

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)分子神経生物学 (現 高崎健康福祉大学薬学部)	助教(現 准教授)
所内共同研究者	柴原 直利	臨床科学部門漢方診断学分野	教授
所内共同研究者	小松かつ子	資源開発部門生薬資源科学分野	教授
所内共同研究者	當銘 一文	資源開発部門生薬資源科学分野	准教授

■背景および目的

近年わが国では、複雑な社会環境などの影響によるうつ病の増加や、高齢化社会に伴う認知症患者の増加など、脳・神経系の疾患の増加が問題視されている。これら疾患による脳機能の低下は、患者本人の生活の質の重大な低下を招き、また周辺の家族などへの生活にも多大な影響を与える。そのため、これら疾患による脳機能の低下を改善または予防する取り組みは、わが国の精神衛生や社会福祉を考える上で急務であると言える。

現在の脳・神経系の疾患の治療薬のターゲットの中心は、神経伝達物質およびその受容体である。例えば、アルツハイマー型認知症の治療薬として以前より用いられているドネペジル（商品名：アリセプト）は、神経伝達物質の一つであるアセチルコリンの分解を阻害することでその薬効を発揮する。また、うつ病の治療薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬 SSRI は、セロトニンのシナプス終末への再取り込みを阻害することでシナプス間隙のセロトニン量を増加させる。そのため、脳・神経系の疾患の治療薬の候補を絞り込む初期の一次スクリーニングでは、神経伝達物質受容体の活性化による cAMP や Ca²⁺ などのセカンドメッセンジャー量の変化を指標とした評価系がよく用いられる。この方法は、迅速・簡便にスクリーニングを進めることが可能である一方、この方法により得られたヒット化合物が実際に薬効を発揮し、治療薬の候補となる確率が極めて低いのも事実である。そのため、脳・神経系の疾患の治療薬開発のための新たなターゲット分子の同定が求められている。

以前より我々は、神経細胞における脳由来神経栄養因子 BDNF の発現制御機構に関する基礎研究を進めている。BDNF は、1982 年にブタの脳より同定された神経栄養因子であり、記憶・学習などの高次脳機能発現に重要なだけでなく、様々な精神疾患や神経変性疾患において BDNF 発現が低下

することが報告されている。したがって、BDNF はこのような疾患のバイオマーカー、さらには創薬ターゲットとなりうることが期待されている。最近我々は、ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼを利用して BDNF 遺伝子発現変化を可視化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。さらに、この BDNF-Luc マウス由来の脳皮質神経細胞初代培養系を利用して、BDNF 遺伝子発現を活性化する薬剤を探索するスクリーニング法を確立した(図1)。こ

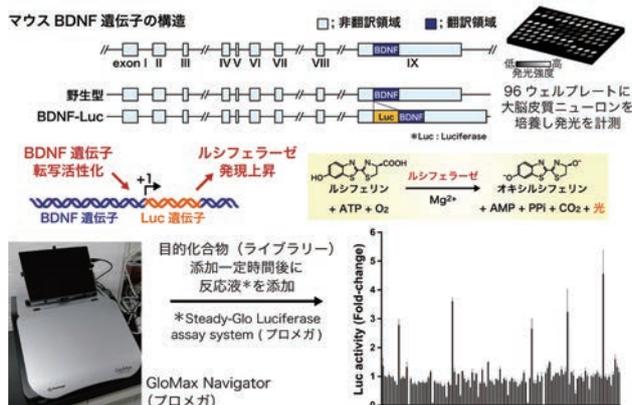


図1 BDNF 遺伝子発現誘導剤の探索法

の方法により得られたヒット化合物は、BDNF 量を増加させ、BDNF の持つ強力な神経栄養因子作用を介して、脳・神経系の疾患により低下した脳の機能性を改善することが期待されるため、我々は、この方法を用いて BDNF 遺伝子発現活性化剤を同定し、脳・神経系の疾患の治療薬シーズとなりうる薬剤探索を進めている。

本研究では、特に生薬や和漢薬などの伝統医薬品に着目した。生薬や和漢薬は、科学的な根拠が曖昧なものも少なくないが、長年の使用実績から、化合物ベースの医薬品と比較して安全性が確保されている。そのため、これら伝統医薬品は長期的な服用も可能であり、治療薬開発だけでなく、機能性食品などの開発にも応用可能であることが期待される (図 2)。そこで本研究では、BDNF 遺伝子発現を活性化する生薬を探索し、活性成分の同定を試みるとともに、これら生薬が脳の機能性に与える影響を検討した。

