

松山大学博士（薬学）学位論文

3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone と酸棗仁湯の

脳由来神経栄養因子産生促進作用が脳機能に及ぼす影響に関する研究

Effects of brain-derived neurotrophic factor induced ability of 3,5,6,7,8,3',4'-
heptamethoxyflavone and sansoninto (酸棗仁湯) on brain functions

松山大学大学院 医療薬学研究科

薬理学研究室

澤本 篤志

-目次-

	頁
序論	4
第1章 柑橘果皮由来成分 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone の抗うつ効果	
第1節 コルチコステロン誘発性うつ病態様モデルマウスに対する 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone の抗うつ効果の検討	
1-1-1 緒言	7
1-1-2 材料と方法	9
1-1-3 結果	13
1-1-4 考察	26
第2節 予測不可能慢性緩和ストレス負荷モデルマウスに対する 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone の抗うつ効果の検討	
1-2-1 緒言	30
1-2-2 材料と方法	31
1-2-3 結果	36
1-2-4 考察	45
第2章 中枢神経疾患改善作用を有する漢方薬の探索	
第1節 中枢神経系に作用する漢方薬の選定	
2-1-1 緒言	50

2-1-2	材料と方法	52
2-1-3	結果	55
2-1-4	考察	57
第2節 酸棗仁湯の脳由来神経栄養因子誘導を介した精神神経疾患改善効果の検討		
2-2-1	緒言	58
2-2-2	材料と方法	59
2-2-3	結果	61
2-2-4	考察	66
総合考察及び結論		68
謝辞		70
引用文献		71
主要論文目録		86
補足資料		87
略語一覧		89

序論

現代医療で用いられる医薬品の大部分は天然資源由来の化合物である。過去 30 年間で認可された医薬品のうち、天然資源由来のものはおよそ 60%にのぼると言われており (Newman et al., 2012)、我々人類は健康を維持するためにこれらの医薬品から多大な恩恵を受けてきた。天然資源由来の化合物が医薬品として用いられてきた歴史は古く、世界三大医学の中国医学、ユナニ医学 (ギリシャ・アラビア医学)、アーユルヴェーダ (インドの伝統医学) ではもちろんのこと (Bhogaonkar et al., 2012; Patwardhan et al., 2005)、西洋において消炎剤として利用されたサリチル酸や 20 世紀最大の発見といわれる抗生物質ペニシリンも天然資源由来の化合物である (Ligon et al., 2004)。このように、古来世界各国で天然物が用いられ、人類の健康維持に重要な役割を果たしてきた。近年の創薬では効率的なハイスループットスクリーニング法が主流となり、リード化合物を一つずつ選び出す天然物由来の創薬は衰退の一途を辿っているが、2011 年 11 月販売の多発性硬化症治療薬フィンゴリモド (冬虫夏草に含まれるミリオシンをリード化合物とした医薬品) や 2017 年 7 月販売の乳癌治療薬ハラヴェン (クロイソカイメンに含まれるコンドリリン B1 をリード化合物とした医薬品) などは、今なお天然資源由来化合物が新薬開発のシーズとして役立つことを証明するものといえる。

当研究室は、柑橘は新薬開発のための天然資源となり得るのではないかと、特に、柑橘果皮には中枢神経系 (central nervous system; CNS) に作用する化合物が含まれるのではないかと考え、研究を進めてきた。柑橘類にはフラボノイド、カロテノイド、クマリン、テルペン、リモノイドなどが含有されており、これらは末梢組織に対し、抗癌作用、抗菌作用、抗アレルギー作用などを示すと報告されている (Dong et al., 2014; Yamamoto et al., 2008) が、CNS に対する作用はほとんど知られていなかったからである。愛媛県は全国有数の柑橘生産地であり、収穫品数 (48 品目) は日本一多い (愛媛県 HP より)。当研究室では、種々の柑橘果皮抽出液を培養下の脳由来神経細胞に添加し、記憶や学習に関わるシグナル

伝達分子である細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) の活性化を指標とするスクリーニングを実施した。その結果、CNS に作用する可能性が高い化合物のひとつとして、ヘプタメトキシフラボン (3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone; HMF) を見出した (Furukawa et al., 2012a)。HMF は柑橘果皮に含まれるポリメトキシフラボン (polymethoxyflavone; PMF) の一種であり、当研究室では様々な中枢神経疾患モデル動物を用いてその効果を検討した。全脳虚血モデルマウスに対する HMF の効果の検討において、全脳虚血モデルマウスの海馬組織では虚血により障害された組織を修復するために脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) が産生されるが、HMF を投与すると BDNF 産生が亢進され、脳保護的作用を示すことを明らかにした (Okuyama et al., 2012; 2014; 2015)。BDNF は神経成長因子 (nerve growth factor) に次いで発見された神経栄養因子の 1 つで、CNS において神経細胞の生存・成長・分化・再生などの役割を担う低分子液性タンパク質である (Greenberg et al., 2009)。BDNF は様々な中枢神経疾患の発症に関与していることが報告されており、特にうつ病や認知症の発症に強く関与している (Phillips et al., 1991; Shirayama et al., 2002; Duclot et al., 2015)。そこで本研究では 2 種類のうつ病態モデルマウスを作製し、HMF の効果について行動薬理学的手法、免疫組織化学的手法、生化学的手法を用いて検討した (第 1 章)。

一方、漢方薬 (Kampo) は、日本独自の発展を遂げた天然資源由来の医薬品である。西洋薬に比べエビデンスという面で大きく遅れをとる漢方薬は、長い間軽んじられる傾向にあったが近年再び注目を集めるようになり (Giridharan et al., 2017)、日本漢方生薬製剤協会が行った漢方薬処方実態調査 2011 によれば、日本の医師の約 83.5% (n=684) が漢方薬を処方しているという。実際、漢方薬は 1971 年から薬価基準収載品目リストに登録され、現在では 148 品目に保険適応がある。また、癌化学療法においては副作用軽減のために西洋薬と併用する治療法などが生み出されている (Arai et al., 2014)。しかし、いまだ漢方薬を処方する医師の 62.4% はエビデンス不足について懸念する状況であり (Moschick et al., 2012)、漢方薬のエビデンス構築を目的とした研究が活発に行われている。また、“育薬”の

観点から新規適応の付加を目的とした研究も盛んになりつつある。抑肝散の認知症周辺症状改善効果 (Iwasaki et al., 2005)、六君子湯の機能性ディスぺプシア改善効果 (Kusunoki et al., 2010)、牛車腎気丸の抗癌剤副作用 (しびれ) に対する効果 (Kono et al., 2013)、などは新規効果が発見された“育薬”の例である。裏返せば、漢方薬は、解明されていない未知の作用を秘めた天然資源の最たるものといえる。そこで本研究では次に、柑橘研究で用いたスクリーニング手法を適応し (Furukawa et al., 2012a; 2012b)、CNS の疾患に奏功する漢方薬の探索を行った (第 2 章)。

第1章 柑橘果皮由来成分 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone

の抗うつ効果

第1節 コルチコステロン誘発性うつ病態様モデルマウスに対する

3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone の抗うつ効果の検討

1-1-1 緒言

うつ病発症の危険因子として、遺伝因子やストレスなどの環境因子などが多数報告されている (Charney et al., 2004)。ストレスは視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA 系) を活性化し、血中グルココルチコイド (齧歯類ではコルチコステロン, corticosterone; CORT) の過剰分泌を引き起こす (Pariante et al., 2008)。通常、副腎からグルココルチコイドが分泌されると、視床下部や下垂体に対する負のフィードバック機構が稼働し正常な血中グルココルチコイド濃度が維持されるが、グルココルチコイドの過剰分泌が長期間継続すると、海馬組織の萎縮や脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 発現の減少を招く (Duman et al., 2006; Paizanis et al., 2007; Ye et al., 2011; Zhao et al., 2012; Numakawa et al., 2013)。ストレスに起因する BDNF 発現の減少はうつ病の発症に深く関与していることから、近年、うつ病の発症仮説として「BDNF 仮説」が提案されている (Martinowich et al., 2007)。

BDNF は中枢神経系 (central nervous system; CNS) において神経細胞の生存・成長に関与する低分子液性タンパク質であり、うつ病だけでなく統合失調症やアルツハイマー型認知症など様々な精神神経疾患の発症に関与していることが明らかにされつつある (Angelucci et al., 2005)。特にうつ病患者の死後脳の解析結果より、BDNF 発現が減少していることや

海馬組織が萎縮していることが明らかとなっている (Duclot et al., 2015)。したがって、BDNF 発現増加作用を有する化合物は画期的なうつ病治療薬として期待されており、近年注目を集める速効型抗うつ薬ケタミンの作用発現にも BDNF 発現の増加作用が関与することが報告されている (Lepach et al., 2015; Duman et al., 2016)。

ヘプタメトキシフラボン (3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone; HMF, Figure 1) は愛媛県南部の特産柑橘「河内晩柑」の果皮に多く含有されるポリメトキシフラボン (polymethoxyflavone; PMF) である (Amakura et al., 2013)。PMF の末梢組織に対する生理活性作用については様々な研究が行われており、抗炎症作用、抗癌作用、抗アレルギー作用、抗肥満作用などが報告されている (Kawai et al., 2007; Dong et al., 2014; Okabe et al., 2014) が、CNS に対する作用 (抗認知症作用・抗うつ作用など) が報告されている PMF はノビレチン (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone; NOB) のみである (Li et al., 2013; Nakajima et al., 2014)。HMF は NOB の 5 位にメトキシ基が修飾された構造を有しているため、NOB と同様に CNS に作用する可能性が高いと考えられた。そこで当研究室では、HMF を一過性全脳虚血マウスに投与したところ、海馬組織において虚血により引き起こされる神経細胞死を抑制すること、この脳保護作用は BDNF 発現増加作用を介している可能性があることを明らかにした (Okuyama et al., 2012; 2014; 2015)。上記のように海馬組織における BDNF 発現の減少はうつ病の発症に深く関与していることから、本研究では HMF の抗うつ作用について検討することとした。

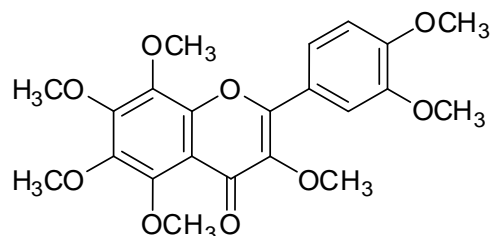


Figure 1. Structure of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF).

うつ病態モデル動物としては、うつ病患者の臨床症状に基づいて種々のモデル動物が開発されている。本研究では、Zhao ら (2008) によって開発された CORT 誘発性うつ病態様

モデルマウスを用いた。ヒトにおいて、慢性的な血中グルココルチコイド値の上昇は HPA 系の破綻を招き、うつ病態を引き起こす (Gourley et al., 2008b) が、CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスは持続的に CORT 濃度を上昇させることで強制的に HPA 系を破綻させるモデルであり、臨床におけるうつ病態時の生理学的現象を反映している。このモデルマウスの利点は、1) ストレスに対する個々のマウスの感受性の差異という因子を除去できること、2) 簡易的な操作でうつ病態モデルマウスを作成できることにある。本研究では CORT を約 4 週間投与することで CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスを作製し、HMF がうつ病態様行動および海馬組織における BDNF 発現に与える影響などについて解析を行った。

1-1-2 材料と方法

1-1-2-1 実験動物

C57BL/6 マウス (雄性、7 週齢) は日本 SLC 株式会社 (浜松) から購入した。飼育条件は室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 時間サイクルの明暗期 (明期 8:00~20:00) とした。また、実験期間中すべてのマウスは餌 (CRF-1; 日本チャールズリバー、横浜) と水 (水道水) は共に自由に摂取できるようにした。すべての動物実験は松山大学動物実験委員会による動物実験実施規程に準じて行った。

1-1-2-2 CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスの作製

CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスは、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO)/ポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG)-300 (3:7) 溶媒 (vehicle) に溶解した CORT (和光純薬工業株式会社、大阪) を終濃度 20 mg/kg となるように、1 日 1 回 9:00~10:00 の間にマウスの皮下 (s.c.) に投与することで作製した (Zhao et al., 2008)。本モデルマウスの対照動物として、vehicle を同様に s.c.投与したマウスを用いた。

1-1-2-3 サンプルの調製および投与

HMF は、オレンジ油（和光純薬工業株式会社）（500 mL）を Silica Gel 60（ナカライテスク株式会社、京都）カラムクロマトグラフィー（75 μ m, 5.0 i.d. \times 67 cm）に付し、n-ヘキサン-酢酸エチル（1:1）溶出部より、HMF を得た（944.8 mg）（Furukawa et al., 2012a）。陽性対照として、抗うつ薬フルオキセチン（fluoxetine; FLX; LKT Laboratories, Inc, MN, USA）を用いた。HMF、FLX は DMSO/PEG-300（3:7）溶媒（vehicle）に溶解し、それぞれの終濃度が 50 mg/kg、10 mg/kg となるように、s.c.投与した。マウスは短期投与グループ（Short term）、中期投与グループ（Medium term）、長期投与グループ（Long term）の 3 グループに分け、実験に供した（Figure 2）。短期投与グループと中期投与グループは対照群（CON）、CORT 投与群（CORT）、CORT および HMF 投与群（CORT+HMF）の 3 群で構成し、長期投与グループは前記 3 群に加えて陽性対照群（CORT + FLX）を含む 4 群で構成した。

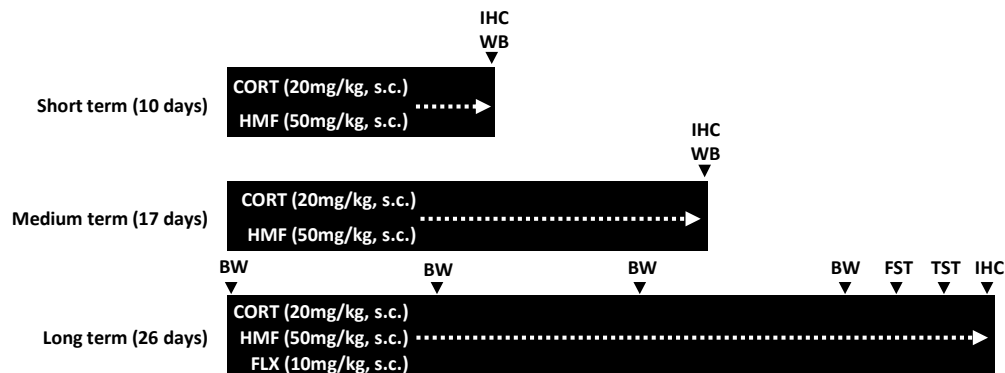


Figure 2. Experimental schedule.

Each abbreviation indicates as follows; measure of body weight changes (BW), immunohistochemistry (IHC), western blotting (WB), forced swim test (FST) and tail suspension test (TST).

1-1-2-4 体重測定

体重測定は、薬物投与開始後、0 日目（Day 0）、7 日目（Day 7）、14 日目（Day 14）、21 日目（Day 21）において薬物投与（9:00~10:00）の前（8:00~9:00）に行った。

1-1-2-5 強制水泳試験

強制水泳試験 (forced swim test; FST) は Porsolt ら (1977) によって開発されたうつ病態様行動の評価系であり、一般的に抗うつ薬スクリーニングのデバイスとして汎用されている。本研究では長期投与グループ 22 日目 (Day 22) に行った。マウスは最終薬物投与の 30 分後に、15 cm の高さまで水 ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) を張ったプラスチック製シリンダー (内径 10 cm × 高さ 25 cm) に配置した。マウスが水面上で浮遊するために必要な最小限の動き (四肢のわずかな動き) をしている状態を不動状態、3 秒間不動状態を維持してからの時間を不動時間と定義した。6 分間の強制水泳のうち後半 4 分間の不動時間を、ストップウォッチを用いて計測した。

1-1-2-6 尾懸垂試験

尾懸垂試験 (tail suspension test; TST) は FST と同様にうつ病態様行動の指標として用いられる評価系である。本研究では長期投与グループ 23 日目 (Day 23) に行った。マウスは、各薬物の s.c.投与 30 分後に TST に供した。すなわち、机上 10 cm の高さに配置されたクリップで尾を挟み (尾の先端から 2 cm の位置)、宙づり状態にした。マウスが完全に運動停止した状態を不動状態、3 秒間不動状態を維持してからの時間を不動時間と定義した。6 分間の尾懸垂のうち後半 4 分間の不動時間を、ストップウォッチを用いて計測した。

1-1-2-7 免疫組織化学的染色

マウスは最終薬物投与の翌日 (短期投与グループの場合は 10 日目 (Day 10)、中期投与グループの場合は 17 日目 (Day 17)、長期投与グループの場合は 26 日目 (Day 26)) に氷冷リン酸緩衝液 (phosphate buffered-saline; PBS) で灌流した後、脳を摘出した。さらに右脳を 4%パラホルムアルデヒドで 48 時間固定した後、15%スクロース溶液に 24 時間、30%スクロース溶液に 24 時間浸し組織内の水分を置換した。固定された右脳は OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社、東京) を用いて凍結包埋し、矢状脳切片 (30

μm) を作製し凍結保存 (-80°C) した。凍結脳切片は PBS で解凍し、HistoVT One (ナカライテスク株式会社) で 20 分間免疫賦活後 (70°C)、2% スキムミルクで 30 分間ブロッキング (室温) し、さらに 5% ヤギ血清溶液で 60 分間ブロッキング (室温) した。次に、以下に示す 1 次抗体と反応させた (4°C、一晚); 抗グリア線維性酸性タンパク (glial fibrillary acidic protein; GFAP) 抗体 (マウス) (希釈率 1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、抗 BDNF 抗体 (ウサギ) (1:150; Epitomics, Burlingame, CA, USA)、抗神経細胞マーカー (neuronal nuclei; NeuN) 抗体 (マウス) (1:300; Millipore, Billerica, MA, USA)、抗リン酸化カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (phosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase; p-CaMK) (p-Thr286) II 抗体 (ウサギ) (1:500; Sigma-Aldrich)、抗ダブルコルチン (doublecortin; DCX) 抗体 (ヤギ) (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)。翌日、以下に示す 2 次抗体と反応させた (室温、1 時間); Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギ IgG (希釈率 1:300; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、Alexa Fluor 488 ロバ抗ヤギ IgG (1:300; Invitrogen)、Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ IgG (1:300; Invitrogen)、Alexa Fluor 568 ヤギ抗マウス IgG (1:300; Invitrogen)。その後、スライドガラス上で DAPI (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で染色された切片を撮影した。BDNF、p-CaMK II の緑系発色シグナル強度は Image J (NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA) を用いて定量解析した。DCX 陽性細胞および NeuN 陽性細胞の数は共焦点レーザー顕微鏡下で観察しながら計数した。

1-1-2-8 ウエスタンブロット

氷冷 PBS で灌流したマウスの左脳から海馬組織を摘出しウエスタンブロット用サンプルとした。海馬組織の重量を測定し、10倍量の RIPA 緩衝液 (20 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% デオキシコール酸ナトリウム, 2 mM EDTA, 1/25 容量プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche, Mannheim, Germany)) を加え、ポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離 (20,000 × g, 4°C, 30分間)

し、得られた上清を回収した。20 µg等量の上清（タンパク抽出液）をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を用いて分離し、Immuno-Blot® PVDF メンブレン（Bio-Rad, Hercules, CA, USA）に転写した。5%スキムミルクで1時間ブロッキングし、以下に示す1次抗体と反応させた（一晚、4°C）；抗細胞外シグナル調節キナーゼ（extracellular signal-regulated kinase; ERK）1/2抗体（ウサギ）（希釈率1:2500; Millipore）、抗リン酸化ERK（p-ERK）（Thr202/Tyr204）抗体（ウサギ）（1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA）。翌日、2次抗体である西洋ワサビペルオキシターゼ結合抗ウサギIgG（希釈率1:2500（p-ERKの場合）または1:5000（ERKの場合）；Cell Signaling）と室温で2時間反応させた。免疫反応性バンドはECL-prime（GE Healthcare, Buckinghamshire, Little Chalfont, UK）を用いて視覚化し、LAS-3000（フジフィルム、東京）を用いて撮影した。バンド強度はImage J（NIH）を用いて定量した。

1-1-2-9 統計処理

それぞれ実験で得られたデータは平均値±標準誤差（SEM）で表し、Student's *t*-test で有意差を求めた。 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意とした。

1-1-3 結果

1-1-3-1 体重変化に対する影響

体重減少はうつ病態の指標の1つであり、齧歯類にCORTを長期間投与すると体重増加率が低下すると報告されている（Zhao et al., 2008）。そこで、本研究ではうつ病態の指標として長期投与グループのマウスについて、0日目（Day 0）、7日目（Day 7）、14日目（Day 14）、21日目（Day 21）に体重測定を行い、0日目における体重を100%として体重増加率を算出した。その結果、CON群の体重増加率に対してCORT群では7日目、14日目、21日目におけるマウスの体重増加率が低下した（Day 7, ** $p < 0.01$; Day 14, ** $p < 0.01$; Day 21,

* $p < 0.05$)。一方、HMF を投与すると 7 日目、14 日目において、CORT 投与により誘発される体重増加率低下が抑制され (Day 7, $^{##}p < 0.01$; Day 14, $^{##}p < 0.01$)、21 日目では有意差はないが CON 群と同等の体重増加率を示した ($109.5 \pm 1.8\%$)。また、FLX は CORT の反復投与によって誘発される体重増加率低下に対して影響しなかった (Figure 3)。

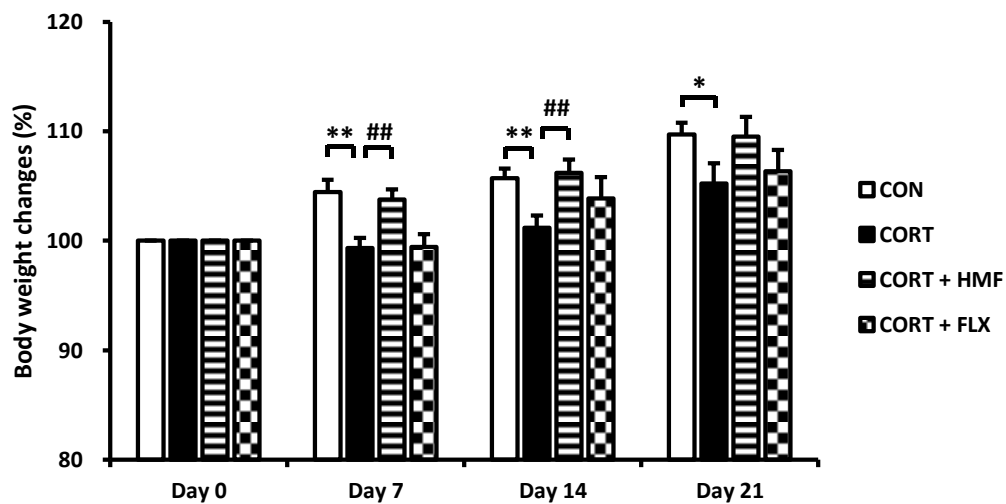


Figure 3. Body weight changes on Days 7, 14, and 21.

Values are means \pm SEM (n = 8). Data are analyzed by Student's t-test and symbols show significant differences between the following conditions: CON vs. CORT (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) and CORT vs. CORT + HMF ($^{##}p < 0.01$).

