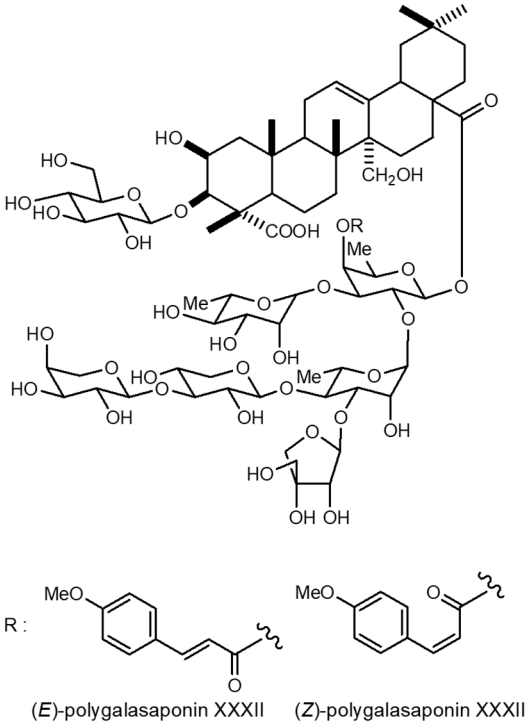
| 105　オンジ由来GDNF発現誘導化合物の抗うつ作用の解析 | 荒木　良太 |
|---|---|

**【目的】**イトヒメハギの根を乾燥させた生薬であるオンジは、古来より精神を安定させる作用を有するものとして、漢方薬の構成生薬に使用されてきた。最近では、もの忘れ改善作用を期待した一般用医薬品としてオンジの抽出エキスが販売されるなど、オンジは中枢神経系の機能異常を改善する生薬として知られている。我々はこれまでに動物を用いた検討から、オンジ抽出エキスが抗うつ様作用を有すること、側坐核や海馬においてグリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）の発現を誘導すること、神経細胞の樹状突起スパインの成熟を促進することを示してきた。GDNF は、うつ病患者の血清中において有意に減少していることや、抗うつ薬により発現が誘導されることから、オンジ抽出エキスの抗うつ様作用に GDNF の発現誘導が大きく寄与するものと想定される。そこで本研究では、オンジ抽出エキスに含まれる GDNF 発現誘導活性を有する化合物を同定するために、GDNF 産生細胞であるラット脳由来アストロサイトを用いて、GDNF mRNA 発現量の変化を指標に成分の分画を行った。

**【方法】**3 日齢の Wistar rat の大脳皮質から振盪法により単離したアストロサイトを実験に用いた。評価化合物を添加した 6 時間後に定量的 RT-PCR 法により、GDNF の mRNA 発現量を解析した。

**【結果】**GDNF の mRNA 発現量の変化を指標に、オンジ抽出エキスから GDNF 発現誘導活性を有する化合物の探索を行った。その結果、強力な GDNF mRNA 発現誘導活性を有する化合物として polygalasaponin XXXⅡ（PS32）を得た。PS32 にはフェニルプロパノイド部分の立体構造の違いにより *E* 体（*E*-PS32）と *Z* 体（*Z*-PS32）の二つの立体異性体が存在するが、*Z*-PS32 と比べて *E*-PS32 でより強い GDNF mRNA 発現誘導活性が見られた。*E*-PS32 をアルカリ加水分解し、フェニルプロパノイド部分を除いた desacyl PS32 とフェニルプロパノイド部分である (*E*)-4-methoxycinnamic acid（*E*-methoxy CA）に分離したところ、*E*-methoxy CA は *E*-PS32 よりは弱いものの GDNF mRNA 発現誘導活性が見られたのに対し、desacyl PS32 は GDNF mRNA 発現誘導活性を示さなかった。また、*E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性は、NF-κB 阻害剤により減弱した。以上の結果から、生薬のオンジは、含有成分 *E*-PS32 のフェニルプロパノイドを含む部分構造により、NF-κB の活性化を介して GDNF 発現誘導活性を示す可能性が示された。

