

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06916

研究課題名(和文) ストレス性精神症状改善に向けた抑肝散によるmicroRNA制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of microRNA regulation by Yokukansan for improvement of stress-related psychiatric symptoms

研究代表者

遠山 正彌 (Masaya, Tohyama)

近畿大学・東洋医学研究所・教授

研究者番号：40028593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HPA axis 調節不全によるうつ病等の発症にmicroRNAが関与する分子機序を解明し、新規治療薬開発や予防措置への応用に向けた研究基盤の確立を目指すことを目的とした。本研究課題では、環境ストレス負荷マウスへの抑肝散投与によりGlucocorticoid 受容体 mRNA 転写後制御因子としてのmicroRNAを視床下部および脳梁領域それぞれで見出すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方薬とmicroRNAに関して基礎研究を行っているのは、知る限り国内では当グループのみであり、国際的にみても数グループである。更に、漢方薬とストレス制御に関しては近年活発に研究がなされるようになってきたものの、その成分などの分子機序についてはあまり進展が見られていない。すなわち、漢方薬である抑肝散が脳内microRNAを制御する分子機序および詳細なストレス制御機序を解明する本研究計画は、精神疾患病態研究にブレークスルーをもたらす可能性を十分秘めており、学術的・社会的意義において非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：It is well known that Glucocorticoid receptor signaling regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and Glucocorticoid receptor expression level is associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. A previous report has suggested that several microRNAs in the brain might regulate Glucocorticoid receptor protein levels. In this study, we aimed to elucidate the Glucocorticoid receptor regulation mechanism in the brain and evaluate the effects of Yokukansan on Glucocorticoid receptor regulation. This study found that Yokukansan regulates two different microRNAs as a post-transcriptional regulator of Glucocorticoid receptor mRNA in the hypothalamus and corpus callosum of environmentally stress-exposed mice.

研究分野：神経化学

キーワード：HPA axis Glucocorticoid受容体 視床下部 脳梁 microRNA 抑肝散

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 精神疾患の中でうつ病の発症には、遺伝的要因というよりはストレス等の様々な環境要因が大きく関与することが知られている。これらを背景として、ストレス応答系である視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA axis) が繰り返し受けるストレス等により過剰に刺激され続けることで調節不全に至り、うつ病性障害などの精神疾患が発症するというストレス仮説が以前から想定されている (Bartanusz, et al., *Endocrinology*. 1993; Kendler, et al., *Am J Psychiatry*. 1999)。しかし、その分子機序や脳の機能的変化はこれまでにほとんど明らかにされていない。

(2) 申請者らはこれまでに、この HPA axis 調節不全によるうつ病等の精神疾患発症の分子機序の解明を目指して環境要因変動としての慢性ストレス負荷をかけたマウスを作製し、うつ病および不安障害のモデルマウスとして、それらの発症メカニズムの詳細な解析を行うことで、グルココルチコイド応答制御不全に関連した SGK1 活性化を進め起因とした分子機序について様々な成果を得てきた (Miyata et al., *PLoS One*. 6, e19859, 2011; Miyata et al., *BBRC*. 464:76-82, 2015; Miyata et al., *BioMed Res Int*, 2015:797280; Miyata et al., *Sci. Rep*, 6:23084, 2016)。この HPA axis 調節機構のひとつとして、海馬や視床下部に発現するグルココルチコイド受容体 (GR) を介した負のフィードバック機構により、グルココルチコイドの分泌が制御されていること、さらには HPA axis の機能不全には GR の発現量変化が関わると考えられている (Herman et al., *Mol Endocrinol*. 1989; Thomson et al., *Neurochem Res*. 2008)。これまでの検討から脳内における GR 発現量は、いくつかの転写因子や、調節因子、さらには mRNA 転写後発現調節を行う miRNA (miR-18, miR-124a) によって制御されていることがすでに報告されている (Schaaf et al., *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002; Vreugdenhil et al., *Endocrinology*. 2009)。

(3) さらにこれらの検討過程の中で、申請者らは漢方薬のひとつである「抑肝散」が認知症に伴って出現するうつ様行動などの行動心理学的症状 (Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia : BPSD) の治療に対して有効であるとの報告に注目し、miRNA 発現変化との関連の可能性を示唆する結果を得ている。すなわち、抑肝散の構成成分中にも抗うつ薬と類似した効果を示す成分が含有されている可能性が十分に考えられた。そこで、申請者らはストレス負荷時の HPA axis 活性化に対する抑肝散の効果を検討したところ、ストレス負荷前に抑肝散を経口投与したマウス群では、対照ストレス群に比べ血中のコルチコステロン量が有意に低下し、コントロールマウス群とほぼ同レベルとなる事実を予備検討結果としてすでに見出しており、環境ストレス負荷による HPA axis 制御不全に関する全く新規の分子機序、すなわち神経症状に効果を示す抑肝散などの漢方薬による miR-18, miR-124a 調節を介した GR 発現制御の分子機序を解明することに興味を持たれた。