1-1-3-2 うつ病態様行動に対する HMF の効果

マウスのうつ病態の評価は FST と TST を用いて、それぞれ 22 日目 (Day 22)、23 日目 (Day 23) に解析した。その結果、FST における CORT 群の不動時間 (57.1 ± 9.8 秒) は CON 群の不動時間 (29.6 ± 5.7 秒) の約 2 倍に延長し、両群間で有意差 (* $p < 0.05$) が認められた。HMF を投与すると、CORT により誘発される不動時間の延長を有意に ($^{#}p < 0.01$) 短縮した (28.1 ± 5.3 秒) のに対し、FLX は CORT により誘発される不動時間の延長に対して影響しなかった (Figure 4A)。TST では、FST の結果と同様に CORT 群の不動時間 (142.6 ± 9.6 秒) は CON 群の不動時間 (94.5 ± 14.7 秒) に比べ有意に (* $p < 0.05$) 長かった。一方、FST の結果とは逆に FLX は CORT により誘発される不動時間の延長を有意に ($^{#}p < 0.05$)

短縮したが、HMF は CORT により誘発される不動時間の延長に対して影響しなかった (Figure 4B)。

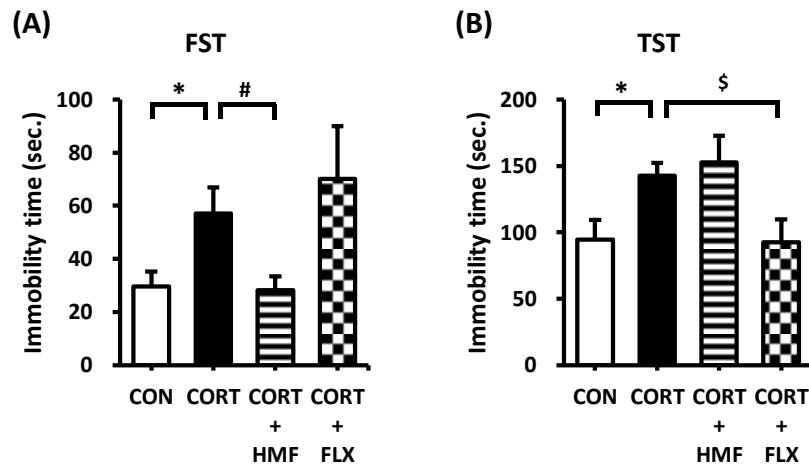


Figure 4. Effects of corticosterone and HMF on depressive-like behavior.

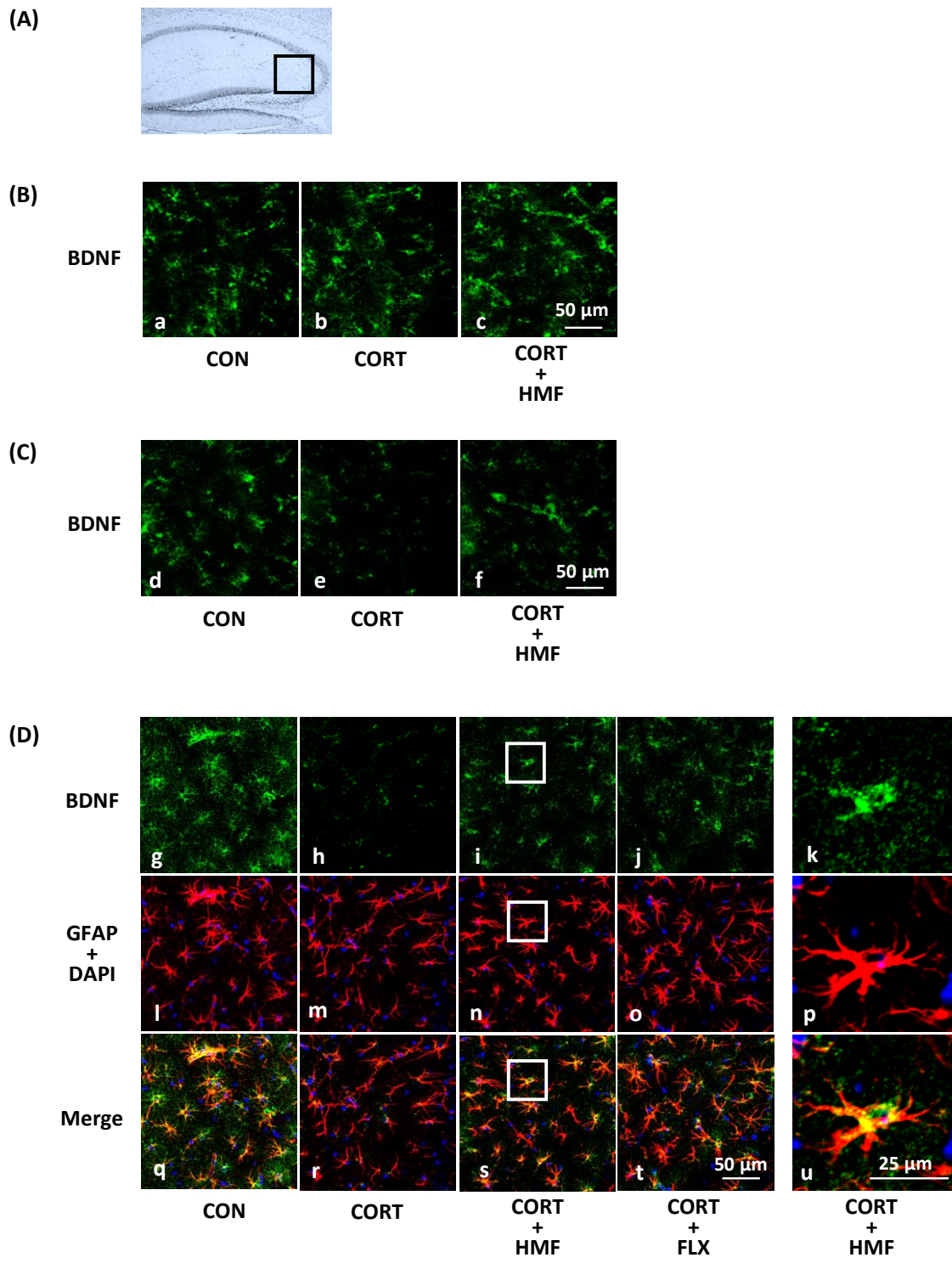
Effect of HMF on corticosterone-induced behavioral abnormalities in the forced swim test (A) and tail suspension test (B). Values are means \pm SEM ($n = 7 - 8$). Symbols show significant differences between the following conditions: CON vs. CORT (* $p < 0.05$), CORT vs. CORT + HMF (# $p < 0.05$), and CORT vs. CORT + FLX ($^{\$} p < 0.05$).

1-1-3-3 海馬 CA3 領域における BDNF 発現に及ぼす影響

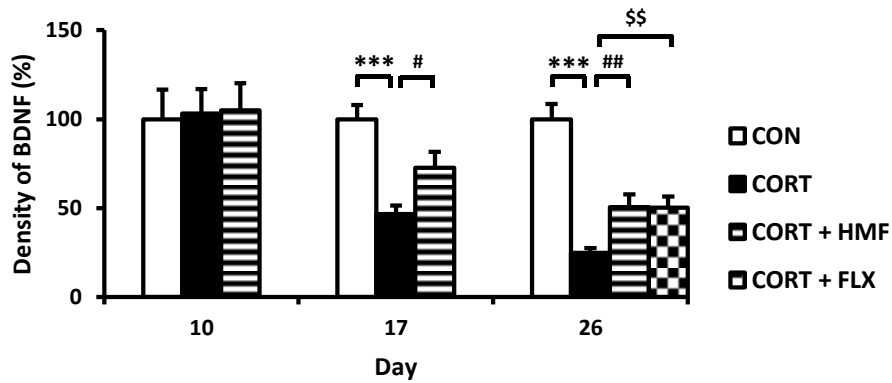
うつ病になると、記憶や学習に関わる脳領域「海馬」が委縮すること、海馬における BDNF 発現が低下することが知られている (Duclot et al., 2015)。そこで HMF が海馬組織の BDNF 発現に及ぼす影響について検討するため、短期投与グループの場合は 10 日目 (Day 10)、中期投与グループの場合は 17 日目 (Day 17)、長期投与グループの場合は 26 日目 (Day 26) のマウス脳を抗 BDNF 抗体で免疫染色し、海馬 CA3 領域 (Figure 5A) における BDNF シグナル強度を解析した。その結果、Day 10 では群間における BDNF シグナル (緑色) に差異は認められなかった (Figure 5B)。Day 17 では CON 群の BDNF シグナル強度に対して CORT 群ではシグナル強度が弱くなり、HMF 群は CORT によるシグナル強度の減弱を抑制することが観察できた (Figure 5C)。さらに、Day 26 では CON 群の BDNF シグナル強度に対して CORT 群の BDNF シグナル強度は著しく減弱しており、HMF 群と FLX 群は CORT

による BDNF シグナル強度の減弱を抑制することが観察できた (Figure 5D)。また、CORT + HMF 投与群の写真 (Figure 5D-i, n, s) において□で囲んだ部分を拡大すると、HMF による BDNF 発現 (緑色) がアストロサイトのマーカーである GFAP (赤色) と重なり合い黄色く発色していることが観察できた (Figure 5D-k, p, u)。

次に BDNF シグナル強度を Image J (NIH) を用いて定量した。その結果を Figure 5E に示す。Day 10 では群間における BDNF シグナル強度に差異は認められなかった。Day 17 では CON 群の BDNF シグナル強度 ($100.0 \pm 7.8\%$) に対して CORT 群ではシグナル強度が減少 ($46.6 \pm 4.7\%$) しており ($***p < 0.001$)、HMF 群は CORT による BDNF シグナル強度の減少を抑制 ($72.6 \pm 9.0\%$) していた ($\#p < 0.05$)。Day 26 では、CON 群の BDNF シグナル強度 ($100.0 \pm 8.6\%$) に対して CORT 群ではシグナル強度 ($24.7 \pm 2.6\%$) が著しく減少しており ($***p < 0.001$)、HMF 群 ($50.6 \pm 7.1\%$) と FLX 群 ($50.2 \pm 6.3\%$) は CORT による BDNF シグナル強度の減少を抑制していた (HMF 群; $##p < 0.01$, FLX 群; $$$p < 0.01$)。以上の結果より、HMF および FLX は、海馬 CA3 領域において CORT により誘発される BDNF 発現の減少を抑制することが明らかとなった。



(E)



(F)

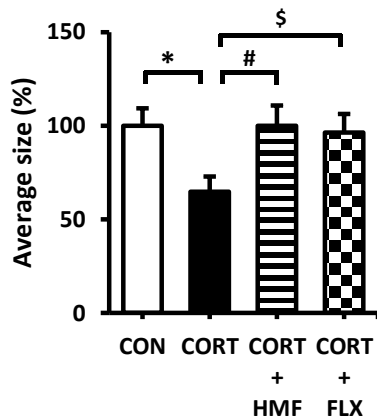


Figure 5. Effects of HMF on the expression of BDNF and GFAP immunoreactivity in the corticosterone-induced depressive mouse hippocampus.

The location of the captured images in the hippocampus and quantification is shown with a square (A). Sagittal sections on Day 10 (B), Day 17 (C) and Day 26 (D) after continuous corticosterone injections were stained with specific antibodies, either anti-BDNF (green; a - k) or anti-GFAP with DAPI staining (red and blue, respectively; l - p). White squares in the CORT + HMF group showed a typical astrocyte expressing BDNF, and each high-power magnification picture was shown as k, p, and u. The scale bar show 50 μm or 25 μm . (E) A quantitative analysis of BDNF-positive signal densities using ImageJ software. Values are means \pm SEM (Day 10; n = 4, Day 17; n = 8, Day 26; n = 8 - 10). Symbols show significant differences between the following conditions: CON vs. CORT (** $p < 0.001$), CORT vs. CORT + HMF (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$), and CORT vs. CORT + FLX ($^{\$}$ $p < 0.01$). (F) A quantitative analysis of the average size of GFAP-positive signals on Day 26 using ImageJ software. Values are means \pm SEM (n = 8 - 10). Symbols show significant differences between the following conditions: CON vs. CORT (* $p < 0.05$), CORT vs. CORT + HMF (# $p < 0.05$), and CORT vs. CORT + FLX ($^{\$}$ $p < 0.05$).

1-1-3-4 アストロサイトの形態学的変化に及ぼす影響

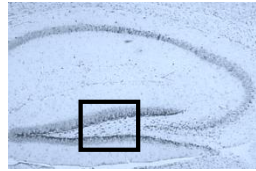
BDNF シグナル（緑色）と GFAP シグナル（赤色; GFAP 陽性細胞）が重なり合う（その結果黄色を呈す）現象が観察された（1-1-3-3）こと、さらに、CON 群のアストロサイトに対して CORT 群のアストロサイトが全体的に縮小していることが観察できたことから、次に HMF がアストロサイトの形態に及ぼす影響について解析した。Figure 5F は Day 26 におけるアストロサイト平均面積の定量結果を示したものであるが、CON 群のアストロサイト平均面積に対して CORT 群では平均面積が減少しており（* $p < 0.05$ ）、HMF 群と FLX 群はこれを抑制していることが明らかとなった（HMF 群; # $p < 0.05$, FLX 群; \$ $p < 0.05$ ）。

1-1-3-5 海馬歯状回領域における神経新生に及ぼす影響

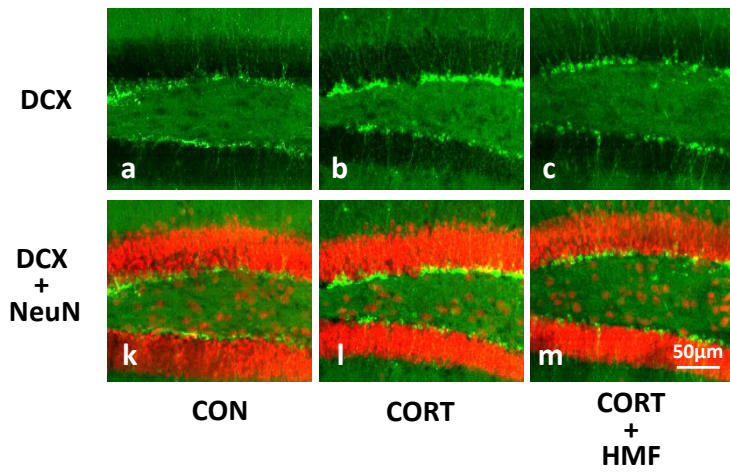
神経新生は神経幹細胞が神経細胞へと分化する現象で主に胎生期から幼年期にみられるが、成体の脳では海馬歯状回領域および側脳室で観察されること（Mayer et al., 2006）、神経新生は CORT を反復投与したラットや慢性ストレス負荷ラットにおいて減少すること（Oomen et al., 2007）が知られている。そこで、次に HMF が CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスの神経新生に及ぼす影響について検討した。短期投与グループの場合は 10 日目（Day 10）、中期投与グループの場合は 17 日目（Day 17）、長期投与グループの場合は 26 日目（Day 26）の海馬歯状回領域（Figure 6A）を、未成熟神経細胞のマーカーである DCX および成熟神経細胞のマーカーである NeuN で免疫染色し、DCX 陽性細胞数を共焦点レーザー顕微鏡下で計数して定量した。Day 10, Day 17, Day 26 における DCX 陽性細胞（緑色）の様子を Figure 6B, C, D にそれぞれ示す。Day 26 においては、CON 群、HMF 群、FLX 群において DCX 陽性細胞が顆粒細胞層へ侵入していく様子が多く観察できたが CORT 群では観察できなかった（Figure 6D）。DCX 陽性細胞数を計数した結果を Figure 6 E に示す。CON 群の DCX 陽性細胞数を 100%として対比（%）を算出した。Day 10 では群間における DCX 陽性細胞数（%）に差異は認められなかった。Day 17 では、CON 群の DCX 陽性細胞数（ $81.9 \pm 3.7\%$ ）に対して CORT 群の DCX 陽性細胞数（ $58.8 \pm 5.2\%$ ）は減少していた

(** $p < 0.01$)。Day 26 においても CON 群の DCX 陽性細胞数 ($78.7 \pm 5.9\%$) に対して CORT 群の DCX 陽性細胞数 ($53.5 \pm 5.9\%$) は減少したが (** $p < 0.01$)、HMF 群 ($69.8 \pm 2.3\%$) と FLX 群 ($76.6 \pm 5.8\%$) は CORT による DCX 陽性細胞数の減少を抑制した (HMF 群; ### $p < 0.001$, FLX 群, \$\$ $p < 0.01$)。一方、NeuN 陽性細胞 (赤色) 数は全ての群において差異が認められなかった (データは示さず)。以上の結果より、HMF および FLX は CORT により誘発される海馬歯状回領域における DCX 陽性細胞の減少を抑制することが明らかとなった。

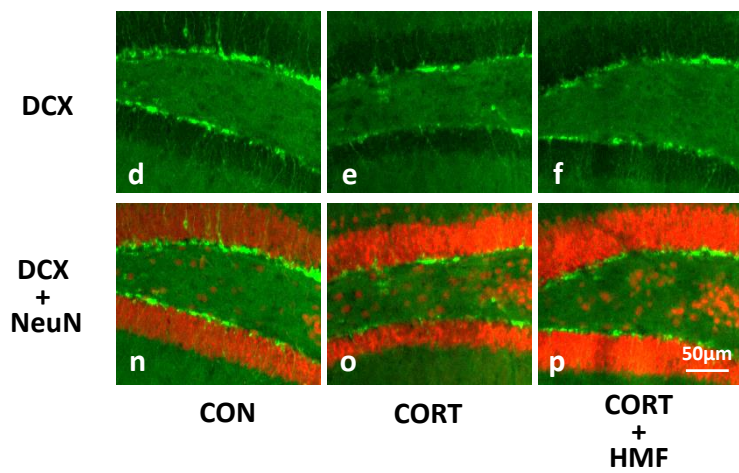
(A)



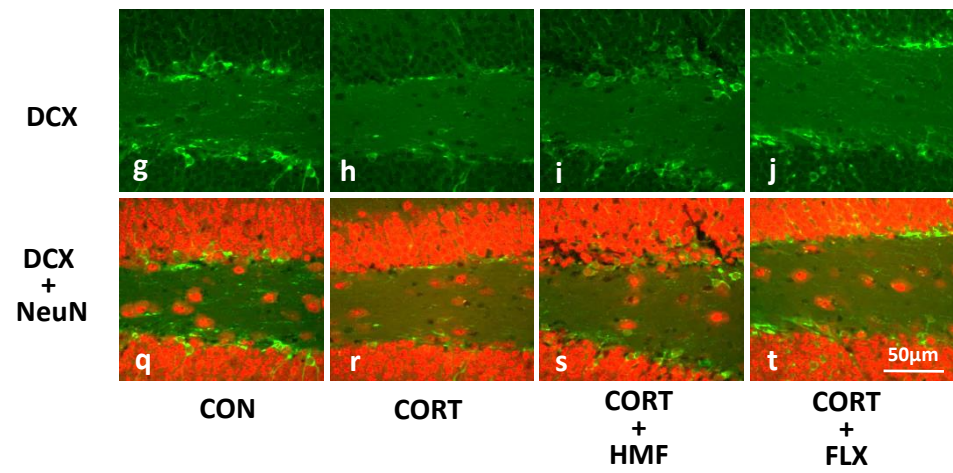
(B)



(C)



(D)



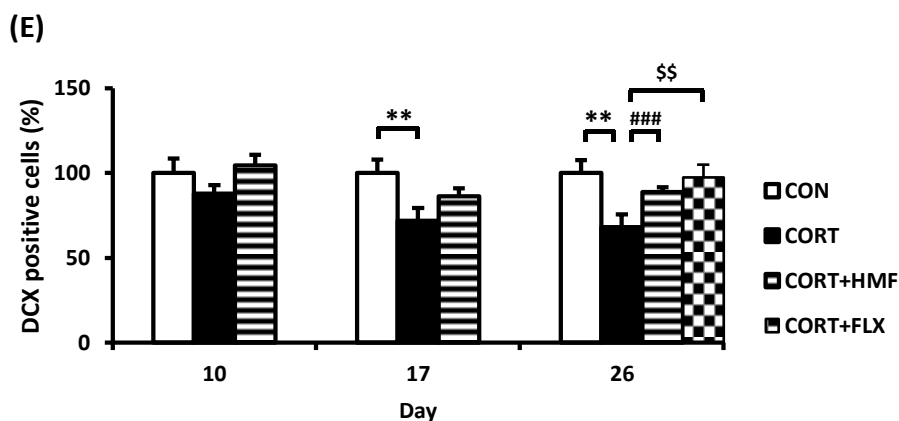


Figure 6. Effects of HMF on the expression of doublecortin immunoreactivity in the corticosterone-induced depressive mouse hippocampal dentate gyrus.

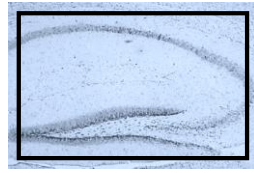
The location of the captured images in the hippocampus is shown with a square (A). Sagittal sections on Day 10 (B), Day 17 (C) and Day 26 (D) after continuous corticosterone injections were stained with specific antibodies, either anti-doublecortin (green; a - j) or anti-NeuN with anti-doublecortin (red and green; k - t). The scale bar shows 50 μ m. (E) A quantitative analysis of doublecortin-positive cell counts was performed manually. Values are means \pm SEM (Day 10; n = 4, Day 17; n = 8, Day 26; n = 8 - 10). Symbols show significant differences between the following conditions: CON vs. CORT (** $p < 0.01$), CORT vs. CORT + HMF (### $p < 0.001$), and CORT vs. CORT + FLX (\$\$ $p < 0.01$).

