

博士論文(2021年3月)内容の要旨および審査結果の要旨

鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科

氏名 ^{みやざき}宮崎 ^{しょうへい}翔平

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博(薬)甲第 9号

学位授与の日付 令和3年3月12日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目「不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキス及びその含有成分の高不安作用に関する研究—行動及び自律神経活動に基づく薬理学的検討—」

論文審査委員(主査) 教授 里見 佳子 医学博士

(副査) 教授 大倉 一人 薬学博士、博士(工学)

教授 三輪 高市 博士(薬学)

准教授 郡山 恵樹 博士(薬学)、博士(医学)

准教授 坂 晋 博士(薬学)

論文要旨

氏名	宮崎翔平
----	------

論文の題名

不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキス及びその含有成分の抗不安作用に関する研究
—行動及び自律神経活動に基づく薬理的検討—

論文の要旨

外部環境の変化によって引き起こされるストレスは、自律神経系と視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸に影響を与える。自律神経は交感神経と副交感神経の 2 つに分類される。不安などの精神的ストレスは交感神経の活性化を誘導し、副交感神経を抑制する。慢性的なストレス (長期的な不安など) は、HPA 軸と交感神経の持続的な活性化を介してストレス性胃潰瘍やうつ病を誘発する。また、うつ病などの気分障害やストレス関連障害の総患者数は年々増加していることに加え、軽度で未治療の患者が多くいることなど医療費に表れない社会的損失が大きい。さらに高血圧や糖尿病などの生活習慣病と同様に早期発見・早期介入によって重症化を予防できることが示唆されている。そこで日常生活におけるストレスを和らげることによってストレスに起因した疾患の発症や重症化などを未然に防ぐことが重要であると考えられる。

神経新生に関わる脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、海馬での過剰発現により不安様行動を減弱することが知られている。また、BDNF はコルチコステロン投与やストレスにより海馬での発現量が減少しており、BDNF/TrkB シグナルが抗うつ薬の作用発現に重要であることが報告されている。このことから、ストレスの緩和において海馬 BDNF/TrkB シグナルの活性化が重要である可能性が示唆された。

エゾウコギ (*Acanthopanax senticosus* HARMS: ASH) は、ロシア、中国、日本 (北海道) などの寒冷な地域に自生するウコギ科の落葉低木である。『神農本草経』や『本草綱目』などの古典的な本草学の文献に記載されており、中国では 2000 年以上も前から滋養強壮や精神安定、関節リウマチの治療などに用いられてきた。近年、ASH はアダプトゲンとしてストレスや疲労に対する抵抗力を高めることが報告されており、欧米諸国では代替医療において広く利用されている。ASH には胃潰瘍発症抑制作用や抗うつ効果があることが報告されている。しかし、ASH の心理的ストレスに対する影響についてはエビデンスが十分ではない。

そこで本論文では、不安高感受性ラットへの ASH エキス及びその含有成分の経口投与による抗不安作用を行動薬理的・自律神経学的に検討し、海馬 BDNF/TrkB シグナルへ与える影響について明らかにすることを目的とした

第 1 章 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキスの抗不安作用及び海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響

新奇環境摂食抑制 (NSF) 試験及び高架式十字迷路 (EPM) 試験の改良版である改良型高架

(IEBW) 試験を用いてその行動を評価し、また行動薬理試験時の心電図の心拍変動解析による自律神経活動を評価し、不安高感受性ラットにおける ASH の抗不安作用を検討した。また、海馬 BDNF/TrkB シグナル関連タンパク質発現解析を行った。NSF テストにおいて ASH エキスは、新奇環境における摂食行動への影響を緩和した。また、5%ASH エキス投与は、自律神経安定化作用を示した。次に IEBW 試験において、ASH エキスは、不安高感受性ラットにおいて抗不安様行動を示し、IEBW による交感神経活動の亢進や副交感神経活動の抑制を改善した。さらに ASH5% 投与は、海馬 BDNF/TrkB シグナルを活性化することが明らかになった。

