

## 精神疾患モデル動物のエピジェネティクス異常に対する和漢薬の作用の解析

申請代表者	荒木 良太	摂南大学薬学部 複合薬物解析学研究室	助教
所内共同研究者	藤原 博典	病態制御研究部門 複合薬物薬理学分野	助教
	松本 欣三	病態制御研究部門 複合薬物薬理学分野	教授

### ■背景・目的

近年、うつ病や不安障害などの精神疾患が急増しており、早急な対策が求められている。これら疾患の治療においては西洋薬による薬物療法が主流となっているが、副作用が高頻度で見られることや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問題点も多く、西洋薬による薬物療法とは異なる治療戦略が必要と考えられる。一方で漢方薬などの和漢薬のなかには、精神機能の異常に対して有効性を示すものがいくつか知られている。しかしながら、これら和漢薬は作用機序の詳細が不明であることから、科学的なエビデンスを求める現代医療において十分に活用されているとは言い難い。こうした点から、和漢薬の作用機序に関する科学的なエビデンスを蓄積することは、和漢薬の活用を促し、より良い精神疾患治療につながるものと考えられる。

精神疾患は遺伝要因と環境要因の相互作用により発症するものと考えられているが、その分子基盤として、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などのエピジェネティックな機序が注目されている。これまでに申請者と共同研究者の松本らは、精神機能の異常に関連するエピジェネティックな変動を明らかにするために、隔離環境での飼育したマウスを用いた研究を進めてきた。その結果、本マウスではうつ・不安様の行動が見られること、GABA<sub>B1a</sub>（GABA<sub>B</sub> 受容体サブユニットの 1 つ）をコードする遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化の減少とヒストンアセチル化の増加が背側縫線核で見られることを明らかにしてきた。さらに、こうしたエピジェネティックな変動に伴って GABA<sub>B1a</sub> の mRNA 発現量が増加していること、背側縫線核の GABA<sub>B</sub> 受容体が隔離飼育マウスの異常行動に関与することも示してきた<sup>1)</sup>。

こうした背景から我々は、漢方薬の作用機序を明らかにすることを目的に、行動薬理的解析に加えてエピジェネティクス解析、神経化学的解析を行っている。前年度までの検討から、漢方薬の加味温胆湯は、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動を抑制するのに対し、GABA<sub>B1a</sub> 遺伝子のエピジェネティックな発現調節には影響を与えないことを見出してきた。そこで本研究では、神経化学的な側面から加味温胆湯の詳細な作用機序の解析を試みた。また前年度の検討から、エピジェネティックな作用を有する可能性が高いと想定された漢方薬である酸棗仁湯についても同様に、行動薬理的解析、遺伝子発現解析、神経化学的解析を行った。

### ■方法

#### 隔離飼育マウスの作製

雄性の ddY 系マウス（Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan）を 3 週齢から 6~8 週間、集団飼育マウスは透明なケージ（24×17×12 cm）にて 5 匹で、隔離飼育マウスは同じサイズの周囲が灰色のケージにて 1 匹で飼育して実験に用いた。動物は、室温 23±1℃で明期 8:00~20:00、暗期 20:00~8:00 の 12 時間明暗サイクルで飼育した。水および飼料は自由に摂取させた。

#### 漢方薬エキスの投与

加味温胆湯エキス、酸棗仁湯エキスは 300 mg/kg または 1000 mg/kg の用量で精製水に溶解し、10 ml/kg の用量で経口投与した。単回投与の実験は試験の 1 時間前に投与した。長期投与の実験は、集団飼育あるいは隔離飼育の 6 週目から 1 日 1 回 14 日間投与し、最終投与の翌日に各種解析を行った。

## mRNA 発現量の解析

TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、マウスの背側縫線核から total RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、抽出した total RNA 1  $\mu\text{g}$  から cDNA を合成した。合成した cDNA の解析は、表 1 のプライマーを用いて real-time PCR 法により行い、 $\beta$ -actin の mRNA 発現量で補正した。