1-1-3-6 海馬組織における神経可塑性に及ぼす影響

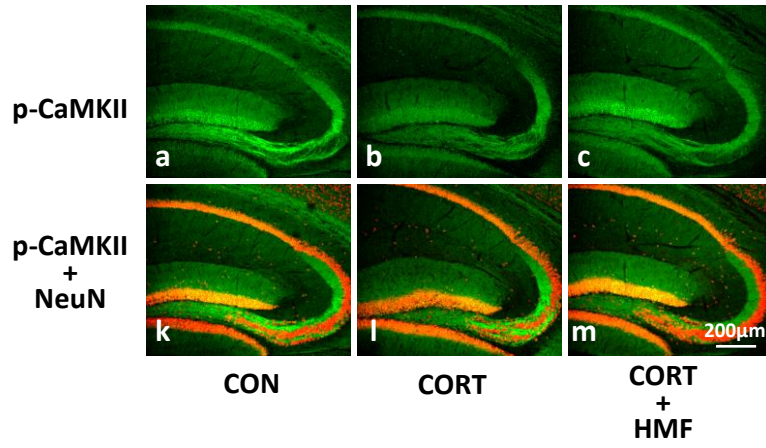
CaMK II は中枢神経系に多く存在するセリン/スレオニンタンパク質リン酸化酵素の1つで、神経可塑性に重要な役割を果たしていること、リン酸化により活性化されることが知られている (Lučić et al., 2008)。そこで、HMF が海馬組織の神経可塑性に及ぼす影響について検討するために、短期投与グループの場合は10日目 (Day 10)、中期投与グループの場合は17日目 (Day 17)、長期投与グループの場合は26日目 (Day 26) におけるマウスの海馬組織 (Figure 7A) を抗 p-CaMKII 抗体あるいは抗 NeuN 抗体を用いて免疫染色し、シグナル強度を解析した。その結果、Day 10 では群間における p-CaMKII シグナル強度 (緑色) に差異は認められなかった (Figure 7B) が、Day 17 では CON 群の p-CaMKII シグナル強度に対して CORT 群のシグナル強度は減弱していた (Figure 7C)。さらに、Day 26 では CORT 群の p-CaMKII シグナル強度の減弱は著しくなり、HMF 群と FLX 群は CORT による p-CaMKII シグナル強度の減弱を抑制することが観察できた (Figure 7D)。p-CaMKII シグナル強度を Image J (NIH) を用いて定量した結果を Figure 7E に示す。Day 10 では群間

における p-CaMKII シグナル強度に差異は認められないのに対し、Day 17 では CON 群の p-CaMKII シグナル強度 ($100.0 \pm 12.0\%$) に対して CORT 群のシグナル強度 ($63.2 \pm 6.2\%$) は有意に ($*p < 0.05$) 減少しており、Day 26 では CON 群の p-CaMKII シグナル強度 ($100.0 \pm 14.3\%$) に対して CORT 群のシグナル強度 ($29.0 \pm 3.5\%$) は著しく ($***p < 0.001$) 減少していた。Day 26 において HMF 群 ($43.7 \pm 4.5\%$)、FLX 群 ($53.7 \pm 8.4\%$) は CORT による p-CaMKII シグナル強度の減少を有意に (それぞれ[#] $p < 0.05$, ^{\$} $p < 0.05$) 抑制していることが明らかになった。また、NeuN 陽性細胞 (赤色) 数については全ての群において差異が認められなかった (データは示さず)。以上の結果より、HMF および FLX は CORT により誘発される海馬組織における p-CaMKII 発現の減少を抑制することが明らかとなった。

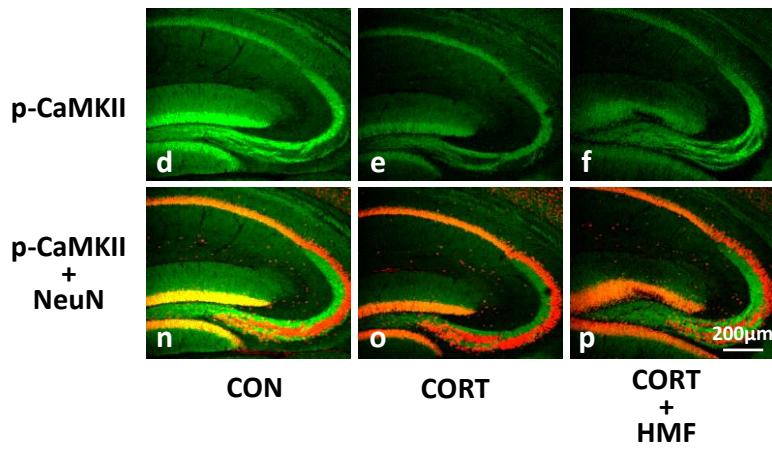
(A)



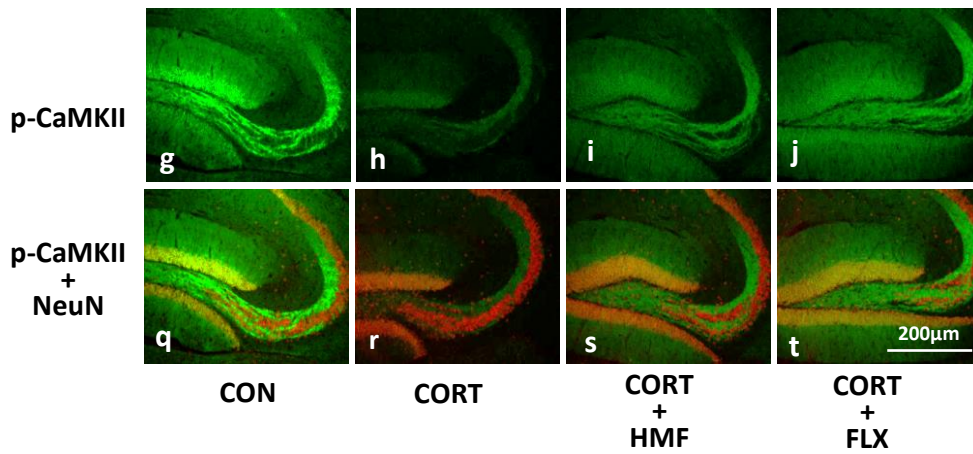
(B)



(C)



(D)



(E)

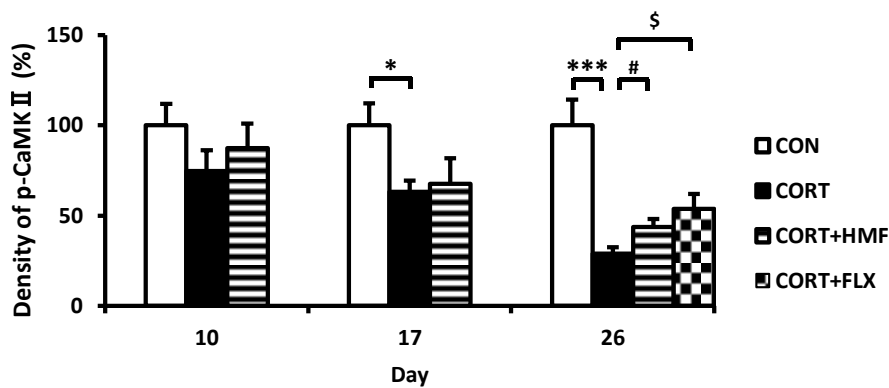


Figure 7. Effects of HMF on the expression of phosphorylated CaMK II and NeuN immunoreactivity in the corticosterone-induced depressive mouse hippocampus.

The location of the captured images in the hippocampus is shown with a square (A). Sagittal sections on Day 10 (B), Day 17 (C) and Day 26 (D) after continuous corticosterone injections were stained with specific antibodies, either anti-phospho-CaMK II (green; a - j) or anti-NeuN with anti-phospho-CaMK II (red and green; k - t). The scale bar shows 200 μ m. (E) A quantitative analysis of phospho-CaMK II-positive signal density using ImageJ software. Values are means \pm SEM (Day 10; n = 4, Day 17; n = 8, Day 26; n = 8 - 10). Symbols show significant differences between the following conditions: CON vs. CORT (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), CORT vs. CORT + HMF (# $p < 0.05$), and CORT vs. CORT + FLX ($^{\$}$ $p < 0.05$).

1-1-3-7 海馬組織における ERK のリン酸化に及ぼす影響

ERK 1/2 は記憶形成や学習に重要なシグナルタンパク質として知られているが、ストレスなどにより誘発されるうつ病発症との関連性についても報告されていること (Gourley et al., 2008a)、当研究室ではこれまでに HMF が培養神経細胞の ERK1/2 のリン酸化を亢進することを見出していること (Furukawa et al., 2012a) から、次いで短期投与グループの 10 日目 (Day 10)、中期投与グループの 17 日目 (Day 17) の海馬組織におけるリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) の発現についてウエスタンブロット法を用いて解析した。その結果を Figure 8 に示す。Day 10 では群間において p-ERK1/2 発現の差異は認められなかった。Day 17 においては CON 群の p-ERK1/2 の発現 (100.0 \pm 11.1%) に対して CORT 群の p-ERK 1/2 の発現 (64.6 \pm 4.0%) は減少しており (** $p < 0.01$)、HMF 群 (85.8 \pm 11.1%) では CORT による p-ERK1/2 発現の低下は、有意でないものの抑制された。以上の結果から、HMF の BDNF 発現増加作用に ERK1/2 の活性化が関与している可能性が示唆された。

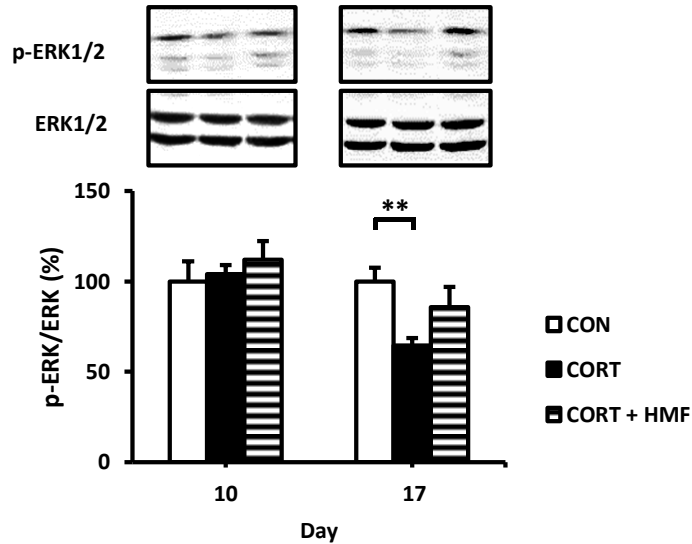


Figure 8. The influence of HMF on the expression of phosphorylated ERK in the corticosterone-induced depressive mouse hippocampus.

Representative band patterns of p-ERK1/2 and ERK1/2 were shown on the graph. A quantitative analysis of the p-ERK/ERK ratio were obtained by using ImageJ software. Values are means \pm SEM (Day 10; n = 4, Day 17; n = 5). Symbols show significant differences between the following conditions: CON vs. CORT (** $p < 0.01$).

1-1-4 考察

本節ではうつ病の「BDNF 仮説」に基づき、CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスに対する HMF の効果について検討した。その結果、CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスに HMF を s.c.投与すると、海馬組織における BDNF 発現を増加させ、神経新生、神経可塑性の減少を抑制し、うつ病態を改善することが明らかとなった。また BDNF 発現増加作用には ERK1/2 の活性化が関与していることが示唆された。

FST や TST は抗うつ薬のスクリーニング法として用いられており、齧歯類の不動時間を指標とする。実際に、CORT をマウスに慢性的に投与すると、FST において不動時間が延長すること (Gourley et al., 2008b)、うつ病態様モデル動物に対して抗うつ薬を投与すると FST、TST において不動時間が短縮すること (Castagné et al., 2010) が報告されている。HMF は FST において、CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスの不動時間を短縮したが TST においては不動時間を短縮しなかった。一方、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (selective

serotonin reuptake inhibitors; SSRI) の FLX は TST において不動時間を短縮したが FST では不動時間を短縮しなかった (Figure 4)。これらの矛盾の原因の一つとして、マウスの系統により抗うつ薬に対する感受性が異なることが考えられる。すなわち、C57BL/6 マウスに対して三環系抗うつ薬デシプラミンを投与すると FST の不動時間短縮作用を示すが、SSRI である FLX の投与では不動時間短縮作用を示さず、一方、BALB/cJ は両薬物によって不動時間を短縮すると報告されている (Lucki et al., 2001)。また、第二の原因として、作用機序の違いが考えられる。SSRI はセロトニン (5-HT) 受容体遮断作用によりシナプス間隙での 5-HT 量を増加することで、最終的には BDNF 発現を増加し、抗うつ作用を示すことが示唆されている (Adachi et al., 2008)。一方、我々は HMF が SSRI とは異なるメカニズムを介して BDNF 発現を増加させる可能性を見出している (未発表データ)。実際に、FST と TST でみられる行動学的変化には異なる神経回路が関与するとされる (Bai et al., 2001)。体重増加率の低下はうつ病態時に見られる兆候の 1 つである (Zhao et al., 2008)。本研究における CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスにおいても体重増加率が低下し、HMF は CORT による体重増加率低下を抑制して、CON 群と同程度の体重増加率を示した。一方、FLX は CORT による体重増加率低下を抑制しなかった (Figure 3)。本研究で生じた FST と TST の結果の矛盾は HMF と FLX が異なる作用機序を有することを裏付けるものといえ、現在解析を進めている。

海馬 CA3 領域は、海馬組織における神経ネットワーク形成に重要な役割を担い、嗅内皮質-歯状回からのシグナルが苔状繊維を介して伝わる領域である (Klausberger et al., 2008)。慢性的な CORT 暴露によって海馬神経ネットワークが障害されると、CA3 領域の BDNF 発現にも影響を与えると考えられ、CA3 領域における BDNF 発現について解析した。その結果、1) HMF が CORT による海馬 CA3 領域の BDNF 発現低下を抑制すること (Figure 5E)、2) HMF の BDNF 発現増加作用は主にアストロサイト上で起こることが明らかとなった (Figure 5D-k, p, u)。Figure 5F に示すように HMF と FLX は CORT によるアストロサイトの萎縮を抑制したことから、HMF が主にアストロサイトに対して作用して、BDNF 産生を

促進した可能性は高い。しかし、アストロサイトと重っていない BDNF シグナルも多数観察できた。脳において最も存在比が高い細胞はアストロサイト（ヒトでは全細胞の 40%）とはいえ、脳を構成するグリア細胞にはアストロサイトのほか、ミクログリア、オリゴデンドロサイトもある。神経細胞とこれらのグリア細胞は相互に複雑な神経ネットワークを構築し、それぞれの細胞が BDNF やグリア細胞由来神経栄養因子（glial-cell derived neurotrophic factor）など様々な神経栄養因子を産生することが知られていること（Du et al., 2002; Parkhurst et al., 2013; Miyamoto et al., 2015）から、Figure 5D において、GFAP と重なりあっていない BDNF シグナルはアストロサイト以外の細胞から産生された BDNF であると考えられ、現在解析中である。なお、FLX はアストロサイトにおける BDNF 発現増加作用を有することが報告されている（Quesseveur et al., 2013）。

BDNF は神経細胞の成長・生存や HPA 系の維持に寄与するほか、海馬歯状回領域における神経新生、神経可塑性にも関与している（Rocci et al., 2006; Grande et al., 2010）。本研究において HMF は CORT による経時的な神経新生細胞の減少を抑制した（Figure 6E）。同様に、神経可塑性の指標として用いた p-CaMKII の発現についても、CORT による経時的減少を抑制した（Figure 7E）。これらの結果は BDNF の定量結果と同様の傾向であったことから、HMF は BDNF 発現増加作用を介して、神経新生、神経可塑性を促進している可能性が示唆された。

ERK1/2 の活性化（=リン酸化）は BDNF 産生に関与する重要なシグナルの 1 つである。当研究室ではこれまでに HMF が培養下の脳由来神経細胞において ERK1/2 のリン酸化促進作用を有することを見出している（Furukawa et al., 2012a）。本研究では Day 17 の海馬組織において、HMF が CORT による p-ERK1/2 の発現低下を、有意ではないが改善する傾向にあることを見出した。これは、HMF が CORT 誘発性うつ病態を改善する作用は、p-ERK1/2 の発現低下の抑制、さらに BDNF 発現低下の抑制を介していることを示唆するものである。同様の作用機序を有する化合物にウコンに含有されるクルクミンがある（Zhang et al., 2012）。すなわち、クルクミンは扁桃体における ERK のリン酸化促進、BDNF 発現増加作

用を介して FST の不動時間を抑制することが明らかとなっている。クルクミンはポリフェノール化合物であり、構造は HMF と全く異なるが、共通した作用機序をもつ可能性が示唆されたことは興味深い。今後は HMF の作用機序を *in vitro* で詳細に解析する予定である。

以上の結果より、HMF を CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスに投与すると、海馬組織における BDNF 発現増加を介して様々な組織化学的障害を抑制し、うつ病態様行動を改善することが示された。本研究の結果は、HMF が新規抗うつ薬候補となる可能性を示唆するものである。

第2節 予測不可能慢性緩和ストレス負荷モデルマウスに対する

3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone の抗うつ効果の検討

1-2-1 緒言

うつ病の発症には様々な要因が絡んでいると考えられ、また糖尿病や高血圧症のように診断基準となるバイオマーカーや基準値が設定されているわけではない。そのため、新規抗うつ薬候補のスクリーニングあるいは発症機序解明のためには、様々なうつ病態モデル動物を用いて慎重に検討していくことが肝要である。コルチコステロン (corticosterone; CORT) 誘発性うつ病態様モデル動物のほか、これまでに社会敗北ストレスモデル動物、慢性ストレス負荷うつ病態モデル動物、嗅球摘出モデル動物などが開発され利用されている (Willner et al., 1987; Zhao et al., 2008; Hollis et al., 2013)。我々は、ヘプタメトキシフラボン (3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone; HMF) の抗うつ効果を評価するために、第1節のCORT誘発性うつ病態様モデルマウスに引き続き、予測不可能慢性緩和ストレス負荷 (chronic unpredictable mild stressed; CUMS) モデルマウスを用いることとした。CUMSモデルマウスとは、緩和なストレス (湿気を帯びた床敷, 傾斜させたケージ, 摂餌・摂水の制限など) をランダムに、かつ慢性的に与えることで自然な血中CORT濃度上昇を継続させ、視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA系) を破綻させてうつ病態を誘発させたマウス (Willner et al., 2017) である。CUMSモデルマウスはCORT誘発性うつ病態様モデルマウスよりもヒトに近い生理現象を再現するため、表面妥当性・構想概念妥当性の高いモデルとされ、近年世界中のうつ病研究者に汎用されている。

また、抗うつ薬とするには、投与経路は経口 (p.o.) でなければならない。そこで、CUMSモデルマウスを用いた実験系では、HMFをp.o.投与することとした。当研究室ではこれま

で、HMF をマウスの腹腔内 (i.p.) に投与すると、脳内に移行することを明らかにしていた (Okuyama et al., 2017) が、本研究ではまず、 p.o.投与した HMF が脳に移行することを LC/MS クロマトグラムを用いて確認し、前節と同様にうつ病の「脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 仮説」に基づいた解析を行うこととした。

1-2-2 材料と方法

1-2-2-1 実験動物

C57BL/6 マウス (雄性、7 週齢) は 1-1-2-1 と同様、日本 SLC 株式会社 (浜松) より購入、飼育した。すべての動物実験は松山大学動物実験委員会による動物実験実施規程に準じて行った。

1-2-2-2 LC/MS 分析用サンプルの調製

HMF は 5%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) 含有生理食塩水に溶解し、終濃度 100 mg/kg となるようにマウスに p.o.投与した。10 分、30 分、60 分、90 分後 (それぞれ n = 3)、マウスをエーテル麻酔し、左心室から氷冷リン酸緩衝液 (phosphate buffered-saline; PBS) を注入して全身灌流した後、脳を摘出した。摘出した脳 (250 mg) を等量の水とともに Sonicator 3000 (Misonix Inc., Farmingdale, NY, USA) を用いて 30 秒間超音波処理した。得られたホモジネートに 150 μ L のメタノールを加え、ボルテックスで 5 分間攪拌した。その後、4°C、14,000 \times g、10 分間遠心分離して得られた上清を LC/MS 分析用サンプルとした。

1-2-2-3 LC/MS を用いた HMF の定量的解析

LC/MS 分析は、micrOTOF-Q 質量分析計 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) に Agilent 1200 シリーズ高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) システム (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を組合わせて行った。カラムは L-column 2 ODS (150 × 2.1 mm i.d., 5 μm; 化学物質評価機構、東京) を用い、流速は 0.2 mL/min とし、注入量は 2 μL に設定した。移動相にはそれぞれ、(A) 0.1% ギ酸水溶液及び (B) 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液を用い、グラジエント溶離 [濃度勾配条件 (B in A) : 0 → 15 分 (0 → 100%)] を行った。MS 分析条件は以下の通りである。イオン化モード : ESI (+)、キャピラリー電圧 : 4,500 V、ネブライザーガス圧 : 400 hPa、ドライガス : 4.0 L/min (180°C)、ヒートブロック温度 : 180°C、衝突エネルギー : 12.0 eV、測定モード : 選択イオン検出 (SIM)、測定イオン : m/z 433。

1-2-2-4 CUMS 負荷モデルマウスの作製

CUMS 負荷は Willner (1987) らによって開発された方法を改変して行った。Table 1 に示すように、強制水泳 (15 分)、湿性ストレス (24 時間)、摂食制限ストレス (24 時間)、拘束ストレス (2 時間)、傾斜ストレス (24 時間)、電気ショックストレス (0.5 mA, 5 秒の電気ショック → 30 秒の休憩の繰り返しを 20 回) の 6 種類のストレスを無作為に組み合わせ、1 日 1 種類 14 日間、10:00~11:00 の間に CUMS 負荷を開始した (Figure 9)。CUMS 負荷のないマウスは CUMS 負荷マウスとは隔離した部屋で飼育した。

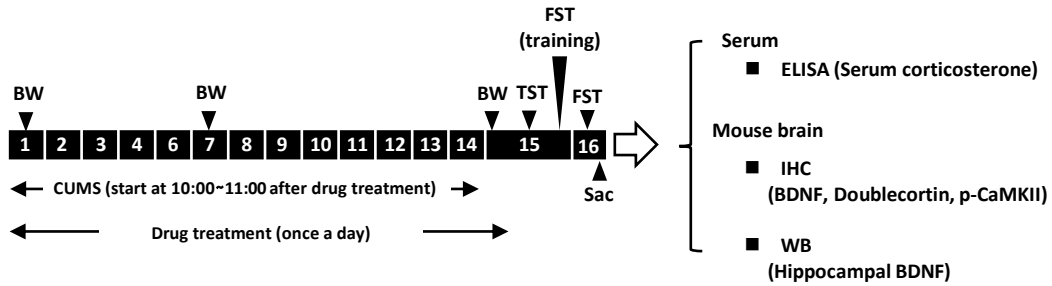


Figure 9. Schematic of the experimental schedule.

Each abbreviation shows; measurement of body weight changes (BW), chronic unpredictable mild stress (CUMS), forced swim test (FST), tail suspension test (TST), Sacrifice (Sac), 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF), Immunohistochemistry (IHC), western blotting (WB).

Table 1. CUMS procedure

Day	CUMS (stress)	Duration
1	Forced swim	15 min
2	Damp sawdust	24 h
3	Food deprivation	24 h
4	Restraint stress	2 h
5	Cage tilt	24 h
6	Electric footshock	0.5 mA, 10-s duration, 60-s interval, 20 shocks
7	Damp sawdust	24 h
8	Restraint stress	2 h
9	Food deprivation	24 h
10	Cage tilt	24 h
11	Electric footshock	0.5 mA, 10-s duration, 30-s interval, 20 shocks
12	Food deprivation	24 h
13	Restraint stress	2 h
14	Cage tilt	24 h

1-2-2-5 薬物投与

HMFはウシオケミックス株式会社（御前崎、静岡）から提供された。HMFは、5% DMSO含有生理食塩水（vehicle）に溶解し、p.o.投与した。マウスは対照群（CON群）、CUMS負荷した群（CUMS群）、CUMSを負荷し、HMFを50 mg/kg/dayの用量で投与した群（CUMS+HMF-L群）、CUMSを負荷し、HMFを100 mg/kg/dayの用量で投与した群（CUMS+HMF-H群）の4群に分けた。CON群およびCUMS群にはvehicleをp.o.投与した。すべての薬物投与はCUMS負荷開始前の9:00~10:00の間に行った。

1-2-2-6 体重測定

体重測定は、CUMS 開始 1 日目 (Day 1)、7 日目 (Day 7)、15 日目 (Day 15) において、CUMS 負荷前に行った。

1-2-2-7 強制水泳試験

強制水泳試験 (forced swim test; FST) は1-1-2-5の方法を改変して行った。本研究では15日目 (Day 15) に15分間の強制水泳を実施し (pretest session)、次いでその24時間後 (すなわち16日目; Day 16) に5分間の強制水泳を実施し (test session)、test sessionの前半3分間の不動時間をANY-maze Video tracking system (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) を用いて記録した。

1-2-2-8 尾懸垂試験

尾懸垂試験 (tail suspension test; TST) は1-1-2-6の方法と同様に行った。本研究では15日目 (Day 15) に6分間の尾懸垂試験を実施し、その後半4分間の不動時間をANY-maze Video tracking system (Stoelting) を用いて記録した。

1-2-2-9 血清コルチコステロン値の測定

FST直後のマウスを断頭し1.5 mLチューブに採取した血液は、4°Cで24時間放置して血餅を凝集させた後、4°C、 $1,200 \times g$ の条件で遠心分離した。得られた上清を血清サンプルとし、Corticosterone ELISA Kit (Assaypro LLC, St. Charles, MO, USA) のサンプルとした。血清コルチコステロン測定操作手順はキット付属のプロトコールに従った。標準品で得られた吸光度から4係数ロジスティック曲線の各パラメータを求め、パラメータからコルチコステロン濃度を算出した。

1-2-2-10 免疫組織化学的染色

組織の固定および凍結切片の調製・染色は 1-1-2-7 の操作手順に従って行った。本章で用いた抗体は以下に示すとおりである。1 次抗体；抗 BDNF 抗体（ウサギ）（希釈率 1:150; Abcam, Cambridge, UK）、抗ダブルコルチン（doublecortin; DCX）抗体（ヤギ）（1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA）、抗神経細胞マーカー（neuronal nuclei; NeuN）抗体（マウス）（1:300; Millipore, Billerica, MA, USA）、抗リン酸化カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ（phosphorylated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase; p-CaMK）II 抗体（p-Thr286）（ウサギ）（1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）。2 次抗体（室温、1 時間）；Alexa Flour 488 ヤギ抗ウサギ IgG（希釈率 1:300; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）、Alexa Flour 488 ロバ抗ヤギ IgG（1:300; Invitrogen）、Alexa Flour 568 ヤギ抗ウサギ IgG（1:300; Invitrogen）。シグナル強度は、Image J（NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA）を用いて定量解析した。

