

生活習慣・ストレスに起因する認知情動行動障害に対する 和漢薬の作用解明

(申請代表者)	岡 淳一郎	東京理科大学薬学部薬理学研究室	教授
(所外共同研究者)	濱田 幸恵	東京理科大学薬学部薬理学研究室	助教
(所内共同研究者)	松本 欣三	病態制御研究部門複合薬物薬理学分野	教授

【要 旨】

【目的】

申請代表者及び所外共同研究者は、幼若期発症1型糖尿病モデルラット(JDM)の学習記憶障害に和漢薬の一つである釣藤散が有効であることを明らかにした。本研究では、そのメカニズム解明を行った。さらに、正常動物および代表的抗うつ薬であるイミプラミンに抵抗性を示すモデル動物を用い、釣藤散のうつ様行動に対する作用を調べた。

【方法】

- 1) 17日齢Wistar/ST系雄性ラットにstreptozotocin (85 mg/kg)を腹腔内投与した。静脈血を採血し、血糖値が300 mg/dL以上の動物をモデルとした。釣藤散[(株)ツムラから供与]は、脱イオン水で1 g/kgになるよう調製して1日1回経口投与した。釣藤散投与は21日齢から始め、実験で使用する前日まで投与した。電気生理学的実験及び生化学的実験は24日齢から28日齢ラットを用いた。モデル動物より急性海馬スライスを作製し、海馬CA3領域からCA1領域に投射するShaffer側枝を刺激して誘導した長期増強(LTP)および長期抑圧(LTD)を測定した。また、ウエスタンブローディング法を用いてグルタミン酸受容体発現の変動について検討した。
- 2) ①ddY系雄性マウスに、釣藤散を脱イオン水で1 g/kgになるよう調製して1日1回6日間経口投与した。行動試験の前日まで釣藤散を投与し、抗うつ薬評価法である強制水泳試験を行った。強制水泳中の無動時間を測定し、これを指標として抗うつ様作用を判定した。②ddY系雄性マウスに副腎皮質刺激ホルモン(ACTH; 0.45 mg/kg/day)を14日間皮下投与し、視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系を亢進させることによって治療抵抗性うつ病のモデルマウスとした。①と同様の実験スケジュールにおいて、抗うつ様作用を判定した。

【結果と考察】

- 1) 幼若期発症1型糖尿病モデルラットで障害されたシナプス可塑性の一つであるLTDが、釣藤散の慢性投与により改善された。しかし、LTPには影響を与えなかった。さらに、JDMラットで認められたグルタミン酸NMDA受容体のサブクラスであるNR2Bの過剰発現が釣藤散の慢性投与により改善された。釣藤散は、NR2B発現を正常に戻すことにより、記憶学習に関与すると考えられているシナプス可塑性を改善させたと考えられる。
- 2) 釣藤散投与により、正常マウスでは強制水泳試験における無動時間を有意に減少させた。しかし、治療抵抗性うつ病モデルマウスでは、有意な変化はみられなかった。よって、釣藤散の抗うつ様作用はHPA系の改善によるものではなく、モノアミン神経系の調節等によるものである可能性が示された。

【背景・目的】

1型糖尿病は小児期に発症することが多いため、小児糖尿病とも呼ばれる。しかし、実験モデル動物を用いた研究において、発症年齢を考慮した研究は行われていなかった。我々は、ヒトの1型糖尿病の発症年齢に適した幼若期発症1型糖尿病モデル(JDM)ラットを作製した[1]。JDMラットは短期記憶に障害をもち、記憶学習の指標とされる海馬神経シナプス可塑性に障害を受けることを明らかにした[1,2]。昨年度は、JDMラットの認知機能障害に対して、和漢薬の一つである釣藤散の有効性について検討した。その結果、JDMラットの学習記憶障害に釣藤散が有効あり、電気生理学的検討の結果シナプス伝達の亢進が釣藤散の慢性投与により回復した。しかし、海馬神経シナプス可塑性への影響やシナプス伝達に対するメカニズムについては不明であった。そこで、本年度はこのメカニズムを解明する目的で検討を行った。

