



水産廃棄物アコヤガイ貝殻真珠層から作製した真珠層抽出成分の抗不安・抗うつ作用の検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-06-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大町, 知輝 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.15118/0002000345

目次

第1章 序論	5
第2章 LPS 誘発不安・うつモデルマウスに対する真珠層抽出成分の抗不安・抗うつ作用	8
2.1 実験方法	8
2.2 実験結果	27
2.3 考察	42
第3章 SAMP8 マウスの老化に伴う BPSD 様症状に対する真珠層抽出成分の効果	44
3.1 実験方法	44
3.2 実験結果	49
3.3 考察	74
第4章 アコヤガイ貝殻真珠層に含まれる抗不安・抗うつ物質の単離・同定および作用経路の検討	76
4.1 実験方法	76
4.2 実験結果	86
4.3 考察	92
第5章 総括・実用化に向けた今後の課題	94
第6章 参考文献	96
第7章 謝辞	105

参考論文

- Tomoki Omachi, Nao Matsuyama, Yasushi Hasegawa. Nacre extract from pearl oyster suppresses LPS-induced depression and anxiety. Journal of Functional Foods. Volume 100. (2023)
- Tomoki Omachi, Yasushi Hasegawa. Effect of nacre extract from pearl oyster shells against behavioral and psychological symptoms of dementia in senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8). Journal of Functional Foods. Volume 116. (2024)

略語一覧

略語	英名	和名
5-HT	5-hydroxytryptamine / Serotonin	5-ヒドロキシトリプタミン/セロトニン
ATF4	activating transcription factor 4	-
ATF6	activating transcription factor 6	-
Bax	Bcl-2-associated X protein	Bcl-2 関連 X タンパク質
BBB	Blood-brain barrier	血液脳関門
Bcl2	b-cell leukemia/lymphoma 2 protein	-
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	脳由来栄養因子
BPSD	Behavioral and psychological symptoms of dementia	周辺症状
CHOP	C/EBP homologous protein	-
Control-Exosome	The serum exosome extracted from control mouse	コントロールマウス由来の血清エクソソーム
CREB	cAMP response element binding protein	cAMP 応答エレメント結合タンパク質
DA	Dopamine	ドーパミン
DAB	3,3'-diaminobenzidine	3,3'-ジアミノベンジジン
DAVID	The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery	-
DEG	differentially expressed genes	発現変動遺伝子
DG	Dentate gyrus	歯状回
eIF2 α	Alpha Subunit Eukaryotic Initiation Factor-2	真核生物翻訳開始因子 2
ER	Endoplasmic reticulum	小胞体
GABA	Gamma-aminobutyric acid	γ アミノ酪酸
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	グリア線維性酸性タンパク質
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素
GO	Gene Ontology	遺伝子オントロジー
GPR78	glucose-regulating protein 78	-

GSK-3 β	Glycogen synthase kinase-3 beta	グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 β
HE	Hematoxylin and eosin	ヘマトキシリンとエオシン
HO-1	Heme oxygenase -1	ヘムオキシゲナーゼ 1
HPA	Hypothalamus-pituitary-adrenal axis	視床下部-下垂体-副腎軸
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IL-1 β	Interleukin-1 beta	インターロイキン 1 β
IL-6	Interleukin-6	インターロイキン 6
IRE1	inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α	イノシトール要求性膜貫通キナーゼ/エンドリボヌクレアーゼ 1 α
JNK	c-jun N-terminal kinase	c-jun N 末端キナーゼ
LPS	Lipopolysaccharide	リボ多糖
MDA	Malondialdehyde	マロンジアルデヒド
Nacre extract	The extract from the nacreous layer of pearl oyster shells	アコヤガイ真珠層由来の抽出物
Nacre PS-Exosome	The serum exosome extracted from nacre sulfated polysaccharide-treated mouse	真珠層硫酸多糖を投与したマウス由来の血清エクソソーム
NE	Norepinephrine / Noradrenaline	ノルエピネフリン / ノルアドレナリン
NF-kB	the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	核内因子 κ B
NLRP3	Nod-like receptor pyrin-containing pyrin domain 3	Nod 様受容体ピリン含有ピリンドメイン 3
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁気共鳴
Nrf2	Nuclear factor E2-related factor 2	核因子 E2 関連因子
PAS staining	Periodic acid-Schiff staining	過ヨウ素酸シッフ染色
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
Per2	Period circadian regulator 2	-
PERK	protein kinase RNA (PKR)-	タンパク質キナーゼ

	like ER kinase	RNA (PKR) 様 ER キナーゼ
SAMP8	Senescence-accelerated mouse P8	老化促進マウス P8
SAMR1	Senescence-accelerated mouse R1	老化促進マウス R1
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸塩-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
SNRI	Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor	セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬
SOD	Superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor	選択的セロトニン再取り込み阻害薬
TBA	Thiobarbituric acid	チオバルビツール酸
TCA	Trichloroacetic acid	トリクロロ酢酸
TFA	Trifluoroacetic acid	トリフルオロ酢酸
TNF α	Tumor necrosis factor α	腫瘍壊死因子 α
TPM	Transcripts Per Million	-
UPR	Unfolded protein response	小胞体ストレス反応

第1章 序論

1.1 うつ病の社会的な影響

うつ病は気分の落ち込みや意欲の低下を特徴とする精神疾患である。重症化すると日常生活に深刻な支障をきたし、最悪の場合、自殺に至ってしまうことが知られている。世界保健機関(WHO)の調査によると、2023 年時点で全世界のうつ病患者は約 2 億 8 千万人となっており、毎年 70 万人が自殺につながっている。[1] 最近の研究によると、COVID-19 のパンデミックによってうつ病患者が 5320 万人増加したことが示されている。[2] また、日本は世界的にうつ病患者が多い国として報告されており、2017 年の地域別統計調査では世界 1 位の中国(推計 5482 万人: 人口比 4%)に次いで、2 番目に患者数が多かった。(推計 506 万人: 人口比 4%) [3] さらに、うつ病による経済的な負担も大きく、自殺やうつ病による日本の経済的損失額は推計 2.7 兆円(2009 年)であった。[4] このように、うつ病は健康と経済の面で大きな影響を与えることから、現代社会において対処すべき課題となっている。

1.2 うつ病の病理変化

大うつ病(MDD)の症状は気分の落ち込みや意欲の低下、楽しさや喜びを感じることができない(アンヘドニア)といった精神症状として現れるが、合併症として不安症状を伴うことがよく知られている。長年、うつ病に関する研究は広く行われているものの、その病態は非常に複雑であるため、未だに詳しい発症原因ははっきりしていない。

うつ病の最も大きな特徴の一つは脳内の神経伝達物質であるモノアミン(ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなど)の不足であり、そのうちセロトニン(5-HT)はうつ病の発症において特に重要であると考えられている。[5] 1960 年代にうつ病患者の脳内でセロトニンが欠乏していることが明らかになったことから、うつ病の原因は脳内のセロトニン欠乏であるという「セロトニン欠乏仮説」が広まった。この仮説は多くの研究で強く支持されており、現在使用されている主要な抗うつ薬の開発基盤となっている。しかし、セロトニン欠乏仮説にはうつ病のメカニズムを説明しきれていない矛盾点が存在している。[6,7,8,9,10,11] 例えば、第一選択抗うつ薬として使用されている選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)などは約 30%のうつ患者に効果がみられないことが報告されている。さらにこれらの薬は、投与から数時間で脳内のセロトニン濃度を増加させるにもかかわらず、症状が改善されるまでに数週間かかってしまうのが一般的である。また、セロトニン神経をターゲットにしない抗炎症薬のような薬剤でも抗うつ作用がみられた報告もみられる。これらの知見は、セロトニンを増やすだけではうつ病を十分に改善できないケースがあることを示しており、セロトニン欠乏仮説と矛盾している。そのため現在ではセロトニン欠乏に加えて、神経炎症や酸化ストレス、神経細胞の減少など、複数の病理変化がうつ病の発症原因であると考えられている。

近年では、うつ病の有力な発症原因として神経炎症が注目されている。グリア細胞(ミクログリアやアストロサイト)は脳内の免疫制御の役割を担っているが、うつ病を発症すると活性化し、炎症性サイトカインを誘導する[11]。うつ病と神経炎症の関係を示すエビデンスは数多く報告されており、例えばうつ病患者の体内では IL-1 β や TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインレベルが増加している。[12,13] また、関節リウ

マチや HIV 感染症などの炎症を伴う疾患はうつ病の併発リスクを増加させ[14,15]、C 型肝炎患者に用いられるインターフェロン治療では副作用としてうつ病を伴ってしまうことが報告されている[16]。さらに、神経炎症はセロトニン合成を阻害するインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) の増加や、ストレス反応を調節する HPA 軸の活性化、神経変性など[17,18]、うつ病につながる複数の病理変化を促進させる。

うつ病患者の脳内では酸化ストレスも起きていることが知られている。[19] 酸素総消費量の約 20%以上は脳で利用されているが、酸素の一部は反応性が高い活性酸素種(ROS)に変化し、神経毒性を示すようになる。[20] 通常、ROS は体内の抗酸化活性と均衡を保っているが、そのバランスが崩れることで酸化ストレス状態になる。ROS は炎症に関与する NF- κ B の転写を活性化させ[21]、さらに神経変性や HPA 軸、セロトニン神経機能異常にも寄与することが知られている。[22]

死後のうつ病患者では海馬および大脳皮質が委縮していることが知られている[23]。これらの領域は記憶や感情を含めた高次脳機能を司っており、5-HT_{1A} ヘテロ受容体は海馬や大脳皮質に高度に分布している[24]。また、うつ病患者の脳内では BDNF が減少しているが[25]、抗うつ薬の投与によって増加することが知られている。[26] これらは神経可塑性の低下がうつ病に寄与することを示唆していることから、最近では「神経可塑性仮説」も強く支持されている。一方、心的ストレスを受けるとグルココルチコイドが分泌されるが、グルココルチコイドは HPA 軸を負に制御する海馬を障害することから、これによって HPA 軸の活動が亢進してしまうと考えられている。[27]

1.3 真珠研究の現状

真珠はアコヤガイをはじめとする真珠貝から作られる。アコヤガイの貝殻は稜柱層と真珠層で構成されており、真珠と真珠層はほぼ同じ組成を示している。真珠および真珠層の主成分は炭酸カルシウム(90%以上)であり、残りは5%以上の有機成分と、わずかな微量金属となっている。有機成分としては、タンパク質や糖質、糖たんぱく質、ペプチド、キチン質など、多様な成分が含まれている。[28] 日本では真珠をアクセサリや化粧品素材として利用することが多いが、中国では古くから近視やてんかん、痙攣に効果を示す生薬として親しまれてきた。[29,30,31] 真珠はその抗酸化活性やブランドイメージの良さから製品化されているが、実際はその生理活性のメカニズムが曖昧なままになっている。

真珠は先行研究において多様な生理活性作用を示すことが知られている。例えば細胞レベルでは様々なモデルに対して高い抗酸化作用を示すことが知られている。[32,33] 組織レベルの作用を含めると、特に多いのは骨形成の促進作用や[34,35,36,37,38]、皮膚再生の促進作用である。[39,40] しかし、骨や皮膚に対する生理活性は非常に低く、抗酸化活性を含めて明らかにされている作用機序や有効成分は明確にされていない。さらに、真珠に関する研究のほとんどが *in vitro* であり、*in vivo* の研究例は非常に限られていることから、依然として真珠の生理活性作用についてはほとんど理解が進んでいないのが現状である。

一方、アコヤガイ貝殻は養殖場において年間数万トン以上、水産廃棄物として処理されており、処理コストの増大や貝殻自体から発生する悪臭によって数多くの問題を抱えている。そのため、アコヤガイ貝殻の効果的な有効活用が望まれている[41]。

1.4 記憶障害に対する真珠層抽出成分の生理活性作用

当研究室ではこれまで、アコヤガイ真珠層に含まれる有機成分を真珠層抽出成分として抽出し、優れた生理活性作用の探索と作用機序の解明に取り組んできた。その成果として、真珠層抽出成分が複数の認知症モデルマウスに対して効果を示すことが明らかになった。富士・山上らはスコポリン誘発記憶障害モデルを用いた検討により、真珠層抽出成分が抗酸化作用、抗炎症作用、BDNFをはじめとする栄養因子の増加を介して記憶障害を抑制することを明らかにした。[42,43] また四ツ屋は、アミロイド β で誘発した記憶障害に対して真珠層抽出成分が有効であることを *in vivo* で明らかにし、脳内の抗酸化活性や BDNF の増加、海馬における神経保護作用を介することを報告した。[44] これらの成果は、真珠層抽出成分が脳機能に対して優れた生理活性を示すことを示唆している。

1.5 本研究について

上記に示したように、酸化ストレスや神経炎症、神経可塑性の低下はうつ病と関連していることから、これらの病理変化に有効な生理活性物質を新たな抗うつ物質の候補として適応する試みが広く行われている。[45] 一方、当研究室では真珠層抽出成分が抗酸化作用、抗炎症作用、神経保護作用を示すことをすでに報告しているため、私は真珠層抽出成分が認知症と同じ神経変性疾患であるうつ病にも有効ではないかと着想した。実際に記憶障害とうつ病の両方に有効である生理活性物質はいくつか存在しており、レスベラトロールやケルセチン、ミリセチンなどのフラボノイドはそのような物質として報告されている。[46,47,48,49,50] また、いくつかの *in vivo* 研究では、SSRI などの抗うつ薬が BDNF の増加を介して認知機能を改善する可能性が示唆されている[51,52,53]。以上のことから、本研究では複数の不安・うつモデルマウスに対して真珠層抽出成分が効果を示すかどうか検討した。また、真珠層に含まれる有効成分の単離・同定も行い、それが脳に作用する経路についても検討した。

第2章 LPS 誘発不安・うつモデルマウスに対する真珠層抽出成分の

抗不安・抗うつ作用

本章ではリポポリサッカライド(LPS)を用いて不安・うつモデルマウスを作製した。LPS はグラム陰性菌細胞壁の外膜を構成する成分であり、IL-1 β や IL-6、TNF α などの炎症性サイトカインを強く誘導することが知られている。生体内に投与すると炎症反応によって Sickness Behavior(自発的運動活性や食欲の低下などを示す)を引き起こし、LPS 投与から 24 時間後にうつ症状や不安症状を引き起こす。神経炎症はうつ病の有力な発症原因として知られており、さらにこのモデルマウスは簡単に作製できることから、有用な不安・うつモデルとして広く用いられている。したがって、LPS をマウスの脳室内に投与することで不安・うつモデルマウスを作製し、真珠層抽出成分が LPS で誘発した不安・うつ症状および Sickness Behavior に効果を示すかどうか検討した。

2.1 実験方法

2.1.1 真珠層抽出液の作製

➤ 使用器具・試薬

- ・漂白剤(DCM)
- ・氷酢酸(和光純薬)
- ・セルロースメンブレン 分子量：孔径 5 nm 約 12000~14000 (アズワン)

➤ 方法

1. 次亜塩素酸処理したアコヤガイ貝殻の稜柱層を、ドライバーを用いて除去し、調製した 10%酢酸で真珠層を脱灰させた。
2. 脱灰後の酢酸溶液をセルロースメンブレンに入れ、脱イオン水に対して透析を行った。外液の脱イオン水は 1 日 1 回交換し、1 週間透析を続けた。
3. 透析した内液を濃縮・凍結乾燥させ、得られた乾燥粉末を真珠層抽出成分として回収した。
4. 適量の真珠層抽出成分を超純水に懸濁させ、12,000 r.p.m で 5 分間遠心分離し、得られた上清を真珠層抽出液として実験に使用した。

2.1.2 不安・うつマウスの作製および真珠層抽出成分の投与

➤ 使用器具・試薬

- ・4 週齢 ICR マウス(日本クレア)
- ・真珠層抽出液 50mg/kg および 100mg/kg
- ・超純水
- ・Lipopolysaccharides from Escherichia coli O127:B8 (SIGMA)
- ・注射針 (26G×1/2) 付 1 mL シリンジ (TERUMO)

➤ 方法

1. 4週齢のICRマウス25～30匹を4つのケージ(1ケージ5、6匹)に分け、1週間順化させた。
2. 順化後、Control群とLPS群には超純水、真珠投与群には真珠層抽出成分50mg/kgおよび100mg/kgを1～2週間毎日腹腔内投与した。
3. LPSを生理食塩水(PBS)で溶解し、0.5μg/μLに調製した。
4. 各マウス群にLPSおよびPBSを2μLずつ脳室内投与した。
5. 脳室内投与してから24時間の餌摂取量および水分摂取量を測定した。
6. 脳室内投与から24時間後に行動薬理試験または解剖を行った。

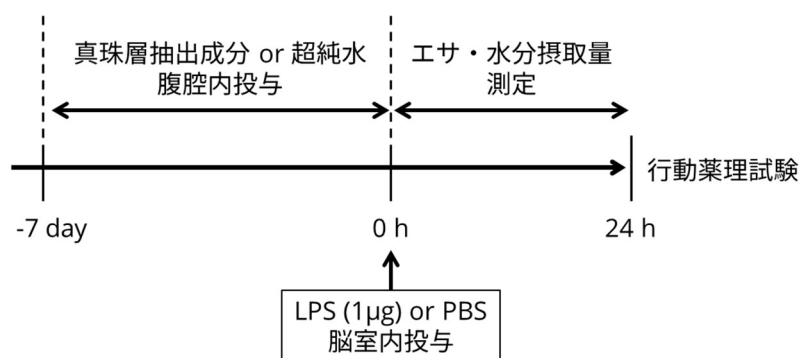


図1 第2章 動物実験スケジュール

2.1.3 行動薬理試験

● オープンフィールド試験

➤ 使用器具

- ・アルミ製円筒容器(直径 35cm×高さ 40cm)
- ・ビニールテープ
- ・油性ペン(黒)
- ・ビデオカメラ
- ・照明

➤ 方法

1. ビニールテープとマッキーペンを用いて、以下の図のように円筒の底面を区切った。
2. 上から照明を照らし、上から撮影されるようにビデオカメラを設置した。
3. マウスを5分間自由に探索させた。
4. マウスが区画をまたいだ回数、中央部にいた時間を測定した。

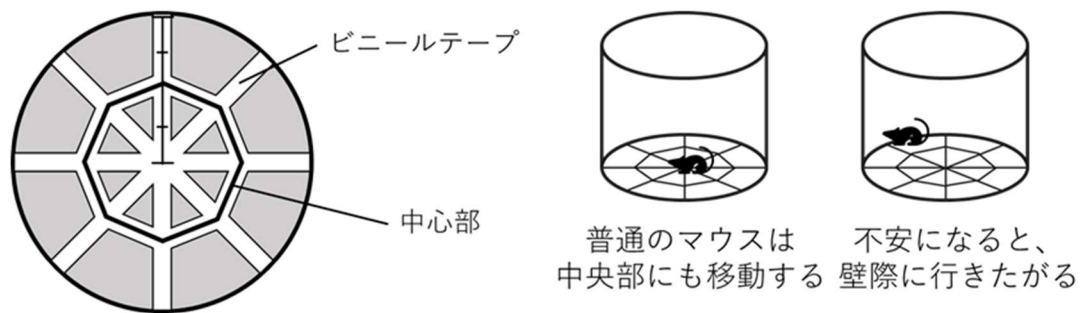


図2 オープンフィールド試験

● 強制水泳試験

➤ 使用器具

- ・マウス用飼育ケージ(縦 20cm×横 30cm×高さ 10cm)
- ・温度計
- ・照明
- ・ビデオカメラ

➤ 方法

1. マウスの足が底に届かないように、マウス用ケージに $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の水を入れた。
2. 照明を用いて上からマウス用ケージを照らし、横から撮影できるようにビデオカメラを水面の高さに調節した。
3. 5 分間マウスを自由に泳がせ、無動時間を測定した。測定後温度計で水温を測り、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ でなかったときに $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の水と入れ替えた。

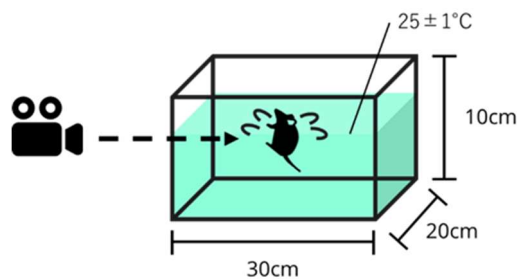


図3 強制水泳試験

● 尾懸垂試験

➤ 使用器具

- ・尾懸垂試験装置(縦 35 cm×横 35 cm×高さ 60 cm)
- ・木製の棒
- ・ビニールテープ
- ・ビデオカメラ
- ・照明

➤ 方法

1. 照明を上から照らし、真横から撮影されるようにビデオカメラを設置した。
2. ビニールテープを用いてマウスの尾を木製の棒に固定した。
3. 腹部が映るように逆さの状態のマウスを6分間吊るし、無動時間を測定した。

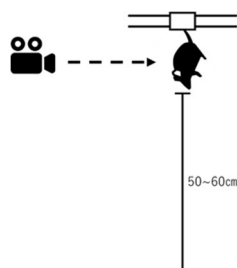


図4 尾懸垂試験

● ショ糖嗜好性試験

➤ 使用器具・試薬・試薬

- ・1%スクロース溶液
- ・給水管(iwaki)
- ・マウス用飼育ケージ(縦 20cm×横 30cm×高さ 10cm)

➤ 方法

1. 実験1週間前に1%スクロース溶液をマウスに与え、味を覚えさせた。
2. 実験前日にマウスを絶食・絶水させた。
3. 1%スクロース溶液が入った給水管と水道水が入った給水管を用意し、重量を測定した。
4. マウスに1%スクロース溶液と水道水を与え、2・4・8・12・24時間後に両者の重量を測定した。
5. 3、4の測定した重量からマウスの1%スクロース溶液と水道水の摂取量を算出し、以下の式からマウスのショ糖嗜好性を算出した。
6. $\text{ショ糖嗜好性}[\%] = \frac{\text{1\%スクロース溶液の摂取量}[\text{g}]}{\text{1\%スクロース溶液の摂取量}[\text{g}] + \text{水道水の摂取量}[\text{g}]} \times 100$

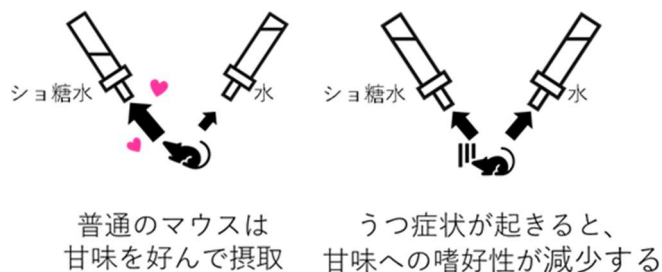


図5 ショ糖嗜好性試験

● 高架式十字迷路試験

➤ 使用器具

- ・高架式十字迷路試験装置
- ・ビデオカメラ
- ・照明
- ・段ボール(縦 10cm×横 30cm)

➤ 方法

1. 実験装置を組み立て、クローズドアームの上部を段ボールで遮光した。
2. 照明を上から照らし、上から撮影されるようにビデオカメラを設置した。
3. マウスをセンターゾーンに置き、5 分間自由に探索させた。
4. マウスがオープンアームに入った回数、クローズドアームに入った回数、オープンアームにいた時間を測定した。また、次の式からオープンアームに入った割合を算出した。

オープンアームに入った割合[%] = $\frac{\text{オープンアームに入った回数}}{\text{自発的運動量(オープンアームに入った回数 + クローズドアームに入った回数)}} \times 100$

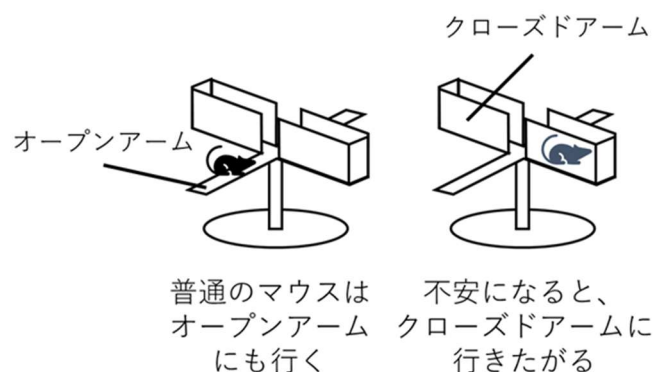


図 6 高架式十字迷路試験

2.1.4 リアルタイム PCR

➤ 試薬・使用器具・試薬

- ・RNAiso Plus (TAKARA)
- ・クロロホルム
- ・75%エタノール
- ・イソプロパノール
- ・DEPC 水
- ・ホモジナイザー
- ・Oligo dT primer
- ・5×RT Buffer
- ・True Script II Reverse Transcriptase
- ・10mM dNTP
- ・サーマルサイクラー

- SYBR Green Master (Master Mix)
- PCR 用チューブ(日本ジェネティクス)
- StepOne™ (applied biosystems™)
- cDNA 溶液
- プライマー(Eurofines)

使用したプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

Primer	配列	アニーリング温度
GAPDH-s GAPDH-a	5`-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3` 5`-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3`	60°C
β Actin-s β Actin-a	5`-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3` 5`-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3`	57°C
IL-1 β -s IL-1 β -a	5`-GGGCCTCAAAGGAAAGAATC-3` 5`-TACCAGTTGGGGAAGTCTGC-3`	55°C
IL-6-s IL-6-a	5`-AGACTTCCATCCAGTTGCCT-3` 5`-CAGGTCTGTTGGGAGTGGTA-3`	55°C
TNF α -s TNF α -a	5`-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3` 5`-GTGGGTGAGGAGCACGTAGC-3`	55°C
GFAP-s GFAP-a	5`-GAGGGACAACCTTGCACAGG-3` 5`-TCCTCCAGCGATTCAACCTT-3`	55°C
Mn-SOD-s Mn-SOD-a	5`-GGCCAAGGGAGATGTTACAA-3` 5`-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3`	55°C
catalase-s catalase-a	5`-AGGTGTTGAACGAGGAGGAG-3` 5`-TGCGTGTAGGTGTGAATTGC-3`	55°C
Cu, Zn-SOD-s Cu, Zn-SOD-a	5`-CGGATGAAGAGAGGCATGTT-3` 5`-CACCTTTGCCCAAGTCATCT-3`	55°C
HO-1-s HO-1-a	5`-CACGCATATACCCGCTACCT-3` 5`-CCAGAGTGTTTCATTCGAGCA-3`	55°C
5HT1a receptor-s 5HT1a receptor-a	5`-CCGTGAGAGGAAGACAGTGA-3` 5`-TAACTGGGTTGAGCAGGGAG-3`	58.4°C
D1 receptor-s D1 receptor-a	5`-ACCCTGTCTGAATGCTCTCAA-3` 5`-TGGGGTTTCAGGGAGGAATTC-3`	55°C
D2 receptor-s D2 receptor-a	5`-AAACCCGGACCTCCCTTAAG-3` 5`-AGAGGACTGGTGGGATGTTG-3`	55°C

DAT-s DAT-a	5`-TGTGAGCCATCTGTGTGGAT-3` 5`-ACAACGAAGCCAGAGGAGAA-3`	55°C
VMAT-s VMAT-a	5`-ACTCTACTGTGTTACGGGG-3` 5`-CAGCCCAACTTGCACATTCT-3`	55°C
BDNF-s BDNF-a	5`-AGAGCTGTTGGATGAGGACCAG-3` 5`-CAAAGGCACTTGACTACTGAGGA-3`	58°C
Dnm-1-s Dnm-1-a	5`-GCAACTGGAGAGGAATGCTG-3` 5`-CACAATCTCGCTGTTCTCGG-3`	57°C
COX-s COX-a	5`-CCATGTCACGATGCTGTCTG-3` 5`-CTCCCAAATCAGAACGAGCG-3`	57°C
Nd1-s Nd1-a	5`-TAGGTGGTGGCTTTGATGGT-3` 5`-TGCCATCAAATCCTCCCTCT-3`	55°C
SDHA-s SDHA-a	5`-AAGGCAAATGCTGGAGAAGA-3` 5`-TGGTTCTGCATCGACTTCTG-3`	53°C

➤ 方法

Total RNA の抽出

1. エッペンに入っている脳組織に RNAiso Plus をそれぞれ 500μL 加えた。
2. 十分にホモジナイズしたのちに、1 時間振盪させた。
3. クロロホルムを 100μL 加え、乳白色になるまでボルテックスした。
4. 室温で 5 分間静置し、12000×g、4°C で 15 分間遠心分離し、3 層に分離させた。
5. 中間の上清が入らないように、一番上の上清を新しいエッペンに移した。
6. イソプロパノールを 500 μL 加え、よく混合させた。
7. 室温で 10 分間静置させ、12000×g、4°C で 10 分間遠心分離した。
8. 上清を除去し、-20°C で冷やした 75% エタノール 500μL を混合させた。
9. 7500×g、4°C で 5 分間遠心分離した。
10. 上清を除去したのちに、冷蔵庫内で 1 晩乾燥させた。
11. 乾燥させた沈殿に DEPC 水 10μL を溶解させ、RNA 濃度・純度を測定した。

cDNA 合成

1. 下記の通りに試薬を混合させた。

試薬	添加量(1 サンプルあたり)
mRNA	全量(9 μ L 程度)
Oligo dT primer	1 μ L
5 $\times$ RT Buffer	4 μ L
True Script II Reverse Transcriptase	0.5 μ L
10mM dNTP	2 μ L
DEPC 水	4 μ L

2. サーマルサイクラーを用いて 42°C で 90 分間反応させた。
3. 合成した cDNA 溶液を実験に使用するまで -20°C で保存した。

リアルタイム PCR($\Delta\Delta C_t$ 法)

1. 2.5.2 で作製した cDNA 溶液を 25ng/ μ L になるように滅菌水で希釈した。
2. 1.5mL エッペンチューブに以下の組成で試薬を混合した。

	添加量(1 サンプルあたり)
Master Mix	5 μ L
Sense primer	0.2 μ L
Anti-sense primer	0.2 μ L
滅菌水	3.6 μ L

3. 上記の混合液 9 μ L を PCR 用チューブに添加し、cDNA 溶液 1 μ L をさらに加えた。
4. チューブのふたを閉め、StepOneTM を用いて CT 値を測定した。
5. 以下の数式により、CT 値から相対 mRNA 発現量を算出した。本項目では LPS 群をキャリブレーターとして利用した。

$$\begin{aligned}\text{相対的 mRNA 発現量} &= 2^{-\Delta\Delta C_t} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t(\text{サンプル}) - \Delta C_t(\text{キャリブレーター}) \\ \Delta C_t &= C_t(\text{ターゲット遺伝子}) - C_t(\text{内部標準遺伝子})\end{aligned}$$

2.1.5 抗酸化活性の評価

➤ 実験器具・試薬

- ・超純水
- ・ホモジナイザー
- ・採取したマウスの脳組織
- ・Pierce®BCA Protein Assay Kit(Thermo)
- ・トリクロロ酢酸：TCA (WAKO)
- ・チオバルビツール酸：TBA (WAKO)

➤ 方法

脳抽出液の作製

1. 摘出した脳部位に対して 20%懸濁液になるように超純水を加え、ダマが見えなくなるまでホモジナイズした。
2. 脳懸濁液を 3500r.p.m、4°C、15 分間遠心分離し、上清を脳抽出液として使用した。

BCA アッセイ

作製した脳抽出液のタンパク質量を定量するために BCA アッセイを実施した。

・検量線の作成

1. 2mg/mL ウシ血清アルブミン溶液(超純水で溶解)を作製し、それぞれ 0,0.1,0.5,1,2 mg/mL になるように希釈した。
2. ligand A : ligand B = 100 : 1 になるように反応溶液を調製し、新しいエッペンに 200 μ L ずつ入れた。
3. 2 の反応溶液に 1 のウシ血清アルブミン溶液を 10 μ L ずつ混和し、37°Cで 30 分間インキュベートした。
4. 562 nm で吸光度を測定し、吸光度を y、タンパク質濃度を x として検量線を作製した。

・タンパク質濃度の定量

1. ligand A : ligand B = 100 : 1 になるように反応溶液を調製し、新しいエッペンに 200 μ L ずつ入れた。
2. 1 の反応溶液に脳抽出液を 10 μ L 混和し、37°Cで 30 分インキュベートした。
3. 562 nm で吸光度を測定し、検量線からタンパク質濃度を測定した。(単位は mg protein/mL)

過酸化脂質量の定量

1. 脳抽出液 50 μ L を新しいエッペンにとり、37°Cで 60 分間インキュベートした。
2. 50%TCA を 100 μ L 添加し、3000r.p.m で 10 分間遠心分離した。
3. 上清 100 μ L を新しいエッペンにとり、0.67%TBA を 100 μ L 添加した。
4. 100°Cで 10 分間加熱した後に、10 分間氷冷した。
5. 氷冷後、540nm で吸光度を測定した。

2.1.6 SDS 電気泳動

➤ 使用器具・試薬

- ・ sample 処理液
- ・ 2-メルカプトエタノール
- ・ ドライサーモユニット TAH-1 (TAIYO)
- ・ 泳動ゲル
- ・ 10×Running Buffer
- ・ Upper Buffer
- ・ Lower Buffer
- ・ ガラスプレート 2 枚
- ・ コーム
- ・ パッキン
- ・ クリップ
- ・ 15mL ファルコンチューブ
- ・ 泳動槽
- ・ 電気泳動用電源装置 MP-7552 (マリソル)

➤ 試薬の調製

- ・ Sample 処理液

1M Tris-HCl(pH6.8) 50mL(Final 0.5M)

20%SDS 1mL(Final 0.2%)

グリセロール 50mL(Final 50%)

上記を混合後、ブロモフェノールブルー(B P B)を微量添加した。

- ・ 泳動ゲル

以下の組成で作製した。

10% アクリルアミド

	Lower ゲル	Upper ゲル
アクリルアミドビズ	3.3 mL	0.5 mL
脱イオン水	4.2 mL	2.4 mL
Lower Buffer	2.5 mL	
Upper Buffer		1 mL
10% APS	100 μ L	36 μ L
20% SDS	50 μ L	20 μ L

15%アクリルアミド

	Lower ゲル	Upper ゲル
アクリルアミドビズ	5 mL	0.5 mL
脱イオン水	2.3 mL	2.4 mL
Lower Buffer	2.5 mL	
Upper Buffer		1 mL
10% APS	100 μ L	36 μ L
20% SDS	50 μ L	20 μ L

・アクリルアミドビズ

アクリルアミド 150 g

N,N'-メチレンビスアクリルアミド 4 g

上記を超純水で 500 mL にメスアップした。

・ Lower Buffer

Tris 90.75 g を超純水 400 mL に溶解し、HCl で pH を 8.8 に調節後 500 mL にメスアップした。

・ Upper Buffer

Tris 30.25 g を超純水 400 mL に溶解し、HCl で pH を 6.8 に調節後 500 mL にメスアップした。

・ 20% SDS

SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 100 g を超純水 500 mL に溶解した。

・ 10%APS

過硫酸アンモニウム 1.0 g を超純水 10 ml に溶解した。

・ 10×Running Buffer

Tris 1.21 g

グリシン 7.5 g

20% SDS 2.5 mL

上記を超純水 500 mL にメスアップした。

➤ 方法

タンパク質サンプルの作製

1. 脳抽出液と 1:1 になるように Sample 処理液を加え、混合後 2-メルカプトエタノールを 2~5 μ L 添加した。
2. ボルテックスし、遠心後に 100°C、10 分間でサンプルを加熱した。
3. 電気泳動に使用する直前に、14000r.p.m、室温、15 分間で遠心分離し、上清をゲルにアプライした。

ゲルの作製

1. 2 枚のガラスプレートとゴム紐をクリップで挟み、プレートの隙間に脱イオン水を注いだ。
2. 以下の組成でゲルを作製した。
3. 1 で脱イオン水がプレートの隙間から漏れていないことを確認し、脱イオン水を捨て、Lower に TEMED を 12 μ L 加え攪拌したのち、即座にプレートに流し入れ、上から静かに脱イオン水を充填した。
4. 30 分後、Lower ゲルが固まり、層の境界がはっきりと確認できたら、上層の脱イオン水を捨てた。
5. 5. Upper に TEMED を 10 μ L 加え攪拌したのち、Lower ゲルの上に充填し、コームを挿入した。
6. 1 時間後、Upper ゲルが固まったらコームを抜き、脱イオン水でウェル内を十分に洗浄した。

電気泳動

1. プレートを泳動槽にセットし、10×Running buffer を 10 倍に希釈し、泳動槽に入れた。
2. パワーサプライを泳動槽に繋ぎ、サンプルを well に 10-50 μ L ずつアプライし、定電流 (C.C) 15-20 mA で泳動を行った。
3. 電気泳動後のゲルはウェスタンブロットに使用した。

2.1.7 ウェスタンブロット

➤ 使用器具・試薬

- ・ Transfer buffer
- ・ Burridge buffer
- ・ Blocking buffer
- ・ AP (アルカリフォスファターゼ) 検出溶液
- ・ Nitro Bind, Transfer Membrane, Pore Size 0.45 μm (GE Osmonics)
- ・ ろ紙
- ・ 電気泳動用電源装置 MP-7552 (マリソル)
- ・ セミドライプロッター
- ・ 一次抗体

使用した抗体は以下のとおりである。

抗体	会社	抗体	会社
β -actin antibody	biorbyt	5TH1a receptor antibody	biorbyt
IL-1 α antibody	biorbyt	BDNF antibody	biorbyt
IL-6 antibody	biorbyt	Nfr2 antibody	biorbyt
TNF α antibody	biorbyt		
GFAP antibody	biorbyt		

- ・ ラビット IgG 抗体 (biorbyt)
- ・ マウス IgG 抗体 (biorbyt)

➤ 試薬の調製

・ Transfer buffer

Tris	1.51 g (25 mM)
グリシン	7.21 g (192 mM)
メタノール	100 mL (20 %)

上記を混合し、超純水で 500 mL にメスアップした。

・ Burridge buffer

Tris	1.21 g (10 mM)
NaCl	2.922 g (50 mM)
Tween-20	0.5 mL (0.05 %)

上記を超純水 900 mL に溶解し、HCl で pH 7.5 に調製後、1 L にメスアップした。

・ Blocking buffer

抗 Actin 抗体を使用する場合、スキムミルク 3 g を Burridge buffer 30 mL に溶解し、作製した。その他の抗体の場合は、ウマ血清 3mL と Burridge Buffer 27mL を混合し、作製した。

- ・ 反応緩衝液

Tris	6 g (0.1 M)
NaCl	2.92 g (0.1 M)
MgCl	0.30 g (5 mM)

上記を超純水 400 mL に溶解し, HCl で pH 9.5 に調製後, 500 mL にメスアップした.

