

氏名（本籍） いまむら さちこ
今村 幸子 (茨城県)

学位の種類 博士（薬学）

報告番号 乙第 1518 号

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）

学位論文題目

抑肝散の活性成分ガイソシジンメチルエーテルの薬理作用と血液脳関門透過性に関する研究

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	岩崎 克典
（副査）	福岡大学	教授	高野 行夫
	福岡大学	教授	片岡 泰文
	福岡大学	教授	金城 順英

抑肝散の活性成分ガイソシジンメチルエーテルの 薬理作用と血液脳関門透過性に関する研究

株式会社ツムラ ツムラ研究所
今村 幸子

現代社会の抱える問題の一つに高齢化があり、それに伴う代表的疾患に認知症がある。わが国の認知症患者は現在400万人を超え、65歳以上の4人に1人が認知症とその予備軍と言われている。認知症の症状には記憶・学習障害などの中核症状と、幻覚・妄想、暴言・暴力、攻撃性、不安、徘徊、うつ症状など様々な周辺症状(BPSD)がある。BPSDは中核症状にもまして介護者へ大きな負担を強いることなどから社会的な問題となっている。臨床では様々な薬物が対症療法的に用いられている。その中でこれまでBPSD治療に主に用いられていた抗精神病薬には錐体外路系症状などの副作用が知られている。2005年、FDAが「これら薬物が認知症患者の死亡率を高める」ことを勧告して以来、同様な報告が相次ぎ、副作用の少ない新しい治療薬が探し求められていた。このような背景において、神経過敏で興奮しやすい、イライラする、眠れないなどの精神症状に効果を持つ抑肝散が抗精神病薬のような副作用がなく、BPSDに有効であることが報告された。これを契機に三大認知症と言われているアルツハイマー型、レビー小体型、血管性認知症患者などを対象とした抑肝散の多施設臨床試験が実施され、現在その有効性が集積されている。その一方で、このような改善効果を有する抑肝散の作用機序の解明が求められている。

著者は抑肝散のBPSD改善効果とその作用機序を明らかにするため*in vivo*および*in vitro*実験を実施し、その作用機序の一つにセロトニン神経系に対する是正作用があり、その活性を釣藤鈎アルカロイド成分が担っていることを見出した。本論文はその成果を4章に分けてまとめたものである。

第1章 抑肝散の薬効評価:動物(*in vivo*)試験

第1章では2種の動物モデル(APP-Tgマウスおよび隔離飼育マウス)を用いて抑肝散のBPSD改善効果を客観的に評価した。

APP-Tgマウス : アルツハイマー病の動物モデルとして知られる APP-Tg マウスにおいて学習障害(図 1A:6か月)、低不安症状(図 1B:7ヵ月)および過活動(図 1C:14ヵ月)が認められた。抑肝散(0.5 および 1.0 %混餌飼料で 15ヶ月間飼育)はこれらの発症を有意に改善した。

隔離飼育マウス : セロトニン神経との関連性が示唆されている隔離飼育マウスの攻撃性と社会性に対する抑肝散(0.5 および 1.0 g/kg:14日間経口投与)および釣藤鈎(75 および 150 mg/kg:14日間経口投与)の効果を検討した(図 2)。抑肝散および釣藤鈎は、隔離飼育により誘発されたマウスの攻撃行動の増加および社会行動の低下を有意に改善した。これらの改善効果は 5-HT_{1A} 受容体遮断薬(WAY-100635)によって阻止された。また、抑肝散の攻撃性および社会性改善作用は釣藤鈎除去により消失した。これらの結果が

