

モノアミン神経系およびエピジェネティクス変動に対する和漢薬の作用に関する

基礎的研究

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

講師

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

■背景・目的

近年、うつ病、不安障害などの精神疾患の患者数が増加しており、早急な対策が求められている。これらの疾患の治療としてはモノアミン神経系を標的とした薬物の使用が主流であるが、副作用が高頻度で認め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の問題点も多く、既存の薬物とは異なる治療戦略の必要であるものと考えられる。

一方で、生薬や漢方薬などの和漢薬には、精神機能異常に対して有効性を示すものがいくつか存在する。和漢薬は西洋薬とは異なり複数の薬効成分が含まれていることから、単にモノアミン神経系に作用する西洋薬とは異なった複雑な作用機序を有するものと推測されている。しかしながら、複雑な作用機序を有するため、和漢薬の詳細な作用機序に関しては未だ不明な点が多く残されており、治療の科学的な根拠が求められる現代医療において和漢薬の使用が敬遠されることも少なくない。

これまでに我々は、漢方薬の加味温胆湯が抗うつ様作用を有することや大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量を増加させることを明らかにしてきた。さらに、加味温胆湯の細胞外セロトニン（5-HT）増加作用には構成生薬の1つであるチクジョが重要な役割を果たしていることを見出してきた（*J Pharmacol Sci.*, **139**, 72-76, 2019.）。また、加味温胆湯の構成生薬の一つであるオンジのエキスが抗うつ様作用を示すこと、および細胞外モノアミン量を変動させることなくグリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF の発現を誘導し、スパインの密度を増加させることも明らかにしている（*Tradit Kampo Med.*, **5**, 89-97, 2019.）。こうした成果から、和漢薬は、“モノアミン神経系に対する作用”と“グリア細胞に対する作用”のように複数の作用機序を有していることが示唆される。これら和漢薬の作用機序を明らかにすることが、西洋薬を用いた治療とは異なる和漢薬を用いた治療戦略の確立につながるものと考えられる。

こうした背景をふまえ本研究では、和漢薬の精神機能異常改善作用の作用機序を明らかにすることを目的に、モノアミン神経系に対する作用として加味温胆湯の抗うつ様作用および細胞外セロトニン量増加作用の詳細な解析と、グリアに対する作用としてオンジエキスが GDNF 遺伝子の DNA メチル化に及ぼす影響の解析を行った。

■方法

モデル動物の作製

隔離飼育マウスは、雄性の ddY 系マウス（Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan）を3週齢から6週間、周囲が灰色のケージ（24×17×12 cm）にて1匹で飼育して作製し、実験に用いた。コルチコステロン慢性投与マウスは、6週齢の ddY 系雄性マウスにコルチコステロン（40 mg/kg）を1日1回2週間皮下投与し、最終投与の翌日に実験に用いた。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。

薬物の投与

加味温胆湯およびオンジエキスは精製水に溶解し、経口投与した。コルチコステロンは 0.5%カルボキシメチルセルロース（Cmc）に懸濁し、皮下投与した。隔離飼育マウスを用いた実験では試験の1時間前に加味温胆湯を 1000 mg/kg の用量で、コルチコステロン慢性投与マウスを用いた実験ではオンジエキスを 20 mg/kg の用量でコルチコステロンと同様に1日1回2週間投与した。5-HT_{1B} アンタゴニスト GR127935 は生理食塩水の溶解し、

加味温胆湯投与の 30 分前に 10 ml/kg の用量で皮下投与した。

強制水泳試験

柱形の透明な測定シリンダー（高さ 27 cm、直径 18 cm）に水温 25°C の水を 13 cm 深さまで入れ、その中で解析マウスを 6 分間水泳させ、その様子をビデオ撮影した。試験終了後、体温低下を防ぐためにマウスをよく乾燥させた。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。

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、30 分間の移動距離を ANY-maze video tracking software（Stoelting Company, Wood Dale, IL）を用いて解析した。

5-HT 取り込み量の解析

9 週齢の雄性的 ddY 系マウス的大脑皮質を採取し、組織の 10 倍量の Syn-PER reagent（sigma, St. Louis, MO, USA）を加え、ダウンスホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを 4°C、1,200×g で 10 分間遠心し、得られた上清をさらに 4°C、15,000×g で 20 分間遠心した。その後、上清を取り除き組織の 5 倍量の HBSS を加え懸濁したものをシナプトソーム溶液として実験に用いた。シナプトソーム溶液 20 μ l に 5-HT（最終濃度 20 nM）と加味温胆湯エキス（最終濃度 1 mg/ml）を加え、全量が 100 μ l となるように HBSS を加えた。その後、37°C で 10 分間インキュベートし、直ちに氷上で 2 分間冷やし、4°C、15,000×g で 20 分間遠心した。上清を採取し、高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器システムを用いて、上清の 5-HT 量を定量し、シナプトソームに取り込まれた 5-HT 量を計算した。