- ・ BCIP 溶液

5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP) 50 mg をジメチルホルムアミド 1 mL に溶解した。

- ・ NBT 溶液

ニトロブルーテトラリゾウム (NBT) 50 mg を 70 % ジメチルホルムアミド 1 mL に溶解した。

- ・ AP 検出溶液

反応緩衝液 30mL, BCIP 溶液 99 μ L, NBT 溶液 48 μ L を混合した。

➤ 方法

1. ニトロセルロースメンブレンとろ紙 4 枚を適当な大きさに切り, Transfer buffer で 15 分振盪した。
2. 電気泳動後、下からろ紙 2 枚, メンブレン, 泳動のゲル, ろ紙 2 枚の順でセミドライプロッターにセットした。
3. 定電圧 (C.V) 10 V で 1 時間半転写した。
4. 転写後, メンブレンを Blocking buffer に 1 時間振盪させた。
5. Blocking buffer を除き, Burridge buffer で軽く 3 回洗浄した。
6. 1 次抗体を加えた Burridge buffer にメンブレンを 2 時間以上振盪させた。
7. 1 次抗体を除き, Burridge buffer で 10 分間振盪し, 洗浄させた。これを 3 回繰り返した。
8. 2 次抗体を加えた Burridge buffer にメンブレンを 2 時間以上振盪させた。
9. 2 次抗体を除き, Burridge buffer で 10 分間振盪し, 洗浄した。これを 3 回繰り返した。
10. メンブレンを AP 検出溶液に浸し, 発色するまで振盪させた。

2.1.8 組織切片の作製

➤ 使用器具・試薬

- ・ PBS
- ・ 4% パラホルムアルデヒド
- ・ エクステンションチューブ
- ・ 鉗子
- ・ ピンセット
- ・ 解剖用ハサミ
- ・ 送液ポンプ

➤ 方法

1. セボフルランを用いてマウスを麻酔した後、左心室から全身へ PBS を還流させた。
2. すべての血液を排出させたのち、灌流液を 4%パラホルムアルデヒドに置換させ、全身を固定した。
3. 脳組織を採取したのち、パラフィン包埋し、ブレグマから-1.8~2.5 mm の領域で 3 μ 厚の組織切片を作製した。
4. 作製した組織切片の一部を用いてヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、残りの組織切片は、免疫組織染色に利用した。

2.1.9 免疫組織染色

➤ 試薬・器具

- ・ キシレン(100%)
- ・ タノール(100%、90%、80%、70%)
- ・ 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)
- ・ スライドガラス
- ・ PBS
- ・ PBS-TritonX-100(0.025%)
- ・ 0.3%過酸化水素水
- ・ Immunohistochemistry kit
- ・ 一次抗体 (biorbyt)
- ・ ラビット IgG 抗体 (biorbyt)
- ・ マウス IgG 抗体 (biorbyt)
- ・ マリノール(武藤化学)
- ・ オートクレーブ(SANYO)

➤ 試薬調製

・PBS(1 L)

塩化ナトリウム	8.00g
リン酸水素二ナトリウム	1.10g
塩化カリウム	0.20g
リン酸二水素カリウム	0.20g
超純水	1 L

上記を混合した。

・PBS-TritonX-100(0.025%)

PBS500mL に対して TritonX-100 を 100 μ L 添加し、混合させた。

・0.3%過酸化水素水

PBS10 mL に対して、30%過酸化水素(和光純薬)を 100 μ L 添加し、混合させた。

・一次抗体

PBS で 50 倍に希釈してから使用した。

・DAB 溶液

DAB	25 μ L
DAB Buffer or Enhance Buffer	1mL

上記を使用する直前に混合した。

・10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)

クエン酸 1 水和物 2.1g を超純水 900mL に溶解させた後に 2M 水酸化ナトリウム溶液で pH6.0 に調製し、1000mL にメスアップした。

➤ 方法

脱パラフィン

1. キシレン I (5 分間)
2. キシレン II (5 分間)
3. キシレン III (5 分間)
4. 100%エタノール I (5 分間)
5. 100%エタノール II (5 分間)
6. 90%エタノール(5 分間)
7. 80%エタノール(5 分間)
8. 70%エタノール(5 分間)
9. 水洗(5 分間)

賦活化処理

1. スライドガラスを 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)に浸し、105°Cで 10 分間オートクレーブをかけた。
2. 脱水
3. 75%エタノール(2 分間)
4. 95%エタノール(2 分間)
5. 100%エタノール(3 分間)
6. 100%エタノール(3 分間)
7. キシレン(5 分間)
8. キシレン(5 分間)

免疫組織染色

1. 脱パラフィン後、賦活化処理を行った。
2. PBS-TritonX-100(0.025%)でスライドガラスをすすいだ。
3. RTU normal goat serum を 3-4 滴スライドガラスに乗せ、室温で 30 分間インキュベートした。
4. 一次抗体をスライドガラスに乗せ、4°Cで一晩インキュベートした。
5. PBS ですすぎ、0.3%過酸化水素水に乗せ、室温で 10 分間インキュベートした。
6. PBS で 2、3 回すすぎ、二次抗体を 1~2 滴スライドガラスに乗せ、室温で 30 分間(染色性が悪いときは 30 分以上)インキュベートした。
7. スライドガラスを PBS に 2 分間浸し、3 回繰り返した。
8. 組織全体が覆われるように DAB 溶液を添加し、2~8 分間室温でインキュベートした。
9. 十分に染色されたところで、滅菌水に乗せ反応を止めた。
10. ヘマトキシリンを添加し、1~2 分間インキュベートした。
11. 脱イオン水を容器に出しながらスライドガラスを浸し、4 分間洗浄した。
12. 脱水を行った後に組織上にマリノールを 2 滴乗せ、その上にカバーガラスに乗せた。

2.1.10 線条体周辺領域におけるモノアミン含有量の定量(蛍光 HPLC 分析)

➤ 使用器具・試薬

- ・ HPLC 装置
- ・ 蛍光検出器
- ・ ろ過瓶
- ・ メンブレンフィルター
- ・ 移動相
- ・ 内部標準溶液
- ・ ポジコンサンプル(セロトニン、ドーパミン塩酸塩、ノルアドレナリン)
- ・ HPLC サンプル

➤ 試薬調製

・ 移動相

12 mM 酢酸 pH 3.5 900 mL

0.26 mM Na₂EDTA 83.2 mg

メタノール 100 mL

オクタスルホン酸ナトリウム (Wako) 190 mg

酢酸と Na₂EDTA、オクタスルホン酸ナトリウムを全量 900mL になるように調製し、フィルターでろ過した。ろ過したものにメタノールを混合し、10 秒間ほど超音波をかけて脱気した。

・ 0.1M 過塩素酸

60 % 過塩素酸 (10.559 mol / L) 474 μ L を超純水 49.526 mL で希釈した。

・ 内部標準溶液

dl-イソプロテレノール塩酸塩 (Wako) を 1.5 ng / mL になるように、0.1 M 過塩素酸で調製した。

・ ポジコンサンプル

セロトニン

ドーパミン塩酸塩 (ナカライテスク株式会社)

ノルアドレナリン

内部標準溶液で上記の試薬をそれぞれ 1nM に調製し、フィルターに通した。

➤ 方法

線条体サンプルの作製

1. マウスの線条体周辺組織に対して 20%懸濁液になるように内部標準溶液を加え、ホモジナイズした。
2. 12000r.p.m で 5 分間遠心後、上清をフィルターに通し、使用するまで -20°C で保存した。

モノアミン濃度の定量

1. 蛍光検出器を装備した HPLC 装置に移動相を 0.4mL/min で流し、平衡化させた。
2. ポジコンサンプルおよび線条体サンプルを 40 μ L インジェクトし、励起波長 280nm、蛍光波長 315nm で分析を開始した。
3. ポジコンサンプルのピーク面積を参考に、HPLC サンプルのセロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリンの含有量を算出した。

2.1.11 統計解析

各データは 4~5 匹/群のマウスから得られ、平均値 $\pm$ 標準偏差として算出したものである。統計解析は一元配置分散分析(ANOVA)と Fisher`s exact test を用いて行い、p 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。すべての統計解析はエクセル統計ソフトウェア (BellCurve)を用いて行われた。

2.2 実験結果

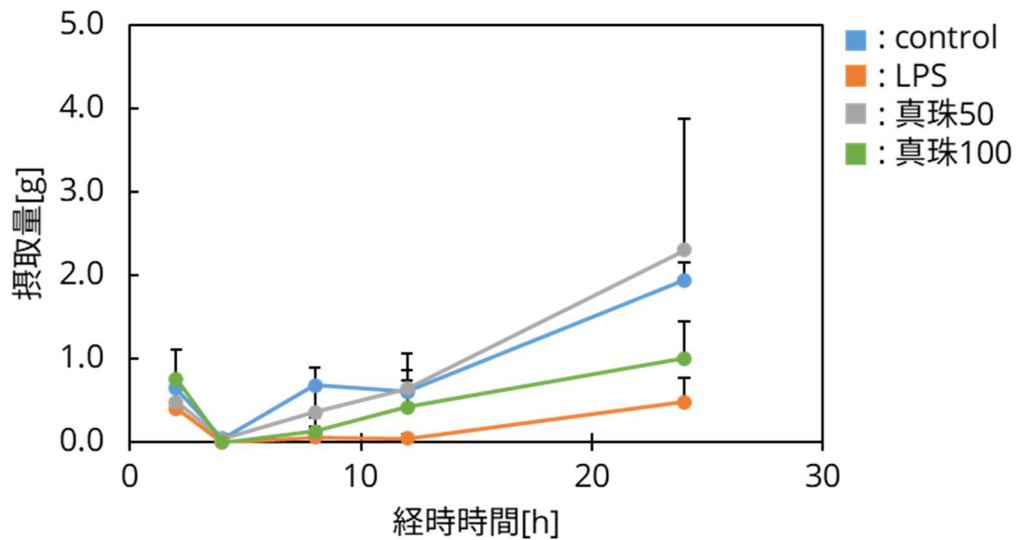
2.2.1 LPS で誘発した不安・うつ行動に対する真珠層抽出成分の効果

LPS を投与すると、24 時間後に Sickness Behavior を示すことが知られている。LPS で誘発した Sickness Behavior に対して真珠層抽出成分が効果を示すかどうか検討するため、LPS の投与から 0、2、4、8、12、24 時間後の食物摂取量および水分摂取量を測定した。(図 7) LPS を投与したマウスでは、コントロールよりも食物摂取量および水分摂取量が有意に減少し、Sickness Behavior が認められた。しかし、真珠層抽出成分 50 mg/kg および 100mg/kg を投与することでマウスの食物摂取量が有意に増加した。(図 6(a),(b)) また、水分摂取量についても、真珠層抽出成分 50mg/kg の投与で有意な増加がみられたが、真珠層抽出液 100mg/kg の投与では有意な変化がみられなかった。(図 6(c))

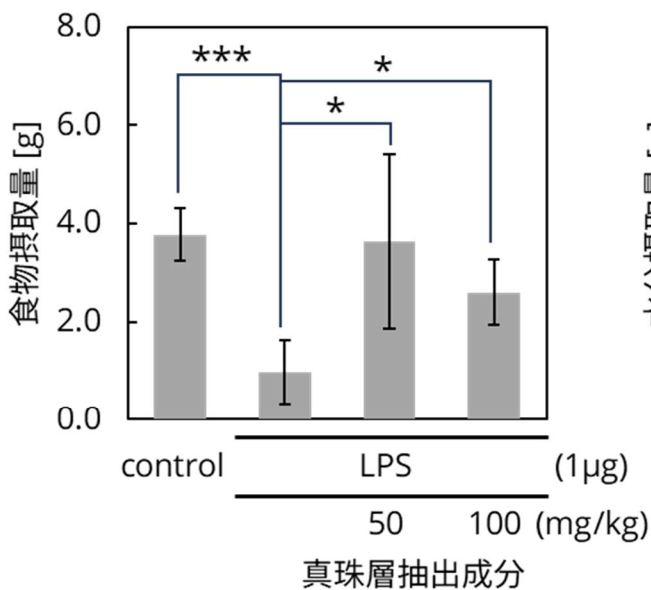
次は LPS で誘発したうつ症状について検討するため、オープンフィールド試験、強制水泳試験、スクロース嗜好性試験を行った。(図 8) 強制水泳試験では、LPS 投与したマウスの不動時間がコントロール群の 3 倍近くまで増加し、LPS 投与によるうつ症状が確認できた。しかし、真珠層抽出液を投与することで、マウスの不動時間がコントロール近くまで減少した。(図 8(b)) 一方、オープンフィールド試験を用いてマウスの自発的運動活性を評価したところ、いずれのマウス群においても有意な変化がみられなかった。(図 8(a)) これらの結果は、それぞれのマウスの運動活性に関係なく、真珠層抽出液が LPS 投与したマウスの不動時間を減少させたことを示唆している。一方、うつ病の主要な症状として、喜びや楽しさを感じられなくなるアンヘドニアがよく知られている。スクロース嗜好性試験を用いて、マウスのアンヘドニアを評価したところ、強制水泳試験の結果と同様に、LPS 群のスクロース嗜好性が 60% 近くまで減少したが、真珠層投与によってスクロース嗜好性が有意に回復した。(図 8(c)) これらの結果から、真珠層抽出液は LPS で誘発したうつ症状を抑制することが明らかになった。

うつ病は、不安症状と併発することがよく知られている。マウスの不安症状を評価するため、オープンフィールド試験および高架式十字迷路試験を行った。(図 9) オープンフィールド試験において、LPS 群ではコントロール群よりも中心部にいる時間が有意に減少したことから、LPS 投与が不安症状を引き起こすことが示された。(図 9(a)) しかし、真珠層抽出液 100mg/kg の投与によって、中心部にいた時間が LPS 群よりも有意に増加した。一方、高架式十字迷路試験では、LPS 群のオープンアームにいた時間がコントロールよりも減少し、真珠層投与によって増加した。(図 9(b)) しかし、オープンアームに入った回数においては、いずれのマウス群においても変化がみられなかった。(図 9(c)) これらの結果から、真珠層抽出成分は、LPS で誘発した不安症状を抑制することが示された。

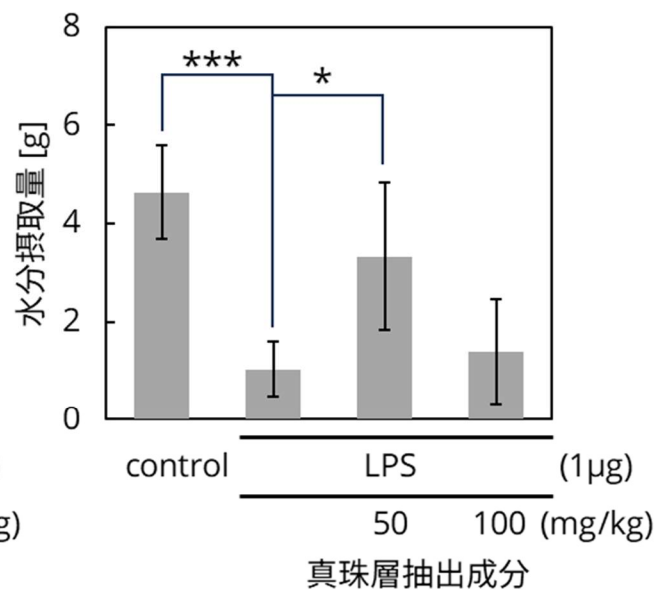
(a) 食物摂取量の経時変化



(b) 食物摂取量



(c) 水分摂取量

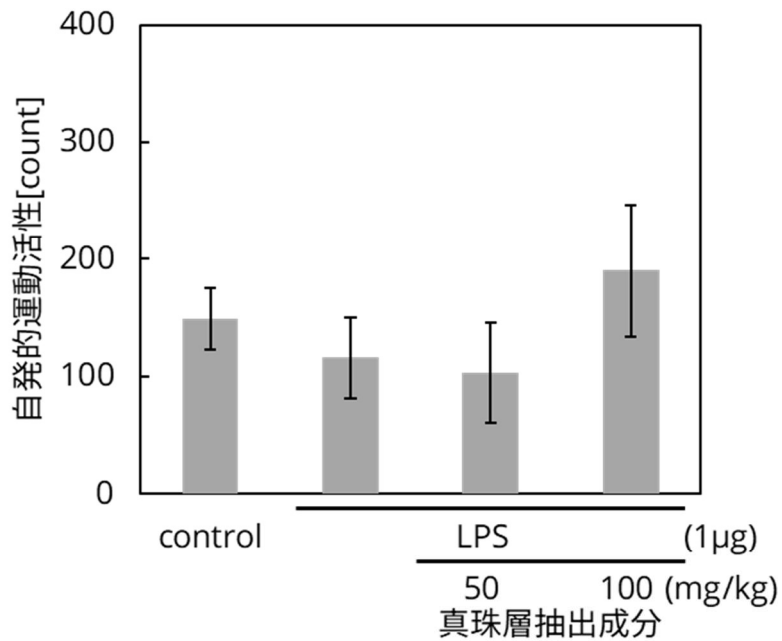


Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

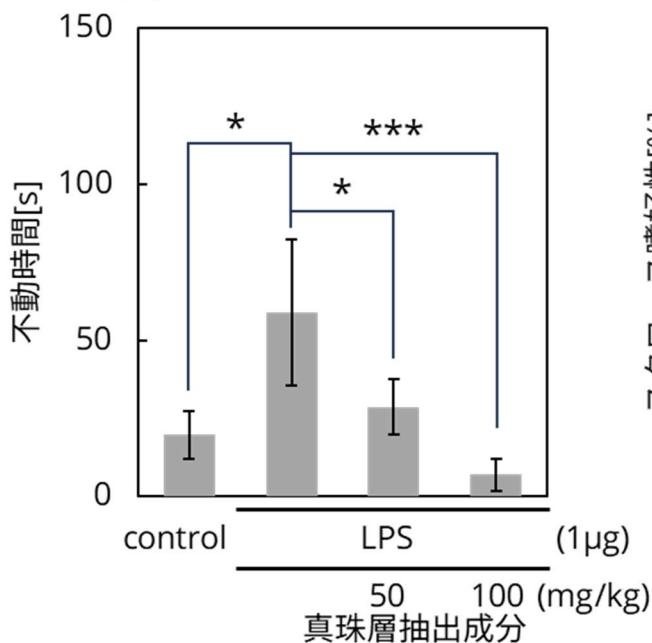
図7 LPSで誘発したSickness Behaviorに対する真珠層抽出液の効果

(a)食物摂取量の経時変化はLPS投与後0,2,4,8,12,24時間後に測定し、その合計を算出した(b)。(c)水分摂取量もLPS投与24時間後に測定した。

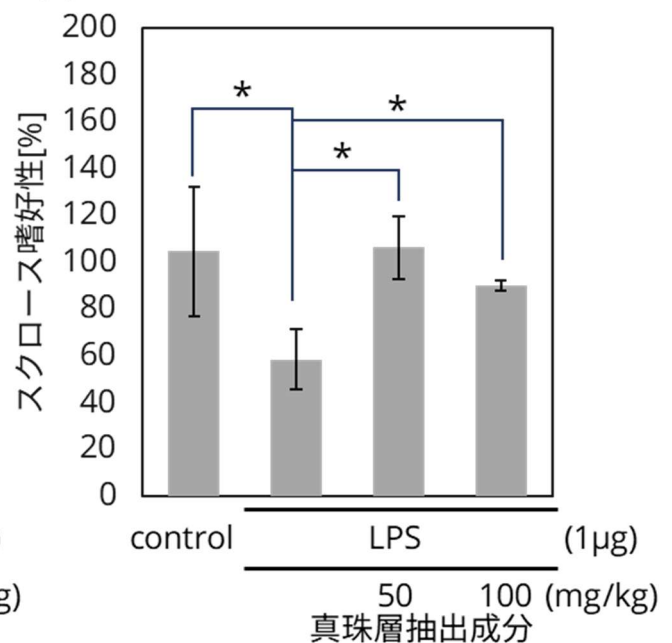
(a) オープンフィールド試験



(b) 強制水泳試験



(c) スクロース嗜好性試験

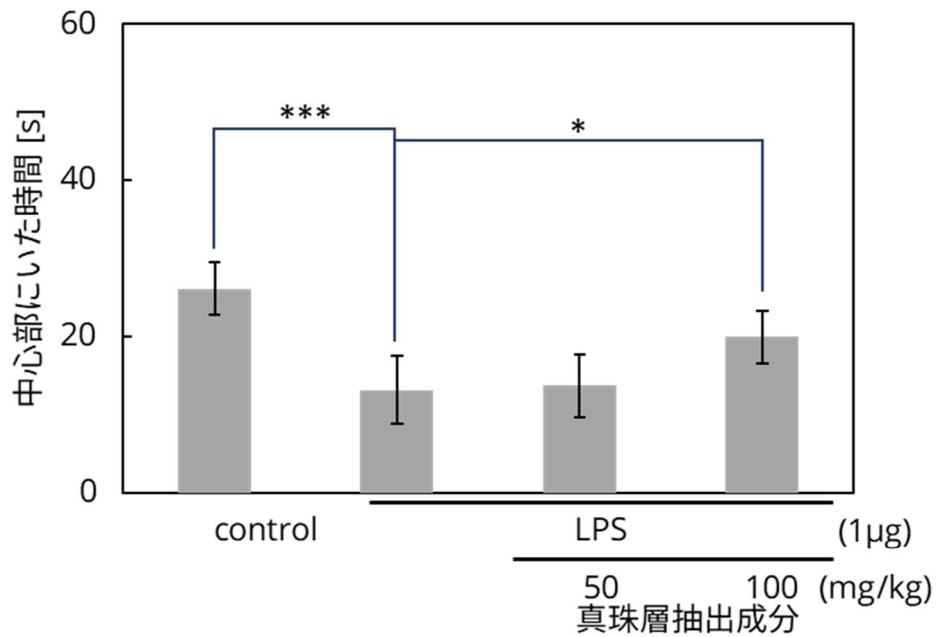


Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

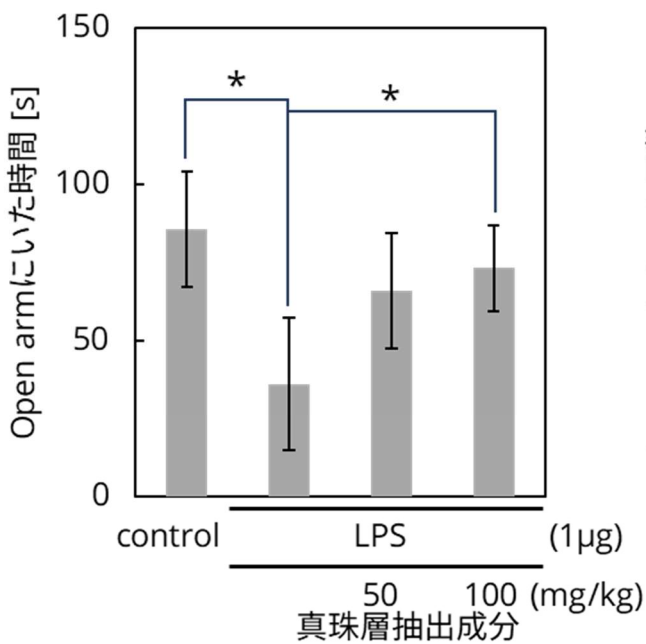
図8 LPSで誘発したうつ症状に対する真珠層抽出液の効果

(a)オープンフィールド試験ではマウスの自発的運動活性を評価した。(b)強制水泳試験では不動時間、(c)スクロース嗜好性試験ではスクロース嗜好性を評価した。(n=5-6)

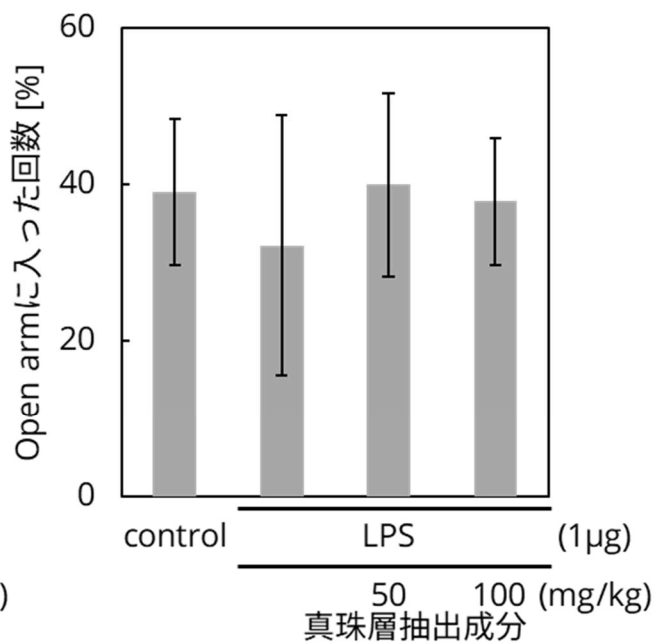
(a) オープンフィールド試験



(b) 高架式十字迷路試験



(c) 高架式十字迷路試験



Fisher's exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

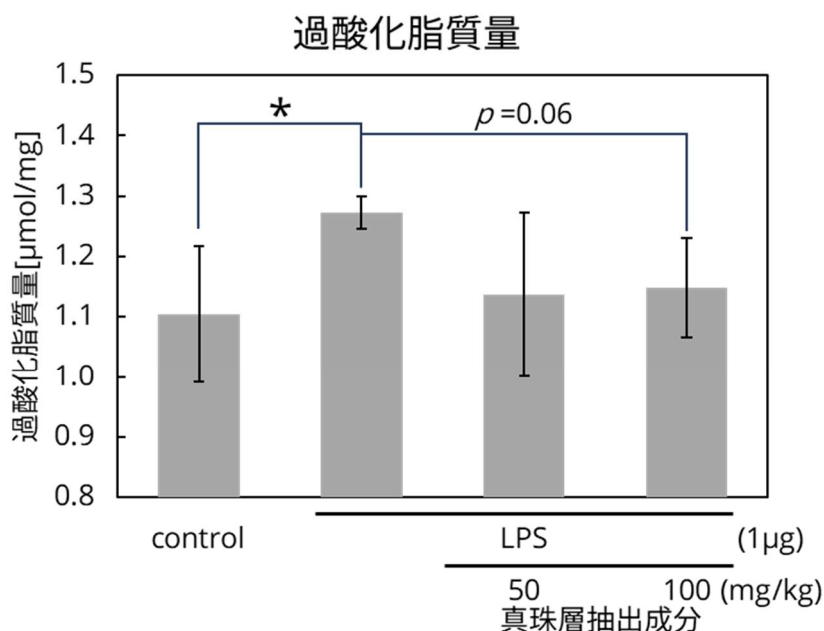
図9 LPSで誘発した不安症状に対する真珠層抽出液の効果

オープンフィールド試験では、(a)マウスが中心部にいた時間、高架式十字迷路試験では、(b)オープンアームに入った回数、(c)オープンアームにいた時間を評価した (n=5-6)

2.2.2 LPS で誘発した酸化ストレス・神経炎症に対する真珠層抽出成分の効果

LPS は炎症に伴って酸化ストレスを引き起こす。そのため、LPS で誘発した酸化ストレスについて検討するため、マウスの皮質・海馬における過酸化脂質量を評価した。(図 10) LPS を投与したマウスでは過酸化脂質量が有意に増加したことから、脳内の酸化ストレスが認められた。一方、真珠層抽出液 100mg/kg の投与では有意差は見られなかったものの、過酸化脂質量が減少する傾向がみられた。一方、様々な抗酸化酵素の転写因子である Nrf2 の発現量は、LPS 投与によってコントロールよりも有意に減少したが、真珠層抽出液を投与することで、発現量の減少が抑制された。(図 11(a)) 加えて、リアルタイム PCR の結果から、真珠層抽出液の投与は Cu, Zn-SOD、Mn-SOD、ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1)、カタラーゼ(catalase)の mRNA 発現量を有意に増加させることが明らかになった。(図 11(b-e)) これらの結果から、真珠層抽出液は Nrf2 の発現量を増加させることで、LPS で誘発した脳内の酸化ストレスを抑制することが明らかになった。

Nrf2 の発現量増加は炎症を抑制することが報告されているため、真珠層抽出液が LPS で誘発した神経炎症に対しても効果を示すかどうか、ウェスタンブロットを用いて検討した。(図 12) 炎症性サイトカインである IL-1 および IL-6、活性化アストロサイトのマーカーである GFAP の発現量は、コントロール群よりも LPS 群で有意に増加したことから、LPS 投与による神経炎症が認められた。(図 12(a-c)) しかし、真珠層抽出液を投与することで、これらのタンパク質の発現量が有意に減少されることが分かった。これらの結果から、真珠層抽出液は LPS で誘発した神経炎症を抑制することが示された。



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 10 各マウス群の脳内における過酸化脂質量
過酸化脂質量の測定は、マウスの皮質・海馬を用いて評価した。(n=5-6)

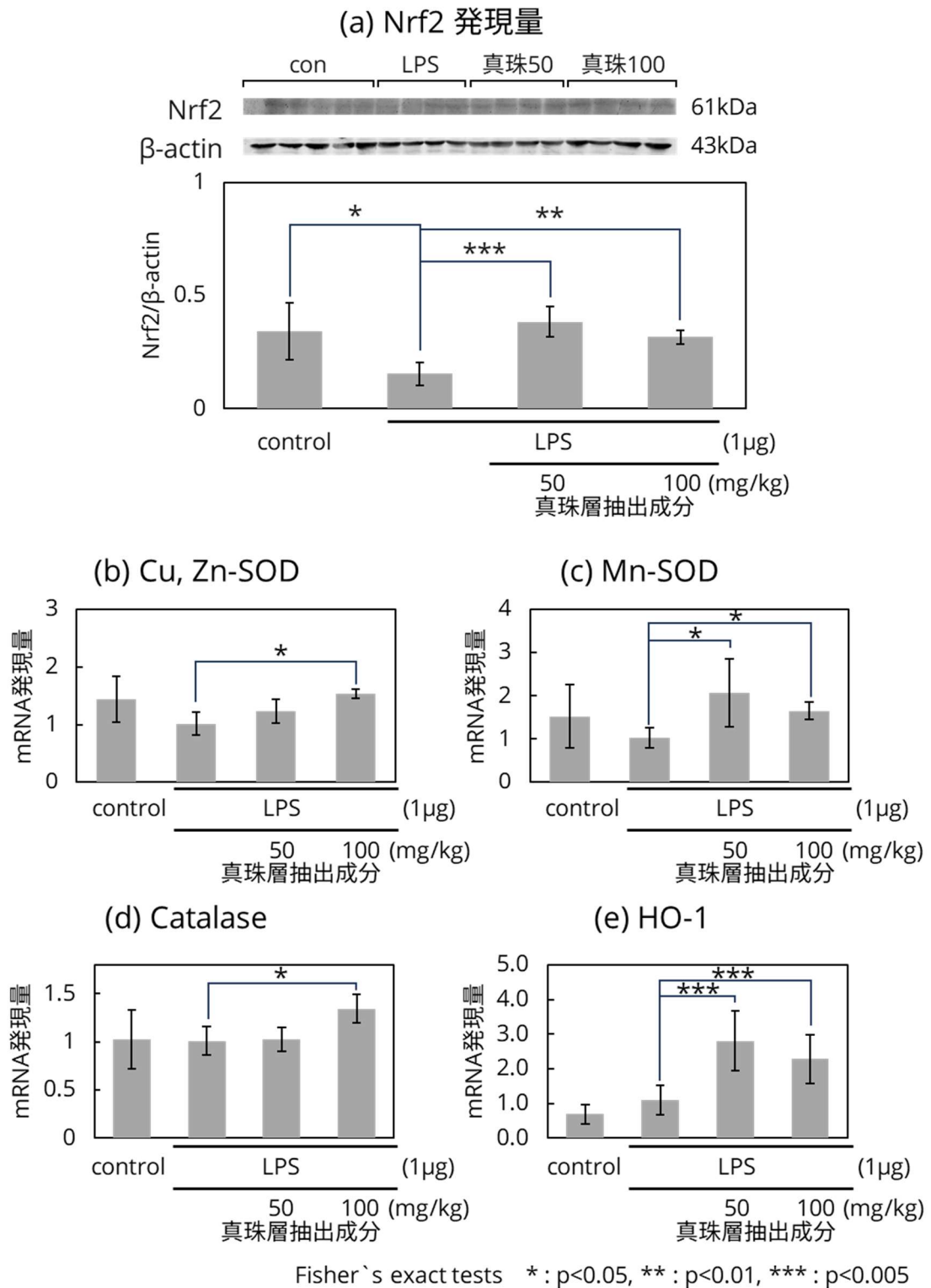
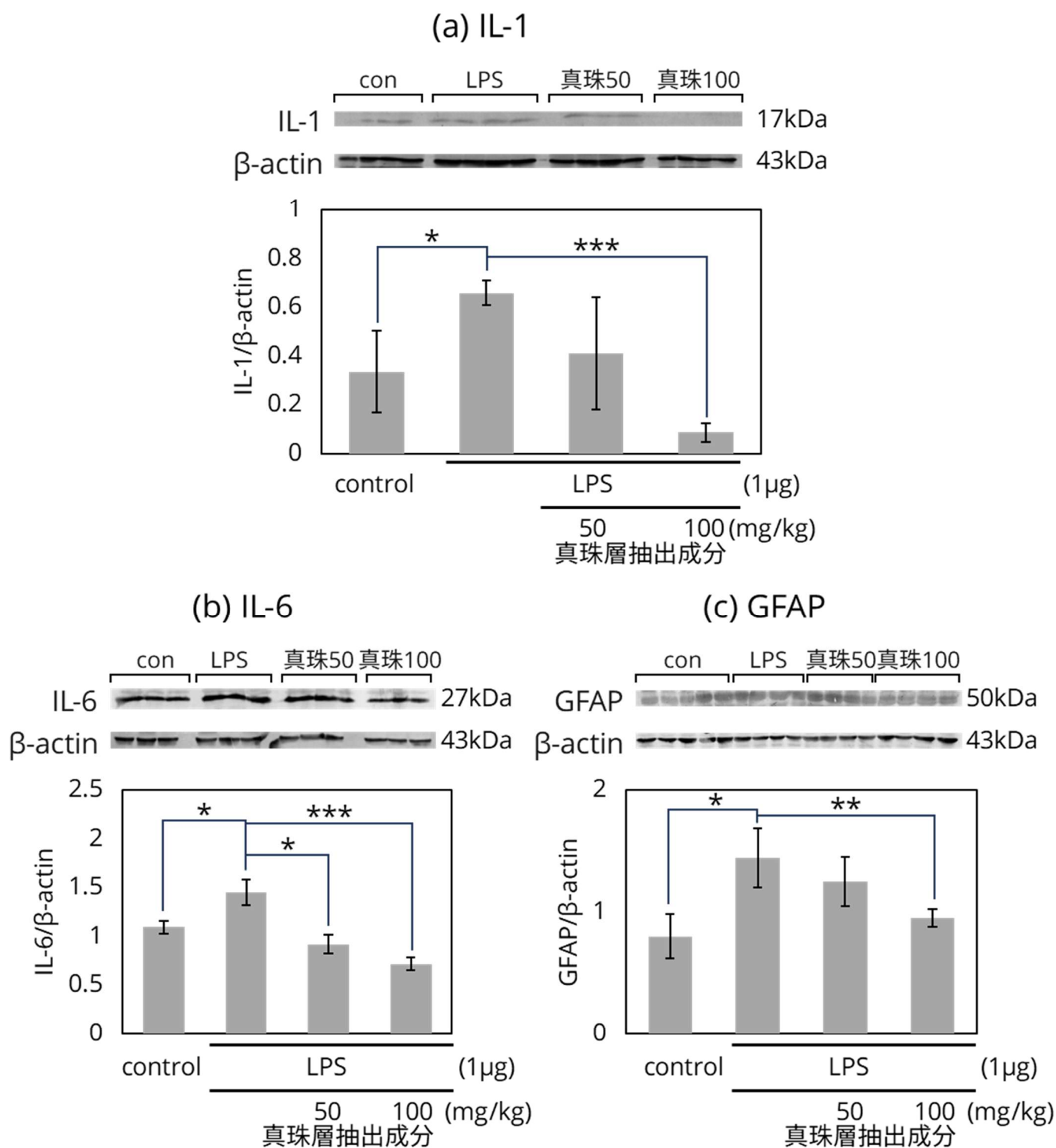


図 10 真珠層抽出成分の抗酸化活性

マウスの脳内における(a)Nrf2 の発現量はウェスタンブロットを用いて測定した。一方、(b)Cu,Zn-SOD、(c)Mn-SOD、(d)Catalase、(e)HO-1 の発現量はリアルタイム PCR を用いて測定した。(n=5-6)



