

脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現誘導能に基づいた脳機能改善効果を有する 生薬・和漢薬のスクリーニングおよびその作用機序の解明

申請代表者 福地 守 富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）
所内共同研究者 柴原 直利 漢方診断学分野

助教
教授

【報告セミナー要旨】

【要旨】

神経栄養因子ファミリーの一員である脳由来神経栄養因子（Brain-derived neurotrophic factor: BDNF）は、記憶や学習に代表される高次脳機能発現において根幹的な役割を果たす重要な因子である。また、うつ病やアルツハイマー病などの精神疾患や神経変性疾患において、BDNF発現レベルの低下が認められる。したがって、BDNFはこれら疾患のバイオマーカーおよび創薬ターゲットとなることが期待されている。我々は最近、ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼを利用することで BDNF 遺伝子発現変化を計測可能なトランスジェニックマウス（BDNF-Luc Tgマウス）を用いて、培養神経細胞において BDNF 遺伝子発現を誘導する薬剤などがルシフェラーゼ活性を指標に検索可能なスクリーニング系を構築した。本研究では、このスクリーニング系を用いて、神経細胞において BDNF 遺伝子発現誘導活性を持ち、将来的に神経・精神疾患により低下した脳機能を改善する可能性のある生薬エキスの探索を行った。120種類の生薬エキスを BDNF-Luc Tgマウス由来大脳皮質神経細胞初代培養系に添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、エキス添加6時間後において、人参を含む5種類の生薬エキスが BDNF 遺伝子発現誘導活性を持つことが明らかとなった。興味深いことに、エキス添加24時間後では9種類の生薬エキスに、48時間後では16種類の生薬エキスに BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められ、BDNF 遺伝子発現を誘導する生薬の種類が時間依存的に増加した。いずれかの時間において BDNF 遺伝子発現を誘導した生薬エキスは18種類存在した。この18種類の生薬のいくつかを取り上げ解析した結果、これら生薬エキスは培養大脳皮質神経細胞において内在性 BDNF mRNA 発現を増加させた。さらに、これら生薬エキスは、記憶・学習に関わる転写制御因子 cAMP-response element (CRE) -binding protein (CREB) のリン酸化および CREB のコアクチベーター CREB-regulated transcription coactivator 1 (CRTC1) の核移行を促進し、CRE 依存的に BDNF 遺伝子プロモーターを活性化することが明らかとなった。したがって、これら生薬エキスには BDNF 遺伝子転写を活性化する活性成分が含まれることが示唆された。現在、マウスにこれら生薬エキスを長期的に投与し、記憶などの脳機能に与える影響を解析中であり、わずかであるがこれら生薬エキスが脳機能を高める可能性を示す予備的な結果を得ている。以上の結果は、培養神経細胞における BDNF 遺伝子発現誘導活性を指標とした脳機能改善効果を有する生薬探索の可能性を示すものであり、今後、脳機能に与える影響について詳細に解析する必要がある。

■背景・目的

近年、我が国ではうつ病などの精神疾患やアルツハイマー型認知症などの神経変性疾患の急増が問題視されている。このような背景から、以前より重点的に対策に取り組むべき四大疾病（がん、脳卒中、心筋梗塞、糖尿病）に精神疾患が加えられ、五大疾病と呼ばれるようになった。脳・神経系の疾患による脳機能の低下は、患者自身の生活の質の重大な低下を招くだけでなく、看病・介護に関わる家族などの周辺の人々の生活にも大きな影響を与える。したがって、これら疾患による脳機能の低下の改善や予防といった観点からの創薬研究は、我々の精神衛生・社会福祉を考える上で重要な取り組みであると考えられる。

