

ロスマリン酸による抗うつ薬様作用のメカニズム解析

2016年7月

近藤 真司

ロスマリン酸による抗うつ薬様作用のメカニズム解析

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

持続環境学専攻

博士（環境学）学位論文

近藤 真司

略語表

ACTH : Adrenocorticotropic hormone; 副腎刺激ホルモン

BDNF : Brain derived- neurotrophic factor; 脳由来神経栄養因子

CORT : Corticosterone; コルチコステロン

CRE : cAMP response element ; cAMP 応答配列

CREB : cAMP response element binding protein ; cAMP 応答配列結合タンパク質

CRH : Corticotropin-releasing hormone; 副腎刺激ホルモン放出因子

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DNRI : Dopamine and noradrenaline reuptake inhibitors ; ドーパミン -ノル
アドレナリン再取込み阻害剤

DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; 精神障害の
診断と統計の手引き

EERO : 70% Ethanol Extract of *rosmalinus officinalis*; *Rosmarinus officinalis*
70%エタノール抽出物

ERK1/2 : Extracellular Signal-regulated Kinase ; 細胞外シグナル調節キナー
ゼ

GABA : γ -aminobutanoic acid; γ -アミノ酪酸

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GR : Glucocorticoid receptor; グルココルチコイド受容体

GRE : Glucocorticoid response element ; グルココルチコイド応答配列

HPA 軸 : Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis; 視床下部-脳下垂体-副腎軸

MAOI : Monoamine oxydase inhibitors ; モノアミンオキシダーゼ阻害剤

MKP-1 : Mitogen -activated protein Kinase Phosphatase- 1

PC : Pyruvate carboxylase; ピルビン酸カルボキシラーゼ

RA: Rosmarinic acid; ロスマリン酸

SNRI : Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors ; セロトニン-ノル
アドレナリン再取り込み阻害剤

SSRI : Selective serotonin reuptake inhibitors ; 選択的セロトニン再取り
込み阻害剤

TCA : Tricyclic antidepressants ; 三環系抗うつ薬

TH : Tyrosine Hydroxylase; チロシン ヒドロキシラーゼ

TST : Tail Suspension Test ; 尾部懸垂試験

目次

第1章 序論	1
第2章 うつモデルマウスを用いたRAによる抗うつ薬様作用及び ストレスホルモン分泌調節作用の検証	
2-1 諸言	23
2-2 実験方法	25
2-2-1 サンプル	
2-2-2 実験動物	
2-2-3 うつ発症抑制効果の評価（尾部懸垂試験）	
2-2-4 脳のタンパク質抽出	
2-2-5 ウェスタンブロット	
2-2-6 統計解析	
2-3 結果	29
2-3-1 TSTにおけるRA経口投与による、うつ行動抑制作用の評価	
2-3-2 RA経口投与がマウス血中コルチコステロン濃度に与える影響	
2-3-3 RA経口投与がマウス副腎重量に与える影響	
2-3-4 RA経口投与がマウス脳（海馬、視床下部）のHPA軸調節 に与える影響	
2-4 考察	39

第 3 章	PC12 細胞における <i>Rosmarinus officinalis</i> 抽出液の抗うつ薬様効果	
3-1	諸言	40
3-2	実験方法	44
3-2-1	サンプル	
3-2-2	実験動物	
3-2-3	うつ発症抑制効果の評価（尾部懸垂試験）	
3-2-4	脳のタンパク質抽出	
3-2-5	ウェスタンブロット	
3-2-6	統計解析	
3-3	結果	47
3-3-1	RA 経口投与による脳（海馬）での BDNF 発現関連因子の発現への影響	
3-4	考察	51
第 4 章	マウス行動及び脳内における RA の抗うつ薬様効果	
4-1	諸言	53
4-2	実験方法	55
4-2-1	サンプル	
4-2-2	PC12 細胞の培養	
4-2-3	PC12 細胞へのサンプル処理	
4-2-4	細胞のタンパク質抽出	
4-2-5	ウェスタンブロット	
4-2-6	統計解析	
4-3	結果	60
4-3-1	分化 PC12 細胞における RA 処理のうつ発症関連因子への影響	
4-3-2	MKP-1 ノックダウン分化 PC12 細胞における RA 処理の BDNF 発現への影響	
4-4	考察	69

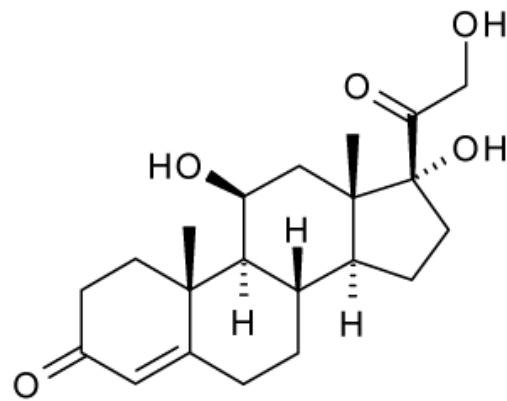
第 5 章 総括	71
参考文献	76
謝辞	84

第1章 序論

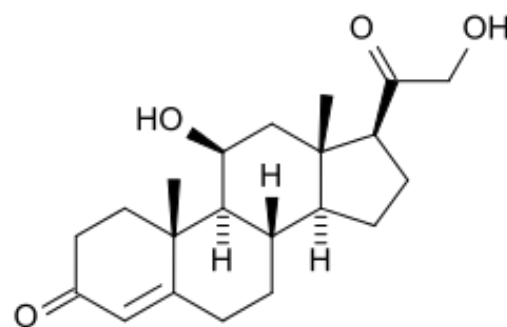
2016年の世界保健機関（WHO）の報告によると、世界のうつ病患者数は約3億5000万人を超える。また厚生労働省の報告によると、日本の気分障害（うつ病を含む）の患者数は110万人を超える。一兆円の経済的負担となり深刻な精神疾患の一つになっている。世界中で1億2千万人がこの精神疾患に罹患しており、年間85万人が自殺している。さらにうつ病患者は過去15年で急速に増加している。厚生労働省によると「憂うつである」「気分が落ち込んでいる」などと表現される症状は抑うつ気分と呼ばれる。精神医学では抑うつ状態とは抑うつ気分が強い状態のことである。このような抑うつ状態がある程度以上、重症である時、うつ病と呼んでいる。具体的な症状の中で主観的な症状は憂うつ、不安、倦怠感、虚脱感、集中力欠落、神経質、自責、悲観的、自殺願望、不眠などを感じる。また客観的な症状は情緒不安定、反応遅延、喧噪、飲酒量増加が観察される。さらに実際に身体に出る症状では食欲不振、頭痛、肩こり、動悸、胃の不快感、便秘、めまい、口渇が挙げられる。現段階においてうつ病の明確で臨床的かつ科学的な診断方法は確立していない。アメリカ精神医学会が出版している「精神障害の診断と統計の手引き」（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders : DSM）によって定義されている基準（例：不眠である。食欲不振である。情緒不安定である。など）により診断される。これらの基準の中で5つ以上の症状が2週間以上毎日続いた場合、うつ病と診断される。

うつ病の発症は過度なストレスにより、ストレスホルモン分泌調節機構である『視床下部—脳下垂体—副腎皮質軸（HPA軸）』が機能不全となった結果、生じた過度な血中グルココルチコイド（ヒトではコルチゾールが、マウス、ラッ

ト及びラビットなどの齧歯類ではコルチコステロンが優位に働く) (図 1-1) が原因であると知られている。グルココルチコイドとは副腎皮質より分泌されるステロイド系ホルモンである。グルココルチコイドは肝臓において糖新生促進作用により、血糖値を増加させる。また、グルカゴン、成長ホルモン、アドレナリンに対して許容作用を持つことが知られる。一方で、過度なグルココルチコイドは神経細胞に対して、毒性を示すことが報告されている。その毒性として活性酸素種 (ROS) やアポトーシスが神経細胞死や脳内神経伝達物質レベルの低下を誘導する (Greenlund *et al.*, 1995)。さらに、グルココルチコイドは Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) の発現を増加させる (Kassel *et al.*, 2001)。近年、うつ病と診断されてから亡くなった 21 人の脳組織 (海馬) の遺伝子解析を行ったところ、MKP-1 の遺伝子発現の有意な増加が確認された。この MKP-1 は ERK1/2 の脱リン酸化を介して脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現を減少させることが報告された (図 1-3、1-4) (Duric *et al.*, 2010)。BDNF は神経新生に関与するペプチドであるので、発現が減少することにより、神経細胞死から脳委縮が生じ、うつ病が発症する。このことより、MKP-1 はうつ病の主要な原因であると考えられた。本研究では MKP-1 をうつ発症マーカーとして着目し、実験を行った。



コルチゾール



コルチコステロン

図 1-1 グルココルチコイド（コルチゾール及びコルチコステロン）の構造式

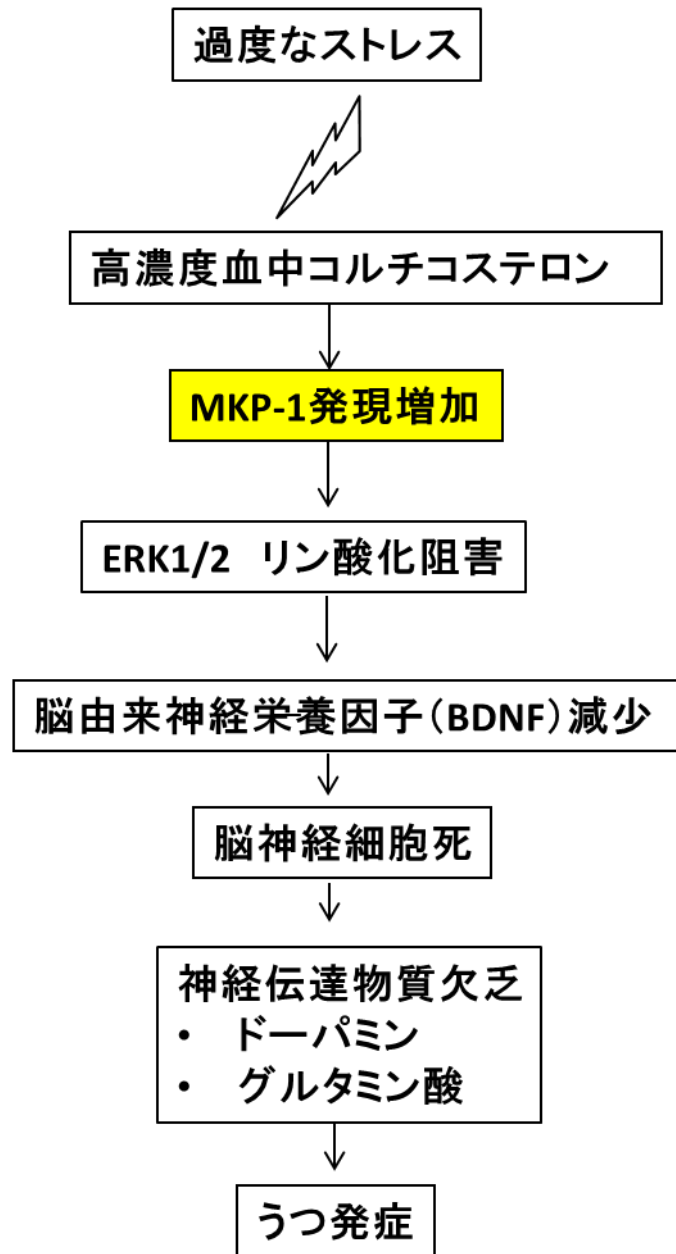


図 1-3 過度なストレスを受けてからうつ発症までの概要

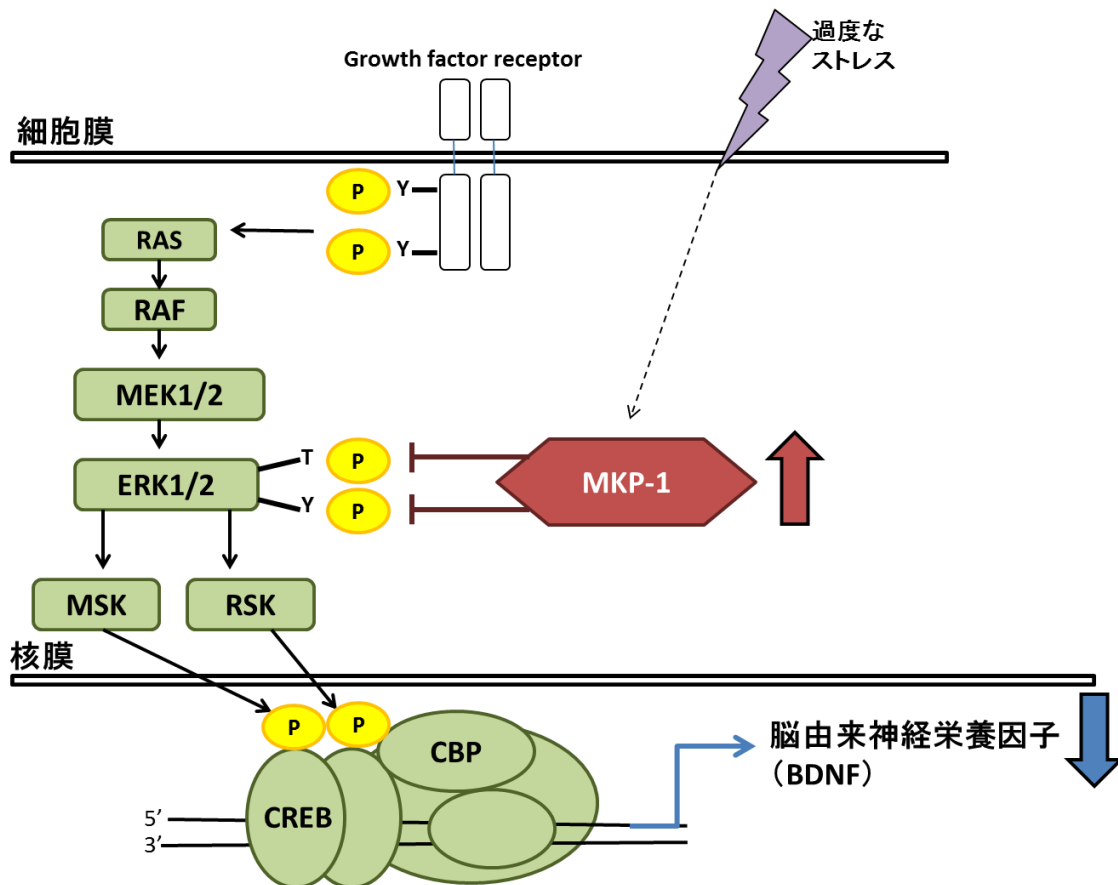


図 1-4 MKP-1 を介した BDNF 発現減少のメカニズム
(Duric et al., 2010) より図を作成

うつ病の治療法には、休養・環境調整・精神療法・薬物療法などが挙げられる。十分な休養と環境（職場環境や家庭環境）を可能な限り整えることがうつ病の治療法の第一段階である。これらに加えて精神療法では、精神科医や臨床心理士の元で行われるカウンセリングにより精神的ストレスを軽減させる。精神療法と並行して薬物療法が行われる。脳内の神経伝達物質の減少がうつ病の原因と考えられているため、薬物療法では、脳内の神経伝達物質を増加させる物質が処方される。

現在、うつ病の治療として三環系抗うつ薬(Tricyclic antidepressants : TCA)、モノアミンオキシダーゼ阻害剤(Monoamine oxidase inhibitors; MAOI)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(Selective Serotonin Reuptake Inhibitors; SSRI)、セロトニン-ノルアドレナリン再取り込み阻害剤(Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors: SNRI)が一般で処方されている(Mao *et al.*, 2008)。神経伝達物質はシナプス間隙において前シナプスから放出され、後シナプスへと伝達される。またシナプス間隙へと放出された神経伝達物質の一部は前シナプスへと再取り込みされる。これらの抗うつ薬は神経伝達物質の前シナプスへの再取り込みを阻害することによりシナプス間隙の神経伝達物質レベルを維持する。しかし抗うつ薬は高い効果を発揮する一方で、深刻な副作用も伴っている(Spencer *et al.*, 2009)。抗うつ薬は後シナプスのアセチルコリン受容体に結合し、自律神経の調整に必要なアセチルコリンの伝達を阻害する。この抗コリン作用による自律神経失調が副作用の眩暈、口渇、眠気及び便秘などの症状を引き起こす。また抗うつ薬は薬代が高く、服用には用法・用量を遵守しなければならない。さらに抗うつ薬による治療は服用を中止すると、元に戻る可能性があるため根本的な解決にはならない。一方で他の治療法として食事療法が試みられ、効果が確認されている食品由来機能性成分は、副作用

が少なく、食生活の中で気軽な摂取が可能である。従って、抗うつ薬の根本治療には食品や植物由来機能性成分による体内環境の改善が最善である。最近では St. John's wort (セイヨウオトギリソウ) と Ginkgo (イチョウ) の抽出物に抗うつ薬としての効果が確認され、実用化されている (図 1-5)。各々の活性成分は hypericin と ginkgolide であると考えられている。

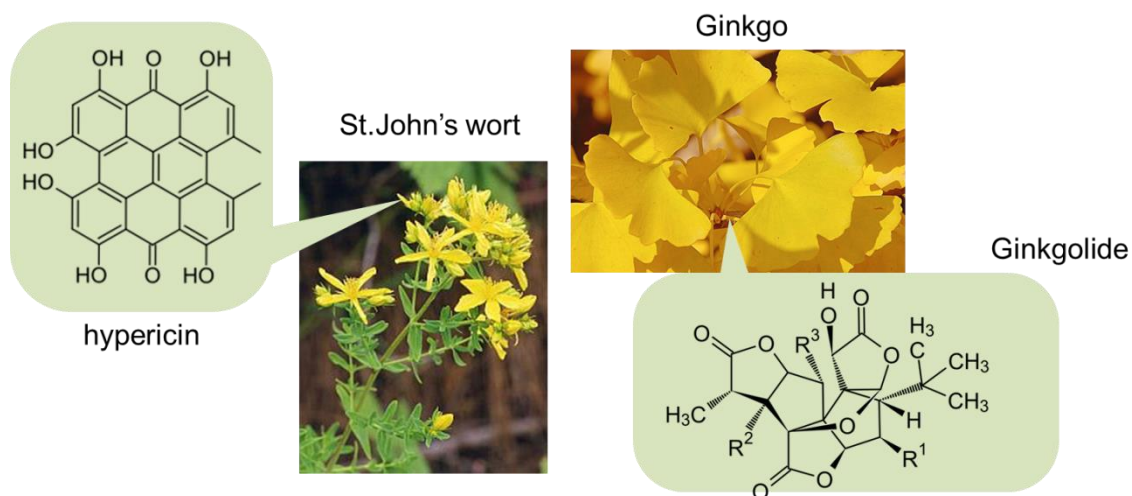


図 1-5 実用化されている植物由来抗うつ薬

本研究で着目した植物由来機能性成分はRAである。RAはローズマリーなどシソ科植物の主成分ポリフェノールである。ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) は地中海地域に広く分布する(図 1-6、図 1-7)。先行研究で着目していたローズマリーは地中海乾燥地域であるチュニジア共和国に生育する。乾燥地に生育する植物は生育環境における劣悪環境因子(高温、乾燥、高塩度及び紫外線)から個体を防御するため、有用な生理活性物質を多く蓄積すると考えられる。北アフリカ地域は乾燥地の中でも、探索源として未利用ではあるが、民間伝承的に用いられている薬用植物が多く生育する地域である。中でもチュニジア共和国は、北部は地中海に面し、南部はサハラ砂漠へと続いている。その距離はわずか数百キロメートルと短く、狭い範囲で環境変動は非常に大きいという非常に特徴的な地域である。特に乾燥経度が著しく高いことから生物多様性に富んでおり、そのような環境下で進化を遂げ、現存する植物体内では生理活性物質が蓄積しているものと考えられる。環地中海乾燥地域に生育する植物のうち、北アフリカ研究センターの調査により民間伝承的に薬用植物として用いられてきた *Rosmarinus officinalis* (図 1-5、1-6) に着目した。

ローズマリー (*R. officinalis*) はストレス軽減やリラックス効果などの伝承薬効情報を持つ。主な含有ポリフェノールとしてRA(図 1-8)、カルノシン酸(図 1-9)及びルテオリン(図 1-10)が含まれる。本研究室で使用された *R. officinalis* はチュニジア半乾燥地域(Kasserine)から採集された(図 1-10)。先行研究により、定量HPLCによる各ポリフェノール含量はチュニジア半乾燥地帯で自生しているものの方が、亜湿潤地帯よりも有意に多く(El Omri *et al.*, 2010)、また中でもRAが最も多く含まれることが確認された。

食物摂取とうつ病が密接に関わっていることが知られている(Murakami *et al.*, 2010)。食品ポリフェノールは神経機能に有益であることが報告されてい

る (Pan *et al.*, 2010)。そのような健康に有益なアロマ植物はハーブなどとして料理に利用されている (Adams *et al.*, 2007)。また栄養面、風味及び保存料として利用されている他に薬理作用を持っているとされる。食用ハーブの中でも、*R. officinalis* は世界中でスパイスとして、または薬用に利用されている (Polunin *et al.*, 1973)。特に痙攣 (Adams *et al.*, 2007; Al-Sereiti *et al.*, 1999)、炎症、組織損傷 (Takaki *et al.*, 2008)、潰瘍 (Dias *et al.*, 2008)、肝機能不全 (Amin *et al.*, 2005) の治療に用いられている他、利尿作用 (Pan *et al.*, 2012) が報告され、それが多種多様な *R. officinalis* 成分によるものとされる。また *R. officinalis* 成分の抗神経疾患効果は多く報告されてはいるが、未だにうつ病への効果のメカニズムが十分に解明されていない。*R. officinalis* やその主要ポリフェノールである RA、カルノシン酸及びルテオリンは神経保護効果 (Haloui *et al.*, 2000)、抗老化 (Adams *et al.*, 2007)、抗アルツハイマー病 (Liu *et al.*, 2009; Scheel-Krüger *et al.*, 1977; Takaki *et al.*, 2008)、抗パーキンソン病 (Park *et al.*, 2010) 及び抗筋委縮性側索硬化症 (Spencer *et al.*, 2009) のような神経系に関連した作用を持つことが報告されている。