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 12 真珠層抽出液の抗炎症作用

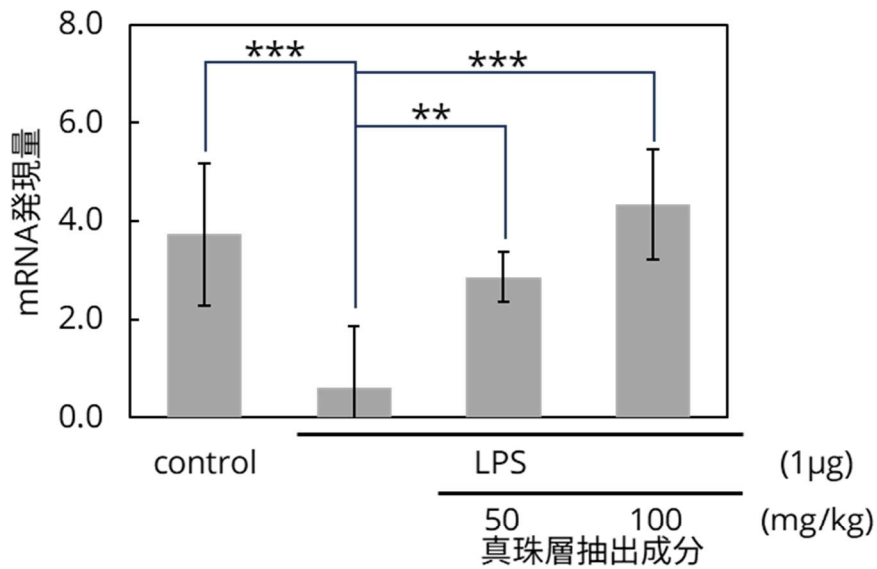
脳内における(a)IL-1、(b)IL-6、(c)GFAP の発現量は、ウェスタンブロットを用いて測定した。

2.2.3 真珠層抽出成分のセロトニン受容体 1A,2A の発現量変化

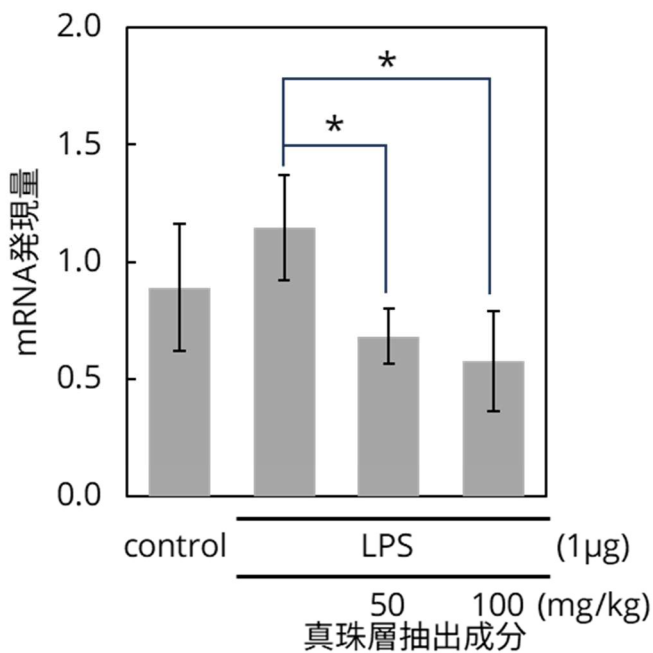
セロトニン(5-HT)1A,2A,2C は、うつ症状や不安症状に関連することが知られているため、真珠層抽出液がこれらの受容体の発現量に影響を与えるかどうか、リアルタイム PCR を用いて検討した。(図 13) 脳内の 5-HT1A 受容体の mRNA 発現量を調べたところ、コントロールに比べて LPS 群で mRNA 発現量が有意に減少したが、真珠層投与したマウス群で mRNA 発現量が濃度依存的に増加した。(図 13(a)) 対照的に、5-HT2A 受容体ではコントロール群と比較して、LPS 投与による発現量増加と真珠層投与による減少がみられた。(図 13(b)) 一方、5-HT2C 受容体では、LPS 投与によって mRNA 発現量の減少がみられたが、真珠層抽出液を投与したマウスでは、mRNA 発現量の有意な増加が見られなかった。(図 13(c))

これらの結果をさらに確認するため、次はウェスタンブロットおよび免疫組織染色を用いて、皮質・海馬における 5-HT1A、2A 受容体の発現量について検討を行った。リアルタイム PCR の結果と一致して、LPS 投与によって 5-HT1A 受容体の発現量がウェスタンブロットおよび免疫組織染色において有意に減少したが、いずれにおいても真珠層抽出液を投与することで発現量がともに増加した。(図 14) 一方、5-HT2A 受容体のウェスタンブロットでは LPS 群とコントロール群の間で有意な変化がみられなかったが、真珠層抽出液を投与したマウスにおいて 5-HT2A 受容体の発現量が濃度依存的に減少することが分かった。(図 15) これらの結果から、真珠層抽出液は 5-HT1A 受容体の発現量増加と、5-HT2A 受容体の発現量減少を介して、LPS で誘発した不安・うつ症状を抑制することが示された。しかしながら、マウスの線条体周辺領域におけるモノアミン含有量(セロトニン、ドーパミン、ノルエピネフリン)を、蛍光 HPLC を用いて調べたところ、いずれの結果においても真珠層投与による変化がみられなかった。(図 17)

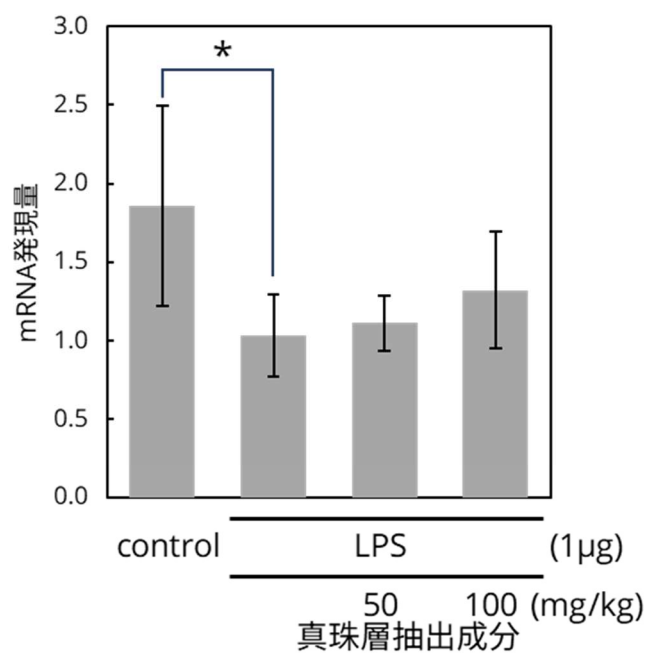
(a) 5HT1A 受容体



(b) 5HT2A 受容体



(c) 5HT2C 受容体



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 13 各マウス群の脳内におけるセロトニン(5-HT)1A,2A,2C 受容体の mRNA 発現量
各マウス群の脳内における(a)5-HT1A、(b)5-HT2A、(c)5-HT2C 受容体の mRNA 発現量はリアルタイム PCR を用いて測定した。(n=5-6)

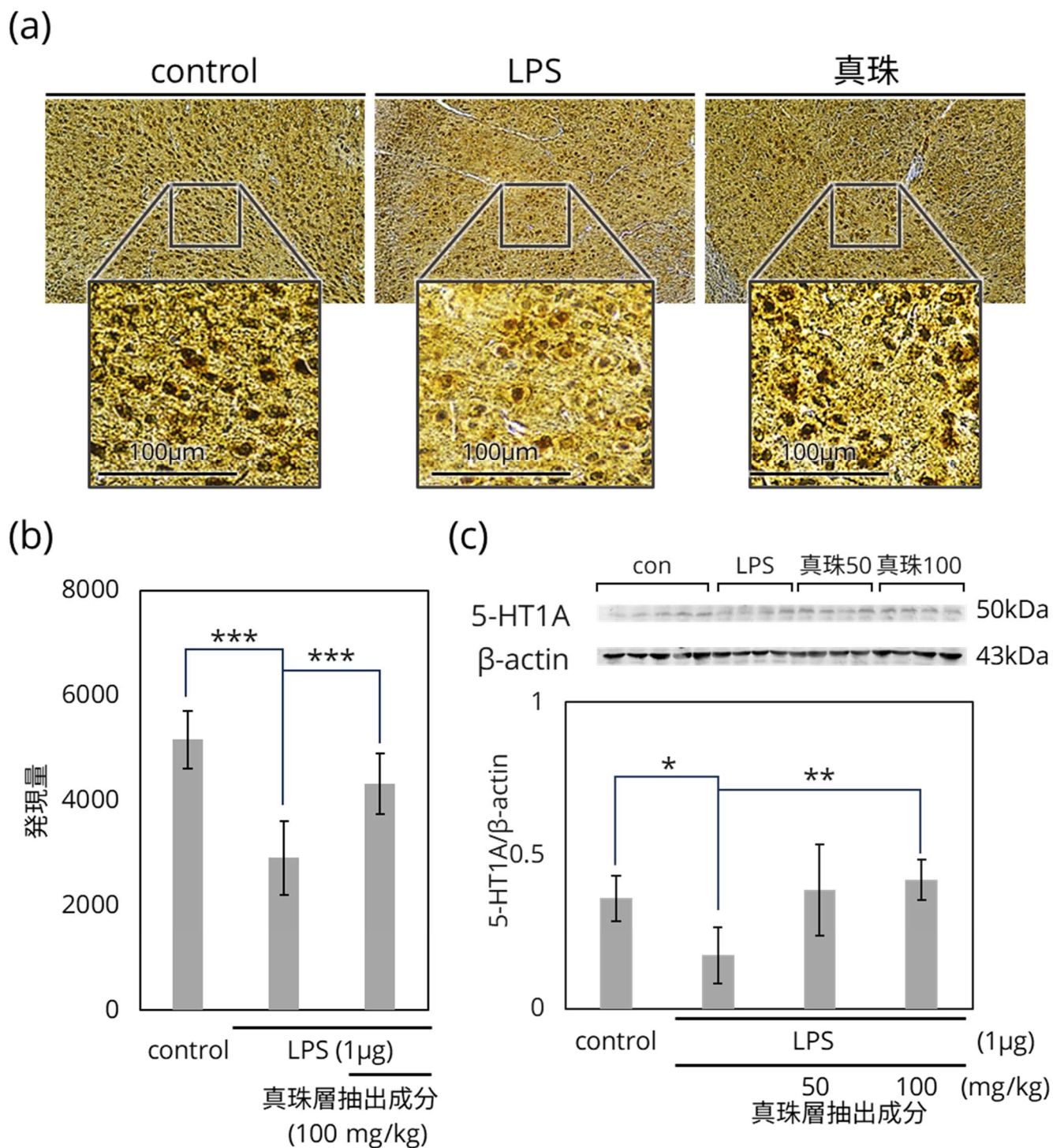
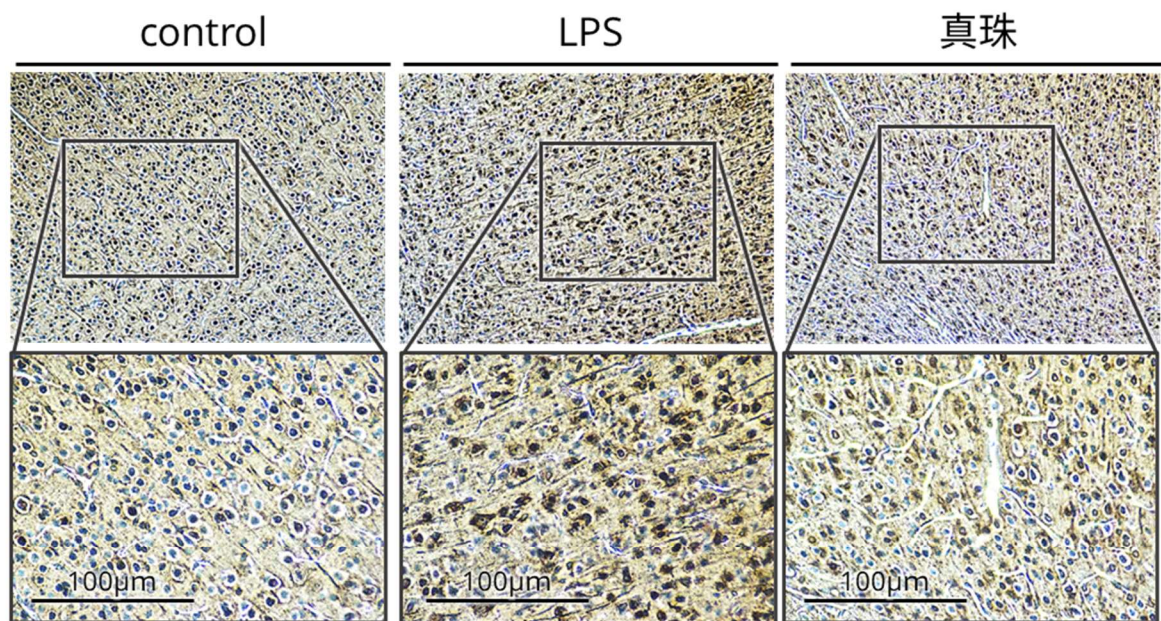


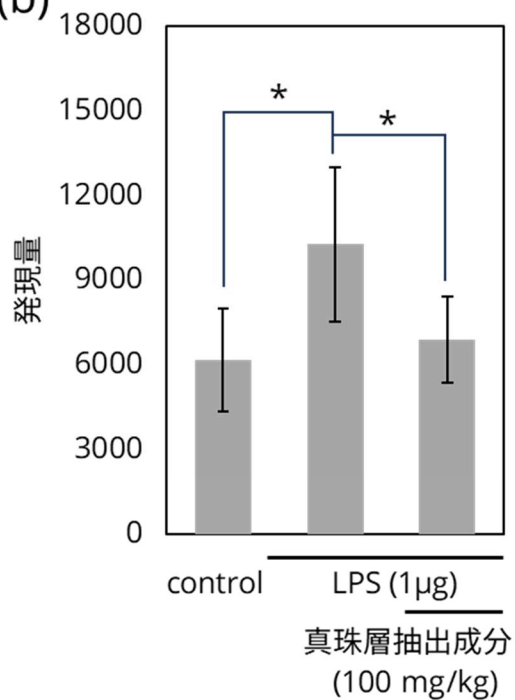
図 14 各マウス群の脳内における 5-HT1A 受容体の発現量

(a)抗 5-HT1A 受容体抗体を用いて、マウス脳組織切片の皮質領域について免疫組織染色を行った。また、5-HT1A 受容体の染色面積を発現量として定量した(b)。一方、脳組織の皮質・海馬を用いて、5-HT1A 受容体についてウェスタンブロットを行った。(n=5-6)

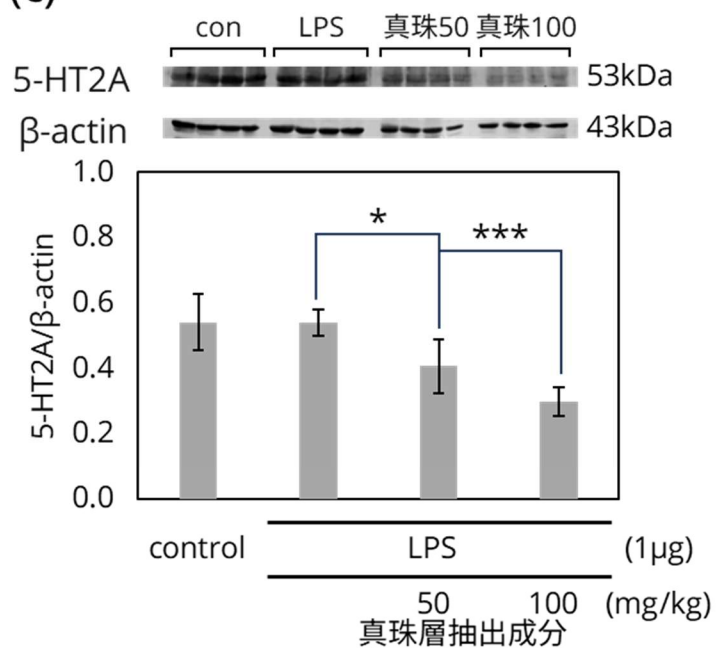
(a)



(b)



(c)

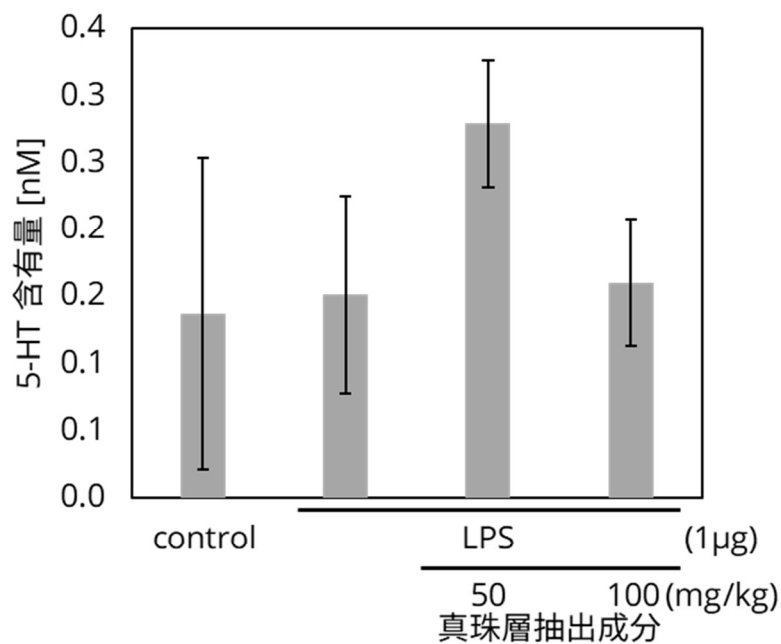


Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

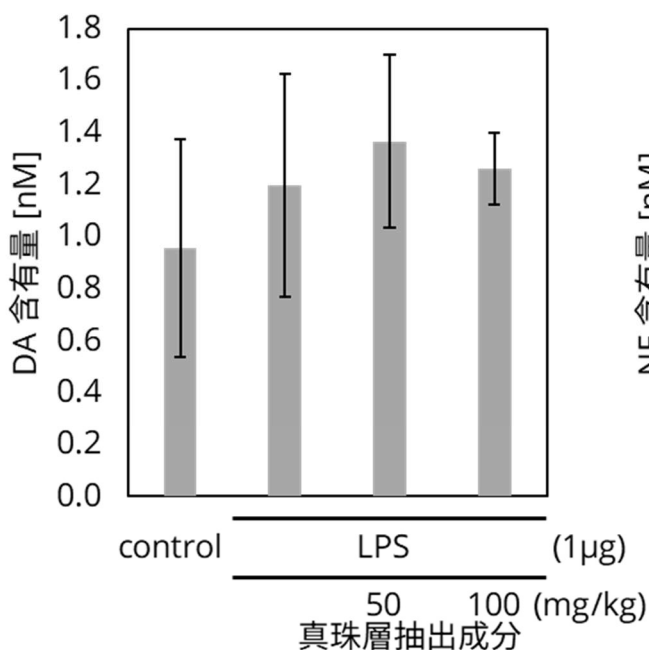
図 15 各マウス群の脳内における 5-HT2A 受容体の発現量

(a)抗 5-HT2A 受容体抗体を用いて、マウス脳組織切片の皮質領域について免疫組織染色を行った。また、5-HT2A 受容体の染色面積を発現量として定量した(b)。一方、脳組織の皮質・海馬を用いて、5-HT2A 受容体についてウェスタンブロットを行った。(n=5-6)

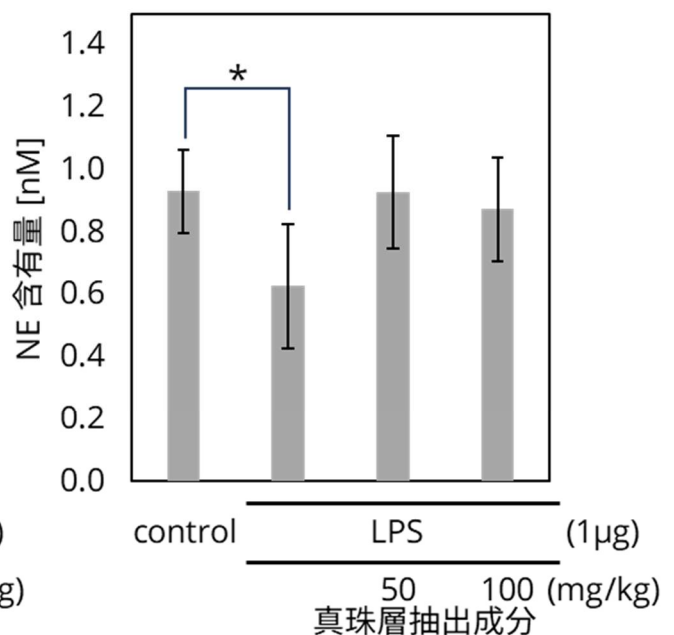
(a) 5-HT 含有量



(b) DA 含有量



(c) NE 含有量



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 16 各マウス群の線条体周辺領域におけるモノアミン含有量

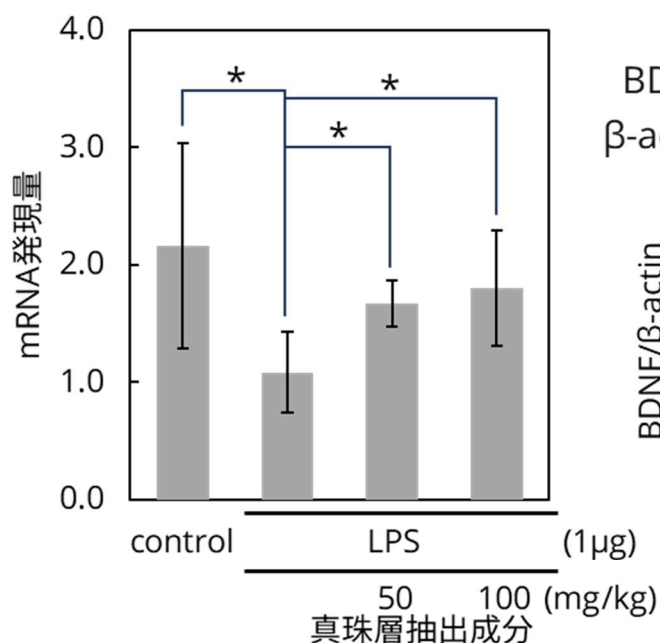
(a)セロトニン(5-HT)、(b)ドーパミン(DA)、(c)ノルエピネフリン(NE)の含有量は、蛍光 HPLC を用いて測定した。(n=5-6)

2.2.4 真珠層抽出液が 5-HT1A 受容体/CREB/BDNF 経路に与える影響

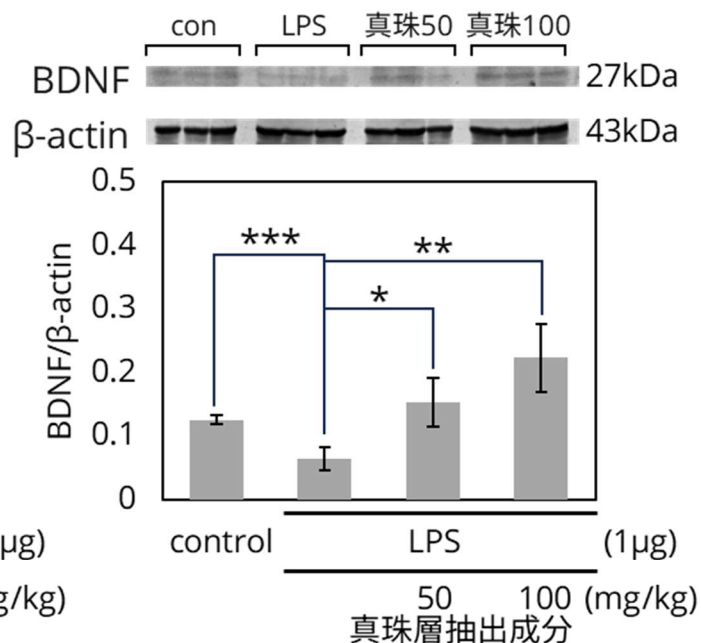
5-HT1A 受容体の活性化は、脳機能に關与する CREB のリン酸化を促進し、BDNF の発現量を増加させることが報告されている。数多くの先行研究において、BDNF の増加が抗うつ作用につながることを報告されているため、5-HT1A 受容体/CREB/BDNF 経路の活性化が真珠層抽出液の作用機序に關わるのかどうかを検討した。リアルタイム PCR およびウェスタンブロットを行った結果、LPS 群の BDNF 発現量はコントロールよりも有意に減少したが、真珠層抽出液の投与によって有意に増加することが明らかになった。(図 17(a,b)) 一方、CREB および p-CREB について調べたところ、LPS の投与によって CREB のリン酸化率がコントロール群よりも減少する傾向がみられたが、真珠層抽出液の投与によって濃度依存的に、CREB のリン酸化率が増加した。(図 17(c)) これらの結果は、真珠層抽出液が 5-HT1A 受容体を介して CREB/BDNF 経路を活性化させたことを示唆している。

次は真珠層抽出液の作用機序が 5-HT1A 受容体を介しているのかを確認するため、5-HT1A 受容体アンタゴニストを用いて、抗不安・抗うつ作用が阻害されるかどうか検討した。本研究では真珠層抽出液とともに、5-HT1A 受容体アンタゴニストである WAY-100635 を共投与し、LPS 投与の 24 時間後にオープンフィールド試験・強制水泳試験を用いて、それぞれマウスの不安症状とうつ症状を評価した。(図 18) これまでの結果と同様に、LPS 群はコントロール群よりも強い不安症状とうつ症状を示したが、真珠層抽出液を投与することで、LPS で誘発したこれら症状が抑制された。しかし、5-HT1A 受容体アンタゴニストを重ねて投与したマウスでは、強制水泳試験およびオープンフィールド試験のいずれにおいても不安症状とうつ症状が増加し、真珠層抽出液による抑制作用が阻害されることが明らかになった。これらの結果から、真珠層抽出液が 5-HT1A 受容体を介して抗不安・抗うつ作用を示すことが明らかになった。

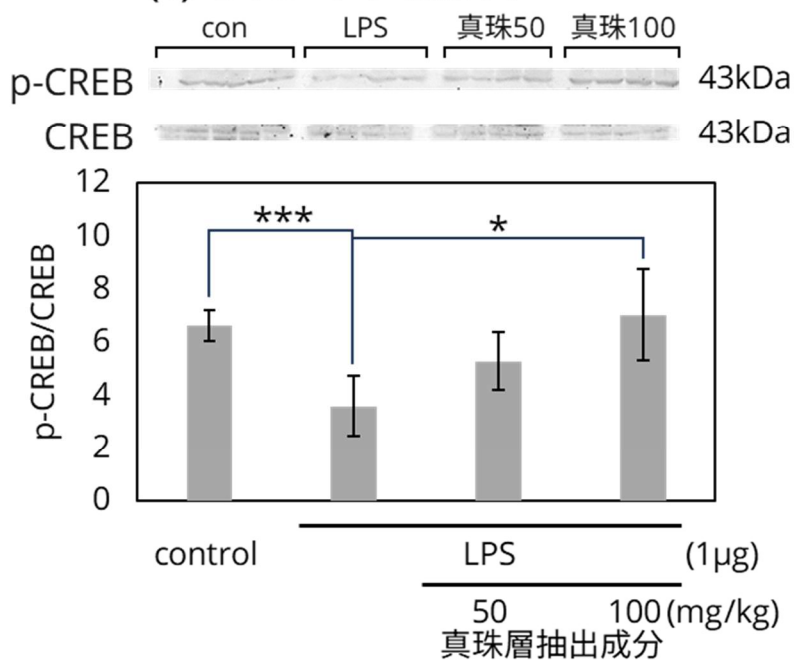
(a) BDNF mRNA 発現量



(b) BDNF タンパク質発現量



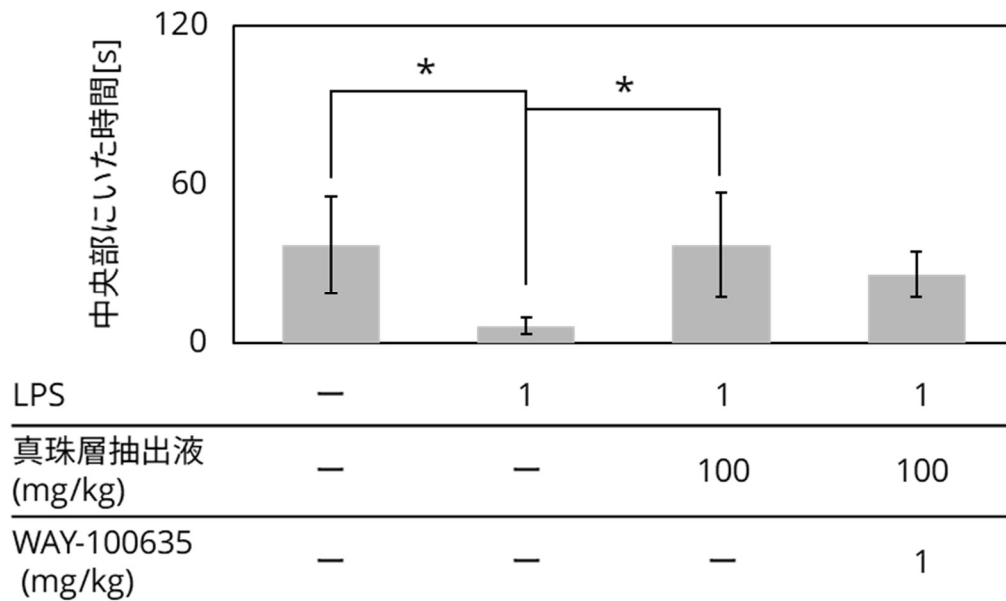
(c) CREB リン酸化率



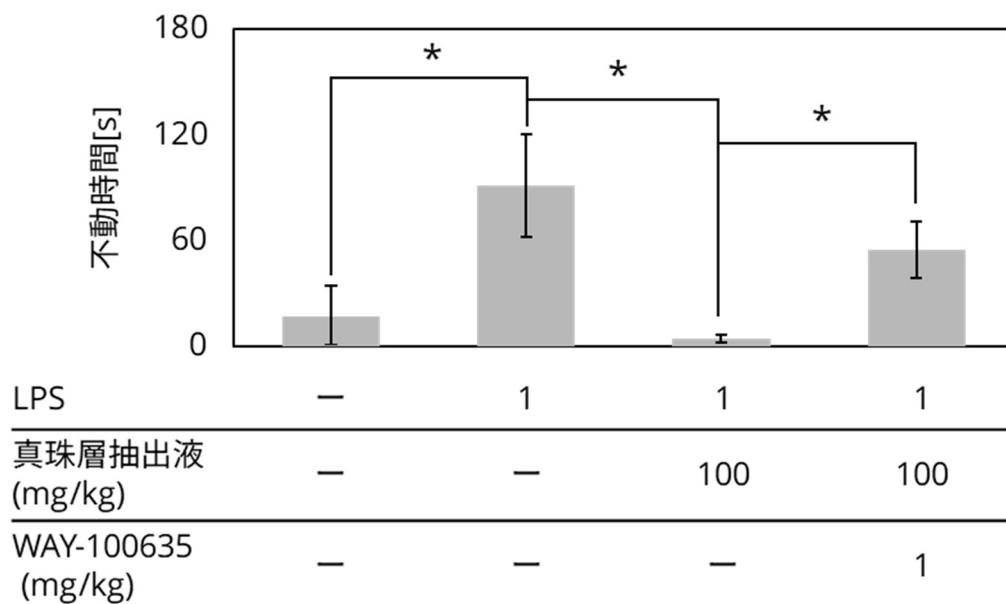
Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 17 各マウス群の脳内における BDNF の発現量および CREB のリン酸化率
BDNF および CREB、p-CREB の発現量はリアルタイム PCR(a)およびウェスタンブロット(b,c)を用いて定量した。(n=5-6)

(a) オープンフィールド試験



(b) 強制水泳試験



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 18 真珠層抽出液と 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト(WAY-100635)を共投与した場合の、抗不安・抗うつ作用の影響

(a)オープンフィールド試験では、マウスの中心部にいた時間によってマウスの不安症状を評価した。また、(b)強制水泳試験では不動時間によってマウスのうつ症状を評価した。

2.3 考察

神経炎症はうつ病の重要な要因の一つとして認識されているため、LPS で作製した不安・うつモデルマウスは多くの先行研究において広く利用されている。実際に多くのうつ病患者の脳内や血液において、IL-1 β や IL-6、TNF α などの炎症マーカーが増加していることが知られており、また SSRI や SNRI など、主要な抗うつ薬が神経炎症を抑制することも報告されている。[54] 本章では、LPS を用いて不安・うつモデルマウスを作製し、真珠層抽出成分を投与することで不安・うつ症状が抑制されることが分かった。また、真珠層投与したマウスの脳内において IL-1 β や IL-6、GFAP の発現量が有意に減少したことから、真珠層抽出成分の抗炎症作用が抗不安・抗うつ作用に寄与することが示唆された。

一方、酸化ストレスは神経炎症と密接に相関し、うつ病につながることが知られている。酸化ストレスは NLRP3 インフラマソームを活性化させることで pro-IL-1 β を成熟型 IL-1 β へプロセッシングさせ、炎症を誘導する。[55] しかし、抗酸化作用に関与する Nrf2 の活性化は HO-1 を介して NLRP3 を減少させ、LPS で誘発したうつ症状や神経炎症を抑制することが報告されている。[56] 本章では、真珠層抽出成分が LPS で誘導した過酸化脂質量の増加を抑制し、抗酸化作用に関与する転写因子である Nrf2 および Cu, Zn-SOD、Mn-SOD、Catalase、HO-1 を増加させることが分かった。したがって Nrf2 を介した抗酸化作用・抗炎症作用は、真珠層抽出成分の抗不安・抗うつ作用において重要な役割を果たしていると考えられる。

また、本章では真珠層抽出成分によって 5-HT_{1A} 受容体と 5-HT_{2A} 受容体の発現量が制御されることが分かった。アザピロンやイブサピロンなどの 5-HT_{1A} 受容体アゴニストは抗うつ作用を示すことから、5-HT_{1A} 受容体は抗不安・抗うつ作用において重要な役割を果たしていると考えられている。[57,58] また、ミアンセリンやミルタザピンなどの 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストも抗うつ作用を示すことが報告されている。[59,60] しかし、脳内のセロトニン量はいずれのマウス群においても有意な変化が見られなかった。おそらく、真珠層抽出成分は 5-HT_{1A}・2A 受容体の発現量を調節することでセロトニンに対する各受容体の感受性を制御し、下流のシグナル伝達の活性を制御していると推察される。また、SSRI や三環系抗うつ薬は抗炎症作用も示すことから [61,62]、5-HT_{1A}・2A 受容体の発現量制御によって抗炎症作用につながっている可能性もある。

本章では、真珠層抽出成分が 5-HT_{1A} 受容体/CREB/BDNF 経路を活性化させることがわかった。BDNF はうつ病患者の脳皮質・海馬において減少するが、抗うつ薬の慢性投与によって増加することから、うつ病の有力な要因であると考えられている [63]。また、クルクミン誘導体である J147 は 5-HT_{1A} 受容体/CREB/BDNF 経路を活性化させることで抗うつ作用を示すことから [64]、この経路の活性化は真珠層抽出成分の抗不安・抗うつ作用において重要な役割を果たしていると考えられる。実際に当研究室では以前、真珠層抽出成分が CREB のリン酸化を介して BDNF を増加させることを報告しており [43,44]、本研究の結果と一致している。

本章のまとめとして、LPS 誘発不安・うつモデルマウスに対して真珠層抽出成分を腹腔内投与することで抗不安・抗うつ作用を示すことが明らかになった。また、作用メカニズムとして Nrf2 を介した抗酸化作用および抗炎症作用、5-HT_{1A}・2A 受容体の発

現量制御、BDNF の増加が関連することが示された。これは真珠層抽出成分が複数の生理活性作用を介して抗不安・抗うつ作用を示すことを示唆している。(図 19)

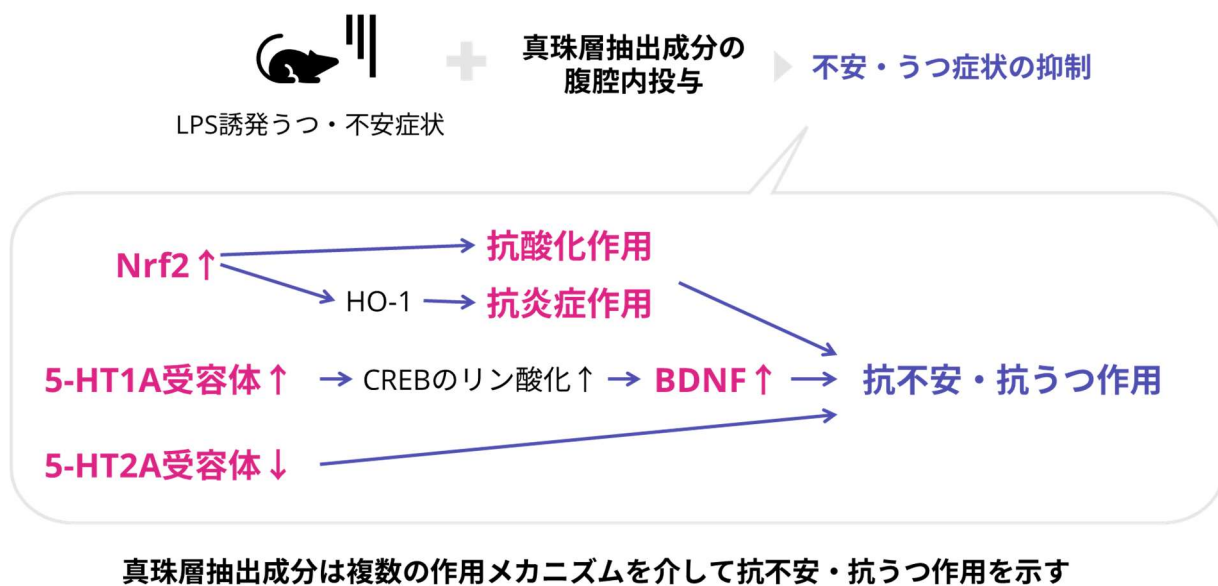


図 19 第 1 章のまとめ

第3章 SAMP8 マウスの老化に伴う BPSD 様症状に対する真珠層抽出成分の効果

老化が進むとうつ病になる傾向がみられ、認知症の発症リスクが増加する。アルツハイマー病をはじめとする認知症では記憶障害などの中核症状に伴って、不安症状やうつ病、易怒性、徘徊行動などの行動・心理的症状(BPSD)が併発する[65,66]。認知症に関する研究の多くが中核症状に焦点を当てているが、認知症患者の 80%以上では BPSD が併発し、介護者の大きな負担になっている。一方、当研究室ではすでに、真珠層抽出成分が D-ガラクトースで誘発した脳老化・皮膚老化を抑制することを、in vivo において明らかにしている[67]。老化に伴う不安・うつ症状について検討するため、老化促進マウス(SAMP8)に着目した。

