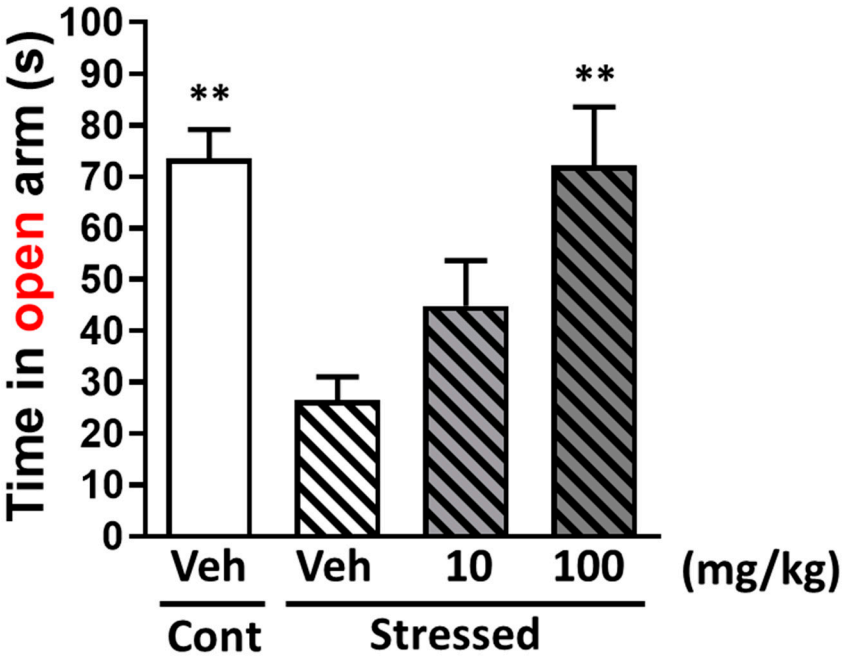
10　神経回路網再構築を介した根本的不安障害治療法の確立	久保山　友晴

【目的】不安障害の治療には、ストレス要因の除去と共に、選択的セロトニン再取り込み阻害薬や、ベンゾジアゼピン系薬物が用いられるが、難治性の患者が一定数存在する。私は、不安障害では軸索や樹状突起の萎縮による神経回路網の破綻が生じ、器質的な要因により脳機能に障害が生じるのではないかという仮説を立てた。もしそうだとすれば、既存の抗不安薬は、モノアミンの量を増やしたり GABA 受容体を刺激したりするシナプス機能調節を目的としたものであるため、もし器質的障害が生じていた場合は、一時的に症状を改善させたとしても、根本的に治療することが困難となっている可能性がある。そこで軸索や樹状突起を伸長させ、神経回路網を再構築することができれば、脳機能が回復し、根本的に不安障害を治療できるのではないか、と考えた。本研究は、この仮説を証明することを目的とした。

【方法】初代培養神経細胞に生薬 X エキスを処置し、軸索・樹状突起伸長作用を検証した。また、新規不安障害モデルマウスを作製し、フルオキセチンおよび生薬 X エキスの作用を検証した。さらに、生薬 X エキス投与後のマウスの脳組織を解析し、軸索密度が変化したかどうか、検証した。

【結果】生薬 X エキスは、初代培養神経細胞において、軸索・樹状突起伸長作用を示した。私は新規ストレス負荷を考案し、本ストレスをマウスに 14 日間負荷したところ、不安様行動を示した。本不安様行動は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬・フルオキセチンでは改善しなかった。一方、生薬 X エキス投与により、本不安様行動は改善した。さらに組織解析を行った結果、生薬 X エキス投与により前辺縁皮質において軸索密度が増加する傾向が見られた。以上のことから生薬 X エキスは、軸索伸長を誘発して神経回路網を再構築し、抗不安作用を示したと考えられた。今後生薬 X が軸索・樹状突起を伸長する機序を明らかにし、その機序を阻害した時に抗不安作用が消失するのかどうかを検証する予定である。これにより、神経回路網再構築による不安障害治療の可能性を示したい。

生薬 X エキスによる抗不安作用



10. 神経回路網再構築を介した根本的不安障害治療法の確立

久保山　友晴

第一薬科大学 薬学部 生薬学分野

Key words：軸索，不安障害，生薬

緒　言

誰もがストレスによって短期間、不安を感じることがあるが、通常は時間が経つと収まる。しかし不安障害の場合、生活機能が障害されるほどの激しい恐怖と不安が長期間にわたって生じる。年間罹患率は国内で 4.8%、ヨーロッパでは 14%と非常に高く、主要な精神疾患の一つである。不安障害の治療には、ストレス要因の除去と共に、選択的セロトニン再取り込み阻害薬や、ベンゾジアゼピン系薬物が用いられるが、難治性の患者が一定数存在する。そのため、新たな治療法の開発が望まれている。

