

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11633

研究課題名（和文）更年期障害モデルマウスを用いた健康寿命の増進に関するラクトフェリンの研究

研究課題名（英文）Study of lactoferrin to extension of healthy life expectancy in ovariectomized model mice

研究代表者

出雲 信夫（Izumo, Nobuo）

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70368976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、実験動物および培養細胞を用いた評価を実施した。前者では、卵巣摘出群の夜間における自発運動量はsham群と比較し有意な低下が認められ、また8週間のラクトフェリン(LF)の投与により自発運動量の増加が認められた。また、前頭葉からのセロトニン遊離量が有意に変化しており、LFが低下した自発運動量を改善することが明らかとなった。後者では、培養神経細胞を用い、LFの添加で有意な神経突起伸長が認められた。また、トータルERKとリン酸化ERKの発現レベルはLFの添加から5分で最大となり10分まで持続し、各種阻害剤によって抑制されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗炎症作用を有するLFに目をつけ、既に確立しているモデルマウスに対する作用を検討する点で高い効果を得た。さらにLFは母乳に多く含まれる安全なタンパク質であり、臨床使用における安全性も高く、医療費の膨らんでいる我が国において、健康寿命を増加する可能性が大いにあり、非常に意義のある研究と考えられた。本研究では、ホルモンのバランスが骨代謝だけではなく中枢神経系に影響し、研究成果は更年期障害やステロイド長期投与患者への補助だけではなく精神的抑制を寛解し、患者にとっても、医療費削減を考えても本研究の意義があった。

研究成果の概要（英文）：This present study was demonstrated the evaluation of lactoferrin (LF) using laboratory animals and cultured cells. In the former, spontaneous locomotor activity in the ovariectomized group was significantly decreased compared to the sham group at night, and LF administration for 8 weeks increased spontaneous locomotor activity. In addition, serotonin release from the frontal lobe was significantly altered, indicating that LF improves decreased spontaneous locomotor activity. In the latter case, using cultured neurons, significant neurite outgrowth was observed with the addition of LF. The expression levels of total ERK and phosphorylated ERK were maximal at 5 min after the addition of LF and persisted until 10 min, indicating that they were suppressed by various inhibitors.

研究分野：薬理学

キーワード：ラクトフェリン 卵巣摘出 セロトニン 更年期障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

LF は、1939 年に「牛乳の赤いタンパク質」として発見された。ヒトを含む哺乳類の乳汁、特に母親の初乳に多く含まれる。このことは、LF が、乳児が必要とする極めて重要でかつ安全なタンパク質と考えられる。そのため、LF の研究は、免疫増強作用や抗炎症作用などが報告されている。また、癌細胞への抑制作用や放射線防護作用など、新しい薬理作用も証明されている。しかしながら、その作用機構は明らかにされていない。また、骨代謝においては、骨芽細胞の増殖促進や破骨細胞への骨吸収抑制が報告されている。一方、中枢神経系においては、脊髄を介して脳へ移行することが証明され、中枢において重要な働きを持っていると考えられている。しかしながら、その効果の検討は、モルヒネの鎮痛効果の増強や抗不安の可能性などであり、ほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OVX モデルマウスでの自発運動量の低下に対する LF の効果を検討し、臨床において LF が更年期障害などによる抑うつ症状を改善する可能性を検討し、超高齢化社会において女性の健康寿命を増加することである。

3. 研究の方法

【動物実験】

(1) モデルマウスと LF の投与

1 週間の予備飼育の後、卵巣摘出手術(OVX)を行った。OVX 8 週間後、自発運動量を測定した。また、LF(100mg/kg、300mg/kg)の投与を 8 週間行った。8 週間後、夜間の自発運動量を測定した。マウスの体重は予備飼育後 1 週間おきに毎週測定した。投与 8 週間後、マウスを安楽死させ前頭葉と海馬の摘出を行った。摘出した前頭葉と海馬は RT-PCR による遺伝子の発現レベルの測定に用いた。

(2) 自発運動量測定

赤外線センサーによってマウスの 1 時間毎の運動量を測定した。測定時間は 19 時から翌日 7 時までの 12 時間で、環境は室温 24 ± 1 、湿度 55%とした。

