

グリア系細胞の機能調節による新規脳機能改善薬の探索 (Sickness 症候群を改善する薬物の探索)

(申請代表者)	矢部武士	摂南大学薬学部	教授
(共同研究者)	荒木良太	摂南大学薬学部	助教

【背景・目的】

グリア細胞は脳の支持細胞に過ぎないものと考えられていた時代もあったが、近年の神経科学の進歩により、従来考えられてきた以上に脳機能の維持・調節に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。また様々な脳・精神疾患においてグリア細胞の異常が見いだされており、病態との関連性が指摘されている。本研究では和漢薬などの植物素材よりグリア細胞の機能調節を可能とする化合物を探索し、新規医薬品としての応用を目指すとともに、漢方薬の薬効との関連性を探ることを目的とする。当初の計画では、アストロサイト、マイクログリア、オリゴデンドロサイトなどの培養を行い、富山大学より提供された生薬エキス、生薬由来成分を作用させ、以下のスクリーニング系により候補化合物の探索を行うことを目標としていた。

①マイクログリアによる炎症惹起因子の産生を制御する化合物の探索 ②アストロサイトによるグルタミン酸取り込み能を制御する薬物の探索 ③色素上皮由来因子(Pigment epithelium-derived factor; PEDF)の産生を制御する化合物の探索 ④オリゴデンドロサイトの生存を促進する化合物の探索

しかしながら、エキス量や実験体制の問題などから本年は①および②のプロジェクトの解析のみにとどまった。①のプロジェクトについて主に報告する。

一般に感染症や炎症時に食欲の低下、体重の減少、疲労感、抑うつ気分などの生理的、精神的な変化が生じるが、これらの一連の症状はsickness behaviorと呼ばれている。Sickness behaviorは、病原体に対する自然免疫を介した宿主側の正常な反応であるが、がん患者の悪液質や慢性疲労症候群においても同様の症状が観察される。しかしながらsickness behaviorに対する認知レベルは低く、多くの場合見過ごされてきたため、治療法、治療薬の開発も立ち遅れてきたのが実状であり、近年、その克服が急務とされている。本研究ではsickness behaviorの治療に有効な薬物を見出すために、マウス脳マイクログリア由来の細胞株であるBV-2細胞を用いてLPSによる炎症反応を抑制する和漢薬由来化合物の探索を行った。また活性の認められた植物由来化合物については、LPS投与動物を用いて行動薬理学試験、免疫組織化学的解析、炎症関連遺伝子発現量の解析を行いその薬効を評価した。

【結果】

(1) BV2細胞を用いた炎症抑制作用を有する生薬エキス、化合物の探索

96穴のマイクロプレートに播種したBV-2細胞に生薬エキス($\mu\text{g/ml}$)、あるいは生薬由来化合物 (10 or 20 μM)の濃度で作用させ、その30分後にLPS(final 0.1 $\mu\text{g/ml}$)を培地に添加した。LPS添加の24時間後に培養上清を回収し、NOの代謝産物でありNO産生量の指標となるNO₂-量をグリース試薬を用いて測定した。その結果、比較的多くの生薬エキス、生薬由来化合物に有意なNO産生軽減作用が認められたが、再現性の確認や細胞毒性の有無による2次スクリーニングなどの結果から、解析対象化合物を絞り、本年は山梔子の主要成分のひとつであるゲニピンに焦点を絞って検討を行った(Fig. 1および2)。

(2) LPSによる炎症関連遺伝子mRNA誘導に及ぼす genipinの作用

genipin (50 μM)を作用させたBV-2細胞にLPS(final 0.1 $\mu\text{g/ml}$)を添加し、6時間後の炎症関連因子mRNA発現量をRT-PCR法により解析した。genipin処置した細胞では、LPSによるiNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6の誘導は有意に抑制された。(Fig. 3)

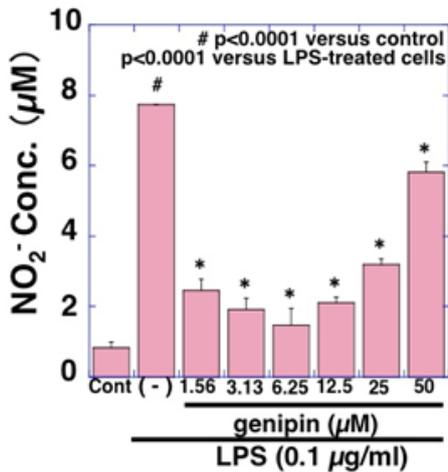


Fig.1 LPSによるNO産生誘導に対するgenipinの作用

genipin存在下では、LPSによるNO産生誘導は有意に抑制された。genipinは培養下で代謝され青色の色素に変化するため、50 µMの濃度では見かけ上、高い数値を示した。

