

氏名	近藤 真司		
学位の種類	博 士（環境学）		
学位記番号	博 甲 第 7912 号		
学位授与年月日	平成 28 年 7 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	ロスマリン酸による抗うつ薬様作用のメカニズム解析		
主査	筑波大学教授	博士（農学）	磯田 博子
副査	筑波大学教授	博士（農学）	張 振亜
副査	筑波大学准教授（協働大学院）	博士（農学）	渡辺 純
副査	筑波大学助教	博士（農学）	Myra Villareal

論 文 の 要 旨

現在、世界のうつ病患者数は 3 億 5000 万人と推定されている（世界保健機関、2016 年）。日本の厚生労働省の報告においても、うつ病を含む気分障害の患者数は 110 万人を超え、一兆円の経済的負担となる深刻な精神疾患の一つである。既存の抗うつ薬には、頭痛、吐き気、めまい等の重篤な副作用があることから、副作用を軽減する植物由来成分の抗うつ薬様効果が注目されている。

ローズマリー (*Rosemarinus officinalis*) は地中海原産の薬用植物であり、ストレス軽減やリラックス効果などの伝承薬効情報を有する。*R. officinalis* 抽出エキスやその主要なポリフェノールであるロスマリン酸 (RA)、カルノシン酸及びルテオリンには、神経保護効果、抗老化、抗アルツハイマー病、抗パーキンソン病及び抗筋委縮性側索硬化症等の神経疾患予防改善効果が報告されている。しかし、*R. officinalis* 成分によるうつ病への効果は十分に解明されていない。

本研究で著者は、*R. officinalis* の主成分である RA の抗うつ薬様効果を見出し、そのメカニズムの解析を行っている。

著者は、うつ発症は過度なストレスによる血中のコルチコステロン (CORT) が原因となり、脳内神経伝達物質の低下により誘導されること、そのメカニズムとして、細胞内 MAP キナーゼである ERK1/2 のリン酸化抑制が脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現を抑制することによる神経細胞死が関連していること、近年うつ発症患者の脳内において、Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) 発現が増加し、ERK1/2 の脱リン酸化を誘導していることが報告され MKP-1 分子はうつ病のマーカーとして注目されていることに着目し、マウス行動を用いた RA によるうつ行動抑制作用の検証を、うつ行動評価試験である尾部懸垂試験 (TST) を用いて行った。これは、マウスを尾部で懸垂させてその無動時間を測定し、無動時間の延長がうつ行動を、逆に抗うつ薬投与による無動時間の短縮はうつ行動の抑制を示す指標とするものである。TST において、Vehicle 群（水投与、ストレスあり）はテスト開始 5 日以降に無動時間が有意に増加したが、RA 経口投与マウスは 5 日以降も無動時間が増加しなかった。このことから、RA 経口投与により、うつ行動が抑制されたことが示唆された。TST 後、Vehicle 群のマウス血中の CORT 濃度は、Control 群（水投与、ストレスなし）に

比べ、有意に増加した。これは TST でのストレスにより、副腎から CORT が過分泌されたことを示す。一方で、RA 経口投与マウスの血中 CORT 濃度は Vehicle 群に比べ、有意に減少した。これは副腎からの CORT 過分泌を、RA 経口投与が抑制したことを示唆する。このことより、RA 経口投与が CORT 分泌調節機構である視床下部－脳下垂体－副腎軸（HPA 軸）に作用することが見出された。副腎重量の解析からも同様の結果が得られたことから著者は、RA 経口投与は HPA 軸を介して CORT の増加を抑制したものと推察した。

著者は、グルココルチコイド受容体 (GR) と CORT が MKP-1 の発現に関与する可能性があるとし唆されていることから、HPA 軸の調節と MKP-1 発現の調節との間には密接な関連性があると考え、RA 経口投与による脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現増加は以下のようなメカニズムであると予想した。すなわち、RA 経口投与による脳内の GR 発現の増加は、RA 経口投与が脳内の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン発現を減少させ、HPA 軸の負のフィードバックの機能不全を抑制し、血中への CORT 分泌を減少させ、この CORT 分泌の減少が GR との二量体の形成を阻害したことによると推定された（転写因子の減少）。さらに、転写因子の減少が MKP-1 発現の減少を招き、続いて ERK1/2 と cAMP 応答配列結合タンパク（CREB）のリン酸化促進による BDNF 発現の増加を惹起すると考えられ、血中 CORT レベル減少による神経細胞死の抑制（細胞毒性の減少）と脳内 BDNF 発現の増加が神経新生を促進し、うつ行動の抑制に関与することが予想された。一方、転写因子の減少とうつのマーカーである MKP-1 発現減少の関連性についてはさらなる解析が必要であるとしている。

著者は、さらに、分化神経細胞モデルである NGF 処理 PC12 細胞を用いて、RA のうつ関連因子の発現検証を行った。RA 処理は細胞での MKP-1 発現を減少させた。これが ERK1/2 リン酸化を促進させ、CREB でもリン酸化促進の増加傾向がみられた。これらによって RA は BDNF 発現を増加させたものと考えた。以上から、RA は生体内で代謝され、カフェ酸としてではなく RA 単体でも効果を持つ事が示唆された。今後の研究として、RA 経口投与したマウスの脳内の RA が検出されれば、RA は脳関門を通過することにより効果を発揮する証明の一端となるとしている。

さらに、著者は MKP-1 をノックダウンした分化神経細胞に RA を処理し、RA 処理は逆に BDNF 発現を減少させることを確認している。これにより、BDNF 発現には MKP-1 が必須であることが示唆された。加えて神経突起の伸長に MKP-1 が必須であることの既往研究を引いて、MKP-1 の神経細胞の維持への関与について言及している。しかし、一方で MKP-1 発現の増加は BDNF 発現を減少させ、神経新生を阻害することから、神経細胞の維持には MKP-1 発現を正常にすることが重要であるとした。

審 査 の 要 旨

うつ病はストレスの多い現代の深刻な社会環境問題の一つである。本研究は、重篤な副作用を伴ううつ病の治療薬に代わり効果が期待されているローズマリーの薬様作用のメカニズム解明に大きく貢献するものとして高く評価される。

学術的には、うつ行動モデルマウス及び神経モデル細胞を用いて検証を行い、RA は HPA 軸において血中への CORT 分泌を調節することにより、CORT 分泌量を正常に戻すように作用すること明らかにし、これにより脳神経細胞死が抑制されることでうつが抑制されることを明らかにしている。また RA は脳内において GR 及び CORT を介した MKP-1 発現を増加抑制する可能性があることを見出し、この MKP-1 発現増加抑制が BDNF 発現減少を抑制させ、神経新生の促進を介してうつを抑制することが期待されることを合わせて見出している。これらは、うつ発症予防及びうつ病治療薬の補完医療における、食薬資源由来天然物の機能性に新たな知見を加え、その機能性メカニズムを解明したものとして高く評価される

平成 28 年 6 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。