SAMP8 は通常よりも老化が早く進み、老化に伴って記憶障害や BPSD 様症状を示すことから、認知症に酷似した病変を示す老化モデルとして広く用いる。[68,69] したがって、第 3 章では SAMP8 の老化に伴う不安・うつ症状に対しても真珠層抽出成分が効果を示すかどうかを検討した。

3.1 実験方法

3.1.1 動物実験

➤ 使用器具・試薬

- ・ 4 週齢 SAMP8(日本クレア)
- ・ SAMR1 マウス(日本クレア)
- ・ AIN93G 基本食

➤ マウスのエサの作製

1. 2.1.1 と同様に、真珠層抽出成分を作製した。
2. 以下の組成で SAMP8 および SAMR1 のエサを作製し、給餌するまで冷蔵庫で保存した。

	SAMR1 (%)	SAMP8 (%)	真珠 125 (%)	真珠 250 (%)
カゼイン	20	20	20	20
コーンスターチ	15	15	15	15
セルロース	5	5	4.85	4.7
ミネラル	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミンミックス	1	1	1	1
L-システイン	0.3	0.3	0.3	0.3
酒石酸水素コリン	0.2	0.2	0.2	0.2
大豆油	5	5	5	5
スクロース	50	50	50	50
真珠層抽出成分	0	0	0.15	0.3
合計	100	100	100	100

➤ 方法

7. 4週齢の SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウス 25 匹を 4 つのケージ(1 ケージ 5 匹)に分け、1 週間順化させた。
8. 順化後、SAMR1 群および SAMP8 群には AIN93G 基本食、真珠投与群には真珠層抽出成分を 125mg/kg、250mg/kg 混ぜたものを、毎日 6 か月間与えた。
9. 6 か月後に行動薬理試験を用いてマウスの BPSD 様行動を評価し、最後に解剖を行った。

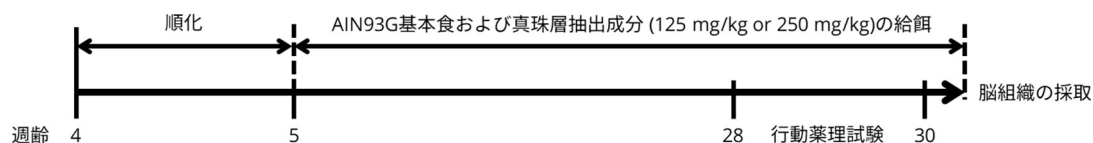


図 20 第 3 章の動物実験スケジュール

3.1.2 行動薬理試験

オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、強制水泳試験、スクロース嗜好性試験を 2.1.3 と同じ方法で行い、マウスの不安・うつ症状を評価した。本章で行った他の行動薬理試験については以下のとおりである。

● 新奇環境摂食抑制試験

➤ 使用器具

- ・マウス用飼育ケージ(縦 20cm×横 30cm×高さ 10cm)
- ・マウスの餌(オリエンタル酵母)
- ・ビデオカメラ
- ・照明

➤ 手順

1. 実験の前日にマウスを絶食させた。
2. マウス用飼育ケージの上から照明を照らし、上から撮影するようにビデオカメラを設置した。また、マウスの餌をケージの端に置いた。
3. マウスをケージ内に入れ、餌を食べ始めるまでの時間を測定した。

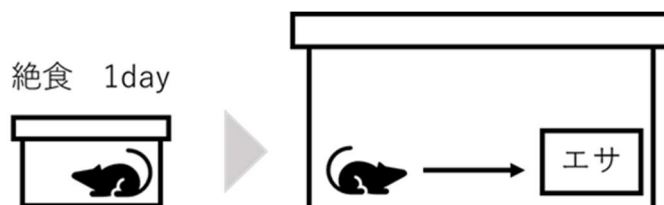


図 21 新規環境摂食抑制試験

● ソーシャルインタラクション試験

➤ 使用器具

- ・アルミ製円筒容器(直径 35cm×高さ 40cm)
- ・マッキーペン(黒)
- ・ビデオカメラ
- ・照明

➤ 手順

1. あらかじめマウスのペアを組み、区別がつけられるように、一方のマウスにマッキーペンで印をつけた。
2. 上から照明を照らし、上から撮影されるようにビデオカメラを設置した。
3. 容器内に 1 組のマウスを入れ、5 分間自由に探索させた。
4. マウス同士の攻撃行動をとった回数・時間、匂いを嗅いだ回数・時間、追いかけた回数・時間を測定した。

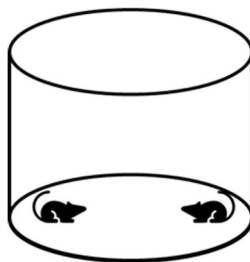


図 22 ソーシャルインタラクション試験

● 概日リズムの評価

➤ 実験器具

- ・ 回転式運動量測定装置
- ・ 遮光用段ボール箱
- ・ 照明
- ・ ビデオカメラ

➤ 手順

1. マウスを回転式運動量測定装置に入れ、回転数を撮影し始めた。
2. 実験開始から 12 時間後に装置を遮光し、回転数が見えるように照明を照らしながら回転数を撮影した。
3. 実験開始から 24 時間後にマウスの運動量の測定を終了した。
4. 2 時間毎のマウスの運動量を算出し、24 時間の運動量変化、明期(0~12 時間後)の運動量、暗期(12~24 時間後)の運動量・運動量割合を算出した。また、暗期の運動量割合は以下の式から算出した。

$$\text{暗期の運動量割合}[\%] = \frac{\text{暗期の運動量}[\text{回}]}{\text{明期の運動量}[\text{回}] + \text{暗期の運動量}[\text{回}]} \times 100$$

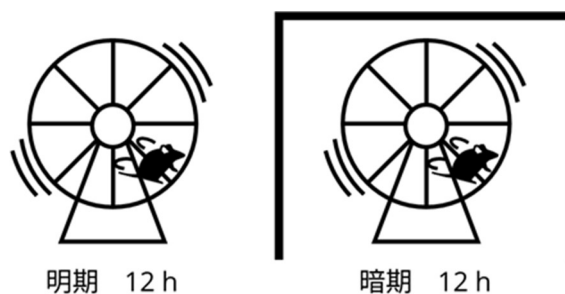


図 23 概日リズムの測定

3.1.3 リアルタイム PCR

本章のリアルタイム PCR は 2.1.4 と同様の方法で行った。また、使用したプライマーは以下のとおりである。

Primer	sequence(5`to3`)
IRE1-s	F-CGTGCTTCGCATCTTCTGCA
	R-CAGCGATCTAGGTCTGGGCT
PERK-s	F-CTGCTGCTTCTGTTCCTGCT
	R-AGCCAAACACTGTCTCCGAC
ATF6	F-ATCGCTGTGCTGAGGAGACA
	R-TCTCTGACACCACCTCGTCC
eIF2 α	F-GCATTCTTCGCCATGTTGCTG
	R-GCATCGTAGGCACCGTATCC
CHOP	F-CAACAGAGGTCACACGCACA
	R-TTCATGCGTTGCTTCCCAGG
ATF4	F-ACTGGCGAGTGTAAGGAGCT
	R-CCCTTGCCCTTACGGACCTCT
BDNF	F-AGAGCTGTTGGATGAGGACCAG
	R-CAAAGGCACTTGACTACTGAGCA
β -actin	F-GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	R-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

3.1.4 RNA シーケンス解析

➤ 使用器具・試薬

- ・液体窒素(室蘭工業大学)
- ・RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- ・Bioanalyzer (Agilent)
- ・NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB)
- ・NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB)
- ・Illumina NextSeq platform

➤ 手順

1. 液体窒素を用いて採取した脳組織を瞬時に凍結させ、total RNA を抽出するまで-80°Cで保存した。
2. RNeasy Mini Kit を用いて、脳組織から Total RNA を抽出し、Bioanalyzer を用いて Total RNA の安定性を確認した。
3. NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module および NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina を用いて RNA-seq ライブラリを構築し、サンプルごとに Illumina NextSeq platform を用いてシークエンスを読み取った。
4. シークエンスファイルから TPM 値を算出し、そのうち TPM<1 の遺伝子を除外した。
5. それぞれの TPM 値を log2 倍率変化に変換した後、少なくとも 1.2 倍の変化があり、p 値 < 0.01 の mRNA を発現変動遺伝子 (DEG) とした。
6. 遺伝子発現パターンを比較するため、各マウス群におけるヒートマップを作製した。また、ToppGene Suite (<https://toppgene.cchmc.org>)を用いてマウス群間における遺伝子オントロジー(GO)を解析した。

3.1.5 電気泳動およびウェスタンブロット

本項目における電気泳動およびウェスタンブロットは、2.1.6 および 2.1.7 と同様の方法で行った。また、使用した一次抗体は以下のとおりである。

抗体	会社	抗体	会社
β -actin antibody (Rabbit 血清)		NF-kB antibody	biorbyt
Bax antibody	biorbyt	IL-6 antibody	biorbyt
Bcl2 antibody	biorbyt	TNF α antibody	biorbyt
PERK antibody	biorbyt	IL-1 β antibody	biorbyt
p-PERK antibody	biorbyt	GFAP antibody	biorbyt
GPR78 antibody	biorbyt	GSK-3 β antibody	biorbyt
ATF4 antibody	biorbyt	p-GSK-3 β (ser9) antibody	biorbyt
CHOP antibody	biorbyt	p-tau antibody	biorbyt
JNK antibody	biorbyt	5-HT1A antibody	biorbyt
p-JNK antibody	biorbyt	NLRP3 antibody	biorbyt

3.1.6 統計解析

各データは 4~5 匹/群のマウスから得られ、平均値±標準偏差として算出したものである。統計解析は一元配置分散分析(ANOVA)と Fisher's exact test を用いて行い、p 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。すべての統計解析はエクセル統計ソフトウェア (BellCurve)を用いて行われた。

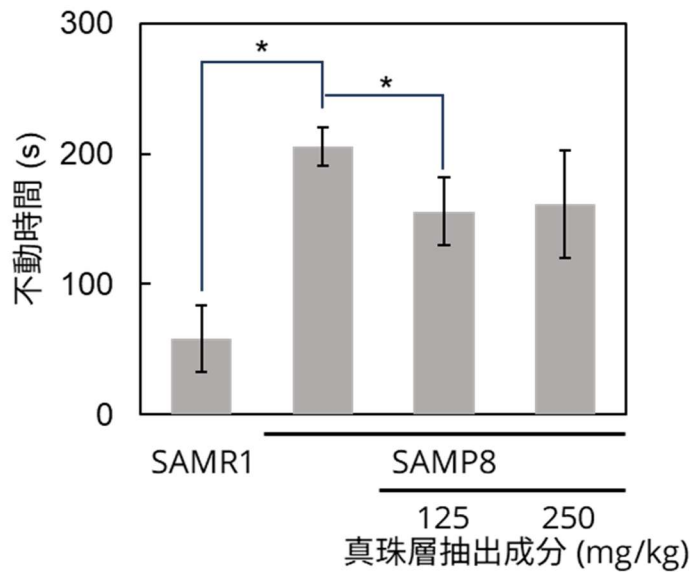
3.2 実験結果

3.2.1 SAMP8 マウスの不安・うつ行動に対する真珠層抽出成分の効果

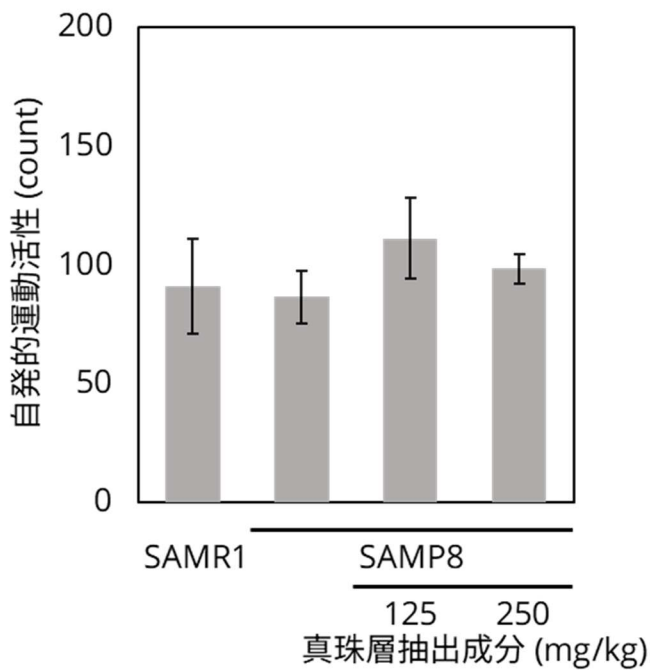
SAMP8 マウスは老化に伴ってうつ症状および不安症状を示すことが知られているため、まずは強制水泳試験およびスクロース嗜好性試験を用いてマウスのうつ症状を評価した。強制水泳試験では、SAMP8 の不動時間が SAMR1 よりも 4 倍近くまで有意に増加し、老化に伴ううつ症状が認められた。真珠層抽出成分を投与したマウスでは、250mg/kg の濃度では有意差な変化が見られなかったものの、125mg/kg の投与したマウスにおいて不動時間の有意な減少がみられた。(図 24(a)) オープンフィールド試験ではいずれのマウス群においても自発的運動活性の変化が見られなかったことから、真珠層抽出成分による不動時間の減少はマウスの運動活性によるものでないことが裏付けられた。(図 24(b)) 一方、スクロース嗜好性試験では SAMP8 のスクロース嗜好性がコントロールよりも 20% 近く減少したが、真珠層抽出成分の投与によって 80% 近くまで増加した。(図 24(c)) これらの結果は、真珠層抽出成分が SAMP8 の老化に伴ううつ症状を抑制したことを示している。

次に高架式十字迷路試験、新奇環境摂食抑制試験を用いて、マウスの不安症状を評価した。高架式十字迷路試験を行ったところ、SAMP8 では SAMR1 よりもオープンアームにいた時間および入った回数がともに減少し、老化に伴う不安症状が認められた。しかし、真珠層抽出成分を投与することでオープンアームにいた時間および入った回数がともに増加したことから、真珠層抽出成分が抗不安作用を示すことが明らかになった。(図 25(a,b)) この結果をさらに確認するため新奇環境摂食抑制試験を行ったところ、SAMP8 のエサを食べ始めるまでの時間は 20~30 秒であったが、真珠層投与マウスではこの時間が 10 秒近くとなり、真珠層抽出成分が SAMP8 の不安症状を抑制することが確認された。(図 25(c))

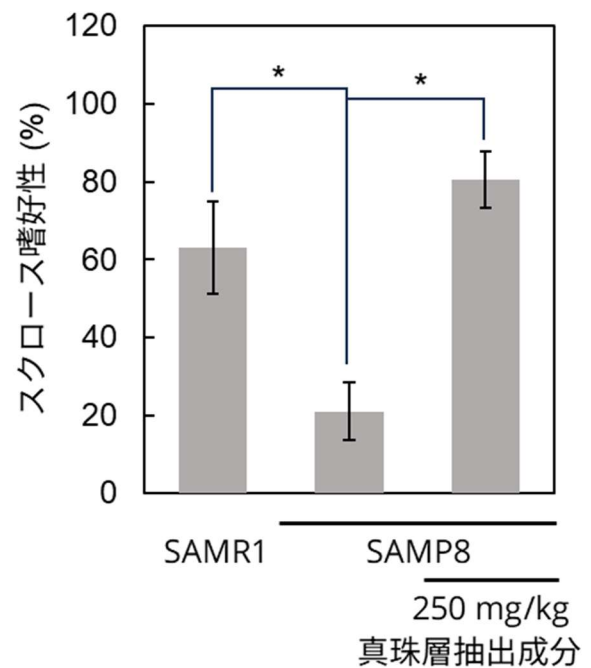
(a) 強制水泳試験



(b) オープンフィールド試験



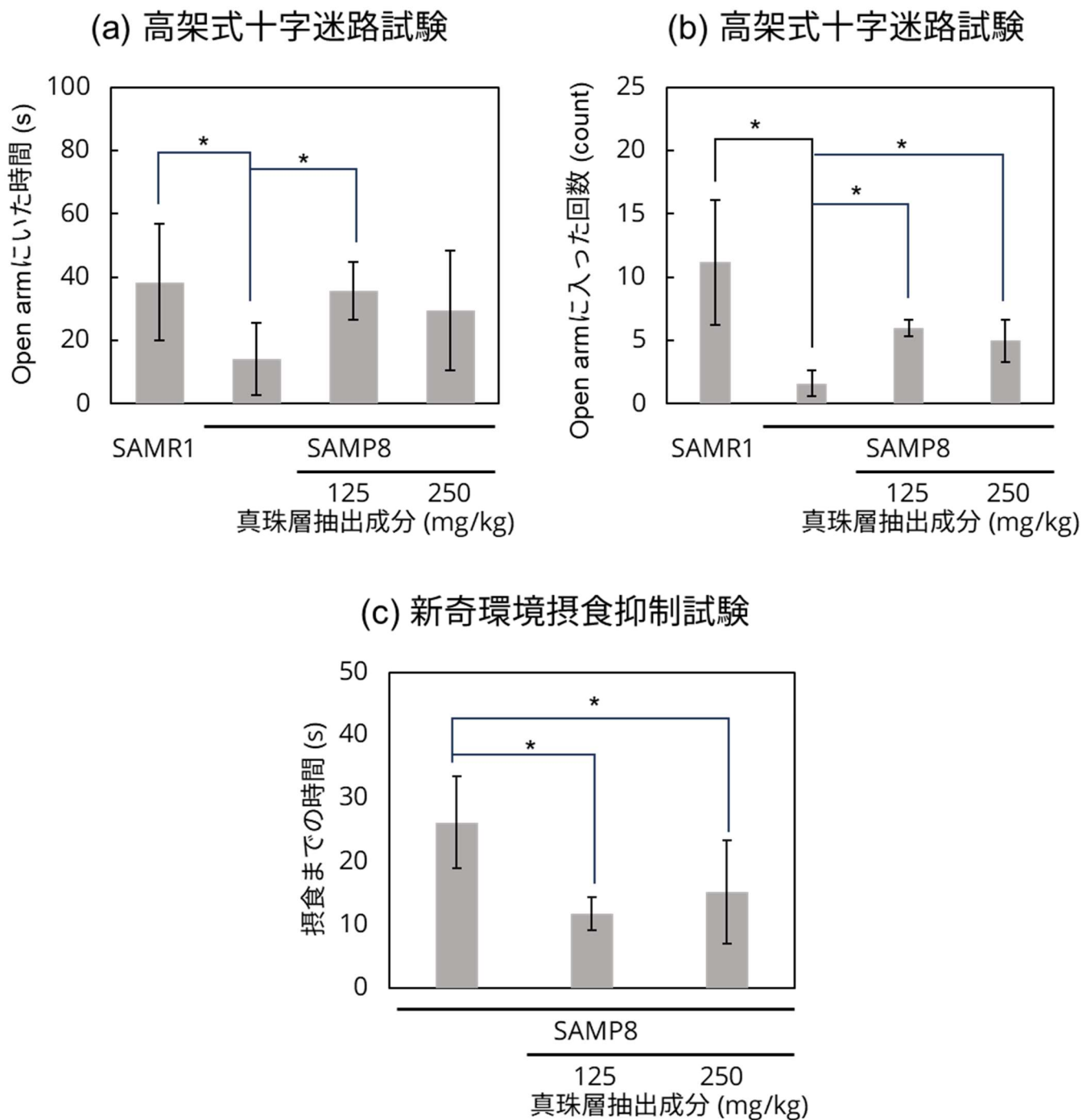
(c) スクロース嗜好性試験



Fisher`s exact tests * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.005

図 24 SAMP8 マウスにおけるうつ症状に対する真珠層抽出成分の効果

各マウス群におけるうつ症状は(a)強制水泳試験、(c)スクロース嗜好性試験を用いて評価した。また、(b)オープンフィールド試験を用いてマウスの自発的運動活性を評価した。(n=5)



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 25 SAMP8 マウスの不安症状に対する真珠層抽出成分の効果
マウスの不安症状を評価するため、高架式十字迷路試験および(c)新規環境摂食抑制試験を行った。高架式十字迷路試験では、(a)オープンアームにいた時間および(b)入った回数をそれぞれ測定した。(n=5)

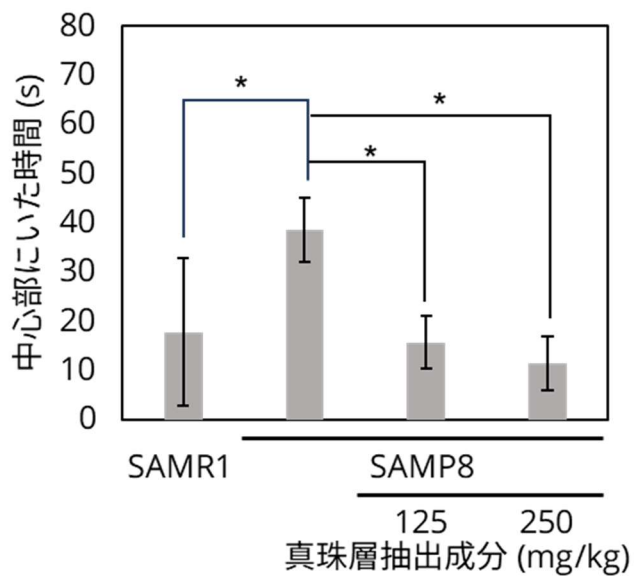
3.2.2 SAMP8 マウスの攻撃行動・概日リズムに対する真珠層抽出成分の効果

認知症患者の多くでは攻撃性や徘徊行動もみられる。統計調査によると、攻撃性は認知症患者の 30~50%[70]、徘徊行動は 50~60%[71]で併発するが、介護者にとってこれらの症状は BPSD の中でも特に大きな負担になっている。また、SAMP8 においても攻撃行動や、徘徊行動の要因となる概日リズムの乱れがみられることから、真珠層抽出成分が SAMP8 マウスの攻撃行動や概日リズムにも影響を与えるかどうか検討した。

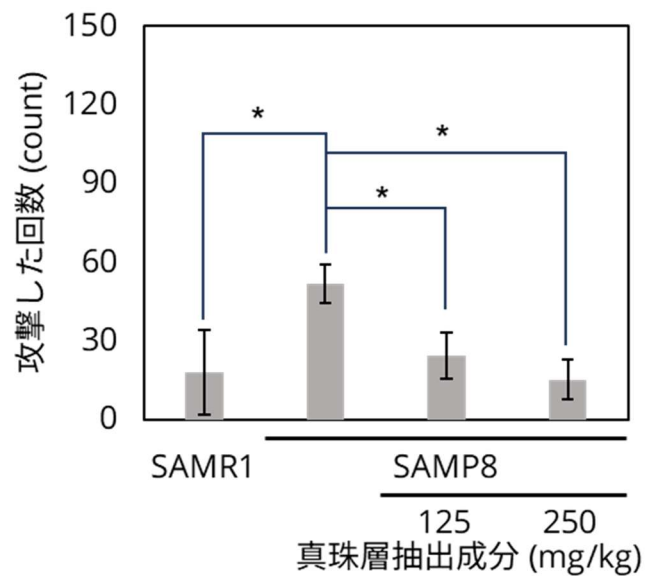
マウスの攻撃性を評価するため、ソーシャルインタラクション試験を行った。各マウス群における攻撃した回数と時間を測定したところ、SAMP8 マウスでは攻撃行動した回数・時間がコントロールよりも増加したが、真珠層抽出成分によってコントロール近くまで減少した。(図 26(a,b)) これらの結果は、真珠層抽出成分が SAMP8 マウスの攻撃性を抑制することを示している。

一方、マウスの概日リズムを評価するため、24 時間の自発的運動活性を明期(9:00-21:00)および暗期(21:00-9:00)に分けて測定した。マウスは夜行性であるため暗期に活発になり、明期では活動しない概日リズムを示す。SAMR1 マウスでは暗期の自発的運動活性が大部分を占め、正常な概日リズムを示したのに対し、SAMP8 マウスでは活動期が逆転し、概日リズムが乱れていることが認められた。しかし、真珠層抽出成分を投与することで活動期のバランスが正常に戻った。(図 26) これらの結果は、真珠層抽出成分が SAMP8 マウスにおける概日リズムの乱れを抑制することを示している。

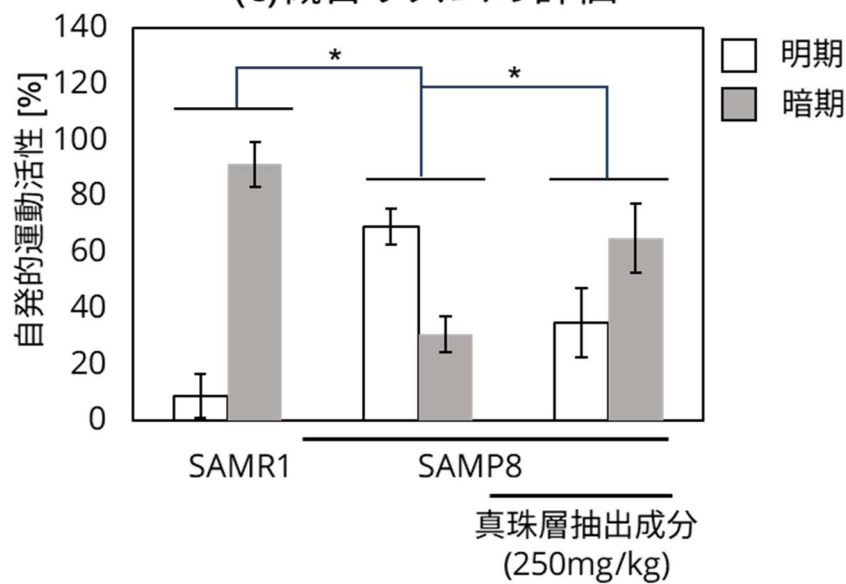
(a) ソーシャルインタラクション試験



(b) ソーシャルインタラクション試験



(c) 概日リズムの評価



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

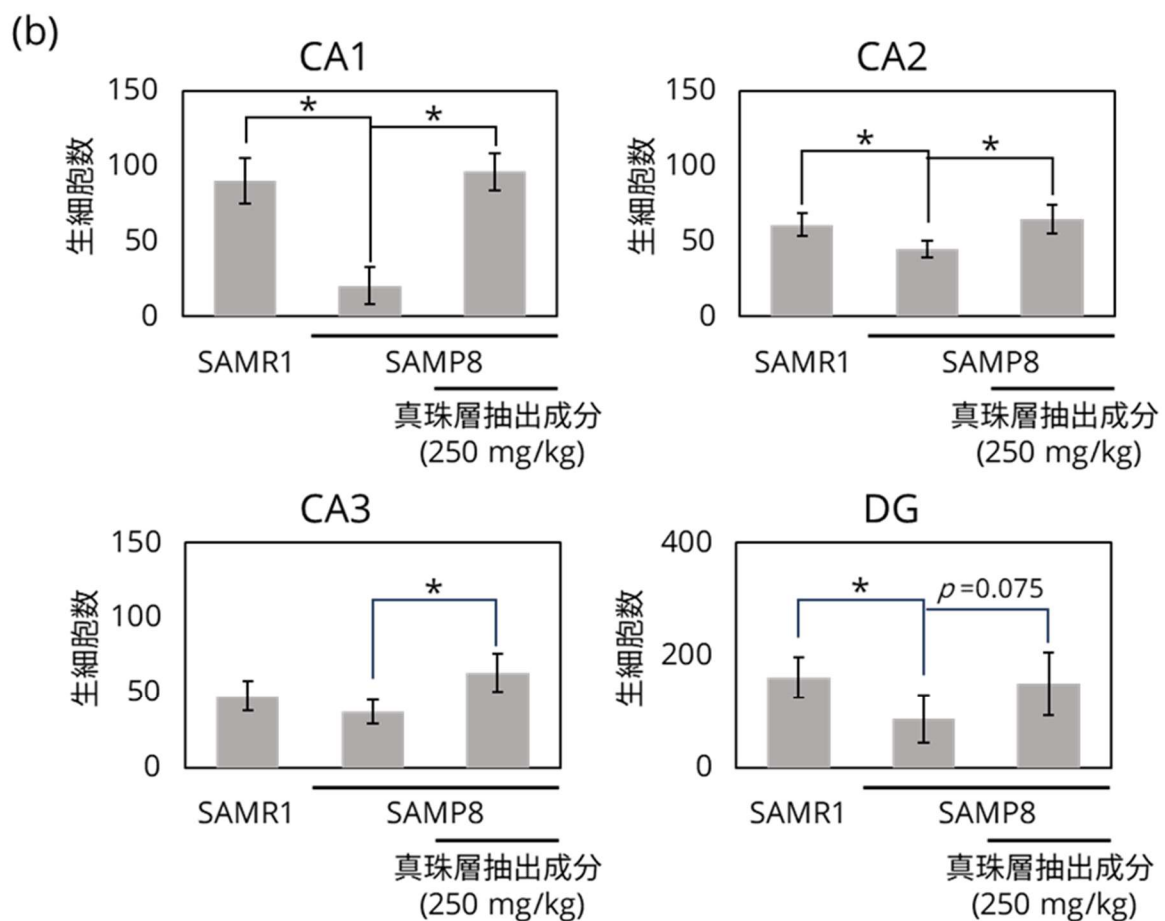
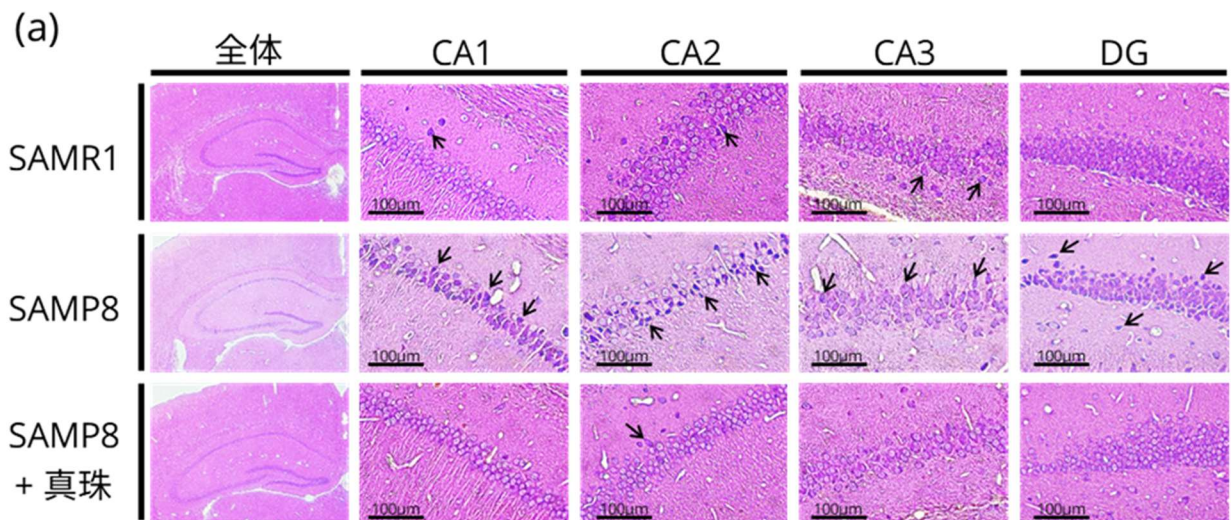
図 26 SAMP8 マウスにおける攻撃行動・概日リズムに対する真珠層抽出成分の効果
各マウス群における攻撃行動はソーシャルインタラクション試験を用いて評価し、(a) 攻撃した時間、(b) 攻撃した回数をそれぞれ測定した。また、(c) マウスの概日リズムは 24 時間の自発的運動活性を測定することで評価した。

3.2.3 老化に伴う神経細胞死に対する真珠層抽出成分の効果

行動薬理試験の結果から、真珠層抽出成分は SAMP8 マウスの BPSD 様症状にも有効であることが分かった。次は作用機序を明らかにするため、海馬領域における神経変性について検討した。マウスの脳組織切片を用いて HE 染色を行ったところ、SAMP8 マウスでは明らかな神経変性が観察されたが、真珠層抽出成分を投与することで生細胞数が有意に増加し、老化に伴う神経変性が抑制されることが確認された。(図 27)

また視床下部や偏桃体も不安・うつ症状に関わるため、これらの領域についても検討した。(図 28,29) 海馬の結果と一致して、視床下部・偏桃体においても SAMP8 マウスで強い神経変性が確認されたが、真珠層投与によって生細胞数が SAMR1 近くまで回復した。

これらの結果をさらに確認するため、アポトーシスに関与する Bax および Bcl2 について免疫組織染色を行った。Bax はアポトーシスを誘導するのに対し、Bcl2 は抗アポトーシスタンパク質として機能する。免疫組織染色の結果、海馬 CA1、CA2、歯状回において Bax の発現量が SAMP8 で増加し、真珠層投与によって減少することが分かった。(図 30) 一方、Bcl2 については CA2、CA3、DG 領域において真珠層投与による発現量増加が確認された。(図 31) また、神経保護に重要な BDNF の mRNA 発現量も真珠層抽出成分によって増加することも確認している。(図 32) これらの結果から、真珠層抽出成分は神経保護作用によって SAMP8 マウスの老化に伴うアポトーシスを抑制することが明らかになった。

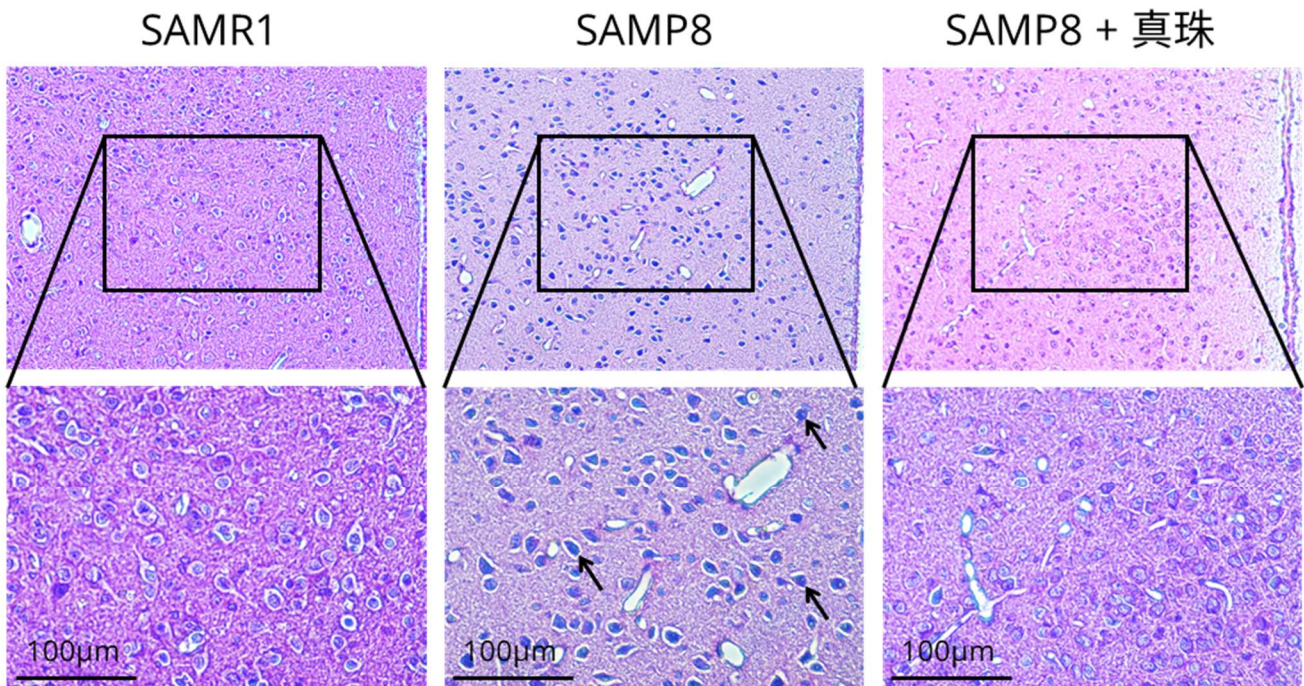


Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

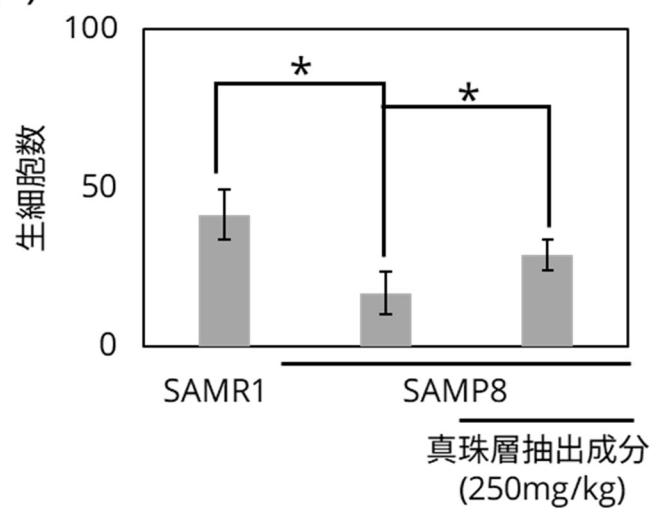
図 27 海馬領域における神経変性に対する真珠層抽出成分の効果

HE 染色を用いて、海馬領域における神経細胞を観察した。(a) 矢印は変性した神経細胞を示し、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表している。また、生存している神経細胞数を CA1、CA2、CA3、歯状回(DG)に分けて測定した。