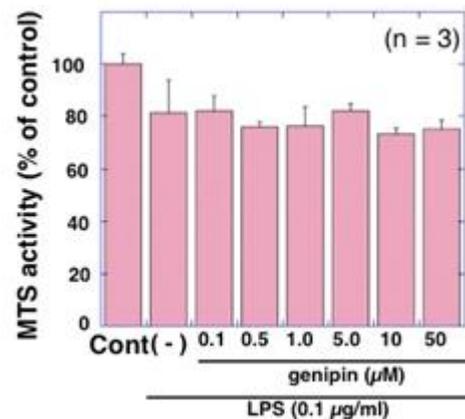


Fig. 2 genipinの細胞毒性の評価
genipinによるNO産生阻害に細胞毒性が関与するか否かを明らかとするために、MTS法を用いて評価を行った。genipinはいずれの濃度においても細胞の生存に影響を及ぼさなかった。

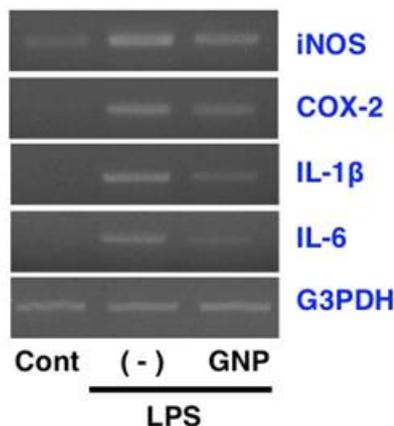
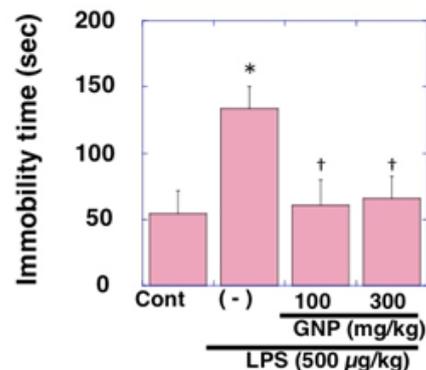


Fig. 3 LPSによる炎症関連遺伝子の誘導に対するgenipinの作用

genipinを作用させたBV-2細胞では、炎症関連遺伝子の誘導は抑制された。

(3) LPS誘発うつ様行動に対するgenipinの作用

LPS(500 µg/kg)投与24時間後に観察されるうつ様行動に対するgenipinの効果について強制水泳試験法を用いて検討を行った。genipinは、LPS投与の1時間前に100 mg/kg、あるいは300 mg/kgの用量で経口投与した。LPS投与群においては、強制水泳試験における無動時間の延長が観察されたが、ゲニピンの投与はこれを強く抑制した。(Fig. 4)



*p < 0.05 vs. CMC/saline-treated mice.
†p < 0.05 vs. CMC/LPS-treated mice.

Fig. 4 LPS誘発うつ様行動に及ぼすgenipinの作用
LPS誘発うつ様行動に対する

(4) LPSによる社会性行動障害に対するgenipinの作用

LPS(500 µg/kg)投与24時間後に観察される社会性行動異常(マウス2個体間での匂い嗅ぎ行動、毛づくろい行動、攻撃行動の減少)に対するgenipinの効果について検討を行った。genipinは、LPS投与の1時間前に100

mg/kg、あるいは300 mg/kgの用量で経口投与した。100 mg/kgの用量でのゲニピンの経口投与により、LPSによる社会性行動異常は有意に改善された。一方、高濃度(300 mg/kg)のゲニピンを投与した群では、有意な差は認められなかった。(Fig. 5)

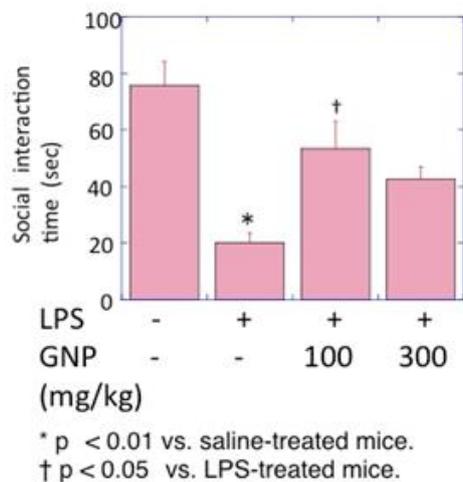


Fig. 5 LPS誘発社会性行動異常に及ぼすgenipinの効果
LPS投与により出現する社会性行動異常(匂い嗅ぎ行動、毛づくろい、攻撃回数などの減少)はゲニピンの経口投与により有意に減少した。