表 1. mRNA 発現量の解析に用いたプライマー

mRNA	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
GABA <sub>B1a</sub>	ACGTCACCTCGGAAGGTTG	CACAGGCAGGAAATTGATGGC
$\beta$ -actin	ACCCACACTGTGCCCATCTA	GCCACAGGATTCCATACCCA

## 他のマウスと遭遇した際の行動の解析

透明なアクリルケージ (30×30×35 cm) に網目状の仕切りを設置し、解析マウスを大きい区画に入れ 3 時間馴化させた。その後、同週齢の新奇マウスを小さい区画に入れ、ANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL) を用いて 20 分間の解析マウスの行動を解析した (図 1)。

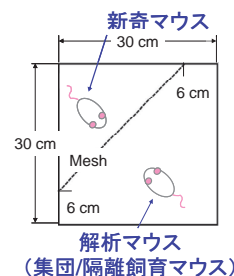


図 1. 他のマウスと遭遇した際の行動解析のケージ

## 新奇環境下における運動量の解析

透明なアクリルケージ (30×30×35 cm) に解析マウスを入れ、ANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL) を用いて 30 分間の移動距離を解析した。

## 攻撃行動の解析

解析マウスと同週齢の ddY 系雄性マウスを測定用ケージ (24×17×12 cm) に入れ、20 分間行動をビデオ撮影した。解析マウスが示した噛み付き行動を攻撃行動と定義し、攻撃行動の時間を測定した。

## In vivo 脳微小透析法

ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg, i.p.) 麻酔下、マウスの大脳皮質前頭前野 (ブレグマより 1.9 mm 前方、0.5 mm 右側方、頭蓋表面より深さ 0.8 mm) にガイドカニューレ (深さ 4 mm: Eicom, Kyoto) を挿入固定した。術後、マウスに鎮痛薬としてブプレノルフィン (0.01 mg/kg, i.p.) を投与し、個別ケージにて飼育した。測定時は透析プローブ (膜長 3 mm: Eicom, Kyoto) をガイドカニューレに挿入し、リンゲル液 (147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>) を流速 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で灌流した。サンプルは 20 分単位で回収し、直ちに高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器 (HPLC/ECD) システムに連続自動注入した。薬物は、プローブ挿入後、基礎遊離量の安定化を確認してから投与した。なお、測定は術後 3 日以内に実施した。NA、DA、5-HT の分析には、HPLC/ECD システムを用い、以下の条件で測定を行った。カラムには Eicompak CAX-ODS (4.6 mm i.d. × 30 mm: Eicom, Kyoto) を用いた。解析にはデータ解析システム Power Chrom<sup>®</sup> (eDAQ Pty., Ltd. Nagoya) を用い、サンプル中のノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量を内部標準物質との面積比により算出した。各神経伝達物質遊離量の変化は、測定開始から数時間後にマウスの基礎遊離量が安定したことを確認し、処置前の 3 サンプルの基礎遊離量の平均を 100% とし、その割合で表した。

## 統計解析

データは全て「平均値±標準誤差」として表し、統計学的処理には Stat View 5.0<sup>®</sup> (SAS Institute Inc, Tokyo) を使用した。In vivo 脳微小透析法 (図 2, 4, 5, 8) の統計解析には、反復測定二元配置分散分析を行った。その他の統計解析は、二元配置分散分析の後に多重比較検定として Dunnett 検定 (図 3) または Tukey-Kramer 検定 (図 6, 7) を行い、 $p < 0.05$  のものを有意差ありとした。