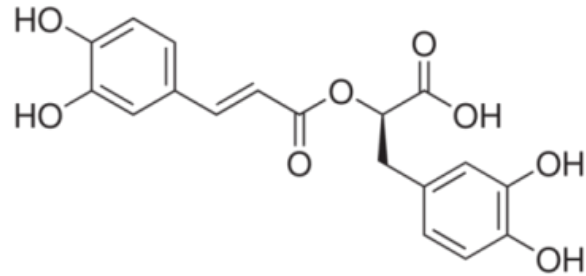


図 1-6 *R. officinalis*

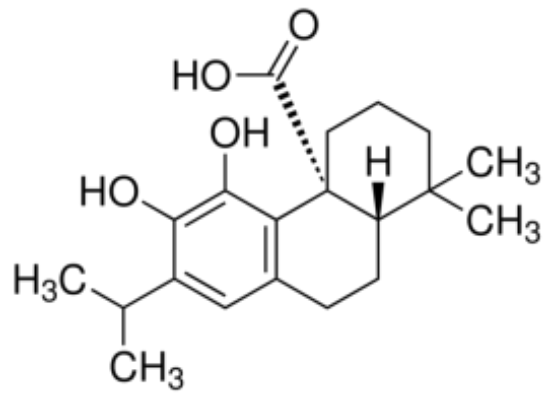


図 1-7 *R. officinalis* (葉)

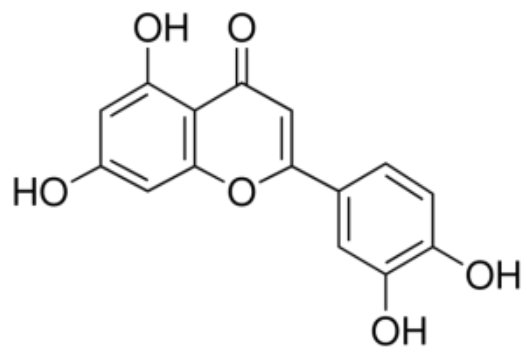
(2012/2/29 チュニジアにて撮影)



RA



カルノシン酸



ルテオリン

図 1-8 *Rosmarinus. officinalis* 主成分ポリフェノールの構造式

当研究室の先行研究では *R. officinalis* の 70%エタノール抽出物 (EERO) (図 1-11) を経口投与することにより、尾部懸垂試験 (TST) でのうつ行動が抑制された (図 1-14)。TST 後、EERO 経口投与したマウスの脳内の MKP-1 の遺伝子発現量が減少したことから、うつ行動が抑制されたと考えられた (図 1-15)。また EERO 経口投与したマウスの脳内の神経伝達物質 (ドーパミンとアドレナリン) が増加したことによっても、うつ行動が抑制されたと考えられた (図 1-16)。また神経細胞モデルであるラット由来副腎褐色細胞腫由来 PC12 細胞においてストレスホルモンであるコルチコステロンによる毒性が、EERO と RA は共に神経保護作用を示した (図 1-20)。さらに両方とも ERK1/2 リン酸化誘導作用をもち、BDNF 発現促進作用を示した (El Omri *et al.*, 2010 ; Sasaki *et al.*, 2013)。さらに以上の結果を考慮し、EERO の主成分ポリフェノールである RA を経口投与したマウスへの効果を検証した。RA を経口投与したマウスの脳内では、MKP-1 の遺伝子発現量が減少し、BDNF の遺伝子発現量が増加した (図 1-17)。また RA 経口投与マウスの脳内のノルアドレナリンレベル及びドーパミンレベルが増加したが、アドレナリンレベルには変化がなかった (図 1-18、図 1-19)。加えて RA 経口投与によって、ドーパミンやノルアドレナリンなどの神経伝達物質生成関連酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の脳内遺伝子発現の増加も確認された。ドーパミン生成経路は (図 1-13) に示す。ローズマリーは民間療法では頭痛、癲癇、認知低下及びうつに用いられてきた (Adams *et al.*, 2007; Al-Sereiti *et al.*, 1999)。加えて、近年、*R. officinalis* をマウスへ経口投与することによりフルオキセチンのように抗うつ薬様効果 (El Omri *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2009) を示した。アロマ植物がドーパミン作動性神経の調節を介して、抗うつ薬様効果を持つ可能性があることが報告された (Machado *et al.*, 2009)

このことから RA が脳内において活性を持ち、抗うつ薬様作用を持つ可能性は非常に高い。本研究では RA による抗うつ薬様作用の更なるメカニズムを行い、その作用の理解を深めることを目的とする。

上記の通り、うつ病は過度なストレスにより増加するグルココルチコイド（コルチコステロン）が神経にダメージを与えることから始まる。従って 2 章では、コルチコステロンの分泌調節機構に着目し、RA による調節作用の検証を行った。

3 章では、コルチコステロン分泌調節を介しての、BDNF 発現メカニズムへの RA の影響に着目した。その検証の一端を担うものとし、RA 経口投与マウス脳内での BDNF 発現の関連因子のタンパク質発現解析を行った。

4 章では分化神経細胞モデルである NGF 処理 PC12 細胞を用いて、RA による BDNF 発現の関連因子のメカニズム解析を行った。

EERO 乾燥体重量 (g/L)	37.5±2.3
EERO 中 RA 濃度 (g/L)	1.93±0.12 (5.1% /EERO 乾燥体)

(El Omri *et al.*, *Journal of Ethnopharmacology*, 2010)

図 1-11 *R. officinalis* 70% エタノール抽出液 (EERO) と RA 濃度

R. officinalis (葉) を暗所で乾燥後、フードプロセッサーで粉砕、粉末化し、粉末 10 g を 70% エタノール 100ml で 2 週間浸透させた。遠心 (1000×g、15 分) し、沈殿を除いた後、0.22 μm フィルターで濾過し、*R. officinalis* 70% エタノール抽出液 (10% w/v) とした。*Rosmarinus officinalis* 70% エタノール抽出物 (EERO) を concentrator で乾燥させ、重量を測定した。また HPLC を用いて EERO 中の RA を定量した。EERO 乾燥体中には RA が 5.1% 含有していることが判明した (Omri らによる検証)。

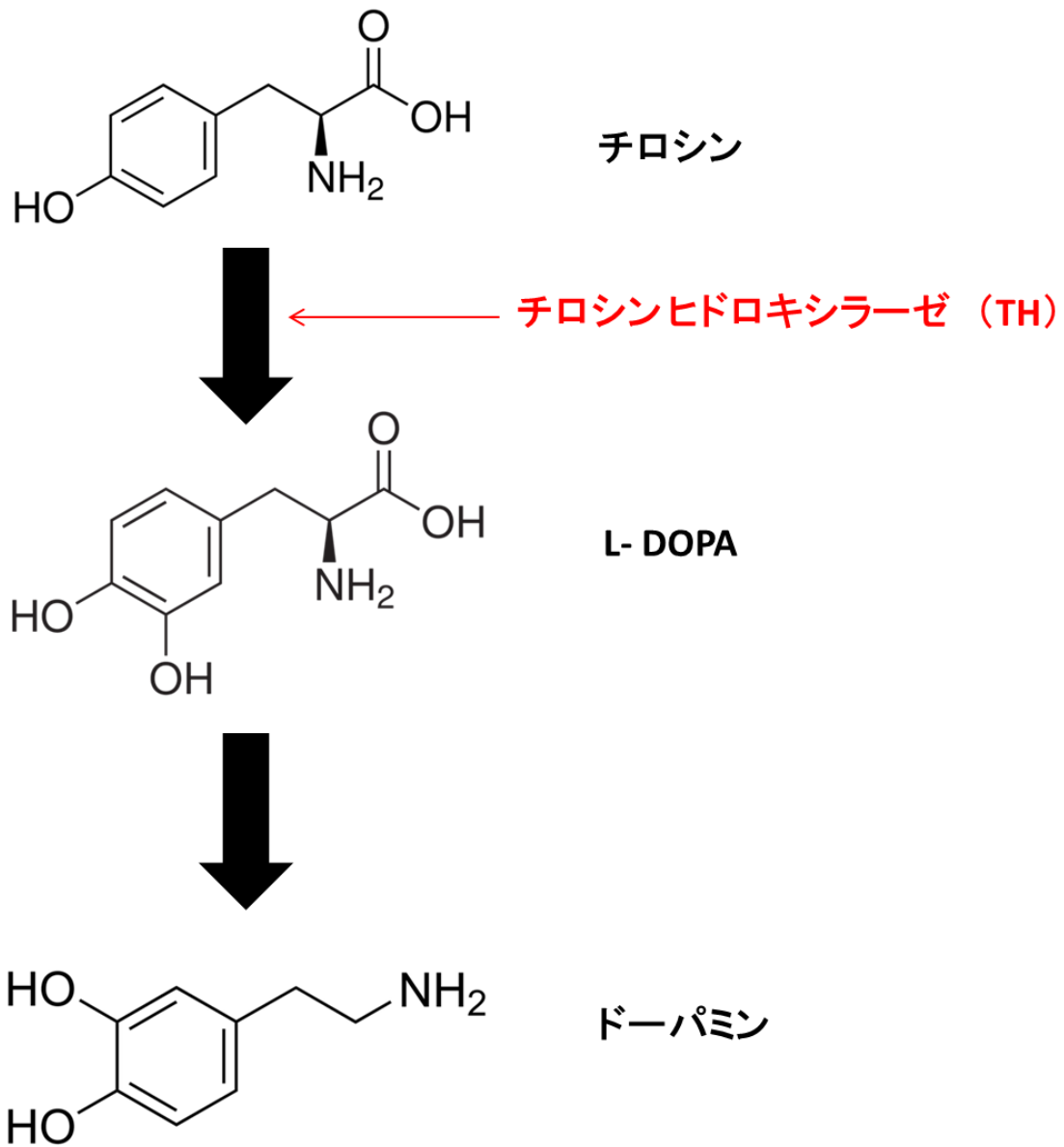


図 1-13 ドーパミンの生成経路

チロシンヒドロキシラーゼ (TH) はチロシンから L-DOPA を生成し、ドーパミンの生成に関わる。

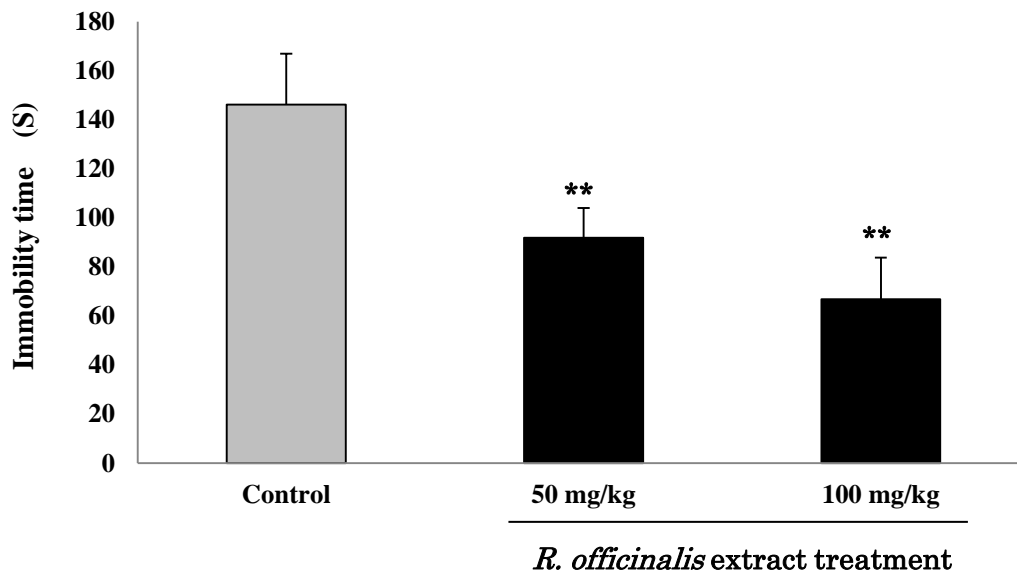


図 1-14 TST における EERO 経口投与マウスの無動時間

縦軸：無動時間 (s) 横軸：経口投与群；ICR マウスに水経口投与 (Control；うつ発症モデル) 及び EERO 経口投与 (50mg/kg, 100mg/kg) 60 分後、TST において尾部で懸垂させ、ストレスを与えた。尾部懸垂開始 2 分後、4 分間の無動時間を測定した。(**P < 0.01 vs Control)

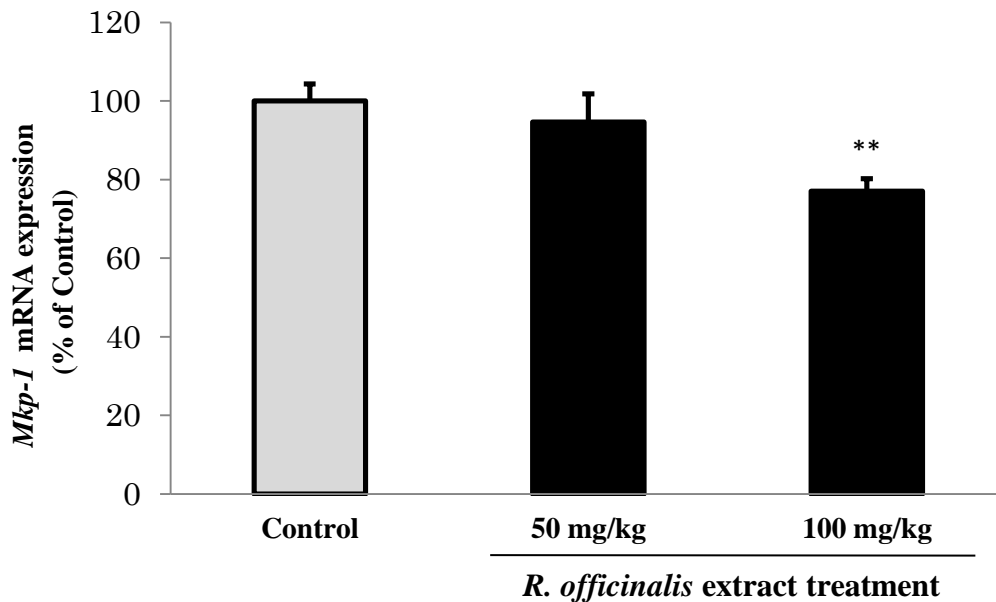


図 1-15 TST 後、EERO 経口投与マウス脳における *Mkp-1* mRNA 発現

縦軸：*Mkp-1* mRNA 発現 (% of Control)、横軸：経口投与群；ICR マウスに水経口投与 (Control；うつ発症モデル) 及び EERO 経口投与 (50mg/kg, 100mg/kg) し、TST で無動時間を測定した後、マウスから脳を採集した。脳から RNA を抽出し、作成された cDNA をリアルタイム PCR で *Mkp-1* mRNA 発現を測定した。(**P < 0.01 vs Control)

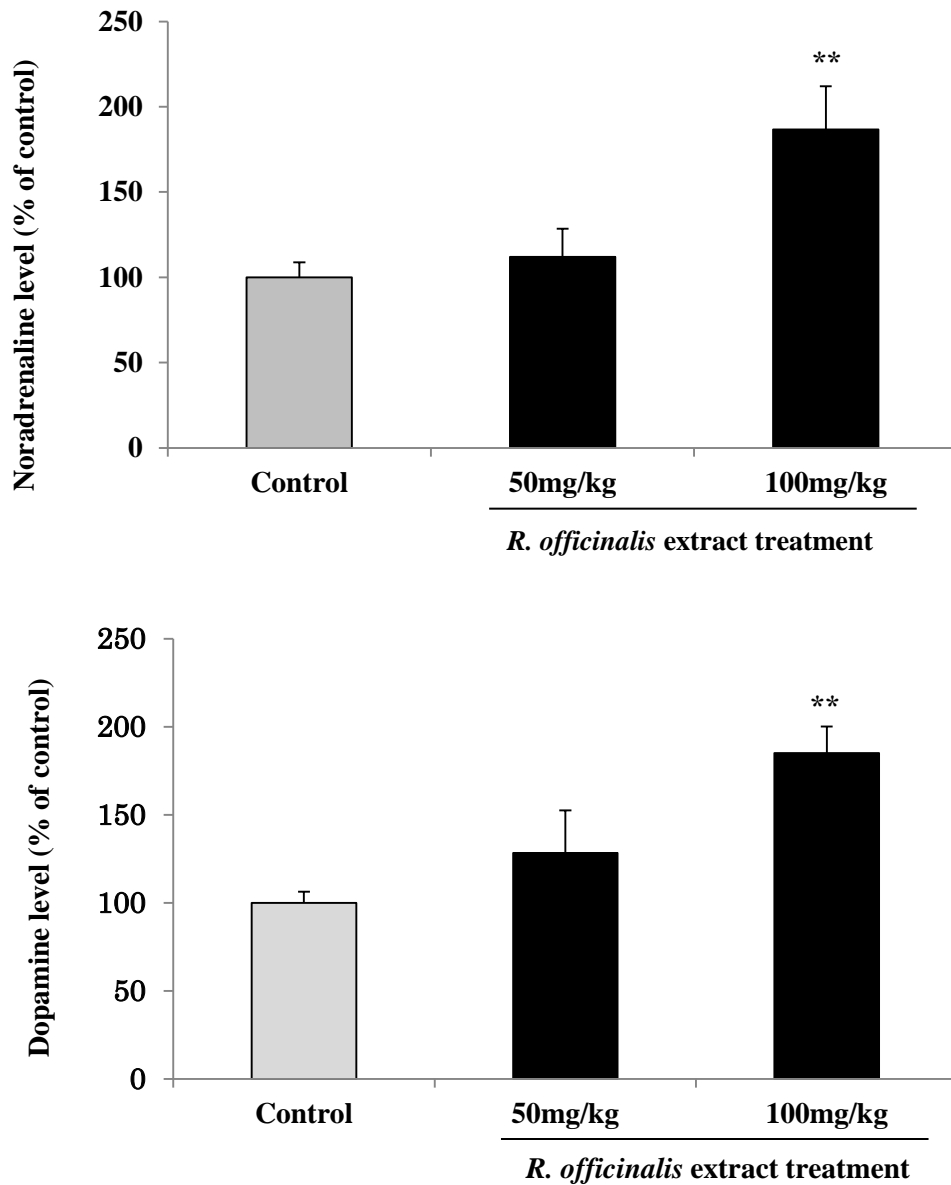


図 1-16 TST 後、EERO 経口投与マウス脳における神経伝達物質の定量

縦軸：脳内の神経伝達物質（ノルアドレナリンおよびドーパミン）レベル（% of Control）、
 横軸：経口投与群；ICR マウスに水経口投与（Control；うつ発症モデル）及び EERO 経口投与（50mg/kg, 100mg/kg）し、TST で無動時間を測定した後、マウスから脳を採集した。脳から神経伝達物質を含む懸濁液を作成した。ECD-HPLC を用いてこの懸濁液の神経伝達物質の定量を行った。（**P<0.01 vs Control）

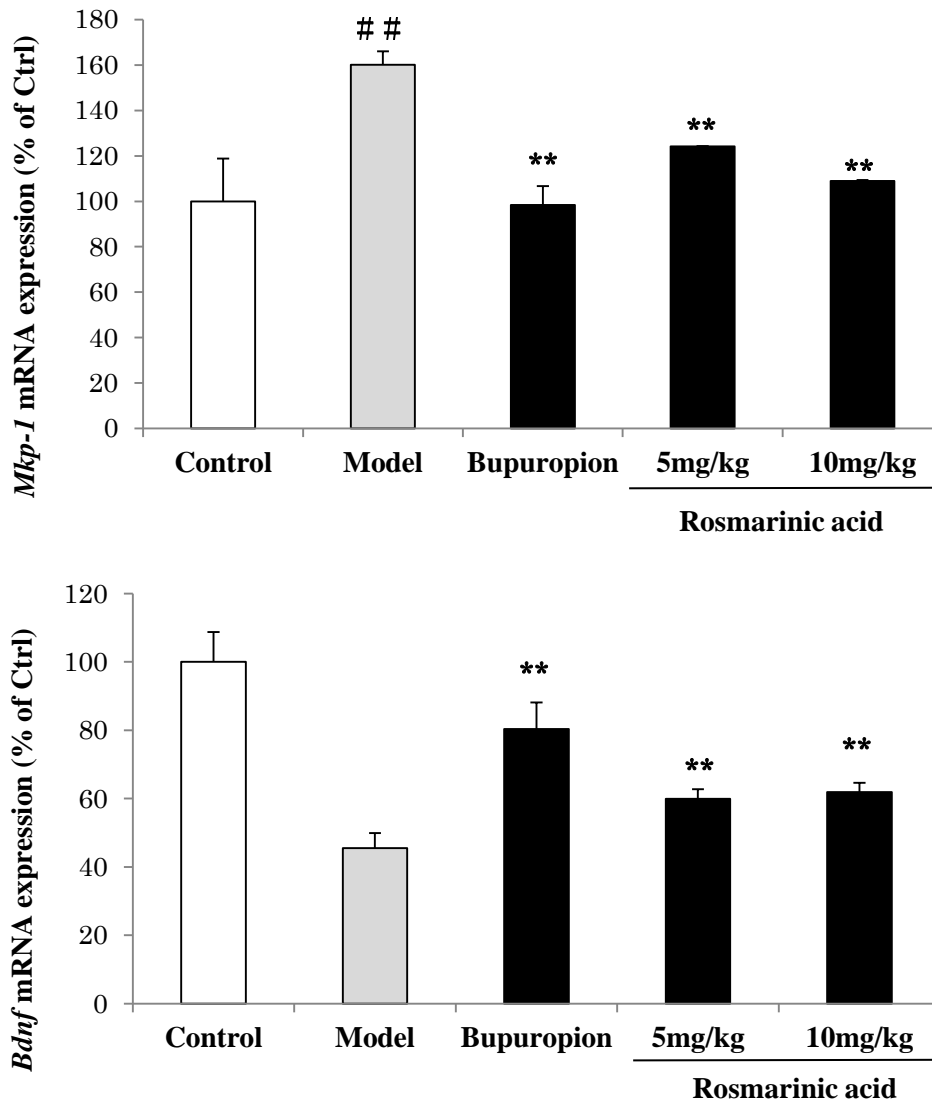


図 1-17 TST 後、RA (Rosmarinic acid) 経口投与マウス脳における *Mkp-1* mRNA および *Bdnf* mRNA 発現

縦軸：*Mkp-1* mRNA および *Bdnf* mRNA 発現 (% of Control)、横軸：経口投与群：ICR マウスに水経口投与 (Model; うつ発症モデル)、抗うつ薬ブプロピオン経口投与 (Bupropion)、RA 経口投与 (5mg/kg, 10mg/kg) 60 分後、TST で無動時間を測定した後、マウスから脳を採集した。脳から RNA を抽出し、作成された cDNA をリアルタイム PCR で *Mkp-1* mRNA 発現を測定した。(**P<0.01 vs Model, ##P<0.01 vs Control)

