

公益財団法人富山第一銀行奨学財団  
理事長 金岡 純二 殿

### 助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 :	950 千円
研究代表者 : 福地 守	所属 : 大学院医学薬学研究部 (薬学)	職位 : 助教
研究題目 : 脳機能改善効果を有する伝統医薬品探索のための新規戦略		

#### 研究概要

近年わが国では、うつ病患者や認知症患者の増加など、脳神経系の疾患の患者の増加が問題視されている。これら疾患による脳機能低下は、患者本人の生活の質の重大な低下を招き、周辺の家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。

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し、その量を増加させることでその薬効を發揮する。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  $Ca^{2+}$  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發揮し、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ものが期待されている。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。そこで本研究では、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

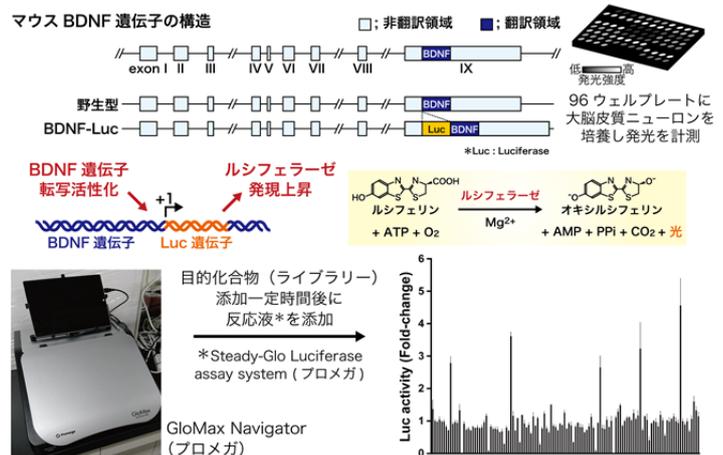


図 1 BDNF 遺伝子発現誘導剤の新規スクリーニング方法

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。そこで本研究では、BDNF 遺伝子発現を活性化する伝統医薬品を探索し、脳の機能性に与える影響を検討した。

## 成果要約

### (1) 生薬エキスを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 120 種類の生薬エキスについて、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、生薬エキスを添加（終濃度：500  $\mu\text{g/mL}$ ）し、6、24、48 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、120 種類の生薬エキスのうち、11 種類の生薬エキスに BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められることが明らかとなった（図 2）。また、この 11 種類の生薬エキスをラット大脳皮質神経細胞初代培養系に添加後、RNA を抽出し、内在性 BDNF mRNA 発現変化を RT-qPCR 法を用いて検討した結果、それぞれの生薬エキス添加によって BDNF mRNA 発現が増加した。

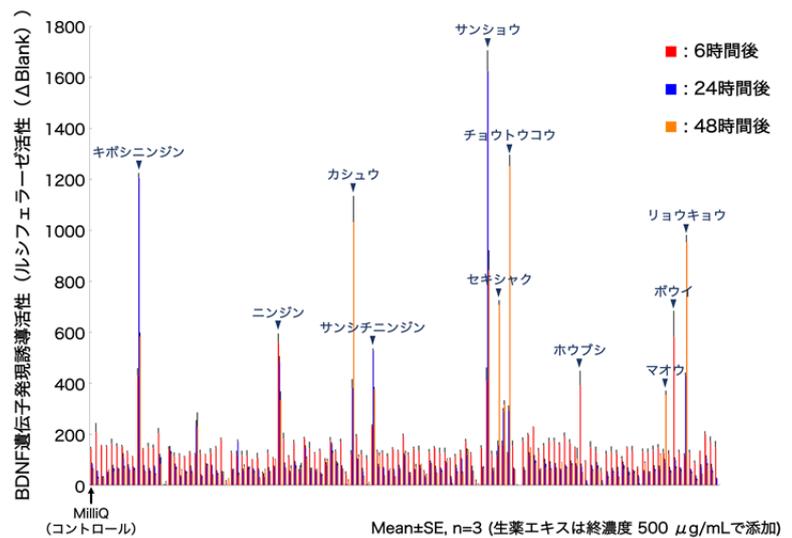


図 2 BDNF 遺伝子発現を誘導する生薬エキスの探索

### (2) 人参、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参、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 マウスに人参、山椒、釣藤鈎エキスのいずれかを 200 mg/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 3）。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、人参エキス投与群ではコントロール群と比較し

