

食品シリーズ

脳内老化制御とバイオマーカー：基盤研究と食品素材

Aging Control in Brain and Biomarker : Basic Research and Food Materials

監修：大澤俊彦，丸山和佳子

Supervisor : Toshihiko Osawa, Wakako Maruyama

HIGH TECHNOLOGY
INFORMATION

シーエムシー出版

第2章 漢方薬生薬による脳内老化制御

築地謙治*¹, 渡辺賢治*²

1 はじめに

超高齢化社会を迎え、高齢者が生産性を保ちながら長生きすることが重要な課題となってきた。老化といえば血管老化である動脈硬化が第一に挙げられる。しかしながら広義の老化は動脈硬化に止まるものでなく、老年期痴呆、パーキンソン病、多発性硬化症などの神経変性疾患も脳内老化に起因すると考えられる。これら神経変性疾患は高齢化に伴い、ますます増加することが予測されており、医療のみならず社会の大きな問題となっている。

WHOによると世界的に見ても高齢化人口は急速に拡大することが予測され、神経変性疾患の罹患率も上昇することが想定されている¹⁾。認知症罹患率はわが国では現在200万人、世界では2400万人と推定されている。2030年には4400万人に達すると推定されており、毎年460万人が新たに発症していると試算されている（7秒に1人の割合）。

認知症の罹患率は加齢とともに著しく上昇する²⁻⁴⁾。加齢は認知症発症の最大のリスクファクターである。一口に認知症といってもアルツハイマー病、脳血管性認知症、レビー小体型認知症があるが、最も頻度が高いのはアルツハイマー病で認知症全体の40~60%を占める。最近の疫学研究によると、脳血管性認知症の有病率や罹患率は治療法や予防法などの進歩に伴い年々減少する傾向にあるが、アルツハイマー病は確実に増加している。

パーキンソン病は社会の高齢化に伴い患者数が増加しており、本邦の有病率は人口10万人あたり約120~150人である。発症から15年までの生存率は一般人口と変わらず、17年以降低下する。併存症はうつと認知症が特に重要である。発症の危険因子として農薬・殺虫剤の暴露、金属（鉛、銅、鉄、マンガン）の職業的暴露や食事からの摂取が挙げられている。防御因子としては喫煙、コーヒー、食事中の不飽和脂肪酸などが注目されている。

こうした加齢に伴う脳内老化は脳神経細胞もしくはグリア細胞の異常によって引き起こされる。特に顕著な現象として、脳神経を取り巻く髄鞘が脱落する脱髄が確認される。実験レベルにおけるデータでも高齢マウス脳内では随所に脱髄が認められ、髄鞘を巻くために必要なオリゴデ

* 1 Kenji Tsuiji 慶應義塾大学 医学部 漢方医学センター

* 2 Kenji Watanabe 慶應義塾大学 医学部 漢方医学センター センター長；准教授

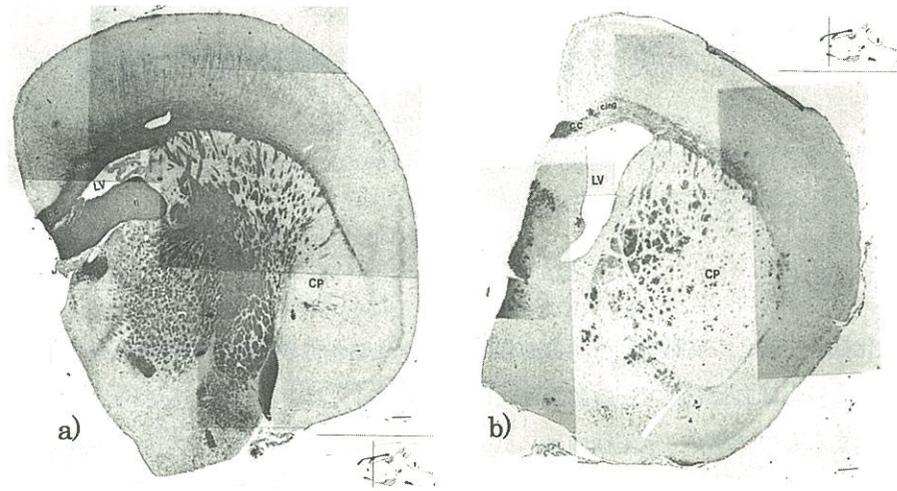


図1 高齢化に伴う脱髄 (抗MBP抗体)

a) 若齢マウス, b) 高齢マウス

出典：文献5), 清和千佳, 阿相皓晃, 知的機能の老化・加齢変化-脳機能の加齢による変化, 臨床検査, 50(9), 961-969 (2006)