(*E*/*Z*)-polygalasaponin XXXⅡの構造



# 105. オンジ由来 GDNF 発現誘導化合物の抗うつ作用の解析

荒木　良太

摂南大学 薬学部 複合薬物解析学研究室

Key words：オンジ，GDNF，アストロサイト，うつ病

## 緒　言

近年、うつ病などの気分障害の患者数は著しく増加しており、最新の調査における本邦の気分障害患者数は 127.6 万人と過去最高である（平成 29 年厚生労働省「患者調査」）。世界に目を向けてみても、最近 10 年間でうつ病の患者数が 18%増加するなど、うつ病患者の急増は国際的にも大きな健康問題となっている。

イトヒメハギの根を乾燥させた生薬であるオンジは、古来より精神を安定させる作用を有するものとして、漢方薬の構成生薬に使用されてきた。最近では、もの忘れ改善作用を期待した一般用医薬品としてオンジの抽出エキスが販売されるなど、オンジは中枢神経系の機能異常を改善する生薬として知られている。我々はこれまでに動物を用いた検討から、オンジ抽出エキスが抗うつ様作用を有すること、側坐核や海馬においてグリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）の発現を誘導すること、神経細胞の樹状突起スパインの成熟を促進することを示してきた［1］。GDNF は、うつ病患者の血清中において有意に減少していることや［2］、いくつかの抗うつ薬により発現が誘導されることが報告されている神経栄養因子であることから［3］、オンジ抽出エキスの抗うつ様作用に GDNF の発現誘導が大きく寄与するものと想定される。

そこで本研究では、オンジ抽出エキスに含まれる GDNF の発現誘導活性を有する化合物を同定するために、GDNF 産生細胞であるラット脳由来アストロサイトを用いて、GDNF mRNA 発現量の変化を指標に成分の分画を行った。

## 方法および結果

### 1.　GDNF mRNA 発現量の変化を指標にしたオンジ抽出エキス中の活性成分の探索

GDNF の mRNA の発現量の変化を指標に、オンジのメタノール抽出エキスを図 1a のように分画し、GDNF 発現誘導活性を有する化合物の探索を行った。GDNF 発現誘導活性は、3 日齢の Wistar rat の大脳皮質から振盪法により単離したアストロサイトを用い、評価化合物を添加した 6 時間後の GDNF mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により解析することで評価した。その結果、強力な GDNF mRNA 発現誘導活性を有する化合物として polygalasaponin XXXⅡ（PS32）を得た（図 1b）。PS32 にはフェニルプロパノイド部分の立体構造の違いにより *E* 体（*E*-PS32）と *Z* 体（*Z*-PS32）の二つの立体異性体が存在する。そこで、*E*-PS32 と *Z*-PS32 で GDNF mRNA 発現誘導活性に違いが見られるのかを解析した。その結果、*E*-PS32 でより強い GDNF mRNA 発現量の増加が見られた（図 2a）。一方で、同じオンジに含有される主要なサポニンである onjisaponin B には PS32 のような GDNF mRNA 発現量の増加は見られなかった（data not shown）。PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性は、フェニルプロパノイド部分の *E*/*Z* 配置に大きく左右されることから、GDNF mRNA 発現誘導活性にはフェニルプロパノイド部分が重要であるものと考えられる。そこで、*E*-PS32 をアルカリ加水分解し、フェニルプロパノイド部分を除いた desacyl PS32（図 1B の R：H）とフェニルプロパノイド部分である(*E*)-4-methoxycinnamic acid（*E*-methoxy CA）に分離し、それぞれの部分構造が GDNF mRNA 発現量に与える影響を解析した。その結果、*E*-methoxy CA は *E*-PS32 よりは弱いものの有意な GDNF mRNA 発現量の増加を示したのに対し、desacyl PS32 は GDNF mRNA 発現量を変化させなかった（図 2b）。