DNA メチル化の解析

マウス的大海馬からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理した DNA を鋳型とし、表 2 のプライマーを用いて PCR 法により CpG アイランドを増幅しクローニングした。各サンプルにつき 8 クローンの塩基配列を解析した。

統計解析

データは全て「平均値 \pm 標準誤差」として表し、統計学的処理には Stat View 5.0[®]（SAS Institute Inc, Tokyo）を使用した。強制水泳試験（図 1）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 Tukey-Kramer 検定を行った。5-HT 取り込み（図 2）と DNA メチル化（図 4）の統計解析は、一元配置分散分析の後に多重比較検定として Tukey-Kramer 検定を行った。いずれも $P<0.05$ のものを有意差ありとした。

■結果・考察

加味温胆湯の抗うつ様作用における 5-HT_{1B} 受容体の関与

これまでの検討から、加味温胆湯の経口投与により、大脑皮質前頭前野において投与 40 分後をピークとした細胞外 5-HT 量の増加が観察されること、加味温胆湯の投与 60 分後において、強制水泳試験における無動時間の増加といった隔離飼育マウスのうつ様行動が減少することを見出している。本結果から、加味温胆湯は選択的 5-HT 再取り込み阻害薬と同様に、細胞外 5-HT 量を増加させることで抗うつ様作を發揮する可能性が考えられた。これまでに、強制水泳試験における選択的 5-HT 再取り込み阻害薬の抗うつ様作用には、5-HT_{1B} 受容体が関与することが報告されている（*J Psychiatry Neurosci.* **33**, 541-550, 2008; *C R Acad Sci III.* **324**, 433-441, 2001.）。そこで本研究ではまず、加味温胆湯の抗うつ様作用における 5-HT_{1B} 受容体の関与を明らかにするために、5-HT_{1B} 受容体アンタゴニスト GR127935（3 mg/kg）の前投与が加味温胆湯の抗うつ様作用に与える影響について解析した。隔離飼育マウスに GR127935（3 mg/kg）を皮下投与し、その 30 分後に加味温胆湯（1000 mg/kg）を経口投与した。加味温胆湯の投与 60 分後に強制水泳試験を行った結果、加味温胆湯の抗うつ様作用は GR127935 の前投与により消失した。以上の結果から、加味温胆湯の抗うつ様作用には 5-HT_{1B} 受容体が関与するものと考えられた。

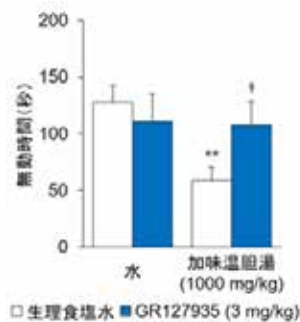


図 1. GR127935 の前投与が加味温胆湯の抗うつ様作用に及ぼす影響
(* $p<0.01$ vs 水、† $p<0.05$ vs 生理食塩水、 $n=8-14$)

加味温胆湯の細胞外 5-HT 量増加作用のメカニズム解析

加味温胆湯の経口投与により、大脳皮質前頭前野において一過的な細胞外 5-HT 量の増加が観察されることから、加味温胆湯が細胞外の 5-HT の再取り込みを抑制している可能性が考えられた。そこで、マウスの大脳皮質から調整したシナプトソームを用いて、加味温胆湯が 5-HT の取り込みに与える影響について解析した。その結果、加味温胆湯 (1 mg/ml) はシナプトソームへの 5-HT の取り込みを抑制することが明らかとなった。大脳皮質前頭前野で見られる加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用は、構成生薬の 1 つであるチクジョを除くことで減弱することから、シナプトソームへの 5-HT の取り込みにおいても、チクジョ抜き加味温胆湯の影響について解析した。その結果、加味温胆湯 (1 mg/ml) と比べてチクジョ抜き加味温胆湯 (1 mg/ml) では、5-HT 取り込み抑制作用が減弱する傾向が見られたものの、有意な変化は見られなかった (図 2)。以上の結果から、加味温胆湯は細胞外の 5-HT の再取り込みを抑制することで細胞外 5-HT 量を増加させるものと考えられた。しかしながら、本結果では 5-HT の再取り込みにおけるチクジョの関与を示すことはできなかった。今後、加味温胆湯およびチクジョ抜き加味温胆湯の 5-HT 取り込み阻害作用の用量反応性を解析することで、チクジョの関与が明らかになる可能性も考えられる。

