

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460925

研究課題名(和文)漢方薬の脳機能改善作用の解析-神経新生やエピジェネティクス制御を指標とした解析

研究課題名(英文)Effect of kampo medicines on brain function

研究代表者

矢部 武士 (YABE, TAKESHI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：40239835

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、加味温胆湯、帰脾湯など古くから神経・精神疾患に臨床応用されてきた漢方処方薬の薬効を、精神疾患モデル動物を用いて行動薬理学的な手法により確認するとともに、薬効発現機序の科学的な分子基盤をエピジェネティクスや神経新生(ニューロジェネシス)の制御機構などに注目して解析おこなった。行動薬理学的解析から、慢性マイルドストレス負荷やコルチコステロン投与によるうつ様行動に対して、加味温胆湯、加味帰脾湯、オンジエキスの投与が改善作用を有することを明らかとした。またオンジエキスを投与したマウス海馬において、GDNF発現増強や神経樹状突起スパイン数の増加が観察された。

研究成果の概要(英文)：Traditional Japanese herbal medicines (called kampo medicines in Japan, remedies composed of specified mixtures of crude drugs derived from plant, animal and mineral materials) have been applied for variety of diseases including mental diseases. Although some kampo medicines have been used traditionally for stress-related psychoneurological diseases such as , the precise mechanism by which kampo medicines ameliorate these mental diseases remains unclear. Oral administration of some kampo medicines (kami-untanto, kihito, and its constituent polygalae radix)) ameliorated the stress-induced depression-like behavior of mice. We also found that oral administration of Polygalae Radix-extract increase the expression of GDNF mRNA and the number of dendritic spine.

研究分野：天然物薬理学

キーワード：漢方薬 うつ様行動 スパイン GDNF

1. 研究開始当初の背景

統合失調症、うつ病、及び不安障害などの精神疾患の患者数は近年増加の一途を辿っており、社会的な問題となっている。これらの疾患の病因・病態の詳細に関しては不明な部分が多く残されているが、脳内アミノ酸・モノアミン神経系の機能異常が関与するものと指摘されている。現在、精神疾患の治療に頻用されている薬物の多くは、この考え方に基づいて開発されたものであり、一定の治療効果が期待できるものの、副作用が高頻度で認められること、薬物に反応しない治療抵抗性患者が多数存在することなど、多くの問題点を抱えている。こうした背景から、既存の薬物とは異なる作用機序に基づく治療戦略が求められている。現代医療において西洋薬（新薬）での治療が困難な疾患に対して西洋薬（新薬）での治療が困難な種々の疾患に対して、漢方薬が一定の治療効果を示す場合があり、その有用性から現代医療の臨床現場で今なお多用されている。しかしながら漢方薬は長い臨床経験の蓄積がある一方で、薬効発現機序や薬効成分の解明は一部を除き未だ充分とは言えない。

2. 研究の目的

本研究では、加味温胆湯、帰脾湯など古くから神経・精神疾患に臨床応用されてきた漢方処方薬の薬効を、精神疾患モデル動物を用いて行動薬理学的な手法により確認するとともに、薬効発現機序の科学的な分子基盤をエピジェネティクスや神経新生（ニューロジェネシス）の制御機構などに注目して解析おこなう。

3. 研究の方法

(1) ストレス誘発性うつ様モデル動物を用いた検討

うつ様モデルマウスは、強制水泳試験法(FST)と慢性マイルドストレス法(CMS)を組み合わせで作製した。すなわち、ddY系マウス(7週齢、♂)を強制水泳させた後、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の3種類のストレスをDay1からDay11まで負荷した。加味温胆湯エキス(1g/kg)及びロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤(SNRI)であるミルナシプラン(60mg/kg)はDay1からDay11まで経口投与した。最終投与の翌日に各種解析を行った。

(2) コルチコステロン投与動物を用いた解析

7週齢のddY系雄性マウスにコルチコステロンを1日1回14日間40mg/kgの用量で投与することで、コルチコステロン慢性投与モデルを作成した。漢方薬エキス、オンジエキスは精製水に溶解し、コルチコステロンと同じスケジュールで1日1回14日間経口投与した。最終投与の翌日に各種解析を行った。

(3) うつ様行動評価試験(強制水泳試験)

円柱形の透明な測定シリンダー(高さ27cm、直径18cm)に水温25℃の水を13cm深さまで入れ、その中でマウスを6分間水泳させ、その様子をビデオ撮影した。6分間の試験のうち、後半の4分間の無動時間を解析した。

(4) 神経栄養因子のmRNA発現量の解析

マウスから海馬を単離後、TRIzol試薬(Life Technologies)を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAを1μgからReverTra Ace(TOYOB0)を用いてcDNAを合成した。合成したcDNAと各種プライマーを用いて、real-time PCR法によりBDNFのmRNA量を測定した。内在性コントロールとしてβ-actinを用いた。

(5) ゴルジ染色

Slice Golgi Kit(Bioenno Lifesciences)付属の固定液を用いてマウスの脳を灌流固定し、同固定液で3日間浸潤固定した後、ピブラトームを用いて厚さ100μmの切片を作製した。Slice Golgi Kitを用いて海馬を含む切片を染色した。神経細胞の形態にはSholl analysisを用い、各マウス10個の神経細胞を解析した。スパイン数の解析は、各マウス3つの神経細胞において、細胞体から200μm以上離れた樹状突起をランダムに3箇所選択し、10μm当たりのスパイン数を画像解析ソフトImage Jを用いて解析した。