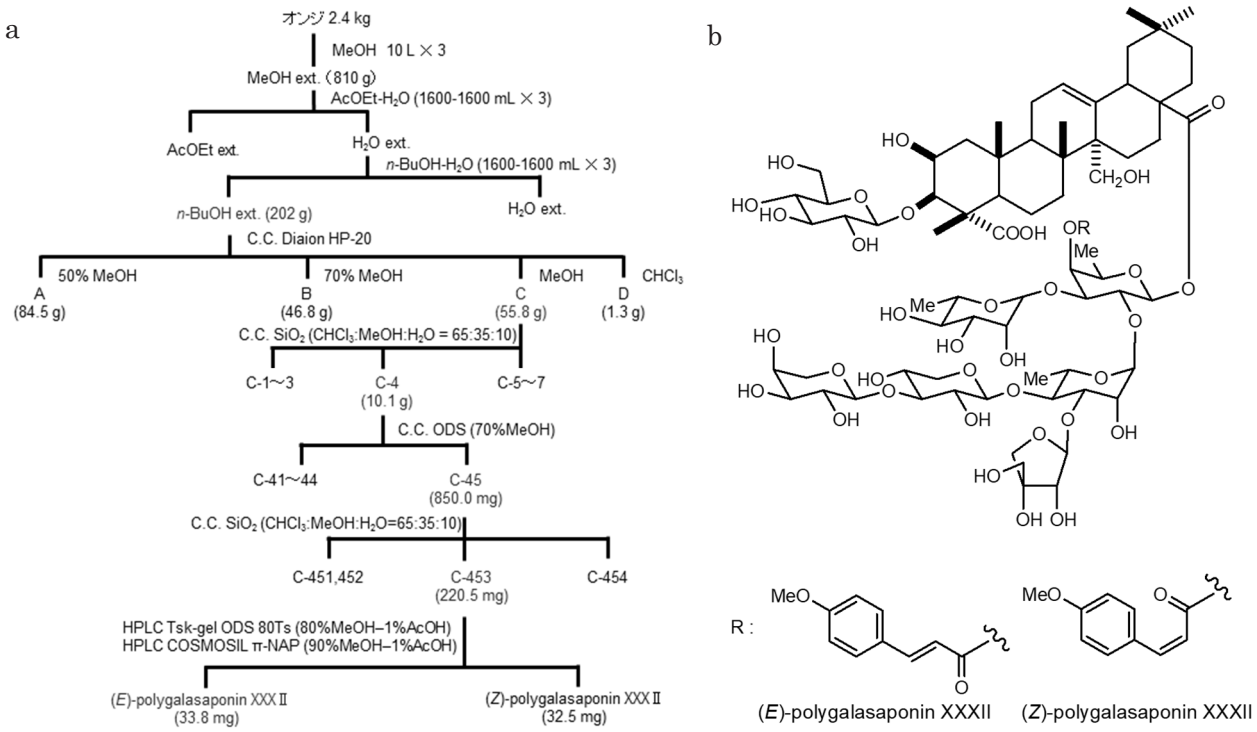



図 1. オンジ抽出エキスの分画概略図と polygalasaponin XXXⅡの構造

a）オンジ抽出エキスの分画概略図。

b）polygalasaponin XXXⅡの構造。

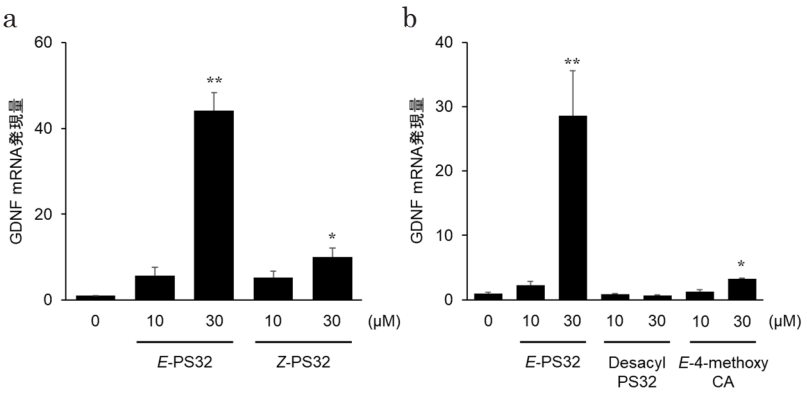



図 2. PS32 の立体異性体および部分構造の GDNF mRNA 発現誘導活性

a） 培養ラットアストロサイトに *E*-PS32（10、30 μM）および *Z*-PS32（10、30 μM）を添加した 6 時間後に RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法により GDNF mRNA 発現量を測定した。その結果、*Z*-PS32（30 μM）と比べて *E*-PS32（30 μM）でより強い GDNF mRNA 発現量の増加が見られた。一元配置分散分析（$F_{(4,10)} = 55.10$、$P < 0.0001$.）の後に多重比較検定として Dunnett 検定を行い、$P < 0.05$ のものを有意差ありとした。*$P < 0.05$, **$P < 0.01$ vs 対照群。n = 3。

