



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Luteolin ameliorates depression-like behaviors by suppressing ER stress in a mouse model of Alzheimer`s disease

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2022-11-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 他那 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/88089

氏名（本籍）	他 那	（中華人民共和国）
学位の種類	博士（再生医科学）	
学位授与番号	甲第1203号	
学位授与日付	令和4年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Luteolin ameliorates depression-like behaviors by suppressing ER stress in a mouse model of Alzheimer's disease	
審査委員	（主査）教授	下畑 享良
	（副査）教授	塩入 俊樹 教授 小澤 修

論文内容の要旨

【背景と目的】

アルツハイマー病（AD）は脳内にアミロイドβ（Aβ）沈着や神経原線維変化を特徴とした不可逆的な神経変性疾患である。炎症はADの進展に重要な役割を果たしている。ミクログリアは、抗炎症のみならずAβによる病理的な傷害に反応し、インターロイキン1β（IL1β）のような炎症性サイトカインを産生する炎症促進作用がある。うつはADの行動心理症状の一つであり、認知症の危険因子である。また、うつ病患者の脳に炎症を認める。さらに、小胞体ストレスはnuclear factor (NF)-κBを活性化し、炎症反応を引き起こす。

本研究では、フラボノイドの一つであるケルセチンを長期摂取したADモデルマウス海馬脳を用い、DNAマイクロアレイにて遺伝子発現解析を行った。さらに、発現遺伝子群によるconnectivity map (CMap) 解析によりルテオリンを同定し、小胞体ストレスおよび炎症反応への作用を培養細胞とADモデルマウスにて解析した。また、行動解析にて、ルテオリンの認知機能および不安・抑うつ様行動への作用を検討した。

【対象と方法】

- ① ケルセチン摂取マウス海馬およびケルセチン処理 HEK293T 細胞における遺伝子発現解析：長期間ケルセチンを摂取したADモデル (APP23) マウス海馬およびケルセチン処理 HEK293T 細胞からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを行った。さらに、発現遺伝子群によりCMapアッセイを行った。
- ② CMapアッセイにて同定したルテオリン作用の培養細胞による解析：*Atg5^{fl/fl}/SC100-1* HEK293T 細胞を用い、小胞体ストレスに対するルテオリンの作用をウェスタンブロット (WB) 法で解析した。株化マウスミクログリア MG6 細胞にて、リポ多糖 (LPS) にて誘導した炎症に対するルテオリンの作用を IL1β の ELISA 法にて解析した。また、炎症における小胞体ストレスの関与を activating transcription factor 4 (ATF4) ノックダウンにより解析した。
- ③ ルテオリン投与後のADモデルマウスの行動解析：43-49週齢のADモデルマウスに連日20 mg/kgのルテオリンを腹腔内注射した。認知機能をY迷路試験と恐怖条件付け試験にて解析し、不安・抑うつ機能を尾懸垂試験と強制水泳試験にて解析した。
- ④ ADモデルマウスにおけるルテオリン投与による脳内ミクログリアの解析：4%パラホルムアルデヒドにてマウス脳を固定し、凍結切片を作成した。Iba1, CD68 と ATF4 の免疫組織染色法を行い、蛍光顕微鏡と共焦点蛍光顕微鏡にて解析した。

【結果】

- ① CMap 解析により、ケルセチンと同じフラボノイドに属するルテオリンを同定した。
- ② *Atg5^{flp}/SC100-1HEK293T* 細胞にて、ルテオリンは ATF4 の発現と A β 産生を抑制した。LPS で刺激した MG6 細胞にて、ATF4, C/EBP homologous protein (CHOP), IL1 β の発現が誘導され、ルテオリンにより抑制されることをリアルタイム RT-PCR にて確認した。さらに、LPS による IL1 β mRNA の誘導は ATF4 ノックダウンにより抑制された。
- ③ ルテオリンを投与した AD モデルマウスの認知機能を Y 迷路試験と恐怖条件付け試験にて評価したが、対照群と有意な差を認めなかった。一方、不安・抑うつ機能を尾懸垂試験と強制水泳試験にて評価したところ、ルテオリン投与によりマウスの活動性が増加した。
- ④ ルテオリンを投与した AD モデルマウス脳切片の免疫染色にて、M1 マクロファージのマーカーである CD68 染色細胞数は減少した。さらに、CD68 陽性・ATF4 陽性細胞数も減少した。また、ルテオリン投与により AD モデルマウス脳において、IL1 β 産生が抑制された。

【考察】

AD において、加齢に伴う慢性炎症がミクログリアの活性化を引き起こす。しかし、炎症における小胞体ストレスの役割は不明のままであった。本研究では、AD モデルマウス脳内の IL1 β 産生が増加し、ルテオリン投与により減少した。また、AD モデルマウス脳内の A β 周辺 CD68 陽性マクロファージに ATF4 の発現を認め、ルテオリン投与よりその発現が減少した。

LPS による IL1 β の誘導には NF- κ B と未だ同定されていない別の因子が必要である。MG6 ミクログリア細胞にて、LPS は ATF4 と CHOP および IL1 β mRNA の発現を増加させ、ATF4 をノックダウンすることにより IL1 β mRNA の発現が抑制された。さらに、LPS により刺激された MG6 細胞において、ルテオリンにより ATF4 の核内移行が抑制された。これらの結果から、LPS は ATF4 を介して IL1 β の発現を誘導することが示唆された。

【結論】

フラボノイドであるルテオリンは、AD モデルマウスにおいて小胞体ストレスを制御することにより炎症を抑制し、不安・抑うつ様行動を改善することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 他 那は、フラボノイドであるルテオリンの効果を、培養細胞および AD モデルマウスを用いて解析し、ルテオリンが小胞体ストレスの抑制作用、および脳内ミクログリアの活性化抑制作用を介して、不安・抑うつ様行動を改善することを示した。本研究の成果は、AD に対する新たな治療薬候補を示すものであり、神経科学ならびに臨床神経学の進歩と発展に少なからず寄与するものと認める。

【主論文公表誌】

Tana, Toshiyuki Nakagawa: Luteolin ameliorates depression-like behaviors by suppressing ER stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 588 (2022) 168-174. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.074