1-2-2-11 ウエスタンブロット

タンパク抽出液の調製は、脳組織の破碎を Astrason 3000（和研薬株式会社、東京）を用いて行ったほかは 1-1-2-8 に記載した手順に従った。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動には 20 µg 等量のタンパク抽出液を用いた。1 次抗体としては抗 BDNF 抗体（ウサギ）（希釈率 1:1000; Abcam）、抗 β-アクチン抗体（ウサギ）（1:1000; Sigma Aldrich）、2 次抗体としては西洋ワサビペルオキシターゼ結合抗ウサギ IgG（希釈率 1:2500; Cell Signaling, Danvers, MA, USA）を用いた。

1-2-2-12 統計処理

データは平均値±標準誤差（SEM）として表した。有意差を Student's t-test および One-way ANOVA post-hoc Williams comparison test、または Dunnett's test によって分析した。

1-2-3 結果

1-2-3-1 p.o.投与後の HMF の脳移行性

当研究室ではこれまでの研究において、HMF の i.p.投与後に HMF が血液脳関門を通過し、脳に移行することを HPLC 法で確認している (Okuyama et al., 2017)。本研究では、マウスに対する HMF の p.o.投与後の脳移行性について解析するため、より高感度な LC/MS 解析法を開発した。Figure 10A は HMF を投与したマウスの脳サンプル、Figure 10B は vehicle を投与したマウスの脳サンプルの LC/MS クロマトグラムを示したものである。この結果から、HMF は LC/MS スペクトルにおいて単一のピークとして検出されることが明らかになった。また標準 HMF を用いて検量線を作成すると、この方法により 0.01~1 ng/mL の範囲で HMF が定量できることが明らかになった。そこで、本方法を用いて HMF (100 mg/kg) p.o.投与 10、30、60 分後におけるマウス脳実質内 HMF 濃度を LC/MS を用いて測定した結果を示したのが Figure 11 である。Figure 11 から、HMF は p.o.投与 10 分後には脳実質に移行している (56.4 ± 15.1 ng/g) こと、p.o.投与 30 分後では 10 分後の約 4 分の 1 程度 (15.3 ± 33.2 ng/g) に HMF 濃度が低下していること、p.o.投与 60 分後では検出不可能なレベルに達することが明らかとなった。なお、90 分後の HMF 量は検出不可能であった (Figure 11 には示さず)。

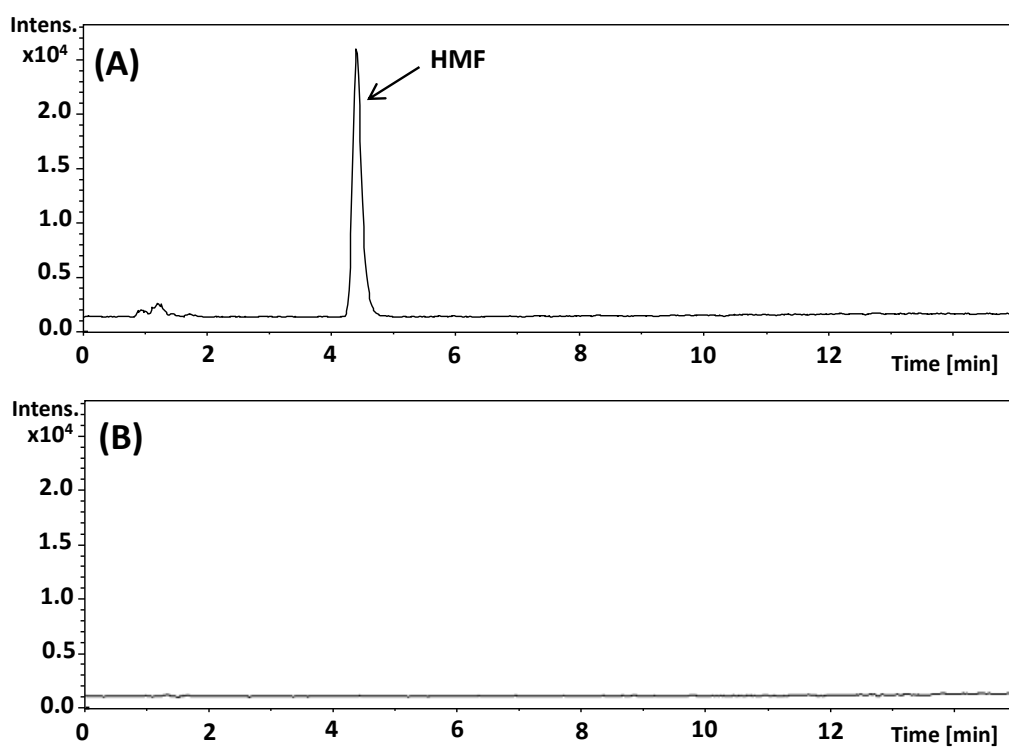


Figure 10. LC/MS chromatograms of Brain tissue.
 LC/MS chromatograms (m/z 433 $[M+H]^+$) of brain tissues from mice treated *p.o.* with HMF (A) and vehicle-treated brains (B). The solid arrow is HMF.

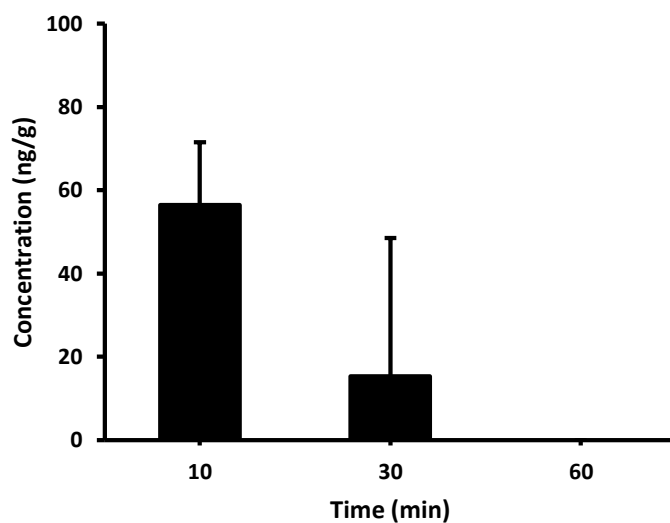


Figure 11. Time course of brain HMF concentration profiles following its *p.o.* administration.

1-2-3-2 体重変化に対する影響

1-1-3-1 と同様にマウスの体重測定を行った。1日目 (Day 1)、7日目 (Day 7)、15日目 (Day 15) における体重を測定し、Day 1 における体重を 100% として体重増加率を算出した。その結果を Figure 12 に示す。Day 7 では CON 群の体重増加率 ($110 \pm 1.7\%$) に対して CUMS 群の体重増加率 ($101 \pm 1.7\%$) は有意に ($**p < 0.01$) 低下していた。Day 15 では CON 群 ($115 \pm 3.3\%$) に対して CUMS 群の体重増加率 ($102 \pm 1.6\%$) の低下はさらに ($***p < 0.001$) 大きくなった。一方、CUMS + HMF-H 群の体重増加率は $107 \pm 1.8\%$ で、CUMS 群の体重増加率低下を抑制することが明らかになった ($#p < 0.05$)。

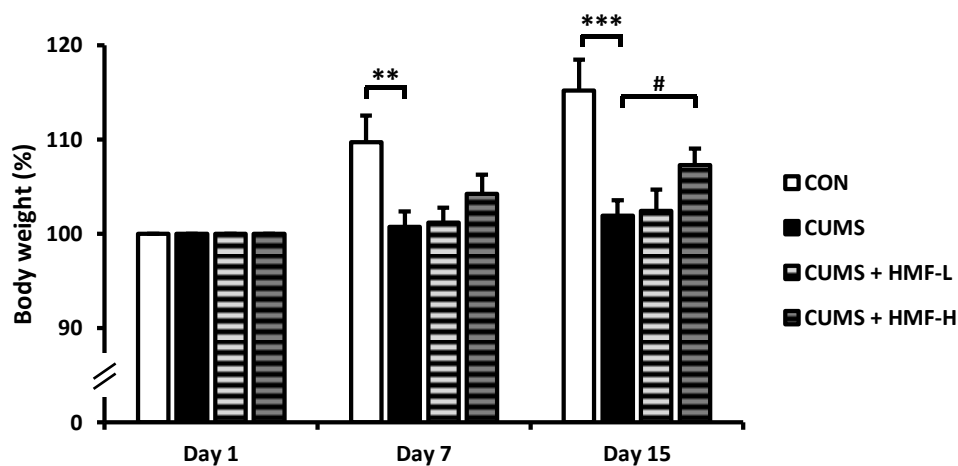


Figure 12. Effects of chronic unpredictable mild stress and HMF treatments on body weight changes on Days 1, 7, and 15.

Values are means \pm SEM ($n = 12 - 16$). Symbols show significant differences between the following groups: CON vs. CUMS ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$, the Student's t -test) and CUMS vs. CUMS + HMF-H ($#p < 0.05$, One-way repeated measures ANOVA followed by the post-hoc Williams multiple comparison test).

1-2-3-3 血清 CORT 濃度に及ぼす影響

血清 CORT 濃度はストレス負荷により上昇し、うつ病の発症に関与することが知られている (Gregus et al., 2005)。そこで、HMF が血清 CORT 濃度に及ぼす影響について検討した。血清サンプルは Day 16 の FST 直後に採取した血液から調製した。Figure 13A に示すように、CUMS 群の血清 CORT 濃度 (705 ± 64.3 ng/mL) は CON 群 (284 ± 27.9 ng/mL) に対して有意に ($***p < 0.001$) 増加した。一方、HMF は CUMS 負荷による血清 CORT 濃

度上昇に影響を与えなかった。Figure13B は FST の 1 時間後に採取した血液を用いて血清 CORT 濃度を測定した結果を示したものであるが、HMF は CUMS による血清 CORT 濃度上昇を抑制していた (Figure 13B)。

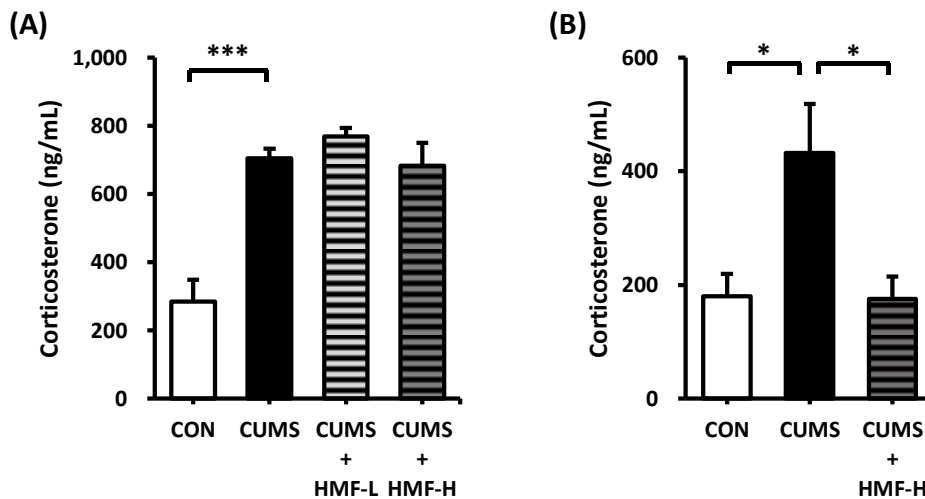


Figure 13. Effects of HMF on serum corticosterone levels.

(A) Concentration of serum corticosterone measured immediately after FST. (B) Concentration of serum corticosterone measured 1 h after FST. Values are means \pm SEM (n = 6 - 10). Symbols show significant differences between following condition : CON vs. CUMS (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Student's t -test), and CUMS vs. CUMS + HMF-H (* $p < 0.05$, Student's t -test).

1-2-3-4 うつ病態様行動に対する HMF の効果

Figure13A で血清 CORT 濃度測定に供した血清サンプルは、FST 直後に調製したものである。すなわち、FST は血清 CORT 濃度に影響を与える可能性が高いため、うつ病態様行動に対する HMF の効果を検討するにあたり、CON 群については FST を行うことはできなかった。ただし予備試験において、CUMS 群の FST における不動時間は対照群に比べて約 2 倍に延長することを確認しており (データは示さず)、CUMS モデルマウスとしての妥当性は確認できている。

Figure 14A は Day 16 の FST の結果を示したものであるが、CUMS 群によって誘発される不動時間の延長 (56 ± 7.0 秒) は CUMS + HMF-L 群 (39 ± 5.3 秒)、CUMS + HMF-H 群 (38 ± 6.4 秒) では有意に ($p < 0.05$) 短縮されていることが明らかになった。Figure 14B

は Day 15 の TST の結果を示したものであるが、HMF は CUMS の不動時間に影響を与えることはなく、1-1-3-2 の結果と同様であった。

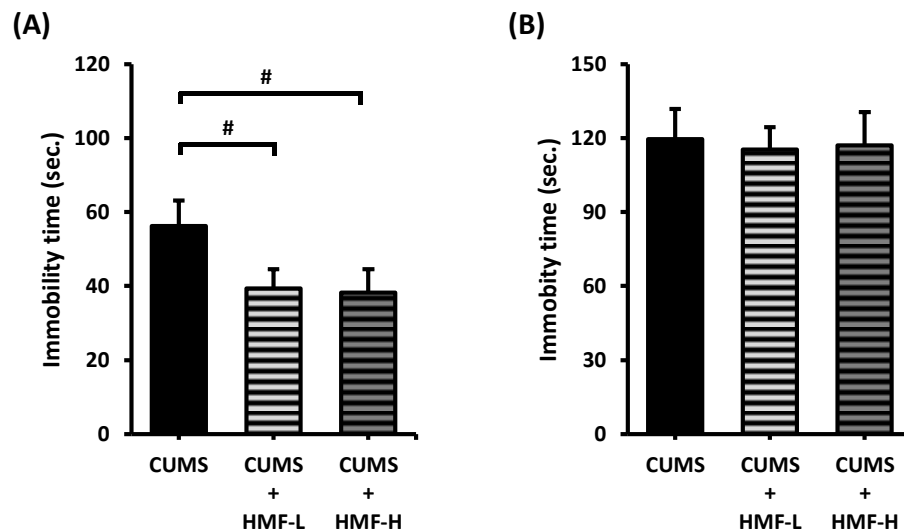


Figure 14. Effects of HMF on CUMS-induced depression-like behavior in the forced swim test and tail suspension test on Day 16.

Immobility time of forced swim test (A) and tail suspension test (B). Values are means \pm SEM (CUMS, $n = 15$; CUMS + HMF-L, $n = 16$; CUMS + HMF-H, $n = 15$). Symbols show significant differences between the following groups: CUMS vs. CUMS + HMF-L, CUMS vs. CUMS + HMF-H ($\#p < 0.05$, one-way ANOVA followed by the post-hoc Williams multiple comparison test).

1-2-3-5 海馬組織における BDNF 発現に及ぼす影響

ストレスを負荷された齧歯類の海馬組織では BDNF 発現が減少することが報告されている (Zhang et al., 2010)。そこでまず、HMF が海馬組織全体の BDNF 発現に及ぼす影響についてウェスタンブロット法を用いて検討した。その結果、Day 16 における CUMS 群の BDNF 発現 ($73 \pm 4.2\%$) は、CON 群 ($100 \pm 9.9\%$) より減少する傾向を示したものの、有意ではない ($p = 0.056$) こと、CUMS + HMF-H 群では CUMS 負荷による BDNF 発現の減少が有意に ($\#p < 0.05$) 改善されることが明らかになった (Figure 15A)。

Figure 15B は、4 週間の CUMS 負荷を行い、後半 2 週間は HMF を p.o.投与して海馬 BDNF 発現への影響を検討した結果を示したものである。その結果、CUMS 群の BDNF 発現 ($82.8 \pm 2.4\%$) は、CON 群 ($100 \pm 6.7\%$) より有意に ($*p < 0.05$) 低いこと、CUMS + HMF-H 群ではこれを有意に ($*p < 0.05$) 改善することが明らかになった。

1-2-3-6 海馬 CA1 領域における BDNF 発現に及ぼす影響

次いで、Day 16 の海馬 CA1 領域 (Figure 16A) における BDNF 発現に及ぼす CUMS および HMF 投与の影響を、免疫組織化学的染色法で解析した。Figure 16B は BDNF シグナル (緑色)、Figure 16C は BDNF シグナル強度を Image J (NIH) を用いて定量した結果を示したものである。CON 群のシグナル強度 ($100.0 \pm 15.7\%$) に対して CUMS 群のシグナル強度 ($24.4 \pm 11.9\%$) は著しく ($**p < 0.01$) 弱いこと、HMF を投与するとシグナル強度の減少が濃度依存的に抑制され、特に CUMS+HMF-H 群のシグナル強度 ($85 \pm 13.5\%$) は CUMS 群のシグナル強度に比べ有意に ($\#p < 0.05$) 高いことが明らかになった。以上の結果より、HMF は CUMS による海馬 CA1 領域の BDNF 発現の減少を抑制することが明らかとなった。また、1-1-3-3 の結果と同様に CA1 領域における GFAP シグナル (アストロサイトのマーカー) の発現 (赤色) についても解析した。その結果、BDNF 陽性細胞はアストロサイトとほぼ重なり合い、その結果、黄色となることが確認できた。

1-2-3-7 海馬歯状回領域における神経新生に及ぼす影響

CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスの場合 (1-1-3-5) と同様に、CUMS モデルマウスについても CUMS 負荷あるいは HMF 投与が、Day 16 の海馬歯状回領域 (Figure 17A) における神経新生に及ぼす影響について、免疫組織化学的染色法で検討した。Figure 17B は抗 DCX 抗体及び抗 NeuN 抗体による染色像、Figure 17C は DCX シグナルの強度を Image J (NIH) を用いて定量した結果を示したものである。その結果、NeuN シグナル (青色) の強度に変化は見られない (データは示さず) のに対し、DCX シグナル (緑色) の強度は、CON 群 ($100.0 \pm 15.1\%$) に対して CUMS 群 ($55.1 \pm 8.8\%$) では有意に ($*p < 0.05$) 減弱していること、CUMS+HMF-H 群 ($87.4 \pm 15.2\%$) はこれを有意に ($\#p < 0.05$) 抑制していることが明らかになった。以上の結果より、HMF は CUMS による歯状回領域の神経新生減少を抑制することが明らかとなった。

1-2-3-8 海馬組織における神経可塑性に及ぼす影響

CORT 誘発性うつ病態様モデルマウス (1-1-3-6) の場合と同様に、CUMS モデルマウスについても CUMS 負荷あるいは HMF 投与が、Day 16 の海馬組織 (Figure 18A) における神経可塑性に及ぼす影響について、免疫組織化学的染色法で検討した。Figure 18B は抗 p-CaMKII 抗体による染色像、Figure 18C は p-CaMKII シグナルの強度を Image J (NIH) を用いて定量した結果を示す。その結果、CON 群の p-CaMKII シグナル強度 ($100 \pm 10.1\%$) に対して CUMS 群のシグナル強度 ($69.2 \pm 7.8\%$) は有意に ($**p < 0.01$) 低下していること、HMF を投与するとシグナル強度の減少が濃度依存的に抑制され、特に CUMS + HMF-H 群のシグナル強度 ($96.7 \pm 9.4\%$) は CUMS 群のシグナル強度に比べ有意に ($\#p < 0.05$) 高いことが明らかになった。以上の結果より、HMF は CUMS により誘発される海馬組織における p-CaMKII 発現の減少を抑制することが明らかとなった。

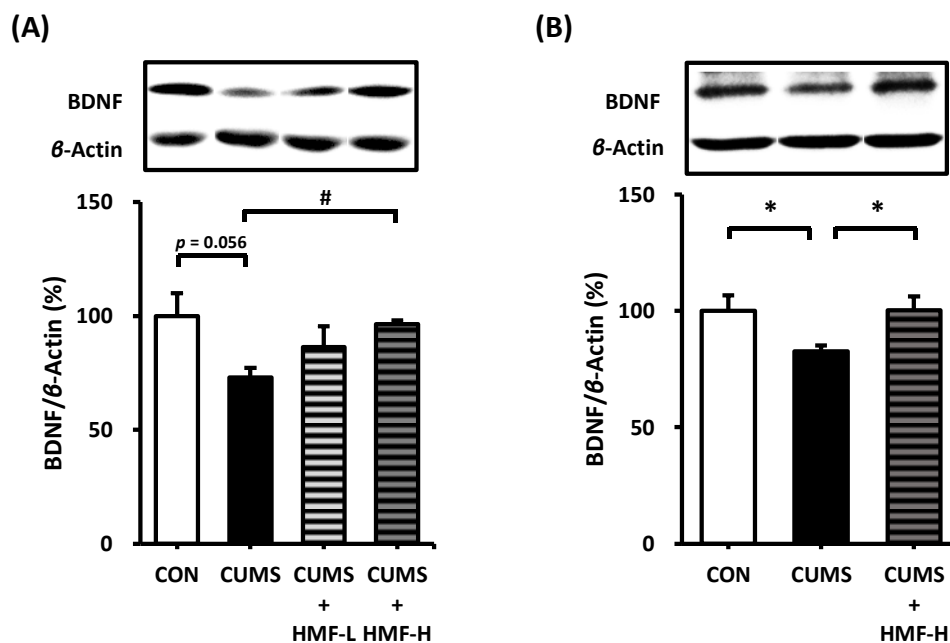


Figure 15. Western blot analysis of BDNF in the CUMS-treated mouse hippocampus.

Representative band patterns of BDNF and β -actin were shown on top of the graph. A quantitative analysis of the BDNF / β -Actin ratio were obtained by using ImageJ software. The BDNF / β -Actin ratio is expressed as a percentage of CON. (A) The BDNF / β -Actin ratio on Day 16. Values are means \pm SEM ($n = 5$). Symbols show significant differences between the following groups; CON vs. CUMS ($p = 0.056$, the Student's t-test), CUMS vs. CUMS + HMF-H ($\# p < 0.05$, one-way ANOVA followed by the post-hoc Williams multiple comparison test). (B) The influence of administration of HMF for 2 weeks on BDNF / β -Actin ratio after 2 weeks CUMS. Values are means \pm SEM ($n = 6 - 7$). Symbols show significant differences compared with CUMS ($* p < 0.05$, Dunnett's test).

