

# 黄連解毒湯によるアルツハイマー型認知症のプレクリニカル期における病態改善作用

坪井 知恵  
(医療生命薬学研究ユニット)

## 【研究の背景と目的】

認知症の約70%はアルツハイマー症(AD)を原因疾患としている。これまでADの発症はアミロイドβ(Aβ)の凝集や神経原繊維の変化による神経細胞死が原因と考えられてきた。一方近年、加齢、感染やストレスなどによって中枢の免疫担当細胞であるミクログリアが活性化し脳内炎症を惹起することがAD発症に深く関与すると考えられるようになってきた。漢方医学において加齢性認知症は成長、発育、生殖の機能を担う「腎」の衰えと、感情を司る「肝」や精神を司る「心」等に乱れがある状態と捉えられ、臨床においては抑肝散、抑肝散加陳皮半夏、帰脾湯、加味帰脾湯、人参養栄湯などが使用されているが、その効果に関するエビデンスは十分ではない。

黄連解毒湯(OGT)は清熱解毒薬である黄連、黄柏、黄芩、山梔子より構成され、漢方方剤として興奮・のぼせ・頭痛・不眠・神経症などに適用される。更に、認知症患者の周辺症状に対する有効性や、老化促進モデルマウスにおける認知機能の改善や神経保護効果などの報告があることから、OGTがADの認知機能改善作用を有している可能性が推測される。しかし、その効果に関するエビデンスは少なく、AD発症前のプレクリニカル期の脳内炎症病態に対するOGTの効果を検討した研究はない。ADプレクリニカル期の病態(低強度の慢性炎症)は、抗酸化活性の低下や変性タンパク質の増加などの様々な要因で惹起されると推察され、多成分系薬剤である漢方方剤による予防や治療が適した病態と考えられる。また、複雑な過程を経て発症するADの予防及び治療には長期間を要することより、長期間の服用が可能な漢方方剤はその目的に適した薬物であると考えられる。

多くのAD研究においては、アミロイド前駆タンパク質(APP)を非生理的に過剰発現させた遺伝子改変ADモデルマウスが繁用されている。しかし、これらモデルマウスはAβ以外にAPP断片等が過剰に産生され、他への生理作用が懸念されるなどの問題点が挙げられる。そこで、本研究では、APPを過剰発現させることなくヒトAD患者脳でのAβ蓄積と脳内炎症病態を呈するADモデルマウスとして、APP<sup>NL-G-F</sup>ノックインマウス(NLGFマウス)を用いてOGTのADに対する有効性を立証することを目的とした。

## 【実験材料と方法】

ADモデルマウスとしてNLGFマウス(雄性、1.5、8及び21ヶ月齢)を用いた。OGTは黄連2.0g、黄柏1.5g、黄芩3.0g、山梔子2.0gを精製水600mLで1時間煎じた。強制経口投与では、その煎液を凍結乾燥し得られたエキス粉末を精製水で調整後、連続10日間経口投与した。自由飲水投与では、OGT煎液を調整し連続1ヶ月間自由飲水にて投与した。OGT投与後に解剖を行いPBS灌流後、脳を採取した。海馬における炎症、酸化ストレスおよびAβ産生・分解に関連する遺伝子の遺伝子発現を調べる為、海馬組織からRNAを抽出し各種mRNAレベルをRT-qPCR法にて評価した。また、脳組織のAβ蓄積を調べる為、脳組織よりパラフィン切片を作製後、DABを用いた免疫組織化学染色法にて評価した。

## 【結果と考察】

1. NLGFマウス(8ヶ月齢)に対するOGTによる病態予防改善効果

NLGF マウス (8 ヶ月齢) は対照群である C57BL/6J マウスに比べ、活性型ミクログリアマーカー *Iba1*、炎症性サイトカイン *Tnf-α*、活性型アストロサイトマーカー *Gfap*、ケモカイン *Cxcl10* の mRNA レベルは有意に高値を示した。1 ヶ月間の OGT の自由飲水投与によって、*Tnf-α*、*Cxcl10*、*Iba1* の mRNA 発現を抑制し、酸化ストレス応答転写因子 *Nrf2* ならびに Aβ 分解酵素 *Nep* の発現を増加させた。一方、*Gfap* には変化が認められなかった。更に、海馬周辺の Aβ沈着とミクログリアのマーカーである *Iba1* のタンパク質発現を DAB 染色法で評価したところ、対照群に比べ 8 月齢では Aβ沈着と IBA1 陽性細胞の増加が認められ、OGT 投与群ではそれらの減少が認められた。

## 2. NLGF マウス (21 ヶ月齢) に対する OGT による病態改善効果

NLGF マウス (21 ヶ月齢) は対照群である NLGF マウス (1.5 ヶ月齢) に比べ、*Iba1*、*Tnf-α*、*Gfap*、*Cxcl10*、神経炎症を助長するミクログリア膜受容体 *Trem2* の mRNA レベルは有意に高値を示した。また、OGT の 10 日間連続強制経口投与によって、遺伝子発現ならびにタンパク質発現は 8 ヶ月齢同様の結果が認められた。

以上の結果より、OGT 投与群では *Gfap* に変化がなく、*Iba1* の mRNA とタンパク質レベルを共に減らし炎症性サイトカインやケモカインそして *Trem2* の mRNA レベルを抑制していることから、OGT の効果はミクログリアの活性化を抑制することによりもたらされていることが示唆された。転写因子 *Nrf2* は、抗酸化関連遺伝子の発現増加や炎症関連遺伝子の発現低下を促し、細胞保護の役割を果たすこと、そして Aβ はミクログリアに対してケモカインの一種である *Cxcl10* の産生を強く促し、ニューロンの機能障害を誘導する報告がある。したがって、OGT は *Nrf2* の発現を上昇させると共に、*Cxcl10* の発現を抑えることで炎症反応とニューロンの機能障害を抑制することが推察された。更に、Aβ 分解能が改善したことによって Aβ 蓄積が減少した可能性が考えられた。したがって、AD プレクリニカル期モデルマウスに対して OGT は抗酸化作用の増加、ミクログリアの活性化抑制、炎症関連遺伝子の発現低下そして Aβ 分解能の改善による抗炎症作用と Aβ クリアランス改善作用を示し、ニューロンの機能障害の抑制に繋がる可能性が高いと推察される。また、その作用は 8 ヶ月ならびに 21 ヶ月齢の NLGF マウス共にみられたことから、脳内炎症の慢性化状態問わず、OGT は AD プレクリニカル期の予防治療薬として有効である可能性が示唆された。本研究では OGT に含まれる有効成分の同定ならびにタンパク質レベルでの作用については明らかにできていない。今後、それらを明らかにすることで AD 治療薬としての有効性を示すことで臨床応用に繋がることを期待される。