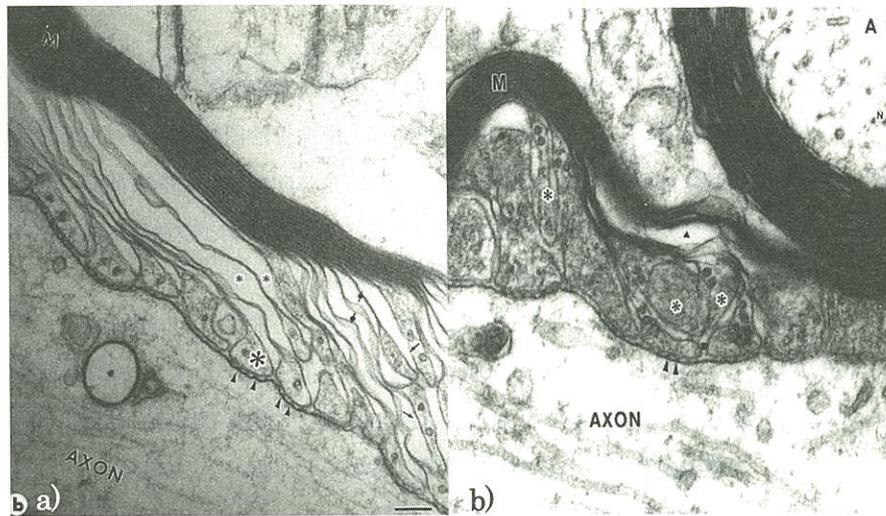


図2 高齢化に伴うミエリン構造の変化

a) 若齢マウス, b) 高齢マウス

出典：文献6), 清和千佳, 阿相皓晃, 老齢脳におけるミエリン形成の分子機構, 生体の科学, 57(3), 184-190 (2006)

ンドロサイトが減少している (図1)⁵⁾。また、髄鞘をより詳細に見ていくと、高齢化に伴いたとえ髄鞘が存在していても、その髄鞘が正常な構造を保っていないことも確認している (図

2)⁶⁾。これらのことが相重なり種々の脳機能障害を引き起こしている。また、この脱髄には酸化ストレスに続く慢性的な炎症が深く関与していることも示唆されている。

これらの老化に伴う脱髄に対し、その発症段階および進行状況を正確に把握することのできるバイオマーカーが求められているが、未だ確立されていない。今現在、脱髄疾患に対する診断としてはMRIやCTといった画像診断、誘発電位による検査、脳脊髄液におけるTotal ProteinやIgG量測定等が行われている。その中でも脳脊髄液の検査は侵襲が大きく、簡便な血清における検査が待たれている。しかし、脳内の脱髄状態を反映したマーカーが未だ見つかっておらず、この発見および定量系の確立が臨床においてもたらす恩恵は非常に大きいといえる。

2 老化に伴う脱髄に対する人参養栄湯の効果

高齢に伴う老年期痴呆などの脳内老化に対する有効な治療法は今のところない。また、患者を取り巻く家族への負担も大きく、患者のQOLの向上を促す治療法の確立が求められている。そこで、我々が注目しているのが漢方薬である。古来より気血兩虚を示し、健忘を伴う疾患に用いられてきた漢方薬の1つである人参養栄湯に注目し、脱髄に対する人参養栄湯の効果について検討し、また、そのメカニズムを解析することで再髄鞘化の鍵となる分子を特定し、それを脱髄マーカーとして注目することを行ってきた。