高齢者の生前における不安症状の程度と、死後脳の海馬 CA3 野における樹状突起密度の間に、負の相関関係があることが明らかにされている［1］。そこで私は、不安障害では軸索や樹状突起の萎縮による神経回路網の破綻が生じ、器質的な要因により脳機能に障害が生じるのではないかという仮説を立てた。もしそうだとすれば、既存の抗不安薬は、モノアミンの量を増やしたり GABA 受容体を刺激したりするシナプス機能調節を目的としたものであるため、もし器質的障害が生じていた場合は、一時的に症状を改善させたとしても、根本的に治療することが困難となっている可能性がある。そこで軸索や樹状突起を伸長させ、神経回路網を再構築することができれば、脳機能が回復し、根本的に不安障害を治療できるのではないか、と考えた。本研究は、この仮説を証明することを目的とした。

本研究では、軸索・樹状突起伸長作用を有する生薬 X を見出し、生薬 X が認知性不安障害モデルマウスの不安様行動を改善し、この時、脳内で軸索が伸長する傾向があることを示した。

方　法

1. 生薬 X の水エキスの作製

生薬 X（栃本天海堂）50.2 g に 1 L の精製水を加え、煎じ器（ウチダ和漢薬）を用いて 1 時間加熱した。綿で濾過後、凍結乾燥し、エキス粉末 21.4 g（収率 42.6%）を得た。

2. 神経細胞培養

胎生 14 日齢 ddY マウス（日本 SLC）から大脳皮質を取り出し、過去の報告［2］に従って培養した。培養翌日、溶媒あるいは生薬 X エキス（0.1、1、10 μg/ml）を処置した。4 日後、固定し、抗リン酸化型 NF-H 抗体（Covance、軸索マーカー）および抗 MAP2 抗体（abcam、樹状突起・神経細胞マーカー）を用いて免疫染色を行い、DAPI を用いて核染色を行った。倒立蛍光顕微鏡（Cell Observer Z1、Carl Zeiss）を用いて画像取得後、画像解析ソフト MetaMorph（Molecular Devices）により解析を行い、神経細胞 1 個あたりが伸長する軸索および樹状突起の長さを算出した。

3. 不安障害モデルマウスの作製

雄性 C57BL/6J マウスに対し、ストレスを与え、不安障害モデルマウスを作製した。方法に関しては未発表のため、ここでは詳細を省く。本マウスに対して、フロオキセチン（10 mg/kg、i.p.）あるいは生薬 X エキス（10、100 mg/kg、p.o.）を 14 日間投与した。マウスの不安様行動は、オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路試験で評価した［3，4］。

4. 組織解析

行動実験終了後、マウス脳を取り出して凍結し、12μm 厚の切片を作製した。切片をメタノールで固定した後、抗リン酸化型 NF-H 抗体を用いて免疫染色を行った。倒立蛍光顕微鏡（BZ-X710）を用いて画像を取得し、MetaMorph により解析を行い、画像内の軸索の長さを算出した。

5. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定には、GraphPad Prism 8.4.3（GraphPad software）を使用して、unpaired *t*-test あるいは one way ANOVA *post hoc* Bonferroni test を行った。有意差水準は 5%とした。

結果および考察

1. 生薬 X エキスによる軸索・樹状突起伸長作用

初代培養した神経細胞に対して、生薬 X エキスを処置した。その結果、0.1、1μg/ml で処置した時に有意な軸索・樹状突起伸長作用を示し、0.1μg/ml で処置した時に最も大きい値を示した（図 1）。