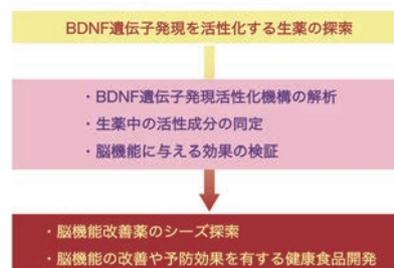


図2 本研究の目的

■結果および考察

昨年度の共同研究により、① 120 種類の生薬エキスのうち、約 1 割の生薬エキスに BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められること (図 3)、②活性の認められた生薬のうち、人参、山椒、釣藤鈎エキスについて詳細に解析した結果、これらエキスは転写制御因子 CREB 依存的に BDNF 遺伝子発現を誘導すること、③これらエキスを長期的にマウスに服用させることで、マウスの記憶学習能がごくわずかであるが亢進すること、などを見出した。そこで本研究では、生薬中の活性成分の同定を進めるとともに、記憶学習に与える影響をより詳細に検討した。

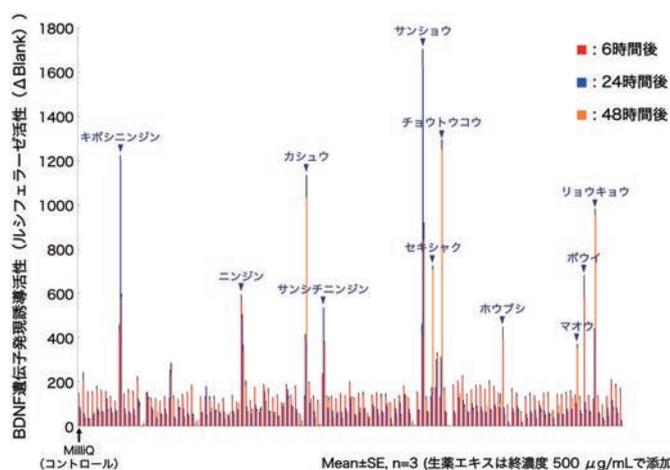


図3 BDNF 遺伝子発現を誘導する生薬エキスの探索

(1) 生薬由来化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

富山大学和漢医薬学総合研究所より恵与いただいた 96 種類の生薬由来化合物について、BDNF-Luc マウス由来大脳皮質神経細胞初代培養系を利用したスクリーニング法により BDNF 遺伝子発現誘導活性を評価した。胎生 16.5 日齢の BDNF-Luc マウスより大脳皮質を単離し、96 ウェルプレートを用いて大脳皮質神経細胞初代培養系を調整した。13 日間の培養後、生薬由来化合物を添加 (終濃度:100, 50, 10 μ M) し、6 時間後に Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega 社) を用いて各ウェルのルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、トリカブトの主要成分である Aconitine、Hypaconitine、Mesaconitine の 3 つに活性が認められた。これらは、テトロドトキシン感受性の Na⁺ チャネルを活性化し、神経細胞を過興奮させる。神経細胞における BDNF 遺伝子発現は、神経活動依存的に活性化するため、これら成分による BDNF 遺伝子発現誘導は、神経細胞の過興奮によるものであることが示唆された。また、Albiflorin が強く BDNF 遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。昨年度の共同研究により、赤芍エキスに BDNF 遺伝子発現誘導活性が見出された (図 3)

ため、BDNF 遺伝子発現誘導活性を有する赤芍中の活性成分は Albiflorin である可能性が考えられた。しかし、十数種類の生薬エキスに BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められた一方、活性を有する生薬由来化合物の数は数種類に限定された (図 4)。

(2) 人参主要成分 Ginsenosides の BDNF 遺伝子発現誘導能の有無

昨年度の共同研究により、人参エキスは神経細胞において BDNF 遺伝子発現を活性化し、神経細胞生存を亢進させることが明らかとなった。そこで、人参に含まれる活性成分の同定を試みるため、市販の Ginsenosidekit (EXTRASYNTEHSE 社より購入) を用いて BDNF-Luc マウス由来大脳皮質神経細胞初代培養系を利用したスクリーニング法により解析を行った。8種類の Ginsenosides (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2) を評価した結果、BDNF 遺伝子発現に顕著な影響は与えなかった。一方、同様の条件下で人参エキスを評価した結果、濃度依存的な BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められた (図 5)。