げっ歯類の神経系は加齢に伴いニューロンの萎縮や減少、グリア細胞の肥大化、ミエリン化などの形態変化が現われる。成熟組織の再生は分化または休止している前駆細胞の急速な分化と関連している。オリゴデンドロサイト前駆細胞はオリゴデンドロサイトの発生源であり、脳に休止状態で存在し、オリゴデンドロサイトが損傷を受けた際に新たなオリゴデンドロサイトを産生する。また、最近の研究では加齢に伴い脳の表層の灰白質は保持されているものの、白質がミエリンの破壊により減少していることがわかってきた。ミエリンの減少は加齢による認知障害を引き起こし、それらはミエリンの萎縮による細胞機能の低下が原因と考えられる。

一方で、漢方は多くの慢性疾患に有効だと考えられており、自己免疫疾患の治療に適用されているものもある。今回使用した人参養栄湯は12の生薬 (地黄, 当帰, 白朮, 茯苓, 人参, 桂皮, 遠志, 芍薬, 陳皮, 黄耆, 甘草, 五味子) からなり、全身の衰弱や手足の冷え、貧血や食欲不振に用いられる (図3)⁷⁾。

この人参養栄湯を30ヶ月齢C57BL/6雄性マウスに3ヶ月間投与したところ、人参養栄湯投与群ではnormalの33ヶ月齢に比べ有意に再髄鞘化が促進された (図4)⁸⁾。また、細胞レベルにおいても30ヶ月齢のFisher344ラットにコントロール群として水を、人参養栄湯投与群として1%人参養栄湯を3ヶ月投与し、その後大脳細胞を培養し、O1およびO4で免疫染色したところ、

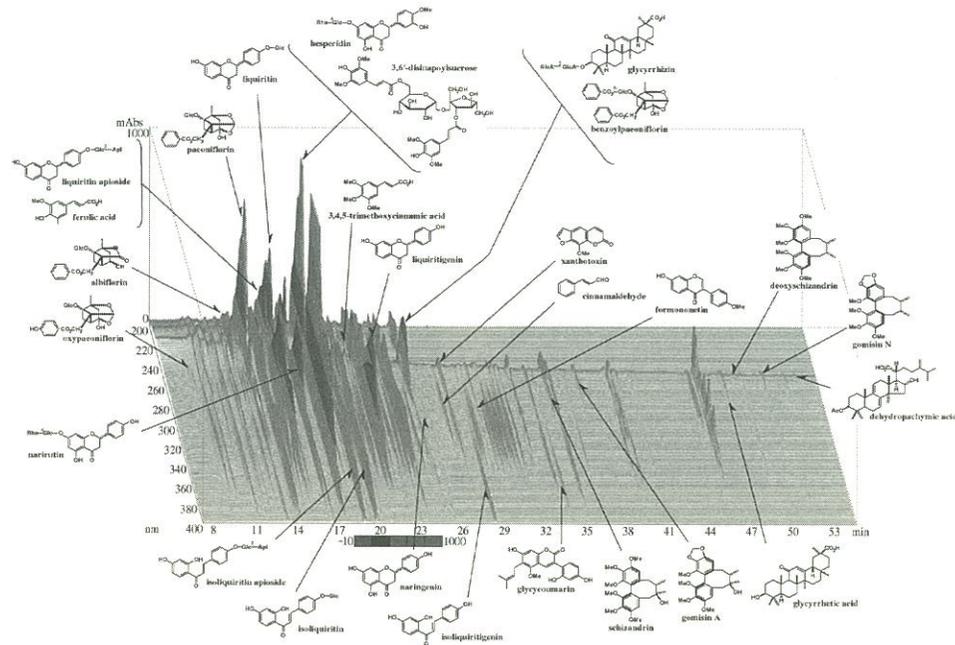


図3 人參養湯成分の3D-HPLC解析

出典：文献7), J. Kobayashi et al., *Int Immunopharmacol.*, **3**, 1027-39 (2003)