脳・神経系の疾患の創薬ターゲットの中心は、神経伝達物質の放出や分解、受容体機能の調節、などといった神経伝達物質受容体活性に関わる分子である。例えば、アルツハイマー型認知症の治療薬として用いられるドネペジル（商品名：アリセプト（エーザイ））は、神経伝達物質の1つであるアセチルコリンの分解を抑制することで、その薬効を発揮する。また、パロキセチン（商品名：パキシル（グラクソ・スミスクライン））は、シナプス間隙のセロトニン量を増加させることで抗うつ効果を発揮する。そのため、脳・神経系の創薬における初期段階の化合物スクリーニングでは、神経伝達物質受容体の機能変化（受容体活性化によるcAMPなどのセカンドメッセンジャーの量的変化など）を指標とした方法が用いられ、優れたスクリーニング方法が多く開発されている。一方で、このような手法により得られたヒット化合物が、実際に治療薬の候補となりうる確率が極めて低いことも事実である。

ところで、脳由来神経栄養因子（BDNF：Brain-derived neurotrophic factor）は、記憶や学習に代表される高次脳機能発現において根幹的な役割を果たす神経栄養因子の1つである。BDNFは、脳・神経系において多彩な生理機能発現に関わることから、うつ病やアルツハイマー病などを含む様々な脳・神経系の疾患において、BDNF発現の低下が認められることが報告されている。また、BDNF発現を増加させる薬剤やBDNF特異的受容体を活性化させる化合物が、うつ病などの精神疾患により低下した脳機能を改善する可能性を示す結果が報告されている。以上より、BDNFは脳・神経系の疾患のバイオマーカーや創薬ターゲットとして着目されている。そこで我々は、神経細胞においてBDNF遺伝子発現を活性化することでBDNFの量を増加させる薬剤が、脳・神経系の疾患の治療薬の候補となりうるのではないかと考えた。本研究では、特に生薬に代表される伝統医薬品に着目し、神経細胞においてBDNF遺伝子発現を活性化させる生薬が脳機能に与える影響について解析を行った。

■結果・考察

(1) BDNF 遺伝子発現誘導活性を有する生薬エキスの探索

これまで、神経細胞においてBDNF遺伝子発現を活性化させる薬剤などを迅速・簡便に探索可能な多検体スクリーニングは存在しなかった。一方、我々は、ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼを利用してBDNF遺伝子発現変化を計測可能なトランスジェニックマウス「BDNF-Lucマウス」を作成した。このBDNF-Lucマウスでは、BDNF遺伝子発現変化に伴いルシフェラーゼ発現が変化する。ルシフェラーゼの量的な変化は、基質であるルシフェリンと反応させることで得られる発光強度を計測することで簡便に評価可能である。最近、我々は、このBDNF-Lucマウス由来大脳皮質ニューロン初代培養系を用いることで、BDNF遺伝子発現誘導活性を有する薬剤などを探索可能な多検体ス

