

助成番号 27-2-23

精神神経症状改善に關与する加味逍遙散の microRNA を介した作用機序解明

近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門

清水 尚子

1. 諸言

女性の更年期障害は、卵巣機能の衰退による女性ホルモン分泌減少などの生物学的要因に加えて、社会心理的なストレスなどの環境要因が複雑に關与して、のぼせや冷えなどの身体的症状やイライラ・不安などの精神的症状を呈する。これらの女性の更年期障害の症状に対して、代表的な漢方薬のひとつとして加味逍遙散（KSS）が処方されてきた。KSS は柴胡、当帰、芍薬、茯苓、白朮、甘草、生姜、薄荷、牡丹皮、山梔子の 10 種類の生薬からなり、特にうつ・不安症状、イライラなどの精神神経症状の強い更年期障害に対して汎用されているが、脳神経系における KSS の作用機序や有効成分はいまだ分子レベルで解明できていないのが現状である。

これまでにうつ病発症の一因として、慢性ストレスなどによる視床下部-下垂体-副腎軸（HPA axis）の破綻が引き起こすコルチゾールの持続的な分泌促進が關与することが示唆されている。HPA axis の破綻は、海馬における脳由来神経栄養因子（BDNF）の産生を抑制し、神経新生低下を引き起こすだけでなく、前頭前野における神経細胞萎縮による神経機能低下に關与することが示唆されている。本研究では、更年期うつ病モデルマウスを作製し、行動解析による KSS の薬効の検討を行うとともに、ストレス応答機構としての HPA axis への KSS の關与の有無を血中コルチゾール量（マウスではコルチコステロン量）の変化について検討する。さらに、HPA axis 調節系に關連する遺伝子、およびそれらの遺伝子の転写後調節機構に關わる microRNA について検討することで、ストレス負荷が脳に与える影響やうつ・不安などの精神神経症状を改善する KSS の作用機序を科学的に解明し、新規治療薬開発や予防措置への応用に向けた研究基盤の確立を目的とする。

2. 方法

2.1 更年期うつ病モデルマウスの作製、行動解析

12 週齢成体雌マウスの卵巣を除去（ovariectomy : OVX）した後、慢性水浸拘束ストレスを負荷することで更年期うつ病モデルマウス（OVX+ストレス負荷マウス）を作製した。コントロールは OVX 群（コントロール OVX 群）とした。ストレス負荷 1 週間前から KSS は

3%混餌での経口投与とした (OVX+ストレス負荷+KSS マウス) (図 1A)。ストレス負荷後の血中コルチコステロン量を ELISA 法によって測定し、KSS の HPA axis に対する効果の有無を検討した。また、強制水泳試験によってストレス負荷後のうつ様行動を評価した。

2.2 HPA axis 関連遺伝子の発現検討

HPA axis 調節系に関連する遺伝子や精神疾患との関連性が報告されている microRNA の発現を、コントロール OVX 群、OVX+ストレス負荷群、OVX+ストレス負荷+KSS 群で比較検討するために、海馬や前頭前野サンプルから total RNA を精製し、Taqman アッセイによる real-timePCR 法によって定量を行った。また、in situ ハイブリダイゼーション法によりコントロール OVX 群、OVX+ストレス負荷群、OVX+ストレス負荷+KSS 群におけるそれらの遺伝子発現について検討を行った。

3.結果

3.1 更年期うつ病モデルマウスの作製、KSS が HPA axis に与える影響について

筆者らは、KSS 投与が更年期障害うつ病モデルマウスにおける HPA axis 活性化によるコルチコステロン増加を正常化するかどうか検討するために、慢性ストレス負荷後の血漿中のコルチコステロン量を測定した (図 1A)。その結果、OVX コントロール群と比較して OVX+ストレス負荷群では有意に血中コルチコステロン濃度が増加したのに対し、OVX+ストレス負荷+KSS 投与群では、増加が認められなかった (図 1B)。

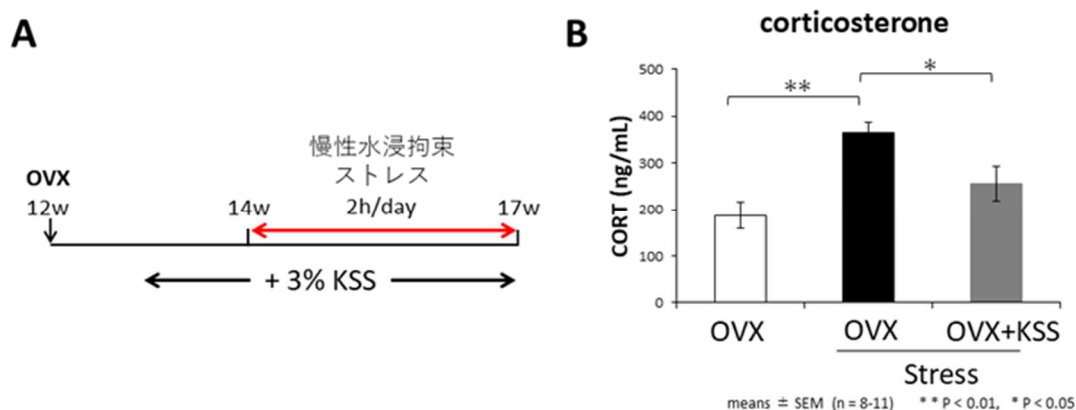


図 1 更年期障害うつ病モデルマウス作製とコルチコステロン濃度

3.2 KSS が更年期障害うつ病モデルマウスのうつ様行動に与える影響について

次に、慢性ストレス負荷後、強制水泳試験によってうつ様行動を評価した。OVX+ストレス負荷群ではコントロール OVX 群と比較し、うつ様行動が有意に増加したのに対し、OVX