O4⁺かつO1⁻で判別されるオリゴデンドロサイトの前駆細胞が培養7日目に確認された(図5)⁷⁾。その際のオリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイトの存在比はコントロール群で共に10%, 人參養湯投与群ではそれぞれ20%, 40%であった。よって, 人參養湯が前駆細胞およびオリゴデンドロサイト共に増殖促進していることがわかった。特に, オリゴデンドロサイトの増加が大きかった。また, 人參養湯投与によりBrdUで標識されたオリゴデンドロサイト前駆細胞がコントロール群に比べ4~5倍になったことも確認した(図6)⁷⁾。

基本的に前駆細胞は分化促進のシグナルを受けない限り休止状態にある。BrdUは分裂期にある細胞に取り込まれる性質をもつことから, 人參養湯投与により前駆細胞の活動性が上昇したことになる。つまり, 人參養湯は, オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を誘導することでオリゴデンドロサイトを増やし, 結果として再髄鞘化を促進させているのである。

脳内ではオリゴデンドロサイトは自分の腕を四方に伸ばし, 再髄鞘化が必要なアクソンにその腕を巻きつけミエリンを巻く。細胞数が増えていても, それらが腕を伸ばし, ミエリンを巻く能力がなければ意味がない。今回の条件で, O1⁺細胞を蛍光で捉え, それらの細胞形態を確認したところ, 人參養湯投与群で多くの細胞突起を確認できた。よって, 再髄鞘化能力をもつオリゴデンドロサイトを人參養湯はきちんと増やしていた。

これらの脱髓に関与する分子の1つとして, ミエリン塩基性タンパク(Myelin Basic Protein; MBP)がある。MBPにはスプライシングにより4つのアイソフォームの存在が知られている。マウスの場合, 21.5, 18.5, 17.0, 14.0 kDである。これらMBPアイソフォームが老齢化, お

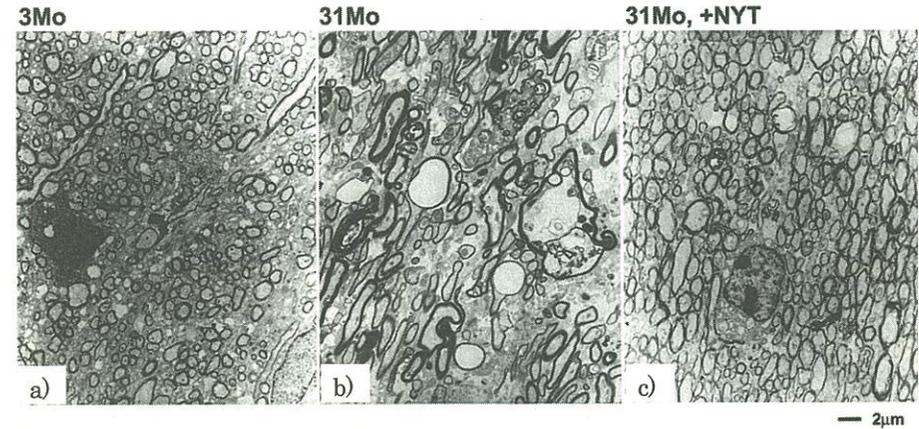


図4 高齢マウスに対する人參養湯の効果(電子顕微鏡像)

a) 3ヶ月齢, b) 33ヶ月齢, c) 33ヶ月齢+人參養湯

出典：文献8), C. Seiwa et al., *J. Neurosci. Res.*, **85**, 954-966 (2007)