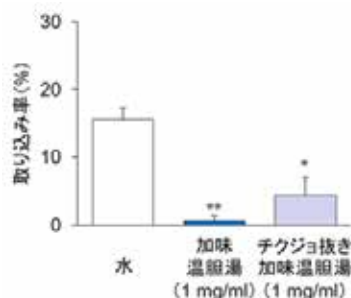


図 2. 加味温胆湯 (1 mg/ml) およびチクジョ抜き加味温胆湯 (1 mg/ml) がシナプトソームの 5-HT 取り込みに及ぼす影響
(* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ vs 水、 $n=3$)

BDNF 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化に対するオンジエキスの作用の解析

これまでの検討から、加味温胆湯の構成生薬の 1 つであるオンジのエキスを投与することにより、コルチコステロン慢性投与マウスで観察されるうつ様行動が改善することを見出している。また、コルチコステロン慢性投与マウスの海馬では、神経新生、樹状突起スパイン密度、成熟スパイン数、BDNF mRNA 発現量の減少が見られるが、そのうち神経新生の減少以外の異常 (スパイン密度、成熟スパイン数、BDNF mRNA 発現量の減少) はオンジエキスにより改善することも明らかにしている (*Tradit Kampo Med.*, **5**, 89-97, 2019.)。これまでに、海馬の樹状突起スパイン数とうつ状態との関連性が示唆されていること (*Neural Plast.*, 8056370, 2016; *Synapse*, **42**, 151-163, 2001)、BDNF が樹状突起スパインの成熟に関与すること (*Development*, **143**, 4224-4235, 2016)、うつ病患者では血清中の BDNF 量が減少していることや抗うつ薬により血清中の BDNF 量が増加すること (*Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **32**, 886-890, 2008) が報告されていることから、オンジエキスによる抗うつ様作用には、BDNF 発現量の増加が関与するものと考えられた。一方で、慢性的なストレスの負荷により、BDNF 遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドにおいて、DNA のメチル化が増加することが報告されている (*Neuron*, **69**, 359-372, 2011)。一般的に、プロモーター領域における DNA のメチル化は遺伝子の転写を抑制することが知られていることから、ストレスによる BDNF mRNA 発現量の減少には DNA メチル化の増加が寄与するものと考えられる。そこで本研究では、コルチコステロン慢性投与により減少した BDNF mRNA 発現量に対してオンジエキスが増加作用を示すメカニズムを明らかにするために、コルチコステロンおよびオンジエキスが BDNF 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドにおける DNA のメチル化に与える影響について解

析した。GDNF 遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドには 15 個の CpG 部位が存在する (図 3)。そのうち、2 番目の CpG 部位において、コルチコステロンの慢性投与による DNA メチル化の有意な増加が見られた。この DNA のメチル化の増加が GDNF mRNA 発現量の減少に関与する可能性が考えられる。しかしながら、この DNA メチル化の増加に対してオンジエキスはなんら影響を及ぼさなかった (図 4)。以上の結果から、オンジエキスは CpG アイランドの DNA メチル化の変化を介さずに、GDNF mRNA の発現量を増加させているものと考えられた。

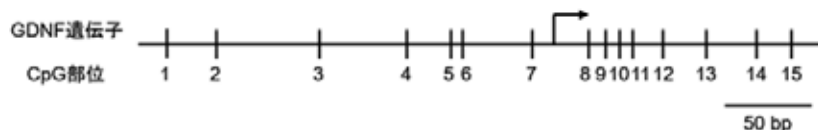


図 3. GDNF 遺伝子の CpG アイランドにおける CpG 部位

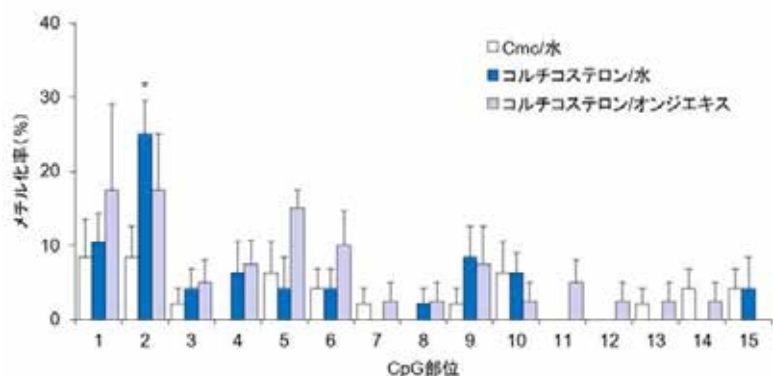


図 4. 海馬の GDNF 遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化の割合 (* $p<0.05$ vs Cmc/水、 $n=5$)

