

精神疾患モデル動物のエピジェネティクス異常に対する 和漢薬の作用の解析

申請代表者	荒木 良太	摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室	助教
所内共同研究者	藤原 博典	病態制御部門複合薬物薬理学分野	助教
所内共同研究者	松本 欣三	病態制御部門複合薬物薬理学分野	教授

■背景・目的

統合失調症、うつ病などの精神疾患は近年急増しており、早急な対策が求められている。これら疾患の治療はモノアミン神経系を標的とした西洋薬による薬物療法が主流であるが、副作用が高頻度で認められることや薬物に反応しない治療抵抗性患者が多数存在することなど問題点も多く、西洋薬とは異なる治療戦略が必要と考えられる。一方で漢方薬などの和漢薬のなかには、精神機能異常に対して有効性を示すものがいくつか知られている。しかしながら、これら和漢薬は明確な作用機序が不明であることから、科学的なエビデンスを求める現代医療では使用されないことも多く、未だ十分に活用されているとは言い難い。こうした点から、漢方薬の作用機序の科学的エビデンスを蓄積し、十分な活用を促すことで、より良い精神疾患治療に貢献できるものと期待される。

精神疾患は遺伝要因と環境要因の相互作用により発症するものと考えられている。近年、環境要因が遺伝子発現を制御する分子基盤として、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化といったエピジェネティックな機序が注目されている。精神疾患の発症においてもエピジェネティックな機序の関与が示唆されており、エピジェネティクスは精神疾患の新たな治療標的やバイオマーカーとなる可能性が考えられる。これまでに申請者と松本らは精神機能に関連するエピジェネティクスの変動を明らかにするために、隔離環境での飼育したマウスを用いた研究を進めてきた。本マウスは統合失調症様、うつ様の行動を示すこと、背側縫線核においてGABA_B受容体サブユニットの1つであるGABA_{B1a}の遺伝子でDNAメチル化の減少とヒストンアセチル化の増加が見られること¹⁾を見出してきた。さらに、こうしたエピジェネティクスの変動に伴い遺伝子発現が変動していること、本遺伝子がコードするGABA_B受容体が隔離飼育マウスの異常行動に関与することも示してきた¹⁾。

こうした背景から我々は、漢方薬の作用機序を明らかにすることを目的に、行動薬理的解析に加えてエピジェネティクスに注目した解析を行っている。これまでの検討から、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際にみられる多動に対して加味温胆湯が抑制作用を示すものの、GABA_{B1a}遺伝子のエピジェネティクスの変動に対しては影響を与えない可能性を見出してきた。そこで本研究では、加味温胆湯の作用機序をエピジェネティクス以外の観点から解析するとともに、エピジェネティクスに作用する漢方薬を見出すことを目指して、隔離飼育によるエピジェネティクス変動の詳細なメカニズムを追究した。

■方法

隔離飼育マウスの作成

雄性のddY系マウス(Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan)を3週齢から6~8週間、集団飼育マウスは透明なケージ(24×17×12 cm)にて5匹で、隔離飼育マウスは同じサイズの周

囲が灰色のケージにて1匹で飼育して実験に用いた。動物は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ で明期 8:00 ~ 20:00、暗期 20:00 ~ 8:00 の12時間明暗サイクルで飼育した。水および飼料は自由に摂取させた。

マウス神経芽細胞種由来細胞株 Neuro2a 細胞の培養

Neuro2a 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地 (10% FBS 含有) を用いて、 37°C 、湿度 95 %、 CO_2 濃度 5 % の条件で培養した。試験の24時間前に低血清培地 (0.5% FBS) に交換し、各種解析に用いた。

漢方薬エキスの投与

加味温胆湯エキスは 1000 mg/kg の用量で精製水に溶解し、集団飼育あるいは隔離飼育の6週目から1日1回14日間、10 ml/kg の用量で経口投与した。最終投与の翌日に各種解析を行った。

mRNA 発現量の解析

TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、マウスの背側縫線核または Neuro2a 細胞から total RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、抽出した total RNA 1 μg から cDNA を合成した。合成した cDNA の定量は、表1のプライマーを用いて real-time PCR 法により行い、 β -actin の mRNA 発現量で補正した。

遺伝子	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
Egr-1	GAGCGAACAACCCTATGAGC	TCGTTTGGCTGGGATAACTC
β -actin	ACCCACACTGTGCCCATCTA	GCCACAGGATTCCATACCCA