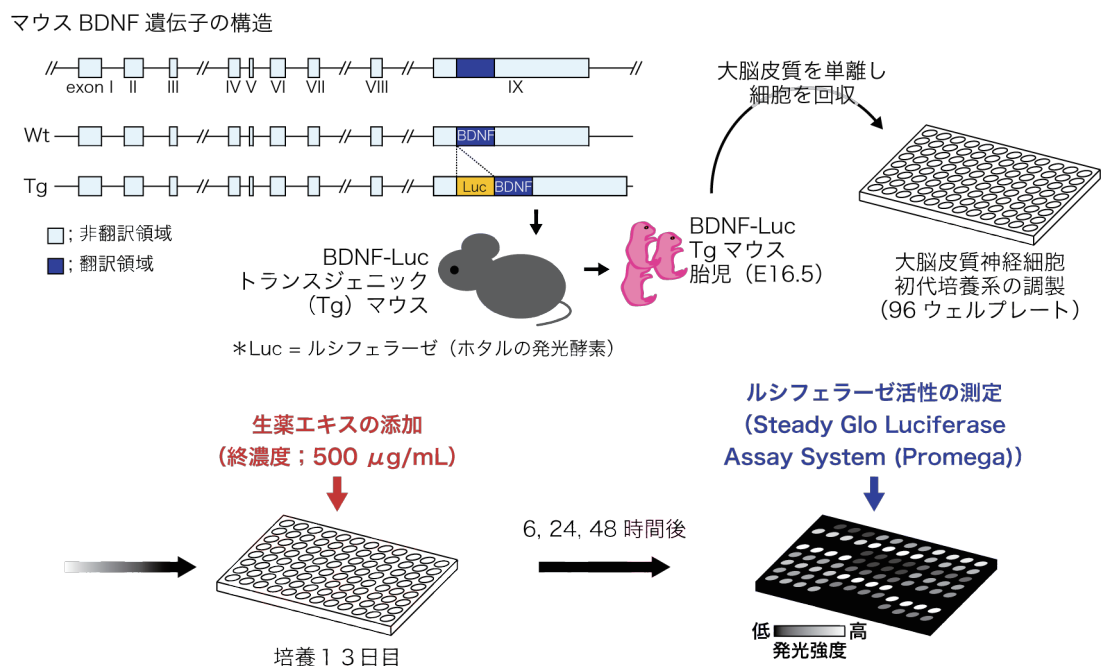


図1 BDNF-Luc マウス由来大脳皮質ニューロン初代培養系を用いたBDNF 遺伝子発現誘導活性を有する生薬エキスの多検体スクリーニング法

表1 BDNF 遺伝子発現誘導活性を有する生薬エキス；ルシフェラーゼ活性に基づいた多検体スクリーニングの結果

生薬名	6 時間後	24 時間後	48 時間後
生干人参	2.78	13.75	9.91
甘草	0.92	1.54	2.07
縮砂	0.79	2.66	3.95
人参	3.60	5.46	5.68
竹節人参	1.14	1.84	2.12
何首烏	0.77	4.29	17.65
三七人参	1.50	6.03	6.41
黄耆	1.26	1.35	2.13
葛根	1.12	1.34	2.33
生薬名	6 時間後	24 時間後	48 時間後
山椒	2.65	18.74	14.41
赤芍	0.75	1.78	12.02
大黄	1.04	3.32	5.36
釣藤鈎	0.81	3.32	21.29
苦参	1.28	1.34	2.48
炮附子	3.22	0.98	0.74
麻黄	0.99	1.20	5.49
防已	4.55	1.33	1.02
良姜	0.89	5.71	14.66

スクリーニング法を構築した (図1)。本研究では、この多検体スクリーニング法を利用して、BDNF 遺伝子発現を活性化させる生薬を探索した。和漢医薬学総合研究所が所有する120種類の生薬エキスライブラリーを用いて解析を行った結果、生薬エキス添加6時間後では5種類の生薬エキスに活性が認められた (ルシフェラーゼ活性が2倍以上に増加した場合に「活性あり」とした)。興味深いことに、生薬エキス添加24時間後には9種類、48時間後には16種類の生薬エキスに活性が認められ、時間経過に依存して活性を有する生薬の種類が増加することが明らかとなった。また、いずれかの時間において活性を示した生薬エキスは全部で18種類存在した (表1)。