一方、うつ病の国内患者は100万人を超え、社会的に大きな問題となっている。しかし、従来の抗うつ薬では治療効果の得られない患者が約15%存在し、新規抗うつ薬の探索が必要とされている。慢性頭痛などに用いられる漢方薬である釣藤散は、マウスにおいて抗不安作用が報告されている[3]。そこで、抗うつ薬のスクリーニング法である強制水泳試験を用いて、釣藤散が抗うつ様作用を有するかを検討した。さらに、代表的抗うつ薬であるイミプラミンに抵抗性を示すモデル動物についても、釣藤散が抗うつ作用を示すか検討した。

【方法】

(1) 幼若期発症1型糖尿病モデル動物の海馬シナプスに対する釣藤散の作用解明

1. 方法

1-1. 幼若期発症1型糖尿病モデルラット作製方法

生後17日齢の雄性Wistar系ラット(日本SLC)にPBSまたはstreptozotocin (STZ) (85 mg/kg) を腹腔内投与し、前者をControlラット、後者を幼若期発症1型糖尿病モデル(JDM)ラットとし、生後21-28日齢で実験に使用した。動物は、室温 23 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 °Cで8:00~20:00の12時間明暗サイクルで動物室にて飼育し、水および飼料は自由に摂取させた。

1-2. 釣藤散の調製および投与方法

釣藤散(CTZ)は、(株)ツムラから供与されたものを用いた (釣藤散: セッコウ 5.0 g, チョウトウコウ 3.0 g, チンピ 3.0 g, バクモントウ 3.0 g, ハンゲ 3.0 g, ブクリョウ 3.0 g, キクカ 2.0 g, ニンジン 2.0 g, ボウフウ 2.0 g, カンゾウ 1.0 g, ショウキョウ 1.0 g)。これを脱イオン水で1 g/kgになるよう調製し、1 g/kgを1日1回経口投与した。釣藤散投与は21日齢から始め、実験で使用する前日まで投与した。電気生理学的実験は24日齢から28日齢ラットを生化学的実験は28日齢ラットを用いた (Fig. 1)。

1-3. 急性海馬スライス標本の作製

ビブラトーム (DTK-1000, Dosaka, Kyoto) を用い、24-28日齢のラットから海馬スライス標本作製した。

1-4. 細胞外電位記録法

Peristaltic pump (IWAKI)により一定速度 (3 mL/min) でACSFを灌流した記録用チャンバー内に脳スライスを移した。顕微鏡観察下で海馬CA1野の錐体細胞樹状突起層に3-7 M Ω の電極抵抗をもつ記録電極 (Tw150F-9, WPI, FL, USA, ACSF充填)、Shaffer側枝に刺激用タングステン双極電極 (WPI, FL, USA) をマニピュレーターにより刺入した。刺激は1分間に1回の頻度で行い (80 μ sec duration)、誘発される集合興奮性シナプス後電位 : field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) は増幅機 (SEZ-2400, NIHONKOH DEN) で増幅後、フィルター (FLA-01, Cygnus Technology) を通して10 kHz以上の波形を除外し、Power Lab 4/SP (ADI instrument, CA, USA) を介してコンピューター (Power Macintosh G4) に取り込んだ。解析はChart 5 (ADL instrument, CA, USA) により、オフラインでfEPSPの振幅amplitudeを測定した。

1-5. ウェスタンブロッティング法

生後28日齢のJDMラットから海馬をサンプリングし、Western blot法を用いて、AMPA受容体のサブタイプであるGluR1、GluR2、NMDA受容体のサブタイプであるNR1、NR2A、NR2Bの発現量を検出した。

(2) 強制水泳試験法を用いた釣藤散の抗うつ作用の検討

2. 方法

2-1. 実験動物

4-5週齢のddY系雄性マウス(日本SLC)を用いた。イミプラミンに抵抗性を示すモデル動物作製についてはKitamuraら[4,5]の方法に準じ、adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (0.45 mg/kg/day, s.c.) を14日間連続投与した。

2-2. 強制水泳試験法 (FST)