したがって、Ginsenosides は少なくとも単独では BDNF 遺伝子発現に影響を与えないことが予想され、複数種類の Ginsenosides が協調的に作用することで BDNF 遺伝子発現を活性化する可能性が考えられた。一方、人参より新規に同定された Gintonin が Gq 共役型の G タンパク質共役型受容体 GPCR を活性化することが報告されている (Hwang et al., 2012 Mol Cells)。以前に我々は、神経細胞における BDNF 遺伝子発現が Gs/q 共役型 GPCR 活性化により誘導されることを報告している (Fukuchi et al., 2015 J Neurosci) ため、Gintonin が人参中の活性成分である可能性も考えられた。これに関しては今後の検討課題である。

(3) 山椒中の BDNF 遺伝子発現誘導活性成分の同定に向けて

昨年度の共同研究により、山椒エキスに BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められた。そこで、山椒中の活性成分の同定を試みた。まず、各種溶媒を用いて抽出した山椒エキスをラット大脳皮質神経細胞初代培養系に添加 (終濃度: 250 μ g/mL) し、3 時間後に回収した RNA を用いて RT-qPCR 法により内在性 BDNF mRNA 発現変化を解析した。その結果、特にメタノール抽出物に強い BDNF mRNA 発現誘導能が認められた (図 6)。現在、このメタノール抽出物の分画を用いた解析を

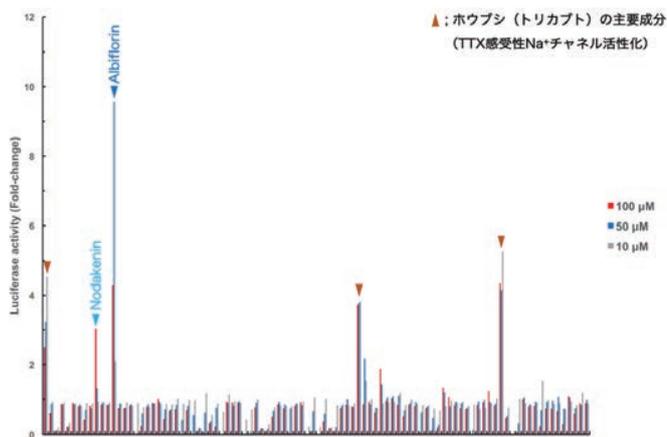


図 4 BDNF 遺伝子発現を誘導する生薬由来化合物の探索

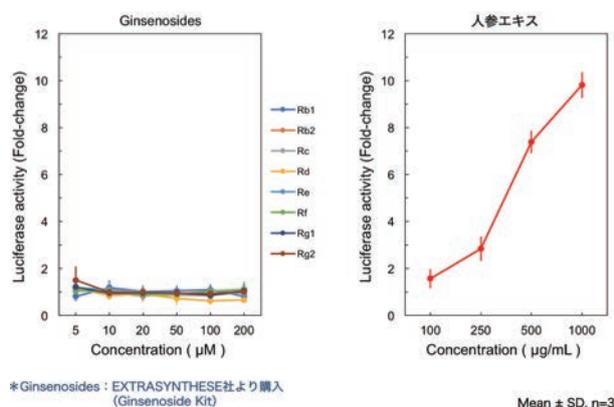


図 5 Ginsenosides の BDNF 遺伝子発現誘導活性の評価

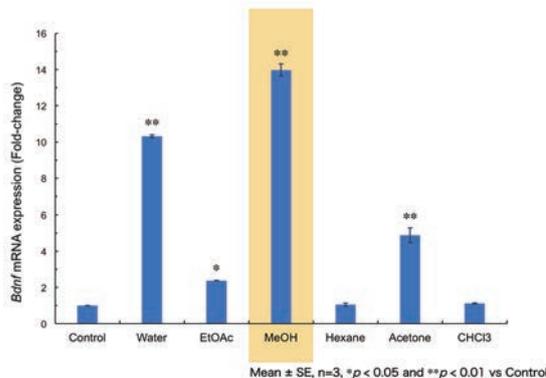


図 6 各種溶媒を用いて抽出した山椒エキスの活性評価

進めており、活性を有する分画を見出している。今後、これら分画より活性成分同定を進める必要がある。

(4) 人參、山椒、釣藤鈎エキスがマウスの記憶学習に与える影響

本研究では、BDNF 遺伝子発現を誘導する生薬のうち人參、山椒、釣藤鈎エキスに特に着目し、マウスを用いて記憶学習に与える効果を検討した。7 週齢雄の C57BL/6N マウスに人參、山椒、釣藤鈎エキスのいずれかを 200mg/kg/day で 14 日間連続投与を行った。コントロールとしては MilliQ 水を投与した。なお、この条件での投与では各群のマウスの体重変化に顕著な差は認められなかった。最終投与日の翌日に、恐怖条件付け試験を行った。恐怖条件付け試験は、場所と恐怖を連合すること