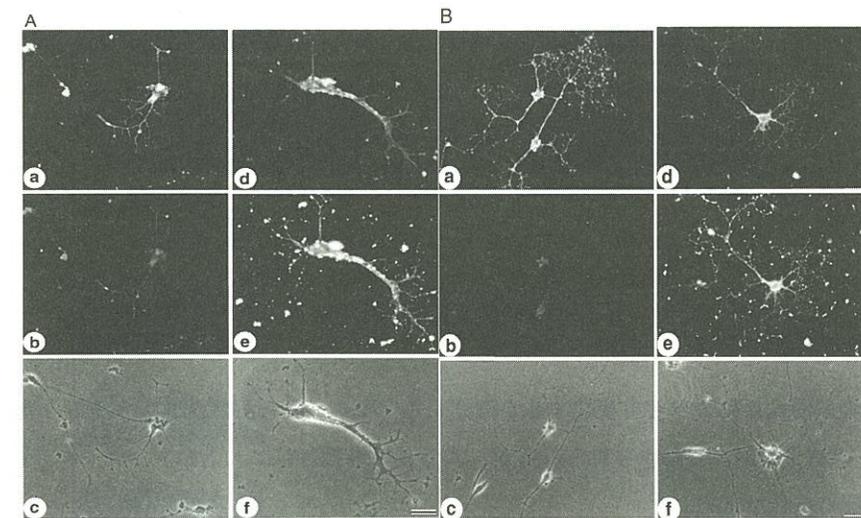


図5 コントロール, 人參養湯投与両群におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイト

A. コントロール群, B. 人參養湯投与群

a, d: O4抗体, b, e: O1抗体, c, f: 位相差顕微鏡像

出典：文献7), J. Kobayashi et al., *Int Immunopharmacol.*, **3**, 1027-39 (2003)

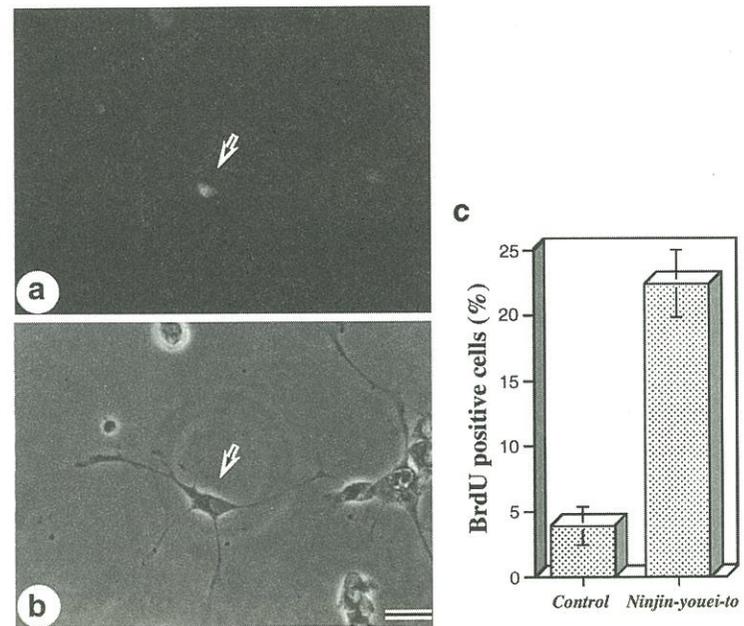


図6 人參養榮湯投与によるBrdU陽性細胞数の変化
a: BrdU抗体による免疫染色, b: 位相差顕微鏡像, c: BrdU陽性細胞数
出典: 文献7), J. Kobayashi *et al.*, *Int Immunopharmacol.*, **3**, 1027-39 (2003)

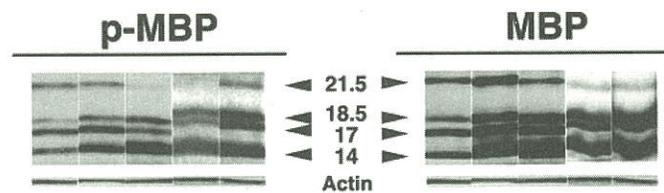


図7 月齢によるpMBP, MBPの変化および31ヶ月齢に対する人參養榮湯の効果
左より3,12,24,31ヶ月齢, 31ヶ月齢+人參養榮湯
出典: 文献8), C. Seiwa *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 954-966 (2007)

よび人參養榮湯投与によりどう変化するか確認したところ, その活性化体であるリン酸化MBP (pMBP) の減少は24ヶ月齢から見られるが, 人參養榮湯投与により若齢マウスレベルに回復することが認められた (図7)⁸⁾。

