

博士学位論文

大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系に着目した
精神疾患に関する研究-隔離飼育マウスを用いた解析

平城 陽介

目次

	頁
序論	1
第1章 隔離飼育が背側縫線核—大脳皮質前頭前野間の神経回路に及ぼす影響の検討	3
実験方法	6
実験結果	
1-1. 隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA 神経系関連遺伝子発現量の解析	9
1-2. 隔離飼育マウスが示す異常行動と GABA _B 受容体の関連性についての解析	11
考察	16
第2章 隔離飼育による背側縫線核内の遺伝子発現変動の分子基盤解析	18
実験方法	20
実験結果	
2-1. 隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA _{B1} 遺伝子の DNA メチル化の解析	22
2-2. 隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA _{B1} 遺伝子の転写開始点周辺のヒストンアセチル化の解析	25
2-3. 隔離飼育マウスで見られる異常行動と GABA _{B1a} の発現量および DNA のメチル化との相関性に関する解析	26
考察	28
第3章 背側縫線核—大脳皮質前頭前野間の神経回路に注目した漢方薬の作用機序の解析	30
実験方法	31
実験結果	
3-1. 加味温胆湯の反復投与が隔離飼育マウスの異常行動と背側縫線核における GABA _{B1a} 発現増加に及ぼす影響	33
3-2. 行動薬理的解析による加味温胆湯と西洋薬の作用比較	35
3-3. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する加味温胆湯の作用	38
3-4. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する加味温胆湯の一味抜きエキスの作用	39
3-5. 隔離飼育マウスの異常行動に対する加味温胆湯竹筴抜きエキスの作用	40
3-6. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する竹筴エキスの作用	41
3-7. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する二陳湯、温胆湯の作用	42
考察	43

	頁
総括	47
謝辞	49
引用文献	50

序論

気分障害、統合失調症、不安障害などの精神疾患は、精神機能の障害に伴う著しい精神的苦痛や社会的機能低下をもたらす慢性疾患である。厚生労働省が3年毎に実施している傷病別の患者属性の調査である『患者調査』によると、本邦における精神疾患患者数は、1999年には204.1万人であったのに対し2014年には392.4万人であり、近年の精神疾患患者数の急激な増加がうかがえる。2013年から2015年にかけて実施された大規模疫学調査からは、本邦における生涯有病率は気分障害と不安障害に限ったものでも11.2%にのぼることが報告されており（精神疾患の有病率等に関する大規模疫学調査研究）、現代社会において精神疾患はありふれた病気と言える。2004年の世界保健機関（WHO）の報告によると、本邦を含めほぼすべての先進国において、病的状態、障害、早死により失われた年数を意味する障害調整生命年の最上位を精神神経疾患が占めている(1)。さらに、2017年には厚生労働省が、うつ病や自殺による本邦の経済損失額が年間約2.7兆円にのぼるとの推計結果を公表している。2018年には、このまま精神疾患への対策が講じられなければ、2010年から2030年の20年間において、世界経済に最大16兆ドルの損失が生じるとの報告がなされている(2)。このような現状から、精神疾患への対策は現代社会における最重要健康課題の一つと言える。

現代医療における精神疾患治療の柱の一つが、抗うつ薬や抗精神病薬を用いた薬物療法である。一般的に「精神疾患は薬物により治療可能」と認識されており、実際に薬物療法が一定の治療効果を示す。しかしながら、抗うつ薬による治療では改善作用が見られない患者が多数存在することからも、既存の薬物療法だけでは十分でないことがうかがえる。このように十分な精神疾患治療が実現しない要因の一つに、精神疾患の発症機序の詳細が未だ不明であることが挙げられる。現状、臨床現場で用いられている精神疾患治療薬が精神疾患病態の分子基盤に則して治療効果を発揮しているかは不明である。つまり、より良い精神疾患治療の実現には、精神疾患の発症および治療に関わる分子基盤の詳細な解析が必要である。

セロトニン神経系は抗精神病薬、抗うつ薬、抗不安薬など多くの精神疾患治療薬の標的となっているモノアミン神経系であり、精神疾患の発症や治療に強く関与することが示唆される。脳内におけるセロトニン神経細胞は、脳幹の縫線核と呼ばれる領域に細胞体が集中しており、この縫線核を起始核とし各脳領域に投射している。情動の制御において重要な役割を担うことが知られている大脳皮質前頭前野には、縫線核の背側部である背側縫線核に局在するセロトニン神経が投射している。死後脳研究から、うつ病自殺者の大脳皮質前頭前野では、セロトニントランスポーターが減少していることや(3)、セロトニン受容体の1つであるセロトニン_{1A}受容体の結合能が増加していることが報告されるなど(4)、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経系が精神機能の調節において重要であることが示唆されている。

こうした背景から本研究では、精神疾患の発症および治療に関わる分子基盤の一端を明らかにすることを目的に、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経系に着目した遺伝子発現解析、行動薬理的解析、エピゲノム解析を行った。

第1章 幼少期からの隔離飼育環境が背側縫線核—大脳皮質前頭前野間の神経回路の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

これまでに双生児研究や家系研究から、精神疾患には遺伝性が認められてきた。2003年のヒトゲノム解読以降は、精神疾患の原因遺伝子を同定することを目的に、気分障害や統合失調症をはじめとした精神疾患のゲノムワイド関連解析が盛んに行われてきた。しかしながら、遺伝要因のみでは精神疾患の発症を十分に説明できるには至らず、精神疾患の発症には遺伝要因以外の要因、すなわち環境要因の寄与を無視することはできないものと考えられる。

マウスなどのげっ歯類は離乳後から社会的に隔離した環境下で長期間飼育すると、成熟後に多動、攻撃行動、感覚情報処理機能障害、認知機能障害、社会性行動障害、うつ様行動、不安様行動といった異常行動を示す(5-10)。長期隔離飼育動物で出現する異常行動は抗精神病薬、抗不安薬、抗うつ薬などにより改善することから、ヒト精神疾患の一部を反映したものと考えられている(11, 12)。すなわち、長期隔離飼育動物は発育期の環境要因を基盤とする精神疾患の分子基盤を解明する上で有用なモデル動物であるものと考えられる。

隔離飼育動物の神経化学的解析から、大脳皮質前頭前野におけるドパミン代謝回転の減少や側坐核におけるセロトニン代謝回転の減少といった定常状態におけるモノアミン神経系の異常が見出されているほか(13)、電気ショックや覚せい剤投与といった外部刺激に対するモノアミン神経系の反応性の亢進など、モノアミン神経系の機能異常がこれまでに報告されている(14-20)。とりわけ背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経系の機能異常が、隔離飼育マウスで認められる異常行動に強く関与する可能性が示されている。隔離飼育マウスでは他個体と遭遇することで多動や過剰な攻撃行動を示すが、その際に背側縫線核が活性化し、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経が過剰に興奮することで、大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量が増加することが明らかになっている。セロトニン神経系の興奮を薬理的に抑制することにより、隔離飼育マウスで認められる多動や攻撃行動が抑制されることから、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経の過剰興奮が隔離飼育により引き起こされる精神機能異常の神経化学的基盤であるものと考えられている(21)。すなわち、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経の易興奮性が、隔離飼育のような環境要因により出現する精神機能異常の神経化学的基盤となる変化であるものと推定される。

これまでに薬理的、電気生理学的解析などから、大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系の起始核である背側縫線核は、攻撃性などの情動行動の制御において重要な脳領域であることが報告されている(22-28)。また、大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系の興奮は、起始核である背側縫線核に局在する GABA 神経系からの抑制性の入力により調

節されることが知られている(29-35) (図 1)。こうした知見から、大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系の易興奮性による情動行動の異常に、背側縫線核の GABA 神経系による興奮制御機能の不全が関与する可能性が考えられる。

GABA 神経系の神経伝達物質である GABA は抑制性神経伝達物質であり、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の働きによりグルタミン酸から生成される。GAD には GAD67 と GAD65 の 2 つのアイソフォームが存在しており、ともに GABA の生成において重要な役割を担っている。これら合成酵素により生成された GABA は刺激に応じてシナプス前終末 (プレシナプス) から細胞外に放出され、シナプス後膜 (ポストシナプス) の GABA 受容体を刺激することで抑制性の神経伝達が起こる。GABA 受容体はイオンチャネル型の GABA_A 受容体と代謝型の GABA_B 受容体に分類される。GABA_A 受容体は 5 つのサブユニットで構成される 5 量体タンパク質であり、構成サブユニットとして、 α 1-6、 β 1-3、 γ 1-3、 δ 、 ϵ 、 θ 、 π 、 ρ 1-3 の 19 種類が知られている。発現部位によりサブユニットの組み合わせに違いが見られることが知られているが、脳内では α 1 サブユニットが 2 つ、 β 2 サブユニットが 2 つ、 γ 2 サブユニットが 1 つからなる GABA_A 受容体が最も多い。GABA_B 受容体は GABA_{B1} サブユニットと GABA_{B2} サブユニットから構成されているヘテロ二量体である。GABA_{B1} サブユニットには GABA_{B1a} と GABA_{B1b} の主要な 2 つのスプライシングバリエントが存在する。これら GABA 合成酵素や GABA 受容体などの GABA 神経系関連遺伝子 (表 1) の発現量の変動が、GABA 神経系の機能に影響を及ぼすものと考えられる。

そこで本章では、隔離飼育によって引き起こされる大脳皮質前頭前野セロトニン神経系の易興奮性の分子基盤を明らかにすることを目的に、まず背側縫線核における GABA 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量に及ぼす隔離飼育の影響について解析を行った。また発現量の変化が認められた遺伝子に関しては、隔離飼育マウスが示す異常行動との関連性について追究した。

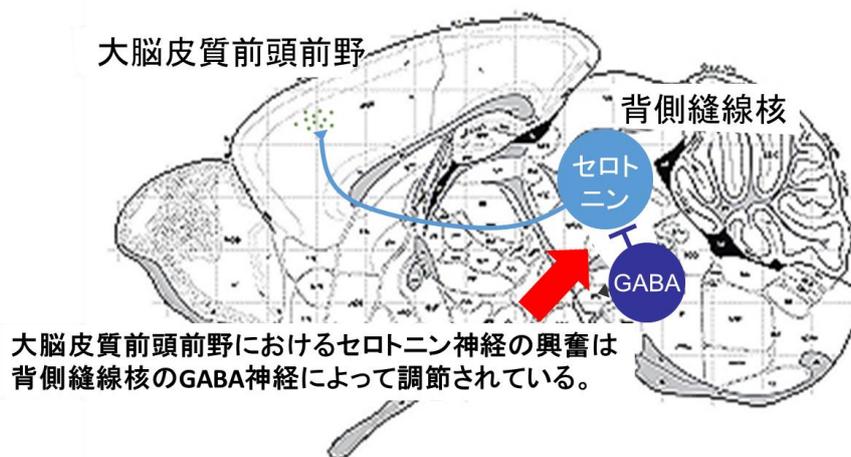


図 1. 背側縫線核における抑制性の GABA 神経によるセロトニン神経の調節

表 1. 脳内における主要な GABA 神経関連遺伝子

	遺伝子
GABA合成酵素	GAD67 GAD65
GABA _A 受容体	GABA _{Aα1} , GABA _{Aβ2} , GABA _{Aγ2}
GABA _B 受容体	GABA _{B1a} , GABA _{B1b} , GABA _{B2}

実験方法

1-1. 実験動物

実験には、3 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。マウスは透明なケージ (24×17×12 cm³) において 5 匹で集団飼育、あるいは壁が灰色の同じ大きさのケージにおいて 1 匹で隔離飼育し、9 週齢時から実験に用いた。飼育環境は室温: 23±1°C、照明時間: 1 日 12 時間(8:00~20:00)とし、水と固形飼料は自由に摂取させた。動物実験は「摂南大学動物実験に関する規定」に準拠して倫理的に行った。

1-2. 薬物

Baclofen および Phaclofen は sigma (St. Louis, MO, USA)より購入した。

1-3. Real-time RT-PCR 法

マウスから大脳皮質前頭前野または背側縫線核を単離後、Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、クロロホルム、イソプロパノールを用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA の 1 µg を ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan)により逆転写し、cDNA を合成した。定量的 real-time PCR は THUNDERBIRD qPCR Mix (Toyobo) と表 2 に示したプライマーを用いて Thermal Cycler Dice Real Time System Single (Takara Bio, Shiga, Japan)にて解析した。なお、mRNA 発現量は β-actin の mRNA 発現量で補正した。

表 2. Real-time PCR 法で用いたプライマー

mRNA	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
GABA _{Aα1}	CTGCTGGACGGTTATGACAA	AAACTGGTCCGAAACTGGTG
GABA _{Aβ2}	TGCCAACAATGAGAAGATGC	GATGTGGCCATCTCGTTTTT
GABA _{Aγ2}	GGCACCCTGCATTATTTTGT	GTTGCTGATCTGGGACGAAT
GABA _{B1a}	ACGTCACCTCGGAAGGTTG	CACAGGCAGGAAATTGATGGC
GABA _{B1b}	GCCTCTCACTCCCCTCATCT	GATCTTGATGGGGTTCGTTGT
GABA _{B2}	CAGCAAGCGTTCGGGTGTA	GTCTTGCGATGACCCAGAT
GAD67	GCCTGAAGATCTGTGGCTTC	AGCAGGTCTTGGAGGACTG
GAD65	AGAGAGGGCCAACTCTGTGA	CTCTGCATCAGTCCCTCCTC
β-actin	ACCCACACTGTGCCCATCTA	GCCACAGGATTCCATACCCA

1-4. Western blot 法

マウスから背側縫線核を単離後、RIPA Buffer (Nacalai Tesque)、SDS Solution (Nacalai Tesque)を加えて可溶化した。4°Cで1時間静置した後、4°C、10,000 ×gにて10分間遠心分離し、上清を回収した。抽出したタンパク質の濃度を測定した後、RIPA Buffer、2-mercaptoethanolを加え、タンパク質濃度が2 mg/mLとなるよう調製し、90°Cで2分間加熱し、これをサンプルとした。1レーンあたり10 μLのサンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。その後、メンブレンに転写した後、スキムミルクを含むTBS-T (Tris-buffered saline、0.1% Tween20)、を用いて室温で1時間ブロッキングした。その後、1次抗体として chicken anti-Tryptophan GABA_{B1} (1:10000; (36))、または rabbit IgG against GAPDH (1:3000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)と4°Cで一晩反応させた。反応後のメンブレンをTBS-Tで洗浄した後、2次抗体として donkey anti-chicken IgY (1:10000; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA)、または swine anti-rabbit IgG (1:3000; DakoCytomation, Glostrup, Denmark)と室温で60分間反応させた。なお、1次抗体および2次抗体の希釈には1%スキムミルクを含むTBS-Tを用いた。反応後のメンブレンをTBS-Tで洗浄した後、タンパク質バンドを Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) と X線フィルムで検出し、Image Jにてタンパク質量を定量した。

1-5. 自発運動量の評価

マウスを測定用ケージ (30×30×30 cm³) に入れ、30分間の移動距離を ANY-maze video tracking software にて解析した。

1-6. エンカウンター試験 (他のマウスと遭遇した際の多動の解析)

図2のように金網で仕切ったアクリルケージ (30×30×30 cm³) を用いて、仕切られた大きい区画に解析マウスを入れ、2時間馴化させた。その後、相手マウスとして同週齢の ddY 系雄性マウスを小さい区画に入れた後、20分間ビデオ録画し、解析マウスの運動時間を測定した。

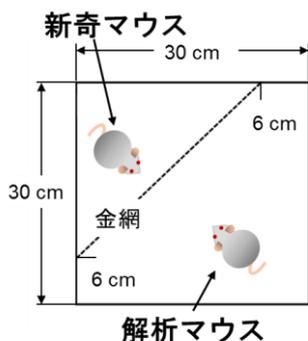


図2. エンカウンター試験用の測定ケージ

金網で仕切られた大きい区画に解析マウス (集団飼育マウスまたは隔離飼育マウス) を、小さい区画に相手マウス (解析マウスと同週齢の新奇 ddY マウス) を入れて、解析を行った。

1-7. 攻撃行動の測定

解析マウスと、intruder マウスとして解析マウスと同週齢同性の ddY 系マウスを、測定用ケージ (24×17×12 cm) に入れ、20 分間ビデオ録画し、総攻撃行動時間を測定した。解析マウスが示す intruder マウスへの噛み付き行動を攻撃行動として解析した。