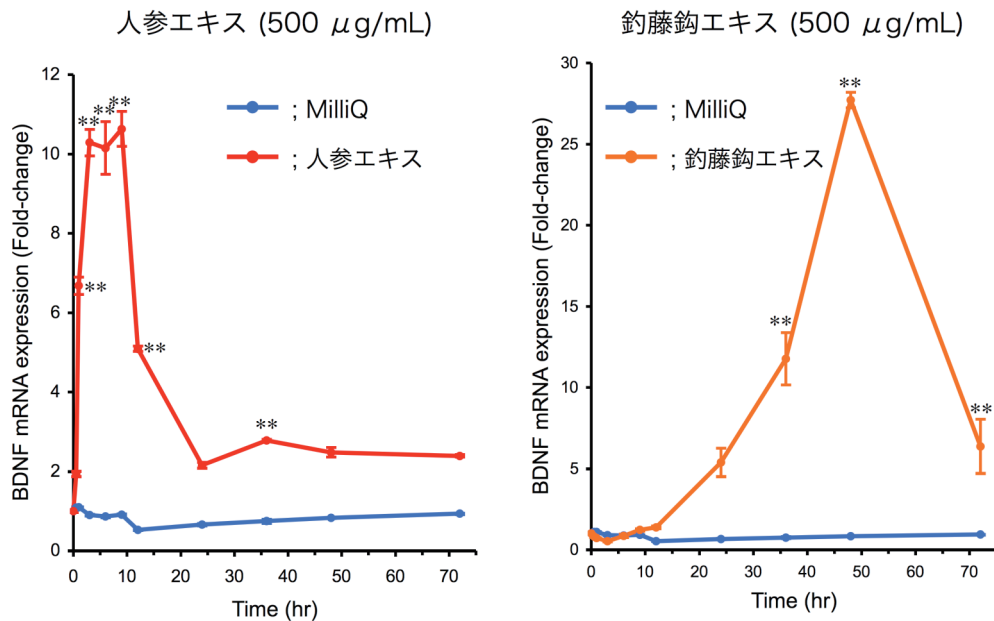


図2 ラット大脳皮質ニューロン初代培養系における人参・釣藤鈎エキス添加後のBDNF mRNA発現の経時的変化

この18種類の生薬エキスの中から、エキス添加6時間後に活性が認められた人参、また24時間以降から活性が上昇し48時間後に活性がピークとなった釣藤鈎の2つの生薬エキスを選び、詳細な解析を行った。はじめに、人参および釣藤鈎エキスが実際に内在性BDNF遺伝子発現を活性化させるか検討した。その結果、ラット大脳皮質ニューロン初代培養系において、人参エキスは添加3時間後から9時間後に内在性BDNF mRNAを有意に増加させた。また、釣藤鈎エキス添加12時間後まではBDNF mRNA発現に変化が認められなかったが、24時間後からBDNF mRNAの増加が認められ、48時間後に増加がピークとなることが明らかとなった(図2)。この結果は、ルシフェラーゼ活性に基づいた多検体スクリーニングの結果を反映するものであり、本スクリーニング法の有効性を示すものでもあった。さらに、これらエキス添加後のBDNF遺伝子プロモーター活性の変化をレポーターアッセイにより検討した結果、これらエキスはCRE(cAMP応答配列)を介してBDNF遺伝子の転写活性化を引き起こすことが明らかとなった。このCREには、記憶に関わる転写制御因子として有名なCREB(CRE-binding protein)が結合する。CREBによる標的遺伝子の転写活性化は、CREBのリン酸化やコアクチベーターCRTC1(CREB-regulated transcription coactivator 1)の核移行依存的に起こることが知られている。そこで、人参または釣藤鈎エキス添加後のCREBのリン酸化状況およびCRTC1の細胞内局在を免疫染色法により解析した。その結果、これらエキスの添加後、CREBのリン酸化およびCRTC1の核移行が顕著に亢進することが明らかとなった。以上より、人参および釣藤鈎エキスは、転写制御因子CREB依存的な転写活性化を介してBDNF遺伝子発現を活性化することが明らかとなった。また、人参および釣藤鈎エキスによるBDNF mRNA発現誘導は、CaM kinaseやMAP kinase、カルシニューリンの阻害剤により抑制され、特にCaM kinaseの阻害剤が強力に発現誘導を抑制した。さらに、これらエキスによるBDNF mRNA発現誘導は、L型電位依存性カルシウムチャンネルやNMDA型グルタミン酸受容体の活性を阻害することで抑制された。以上より、人参および釣藤鈎エキスは、これらチャンネルや受容体活性化によるカルシウムシグナリング、

特にCaM kinaseを介したシグナリングを活性化することでCREB依存的にBDNF遺伝子転写を活性化することが示唆された。しかし、人参および釣藤鈎エキスがどのようにこれらシグナリングを活性化するのかについては、今後の検討課題である。