+ストレス負荷+KSS 投与群ではうつ様行動の増加が軽減された (図 2)。

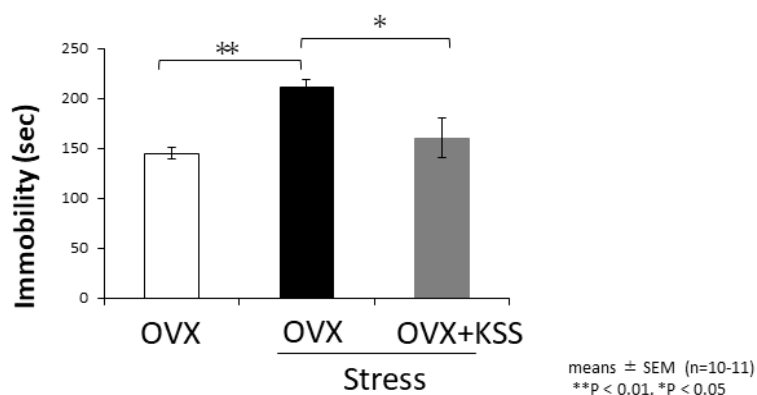


図 2 強制水泳試験

3.-2 KSS が microRNA 発現に与える影響

更年期障害モデルマウスにおける KSS 投与が microRNA 発現量に与える影響について、real-time PCR 法によって海馬、前頭前野サンプルを用いて検討を行った。その結果、前頭前野におけるいくつかの microRNA 発現が、OVX+ストレス負荷群と比較して OVX+ストレス負荷+KSS 投与群では低下することが明らかとなった。しかし、海馬の microRNA 発現については、OVX+ストレス負荷群と比較して OVX+ストレス負荷+KSS 投与群で有意な発現変化は認められなかった。

4.考察

本研究の更年期うつ病モデルマウスを用いた検討によって、モデルマウスへの KSS 投与により、慢性ストレス負荷によるコルチコステロンの分泌増加が正常化すること、さらには、更年期うつ病モデルマウスで観察されるうつ様行動が軽減されることが明らかとなった。また、これまでに精神疾患関連遺伝子との関連性が報告されている microRNA 発現検討では、更年期うつ病モデルマウス前頭前野において KSS 投与がいくつかの microRNA 発現変化を引き起こすことを見出した。今後は、これらのターゲット遺伝子の詳細な解析を行っていく予定である。女性の更年期障害は、卵巣機能の衰退による女性ホルモン分泌減少などの生物学的要因に加えて、ストレス応答系である HPA axis が繰り返し受ける社会心理的ストレスなどにより過剰に刺激され続けることで調節不全に至り、うつ・不安などの精神神経症状を呈すると想定されている。しかし、その分子機序や脳の機能的変化は、これまでに明らかにされていないのが現状である。ストレス負荷によるコルチコステロン増加は海馬の神経新生レベルを低下させ、HPA axis 応答系の負のフィードバック調節機構の破綻を引き起こす¹⁾。さらに、前頭前野では神経細胞の樹状突起の退縮やスパインの形成異常

による神経活動の低下との関連性が示唆されている^{2,3)}。以上より、更年期障害うつモデルにおける KSS 投与は、HPA axis の過剰な活性化を正常化している可能性があり、KSS による精神神経症状改善の分子機序のひとつである可能性が示唆された。今後、これらの KSS による HPA axis の正常化の分子機序について詳細に検討していく予定である。また、KSS は 10 種類の構成生薬が配合されたものであり、これらの中のどの生薬成分が、HPA axis 活性化の正常化に関与するのかを検討することは非常に重要であり、今後の検討課題である。

5. 結語

本研究において、KSS は HPA axis の正常化に関与することが明らかとなり、ストレス応答系の破綻が引き起こす更年期障害の精神神経症状に対して有効な漢方薬である可能性が示唆された。客観的診断法や根本的治療法の確立が遅れているうつ病や不安障害にとって、それらの発症機序解明への足掛かりを得ることは非常に重要であり、今後の新たなアプローチが期待される。

6. 文献

- 1) Pariante CM and Miller AH. Glucocorticoid Receptors in Major Depression: Relevance to Pathophysiology and Treatment. *Biol Psychiatry*. 2001;49:391-404.
- 2) Diorio D, Viau V, Meaney MJ. The Role of the Medial Prefrontal Cortex (Cingulate Gyrus) in the Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *J Neurosci*. 1993;13:3839-47.
- 3) Radley JJ, et al. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol*. 2008;507:1141-1150.