3 人參養榮湯の作用機序

前述のMBPを産生するには, FcR γ /Fyn-Rho-MAPKシグナル伝達系が知られている⁸⁾。人

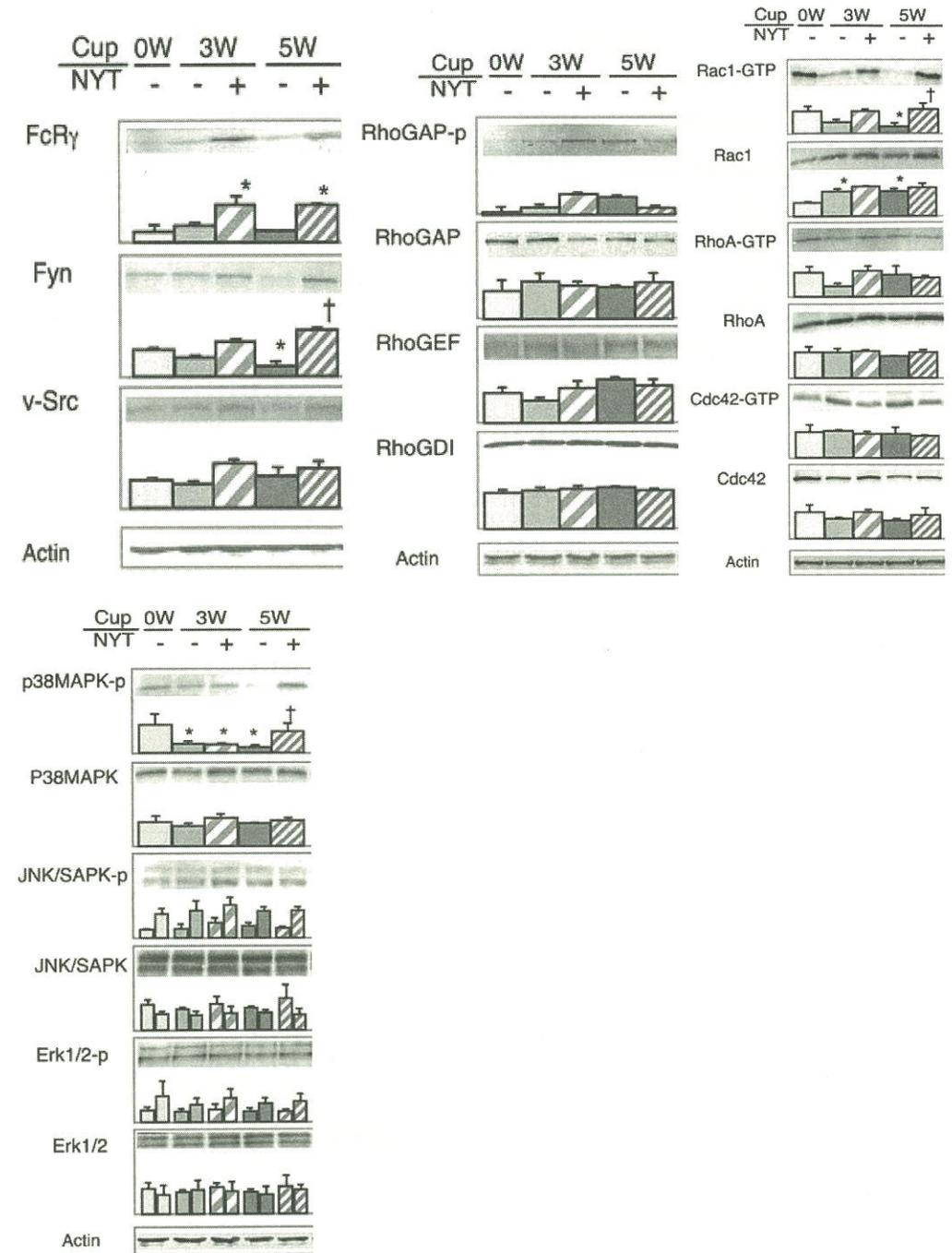


図8 FcR γ /Fyn-Rho-MAPKシグナル伝達系におけるカプリゾンおよび人參養榮湯投与の影響
出典: 文献8), C. Seiwa *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 954-966 (2007)