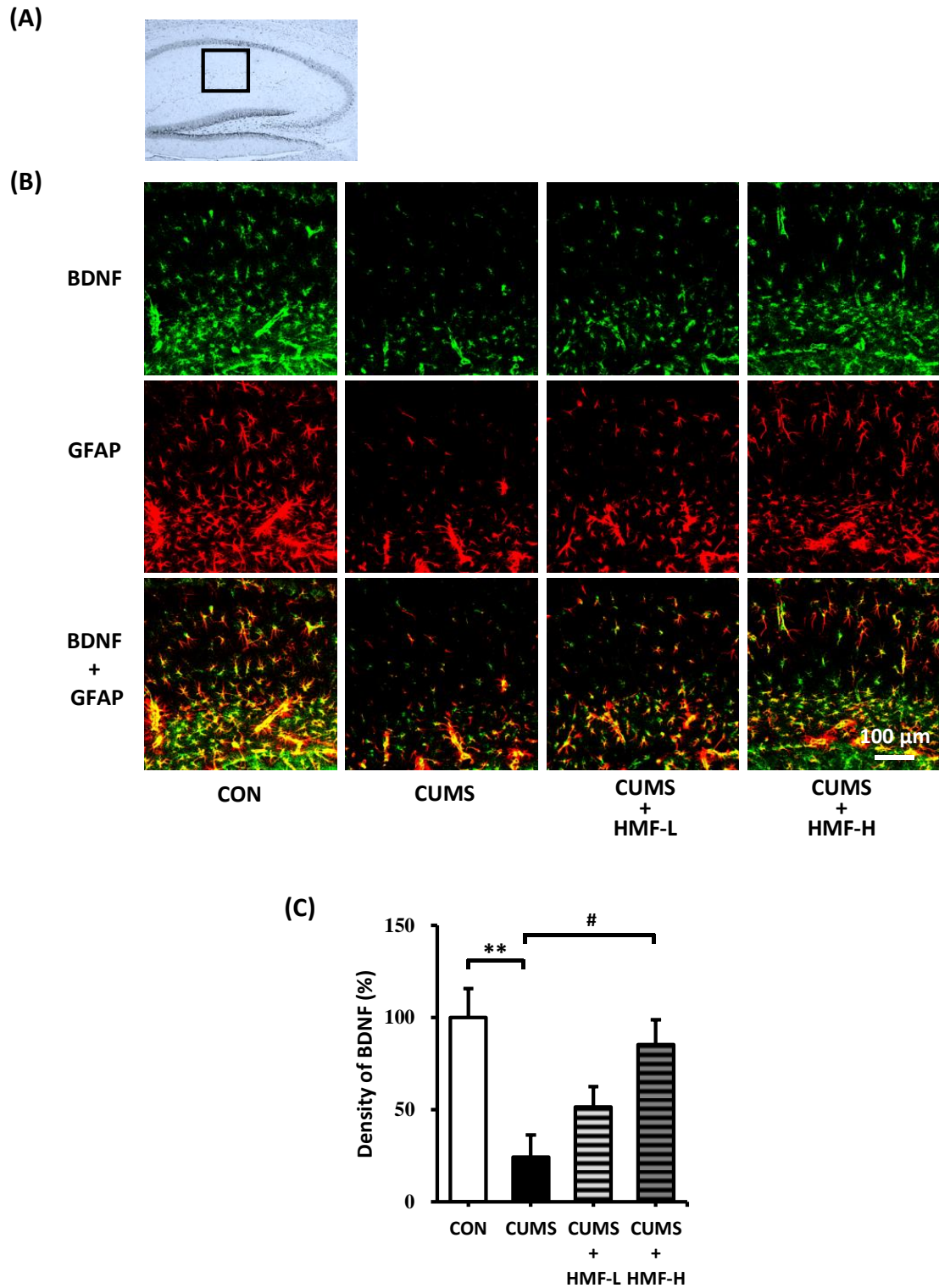


Figure 16. Effects of HMF on the expression of BDNF and GFAP in the CUMS-treated mouse hippocampus on Day 16.

The location of the captured images in the hippocampus and quantification is shown with a square (A). (B) Immunoreactivities of BDNF (green) and GFAP (red). The white scale bar shows 100 μm . (C) A quantitative analysis of BDNF densities. Values are means \pm SEM ($n = 6 - 8$). Symbols show significant differences between the following groups: CON vs. CUMS (** $p < 0.01$, the Student's t -test), CUMS vs. CUMS + HMF-H (# $p < 0.05$, one-way ANOVA followed by the post-hoc Williams multiple comparison test).

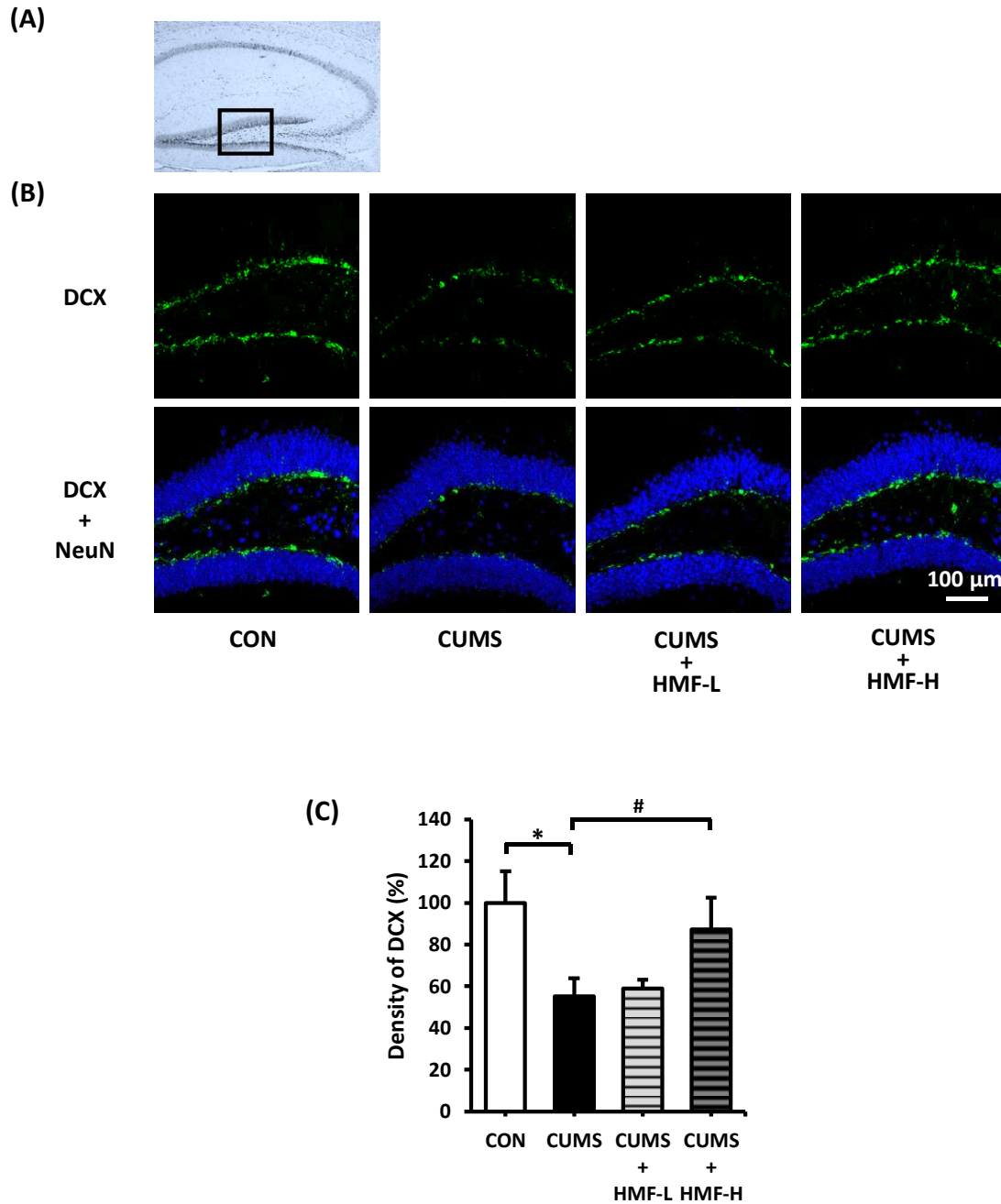


Figure 17. Effects of HMF on neurogenesis in the CUMS-treated mouse hippocampus on Day 16.

The location of the captured images in the hippocampus and quantification is shown with a square (A). (B) Immunoreactivities of DCX (green) and NeuN (blue). The white scale bar shows 100 μm . (C) A quantitative analysis of DCX densities. Values are means \pm SEM (n = 6 - 8). Symbols show significant differences between the following groups: CON vs. CUMS (* $p < 0.05$, the Student's t-test), CUMS vs. CUMS + HMF-H (# $p < 0.05$, one-way ANOVA followed by the post-hoc Williams multiple comparison test).

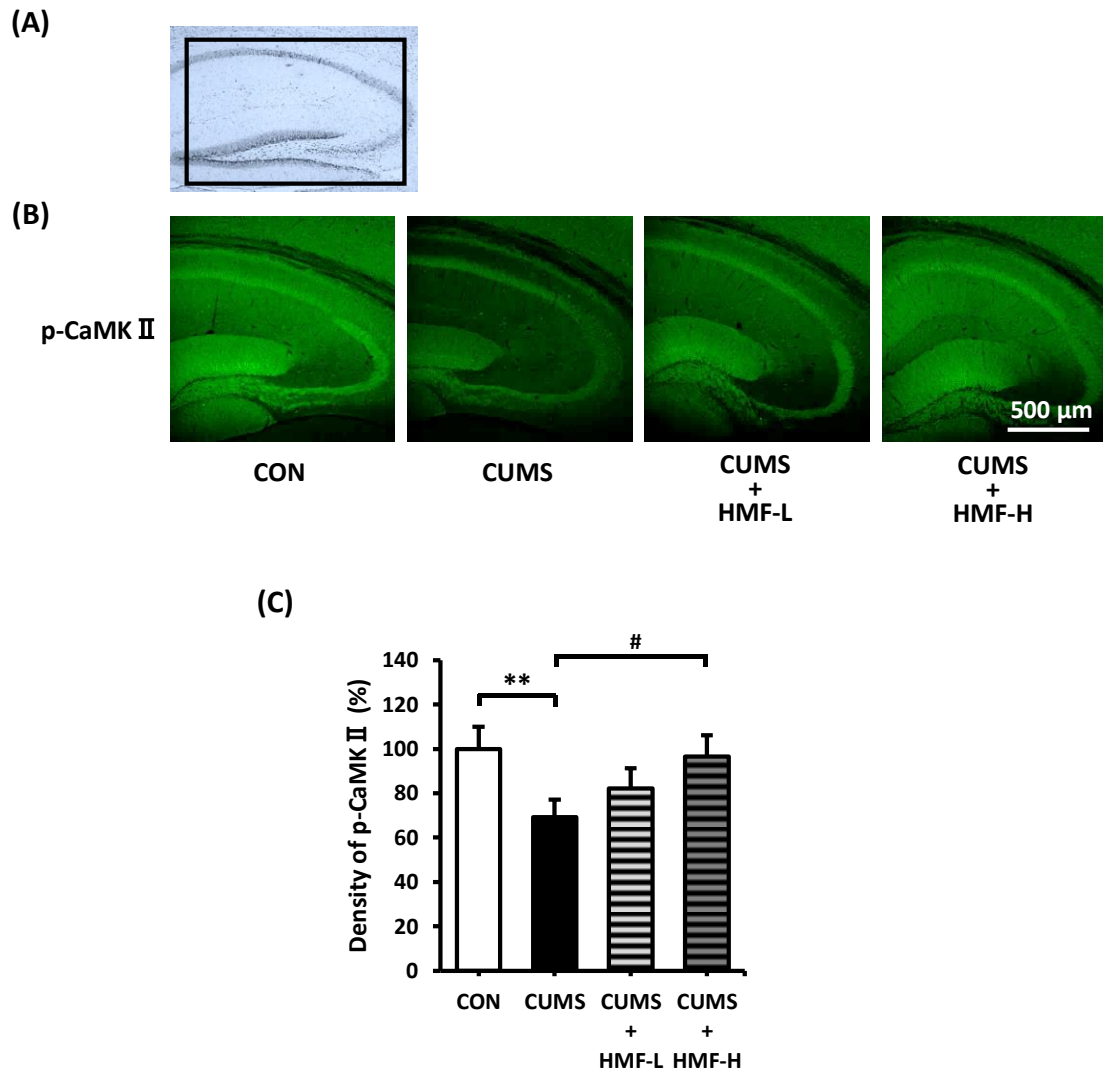


Figure 18. Influence of HMF on the neuronal network in the CUMS-treated mouse hippocampus on Day 16.

The location of the captured images in the hippocampus and quantification is shown with a square (A). (B) Immunoreactivity of p-CaMKII (green). The white scale bar shows 500 μm . (C) A quantitative analysis of p-CaMKII densities. Values are means \pm SEM (n = 6 - 8). Symbols show significant differences between the following groups: CON vs. CUMS (** $p < 0.01$, the Student's t -test), CUMS vs. CUMS + HMF-H (# $p < 0.05$, one-way ANOVA followed by the post-hoc Williams multiple comparison test).

1-2-4 考察

本節では p.o.投与後の HMF 脳移行性の検討、CUMS モデルマウスの種々の病態に対する HMF の効果について検討を行った。その結果、1) p.o.投与した HMF は脳に移行するこ

と、2) HMF は CUMS 負荷によるうつ病態様行動を改善すること、3) HMF は海馬組織における BDNF 発現の低下、海馬歯状回領域における神経新生の低下、神経可塑性の低下を抑制すること、を明らかにした。

フラボノイド化合物の脳内移行性を示す報告はこれまでも散見されるが、実際にフラボノイド化合物が血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を通過して脳実質へ移行したことを証明するものではなく、血管内または内皮細胞内に残存したものが検出されている可能性が高いとする報告もある (Youdim et al., 2004)。そこで本研究ではこの可能性を取り除くため、十分に還流を行った後に脳を採取し、解析に供した。これまで、i.p.投与した後の脳内 HMF 含量は HPLC 法で測定していたが (Okuyama et al., 2017)、p.o.投与後の HMF の脳内含量は、本研究において微量 HMF 量を測定する LC/MS 法を開発したことで初めて可能とした。Figure 10 の結果は、HMF を単回 p.o.投与すると i.p.投与の場合 (Okuyama et al., 2017) と同様、HMF の未変化体が脳へ移行することを示している。また Figure 10A の保持時間 1 分あたりに小さなピークが出現している。このピークは Figure 10B の vehicle 投与では出現しないことから、HMF の代謝物である可能性がある。PMF の主な代謝様式はメトキシ基の脱メチル化であるが (Li et al., 2008)、PMF の 1 つで HMF の 3 位が水酸基に置換された構造を有するナツダイダイン (3-Hydroxy-5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone) は脳内移行性が HMF より著しく低いことから (Okuyama et al., 2017)、Figure 10A で出現したピークはおそらく、BBB を通過した後に HMF が代謝されたものであると考えられる。p.o.投与した場合に脳への移行が速やかであるのは、HMF の回腸からの吸収率が高いためと考えられる。すなわち、p.o.投与された HMF は速やかに血中に移行し (Kakiuchi et al., 2017)、血中 HMF は速やかに脳に移行する (Okuyama et al., 2017) と考えられる。実際、フラボノイド化合物であるヘスペリジン、ナリンゲニン、アントシアニンなどは BBB の *in vitro* モデルである ECV304/C6 の共培養系において、脂溶性依存的に BBB 透過性を示すと報告されており (Begley et al., 2004)、脂溶性の高い構造を有する HMF もこれらの化合物同様、脳実質への移行性が高いのであろう。Figure 11 は、HMF は p.o.投与後、脳へ移行するが、消失

も極めて速やかであることを示している。脳からの消失が速やかである理由については検討していないが、血管内皮細胞に発現する薬剤排出ポンプによって血中へ排出されることがひとつの可能性として考えられる。

うつ病態様行動についてはFSTで評価した。本研究では、CUMSスケジュールに強制水泳ストレスを含むこと、FSTをpretest sessionとtest sessionの2回で構成したことから、マウスの強制水泳に対する慣れの危険性を除去するためにtest sessionでは5分間の試験時間のうちはじめの3分間の不動時間を測定した。その結果、Figure 14Aに示したように、HMFはCUMSによる不動時間を短縮したことから、HMFはCUMSモデルマウスに対して抗うつ様効果を示すことが示唆された。うつ病態様行動の評価法として、FSTの他にTSTが汎用されており、本研究においてもHMFの作用をTSTにより解析した。しかし、HMFはTSTにおける不動時間には影響を及ぼさなかった (Figure 14B)。すなわち、HMFの抗うつ作用にはFSTの行動に影響を与える神経経路が関与している可能性が高い。なお、PMFのひとつノビレチン (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxy flavone; NOB) のCUMSモデル動物に対する抗うつ様効果は、無快感状態 (スクロース嗜好性試験, sucrose preference test; SPT) で判定されている (Li et al., 2013)。抗うつ効果の評価は第1節より一貫して体重変化、FST、TSTの3項目で行っているため本研究では用いなかったが、今後、SPTなどの他の評価法についても検討していく予定である。

HMFの抗うつ作用の機序については、HMFがFST直後の血清CORT濃度の上昇に影響しなかったとの本研究の知見 (Figure 13A)、ノルアドレナリントランスポーター (noradrenaline transporter; NAT) 欠損マウスではFST後の一過性CORT濃度上昇が抑制されるとの報告 (Solich et al., 2008) を考え合わせると、HMFはNAT発現を介して作用している可能性は低いと考えられる。またCUMS + HMF群の血清CORT濃度はCUMS群と同レベルであったことから、HMFが副腎皮質を介して作用している可能性も低いと考えられる。HMFの作用点が副腎皮質ならば、FST直後の一過性のCORT濃度上昇はHMF投与により抑制されるはずだからである。一方、NOBはCUMS負荷により生じるCORT濃度上

昇を抑制したと報告されている (Li et al., 2013)。NOB を i.p.投与した場合は、脳への移行は HMF より著しく低いこと (Okuyama et al., 2017) から、同じ PMF といえども、HMF と NOB の作用機序は異なる可能性が示唆される。また FST の 1 時間後に採取した血清サンプルを解析すると、HMF によって CORT 濃度の上昇が抑制された (Figure 13B)。これは、FST 後の血清 CORT 濃度の上昇を正常な負のフィードバック機構により抑制するのに一定の時間を要するのではないかと推測される。実際に、天然ポリフェノールであるレスベラトロールは HMF と同様に海馬組織の BDNF 発現を増加し、CUMS 負荷による血清 CORT 濃度上昇を抑制するとの報告がある (Liu et al., 2014)。

うつ病の発症には何らかのストレスが関与しており、体重増加率の低下はストレスに起因することが知られている (Zhao et al., 2008)。本研究において CUMS による体重増加率の低下は HMF によって改善されたが、この作用機序については今後解明していく予定である。

CUMS モデル動物の海馬組織では BDNF 発現が減少するが、抗うつ薬の慢性投与により改善することが報告されている (Zhang et al., 2010)。本研究においてウエスタンブロット法で海馬組織全体における BDNF 発現を解析すると、HMF は CUMS で引き起こされる BDNF 発現減少を抑制する傾向を示し (Figure 15A)、この報告とよく一致した。また、HMF の投与に先立ち、CUMS を 2 週間負荷したマウスの海馬においても同様の結果を示した (Figure 15B)。すなわち、HMF は CUMS によって誘発される BDNF 発現減少の抑制効果に加え、CUMS によって既に減少した BDNF 発現を回復する効果も有していることが明らかになった。すなわち、HMF は BDNF 発現の減少に対して、予防的にも治療的にも作用する可能性が示された。次いで、免疫組織化学的染色法を用いて海馬 CA1 領域 (嗅内皮質-歯状回-CA3 からのシグナルを受け取る領域) の BDNF 発現について解析したところ、CUMS により CA1 領域の BDNF 発現は低下するが、HMF は濃度依存的に抑制することが明らかになった (Figure 16C)。すなわち、HMF は海馬 CA1 領域における BDNF 発現増加作用を示し、海馬神経ネットワークの維持に寄与する可能性が示唆された。また、GFAP の

シグナルと BDNF のシグナルが重なり合うことから、アストロサイトが BDNF 発現に関与していることが示唆された (Figure 16B)。脳の毛細血管の 99% はアストロサイトの足突起によって強固に覆われており、血管内皮細胞相互はギャップ結合によって結びついている。アストロサイトの足突起は血管内皮細胞の密着結合よりはゆるく、しかし自由な分子拡散は妨げる BBB の第 2 のバリアとして働いている (塗谷ら, 2015)。また近年、フラボノイド化合物が神経系に作用し、その作用点のアストロサイトであるとの報告もある (Matias et al., 2015)。これらの知見から、HMF は脳内へ移行した後、まずアストロサイトに作用し、アストロサイトから分泌された BDNF などが間接的に他のグリア細胞あるいは神経細胞に作用しているのではないかと考えられる。また、HMF は CUMS による神経新生の低下、神経可塑性の低下を濃度依存的に改善することが明らかになった (Figure 17C, 18C)。以上の結果より、HMF は CORT 誘発性うつ病態様モデルマウスのみならず CUMS モデルマウスにおいても抗うつ作用を示すこと、これらの効果は p.o. 投与によっても発揮されることが明らかとなった。

HMF の作用機序については未解明であるが、ヒト単球細胞においてホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase) 4 阻害作用を有することが報告されている (Manthey et al., 1999)。中枢神経系を構成する細胞においても同様の作用を示すかは明らかではないが、HMF の作用機序の 1 つであると考えられるため現在解析を進めている。また、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase; MAPK) / 細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) キナーゼ (MEK) が HMF の BDNF 発現増加作用に関与する可能性も見出しており (第 1 節)、MEK 阻害剤の U0126 を用いて作用機序解明に取り組んでいるところである。

以上、CUMS モデルマウスに HMF を p.o. 投与すると、海馬組織における BDNF 発現増加を介して様々な組織化学的障害を抑制し、うつ病態様行動が改善することが示された。本研究の結果は HMF が新規抗うつ薬となり得ることを支持するものである。

第2章 中枢神経疾患改善作用を有する漢方薬の探索

第1節 中枢神経系に作用する漢方薬の選定

2-1-1 緒言

近年、薬学領域の研究においては、開発に莫大な投資が必要となる新薬開発に加えて、既存の薬物の適応範囲の拡大を目的とした“育薬”が推進されている（中野, 2008）。特に日本独自の発展を遂げてきた漢方薬の育薬・エビデンスの構築は重要視されており、様々な研究が行われている。代表例として、抑肝散（yokukansan; YKS）の不安障害や認知症周辺症状の改善効果（Iwasaki et al., 2005; Monji et al., 2009; Uchida et al., 2009; Mizoguchi et al., 2017）、大建中湯の術後腸閉塞の予防効果（Endo et al., 2014）、六君子湯の機能性胃腸症の改善効果（Kusunoki et al., 2010）などが挙げられ、このような漢方薬の育薬は今後さらに加速していくものと考えられる。そこで、本研究では、柑橘の選定で用いたスクリーニング手法を適応し（Furukawa et al., 2012a; 2012b）、漢方薬の育薬研究を行うこととした。

当研究室では、柑橘果皮由来成分ヘプタメトキシフラボン（3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone; HMF）が様々な病態モデル動物の脳において、脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor; BDNF）の発現を亢進し、病態を改善することを見出してきた（Okuyama et al., 2013; 2014; 2015; 2017; Sawamoto et al., 2016; 2017）。中枢神経系（central nervous system; CNS）における BDNF 発現の減少は、認知症やうつ病など様々な CNS の疾患の発症に関与しており、ストレスや脳虚血、加齢に伴う脳血流の低下によっても生じる（Banoujaafar et al., 2014; Okuyama et al., 2014）。特に脳血流の低下に伴う BDNF 発現の減少はアルツハイマー型認知症やうつ病などの発症に深く関与しているため、正常な脳血流の維持は

これらの疾患予防に重要である (Seifert et al., 2010)。逆に、運動により血流が良好な状態にあると、海馬における BDNF 発現が上昇することが報告されている (Wrann et al., 2013)。一方、東洋医学の概念に“瘀血”という症状がある。瘀血は血液が停滞したり巡りが悪くなったりした状態を意味し、この状態が継続すると脳血管障害や神経痛などを引き起こす。瘀血を改善する作用（駆瘀血作用）を有する漢方薬は一般的に不安や不眠、更年期障害、循環器疾患などに適応されるが、CNS の疾患に対する適応はない。そこで本研究では、漢方薬の中でも駆瘀血作用を有する漢方薬を対象として中枢神経疾患に対する効果について検討した。駆瘀血作用を有する漢方薬として選んだのは、防風通聖散 (bofutsushosan; BTS)、白虎加人参湯 (byakkokaninjinto; BKNT)、腸癰湯 (choyoto; CYT)、五苓散 (goreisan; GRS)、葛根加朮附湯 (kakkonkajutsubuto; KKJT)、荊芥連翹湯 (keigairengyoto; KRT)、香蘇散 (kososan; KS)、芎歸膠艾湯 (kyukikyogaito; KKT)、人参養榮湯 (ninjinyoeito; NYT)、苓桂朮甘湯 (ryokeijutsukanto; RJT)、酸棗仁湯 (sansoninto; SAT)、四物湯 (shimotsuto; SIT)、疎経活血湯 (sokeikakketsuto; SKT)、桃核承気湯 (tokakujokito; TJT)、薏苡附子敗醬散 (yokuibushihaisyosan; YBHS)、YKS の 16 種類である。本研究ではこれらの漢方薬について、神経細胞における細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase ; ERK) 1/2 のリン酸化を指標としたスクリーニング (Furukawa et al., 2012a) を行った。ERK1/2 は、神経可塑性および中枢神経系における長期増強 (long-term potentiation; LTP) の発達に参与することが報告されており (Ying et al., 2002)、実際、当研究室ではこのスクリーニング法を用いて柑橘果皮由来成分 HMF を見出すことに成功している (Furukawa et al., 2012a)。本研究では神経細胞として、マウス神経芽細胞腫 (neuroblastoma) に由来する Neuro2a 細胞を用いた。Neuro2a 細胞は初代培養神経細胞に比べて培養が容易であり、また分化能を有しているという利点がある。すなわち、ERK 1/2 活性化は神経細胞の分化にも関与することが報告されており (Samuels et al., 2008)、Neuro2a 細胞を用いれば、本スクリーニング法で陽性となった漢方薬について、分化能 (神経突起伸展作用) を検討することができる (Furukawa et al., 2012b)。