水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の水が高さ7cm入った、直径18cm、高さ50cmの透明なプラスチック製の円筒形シリンダーに、マウスを1匹ずつ15分間泳がせた。この試験を2日間連続で行った。マウスを上記のような逃避不可能な装置に投じると、最初は逃れようと盛んにもがくが、そのうち諦めてじっと浮かんだままの無動状態となるため、2日目の強制水泳開始から最初の6分間の総無動時間を測定し、抑うつ状態の指標とした。イミプラミン(IMI) (15 mg/kg/day) または釣藤散(CTS) (1 g/kg/day) は本試験前日まで6日間連続投与した (Fig. 2)。

【結果・考察】

(1) 幼若期発症1型糖尿病モデル動物の海馬シナプスに対する釣藤散の作用解明

幼若期発症1型糖尿病モデル(JDM)ラットでは、記憶学習の指標とされる海馬神経シナプス可塑性の一つである長期抑圧(LTD)が障害されていたが、釣藤散の慢性投与によりLTDは回復した(Fig. 3)。さらに、生化学的検討により、JDMラットでは海馬においてNMDA受容体のサブユニットの一つであるNR2Bの発現上昇がみられたが、釣藤散の慢性投与によりNR2Bの発現は正常レベルまで低下した (Fig. 4)。

本研究により、釣藤散の慢性投与は、海馬シナプス伝達のみならずシナプス可塑性にも影響を与えることが明らかになった。これは、NR2Bの発現調節によるものと考えられる。我々は、JDMラットのLTD障害はNR2Bアンタゴニスト投与により回復することを報告しており[6]、過剰発現したNR2Bの機能を抑制するためであると推論した。しかし、これまでの研究では動物の週齢を統一しておらず、発現量の変化を捉えることができなかった。本研究で、はじめてJDMの海馬におけるNR2Bの発現増加を明らかにすることができた。

我々の先行研究では、釣藤散を構成する主要な生薬である釣藤鈎の有効成分であるアルカロイド、リンコフィリンには大脳皮質におけるNMDA受容体のサブユニットの一つであるNR2BのmRNA発現を抑制した [7]。さらに別の研究で、リンコフィリンはNMDA受容体を非競合的に阻害する作用があることが報告されている [8]。これらの結果から、釣藤散の慢性投与はNMDA受容体の活性化レベルを抑制し、海馬シナプス伝達のみならずシナプス可塑性にも影響を与えたと考えられる。

本研究課題はJournal of Pharmacological Sciencesに掲載された [9]。

(2) 強制水泳試験法を用いた釣藤散の抗うつ様作用の検討

釣藤散は、通常マウスに対して抗うつ様作用を示した (Fig. 5) が、イミプラミンに抵抗性を示す治療抵抗性モデル動物においては、抗うつ様作用を示さなかった (Fig. 6)。今回用いたACTH投与モデルでは視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系が過活動していると考えられている。今回の結果より、釣藤散はHPA系を介さず抗うつ様作用を有すると考えられる。釣藤散は老化促進モデルマウスの脳内脳由来神経栄養因子(BDNF)の減少を改善する [3]。また、釣藤散の主要生薬を含む抑肝散の投与により、高齢ラットの前頭前皮質のセロトニンおよびドパミン系神経伝達の増強が報告されている [10]。したがって、BDNFの減少の改善またはモノアミン系

神経伝達の増強により抗うつ様作用を示した可能性が考えられる。本研究により、釣藤散が新規抗うつ薬としてうつ治療の選択肢を広げる可能性が示された。

【結論】

本研究では、釣藤散の慢性投与により幼若期発症1型糖尿病モデルラットの海馬神経シナプス可塑性の障害が改善された。さらに、NMDA受容体のサブユニットの一つであるNR2Bの発現変化を改善させたことから、釣藤散はNMDA受容体の発現調節により、認知機能改善効果を示す可能性が考えられ、幼若期発症1型糖尿病モデルラットの治療薬として有効であることが示唆された。さらに、釣藤散は抗うつ様作用も有することが明らかにされた。今後はそのメカニズムを解明したい。