1-8. 強制水泳試験

ビーカー (高さ 27 cm、直径 18 cm) に水温 25±1°C の水を 13 cm の深さまで満たし、その中で試験マウスを 6 分間泳がせビデオに録画し、最後の 4 分間における無動時間を測定した。

1-9. 背側縫線核への薬物の投与

マウスの背側縫線核 (ブレグマより 4.4 mm 後方、1.5 mm 右側、頭蓋表面より深さ 3.8 mm) にガイドカニューレ (長さ 4.0 mm: Eicom, Kyoto, Japan) を垂直方向から右側に 26 度の角度で挿入固定した (図 3)。術後、マウスに鎮痛薬としてブプレノルフィン (0.01 mg/kg, i.p.) を投与し、1 週間の回復期間を設けた。薬物の投与は Hamilton microsyringe を用いて、ガイドカニューレに設置したインジェクションカニューレを介して行った。薬液の投与量は 0.2 μ L とし、5 分間かけて投与した。

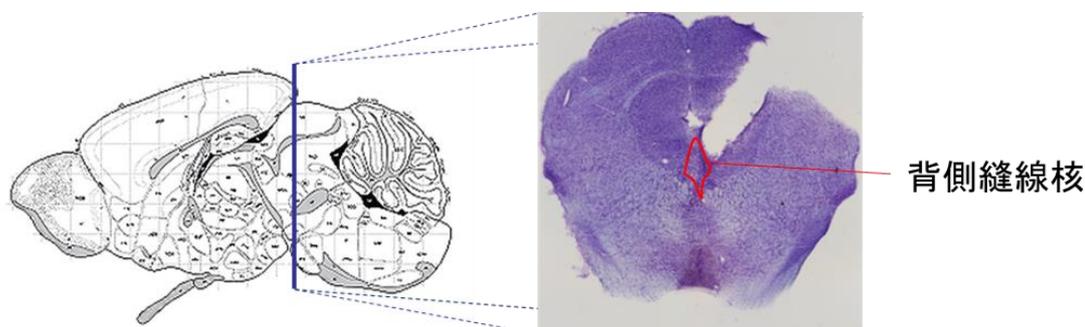


図 3. 背側縫線核へのガイドカニューレ挿入

1-10. 統計学的解析

データは全て「平均値±標準誤差」として表し、統計学的処理には StatView 5.0 J (SAS Institute Inc., Tokyo) を使用した。Student's *t* 検定、あるいは二元配置分散分析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。

実験結果

1-1 背側縫線核における GABA 神経系関連遺伝子発現量の解析

隔離飼育マウスの異常行動の一部に背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経系の過剰興奮が関与すること、また、この領域におけるセロトニン神経系の興奮は GABA 神経により抑制的に調節されることが知られている。そこで、背側縫線核および大脳皮質前頭前野における GABA 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量に隔離飼育が影響するかについて解析を行った。6 週間の隔離飼育を行ったマウスより背側縫線核と大脳皮質前頭前野を採取し mRNA 発現量を測定したところ、背側縫線核において GABA_B 受容体サブユニットの一つである GABA_{B1a} の発現量が有意に増加していた。一方で、GABA_{Aα1}、GABA_{Aβ2}、GABA_{Aγ2} といった GABA_A 受容体のサブユニット、GABA_{B1b} や GABA_{B2} といった他の GABA_B 受容体サブユニット、GAD67、GAD65 といった GABA 合成酵素の mRNA 発現量には変化が見られなかった (図 4A)。また、大脳皮質前頭前野では、今回解析したいずれの遺伝子においても mRNA 発現量に変化は見られなかった (図 4B)。さらに、背側縫線核において mRNA レベルで発現増加が確認された GABA_{B1a} は、タンパク質レベルにおいても発現増加が確認された (図 5)。

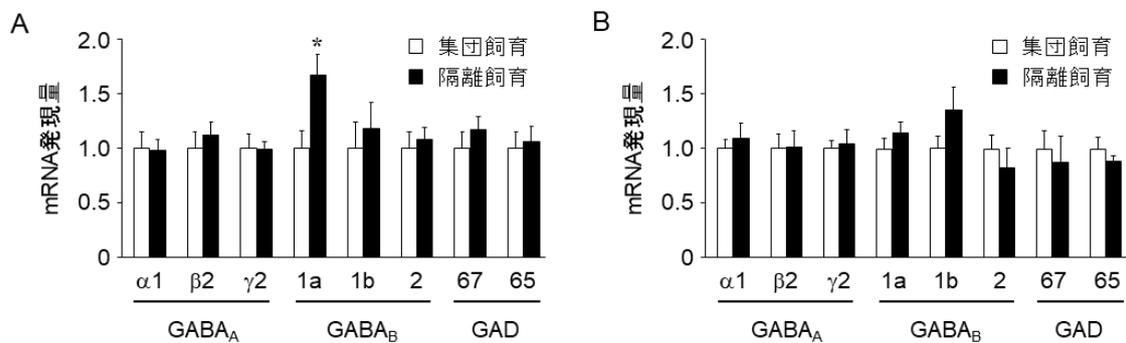


図 4. 隔離飼育マウスの背側縫線核 (A) と大脳皮質前頭前野 (B) における GABA 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量の変化

隔離飼育マウスの背側縫線核では、GABA_B 受容体のサブユニットの一つである GABA_{B1a} の mRNA 発現量が有意に増加していた。その他の GABA 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量に違いは見られなかった。一方で、大脳皮質前頭前野ではいずれの GABA 神経系関連遺伝子の mRNA 発現量も集団飼育マウスと隔離飼育マウスの間に違いは見られなかった。n=10-11。* $P < 0.05$ vs. 集団飼育マウス。(Neuropharmacology, 101, 1-12, 2016 から改変)

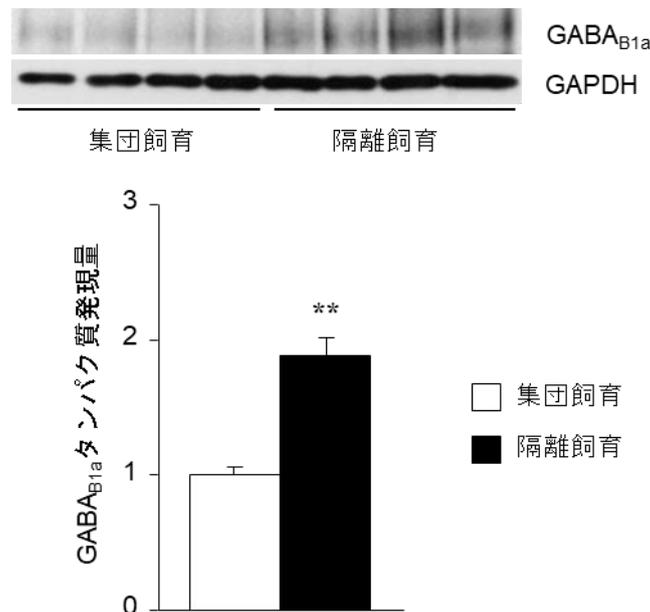


図 5. 隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA_{B1a} のタンパク質発現量の変化

隔離飼育マウスの背側縫線核では、GABA_{B1a} のタンパク質発現量が有意に増加していた。n=4。 ** $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

1-2 隔離飼育マウスが示す異常行動と GABA_B 受容体の関連性についての解析

本研究で注目している背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経系の過剰興奮は、隔離飼育マウスが他個体と遭遇した際に示す多動に関与することが知られている。そこで次に、前項で発現量の増加が見られた背側縫線核の GABA_{B1a} と隔離飼育マウスの異常行動との関連性を明らかにするために、GABA_B 受容体リガンドを背側縫線核内投与した動物を用いて行動薬理学的手法により解析を行った。その結果、GABA_B 受容体アゴニストである baclofen を 0.06 nmol 投与した隔離飼育マウスでは、「他個体と遭遇した際に出現する多動行動」が増悪した。また、対照群である集団飼育マウスに baclofen を 0.06 nmol の用量で投与した際に、「他個体と遭遇した際の運動量の増加」が観察され、その多動は隔離飼育マウスと同程度であった。しかしながら、集団飼育マウス、隔離飼育マウスともに、baclofen を 0.12 nmol の用量で投与した場合には、他個体と遭遇した際の運動量に変化は見られなかった (図 6)。一方で、GABA_B 受容体アンタゴニストである phaclofen を 0.1 nmol もしくは 0.3 nmol の用量で投与することにより、隔離飼育マウスが「他個体と遭遇した際に示す多動」は減弱した。なお、phaclofen は集団飼育マウスの運動量には影響を与えなかった (図 7)。

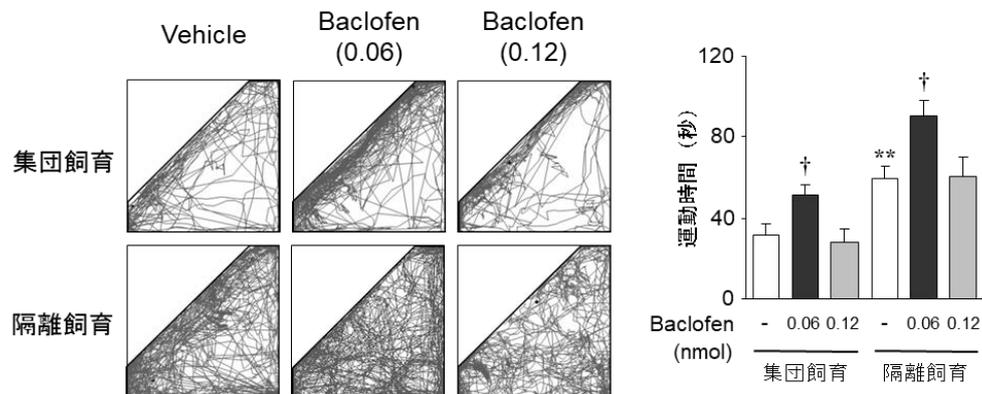


図 6. 他個体と遭遇した際の行動に対する $GABA_B$ 受容体アゴニスト baclofen の背側縫線核内投与の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、他個体と遭遇した際に、運動時間の有意な増加が観察された（左図：マウスの運動の軌跡。右図：運動時間の定量結果）。 $GABA_B$ 受容体アゴニスト baclofen を背側縫線核に 0.06 nmol の用量で投与すると、集団飼育マウス、隔離飼育マウスともに、他個体と遭遇した際の運動時間が vehicle 投与マウスと比べて有意に増加した。一方で、 $GABA_B$ 受容体アゴニスト baclofen を背側縫線核に 0.12 nmol の用量で投与した場合は、集団飼育マウス、隔離飼育マウスともに、他個体と遭遇した際の運動時間は vehicle 投与マウスと同程度であった。二元配置分散分析の結果、飼育環境 ($F_{1,33} = 34.39$, $P < 0.001$) 及び薬物 ($F_{2,33} = 8.95$, $P < 0.001$) による主効果が認められたが、交互作用 ($F_{2,33} = 0.35$, $P = 0.71$) は認められなかった。n=5-8。* $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。† $P < 0.05$ vs. vehicle 投与マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

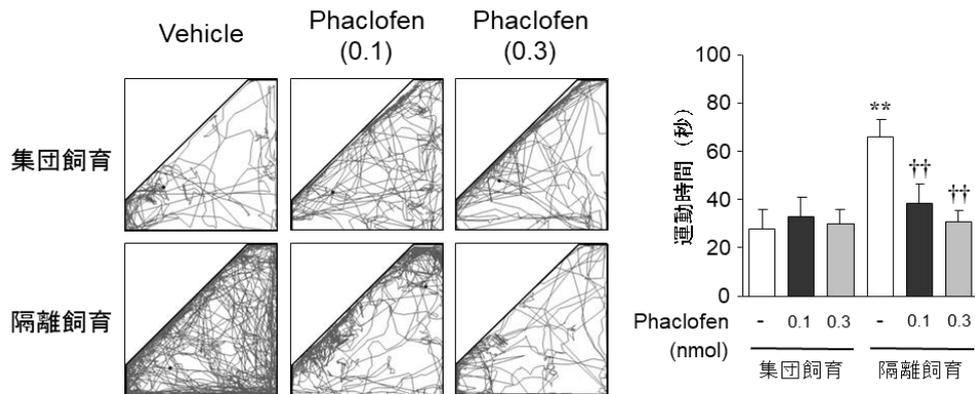


図 7. 他個体と遭遇した際の行動に対する $GABA_B$ 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、他個体と遭遇した際の、運動時間の有意な増加が観察された（左図：マウスの運動の軌跡。右図：運動時間の定量結果）。 $GABA_B$ 受容体アンタゴニスト phaclofen を背側縫線核に 0.1 nmol または 0.3 nmol の用量で投与すると、他個体と遭遇した際に隔離飼育マウスで観察される多動が、集団飼育マウスレベルにまで抑制された。一方で、 $GABA_B$ 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与は、集団飼育マウスの運動時間に影響を及ぼさなかった。二元配置分散分析の結果、飼育環境 ($F_{1,33} = 9.69, P < 0.01$) 及び薬物 ($F_{2,33} = 6.63, P < 0.01$) による主効果と交互作用 ($F_{2,33} = 6.59, P < 0.01$) が認められた。n=4-8。** $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。†† $P < 0.01$ vs. vehicle 投与マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

さらに、隔離飼育マウスが示す他の異常行動に対する背側縫線核 GABA_B 受容体の関与についても同様に解析を行った。その結果、「他個体と遭遇した際に見られる多動」と同様に、隔離飼育マウスが示す「過剰な攻撃行動」は 0.06 nmol の baclofen を投与することで増悪し、0.3 nmol の phaclofen を投与することで減弱した (図 8)。一方で、隔離飼育マウスが示す「新奇環境下での多動」および「強制水泳試験における無動時間」の増加に対しては、baclofen、phaclofen ともに影響を与えなかった (図 9, 10)。

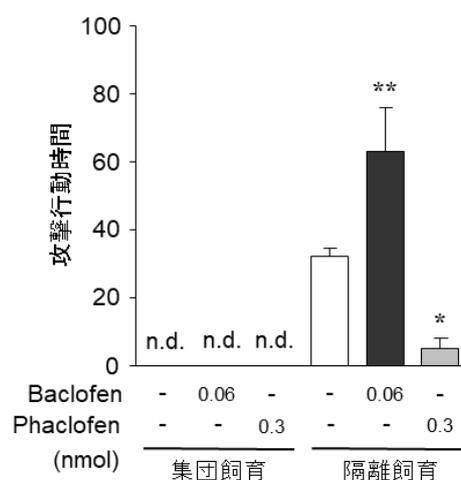


図 8. 攻撃行動に対する GABA_B 受容体アゴニスト baclofen および GABA_B 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与の影響

集団飼育マウスでは攻撃行動が認められなかったのに対し、隔離飼育マウスでは過剰な攻撃行動が観察された。隔離飼育マウスで観察された過剰な攻撃行動は、GABA_B 受容体アゴニスト baclofen を背側縫線核に 0.06 nmol の用量で投与することで増悪し、GABA_B 受容体アンタゴニスト phaclofen を背側縫線核に 0.3 nmol の用量で投与することで減弱した。一方で、GABA_B 受容体アゴニスト baclofen および GABA_B 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与は、集団飼育マウスの行動には影響を及ぼさなかった。二元配置分散分析の結果、飼育環境 ($F_{1,20} = 60.73, P < 0.001$) 及び薬物 ($F_{2,20} = 15.64, P < 0.001$) による主効果と交互作用 ($F_{2,20} = 15.64, P < 0.001$) が認められた。n.d = not detected。n=4-6。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle 投与マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

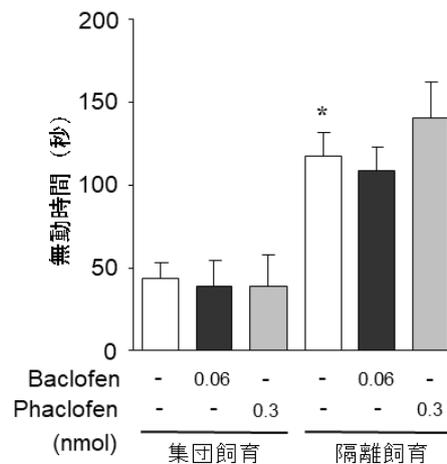


図 9. 強制水泳試験における無動時間に対する GABA_B 受容体アゴニスト baclofen および GABA_B 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、強制水泳試験における無動時間が有意に増加していた。集団飼育マウス、隔離飼育マウスともに、GABA_B 受容体アゴニスト baclofen および GABA_B 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与は無動時間に影響を及ぼさなかった。二元配置分散分析の結果、飼育環境 ($F_{1, 19} = 40.12, P < 0.001$) による主効果が認められたが、薬物 ($F_{2, 29} = 0.50, P = 0.61$) による主効果と交互作用 ($F_{2, 19} = 0.61, P = 0.56$) は認められなかった。n=4-5。* $P < 0.05$ vs. 集団飼育マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