## ■結果・考察

### 加味温胆湯が大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

前年度の行動薬理学的検討から、加味温胆湯は抗うつ薬に類似した作用を有するものと推測された。そこで本研究では、加味温胆湯が抗うつ薬と同様に細胞外モノアミン量を増加させるかを明らかにするために、*in vivo* 脳微小透析法により大脳皮質前頭前野の細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量を解析し、選択的セロトニン再取り込み阻害作用を持つ抗うつ薬であるフルオキセチンの作用と比較した。正常マウスに加味温胆湯（1000 mg/kg, p.o.）を投与したところ、40 分後をピークとした一過性で選択的な細胞外セロトニン量の増加が確認された。一方でフルオキセチン（30 mg/kg, p.o.）は、細胞外セロトニン量の顕著で持続的な増加と、細胞外ノルアドレナリン量と細胞外ドパミン量の緩やかな増加を引き起こした（図 2）。本結果から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量を選択的に増加させる作用を有することが明らかとなった。しかしながら、加味温胆湯による細胞外セロトニン量増加作用はフルオキセチンの作用と比べると増加率も小さく、持続性も見られなかったことから、加味温胆湯による細胞外セロトニン量増加作用はセロトニン再取り込みの阻害によるものではない可能性が考えられた。

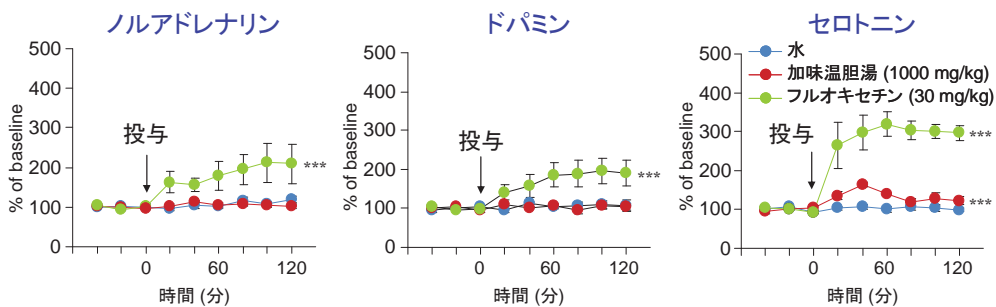


図 2. 加味温胆湯、フルオキセチンが大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (\*\*\*) $p < 0.001$  vs 水,  $n=5$ )

### 加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に関与する構成生薬の同定

加味温胆湯の投与により大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量が増加したことから、次に加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に関与する構成生薬の同定を試みた。加味温胆湯を構成する生薬（半夏、陳皮、茯苓、甘草、生姜、竹筴、枳実、遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参）のうち、いずれか1つを除いた一味抜き処方を作製し、大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を *in vivo* 脳微小透析法により解析した。投与後から 1 時間における細胞外モノアミン量の変化率を Net-AUC で評価した結果、竹筴抜き処方（1000 mg/kg, p.o.）において細胞外セロトニン量増加作用の著しい減弱が見られた。他の一味抜き処方（1000 mg/kg, p.o.）では、細胞外セロトニン量増加作用に大きな変化は見られなかった（図 3）。本結果から、加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用には、竹筴が重要な役割を担う可能性が示された。