ことで形成される記憶である。本研究では、マウスを新規環境下であるチャンバーに 3 分間入れ、マウスをチャンバーに入れてから 2 分 28 秒後に床から電気ショックを 2 秒間与えた (条件付け)。翌日、マウスを再び同じチャンバーに入れ、3 分間のうちに観察されるすくみ反応を FreezeFrame2 (Actimetrics 社) を用いて計測した (テスト)。マウスが場所と恐怖を連合して記憶した場合、テスト時にすくみ反応は顕著に増加するため、このすくみ反応を指標として記憶学習能の変化を解析可能である (図 7)。解析を行った結果、コントロール群ではテスト時のすくみ反応の増加が認められたが、人參エキス投与群ではコントロール群と比較して変化は認められなかった (図 8)。一方、山椒や釣藤鈎エキスを投与した群では、コントロール群と比較してすくみ反応がわずかであるが亢進する (有意な差は認められなかったが、効果量を算出した結果、中程度の効果があることが示唆された) ことが明らかとなった (図 8)。また、条件付けの 30 分前にマウスに抗コリン薬であるスコポラミンを投与 (1 mg/kg) すると、記憶学習障害が起こることが知られている (図 9)。実際に、コントロール群にスコポラミンを投与した結果、生理食塩水を投与した群と比較してすくみ反応が有意に減少することが明らかとなった。しかし、このすくみ反応の有意な減少は、人參エキス投与群では認められなかった (図 10)。したがって、人參エキスは通常の記憶学習能には影響を与えないが、スコポラミン誘発性の記憶学習障害に対して抑制効果を発揮することが明らかとなった。この抑制効果は、

動物実験で記憶学習等の高次脳機能を評価 → 文脈性恐怖条件付け (Contextual Fear Conditioning)

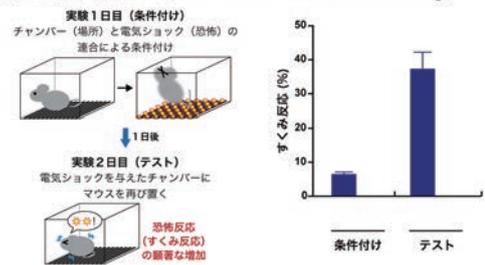


図 7 文脈性恐怖条件付け試験の概要

コントロール群ではテスト時のすくみ反応の増加が認められたが、人參エキス投与群ではコントロール群と比較して変化は認められなかった (図 8)。

一方、山椒や釣藤鈎エキスを投与した群では、コントロール群と比較してすくみ反応がわずかであるが亢進する (有意な差は認められなかったが、効果量を算出した結果、中程度の効果があることが示唆された) ことが明らかとなった (図 8)。また、条件付けの 30 分前にマウスに抗コリン薬であるスコポラミンを投与 (1 mg/kg) すると、記憶学習障害が起こることが知られている (図 9)。実際に、コントロール群にスコポラミンを投与した結果、生理食塩水を投与した群と比較してすくみ反応が有意に減少することが明らかとなった。しかし、このすくみ反応の有意な減少は、人參エキス投与群では認められなかった (図 10)。したがって、人參エキスは通常の記憶学習能には影響を与えないが、スコポラミン誘発性の記憶学習障害に対して抑制効果を発揮することが明らかとなった。この抑制効果は、

