

氏 名 わたり ひでとし
渡り 英俊

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 157 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学専攻

学位論文題目 The effect of kamikihito on cognitive function
(加味帰脾湯の認知機能に対する作用)

論文審査委員

(主査) 教授 鈴木 道雄
(副査) 教授 井村 穰二
(副査) 教授 笹原 正清
(副査) 教授 清水 忠道
(指導教員) 教授 嶋田 豊

論文内容の要旨

[目的]

認知症はその患者数が増加の一途をたどっており、世界的に社会問題となっている。Alzheimer's disease(AD)はその主な原因であり治療薬の研究、開発が進行しているが、いまだ根本治療薬の開発には至っていない。そのような状況の中、我々は漢方医学で用いる生薬、方剤の中から AD 改善作用を有する薬物の検索を行い、これまでに加味帰脾湯が *in vivo*、*in vitro* の実験モデルにおいて AD 病態を改善させることを報告してきた。本研究ではその作用メカニズムを明らかにするため、AD の神経機能不全の要因である神経原線維変化、すなわち tau のリン酸化に対する加味帰脾湯の作用を検討した。また、加味帰脾湯の製剤法による効果の違いを明らかにするため、日本と韓国で独自に製剤された加味帰脾湯の正常マウスに対する記憶増強作用を検討した。

[方法]

① 妊娠 ddY マウス (E14) より調製した初代培養大脳皮質神経細胞に amyloid β 25-35 ($A\beta$, 10 μ M) を処置して軸索萎縮を誘発した。 $A\beta$ 処置の 1 時間前 (前処置) または 24 時間後 (後処置) に加味帰脾湯エキス(KKT, 10 μ g/ml)、kenpaullone (KPL, 1 μ M)

[KPL: glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)および cyclin dependent kinase 5(CDK5)の阻害薬]を処置し以下の作用を検討した。(1)蛍光免疫染色による軸索伸展作用の検討。(2)蛍光免疫染色による tau リン酸化抑制作用の検討。(3)protein phosphatase 2A(PP2A)活性化作用の検討。

② 日本で製剤し使用されている加味帰脾湯 (KKT) と、韓国で製剤し使用されている加味帰脾湯 (kami-guibi-tang, KGT)、また対照薬として安中散 (AS) を用いた。正常マウス (ddY、雄性、6 週齢) に KKT、KGT、AS エキス (500 mg/kg/day) もしくは生理食塩水を 13 日間連続で経口投与した。投与 8 日目に novel object recognition test、投与 11 日目に object location test を開始しマウスの記憶能力を評価した。各テストのインターバル時間は 48 時間に設定した。また、各エキスの 3D-HPLC 分析を行い、含有成分の比較を行った。

[結果]

① (1) 前処置では KKT、KPL ともに軸索伸展作用を示した。後処置では KPL は軸索伸展作用を示さなかったのに対して KKT は軸索伸展作用を示した。(2) $A\beta$ の処置により 4 時間後をピークとして、その後少なくとも 72 時間持続する tau リン酸化の上昇を認めた。前処置では KPL は $A\beta$ 処置後 4 時間まで一過性にリン酸化を抑制したのに対して、KKT は 72 時間まで持続的にリン酸化を抑制した。後処置では KPL はリン酸化を抑制できなかったのに対して KKT は処置後 72 時間でリン酸化を抑制した。(3) $A\beta$ 処置により PP2A の活性が低下した。KKT の後処置により PP2A の活性低下が改善した。

② KKT 投与群、KGT 投与群ではともに novel object recognition test と object location test において記憶増強作用が示された。それに対し AS 投与群、生理食塩水投与群では記憶増強作用は見られなかった。3D-HPLC 分析の結果、KKT と KGT の間で成分の含有量に多少の違いが認められたものの、類似の成分パターンが示された。

[考察]

KPL が tau のリン酸化を一過性に抑制したのに対して、KKT は持続的に tau のリン酸化を抑制した。また後処置においても KKT は tau のリン酸化を抑制した。この KKT の作用として PP2A の活性化による tau の脱リン酸化促進作用が関与していることが示唆された。

KKT は持続的かつ後処置でも有効であった tau のリン酸化改善作用によって KPL と異なり $A\beta$ 処置による軸索萎縮が生じた後からでも軸索伸展作用を示したと考えられた。

日本と韓国においてそれぞれ独自の方法で製剤された加味帰脾湯エキスが正常マウスに対して同等の記憶増強作用を示し、成分パターンとしては類似していることから、少なくとも加味帰脾湯においては成分含有量の多少の違いは薬理効果を大きく左右するものではないことが示唆された。

[結 論]

本研究により、KKTがPP2Aを活性化することによりtauを脱リン酸化することが示された。また、日本と韓国で別々に製剤された加味帰脾湯が同等の正常記憶増強作用を有することが示された。

本研究はKKTがAD発症後にも有効である可能性を示唆しており、今後さらに基礎研究によって作用メカニズムの全容が明らかとなり、臨床研究においてその有効性が示されることが期待される。

文献

Watari H, Shimada Y, Tohda C: New treatment for Alzheimer's disease, kamikihito, reverses amyloid- β -induced progression of tau phosphorylation and axonal atrophy. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2014, Article ID 706487, 2014. DOI: 10.1155/2014/706487.