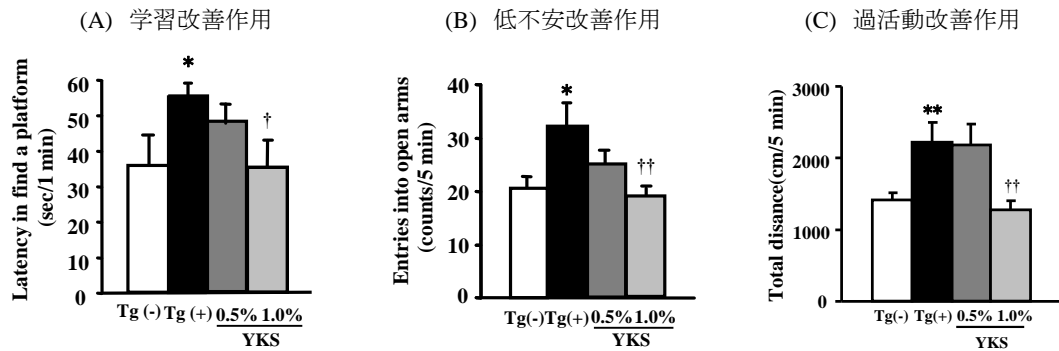


図1 APP-Tg マウスの学習障害(モーリス水迷路試験)、低不安作用(高架式十字迷路試験)および過活動(オープンフィールド試験)に対する抑肝散の改善効果。各値は Mean ± SE (n=10) で示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Tg(-), † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, vs Tg(+); Mann-Whitney U test または One-way ANOVA+Fischer's PLSD test。

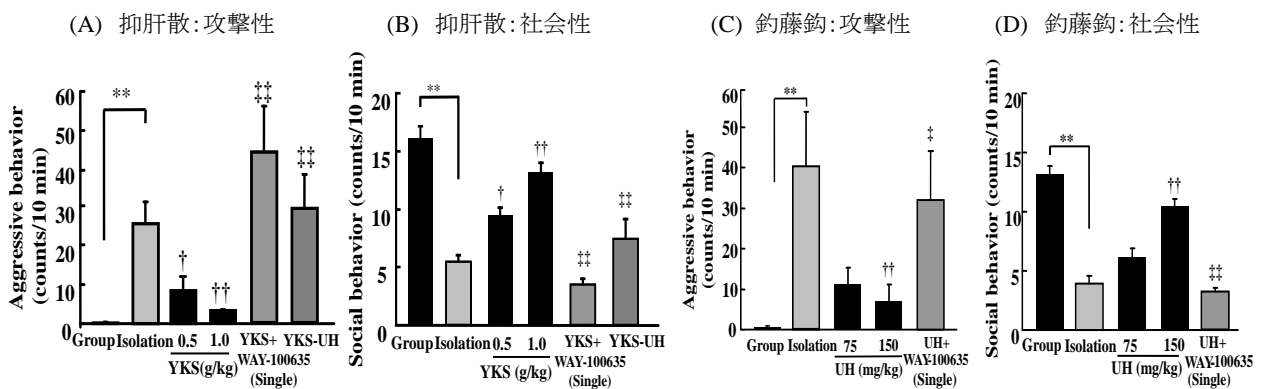


図2 隔離飼育マウスの攻撃行動および社会行動に対する抑肝散および釣藤鈎の改善効果。抑肝散(0.5 および 1.0 g/kg) および釣藤鈎(75 および 150 mg/kg)は隔離4週から6週までの14日間経口投与した。各値は Mean ± SE (n=7~10) で示した。* $p < 0.01$ vs Group, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs Isolation, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs YKS (1.0 g/kg) : Student's t-test または Dunnett's test。

ら、抑肝散の攻撃性および社会性改善作用には 5-HT_{1A} 受容体の活性化が関与し、その作用に構成生薬・釣藤鈎(UH)が寄与していることが示唆された。

第2章 抑肝散の作用機序:培養細胞(*in vitro*)試験

第2章では釣藤鈎に含まれる活性成分を探索するため主要なアルカロイド7成分を対象に *in vitro* 受容体結合試験を行った。その結果、ガイソシジンメチルエーテル(GM)に抑肝散や釣藤鈎と同様の 5-HT_{1A} 受容体に対する強い結合性が認められた。[³⁵S]GTPγS 結合試験で 5-HT_{1A} 受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用を検証した結果、GMは 5-HT_{1A} 受容体に対するパーシャルアゴニスト作用を示すことが示唆された(図3)。