参考論文

- [1] Iwai T, Suzuki M, Kobayashi K, Mori K, Mogi Y, Oka JI. The influences of juvenile diabetes on memory and hippocampal plasticity in rats: improving effects of glucagon-like peptide-1. *Neuroscience Research*. 2009; 64: 67-74.
- [2] Sasaki-Hamada S, Sacai H, Oka JI. Diabetes onset influences hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-treated rats. *Neuroscience*. 2012;227: 293-304.
- [3] Zhao Q., Yokozawa T., Tsuneyama T., Tanaka K., Miyata T., Shibahara N., Matsumoto K. Chotosan-induced improvement of cognitive deficits in senescence-accelerated mouse (SAMP8) involves normalization of angiogenic/neurotrophic factors and neuroplasticity systems in the brain. *Chinese Medicine* 2011; 6: 33.
- [4] Kitamura Y, Araki H, Gomita Y. Influence of ACTH on the effects of imipramine desipramine and lithium on duration of immobility of rats in the forced swim test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002; 71: 63-69.
- [5] Kitamura Y, Yagi T, Kitagawa K, Shinomiya K, Kawasaki H, Asanuma M, Gomita Y. Effects of bupropion on the forced swim test and release of dopamine in the nucleus accumbens in ACTH-treated rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2010; 382: 151-158.
- [6] Sacai H, Sasaki-Hamada S, Sugiyama A, Saitoh A, Mori K, Yamada M, Oka JI: The impairment in spatial learning and hippocampal LTD induced through the PKA pathway in juvenile-onset diabetes rats are rescued by modulating NMDA receptor function. *Neuroscience Research*. 2014; in press.
- [7] Zhou JY, Mo ZX, Zhou SW. Rhynchophylline down-regulates NR2B expression in cortex and hippocampal CA1 area of amphetamine-induced conditioned place preference rat. *Archives of pharmacal research*. 2010; 33: 557-565.
- [8] Kang TH, Murakami Y, Matsumoto K, Takayama H, Kitajima M, Aimi N, Watanabe H. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 455: 27-34.
- [9] Sasaki-Hamada S, Tamaki K, Otsuka H, Ueno T, Sacai H, Niu Y, Matsumoto K, Oka JI: Chotosan, a Kampo formula, ameliorates hippocampal LTD and cognitive deficits in juvenile-onset diabetes rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2014; 124, 192-200.
- [10] Mizoguchi K, Tanaka T, Tabira T. Anxiolytic effect of a herbal medicine, *yokukansan*, in aged rats: Involvement of serotonergic and dopaminergic transmissions in the prefrontal cortex. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127, 70-76.