以上の結果から、抗不安作用を有する ASH エキスは、精神的ストレスに起因した疾患に対して有益なサプリメントもしくは予防薬となり得ることが示唆された。

第 2 章 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキス含有成分の抗不安作用及び海馬 BDNF/TrkB への影響

第 1 章では、不安高感受性ラットにおける ASH エキスの抗不安作用が明らかとなった。そこで、ASH エキスの含有成分の中でも含有量が多いエレウテロサイド E (syringaresinol di-O-β-D-glucoside: SYG)、クロロゲン酸 (CHA) について、オープンフィールド試験 (OFT) 及び IEBW 試験を用いて行動及び自律神経活動を評価し、不安高感受性ラットにおける SYG の抗不安作用を検討した。また、ASH エキスと同様に海馬 BDNF/TrkB シグナル関連タンパク質発現解析を行った。さらに、SYG と CHA に次いで含有量の多いシリンギン (SYR) 及びイソフラキシジン (ISO) について不安高感受性ラットにおける IEBW 試験での行動及び自律神経活動を評価し、抗不安作用について検討した。OFT において SYG と CHA は単独では有意な変化をもたらさなかったが、SYG と CHA の組み合わせでは ASH エキスと同様にオープンフィールドによる行動抑制を有意に改善した。また、SYG は IEBW による交感神経活動の亢進や副交感神経活動の抑制を改善し、CHA は IEBW 上での行動を改善した。さらに SYG と CHA は組み合わせることで、OFT 及び IEBW 試験において ASH エキスの結果と非常に似た結果を示した。IEBW 試験において SYR は行動及び自律神経活動の面において部分的に ASH エキスの抗不安作用に寄与している可能性が示唆された。ISO は、第 1 章での ASH エキスの摂取量に基づいた投与量では、有意な変化をもたらさなかった。

今回の実験では、CHA と SYG の組み合わせのみしか検討できなかったが、ISO なども他の成分と組み合わせることで抗不安作用を示す可能性が考えられるため、含有成分の組み合わせに関する研究も行っていく必要がある。

以上の結果から、ASH は心理的ストレスに有効であり、その有効成分としては SYG と CHA である可能性が示唆された。また、SYR の部分的な寄与の可能性も示唆された。限られた副作用しか持たない ASH は、メンタルストレスに対するサプリメントや予防薬として非常に優れている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

【判定結果】

当委員会は、宮崎翔平氏による学位申請論文の審査及び口述による諮問を行った結果、博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判断した。

【判定理由】

本論文で申請者は、不安に感受性の高いラットを用いて、エゾウコギ及びその成分の抗不安作用について解析した。エゾウコギは、ロシア、中国、韓国、日本（北海道）などの寒冷地に自生している落葉低木で、中国では古くから滋養強壮や関節リュウマチなどに用いられてきた。近年、エゾウコギはストレスや疲労に対する抵抗力を高めることが報告され、欧米では代替医療において利用されている。しかし、精神的ストレスに対する作用については十分な研究がなされていないことから、本論文では、精神的ストレスを測定できる実験系を用いて、ラットにおけるエゾウコギの抗不安作用について解析するとともに、その作用機序の一端を示した。

申請者は、まず精神的ストレスをより正確に測定するために新規の実験系の構築に取り組んだ。ストレスの評価は、ラットに埋め込んだ生体電位送信機の心電図データから心拍変動を解析し、自律神経活動（副交感神経活動・交感神経活動）の変化を評価することで行った。予備実験として、高所ストレスの系として従来から使用されている高架型十字迷路で自律神経活動を評価したところ、ばらつきが大きく飼育ケージとの差が見られなかった。そこで、装置の高さを高くするなどの改良を加えた改良型高架試験装置（IEBW 装置）を作製して評価したところ、飼育ケージと比較して有意な変化が観察されたため、IEBW 装置を使用して実験を行うことにした。また、不安行動の測定系として良く用いられている新奇環境摂食抑制試験、あるいはオープンフィールド試験における行動観察も行った。さらに、ラットの個体差を最小限とするために、IEBW 試験の成績から個性判別を行い、不安に対する感受性が高いと考えられるラットを選別して実験を行った。また、ストレスや精神疾患への関与が報告されている脳由来神経栄養因子（BDNF）、BDNF の受容体である Tyrosine kinase receptor B (TrkB)、BDNF/TrkB シグナルの下流因子である cAMP response element-binding protein (CREB) の海馬における発現をウエスタンブロット法及び免疫染色法により解析した。