(3) Social interaction 試験

測定方法は面積が 50×50 cm、高さ 30 cm の箱にマウスを入れた円筒とマウスの入っていない円筒を入れ、配置場所による差が出ないように 2 つの円筒にマウスを交互に入れた。円筒を 2 つ入れることでどれだけ円筒ではなくマウスに対して興味を持っているのかという事を判断した。評価方法として、マウスがいる Zone の滞在時間をマウスがいない Zone の滞在時間で割ってその割合で評価した。

(4) マイクロダイアリシス法

測定原理としては生体内に透析膜を留置して生体内の物質を連続して回収していく方法で、social interaction 試験と同様に相手が近くにいる際の遊離量を測定したかった為、フリームービングで測定した。

(5) Realtime RT-PCR 法

8 週間の LF 投与後、ドパミンマーカーとして TH、セロトニンマーカーとして TPH の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR により測定した。各マウスから摘出した個々の前頭葉と海馬から RNA を抽出した。各遺伝子の発現レベルは GAPDH で補正し、Sham 群に対する相対比を算出した。

【培養細胞実験】

(1) 細胞および培養条件

ラット副腎褐色細胞腫由来 PC12 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより分与された。10%FBS、1%penicillin、1%streptomycin 含有 D-MEM/F-12 (ナカライ) で PC12 細胞を 37°C 、5% CO_2 に設定したインキュベーターで培養した。

(2) 神経伸長作用の評価

細胞培養後、タイプ コラーゲンで処理した 12well 組織培養プレートに PC12 細胞を 4×10^3 個/well で播種した。播種から 1 日後、無血清培地にて最終濃度を 100、250、500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した LF で処理した。Positive Control として、50ng/mL に調節した NGF にて処理した。薬剤添加から 1 日後と 3 日後に顕微鏡下でランダムに 5 視野撮影し、画像解析を実施した。

(3) ウエスタンブロット

PC12 細胞を 2×10^6 個/60mm dish に播種し、10%FBS、1%penicillin streptomycin 含有 D-MEM/高グルコース (富士フィルム) で培養を行った。播種から 1 日後、無血清培地にて 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した LF で処理した。薬剤投与から 0 分、5 分、10 分、30 分、2 時間、6 時間後にタンパク質を抽出した。その後、ウエスタンブロット法を実施した。

(4) 各種阻害剤を用いた評価

形態学的評価と同様にタイプ コラーゲンで処理した 12well 組織培養プレートに PC12 細胞を 2×10^5 個/well に播種した。播種から 1 日後、無血清培地にて 250 μ g/mL に調整した LF、阻害剤 (AG879、PD98059) LF + 阻害剤で処理した。薬剤添加から 3 日後に顕微鏡下でランダムに 5 視野撮影した。一方、播種から 1 日後、無血清培地にて 250 μ g/mL に調整した LF、阻害剤 (AG879、PD98059) LF + 阻害剤で処理した。AG879 添加後 5 分後、PD98059 添加後 2 時間後にタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法を実施した。

4. 研究成果

【動物実験】

(1) 自発運動量

卵巣摘出 8 週間後における自発運動量において、活動期に入る 19 時から 3 時間の比較・19 時から 12 時間の比較は共に OVX の運動量が有意に低下した。一方、投与 8 週間後 (卵巣摘出 16 週間後) における自発運動量において、12 時間比較では sham 群と OVX 群のみで優位に差があり、OVX 群とラクトフェリン投与群に有意な差はなかった。

(2) Social interaction 試験

LF 投与後 8 週間後における Social interaction 試験において、滞在時間は OVX で滞在時間が減り、ラクトフェリン投与群で Sham 群には劣るものの滞在時間が改善し、有意に変化した。

(3) マイクロダイアリシス法

LF 投与後 8 週間後におけるマイクロダイアリシスの測定結果において、ドパミンは Sham 群と OVX 群間で有意に変化した。セロトニンは Sham 群と OVX 群では減少傾向にあり、OVX 群と LF 投与群においては有意に変化した。

