

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460918

研究課題名(和文) 社会的ストレスに対する香蘇散の有効性-多彩な行動薬理学的手法を用いた基礎研究-

研究課題名(英文) Efficacy of kososan on social stress - basic research using multi-behavioral battery-

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、社会的ストレスで誘発されるマウスのネガティブ思考に対する香蘇散の改善効果は観察されなかったものの、うつ様行動に対して香蘇散は抑制効果を発揮し、その作用メカニズムに脳内炎症抑制作用が深く関与することを明らかにした。また、うつの再発防止に香蘇散が有効である可能性も示された。これらの成果は、社会的ストレスによるうつの発症や再発における香蘇散の有用性を示唆するものであり、またこの研究を通して脳内炎症がうつの病態に深く関与することが検証され、今後の創薬研究に役立てられることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that kososan prevents social stress-induced depression-like behaviors by attenuating neuroinflammation in mice, although kososan does not have a recovery effect on the stress-triggered negative cognitive bias. Our preliminary data also suggest that kososan is effective for prevention of relapse in depression. These findings indicate that kososan has potential preventive effects on onset and recurrence of depression. And our verification that neuroinflammation is strongly involved in etiology of depression would be useful for drug discovery research in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：香蘇散 社会的ストレス 脳内炎症

### 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が乏しく、そのことが漢方治療の EBM の障壁となっている。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) を推し進めており、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及びその作用メカニズムについて基礎研究を行っている。

長期間にわたる過度の環境及び社会的ストレスは、うつ病などの精神疾患を誘発する外因性危険因子として知られている。これまでに我々は、環境ストレス誘発うつ様モデルマウスを用いて、香蘇散の抗うつ様効果を明らかにし、またその抗うつ様作用メカニズムに脳内オレキシン・NPY 神経系制御並びに海馬神経新生が深く関与していることも見出している。しかし、社会的ストレスによって誘発される精神行動異常に対して香蘇散がどの程度有効であるかについて未だ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究課題では社会的ストレスモデルとしてよく利用されている chronic social defeat stress (CSDS) モデルマウスを用いて、CSDS で誘発されるうつ様行動並びに認知機能異常に対する香蘇散の効果とその作用メカニズムについて検討を行った。また、うつの再発に及ぼす香蘇散の効果についても検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) CSDS モデルマウスを用いたうつ様行動並びに認知機能の評価

本モデルマウスは、試験動物である C57BL/6J マウス (8 週齢, 雄性) を攻撃性が強い aggressor マウス (ICR, リタイア, 雄性) の飼育ケージに入れ、一日 10 分間を 10 日間行うことで作成した (Day1-10)。香蘇散 (1 g/kg/日) は、ストレス負荷開始日から 12 日間経口投与した (Day1-12)。うつ様行動は自動行動解析装置 EthoVision を用いた social interaction (SI) 試験で示される忌避行動 (Day11) 並びに強制水泳試験 (FST) における無動行動 (Day12) により評価した。また、認知機能異常としてのネガティブ思考 (NCB) は FreezeFrame システムを用いた改良型 fear conditioning 試験 [ambiguous-cue fear conditioning (ACFC) 試験] で示されるすくみ行動により評価した (Day13-14)。

#### (2) CSDS 誘発脳内炎症の評価

脳内炎症は脳内に存在する免疫担当細胞である microglia に注目し、免疫組織化学染

色法を用いた Iba1 (microglia のマーカー)、NLRP3 (炎症型のマーカー)、CX3CR1 (抗炎症型のマーカー) 陽性細胞数による評価、および試験マウス脳から単離した microglia 培養系により LPS 刺激時の炎症性サイトカイン IL-6 産生量の ELISA による評価を行った。

#### (3) 再発うつの評価

本検討では、試験動物に BALB/c マウス (8 週齢, 雄性) を用い、一日 5 分間を 5 日間 defeat stress を負荷することにより CSDS モデルマウスを作製した。Day 6 に SI 試験 (SI1) の忌避行動によりうつ様マウスを選別した。香蘇散 (1 g/kg/日) 又はミルナシブラン (比較する抗うつ薬, 60 mg/kg/日) は、うつ様マウスに連日経口投与した (Day 7-32)。抗うつ様効果は、Day 30 の SI 試験 (SI2) により評価した。また、Day 30 の SI 試験で忌避行動を示さなくなったマウス (回復マウス) に対して、Day 31 に再び SDS を単回負荷し (5 分間)、Day 32 の SI 試験 (SI3) により忌避行動の再発を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) CSDS 誘発うつ様行動並びに認知機能異常に対する香蘇散の効果

CSDS 負荷マウスでは、SI 試験の SI ratio の低下による忌避行動 (図 1A)、並びに FST の無動時間延長による無気力行動 (図 1B) が認められた。そして香蘇散投与はこれらに対して抑制効果を発揮した。また、SI 試験時の自発運動量には群間に差は認められなかったことから、香蘇散の行動回復は自発運動量の差によるものではなく、抗うつ様効果によるものであることが示唆された。