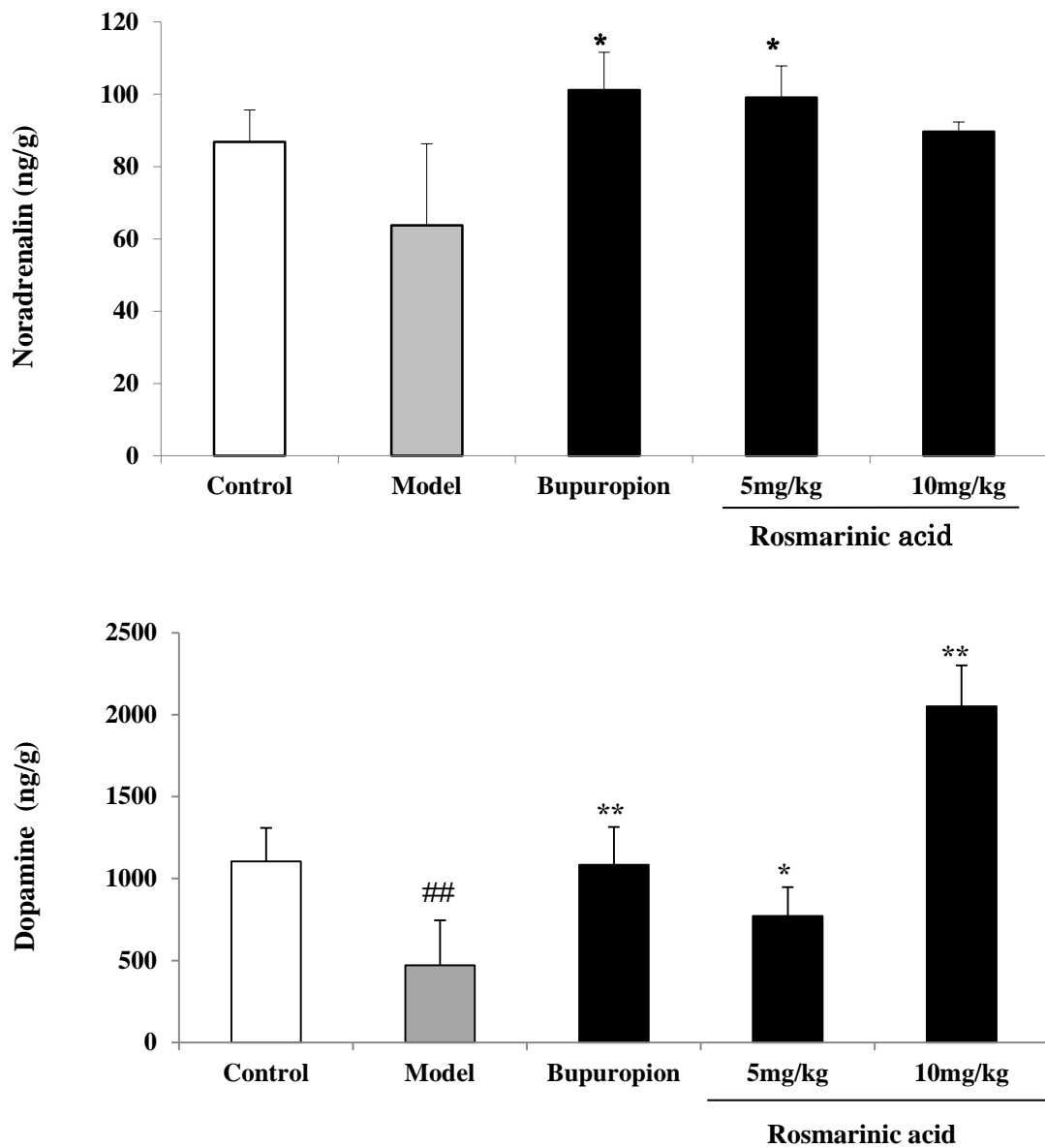


図 1-18 TST 後におけるマウス脳の内ルアドレナリンおよびドーパミンの濃度

TST 後、Control 群（水経口投与、TST なし）、Model 群（水経口投与、TST あり）、Bupropion (20 mg/kg、TST あり) 経口投与群、RA (5 mg/kg または 10 mg/kg、TST あり) 経口投与群のマウスから脳を採集し、ELISA を用いてノルアドレナリンおよびドーパミンの濃度を測定した。(* $P < 0.05$ vs Model, ** $P < 0.01$ vs Model, ## $P < 0.01$ vs Control)

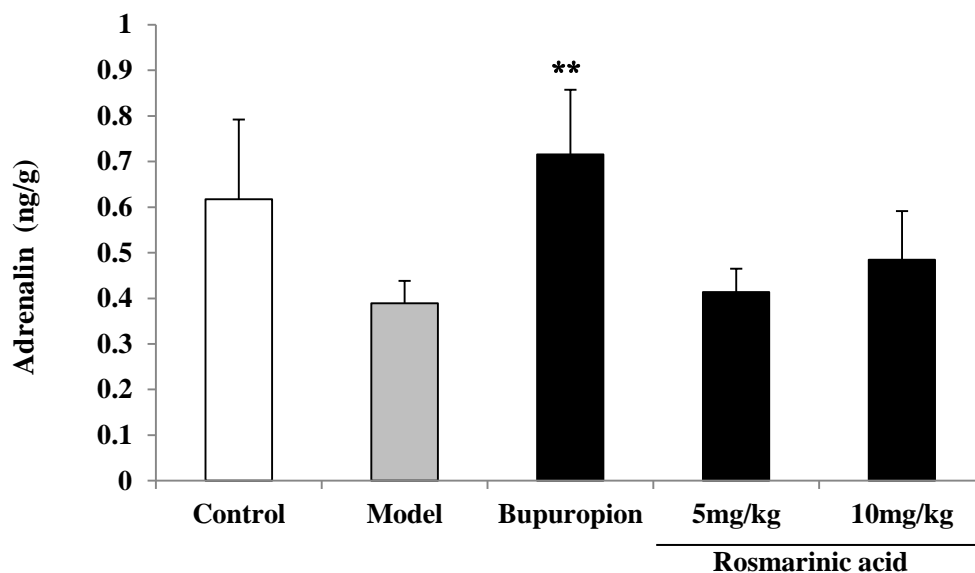


図 1-19 TST 後におけるマウス脳のアドレナリン濃度

TST 後、Control 群（水経口投与、TST なし）、Model 群（水経口投与、TST あり）、Bupropion (20 mg/kg、TST あり) 経口投与群、RA (5 mg/kg または 10 mg/kg、TST あり) 経口投与群のマウスから脳を採集し、ELISA を用いてアドレナリン濃度を測定した。(* $P < 0.05$ vs Model, ** $P < 0.01$ vs Model, # $P < 0.05$ vs Control)

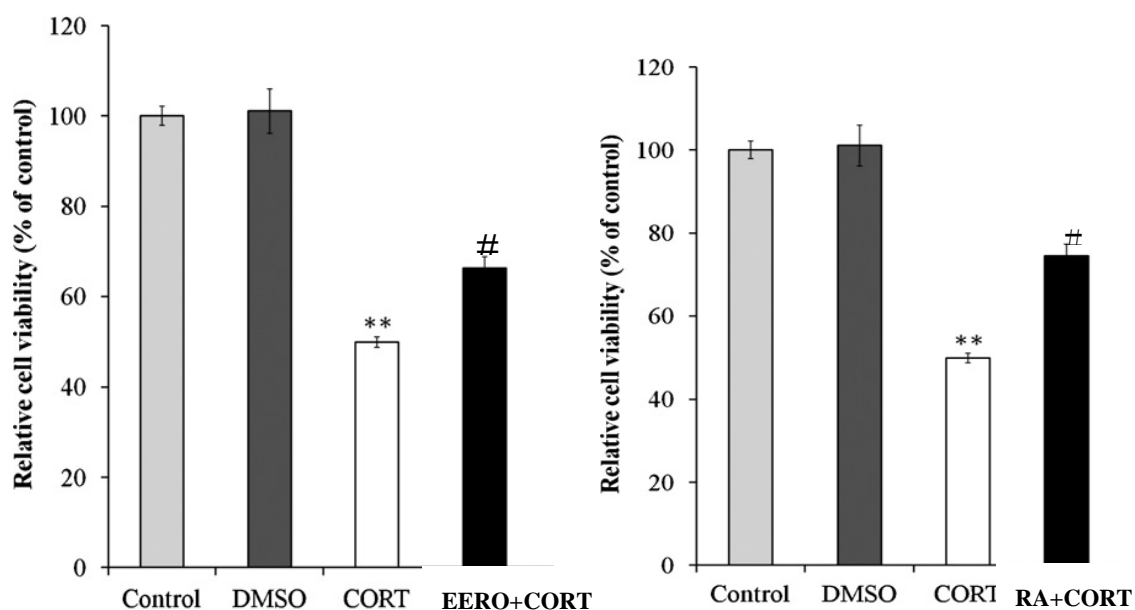


図 1-20 コルチコステロン下における EERO 及び RA 処理 PC12 細胞の細胞生存率

縦軸：細胞生存率 (% of Control)、横軸：処理群；PC12 細胞を 96 ウェルプレートに 1.0×10^5 cells/well で播種し、24 時間後、1/1000 希釈 EERO もしくは RA で処理した後、コルチコステロン (Cort) を処理した。インキュベーターで 48 時間培養した後、MTT 10 μ l/well を添加し、24 時間後、10% SDS 100 μ l/well 添加し、24 時間後、570nm で吸光度を測定した。(**P<0.01 vs DMSO, #P<0.05 vs CORT)

第2章 うつモデルマウスを用いた RA による抗うつ薬様作用及びストレスホルモン分泌調節作用の検証

2-1 諸言

ヒト及びマウスなどの哺乳類は慢性的もしくは深刻なストレスによって、うつが発症する。ストレスには外部環境（温度、湿度、光）、社会的敗北など様々ある。これらのストレスがより深刻になると、ストレスホルモンであるグルココルチコイド（齧歯類ではコルチコステロンが優勢に働く）の血中濃度が過度に増加し、脳に深刻なダメージを与える。このグルココルチコイド濃度は視床下部－脳下垂体－副腎軸（HPA 軸）により調節される。正常時、グルココルチコイド濃度は視床下部から分泌される副腎刺激ホルモン放出因子（CRH）と脳下垂体から分泌される副腎刺激ホルモン（ACTH）によって副腎から分泌される。グルココルチコイドは負のフィードバックにより、グルココルチコイド受容体（GR）に結合し、CRH と ACTH を介してグルココルチコイド分泌量を調節する。一般にグルココルチコイド（齧歯類ではコルチコステロンが優勢に働く）は炭水化物、タンパク質及び脂質の代謝に関与し、外部環境によるストレスから体内の恒常性を保つので、必要不可欠である。しかし、過度なストレスは体内の恒常性を保とうとグルココルチコイドを過度に分泌させ、脳内でのグルココルチコイド受容体の発現量を減少させる。これは HPA 軸を機能不全に陥れてグルココルチコイド分泌の調節を不能とする（図 2-1）。その結果、生じた過度な血中コルチコステロンが神経細胞死、神経伝達物質レベルの低下を招き、うつを発症させ

ると考えられている。

尾部懸垂によってストレスが与えられ、コルチコステロン濃度を増加させることが報告されている。うつ及び抗うつ薬の *in vivo* 実験においてうつ発症モデルを任意に作出する必要がある。本研究ではマウスにストレスとして尾部で懸垂させることによってうつ発症の *in vivo* モデルを作出した。

他の *in vivo* としてうつ発症研究の行動試験において二つの行動試験が用いられる。強制水泳試験 (FST) と尾部懸垂試験 (TST) である。FST では強制水泳試験 (FST) は浸水による体温低下がストレスを与えていると考えられる。

本研究室のRAによるうつ行動抑制作用の検証とうつ行動に関与する HPA 軸の調節作用について検証を行った。

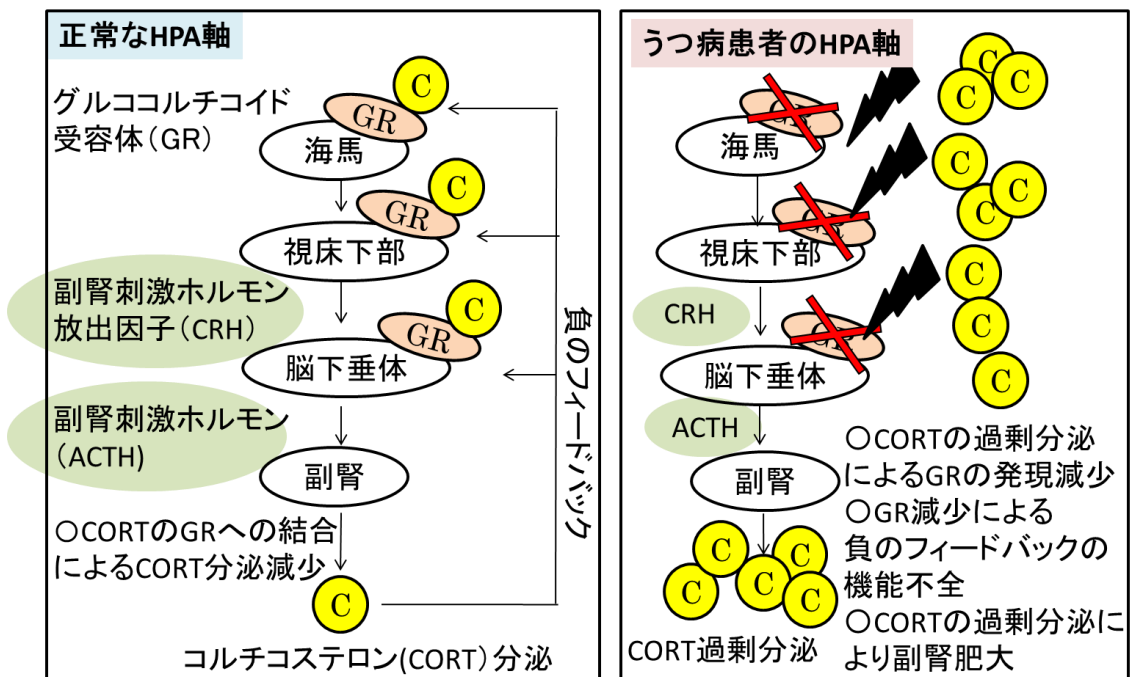


図 2-1 視床下部－脳下垂体－副腎軸 (HPA 軸)

2-2 実験方法

2-2-1 サンプル

本研究において実験で経口投与に使用されたサンプルは、RA (MP biomedical, Santa Ana, CA, USA) である。RA は経口投与を行うため、DW で懸濁された。RA 5 および 10 mg/kg weight となるように濃度調節を行い、ゾンデおよびシリンジを用いて経口投与を行った。

2-2-2 実験動物

本研究において ICR マウス (charles river laboratories Japan, Yokohama, Kanagawa, Japan)、♂、8 週齢、35 - 40 g が用いられた。マウスは自由食餌飲水及び 12 / 12h 明暗の元で飼育された。慣熟のためマウスは 1 週間飼育された。マウスの体重を毎日測定された。慣熟後、実験は 9 : 00- 16 : 00 で行われた。実験は筑波大学動物実験取扱規定に従って行われた。

2-2-3 うつ発症抑制効果の評価 (尾部懸垂試験; Tail suspension test; TST)

TST はマウスにおける抗うつ薬のスクリーニングとして最も用いられる。マウスは尾部懸垂試験用ボックス内のフックに尾部で懸垂された。懸垂開始 2 分後、4 分間の無動時間を測定した。経口投与群はうつ発症モデル Control 群 (水経口投与+ TST なし)、Vehicle (ストレス) 群 (水経口投与+ TST あり) 及び RA 群 (RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与 + TST なし) 経口投与群の 4 群 (8 匹 / 1 群) に分け、7 日間毎日経口投与された。TST は経口投与期間中 1 日置き (1、3、5、7 日目) に行われ、経口投与 60 分後に行われた。

2-2-4 脳のタンパク質抽出

TST 後、RA 経口投与によるマウス脳内への効果を評価するため、脳内におけるうつ発症関連因子のタンパク質発現量への影響を検証した。脳から海馬および視床下部を採取し、各々100 mg ずつ、冷 PBS 1 ml で 2 回洗浄し、500 μ l RIPA buffer (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) (1/100 protein inhibitor) を添加し、ホモジナイザー (Kinematica AG, Littau, Luzern, Switzerland) を用いて氷上で緩やかに懸濁し、5 分間氷上で静置した。細胞懸濁液を細胞保存用チューブに移し、15 分間液体窒素の中で静置した。その後、氷上で静置、融解させた (1 ~ 2 h)。融解後、細胞懸濁液をタンパク質低接着チューブに移し、10,000 \times g、20 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離した。沈殿物を残して、上清をタンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液は使用前まで-80 $^{\circ}$ C で保存した。

2-2-5 ウェスタンブロット

抽出したタンパク質抽出液での標的とするタンパク質の発現解析を行うため、先ずタンパク質の定量を行った。タンパク質定量には 2-D Quant kit (GE healthcare, Little Chalfont, Buckingham, UK) を用いた。方法は kit のプロトコールに従った。定量を行ったタンパク質を用いて、SDS-PAGE を行った。さらにタンパク質を泳動させたアクリルアミドゲルから PVDF メンブレン (Millipore, Darmstadt, Deutsch) へと転写を行った。メンブレン上の標的タンパク質の一次抗体 (抗体種類) を反応させた (16h、-4 $^{\circ}$ C)。さらに二次抗体 (抗体種類) を反応させた (45 min、室温)。標的タンパク質の発現解析には OdysseyFc Imaging System (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) を用いた。

2-2-6 統計解析

結果は、平均値±SD で示した。各集団の比較は t 検定を行い、*P<0.05 **P<0.01 を有意とみなした。

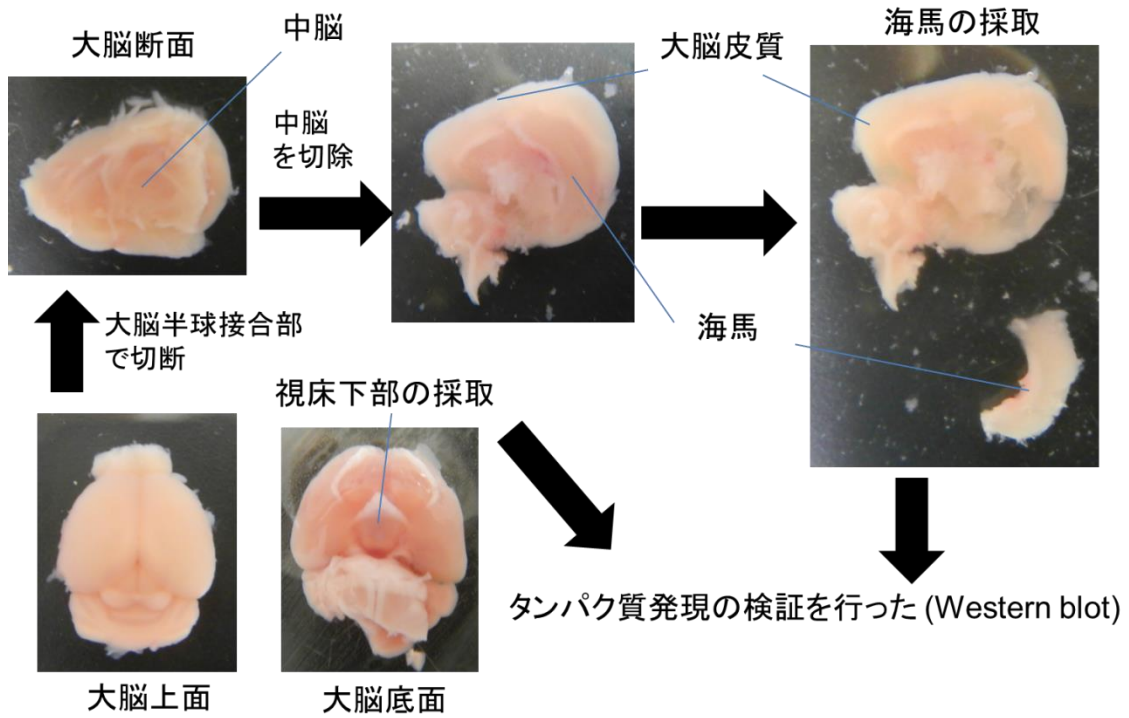


図 2-2 大脳から採取した海馬と視床下部

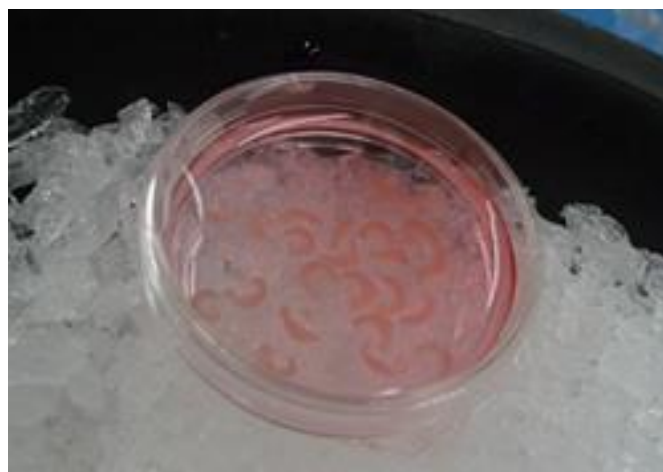


図 2-3 冷 PBS 内の海馬



図 2-4 ICR マウス

ICR マウスは炎症、免疫、がん、代謝(糖尿)、神経系、繁殖など幅広い研究分野で利用される白色のクローズドコロニーマウスである。本研究では、尾部懸垂試験 (Tail suspension test; TST) でストレスを与えることにより、うつ発症の *in vivo* モデルとして用いた。

2-3 結果

2-3-1 TSTにおけるRA経口投与による、うつ行動抑制作用の評価

TSTは抗うつ薬のスクリーニングに利用されてきた。マウスの尾部で懸垂を行った時の無動時間の延長はうつ発症を示唆するので、RAを経口投与した時のマウスの無動時間に与える影響を評価した。

マウスを尾部懸垂試験用ボックス内のフックに尾部で懸垂し始めてから2分後、4分間の無動時間を測定した。その結果、TST開始5日目からVehicle群の無動時間が著しく増加した(136.7 ± 47.1 s)。一方でRA経口投与群は投与開始及びTST開始5日目からでも無動時間は増加されなかった(RA 5 mg/kg weight投与群: 49.7 ± 45.2 s、RA 10 mg/kg weight投与群: 69.3 ± 11.1 s) (図 2-5)。最終日7日目において、Vehicle群では無動時間が 152.3 ± 28.2 sまで増加した。一方で、RA経口投与群の無動時間は最終日まで増加しなかった(RA 5 mg/kg weight投与群: 67.3 ± 7.6 s、RA 10 mg/kg weight投与群: 40.8 ± 17.3 s)の即ち、RA経口投与は無動時間の増加を抑制した。

2-3-2 RA経口投与がマウス血中コルチコステロン濃度に与える影響

うつを発症したマウスの血中でストレスホルモンであるコルチコステロンが過度に増加する。そこでTSTによって、うつを発症したマウスの血中コルチコステロン濃度へのRA経口投与の影響を検証した。Vehicle群では、血中コルチコステロン濃度がControl群()に比べて有意に増加した。しかし、RAの経口投与によって血中コルチコステロン濃度の増加が抑制された(図 2-7)。