2-1-2 材料と方法

2-1-2-1 漢方薬抽出物の調製

漢方薬の調製に用いた生薬は、ウチダ和漢薬株式会社（東京）または栃本天海堂（大阪）から購入した。漢方薬抽出物は、Table 2 に示す 1 日量で調製した。例えば、酸棗仁湯（SAT）の 1 日量は、サンソウニン（15.0 g）、チモ（3.0 g）、センキュウ（3.0 g）、ブクリョウ（5.0 g）及びカンゾウ（1.0 g）からなり、これらを水（500 mL）中で 60 分間ほぼ半量になるまで煎じ、ろ過した後、煎出物を約 50 mL になるまで減圧濃縮し、次いで凍結乾燥した濃縮物（2.9 g）を試験サンプルとして用いた。その他の漢方薬も同様に調製し、濃縮物の収量は、防風通聖散（BTS）7.8 g、白虎化人參湯（BKNT）3.3 g、腸癰湯（CYT）2.2 g、五苓散（GRS）2.5 g、葛根加朮附湯（KKJT）5.5 g、荊芥連翹湯（KRT）7.7 g、香蘇散（KS）3.1 g、芎歸膠艾湯（KKT）7.4 g、人參養榮湯（NYT）10.1 g、苓桂朮甘湯（RJT）1.5 g、四物湯（SIT）5.8 g、疎経活血湯（SKT）8.7 g、桃核承気湯（TJT）2.9 g、薏苡附子敗醬散（YBHS）0.7 g、抑肝散（YKS）4.9 g であった。

2-1-2-2 細胞培養

Neuro2a 細胞は旭川医科大学の林要喜知教授より譲与を受けた。Neuro2a 細胞は 37°C、5% CO₂ の条件下で 10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、ペニシリン（100 U/mL）、ストレプトマイシン（100 µg/mL）を含むダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）で培養した。ERK 活性化作用の評価には Neuro2a 細胞を 24 ウェルプレートに 1 × 10⁵ 細胞ずつ、神経突起伸展作用の評価には 24 ウェルプレートに 1 × 10³ 細胞ずつ、それぞれ播種し 24 時間培養した。その後 2% FCS を含む培地に交換し、24 時間後に実験に供した (Furukawa et al., 2012b)。漢方薬抽出物は 2% FCS-DMEM に溶解した。陽性対照として、

N⁶,2'-0-dibutyryladenine 3',5'-cyclic monophosphate (dbcAMP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) をリン酸緩衝液 (phosphate buffered-saline; PBS)に溶解し、用いた。

Table 2. Crude drugs used in the present study

Crude drugs	Botanical origin	Company	Lot number
Achyranthes root	<i>Achyranthes bidentata</i> Blune (Amaranthaceae)	Uchida-Wakanyaku	B420143
Alisma rhizome	<i>Alisma orientale</i> Juzepczuk (Alismataceae)	Uchida-Wakanyaku	8A51153
Aluminum silicate hydrate with silicon dioxide		Uchida-Wakanyaku	90G0109
Anemarrhena rhizome	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge (Liliaceae)	Uchida-Wakanyaku	B6T0307
Angelica Dahurica root	<i>Angelica dahurica</i> Bentham et Hooker (Umbelliferae)	Uchida-Wakanyaku	99F0509
Artemisia leaf	<i>Artemisia princeps</i> Pampanini (Compositae)	Uchida-Wakanyaku	043021
Astragalus root	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge (Leguminosae)	Uchida-Wakanyaku	7750014
Atractylodes rhizome	<i>Atractylodes japonica</i> Koizumi (Compositae)	Uchida-Wakanyaku	9900510
Benincasa seed	<i>Benincasa cerifera</i> Savi (Cucurbitaceae)	Uchida-Wakanyaku	C6A0316
Brown rice	<i>Oryza sativa</i> Linné (Gramineae)	Uchida-Wakanyaku	75G0139
Bupleurum root	<i>Bupleurum falcatum</i> Linné (Umbelliferae)	Uchida-Wakanyaku	B6T1101
Cinnamon bark	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume (Lauraceae)	Uchida-Wakanyaku	D2T0129
Citrus unshiu peel	<i>Citrus unshiu</i> Markovich (Rutaceae)	Uchida-Wakanyaku	99S0312
Clematis root	<i>Clematis chinensis</i> Osbeck (Ranunculaceae)	Uchida-Wakanyaku	B850003
Cnidium rhizome	<i>Cnidium officinale</i> Makino (Umbelliferae)	Uchida-Wakanyaku	9AG0233
Coptis rhizome	<i>Coptis japonica</i> Makino (Ranunculaceae)	Uchida-Wakanyaku	75G0018
Cyperus rhizome	<i>Cyperus rotundus</i> Linné (Cyperaceae)	Uchida-Wakanyaku	9950138
Donkey glue		Uchida-Wakanyaku	9610001
Ephedra herb	<i>Ephedra sinica</i> Stapf (Ephedraceae)	Tochimoto Tenkaido	0011715003
Forsythia fruit	<i>Forsythia suspensa</i> Vahl (Oleaceae)	Uchida-Wakanyaku	9AJ0805
Gardenia fruit	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis (Rubiaceae)	Uchida-Wakanyaku	B6E0206
Ginger	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae)	Uchida-Wakanyaku	B2L0227
Ginseng	<i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer (Araliaceae)	Uchida-Wakanyaku	D2H0407
Glycyrrhiza	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer or <i>G. glabra</i> Linné (Leguminosae)	Uchida-Wakanyaku	B7E0114
Gypsum		Uchida-Wakanyaku	9010231
Immature orange	<i>Citrus aurantium</i> Linne var. daidai Makino (Rutaceae)	Uchida-Wakanyaku	9BA0118
Japanese angelica root	<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa (Umbelliferae)	Uchida-Wakanyaku	C100318
Japanese gentian	<i>Gentiana scabra</i> Bunge (Gentianaceae)	Uchida-Wakanyaku	9010803
Jujube	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. inermis Rehder (Rhamnaceae)	Uchida-Wakanyaku	C100302
Jujube seed	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller (Rhamnaceae)	Uchida-Wakanyaku	0290210
Mentha herb	<i>Mentha arvensis</i> Linné var. piperascens Malinvaud (Labiatae)	Uchida-Wakanyaku	90L504
Moutan bark	<i>Paeonia suffruticosa</i> Anderews (Paeoniaceae)	Uchida-Wakanyaku	9201260
Notopterygium	<i>Notopterygium incisum</i> Ting ex H.T. Chang or <i>N. forbesii</i> Boissieu (Umbelliferae)	Uchida-Wakanyaku	C1J0122
Patrinia root	<i>Patrinia scabiosifolia</i> Fisch. ex Trevir. (Valerianaceae)	Uchida-Wakanyaku	D2N3549
Peach kernel	<i>Prunus persica</i> Batsch (Rosaceae)	Tochimoto Tenkaido	008113001
Peony root	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas (Paeoniaceae)	Uchida-Wakanyaku	94J1110
Perilla herb	<i>Perilla frutescens</i> Britton var. acuta Kudo (Labiatae)	Uchida-Wakanyaku	0170242
Phellodendron bark	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht or <i>P. chinense</i> Schneider (Rutaceae)	Uchida-Wakanyaku	362122
Platycodon root	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle (Campanulaceae)	Uchida-Wakanyaku	01C0115
Polygala root	<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow (Polygalaceae)	Uchida-Wakanyaku	75L0019
Polyporus sclerotium	<i>Polyporus umbellatus</i> Fries (Polyporaceae)	Uchida-Wakanyaku	9201157
Poria sclerotium	<i>Poria cocos</i> Wolf (Polyporaceae)	Uchida-Wakanyaku	90J0513
Processed aconite root	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux of <i>A. japonicum</i> Thunberg (Ranunculaceae)	Uchida-Wakanyaku	9BR0519
Pueraria root	<i>Pueraria lobata</i> Willd Ohwi (Leguminosae)	Uchida-Wakanyaku	B0M0108
Rehmannia root	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. purpurea Makino (Scrophulariaceae)	Uchida-Wakanyaku	9B50212
Rhubarb	<i>Rheum palmatum</i> Linné, <i>R. tanguticum</i> Maximowicz, <i>R. officinale</i> Baillon, or <i>R. coreanum</i> Nakai (Polygonaceae)	Uchida-Wakanyaku	362125
Saposhnikovia root	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin (Umbelliferae)	Uchida-Wakanyaku	B6J0518
Schizonepeta spike	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briquet (Labiatae)	Uchida-Wakanyaku	97S0128
Schisandra fruit	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon (Schisandraceae)	Uchida-Wakanyaku	98T0147
Scutellaria root	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi (Labiatae)	Uchida-Wakanyaku	78E0015
Sinomenium stem	<i>Sinomenium acutum</i> Rehder et Wilson (Menispermaceae)	Uchida-Wakanyaku	04L0516
Uncaria hook	<i>Uncaria rhynchophylla</i> (Rubiaceae)	Uchida-Wakanyaku	9650310

2-1-2-3 ウェスタンブロット

漢方薬抽出物は終濃度 1.0 mg/mL になるように培地に添加し、30 分間反応させた。サンプルと反応後の細胞は、滅菌した氷冷 PBS で 2 回洗浄した後 1.5 mL チューブに回収し、1-1-2-8 に記載した RIPA 緩衝液で溶解した。得られたタンパク抽出液（タンパク量 30 μ g）を用いて、1-1-2-8 に記載したウェスタンブロット法を行った。用いた 1 次抗体は、抗 ERK1/2 抗体（ウサギ）（希釈率 1:2500; Millipore, Billerica, MA, USA）、抗リン酸化 ERK1/2 (p-ERK) 抗体（Thr202/Tyr204）（ウサギ）（1:1000; Cell Signaling, Woburn, MA, USA）、2 次抗体は、西洋ワサビペルオキシターゼ結合抗ウサギ IgG（希釈率 1:2500（p-ERK の場合）または 1:5000（ERK の場合）; Cell signaling）である。免疫反応性バンドは ECL-prime（GE Healthcare, Buckinghamshire, Little Chalfont, UK）を用いて視覚化し、LAS-3000（フジフィルム、東京）を用いて撮影した。バンド強度は Image J（NIH, Bethesda, Rockville, MD, USA）を用いて定量した。

2-1-2-4 神経突起伸展作用の評価

漢方薬抽出物は終濃度 20 μ g/mL あるいは 100 μ g/mL になるように添加し、72 時間反応させた。細胞の撮影は、顕微鏡用 USB 接続デジタルカメラ（HDCE-20C; アズワン、大阪）を接続した位相差顕微鏡（IMT-2; オリンパス、東京）を用いて行った。1 ウェル当たり 4 視野で撮影し、1 視野当たり 10 個の細胞の突起伸展の平均をその視野の値とした。すなわち、1 ウェル当たりの n 数を 4 とした。神経突起伸展は細胞体を中心として伸展している突起全ての長さの合計を 1 つの細胞の突起の長さ（ μ m）と定義した。突起の長さは Image J（NIH）を用いて計測した。

2-1-2-5 統計学的手法

それぞれの群のデータは平均値±標準誤差 (SEM) として表した。群間における有意差は、Student's *t*-test および Dunnett's test を用いて算出した。統計ソフトは Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありと定義した。

2-1-3 結果

2-1-3-1 Neuro2a 細胞における ERK2 活性化作用

ERK は分子量 44kDa の ERK1 と 42kDa の ERK2 から成るが、特に ERK2 が CNS において記憶や神経新生に関わっているとされる (Samuels et al., 2008)。また、ERK の活性化はリン酸化されることである。そこで、ERK 活性化の評価は、リン酸化 ERK2 (p-ERK2) と総 ERK2 の比を求めることで行った。その結果、無処理群 (CON) に対して 5 種類の漢方薬 (NYT、SAT、SIT、SKT、TJT) において有意にその比が高いこと、すなわち ERK2 が活性化されることが明らかとなった (Figure 19)。

2-1-3-2 Neuro2a 細胞に対する神経突起伸展作用

ERK2 活性化作用を有する 5 種類の漢方薬 (NYT、SAT、SIT、SKT、TJT) について Neuro2a 細胞に対する神経突起伸展作用を検討した。その結果、Figure 20 に示すように、陽性対照である dbcAMP 存在下で 72 時間培養すると無処理群 (None) に比べて著しく (** $p < 0.01$) 神経突起が伸展した。各種漢方薬 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ あるいは 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下で 72 時間培養した場合、None に対して SAT、SKT、TJT が有意な ($^s p < 0.05$, $^{ss} p < 0.01$) 神経突起伸展作用を示した。特に SAT の神経突起伸展作用が最も強かった (Figure 20A)。

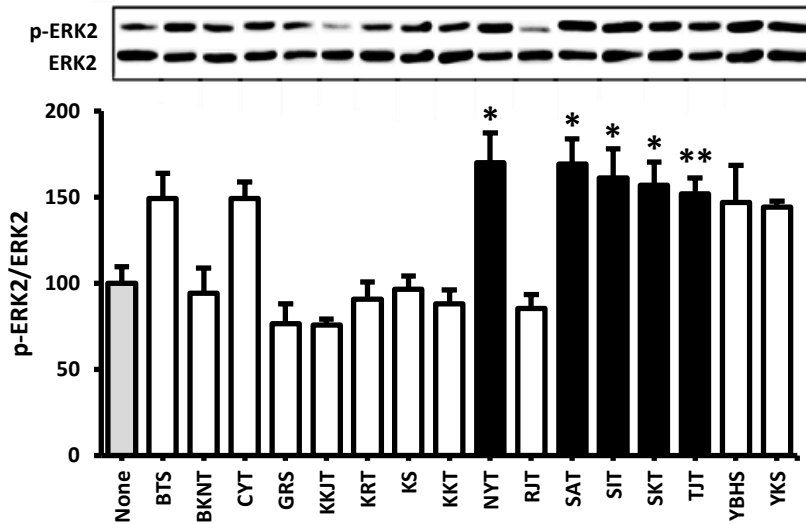


Figure 19. Effects of Kampo medicine extracts on the phosphorylation of ERK2 in Neuro2a cells. Neuro2a cells were treated for 30 min with each Kampo medicine extract (1.0 mg/mL). The density ratio of p-ERK2 to total ERK2 in untreated cultures (None) was expressed as 100% arbitrary units. Results are presented as the mean \pm SEM (n = 4 different cultures). Symbols show significant differences compared with None groups (* $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$, Dunnett's test).

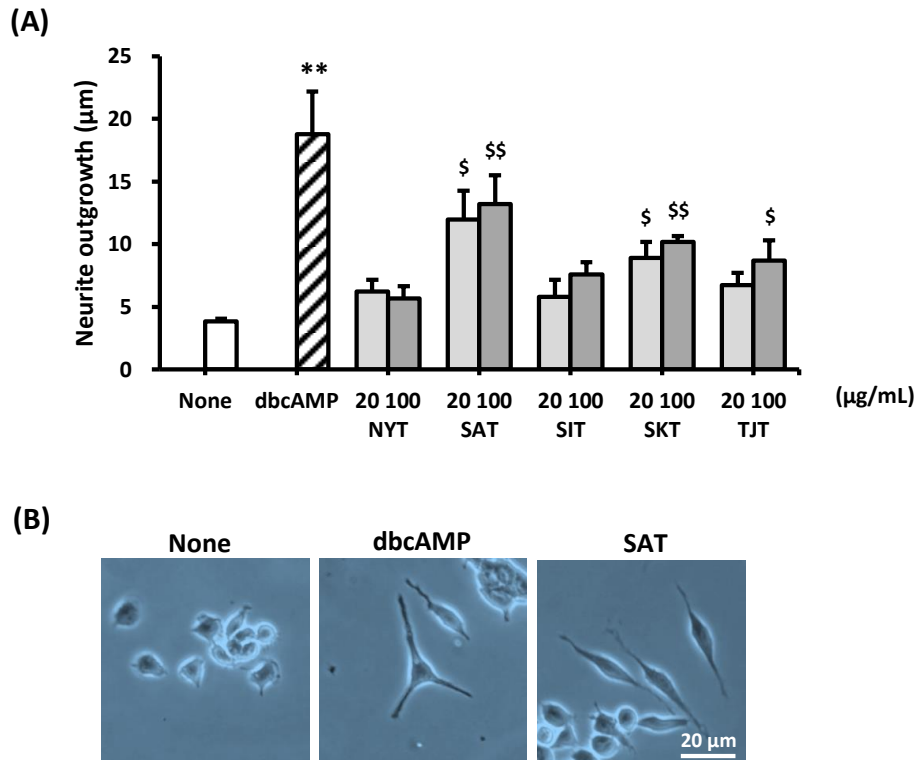


Figure 20. Effects of Kampo medicine extracts and dbcAMP on neurite outgrowth in Neuro2a cells. Neuro2a cells were treated for 72 h with each Kampo medicine extract (20 or 100 μ g/mL) or dbcAMP (5 mM). (A) Each column represents the mean of the total length of neurites \pm SEM (n = 4). Symbols show significant differences compared with None groups (** $p < 0.01$, Student's *t*-test) or dbcAMP group ($^{\$}$ $p < 0.05$ or $^{\$\$}$ $p < 0.01$, Dunnett's test). (B) Representative photomicrographs of none, dbcAMP and SAT groups are shown.

2-1-4 考察

本研究では駆瘀血作用を有する漢方薬の中から、CNS に作用する漢方薬を探索する目的で、Neuro2a 細胞を用いて、ERK2 活性化作用と神経突起伸展作用を指標とした *in vitro* スクリーニングを行った。その結果、NYT、SAT、SIT、SKT、TJT の 5 つの漢方薬が ERK2 活性化作用を示すこと (Figure 19)、その内 SAT、SKT、TJT が神経突起伸展作用を示すこと (Figure 20A) が明らかとなった。ERK2 活性化作用と神経突起伸展作用を示した SAT については、少なくとも ERK2 の活性化が神経活性化作用に関与している可能性が高いと考え、第 2 節において SAT の作用を *in vivo* で詳細に解析することとした。なお、最も強い ERK2 活性化作用を示したのは NYT であったが、神経突起伸展作用は示さなかったことから、NYT の ERK2 活性化作用は神経突起伸展作用の間に直接的な相関性はないものと考えられる。ERK2 の活性化は記憶や神経活性に関与する他に、外部からの刺激や炎症など様々な反応によって活性化するため、NYT の ERK2 活性化作用は神経活性以外に起因するものと推測される。

第 2 節 酸棗仁湯の脳由来神経栄養因子誘導を介した精神神経疾患

改善効果の検討

2-2-1 緒言

酸棗仁湯 (sansoninto; SAT) は不眠症などに用いられる漢方薬であるが、精神神経疾患に対する効果は報告されていない。第 1 節の研究において、SAT が中枢神経系 (central nervous system; CNS) において何らかの効果を示す可能性があることを見出したことから、本節では SAT の精神神経疾患に対する効果について *in vivo* で検討することにした。

SAT は、第 1 節で明らかにしたように、細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) 2 活性化作用および神経突起伸展作用を有する漢方薬として見出したものである。ERK2 は脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 産生に関与するシグナル伝達因子の 1 つであり、ERK2 の活性化を介して BDNF 発現増加作用を有する化合物はうつ病、統合失調症あるいは認知障害の治療薬候補となりうる可能性が示唆されている (Yu et al., 2011)。そこで SAT の 1) 抗うつ作用の検討、2) MK-801 誘発性統合失調症陽性様症状に対する効果の検討、3) MK-801 誘発性短期作業記憶障害に対する効果の検討を行った。

うつ症状に対する効果は、強制水泳試験 (forced swim test; FST) で評価した。抗うつ効果には海馬組織における BDNF 発現との関連性が示唆されており (BDNF 仮説)、FST 後に海馬組織における BDNF 発現への影響についてウエスタンブロット法を用いて解析した。MK-801 (グルタミン酸 NMDA 受容体遮断薬) により誘発される統合失調症陽性様症状 (行動過多) および短期作業記憶障害に対する効果は、それぞれオープンフィールド試験 (open field test; OFT) と Y 字迷路試験 (Y-maze test; YMT) を用いて評価した。NMDA

受容体下流にはカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase; CaMK) II や ERK2、cAMP 応答要素結合タンパク質 (cAMP response element-binding protein; CREB) を活性化する経路が存在しており、これらは記憶や学習に重要な役割を果たしている。そこで、これらの細胞内シグナル伝達物質に及ぼす影響についてもウエスタンブロット法を用いて解析した。

2-2-2 材料と方法

2-2-2-1 実験動物

ICR マウス (雄性、5 週齢) は 1-1-2-1 と同様、日本 SLC 株式会社 (浜松) より購入、飼育した。すべての動物実験は松山大学動物実験委員会による動物実験実施規程に準じて行った。

2-2-2-2 サンプルの調製及び投与

SAT は、マウスの飲水である水道水に懸濁し、1.0 g/kg を経口 (p.o.) 投与した (SAT 投与群; SAT)。対照群 (CON) には、水道水を p.o.投与した。MK-801 ((+)-MK-801 hydrogen maleate; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は生理食塩水にとかし、腹腔内 (i.p.) 投与した (0.2 mg/kg)。なお、この研究で使用した SAT の HPLC プロフィールを補足資料の Figure 1S に示す。

2-2-2-3 強制水泳試験

強制水泳試験 (FST) では、水 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) を張ったプラスチック製シリンダー (内径 18 cm × 高さ 27 cm) の中央にマウスを配置して 6 分間水泳させ、不動時間を ANY-maze Video tracking system (Stoelting) を用いて記録することにより解析した。

2-2-2-4 オープンフィールド試験

オープンフィールド試験 (OFT) では、マウスを OFT 装置 (W70 × D70 × H50 cm) の中央に配置し、10 分間の探索行動を ANY-maze Video tracking system (Stoelting) で撮影し、総移動距離を求めることで解析した (Okuyama et al., 2013)。

2-2-2-5 Y 字迷路試験

Y 字迷路試験 (YMT) とは、3 つのアーム (W35 × D8.5 × H15 cm) が 120° の角度で接続された装置の 1 つのアームの先端にマウスを配置し、8 分間自由に探索行動させ、自発的に異なるアームに入る性質 (交替行動) を利用した試験方法で、交替行動率を ANY-maze Video tracking system (Stoelting) を用いて解析した。

$$\text{交替行動率 (\%)} = \frac{\text{交替行動数}}{(\text{総アーム侵入回数} - 2)} \times 100$$

2-2-2-6 ウェスタンブロット

各行動試験直後に海馬組織を摘出し、ウェスタンブロットは 1-1-2-8 に記載した方法と同様に行った。用いた 1 次抗体は、抗 ERK1/2 抗体 (ウサギ) (希釈率 1:2500; Millipore, Billerica, MA, USA)、抗リン酸化 ERK (p-ERK) (Thr202/Tyr204) 抗体 (ウサギ) (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、抗 CREB 抗体 (ウサギ) (1:2500; Cell Signaling)、抗リン酸化 CREB (p-CREB) 抗体 (ウサギ) (1:1000; Cell Signaling)、抗 CaMK II 抗体 (ウサギ) (1:1000; Sigma-Aldrich)、抗リン酸化 CaMK (p-CaMK) II 抗体 (ウサギ) (1:1000; Sigma-Aldrich)、2 次抗体は、西洋ワサビペルオキシターゼ結合抗ウサギ IgG (希釈率 1:2500 (p-ERK, p-CREB, p-CaMKII, CaMKII の場合) または 1:5000 (ERK, CREB の場合); Cell signaling) である。

2-2-2-7 統計学的手法

それぞれの群のデータは平均値±標準誤差 (SEM) として表した。群間における有意差は、Student's *t*-test および Dunnett's test を用いて算出した。統計ソフトは Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありと定義した。

2-2-3 結果

2-2-3-1 SAT の抗うつ様効果の検討

7日間 SAT を投与したマウス (SAT 群) あるいは水道水を投与したマウス (CON 群) のうつ様症状は、FST で検討した。逃避不可能な水槽内で強制水泳を負荷されたマウスは、逃避行動の後にやがて水面上に頭だけだして浮いた状態 (不動行動) となり、一定時間内での不動行動持続時間は、抑うつ行動として評価することができる (Porsolt et al., 1977)。Figure 21 に示すように、FST における不動時間は、CON 群 (233.9 ± 7.0 秒) に比べ、SAT 群 (165.1 ± 20.6 秒) では有意に ($*p < 0.05$) 短縮された。一方、うつ病態の指標の 1 つに体重増加の抑制があるが (Zhao et al., 2008)、CON 群と SAT 群の群間における体重変化に差は認められなかった (データは示さず)。

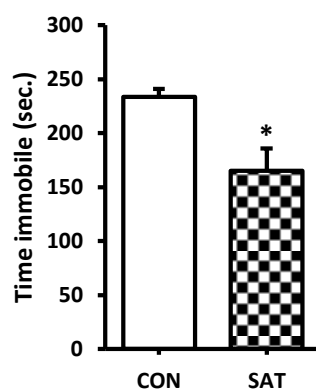


Figure 21. Effects of SAT on behavior in the forced swim test.