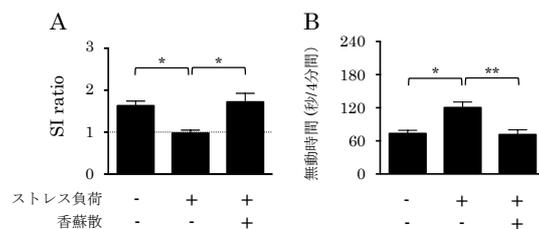


図 1 CSDS 誘発うつ様行動に対する香蘇散の効果  
A, SI 試験における忌避行動; B, FST における無動行動, 平均±標準誤差 (A, n = 18-19; B, n = 12-14), \*P < 0.01, \*\*P < 0.001

一方、CSDS 負荷マウスでは ACFC 試験におけるすくみ行動の増加が観察されたが、香蘇散投与によるすくみ行動の減少は認められなかった。これにより、CSDS で誘発される NCB 行動に対して香蘇散は作用しない可能性が示された。

#### (2) CSDS 誘発脳内炎症に対する香蘇散の効果

本検討では、ストレスの影響を特に受けやすい脳内領域である海馬歯状回 (DG, 図 2A) に焦点を絞り解析を行った。その結果、CSDS 負荷マウスでは DG の Iba1 陽性細胞および Iba1 陽性凝集体 (活性化 microglia の指標の

一つ(図 2B)の数が有意に増加しており、それらは香蘇散投与で抑制された(図 2C)。

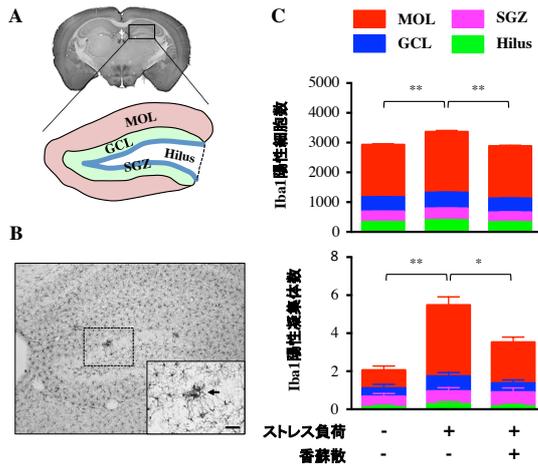


図 2 海馬歯状回 microglia 挙動に及ぼす香蘇散の影響

A, 海馬歯状回 (DG) の模式図; B, DG 中の Iba1 陽性細胞とその凝集体 (矢印), scale bar = 20  $\mu$ m; C, DG 中の Iba1 陽性細胞数とその凝集体数, 平均 $\pm$ 標準誤差 (n = 18-19), \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \* $P$  < 0.001

また、活性化した microglia には炎症型と抗炎症型の2つの phenotype が存在することから、これらのバランスを検討したところ、CSDS 負荷マウスでは DG 中の SGZ で炎症型 microglia の NLRP3 陽性細胞数の増加並びに DG 中の SGZ と MOL で抗炎症型 microglia の CX3CR1 陽性細胞数の減少が認められた(図 3)。そして香蘇散は炎症型には作用せず、MOL の抗炎症型 microglia 数を増加させた。

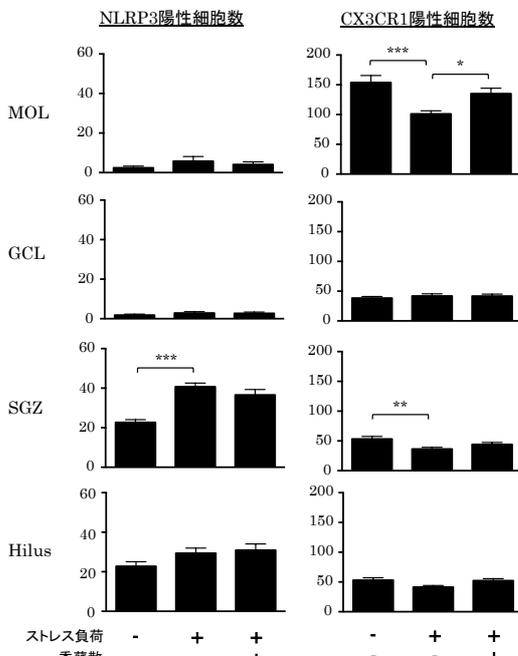


図 3 炎症型および抗炎症型 microglia 挙動に及ぼす香蘇散の影響

平均 $\pm$ 標準誤差 (n = 12-15), \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \* $P$  < 0.001