(a) 視床下部領域



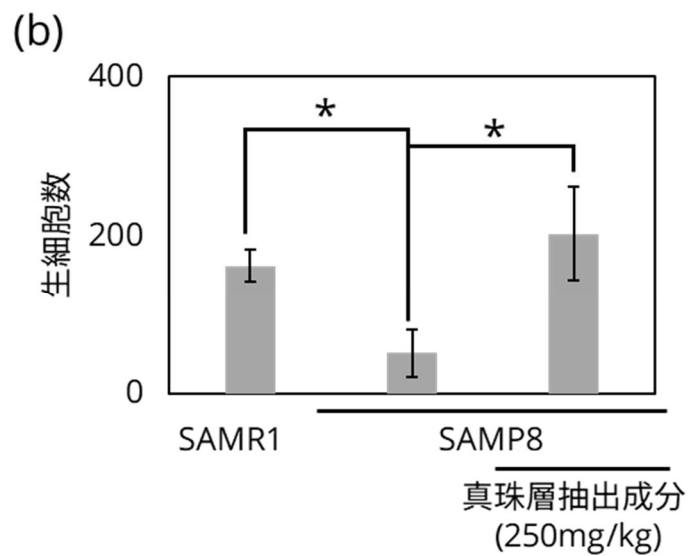
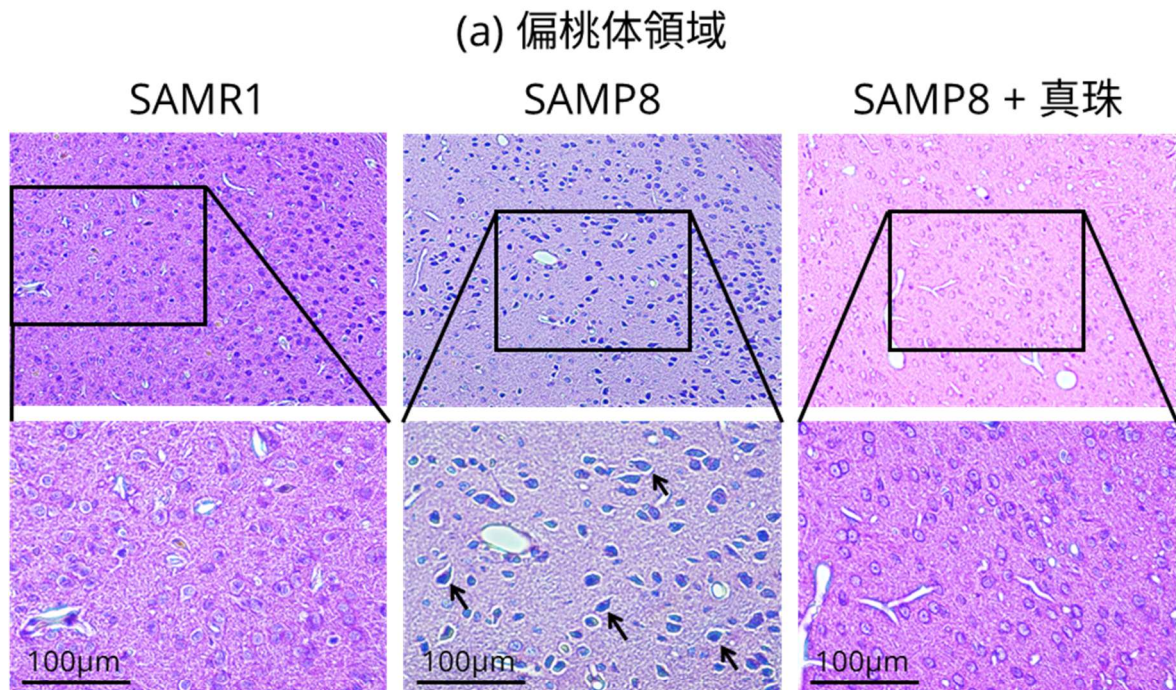
(b)



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 28 視床下部における神経変性に対する真珠層抽出成分の効果

HE 染色を用いて、視床下部領域における神経細胞を観察した。(a) 矢印は変性した神経細胞を示し、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表している。また、生存している神経細胞数を測定した。(b)



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 29 扁桃体における神経変性に対する真珠層抽出成分の効果
 HE 染色を用いて、扁桃体領域における神経細胞を観察した。(a) 矢印は変性した神経細胞を示し、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表している。また、生存している神経細胞数を測定した。(b)

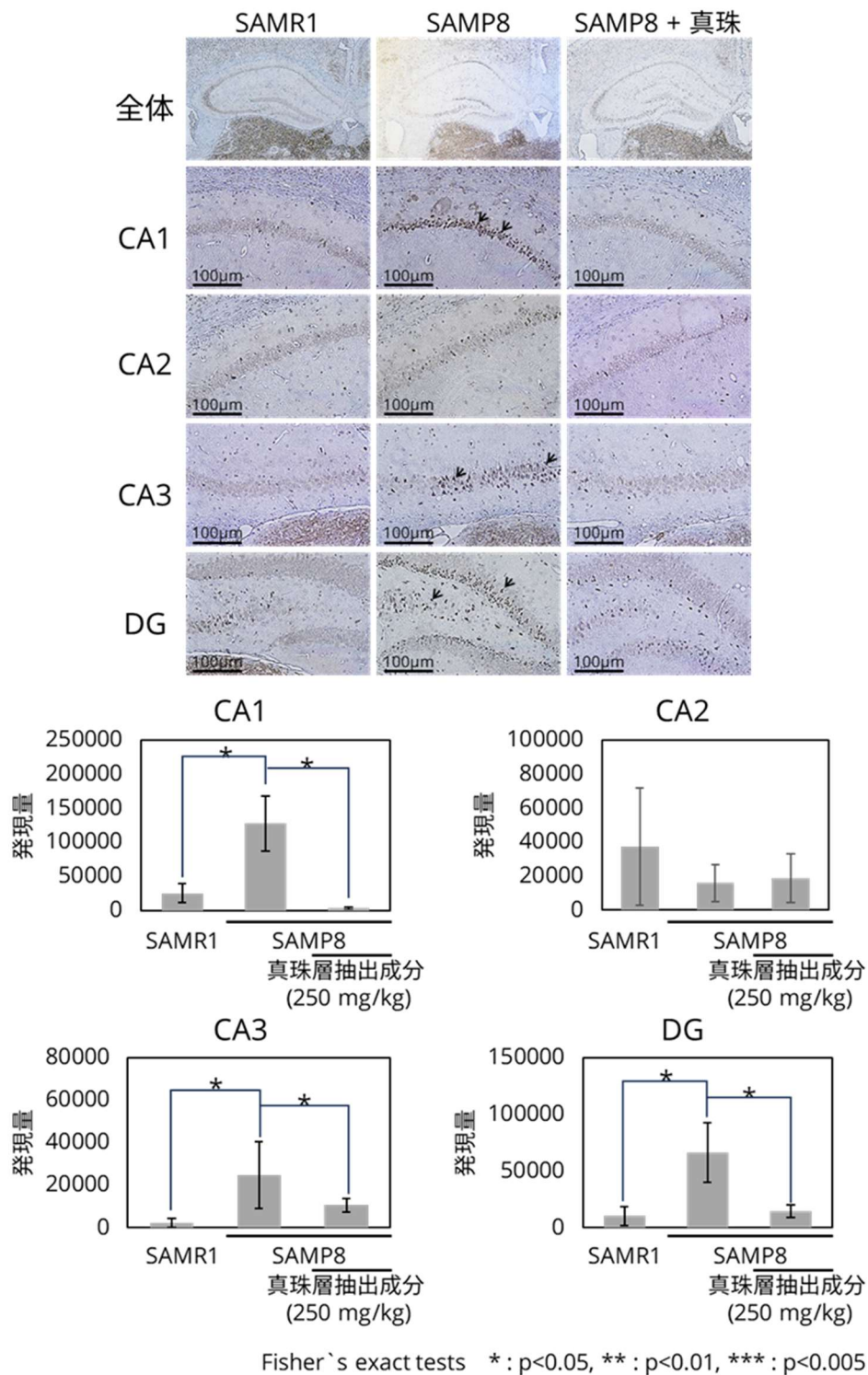


図 30 Bax に対する海馬領域の免疫組織染色
矢印は陽性の神経細胞を示し、スケールバーは 100 μ m を表している。それぞれの領域における発現量は、ImageJ を用いて定量した。

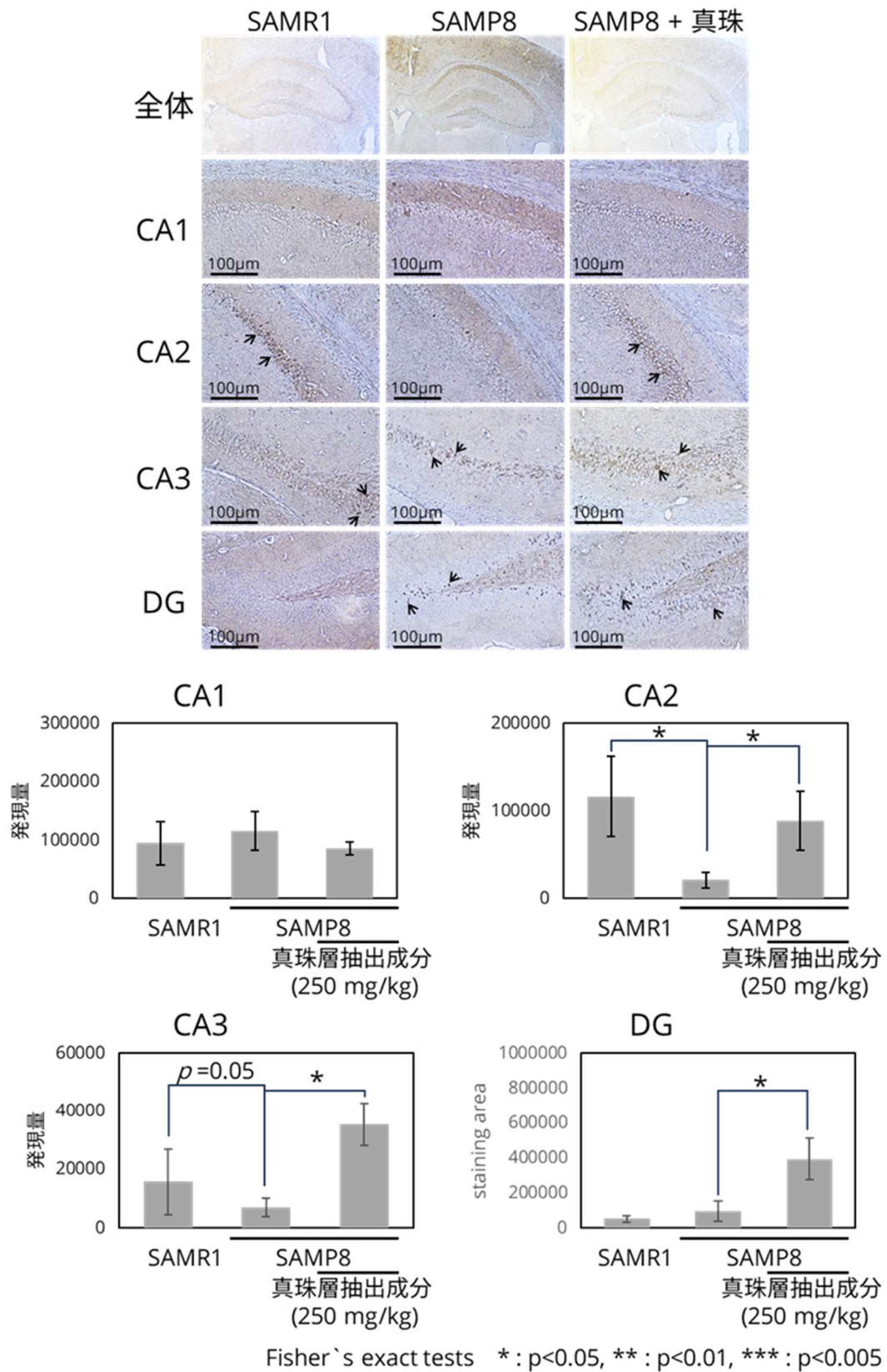
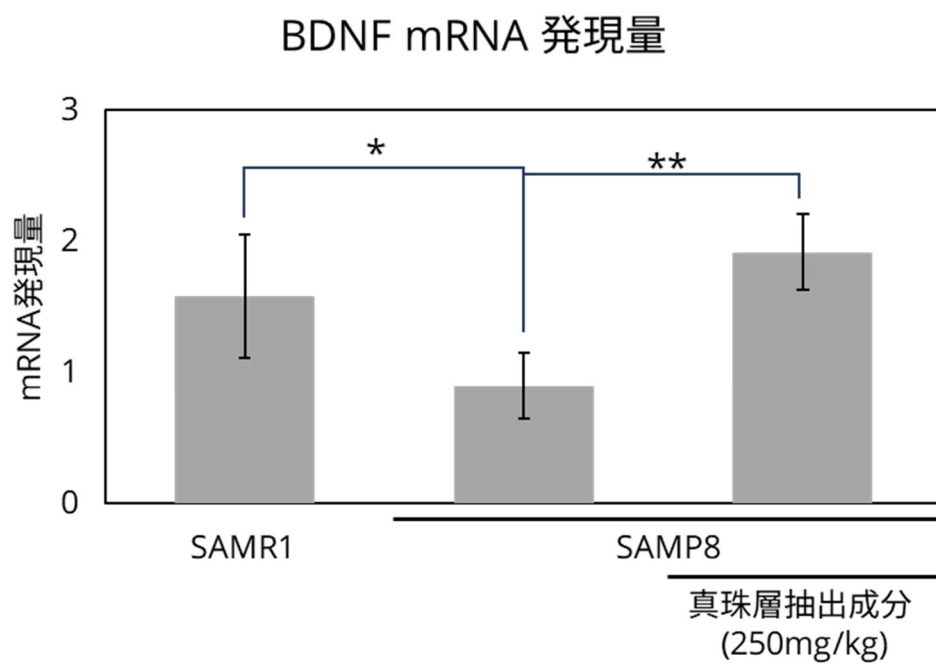


図 31 Bcl2 に対する海馬領域の免疫組織染色
矢印は陽性の神経細胞を示し、スケールバーは 100 μ m を表している。それぞれの領域における発現量は、ImageJ を用いて定量した。



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 32 BDNF の mRNA 発現量

各マウス群における mRNA 発現量はリアルタイム PCR を用いて測定し、 β -actin に対して標準化した。(n=4-5)

3.2.4 RNA シークエンス解析を用いた SAMP8 マウスの脳内における遺伝子発現の検討

真珠層抽出成分の作用メカニズムさらに検討するため、マウスの脳組織を用いて RNA シークエンス解析を行った。本研究で得られた発現変動遺伝子(DEGs)は合計で 12553 個であり、SAMR1 vs SAMP8 における GEGs は 401 個、SAMP8 vs SAMP8+真珠では 317 個であった。(図 33) これらの DEGs のうち、両方の条件を満たす遺伝子群を Target genes(図 33*)とし、Target genes についてヒートマップを作製した。(図 34(a))

ヒートマップについて統計解析を行ったところ、発現パターンが異なる 4 つのクラスターが得られた。そのうち C4 クラスター(SAMP8 で発現量が増加し、真珠層投与によって減少した DEGs)に対してエンリッチメント解析を行った。(図 34(b)) 解析の結果、上位の GO term には「protein refolding」、「cellular response to unfolded protein」、「response to endoplasmic reticulum stress」など、タンパク質の折り畳みや ER ストレスに関連する生化学プロセスが示された。これは、ER ストレスやタンパク質の折り畳みに関わる mRNA 発現量が SAMP8 マウスで増加し、真珠層投与で減少することを示唆している。一方、C2 クラスター(SAMP8 で発現量が減少し、真珠層投与によって増加した DEGs)についてもエンリッチメント解析を行ったが、有意な GO term は得られなかった。

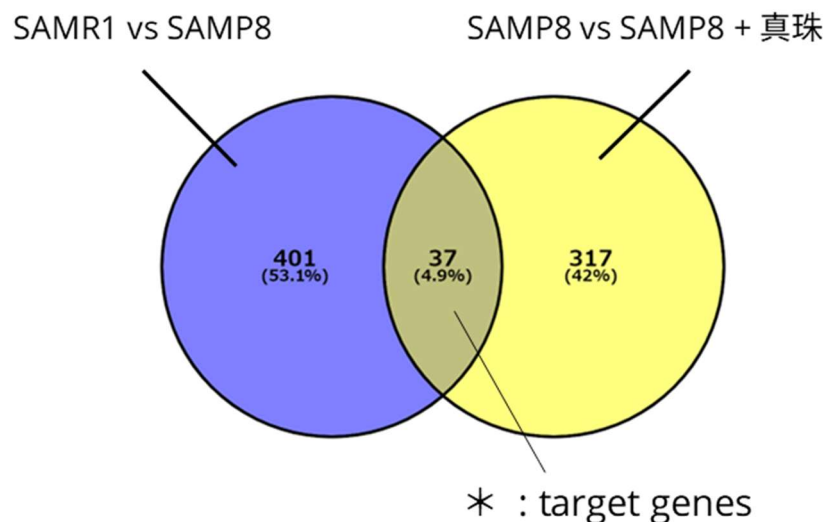
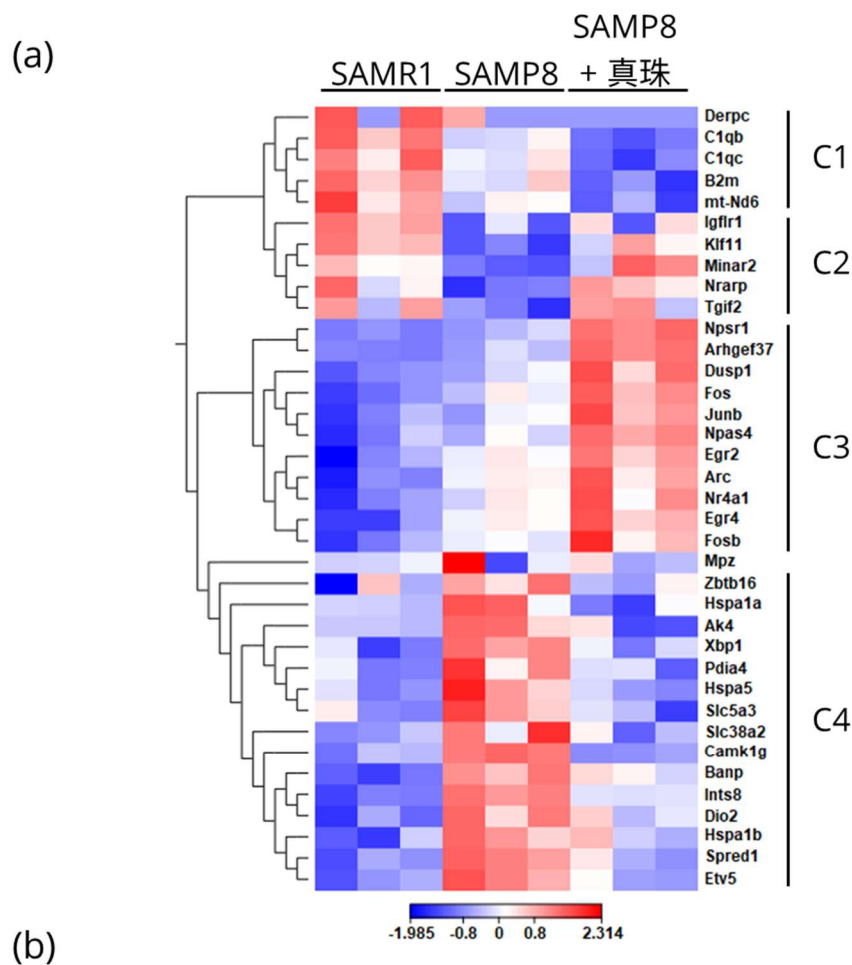


図 33 RNA シークエンス解析で使用した DEGs のベン図

青い円は SAMR1-SAMP8 の間で得られた DEGs、黄色の円は SAMP8-SAMP8+真珠の間で得られた DEGs、Target genes は両方の条件を満たす DEGs を表している。



(b)

Run Using Options Create Sublist

25 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_BP_DIRECT	protein refolding	RT		3	18.8	1.1E-4	1.4E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to unfolded protein	RT		3	18.8	1.2E-4	1.4E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	chaperone mediated protein folding requiring cofactor	RT		3	18.8	2.7E-4	2.1E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to unfolded protein	RT		3	18.8	8.6E-4	5.0E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to endoplasmic reticulum stress	RT		3	18.8	1.9E-3	8.1E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	RT		3	18.8	2.1E-3	8.1E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	male germ-line stem cell asymmetric division	RT		2	12.5	3.0E-3	8.2E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of neuron differentiation	RT		3	18.8	3.1E-3	8.2E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	protein folding	RT		3	18.8	3.2E-3	8.2E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of microtubule nucleation	RT		2	12.5	5.9E-3	1.4E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of apoptotic process	RT		4	25.0	1.2E-2	2.5E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of mitotic spindle assembly	RT		2	12.5	1.5E-2	2.9E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to interleukin-4	RT		2	12.5	2.0E-2	3.6E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	protein localization to nucleus	RT		2	12.5	3.7E-2	5.6E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	endoplasmic reticulum unfolded protein response	RT		2	12.5	3.9E-2	5.6E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of fat cell differentiation	RT		2	12.5	3.9E-2	5.6E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to glucose starvation	RT		2	12.5	4.1E-2	5.6E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to heat	RT		2	12.5	4.8E-2	6.2E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	RT		2	12.5	5.7E-2	6.8E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of ERK1 and ERK2 cascade	RT		2	12.5	6.2E-2	6.8E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to oxidative stress	RT		2	12.5	6.2E-2	6.8E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	liver development	RT		2	12.5	7.8E-2	8.1E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of cell death	RT		2	12.5	8.0E-2	8.1E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	sodium ion transport	RT		2	12.5	9.3E-2	9.0E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of transcription, DNA-templated	RT		3	18.8	9.7E-2	9.1E-1

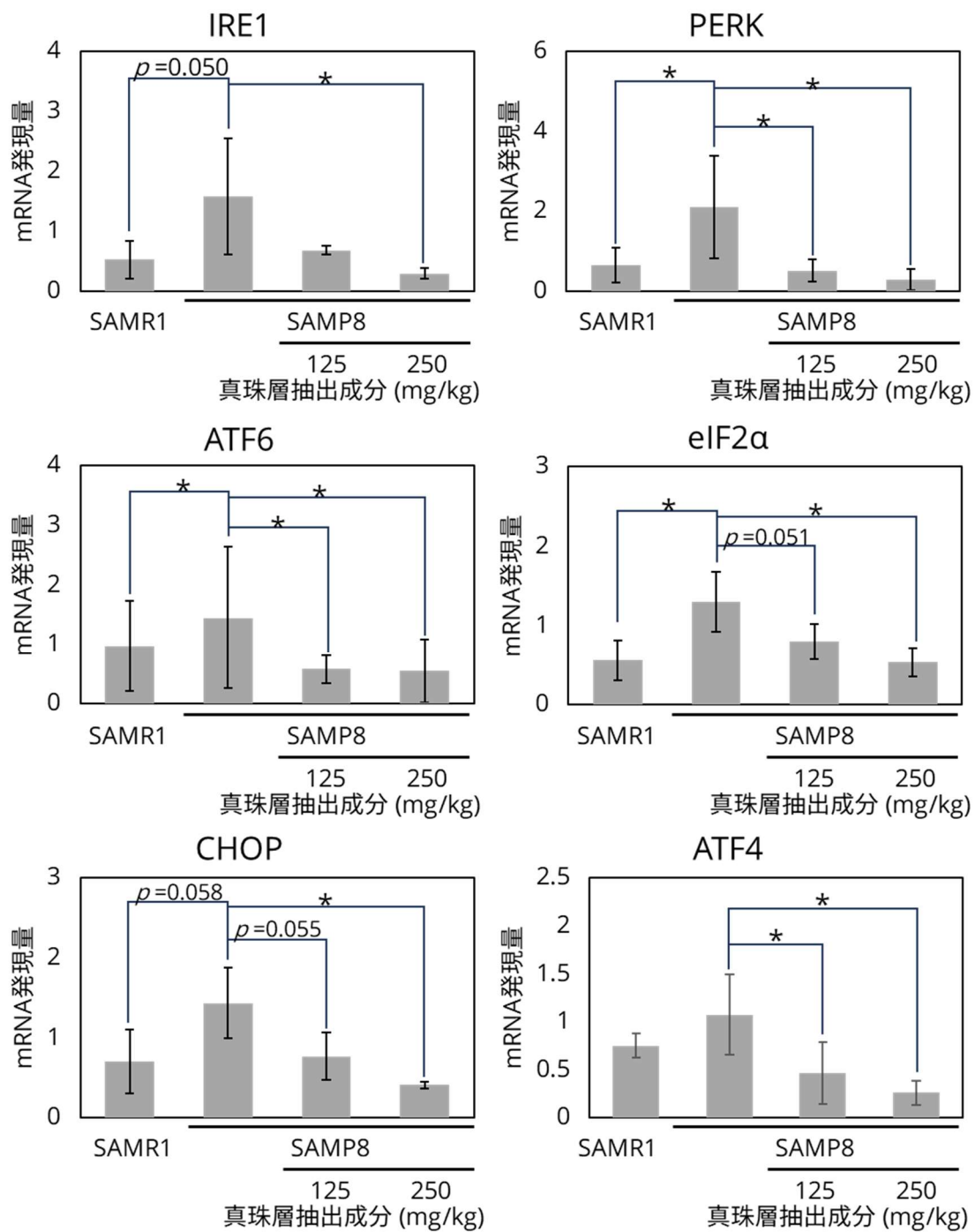
図 34 各マウス群における RNA シークエンス解析の結果

(a) Target genes おける ヒートマップを作製し、それぞれ発現パターンが異なる C1、C2、C3、C4 クラスターが得られた。また、DAVID ウェブツールを用いて、C4 クラスターの GO 解析を行った。(b)

3.2.5 真珠層抽出成分の ER ストレス抑制作用

小胞体はタンパク質の折り畳みや翻訳後修飾に関わるオルガネラであるが、折り畳みに失敗した unfolded proteins が蓄積すると小胞体ストレス反応(UPR)シグナル経路が活性し、unfolded proteins 蓄積の改善に寄与する。しかし過剰になると神経細胞死につながってしまう。また、ER ストレスはうつ病や認知症などの神経変性疾患に関わっていることが知られている。RNA シークエンス解析の結果をさらに確認するため、リアルタイム PCR を用いて ER ストレスに関わる IRE1、PERK、ATF6、eIF2 α 、CHOP、ATF4 の mRNA 発現量を調べた。RNA シークエンス解析の結果と一致して、SAMP8 マウスにおけるこれらの mRNA 発現量は有意に増加したが、真珠層抽出成分を投与することで減少した。(図 35)

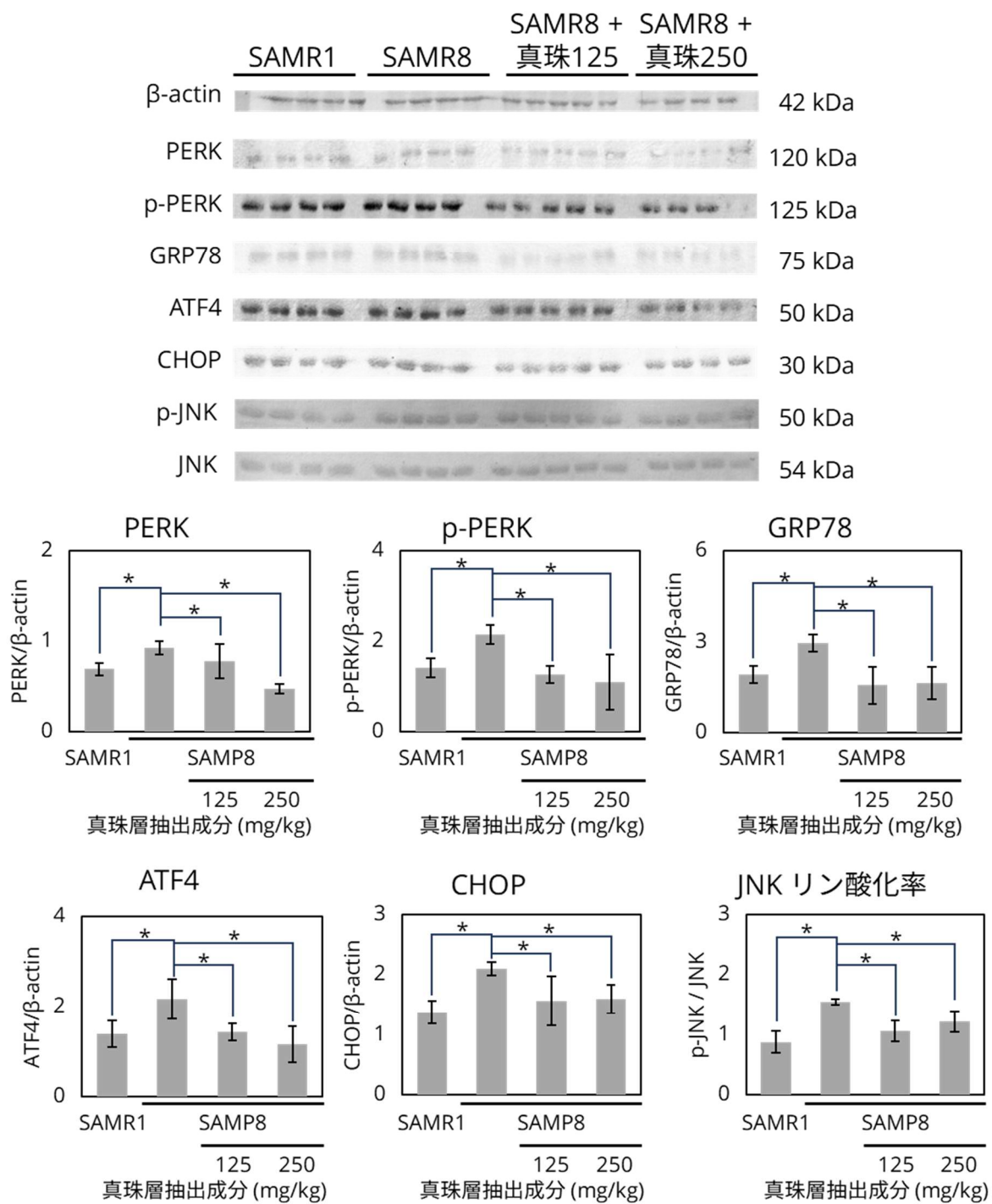
一方、ウェスタンブロットと免疫組織染色でも同様の結果が得られた。(図 36,37) いずれにおいても、ER ストレス関連タンパク質の発現量が SAMP8 で有意に増加したが、真珠層抽出成分によって減少した。これらの結果から、真珠層抽出成分は SAMP8 マウスの ER ストレスを抑制することが示された。



Fisher's exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 35 ER ストレスに関わる mRNA 発現量

各マウス群における IRE1、PERK、ATF6、eIF2 α 、CHOP、ATF4 の mRNA 発現量はリアルタイム PCR を用いて測定し、 β -actin に対して標準化した。(n=4-5)



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 36 ER ストレスに関わるタンパク質の発現量

各マウス群の皮質・海馬における PERK、p-PERK、GRP78、ATF4、CHOP、JNK、p-JNK の発現量はウェスタンブロットを用いて測定した。発現量は ImageJ を用いて定量し、 β -actin に対して標準化した。(n=4-5)

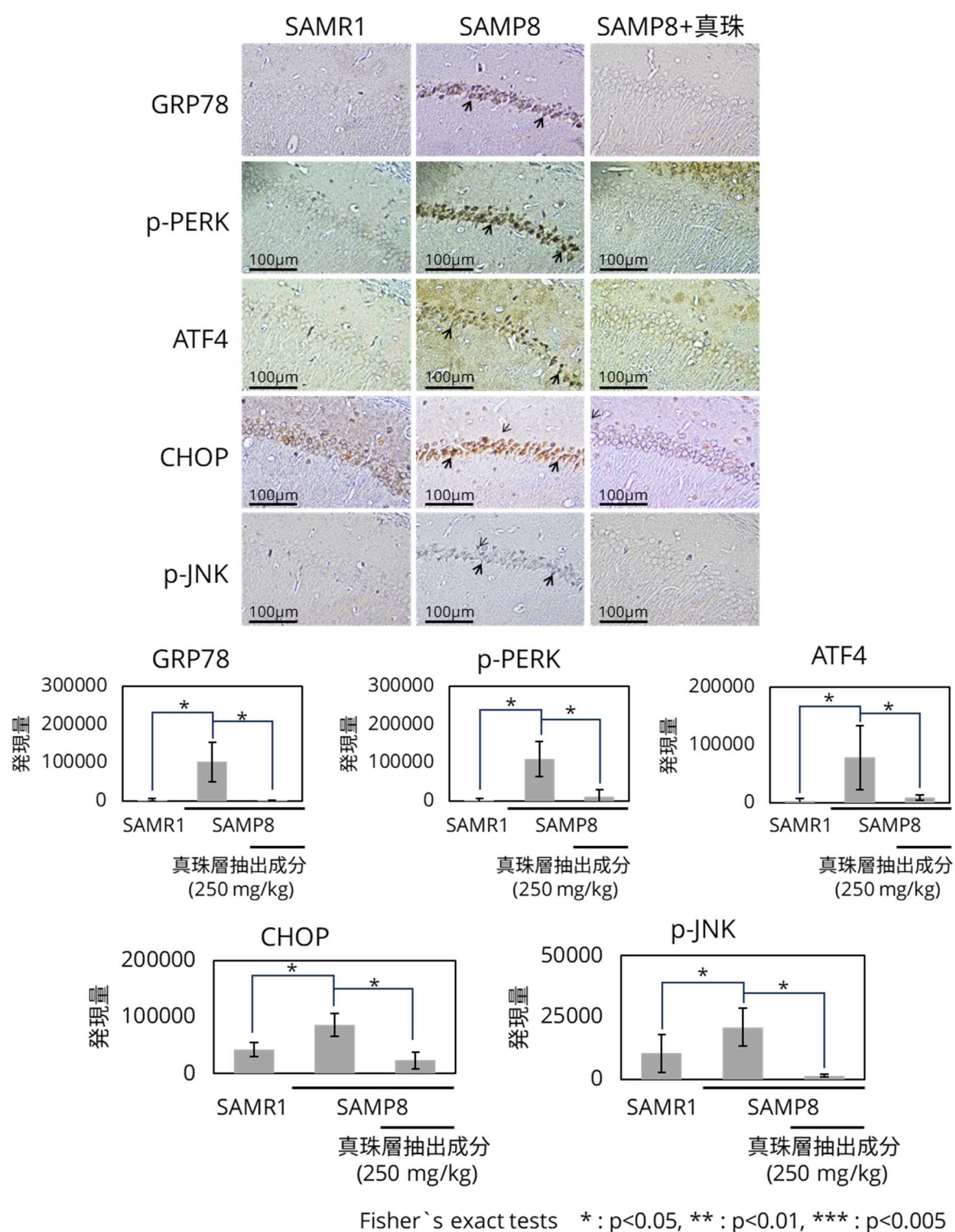


図 37 海馬 CA1 領域における ER ストレス関連タンパク質の免疫組織染色
 矢印は陽性の神経細胞を示し、スケールバーは 100 μ m を表している。それぞれのタンパク質の発現量は、ImageJ を用いて染色面積を定量した。

3.2.6 SAMP8 マウスの脳内における真珠層抽出成分の抗炎症作用

ER ストレスは神経炎症につながるということが報告されているため、炎症を誘導する NF- κ B や NLRP3 に着目した。NF- κ B は炎症性サイトカインの転写因子であり、活性化すると IL-6 や TNF α などの炎症性サイトカイン産生を誘導する。一方、NLRP3 は NLRP3 インフラマソーム複合体の形成に関与するが、形成過程で IL-1 β などの炎症性サイトカインが産生される。したがってウェスタンブロットおよび免疫組織染色を用いて NF- κ B と NLRP3 について調べた。(図 38) いずれにおいても、SAMP8 で発現量がともに増加したが、真珠層投与によって減少した。また炎症性サイトカインである IL-6、TNF α 、IL-1 β について免疫組織染色を行ったところ、海馬 CA1 領域において真珠層抽出成分による発現量減少がみられた。(図 39) さらにウェスタンブロットにおいても IL-1 β 、TNF α 、GFAP の発現量が真珠層投与により抑制された。(図 40) これらの結果は、真珠層抽出成分が NF- κ B および NLRP3 を介して SAMP8 の神経炎症を抑制することを示唆している。

この結果をさらに確認するため、GSK-3 β のリン酸化についても検討を行った。ER ストレスは GSK-3 β のリン酸化を介して NF- κ B や炎症性サイトカインを増加させることが報告されている。また、GSK-3 β が NLRP3 の活性化を制御することも報告されている。そのため、ウェスタンブロットを用いて GSK-3 β および p-GSK-3 β (Ser9) の発現量を調べた。不活性型である p-GSK-3 β (Ser9) では、いずれのマウス群においても変化が見られなかったが、活性型である GSK-3 β では SAMP8 で増加する傾向がみられ、真珠層投与によって有意に減少した。(図 41) 特に真珠層抽出成分 250mg/kg の投与は GSK-3 β のリン酸化率を著しく増加させた。これらの結果から、真珠層抽出成分の ER ストレス抑制は GSK-3 β を介して SAMP8 マウスの神経炎症を抑制することが示唆された。