2-3-3 RA 経口投与がマウス副腎重量に与える影響

うつを発症したマウスで、過度にコルチコステロンを分泌した副腎は肥大化する。そこで RA による副腎肥大化抑制作用を検証するため、RA 経口投与マウスから副腎を採取し(図)、その重量を測定した。Vehicle 群では副腎の重量が有意に増加した。一方で RA 経口投与マウスでは副腎肥大化が抑制された(図 2-8)。

2-3-4 RA 経口投与がマウス脳(海馬、視床下部)の HPA 軸調節に与える影響

ストレスホルモンであるコルチコステロン(CORT)は HPA 軸によって調節される。HPA 軸は海馬と視床下部のグルココルチコイド受容体(GR)に CORT が結合することから始まり、ネガティブフィードバックされる。CORT が結合した GR は視床下部からの副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRH)と副腎刺激ホルモン(ACTH)を介して、CORT の分泌を調節する。RA 経口投与による CORT 分泌調節機構(HPA)への影響を検証するため、マウス脳(視床下部と海馬)の GR 発現と CRH 発現の検証を行った。その結果、Vehicle 群では、海馬と視床下部においては共に GR 発現が減少した。RA 経口投与は GR の発現減少を抑制した(海馬: 図 2-9、視床下部: 図 2-10)。GR によって調節される CRH については、Vehicle 群では CRH 発現が増加した。RA 経口投与は CRH 発現の増加を抑制した(図 2-11)。

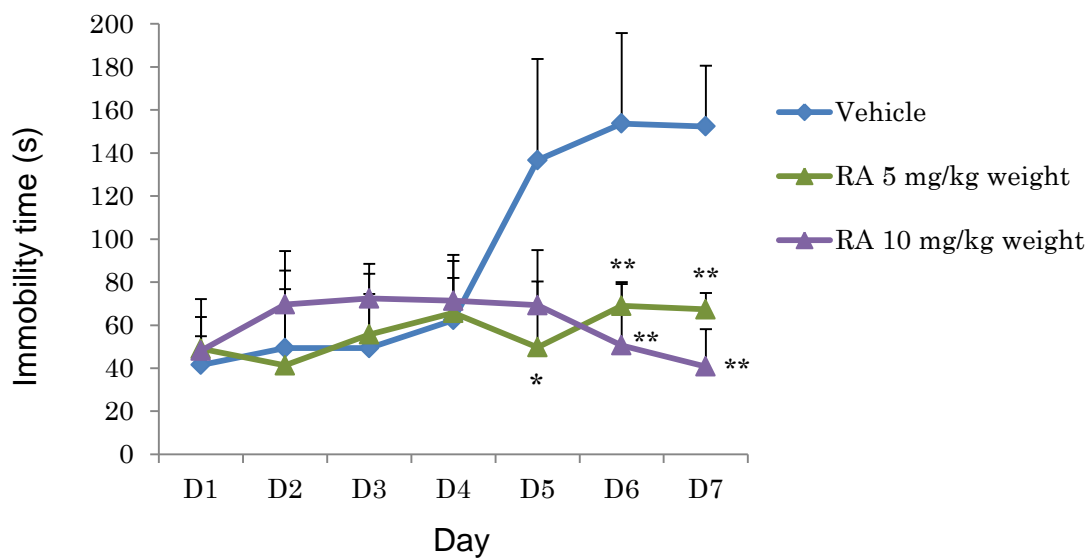


図 2-5 TST における RA 経口投与マウスの無動時間

縦軸：無動時間 (s) 横軸：経口投与群；ICR マウスに水経口投与 (Vehicle；うつ発症モデル) 及び RA 経口投与 (5 mg/kg, 10 mg/kg)。経口投与 60 分後、TST において尾部で懸垂させ、ストレスを与えた。尾部懸垂開始 2 分後、4 分間の無動時間を測定した。(*P < 0.05 vs Vehicle, **P < 0.01 vs Vehicle)



図 2-6 尾部懸垂試験 (Tail suspension test; TST) における ICR マウス

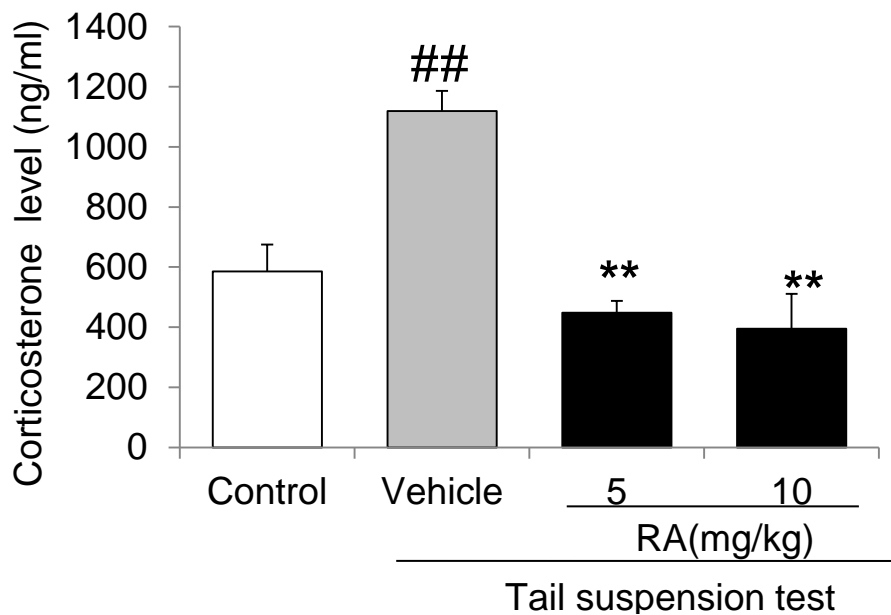


図 2-7 TST 後におけるマウス血中のコルチコステロン濃度

TST 後、Control 群（水経口投与、TST なし）、Vehicle 群（水経口投与、TST あり）、RA（5 mg/kg または 10 mg/kg、TST あり）経口投与群のマウスから血液を採集し、ELISA を用いてコルチコステロン濃度を測定した。（**P < 0.01 vs Vehicle, ##P < 0.01 vs Control）

副腎



腎臓

図 2- 腎臓上部に付随する副腎

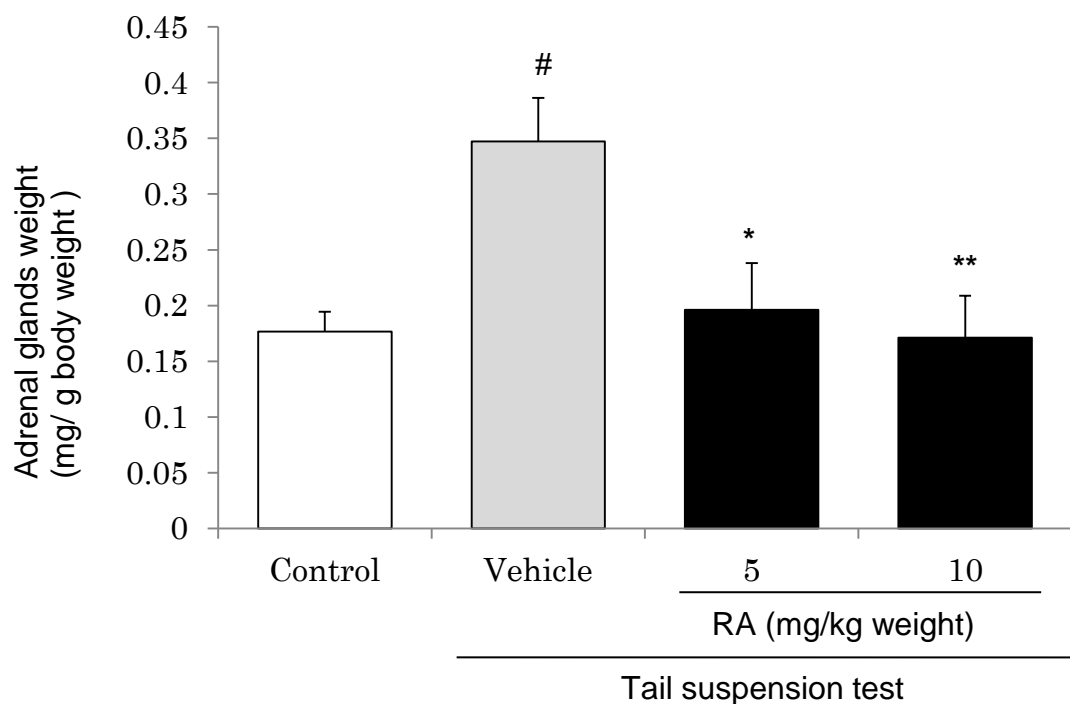


図 2-8 TST 後、RA 経口投与マウスの副腎重量

縦軸：副腎重量 (mg/ g 体重)、横軸：経口投与群；Control 群（水経口投与、TST なし）、Vehicle 群（水経口投与、TST あり）、RA 経口投与群（RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与、TST あり）。TST 後、マウスの腎臓から副腎を採取し、重量を測定した。（#P < 0.05 vs Control, *P < 0.05 vs Vehicle, **P < 0.01 vs Vehicle）

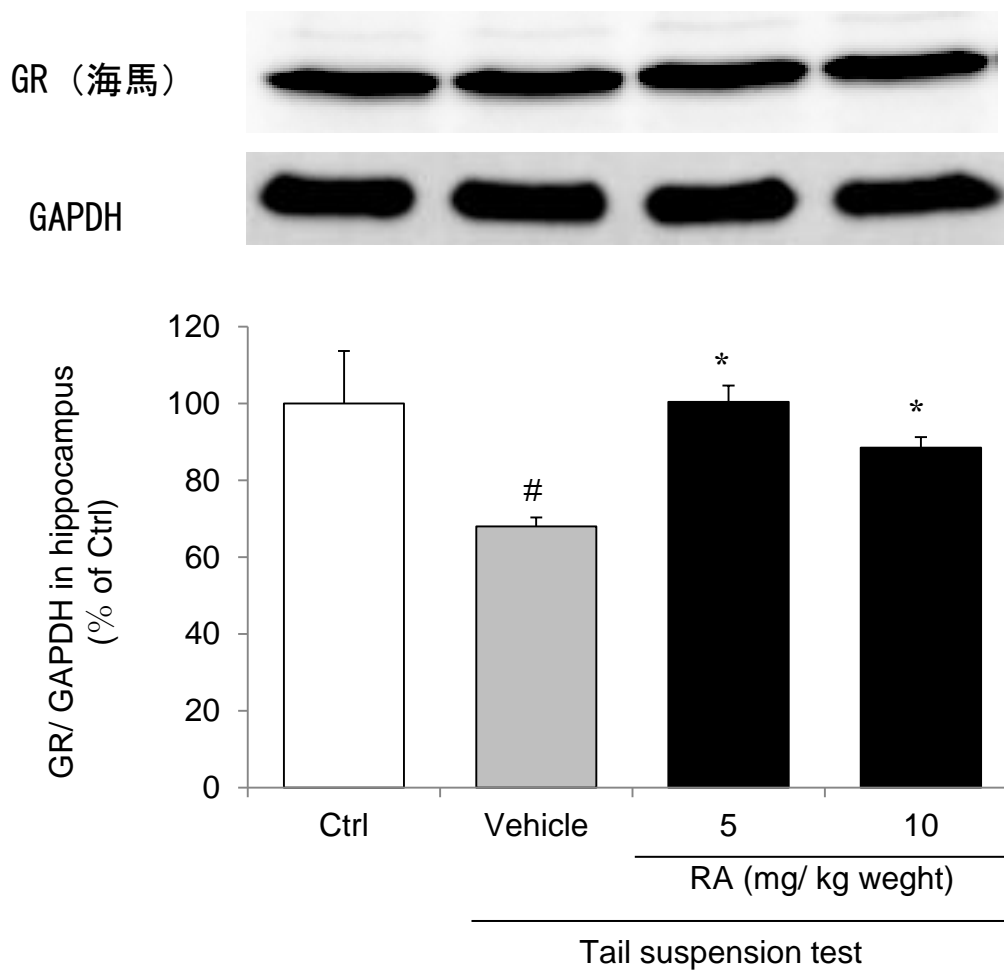


図 2-9 TST 後、RA 経口投与マウス脳(海馬)における GR 発現

縦軸：海馬の GR 発現 (% of Control)、横軸：経口投与群；Control 群（水経口投与、TST なし）、Vehicle 群（水経口投与、TST あり）、RA 経口投与群（RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与、TST あり）。TST 後、マウスから脳（海馬）を採取し、タンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した海馬タンパク質の GR の発現を検証した (#P < 0.05 vs Control, *P < 0.05 vs Vehicle)。

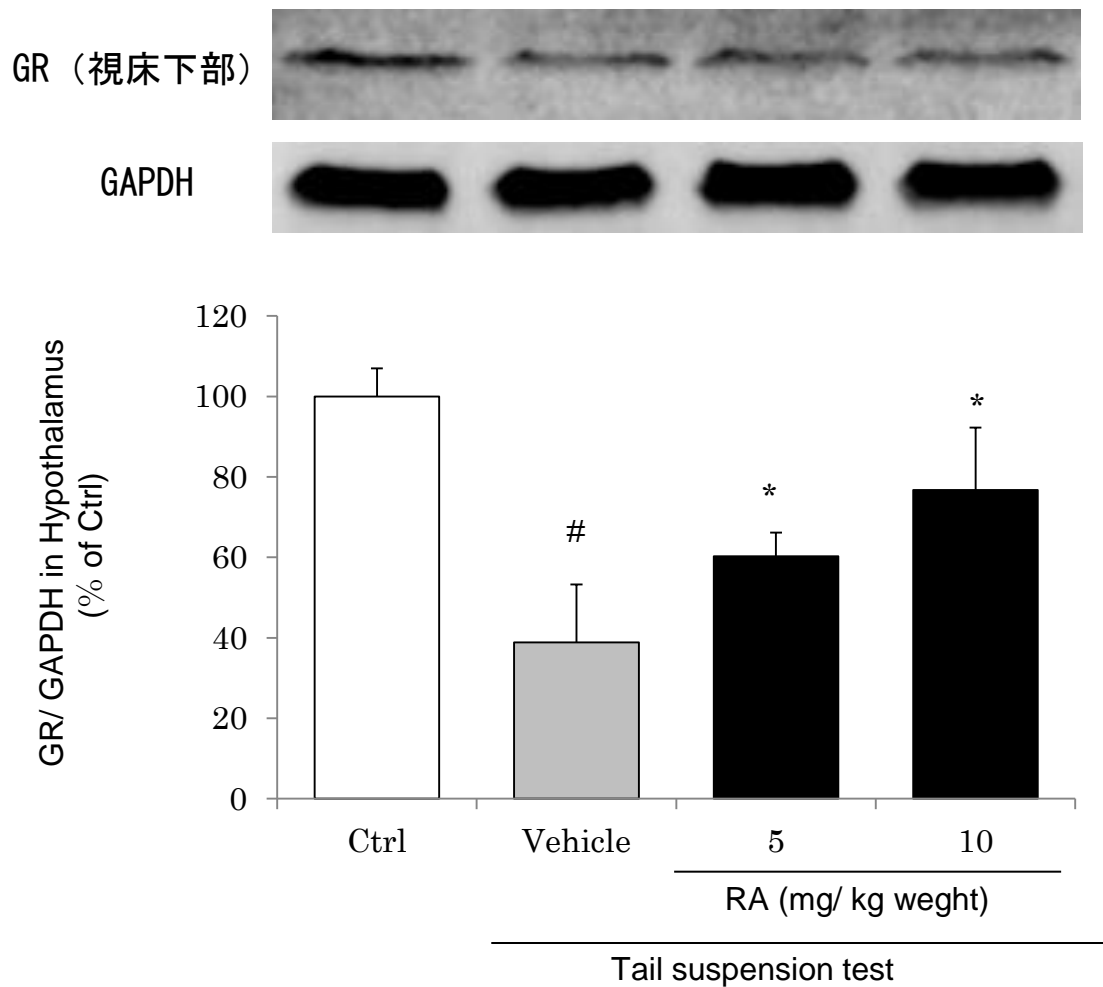


図 2-10 TST 後、RA 経口投与マウス脳(視床下部)における GR 発現

縦軸：視床下部の GR 発現 (% of Control)、横軸：経口投与群；Control 群（水経口投与、TST なし）、Vehicle 群（水経口投与、TST あり）、RA 経口投与群（RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与、TST あり）。TST 後、マウスから脳（視床下部）を採取し、タンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した視床下部タンパク質の GR の発現を検証した（#P < 0.05 vs Control, *P < 0.05 vs Vehicle）。

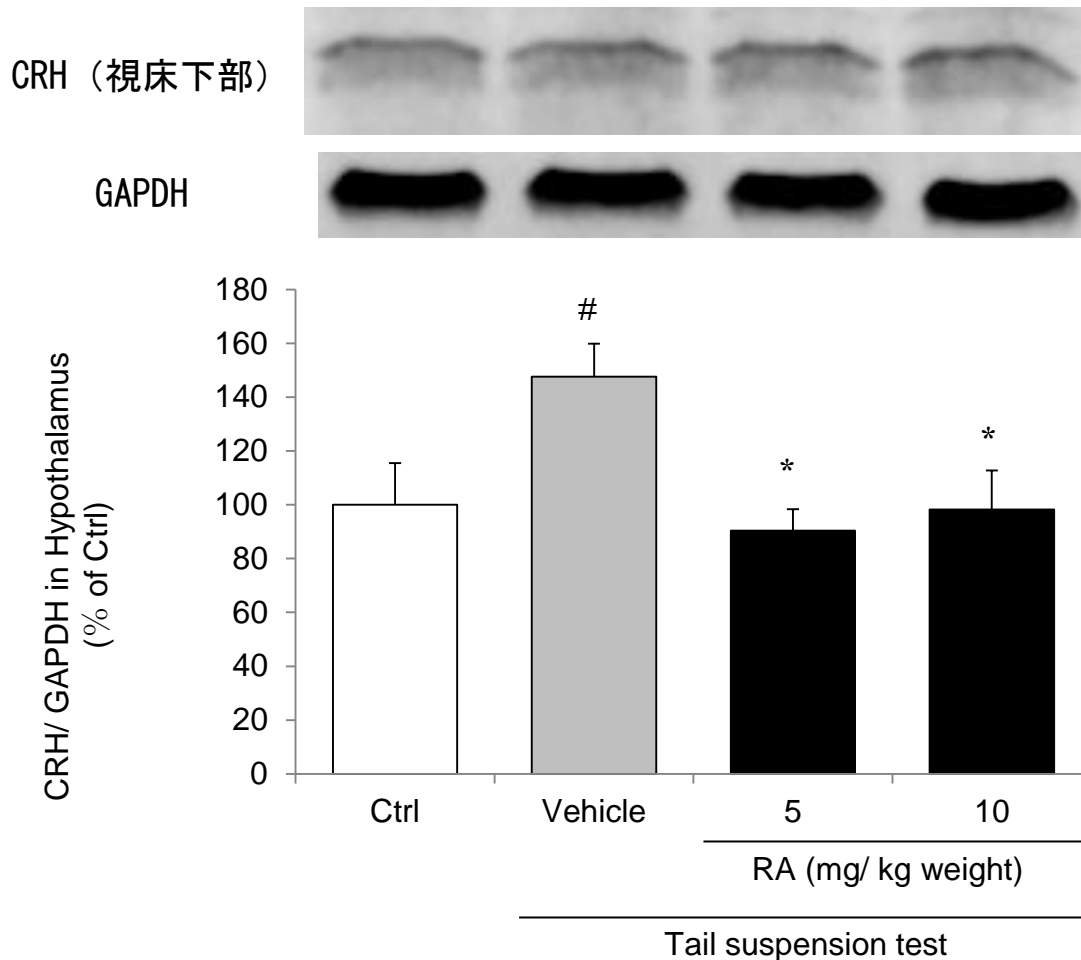


図 2-11 TST 後、RA 経口投与マウス脳(視床下部)における CRH 発現
 縦軸：視床下部の CRH 発現 (% of Control)、横軸：経口投与群；Control 群（水経口投与、TST なし）、Vehicle 群（水経口投与、TST あり）、RA 経口投与群（RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与、TST あり）。TST 後、マウスから脳（視床下部）を採取し、タンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した視床下部タンパク質の CRH の発現を検証した（[#] $P < 0.05$ vs Control, ^{*} $P < 0.05$ vs Vehicle）。

2-4 考察

本章では、マウス行動において RA によるうつ行動抑制作用を検証するために、うつ行動評価試験である尾部懸垂試験 (TST) を用いた。これはうつ発症の証明と新規抗うつ薬の効果を評価するために広く用いられる (Porsolt *et al.*, 1978; Xu *et al.*, 2005)。マウスを尾部で懸垂させ、その無動時間が測定する。無動時間の延長はうつ行動を示すとされ、逆に抗うつ薬投与による無動時間の短縮はうつ行動抑制を示すとされる。また尾部懸垂試験の無動時間はヒトのうつ行動にも反映されると考えられている (Porsolt *et al.*, 1977; Steru *et al.*, 1985)。この試験の特性から尾部懸垂試験は抗うつ薬のスクリーニングとして広く用いられている。加えて、尾部懸垂試験では植物由来成分などの抗うつ薬様効果を持つ天然由来成分を投与することによって無動時間が短縮し、うつ行動が抑制されたことが報告されている (Pan *et al.*, 2012)。

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。一方 RA 経口投与マウスは Vehicle 群に比べ、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、うつ行動を抑制されたことが示唆される。この効果は、先行研究での RA 経口投与によるマウス脳内での神経伝達物質レベルの増加と神経新生に関与する BDNF の発現増加が関与していると考えられる。TST 後、Vehicle 群のマウス血中のコルチコステロン (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 経口投与されたマウスの血中 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 HPA 軸に作

用することが見出された。副腎から CORT が過分泌されると、副腎は肥大化する。実際、Vehicle 群の副腎重量は Control 群に比べて高かった。一方、RA 経口投与マウスの副腎重量は Vehicle 群に比べて低かった。これは RA 経口投与が CORT 分泌を抑制することにより、副腎の肥大化を抑制したことを意味する。TST 後、脳内の HPA 調節因子の発現を確認した。Vehicle 群の海馬及び視床下部でのグルココルチコイド受容体 (GR) の発現は、Control 群に比べて有意に減少した。これは GR 発現の減少に伴い、CORT 分泌の調節に障害が生じていることを示唆する。一方で RA 経口投与は Vehicle 群に比べて、GR 発現量を増加させた。これは HPA 軸における、CORT 分泌調節の機能不全を RA 経口投与が抑制したことを示す。さらに GR によって調節される CRH 発現において、Vehicle 群では Control 群に比べて CRH 発現量が有意に増加した。これは GR 発現量の減少により、負のフィードバックに不調が起こり、CRH 発現が増加しているためである。一方で RA 経口投与は Vehicle 群に比べて、CRH 発現量は減少した。これは GR 発現の減少を RA 経口投与が抑制したことにより、CRH 発現が調節されたためと考えられる。さらに我々は、脳下垂体における ACTH 発現への RA の影響を検証するため、脳下垂体の採取を試みたが、トルク鞍に囲まれており、また非常に微小な組織であったために採取を断念した。マウスの脳下垂体よりも大きなラットの脳下垂体を用いた検証を推奨する。以上の結果により、RA 経口投与は HPA 軸を介して、CORT の増加を抑制したものと考えられる。