以上の結果から、香蘇散の脳内炎症抑制効

果は、抗炎症型 microglia の増加により、炎症・抗炎症バランスを整えたことによる可能性が示された。

次に、香蘇散が機能的にも脳内炎症反応を抑制するのかを検証するために、培養 microglia を用いた ex vivo の実験系で検討を行った。その結果、LPS 刺激により非ストレス群と比べて CSDS 負荷マウス由来 microglia からの有意な IL-6 産生量の増加が認められ、その増加は香蘇散投与マウス由来 microglia では抑制された(図 4)。このことから、香蘇散は機能的にも脳内炎症反応抑制効果が確認された。

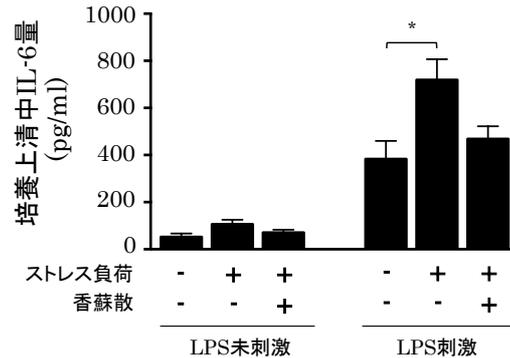


図 4 培養 microglia の炎症応答に及ぼす香蘇散の影響

平均 $\pm$ 標準誤差 (n = 6-7), \* $P$  < 0.05

### (3) うつの再発に対する香蘇散の効果

CSDS 負荷マウスから選別された回復マウスは、単回では忌避行動が示されない強度の defeat stress 負荷でも、有意な忌避行動の再発が認められたのに対し、香蘇散投与マウスから選別された回復マウスは defeat stress の再負荷でも再発は起こらなかった(図 5)。一方、既存の抗うつ薬であるミルナシプラン投与マウスから選別された回復マウスでは、defeat stress の再負荷で再発が認められた。以上の結果から、香蘇散はミルナシプランよりうつの再発に対する防止効果が期待できる可能性が示された。

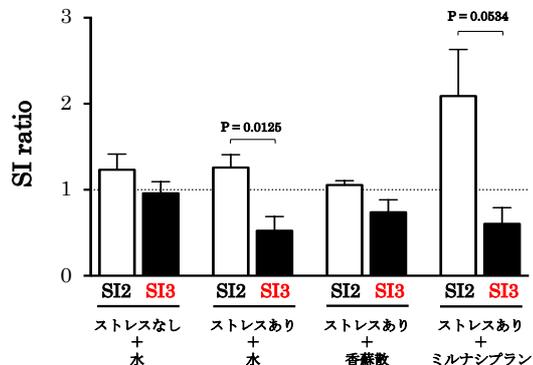


図 5 うつの再発に対する香蘇散の効果

平均 $\pm$ 標準誤差 (n = 8-12)

本研究課題では、社会的ストレスモデルとして CSDS モデルマウスを利用し、そのモデルマウスが示すうつ様行動に対して、香蘇散が行動薬理的な改善効果を発揮し、その作

用メカニズムに脳内炎症反応の抑制効果が一部関与することを明らかとした。また、CSDS 誘発 NCB に対しては今回の実験条件では香蘇散の改善効果は明らかにできなかった。しかし、当初は予期出来なかったうつの再発に対する香蘇散の防止効果について新たな可能性を示す知見が得られた。このうつの再発に関する研究は、新規に獲得した科研費の研究課題の一つとなっており、今後詳細に検証を進める予定である。そして、うつの再発における香蘇散治療の位置づけをより明確にすることができれば、うつの再発も含めたうつ病治療の選択肢の幅も広がると考えられ、よりよい社会の実現に貢献できることを期待する。

#### 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)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 伊藤直樹、社会的ストレスによる抑うつ様行動の再発に対する漢方方剤「香蘇散」の防止効果、日本薬学会第 137 年会、2017/3/25-27、仙台国際センター・東北大学 (宮城県、仙台市)
- 2) 伊藤直樹、社会的ストレス誘発脳内炎症に対する香蘇散の制御、第 33 回和漢医薬学会学術大会、2016/8/27-28、星薬科大学 (東京都、品川区)
- 3) 伊藤直樹、漢方方剤「香蘇散」による社会的ストレス誘発うつ様行動緩和には、脳内炎症反応抑制が関与する、第 39 回日本神経科学大会、2016/7/20-22、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
- 4) 伊藤直樹、社会性ストレス誘発うつ様行動とそれに伴う脳内炎症反応に対する香蘇散の抑制効果、第 32 回和漢医薬学会学術大会、2015/8/22-23、富山国際会議場 (富山県、富山市)
- 5) 伊藤直樹、社会的ストレスに対する香蘇散の有効性、日本薬学会第 135 年会、2015/3/26-28、デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県、神戸市)

#### 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・教授

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