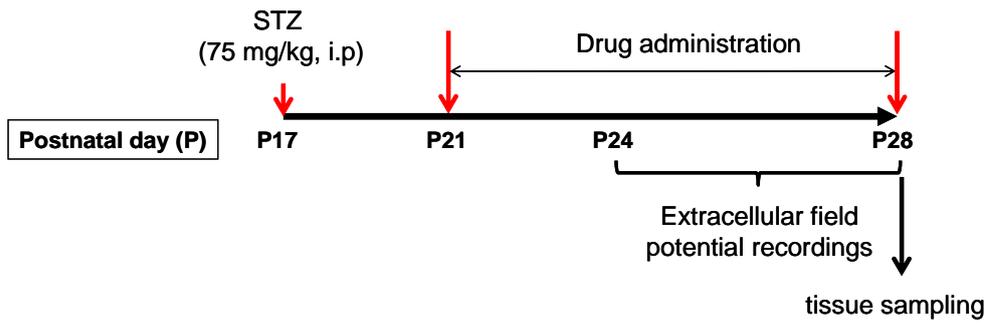


Fig. 1. Schematic drawing of experimental schedule

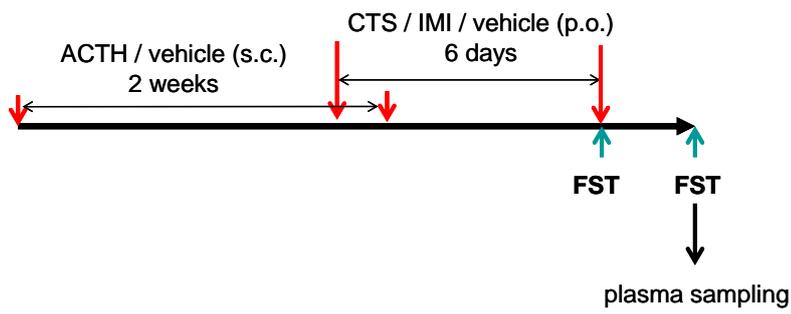


Fig. 2. Schematic drawing of experimental schedule

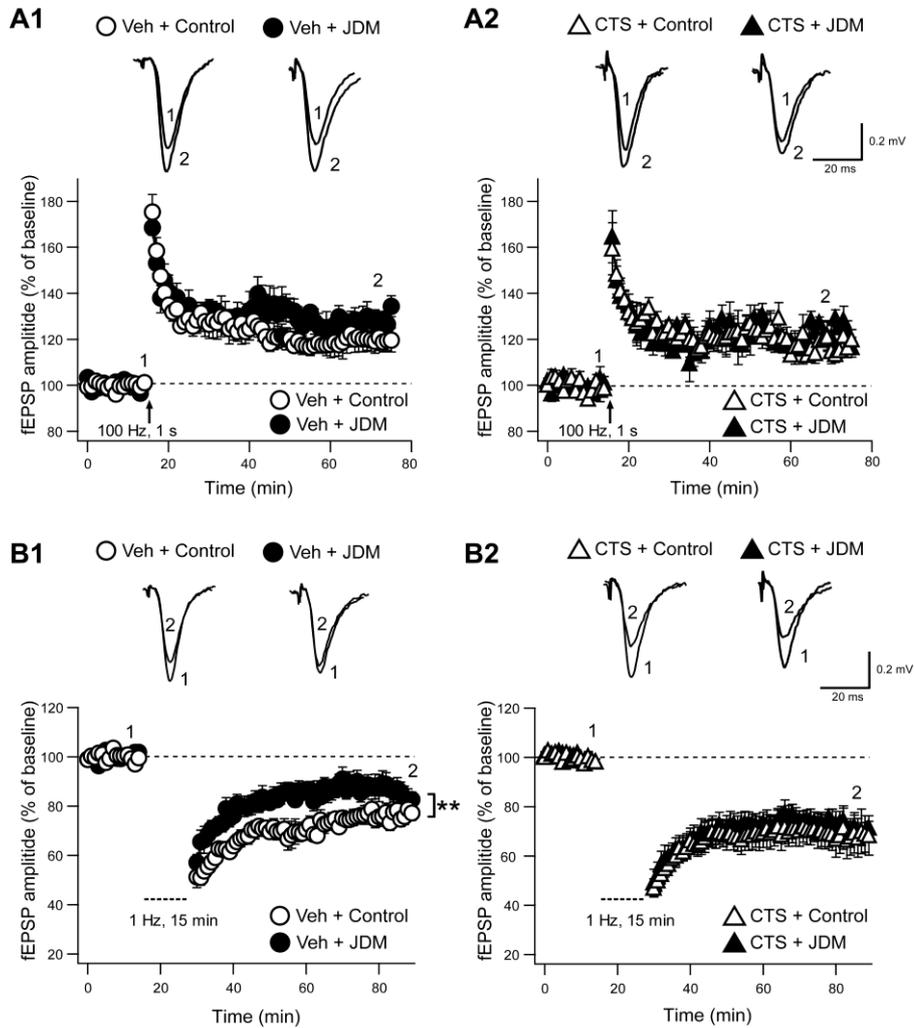


Fig. 3. Effect of CTZ on LTP and LTD. Each data represents the mean \pm S.E.M. ($n = 5 - 9$). $**P < 0.01$, ns; non-significant, two-way repeated measures ANOVA.