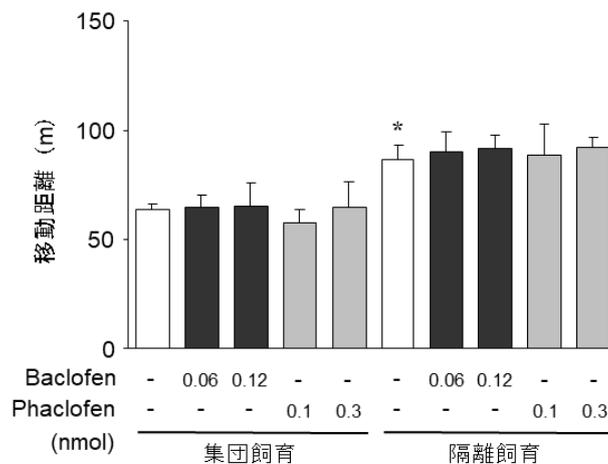


図 10. 新奇環境下における多動に対する GABA_B 受容体アゴニスト baclofen および GABA_B 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、新奇環境下における移動距離が有意に増加していた。集団飼育マウス、隔離飼育マウスともに、GABA_B 受容体アゴニスト baclofen および GABA_B 受容体アンタゴニスト phaclofen の背側縫線核内投与は移動距離に影響を及ぼさなかった。二元配置分散分析の結果、飼育環境 ($F_{1,36} = 25.99, P < 0.001$) による主効果が認められたが、薬物 ($F_{4,36} = 0.17, P = 0.95$) による主効果と交互作用 ($F_{4,36} = 0.065, P = 0.99$) は認められなかった。n=4-5。* $P < 0.05$ vs. 集団飼育マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

考察

本章では、隔離飼育マウスが示す異常行動の分子基盤を明らかにするために、背側縫線核のセロトニン神経系の興奮制御に関わる GABA 神経系関連遺伝子の発現量解析を行った。その結果、隔離飼育マウスでは背側縫線核において、GABA_B 受容体のサブユニットの1つである GABA_{B1a} の mRNA 発現量およびタンパク質発現量が集団飼育マウスと比較して有意に増加していることを見出した。GABA_B 受容体は、刺激が入力されると Ca²⁺チャネルの抑制や K⁺チャネルの活性化を介して細胞膜に過分極を引き起こし、神経細胞の興奮を抑制する働きを持つ受容体である。GABA_B 受容体は GABA_{B1} サブユニットと GABA_{B2} サブユニットから構成されているヘテロ二量体であり、GABA_{B1} サブユニットにはリガンド結合部位が存在し、GABA_{B2} サブユニットには G タンパク質が共役していることが知られている。GABA_{B1} には GABA_{B1a} と GABA_{B1b} の主要な2つのスプライシングバリエーションが存在することが報告されている(37)。本研究において隔離飼育マウスの背側縫線核で発現量の増加が見られた GABA_{B1a} は主にプレシナプス側に局在する GABA_B 受容体の構成サブユニットであることが知られており、プレシナプスからの GABA の放出を負に制御していることが報告されている。一方で、今回発現量の変化が見られなかった GABA_{B1b} を含む GABA_B 受容体は主にポストシナプス側に局在しており、GABA の放出への寄与は小さいと考えられている (図 11) (38, 39)。今回は、隔離飼育マウスの背側縫線核における細胞外 GABA 量について検討を行っていないため、GABA_{B1a} の発現増加が GABA の放出に及ぼす影響は不明であるが、これまでの報告を考慮すると、隔離飼育マウスの背側縫線核では GABA_{B1a} の発現量が増加していることで、抑制性神経伝達物質である GABA の放出が過剰に抑制され、セロトニン神経系の脱抑制が生じている可能性が考えられる。

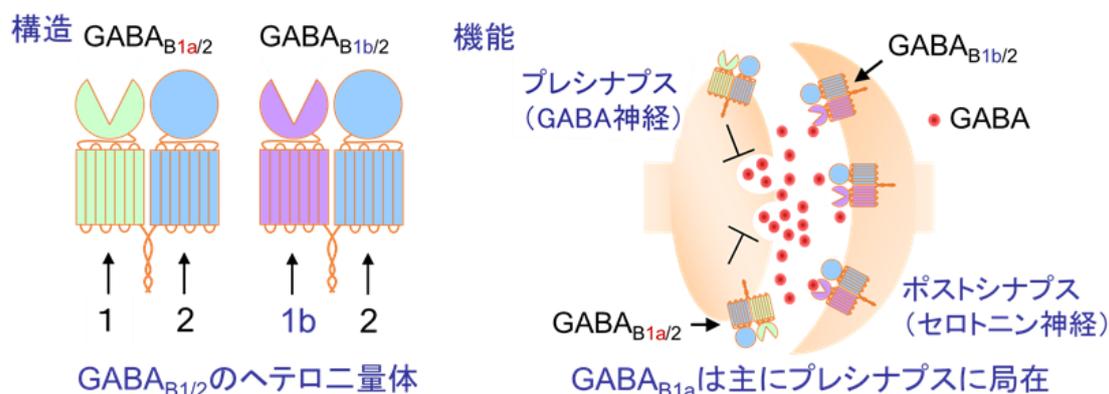


図 11. GABA_B 受容体の構造と機能

今回行った行動薬理的検討からは、背側縫線核内の $GABA_B$ 受容体を刺激することにより、隔離飼育マウスが他個体と遭遇した際に示す多動や過剰な攻撃行動が増悪することが明らかとなった。また、集団飼育マウスにおいても背側縫線核内の $GABA_B$ 受容体刺激により、隔離飼育マウスと同様な多動が誘発されることも見出された。一方で、背側縫線核内の $GABA_B$ 受容体を遮断することにより、これら隔離飼育マウスの異常行動が抑制された。しかしながら、 $GABA_B$ 受容体リガンドは、隔離飼育マウスが示す新奇環境下における多動や強制水泳試験における無動時間の増加といったうつ様行動には影響を及ぼさなかった。これまでに、背側縫線核の $GABA$ 神経系はセロトニン神経を負に制御することで感情の制御を行うことや(29-32, 34, 35, 40)、背側縫線核の $GABA_B$ 受容体刺激によりセロトニン神経の興奮と攻撃性が増加することが報告されている(41)。こうした知見から、背側縫線核の $GABA_B$ 受容体の活性化は、隔離飼育マウスで見られる異常行動のうち、攻撃行動などのように他個体との遭遇といった「社会的な刺激が引き金となる異常行動」に関与するものと考えられる。一方で、集団飼育マウスでは背側縫線核における $GABA_B$ 受容体の刺激では攻撃行動を誘発するに至らなかったことから、 $GABA_B$ 受容体の刺激は攻撃行動を増悪させるのみであり、攻撃行動を引き起こすには十分ではないものと推測される。

また興味深いことに、背側縫線核内投与の検討では、低用量 (0.06 nmol) の baclofen の投与では隔離飼育マウスの異常行動に改善が見られたのに対し、高用量 (0.12 nmol) の baclofen の投与では隔離飼育マウスが示す異常行動は改善されないといった、ベル型の用量反応を示した。これまでに背側縫線核を含むいくつかの脳領域において、低用量 (0.06 nmol) の baclofen はプレシナプス側の $GABA_B$ 受容体に優先的に刺激するのに対し、高用量 (0.12 nmol) の baclofen はプレシナプス側とポストシナプス側の両方の $GABA_B$ 受容体を刺激することが報告されている(42-45)。すなわち、低用量の baclofen はプレシナプス側の $GABA_B$ 受容体を刺激することで $GABA$ の放出が抑制され、結果としてポストシナプス側の神経の脱抑制が起こるが、高用量の baclofen はポストシナプス側の $GABA_B$ 受容体を刺激することで、直接的にポストシナプス側の神経を抑制するものと考えられている(43, 46)。こうした用量による baclofen の作用機序の違いが、本研究においてベル型の用量反応が見られた要因であるものと考えられる。つまり、ポストシナプス側に発現している $GABA_B$ 受容体よりもプレシナプス側に発現している $GABA_B$ 受容体、すなわち $GABA_{B1a}$ を含む $GABA_B$ 受容体が、隔離飼育マウスの異常行動に強く関与するものと想定される。現状、 $GABA_{B1a}$ を含む $GABA_B$ 受容体に選択性の高い薬物が存在しないため、行動薬理的解析では隔離飼育マウスの異常行動における $GABA_{B1a}$ の関与を明らかにすることはできない。今後、遺伝子組み換えウイルスベクターを用いた遺伝子過剰発現実験やノックダウン実験を行うことで、隔離飼育マウスで見られる異常行動における $GABA_{B1a}$ の関与が明らかになるものと考えられる。

第2章 隔離飼育による背側縫線核内の遺伝子発現変動の分子機序解析

第1章において、隔離飼育といった環境要因により、背側縫線核において $GABA_{B1a}$ の発現量が増加することを明らかとした。精神疾患の発症には環境要因が大きく寄与することが知られており、環境要因による遺伝子発現変動の詳細を明らかにすることが、精神疾患の発症における分子基盤の解明の一助となるものと考えられる。近年、環境要因による遺伝子発現変動の機序として、DNA やヒストンタンパク質の化学的修飾を介した遺伝子発現制御、いわゆるエピジェネティクスが提唱されており、環境要因が原因で発症する疾患の分子基盤の一端であるものとして注目されている。実際に臨床研究から、気分障害や統合失調症などの精神疾患におけるエピジェネティクスの関与が示唆されており(47-52)、精神疾患の発症機序を解明する上で環境要因によるエピゲノム修飾の解析は欠かせないものであると考えられる。

DNA のメチル化は、すべての真核生物で見られる現象であり、主に DNA のシトシン残基の 5 位にメチル基が付加される反応のことをいう。DNA のメチル化は、全てのシトシン残基で同様に観察されるものではなく、シトシン残基の 3' 末端側にグアニン残基が隣接する「CpG 部位」と呼ばれる配列で頻繁に観察される。CpG 部位はゲノム全体に分布しているものの、その分布は一様ではなく特定の領域に集中して観察される。CpG 部位が集中して観察される領域は CpG アイランドと呼ばれ、CpG アイランドの多くが遺伝子の転写開始点周辺に存在する(図 12)。一般的に、転写開始点周辺の CpG アイランドにおける DNA のメチル化は遺伝子の転写抑制に関与しており、細胞の分化や機能調節において重要な役割を担うものと考えられている(53-56)。DNA メチル化による転写抑制機序の詳細については未だ不明な点が多く残されているが、メチル化された DNA にヒストン脱アセチル化酵素がリクルートされることで、周辺のヒストンタンパク質の脱アセチル化が生じ、後述の機序による転写抑制が生じるという仮説が一般的に支持されている(57-59)。

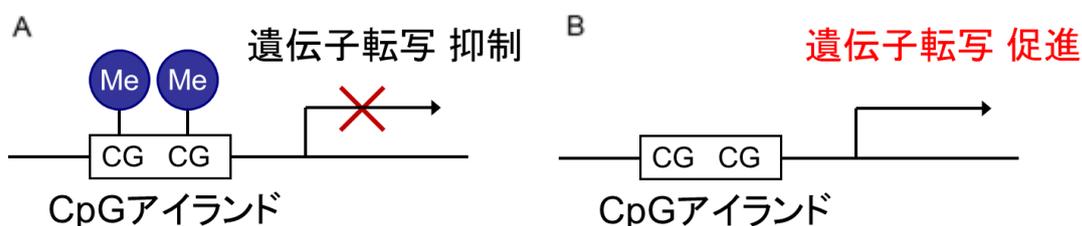


図 12. 転写開始点周辺の CpG アイランドにおける DNA メチル化が転写に及ぼす影響

一般的に、転写開始点周辺の DNA メチル化の増加は遺伝子の転写を抑制し (A)、DNA メチル化の減少は遺伝子の転写を促進する (B)。

ヒストンタンパク質のアセチル化は DNA のメチル化と同様に、一般的なエピゲノム修飾として知られている。ヒストンタンパク質のアセチル化は、8 量体のヒストンコアを形成するサブユニットである H2A、H2B、H3、H4 の N 末端側、所謂ヒストンテールの Lys 残基において生じる。未修飾のヒストンテールは正電荷を帯びており、負電荷を帯びた DNA を結合させることでヌクレオソーム構造を形成している。ヌクレオソーム構造では DNA とヒストンが密接に結合しているため、転写因子などのタンパク質が DNA に結合できず転写が抑制された状態となっている (図 13A)。しかしながらヒストンテールがアセチル化されると、ヒストンテールの正電荷が中和されることによりヒストンテールと DNA の結合が弱くなり、ヌクレオソーム構造が緩和される (図 13B)。その結果、転写因子が DNA と結合できるようになり、転写が促進する(60-62)。

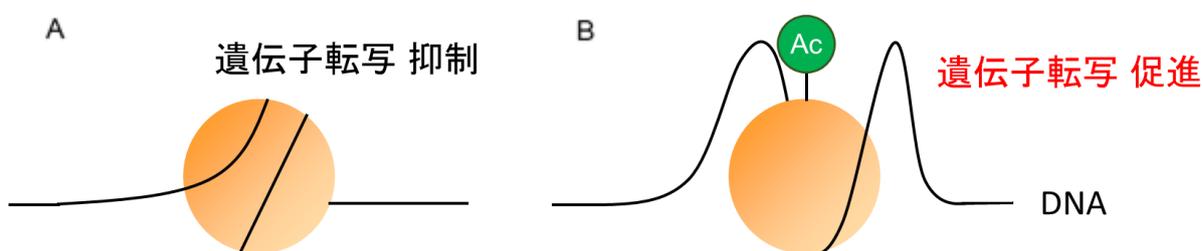


図 13. ヒストンタンパク質のアセチル化が転写に及ぼす影響

アセチル化されていないヒストンは DNA と密接に結合しているため、転写因子が DNA に結合できず遺伝子の転写が抑制される (A)。一方で、ヒストンがアセチル化されると、ヒストンの正電荷が中和されることによりヒストンと DNA の結合が弱くなり、ヌクレオソーム構造が緩和され、転写因子が DNA に結合することで遺伝子の転写が促進する (B)。

このようなエピゲノム修飾は、後天的な環境要因により変動することが知られている。そこで本章では、背側縫線核における $GABA_{B1a}$ 発現量が隔離飼育といった環境要因により増加する機序を明らかにすることを目的に、 $GABA_{B1a}$ 転写開始点周辺の DNA メチル化やヒストンタンパク質アセチル化について解析をおこなった。

実験方法

2-1. 実験動物

1-1.に準ずる。ただし4週間の隔離飼育マウスは、3週齢から隔離飼育し、7週齢時に各種実験に用いた。

2-2. バイサルファイトシーケンス法

背側縫線核および大脳皮質前頭前野から DNA 抽出液 (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA, 0.1%SDS, 100µg/ml proteinase K)、TE 飽和 phenol (Nacalai Tesque)、phenol:chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1 (pH7.9)(Nacalai Tesque) および ethanol を用いてゲノム DNA を抽出した。DNA のバイサルファイト処理は、MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Takara Bio) を用いて行った。バイサルファイト処理した DNA を鋳型として、表3に示すプライマーを用いて PCR により目的領域を増幅した。得られた PCR 産物は電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて単離精製した。精製した DNA は pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) を用いてクローニングし、DNA 配列決定サービス (Fasmac, Kanagawa, Japan) により配列を決定した。解析には、マウス 1 匹あたり正しい配列のインサートを含む 8~10 の独立した組換えクローンをを用いた。

表 3. バイサルファイトシーケンス法で用いたプライマー

CpG アイランド	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
1	TTGGATTTTTGTGGAAGAAGAATAG	CACCAACAACAACAACATCTA
2	AAGTTTTTTTTTTAGTTTTTTTTTTTT	AAATCTACTTCACAATCCCAAAA

2-3. クロマチン免疫沈降法

5匹のマウスの背側縫線核を1サンプルとして使用した。単離した組織は液体窒素で凍結し、ドライアイス上で小片(1~2mm)に細断した。細断した組織に1%ホルムアルデヒドを含有するリン酸緩衝食塩水(PBS)を10ml加え、室温にて15分間ローターを用いて転倒混和した。転倒混和後、ChIP-IT Express Enzyme Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) 付属のグリシン溶液を2ml添加し、さらに5分間転倒混和した。その後、ダウンズホモジナイザーの Loose ペストル (Wheaton, Millville, NJ, USA) を用いて組織をホモジナイズし、4℃、720×gで5分間遠心分離した。上清を完全に取り除いたペレットにプロテアーゼ阻害剤カクテルおよびPMSFを含む溶解バッファーを1ml添加し、