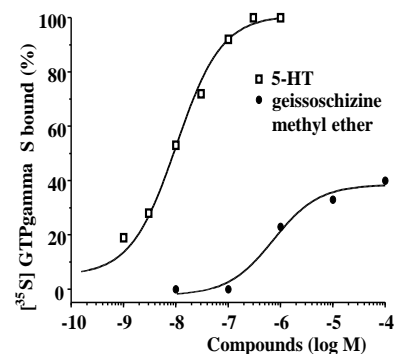


図3 GMの5-HT_{1A}受容体に対するパーシャルアゴニスト活性(CHO-h5-HT1A細胞を用いた[³⁵S]GTPγS結合試験)。各値は2回測定の前平均値で示した。

GM はセロトニンと同様のインドール骨格を有することから 5-HT 受容体の各種サブタイプに対する結合性を調べた。その結果、5-HT₇ 受容体に対しても強い結合性を示した。そこで、5-HT₇ 受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用について、HEK293-h5-HT₇ 細胞の cAMP 産生量を指標に検討したところ、GM は 5-HT で産生される cAMP 量の増加（発行強度は減少）を有意に抑制（発行強度は増加）した。この結果から GM の 5-HT₇ 受容体に対するアンタゴニスト作用が示唆された（図 4）。

以上の結果から、GM は抑肝散の薬効を担う活性成分の一つである可能性が示唆された。

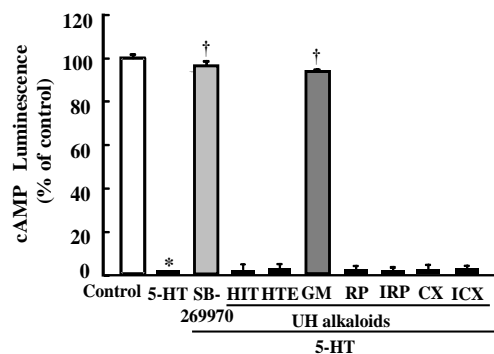


図 4 GM の 5-HT₇ 受容体に対するアンタゴニスト作用。5-HT 誘発 cAMP 産生に対する各被験物質の抑制作用は 100 nM の固定濃度で比較した。cAMP 量は cAMP-Glo assay kit を用いて測定した。各値は Mean ± SE (n = 3)。*P<0.0001 vs Control, †P<0.0001 vs 5-HT: one-way ANOVA + Sheffé's test.

第 3 章 ガイソシジンメチルエーテルの血液脳関門透過性

第 1 章の薬効が第 2 章で証明した活性成分 GM によるものなら、経口投与された抑肝散中の GM は血中に移行し、血液脳関門 (BBB) を通過し脳内に達しなければならない。そこで、第 3 章では GM の BBB 透過性について検討した。

抑肝散をラットに経口投与すると 1 時間後をピークに GM が血漿中に検出された（図 5A）。抑肝散投与量（0.25-4.0 g/kg）と血漿（図 5B）および脳中（図 5C）の GM 検出濃度の関係を投与 1 時間後で調べたところ、血漿および脳から用量依存的に GM が検出された。GM の BBB 透過性を *in vitro* BBB 培養モデルを用いて検討したところ、その透過率は 27.3 % および透過係数 (P_e 値) は 97.2×10^{-6} cm/sec であった。これらの結果から、抑肝散中の GM は、経口投与後、消化管から吸収され血中に移行し BBB を通過して脳に到達することが示唆された。