第3章 マウス脳内でのうつ関連因子の発現における RA の影響

3-1 諸言

第三章では、マウス脳内でのうつ関連因子のタンパク質発現への RA の影響を、ウェスタンブロットを用いて検証する。本研究室の先行研究では RA 経口投与マウスの脳内での、MKP-1 及び BDNF の遺伝子発現量を、リアルタイム PCR を用いて検証した。このことにより RA の経口投与により転写レベルでは MKP-1 発現の減少を介して、BDNF 発現が増加したことが示唆された。しかし、BDNF は翻訳直後、BDNF 前駆体 (proBDNF) として存在する。proBDNF は BDNF の機能とは異なり、神経新生の抑制や神経突起の委縮などの機能を持つ。proBDNF は細胞内でプロテアーゼによるプロセッシングを経て、成熟 BDNF (BDNF) となる (図 3-2)。つまり、先行研究での転写レベルのみの検証では、RA 経口投与によって調節された脳内の BDNF は proBDNF である可能性も生じる。従って、タンパク質レベルでの BDNF 発現の検証が必要である。MKP-1 発現はグルココルチコイド受容体 (GR) とコルチコステロン (CORT) によって調節されることが報告された。そのメカニズムとして、CORT は GR と複合体を形成して、核内へ移動することから始まる。複合体は二量体を形成し、転写因子として機能する。この二量体が DNA 上のグルココルチコイド応答領域 (GRE) に結合することにより MKP-1 は転写される (図 3-1)。さらに一章で記述した通りに、MKP-1 は ERK1/2 の脱リン酸化を介して、BDNF 発現を抑制する。本章では GR 及び CORT により調節される MKP-1 を介した BDNF 発現への RA の影響をタンパク質レベルで検証する。

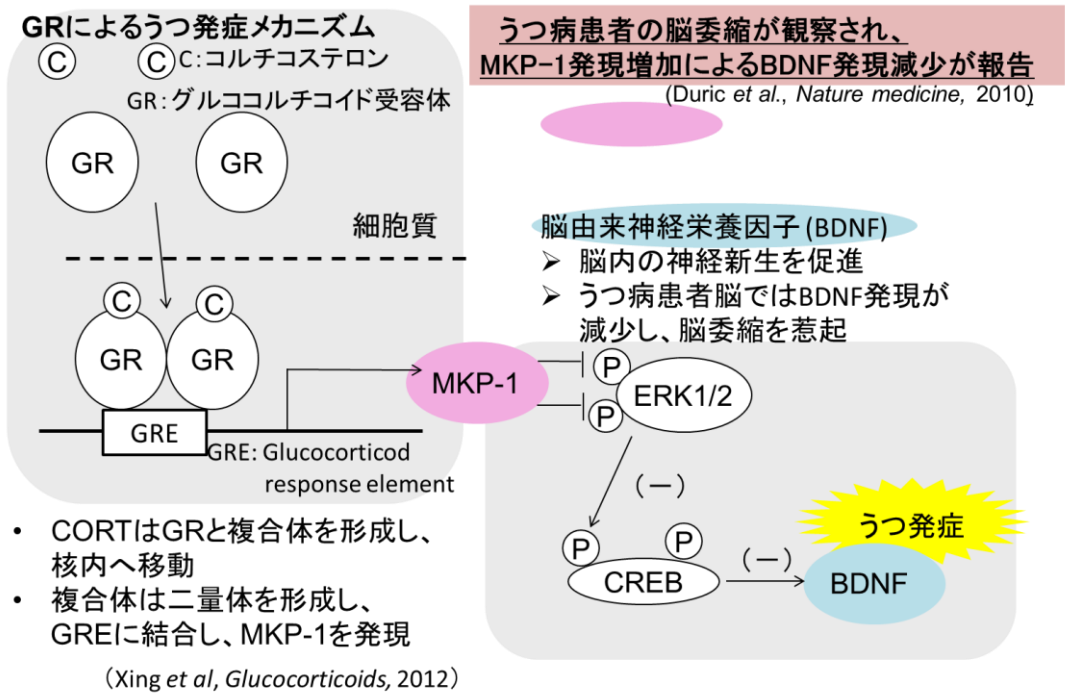


図 3-1 GR と CORT による MKP-1 発現

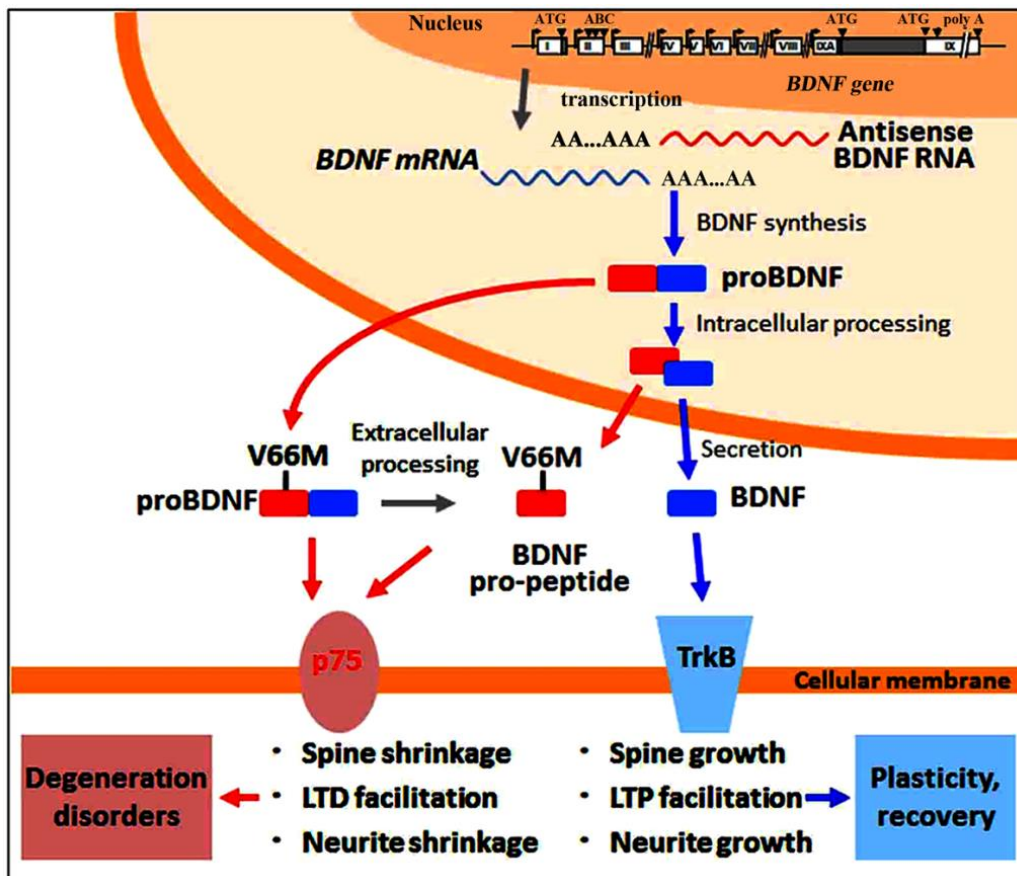


図 3-2 翻訳後の BDNF プロセッシング

(T. Mizui *et al.*, *Neuroscience & Medicine*, 2014)

3-2 実験方法

3-2-1 サンプル

本研究において実験で経口投与に使用されたサンプルは、RA (MP biomedical, Santa Ana, CA, USA) である。RA は経口投与を行うため、DW で懸濁された。RA 5 および 10 mg/kg weight となるように濃度調節を行い、ゾンデおよびシリンジを用いて経口投与を行った。

3-2-2 実験動物

本研究において ICR マウス (charles river laboratories Japan, Yokohama, Kanagawa, Japan)、♂、8 週齢、35 - 40 g が用いられた。マウスは自由食餌飲水及び 12 / 12h 明暗の元で飼育された。慣熟のためマウスは 1 週間飼育された。マウスの体重は毎日測定された。慣熟後、実験は 9 : 00- 16 : 00 で行われた。実験は筑波大学動物実験取扱規定に従って行われた。

3-2-3 うつ発症抑制効果の評価 (尾部懸垂試験; Tail suspension test; TST)

TST はマウスにおける抗うつ薬のスクリーニングとして最も用いられる。マウスは尾部懸垂試験用ボックス内のフックに尾部で懸垂された。懸垂開始 2 分後、4 分間の無動時間を測定した。経口投与群はうつ発症モデル Control 群 (水経口投与+ TST なし)、Vehicle (ストレス) 群 (水経口投与+ TST あり) 及び RA 群 (RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与 + TST なし) 経口投与群の 4 群 (8 匹 / 1 群) に分け、7 日間毎日経口投与された。TST は経口投与期間中 1 日置き (1、3、5、7 日目) に行われ、経口投与 60 分後に行われた。

3-2-4 脳のタンパク質抽出

TST 後、RA 経口投与によるマウス脳内への効果を評価するため、脳内におけるうつ発症関連因子のタンパク質発現量への影響を検証した。海馬および視床下部を各々100 mg ずつ、冷 PBS 1 ml で 2 回洗浄し、500 μ l RIPA buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1/100 protein inhibitor) を添加し、ホモジナイザー (Kinematica AG, Littau, Luzern, Switzerland) を用いて氷上で緩やかに懸濁し、5 分間氷上で静置した。細胞懸濁液を細胞保存用チューブに移し、15 分間液体窒素の中で静置した。その後、氷上で静置、融解させた (1 ~ 2 h)。融解後、細胞懸濁液をタンパク質低接着チューブに移し、10,000 \times g、20 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離した。沈殿物を残して、上清をタンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液は使用前まで-80 $^{\circ}$ C で保存した。

3-2-5 ウェスタンブロット

抽出したタンパク質抽出液での標的とするタンパク質の発現解析を行うため、先ずタンパク質の定量を行った。タンパク質定量には 2-D Quant kit (GE healthcare, Little Chalfont, Buckingham, UK) を用いた。方法は kit のプロトコールに従った。定量を行ったタンパク質を用いて、SDS-PAGE を行った。さらにタンパク質を泳動させたアクリルアミドゲルから PVDF メンブレン (Millipore, Darmstadt, Deutsch) へと転写を行った。メンブレン上の標的タンパク質の一次抗体 (抗体種類) を反応させた (16h、-4 $^{\circ}$ C)。さらに二次抗体 (抗体種類) を反応させた (45 min、室温)。標的タンパク質の発現解析には OdysseyFc Imaging System (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) を用いた。

3-2-4 統計解析

結果は、平均値±SDで示した。各集団の比較は t 検定を行い、*P<0.05 **P
を有意とみなした。

3-3 結果

3-3-1 RA 経口投与による脳（海馬）での BDNF 発現関連因子の発現への影響

うつ病の発症は神経新生を司る脳由来神経栄養因子（BDNF）の減少による、脳萎縮が原因の一つである。BDNF は MERK1/2 リン酸化を介した、CREB リン酸化によって生じる。しかし、CORT などのストレス因子によって増加した MKP-1 が ERK1/2 を脱リン酸化することで、BDNF の発現が阻害される。

RA 経口投与による、BDNF 発現とその発現に関与する因子への影響を検証するため、RA 経口投与マウスの脳（海馬）における MKP-1 発現、BDNF 発現、及び ERK1/2 と CREB のリン酸化を検証した。脳内において、Vehicle 群では Control 群に比べ、MKP-1 の発現は有意に増加した。RA 経口投与は MKP-1 の発現増加を抑制した（図 3-3）。脳における ERK1/2 のリン酸化は全く検知されなかった。Control 群と比して、Vehicle 群および RA 経口投与群の脳内では共に CREB リン酸化を増加させた（図 3-4）。Vehicle 群の脳内では Control 群と比べて、有意に BDNF 発現を減少させた。一方で RA 経口投与は BDNF 発現減少を抑制した（図 3-5）。

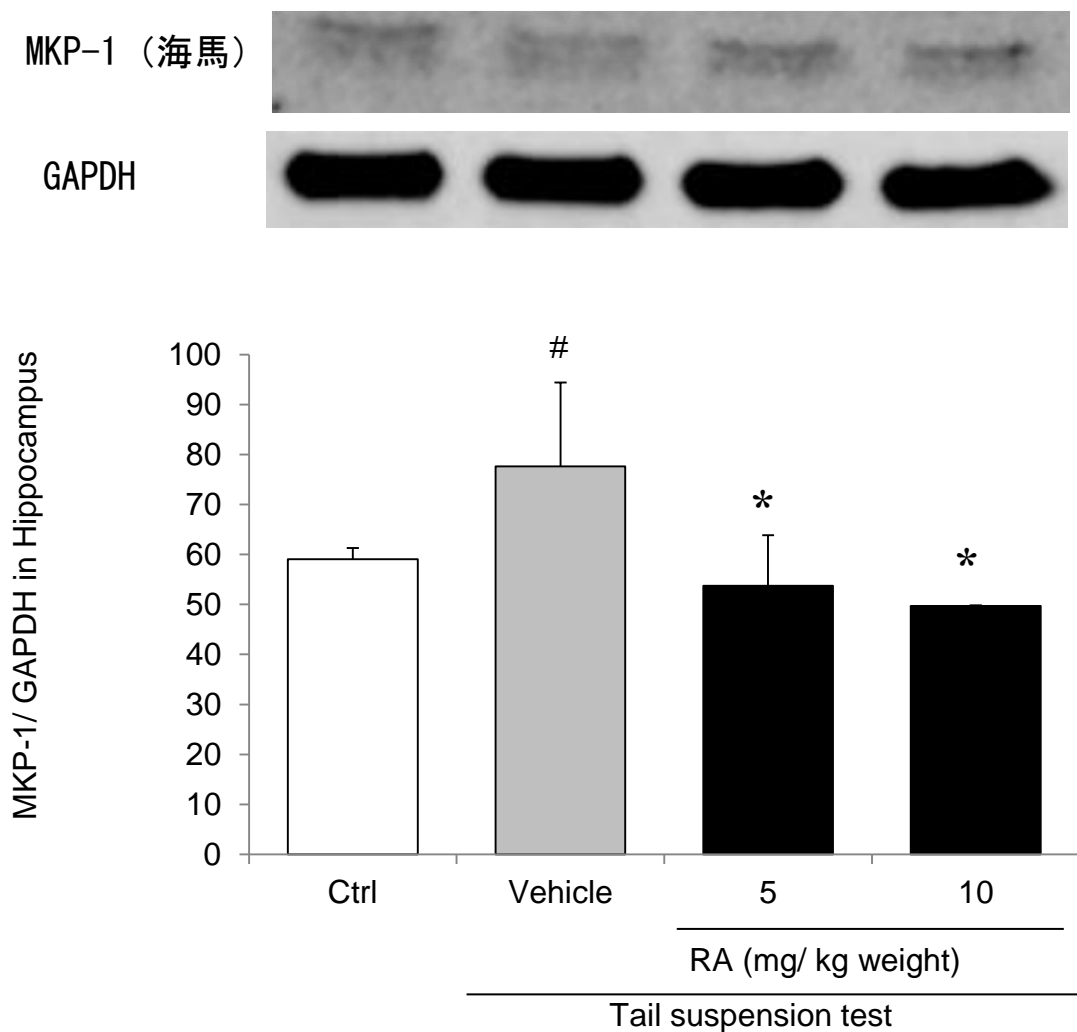


図 3-3 TST 後、RA 経口投与マウス脳(海馬)における MKP-1 発現

縦軸：海馬の GR 発現 (% of Control)、横軸：経口投与群；Control 群（水経口投与、TST なし）、Vehicle 群（水経口投与、TST あり）、RA 経口投与群（RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与、TST あり）。TST 後、マウスから脳（海馬）を採取し、タンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した海馬タンパク質の MKP-1 の発現を検証した（# $P < 0.05$ vs Control, * $P < 0.05$ vs Vehicle）。

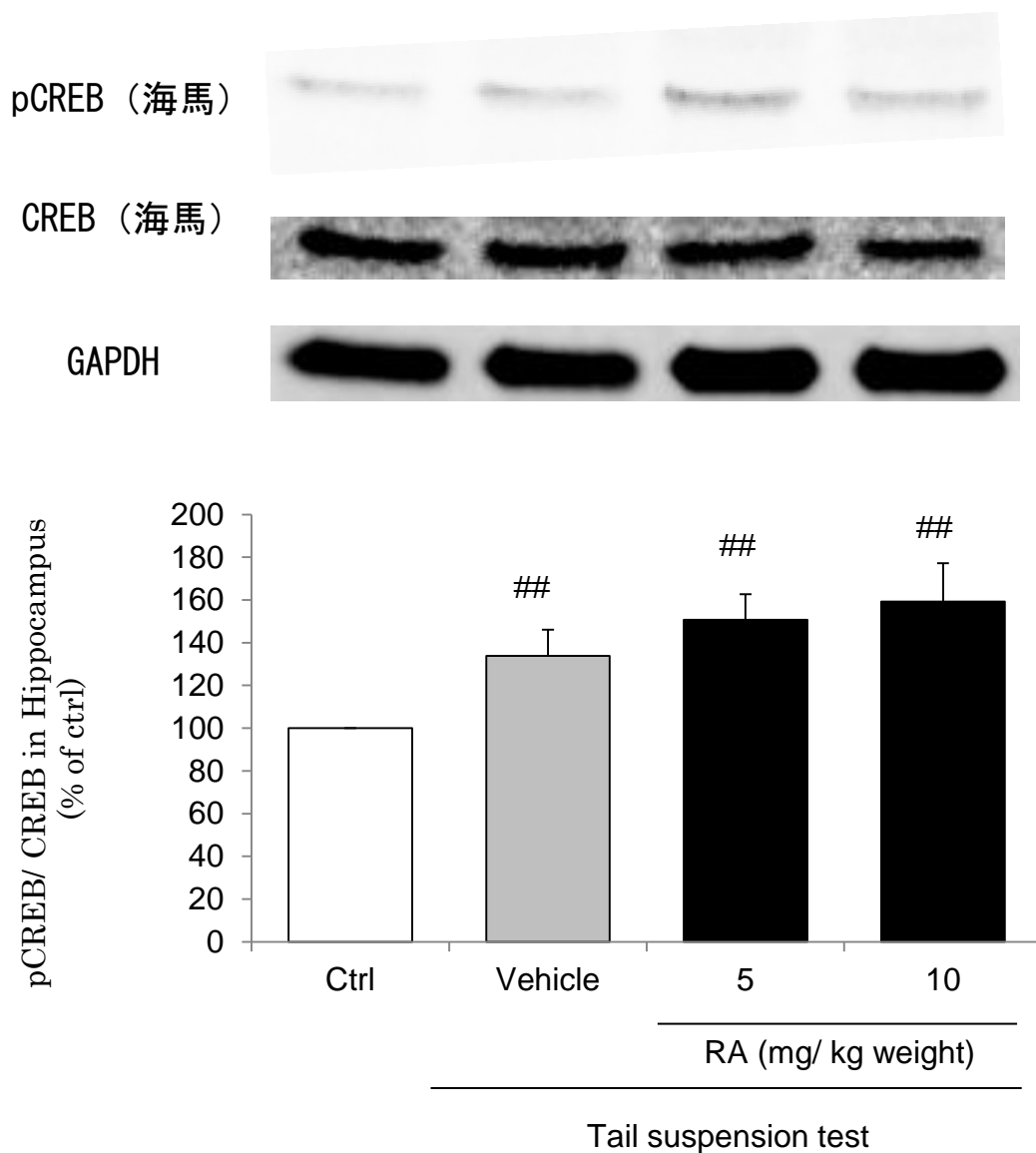


図 3-4 TST 後、RA 経口投与マウス脳(海馬)における CREB リン酸化
 縦軸：海馬の CREB リン酸化 (% of Control)、横軸：経口投与群；Control 群
 (水経口投与、TST なし)、Vehicle 群 (水経口投与、TST あり)、RA 経口投与
 群 (RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与、TST あり)。TST 後、マウスから脳
 (海馬) を採取し、タンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽
 出した海馬タンパク質の CREB リン酸化を検証した (##P < 0.01 vs Control)。

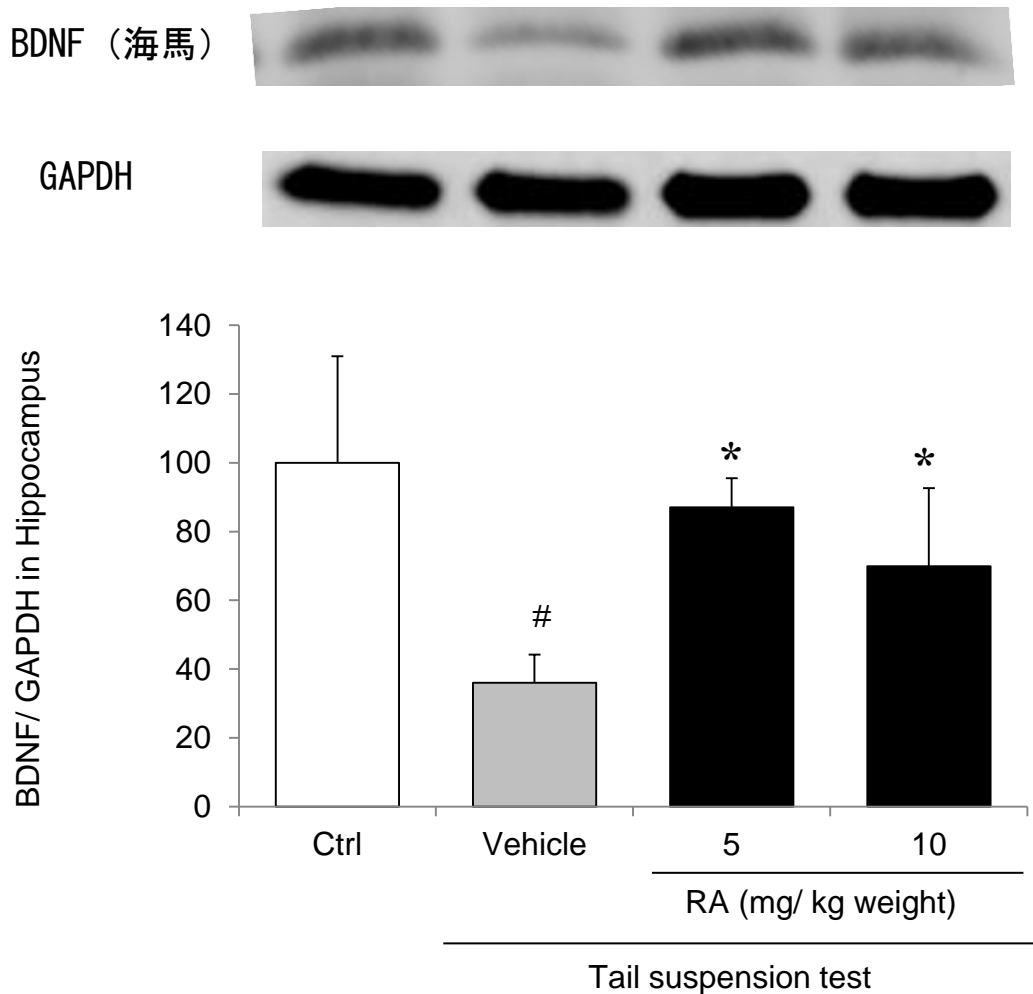


図 3-5 TST 後、RA 経口投与マウス脳(海馬)における BDNF 発現

縦軸：海馬の BDNF 発現 (% of Control)、横軸：経口投与群；Control 群（水経口投与、TST なし）、Vehicle 群（水経口投与、TST あり）、RA 経口投与群（RA 5 mg/kg または 10 mg/kg 経口投与、TST あり）。TST 後、マウスから脳（海馬）を採取し、タンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した海馬タンパク質の BDNF 発現を検証した (**P < 0.01 vs Control, *P < 0.05 vs Vehicle)。