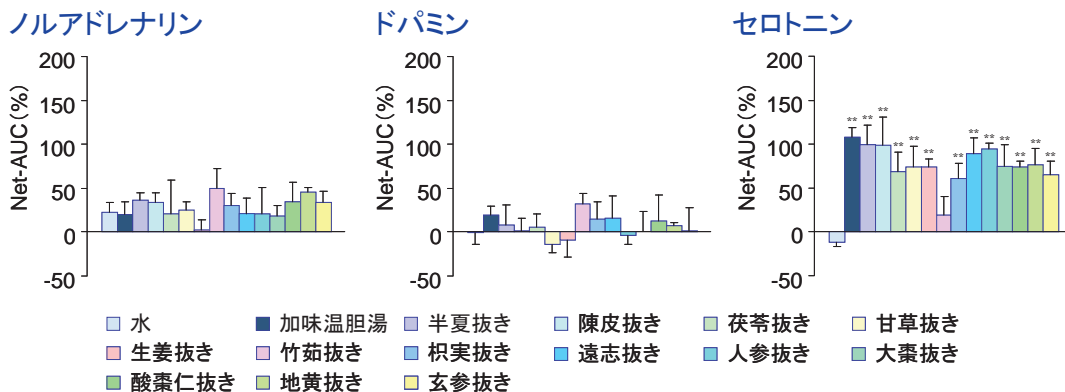


図 3. 加味温胆湯一味抜き処方が大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (\*\*) $p < 0.01$  vs 水,  $n=3-5$ )

**竹筴エキスが脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響**

加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に竹筴が重要な役割を担う可能性が示されたことから、次に、竹筴単味エキスが脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を解析した。エキス作製時の収率をもとに、加味温胆湯 (1000 mg/kg) に含まれると想定される竹筴エキス量 (66.5 mg/kg, p.o.) を算出した。算出された竹筴エキス量 (66.5 mg/kg, p.o.) を投与したところ、細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量のいずれも変化は見られなかった (図 4)。本結果から、細胞外セロトニン量増加作用には竹筴だけでは十分でない可能性が考えられた。

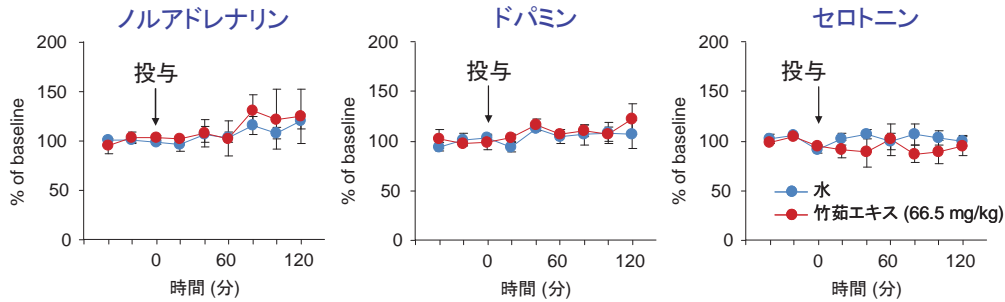


図 4. 竹筴エキスが脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (n=3-4)

**二陳湯と温胆湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響**

竹筴エキスのみでは細胞外セロトニン量増加作用がみられないことから、細胞外セロトニン量増加作用には竹筴と他のなんらかの生薬との組み合わせが重要である可能性が考えられる。そこで、加味温胆湯の構成に注目した。加味温胆湯は二陳湯の加減方であり、半夏、陳皮、茯苓、甘草、生姜の 5 つの生薬からなる二陳湯に、竹筴と枳実の 2 つの生薬を加えることで温胆湯となる。この温胆湯にさらに 6 つの生薬 (遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参) を加えることで加味温胆湯となる。この 3 つの漢方処方 の効能・効果を見てみると、二陳湯は体力中等度で悪心・嘔吐があるものの胃部不快感等に対して用いられるのに対し、温胆湯と加味温胆湯は体力中等度以下で胃腸が虚弱なものの不眠・神経症に対して用いられる。このように、竹筴と枳実が加えられて温胆湯となることで不眠・神経症などの神経精神症状に対して効果を発揮することからも、中枢神経系に対する作用における竹筴の重要性が伺える。そこで次に、竹筴を加える前の処方である二陳湯と竹筴を加えた後の処方である温胆湯において、脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を比較した。その結果、二陳湯 (1000 mg/kg, p.o.) は細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量のいずれにも影響を及ぼさなかったのに対し、温胆湯 (1000 mg/kg, p.o.) は細胞外セロトニン量を選択的に増加させた (図 5)。以上の結果から、細胞外セロトニン量増加作用には、温胆湯を構成する生薬が重要であるものと考えられた。また、不眠や神経症に対して用いられる温胆湯と加味温胆湯の両方において細胞外セロトニン量増加作用が見られたことから、この細胞外セロトニン量増加作用が不眠や神経症に対する作用において重要である可能性が考えられた。