b） 培養ラットアストロサイトに Desacyl PS32（10、30 μM）および *E*-4-methoxy CA（10、30 μM）を添加した 6 時間後に RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法により GDNF mRNA 発現量を測定した。その結果、*E*-PS32（30 μM）よりは弱いものの、*E*-4-methoxy CA（30 μM）において GDNF mRNA 発現量の増加が見られた。一方で、Desacyl PS32（10、30 μM）では GDNF mRNA 発現量の増加は見られなかった。一元配置分散分析（$F_{(6,14)} = 15.38$、$P < 0.0001$.）の後に多重比較検定として Dunnett 検定を行い、$P < 0.05$ のものを有意差ありとした。*$P < 0.05$、**$P < 0.01$ vs 対照群。n = 3。

**2. *E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性における NF-κB および LPA1 受容体の関与**

NF-κB は細胞の生存や炎症に関連するさまざまな遺伝子を活性化させる転写因子として知られている。これまでにアストロサイトにおける GDNF の発現は NF-κB の活性化により誘導されることが報告されていることから［4］、*E*-PS32 による GDNF mRNA 発現誘導活性に NF-κB の活性化が関与する可能性が考えられる。そこで、NF-κB 阻害剤である JSH-23（Cayman Chemical Company, MI, USA）の前処置が *E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性に与える影響を解析した。JSH-23（10μM）を *E*-PS32 添加の 30 分前に添加したところ *E*-PS32 による GDNF mRNA 発現誘導が完全ではないものの有意に抑制された（図 3）。

また、近年、種々の選択的セロトニン再取り込み阻害薬や三環系抗うつ薬がアストロサイトのリゾホスファチジン酸受容体 1（LPA1 受容体）を介して、GDNF の発現を誘導することが示唆されていることから［5］、*E*-PS32 による GDNF mRNA 発現誘導活性に LPA1 受容体が関与する可能性も考えられる。そこで、LPA1 受容体遮断薬である Ki16425（Cayman Chemical Company, MI, USA）の前処置が *E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性に与える影響を解析した。Ki16425（10μM）を *E*-PS32 添加の 30 分前に添加したところ、*E*-PS32 による GDNF mRNA 発現誘導は変化が認められなかった（図 3）。

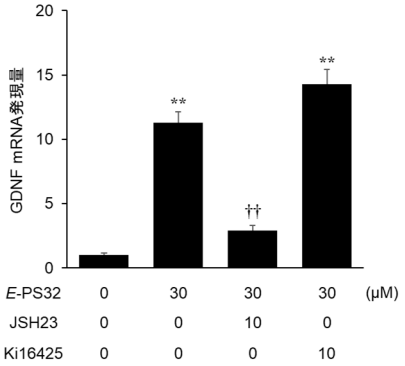



図 3. *E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性における NF-κB および LPA1 受容体の関与

培養ラットアストロサイトに *E*-PS32（30μM）を添加した 6 時間後に RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法により GDNF mRNA 発現量を測定した。JSH23（10μM）および Ki16425（10μM）は *E*-PS32 添加の 30 分前に添加した。その結果、*E*-PS32 による GDNF mRNA 発現量の増加は、JSH23 の前処置により有意に抑制された。一方で、Ki16425 の前処置は *E*-PS32 による GDNF mRNA 発現増加になんら影響を及ぼさなかった。一元配置分散分析（$F_{(3,8)} = 75.05$、$P < 0.0001$.）の後に多重比較検定として Tukey-Kramer 検定を行い、$P < 0.05$ のものを有意差ありとした。**$P < 0.01$ vs 対照群、††$P < 0.01$ vs *E*-PS32（30μM）JSH23（0μM）Ki16425（0μM）群。n = 3。

