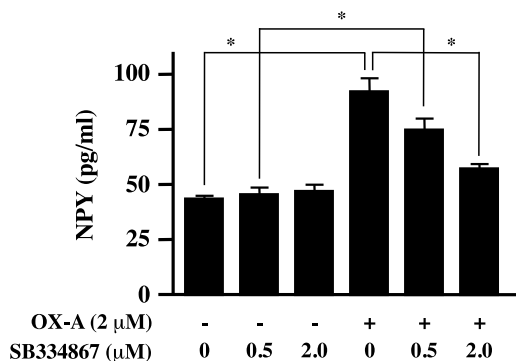


図5 OX-A添加による NPY 産生促進に対する OXR1 遮断薬 SB-334867 の影響
*P<0.001

次に、OX-A 添加によって誘導された NPY 産生量の増加の機序を調べるために、NPY 産生並びに分解に関与する酵素に注目し、その遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法により定量した。その結果、OX-A 添加 3 時間後に NPY 分解酵素の一つである AP1 mRNA 発現量の一過性の減少が認められた(図 6)。このことより、OX-A 添加による NPY 産生促進作用の一部は、NPY 分解酵素の発現量減少による可能性が考えられた。

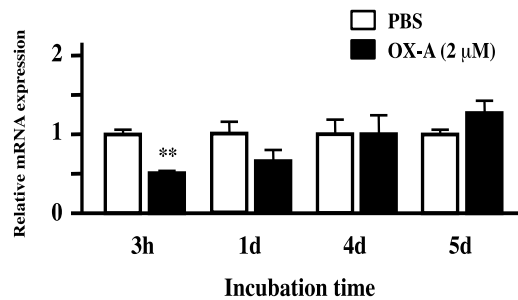


図6 OX-A添加の NPY 分解酵素 AP1 mRNA 発現量に与える影響
**P<0.01

以上の結果から、OX-A は海馬培養細胞からの NPY 産生量を増加させる方向に作用することが初めて示された。

本研究課題では、香蘇散に OX-A 神経系並びに OX-A 自身の作用を調節する作用があるかどうかを明らかにすることは出来なかった。しかし、一方で海馬における OX-A の NPY 産生に及ぼす影響についてはこれまで明らかになっていなかったことを考慮すると、今後この経路における香蘇散の作用を検討する価値はあると考えられる。そしてそれらの検討を通じて、香蘇散の抗うつ様効果における OX-A/NPY 神経ネットワークの関与の詳細が明らかになることを期待する。

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., Hori A., Yabe T., Nagai T., Oikawa T., Yamada H. and Hanawa T. Involvement of neuropeptide Y signaling in the antidepressant-like effect and hippocampal cell proliferation induced by kotosan, a Kampo medicine, in the stress-induced depression-like model mice. *Biol. Pharm. Bull.* **35**(10), 1775-1783, 2012. (査読 有)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Ito N., A possible mechanism underlying an antidepressive-like effect of kososan, a Kampo medicine, through the hypothalamic orexinergic system in the stress-induced depression-like model mice. 1st Joint Symposium between WHO Collaborating Centres for Traditional Medicine in Korea and Japan, September 1st, 2012, Tokyo.

(2) 伊藤直樹、香蘇散の抗うつ様効果における脳内 orexin A/neuropeptide Y 神経系の関与、第 29 回和漢医薬学会学術大会、2012/9/1-2、東京

(3) 伊藤直樹、香蘇散の抗うつ様効果における脳内 neuropeptide Y 神経系の関与、第 28 回和漢医薬学会学術大会、2011/8/27-28、富山

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・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