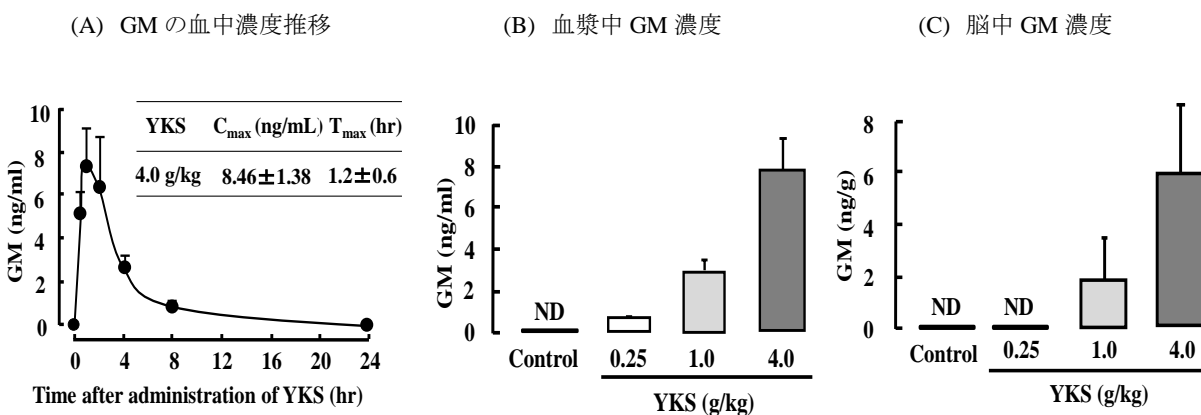


図 5 抑肝散経口投与後の血漿中 GM 濃度推移 (A) と抑肝散経口投与 1 時間後の GM 血漿 (B) および脳組織中濃度 (C)。血漿および脳中の GM は LC-MS/MS-MRM 分析にて測定した。各値は Mean ± S.E. (n=3) で示した。

第4章 GMの薬理効果の検証

抑肝散中のGM含有量でBPSD様症状(攻撃性/社会性)が改善するか否かを隔離飼育マウスを用いて検証した。

GM(150および300 μg/kg、隔離4週から6週までの14日間経口投与)は、抑肝散や釣藤鈎と同様に隔離により誘発された攻撃性の増加および社会性の減少を用量依存的に改善した(図6)。これらの改善効果は抑肝散や釣藤鈎と同じように5-HT_{1A}受容体遮断薬(WAY-100635)により阻止された。この結果はGMが抑肝散の薬理作用を担う成分の一つであることを強く示唆した。

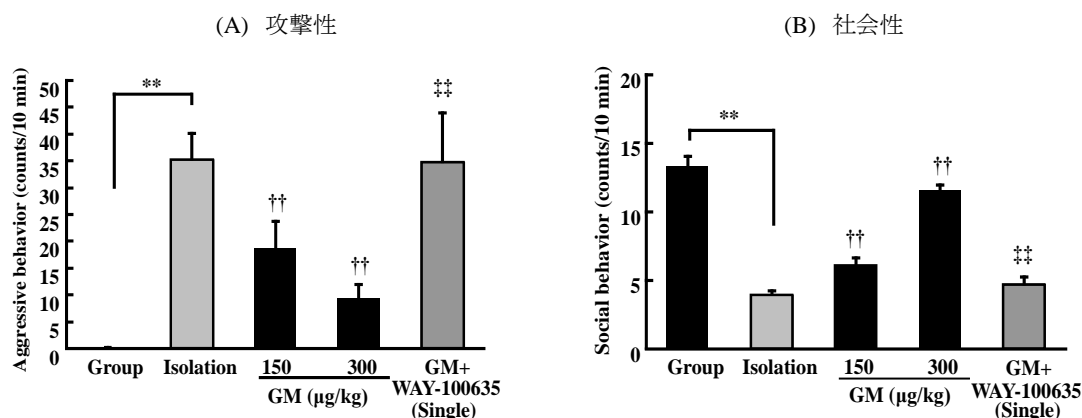


図6 隔離飼育マウスの攻撃性および社会性に対するGMの効果。GM(150および300 μg/kg)は隔離4週から6週までの14日間経口投与した。ソーシャルインタラクション試験は最終日(14日目)の各薬剤投与の60分後に行った。WAY-100635(0.1 mg/kg)はソーシャルインタラクション試験の30分前に腹腔内投与した。各値はMean ± SE (n = 10~29)。**p < 0.01 vs Group, ††p < 0.01 vs Isolation, †††p < 0.01 vs GM(300 μg/kg) : Student's t-test または Dunnett's test。

総括

本研究の成果を図7にまとめた。本論文は「抑肝散が服用されるとその成分であるGMが血中に移行し、BBBを通過し脳内に達する。脳内に達したGMはセロトニン神経の機能異常に対し5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニストおよび5-HT₇受容体アンタゴニストとして作用し、興奮、攻撃性、社会性などのBPSDを改善する」という一連の機序を総括として提唱した。