2. 研究の目的

(1) 環境要因としてのストレス負荷による HPA axis 調節不全によるうつ病性障害等の発症機序の解明を目指して、海馬や視床下部、脳梁等での抑肝散等による GR 発現調節に関連する miR-18, miR-124a 制御機構を明らかにし、新規の治療標的や新薬候補の探索を行う。

(2) うつ病性障害発症に対する治療薬開発はセロトニンを中心としたモノアミン仮説および BDNF 仮説に集中しているのが現状であるが、半数程度の患者で治療効果が無いなど、問題を多く抱えている。そこで、申請者らは全く新たな視点からのうつ病性障害発症に対する治療薬開発への展開を目指し、「HPA axis 制御不戦による血中グルココルチコイド量の持続的な増加」に注目した。そこで、漢方薬成分による miR-18, miR-124a 発現制御を介した転写後調節による GR タンパク量制御という全く新規の分子機序で HPA axis の正常化に関与することを見出すことを本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 申請者らはこれまで、水浸拘束法により環境ストレス負荷を行ってきた。この環境ストレス暴露マウスでは恒常的に血中のコルチコステロン量が増加しており、尾懸垂法などの行動解析で無気力レベルの上昇や海馬歯状回における神経新生レベルの低下など、ヒトうつ病患者で観察されるような動態を示したことからうつ病のモデルマウスであると考えられることから本研究計画においても使用する。

(2) 本研究計画では、まず HPA axis に関連する脳領域である海馬や視床下部と共に大脳皮質や脳梁における GR mRNA 量について、本環境ストレス負荷の有無による変化を real-time-PCR および in situ hybridization で比較検討する。

(3) GR タンパク量についても上記の各領域について western blotting および免疫組織化学法により比較検討する。

(4) 同様に、miR-18, miR-124a の発現について検討するために TaqMan probe をそれぞれ合成し、real time-PCR で比較検討する。さらに、DIG labeled-LNA probe についてもそれぞれ合成し、in situ hybridization で比較検討する。

(5) この環境ストレス暴露マウスへの抑肝散等の漢方薬の前投与によりストレス負荷後の GR mRNA, GR タンパク質、miR-18, miR-124a の発現について、脳の各領域で上記と同様の各手法を用いて比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) まず環境ストレス負荷マウス脳の海馬や視床下部、脳梁における GR mRNA 量について、環境ストレス負荷の有無による変化を real time-PCR および in situ hybridization 法により比較検討を実施した。その結果、海馬、視床下部、脳梁において GR mRNA 量の低下傾向を見出したが、有意差はつかなかった。

(2) 次にタンパク発現量について western blotting、免疫組織化学等で比較検討を行ったところ、環境ストレス負荷マウスにおける視床下部、脳梁において GR タンパク量の有意な低下を見出した。

(3) さらに、miR-18, miR-124a の発現量変化について検討するために TaqMan probe をそれぞれ合成し、real time-PCR で比較検討したところ、海馬ではストレス負荷による変化を両 miRNA 共に見出せなかった。しかし、視床下部においては、miR-18 の有意な発現増加が生じることを見出すと共に、脳梁における miR-124a の有意な発現増加を見出すことが出来た。また、視床下部における miR-124a、脳梁における miR-18 の発現量変化は観察されなかった。