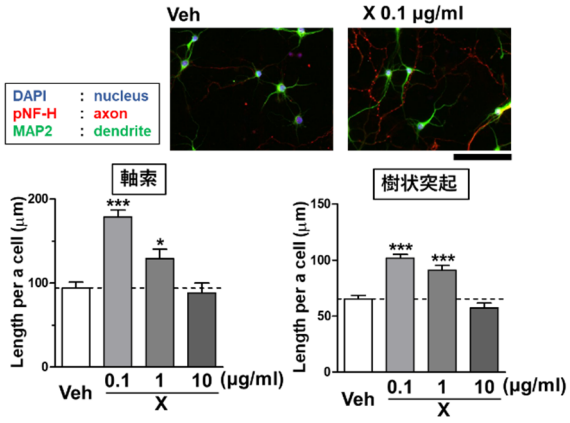


図 1. 生薬 X エキスによる軸索・樹状突起伸長作用

初代培養神経細胞に対して溶媒（Veh）あるいは生薬 X エキス（0.1、1、10μg/ml）を処置し、4 日後固定し、抗 pNF-H 抗体（赤）および抗 MAP2 抗体（緑）を用いた免疫染色を行った。核は DAPI を用いて染色した（青）。細胞当たりが伸長する軸索および樹状突起の長さを算出した。*P＜0.05、***P＜0.001 vs Veh、one way ANOVA *post hoc* Bonferroni test、$n = 11 \sim 30$。スケールバー：100μm。

2. 新規不安障害モデルマウスの作製

雄性 C57BL/6J マウスに対して、私が考案したストレスを 14 日間負荷させた後に、高架式十字迷路試験を行った。その結果、ストレス負荷マウスでは、未負荷マウスに比べ、open arm での滞在時間が有意に減少した（図 2a）。翌日、オープンフィールドテストを行った。その結果、ストレス負荷マウスでは、未負荷マウスに比べ、peripheral zone での滞在時間が有意に増加した（図 2b）。以上のことから、本マウスは不安様行動を示しており、不安障害モデルマウスの作製に成功したと言える。

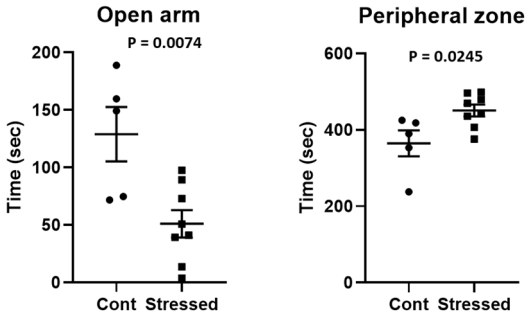


図 2. 新規ストレス負荷による不安様行動の誘発

新規に考案したストレスを 14 日間マウスに負荷した後に、高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験を行い、open arm での滞在時間および peripheral zone の滞在時間をそれぞれ計測した。Unpaired *t*-test。

3. 独自の不安障害モデルマウスに対するフルオキセチンの作用

上記で作製した不安障害モデルマウスに対して、セロトニン再取り込み阻害剤フルオキセチンを 14 日間腹腔内投与した。本薬剤は日本では用いられていないが、海外では抗不安薬として用いられている。フルオロキセチンを投与したマウスを用いて高架式十字迷路試験を行った結果、open arm での滞在時間が溶媒投与群に比べて増加しなかった（図 3）。この結果、本不安障害モデルマウスは、フルオロキセチン耐性の難治性不安障害モデルマウスであると考えられた。

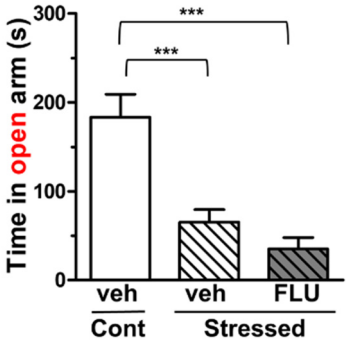


図 3. 独自の不安障害モデルマウスに対するフルオキセチンの作用

独自のストレスを 14 日間負荷後、溶媒（Veh）あるいはフロオキセチン（FLU、10 mg/kg/day）を 14 日間連続腹腔内投与した。ストレス未負荷マウス（Cont）には溶媒（Veh）を腹腔内投与した。そして高架式十字迷路試験を行い、open arm での滞在時間を計測した。***P＜0.001、one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test、$n = 6 \sim 8$。

4. 独自の不安障害モデルマウスに対する生薬 X エキスの作用

上記で作製した不安障害モデルマウスに対して、生薬 X エキスを 14 日間経口投与し、高架式十字迷路試験を行った。その結果、用量依存的に open arm の滞在時間が増加し、100 mg/kg 投与群では溶媒投与群に比べて有意に open arm の滞在時間が増加した（図 4）。以上のことから、生薬 X エキスは抗不安作用を示したと考えられた。