(4) Real time RT-PCR 法

LF 投与後 8 週間後における Realtime RT-PCR の測定結果において、海馬では Sham 群と OVX 群で若干の低下傾向があり、OVX 群と LF 投与群で増加傾向が認められた。前頭葉では Sham 群と OVX 群で変化は認められなかったが、OVX 群と LF 投与群において有意に改善した。

【培養細胞実験】

(1) 神経突起身長作用の評価

NGF 処理群において Control 群と比較して 1 日後に Length は有意に増加し、3 日後に Length、Joint、Pass の全てで有意に増加した。LF 処理群においては Control 群と比較して 1 日後では全ての濃度で有意な変化は見られなかったが、3 日後に Length、Joint、Pass 全てで有意に増加した。さらに 3 日後の LF 濃度 250 μ g/mL は、NGF 処理群と同レベルまで細胞伸長作用を示した。

(2) Western blotting 法による ERK 発現の評価

LF 処理から 5 分後と 10 分後にリン酸化 ERK のバンドが濃く見られ、発現量が増加したことが分かった。さらにこの画像を ImageJ で解析した結果、リン酸化 ERK の発現量は LF 処理から 5 分で最大となり 10 分まで有意に増加した。

(3) 阻害剤を用いたメカニズム解析

LF 処理群において 3 日後に神経突起の伸長が見られた。阻害剤単独 (AG879、PD98059) または LF に各阻害剤を処理した群では神経突起の伸長は見られなかった。LF 処理群は Control 群と比較して Length、Joint、Pass 全てで有意に神経突起伸長を増加した。しかし阻害剤または LF + 各阻害剤処理によって Length、Joint、Pass 全てを有意に抑制した。

(4) 各阻害剤を用いた Western blotting 法によるメカニズム評価

AG879、PD98059 処理において、LF 処理群のみでリン酸化 ERK のバンドが濃く見られ、発現量が増加した。LF 処理群と比較して AG879 処理群または LF + AG879 処理群で有意にリン酸化 ERK を減少させた。また PD98059 処理群または LF + PD98059 処理群でも有意にリン酸化 ERK を減少させた。

以上より、LF の単独添加によって NGF と同様の経路を介して神経突起伸長作用を促進させ、卵巣摘出により低下した前頭前野での 5-HT 遊離量を回復することにより自発運動量を改善することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水上乃愛、長嶋大地、岩崎莉奈、南條佑磨、古川恵、速水耕介、出雲信夫
2. 発表標題 PC12細胞の神経突起伸長に対するラクトフェリンの効果
3. 学会等名 日本薬学会142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Furukawa M, Izumo N, Ishiyama Y, Kurono H, Nitto T, Hoshino T, Manabe T
2. 発表標題 Preventive effect of lactoferrin on decreased spontaneous activity by ovariectomy in rats.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izumo N, Furukawa M, Nagashima D, Toho M, Kurono H, Mizukami N, Hoshino T, Manabe T
2. 発表標題 Lactoferrin promotes PC12 cells neurite outgrowth via ERK signaling pathways.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奈良優希、岸麻友、横江美咲、青木亮憲、長嶋大地、古川恵、出雲信夫
2. 発表標題 卵巣摘出マウスの自発運動量低下に対するラクトフェリンの治療効果
3. 学会等名 第31回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南條 佑磨・古川 恵・水上 乃愛・東方 優大・長嶋 大地・日塔 武彰・速水 耕介・星野 達雄・出雲 信夫
2. 発表標題 ラクtofelinはERK経路を介してPC12細胞の神経突起を伸長する
3. 学会等名 日本薬理学会第144回関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水上 乃愛, 長嶋 大地, 古川 恵, 東方 優大, 日塔 武彰, 速水 耕介, 出雲 信夫
2. 発表標題 ラクtofelinはPC12細胞のTrkA受容体を介して神経突起伸長を促進する
3. 学会等名 第23回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水上 乃愛, 長嶋 大地, 古川 恵, 東方 優大, 日塔 武彰, 速水 耕介, 出雲 信夫
2. 発表標題 ラクtofelinはPC12細胞のTrkA受容体を介して神経突起伸長を促進する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------