The test was performed after the daily p.o. administration of SAT (1.0 g/kg/day) for 7 days. Values represents the mean of the immobility time \pm SEM ($n = 8$). Symbols show significant differences compared with CON groups ($*p < 0.05$, Student's *t*-test).

2-2-3-2 SAT が海馬 BDNF 発現に及ぼす影響

FST 後にマウスの海馬組織を摘出し、BDNF 発現に対する影響をウエスタンブロット法を用いて解析した。BDNF 発現は、成熟型 BDNF (m-BDNF) と前駆体 BDNF (pro-BDNF) の比を算出することで解析した。その結果、CON 群 ($100.0 \pm 1.9\%$) に対して SAT 群 ($123.7 \pm 4.2\%$) では有意に ($*** p < 0.001$) BDNF 発現が増加していた (Figure 22)。

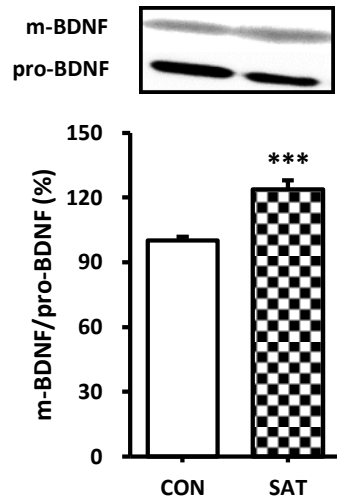


Figure 22. Effects of the administration of SAT for 7 days on the expression of BDNF in the mouse hippocampus.

The density ratio of mature BDNF (m-BDNF) to precursor BDNF (pro-BDNF) in the vehicle-treated group (CON) was expressed as 100% arbitrary units. Results are shown as the mean \pm SEM ($n = 8$). Symbols show significant differences compared with CON groups ($*** p < 0.001$, Student's t -test).

2-2-3-3 SAT が統合失調症陽性様症状に及ぼす影響

海馬組織における BDNF 発現の低下は神経細胞の活動に影響し、正常な神経ネットワークを障害することで様々な CNS の疾患の発症に関与する (Angelucci et al., 2005)。特に、腹側海馬における神経細胞活動の低下はグルタミン酸の過剰放出を招き、ドーパミン系の過活動を引き起こすことで統合失調症陽性様症状を誘発する (Stahl., 2013)。そこで、MK-801 を用いて、統合失調症陽性様症状モデルマウスを作成し、SAT が行動障害に及ぼす影響について OFT および YMT で解析した。

まず、SAT の単回投与が行動学的変化に及ぼす影響について OFT で検討した。OFT は、新奇環境（オープンフィールド）下での自発的な活動性や不安様行動などを測定するテストである。対照群のマウス（CON 群）には水道水を、SAT 投与群のマウス（SAT 群）には SAT (1 g/kg) をそれぞれ p.o.投与し、30 分後に OFT 装置において総移動距離を計測した。その結果、SAT を単回投与しても総移動距離に影響しないことが確認された (Figure 23A)。

次に、MK-801 誘発統合失調症陽性様症状を呈したモデルマウスに及ぼす SAT の影響を OFT で検討した。対照群のマウス（CON 群）と MK-801 投与群のマウス（MK-801 群）には OFT の 60 分前に水道水を p.o.投与した。SAT 投与群のマウス（MK-801+SAT 群）には OFT の 60 分前に SAT (1 g/kg) を p.o.投与した。さらに、MK-801 群および SAT+MK-801 群のマウスには OFT の 30 分前に MK-801 (0.2 mg/kg) を、CON 群のマウスには生理食塩水を i.p.投与した。マウスの総移動距離を計測した結果、MK-801 群の総移動距離 (84.2 ± 5.8 m) は CON 群 (55.0 ± 4.5 m) に対して長かった。一方、MK-801+SAT 群の総移動距離 (68.6 ± 10.2 m) は MK-801 投与群より有意ではないが短く、SAT 投与は MK-801 により誘発される異常行動（過活動）を抑制する傾向を示すことが明らかになった (Figure 23B)。

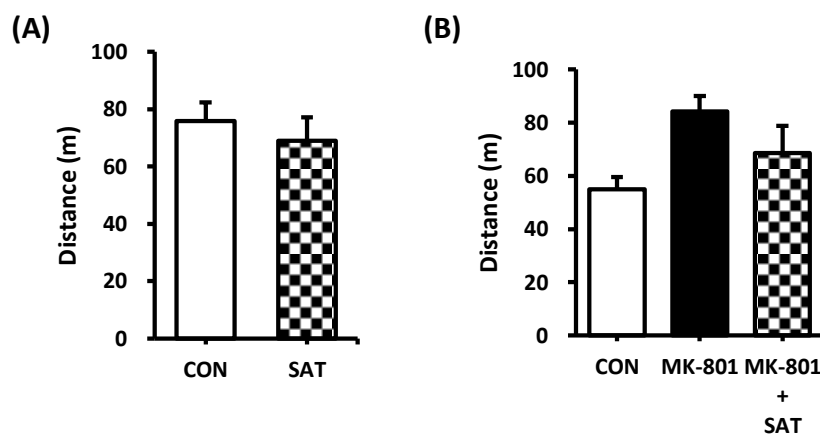


Figure 23. Effects of SAT on spontaneous behavior and MK-801-induced schizophrenia positive symptom-like behavior in the open field test.

SAT (1.0 g / kg) was p.o. administrated to mice 1 h before the test and MK-801 (0.2 mg / kg) was i.p. injected into mice 30 min before the test. (A) The result of distance which treatment with SAT. (B) The result of distance which treatment with MK-801 or MK-801 + SAT. Values represent the mean of the percentage of alternation behaviors \pm SEM (n = 8).

2-2-3-4 SAT の MK-801 誘発性短期記憶障害に対する効果

MK-801 の i.p.投与は統合失調症陽性様症状だけでなく短期記憶障害を引き起こす (Okuyama et al., 2014)。そこで次に、MK-801 誘発統合失調症陽性様症状モデルマウスに及ぼす SAT の影響を YMT で解析した。YMT は空間作業記憶 (短期記憶) を測定する試験法で、3 回連続して異なるアームに侵入した回数の割合 (交替行動率) を短期記憶の指標とする。

OFT の場合と同様に、SAT の p.o.投与は YMT の 60 分前、MK-801 の i.p.投与は YMT の 30 分前とした。結果を Figure 24 に示すが、CON 群の交替行動率 ($66.5 \pm 3.1\%$) に対して MK-801 群の交替行動率 ($45.3 \pm 2.3\%$) は有意に ($**p < 0.01$) 低かった。一方、MK-801 + SAT 群の交替行動率 ($52.8 \pm 4.5\%$) は MK-801 群より高く、SAT には MK-801 により誘発される短期記憶障害を、有意ではないが抑制する作用があることが明らかになった。

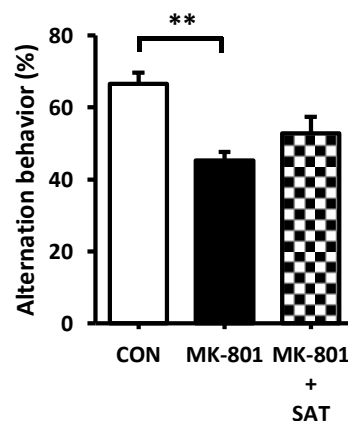


Figure 24. Effects of SAT extract on MK-801-induced spontaneous alternation behavior impairments in the Y-maze test.

SAT (1.0 g/kg) was p.o. administrated to mice 1 h before the test and MK-801 (0.2 mg/kg) was i.p. injected into mice 30 min before the test. The result of alternation behavior which treatment with MK-801 or MK-801 + SAT. Values represent the mean of the percentage of alternation behaviors \pm SEM (n = 8). Symbols show significant differences compared with MK-801 groups ($** p < 0.01$, Dunnett's test).

2-2-3-5 SAT の NMDA 受容体下流シグナル伝達に及ぼす影響

NMDA 受容体の下流にあるシグナル伝達経路は認知機能や記憶の形成に重要な役割を果たしている (Atkins et al., 1998)。前述したように、我々は CNS における ERK の活性化

作用に焦点を当て実験を進めてきた。そこで、SAT が NMDA 受容体下流にある ERK2 のリン酸化に及ぼす影響についてウエスタンブロット法を用いて解析した。その結果、p-ERK2 の発現は MK-801 によって減少するが、SAT はこれを有意ではないが ($p=0.1$) 抑制することが明らかになった (Figure 25A)。

CaMKII は NMDA 受容体の下流に存在し、神経可塑性に重要なリン酸化酵素の 1 つである (Lučić et al., 2008)。そこで、CaMKII リン酸化体 (p-CaMKII) の発現に対する SAT の効果についても解析した。その結果、p-CaMKII の発現は MK-801 によって有意に ($*p < 0.05$) 減少し、SAT は MK-801 によって引き起こされる p-CaMKII 発現の減少を有意に ($*p < 0.05$) 抑制した。

核内転写因子である CREB のリン酸化は、LTP の形成に重要であり、CaMKII によってリン酸化が促進される (Sun et al., 1994)。そこで、CREB リン酸化体 (p-CREB) の発現に対する SAT の効果についてウエスタンブロット法を用いて解析した。その結果、p-CREB の発現は MK-801 によってわずかに減少しており、SAT は MK-801 によって引き起こされる p-CREB 発現の減少を有意に ($**p < 0.01$) 上昇させた。

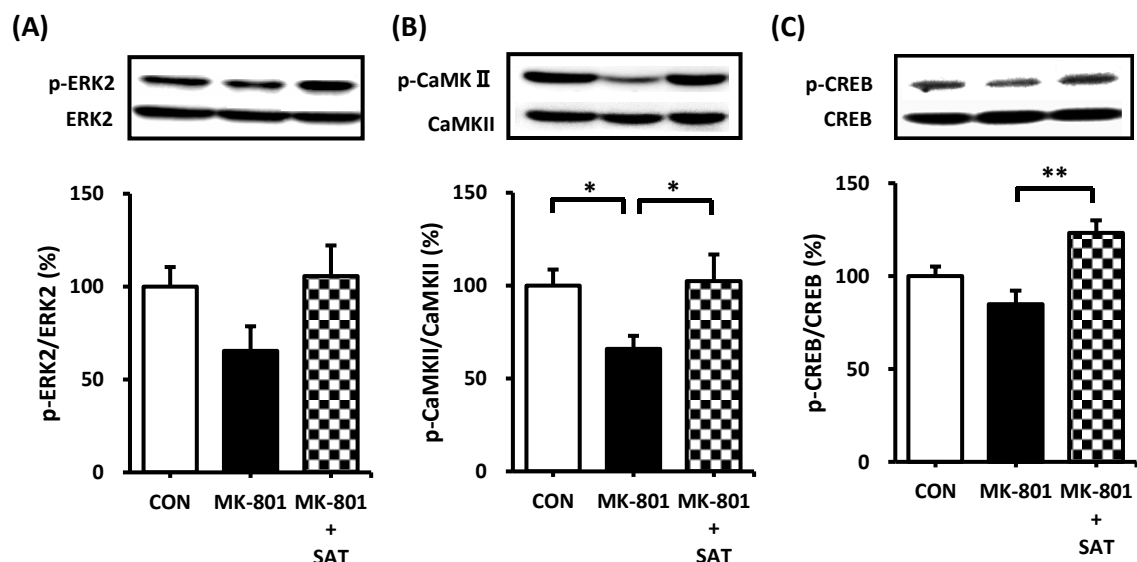


Figure 25. Effects of SAT extract on intracellular signaling in the MK-801-injected mouse hippocampus.

The density ratio of (A) phosphorylated ERK2 (p-ERK2) to total ERK2 (ERK2) (CON, $n = 7$; MK-801, $n = 6$; MK-801+SAT, $n = 6$), (B) phosphorylated CaMK II (p-CaMK II) to total CaMK II (CON, $n = 5$; MK-801, $n = 6$; MK-801+SAT, $n = 5$), and (C) phosphorylated CREB (p-CREB) to total CREB (CREB) (CON, $n = 5$; MK-801, $n = 5$; MK-801+SAT, $n = 5$) in the control group (CON) was expressed as 100% arbitrary units. Values represent the mean \pm SEM. Symbols show significant differences compared with MK-801 groups ($*p < 0.05$ or $**p < 0.01$, Dunnett's test).

2-2-4 考察

本研究では SAT の精神神経疾患に対する影響について検討した。その結果、SAT は抗うつ様作用、MK-801 誘発統合失調症陽性様症状改善作用、MK-801 誘発性短期作業記憶障害改善作用を有する可能性が示唆された。また、SAT は海馬組織における BDNF 発現増加作用を有することが明らかとなった。

SAT を 1 週間 p.o.投与した後に FST を行うと、SAT は不動時間を短縮し、海馬組織における BDNF 発現を増加させた (Figure 22)。すなわち、ERK2 の活性化、神経突起伸展を指標とした *in vitro* スクリーニングにより見出された SAT は、*in vivo* において BDNF 発現増加作用を有することが示された。MK-801 誘発統合失調症陽性様症状に対して SAT は異常行動 (過活動) を抑制する傾向を示した (Figure 23B)。また、SAT は MK-801 誘発性短期作業記憶障害モデルマウスの交替行動率低下を改善する傾向を示した (Figure 24)。SAT は主に不眠症患者に処方される漢方薬であり、その他衰弱、疲労、煩さ、イライラなどの神経症状を効果的に改善する漢方薬であるが、本研究の結果は SAT の新たな適応を見出した可能性を示唆するものである。特に、SAT は単回投与でも MK-801 誘発統合失調症陽性様症状および MK-801 誘発性短期作業記憶障害の改善傾向を示したという結果は、SAT が精神神経疾患に対して短期間且つドラスティックに作用する可能性を示唆する。漢方薬は長期間服用することではじめて効果を発揮し、その効果はマイルドであることが多いことを考え合わせると、SAT をこれらの疾患に適応した場合、その治療効果が速やかに現れることが期待できる。

MK-801 はグルタミン酸 NMDA 受容体の遮断薬であり、NMDA 受容体の下流には CaMK II または ERK-CREB 経路を含むいくつかのカスケードが存在し、主にタンパク質合成および神経可塑性を制御している (Li et al., 2015)。また、BDNF 受容体 (TrkB) の下流にも CaMK II または ERK-CREB 経路などのカスケードが存在している。そこで、ウエスタンブロット法を用いて、SAT が NMDA 受容体及び TrkB 受容体下流のシグナル伝達物質に及ぼす影響

について解析した。その結果、SAT は海馬における ERK2 のリン酸化をわずかに誘導すること、CaMK II および CREB のリン酸化を誘導すること、が明らかになった (Figure 25)。これらの結果は、SAT が海馬組織の NMDA 受容体の下流において記憶や学習に重要な役割を果たす ERK2 や CaMKII、CREB などの細胞内シグナル伝達を活性化することを、初めて示したものである。

近年、YKS の認知症周辺症状改善効果について多数報告されている (Iwasaki et al., 2005; Monji et al., 2009; Mizoguchi et al., 2017)。YKS の配合生薬は柴胡、釣藤鈎、蒼朮、茯苓、当归、川芎、甘草、SAT の配合生薬は酸棗仁、知母、茯苓、川芎、甘草であり、両者には 3 種類の生薬が共通に含まれている。漢方薬 *in vitro* スクリーニングにおいて YKS の ERK2 活性化作用は SAT よりも弱かった (Figure 19) ことから、SAT の ERK2 活性化作用には酸棗仁もしくは知母の関与が大きいと考えられる。酸棗仁には C-glycoside flavonoid である spinosin が含有されており、spinosin にはスコポラミン誘発性記憶障害の改善作用や海馬歯状回領域における神経新生促進作用が報告されている (Jung et al., 2014)。また、知母に含まれる timosaponin または timosaponin 代謝物の YY-23 が慢性ストレス負荷モデルラットにおいて抗うつ作用を示すことも報告されている (Zhang et al., 2016)。今後は SAT を構成する 5 生薬の作用について個々に検討していく予定である。

総合考察及び結論

本研究で得られた新知見を以下に示す。

本研究では、「3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone と酸棗仁湯の脳由来神経栄養因子産生促進作用が脳機能に及ぼす影響」に関する研究を行った。

第1章では、当研究室において候補化合物として見出していた柑橘果皮由来成分ヘプタメトキシフラボン (3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone; HMF) が抗うつ作用を示すことを明らかにし、その効果は BDNF 発現増加によることを示唆することができた。HMF の CNS における作用は、これまでに健忘症モデルマウス、脳虚血モデルマウスなどいくつかの病態モデル動物を用いて検討してきたが、その過程で、HMF は一過性全脳虚血マウスの海馬組織において虚血により引き起こされる神経細胞死を抑制し、この脳保護作用は BDNF 発現増加作用を介している可能性を示してきた (Okuyama et al., 2012; 2014; 2015)。海馬組織における BDNF 発現の減少はうつ病の発症に深く関与しているとの報告 (Martinowich et al., 2007; Duclot et al., 2015) と考え合わせ、コルチコステロン (corticosterone; CORT) 誘発性うつ病態様モデルマウスおよび予測不可能慢性緩和ストレス負荷 (chronic unpredictable mild stressed; CUMS) モデルマウスを用いて本研究に取り組んだが、その結果、予測通り HMF が BDNF 発現増加作用を介して、抗うつ効果を示すとの結果を得ることができた。さらに、HMF が抗うつ薬フルオキセチン (fluoxetine; FLX) とは異なる経路を介して BDNF 発現を増加させ、抗うつ効果を示す可能性を示したことは、HMF が新規抗うつ薬となる可能性を示唆するものといえる。

第2章では、「育薬」の観点から CNS の疾患に奏功する漢方薬の探索を行い、酸棗仁湯 (sansoninto; SAT) が候補化合物となり得ることを明らかにした。SAT は不眠症や神経症状に用いられる漢方薬であるが、その他の精神神経疾患に対する適応はない。本研究では様々な行動学的手法を用いて探索し、SAT が 1) 抗うつ様作用を示すこと、2) MK-801 誘

発統合失調症陽性様症状の改善傾向を示すこと、3) MK-801 誘発性短期記憶障害改善効果を示すこと、を明らかにするとともに、これらの作用には海馬組織における BDNF 発現増加作用が関与する可能性を見出した。

以上、本研究の結果より、柑橘果皮、特に河内晩柑果皮に多く含有される HMF、漢方薬である SAT が CNS における BDNF 発現を増加すること、うつ病など精神神経疾患の予防または治療に役立つ可能性を明らかにすることができた。これらの知見は、予防医学が重視される今後の医療において、新たな医療トレンドを築く礎となるものと考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行ならびに本論文の作成に際し、終始御懇篤なるご指導と御鞭撻を賜りました恩師 松山大学薬学部 薬理学研究室 古川 美子 教授に深甚なる謝意を表します。

終始変わらぬ御指導激励を賜りました 松山大学薬学部 薬理学研究室 中島 光業 教授 ならびに 奥山 聡 准教授に感謝いたします。

本研究の実施にあたり、オレンジ油より 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone の単離、LC/MS を用いたマウス脳内における HMF の定量解析ならびに酸棗仁湯をはじめとする漢方薬抽出物の調製をおこなっていただきました 松山大学薬学部 生薬学研究室 天倉 吉章 教授 ならびに 好村 守生 准教授 に感謝いたします。また、3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (合成品) を提供していただきました ウシオケミックス株式会社 の御厚意に深謝いたします。

マウス脳内における神経伝達物質の測定について特別なるご協力、および御助言を賜りました 中部大学 応用生物学部 食品栄養科学科 横越 英彦 教授 ならびに 名古屋経済大学 人間生活科学部 管理栄養学科 山田 貴史 准教授 に感謝いたします。

種々のご協力を頂きました松山大学薬学部薬理学研究室諸氏に心から感謝いたします。

大学院研究報告会にて、御助言を賜りました松山大学薬学部教員の皆様に心から御礼申し上げます。

なお、本研究の遂行にあたり、奨学金給付による経済的支援を賜りました 日本薬学会長井 記念薬学研究奨励 (Nagai Memorial Research Scholarship from the Pharmaceutical Society of Japan) に謝意を表します。

最後に、これまで私を支えてくれた家族ならびに友人に心より感謝いたします。

参考文献

Adachi M., Barrot M., Autry A.E., Theobald D., Monteggia L.M. (2008) Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. *Biol. Psychiatry*, **63(7)**, 642-649.

Amakura Y., Yoshimura M., Ouchi K., Okuyama S., Furukawa Y., Yoshida T. (2013) Characterization of constituents in the peel of citrus kawachiensis (Kawachibankan). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77(9)**, 1977-1980.

Angelucci F., Brene S., Mathe A.A. (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol. Psychiatry*, **10**, 345-352.

Arai Y.C.P., Yasui H., Isai H., Kawai T., Nishihara M., Sato J., Ikemoto T., Inoue S., Ushida T. (2014) The review of innovative integration of Kampo medicine and Western medicine as personalized medicine at the first multidisciplinary pain center in Japan. *EPMA J.*, **5(1)**, 10, doi: 10.1186/1878-5085-5-10.

Atkins C.M., Selcher J.C., Petraitis J.J., Trzaskos J.M., Sweatt J.D. (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat. Neurosci.*, **1(7)**, 602-609.

Bai F., Li X., Clay M., Lindstrom T., Skolnick P. (2001) Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **70(2)**, 187-192.

Banoujaafar H., Van Hoecke J., Mossiat C.M., Marie C. (2014) Brain BDNF levels elevation induced by physical training is reduced after unilateral common carotid artery occlusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34(10)**, 1681-1687.

Begley D.J. (2004) "Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease". Chap. 9, ed., by Sharma H.S., Westman J. Academic Press, Netherlands, pp, 83-97.

Bhogaonkar P.Y., Ahmad S.A. (2012) Pharmacognostic studies on *Xanthium Strumarium* L-A folk unani medicinal herb. *Biosci. Discov.*, **3(1)**, 101-106.

Castagné V., Moser P., Roux S., Porsolt R.D. (2010) Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **5(8)**, 1-14.

Charney D.S., Manji H.K. (2004) Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci. STKE*, **225(5)**, 1-11.