氷上で 30 分間インキュベートした。その後、ダウンスホモジナイザーの Tight ペストルを用いてホモジナイズし、4 °C、720 ×g で 10 分間遠心分離することで核抽出物を得た。各抽出物は 1 ml の氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、ChIP-IT Express Enzyme Kit 付属の Digestion Buffer を 350 μL 添加し再懸濁した。クロマチンの調製は、ChIP-IT Express Enzyme Kit を用いて、付属のマニュアル通り行った。得られたクロマチンと抗アセチル化ヒストン H3 および抗アセチル化ヒストン H4 抗体 (Active Motif) を用いて 4 °C で一晩、免疫沈降を行った。ChIP DNA と Input DNA は phenol:chloroform:isoamyl alcohol 25:24:1 (pH7.9)(Nacalai Tesque) および ethanol で精製し、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio) と表 4 に示したプライマーを用いて、*gabbr1* 遺伝子の CpG アイランド領域を定量した。

表 4. クロマチン免疫沈降法で用いたプライマー

GABA _{B1a} 転写開始点からの距離 (塩基対)	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
-1034 ~ -816	GGTGTAAGCATTTCCTGCT	ACCAAGGCTCTCAACCTTCA
-161 ~ 38	GGTCTCTCGGCAGCTCTTAG	GAGGGTGCAGGGGAAGAC
197 ~ 430	CCTGGATTCCCTGTGGAAGAA	CTACCCCATCACTCGCCTCT
2841 ~ 3048	CCACCCTCCTTTCCTTTAGTG	GCAAAGGACCAGTCCTAGAAGA
4714 ~ 4838	GTCTCTGGCCCTAGGAAGC	GACACTTCTTCTGGGGAAGG
4928 ~ 5049	CTGCCTCTTCTGCTGGTGAT	TATACTGCACGCCGTTCTGA

2-4. 統計学的解析

1-10 に準ずる。

実験結果

2-1. 隔離飼育マウスの背側縫線核における $GABA_{B1}$ 遺伝子の DNA メチル化の解析

$GABA_{B1}$ 遺伝子には、2 つの主要なスプライシングバリエント、 $GABA_{B1a}$ および $GABA_{B1b}$ が存在するが、それぞれの発現制御は異なるプロモーターにより調節されることが知られている(63)。 $GABA_{B1a}$ および $GABA_{B1b}$ の転写開始点の周辺には、それぞれ CpG アイランド (CG の割合が 60%以上、観察された CpG 数が理論上予想される CpG 数の 60%以上、および長さが 200 塩基対以上) が 1 つずつ存在している (CpG アイランド 1 および 2) (図 14)。こうした CpG アイランドの局在から、CpG アイランド 1 および 2 における DNA のメチル化が、それぞれ $GABA_{B1a}$ および $GABA_{B1b}$ の転写を調節するものと考えられる。

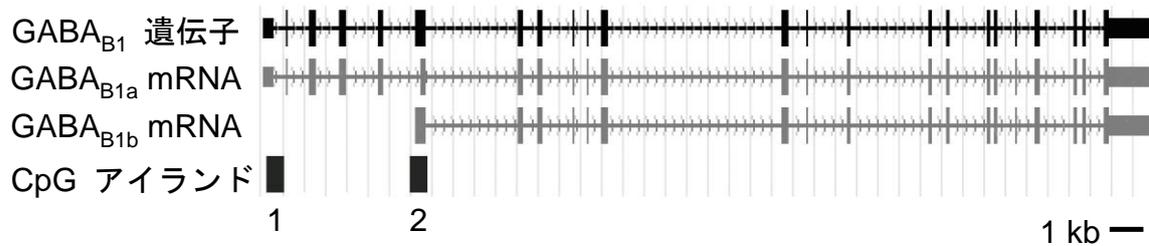


図 14. $GABA_{B1}$ 遺伝子の構造

$GABA_{B1}$ 遺伝子には $GABA_{B1a}$ と $GABA_{B1b}$ の主に 2 つのスプライシングバリエントが存在する。2 つのスプライシングバリエントは転写開始点が異なり、それぞれの転写開始点の周辺には CpG アイランドが存在する。

そこで本項では、背側縫線核における GABA_{B1} 遺伝子の 2 つ CpG アイランドの DNA メチル化が隔離飼育により影響を受けるかについて解析を行った。GABA_{B1} 遺伝子の CpG アイランド 1 には 53 個の CpG 部位が存在するが、背側縫線核における 53 箇所の CpG 部位の DNA メチル化について解析したところ、集団飼育マウス、隔離飼育マウスともに、ほとんどの CpG 部位の DNA メチル化率は低値を示した。しかしながら、GABA_{B1a} の転写開始点の 516 塩基対下流に位置する CpG 部位の DNA メチル化は、集団飼育マウスにおいて比較的高い割合を示し、隔離飼育マウスでは集団飼育マウスと比べて有意に DNA メチル化が減少していることが明らかとなった (図 15)。

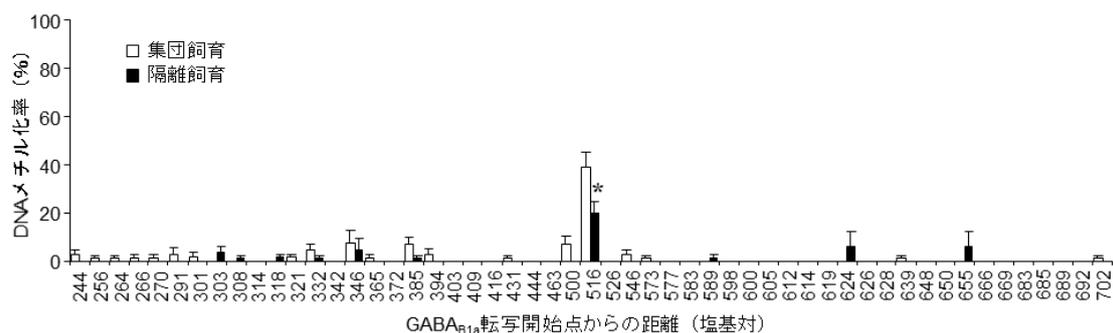


図 15. 隔離飼育マウスの背側縫線核の CpG アイランド 1 における DNA メチル化率

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、GABA_{B1a} 転写開始点の 516 塩基対下流の CpG 部位において、DNA メチル化率の有意な減少が見られた。n=8。* $P < 0.05$ vs. 集団飼育マウス。(Neuropharmacology, 101, 1-12, 2016 から改変)

一方で CpG アイランド 2 には 44 個の CpG 部位が存在するが、CpG アイランド 1 とは異なり、集団飼育マウス、隔離飼育マウスとも、高い割合で DNA メチル化が見られた。また、いずれの CpG 部位においても DNA メチル化に両飼育環境間で違いは見られなかった (図 16)。

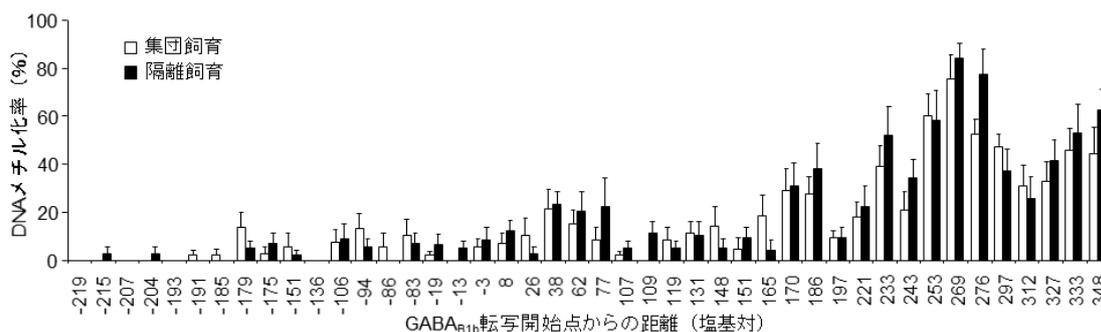


図 16. 隔離飼育マウスの背側縫線核の CpG アイランド 2 における DNA メチル化率
 集団飼育マウスと隔離飼育マウスで DNA メチル化率に違いは見られなかった。n=8。

背側縫線核で DNA メチル化率に変化が見られた CpG アイランド 1 について、大脳皮質前頭前野においても同様の解析を行った。その結果、大脳皮質前頭前野では CpG アイランド 1 における DNA メチル化に変化は認められなかった (図 17)。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

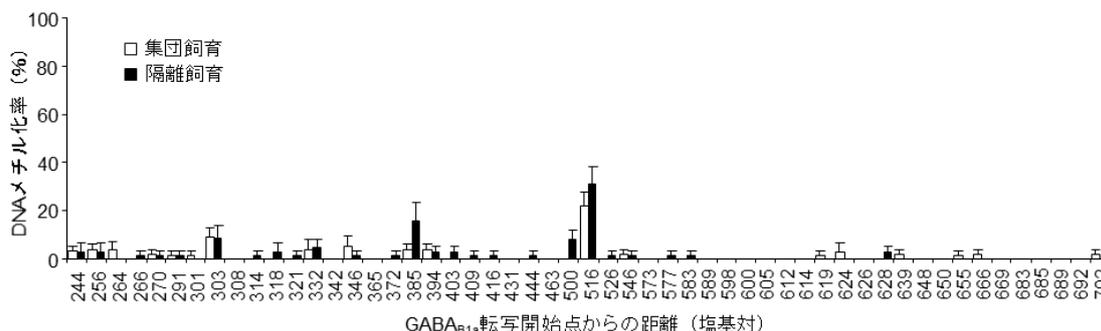


図 17. 隔離飼育マウスの大脳皮質前頭前野の CpG アイランド 1 における DNA メチル化率
 集団飼育マウスと隔離飼育マウスで DNA メチル化率に違いは見られなかった。n=8。
 (Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

2-2. 隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA_{B1} 遺伝子の転写開始点周辺のヒストンアセチル化の解析

ヒストンアセチル化による転写制御には、主にヒストン H3 サブユニットおよびヒストン H4 サブユニットのアセチル化が関与することが知られている。そこで、GABA_{B1a} の転写開始点周辺および GABA_{B1b} の転写開始点周辺において、ヒストン H3 とヒストン H4 のアセチル化の状態について解析を行った。その結果、隔離飼育マウスの背側縫線核では GABA_{B1a} の転写開始点周辺において、ヒストン H3 のアセチル化率の有意な増加が観察された。一方で、GABA_{B1b} の転写開始点周辺においては、ヒストン H3 のアセチル化率に両飼育環境間で違いは認められなかった (図 18A)。また、ヒストン H4 のアセチル化率に関しては、GABA_{B1a} の転写開始点周辺および GABA_{B1b} の転写開始点周辺ともに、飼育環境による違いは見られなかった (図 18B)。

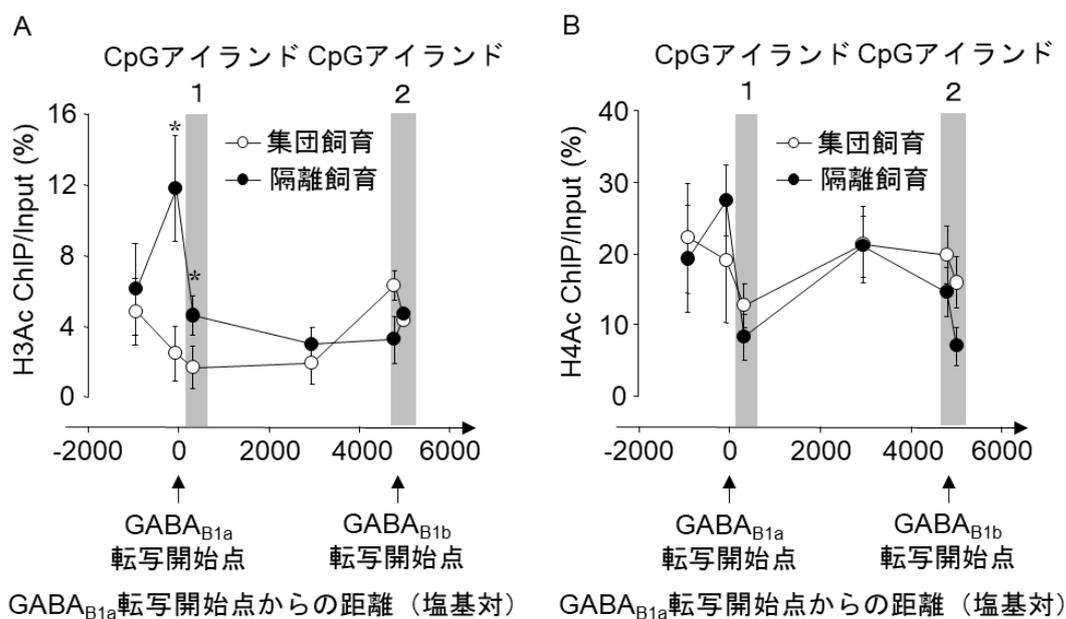


図 18. 隔離飼育マウスの背側縫線核の GABA_{B1} 遺伝子転写開始点周辺におけるヒストン H3、H4 のアセチル化率の変化

(A) 集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、GABA_{B1a} 転写開始点周辺におけるヒストン H3 のアセチル化が有意に増加していた。一方で、GABA_{B1b} 転写開始点周辺におけるヒストン H3 のアセチル化には、集団飼育マウスと隔離飼育マウスで違いは見られなかった。(B) H4 のアセチル化は、GABA_{B1a} 転写開始点周辺、GABA_{B1b} 転写開始点周辺ともに、集団飼育マウスと隔離飼育マウスとで違いは見られなかった。n=5。*P < 0.05 vs. 集団飼育マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

2-3. 隔離飼育マウスで見られる異常行動と $GABA_{B1a}$ の発現量およびDNAのメチル化との相関性に関する解析

これまでの検討から、隔離飼育マウスの背側縫線核において、 $GABA_{B1}$ 遺伝子のエピゲノム修飾の変化が観察された。こうしたエピゲノム変化による $GABA_{B1a}$ の発現増加が、隔離飼育マウスで出現する異常行動に関与する可能性が推測される。この仮説を実証するためには、標的のエピゲノム変化を人為的に制御したマウスを作製し、表現型を解析することが望ましい。しかしながら、現状では標的のエピゲノム変化を制御するような技術は確立されていない。

そこで本研究では、隔離飼育マウスで見られる異常行動と $GABA_{B1a}$ の発現量およびDNAのメチル化との関係性を明らかにすることを目的に、異常行動が十分に観察されない隔離飼育4週間後のマウスにおいて mRNA 発現量およびDNAのメチル化を解析し、異常行動と mRNA 発現量およびDNAのメチル化との相関性を評価した。まず、4週間の隔離飼育を行ったマウスにおいて行動を解析したところ、6週間の隔離飼育と異なり、他個体と遭遇した際の多動は見られなかった (図 19)。

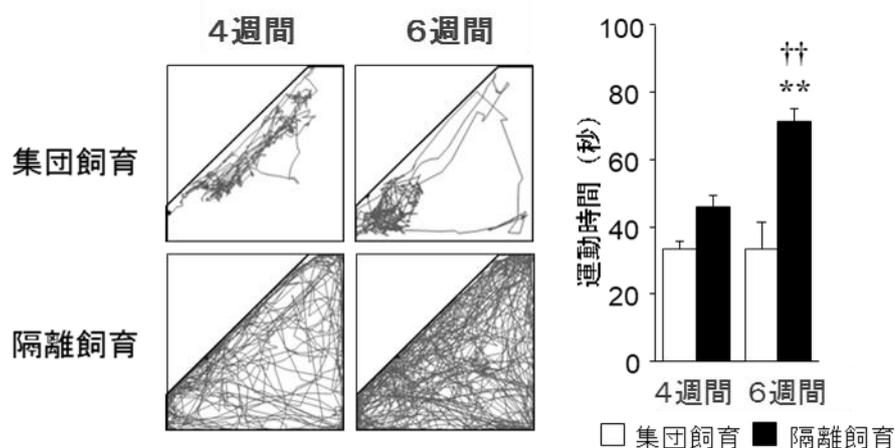


図 19. 4週間または6週間の隔離飼育が新規マウスと遭遇した際の行動に及ぼす影響

6週間の隔離飼育では、集団飼育と比べて運動時間の有意な増加が観察されたのに対し、4週間の隔離飼育では運動時間の有意な増加は認められなかった (左図: マウスの運動の軌跡。右図: 運動時間の定量結果)。二元配置分散分析の結果、飼育環境 ($F_{1,20} = 50.18, P < 0.001$) 及び飼育期間 ($F_{1,20} = 20.92, P < 0.001$) による主効果と交互作用 ($F_{1,20} = 10.29, P < 0.01$) が認められた。n=6。** $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。†† $P < 0.01$ vs. 4週間飼育マウス。(Neuropharmacology, **101**, 1-12, 2016 から改変)