(5) LPSによるc-fos発現誘導に対するgenipinの作用

LPS投与後の動物脳の特定期域において神経活動の指標となるc-fosの持続的な発現増強が観察されることが報告されており、sickness behaviorとの関連性が示唆されている。LPS(500 μg/kg)の腹腔内投与の24時間後に能を摘出し、免疫組織化学的手法によって、線条体中心核、視床下部室傍核、延髄孤束核におけるc-fos陽性細胞数を検討した。LPS投与後のマウスの線条体中心核、視床下部室傍核においてc-fos陽性細胞の増加が観察され、これらの領域では持続的な神経活動の活性化が生じていることが示唆された。一方、genipin(100 mg/kg)を経口投与した動物では、LPSによるc-fos陽性細胞の増加は観察されなかった。また延髄孤束核におけるc-fos発現細胞数は、LPSやgenipinの投与により影響を受けなかった。(Fig.6)

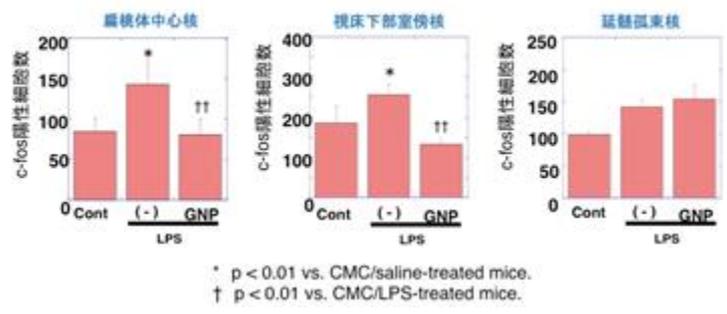


Fig. 6 LPSによるc-fos発現誘導に及ぼすgenipinの作用
扁桃体中心核、視床下部室傍核、延髄孤束核におけるc-fos陽性細胞数を免疫組織化学的解析により評価した。LPS投与24時間後において扁桃体中心核、視床下部室傍核において持続的なc-fos発現誘導が観察されたが、genipinの投与はこれを抑制した。一方、延髄孤束核では変化は認められなかった。

(6) LPSによる炎症性サイトカインの誘導に対するgenipinの作用

c-fos陽性細胞数の検討で変化の認められた線条体中心核、および視床下部室傍核における炎症関連因子 mRNA発現量についてReal time-PCR法を用いて検討を行った。Fig. 8に示すようにiNOS, IL-1 β , COX-2, IL-6などのmRNA発現量はLPS投与2時間後で増加していたが、その増加はgenipinの投与により有意に抑制された。(Fig.7)



Fig. 7 LPS投与2時間後の脳内炎症関連因子の発現量に対するgenipinの作用
扁桃体、および視床下部における炎症関連因子のmRNA発現量をReal time
PCRにより解析した。genipin(100 mg/kg)の投与は、LPSによるiNOS, COX-2,
IL-1 β , IL-6の誘導を有意に抑制した。

【考察】

本研究ではsickness behaviorの治療に有効な薬物を見いだすことを目的にマウスマイクログリア由来細胞株 BV-2細胞を用いて、LPSによるiNOS誘導に対する抑制作用を指標に和漢薬エキス、および和漢薬由来化合物の探索を行った。その結果、強いNO産生抑制作用を有し、かつ細胞毒性の少ない化合物としてgenipinを見いだした。genipinは山梔子に含まれるイリド系化合物であり、胆汁分泌促進作用、異運動亢進抑制作用、血清脂質低下作用、鎮痛作用などが報告されている。また抗炎症作用についても既に報告されているが、マクロファージやマイクログリアを用いた培養細胞を用いた解析が中心であり、in vivoでの効果に関しては検討の試み自体が少ないのが実状である。そこで本研究では、genipinのin vivoでの作用を評価することを目的として、LPS投与動物を用いて行動薬理的解析を行った。その結果、うつ様行動や社会行動異常をゲニピンの経口投与が改善することを明らかとした。また活性化したニューロンで発現することから、神経活動の指標とされるc-fosを指標に検討を行ったところ、情動行動に関連が深い扁桃体や視床下部において、LPS投与により増加したc-fos陽性細胞数が、genipin投与により抑制されることが明らかとなった。これらの領域では、LPS投与後に炎症関連遺伝子群 (iNOS, IL-1 β , IL-6, COX-2) の発現増強が観察されたが、ゲニピン投与群では有意に抑制されており、genipinは脳内炎症反応を抑制することにより、sickness behaviorを改善する可能性が示唆された。LPS投与後の

動物の延髄孤束核において抹消神経からの求心性の刺激によりc-fos発現細胞が増加するとの報告があるが、本検討では、LPS投与、genipin投与のいずれも発現細胞数に影響を及ぼさなかったことから、末梢神経を介したメカニズムはgenipinによる改善作用に関係しないものと推定された。

以上の結果から山梔子の主要成分の一つであるgenipinが脳内炎症反応を抑制することにより、sickness behaviorを改善する可能性が示唆された。本研究結果は、sickness behaviorに対する治療薬としてのgenipinの可能性を示唆するとともに、加味帰脾湯、黄連解毒湯、加味逍遙散など山梔子を構成生薬とする漢方処方薬の薬効や作用メカニズムを理解する上での一助となる。