表 1. mRNA 発現量解析用プライマー

タンパク質発現量の解析

抽出した背側縫線核から、RIPA buffer (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いてサンプルを作製した。サンプルに半量の sample buffer (27% glycerol, 140 mM Tris-Hcl (pH 6.8)、11% SDS、0.02% bromophenol blue、17% β -mercaptoethanol) を加え5分間煮沸し、1レーンあたり 20 μg のタンパク質を 10% SDS- ポリアクリルアミドゲルに注入し電気泳動した。その後、分離したタンパク質バンドを immobilin-P transfer membrane (Millipore Co., Bedford, MA) に転写した後、membrane を skim milk を含む TBS-T (0.05% Tween-20, Tris-buffered saline) でブロッキングし、一次抗体:ラビット抗 Egr-1 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、マウス抗 β -actin 抗体 (1:5000, Sigma, St. Louis, MO, USA) と 4°C で一晩反応、二次抗体:抗ラビット IgG 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗マウス IgG 抗体 (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) と室温で2時間反応させ、Chemi-Lumi One (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用い、ChemiDoc MP システム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて検出した。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法

Neuro2a 細胞に 1% ホルムアルデヒドを含む PBS を 10 分間添加し、タンパク質と DNA の複合体を架橋した。その後、ChIP-IT Express Enzyme Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) と抗 Egr-1 抗体を用いて、Egr-1 結合 DNA 配列を抽出した。得られたサンプルはフェノールとクロロホルムを用いて精製し、表2のプライマーと Thermal Cycler Dice Real Time System Single (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan) を用いて定量した。Egr-1 の結合率は IP/Input として算出した。

遺伝子	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
GABA _{B1a}	AGGCGCTCTCTCCTCTCT	CACCTCACGGGCTCCAAC

表 2. ChIP 用プライマー

他のマウスと遭遇した際の行動の解析

透明なアクリルケージ (30 × 30 × 35 cm) に網目状の仕切りをし、resident として集団飼育または隔離飼育マウスを大きい区画に入れ、3 時間の馴化の後、intruder として同週齢の新奇マウスを小さい区画に入れた (図 1)。その後 20 分間の resident の行動を ANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL) を用いて解析した。

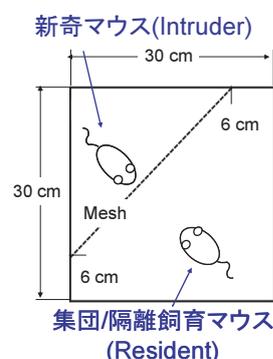


図 1. 社会的な刺激の負荷に用いるケージ

新奇環境下における運動量の解析

透明なアクリルケージ (30 × 30 × 35 cm) に集団飼育または隔離飼育マウスを入れ、30 分間の移動距離を

ANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL) を用いて解析した。

強制水泳試験

柱形の透明な測定シリンダー (高さ 27 cm、直径 18 cm) に水温 25°C の水を 13 cm 深さまで入れ、その中で集団飼育または隔離飼育マウスを 6 分間水泳させ、その様子をビデオ撮影した。試験終了後、体温低下を防ぐためにマウスをよく乾燥させた。6 分間の試験のうち、後半の 4 分間の無動時間を解析した。

In vivo 脳微小透析法

ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg, i.p.) 麻酔下、マウスの大脳皮質前頭前野 (ブレグマより 1.9 mm 前方、0.5 mm 右側方、頭蓋表面より深さ 0.8 mm) にガイドカニューレ (深さ 4 mm: Eicom, Kyoto) を挿入固定した。術後、マウスに鎮痛薬としてブプレノルフィン (0.01 mg/kg, i.p.) を投与し、個別ケージにて飼育した。測定時は透析プローブ (膜長 3 mm: Eicom, Kyoto) をガイドカニューレに挿入し、リンゲル液 (147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂) (Fuso Pharmaceutical Industries, Osaka) を流速 1 μL/min で灌流した。サンプルは 20 分単位で回収し、直ちに高速液体クロマトグラフィー / 電気化学検出器 (HPLC/ECD) システムに連続自動注入した。薬物は、プローブ挿入後、基礎遊離量の安定化を確認してから投与した。なお、測定は術後 3 日以内に実施した。NA、DA、5-HT の分析には、HPLC/ECD システムを用い、以下の条件で測定を行った。カラムには Eicompak CAX-ODS (4.6 mm i.d. × 30 mm: Eicom, Kyoto) を用いた。解析にはデータ解析システム Power Chrom[®] (eDAQ Pty., Ltd. Nagoya) を用い、サンプル中の NA、DA、5-HT 量を内部標準物質との面積比により算出した。各神経伝達物質遊離量の変化は、測定開始から数時間後にマウスの基礎遊離量が安定したことを確認し、処置前の 3 サンプルの基礎遊離量の平均を 100% とし、その割合で表した。