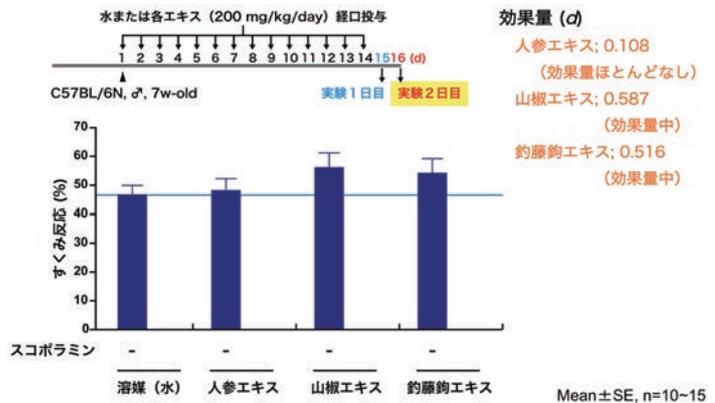


図 8 人參、山椒、釣藤鈎エキスがマウスの記憶学習に与える影響

動物実験で簡単に記憶学習障害を誘導する薬剤モデル → 抗コリン薬 (スコポラミン) 誘発性の健忘症モデル

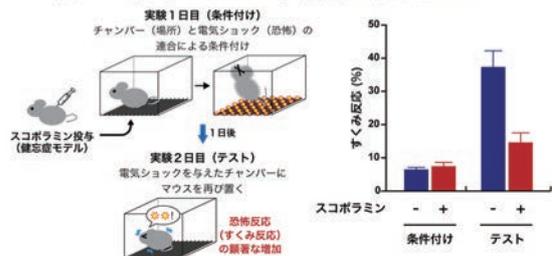


図 9 スコポラミン投与により認められる記憶学習障害

山椒や釣藤鈎エキス投与群では認められなかった (図 10)。まだ予備的な結果ではあるが、人参エキスを投与したマウスの海馬では、BDNF タンパク質の増加が認められた。したがって、スコポラミンによる海馬の機能障害が人参エキスにより増加した BDNF により抑制されたため、人参エキスでは明確な効果が認められた可能性が考えられた。いずれにしても、各エキスの投与量や投与期間などの検討が必要である。

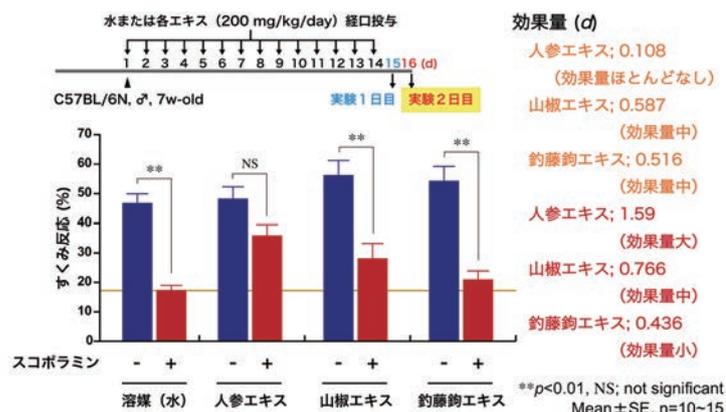


図 10 記憶学習障害に対する人参、山椒、釣藤鈎エキスの効果

■結論および今後の課題・展望など

昨年度および本年度の共同研究により、神経細胞において BDNF 遺伝子発現を活性化する生薬エキスを同定することに成功した。これら生薬エキス中に含まれる活性成分については、1 つは Albiflorin である可能性が考えられた。最近、Albiflorin が海馬における BDNF 発現を増加させることや抗うつ様効果を有することが報告されている (Wang et al., 2016 J Ethnopharmacol) ことを考慮すると、Albiflorin はうつ病などの精神疾患の治療薬シーズとなる可能性が期待され、さらに認知症などの神経変性疾患の治療薬シーズとしての可能性も期待できる。また、人参中の主要な有効成分である Ginsenosides は、単独では BDNF 遺伝子発現に影響を与えないことが明らかとなり、今後、詳細な検討を進める必要がある。山椒中の有効成分については、現在も活性を有する分画を探索しており、来年度以降も引き続き解析を進めていく予定である。また、人参、山椒、釣藤鈎エキスがマウスの脳の機能性に影響を与えることが示唆された。特に人参では、海馬における BDNF 発現量の増加が認められ、スコポラミン誘発性の記憶学習障害を改善することが明らかとなった。今後は、高齢マウスやアルツハイマー病モデルマウス、うつ病モデルマウスなどの疾患モデル動物を用いて、これら生薬エキスが各疾患による症状にどのように影響するのか検討を進める必要がある。これら研究成果に基づき、ヒトを対象とした臨床試験を計画し進めることにより、将来的には脳・神経系の疾患の治療や予防を目的とした医薬品だけでなく機能性食品の開発に結びつくことが期待される。