Watari H, Shigyo M, Tanabe N, Tohda M, Cho KH, Kyung PS, Jung WS, Shimada Y, Shibahara N, Kuboyama T, Tohda C: Comparing the effects of kamikihito in Japan and kami-guibi-tang in Korea on memory enhancement: working towards the development of a global study, Phytotherapy Research, 2014, DOI: 10.1002/ptr.5250.

学位論文審査の要旨

【目的】

認知症はその患者数が増加の一途をたどっており、世界的に社会問題となっている。認知症の主な原因疾患はAlzheimer's disease (AD) であり、その治療薬の研究が進行しているが、まだ根本治療薬の開発には至っていない。そのような状況の中で、漢方医学で用いられる生薬、方剤の中から、ADに対する治療効果を有する薬物の検索も行われており、これまでに加味帰脾湯が*in vivo*および*in vitro*の実験モデルにおいて、ADの病態を改善させることが報告されている。

本研究で渡り英俊君は、加味帰脾湯のAD病態改善作用のメカニズムを明らかにするため、ADにおける神経機能不全の一要因である神経原線維変化の形成機序、すなわちtauのリン酸化に対する加味帰脾湯の作用を検討した。また、加味帰脾湯の製剤法による効果の違いを明らかにするため、日本と韓国で独自に製剤された加味帰脾湯の正常マウスに対する記憶増強作用を検討した。

【方法】

研究1: 胎生14日齢のddYマウスより調製した初代培養大脳皮質神経細胞に10 μ Mのamyloid β (A β) 25-35を処置して軸索萎縮を誘発した。A β 処置の1時間前(前処置)または24時間後(後処置)に、10 μ g/mlの加味帰脾湯(KKT)エキスまたは1 μ Mのkenpaullone(KPL) [glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) およびcyclin dependent kinase 5 (CDK5) の阻害薬]を処置し、(1) 蛍光免疫染色による軸索伸展作用、(2) 蛍光免疫染色によるtauリン酸化抑制作用、(3) protein phosphatase 2A (PP2A) 活性化作用、について検討した。

研究2: 日本で製剤され使用されている加味帰脾湯(KKT)、韓国で製剤され使用されている加味帰脾湯(kami-guibi-tang, KGT)、および対照薬として安中散(AS)を用いた。正常マウス(ddY、雄性、6週齢)にKKT、KGT、ASエキス(500 mg/kg/day)もしくは生理食塩水を13日間連続で経口投与した。投与8日目からnovel object recognition test、投与11日目からobject location testを行い、マウスの記憶能力を評価した。また、各エキスの3D-HPLC分析を行い、含有成分の比較を行った。

【結果】

研究 1 : (1) 前処置では KKT、KPL ともに軸索伸展作用を示した。後処置では KPL は軸索伸展作用を示さなかったのに対して KKT は軸索伸展作用を示した。(2) A β の処置により 4 時間後をピークとして、その後少なくとも 72 時間持続する tau リン酸化の上昇を認めた。前処置では、KPL は A β 処置後 4 時間まで一過性にリン酸化を抑制したのに対して、KKT は 72 時間まで持続的にリン酸化を抑制した。後処置では、処置後 72 時間に KPL はリン酸化を減少させなかったのに対して、KKT はリン酸化を減少させた。(3) A β 処置による PP2A の活性低下は、KKT の後処置により改善した。

研究 2 : KKT 投与群および KGT 投与群ではともに、novel object recognition test と object location test において記憶増強作用が示された。それに対し、AS 投与群、生理食塩水投与群では、記憶増強作用はみられなかった。3D-HPLC 分析の結果、KKT と KGT の間で成分の含有量に多少の違いが認められたものの、よく類似した成分パターンが示された。

【総括】

渡り英俊君は、研究 1 において、KPL を A β 処置の前に投与した場合、tau のリン酸化を一過性に抑制するのに対して、KKT は持続的に tau のリン酸化を抑制すること、また A β 処置の後に投与した場合も、KKT は KPL ではみられない tau のリン酸化の減少を生じることが示し、この KKT の作用に PP2A の活性化による tau の脱リン酸化促進作用が関与することを示唆した。研究 2 においては、日本と韓国においてそれぞれ独自の方法で製剤された加味帰脾湯エキスが、正常マウスに対して同等の記憶増強作用を示し、薬理効果が大きく異なるものではないことを示唆した。

本研究は、KKT が tau のリン酸化改善作用によって、A β 処置による軸索萎縮が生じた後からでも軸索伸展作用を示すこと、その機序として PP2A の活性化が示唆されることを初めて明らかにした点で新規性があり、また医学における学術的重要性も高い。さらに、KKT が AD 発症後にも有効であることを示唆し、国際共同による臨床研究に発展する可能性を示した点で臨床的発展が大いに期待できると考えられる。

以上より本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。