3-4 考察

マウス脳内の MKP-1 発現に関し、TST によるストレス (Vehicle 群) で MKP-1 発現が増加し、ERK1/2 と CREB の脱リン酸化を介して、BDNF 発現が減少したものと考えられる。しかし、Vehicle 群での CREB のリン酸化は、Control 群に比べて有意に増加した。これは CREB のリン酸化は ERK1/2 リン酸のみで調節されているのではなく、他経路によっても調節され得るからというのが理由であると考えられる。CREB のリン酸化は Act のリン酸化によっても調節される。ストレスによっては Act のリン酸化を調節した結果、CREB リン酸化に影響を与える可能性も考えられる。RA 経口投与による BDNF 発現の増加は MKP-1 発現の抑制によってなされたと考えられる。さらに、マウス脳内における ERK1/2 のリン酸化の検証を行った。しかし脳内の総 ERK1/2 発現は検出されたが、リン酸化 ERK1/2 は検出されなかった。原因として以下のことが考えられる。① RA 経口後、速やかに脳を採取しなかったため (実際は一夜経過してから採取)。②脳採取直後に液体窒素で凍結させたため (タンパク質抽出時の液体窒素への投入と加えると計 2 回液体窒素に投入したことになる)。以上が原因でリン酸化 ERK1/2 が検出されなかったと考えられる。4 章での細胞を用いた実験で、リン酸化 ERK1/2 の検出を行った。

三章諸言の通り、GR と CORT が MKP-1 の発現に関与する可能性が示唆されていることから、HPA 軸の調節と MKP-1 発現の調節の間には密接な関連性があると考えられる。RA 経口投与による BDNF 発現増加は以下のようなメカニズムが予想される。二章の内容を含め、RA 経口投与が脳内の GR 発現増加させたことから、HPA 軸の負のフィードバックの機能不全が抑制された。これは RA 経口投与によ

る、脳内の CRH 発現減少と血中への CORT 分泌減少によっても示唆される。この CORT 分泌の減少が GR との二量体の形成を阻害する（転写因子の減少）。転写因子の減少が MKP-1 発現の減少を招き、続いて ERK1/2 と CREB のリン酸化促進による BDNF 発現の増加を惹起したものと考えられる。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がうつ行動の抑制に関与することが予想される。

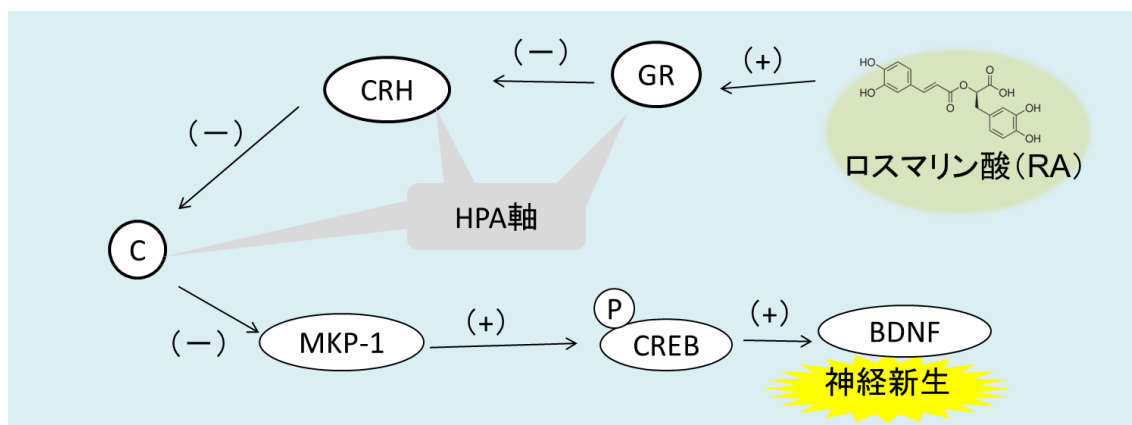


図 3-6 RA による HPA 軸調節を介した BDNF 発現

第4章 RA 処理分化神経細胞を用いた抗うつ作用の 分子メカニズムの解析

4-1 諸言

RA 経口投与によりが脳に到達し、第三章のように BDNF 発現に影響を与えるかを確認するため分化神経細胞モデルを用いて検証を行った。脳へと到達する成分は血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) と呼ばれる障壁によって選別される。BBB はアストロサイトと内皮細胞で構成される障壁が脳内毛細血管を囲む構造である。BBB は毒素や病原菌が脳へ到達するのを防ぐために存在するものと考えられている。基本的に MW=500 以上の分子は BBB を通過できず、脂溶性物質は BBB を通過しやすい。しかし、BBB は有用な成分を選択的に脳へ供給している。栄養源となる糖やタンパク質、神経伝達物質などは各々に特異的なトランスポーターを介して、BBB を通過する。ポリフェノールなどの BBB 通過のメカニズムは未だ明らかにされていないが、ルテオリンなど一部ポリフェノールの BBB 通過が確認されている。本研究で注目された RA は脂溶性物質であるため、通過する可能性が示唆される。

RA は経口投与によって様々な器官 (小腸や肝臓) による代謝により分解する可能性も示唆される。RA はカフェ酸誘導体と呼ばれ、代謝により一部がカフェ酸に分解するので、第三章での RA の抗うつ薬様作用はカフェ酸による影響である可能性もある。従って、本章では RA が実際、脳神経細胞でのうつ関連因子の発現に影響があるか検証を行った。

また第三章で記述した通りに、RA が MKP-1 発現抑制を介して BDNF 発現を増加

させたかどうかを確認するため、MKP-1 をノックダウンさせた分化神経細胞モデルを用いて検証した。

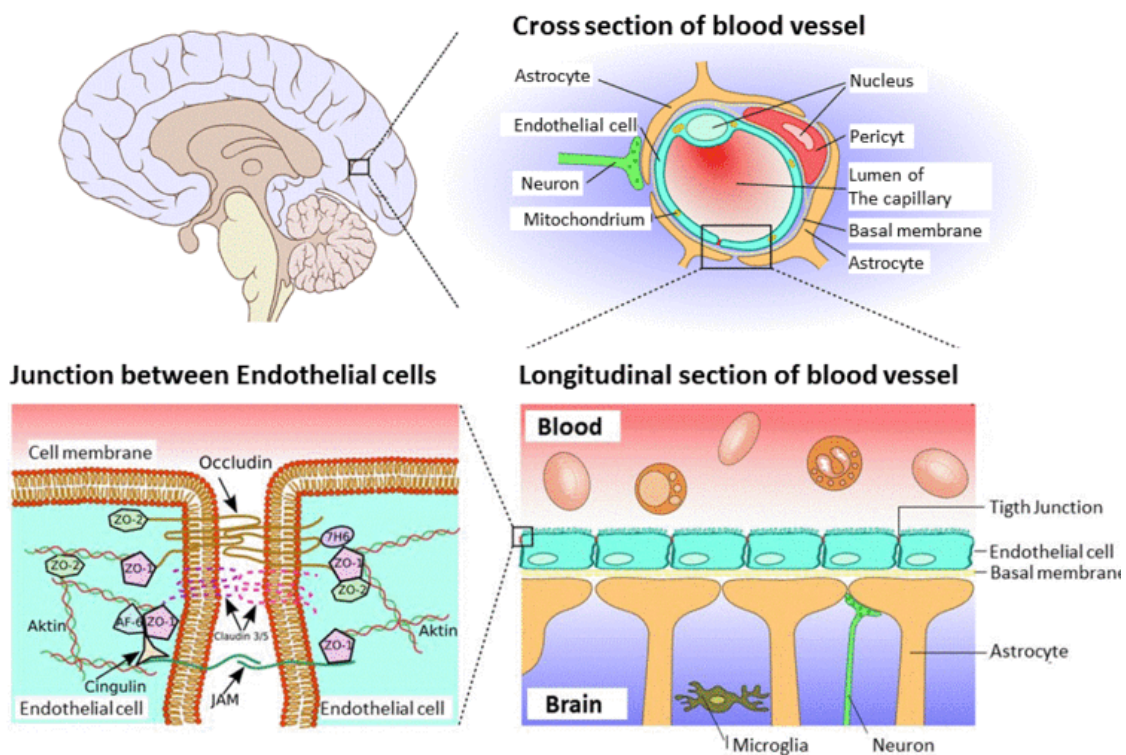


図 4-2 血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB)

(B. Lacwin., *Genetic Literacy Project*, 2016)

4-2 実験方法

4-2-1 サンプル

本研究で PC12 細胞を用いた実験に使用されたサンプルは、RA (MP biomedical, Santa Ana, CA, USA) である。また PC12 細胞に与えるストレスとしてコルチコステロン(corticosterone, CORT)が使用された。PC12 細胞への処理のため、RA 及び CORT は Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。終濃度として RA は 5、15、25 μM に、コルチコステロンは 200 μM に培地で濃度調整した。

4-2-2 PC12 細胞の培養

本研究ではラット副腎髄質褐色腫細胞である PC12 細胞 (Riken, Tsukuba, Japan) を用いた。

増殖培地は Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, Japan) に 10% ウマ血清 (Horse serum: HS) (Gibco Invitrogen, Japan)、5% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum) (Bio West, USA) 及び 1% ペニシリンストレプトマイシン (Lonza, Japan) を加え、使用した。

液体窒素中に保存されている PC12 細胞 (1.5 ml DMSO 入り細胞懸濁液) を 37 °C 恒温槽にて溶解した。8.5 ml 増殖培地を穏やかに添加して懸濁後 (Total 10 ml)、遠心 (1,000 rpm、3 分) により細胞を沈殿させた。沈殿した細胞を残して培地を除いて、新たな増殖培地で懸濁後、培養を開始した。細胞の凍結保存は 75 cm² フラスコ (BD Falcon, Japan) に 80% コンフルエントの状態 で 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Wako, Japan) 増殖培地に細胞を懸濁後、1.5 ml/vial にて保存した。その際、細胞は BICELL (Nihon Freezer, Japan) を用いて -1 °C/min にて細胞温度を低下させ、-80 °C まで冷却後、液体窒素に保存した。

継代培養は細胞が 80% コンフルエントの状態で行った。新しい培養培地を交換し、フラスコから細胞を剥離した。培養培地を用いて細胞溶液を懸濁させた後、遠心 (1,000 rpm、3 分) により細胞を沈殿させ、上清を除去した。培養培地を添加し、懸濁した細胞溶液を再度フラスコに播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。後に、80% コンフルエントになる毎に継代培養を行った。

4-2-3 PC12細胞へのサンプル処理

10cm²ディッシュに細胞数が 2×10^6 /dishとなるよう播種した。インキュベーター (37 °C、5% CO₂) で24 h 培養した後、100 nM 神経成長因子 (NGF) を処理して、24 h 分化培養させてからサンプル処理を行った。まず、新しいNGF入り培地に交換し、各々の濃度のRA (5、15、25 μM) で処理した。インキュベーター (37 °C、5% CO₂) で10分反応させた後、200 μM コルチコステロンを処理した。さらにインキュベーター (37 °C、5% CO₂) で2 h 培養させた。

4-2-4 細胞のタンパク質抽出

RA 処理細胞のタンパク質発現を検証するため、細胞からタンパク質の抽出を行った。

細胞を冷 PBS 10 ml /Dish で 2 回洗浄し、250 μl RIPA buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1/100 protein inhibitor) を添加し、5 分氷上で静置した。スクレイパーで細胞をかきとり、採集した細胞懸濁液を細胞保存用チューブに移し、15 分間液体窒素の中で静置した。その後、氷上で静置、融解させた (1 ~ 2 h)。融解後、細胞懸濁液をタンパク質低接着チューブに移し、10,000 ×g、20 分間、4 °Cで遠心分離した。沈殿物を除いた上清をタンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液は使用前まで-80°Cで保存した。

4-2-5 ウェスタンブロット

抽出したタンパク質抽出液での標的とするタンパク質の発現解析を行うため、先ずタンパク質の定量を行った。タンパク質定量には 2-D Quant kit (GE healthcare, Little Chalfont, Buckingham, UK) を用いた。方法は kit のプロトコールに従った。定量を行ったタンパク質を用いて、SDS-PAGE を行った。さらにタンパク質を泳動させたアクリルアミドゲルから PVDF メンブレン () へと転写を行った。メンブレン上の標的タンパク質の一次抗体 (抗体種類) を反応させた (16h、 -4°C)。さらに二次抗体 (抗体種類) を反応させた (45 min、室温)。標的タンパク質の発現解析には OdysseyFc Imaging System (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) を用いた。

4-2-6 統計解析

結果は、平均値 \pm SD で示した。各集団の比較は t 検定を行い、# $P<0.05$ 、## $P<0.01$ (vs Control) 及び* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ (vs Model) を有意とみなした。

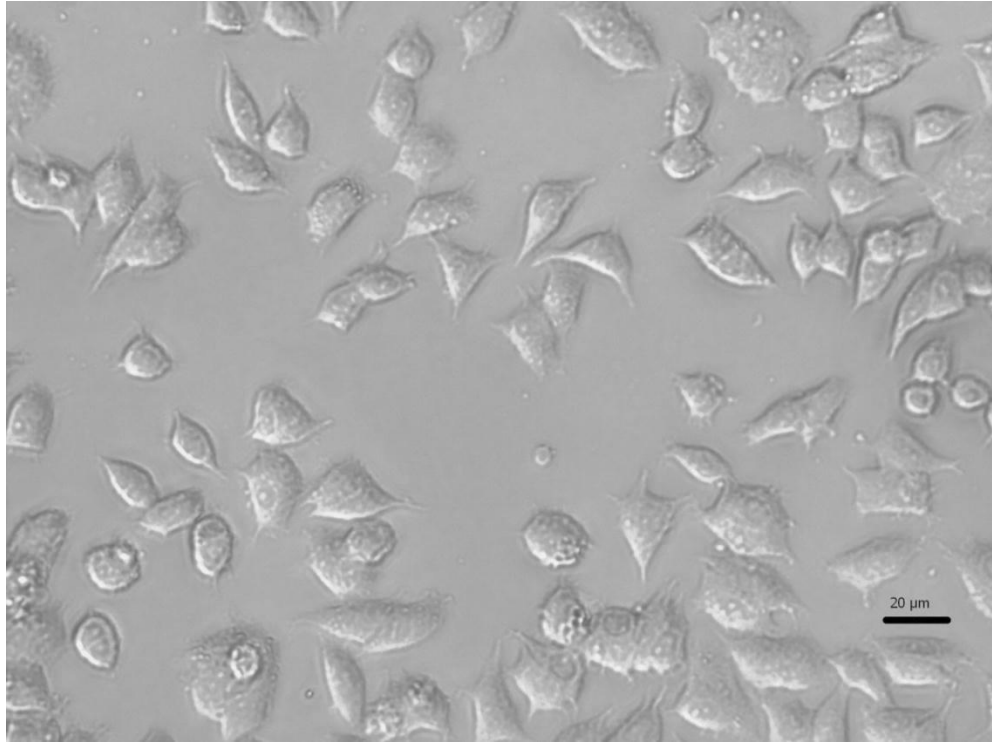


图 4-3 PC12 細胞（分化前）

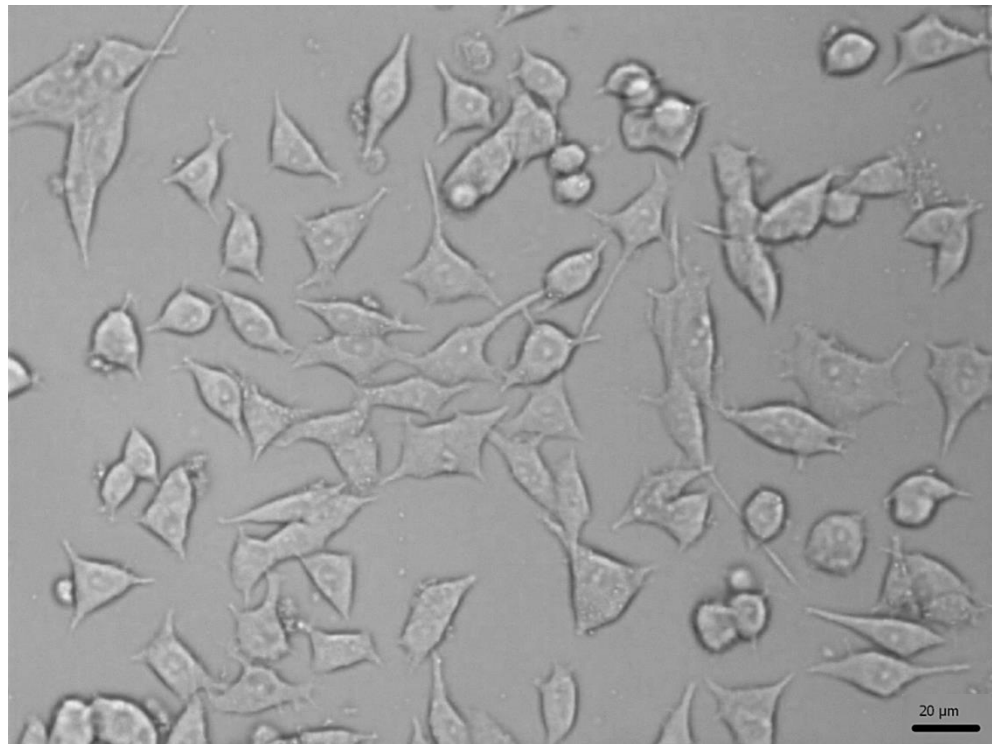


图 4-4 PC12 細胞（分化後）

4-3 結果

4-3-1 分化 PC12 細胞における RA 処理のうつ発症関連因子への影響

うつの発症は神経新生を司る脳由来神経栄養因子 (BDNF) の減少による、脳委縮が原因の一つである。BDNF は MERK1/2 リン酸化を介した、CREB リン酸化によって生じる。しかし、CORT などのストレス因子によって増加した MKP-1 が ERK1/2 を脱リン酸化することで、BDNF の発現が阻害される。分化 PC12 細胞を用いて、分化神経細胞における RA 処理のうつ発症関連因子への影響を検証するため、分化 PC12 細胞における MKP-1 発現、BDNF 発現、及び ERK1/2 と CREB のリン酸化を検証した。分化 PC12 細胞において、Vehicle 群では Control 群に比べ、MKP-1 の発現に有意に変化が見られなかった。5 μM RA 処理では MKP-1 の発現に変化が見られなかったが、15 μM 、25 μM RA 処理では MKP-1 発現は有意に減少された (図 4-2)。分化 PC12 細胞において、Vehicle 群では Control 群に比べ、ERK1/2 のリン酸化は有意に減少した。RA 処理群では、Vehicle 群と比して、ERK1/2 のリン酸化が増加した (図 4-3)。分化 PC12 細胞において、Vehicle 群では Control 群に比べ、CREB のリン酸化は有意に減少した。RA 処理群では、Vehicle 群と比して、CREB のリン酸化に有意な変化が見られなかった。しかし、RA 処理による CREB のリン酸化の増加傾向が見られた (図 4-4)。Vehicle 群の分化処理 PC12 細胞では Control 群と比べて、有意に BDNF 発現を減少させた。一方で 5 μM RA 処理群は BDNF 発現減少を抑制した。15、25 μM RA 処理群では有意な変化は見られなかったが、増加傾向がみられた (図 4-5)。

4-3-2 MKP-1 ノックダウン分化 PC12 細胞における RA 処理の BDNF 発現への影響

RA が実際どのように MKP-1 を介して、BDNF の発現に影響を与えたのかを検証する一端として、MKP-1 をノックダウンした細胞を用いて、BDNF 発現の検証を行った。先ずリポフェクタミンと MKP-1 siRNA を用いて MKP-1 をノックダウンし、MKP-1 発現が減少されたことを確認した (図 4-6)。また同様の条件で、MKP-1 をノックダウンした細胞に RA を処理したところ、BDNF 発現が減少された (図 4-7)。