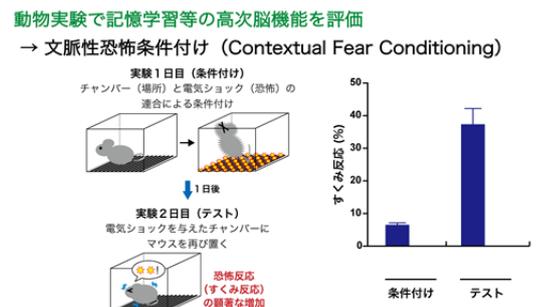


図 3 文脈性恐怖条件付け試験の概要

て変化は認められなかった (図4)。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4)。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。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、人参エキス投与群では認められなかった (図5)。したがって、人参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、山椒や釣藤鈎エキス投与群では認められなかった (図5)。まだ予備的な結果ではあるが、人参エキスを投与した

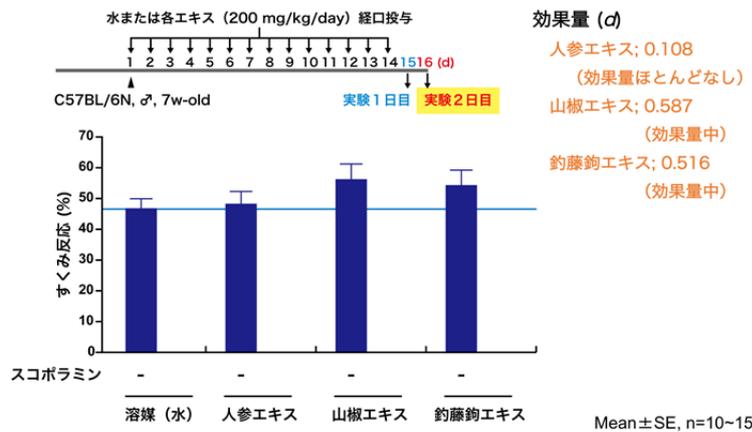


図4 人参、山椒、釣藤鈎エキスがマウスの記憶学習に与える影響

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。

以上の結果より、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。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。

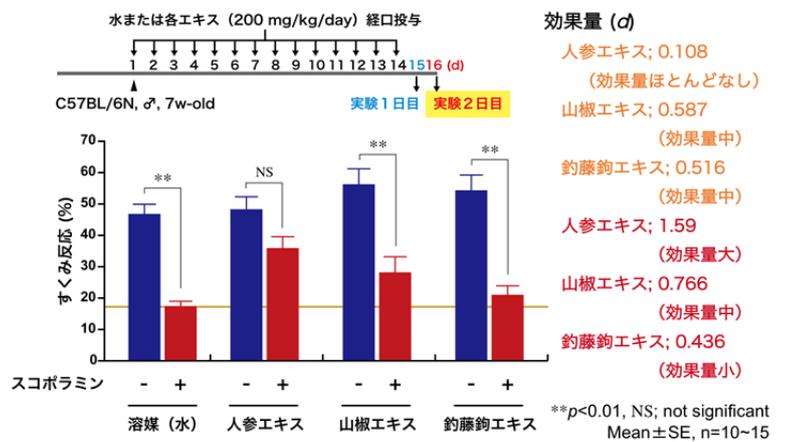


図5 記憶学習障害に対する人参、山椒、釣藤鈎エキスの効果

<p>研究成果 発表状況</p>	<p><b>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・学会発表など</li> </ul> <p>第38回日本生物学的精神医学会 第59回日本神経化学会大会 合同大会での口頭発表  <u>福地 守</u>、前畑 陽祐、森 寿、牧 昌次郎、田淵 明子、津田 正明</p> <p>BDNF-Luc マウスを利用した BDNF 遺伝子発現変化の可視化および BDNF 遺伝子発現誘導剤の探索</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・市民講座など</li> </ul> <p>“きときと脳作り” 市民参加型ミニシンポジウム第1回「神経栄養因子 BDNF を増やして認知症予防を！」での講演  <u>福地 守</u></p> <p>脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現から抗認知症戦略を考える</p>		
<p>経費の 執行状況</p>	<p style="text-align: center;">区 分</p> <p><b>【物品費】</b>            実験動物（マウス）            実験用消耗品            実験用試薬類            実験機器</p> <p><b>【旅費】</b>            なし</p> <p><b>【謝金】</b>            なし</p> <p><b>【その他】</b>            なし</p> <p style="text-align: right;">合計</p>	<p style="text-align: center;">執行額（円）</p> <p style="text-align: right;">42,240 円            312,944 円            316,608 円            278,208 円</p> <p style="text-align: right;">950,000 円</p>	<p style="text-align: center;">備 考</p>