## 考　察

本研究では、生薬のオンジに含まれるサポニンである *E*-PS32 が GDNF の発現を強く誘導することを見出した。また、*E*-PS32 の立体異性体である *Z*-PS32 は *E*-PS32 と比べて GDNF mRNA 発現誘導活性が弱いことから、*E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性にはフェニルプロパノイド部分の *E/Z* 配置が寄与するものと考えられた。GDNF mRNA 発現誘導活性において重要と考えられるフェニルプロパノイド部分を *E*-PS32 から除去した desacyl PS32 では GDNF mRNA 発現誘導が全く見られなかったことからも、活性におけるフェニルプロパノイド部分の重要性がうかがえる。一方で、*E*-PS32 のフェニルプロパノイド部分である *E*-4-methoxy CA は GDNF mRNA 発現誘導活性を示したものの、その活性は *E*-PS32 よりも弱かった。本結果から、*E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性はフェニルプロパノイド部分のみで説明できるものではなく、その他の構造も必要である可能性が考えられた。オンジ抽出エキスや生薬オンジを含む漢方薬を服用する場合、その投与経路は経口投与となることから、*E*-PS32 のような配糖体は腸内細菌などにより糖鎖部分が分解されることも多い。*E*-PS32 の場合、糖鎖部分が分解されることで、フェニル

プロパノイド部分にいくつかの糖鎖が結合した化合物に代謝され、その代謝産物が吸収されて中枢神経系に移行することも十分に考えられる。こうしたことからも、*in vivo* において GDNF の発現を誘導している化合物は、フェニルプロパノイド部分を含む *E*-PS32 の代謝産物である可能性が考えられる。現在、*in vivo* 実験に用いるのに十分な量の *E*-PS32 を単離しており、今後、*E*-PS32 およびその代謝産物の体内動態の解析を行うことを検討している。

また本研究から、*E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性には、NF-κB の活性化が関与する一方で LPA1 受容体は関与しない可能性が示された。NF-κB は GDNF の発現誘導、細胞の増殖や生存、シナプスの形成などに関与する一方で［6］、炎症性サイトカインの産生にも関与することが知られていることから、*E*-PS32 により炎症が誘発されている可能性も考えられる。*E*-PS32 による炎症の誘発の有無を明らかにすることが今後の検討課題の一つとして挙げられる。LPA1 受容体は、シグナル分子として働くリン脂質誘導体であるリゾホスファチジン酸の受容体であり、抗うつ薬による GDNF 発現誘導に関与する分子として報告されている［5］。しかしながら、*E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性に LPA1 受容体は関与しないことから、*E*-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導の作用機序は抗うつ薬とは異なるものと考えられる。今後は、*E*-PS32 のみならず、GDNF mRNA 発現誘導活性を示す *E*-PS32 代謝産物において、その作用機序を追究する予定である。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室の矢部武士教授、稲冨由香助教である。

## 文　献

1) Araki R, Fujiwara H, Matsumoto K, Toume K, Yabe T. Polygalae radix extract ameliorates behavioral and neuromorphological abnormalities in chronic corticosterone‐treated mice. Tradit Kampo Med. 2018 Oct 3;5(2):89-97. Epub 2018 Jun 1. DOI: 10.1002/tkm2.1198

2) Lin PY, Tseng PT. Decreased glial cell line-derived neurotrophic factor levels in patients with depression: a meta-analytic study. J Psychiatr Res. 2015 Apr;63:20-7. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25726496 DOI: 10.1016/j.jpsychires.2015.02.004

3) Hisaoka K, Nishida A, Koda T, Miyata M, Zensho H, Morinobu S, Ohta M, Yamawaki S. Antidepressant drug treatments induce glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) synthesis and release in rat C6 glioblastoma cells. J Neurochem. 2001 Oct;79(1):25-34. PMID: 11595754 DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00531.x

4) Appel E, Kolman O, Kazimirsky G, Blumberg PM, Brodie C. Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. Neuroreport. 1997 Oct 20;8(15):3309-12. PMID: 9351662 DOI: 10.1097/00001756-199710200-00023

5) Kajitani N, Miyano K, Okada-Tsuchioka M, Abe H, Itagaki K, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Uezono Y, Takebayashi M. Identification of Lysophosphatidic Acid Receptor 1 in Astroglial Cells as a Target for Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Expression Induced by Antidepressants. J Biol Chem. 2016 Dec 30;291(53):27364-27370. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27864362 DOI: 10.1074/jbc.M116.753871

6) Boersma MC, Dresselhaus EC, De Biase LM, Mihalas AB, Bergles DE, Meffert MK. A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. J Neurosci. 2011 Apr 6;31(14):5414-25. PMID: 21471377 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2456-10.2011