工的に脱髄を誘発することが可能なカプリゾンと人参養栄湯を3週および5週投与することによるこれらシグナル伝達系におけるタンパク発現量をウェスタンブロットにて確認したところ、FcR γ は投与0週（コントロール）に比べ3週、5週の人参養栄湯投与により有意に発現が増加しており、Fynは5週間のカプリゾン投与により発現が減少していた。Rac1活性に影響を与えるRhoレギュレーター群においてはどの群においても有意な差は見られていない。Rho GTPase cycleにおける解析ではRac1-GTPでは5週のカプリゾン投与により減少を示し、同じ5週の人参養栄湯投与によりコントロールレベルまでの回復を示した。また、Rac1では3週および5週のカプリゾン投与により有意な発現上昇を示した。最後に、p38MAPK関連タンパクについて解析した結果、p38MAPKが3週、5週のカプリゾン投与で発現減少を示し、同様に3週の人参養栄湯投与でもそれらの回復はできなかった。しかし、5週間の人参養栄湯投与により有意な回復が確認された（図8）⁸⁾。

以上の結果より、人参養栄湯はFcR γ /Fyn-Rho-MAPKシグナル伝達系を活性化し、その結果発現が上昇したMBPがオリゴデンドロサイト前駆細胞を分化誘導し最終的にオリゴデンドロサイトが増え、再髄鞘化を促進している可能性が示された。

4 カプリゾン誘発性脱髄に対する人参養栄湯の遺伝子発現への影響

脱髄に対する人参養栄湯の効果を、遺伝子レベルにおいてもGeneChipを用いて解析を行った。サンプルのタイミングは、3週間のカプリゾン投与および人参養栄湯投与群である。まず、3週間のカプリゾン投与によりコントロールと比べ発現が減少した遺伝子プローブの上位に、MBPに代表されるミエリン関連タンパク、ミエリンの構造維持に関連するような遺伝子が見られた。一方、カプリゾン+人参養栄湯3週間投与によりコントロールに比べ発現が上昇した遺伝子プローブ上位では3週のカプリゾン投与で減少が見られたミエリン関連遺伝子プローブの一部が今度は増加を示していた。このことから、人参養栄湯が遺伝子レベル、タンパクレベルにおいてもMBPを取り巻くファミリーを活性化することで再髄鞘化を促進していることが確認できた（表1）⁷⁾。

表1 カプリゾン3週投与により変化した遺伝子プローブ
上：減少、下：増加

Probe set ID	Definition	Gene ID	Fold change water/cup
1450483_at	Gap junction membrane channel protein alpha 12	118454	28.1
1418086_at	Protein prosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	68458	9.9
1417275_at	Myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein	17153	7.8
1448982_at	Protease, serine 18	19144	7.2
1448768_at	Myelin oligodendrocyte glycoprotein	17441	5.0
1426960_a_at	Fatty acid 2-hydroxylase	338521	4.9
1460219_at	Myelin-associated glycoprotein	17136	4.8
1451961_a_at	Myelin basic protein	17196	4.8
1425467_a_at	Proteolipid protein (myelin) 1	18823	4.6
1432558_a_at	Myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein	17153	4.5
1433543_at	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i>)	68743	4.5
1420968_at	Hyaluronan and proteogly can link protein 2	73940	4.3
1418472_at	Aspartoacylase (aminoacylase) 2	11484	4.1
1419063_at	UDP-glucuronosyltransferase 8	22239	4.0
1416003_at	Claudin 11	18417	3.8
1451718_at	Proteolipid protein (myelin) 1	18823	3.7
1418406_at	Phosphodiesterase 8A	18584	3.6
1423946_at	PDZ and LIM domain 2	213019	3.6
1454651_x_at	Myelin basic protein	17196	3.5
1450088_a_at	Myelin-associated oligodendrocytic basic protein	17433	3.3

Probe set ID	Definition	Gene ID	-Fold change NYT/control
1438403_s_at	Receptor (calcitonin) activity-modifying protein 2	54409	2.2
1452751_at	Early B-cell factor 3	73115	2.2
1460219_at	Myelin-associated glycoprotein	17136	2.2
1418517_at	Iroquois-related homeobox 3 (<i>Drosophila</i>)	16373	2.0
1417153_at	BTB (POZ) domain containing 14A	67991	2.0
1454651_x_at	Myelin basic protein	17196	2.0
1436201_x_at	Myelin basic protein	17196	1.9
1424567_at	Tetraspan 2	70747	1.8
1437341_x_at	Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1	12799	1.8
1451718_at	Proteolipid protein (myelin) 1	18823	1.8