統計解析

データは全て「平均値±標準誤差」として表し、統計学的処理には Stat View 5.0® (SAS Institute Inc, Tokyo) を使用した。In vivo 脳微小透析法 (図3) の統計解析には、反復測定二元配置分散分析を行った。その他の統計解析は、Student's *t* 検定 (図4)、二元配置分散分析 (図2, 5) の後に多重比較検定として Tukey-Kramer 検定 (図2) または Dunnett 検定 (図5) を行い、 $P < 0.05$ のものを有意差ありとした。

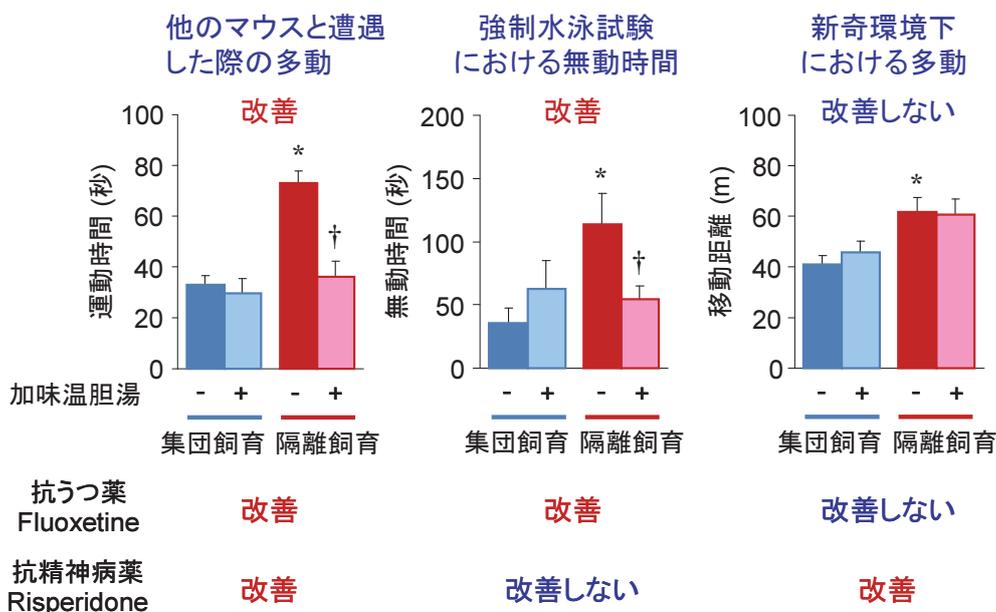


図2. 加味温胆湯 (1000 mg/kg)、Fluoxetine (20 mg/kg)、Risperidone (0.3 mg/kg) を用いた行動薬理的解析
* $p < 0.05$ vs. 集団飼育、† $p < 0.05$ vs. 加味温胆湯 (-)。

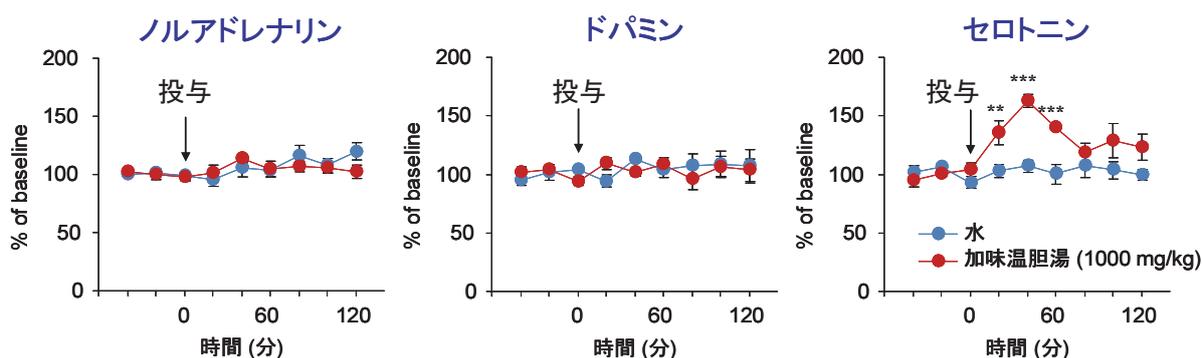


図3. 加味温胆湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に与える影響
矢印で示した時間に加味温胆湯 (1000 mg/kg) を経口投与した。
* $p < 0.05$ vs. 水。