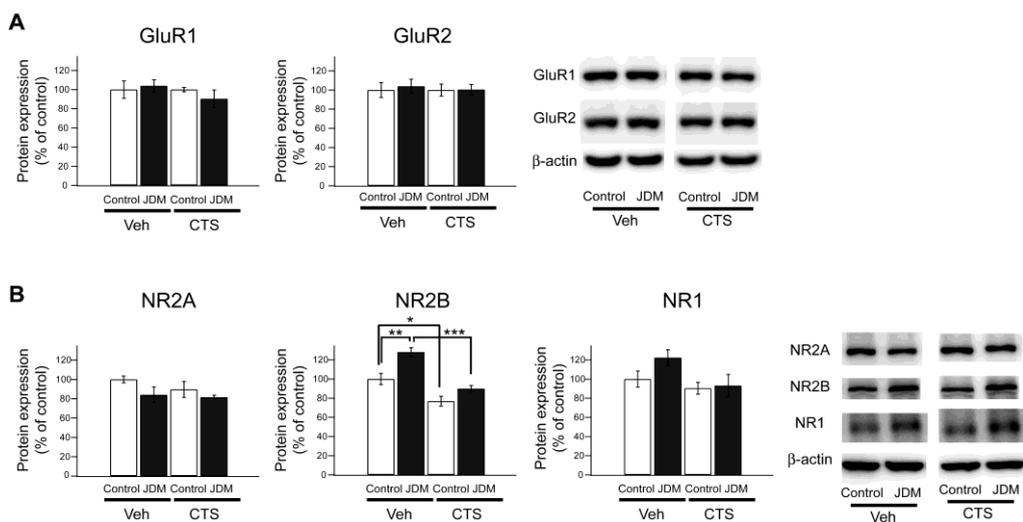


Fig. 4. Effect of CTZ on the expression of AMPA and NMDA receptor subunits. Each data represents the mean \pm S.E.M. ($n = 6$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ns; non-significant, Bonferroni-adjusted post hoc test.

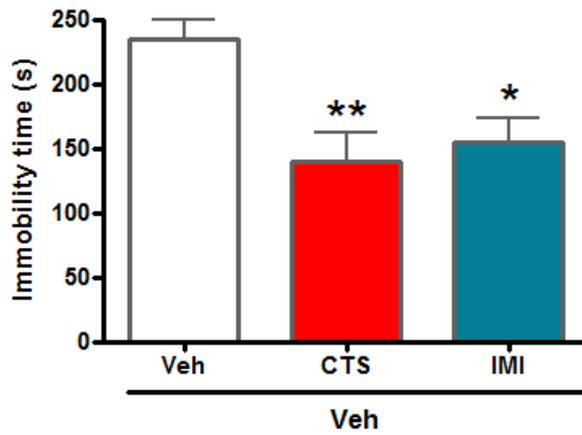


Fig. 5. Effect of CTZ on immobility time in the FST in ddy mice. Each data represents the mean \pm S.E.M. (n = 6). *P<0.005, **P<0.01, ns; non-significant, Dunnett's multiple comparison test.

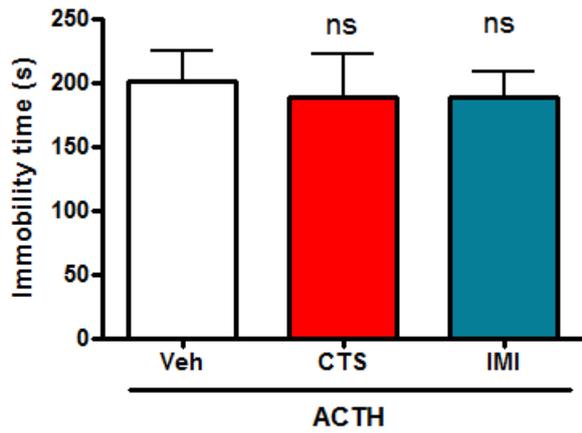


Fig. 6. Effect of CTZ on immobility time in the FST in ACTH-treated mice. Each data represents the mean \pm S.E.M. (n = 6). ns; non-significant, Dunnett's multiple comparison test.