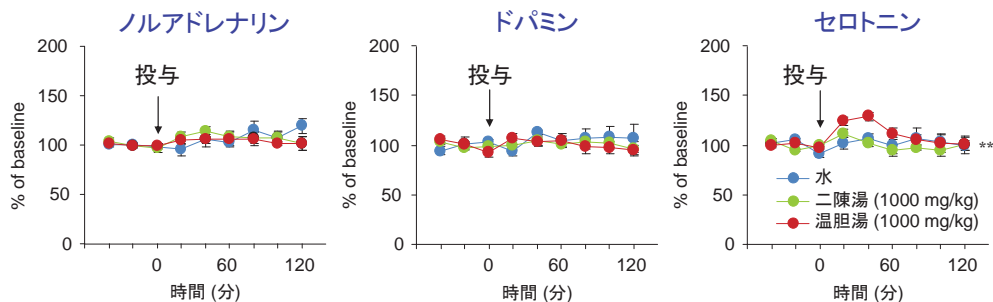


図 5. 二陳湯、温胆湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (\*\*p<0.01 vs 水, n=3-4)

**隔離飼育マウスで見られる多動や GABA<sub>B1a</sub> の発現増加に対する酸棗仁湯の影響**

これまでの検討から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量を一過的に増加させることを見出した。一方で、前年度までの検討から、加味温胆湯は隔離飼育マウスの背側縫線核で見られる GABA<sub>B1a</sub> のエピジェネティックな発現調節異常に対しては改善作用を示さないことが明らかとなっている。

そこで次に、エピジェネティックな作用を有する漢方薬の見出すことを目的に、新たな漢方薬として酸棗仁湯の作用を解析した。これまでに共同研究者の藤原らにより、酸棗仁湯の慢性投与が隔離飼育マウスの社会性行動異常などの異常行動を改善することが報告されていることから<sup>2)</sup>、酸棗仁湯は隔離飼育マウスで見られるエピジェネティックな異常を改善する可能性が考えられる。そこで、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動や、隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA<sub>B1a</sub> mRNA 発現増加を指標に、酸棗仁湯の 14 日間投与が行動異常やエピジェネティックな遺伝子発現調節異常に及ぼす影響を検討した。その結果、酸棗仁湯 (1000 mg/kg, p.o. 1 日 1 回 14 日間投与) は隔離飼育マウスで見られる多動や GABA<sub>B1a</sub> mRNA の増加に対して、改善作用を示さなかった (図 6)。

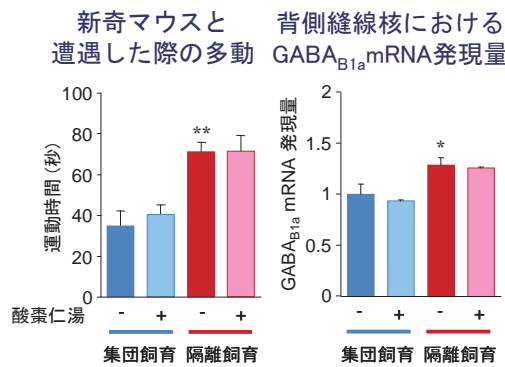


図 6. 隔離飼育マウスで見られる多動や GABA<sub>B1a</sub> の発現増加に対する酸棗仁湯の影響 (\*\* $p < 0.01$  vs 水,  $n = 5-9$ )