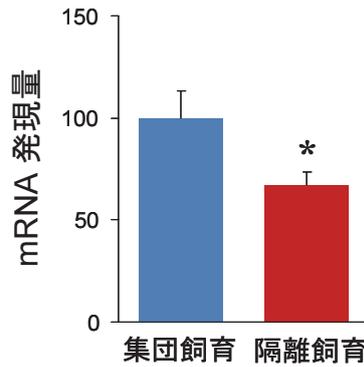


図4. 隔離飼育マウスの背側縫線核における Egr-1 mRNA 発現量
* $p < 0.05$ vs. 集団飼育。

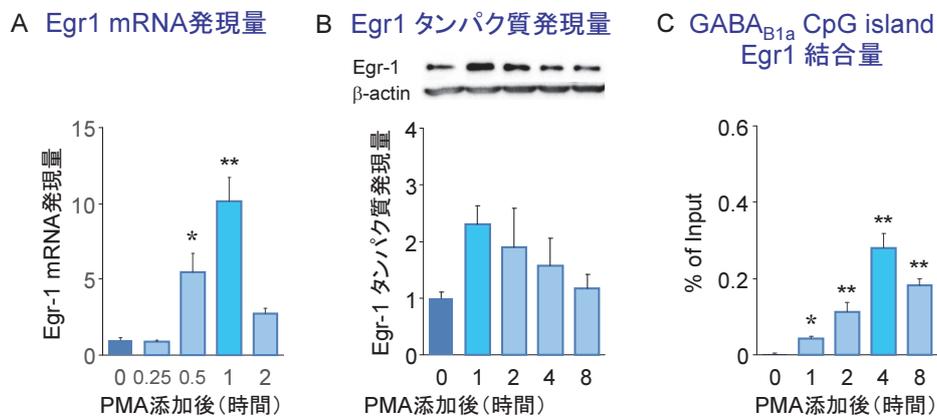


図5. Neuro2a 細胞での PMA (100 ng/ml) 刺激による Egr-1 の発現量の変動と GABA_{B1a} CpG island への結合率の変動
(A) Egr-1 mRNA 発現量、(B) Egr-1 タンパク質発現量、(C) Egr-1 の GABA_{B1a} 遺伝子への結合率。
* $p < 0.05$ vs. コントロール、** $p < 0.01$ vs. コントロール。

■結果・考察

加味温胆湯が隔離飼育マウスの異常行動に与える影響

これまでに、加味温胆湯 (1000 mg/kg) を 14 日間投与することで、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際にみられる多動が改善することを見出している。しかしながら、加味温胆湯 (1000 mg/kg) の 14 日間投与は、隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA_{B1a} の発現増加に対してはなんら影響を与えなかった。こうした結果から、加味温胆湯は背側縫線核の GABA_{B1a} のエピジェネティクス変動を介さずに、他のメカニズムを介して隔離飼育マウスの異常行動を改善する可能性が考えられた。

そこで本研究ではまず、加味温胆湯の行動薬理的活性の特徴を明らかにするために、隔離飼育マウスでみられる様々な異常行動を指標に加味温胆湯の作用と西洋薬の作用を比較した。その結果、加味温胆湯は隔離飼育マウスでみられる強制水泳試験における無動時間の増加を抑制したのに対し、新奇環境下における多動は抑制しないことが明らかとなった。同様の検討を抗うつ薬 fluoxetine (20 mg/kg, p.o.)、抗精神病薬 risperidone (0.3 mg/kg, p.o.) についても行った。その結果、fluoxetine は他のマウスと遭遇した際多動と強制水泳試験における無動時間の増加を抑制し、新奇環境下における多動は抑制しないといった、加味温胆湯と同様の活性を示した。一方で、risperidone は他のマ