出典：文献8), C. Seiwa et al., *J. Neurosci. Res.*, **85**, 954-966 (2007)

5 行動学的検討

老化に伴い脱髄が起こると、組織学的・生化学的な変化以外にも記憶や意欲の低下といった精神的な影響も見られる。ヒトにおけるこういった現象を動物でどう評価するかは非常に難しい課題であるが、動物（マウス）モデルにおいて一般的に上記の記憶力や意欲の低下の指標として用いられる行動実験を行うことが妥当であると思われた。試験は、電撃を加えることに対するPassive Avoidance（受動回避試験）を行った。Passive Avoidanceは、2つのBoxで構成された装置で、一方が暗室、もう一方が明室となっている。マウスは夜行性のため極力暗室の方へ移動したがる性質をもつ。しかし、この装置では暗室に入ると一瞬電撃刺激が加えられる。マウスは驚き明室に飛び出してくるが、しばらくするとまた様子を窺いながら暗室に移動する。そうしてまた電撃を受ける。これを繰り返し、暗室に対する恐怖・不安が記憶される。これを一定期間後にどれだけ記憶を維持しているか再度評価するという方法である。

検討マウスは、32ヶ月齢、雌性ICRマウス11匹および28ヶ月齢である。初回に上記の刺激を5分間にわたり記憶させた。暗室に入った平均回数は3.5回であった。初回の試験1週間後、2週間後に刺激記憶の確認を行った。結果、1週後・2週後共に全ての雌性マウスで刺激記憶が保持されていた。よって、記憶力の低下は確認できなかった。しかし、マウスの約2年という寿命およびこれまでの老齢マウスにおける脳組織学的検討から32ヶ月齢ではほぼ確実に若齢時より脱髄が進行していることが予測できる。つまり、脳の脱髄状態と行動学的変化には時間的なギャップがあることが考えられる。一見、行動的には異常を感じられなくても脳内では着実に脱髄が進行している可能性を否定できないことになる。よって、上記の意味からも脳内の脱髄状態を出来るだけ早期から判定できる脱髄マーカーの検索が必要となる。その1つとして今回のpMBPもその指標としての有用性を秘めていると考えられる。

6 結語

漢方薬人参養栄湯にはMBPを介して脱髄細胞の再髄鞘化をすることが示された。再髄鞘化を担う細胞はオリゴデンドロサイトであるが、人参養栄湯には前駆細胞からの成熟も促進し、さらに髄鞘化を可能にすることが示された。その作用機序は脳内MBP産生に関わるFcR γ /Fyn-Rho-MAPKシグナル伝達系を活性化することで行われていることが見えてきた。

また、実際の脳内における脱髄の進行と、その表現形であるはずの行動変化には時間的ずれが生じていることがわかった。臨床において早期に対処するためには当然早期に発見することが必要でありそのためには脳内の脱髄状態を早期から反映するマーカーが必要である。今回対象とし

たpMBPはその対象としての大きな有用性を秘めており、今後これを用いた検査系の確立を期待したい。

文 献

- 1) <http://www.un.org/esa/population/publications/>
- 2) 宮永和夫ほか, 老年精神医学雑誌, **8**(12), 1317-1331 (1997)
- 3) 大塚俊男ほか, 老年精神医学雑誌, **3**(4), 435-439 (1992)
- 4) CP. Ferri *et al.*, *Lancet*, **366**, 2112-2117 (2005)
- 5) 清和千佳, 阿相皓晃, 知的機能の老化・加齢変化-脳機能の加齢による変化, 臨床検査, **50**(9), 961-969 (2006)
- 6) 清和千佳, 阿相皓晃, 老齢脳におけるミエリン形成の分子機構, 生体の科学, **57**(3), 184-190 (2006)
- 7) J. Kobayashi *et al.*, *Int Immunopharmacol.*, **3**, 1027-39 (2003)
- 8) C. Seiwa *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 954-966 (2007)