抑肝散を含む漢方薬は、現代社会において、あらためてその価値が認められてきている。それは、西洋薬では解決できない特異的効果が見出されているためである。本論文で提示した科学的エビデンスが医師および医療従事者に理解され、抑肝散がBPSDで難渋している多くの認知症患者の治療に役立つことを切望する。

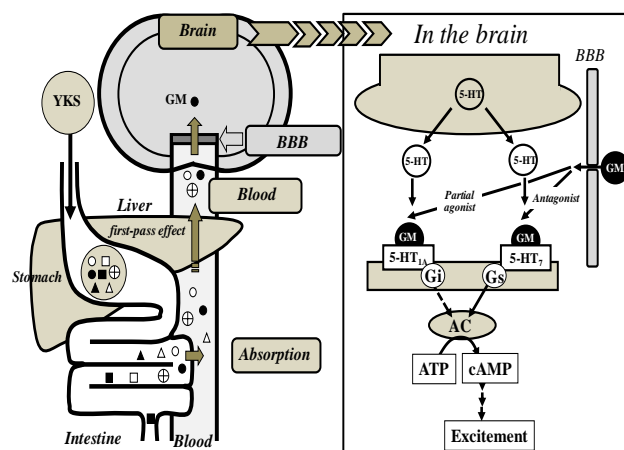


図7 抑肝散のインドールアルカロイド成分・GMのBBB透過性と脳内セロトニン(5-HT)神経系に及ぼす作用

移行性などについて検討した。本論文はそれらの成果を三章に分けてまとめたものである。すなわち、第1章ではアルツハイマー病モデル動物（APP-Tgマウス）および隔離飼育マウスを用いて、抑肝散が攻撃性、社会性、不安および過活動などのBPSD症状および記憶学習障害などの中核症状を改善することを客観的に実証した。更に、抑肝散と同様の効果が構成生薬であるチョウトウコウに認められたことから、抑肝散の効果にはチョウトウコウが寄与していることを示唆した。

第2章では、チョウトウコウに抑肝散と同様な5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用があり、その活性成分がアルカロイド成分のガイソシジンメチルエーテル（GM）であること、およびこの成分が5-HT_{1A}受容体だけでなく5-HT₇受容体に対してアンタゴニスト作用を示すことをヒトの5-HT_{1A}または5-HT₇受容体を発現させたCHO-h5-

H T_{1A} 細胞 や H E K 2 9 3 - h 5 - H T₇ 細胞 を 用 い た
i n v i t r o 試 験 で 明 ら か に し 、 両 作 用 の 相 加
 な い し 相 乗 効 果 が 抑 肝 散 の B P S D 改 善 効 果
 に 関 与 し て い る 可 能 性 を 示 唆 し た 。
 第 3 章 で は 、 第 1 章 で の 抑 肝 散 の 薬 効 (*i n*
v i v o) と 第 2 章 で の 活 性 成 分 G M の 作 用 機
 序 (*i n v i t r o*) を 連 動 さ せ る た め 、 抑 肝 散
 を 経 口 投 与 し た ラ ッ ト の 血 漿 お よ び 脳 か ら
 の G M 検 出 を 試 み た 。 そ の 結 果 、 経 口 投 与
 し た 抑 肝 散 に 含 ま れ る G M が 血 中 に 吸 収 さ
 れ 脳 に 到 達 す る こ と を 明 ら か に し た 。 ま た 、
i n v i t r o B B B 透 過 性 試 験 の 結 果 か ら 、 G M
 の B B B 透 過 性 が 2 7 . 3 % で あ る こ と を 示 し
 た 。 最 後 に 、 G M が 抑 肝 散 の 活 性 成 分 で あ
 る こ と を 成 体 で 検 証 す る た め 、 抑 肝 散 に 含
 ま れ る G M 含 量 を 隔 離 飼 育 マ ウ ス に 投 与 し 、
 攻 撃 性 お よ び 社 会 性 改 善 効 果 を 検 討 し た 。
 G M は 抑 肝 散 や チ ョ ウ ト ウ コ ウ と 同 じ よ う
 に 攻 撃 性 お よ び 社 会 性 を 改 善 し 、 G M が 抑
 肝 散 の 活 性 成 分 で あ る こ と を 強 く 示 唆 し た 。