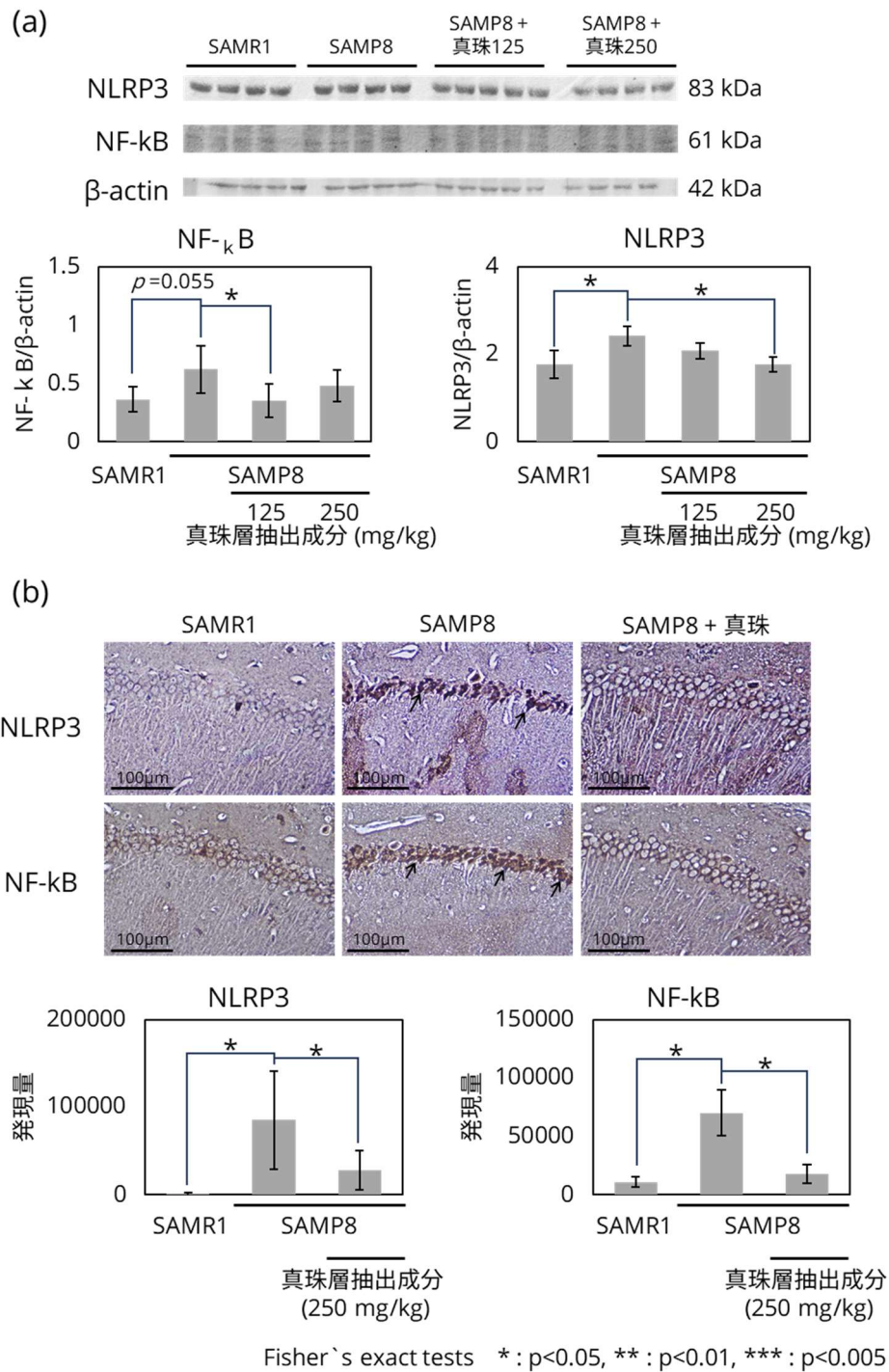


図 38 各マウス群の脳内における NLRP3 および NF- κ B の発現量

(a) ウェスタンブロットを用いて皮質・海馬における NLRP3 および NF- κ B の発現量を測定した。発現量は ImageJ を用いて定量し、 β -actin に対して標準化した。(n=4-5)、
 (b) 海馬 CA1 領域における NLRP3 および NF- κ B の免疫組織染色を行った。矢印は陽性の神経細胞を示し、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表している。ImageJ を用いて染色面積を定量することで、それぞれのタンパク質の発現量を測定した。

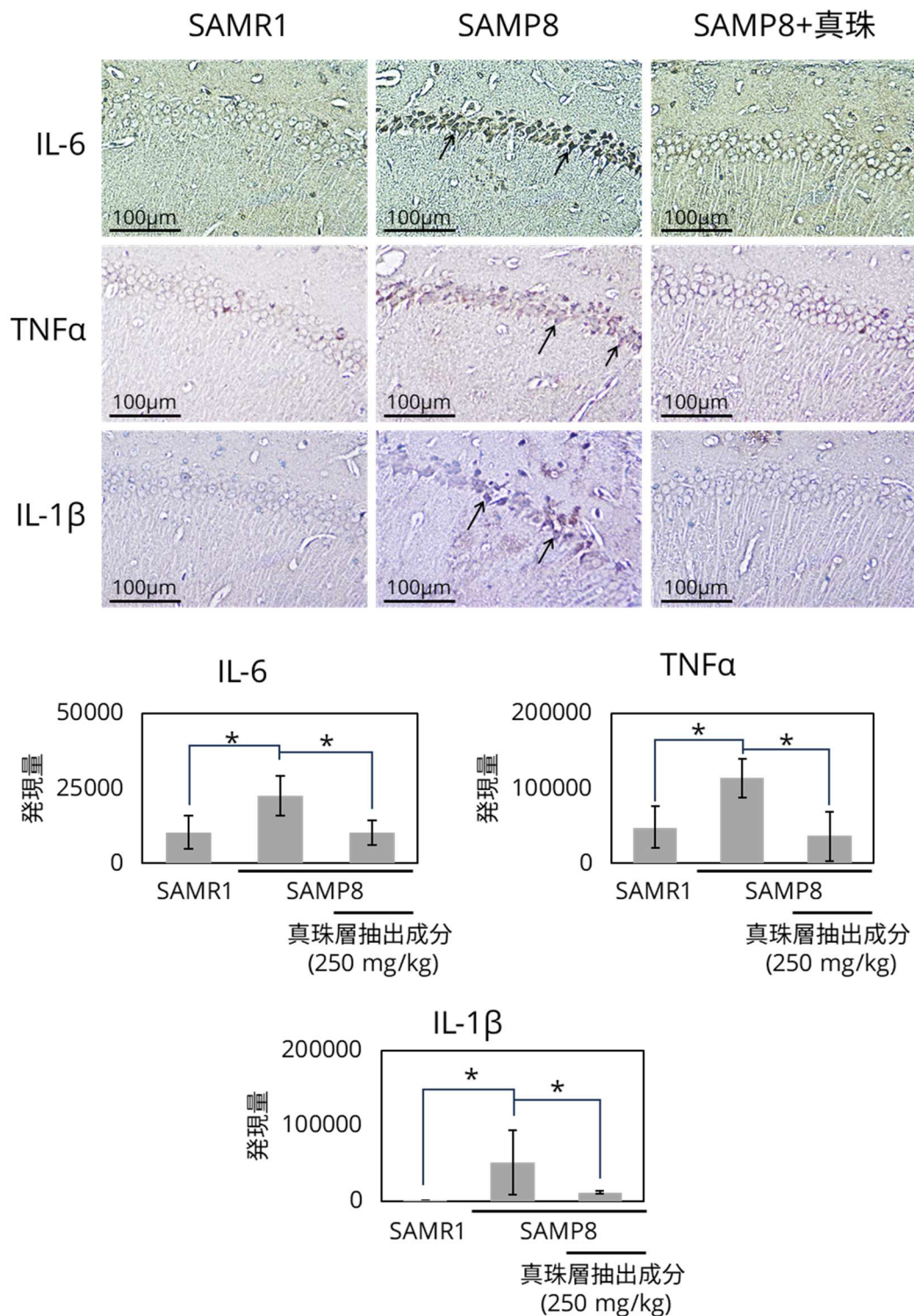
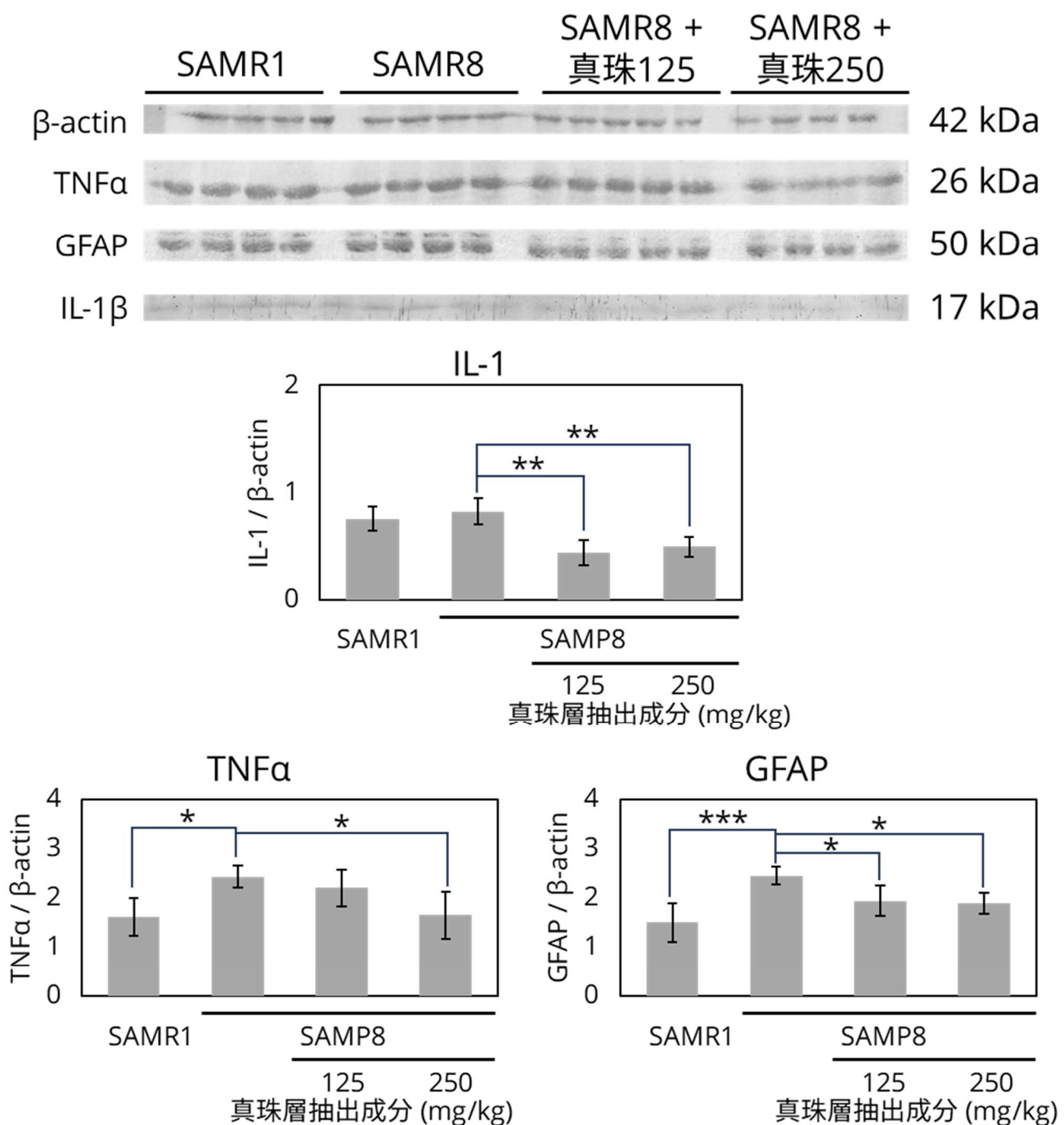


図 39 海馬 CA1 領域における炎症性サイトカインの免疫組織染色
矢印は陽性の神経細胞を示し、スケールバーは 100 μ m を表している。ImageJ を用いて染色面積を定量することで、それぞれのタンパク質の発現量を測定した。



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 40 IL-1 β 、TNF α 、GFAP の発現量変化

各マウス群の皮質・海馬における IL-1 β 、TNF α 、GFAP の発現量はウェスタンブロットを用いて測定した。発現量は ImageJ を用いて定量し、 β -actin に対して標準化した。(n=4-5)

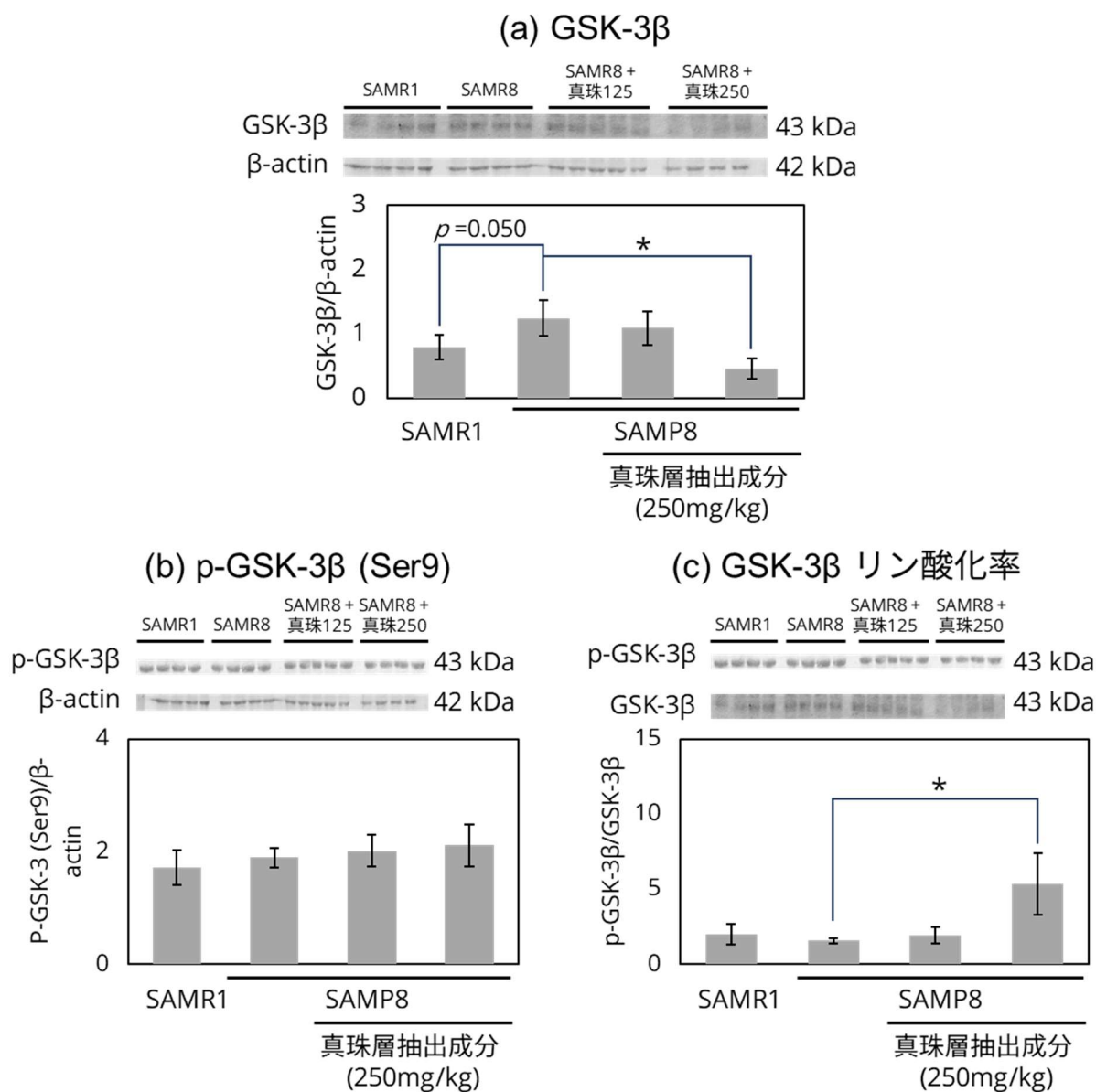


図 41 IL-1 β 、TNF α 、GFAP の発現量変化

各マウス群の皮質・海馬における(a)GSK-3 β 、(b)p-GSK-3 β (ser9)の発現量はウェスタンブロットを用いて測定した。発現量は ImageJ を用いて定量し、 β -actin に対して標準化した。(c)GSK-3 β のリン酸化率は、p-GSK-3 β (ser9) / GSK-3 β から算出された (n=4-5)

3.2.7 真珠層抽出成分によるリン酸化タウの抑制

アルツハイマー病は、脳内でリン酸化タウが増加することが知られている。SAMP8 マウスはアルツハイマー病モデルではないが、老化に伴ってリン酸化タウが増加することから、海馬や皮質における発現量を調べた。免疫組織染色およびウェスタンブロットを行ったところ、SAMP8 の p-タウの発現量は SAMR1 よりも増加したが、真珠層抽出成分を投与したマウスで SAMR1 近くまで減少した。(図 42) リン酸化タウの蓄積は神経細胞死につながることから、真珠層抽出成分による発現量の減少は神経保護作用に寄与している可能性がある。

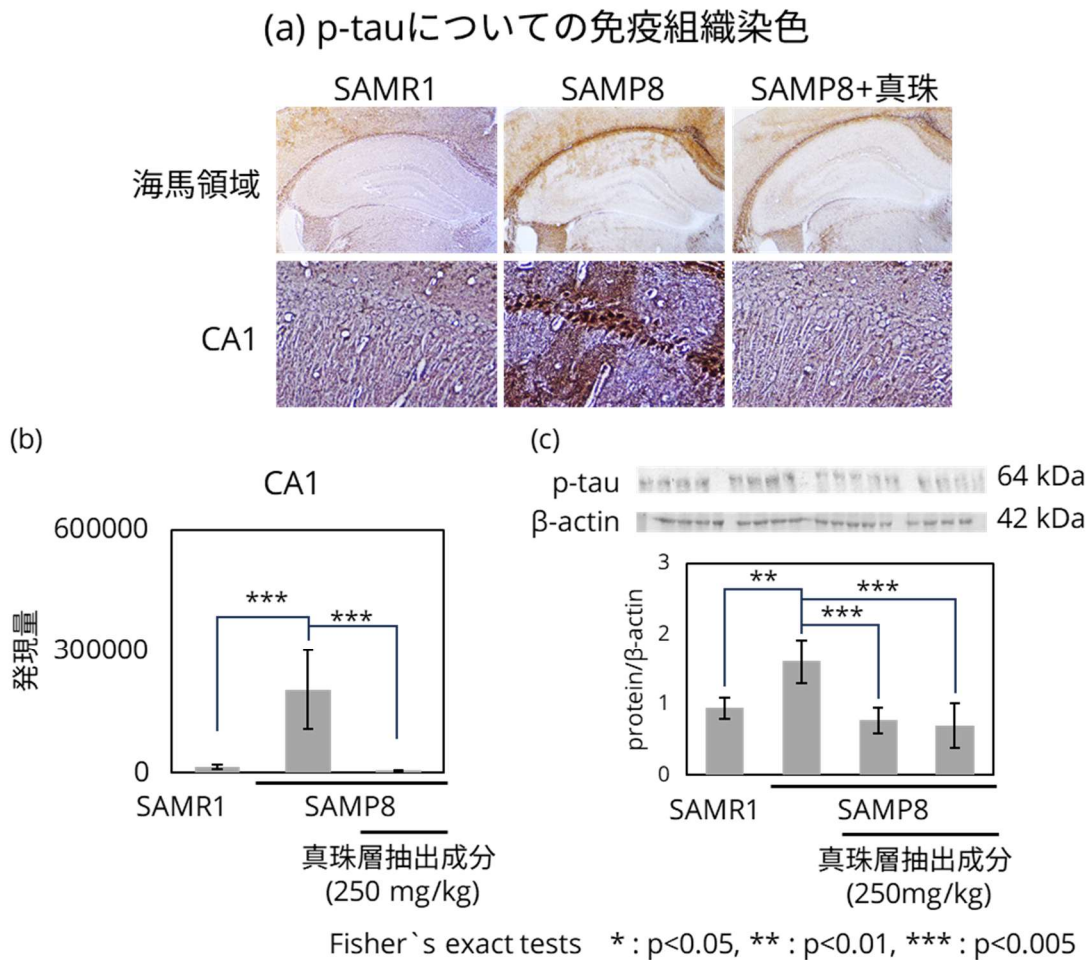
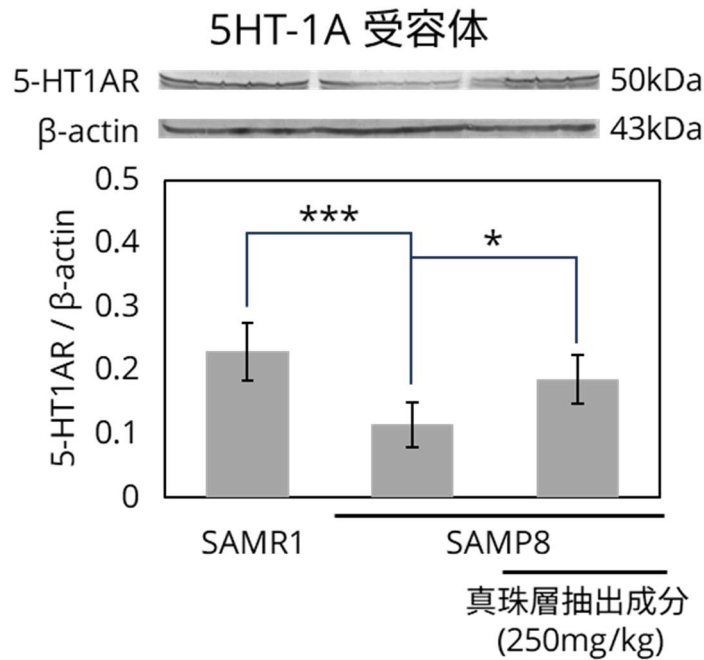


図 42 各マウス群の脳内における p-タウの発現量

(a)海馬 CA1 領域における p-タウの免疫組織染色を行った。矢印は陽性の神経細胞を示し、スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表している。ImageJ を用いて染色面積を定量することで発現量を測定した。(b)ウェスタンブロットを用いて皮質・海馬における p-タウの発現量を測定した。発現量は ImageJ を用いて定量し、 β -actin に対して標準化した。(n=4-5)

3.2.8 SAMP8 の 5-HT1A 受容体に対する真珠層抽出成分の効果

真珠層抽出成分は LPS 誘発モデルマウスの 5-HT1A 受容体を増加させたことから、SAMP8 マウスに対しても同様の効果があるかどうか検討した。ウェスタンブロットを用いて行ったところ、SAMP8 における発現量は SAMR1 の半分近くまで減少したが、真珠層投与によって有意に増加した。(図 43) このことから、真珠層抽出成分は SAMP8 マウスの 5-HT1A 受容体の発現量も増加させることが分かった。



Fisher`s exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 43 SAMP8 マウスにおける 5-HT1A 受容体の発現量

ウェスタンブロットを用いて皮質・海馬における 5-HT1A 受容体の発現量を測定した。発現量は ImageJ を用いて定量し、 β -actin に対して標準化した。(n=4-5)

3.3 考察

本章では、真珠層抽出成分が SAMP8 マウスの脳内における ER ストレスを著しく抑制し、最終的に老化に伴う不安・うつ症状を抑制することが示された。多くの先行研究では、ER ストレス阻害剤が抗うつ作用を示すことが報告されており[72,73,74]、本研究の結果と一致している。一方、真珠層抽出成分は SAMP8 マウスにおける NF-kB や NLRP3、IL-1 β 、IL-6、TNF α の発現量を減少させたが、ER ストレスは UPR シグナル経路を介して NF-kB や NLRP3 活性化させ、神経炎症を誘導する。[75] また、IRE1 α の活性化は GSK-3 β を介して NF-kB や炎症性サイトカインを増加させることが報告されている。[76] したがって、真珠層抽出成分の ER ストレス抑制は抗炎症作用に寄与していると考えられる。(図 44)

真珠層抽出成分は SAMP8 マウスにおける神経変性を抑制し、BDNF の mRNA 発現量も増加させることが分かった。真珠層抽出成分の神経保護作用はアミロイド β 誘発記憶障害モデルマウスや D-ガラクトース誘発モデルマウスにおいても確認されている。[44,67] また、ER ストレスと神経炎症はともにアポトーシスにつながることから、これらの抑制が神経保護に寄与していると推察された。一方、海馬、視床下部、扁桃体は視床下部－下垂体－副腎(HPA)軸に関連しているが、HPA 軸の機能異常もうつ病の発症原因のひとつとして考えられている。[77] そのため、これらの脳領域における真珠層抽出成分の神経保護作用は HPA 軸にも影響を与えていると考えられる。

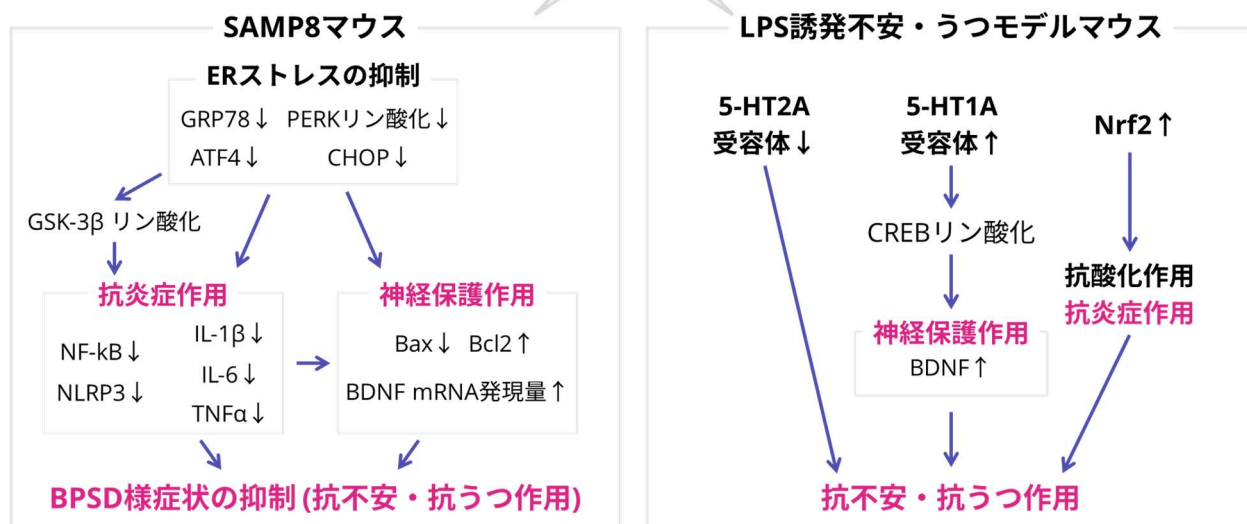
LPS 誘発不安・うつモデルマウスおよび SAMP8 マウスに対して真珠層抽出成分は抗不安・抗うつ作用を示したが、直接的なターゲットは明らかになっていない。両者における生理活性作用には異なる点がみられたが、これは不安・うつ症状の発症メカニズムが異なるため作用に違いが生じたものと考えられる。(図 44) しかし共通して、抗炎症作用と神経保護作用を介することが示された。5-HT1A 受容体の発現量増加も二つのモデルマウスで確認されているが、SAMP8 マウスでの検討は十分ではないためさらに確認する必要がある。これらのことから、少なくとも抗炎症作用と神経保護作用は抗不安・抗うつ作用において重要な役割を果たしていると考えられる。

当研究室は以前、真珠層抽出成分が腹腔内投与・経口投与のいずれでもスコポリンで誘発した記憶障害を抑制することを報告している。[42] 第 2 章および第 3 章の結果から、真珠層抽出成分の抗不安・抗うつ作用は腹腔内投与に限らず、経口投与でも発揮されることが分かった。これはアコヤガイ真珠層を機能性食品として日常的に摂取することで、不安症状やうつ病の予防・治療に役立てることができる可能性を示唆している。

真珠層抽出成分は SAMP8 マウスの不安・うつ症状に限らず、攻撃行動や概日リズム障害にも有効であることが分かった。いくつかの先行研究では、ER ストレスが時計遺伝子を介して概日リズムを乱すことが報告されている。[78,79] RNA シークエンス解析の結果によると、時計遺伝子である Per2 の mRNA 発現量は SAMP8 で増加するが、真珠層投与によって減少することが確認されている(データ未掲載)。一方、一部の 5-HT1A 受容体アゴニストは攻撃性を抑制することが報告されているが [80]、本章では SAMP8 マウスの 5-HT1A 受容体の発現量が真珠層投与によって増加することが確認された。これらの結果は、真珠層抽出成分が概日リズム障害や攻撃性を抑制すること

を示唆しているが、詳しいメカニズムについてはさらに検討する必要がある。

不安・うつ症状の発症メカニズムが異なる



抗炎症作用および神経保護作用は、真珠層抽出成分の抗不安・抗うつ作用において重要な役割を果たす

図 44 第 2 章のまとめ

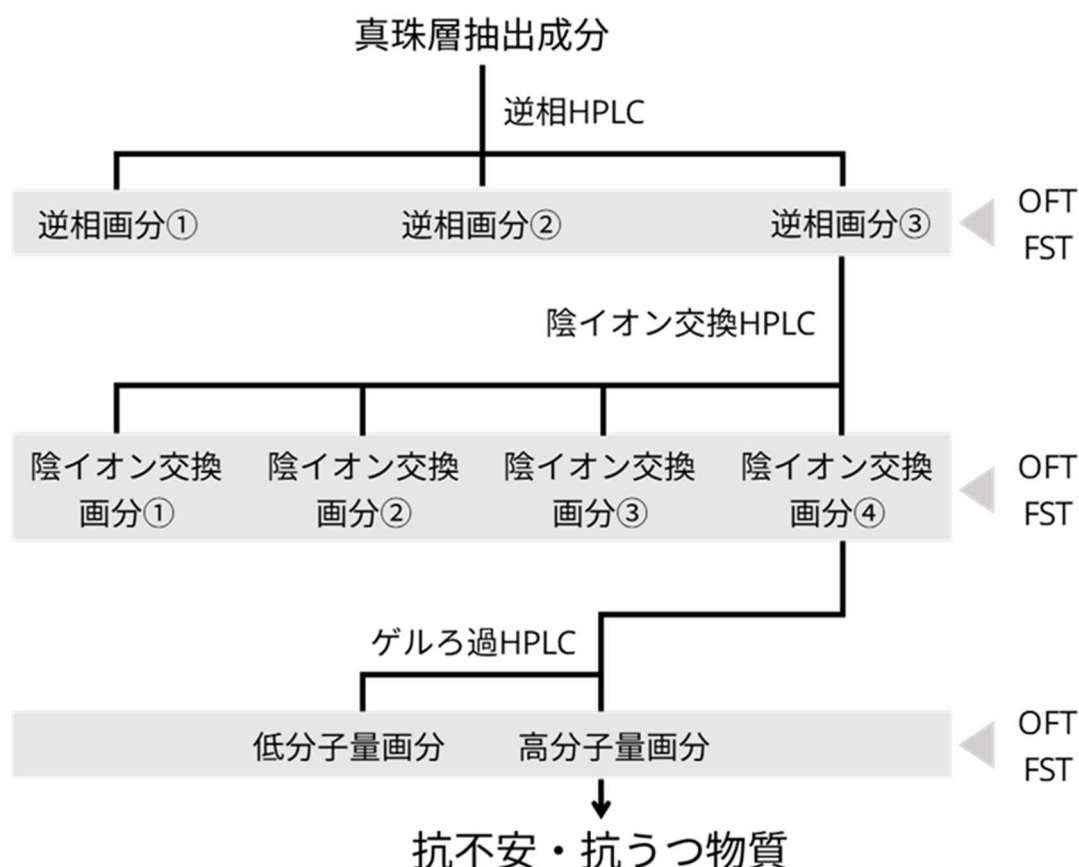
第4章 アコヤガイ貝殻真珠層に含まれる抗不安・抗うつ物質の単離・同定および作用経路の検討

真珠層抽出成分が抗不安・抗うつ作用を示すことから、LPS 誘発不安・うつモデルマウスを用いた評価系を活用し、真珠層中の抗不安・抗うつ物質の単離・同定を行った。また、抗不安・抗うつ物質が脳に作用する経路としてエクソソームが関与している可能性を考慮し、その検証も行った。

4.1 実験方法

4.1.2 抗不安・抗うつ物質の分画・精製

図 45 に示すように、真珠層抽出成分を逆相 HPLC、陰イオン交換 HPLC、ゲルろ過 HPLC により複数に分画し、オープンフィールド試験と強制水泳試験を用いてそれぞれの画分の抗不安・抗うつ作用を順次評価した。本研究では逆相③、陰イオン④、高分子量画分において生理活性が認められた。



OFT：オープンフィールド試験

FST：強制水泳試験

図 45 抗不安・抗うつ物質の分画・精製のフローチャート

➤ 使用器具・試薬

- ・真珠層抽出成分
- ・アセトニトリル
- ・NaCl(和光純薬)
- ・0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)溶液
- ・20mM Tris-HCl (pH7.5)
- ・C18 逆相カラム(ODS80TS; TOSOH)
- ・TSK-gel DEAE-5PW カラム(TOSOH)
- ・TSK-gel G3000SW カラム(TOSOH)
- ・セルロースメンブレン MWCO:6000~8000 (Spectrum Medical Industries)

➤ 方法

逆相 HPLC

1. 200mg/mL 真珠層抽出液を作製し、コンセントレーターを用いて凍結乾燥した。
2. 乾燥物を 0.1%TFA 溶液 1~2mL に溶解した後、13000r.p.m で 1 分間遠心分離し、上清を 0.45 μ m フィルターにかけた。
3. 0.1%TFA 溶液で HPLC を平衡化し、流速 1mL/min で真珠層抽出液を C18 逆相カラムにかけた。吸着成分はアセトニトリル(0~100%)の直線的なグラジエントで溶出させた。
4. ①6~30min、②30~45min、③45~60min の溶出液を採取し、コンセントレーターを用いて溶出液を凍結乾燥した。
5. 乾燥物を超純水に溶解させた後、目的の濃度に希釈し、以降の実験に使用した。

陰イオン交換 HPLC

1. 20mM Tris-HCl (pH7.5)で HPLC を平衡化し、逆相 HPLC をかけた画分を、0.5mL/min の条件で TSK-gel DEAE-5PW カラムにかけた。吸着成分は NaCl(0~0.5M)のグラジエントで溶出させた。
2. ①0~13min、②13~26min、③26~39min、④39~51min の溶出液を採取した後、セルロースメンブレンに入れ、脱イオン水に対して脱塩を行った。
3. コンセントレーターを用いて溶出液を凍結乾燥し、乾燥物を超純水に溶解させた。
4. 目的の濃度に希釈し、以降の実験に使用した。

ゲルろ過 HPLC

1. 20mM Tris-HCl (pH7.5)で HPLC を平衡化し、陰イオン交換 HPLC をかけた画分を、0.4mL/min の条件で TSK-gel G3000SW カラムにかけた。
2. ①0~20min、②20~40min の溶出液を採取し、コンセントレーターを用いて溶出液を凍結乾燥した。
3. 乾燥物を超純水に溶解させた後、目的の濃度に希釈し、以降の実験に使用した。

4.1.3 各 HPLC 画分における抗不安・抗うつ作用の評価

➤ 使用器具・試薬

- ・ 4 週齢 ICR マウス(日本クレア)
- ・ 真珠層抽出液 50mg/kg および 100mg/kg
- ・ 超純水
- ・ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O127:B8 (SIGMA)
- ・ 注射針 (26G×1/2) 付 1 mL シリンジ (TERUMO)

➤ 方法

1. 4 週齢の ICR マウスをケージ(1 ケージ 5、6 匹)に入れ、1 週間順化させた。
2. 順化後、Control 群と LPS 群には超純水、画分投与群には真珠層抽出成分 100mg/kg 等量の HPLC 画分を 2 週間毎日腹腔内投与した。
3. 各マウス群に LPS 1mg/kg および PBS を腹腔内投与した。
4. LPS 投与から 24 時間後にオープンフィールド試験および強制水泳試験を用いて各画分の抗不安・抗うつ作用を評価した。

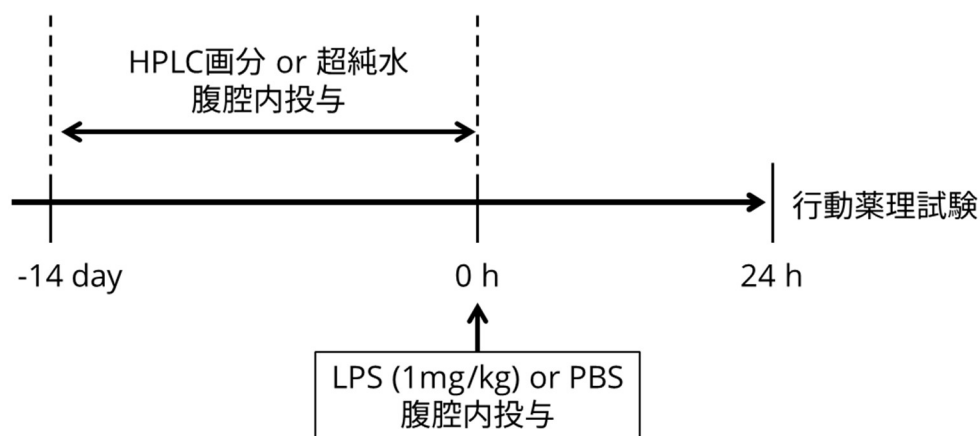


図 46 第 4 章の動物実験スケジュール (各 HPLC 画分の活性評価)

4.1.4 抗不安・抗うつ物質のタンパク質量・糖質量の定量

➤ 使用器具・試薬

- ・ Pierce®BCA Protein Assay Kit(Thermo)
- ・ ウシ血清アルブミン(和光純薬)
- ・ グルコース(和光純薬)
- ・ フェノール(和光純薬)
- ・ 濃硫酸(和光純薬)
- ・ 分光光度計

抗不安・抗うつ物質の重量測定

1. エッペンの重量を計り、単離した抗不安・抗うつ物質溶液を入れた。
2. コンセントレーターを用いて抗不安・抗うつ物質溶液を凍結乾燥し、乾燥物が入ったエッペンを再度計った。
3. 計った重量の差から抗不安・抗うつ物質の重量を算出した。