■結論

本研究結果から、加味温胆湯は 5-HT の再取り込みを阻害することで細胞外の 5-HT を増加させること、この細胞外 5-HT 量の増加により、5-HT_{1B} 受容体が刺激されることが抗うつ様作用のメカニズムの一端である可能性が考えられた。一方で、加味温胆湯の構成生薬の 1 つであるオンジは、GDNF の発現量を増加させることで抗うつ様作用を発揮すると考えられるが、その GDNF 増加作用には DNA のメチル化の変動を介さないメカニズムが存在するものと考えられた。

トリパノソーマに対する生薬由来化合物・抽出物の抗原虫効果の検討

申請代表者	平山 謙二	長崎大学 熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野	教授
所外共同研究者	水上 修作	長崎大学 熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野	助教
所外共同研究者	田山 雄基	長崎大学 熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野	大学院生

■背景・目的

トリパノソーマは、幅広い宿主に寄生する原虫で、シャーガス病（*Trypanosoma cruzi*）やアフリカ睡眠病（*T. brucei*）などを引き起こす。これらの有効な治療法についての研究は十分に進んでおらず、“顧みられない熱帯病”と呼ばれる疾患群に含まれている。我々は、これまでに和漢薬ライブラリーの中から優れた抗マラリア効果を持つ化合物・抽出物を発見した経験を活かし、新規抗シャーガス病薬開発を目指して、和漢薬ライブラリーに含まれるサンプル（生薬由来化合物・生薬エキス）の *T. cruzi* に対する抗原虫活性を検討することとした。

■結果・考察

今回は、サンプルのトリポマスティゴート型及び（感染細胞内での形態である）アマスティゴート型 *T. cruzi* に対する活性の検討を行った。

サンプルを 96 ウェルプレートに準備し、ここにトリポマスティゴート型 *T. cruzi* (Tulahuen 株) と NBMH (New Born Mouse Heart) 細胞を混ぜたものを加え、プレートを 37°C 5%CO₂ インキュベーター内で静置した（サンプルの最終濃度は、生薬由来化合物は 20 µM、生薬エキスは 20 µg/mL）。今回の実験には、ルシフェラーゼを発現する組換え原虫を使用し、ルシフェラーゼの基質を加えた際の発光量をもとに、原虫量を測定することとした。3 日間の静置後、原虫と細胞を含むプレートに基質を加えて、発光量を検出した。

各サンプルの発光量を、0.5%NP40 で処理をしたウェル（阻害率 100%）、及び、溶媒のみを加えたウェル（阻害率 0%）のウェルと比較して、各サンプルの原虫阻害率を算出した。

夫々のサンプルの阻害率は、生薬由来化合物（全 96 種）では、40%以下：82 種、40~60%：3 種、60~80%：3 種、80~100%：9 種であった。また、生薬エキス（全 120 種）では、40%以下：112 種、40~60%：3 種、60~80%：0 種、80~100%：5 種であった（表 1）。なお、実験は 3 回行い、中央値を算出した（特許出願の可能性があり、詳細は現時点では開示しない）。

阻害率 60%をカットオフ値としたところ、12 種の生薬由来化合物及び 5 種の生薬エキ스가、比較的高い抗トリパノソーマ活性を持つサンプルとして選定された。また、同時に行った細胞傷害性試験（詳細は割愛）の結果、これらの内 5 種の生薬由来化合物及び 3 種の生薬エキスは、比較的細胞傷害性が低く（細胞傷害率 40%以下）、より詳細な検討を行うのに適したサンプルであると考えられた。

■結論

生薬由来化合物・生薬エキス双方から、高い抗トリパノソーマ活性を示し、かつ細胞傷害性の低い、サンプルを複数個発見することができた。今後、IC₅₀（50%阻害濃度）、CC₅₀（50%細胞傷害濃度）を決定し、動物実験などを行う予定である。

和漢薬に基づいた抗原虫薬開発という和漢研・熱研双方の特色を生かした共同研究として、今後の発展が期待できる結果が得られた。