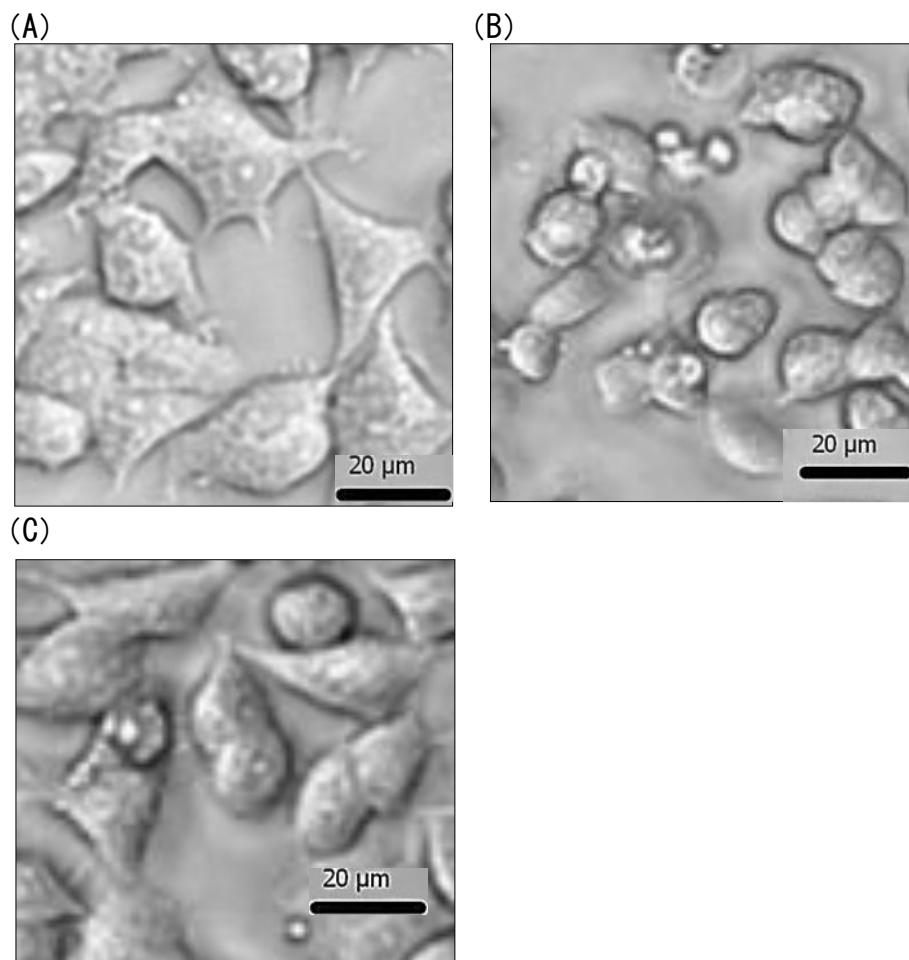


図 4-5 コルチコステロン下における RA 処理 PC12 細胞

Control (無処理) (A)、コルチコステロン (CORT) 処理 (B)、15 μ M RA 処理 +
CORT 処理 (C)

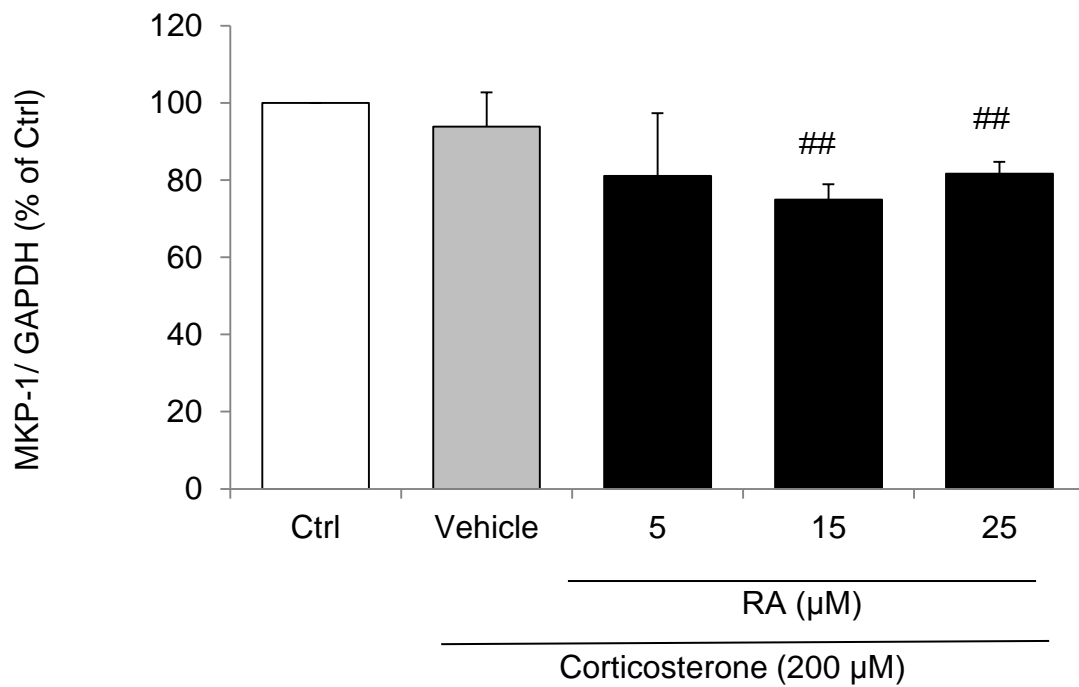
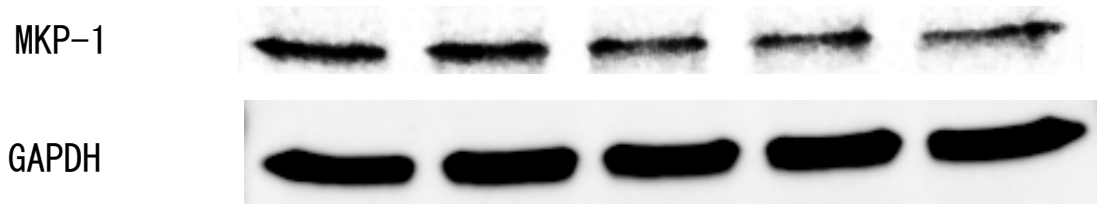


図 4-6 RA 処理分化 PC12 細胞における MKP-1 発現

縦軸：分化 PC12 細胞の BDNF 発現 (% of Control)、横軸：処理群；Control 群（無処理、CORT 処理なし）、Vehicle 群（無処理、CORT 処理あり）、RA 処理群（15 μM または 25 μM RA 処理、CORT 処理あり）。処理後、PC12 細胞からタンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した PC12 細胞のタンパク質の MKP-1 発現を検証した (###P < 0.01 vs Control)。

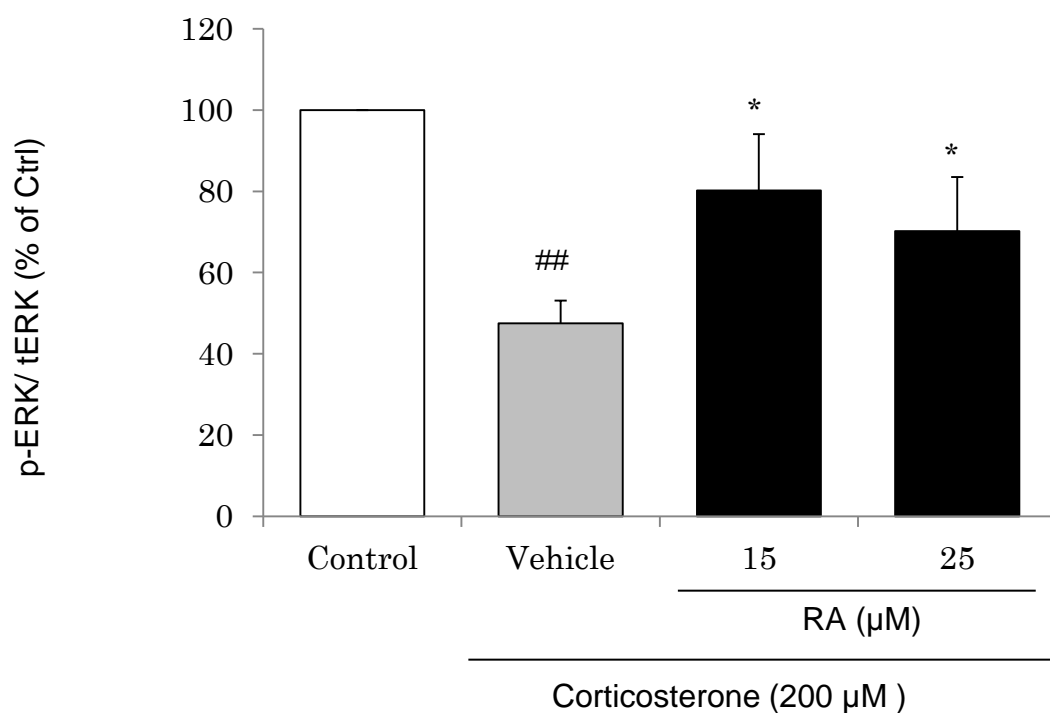
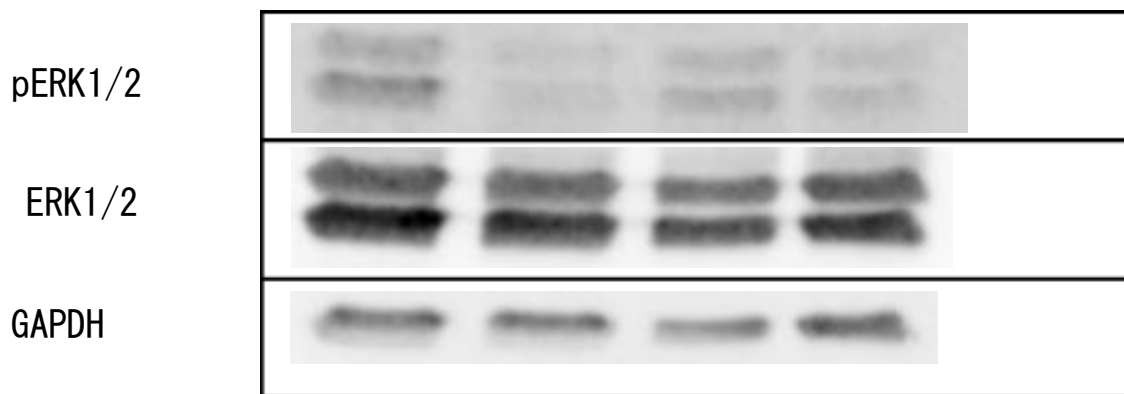


図 4-7 RA 処理分化 PC12 細胞における ERK1/2 リン酸化

縦軸：分化 PC12 細胞の ERK1/2 リン酸化 (% of Control)、横軸：処理群；Control 群（無処理、CORT 処理なし）、Vehicle 群（無処理、CORT 処理あり）、RA 処理群（15 μM または 25 μM RA 処理、CORT 処理あり）。処理後、PC12 細胞からタンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した PC12 細胞のタンパク質の ERK1/2 リン酸化を検証した (**P < 0.01 vs Control, *P < 0.05 vs Vehicle)。

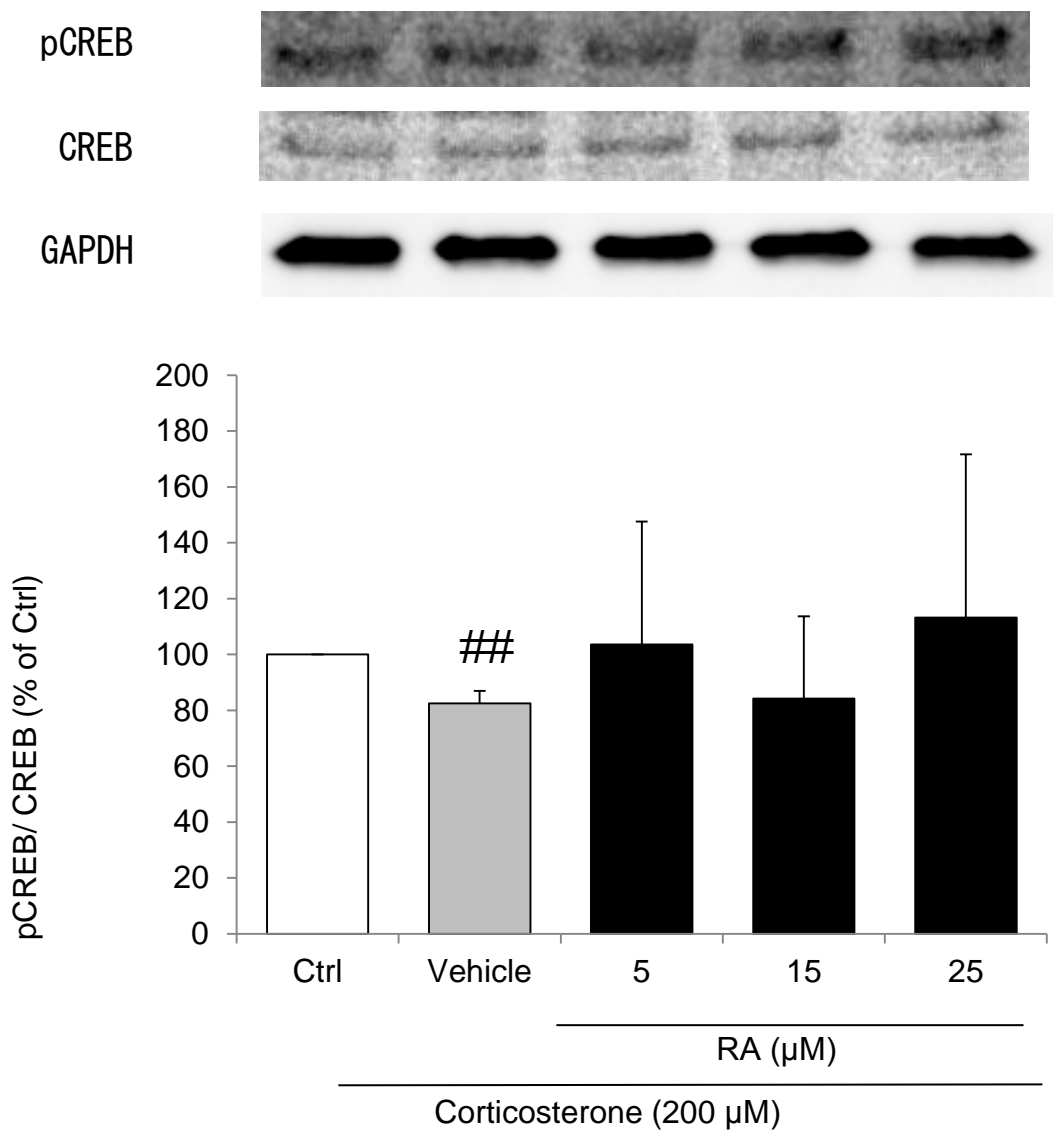


図 4-7 RA 処理分化 PC12 細胞における CREB リン酸化

縦軸：分化 PC12 細胞の CREB リン酸化 (% of Control)、横軸：処理群；Control 群（無処理、CORT 処理なし）、Vehicle 群（無処理、CORT 処理あり）、RA 処理群（5 μM、15 μM または 25 μM RA 処理、CORT 処理あり）。処理後、PC12 細胞からタンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した PC12 細胞のタンパク質の CREB リン酸化を検証した (**P < 0.01 vs Control)。

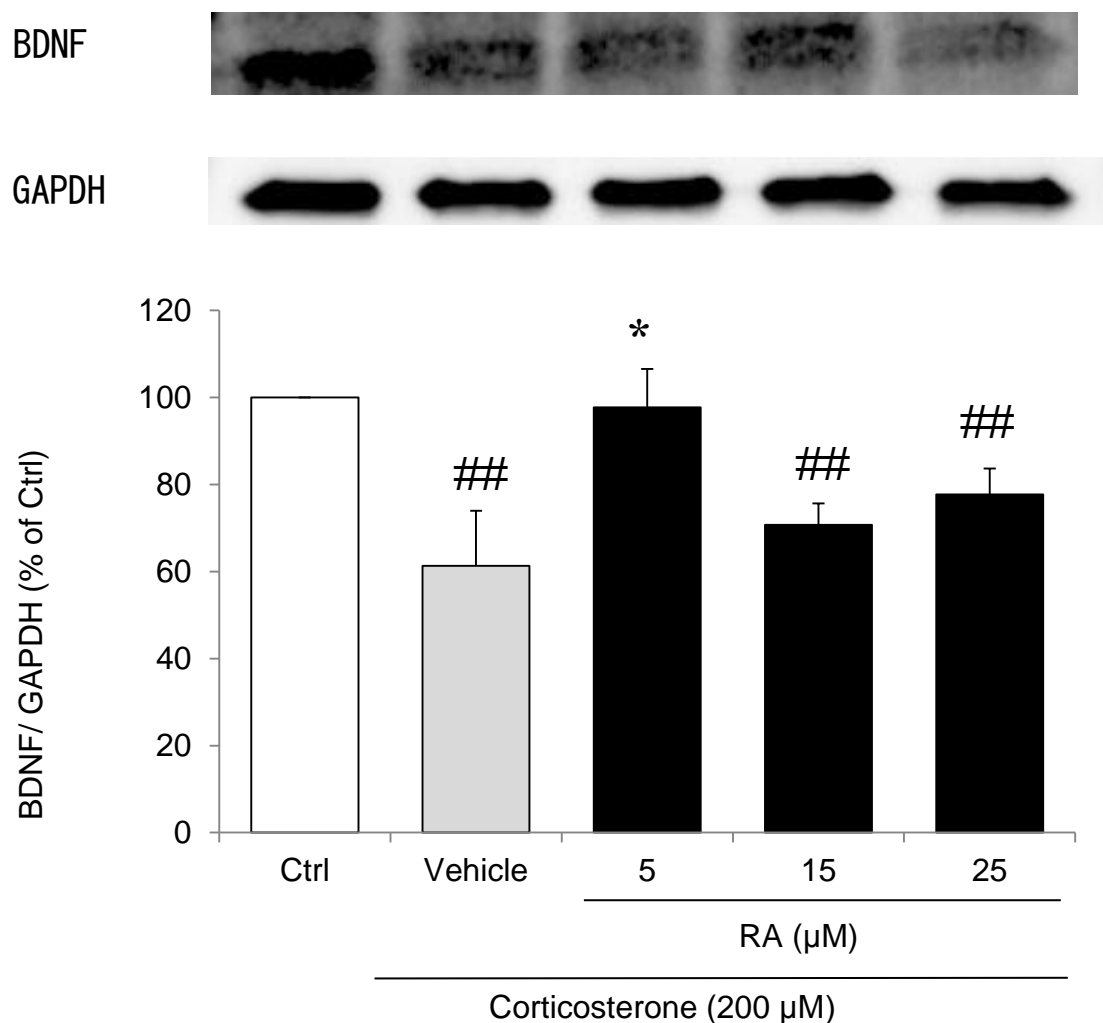


図 4-8 RA 処理分化 PC12 細胞における BDNF 発現

縦軸：分化 PC12 細胞の BDNF 発現 (% of Control)、横軸：処理群；Control 群（無処理、CORT 処理なし）、Vehicle 群（無処理、CORT 処理あり）、RA 処理群（5 μM、15 μM または 25 μM RA 処理、CORT 処理あり）。処理後、PC12 細胞からタンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した PC12 細胞のタンパク質の BDNF 発現を検証した（##P < 0.01 vs Control, *P < 0.05 vs Vehicle）。

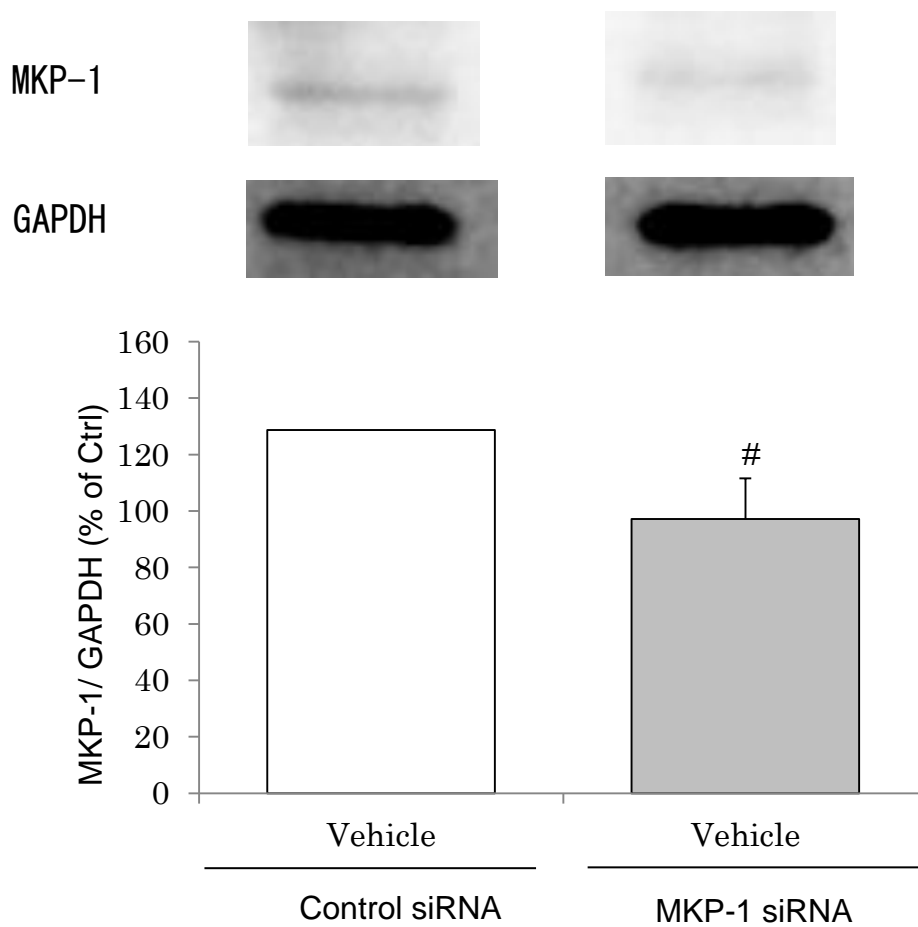


図 4-9 MKP-1 ノックダウン分化 PC12 細胞における MKP-1 発現

縦軸：分化 PC12 細胞の MKP-1 発現 (% of Control)、横軸：処理群；Control 群 (Control siRNA 処理、CORT 処理あり)、MKP-1 ノックダウン群 (MKP-1 siRNA 処理、CORT 処理あり)。処理後、PC12 細胞からタンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した PC12 細胞のタンパク質の MKP-1 発現を検証した (#P < 0.05 vs Control)。