(2) 人参および釣藤鈎エキスがマウスの脳機能に与える影響

次に、神経細胞においてBDNF遺伝子発現を活性化させた人参および釣藤鈎エキスが脳機能に与える効果について解析するため、マウスを用いた行動解析を行った。本研究では、促進老化・短寿命を示すマウス系統であり、早期に学習・記憶障害を呈するSAMP8、および通常老化を示すコントロールマウスであるSAMR1の2つの系統を用いて解析を行った。以前の報告により、SAMP8は4ヶ月齢以降の早い段階で文脈性恐怖記憶が低下することが示されていたため、本研究では、文脈性恐怖条件付け試験を行動解析に用いた。文脈性恐怖条件付け試験では、マウスを新規環境であるチャンバーに置き、一定時間後に床から電気ショックを与える（条件付けをする）ことで、場所と恐怖を連合して形成される記憶である。マウスの記憶学習の程度は、条件付けの翌日に同一チャンバーにマウスを置くことで観察されるすくみ反応の程度により評価可能である（条件付けにより記憶が形成された場合、マウスのすくみ反応は亢進する）。今回は、SAMR1およびSAMP8を用いて、9週齢から人参または釣藤鈎エキスの投与（それぞれのエキスは給水ビンに添加し、マウスの一日当たりの水の消費量約5mLから投与量を算出し、200mg/kgとなるようにエキスを調製した）を開始し、20週齢において文脈性恐怖条件付け試験を行った。しかし、SAMP8は攻撃性が高く、実験を開始して1週間後には同一ケージ内のマウスが怪我を負う様子が確認された。そのため、このまま実験を継続させることは不適切であり、実験系の条件検討が必要であると判断したため、SAMP8を用いた解析は中止した（一方で興味深いことに、このように怪我を負ったマウスは、人参エキスを与えたSAMP8では全く確認されなかった。したがって、人参エキスはSAMP8の高い攻撃性を緩和している可能性が考えられた。そのため、これについては今後別途解析が必要である。）。SAMR1に人参または釣藤鈎エキスを長期的に投与し、文脈性恐怖条件付けを行った。その後、マウスのすくみ反応を測定したが、水のみを与えたSAMR1ではすくみ反応にほとんど変化が認められなかった。それに対し、人参または釣藤鈎エキスを投与したSAMR1では、条件付けによりすくみ反応がわずかに増加する傾向が得られた。したがって、人参および釣藤鈎エキスがSAMR1の記憶をわずかに高める可能性が考えられた。

■結論

本研究により、神経細胞においてBDNF遺伝子発現を活性化させる生薬エキスを初めて網羅的に探索し、120種類の生薬エキスのうち18種類にBDNF遺伝子発現誘導活性が認められることが示された。この18種類の中から人参および釣藤鈎エキスを選び詳細に解析した結果、これらエキスは、転写制御因子CREB依存的な転写活性化を介して内在性BDNF遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。また、人参エキスがSAMP8の高い攻撃性を緩和する可能性、さらに人参や釣藤鈎エキスの長期投与によりSAMR1の記憶がわずかではあるが亢進する可能性を示す予備的な結果が得られた。これらの結果は、①ルシフェラーゼ活性を指標として神経細胞におけるBDNF遺伝子発現を活性化させる生薬などの伝統医薬品が簡単に探索可能であること、②神経細胞においてBDNF遺伝子発現を活性化させる生薬がマウスの脳機能を改善する可能性があること、などを示すものであり、BDNF遺伝子発現誘導活性を指標とした脳機能改善効果を有する伝統医薬品探索の可能性を示すものとなった。今後は、認知症などの脳・神経系の疾患により低下した脳機能に対する人参や釣藤鈎エ

キスの効果を検討する必要がある。また、これらエキスに脳機能改善効果が認められた場合には、その効果がBDNF遺伝子発現誘導活性により発揮されるものなのか、などについても解析を進めることで、BDNF遺伝子発現誘導活性を指標とした脳機能改善効果を有する伝統医薬品探索の有効性を示すことと結びつくと思われる。