Dong Y., Cao A., Shi J., Yin P., Wang L., Ji G., Xie J., Wu D. (2014) Tangeretin, a citrus polymethoxyflavonoid, induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways. *Oncol. Rep.*, **31(4)**, 1788-1794.

Du Y., Dreyfus C.F. (2002) Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J. Neurosci. Res.*, **68(6)**, 647-654.

Duclot F., Kabbaj M. (2015) Epigenetic mechanisms underlying the role of brain-derived neurotrophic factor in depression and response to antidepressants. *J. Exp. Biol.*, **218(1)**, 21-31.

Duman R.S., Monteggia L.M. (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry*, **59(12)**, 1116-1127.

Duman R.S., Aghajanian G.K., Sanacora G., Krystal J.H. (2016) Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat. Med.*, **22(3)**, 238-249.

Endo M., Hori M., Ozaki H., Oikawa T., Hanawa T. (2014) Daikenchuto, a traditional Japanese herbal medicine, ameliorates postoperative ileus by anti-inflammatory action through nicotinic acetylcholine receptors. *J. Gastroenterol.*, **49(6)**, 1026-1039.

Furukawa Y., Okuyama S., Amakura Y., Watanabe S., Fukata T., Nakajima M., Yoshimura M., Yoshida T. (2012a) Isolation and characterization of activators of ERK/MAPK from citrus plants. *Int. J. Mol. Sci.*, **13(2)**, 1832-1845.

Furukawa Y., Watanabe S., Okuyama S., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Nakajima M. (2012b) Effect of citrus polymethoxyflavones on neurogenesis in neuroblastoma cells. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, **2(5)**, 432-437.

Giridharan V.V., Thandavarayan R.A., Konishi T., Quevedo J. (2017) "Japanese Kampo medicines for the treatment of common diseases: focus on inflammation". Chap. 9, ed, by Arumugan S., Watanabe K. Academic Press., Netherlands, pp, 75-88.

Gourley S.L., Wu F.J., Taylor J.R. (2008a) Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1148(1)**, 509-514.

Gourley S.L., Wu F.J., Kiraly D.D., Ploski J.E., Kedves A.T., Duman R.S., Taylor J.R. (2008b) Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol. Psychiatry*, **63(4)**, 353-359.

Grande I., Fries G.R., Kunz M., Kapczinski F. (2010) The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. *Psychiatry Invest.*, **7(4)**, 243-250.

Greenberg M.E., Xu B., Lu B., Hempstead B.L. (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.*, **29(41)**, 12764-12767.

Gregus A., Wintink A.J., Davis A.C., Kalynchuk L.E. (2005) Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain Res.*, **156(1)**, 105-114.

Hollis F., Kabbaj M. (2014) Social defeat as an animal model for depression. *ILAR J.*, **55(2)**, 221-232.

Iwasaki K., Satoh-Nakagawa T., Maruyama M., Monma Y., Nemoto M., Tomita N., Tanji H., Fujiwara H., Seki T., Arai H., Sasaki H. (2005) A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-Gan San for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients. *J. Clin. Psychiatry*, **66(2)**, 248-252.

Jung I.H., Lee H.E., Park S.J., Ahn Y.J., Kwon G., Woo H., Lee S.Y., Kim J.S., Jo Y.W., Jang D.S., Kang S.S., Ryu J.H. (2004) Ameliorating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid, on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **120**, 88-94.

Kakiuchi A., Ito S., Okuyama S., Furukawa Y., Mizuma T. (2017) Human serum albumin binding of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid possessing a neuroprotective effect. *Chem-Bio. Informatics J.*, **17**, 103-109.

Kawai M., Hirano T., Higa S., Arimitsu J., Maruta M., Kuwahara Y., Ohkawara T., Hagihara K., Yamadori T., Shima Y., Ogata A., Kawase I., Tanaka T. (2007) Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol. Int.*, **56(2)**, 113-123.

Klausberger T., Somogyi P. (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, **321(5885)**, 53-57.

Kono T., Hata T., Morita S., Munemoto Y., Matsui T., Kojima H., Takemoto H., Fukunaga M., Nagata N., Shimada M., Sakamoto J., Mishima H. (2013) Goshajinkigan oxaliplatin neurotoxicity evaluation (GONE): a phase 2, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of goshajinkigan to prevent oxaliplatin-induced neuropathy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **72(6)**, 1283-1290.

Kusunoki H., Haruma K., Hata J., Ishii M., Kamada T., Yamashita N., Honda K., Inoue K., Imamura H., Manabe N., Shiotani A., Tsunoda T. (2010) Efficacy of rikkunshito, a traditional Japanese medicine (Kampo), in treating functional dyspepsia. *Intern. Med.*, **49(20)**, 2195-2202.

Lepack A.E., Fuchikami M., Dwyer J.M., Banasr M., Duman R.S. (2015) BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **18(1)**, 1-6.

Li J., Zhou Y., Liu B.B., Liu Q., Geng D., Weng L.J., Yi L.T. (2013) Nobiletin ameliorates the deficits in hippocampal BDNF, TrkB, and synapsin I induced by chronic unpredictable mild stress. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, 1-11.

Li J., Luo Y., Zhang R., Shi H., Zhu W., Shi J. (2015) Neuropeptide trefoil factor 3 reverses depressive-like behaviors by activation of BDNF-ERK-CREB signaling in olfactory bulbectomized rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **16(12)**, 28386-28400.

Li S., Pan M.H., Wang Z., Lambros T., Ho C.T. (2008) Biological activity, metabolism and separation of polymethoxyflavonoids from citrus peels. *Tree For. Sci. Biotechnol.*, **2**, 36-51.

Ligon B.L. (2004) Penicillin: its discovery and early development. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, **15(1)**, 52-57.

Liu D., Xie K., Yang X., Gu J., Ge L., Wang X., Wang Z. (2014) Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav. Brain Res.*, **264**, 9-16.

Lucki I., Dalvi A., Mayorga A.J. (2001) Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology*, **155(3)**, 315-322.

Lučić V., Greif G.J., Kennedy M.B. (2008) Detailed state model of CaMKII activation and autophosphorylation. *Eur. Biophys. J.*, **38(1)**, 83-98.

Maher P., Akaishi T., Abe K. (2006) Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103(44)**, 16568-16573.

Manthey J.A., Grohmann K., Montanari A., Ash K., Manthey C.L. (1999) Polymethoxylated flavones derived from citrus suppress tumor necrosis factor- α expression by human monocytes. *J. Nat. Prod.*, **62(3)**, 441-444.

Matias I., Buosi A.S., Gomes F.C.A. (2016) Functions of flavonoids in the central nervous system: astrocytes as targets for natural compounds. *Neurochem. Int.*, **95**, 85-91.

Mayer J.L., Klumpers L., Maslam S., De Kloet E.R., Joels M., Lucassen P.J. (2006) Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. *J. Neuroendocrinol.*, **18(8)**, 629-631.

Martinowich K., Manji H., Lu B. (2007) New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat. Neurosci.*, **10(9)**, 1089-1093.

Miyamoto N., Maki T., Shindo A., Liang A.C., Maeda M., Egawa N., Itoh K., Lo E.K., Lok J., Ihara M., Arai K. (2015) Astrocytes promote oligodendrogenesis after white matter damage via brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.*, **35(41)**, 14002-14008.

Mizoguchi K., Ikarashi Y. (2017) Cellular pharmacological effects of the traditional Japanese Kampo medicine yokukansan on brain cells. *Front. Pharmacol.*, **8**, 655.

Monji A., Takita M., Samejima T., Takaishi T., Hashimoto K., Matsunaga H., Oda M., Sumida Y., Mizoguchi Y., Kato T., Horikawa H., Kanba S. (2009) Effect of yokukansan on the behavioral and psychological symptoms of dementia in elderly patients with Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **33(2)**, 308-311.

Moschik E.C., Mercado C., Yoshino T., Matsuura K., Watanabe K. (2012) Usage and attitudes of physicians in Japan concerning traditional Japanese medicine (Kampo medicine): a descriptive evaluation of a representative questionnaire-based survey. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2012**, doi:10.1155/2012/139818.

Nakajima A., Ohizumi Y., Yamada K. (2014) Anti-dementia activity of nobiletin, a citrus flavonoid: a review of animal studies. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, **12(2)**, 75-82.

Newman D.J., Cragg G.M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **75(3)**, 311-335.

Numakawa T., Adachi N., Richards M., Chiba S., Kunugi H. (2013) Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system. *Neuroscience*, **239**, 157–172.

Oomen C.A., Mayer J.L., De Kloet E.R., Joëls M., Lucassen P.J. (2007) Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalizes the reduction in neurogenesis after chronic stress. *Eur. J. Neurosci.*, **26(12)**, 3395-3401.

Okabe Y., Shimada T., Horikawa T., Kinoshita K., Koyama K., Ichinose K., Aburada M., Takahashi K. (2014) Suppression of adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora*. *Phytomedicine*, **21(6)**, 800-806.

Okuyama S., Shimada N., Kaji M., Morita M., Miyoshi K., Minami S., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Watanabe S., Nakajima M., Furukawa F. (2012) Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice. *Neurosci. Lett.*, **528(2)**, 190-195.

Okuyama S., Fukata T., Nishigawa Y., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Nakajima M., Furukawa Y. (2013) Citrus flavonoid improves MK-801-induced locomotive hyperactivity: possible relevance to schizophrenia. *J. Funct. Food.*, **5(4)**, 2002-2006.

Okuyama S., Morita M., Miyoshi K., Nishigawa Y., Kaji M., Sawamoto A., Terugo T., Toyoda N., Makihata N., Amakura Y., Yoshimura M., Nakajima M., Furukawa Y. (2014) 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. *Neurochem. Int.*, **70**, 30-38.

Okuyama S., Morita M., Sawamoto A., Terugo T., Nakajima M., Furukawa Y. (2015) Edaravone enhances brain-derived neurotrophic factor production in the ischemic mouse brain. *Pharmaceuticals*, **8(2)**, 176-185.

Okuyama S., Miyazaki K., Yamada R., Amakura Y., Yoshimura M., Sawamoto A., Nakajima M., Furukawa Y. (2017) Permeation of polymethoxyflavones into the mouse brain and their effect on MK-801-induced locomotive hyperactivity. *Int. J. Mol. Sci.*, **18(3)**, 489, doi:10.3390/ijms18030489.

Paizanis E., Hamon M., Lanfumey L. (2007) Hippocampal neurogenesis, depressive disorders, and antidepressant therapy. *Neural Plast.*, **2007**, doi:10.1155/2007/73754.

Pariante C.M., Lightman S.L. (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.*, **31(9)**, 464-468.

Parkhurst C.N., Yang G., Ninan I., Savas J.N., Yates J.R., Lafaille J.J., Hempstead B.L., Littman D.R., Gan W.B. (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, **155(7)**, 1596-1609.

Patwardhan B., Warude D., Pushpangadan P., Bhatt N. (2005) Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2(4)**, 465-473.

Phillips H.S., Hains J.M., Armanini M., Laramée G.R., Johnson S.A., Winslow J.W. (1991) BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, **7(5)**, 695-702.

Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **229(2)**, 327-336.

Quesseveur G., David D.J., Gaillard M.C., Pla P., Wu M.V., Nguyen H.T., Nicols V., Auegan G., David I., Dranovsky A., Hantraye P., Hen P., Gardier A.M., Déglon N., Guiard B.P. (2013) BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl. Psychiatry*, **3(4)**, doi:10.1038/tp.2013.30.

Rossi C., Angelucci A., Costantin L., Braschi C., Mazzantini M., Babbini F., Fabbri M.E., Tessarollo L., Maffei L., Berardi N., Caleo M. (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.*, **24(7)**, 1850-1856.

Samuels I.S., Karlo J.C., Faruzzi A.N., Pickering K., Herrup K., Sweatt J.D., Saitta S.C., Landreth G.E. (2008) Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *J. Neurosci.*, **28(27)**, 6983-6995.

Sawamoto A., Okuyama S., Yamamoto K., Amakura Y., Yoshimura M., Nakajima M., Furukawa Y. (2016) 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, ameliorates corticosterone-induced depression-like behavior and restores brain-derived neurotrophic factor expression, neurogenesis, and neuroplasticity in the hippocampus. *Molecules*, **21(4)**, 541, doi:10.3390/molecules21040541.

Sawamoto A., Okuyama S., Amakura Y., Yoshimura M., Yamada T., Yokogoshi H., Nakajima M., Furukawa Y. (2017) 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone ameliorates depressive-like behavior and hippocampal neurochemical changes in chronic unpredictable mild stressed mice by regulating the brain-derived neurotrophic factor: requirement for ERK activation. *Int. J. Mol. Sci.*, **18(10)**, 2133, doi:10.3390/ijms18102133.

Seifert T., Brassard P., Wissenberg M., Rasmussen P., Nordby P., Stallknecht B., Adser H., Jakobsen A.H., Pilegaard H., Nielsen H.B., Secher N.H. (2010) Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **298(2)**, 372-377.

Shirayama Y., Chen A.C.H., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.*, **22(8)**, 3251-3261.

Solich J., Palach P., Budziszewska B., Dziedzicka-Wasylewska M. (2008) Effect of two behavioral tests on corticosterone level in plasma of mice lacking the noradrenaline transporter. *Pharmacol. Rep.*, **60(6)**, 1008.

Stahl S.M. (2013) "Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications", Cambridge University Press, pp, 93-146.

Sun P., Enslin H., Myung P.S., Maurer R.A. (1994) Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev.*, **8(21)**, 2527-2539.

Uchida N., Egashira N., Iwasaki K., Ishibashi A., Tashiro R., Nogami A., Manome N., Abe M., Takasaki K., Mishima K., Takata J., Oishi R., Nishimura R., Fujiwara M. (2009) Yokukansan inhibits social isolation-induced aggression and methamphetamine-induced hyperlocomotion in rodents. *Biol. Pharm. Bull.*, **32(3)**, 372-375.

Willner P., Towell A., Sampson D., Sophokleous S., Muscat R. (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, **93(3)**, 358-364.

Willner P. (2017) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol. Stress*, **6**, 78-93.

Wrann C.D., White J.P., Salogiannis J., Laznik-Bogoslavski D., Wu J., Ma D., Lin J.D., Greenberg M.E., Spiegelman B.M. (2013) Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. *Cell Metab.*, **18(5)**, 649-659.

Yamamoto M., Suzuki A., Hase T. (2008) Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **54(1)**, 95-98.

Ye Y., Wang G., Wang H., Wang X. (2011) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci. Lett.*, **503(1)**, 15-19.

Ying S.W., Futter M., Rosenblum K., Webber M.J., Hunt S.P., Bliss T.V., Bramham C.R. (2002) Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J. Neurosci.*, **22(5)**, 1532-1540.

Youdim K.A., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. (2004) Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic. Biol. Med.*, **37(11)**, 1683-1693.

Yu H., Chen Z.Y. (2011) The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol. Sin.*, **32(1)**, 3-11.

Zhang Y., Gu F., Chen J., Dong W. (2010) Chronic antidepressant administration alleviates frontal and hippocampal BDNF deficits in CUMS rat. *Brain Res.*, **1366**, 141-148.

Zhang L., Xu T., Wang S., Yu L., Liu D., Zhan R., Yu S.Y. (2012) Curcumin produces antidepressant effects via activating MAPK/ERK-dependent brain-derived neurotrophic factor expression in the amygdala of mice. *Behav. Brain Res.*, **235(1)**, 67-72.

Zhang Q., Guo F., Fu Z.W., Zhang B., Huang C.G., Li Y. (2016) Timosaponin derivative YY-23 acts as a non-competitive NMDA receptor antagonist and exerts a rapid antidepressant-like effect in mice. *Acta Pharmacol. Sin.*, **37(2)**, 166-176.

Zhao Y., Ma R., Shen J., Su H., Xing D., Du L. (2008) A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur. J. Pharmacol.*, **581(1)**, 113-120.

Zhao Y., Wang Z., Dai J., Chen L., Huang Y., Zhan Z. (2012) Beneficial effects of benzodiazepine diazepam on chronic stress-induced impairment of hippocampal structural plasticity and depression-like behavior in mice. *Behav. Brain Res.*, **228(2)**, 339-350.

塗谷睦生. (2015) アストロサイト-血管相互作用. *日本薬理学雑誌*, **145(6)**, 326-328.

辻稔, 宮川和也, 竹内智子, 武田弘志. (2007) 一般行動および抑うつ様行動の評価法. *日本薬理学雑誌*, **130(2)**, 97-104.

中野重行. (2008) 育薬をめぐって. *臨床薬理*, **39(3)**, 51-52.

主要論文目録

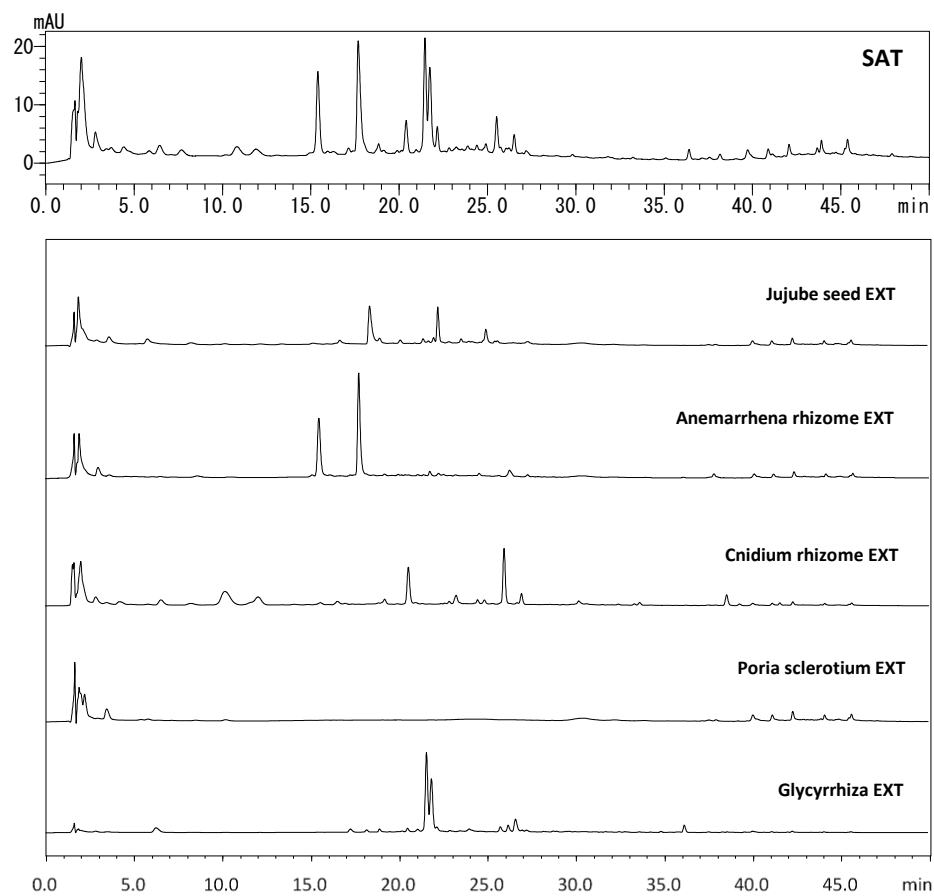
本学位論文内容は下記の発表論文による。

- (1) Sawamoto A., Okuyama S., Yamamoto K., Amakura Y., Yoshimura M., Nakajima M., Furukawa Y. (2016) 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, ameliorates corticosterone-induced depression-like behavior and restores brain-derived neurotrophic factor expression, neurogenesis, and neuroplasticity in the hippocampus. *Molecules*, **21(4)**, 541, doi:10.3390/molecules21040541.
- (2) Sawamoto A., Okuyama S., Amakura Y., Yoshimura M., Yamada T., Yokogoshi H., Nakajima M., Furukawa Y. (2017) 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone ameliorates depressive-like behavior and hippocampal neurochemical changes in chronic unpredictable mild stressed mice by regulating the brain-derived neurotrophic factor: requirement for ERK activation. *Int. J. Mol. Sci.*, **18(10)**, 2133, doi:10.3390/ijms18102133.
- (3) Sawamoto A., Okuyama S., Amakura Y., Yoshimura M., Nakajima M., Furukawa Y. (2018) Sansoninto as evidence-based remedial medicine for depression-like behavior. *J. Nat. Med.*, **72(1)**, 118-126.

補足資料

Sansoninto (SAT)

(A)



(B)

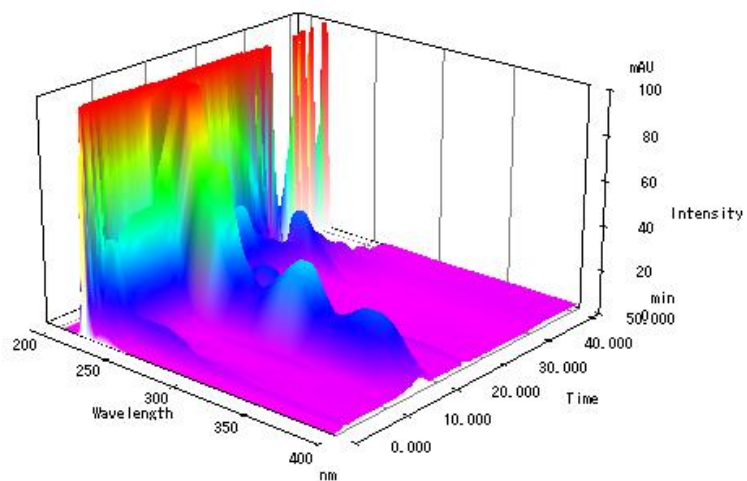


Figure 1S. HPLC chromatograms of Kampo medicine extracts used in the present study.

(a) HPLC chromatogram at 280 nm; (b) 3D-HPLC profile. HPLC conditions were as follows: column, L-column ODS (5 μ m, 150 \times 2.1 mm i.d.) (Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan); mobile phase, solvent A was 5% acetic acid and solvent B was an acetonitrile gradient: [0 \rightarrow 30 min (0 \rightarrow 50% B in A), 30 \rightarrow 35 min (50 \rightarrow 85% B in A), 35 \rightarrow 40 min (85% B in A), 40 \rightarrow 50 min (85 \rightarrow 100% B in A)]; injection volume, 2 μ L; column temperature, 40 $^{\circ}$ C; flow rate, 0.3 mL/min.

Each crude drug extract contained in sansoninto (SAT) was obtained as follows: The crude drug (50 g) was boiled in water (500 mL) for 60 min. After filtration, the decoction was evaporated *in vacuo*, and was then lyophilized to obtain the powder concentrated extract. The yields of each concentrated extract were as follows: jujube seed (2 g), anemarrhena rhizome (14.3 g), cnidium rhizome (10.3 g), poria sclerotium (16.3 g), and glycyrrhiza (10.8 g).

略語一覽

BBB	blood-brain barrier
BTS	bofutsushosan
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BKNT	byakkokaninjinto
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CREB	cAMP response element-binding protein
CNS	central nervous system
CYT	choyoto
CUMS	chronic unpredictable mild stressed
CORT	corticosterone
DMSO	dimethyl sulfoxide
DCX	doublecortin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fetal calf serum
FLX	fluoxetine
FST	forced swim test
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GRS	goreisan
HMF	3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone
HPLC	high performance liquid chromatography
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis
i.p.	intraperitoneal

KKJT	kakkonkajutsubuto
KRT	keigairengyoto
KS	kososan
KKT	kyukikyogaito
LTP	long-term potentiation
dbcAMP	N ⁶ ,2'-0-dibutyryladenine 3',5'-cyclic monophosphate
NeuN	neuronal nuclei
NOB	5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone
NYT	ninjinyoeito
OFT	open field test
PBS	phosphate buffered-saline
PEG	polyethylene glycol
PMF	polymethoxyflavone
p.o.	oral administration (per os)
QOL	quality of life
RJT	ryokeijutsukanto
SAT	sansoninto
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors
SIT	shimotsuto
SKT	sokeikakketsuto
s.c.	subcutaneously
TST	tail suspension test
TJT	tokakujokito
YMT	Y-maze test
YBHS	yokuibushihaisyosan

YKS

yokukansan