こうした4週間隔離飼育したマウスの背側縫線核では、GABA_{B1a} mRNA 発現量の有意な増加は見られなかった (図 20)。

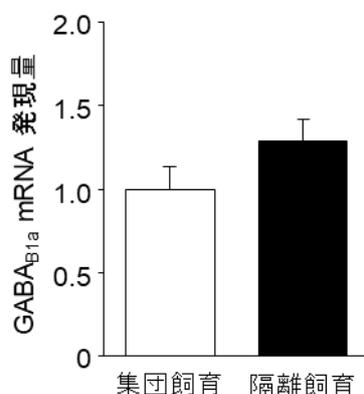


図 20. 4 週間の隔離飼育が背側縫線核の GABA_{B1a} mRNA 発現量の及ぼす影響

4 週間の隔離飼育では、背側縫線核の GABA_{B1a} mRNA 発現量の有意な増加は認められなかった。n=10-11。(*Neuropharmacology*, **101**, 1-12, 2016 から改変)

また、背側縫線核における GABA_{B1} 遺伝子の DNA メチル化についても解析したところ、6 週間の隔離飼育で観察された CpG アイランド 1 における DNA メチル化率の有意な減少は 4 週間の隔離飼育では認められなかった (図 21)。

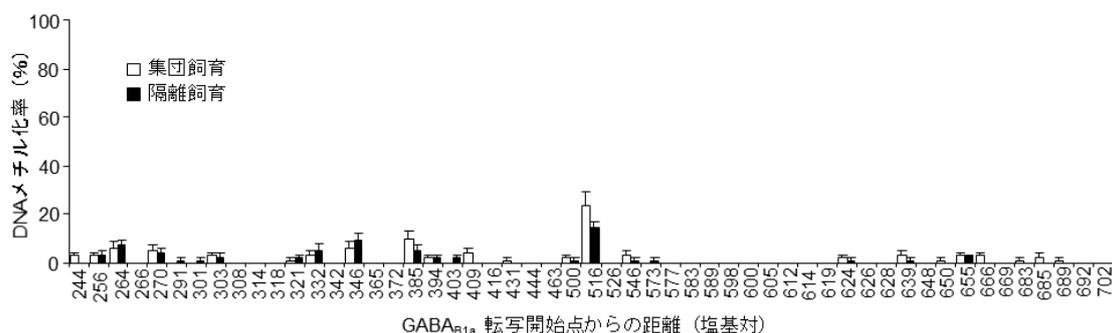


図 21. 4 週間の隔離飼育が背側縫線核の CpG アイランド 1 におけるメチル化率に及ぼす影響

4 週間の隔離飼育では有意な DNA メチル化率の減少は認められなかった。n=6。(*Neuropharmacology*, **101**, 1-12, 2016 から改変)

考察

本章では、隔離飼育マウスの背側縫線核で見られる $GABA_{B1a}$ の発現増加とエピゲノム修飾の関連性を明らかにするために、 $GABA_{B1}$ 遺伝子の転写開始点周辺における DNA のメチル化やヒストンタンパク質のアセチル化について解析した。その結果、隔離飼育マウスにおいて $GABA_{B1a}$ の発現増加が見られた背側縫線核では、 $GABA_{B1a}$ の転写開始点周辺の DNA のメチル化が減少するとともにヒストン H3 のアセチル化も増加しており、転写促進が推察されるようなエピゲノム修飾の変化が観察された。一方で、発現変動が見られなかった $GABA_{B1b}$ の転写開始点周辺では、DNA のメチル化にもヒストンタンパク質のアセチル化にも変化は認められなかった。さらに、第 1 章で $GABA_{B1a}$ の発現変動が見られなかった隔離飼育マウスの大脳皮質前頭前野では、背側縫線核とは異なり DNA メチル化の減少は観察されなかった。さらに、4 週間隔離飼育したマウスを用いた検討から、 $GABA_{B1a}$ の転写開始点周辺におけるエピゲノム修飾の変化は、 $GABA_{B1a}$ の mRNA 発現量や異常行動と相関していることも明らかとなった。

これらの結果は、環境要因によるエピゲノム修飾の変化が脳領域依存的、遺伝子依存的、時間依存的に生じることを示すとともに、隔離飼育により引き起こされる異常行動にエピゲノム修飾の変化が関与する可能性を強く示唆するものである。

$GABA_{B1a}$ の転写開始点の上流 84 塩基対から 7 塩基対の領域は、ヒトとマウスの間においても配列が 93%一致するなど高度に保存されている。この領域には転写において重要となる TATA ボックスは存在しないが、転写因子である SP1 の結合サイトが存在するなど転写において重要な領域であることが知られている(63)。したがって、 $GABA_{B1a}$ の転写開始点周辺における DNA メチル化の減少がヒストン H3 のアセチル化を誘導し、SP1 などの転写因子の結合を促進することで転写が活性化している可能性が考えられる。

また、隔離飼育により DNA のメチル化率が減少した $GABA_{B1a}$ 転写開始点周辺の CpG アイランド 1 には、転写因子である Egr-1 の結合部位が存在する。Egr-1 は、DNA メチル基転移酵素やヒストン脱アセチル化酵素などのエピジェネティクス関連酵素と複合体を形成し、エピゲノム修飾に関与することが知られている(64)。また、我々の予備的検討から隔離飼育マウスの背側縫線核では Egr-1 の発現量が減少していることが明らかとなっている。こうした知見から、隔離飼育環境により、背側縫線核において Egr-1 の発現量が減少することで、 $GABA_{B1a}$ 転写開始点周辺での DNA メチル基転移酵素やヒストン脱アセチル化酵素の結合量が減少し、DNA メチル化の減少やヒストンタンパク質のアセチル化の増加が引き起こされる可能性も想定される。

第 1 章と第 2 章を通して、隔離飼育により生じる背側縫線核での $GABA_{B1}$ 遺伝子のエピゲノム修飾変化が異常行動の出現に関与する可能性が示された。こうした研究結果は、精神疾患の発症に脳領域選択的かつ遺伝子選択的なエピゲノム修飾の変化が関与する

ことを示唆している。しかしながら、既存の治療薬は脳領域選択的あるいは遺伝子選択的な作用を期待できるとは言い難い。こうした選択性の欠如が副作用の発現などにつながる可能性も考えられる。すなわち、より効果的な治療法の開発には、脳領域選択的かつ遺伝子選択的なエピゲノム修飾の制御が重要となってくるものと考えられる。現状、エピゲノム修飾の制御機構については不明な点も多い。今後、エピゲノム修飾を疾患の治療標的とするためには、エピゲノム修飾を引き起こすシグナルを含めたエピゲノム修飾制御機構の解明やエピゲノム修飾を人為的に導入できるような技術の開発が必要になるものと考えられる。

第3章 背側縫線核—大脳皮質前頭前野間の神経回路に注目した漢方薬の作用機序の解析

第1章と第2章から、隔離飼育マウスの背側縫線核では、エピゲノム修飾の変動を介した GABA_{B1a} の発現増加が生じることを明らかにした。こうした GABA 神経系の異常による大脳皮質前頭前野セロトニン神経系の機能不全が異常行動の出現につながるものと考えられる。こうした知見から、背側縫線核の GABA_{B1a} 発現変動や大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系は、精神疾患治療薬の作用機序を評価する際の指標として有用であるものと考えられる。

精神疾患の薬物治療に用いられる薬物は、主に抗精神病薬や抗うつ薬などのいわゆる西洋薬である。一方で、比較的軽度な精神疾患の治療や西洋薬では効果が認められない場合や副作用が強い場合においては漢方薬が用いられることがあり、十分な有効性が認められている。加えて、漢方薬は西洋薬と比べて副作用が軽度であるといった利点も有している。しかしながら、西洋薬とは異なり、漢方薬は作用機序の科学的根拠に乏しく、エビデンスに基づく治療を重視する現代医療において漢方薬の使用は十分に進んでいない。こうした背景から、漢方薬の作用に関する基礎的知見の集積が精神疾患の治療における漢方薬の適切な使用を促し、治療効果が高く副作用の少ない精神疾患治療の実現に貢献しうるものと考えられる。

加味温胆湯は、半夏、陳皮、茯苓、甘草、生姜、竹筴、枳実、遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参の13種類の生薬で構成される漢方処方であり、古来より不安や不眠症に対して用いられてきた。これまでに臨床研究から、認知機能障害や気分変調を伴う患者のうつ症状および倦怠感に対して加味温胆湯が有効であることが報告されている(65, 66)。また前臨床研究から、加味温胆湯が脳内のアセチルコリン神経系の機能を増強することや、神経栄養因子の放出を増加させることなどが報告されている(67-69)。これらの報告は、加味温胆湯が中枢神経系の機能障害を改善させる可能性を示すものと考えられる。

そこで第3章では、背側縫線核の GABA_{B1a} の発現量や大脳皮質前頭前野セロトニン神経系の機能を指標に、加味温胆湯の作用機序を追究した。

実験方法

3-1. 実験動物

1-1 に準ずる。

3-2. 漢方薬のエキスの作成

加味温胆湯を構成する生薬（表 4）を 3 日分に水を 1000 ml 加え、60 分間煎出した後に吸引濾過し、凍結乾燥したものを実験に供した。加味温胆湯のエキス抽出率は 21 % であった。

表 5. 加味温胆湯の構成生薬の 1 日量

構成生薬	1日量	製造会社	Lot No.
半夏	5.0 g	Uchida Wakan-yaku Co Ltd., Tokyo, Japan	060126
竹筴	3.0 g	Tochimoto Tenkaido Co Ltd., Osaka, Japan	026609004
枳実	3.0 g	Uchida Wakan-yaku Co Ltd., Tokyo, Japan	00D0118
茯苓	3.0 g	Tochimoto Tenkaido Co Ltd., Osaka, Japan	009510016
陳皮	3.0 g	Uchida Wakan-yaku Co Ltd., Tokyo, Japan	02F1168
甘草	2.0 g	Uchida Wakan-yaku Co Ltd., Tokyo, Japan	00F3255
遠志	2.0 g	Tochimoto Tenkaido Co Ltd., Osaka, Japan	001410002
玄参	2.0 g	Tochimoto Tenkaido Co Ltd., Osaka, Japan	023308001
人参	2.0 g	Uchida Wakan-yaku Co Ltd., Tokyo, Japan	00F1204
地黄	2.0 g	Uchida Wakan-yaku Co Ltd., Tokyo, Japan	0450212
酸棗仁	2.0 g	Tochimoto Tenkaido Co Ltd., Osaka, Japan	021110007
大棗	2.0 g	Uchida Wakan-yaku Co Ltd., Tokyo, Japan	0301163
生姜	0.5 g	Tsumura & Co., Tokyo, Japan	D41821

3-3. 薬物投与スケジュール

反復投与の実験は、9 週齢時から 1 日 1 回 14 日間 1000 mg/kg の用量で加味温胆湯を経口投与し、最終投与の 24 時間後に行動実験および遺伝子発現量の解析を行った。単回投与の実験は、9 週齢のマウスに各薬物を経口投与し、1 時間後に行動実験を行った。

3-4. エンカウンター試験（他のマウスと遭遇した際の多動の解析）

1-6 に準ずる。

3-5. Real-time RT-PCR 法

1-3 に準ずる。

3-6. 自発運動量の評価

1-5 に準ずる。

3-7. 強制水泳試験

1-8 に準ずる。

3-8. *In vivo* 脳微小透析法による細胞外モノアミン量の測定

マウスの大脳皮質前頭前野（ブレグマより 1.9 mm 前方、0.5 mm 右側方、頭蓋表面より深さ 0.8 mm）にガイドカニューレ（4.0 mm: Eicom）を挿入固定した。術後、マウスに鎮痛薬として Buprenorphine (0.01 mg/kg, i.p.) を投与し個別ケージにて飼育した。測定時は透析プローブ（膜長 3.0 mm: Eicom）をガイドカニューレに挿入し、リンゲル液（147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂）を流速 1.0 μ l/min で灌流した。サンプルは 20 分単位で回収し、直ちに高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器（HPLC/ECD）システムに連続自動インジェクションした。なお、測定には術後 24 時間以上 48 時間以内のマウスを使用した。ノルアドレナリン、ドパミンおよびセロトニン量の分析には、HPLC/ECD システムを用い、以下の条件で測定を行った。カラムには Eicompak CAX (2.0 mm i.d.×30 mm: Eicom) を用い、HPLC の移動相には 2.7 mM 酢酸、67.3 mM 酢酸アンモニウム、50 mM 硫酸ナトリウム、50 mg/ml EDTA・2Na を用いた。流速 0.25 ml/min、カラム温度 35°C、ECD の加圧電圧 450 mV とし、参照電極には Ag/AgCl 電極、作用電極にはグラファイト標準電極を用いた。解析には Power Chrom (eDAQ, Nagoya, Japan) を用い、サンプル中のノルアドレナリン、ドパミンおよびセロトニン量は、あらかじめ求めた標準物質との面積比より算出した。薬物処置あるいは新奇マウスを導入する直前の 3 サンプルの平均値を基礎遊離量とし、ノルアドレナリン、ドパミンおよびセロトニン量の変化は、基礎遊離量を 100%とした際の変化率で表した。

3-9. 統計学的解析

データは全て「平均値±標準誤差」として表し、統計学的処理には StatView 5.0 J (SAS Institute) を使用した。細胞外モノアミン量変化の解析は、反復測定二元配置分散分析を行った。その他の解析は Student's *t* 検定、あるいは二元配置分散分析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。

実験結果

3-1. 加味温胆湯の反復投与が隔離飼育マウスの異常行動と背側縫線核における GABA_{B1a} 発現増加に及ぼす影響

本章ではまず、隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA_{B1a} の発現増加に加味温胆湯の投与が影響を及ぼすかについて検討を行った。第2章より、隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA_{B1a} の発現増加にはエピゲノム修飾の変化が関与することが示唆されたことから、加味温胆湯の投与期間はエピゲノム修飾の変化が十分に生じるものと想定される14日間とした。9週齢の隔離飼育マウスに加味温胆湯を反復投与した結果、隔離飼育マウスが示す他個体と遭遇した際の多動は、集団飼育マウスと同程度にまで抑制されることが明らかとなった（図22）。

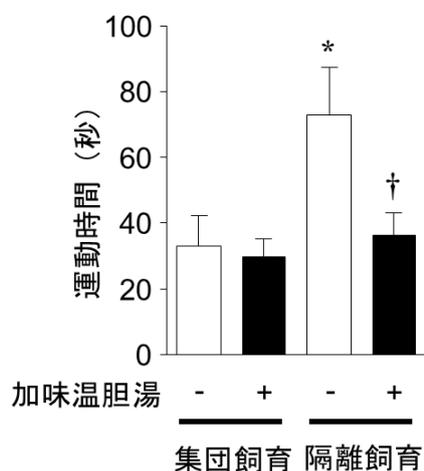


図22. 隔離飼育マウスが他個体と遭遇した際に示す多動に対する加味温胆湯の反復投与の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、他個体と遭遇した際に多動が見られた。この多動は、加味温胆湯を 1000 mg/kg の用量で 1 日 1 回 14 日間経口投与することで抑制された (A)。n=8-10。* $P < 0.05$ vs. 集団飼育マウス。† $P < 0.05$ vs. vehicle 投与マウス。

しかしながら、加味温胆湯の反復投与は、隔離飼育マウスの背側縫線核における $GABA_{B1a}$ の mRNA 発現増加に影響を与えなかった (図 23)。本結果から、加味温胆湯は背側縫線核の $GABA_{B1a}$ の発現量調節とは異なる作用機序により、異常行動を改善するものと考えられた。