4. 研究成果

(A) ストレス誘発性うつ様モデルマウスを用いた解析

強制水泳試験においてストレス負荷群では無動時間が延長しうつ様症状が認められたが、加味温胆湯エキス投与群、及びミルナシプラン投与群では有意に無動時間が短縮した。一方、加味温胆湯エキスの投与は、オープンフィールド試験における自発運動量には影響を及ぼさなかった。ストレス負荷動物の海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞(神経系前駆細胞)数は、加味温胆湯エキスまたはミルナシプランの経口投与によって増加した。血中コルチコステロン濃度は、ストレス負荷群と加味温胆湯投与群で有意な差は認められなかったが、視床下部室傍核におけるグルココルチコイドレセプター(GR)の発現誘導が加味温胆湯投与群で観察された(図1)

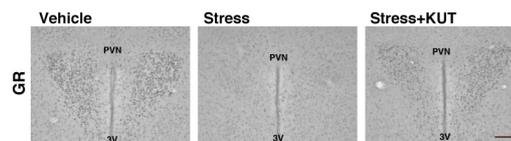


図1 視床下部室傍核GR発現に及ぼす加味温胆湯の作用

PVN: 室傍核、3V: 第3脳室 Scale bar: 100 μm

(B) コルチコステロン投与動物を用いた検討
(1) 加味温胆湯エキスの作用

コルチコステロン(40 mg/kg)を7日間投与することにより海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞(神経系前駆細胞)数は顕著に減少したが、加味温胆湯エキスを同時に投与することによって細胞数の減少が抑制された。

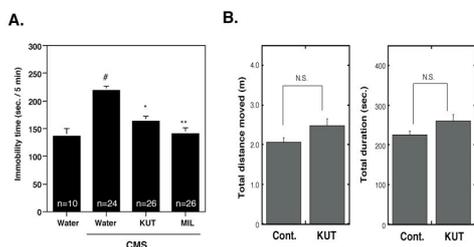


図2 慢性マイルドストレスによるうつ様行動に対する加味温胆湯の効果

A. 強制水泳試験 # $p < 0.001$ versus non-stress group, * $p < 0.005$, ** $p < 0.0001$ versus CMS-treated group B. オープンフィールド試験 (左) 総移動距離、(右) 総移動時間

強制水泳試験においてコルチコステロン投与群では無動時間が延長しうつ様症状が認められたが、加味温胆湯エキス投与群、及びミルナシプラン投与群では有意に無動時間が短縮した(図2)。

(2) 帰脾湯エキス、オンジエキスによるうつ様行動改善作用

コルチコステロン投与による強制水泳試験における無動時間の増加は、帰脾湯エキスやオンジエキスの投与により有意に改善した。一方で、帰脾湯エキスやオンジエキスの投与は自発運動量に影響を及ぼさなかった。

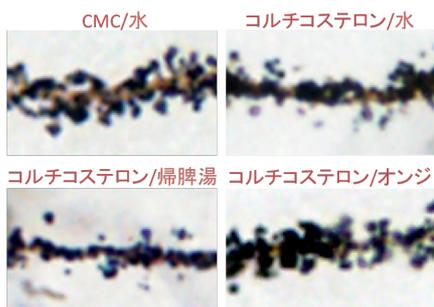


図3 コルチコステロン慢性投与によるスパイン数減少に対する帰脾湯、オンジの作用

(3) 樹状突起に対する効果

コルチコステロン投与動物では、海馬歯状回でのスパイン数の減少が観察されたが、オンジエキスの投与はこれを改善した。一方、帰脾湯はスパイン数の減少に対して影響を及ぼさなかった(図3)。

(4) 神経栄養因子 mRNA 発現に及ぼす作用

コルチコステロン投与動物では、海馬に

おける GDNF, FGF2, VEGF の mRNA 発現量の有意な減少が観察された。また BDNF, NGF, IGF1, NT-3 の mRNA 発現量は減少傾向が認められた。帰脾湯の投与は、いずれの因子の mRNA 発現量にも影響を及ぼさなかったが、オンジ投与動物の海馬において GDNF 発現量の有意な回復が観察された。

(5) 培養アストロサイトの GDNF mRNA 発現に対する作用

GDNF mRNA 発現増強作用を有するオンジ中の有効成分を明らかにするため、オンジエキスの分画をおこない、培養アストロサイトへの作用を指標に解析を行った。その結果、サポニンを多く含む画分において、最も強い GDNF 発現増強作用が観察された。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 公文早苗、高橋実友、小松原靖二郎、吉田葉、宮本彩海、南園友紀、和田梨沙、板原倭、稲富由香、荒木良太、矢部武士「生薬オンジの脳機能改善作用のメカニズム会席」日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 24-27 日 (発表日 3 月 26 日)

(2) 荒木良太、岡本玖美、上川床友望、高橋実友、小松原靖二郎、南園友紀、和田梨沙、矢部武士「コルチコステロン慢性投与による脳神経障害に対する帰脾湯、オンジエキスの作用」第 130 回日本薬理学会近畿部会、京都、2016 年 11 月 19 日

(3) 高橋実友、岡本玖美、上川床友望、小松原靖二郎、南園友紀、和田梨沙、荒木良太、矢部武士「コルチコステロン慢性投与による脳機能障害に対する帰脾湯、オンジエキスの作用」第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、高槻、2016 年 10 月 15 日

(4) 荒木良太、矢部武士「エピジェネティクスに注目した漢方薬、生薬の脳・精神機能改善作用のメカニズム解析」天然薬物研究方法論アカデミー第 19 回岡崎シンポジウム 生理学研究所研究会 天然薬物研究方法を考える若手の会、岡崎、2016 年 10 月 15 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.setsunan.ac.jp/~p-shoyak/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部武士 (Yabe Takeshi)
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号：40239835

(2) 研究分担者

荒木良太 (Araki Ryota)
摂南大学・薬学部・助教
研究者番号：90710682

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()