BCA アッセイ

抗不安・抗うつ物質に含まれるタンパク質量を定量するために BCA アッセイを実施した。

・検量線の作成

1. 2mg/mL ウシ血清アルブミン溶液(超純水で溶解)を作製し、それぞれ 0,0.1,0.5,1,2 mg/mL になるように希釈した。
2. ligand A : ligand B = 100 : 1 になるように反応溶液を調製し、新しいエッペンに 200 μ L ずつ入れた。
3. 2 の反応溶液に 1 のウシ血清アルブミン溶液を 2 μ L ずつ混和し、37°C で 30 分インキュベートした。
4. 562 nm で吸光度を測定し、吸光度を y、タンパク質濃度を x として検量線を作製した。

・タンパク質量の定量

1. 抗不安・抗うつ物質に超純水 1mL を溶解させた。
2. ligand A : ligand B = 100 : 1 になるように反応溶液を調製し、新しいエッペンに 200 μ L ずつ入れた。
3. 1 の反応溶液に抗不安・抗うつ物質溶液を 2 μ L 混和し、37°C で 30 分インキュベートした。
4. 562 nm で吸光度を測定し、検量線からタンパク質量を算出した。(単位は mg protein/mL)
5. タンパク質量と抗不安・抗うつ物質の重量から、全体のタンパク質の割合を算出した。

糖質量の測定

抗不安・抗うつ物質に含まれる糖質量を決定するために、フェノール硫酸法を決定した。

・検量線の作成

1. 10 mg/mL グルコースを希釈して 0、0.5、1、2、5、10 mg/mL の溶液 20 μ L をそれぞれエッペンチューブに分注する。
2. 5 % フェノールを各濃度のグルコース溶液に 20 μ L ごとに添加し混合する。
3. 濃硫酸を 100 μ L 添加し攪拌後、室内で 30 分間放置する。
4. 分光光度計を用いて 490 nm の吸光度を測定する。

・糖質量の定量

1. 抗不安・抗うつ物質に超純水 1mL を溶解させた。
2. 抗不安・抗うつ物質溶液 20 μ L に 5 % フェノールを 20 μ L 添加し混合させた。
3. 濃硫酸を 100 μ L 添加し攪拌後、室内で 30 分間放置した。
4. 分光光度計を用いて 490 nm の吸光度を測定した。
5. 検量線の式から糖質量(mg/mL)を算出した。
6. 糖質量と抗不安・抗うつ物質の重量から、全体の糖質量の割合を算出した。

4.1.5 PAS 染色

➤ 使用器具・試薬

- ・ 12.5%トリクロロ酢酸
- ・ 1 %過ヨウ素酸
- ・ 0.5%亜硫酸水素ナトリウム
- ・ フクシン染色液

➤ 試薬の調製

- ・ 12.5%トリクロロ酢酸

12.5g トリクロロ酢酸を 100mL にメスアップした。

- ・ 1 %過ヨウ素酸

1g 過ヨウ素酸を 6mL 酢酸で溶解し、3%酢酸で 200mL にメスアップした。

- ・ 0.5%亜硫酸水素ナトリウム

1g 亜硫酸ナトリウムを 10mL 脱イオン水で溶解した後、10mL の 1M HCl と混合し、200mL にメスアップした。

- ・ フクシン染色液

塩基性フクシン 1g を 60°Cで温めた脱イオン水 200mL に溶解した後、亜硫酸ナトリウム 1g を加えた。その後、1M HCl20mL を加え、ろ過したものを冷暗所に保管した。

➤ 方法

1. 抗不安・抗うつ物質を SDS 電気泳動にかけた。
2. 電気泳動ゲルを 12.5%トリクロロ酢酸で 30 分間振盪させた。
3. 脱イオン水で 30 ほどゲルを洗浄した。
4. 1%過ヨウ素酸で 50 分間振盪させた。
5. 脱イオン水でゲルを 10 分間振盪させ、5 回繰り返した。
6. フクシン溶液にゲルを浸し、遮光させながら 50 分間振盪させた。
7. 0.5%亜硫酸ナトリウム溶液でバンドが見えるまで浸透させた。

4.1.6 STAINS ALL 染色

➤ 使用器具・試薬

- ・ 25% 2-プロパノール溶液
- ・ 1M Tris-HCl
- ・ STAINS ALL 染色液

➤ 試薬の調製

- ・ STAINS ALL 染色液

STAINS ALL	2mg
2-プロパノール	10mL
1M Tris-HCl	0.6mL
ホルムアミド	4mL
超純水	40mL

上記の試薬を混合させた。染色液は使用直前に調製した。

➤ 方法

➤ 抗不安・抗うつ物質を SDS 電気泳動にかけた。

1. 電気泳動ゲルを 25% 2-プロパノール溶液で 10 分間振盪させ、これを 4 回繰り返した。
2. ゲルを 25% 2-プロパノール溶液で一晩放置した。
3. 超純水で 10 分間、ゲルを振盪させ、これを 4 回繰り返した。
4. ゲルを STAINS ALL 溶液に浸し、遮光しながら 1~3 時間ほど発色するまで染色した。

4.1.7 銀染色

➤ 使用器具・試薬

- ・ 銀染色キットワコー(和光純薬)
- ・ メタノール
- ・ 酢酸

➤ 試薬の調製

- ・ 固定液 I

メタノール	10mL
酢酸	2mL
脱イオン水	8 mL

上記の試薬を混合させた。

・固定液Ⅱ

メタノール	1mL
酢酸	1.5mL
固定原液(キット)	4mL
脱イオン水	13.5mL

上記の試薬を混合させた。

・増感液

増感原液(キット) 100 μ L に脱イオン水を加え、混合させた。

・染色液

染色液 A(キット) 1mL と染色液 B(キット)1mL をよく混合させたのち、脱イオン水 18mL を加えてよく混合させた。

・現像液

現像原液(キット)1mL に脱イオン水 19mL を加え、混合させた。

➤ 方法

1. 抗不安・抗うつ物質を SDS 電気泳動にかけた。
2. 電気泳動を流している間に、固定液Ⅰ、固定液Ⅱ、増感液、染色液、現像液を調製した。
3. 電気泳動ゲルを固定液Ⅰに浸し、15 分間振盪させた。
4. ゲルを固定液Ⅱに浸し、15 分間振盪させた。
5. ゲルを脱イオン水に浸し、5 分間振盪させた。これを 3 回繰り返し、十分に洗浄させた。
6. ゲルを増感液に浸し、5~10 分間振盪させた。
7. ゲルを脱イオン水に浸し、5 分間振盪させた。
8. ゲルを染色液に浸し、正確に 15 分間振盪させた。
9. ゲルを脱イオン水に浸し、3~5 分間振盪させた。これを 3 回繰り返し、十分に洗浄させた。
10. ゲルを現像液に浸し、バンドが見えるまで浸透させた。
11. 現像中の溶液に酢酸を加え、2~3 分間振盪させた。加える酢酸液は、現像液の 0.1~0.5%等量にした。
12. ゲルを脱イオン水に浸し、2 分間振盪させた。これを 3 回繰り返し、十分に洗浄させた。

4.1.8 抗不安・抗うつ物質を投与したマウスの血清エクソソーム(Nacre PS-Exosome)の抽出

➤ 使用器具・試薬

- ・抗不安・抗うつ物質を投与したマウスおよびその Control マウス(4.2.1、4.2.2 参照)の血清
- ・ Exosome Precipitation Solution (Serum/Plasma) (MACHEREY-NAGEL)

➤ 方法

1. 抗不安・抗うつ物質を投与したマウス、およびその Control マウスの血清を 10000 ×g で 15 分間遠心分離し、新しいエッペンに少なくとも 100 μL 分注した。
2. 血清の 0.4 倍等量の Exosome Precipitation Solution(Serum/Plasma)を加え、十分混合した。
※例えば血清 100 μL の場合、40 μL 加える。
3. 血清混合液を 2~8℃で 30 分間インキュベートした後、500 ×g で 5 分間遠心分離した。
4. 上清を除去し、沈殿物と RNase-free water 500 μL を混合させた。
5. 抗不安・抗うつ物質処理マウス由来の血清エクソソーム溶液を Nacre PS-Exosome、その Control マウス由来のものを Control-Exosome として以降の実験に使用した。
6. エクソソーム濃度は BCA アッセイを用いて測定した。

4.1.9 Nacre-Exosome の抗不安・抗うつ作用の検討

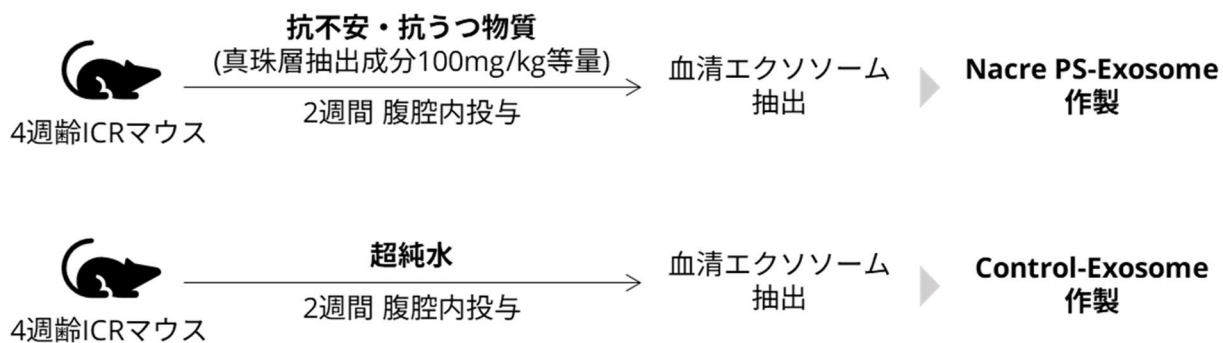
➤ 使用器具・試薬

- ・4 週齢 ICR マウス(日本クレア)
- ・超純水
- ・Lipopolysaccharides from Escherichia coli O127:B8 (SIGMA)
- ・注射針 (26G×1/2) 付 1 mL シリンジ (TERUMO)
- ・Nacre PS-Exosome および Control-Exosome

➤ 方法

1. 4 週齢の ICR マウスをケージ(1 ケージ 5 匹)に入れ、1 週間順化させた。
2. 順化後、Control 群と LPS 群には超純水、エクソソーム投与群には Control-Exosome および Nacre PS-Exosome (500 μg/kg)を 2 週間毎日腹腔内投与した。
3. 各マウス群に LPS 1mg/kg および PBS を腹腔内投与した。
4. LPS 投与から 24 時間後にオープンフィールド試験および強制水泳試験を用いてマウスの不安・うつ行動を評価した。

1. 血清エクソソーム溶液の作製



2. Nacre PS-Exosomeの抗不安・抗うつ作用の評価

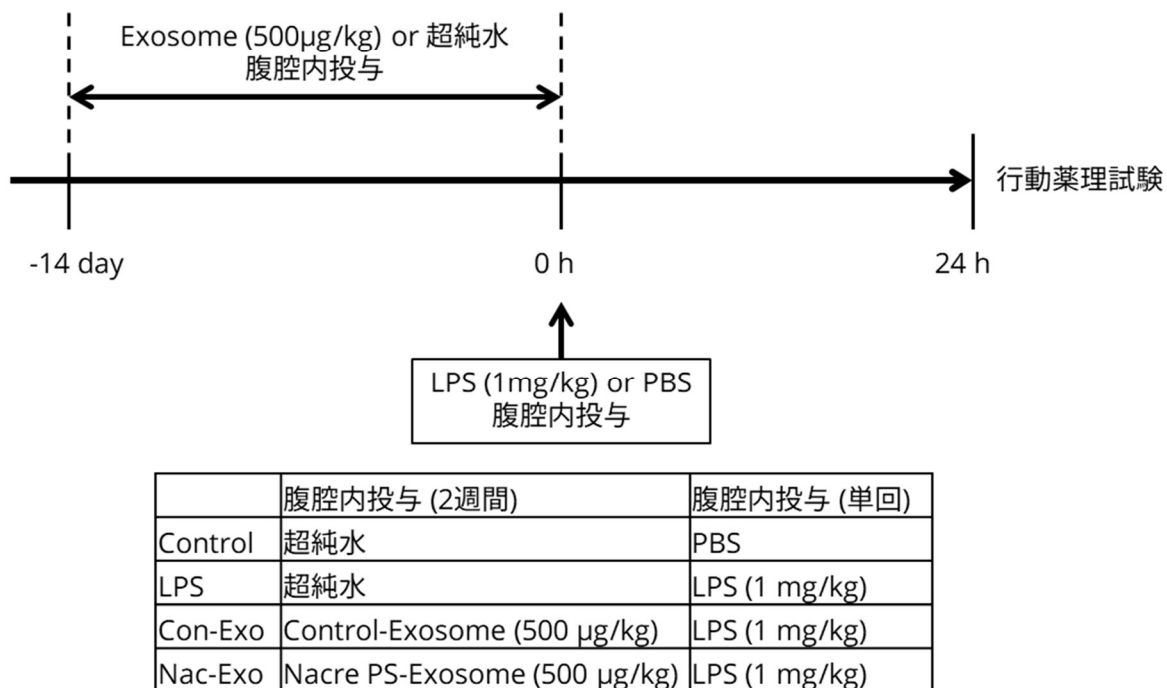


図 47 Nacre PS-Exosome の抗不安・抗うつ作用の評価スケジュール

4.1.10 リアルタイム PCR

本章のリアルタイム PCR は 2.1.4 と同様の方法で行った。また、使用したプライマーは以下のとおりである。

Primer	sequence(5`to3`)
Mn-SOD	F- GGCCAAGGGAGATGTTACAA
	R- GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
BDNF	F-AGAGCTGTTGGATGAGGACCAG
	R-CAAAGGCACTTGACTACTGAGCA
TNF α	F- ACGGCATGGATCTCAAAGAC
	R- GTGGGTGAGGAGCACGTAGC
GFAP	F- GAGGGACAACCTTTGCACAGG
	R- TCCTCCAGCGATTCAACCTT
GRP78	F-CCTGCGTCGGTGTGTTCAAG
	R-CGTGAGTTGGTTCTTGGCCG
β -actin	F-GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	R-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

4.1.11 電気泳動およびウェスタンブロット

本項目における電気泳動およびウェスタンブロットは、2.1.6 および 2.1.7 と同様の方法で行った。また、使用した一次抗体は以下のとおりである。

抗体	会社
β -actin antibody (Rabbit 二次抗体)	proteintech
TNF α antibody	biorbyt
GFAP antibody	biorbyt
GRP78 antibody	biorbyt

4.1.12 統計解析

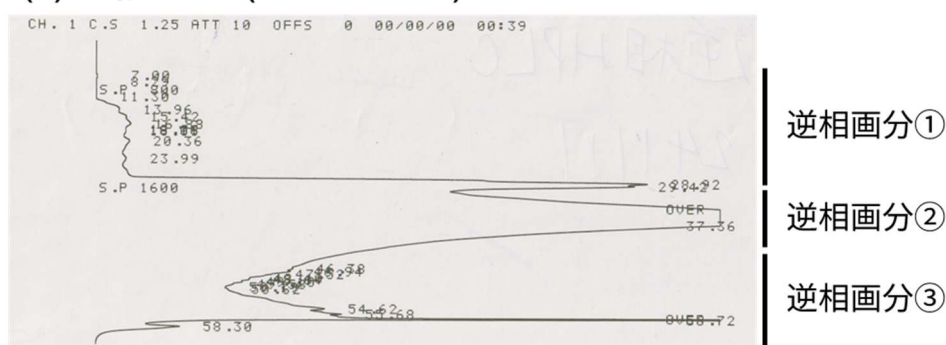
各データは 4~5 匹/群のマウスから得られ、平均値 $\pm$ 標準偏差として算出したものである。統計解析は一元配置分散分析(ANOVA)と Fisher`s exact test を用いて行い、p 値が 0.05 未満で有意差ありと判定した。すべての統計解析はエクセル統計ソフトウェア (BellCurve)を用いて行われた。

4.2 実験結果

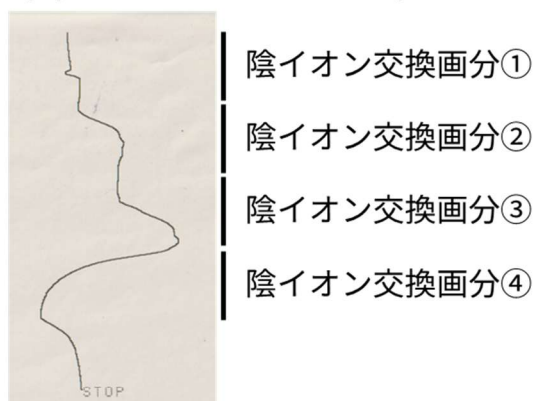
4.2.1 真珠層抽出成分に含まれる抗不安・抗うつ物質の単離・同定

真珠層抽出成分を逆相 HPLC、陰イオン交換 HPLC、ゲルろ過 HPLC の順に分画し、それぞれの画分についてオープンフィールド試験、強制水泳試験を用いて活性を評価した。(図 48) 本章では逆相③→陰イオン交換④→高分子量画分の順に目的物質の単離が進み、一貫して抗不安・抗うつ作用が確認された。(図 49)

(a) 逆相HPLC (abs 230 nm)



(b) 陰イオン交換HPLC (abs 210 nm)



(c) ゲルろ過HPLC (abs 210 nm)

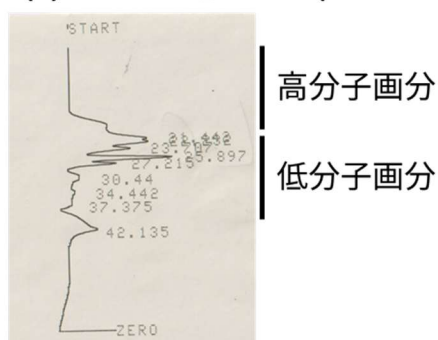
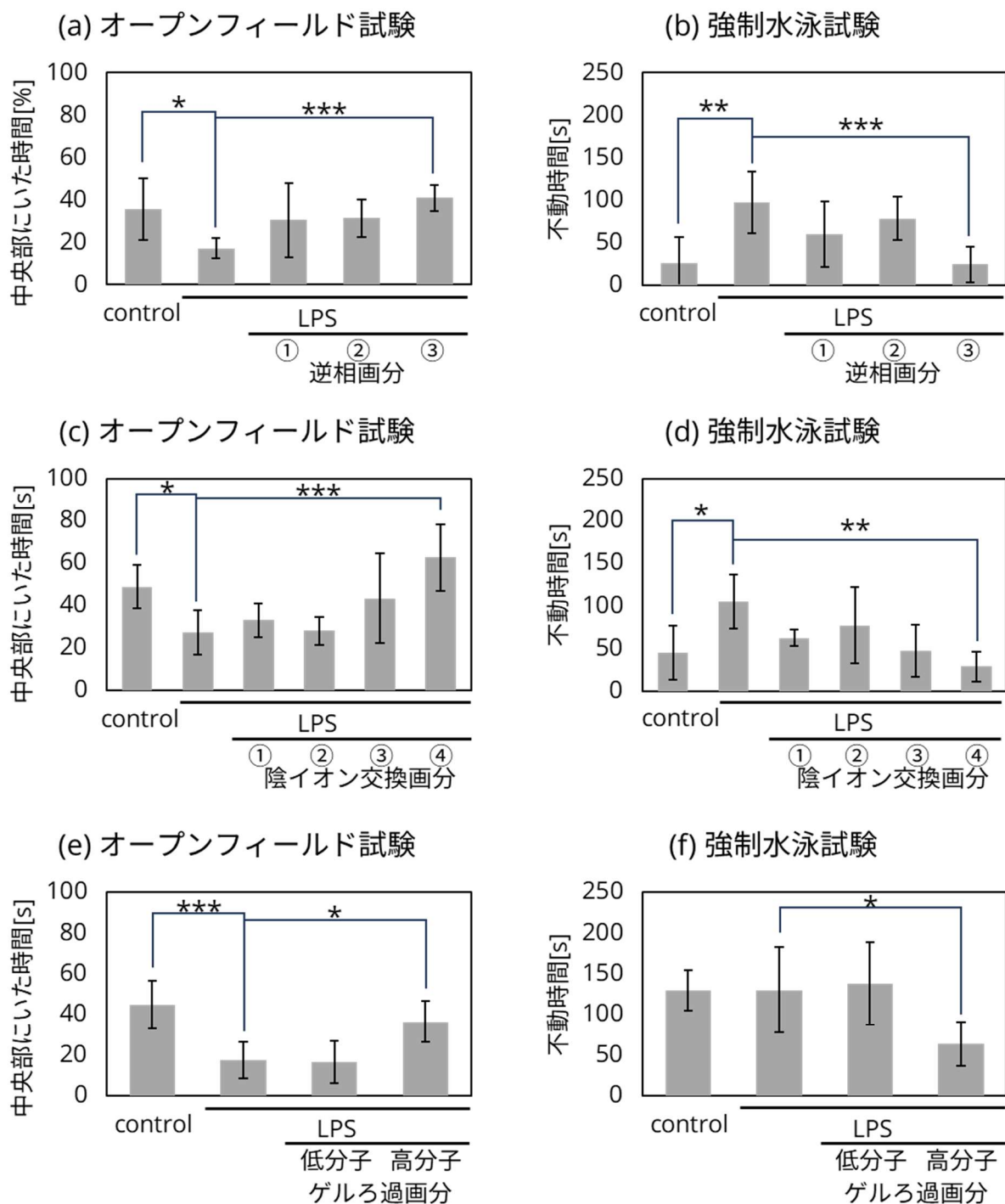


図 48 HPLC 分画のピーク波形

(a)逆相 HPLC 分画、(b)陰イオン交換 HPLC 分画、(c)ゲルろ過 HPLC 分画



Fisher's exact tests * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$

図 49 各 HPLC 画分の抗不安・抗うつ作用

それぞれの画分についてオープンフィールド試験、強制水泳試験を行った結果を示しており、(a),(b)は逆相画分、(c),(d)は陰イオン交換画分、(e),(f)はゲルろ過画分した画分の結果を表している。

4.2.2 抗不安・抗うつ物質の同定

抗不安・抗うつ物質のタンパク質量および糖質量を、それぞれ BCA アッセイとフェノール硫酸法を用いて定量した。糖質濃度は 0.1085 mg/mL であったが、タンパク質が検出されなかったため、得られた生理活性物質は糖類であることが分かった。

銀染色はタンパク質を高感度に検出する染色法として広く用いられている。また、STAINS-ALL は様々な有機成分を、その特性によってそれぞれ異なる色に染色することができる。例えば硫酸多糖やリン脂質、核酸などの負電荷をもつ酸性分子は青色、カルシウム結合タンパク質は紫色、酸性ではない糖タンパク質や中性糖は赤に染色される[81,82,83]。そこで抗不安・抗うつ物質について銀染色および STAINS ALL 染色を行ったところ、銀染色ではバンドがみられなかったのに対し、STAINS ALL 染色では 180kDa 以上で青いスメアが検出された。(図 50) これらの結果から、この物質は 180kDa 以上の酸性多糖類であることが分かった。

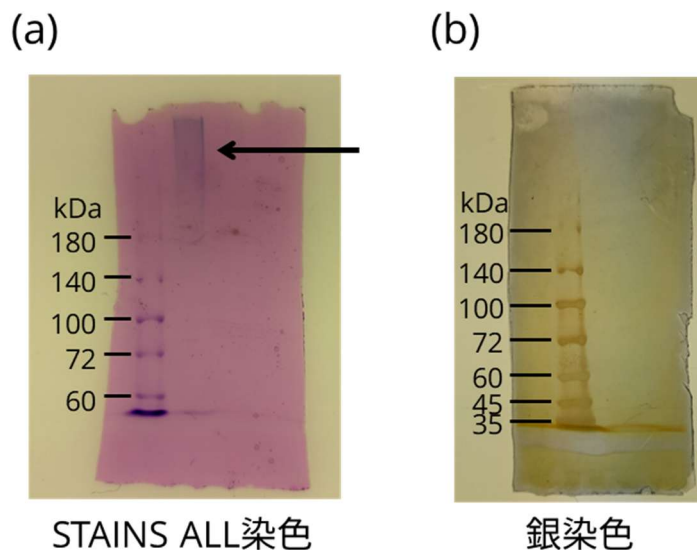


図 50 抗不安・抗うつ物質の STAINS ALL 染色・銀染色

(a) STAINS ALL 染色の結果を示しており、矢印は抗不安・抗うつ物質のバンドを示している。(b) 銀染色の結果を示している。

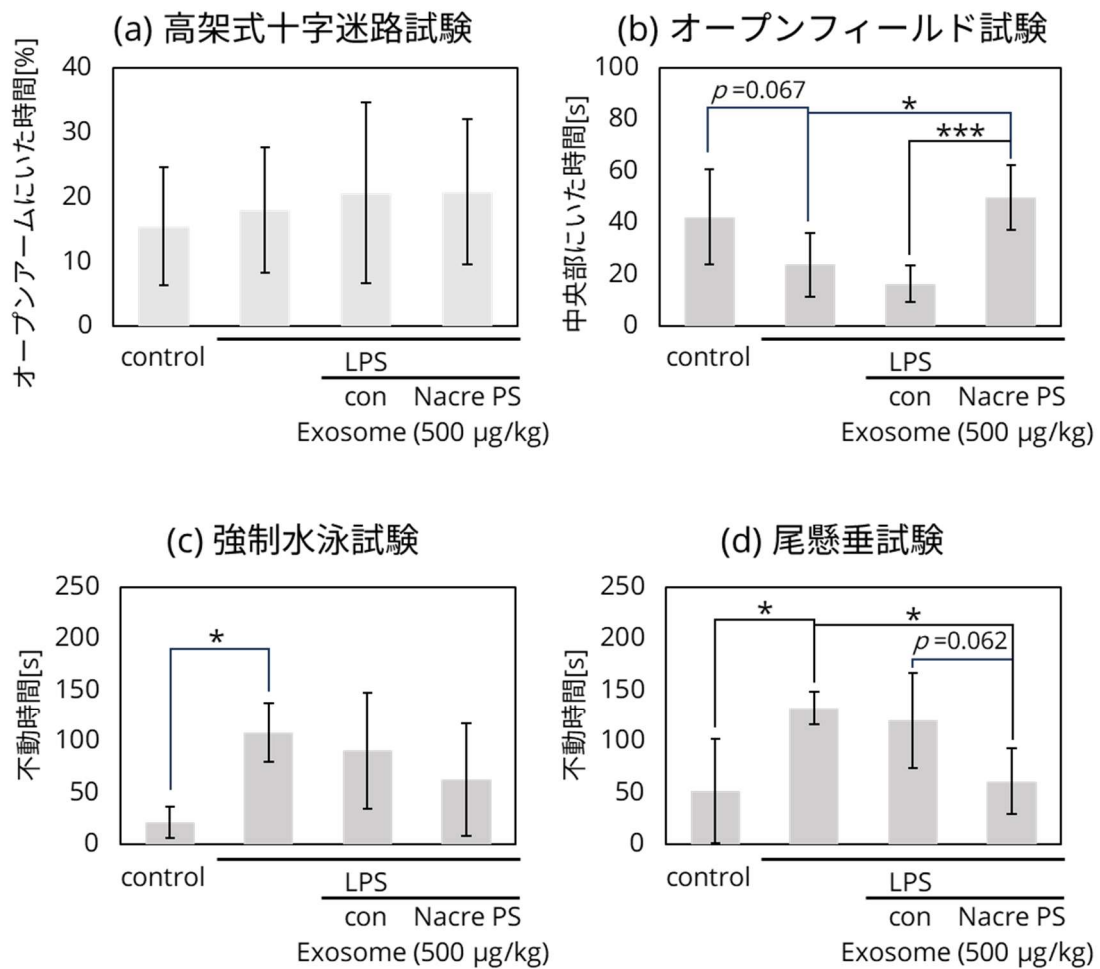
当研究室の山上以前、今回と同じ画分において記憶改善物質である真珠層硫酸多糖を単離・同定している。[46] この研究では真珠層硫酸多糖がガラクトースやマンノース、D-グルコースなど様々な単糖から成り、ウロン酸や硫酸基を含むことが示されている。(図 51) また、ゲルろ過クロマトグラフィー分析により分子量が約 750kDa であることが明らかにされている。これらは本章の結果と一致するため、真珠層硫酸多糖は記憶改善作用だけでなく、抗不安・抗うつ作用も示すことが示唆された。

Monosaccharide	Composition [%]
D-Galactose	23.6
D-Mannose	12.0
D-Glucose	26.0
D-Ribose	5.6
N-Acetyl-D-Mannosamine	3.9
N-Acetyl-D-Glucosamine	6.8
Fucose	3.8
Rhamnose	7.9
N-Acetyl-D-Galactosamine	2.6
Uronic Acid	7.8
Sulfate Group	10.5

図 51 真珠層硫酸多糖の単糖組成分析([43]より参照)

4.2.3 真珠層硫酸多糖のエクソソームを介した経路の検討

真珠層硫酸多糖の特徴から、この物質はおそらく脳に直接作用しないと考えられる。そこで本章では真珠層硫酸多糖が脳に作用する経路としてエクソソームが関わっている仮定し、真珠層硫酸多糖で処理したマウス由来の血清エクソソーム(Nacre PS-Exosome)が LPS 誘発モデルマウスに対して抗不安・抗うつ作用を示すかどうか検討した。(図 52) 高架式十字迷路試験ではいずれのマウスにおいても変化が見られなかったが、オープンフィールド試験では Nacre PS-Exosome によって中央部にいた時間が有意に増加した。(図 52(a),(b)) 一方、強制水泳試験では Nacre PS-Exosome 投与による不動時間の減少は見られなかったが、尾懸垂試験では Nacre PS-Exosome によって不動時間が有意に減少した。(図 52(c),(d)) これらの結果をさらに確認するためマウスの脳を用いてリアルタイム PCR を行ったところ、Mn-SOD や BDNF の mRNA 発現量が LPS によって減少したが、Nacre PS-Exosome 投与によって増加することが分かった。(図 53(a),(b)) また、ウェスタンブロットを行ったところ、TNF α や GFAP、GRP78 の発現量も Nacre PS-Exosome を投与することで減少した。(図 53(c-e)) これらの結果はこれまでの真珠層抽出成分の結果と一致しているため、エクソソームを介して脳に作用している可能性がわずかに示された。しかし、まだはっきりしていない結果もあるため、本当に真珠層硫酸多糖がエクソソームを介して抗不安・抗うつ作用を示しているかについてはさらに検討する必要がある。



Fisher`s exact tests *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$

図 52 Nacre PS-Exosome の抗不安・抗うつ作用
マウスの不安症状を評価するため、それぞれ(a)高架式十字迷路試験と(b)オープンフィールド試験を行った。また、うつ症状を評価するため、(c)強制水泳試験と(d)尾懸垂試験を行った。(n=5)

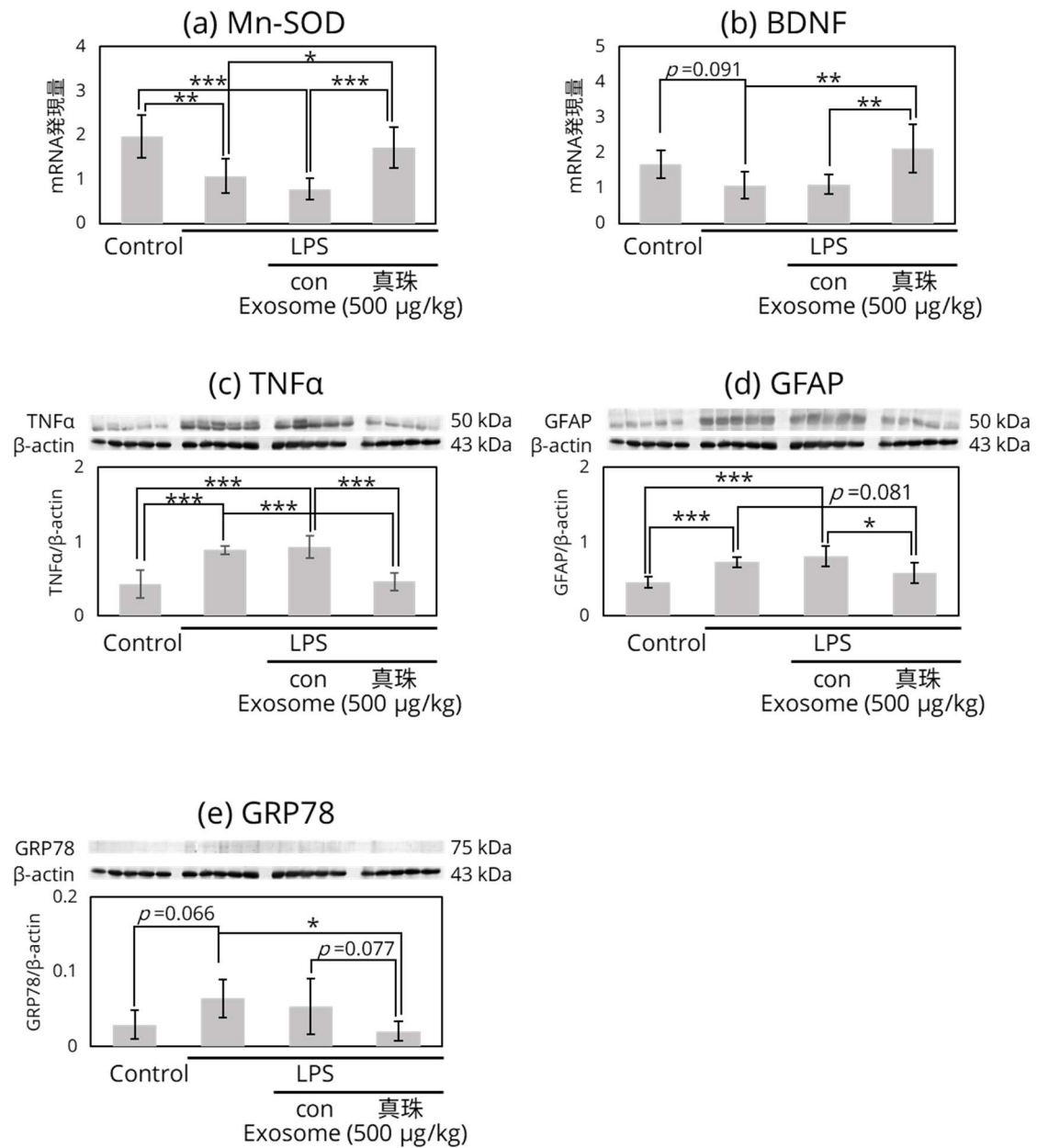


図 53 Nacre PS-Exosome の脳内における生理活性作用

各マウス群における (a)Mn-SOD、(b)BDNF の mRNA 発現量はリアルタイム PCR を用いて測定し、 β -Actin に対して標準化した。(n=5) また、(c)TNF α 、(d)GFAP、(e)GRP78 の発現量はウェスタンブロットを用いて測定し、同様に β -actin に対して標準化した。(n=5)

4.3 考察

本章では逆相分画、陰イオン交換分画、ゲルろ過分画によって真珠層中の抗不安・抗うつ物質の分画・精製を行った。ゲルろ過 HPLC 画分について強制水泳試験をおこなった結果では control マウスの不動時間は 100 秒以上になったが、おそらくマウス同士の喧嘩によるストレスでうつ症状が出てしまったものと推察される。しかし、逆相③・陰イオン交換④と同様に、高分子画分の投与によって不動時間が 50 秒近くまで有意に減少したことから、高分子画分は抗うつ作用を示すと判断した。

また、真珠層硫酸多糖が脳に作用する経路について検討した。薬物動態の観点から、真珠層硫酸多糖が直接脳に作用する可能性は低いと考えられる。血液脳関門 (BBB) は血管と脳内を隔てており、脳内に入る物質を制限する役割を担っている。基本的に低分子量の脂溶性物質しか通過することができないため、硫酸多糖のような高分子量の水溶性物質は通過できないと考えられる。また、体内に投与した薬剤は体内の ADME 系によってほとんど脳に到達しないことが知られている。体内に入った薬剤は通常、吸収 (Absorption)、分布 (Distribution)、代謝 (Metabolism)、排泄 (Excretion) のプロセスを経て体内を移動する。[84] 経口投与の場合は腸管から吸収され、肝臓による様々な代謝・化学修飾を受け、腎臓を介して排出される。(図 54) この過程で腸管に吸収されないものはそのまま排出され、吸収されたとしても肝臓で様々な代謝・化学修飾を受けるため、ほとんどの薬剤は脳に到達する前にすぐに排出されてしまう。肝臓を通過した薬剤の一部は血液を介して全身へ輸送されるが、硫酸多糖は血液脳関門を通過できないため再度肝臓に戻り、排出されると考えられる。そのため本研究では脳に作用する別の経路としてエクソソームを介した経路について検討した。

エクソソームは mRNA やタンパク質、miRNA など様々な成分を内包する細胞外小胞であり、組織間および細胞間でこれらの物質を輸送する。また、様々な細胞から分泌されることや血液脳関門を通過できることから、新たな細胞間コミュニケーションツールとして注目されている。実際に、ヒト幹細胞由来のエクソソームが神経炎症およびアミロイド β 沈着を抑制し、記憶障害を抑制することが報告されている。[85] また、真珠層硫酸多糖は経口投与でも効果を示すことから、薬物代謝を制御する腸管または肝臓に作用することで、それらの細胞から生理活性を示すエクソソームが分泌され、抗不安・抗うつ作用につながるタンパク質や miRNA が脳に輸送されるという仮説を立てた。(図 55)

しかし、Nacre PS-Exosome の生理活性について検討したところ、オープンフィールド試験や尾懸垂試験では抗不安・抗うつ作用がみられたものの、高架式十字迷路試験や強制水泳試験では Nacre PS-Exosome の効果が確認されなかった。また脳内における生理活性作用については一部の活性が示されたが、検討が十分でないため、真珠層硫酸多糖のエクソソームを介した作用が本当に抗不安・抗うつ作用につながっているのかははっきりとしていない。一方、真珠層中の他の画分においても様々な生理活性が確認されている。例えば当研究室の張恒は、真珠層抽出成分→逆相③→陰イオン①の画分が抗糖尿病作用を示すことを確認しており、脾臓に対する抗炎症作用を介していることがわかっている。また当研究室の柴田は、真珠層抽出成分→陰イオン④で老化に伴う外見変化や不安を抑制することを見出したが、真珠層中の 10kDa 以下の画分(真珠層抽出成分には含まれていない)で同様の結果が得られている。したがって、抗不安・抗うつ作用