ウスと遭遇した際の多動と新奇環境下における多動を抑制する一方で、強制水泳試験における無動時間の増加は抑制しないといった、加味温胆湯とは異なる活性を示した。こうした結果から、加味温胆湯は抗うつ薬に類似した作用を持つ可能性が考えられた（図2、一部データ省略）。

大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する加味温胆湯の影響

次に、加味温胆湯が抗うつ薬と同様に細胞外モノアミン量を増加させるかを明らかにするために、*in vivo* 脳微小透析法により大脳皮質前頭前野の細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量を解析した。集団飼育マウスに加味温胆湯（1000 mg/kg, p.o.）を投与したところ、40分後をピークとしたセロトニン量の有意な増加が確認された。一方で、ノルアドレナリン量、ドパミン量にはなんら影響を与えなかった（図3）。本結果から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量を選択的に増加させるといった選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）様の作用を有することが明らかとなった。加味温胆湯は臨床現場においてもうつ病患者に処方されることがあることから、加味温胆湯によるうつ病の改善にはSSRI様作用が一部関与する可能性が考えられる。

隔離飼育による Egr-1 の発現量変動の解析

これまでの検討から、加味温胆湯の作用機序の一端を明らかにしたものの、未だエピジェネティックな作用を見出すには至っていない。そこで次に、漢方薬のエピジェネティックな作用を評価できる指標を見出すために、隔離飼育による GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクス変動に関与する分子の解析を行った。

GABA_{B1a} 遺伝子の転写開始点付近には、最初期遺伝子 Egr-1 の結合配列が存在する。Egr-1 はヒストン脱アセチル化酵素や DNA メチル基転移酵素といったエピジェネティクス関連遺伝子をリクルートすることが報告されている²⁾ことから、GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクスの変動に Egr-1 が関与する可能性が考えられる。そこでまず、隔離飼育により GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクス変動が見られた背側縫背核において、Egr-1 の mRNA 発現量を解析した。その結果、隔離飼育マウスでは Egr-1 の mRNA 発現量が減少していることを見出した（図4）。

GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクス変動における Egr-1 の関与の解析

隔離飼育により背側縫背核の Egr-1 の mRNA 発現量が減少することから、この Egr-1 の減少が GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクス変動を引き起こす可能性が考えられる。そこで、GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクス変動における Egr-1 の関与を明らかにするために、マウス神経芽細胞腫由来細胞株 Neuro2a 細胞を用いて Egr-1 と GABA_{B1a} 遺伝子発現との関連性を追究した。

Egr-1 遺伝子の発現は、細胞内シグナル分子であるプロテインキナーゼ C の活性化により誘導される。そこで PKC の活性化剤であるホルボール 12- ミリスタート 13- アセタート（PMA）（100 ng/ml）を添加したところ、1時間後をピークに Egr-1 の mRNA およびタンパク質の発現が誘導された（図5A, B）。本条件で Egr-1 を誘導した際の GABA_{B1a} 遺伝子上の CpG island における Egr-1 結合量を ChIP 法により解析したところ、PMA 刺激の4時間後をピークに Egr-1 の結合量が増加した（図6C）。Egr-1 の発現量のピークと結合量のピークに時間的なずれがあるものの、Egr-1 の発現量に依存して GABA_{B1a} 遺伝子への結合量が増加する可能性が考えられた。

■結論

行動薬理的解析と *in vivo* 脳微小透析法での神経化学的解析から、加味温胆湯は SSRI 様の細胞外

セロトニン量増加作用を介して抗うつ様作用を示す可能性が考えられた。

また、隔離飼育マウスと Neuro2a 細胞を用いた検討から、GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクス変動に Egr-1 の発現変動が関与する可能性が示された。今後、GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティクス変動における Egr-1 の関与を明らかにできれば、Egr-1 の発現誘導活性を指標に漢方薬のエピジェネティックな作用を見出せるものと考えている。

■謝辞

In vivo 脳微小透析法を実施するにあたりご協力いただきました、大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野の吾郷由希夫先生に御礼申し上げます。

■引用文献

1. Araki R., Hiraki Y., Nishida S., Kuramoto N., Matsumoto K., Yabe T. Epigenetic regulation of dorsal raphe GABA(B1a) associated with isolation-induced abnormal responses to social stimulation in mice. *Neuropharmacology*, 101, 1-12, 2016.
2. Cartron PF., Blanquart C., Hervouet E., Gregoire M., Vallette FM. HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the NY-ESO1 gene expression. *Mol Oncol.* 7, 452-463, 2013.