(4) 抑肝散等の漢方薬の前投与により、環境ストレス負荷による血中コルチコステロン量の増加が抑制されることを見出した。

(5) 環境ストレス負荷マウスへの抑肝散の前投与による視床下部および脳梁領域におけるストレス応答と GR mRNA、GR タンパク量変化および miR-18, miR-124a の発現量変化、更には免疫組織化学的な検討を実施した。その結果、抑肝散の前投与の有無による比較検討から、視床下部における miR-18 の有意な発現量増加および脳梁における miR-124a の有意な発現量増加は、抑肝散投与群で抑制されることを見出した。また、視床下部および脳梁における GR mRNA には影響がなかった。これらの結果から、抑肝散の前投与により脳領域特異的に miR-18, miR-124a の発現量変化が生じ、GR タンパク量が正常化することを見出すことが出来た。さらに、免疫組織化学的な検討を実施し、視床下部の GR タンパク量の正常化は室傍核で生じていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Shimizu S, Ishino Y, Takeda T, Tohyama M, Miyata S. | 4. 巻 2019 |
| 2. 論文標題 Antidepressive Effects of Kamishoyosan through 5-HT1A Receptor and PKA-CREB-BDNF Signaling in the Hippocampus in Postmenopausal Depression-Model Mice. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine | 6. 最初と最後の頁 9475384 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/9475384. eCollection 2019. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyata S. | 4. 巻 1190 |
| 2. 論文標題 Cytoskeletal Signal-Regulated Oligodendrocyte Myelination and Remyelination. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology | 6. 最初と最後の頁 33-42 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-32-9636-7_3. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yasugaki S, Liu CY, Kashiwagi M, Kanuka M, Honda T, Miyata S, Yanagisawa M, Hayashi Y. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Effects of 3 Weeks of Water Immersion and Restraint Stress on Sleep in Mice. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 1072 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.01072. eCollection 2019. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Ishino Y, Shimizu S, Tohyama M, Miyata S. | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 controls oligodendrocyte differentiation in the corpus callosum during early brain development. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Developmental Neurobiology | 6. 最初と最後の頁 245-260 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dneu.22871. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 清水尚子, 石野雄吾, 遠山正彌, 宮田信吾 |
| 2. 発表標題 加味逍遙散の基礎的エビデンス |
| 3. 学会等名 第8回Osaka Science-Based Kampo研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石野雄吾, 清水尚子, 遠山正彌, 宮田信吾 |
| 2. 発表標題 オリゴデンドロサイト分化制御の新規分子機構解明へ向けて |
| 3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安垣進之助, 柏木 光昭, 鹿糠 実香, 宮田 信吾, 柳沢正史, 林悠 |
| 2. 発表標題 うつ病のマウスモデルにおける人為的レム睡眠増加の影響 |
| 3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮田信吾、清水尚子、石野雄吾、山本彬世、川上あゆみ、鹿島美恵子、遠山正彌 |
| 2. 発表標題 Yokukansan regulates microRNA expression and normalizes glucocorticoid receptor protein expression in the mice brain after stress exposure |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 S. Miyata, S. Shimizu, Y. Ishino, M. Tohyama. |
| 2. 発表標題 Discovery of novel antidepressant agents targeting protein kinases in oligodendrocytes |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2019, SfN's 49th annual meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 宮田信吾、清水尚子、石野雄吾、遠山正彌 |
| 2. 発表標題 抗ストレス効果に関連する低分子化合物の探索 |
| 3. 学会等名 第20回ORIGIN2019神経科学研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮田信吾、清水尚子、石野雄吾、遠山正彌 |
| 2. 発表標題 Signal crosstalk regulation of neuron-glia communications in psychiatric disorders |
| 3. 学会等名 NEURO2019, 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石野雄吾、清水尚子、遠山正彌、宮田信吾 |
| 2. 発表標題 Towards understanding of novel molecular mechanisms underlying oligodendrocyte properties both in normal and pathological condition |
| 3. 学会等名 NEURO2019, 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 清水尚子、石野雄吾、遠山正彌、宮田信吾 |
| 2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of Kamishoyosan on neuropsychiatric symptoms owing to menopause |
| 3. 学会等名 NEURO2019, 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安垣進之助、劉至堯、柏木光昭、鹿糠実香、本多隆利、宮田信吾、柳沢正史、林悠 |
| 2. 発表標題 The relation between depression and REM sleep: insights from a model mouse of depression |
| 3. 学会等名 NEURO2019, 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安垣進之助、劉至堯、柏木光昭、鹿糠実香、本多隆利、宮田信吾、柳沢正史、林悠 |
| 2. 発表標題 うつ病とレム睡眠の関係について マウスのうつ病モデルを用いた解析 |
| 3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 清水尚子、石野雄吾、武田卓、遠山正彌、宮田信吾 |
| 2. 発表標題 更年期障害における精神神経症状を改善する加味逍遙散の作用機序解明 |
| 3. 学会等名 第39回産婦人科漢方研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮田信吾 |
| 2. 発表標題 分子科学で精神疾患を解く |
| 3. 学会等名 第40回 東邦大学 生命科学シンポジウム 「脳神経疾患への最新アプローチ」(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石野雄吾、清水尚子、遠山正彌、宮田信吾 |
| 2. 発表標題 オリゴデンドロサイトの分化・髄鞘化における新規分子メカニズムの探索 |
| 3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 清水尚子、石野雄吾、武田卓、遠山正彌、宮田信吾 |
| 2. 発表標題 更年期障害における精神神経症状を改善する加味逍遙散の作用機序解明 |
| 3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門(基礎研究部門) https://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/index.html 近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門(基礎研究部門)研究成果 https://www.med.kindai.ac.jp/toyo/study/results.html</p> |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 宮田 信吾 (Miyata Shingo) (70403194) | 近畿大学・東洋医学研究所・教授 (34419) | |
| 研究分担者 | 清水 尚子 (Shimizu Shoko) (50572731) | 近畿大学・東洋医学研究所・助教 (34419) | |
| 研究分担者 | 石野 雄吾 (Ishino Yugo) (80625088) | 近畿大学・東洋医学研究所・助教 (34419) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |