

学位（博士）論文の要旨及び審査結果の要旨

学位記番号	甲第一号	学位授与年月日	平成 30 年 3 月 20 日
氏名（カナ）	澤本 篤志（サワモト アツシ）		
論文題目（和）	3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone と酸棗仁湯の脳由来神経栄養因子産生促進作用が脳機能に及ぼす影響に関する研究		
論文題目（洋）	Effects of brain-derived neurotrophic factor induced ability of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone and sansoninto (酸棗仁湯) on brain functions		
審査委員	主査： 松山大学 教授 舟橋 達也 副査： 松山大学 教授 古川 美子 副査： 松山大学 教授 河瀬 雅美		
受理日	平成 29 年 9 月 11 日		
公開発表日	平成 29 年 12 月 21 日		
審査終了	平成 30 年 2 月 15 日		

博士論文審査結果（要旨）

博士（薬学） 澤本 篤志

論文題名

脳由来神経栄養因子誘導を介して中枢神経系に作用する天然由来成分に関する研究

1. 内容の要旨

【背景】脳由来神経栄養因子(BDNF)は、中枢神経系において神経細胞の可塑性や神経新生、生存などに関与する液性タンパク質であり、脳機能維持に重要な役割を担う。海馬組織における BDNF 発現の減少はうつ病をはじめ認知機能障害やアルツハイマー病など様々な神経疾患に関与すると報告されていることから、BDNF 発現増加作用を示す化合物は、これら疾患の予防あるいは治療に有効と期待される。当研究室ではこれまでに、柑橘果皮成分 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone(HMF)は、全脳虚血モデルマウスの海馬歯状回領域における BDNF 発現を増加させ、脳保護作用を示すことを明らかにしてきた。本研究では、1) HMF をうつ病態様モデルマウスに投与し、その効果を解析した。また、2) 柑橘研究で用いた手法を適応し、神経疾患に奏効する漢方薬探索を目的とするスクリーニングを実施した。

【方法】1-1) コルチコステロン(CORT)誘発性うつ病態モデルマウスに対する HMF の抗うつ効果の検討：CORT を約 4 週間持続的に投与することで CORT 誘発性うつ病態様モデル(CORT モデル)マウスを作製し、行動薬理学的手法、免疫組織化学的手法、ウエスタンブロット法(WB)で HMF の抗うつ効果について解析した。1-2) 慢性ストレス誘発性うつ病態様モデル(CUMS モデル)マウスに対する HMF の抗うつ効果の検討：2 週間にわたり穏やかで予測不能な 6 種類のストレスをマウスに負荷することで慢性ストレス負荷うつ病態モデル(CUMS モデル)マウスを作製し、行動薬理学的手法、免疫組織化学的手法、WB で HMF の抗うつ効果について解析した。HMF の脳移行性は、LC/MS 法を用いて解析した。2-1) 漢方薬スクリーニング：*in vitro* スクリーニングは、Neuro2a 細胞を用い、WB で細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)の活性化作用及び神経突起伸展作用を解析することで行った。*in vivo* スクリーニングは、MK-801(NMDA 受容体遮断薬)によって誘発される短期作業記憶障害モデルマウスを用い、行動薬理学的手法で行った。2-2) 候補漢方薬の作用および作用機序解析：2-1 で見出した候補漢方薬について、MK-801 誘発性短期作業記憶障害モデルマウスを用い、行動薬理学的手法、WB で解析した。

【結果】1)HMF は、CORT モデルマウス及び CUMS モデルマウスにおけるうつ様行動を抑制し、海馬組織における BDNF 発現の低下、海馬歯状回領域における神経新生の低下、神経可塑性の低下を抑制した。また、HMF は経口投与後、速やかに脳内へ移行することが明

らかとなった。以上の結果から、HMFは海馬におけるBDNF発現を増加することで抗うつ作用を示す可能性が示唆された。2) 16種の候補漢方薬の中で最も強いERK活性化作用、神経突起伸展作用を示したのは酸棗仁湯(sansoninto)であった。酸棗仁湯は、短期作業記憶障害モデルマウスのうつ病態および異常行動を改善した。また、海馬においてBDNF発現を増加し、神経可塑性の低下を抑制した。以上の結果から、酸棗仁湯はBDNF発現を増加することでうつ病などの神経疾患を改善する可能性が示唆された。

【考察】本研究の結果は、食経験のある植物や漢方薬にBDNF発現増加作用があることを示したものであり、今後、新規の神経疾患予防薬あるいは治療薬が開発される可能性を示したものである。

2. 審査結果の要旨

現代医療で用いられる医薬品の大部分は天然資源由来の化合物であり、過去30年間で認可された医薬品のうち、天然資源由来のものはおよそ6割を占めるといわれている。愛媛県は全国有数の柑橘生産地であり、収穫品数48品目は日本で最も多い。柑橘類にはフラボノイド、カロテノイド、クマリン、テルペン、リモノイドなどの成分が含まれており、これらは末梢組織に対して抗癌作用、抗菌作用、抗アレルギー作用などを示すと報告されているが、柑橘由来成分の中樞神経系に対する作用はほとんど知られていなかった。柑橘由来成分であるヘプタメトキシフラボン(3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone; HMF)は柑橘果皮に含まれるポリメトキシフラボンの一種であり、全脳虚血モデルマウスに対するHMFの投与は脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)の産生亢進を介して脳保護的な作用を示す。BDNFは神経栄養因子の1つであり神経細胞の生存・成長・分化・再生などで役割を担うことから様々な中樞神経疾患、特にうつ病や認知症の発症に関与していることが報告されている。

一方、漢方薬は日本独自の発展を遂げた天然資源由来の医薬品であるが、西洋薬に比べてエビデンス不足の状態にあるといわれている。そのため、近年、エビデンス構築を目的とした研究や育薬の観点から新規適応の付加を目的とした研究が活発に行われるようになってきている。

そこで本研究では、うつ病態モデル動物に対するHMFの効果とその作用機序について検討した。さらに、中樞神経系の疾患に作用する漢方薬の探索を行い、酸棗仁湯の効果とその作用機序についても検討した。

得られた研究成果の概要は、次のようにまとめられる。

まず、コルチコステロン(corticosterone; CORT)誘発性うつ病態様モデルマウスに対するHMFの作用について体重測定、強制水泳試験(forced swim test; FST)、尾懸垂試験(tail suspension test; TST)を用いて検討している。その結果、CORT誘発性うつ病態様モデルマウスにHMFを皮下投与すると、CORT投与により誘発される体重増加率の低下が抑制され、

FST において不動時間の短縮がみられたことからうつ病態の改善効果を示すことが明らかとなった。しかし、TST においては不動時間の短縮は認められなかった。一方、SSRI に分類される抗うつ薬であるフルオキセチン(fluoxetine; FLX)投与では TST において不動時間の短縮がみられたが、FST では不動時間の短縮は認められなかった。この矛盾の原因としてマウスの系統による抗うつ薬に対する感受性の相違やその作用機序の相違を指摘している。マウスに対する慢性的な CORT 曝露によって海馬神経ネットワークが障害されると海馬領域の BDNF 発現に影響があると考え、その BDNF 発現に及ぼす HMF 投与の影響について解析している。その結果、HMF 投与により CORT による海馬領域の BDNF 発現の低下を抑制するとともに、BDNF 発現の増加作用は主にアストロサイトで生じることを明らかにした。また、HMF は CORT による経時的な神経新生細胞の減少を抑制するとともに、神経可塑性の指標として用いたリン酸化された CaMKII 発現量についても CORT による経時的な減少を抑制した。これらの結果から HMF が BDNF 発現増加作用を介して、神経新生及び神経可塑性を促進している可能性を示唆している。また、この HMF による BDNF 発現増加作用は ERK1/2 のリン酸化を介して生じている可能性についても指摘している。

次に、マウスを用いた HMF 経口投与後の脳移行性についての検討、そして予測不可能慢性緩和ストレス(chronic unpredictable mild stressed; CUMS)負荷モデルマウスにおけるうつ病態様行動に対する HMF の効果について FST を用いて検討している。その結果、マウスに経口投与した HMF は比較的速やかに脳内に移行し、脳内からの消失も速やかに行われることを示した。また、HMF 経口投与は FST における CUMS による不動時間を抑制したことから HMF は経口投与においても CUMS 負荷モデルマウスのうつ病態様行動に対して改善効果を示した。さらに解析したところ、その改善効果は CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスの場合と同様に、海馬組織における BDNF 発現の低下、神経新生や神経可塑性の減少がそれぞれ抑制された結果生じていることを明らかにした。

さらに、駆瘀血作用を有する漢方薬の中から中枢神経系に作用する漢方薬について neuro2a 細胞を用いて ERK2 活性化作用と神経突起進展作用を指標として *in vitro* スクリーニングを行っている。その結果、酸棗仁湯が ERK2 活性化作用と神経突起進展作用を示すことが明らかとなり、さらに *in vivo* でその精神神経疾患に対する影響について検討している。酸棗仁湯を経口投与したマウスについて FST を行うと不動時間を短縮し、海馬組織における BDNF 発現量の増加が認められた。また、酸棗仁湯は MK-801 誘発性統合失調症陽性様症状に対する異常行動(過活動)抑制傾向及び MK-801 誘発性短期作業記憶障害モデルマウスの交替行動率低下の改善傾向も示した。これらの結果は酸棗仁湯の新たな適応の可能性を示唆するものといえる。MK-801 はグルタミン酸 NMDA 受容体の遮断薬であり、NMDA 受容体の下流には CaMKII または ERK-CREB 経路を含むカスケードが存在しており、主にタンパク質合成や神経可塑性を制御している。また、BDNF 受容体(TrkB)の下流にも同様のカスケードが存在することからウエスタンブロット法を用いて、酸棗仁湯が NMDA 受容体及び TrkB 受容体下流のシグナル伝達物質に及ぼす影響について解析している。その結果、

酸棗仁湯は海馬における ERK2、CaMKII、CREB のリン酸化を誘導することを示した。これらの結果は、酸棗仁湯が海馬組織の NMDA 受容体下流において記憶や学習に重要な役割を果たす ERK2、CaMKII、CREB などの細胞内シグナル伝達の活性化が生じることを初めて示したものであり、酸棗仁湯の作用機序を解明する上で重要な成果であるといえる。

以上、本研究により、柑橘に含有される HMF 及び漢方薬である酸棗仁湯によるうつ病など精神神経疾患の予防もしくは治療に繋がる新たな知見を提示しており、その作用機序の解明は、予防医学が重視される今後の医療の発展に寄与する重要な成果であるといえる。

本学位論文の予備審査会は、平成 29 年 12 月 21 日に松山大学薬学部で開催され、口頭発表と質疑応答が行われた。さらに、学位論文審査委員により本学位論文の内容について審査が行われた。その結果、本学位論文に記載された研究成果は、新規性と学術性が高く、その内容は薬学に関連する学問領域において高く評価されることから、審査委員全員一致して、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと判定した。