には真珠層中の他の成分も関与している可能性が高いと考えられる。

また可能性は低いが、真珠層硫酸多糖の代謝産物が脳に作用している可能性も否定できない。天然物由来の硫酸多糖は複数の生理活性作用を示すことが知られている。例えば海藻に含まれるフコイダンは記憶障害改善作用の他に抗うつ作用、抗凝固作用もあり、豚の腸粘膜に含まれるヘパリンは抗凝固作用や抗腫瘍作用、抗炎症作用を示すことが報告されている[86,87]。一方、硫酸多糖の生理活性は硫酸基によって調節されていることが知られている。中国の研究チームは、海ブドウ由来の硫酸多糖を4つに分画し、そのうち硫酸基を最も多く含む画分で最も抗炎症活性を示したことを報告している[88]。また硫酸基を持たないヒアルロン酸やキトサンは、化学的に硫酸基を付加することで抗腫瘍活性や抗凝固活性を示すようになることも報告されている[89,90]。これらのことから、真珠層硫酸多糖の構造(特に硫酸基付加部位)を決定し、他の硫酸多糖と比較することで、生理活性作用や活性部位を明らかにすることができる可能性がある。

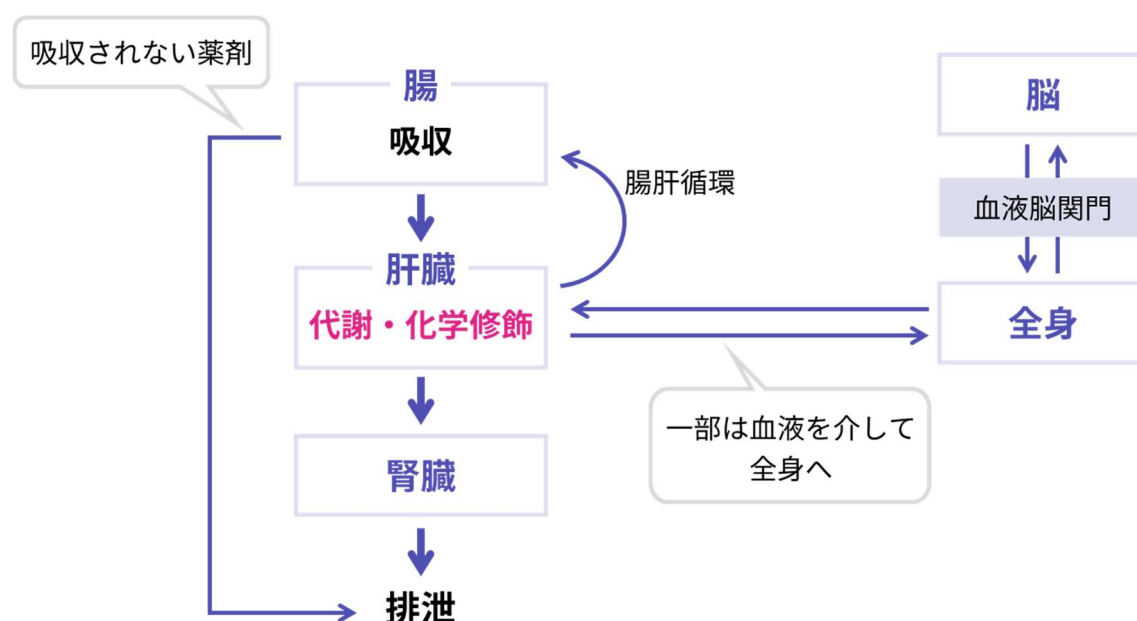


図 54 体内動態の概念図

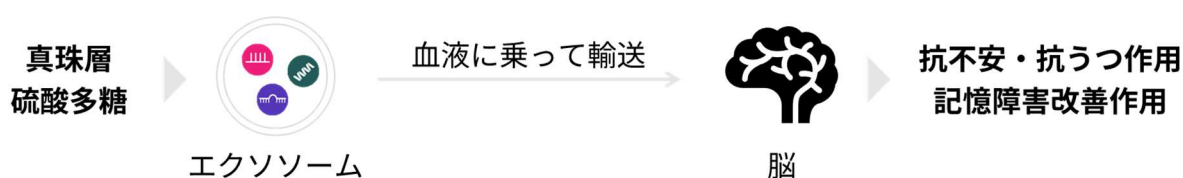
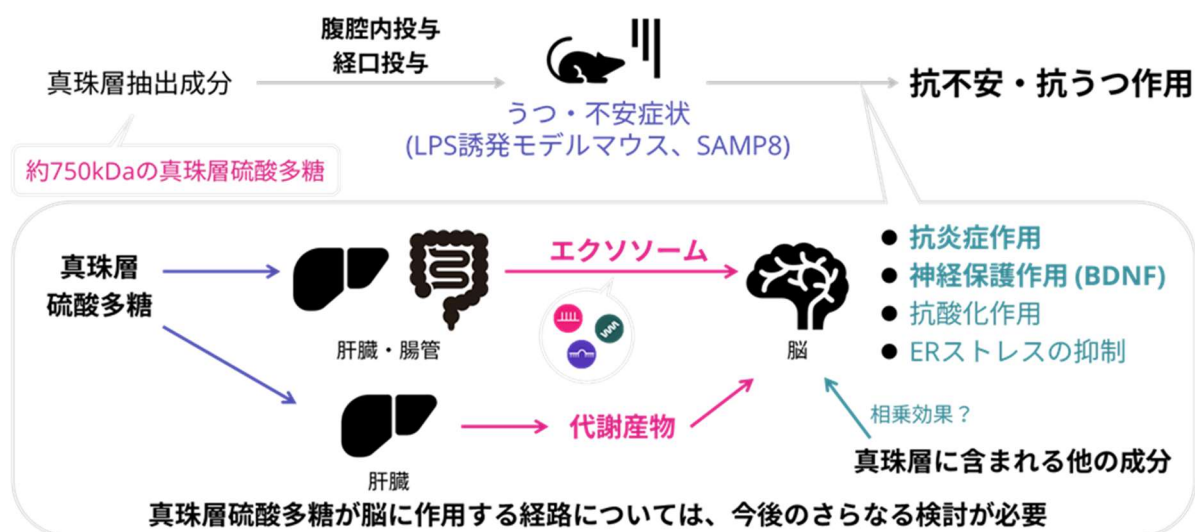


図 55 真珠層硫酸多糖がエクソソームを介して脳に作用する経路の仮説

第5章 総括・実用化に向けた今後の課題

本研究では、真珠層抽出成分が LPS 誘発モデルマウスおよび SAMP8 マウスに対して抗不安・抗うつ作用を示すことが明らかになり、脳内では抗酸化作用や抗炎症作用、神経保護作用、ER ストレスの抑制が関連していることが示唆された。二つのモデルマウスに対する生理活性作用に違いはみられるものの、共通して抗炎症作用と神経保護作用が確認されたことから、これらの生理活性は抗不安・抗うつ作用において重要であると考えられる。また本研究では LPS 誘発モデルを用い、約 750kDa の硫酸多糖が抗不安・抗うつ作用に寄与していることを明らかにした。当研究室は以前にも、この物質がスコポリン誘発記憶障害に対して効果を示すことを報告しているため、真珠層硫酸多糖は記憶障害だけでなく、不安・うつ病にも有効であることが示された。本研究は、真珠が不安やうつ病に有効であることを初めて示す報告となった。(図 56)

一方、真珠層硫酸多糖が脳に作用する経路としてエクソソームを介する可能性が示唆されたが、相乗効果などにより他の成分が関与している可能性も考えられた。さらに、代謝産物が脳に作用している可能性も否定できない。したがって、脳に作用する経路については今後の研究課題となる。(図 56) また、他の不安・うつモデルにおいても再現性がみられるか検証する必要があると考えられる。



本研究の成果は、真珠が不安・うつ病に有効であることを初めて示す報告

図 56 本研究の総括

本章では実用化に向けて、真珠の副作用や臨床試験についても論述する。既存の抗うつ薬はうつ病患者に大きな負担を強いてしまうことが知られている。SSRI や SNRI などの合成薬剤は第一選択抗うつ薬として最初に処方されることが多いが、副作用として吐き気、嘔吐、睡眠障害、性機能障害などが生じることがある。[91,92] さらに抗うつ薬が効かないケースもあるため、その場合は薬剤の用量調整や別の抗うつ薬への切り替え、他の薬剤との併用などの対策が講じられる。しかし、これによって副作用が増大するリスクがあるため、患者へのさらなる負担につながってしまう。一方、真珠は先行研究においてその安全性が示されている。急性毒性や長期毒性、遺伝子変異など様々な観

点から真珠の毒性試験が行われているが、いずれの研究でも明らかな毒性は報告されていない。[93,94,95,96,97] また、真珠は 1000 年以上にわたって食されてきた生薬としても親しまれている。一方、当研究室の山本は SAMP8 マウスに真珠層抽出成分を食餌させ続け、その寿命を調べたところ、真珠層投与によって SAMP8 マウスの寿命が 33% 延長することをすでに報告している。[98] しかし、肝臓でわずかな毒性がみられたことから、真珠層抽出成分の副作用に関してはさらに検討を重ねる必要があると考えられる。

一方、中国の研究グループの統計調査によると、真珠に関する臨床研究は 34 件ほど行われているが、他の薬剤と組み合わせて使用されることが多く、真珠だけを用いた臨床研究は限られている。[99] 真珠だけを用いたものでは婦人科系疾患や床ずれに対する効果が報告されている。[100,101,102] また、台湾の研究グループは被験者に真珠粉末を投与することで、血液中の抗酸化活性を増加させることを報告している。[103] しかし、真珠だけを用いた臨床試験で、記憶障害やうつ病について調べた報告はないことから、真珠層抽出成分のみで臨床試験を実施することで、真珠の機能性食品としての有効性をさらに確立できる可能性があると考えられる。

第6章 参考文献

- [1] World Health Organization (WHO). Depressive disorder (depression). (2017) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. (2024. 12. 22 アクセス)
- [2] COVID-19 Mental Disorders Collaborators. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *Journal of The Lancet*. Volume 398, Issue 10312, p1700-1712. (2021)
- [3] World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2017.
- [4] 厚生労働省『自殺・うつ対策の経済的便益 (自殺やうつによる社会的損失)』、2009、厚生労働省『自殺・うつ対策の経済的便益 (自殺やうつによる社会的損失)』2009 年、<https://www.mhlw.go.jp/bunya/shougaihoken/cyousajigyoku/>. (2024. 12. 22 アクセス)
- [5] Svenja Bremshey, Juliana Groß, Kim Renken, Olivia Andrea Maseck. The role of serotonin in depression—A historical roundup and future directions. *Journal of Neurochemistry*. Volume 168, Issue 9, page 1751-1779. (2024)
- [6] Moncrieff, J., Cooper, R.E., Stockmann, T. et al. The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Mol Psychiatry* 28, 3243–3256 (2023).
- [7] Vahid-Ansari Faranak, Albert Paul R. Rewiring of the Serotonin System in Major Depression. *Frontiers in Psychiatry*. Volume 12.DOI: 10.3389/fpsyt.2021.802581 (2021)
- [8] Krishnan, V., Nestler, E. The molecular neurobiology of depression. *Nature* **455**, 894–902 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07455>.
- [9] Vahid-Ansari Faranak , Zhang Min , Zahrai Amin , Albert Paul R. Overcoming Resistance to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Targeting Serotonin-1A Receptors and Adult Neuroplasticity. *Frontiers in Neuroscience*. Volume 13. DOI: 10.3389/fnins.2019.00404. (2019)
- [10] Madhukar H. Trivedi, M.D., Maurizio Fava, M.D., Stephen R. Wisniewski, Ph.D., Michael E. Thase, M.D., Frederick Quitkin, M.D., Diane Warden, Ph.D., M.B.A., Louise Ritz, M.B.A., +6, for the STAR*D Study Team. Medication Augmentation after the Failure of SSRIs for Depression. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*. Volume. 354, No.12. DOI: 10.1056/NEJMoa052964. (2006)
- [11] Wang, H., He, Y., Sun, Z. *et al.* Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *J Neuroinflammation* **19**, 132 (2022).
- [12] Yekta Dowlati, Nathan Herrmann, Walter Swardfager, Helena Liu, Lauren Sham, Elyse K. Reim, Krista L. Lanctôt, A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression, *Biological Psychiatry*, Volume 67, Issue 5, 2010, Pages 446-457.
- [13] Yong-Ku Kim, Kyeong-Sae Na, Kyung-Ho Shin, Han-Yong Jung, So-Hyun Choi, Jung-Bum Kim, Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Volume 31, Issue 5,

2007, Pages 1044-1053.

- [14] Yehuda Pollak, Raz Yirmiya, Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for 'depression due to a general medical condition', immunotherapy and antidepressive treatment, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, Volume 5, Issue 4, December 2002, Pages 389–399.
- [15] Jeffrey A. Ciesla, M.A., and John E. Roberts, Ph.D. Meta-Analysis of the Relationship Between HIV Infection and Risk for Depressive Disorders. *The American Journal of Psychiatry*. Volume 158, No. 5. (2001)
- [16] Naoshi Horikawa, Tomoko Yamazaki, Namiki Izumi, Masakatsu Uchihara, Incidence and clinical course of major depression in patients with chronic hepatitis type C undergoing interferon-alpha therapy: a prospective study, *General Hospital Psychiatry*, Volume 25, Issue 1, 2003, Pages 34-38.
- [17] Jeon SW, Kim YK. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World J Psychiatry*. 2016 Sep 22;6(3):283-93. doi: 10.5498/wjp.v6.i3.283.
- [18] Charles L. Raison, Andrey S. Borisov, Matthias Majer, Daniel F. Drake, Giuseppe Pagnoni, Bobbi J. Woolwine, Gerald J. Vogt, Breanne Massung, Andrew H. Miller, Activation of Central Nervous System Inflammatory Pathways by Interferon-Alpha: Relationship to Monoamines and Depression, *Biological Psychiatry*, Volume 65, Issue 4, 2009, Pages 296-303.
- [19] Catherine N. Black, Mariska Bot, Peter G. Scheffer, Pim Cuijpers, Brenda W.J.H. Penninx. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis, *Psychoneuroendocrinology*, Volume 51, 2015, Pages 164-175.
- [20] Nataliia Bakunina, Carmine M. Pariante, Patricia A. Zunszain. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*. Volume 144, Issue 3, Page 365-373. (2015)
- [21] B.J. Rawdin, S.H. Mellon, F.S. Dhabhar, E.S. Epel, E. Puterman, Y. Su, H.M. Burke, V.I. Reus, R. Rosser, S.P. Hamilton, J.C. Nelson, O.M. Wolkowitz, Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression, *Brain, Behavior, and Immunity*, Volume 31, 2013, Pages 143-152.
- [22] Correia, Ana Salomé, Armando Cardoso, and Nuno Vale. 2023. "Oxidative Stress in Depression: The Link with the Stress Response, Neuroinflammation, Serotonin, Neurogenesis and Synaptic Plasticity", *Antioxidants* 12, no. 2: 470.
- [23] Ronald S Duman, Jessica Malberg, Shin Nakagawa, Carrol D'Sa, Neuronal plasticity and survival in mood disorders, *Biological Psychiatry*, Volume 48, Issue 8, 2000, Pages 732-739.
- [24] Kinga Sałaciak, Karolina Pytka, Biased agonism in drug discovery: Is there a future for biased 5-HT_{1A} receptor agonists in the treatment of neuropsychiatric diseases?, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 227, 2021, 107872.
- [25] Yu, H., Chen, Zy. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin* 32, 3–11 (2011).

- [26] Biao Chen, Dar Dowlatshahi, Glenda M MacQueen, Jun-Feng Wang, L.Trevor Young, Increased hippocampal bdnf immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication, *Biological Psychiatry*, Volume 50, Issue 4, 2001, Pages 260-265.
- [27] Murawska-Ciałowicz, Eugenia, Mona Wiatr, Maria Ciałowicz, Gilmara Gomes de Assis, Wojciech Borowicz, Silvia Rocha-Rodrigues, Małgorzata Paprocka-Borowicz, and Adilson Marques. 2021. "BDNF Impact on Biological Markers of Depression—Role of Physical Exercise and Training" *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, no. 14: 7553.
- [28] Kinoshita, S.; Wang, N.; Inoue, H.; Maeyama, K.; Okamoto, K.; Nagai, K.; Kondo, H.; Hirono, I.; Asakawa, S.; Watabe, S. Deep sequencing of ESTs from nacreous and prismatic layer producing tissues and a screen for novel shell formation- related genes in the pearl oyster. *PLoS ONE* 2011, 6, e21238.
- [29] Zhang, J.X.; Li, S.R.; Yao, S.; Bi, Q.R.; Hou, J.J.; Cai, L.Y.; Han, S.M.; Wu, W.Y.; Guo, D.A. Anticonvulsant and sedative–hypnotic activity screening of pearl and nacre (mother of pearl). *J. Ethnopharmacol.* 2016, 181, 229–235.
- [30] Xu, H.; Huang, K.; Gao, Q.; Gao, Z.; Han, X. A study on the prevention and treatment of myopia with nacre on chicks. *Pharmacol. Res.* 2001, 44, 1–6.
- [31] Mangrulkar, R.S.; Saint, S.; Chu, S.; Tierney, L.M. What is the role of the clinical “pearl”? *Am. J. Med.* 2002, 113, 617–624.
- [32] Hsin-Ling Yang, Mallikarjuna Korivi, Ming-Kuem Lin, Hebron Chun-Wei Chang, Chi-Rei Wu, Meng-Shiou Lee, William Tzu-Liang Chen, You-Cheng Hseu. Antihemolytic and antioxidant properties of pearl powder against 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced hemolysis and oxidative damage to erythrocyte membrane lipids and proteins. *Journal of Food and Drug Analysis*. Volume 25, Issue 4, Pages 898-907. (2017)
- [33] Siyin Han PhD, Peng Liu PhD, Qiangqiang Yan MD, Yanhui Cen PhD, Guanyi Wu PhD, Zhenxing Chen PhD, Mingxing Li PhD, Yasheng Deng MD, Fei Luo MD, Jiang Lin PhD. Seawater pearl hydrolysate inhibits photoaging via decreasing oxidative stress, autophagy and apoptosis of Ultraviolet B-induced human skin keratinocytes. *Journal of Cosmetic Dermatology*. Volume 23, Issue1, Page 256-270. (2023)
- [34] Rousseau, M.; Pereira-Mouriès, L.; Almeida, M.J.; Milet, C.; Lopez, E. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2003, 135, 1–7.
- [35] Brion, A.; Zhang, G.; Dossot, M.; Moby, V.; Dumas, D.; Hupont, S.; Piet, M.H.; Bianchi, A.; Mainard, D.; Galois, L.; et al. Nacre extract restores the mineralization capacity of subchondral osteoarthritis osteoblasts. *J. Struct. Biol.* 2015, 192, 500–509.
- [36] Chaturvedi, R.; Singha, P.K.; Dey, S. Water Soluble Bioactives of Nacre Mediate Antioxidant Activity and Osteoblast Differentiation. *PLoS ONE* 2013, 8, e84584.
- [37] Atlan, G.; Delattre, O.; Berland, S.; LeFaou, A.; Nabias, G.; Cot, D.; Lopez, E.

- Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1017–1022.
- [38] Asvanund, Pattapon DDS, MSD, PhD*; Chunhabundit, Panjit BSc, MSc, PhD[†]. Alveolar Bone Regeneration by Implantation of Nacre and B-Tricalcium Phosphate in Guinea Pig. *Implant Dentistry* 21(3):p 248-253, June 2012.
- [39] Rousseau, M.; Pereira-Mouriès, L.; Almeida, M.J.; Milet, C.; Lopez, E. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts. *Comp. Biochem. Physiol. B* **2003**, *135*, 1–7.
- [40] Chen, X., Peng, L. H., Chee, S. S., Shan, Y. H., Liang, W. Q., & Gao, J. Q. (2019). Nanoscaled pearl powder accelerates wound repair and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *45*(6), 1009–1016.
- [41] Meiqi Cheng, Man Liu, Lirong Chang, Qing Liu, Chunxiao Wang, Le Hu, Ziyue Zhang, Wanying Ding, Li Chen, Sihan Guo, Zhi Qi, Panpan Pan, Jingdi Chen, Overview of structure, function and integrated utilization of marine shell, *Science of The Total Environment*, Volume 870, 161950. (2023)
- [42] Fuji, Tatsuya; Inoue, Tatsurou; Hasegawa, Yasushi. Nacre extract prevents scopolamine-induced memory deficits in rodents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 11(3):p 202-208. (2018)
- [43] Yamagami, H.; Fuji, T.; Wako, M.; Hasegawa, Y. Sulfated Polysaccharide Isolated from the Nacre of Pearl Oyster Improves Scopolamine-Induced Memory Impairment. *Antioxidants*. (2021)
- [44] Yotsuya, Y., Hasegawa, Y. Nacre extract from pearl oyster attenuates amyloid beta-induced memory impairment. *J Nat Med* 76, 419–434. (2022)
- [45] Wei Dai, Kunmiao Feng, Xiaolei Sun, Lingchuan Xu, Sijia Wu, Khalid Rahmand, Dan Jia, Ting Han, Natural products for the treatment of stress-induced depression: Pharmacology, mechanism and traditional use, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 285, 2022, 114692.
- [46] D. Liu, K. Xie, X. Yang, J. Gu, G. Li, X. Wang, Z. Wang. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats, *Behavioural Brain Research*, 264 (1) (2014), pp. 9-16, 10.1016/j.bbr.2014.01.039.
- [47] Shayganfard, M. Molecular and biological functions of resveratrol in psychiatric disorders: a review of recent evidence. *Cell Biosci* **10**, 128 (2020).
- [48] Ya-Dong Wei, Xing-xing Chen, Long-Jun Yang, Xin-Ran Gao, Qing-Rong Xia, Cong-Cong Qi, Jin-Fang Ge, Resveratrol ameliorates learning and memory impairments induced by bilateral hippocampal injection of streptozotocin in mice, *Neurochemistry International*, Volume 159, 2022, 105385.
- [49] Silvestro, Serena, Placido Bramanti, and Emanuela Mazzon. 2021. "Role of Quercetin in Depressive-Like Behaviors: Findings from Animal Models" *Applied Sciences* 11, no. 15: 7116.
- [50] Li Jie, Xiang Haitao , Huang Chao , Lu Jiashu. Pharmacological Actions of

Myricetin in the Nervous System: A Comprehensive Review of Preclinical Studies in Animals and Cell Models. *Frontiers in Pharmacology*. Volume 12. (2021)

- [51] Santarelli, L., et al. (2003). *Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants*. *Science*, 301(5634), 805-809.
- [52] Clark, M. S., et al. (2006). *Antidepressant treatment reduces cognitive impairment and hippocampal damage in a rat model of depression*. *Psychopharmacology*, 184(4), 543-551.
- [53] Duman, R. S., et al. (2000). *Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders*. *Biological Psychiatry*, 48(8), 732-739.
- [54] Rhie SJ, Jung EY, Shim I. The role of neuroinflammation on pathogenesis of affective disorders. *J Exerc Rehabil*. 2020 Feb 26;16(1):2-9.
- [55] Yu Qingying , Zhao Tingting , Liu Molin , Cao Duo , Li Jiaxin , Li Yanling , Xia Mengyao , Wang Xiaoyu , Zheng Tingting , Liu Chuanguo , Mu Xiangyu , Sun Peng. Targeting NLRP3 Inflammasome in Translational Treatment of Nervous System Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, volume 12. (2021)
- [56] Bian, H., Wang, G., Huang, J. et al. Dihydrolipoic acid protects against lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and neuroinflammation via regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling in rat. *J Neuroinflammation* 17, 166 (2020).
- [57] Elżbieta Żmudzka, Kinga Sałaciak, Jacek Sapa, Karolina Pytko, Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies, *Life Sciences*, Volume 210, 2018, Pages 106-124.
- [58] Joshua Kaufman, Christine DeLorenzo, Sunia Choudhury, Ramin V. Parsey, The 5-HT1A receptor in Major Depressive Disorder, *European Neuropsychopharmacology*, Volume 26, Issue 3, 2016, Pages 397-410.
- [59] Greenberg, M. J., Muirhead, M. A., & Gorman, S. L. (1990). Mianserin: Pharmacological properties and clinical use. *Pharmacology & Therapeutics*, 46(3), 223-233.
- [60] Fava, A. N., Gatti, A. C. T., & Almeida, G. M. (2012). 5-HT2A receptor antagonism: Role in the therapeutic profile of mirtazapine. *Psychopharmacology*, 219(1), 1-9.
- [61] Zhenlei Xia, Joseph W. Depierre, Lennart Nässberger. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 β and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cells, *Immunopharmacology*, Volume 34, Issue 1, 1996, Pages 27-37.
- [62] Roumestan, C., Michel, A., Bichon, F. et al. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respir Res* 8, 35 (2007).
- [63] Rana, T., Behl, T., Sehgal, A. et al. Unfolding the Role of BDNF as a Biomarker for Treatment of Depression. *J Mol Neurosci* 71, 2008–2021 (2021).
- [64] Lejing Lian, Ying Xu, Jianbo Zhang, Yingcong Yu, Naping Zhu, Xiaofei Guan, Hui Huang, Ruijie Chen, Jie Chen, Guilan Shi, Jianchun Pan, Antidepressant-like effects of a novel curcumin derivative J147: Involvement of 5-HT1A receptor, *Neuropharmacology*, Volume 135, 2018, Pages 506-513.

- [65] Cerejeira Joaquim , Lagarto Luísa , Mukaetova-Ladinska Elizabeta. Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia, *Frontiers in Neurology*, volume 3. (2012)
- [66] Taameeyapradit U, Udomittipong D, Tepparak N. Characteristics of behavioral and psychological symptoms of dementia, severity and levels of distress on caregivers. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*. 2014 Apr;97(4):423-430.
- [67] Yamamoto, H., Shimomura, N., Oura, K. et al. Nacre Extract from Pearl Oyster Shell Prevents D-Galactose-Induced Brain and Skin Aging. *Mar Biotechnol* 25, 503–518 (2023).
- [68] Bergamini Giorgio , Massinet Helene , Hart Aaron , Durkin Sean , Pierlot Gabin , Steiner Michel Alexander, Probing the relevance of the accelerated aging mouse line SAMP8 as a model for certain types of neuropsychiatric symptoms in dementia, *Frontiers in Psychiatry*, Volume 14.(2023)
- [69] Vasilopoulou F, Bellver-Sanchis A, Companys-Aleman J, Jarne-Ferrer J, Irisarri A, Palomera-Ávalos V, Gonzalez-Castillo C, Ortuño-Sahagún D, Sanfeliu C, Pallàs M, et al. Cognitive Decline and BPSD Are Concomitant with Autophagic and Synaptic Deficits Associated with G9a Alterations in Aged SAMP8 Mice. *Cells*. 2022; 11(16):2603.
- [70] Meghan C. Gilmore, Lisa Stebbins, Soledad Argüelles-Borge, Brizel Trinidad, Charles J. Golden. Development and treatment of aggression in individuals with dementia. *Aggression and Violent Behavior*, Volume 54, 2020, 101415.
- [71] Agrawal AK, Gowda M, Achary U, Gowda GS, Harbishettar V. Approach to Management of Wandering in Dementia: Ethical and Legal Issue. *Indian Journal of Psychological Medicine*. 2021;43(5_suppl):S53-S59. doi: 10.1177/02537176211030979.
- [72] Meng He, Xu-Feng Huang, Guanbin Gao, Ting Zhou, Wenting Li, Jinqi Hu, Jia Chen, Jing Li, Taolei Sun, Olanzapine-induced endoplasmic reticulum stress and inflammation in the hypothalamus were inhibited by an ER stress inhibitor 4-phenylbutyrate, *Psychoneuroendocrinology*, Volume 104, 2019, Pages 286-299.
- [73] Jangra, A., Sriram, C.S., Dwivedi, S. et al. Sodium Phenylbutyrate and Edaravone Abrogate Chronic Restraint Stress-Induced Behavioral Deficits: Implication of Oxidative-Nitrosative, Endoplasmic Reticulum Stress Cascade, and Neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol* 37, 65–81 (2017).
- [74] Mao, J., Hu, Y., Ruan, L., Ji, Y., Lou, Z."Role of endoplasmic reticulum stress in depression (Review)". *Molecular Medicine Reports* 20.6 (2019): 4774-4780.
- [75] Chipurupalli Sandhya , Samavedam Unni , Robinson Nirmal. Crosstalk Between ER Stress, Autophagy and Inflammation. *Frontiers in Medicine*, volume 8. (2021)
- [76] Sena Kim, Yeonsoo Joe, Hyo Jeong Kim, You-Sun Kim, Sun Oh Jeong, Hyun-Ock Pae, Stefan W. Ryter, Young-Joon Surh, Hun Taeg Chung; Endoplasmic Reticulum Stress-Induced IRE1 α Activation Mediates Cross-Talk of GSK-3 β and XBP-1 To Regulate Inflammatory Cytokine Production. *J Immunol* 1 May 2015; 194 (9): 4498–4506.
- [77] Tafet Gustavo E. , Nemeroff Charles B. Pharmacological Treatment of Anxiety

- Disorders: The Role of the HPA Axis. *Frontiers in Psychiatry*. Volume 11, 10.3389/fpsy.2020.00443. (2020)
- [78] Marishka K. Brown, May T. Chan, John E. Zimmerman, Allan I. Pack, Nicholas E. Jackson, Nirinjini Naidoo. Aging induced endoplasmic reticulum stress alters sleep and sleep homeostasis. *Neurobiology of Aging*, Volume 35, Issue 6, 2014, Pages 1431-1441.
- [79] Lei Gao, Huatao Chen, Cuimei Li, Yaoyao Xiao, Dan Yang, Manhui Zhang, Dong Zhou, Wei Liu, Aihua Wang, Yaping Jin. ER stress activation impairs the expression of circadian clock and clock-controlled genes in NIH3T3 cells via an ATF4-dependent mechanism. *Cellular Signalling*, Volume 57, 2019, Pages 89-101.
- [80] Sietse F. de Boer, Jaap M. Koolhaas, 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: A pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis, *European Journal of Pharmacology*, Volume 526, Issues 1–3, 2005, Pages 125-139.
- [81] Neelima Sharma, Rajan Sharma, Yudhishtir S. Rajput, Bimlesh Mann, Kamal Gandhi, Distinction between glycomacropeptide and β -lactoglobulin with ‘stains all’ dye on tricine SDS-PAGE gels, *Food Chemistry*, Volume 340, 2021, 127923.
- [82] Harvey A. Goldberg, Kevin J. Warner, The Staining of Acidic Proteins on Polyacrylamide Gels: Enhanced Sensitivity and Stability of “Stains-All” Staining in Combination with Silver Nitrate, *Analytical Biochemistry*, Volume 251, Issue 2, 1997, Pages 227-233.
- [83] Sharma, Y., Rao, C. M., Rao, S. C., Krishna, A. G., & Somasundaram, T. (1989). Binding site conformation dictates the color of the dye stains-all. A study of the binding of this dye to the eye lens proteins crystallins. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20269–20275.
- [84] Jiahui Wang, Kehan Zhu, Miaomiao Zhang, Qian Zhou, Wen Ji, Zhen Yao, Duxin Li, Pharmacokinetics, tissue distribution, and subacute toxicity of oral carrageenan in mice, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 266, Part 1, 2024, 130725.
- [85] Ding, M., Shen, Y., Wang, P. *et al.* Exosomes Isolated From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Neuroinflammation and Reduce Amyloid-Beta Deposition by Modulating Microglial Activation in Alzheimer’s Disease. *Neurochem Res* **43**, 2165–2177 (2018).
- [86] Jing Yang, He Zhao, Shengtao Qu. Therapeutic potential of fucoidan in central nervous system disorders: A systematic review. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 277, Part 3. (2024)
- [87] Danielle M. H. Beurskens, Joram P. Huckriede, Roy Schrijver, H. Coenraad Hemker, Chris P. Reutelingsperger, Gerry A. F. Nicolaes. The Anticoagulant and Nonanticoagulant Properties of Heparin. *Thromb Haemost* 2020, volume 120(10): 1371-1383.
- [88] Yujiao Sun, Zhengqi Liu, Shuang Song, Beiwei Zhu, Lili Zhao, Jinju Jiang, Ning Liu, Jing Wang, Xuefeng Chen. Anti-inflammatory activity and structural identification of a sulfated polysaccharide CLGP4 from *Caulerpa lentillifera*. *International Journal of*

Biological Macromolecules, Volume 146, 2020, Pages 931-938.

- [89] Anaïd Benítez; Travis J. Yate6s; Luis E. Lopez; Wolfgang H. Cerwinka; Ashraf Bakkar; Vinata B. Lokeshwar. Targeting Hyaluronidase for Cancer Therapy: Antitumor Activity of Sulfated Hyaluronic Acid in Prostate Cancer Cells. *Microenvironment and Immunology*, Volume 71, Issue 12. (2011)
- [90] Syrine Dimassi, Nicolas Tabary, Feng Chai, Nicolas Blanchemain, Bernard Martel. Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, Volume 202, 2018, Pages 382-396.
- [91] David DJ, Gourion D. [Antidepressant and tolerance: Determinants and management of major side effects]. *L'encephale*. 2016 Dec;42(6):553-561. DOI: 10.1016/j.encep.2016.05.006.
- [92] Thanacoody, H.K.R., Thomas, S.H.L. Tricyclic Antidepressant Poisoning. *Toxicol Rev* **24**, 205–214 (2005).
- [93] Mao, Q. H., Xu, P., Cheng, Y. N., Liao, J., Chen, L., Xing, L., et al. (2018). Preliminary Study on Preparation and Biological Experimental Assessment of Nano-Scale Freshwater Pearl Powder. *J. Mod. Stomatology* **32** (05), 257–260.
- [94] Zheng, B., Xu, P., Li, X. N., Chen, L., Chen, Y. N., Zhang, W. B., et al. (2019). Effect of Nano-Pearl Powder on Cell Viability of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Chin. J. Pract. Stomatology* **12** (01), 26–30.
- [95] Wu, J. Y., and Zhu, J. P. (2009). Observe the Safety of Water Soluble Pearl Powder: An Experimental Research. *Chin. Archives Traditional Chin. Med.* **27** (02), 397–399.
- [96] Shen, L. L., Zhong, Y. H., Li, S. F., Hu, Q., Huan, F., and Wang, Y. B. (2013). Toxicological Evaluation for the Edible Safety of Pearl Powder. *J. Baotou Med. Coll.* **29** (05), 21–24.
- [97] Deng, C. M., Yin, G. R., Liu, Y., Yin, L. B., and Lu, D. W. (2014). Safety Evaluation of the Black Pearl. *Guangdong Chem. Ind.* **41** (05), 19–20.
- [98] Yamamoto, H.; Shimomura, N.; Hasegawa, Y. Oral Administration of Nacre Extract from Pearl Oyster Shells Has Anti-Aging Effects on Skin and Muscle, and Extends the Lifespan in SAMP8 Mice. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 713.
- [99] Song Yinglian , Chen Wanyue , Fu Ke , Wang Zhang. The Application of Pearls in Traditional Medicine of China and Their Chemical Constituents, Pharmacology, Toxicology, and Clinical Research. *Frontiers in Pharmacology*. Volume 13. (2022)
- [100] Tang, Z. J., Mei, Z. M., Huo, M. Y., and Zou, Y. P. (1992). Treatment of 64 Cases of Cervical Erosion with Pearl Powder. *Chin. J. New Drugs Clin.* (05), 296–297.
- [101] Zhao, J. Z., and Yu, W. Y. (2014). Observation on Treatment of 47 Cases of Infection and Dehiscence of Perineal Side Incision with Pearl Powder. *Zhejiang J. Traditional Chin. Med.* **49** (05), 352–353.
- [102] Xie, F. Z. (2013). Observation on the Effect of Pearl Powder in the Nursing of Pressure Sores. *Mod. Nurse* (01), 135–136.
- [103] Hui-Fang Chiu, Su-Chun Hsiao, Yan-Ying Lu, Yi-Chun Han, You-Cheng Shen, Kamesh Venkatakrishnan, Chin-Kun Wang. Efficacy of protein rich pearl powder on

antioxidant status in a randomized placebo-controlled trial. *Journal of Food and Drug Analysis*, Volume 26, Issue 1, 2018, Pages 309-317.

第7章 謝辞

本博士論文は、学部4年生から博士課程3年生の間の6年間に行った研究をまとめたものです。本研究の成果を発表するまでに多くの方々からご指導やご助力をいただきました。

本研究を遂行するにあたり、あらゆる研究活動についてご指導いただきました長谷川靖教授には誠に心から深く感謝申し上げます。また、予備審査および本審査におきまして貴重なご助言をいただいた本学のチャンヨンチョル教授、徳樂清孝教授にも感謝申し上げます。他にも四ツ屋君や下村さん、西村君をはじめとする当研究室の同期・先輩・後輩の皆様には研究の手助けや研究室の環境作りに尽くしていただいたこと、なにより研究室メンバーとして時間をともにしてくれたことに感謝申し上げます。また本論文の執筆にあたり、富士さん、井上さん、松山さん、大浦さん、光さん、四ツ屋君、下村さん、若生さん、山本さん、張君、柴田君の研究成果を参考にさせていただきました。皆様に感謝の意を表します。

本研究は日本科学協会 笹川科学研究助成、ならびに JST 次世代研究者挑戦的研究プログラムにより研究助成の支援をいただいたものです。また、RNA-seq 解析のご指導は筑波大学の菅澤助教より賜りました。また、産業技術総合研究所の野田グループ長からは研究に対する姿勢や情熱をご教授いただきました。これらの方々や団体にも深く感謝申し上げます。

最後に博士課程への進学を後押しし、精神面や経済面で応援してくれた両親、兄弟に心から感謝申し上げます。