**酸棗仁湯の単回投与の影響に関する行動薬理的解析**

酸棗仁湯の 14 日間投与では、隔離飼育マウスで見られる行動異常ならびに遺伝子発現異常の改善が見られなかったことから、次に酸棗仁湯の単回投与の影響を行動薬理的に解析した。その結果、酸棗仁湯 (300, 1000 mg/kg, p.o.) は、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動や攻撃行動、新奇環境下における多動を用量依存的に改善するといった抗不安様作用を示した (図 7)。

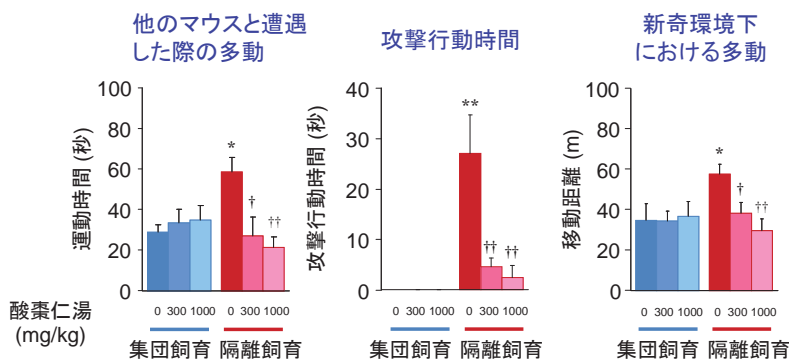


図 7. 隔離飼育マウスで見られる異常行動に対する酸棗仁湯の影響 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs 集団飼育, † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  vs 水,  $n = 5-7$ )

### 酸棗仁湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

酸棗仁湯の単回投与により抗不安様作用が見られたことから、酸棗仁湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を解析した。その結果、酸棗仁湯 (1000 mg/kg, p.o.) は、細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量に対してなんら影響を及ぼさなかった (図 8)。

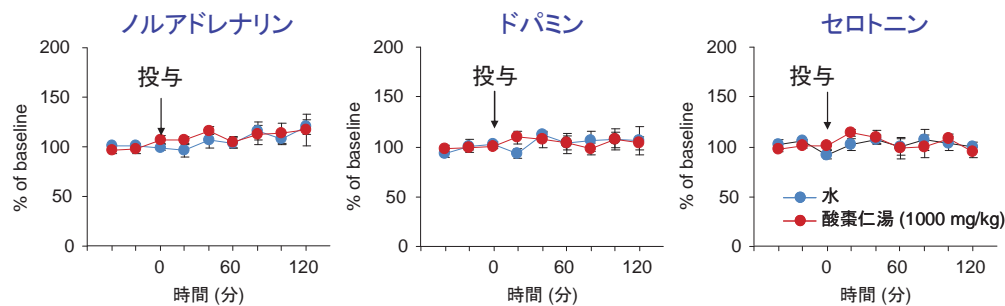


図 8. 酸棗仁湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (n=5)

## ■結論

前年度と今年度を実施した漢方薬の 14 日間投与による作用の解析からは、加味温胆湯および酸棗仁湯のエピジェネティックな作用は見出すことができなかった。しかしながら行動薬理的解析および神経化学的解析から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量増加作用を介して抗うつ様作用を示す可能性が考えられた。この加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用には、竹筴が重要であることが示唆された。また、酸棗仁湯は細胞外モノアミン量の変化を介さずに抗不安作用を示すものと考えられた。

## ■引用文献

1. Araki R., Hiraki Y., Nishida S., Kuramoto N., Matsumoto K., Yabe T. Epigenetic regulation of dorsal raphe GABA(B1a) associated with isolation-induced abnormal responses to social stimulation in mice. *Neuropharmacology*, **101**, 1-12, 2016.
2. Fujiwara H, Tsushima R, Okada R, Awale S, Araki R, Yabe T, Matsumoto K.. Sansoninto, a traditional herbal medicine, ameliorates behavioral abnormalities and down-regulation of early growth response-1 expression in mice exposed to social isolation stress. *J Tradit Complement Med.*, **12**, 81-88, 2017.