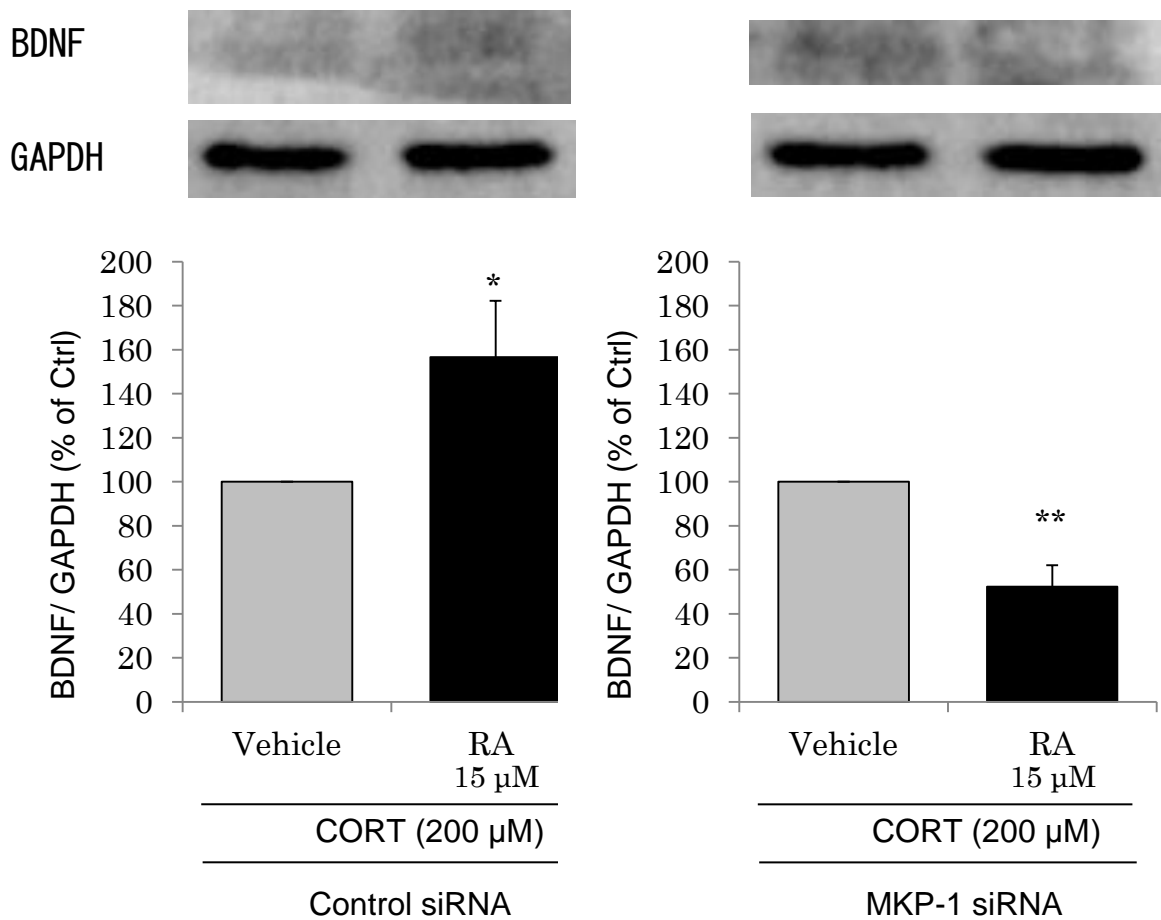


図 4-10 MKP-1 ノックダウン分化 PC12 細胞における BDNF 発現

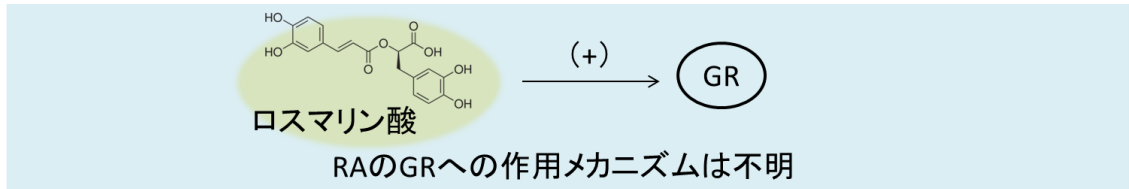
縦軸：分化 PC12 細胞の BDNF 発現 (% of Control)、横軸：処理群；Control 群（Control siRNA 処理、CORT 処理あり）、MKP-1 ノックダウン群（MKP-1 siRNA 処理、CORT 処理あり）。処理後、PC12 細胞からタンパク質抽出を行った。ウェスタンブロットを用いて抽出した PC12 細胞のタンパク質の BDNF 発現を検証した (*P < 0.05 vs Vehicle, **P < 0.01 vs Vehicle)。

4-4 考察

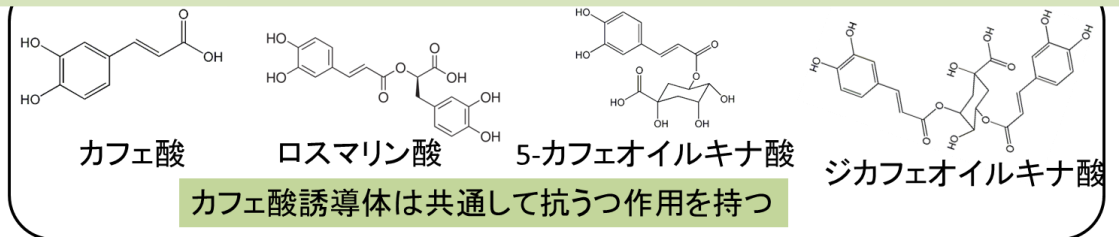
本章では、分化神経細胞モデルである NGF 処理 PC12 細胞を用いて、RA のうつ関連因子の発現検証を行った。RA 処理は細胞での MKP-1 発現において減少した。これが ERK1/2 リン酸化を促進させ、CREB でもリン酸化促進の増加傾向がみられた。これらによって RA は BDNF 発現を増加したものと考えられる。以上により RA は生体内で代謝され、カフェ酸としてではなく RA 単体でも効果を持つ事が示唆された。今後の研究として、RA 経口投与したマウスの脳内の RA が検出されれば、RA は BBB を通過することにより効果を発揮する証明の一端となる。

また RA を含むカフェ酸誘導体には、カフェ酸、5-カフェオイルキナ酸及びジカフェオイルキナ酸などがある。これらのカフェ酸誘導体には共通して抗うつ作用が見出されているので、カフェ酸誘導体の共通した構造が作用する可能性が見出された。その可能性の一つとして、RA を含むカフェ酸誘導体は GR アンタゴニストとして機能するかもしれない。RA が GR アンタゴニストとして機能するならば、CORT と GR の複合体の形成を阻害することにより、MKP-1 発現減少を介して BDNF 発現を増加させることが期待される。

MKP-1 をノックダウンした分化神経細胞に RA を処理したところ、RA 処理は逆に BDNF 発現が減少した。これは BDNF 発現には MKP-1 が必須であることが示唆される。神経突起の伸長に MKP-1 が必須であることが報告されていることから、MKP-1 は神経細胞の維持に関与する可能性が示唆される。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。これらの事より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考えられる。



カフェ酸誘導体：野菜、果物、コーヒー、ワインなど幅広く含まれるフェノール化合物



カフェ酸構造及びそのロスマリン酸の構造によるGRアンタゴニストとしての可能性

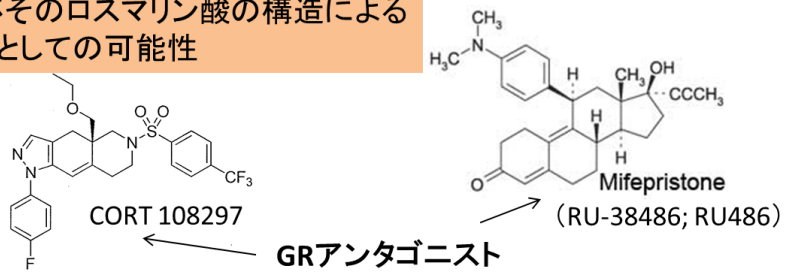


図 4-11 RA の GR アンタゴニストとしての可能性

第5章 総括

第2章では、マウス行動においてRAによるうつ行動抑制作用を検証するために、うつ行動評価試験である尾部懸垂試験（TST）を用いた。これはうつ発症の証明と新規抗うつ薬の効果を評価するために広く用いられる (Murakami *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2012)。マウスを尾部で懸垂させ、その無動時間が測定する。無動時間の延長はうつ行動を示すとされ、逆に抗うつ薬投与による無動時間の短縮はうつ行動抑制を示すとされる。また尾部懸垂試験の無動時間はヒトのうつ行動にも反映されると考えられている (Park *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2003)。この試験の特性から尾部懸垂試験は抗うつ薬のスクリーニングとして広く用いられている。加えて、尾部懸垂試験では植物由来成分などの抗うつ薬様効果を持つ天然由来成分を投与することによって無動時間が短縮し、うつ行動が抑制されたことが報告されている (Pan *et al.*, 2012)。

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。一方RA経口投与マウスはVehicle群に比べ、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、うつ行動を抑制されたことが示唆される。この効果は、先行研究でのRA経口投与によるマウス脳内での神経伝達物質レベルの増加と神経新生に關与するBDNFの発現増加が關与していると考えられる。TST後、Vehicle群のマウス血中のコルチコステロン（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経口投与されたマウスの血中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HPA軸に作

用することが見出された。副腎から CORT が過分泌されると、副腎は肥大化する。実際、Vehicle 群の副腎重量は Control 群に比べて高かった。一方、RA 経口投与マウスの副腎重量は Vehicle 群に比べて低かった。これは RA 経口投与が CORT 分泌を抑制することにより、副腎の肥大化を抑制したことを意味する。TST 後、脳内の HPA 調節因子の発現を確認した。Vehicle 群の海馬及び視床下部でのグルココルチコイド受容体 (GR) の発現は、Control 群に比べて有意に減少した。これは GR 発現の減少に伴い、CORT 分泌の調節に障害が生じていることを示唆する。一方で RA 経口投与は Vehicle 群に比べて、GR 発現量を増加させた。これは HPA 軸における、CORT 分泌調節の機能不全を RA 経口投与が抑制したことを示す。さらに GR によって調節される CRH 発現において、Vehicle 群では Control 群に比べて CRH 発現量が有意に増加した。これは GR 発現量の減少により、負のフィードバックに不調が起こり、CRH 発現が増加しているためである。一方で RA 経口投与は Vehicle 群に比べて、CRH 発現量は減少した。これは GR 発現の減少を RA 経口投与が抑制したことにより、CRH 発現が調節されたためと考えられる。さらに我々は、脳下垂体における ACTH 発現への RA の影響を検証するため、脳下垂体の採取を試みたが、トルク鞍に囲まれており、また非常に微小な組織であったために採取を断念した。マウスの脳下垂体よりも大きなラットの脳下垂体を用いた検証を推奨する。以上の結果により、RA 経口投与は HPA 軸を介して、CORT の増加を抑制したものと考えられる。

第 3 章ではマウス脳内の MKP-1 発現に関し、TST によるストレス (Vehicle 群) で MKP-1 発現が増加し、ERK1/2 と CREB の脱リン酸化を介して、BDNF 発現が減少したものと考えられる。しかし、Vehicle 群での CREB のリン酸化は、Control 群に比べて有意に増加した。これは CREB のリン酸化は ERK1/2 リン酸のみで調節されているのではなく、他経路によっても調節され得るからというのが理由

であると考えられる。CREBのリン酸化はActのリン酸化によっても調節される。ストレスによってはActのリン酸化を調節した結果、CREBリン酸化に影響を与える可能性も考えられる。

経口投与によるBDNF発現の増加はMKP-1発現の抑制によってなされたと考えられる。さらに、マウス脳内におけるERK1/2のリン酸化の検証を行った。しかし脳内の総ERK1/2発現は検出されたが、リン酸化ERK1/2は検出されなかった。原因として以下のことが考えられる。① RA経口後、速やかに脳を採取しなかったため（実際は一夜経過してから採取）。②脳採取直後に液体窒素で凍結させたため（タンパク質抽出時の液体窒素への投入と加えると計2回液体窒素に投入したことになる）。以上が原因でリン酸化ERK1/2が検出されなかったと考えられる。4章での細胞を用いた実験で、リン酸化ERK1/2の検出を行った。

第3章諸言の通り、GRとCORTがMKP-1の発現に関与する可能性が示唆されていることから、HPA軸の調節とMKP-1発現の調節の間には密接な関連性があると考えられる。RA経口投与によるBDNF発現増加は以下のようなメカニズムが予想される。二章の内容を含め、RA経口投与が脳内のGR発現増加させたことから、HPA軸の負のフィードバックの機能不全が抑制された。これはRA経口投与による、脳内のGRH発現減少と血中へのCORT分泌減少によっても示唆される。このCORT分泌の減少がGRとの二量体の形成を阻害する（転写因子の減少）。転写因子の減少がMKP-1発現の減少を招き、続いてERK1/2とCREBのリン酸化促進によるBDNF発現の増加を惹起したものと考えられる。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がうつ行動の抑制に関与することが予想される。

第4章では、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発現において減少し

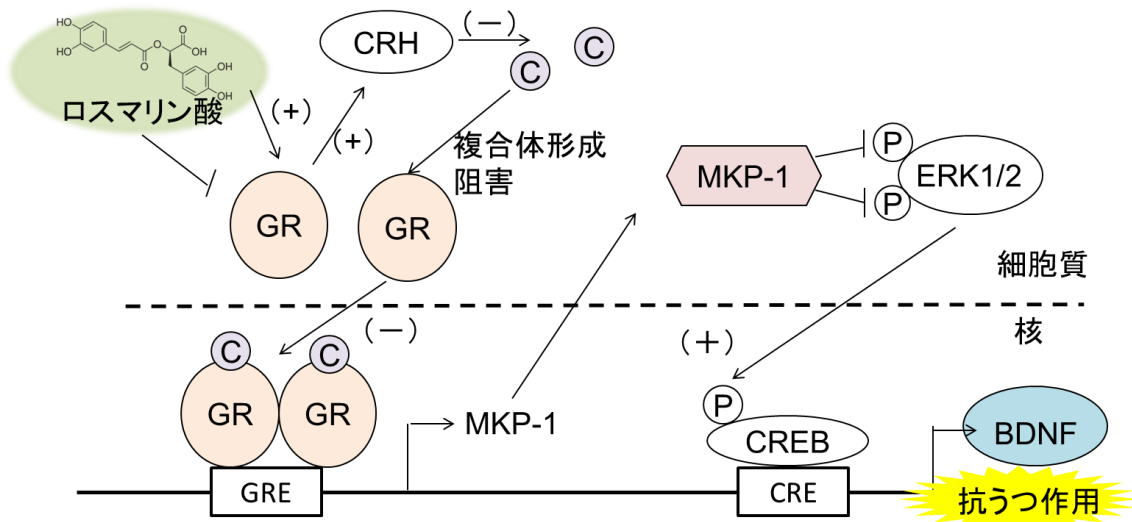
た。これが ERK1/2 リン酸化を促進させ、CREB でもリン酸化促進の増加傾向がみられた。これらによって RA は BDNF 発現を増加したものと考えられる。以上により RA は生体内で代謝され、カフェ酸としてではなく RA 単体でも効果を持つ事が示唆された。今後の研究として、RA 経口投与したマウスの脳内の RA が検出されれば、RA は BBB を通過することにより効果を発揮する証明の一端となる。

また RA を含むカフェ酸誘導体には、カフェ酸、5-カフェオイルキナ酸及びジカフェオイルキナ酸などがある。これらのカフェ酸誘導体には共通して抗うつ作用が見出されているので、カフェ酸誘導体の共通した構造が作用する可能性が見出された。その可能性の一つとして、RA を含むカフェ酸誘導体は GR アンタゴニストとして機能するかもしれない。RA が GR アンタゴニストとして機能するならば、CORT と GR の複合体の形成を阻害することにより、MKP-1 発現減少を介して BDNF 発現を増加させることが期待される。

MKP-1 をノックダウンした分化神経細胞に RA を処理したところ、RA 処理は逆に BDNF 発現が減少した。これは BDNF 発現には MKP-1 が必須であることが示唆される。神経突起の伸長に MKP-1 が必須であることが報告されていることから、MKP-1 は神経細胞の維持に関与する可能性が示唆される。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。これらの事より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考えられる。

以上の In vivo 及び In vitro を用いた検証から、RA を投与すると脳に到達する可能性が高い。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ことが示唆される。このことにより、脳神経細胞死を抑制することでうつを抑制することが期待される。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(図 5-1)。



- ロスマリン酸はHPA軸調節を促進させ、CORT減少によるCORT-GR複合体形成阻害をおこし、MKP-1発現減少させたことでBDNF発現が増加し、抗うつ作用を示したことが考えられる

図 5-1 RA による抗うつ作用のまとめ

参考文献

Abrahamsson T, Nilsson S. Phenylethanolamine-N-methyl Transferase (PNMT) Activity and Catecholamine Content in Chromaffin Tissue and Sympathetic Neurons in the Cod, *Gadus morhua*: *Acta Physiologica* , 96 (1976), 94-99.

Adams M, Gmunder F, Hamburger M: Plants traditionally used in age related brain disorders—a survey of ethnobotanical literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 113 (2007), 363-381.

Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P: Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 3 (1999), 124-130.

Amin A, Hamza AA: Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences*, 77 (2005), 266-278.

Ascher JA, Cole JO, Colin N, Feighner JP, Ferris RM, Hibiger HC, Golden RN, Martin P, Potter WZ, Richelson E: Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity: *Journal of Clinical Psychiatry*, 56(1995), 395-401.

Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is

degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid: *Life Sciences*, 75 (2004), 165-178.

D' Evoli L, Huikko L, Lampi AM, Lucarini M, Lombardi-Boccia G, Nicoli S, Piironen V: Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (2006), 818-823.

Dias PC, Foglio MA, Possenti A, de Carvalho JE: Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 69 (2000), 57-62.

Doolaee EH, Raes K, De Vos F, Verhé R, De Smet S: Absorption, distribution and elimination of carnosic acid, a natural antioxidant from *Rosmarinus officinalis*, in rats: *Plant Foods Human Nutrition*, 66 (2011), 196-202.

Duric V, Banasr M, Licznerski P, Schmidt HD, Stockmeier CA, Simen AA *et al.*: A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior. *Nature Medicine*, 16 (2010), 1328-1332.

El Omri A, Han J, Kawada K, Ben Abdrabbah M, Isoda H: Luteolin enhances cholinergic activities in PC12 cells through ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Brain Research*, 1437 (2012), 16-25.

El Omri A, Han J, Yamada P, Kawada K, Abdrabbah MB, Isoda H: *Rosmarinus officinalis* polyphenols activate cholinergic activities in PC12 cells

through phosphorylation of ERK1/2. *Journal of Ethnopharmacology*, 131 (2010), 451-458.

Greenlund LJ, Deckwerth TL, Johnson EM Jr : Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death, *Neuron*, 14 (1995), 303-315.

Haloui M, Louedec L, Michel JB, Lyoussi B: Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71 (2000), 465-472.

Heinrich M, Kufer J, Leonti M, Pardo-de-Santayana M: Ethnobotany and ethnopharmacology—interdisciplinary—links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology*, 107 (2006), 157-160.

Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE: Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor: *Behavioural Brain Research*, 2 (2006), 280-288.

Kassel O, Sancono A, Krätzschar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC: Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1, *The EMBO Journal*, 20 (2001), 7108-7116

Lin CW, Wu MJ, Liu IY, Su JD, Yen JH: Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7 (2010), 4477-4486.

Lin TY, Yang TT, Lu CW, Wang SJ. Inhibition of glutamate release by bupropion in rat cerebral cortex nerve terminals: *The Neurobiology of Neurodegenerative Disorder: From Basic to Clinical Research Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35 (2011), 598-606.

Liu J, Mori A: Stress, Aging, and Brain Oxidative Damage: *Neurochemical Research* 24(1999), 1479-1497.

Liu R, Gao M, Qiang GF, Zhang TT, Lan X, Ying J *et al.*: The anti-amnesic effect of luteolin against amyloid β_{25-35} peptide induced toxicity in mice involve the protection of the neurovascular unit. *The Journal of Neuroscience*, 162 (2009), 1232-1243.

Machado DG, Bettio LEB, Cunha MP, Capra JC, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, Rosrigues AL: Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33 (2009), 642-650.

Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla AR, Grando J, Brocardo PS, Bettio LE, Dalmarco JB, Rial D, Prediger RD, Pizzolatti MG, Rosrigues AL: *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*; in press.

Mao Q, Huang Z, Ip S, Che C: Antidepressant-like effect of ethanol extract from *Paeonia lactiflora* in mice. *Phytotherapy Research*, 22 (2008), 1496-1499.

McIntosh J, Cortopassi KM, Sapolsky RM: Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid study. *Brain Research* 791 (1998), 215-222.

Moreno S, Scheyer T, Roman CS, Vojnov AA: Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition: *Free Radical Research*, 40 (2006), 223-231.

Murakami K, Sasaki S : Dietary intake and depressive symptoms: a systematic review of observational studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54 (2010), 471-488.

Pan MH, Lai CS, Tsai ML, Wu JC, Ho CT: Molecular mechanisms for anti-aging by natural dietary compounds. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56 (2012), 88-115.

Park SE, Kim S, Sapkota K, Kim SJ: Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30 (2010), 759-767.

Parker KJ, Schatzberg AF, Lyons DM: Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression: *Hormones and Behavior*, 43 (2003), 60-66.

Polunin O, Smythies BE: Flowers of South-west Europe: a field guide. *London Oxford University Press, New York* (1973).

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M: Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants: *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 229 (1977), 327-336.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M: Behavioural despair in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine: *European Journal of Pharmacology*, 51(1978), 291-294.

Sasaki K, El Omri A, Kondo S, Han J, Isoda H: *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation: *Behavioural Brain Research*, 238(2013), 86 -94.

Scheel-Krüger J, Cools AR, Honig W: Muscimol antagonizes the ergometrine-induced locomotor activity in nucleus accumbens: Evidence for a GABA-dopaminergic interaction: *European Journal of Pharmacology*, 42(1977), 311-313.

Seol GH, Shim HS, Kim PJ, Moon HK, Lee KH, Shim I, Suh SH, Min SS: Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 130 (2010), 187-190.

Shank RP, Bennett GS, Freytag SO, Campbell GL: Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools: *Brain Research*, 329(1985), 364-367.

Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinoshita N: Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans: *FEBS Letters*, 438 (1998), 220-224.

Shimojo Y, Kosaka K, Noda Y, Shimizu T, Shirasawa T: Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 88 (2010), 896-904.

Spencer JP: Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes and Nutrition*, 4 (2009), 243-250.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice: *Psychopharmacology*, 85 (1985), 367-370.

Takaki I, Bersani ALE, Vendruscolo A, Sartoretto SM, Diniz SP, Bersani-Amado CA: Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of Medicinal Food*, 11 (2008), 741-746.

Weinshilboum R, Axelrod J: Serum dopamine-beta-Hydroxylase Activity: *Circulation Research*, 28 (1971), 307-315.

Xu Y, Ku BS, Yao HY, Lin YH, Ma X, Zhang YH, Li XJ: The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice: *European Journal of Pharmacology*, 518 (2005), 40-46.

Zafir A, Banu N: Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats: *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 46 (2009). 53-58.

Zhen L, Zhu J, Zhao X, Huang W, An Y, Li S *et al.*: The antidepressant-like effect of fisetin involves the serotonergic and noradrenergic system. *Behavioural Brain Research*, 228 (2011), 359-366.

Zhu WL, Shi HS, Wei YM, Wang SJ, Sun CY, Ding ZB *et al.*: Green tea polyphenols produce antidepressant-like effects in adult mice. *Pharmacological Research*, 65 (2012), 74-80.

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご指導、ご協力をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

筑波大学大学院生命環境科学研究科の磯田博子教授には、本研究の遂行にあたり、研究テーマから本論文の作成に至るまで過分のご指導とご援助を賜りました。深く御礼申し上げます。

本研究の遂行において多大なご協力、ご助力いただきました北アフリカ研究センターの皆様、ならびに磯田研究室の皆様に御礼申し上げます。