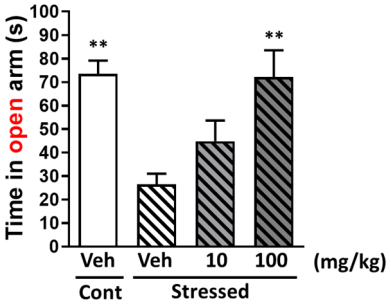


図 4. 独自の不安障害モデルマウスに対する生薬 X エキスの作用

独自のストレスを 14 日間負荷後、溶媒（Veh）あるいは生薬 X エキス（10、100 mg/kg/day）を 14 日間連続経口投与した。ストレス未負荷マウス（Cont）には溶媒（Veh）を腹腔内投与した。そして高架式十字迷路試験を行い、open arm での滞在時間を計測した。**P＜0.01、one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test vs Veh/Stressed, $n = 6$。

5. 生薬 X エキス投与したマウスの脳組織解析

生薬 X エキス投与したマウスの脳の薄切切片を作製し、抗リン酸化型 NF-H 抗体を用いた免疫染色を行い、前辺縁皮質における軸索密度を定量した。その結果、ストレス負荷によって軸索密度が減少する傾向が見られたが、有意な差ではなかった（図 5）。また、生薬 X エキス投与により用量依存的に軸索密度が増加する傾向が見られたが、有意なものではなかった（図 5）。今後他の脳領域も観察し、軸索密度がストレス負荷によって減少するのかどうか、生薬エキス投与によって増加するのかどうか、明らかにしていく予定である。

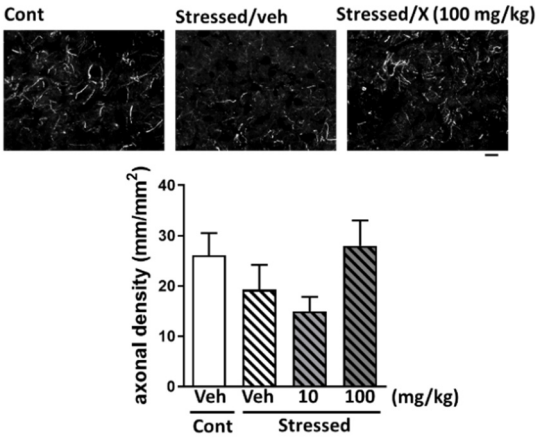


図 5. 生薬 X エキス投与したマウスの脳組織解析

独自のストレスを 14 日間負荷後、溶媒（Veh）あるいは生薬 X エキス（10、100 mg/kg/day）を 14 日間連続経口投与した。ストレス未負荷マウス（Cont）には溶媒（Veh）を腹腔内投与した。高架式十字迷路試験終了後、脳を取り出して切片を作製し、抗 pNF-H 抗体を用いた免疫染色を行った。そして前辺縁皮質における軸索密度を定量した。

スケールバー：20 μ m。

以上により、軸索伸長により不安障害を改善させる薬物候補として、生薬 X を同定した。今後生薬 X の活性成分およびその作用機序を明らかにし、その作用機序を阻害した時に生薬 X の抗不安作用が阻害されるのかどうか、明らかにしていく予定である。これにより、軸索伸長により抗不安作用が示されることを証明し、新たな不安障害治療法を提唱したい。

文　献

1) Soetanto A, Wilson RS, Talbot K, Un A, Schneider JA, Sobiesk M, Kelly J, Leurgans S, Bennett DA, Arnold SE. Association of anxiety and depression with microtubule-associated protein 2- and synaptopodin-immunolabeled dendrite and spine densities in hippocampal CA3 of older humans. Arch Gen Psychiatry. 2010 May;67(5):448-57. PMID: 20439826 doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.48.

2) Kuboyama T, Hirotsu K, Arai T, Yamasaki H, Tohda C. Polygalae Radix Extract Prevents Axonal Degeneration and Memory Deficits in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. Front Pharmacol. 2017 Nov 14;8:805. PMID: 29184495 doi: 10.3389/fphar.2017.00805. eCollection 2017.

3) Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. J Vis Exp. 2008 Dec 22;(22):1088. PMID: 19229173 doi: 10.3791/1088.

4) Fernandes SS, Koth AP, Parfitt GM, Cordeiro MF, Peixoto CS, Soubhia A, Moreira FP, Wiener CD, Oses JP, Kaszubowski E, Barros DM. Enhanced cholinergic-tone during the stress induce a depressive-like state in mice. Behav Brain Res. 2018 Jul 16;347:17-25. PMID: 29501509 doi: 10.1016/j.bbr.2018.02.044. Epub 2018 Mar 1.