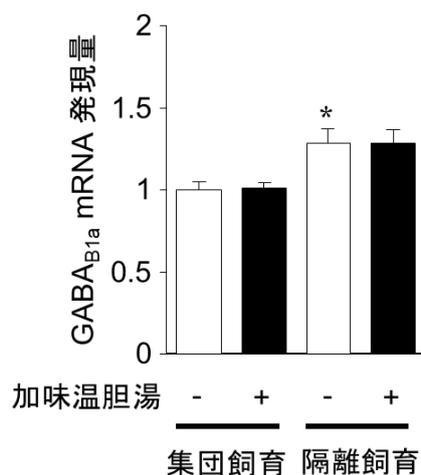


図 23. 隔離飼育マウスの背側縫線核における $GABA_{B1a}$ mRNA 発現量の増加に対する加味温胆湯の反復投与の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、背側縫線核において $GABA_{B1a}$ mRNA 発現量の有意な増加が見られた。この $GABA_{B1a}$ mRNA 発現量の増加に対して、加味温胆湯 (1000 mg/kg) の 1 日 1 回 14 日間経口投与は影響を及ぼさなかった。n=4-8。* $P < 0.05$ vs. 集団飼育マウス。

3-2. 行動薬理的解析による加味温胆湯と西洋薬の作用比較

前項での結果から、加味温胆湯の反復投与は異常行動を改善するものの、 $GABA_{B1a}$ の遺伝子発現変動には影響を与えないことが示された。そこで次に、加味温胆湯の単回投与のみで隔離飼育マウスの異常行動が改善するか否かを検討したところ、加味温胆湯の投与は隔離飼育マウスが示す他個体と遭遇した際の多動に対して、用量依存的な改善作用を示すことが明らかとなった。また、同様に単回投与で効果が見られる西洋薬と作用を比較することを目的に、選択的セロトニン再取り込み阻害作用を有する抗うつ薬である fluoxetine およびドパミン D_2 /セロトニンセロトニン₂ 受容体遮断作用を有する抗精神病薬である risperidone においても同様の検討を行った。その結果、fluoxetine、risperidone とともに、隔離飼育マウスが示す他個体と遭遇した際の多動を有意に抑制した (図 24)。

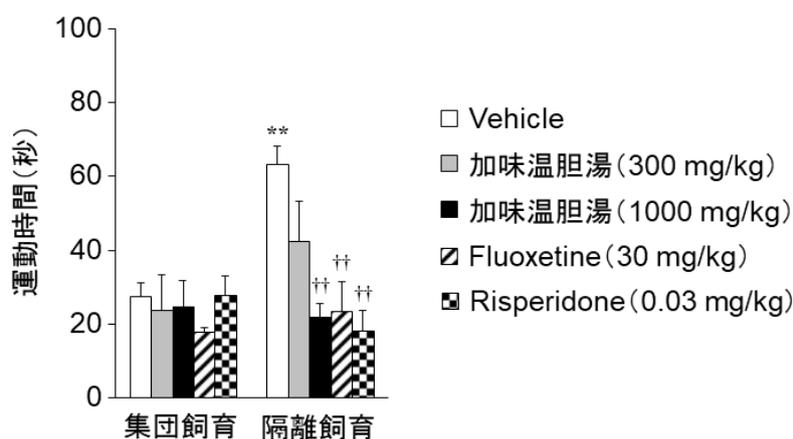


図 24. 他個体と遭遇した際の隔離飼育マウスの多動に対する加味温胆湯および西洋薬の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、他個体と遭遇した際に多動が見られた。この多動は、加味温胆湯 (1000 mg/kg)、fluoxetine (30 mg/kg)、risperidone (0.03 mg/kg) により有意に抑制された。n=4-11。** $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。†† $P < 0.01$ vs. vehicle 投与マウス。(J Pharmacol Sci., 18, 30212-3, 2018 から改変)

加味温胆湯の単回投与は、隔離飼育マウスが示す強制水泳試験における無動時間の増加に対しても改善作用を示した。加味温胆湯と同様に fluoxetine も隔離飼育マウスが示す強制水泳試験における無動時間の増加に対しても改善作用を示した。一方で、risperidone は隔離飼育マウスが示す強制水泳試験における無動時間の増加に対しては改善作用を示さなかった（図 25）。

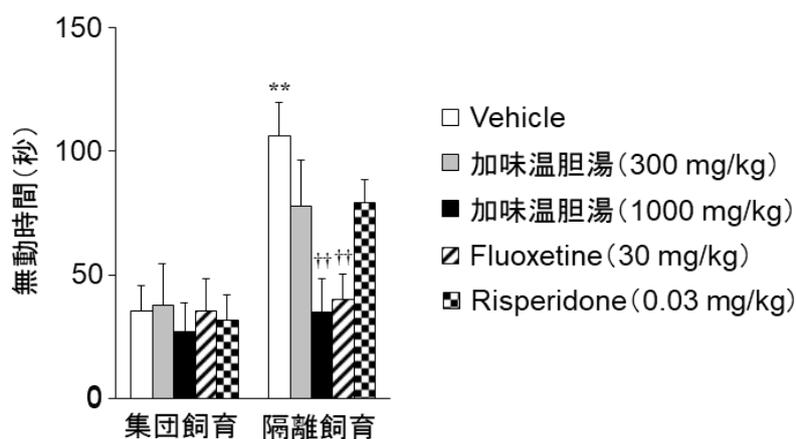


図 25. 隔離飼育マウスが示す強制水泳試験における無動時間の増加に対する加味温胆湯および西洋薬の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、無動時間の増加が見られた。この無動時間の増加は、加味温胆湯 (1000 mg/kg)、fluoxetine (30 mg/kg)により有意に抑制されたが、risperidone (0.03 mg/kg)は無動時間に影響を及ぼさなかった。n=6-11。** $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。†† $P < 0.01$ vs. vehicle 投与マウス。(J Pharmacol Sci., 18, 30212-3, 2018 から改変)

しかしながら加味温胆湯の単回投与は、隔離飼育マウスが示す新奇環境下における多動を抑制しなかった。加味温胆湯と同様に fluoxetine も隔離飼育マウスが示す新奇環境下における多動を抑制しなかった。一方で、risperidone は隔離飼育マウスが示す新奇環境下における多動を有意に抑制した（図 26）。

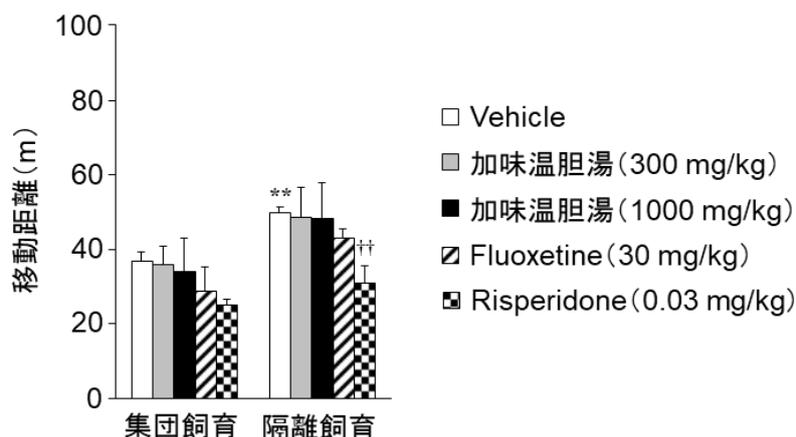


図 26. 隔離飼育マウスが示す新奇環境下における多動に対する加味温胆湯および西洋薬の影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、新奇環境下における多動が見られた。この多動は、加味温胆湯 (1000 mg/kg)、fluoxetine (30 mg/kg)では抑制されなかったが、risperidone (0.03 mg/kg)により有意に抑制された。n=6-13。** $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。†† $P < 0.01$ vs. vehicle 投与マウス。(J Pharmacol Sci., 18, 30212-3, 2018 から改変)

以上の結果より、加味温胆湯は単回投与でも隔離飼育マウスの異常行動を改善すること、またその改善作用は抗うつ薬である fluoxetine と類似しているが、抗精神病薬である risperidone とは異なることが明らかとなった。

3-3. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する加味温胆湯の作用

前項での行動薬理的解析から、加味温胆湯の作用は抗うつ薬である **fluoxetine** と類似していることが明らかになったことから、加味温胆湯は **fluoxetine** と同様にセロトニン神経系に作用する可能性が推測された。そこで、*in vivo* 脳微小透析法を用いて、大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす加味温胆湯投与の影響について解析を行った。その結果、加味温胆湯投与群において経口投与の 40 分後をピークとした細胞外セロトニン量の増加が観察された。一方で、細胞外のノルアドレナリン量やドパミン量には変化は認められなかった (図 27A-C)。細胞外セロトニン量の変化を Net-AUC (図 27D) で評価したところ、加味温胆湯による有意な細胞外セロトニン量の増加が認められた (図 27E)。以上の結果より、加味温胆湯は **fluoxetine** と同様に、細胞外セロトニン量の増加を介して異常行動を改善する可能性が考えられた。

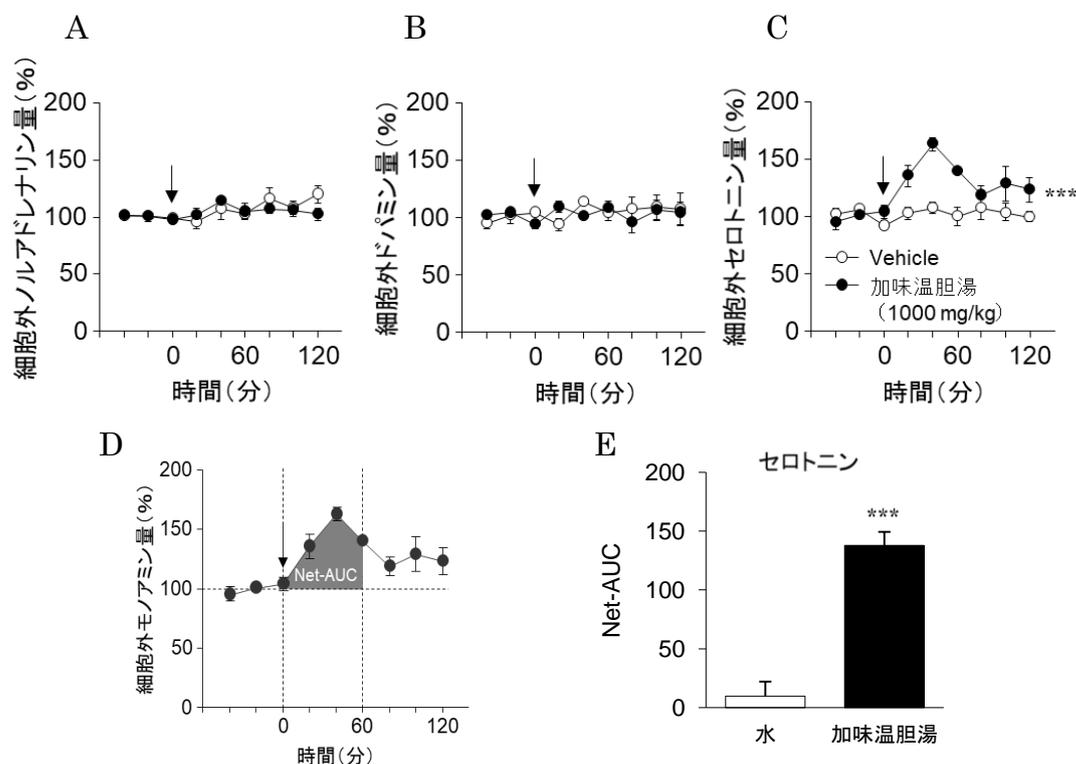


図 27. 加味温胆湯が大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

図の矢印で示した位置で加味温胆湯の経口投与を行った。加味温胆湯 (1000 mg/kg)は、細胞外ノルアドレナリン量、細胞外ドパミン量には影響を及ぼさなかったが、細胞外セロトニン量を有意に増加させた。n=5。*** $P < 0.001$ vs. vehicle. (*J Pharmacol Sci.*, **18**, 30212-3, 2018 から改変)

3-4. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する加味温胆湯の一味抜きエキスの作用

前項までの結果から、加味温胆湯に細胞外セロトニン量増加作用が見出された。そこで次に、13種類の加味温胆湯構成生薬のうちいずれの生薬が活性発現に関与するかを明らかとするために、加味温胆湯の一味抜きエキスを調整し、細胞外モノアミン量に及ぼす影響を解析した。投与後から1時間における細胞外モノアミン量の変化をNet-AUC (図27D)で評価したところ、加味温胆湯で見られた細胞外セロトニン量の増加作用は加味温胆湯竹筴抜きエキスにおいて著しく減少することが明らかとなった(図28A-C)。

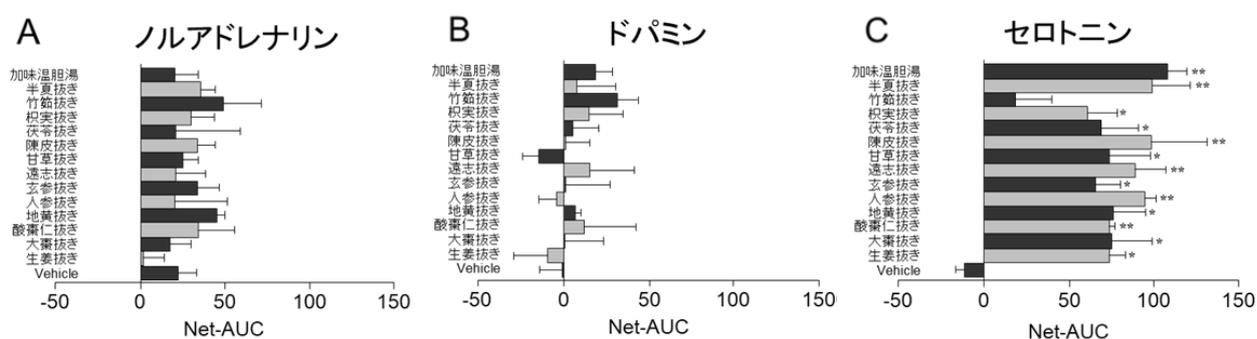


図 28. 加味温胆湯の一味抜きエキスが大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

投与後から1時間における細胞外モノアミン量の変化をNet-AUCで評価した。いずれの加味温胆湯一味抜きエキス(1000 mg/kg)も、細胞外ノルアドレナリン量、細胞外ドパミン量には影響を及ぼさなかった。一方で、加味温胆湯竹筴抜きエキス(1000 mg/kg)では、加味温胆湯で見られた細胞外セロトニン量の増加が著しく減少していた。n=3-5。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ vs. vehicle。(J Pharmacol Sci., 18, 30212-3, 2018 から改変)

3-5. 隔離飼育マウスの異常行動に対する加味温胆湯竹筴抜きエキスの作用

加味温胆湯竹筴抜きエキスでは細胞外セロトニン量増加作用が減弱することから、構成生薬から竹筴を除くことにより、異常行動に対する加味温胆湯の作用にも変化が見られる可能性が考えられる。そこで、隔離飼育マウスの異常行動に対する加味温胆湯竹筴抜きエキスの作用について解析した。その結果、加味温胆湯竹筴抜きエキスでは、加味温胆湯で見られた隔離飼育マウスが示す他個体と遭遇した際の多動（図 29）や強制水泳試験における無動時間の増加（図 30）に対する改善作用が消失することが明らかとなった。

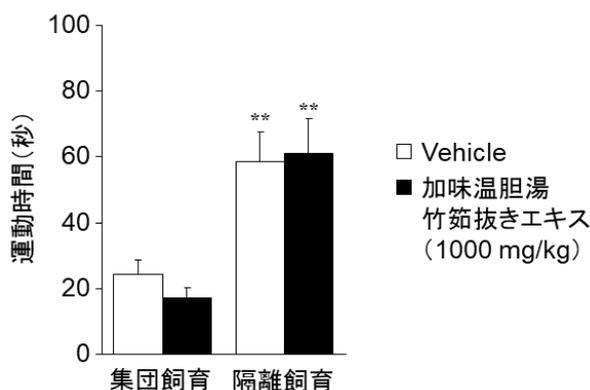


図 29. 加味温胆湯竹筴抜きエキスが他個体と遭遇した際の多動に及ぼす影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、他個体と遭遇した際に多動が見られた。この多動は、加味温胆湯竹筴抜きエキス (1000 mg/kg) では抑制されなかった。n=10-12。* $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。(J Pharmacol Sci., 18, 30212-3, 2018 から改変)