申請者は、上記の実験系を用いて、まず経口摂取によるエゾウコギエキスの抗不安作用を解析した。その結果、エゾウコギは IEBW 装置のオープンアーム滞在時間を延長させ、交感神経活動亢進の抑制と副交感神経活動低下の抑制を示した。また、新奇環境摂食抑制試験においても、エゾウコギはラットの摂食抑制行動を緩和した。つまり、エゾウコギは、不安行動の軽減と自律神経活動の安定化をもたらすことがわかった。

次に、エゾウコギの作用機序解明にむけて、海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響を調

べた。エゾウコギは、BDNFの発現を増強し、TrkBとCREBのリン酸化を促進した。BDNFの発現増加は、海馬の免疫染色においても確認された。このことより、エゾウコギの抗不安作用には、BDNF/TrkBシグナルの活性化が関与していることが示唆された。

そこで、続いてエゾウコギの抗不安作用に関与する成分の同定に取り組むこととし、エゾウコギの主要な成分として知られているクロロゲン酸(CHA)、エレウテロサイドE(SYG)、イソフラキシジン(ISO)、エレウテロサイドB(SYR)及び含量の多いCHAとSYGの混合物(Mix)について解析した。

オープンフィールド試験では、CHAとSYGは単独では効果が見られなかったが、Mixでは移動時間や移動距離の延長と行動抑制の改善が見られた。IEBW試験において、Mixはオープンアームでの滞在時間を延長させ、交感神経活動亢進の抑制、副交感神経活動低下の抑制を示した。この結果は、エゾウコギエキスの結果と同じであった。一方、CHAはオープンアームでの滞在時間は延長させたが、自律神経活動への影響はみられず、SYGはオープンアームでの滞在時間には影響しなかったが、自律神経活動を改善した。このことから、エゾウコギエキスの抗不安作用において、CHAの不安行動抑制作用とSYGの自律神経安定化作用が複合的に関与していることが示唆された。

比較的含量の少ないISOとSYRでは、SYRのみIEBW試験でのオープンアーム滞在時間の延長と副交感神経活動の改善を示した。よって、エゾウコギエキスの抗不安作用において、SYRの寄与はあるが、ISOの寄与は少ないと考えられた。

最後にエゾウコギの抗不安作用への関与が大きいと考えられるCHAとSYGについて、海馬BDNF/TrkBシグナルへの影響を解析した。Mixでは、エゾウコギエキと同じくBDNFの発現増加、TrkBとCREBのリン酸化促進が見られたが、SYGではBDNFの発現増加とCREBのリン酸化促進のみが見られ、CHAでは変化が見られなかった。またMixとSYGのBDNF発現誘導は、海馬の免疫染色でも確認された。よって、エゾウコギの抗不安作用において、SYGはBDNF/TrkBシグナル活性化を介して作用していることが示唆された。

以上の結果から、エゾウコギはストレス下において抗不安作用や自律神経活動の安定化をもたらし、作用機序として海馬BDNF/TrkBシグナルの活性化が関与していることが示された。含有成分の中で、CHAは抗不安様行動の誘導に、SYGは自律神経活動の安定化と海馬BDNF/TrkBシグナルの活性化に、SYRは抗不安様行動の誘導と副交感神経活動の低下抑制に、それぞれ寄与していることが示された。

以上のように、本論文はエゾウコギの抗不安作用を明らかにし、その有効成分としてCHA、SYGとSYRが考えられることを示すとともに、作用機序として海馬BDNF/TrkBシグナルの活性化が関与していることを示したものであり、薬学において価値のある研究と認めた。