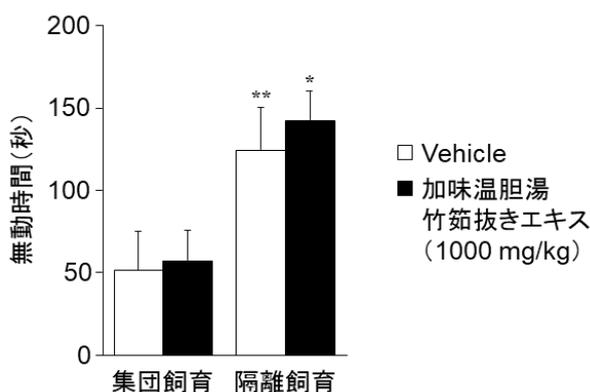


図 30. 加味温胆湯竹筴抜きエキスが強制水泳試験における無動時間の増加に及ぼす影響

集団飼育マウスと比べて隔離飼育マウスでは、無動時間の増加が見られた。この無動時間の増加は、加味温胆湯竹筴抜きエキス (1000 mg/kg) では抑制されなかった。n=10-11。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ vs. 集団飼育マウス。(J Pharmacol Sci., 18, 30212-3, 2018 から改変)

3-6. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する竹筴エキスの作用

前項までの検討から、加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に竹筴が関与することが示唆されたことから、次に、竹筴エキスのみで細胞外セロトニン量が増加するか否かを解析した。1000 mg/kg の加味温胆湯に含まれる竹筴エキス成分と同程度の量と想定される竹筴エキス (66.5 mg/kg) を投与し、大脳皮質前頭前野における細胞外モノアミン量を測定したところ、竹筴エキスのみでは、細胞外モノアミン量に影響を及ぼさないことが明らかとなった (図 31)。

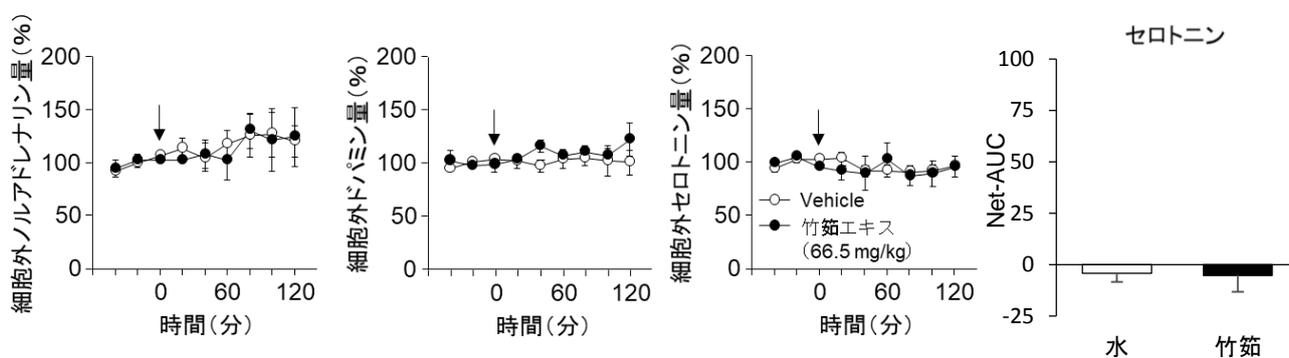


図 31. 竹筴エキスが大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

図の矢印で示した位置で竹筴エキス (66.5 mg/kg) の経口投与を行った。竹筴エキスは、細胞外ノルアドレナリン量、細胞外ドパミン量、細胞外セロトニン量に対して影響を及ぼさなかった。n=3-4。 (*J Pharmacol Sci.*, **18**, 30212-3, 2018 から改変)

3-7. 大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する二陳湯、温胆湯の作用

加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に竹筴が重要であるにもかかわらず、竹筴エキスのみでは細胞外セロトニン量の増加が見られないことから、細胞外セロトニン量増加作用には、竹筴と他の生薬の組み合わせが重要であるものと考えられる。そこで、竹筴との組み合わせにより薬効を発揮する可能性が考えられる生薬を絞り込むために、加味温胆湯の構成を基本方剤に分解して考察した。加味温胆湯は二陳湯の加減方であることが知られている。すなわち、半夏、陳皮、茯苓、甘草、生姜の5つの生薬で構成される二陳湯に、竹筴と枳実の2つの生薬を加えた処方が温胆湯であり、温胆湯に遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参の6つの生薬を加えた処方が加味温胆湯である。二陳湯の効能・効果は胃部不快感などの消化器症状の改善であるのに対し、温胆湯や加味温胆湯の効能・効果は消化器症状に加えて不眠や不安神経症などの精神症状の改善とされている（図 32）。

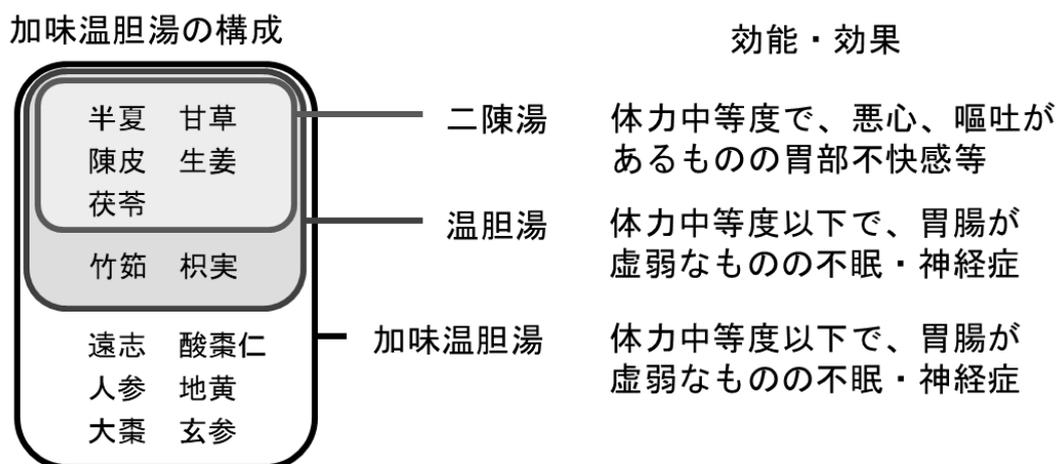


図 32. 加味温胆湯の構成

このように、二陳湯に竹筴と枳実が加わることで精神症状への作用が追加されることから、精神症状の改善において竹筴が重要であることがうかがえる。そこで、竹筴を含まない二陳湯と竹筴を含む温胆湯において、大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する作用を解析した。その結果、二陳湯は細胞外モノアミン量に影響を与えなかったのに対し、温胆湯は加味温胆湯よりは弱いながらも細胞外セロトニン量を増加させた（図 33）。

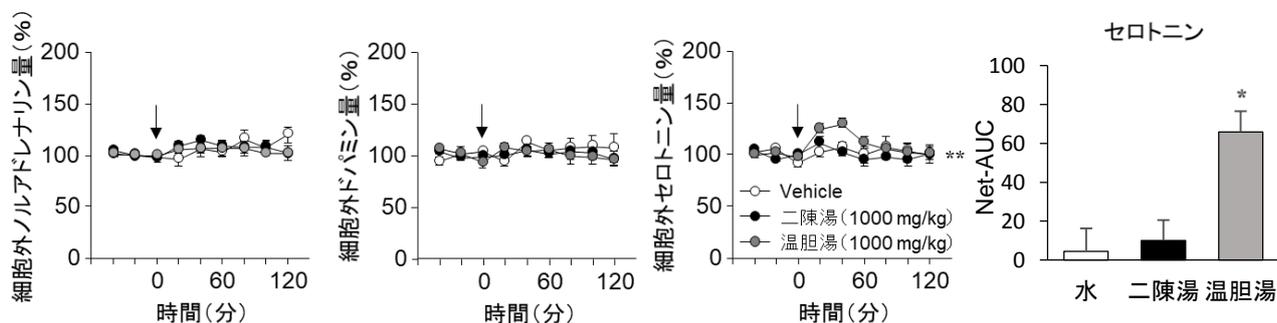


図 33. 二陳湯、温胆湯が大腦皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

図の矢印で示した位置で二陳湯 または温胆湯(1000 mg/kg) の経口投与を行った。二陳湯は、細胞外ノルアドレナリン量、細胞外ドパミン量、細胞外セロトニン量に対して影響を及ぼさなかった。温胆湯は、細胞外ノルアドレナリン量、細胞外ドパミン量に対して影響を及ぼさなかったが、細胞外セロトニン量を有意に増加させた。n=5。** $P < 0.01$ vs. vehicle。

考察

本章では、第1章と第2章で見出した背側縫線核の $GABA_{B1a}$ の発現変動と、 $GABA_{B1a}$ によって制御を受ける大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系に注目し、未だ作用機序の詳細が明らかとなっていない漢方薬の精神疾患に対する改善作用の作用機序の解明を試みた。

一般的に、「漢方薬は西洋薬と比較して作用が弱く、長期間の服用により初めて薬効を示す」との認識が強い。西洋薬で見られるような短期間での作用とは異なり、長期間の服用による作用には遺伝子発現の変動を伴う可能性も考えられる。そこで本研究では、古来より精神症状に対して用いられてきた漢方処方であり、現代においても臨床現場において精神症状に対する改善作用が報告されている加味温胆湯について、隔離飼育マウスの異常行動と背側縫線核における $GABA_{B1a}$ の発現量に対する作用を解析した。隔離飼育マウスに加味温胆湯を反復投与した結果、他個体と遭遇した際の多動が集団飼育マウスと同程度にまで抑制されており、異常行動に対する改善作用が認められた。しかしながら、加味温胆湯は背側縫線核における $GABA_{B1a}$ の mRNA 発現増加に対しては影響を及ぼさなかった。こうした結果から、加味温胆湯は背側縫線核の $GABA_{B1a}$ 発現量の変動を介さずに精神症状を改善しているものと考えられる。さらに本研究から、加味温胆湯の単回投与だけでも隔離飼育マウスの異常行動に改善が見られることが明らかとなった。こうした結果は、「漢方薬の薬効発現には時間がかかる」といった一般的な認識とは異なり、加味温胆湯は西洋薬と同程度の早さで薬効を発揮する可能性を示している。

行動薬理的解析から、加味温胆湯の異常行動改善パターンは抗うつ薬である **fluoxetine** と類似しており、抗精神病薬である **risperidone** とは異なることが見出された。

In vivo 脳微小透析法から、加味温胆湯も大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量を増加させることが見出されたことから、神経化学的な点からも加味温胆湯が **fluoxetine** と類似していることが示された。しかしながら、**fluoxetine** は持続的に細胞外セロトニン量を増加させるのに対し、加味温胆湯は一過的に細胞外セロトニン量を増加させるといった違いが見られた。こうした細胞外セロトニン量の変動パターンの違いは、加味温胆湯と **fluoxetine** の作用機序の違いによるものと推測される。すなわち、加味温胆湯は **fluoxetine** のようにセロトニントランスポーターを阻害しセロトニンの再取り込みを抑制するのではなく、別の標的分子に作用して細胞外セロトニン量を増加させている可能性が高いと考えられる。

Fluoxetine などの選択的セロトニン再取り込み阻害薬は、強制水泳試験における無動時間の増加や他個体と遭遇した際の多動を抑制することが知られているが、その作用にはセロトニン $5-HT_{1B}$ 受容体やセロトニン $5-HT_4$ 受容体への入力に関与することが報告されている(70, 71)。つまり、加味温胆湯による改善作用においても細胞外セロトニン

量の増加によるセロトニン 5-HT_{1B} 受容体やセロトニン 5-HT₄ 受容体への入力が増加が関与している可能性が考えられる。

第一章では、大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経の過剰興奮、すなわち細胞外セロトニン量の増加が異常行動を引き起こす可能性が示された。これは一見すると、加味温胆湯や fluoxetine による大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量増加作用が精神症状の改善に寄与することとは相反するものにも見える。今のところ、この現象を合理的に説明できる知見は存在しないが、セロトニン神経の発火パターンの違いにより相反する作用が観察される可能性も考えられる。神経細胞の発火パターンと脳機能との関連性についてはドパミン神経系において解析が進んでいる。ドパミン神経では、ミリ秒単位で連続的に少量のドパミン放出を引き起こす発火パターンと、一過的に多量のドパミン放出を引き起こす発火パターンが存在し、そのうち一過的な発火パターンが報酬や学習に関与していることが報告されている(72)。セロトニン神経もミリ秒単位で連続的に少量のセロトニン放出を引き起こす発火パターンと、一過的に多量のセロトニン放出を引き起こす発火パターンが存在し、ドパミン神経と同様の神経発火パターンを有していることから、神経発火パターンの違いが異なる作用を示すものと考えられる。しかしながら、本研究では細胞外セロトニン量の変化を 20 分間隔で測定していることから、発火パターンの変化を検出することはできない。つまり、ミリ秒単位のセロトニン神経の発火の変化を解析することにより、病態の発症に関わるセロトニン神経の異常と、治療に関わるセロトニン神経の変化を明らかにすることができるものと推測している。

加味温胆湯の一味抜きエキスをを用いた解析から、加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用や異常行動改善作用には、構成生薬の 1 つである竹筴が重要な役割を担っていることが明らかとなった。竹筴は抗炎症作用、抗酸化作用を有することが報告されているが(73, 74)、これまでにセロトニン神経系に作用することは報告されていない。本研究においても、竹筴エキス単独では細胞外セロトニン量増加作用が確認できなかったことから、細胞外セロトニン量増加作用には竹筴と他の生薬の組み合わせが重要であるものと考えられる。さらに、大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に対する二陳湯、温胆湯の作用を解析した結果、温胆湯では細胞外セロトニン量が増加したのに対し、二陳湯では細胞外セロトニン量の増加が認められなかった。本結果から、細胞外セロトニン量の増加には、竹筴と温胆湯に含まれる他の生薬との組み合わせが重要であるものと考えられる。生薬の組み合わせによる複合効果には、薬理的複合効果と薬剤学的複合効果が考えられる。薬理的複合効果としては、竹筴由来の成分と他の生薬由来の成分がそれぞれの標的分子に作用し、その相乗効果によって細胞外セロトニン量が増加する可能性が考えられる。一方で薬剤学的複合効果としては、竹筴と他の生薬を合わせて煎じることで細胞外セロトニン量増加作用を有する成分の抽出効率が向上する可能性や、細胞外セロトニン量増加作用を有する成分が複合体を形成することで脳への移行性が向上する可能性などが考えられる。

大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量に対する加味温胆湯、温胆湯および二陳湯の作用を比較すると、精神症状に対して用いられる加味温胆湯および温胆湯では細胞外セロトニン量が増加するのに対し、消化器症状に対して用いられる二陳湯では細胞外セロトニン量は増加しなかった。以上の結果より、加味温胆湯や温胆湯が持つ細胞外セロトニン量増加作用が精神症状の改善に寄与する可能性が考えられる。

加味温胆湯は、温胆湯に6つの生薬（遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参）が加えられた処方である。これまでに、遠志が海馬や側坐核といったうつ症状に関連する脳領域において、グリア細胞株由来神経栄養因子の産生を促進し、神経細胞における興奮性シナプス後部である樹状突起スパインを増加させ、抗うつ様作用を示すことが報告されている(75)。また酸棗仁の成分がGABA神経系に作用して抗不安様作用を示すことなども報告されており(76)、これら6つの生薬の多くは、精神症状に対する有効性が基礎研究からも明らかとなりつつある。このような知見を考慮すると、加味温胆湯は温胆湯が有する細胞外セロトニン量増加作用以外にも、様々な作用機序が精神症状改善作用に関与するものと考えられる。このように数多くの標的を介して治療効果をもたらす作用機序は、西洋薬にはない漢方薬独自のものであり、西洋薬では改善の見られない治療抵抗性の患者に対しての有効性も期待できる。また、多くの作用標的を有する漢方薬は、副作用の観点からも西洋薬にはない優位性を持つ。例えば抗うつ薬などは、しばしば吐き気を含む胃腸症状などの副作用が出現し、一部の患者では投薬が中止されるケースもある。一方で加味温胆湯は、消化器症状の改善に主に用いられる二陳湯の加方であることからわかるように、半夏や陳皮などの制吐や消化不良を改善する生薬を含んでいる(77, 78)。このような特徴からも、消化器症状に対する副作用により抗うつ薬の服用が困難な患者において、加味温胆湯は有用な代替薬となることが期待される。

第3章では、加味温胆湯が有する大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系に対する急速な作用を明らかにするなど、漢方薬の作用機序に関する科学的根拠の集積に貢献できたものと考えられる。漢方薬の作用機序に関する基礎的知見を集積することにより、西洋薬と漢方薬の双方の利点を生かした新たな精神疾患治療法の構築に結びつく可能性も期待され、患者の症状にあわせたより適切な治療の選択肢の提供に貢献することが期待される。

総括

本研究では、背側縫線核から大脳皮質前頭前野に投射するセロトニン神経系に着目し、精神疾患の発症および治療に関わる分子基盤の一端を明らかにすることを目的とした。第1章および第2章では精神疾患の発症に関わる分子基盤の解析として、精神疾患の発症における環境要因の寄与を考慮した精神疾患モデル動物である隔離飼育マウスを用いた遺伝子発現量解析、行動薬理的解析、エピゲノム解析を行った。第3章では精神疾患の治療に関わる分子基盤の解析として、行動薬理的解析、神経化学的解析を行い、漢方薬である加味温胆湯の作用機序の解明を試みた。

第1章では、隔離飼育といった悪環境により、情動の制御において重要な大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系の興奮制御機構である背側縫線核のGABA神経系の遺伝子発現量が増加することを明らかにした。また、隔離飼育により発現量の増加が見られた背側縫線核のGABA_B受容体は、他個体と遭遇した際の行動の制御に関与する一方で、うつ様行動などには関与しない可能性を見出した。実験動物の行動を単純にヒトに外挿することはできないが、本研究で他個体との遭遇の際の行動異常はヒトでいうところの社会性の異常と考えることができる。すなわち本研究成果から、統合失調症やうつ病などの特定の“疾患”ではなく、社会性の異常といった複数の精神疾患にまたがって認められる“症状”に、背側縫線核GABA_B受容体の発現増加が関与することが示唆された。

第2章では、第1章で見出したGABA_{B1a}発現増加の分子機序として、DNAのメチル化やヒストンタンパク質のアセチル化といったエピゲノム修飾の変化を明らかにした。これらエピゲノム変化は長期間にわたる悪環境への暴露の結果であり、疾患の発症に関与する遺伝子発現変動に先立って生じる変化であるものと考えられる。すなわち本研究成果は、既存の治療薬のような神経伝達物質の受容体などを標的とした薬物ではなく、エピゲノム修飾を標的とした新規治療薬の可能性を示すものである。

第3章では、加味温胆湯が抗うつ薬と同様に、急速な細胞外セロトニン量の増加を引き起こすことをはじめて明らかにした。さらに本研究で見出した細胞外セロトニン量増加作用には竹筍を含めたいくつかの生薬が重要である可能性を示した。漢方薬は西洋薬とは異なり複数の成分が含まれていることから、複数の標的分子に働きかけて複雑な生体機能を調節し、副作用を軽減しつつ薬効を発揮しているものと考えられる。しかしながら、複数の成分を含有しているがゆえに、その薬理作用を明らかにすることは容易ではない。本研究成果は、多数存在する漢方薬の作用機序の一端を明らかにしたに過ぎない。しかしながら、こうした成果の集積が漢方薬の作用機序を理解する上での一助となるものと考えている。

以上、大脳皮質前頭前野のセロトニン神経系に着目することで、社会性における背側縫線核のGABA_B受容体の重要性、環境要因を基盤とした精神疾患におけるエピゲノム修飾変化の重要性、漢方薬の作用機序の一端が示された。今後、エピゲノム修飾の制御

機構の解明や漢方薬の作用機序に関する知見の集積により、精神疾患の発症および治療に関わる分子基盤の理解が深まり、精神疾患に対する十分な対策へとつながることが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室教授、矢部 武士先生に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御指導、御助言を頂きました、摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室講師、荒木 良太先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行において、貴重なご助言とご指導を戴きました大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 准教授、吾郷 由希夫先生、ならびに、富山大学和漢医薬学総合研究所複合薬物薬理学分野 教授、松本 欣三先生、同助教、藤原 博典先生、富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野 准教授、當銘 一文先生、大日本住友林業、田中 辰典博士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、援助していただきました、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり御協力、御援助下さいました摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室の皆様へ感謝致します。

引用文献

1. Death and DALY estimates for 2004 by cause for WHO member states.
2. Patel V, Saxena S, Lund C, Thornicroft G, Baingana F, Bolton P, et al. The Lancet Commission on global mental health and sustainable development. *Lancet*. 2018;392(10157):1553-98.
3. Mann JJ, Hentleff RA, Lagattuta TF, Perper JA, Li S, Arango V. Lower 3H-paroxetine binding in cerebral cortex of suicide victims is partly due to fewer high affinity, non-transporter sites. *J Neural Transm (Vienna)*. 1996;103(11):1337-50.
4. Arango V, Underwood MD, Gubbi AV, Mann JJ. Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res*. 1995;688(1-2):121-33.
5. Ago Y, Arikawa S, Yata M, Yano K, Abe M, Takuma K, et al. Antidepressant-like effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU-43044 are associated with changes in prefrontal dopamine in mouse models of depression. *Neuropharmacology*. 2008;55(8):1355-63.
6. Ago Y, Takahashi K, Nakamura S, Hashimoto H, Baba A, Matsuda T. Anxiety-like and exploratory behaviors of isolation-reared mice in the staircase test. *J Pharmacol Sci*. 2007;104(2):153-8.
7. Fone KC, Porkess MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(6):1087-102.
8. Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm Behav*. 2009;55(1):248-56.
9. Zhao X, Sun L, Jia H, Meng Q, Wu S, Li N, et al. Isolation rearing induces social and emotional function abnormalities and alters glutamate and neurodevelopment-related gene expression in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(7):1173-7.
10. Lukkes J, Vuong S, Scholl J, Oliver H, Forster G. Corticotropin-releasing factor receptor antagonism within the dorsal raphe nucleus reduces social anxiety-like behavior after early-life social isolation. *J Neurosci*. 2009;29(32):9955-60.
11. Lapiz MD, Fulford A, Muchimapura S, Mason R, Parker T, Marsden CA. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol*. 2003;33(1):13-29.
12. Lukkes JL, Watt MJ, Lowry CA, Forster GL. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Front Behav Neurosci*.

2009;3:18.

13. Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, et al. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*. 2000;100(4):749-68.
14. Ago Y, Sakaue M, Baba A, Matsuda T. Selective reduction by isolation rearing of α -MPTP-induced 1A receptor-mediated dopamine release in vivo in the frontal cortex of mice. *J Neurochem*. 2002;83(2):353-9.
15. Cabib S, Ventura R, Puglisi-Allegra S. Opposite imbalances between mesocortical and mesoaccumbens dopamine responses to stress by the same genotype depending on living conditions. *Behav Brain Res*. 2002;129(1-2):179-85.
16. Fulford AJ, Marsden CA. Effect of isolation-rearing on conditioned dopamine release in vivo in the nucleus accumbens of the rat. *J Neurochem*. 1998;70(1):384-90.
17. Fulford AJ, Marsden CA. Conditioned release of 5-hydroxytryptamine in vivo in the nucleus accumbens following isolation-rearing in the rat. *Neuroscience*. 1998;83(2):481-7.
18. Fulford AJ, Marsden CA. An intact dopaminergic system is required for context-conditioned release of 5-HT in the nucleus accumbens of postweaning isolation-reared rats. *Neuroscience*. 2007;149(2):392-400.
19. Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Inglis W, Kendall DA, Marsden CA, et al. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;59(4):859-72.
20. Jones GH, Hernandez TD, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992;43(1):17-35.
21. Ago Y, Araki R, Tanaka T, Sasaga A, Nishiyama S, Takuma K, et al. Role of social encounter-induced activation of prefrontal serotonergic systems in the abnormal behaviors of isolation-reared mice. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(8):1535-47.
22. Bannai M, Fish EW, Faccidomo S, Miczek KA. Anti-aggressive effects of agonists at 5-HT_{1B} receptors in the dorsal raphe nucleus of mice. *Psychopharmacology*. 2007;193(2):295-304.
23. Faccidomo S, Bannai M, Miczek KA. Escalated aggression after alcohol drinking in male mice: dorsal raphe and prefrontal cortex serotonin and 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(12):2888-99.
24. Jacobs BL, Cohen A. Differential behavioral effects of lesions of the median or dorsal raphe nuclei in rats: open field and pain-elicited aggression. *Journal of comparative and physiological psychology*. 1976;90(1):102-8.

25. Mos J, Olivier B, Poth M, Van Oorschot R, Van Aken H. The effects of dorsal raphe administration of eltoprazine, TFMPP and 8-OH-DPAT on resident intruder aggression in the rat. *European journal of pharmacology*. 1993;238(2-3):411-5.
26. Sijbesma H, Schipper J, de Kloet ER, Mos J, van Aken H, Olivier B. Postsynaptic 5-HT₁ receptors and offensive aggression in rats: a combined behavioural and autoradiographic study with eltoprazine. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;38(2):447-58.
27. van der Vegt BJ, Lieuwes N, van de Wall EH, Kato K, Moya-Albiol L, Martinez-Sanchis S, et al. Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behavior in rats. *Behavioral neuroscience*. 2003;117(4):667-74.
28. Vergnes M, Depaulis A, Boehrer A. Parachlorophenylalanine-induced serotonin depletion increases offensive but not defensive aggression in male rats. *Physiology & behavior*. 1986;36(4):653-8.
29. Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nature neuroscience*. 2005;8(3):365-71.
30. Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci*. 2001;21(24):9917-29.
31. Chiba T, Kayahara T, Nakano K. Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Res*. 2001;888(1):83-101.
32. Freedman LJ, Insel TR, Smith Y. Subcortical projections of area 25 (subgenual cortex) of the macaque monkey. *The Journal of comparative neurology*. 2000;421(2):172-88.
33. Tao R, Auerbach SB. Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *Journal of psychopharmacology*. 2000;14(2):100-13.
34. Varga V, Kocsis B, Sharp T. Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *The European journal of neuroscience*. 2003;17(2):280-6.
35. Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience*. 2001;106(4):783-92.
36. Kuramoto N, Wilkins ME, Fairfax BP, Revilla-Sanchez R, Terunuma M, Tamaki K, et al. Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*. 2007;53(2):233-47.
37. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiological reviews*. 2004;84(3):835-67.

38. Perez-Garci E, Gassmann M, Bettler B, Larkum ME. The GABAB1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca²⁺ spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron*. 2006;50(4):603-16.
39. Vigot R, Barbieri S, Brauner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang YP, et al. Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron*. 2006;50(4):589-601.
40. Challis C, Boulden J, Veerakumar A, Espallergues J, Vassoler FM, Pierce RC, et al. Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. *J Neurosci*. 2013;33(35):13978-88, 88a.
41. Takahashi A, Shimamoto A, Boyson CO, DeBold JF, Miczek KA. GABA(B) receptor modulation of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus and escalation of aggression in mice. *J Neurosci*. 2010;30(35):11771-80.
42. Abellan MT, Jolas T, Aghajanian GK, Artigas F. Dual control of dorsal raphe serotonergic neurons by GABA(B) receptors. Electrophysiological and microdialysis studies. *Synapse*. 2000;36(1):21-34.
43. Cruz HG, Ivanova T, Lunn ML, Stoffel M, Slesinger PA, Luscher C. Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nature neuroscience*. 2004;7(2):153-9.
44. Davies CH, Davies SN, Collingridge GL. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *The Journal of physiology*. 1990;424:513-31.
45. Howe JR, Sutor B, Zieglgansberger W. Baclofen reduces post-synaptic potentials of rat cortical neurones by an action other than its hyperpolarizing action. *The Journal of physiology*. 1987;384:539-69.
46. Labouebe G, Lomazzi M, Cruz HG, Creton C, Lujan R, Li M, et al. RGS2 modulates coupling between GABAB receptors and GIRK channels in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Nature neuroscience*. 2007;10(12):1559-68.
47. Uher R. Genes, environment, and individual differences in responding to treatment for depression. *Harv Rev Psychiatry*. 2011;19(3):109-24.
48. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*. 2009;12(3):342-8.
49. McGowan PO, Sasaki A, Huang TC, Unterberger A, Suderman M, Ernst C, et al. Promoter-wide hypermethylation of the ribosomal RNA gene promoter in the suicide brain. *PLoS One*. 2008;3(5):e2085.
50. Dammann G, Teschler S, Haag T, Altmuller F, Tuczec F, Dammann RH. Increased

DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder. *Epigenetics*. 2011;6(12):1454-62.

51. Carlberg L, Scheibelreiter J, Hassler MR, Schloegelhofer M, Schmoeger M, Ludwig B, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-epigenetic regulation in unipolar and bipolar affective disorder. *J Affect Disord*. 2014;168:399-406.

52. Mitchelmore C, Gede L. Brain Derived Neurotrophic Factor: epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Brain Res*. 2014;1586:162-72.

53. Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(19):8689-94.

54. Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*. 2010;328(5980):916-9.

55. Ehrlich M, Lacey M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics*. 2013;5(5):553-68.

56. Khavari DA, Sen GL, Rinn JL. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. *Cell Cycle*. 2010;9(19):3880-3.

57. Dobosy JR, Selker EU. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2001;58(5-6):721-7.

58. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature genetics*. 1998;19(2):187-91.

59. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998;393(6683):386-9.

60. Spange S, Wagner T, Heinzl T, Kramer OH. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(1):185-98.

61. Wade PA, Geron A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature genetics*. 1999;23(1):62-6.

62. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature genetics*. 1999;23(1):58-61.

63. Steiger JL, Bandyopadhyay S, Farb DH, Russek SJ. cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. *J Neurosci*. 2004;24(27):6115-26.

64. Cartron PF, Blanquart C, Hervouet E, Gregoire M, Vallette FM. HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the NY-ESO1 gene expression. *Mol Oncol.* 2013;7(3):452-63.
65. Kogure T, Tatsumi T, Oku Y. Four cases of dysthymic disorder and general malaise successfully treated with traditional herbal (kampo) medicines: kamiuntanto. *Integrative medicine insights.* 2010;5:1-6.
66. Maruyama M, Tomita N, Iwasaki K, Ootsuki M, Matsui T, Nemoto M, et al. Benefits of combining donepezil plus traditional Japanese herbal medicine on cognition and brain perfusion in Alzheimer's disease: a 12-week observer-blind, donepezil monotherapy controlled trial. *Journal of the American Geriatrics Society.* 2006;54(5):869-71.
67. Yabe T, Toriizuka K, Yamada H. Effects of Kampo medicines on choline acetyltransferase activity in rat embryo septal cultures. *J Trad Med.* 1995;12:54-60.
68. Yabe T, Torizuka K, Yamada H. Choline acetyltransferase activity enhancing effects of kami-untan-to (KUT) on basal forebrain cultured neurons and lesioned rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology.* 1995;2(1):41-6.
69. Yabe T, Yamada H. Kami-Untan-To enhances choline acetyltransferase and Nerve growth factor mRNA levels in brain cultured cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology.* 1997;3(4):361-7.
70. Ago Y, Nakamura S, Baba A, Matsuda T, Sulpiride in combination with fluvoxamine increases in vivo dopamine release selectively in rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology,* 2005;30:43-51.
71. Hasebe S, Ago Y, Nishiyama S, Oka S, Hashimoto H, Takuma K, Matsuda T, Pharmacological profile of encounter-induced hyperactivity in isolation-reared mice. *Behav. Pharmacol.,* 2015;26: 681-690
72. Schultz W, Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol.* 1998; 80(1):1-27.
73. Lim D, Cho Y, Kim W, Jeong S, Jang YP, Kim J. Original Research: Extract of *Bambusae Caulis in Taeniam* inhibits cigarette smoke-induced pulmonary and intestinal inflammation. *Exp Biol Med (Maywood).*, 2017;242(1):102-112. Epub 2016 Sep 2.
74. Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Song SB, Teng YC, Cai DQ, Lee KJ. *Bambusae caulis* in Liquamen Suppresses the Expression of Thymus and Activation-Regulated Chemokine and Macrophage-Derived Chemokine in Human Keratinocytes due to Antioxidant Effect. *Evid Based Complement Alternat Med.,* 2012; 617494.
75. Araki RF, H; Matsumoto, K; Toume, K; Yabe, T. *Polygalae radix* extract ameliorates behavioral and neuromorphological abnormalities in chronic corticosterone - treated mice.

Tradit Kampo Med. 2018;5(2):89-97.

76. Han H, Ma Y, Eun JS, Li R, Hong JT, Lee MK, et al. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen*: possible involvement of GABAergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;92(2):206-13.

77. Lyu JH, Lee HT. Effects of dried Citrus unshiu peels on gastrointestinal motility in rodents. *Archives of pharmacal research.* 2013;36(5):641-8.

78. Maki T, Takahashi K, Shibata S. An anti-emetic principle of *Pinellia ternata* tuber. *Planta medica.* 1987;53(5):410-4..