

博士論文

高脂肪食で誘発される精神性障害とそのメカニズムの研究：

オキシトシン投与で改善する高脂肪食餌誘発性肥満マウスの

社会認知機能と物体認知機能の障害

東北大学大学院農学研究科

生物産業創成科学専攻 天然物生物機能科学講座

機能分子解析学分野

林 遼太郎

(略語)

ND 通常食 Normal diet

HFD 高脂肪食 High fat diet

OXT オキシトシン Oxytocin

OXTR オキシトシン受容体 Oxytocin receptor

PVN 室傍核 Paraventricular hypothalamic nucleus

SON 視索上核 Supraoptic nucleus

LS 外側中隔核 Lateral septum

MeA 内側扁桃体 Medial amygdala

MPOA 内側視索前野 Medial preoptic area

NTS 孤束核 Nucleus of the tractus solitarius

ASD 自閉症スペクトラム障害 Autism spectrum disorder

序章 緒言

第1節 高脂肪食摂取と認知機能

第2節 OXT/OXTR システム

第3節 肥満と OXT/OXTR システム

第4節 OXTR アゴニスト

第5節 本研究の目的

第1章 高脂肪食摂取マウスにおける OXT の認知機能改善効果の検証

第1節 緒言

第2節 実験方法

第3節 結果

第4節 考察

第2章 高脂肪食摂取マウスにおける OXT の認知機能改善メカニズムの解明

第1節 緒言

第2節 実験方法

第3節 結果

第4節 考察

第3章 認知機能改善食品素材の開発を目指した天然物由来 OXTR アゴニストの探索

第4章 総合考察

引用文献

謝辞

序章 緒言

第1節 高脂肪食摂取と認知機能

脂肪の過剰摂取は、肥満、糖尿病、メタボリックシンドロームなどの生活習慣病の主要な危険因子であることは広く知られているが、ヒトにおいて肥満はアルツハイマー病^{1,2}や認知機能低下³、うつ病様行動⁴、不安行動⁵との間にも相関関係が認められている。このように脂肪の過剰摂取や肥満は身体疾患のみならず精神疾患とも関連があることが知られている。げっ歯類においても高脂肪食（HFD）の摂取は、社会認知や物体認知記憶を低下させ、不安関連行動だけでなく、うつ病様行動を増加させることが、これまでの研究で示されており⁶⁻⁹、ヒトとげっ歯類では脂質の摂取という共通した環境によって認知機能の破綻が起きることが示唆されている。

高脂肪食の消費と肥満の増大は世界的な健康リスクであるが、これと認知機能の低下が見られる認知症や、社会認知機能の低下が見られる自閉症の患者数の増加などとも何らかの関係が疑われることから、高脂肪食の摂取による認知機能の低下のメカニズム解明と効果的な治療法の開発が求められている。

高脂肪食摂取がヒトの脳に与える影響についての報告は多くはないが、高脂肪食摂取が視床下部のセロトニントランスポーターの結合を減少させる¹⁰などの報告があり、ヒトにおいても高脂肪食の摂取が脳に影響を与えることが示されている。

高脂肪食の摂取が認知機能を低下させるメカニズムとしていくつかのメカニズムが提唱

されている。

1つはインスリンシグナルである。糖尿病はインスリンが十分に働かないために、血糖が増加する疾患であるが、特に2型糖尿病ではインスリンへの感受性が低下するインスリン抵抗性が生じることが原因の1つとされており、インスリン抵抗性の危険因子の1つに高脂肪食の過剰摂取が挙げられている。糖尿病と認知症の関係については我が国における久山町研究において、糖尿病関連因子、特にインスリン抵抗性がアミロイド β の沈着に強く関連していることが報告されている¹¹。インスリン抵抗性による中枢の高インスリン状態は炎症性サイトカインを増加させ、神経炎症を惹起する。またインスリン分解酵素は中枢神経においてアミロイド β ペプチドの分解の一部を担っており、高インスリン状態はアミロイド β の分解について抑制方向に働く。このようにインスリン抵抗性によるインスリンシグナルの低下は認知機能の低下の原因の1つであると考えられている。1例としてインスリンシグナルのネガレギュレーターである SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2)を阻害することで、認知機能が改善したところからも、脳のインスリン作用を高めることが認知機能の改善につながると期待されている¹²。中枢神経系のインスリン受容体は主に嗅球、海馬、視床下部、皮質などで発現しているが、インスリンの経鼻投与は鼻粘膜上皮輸送系を介して中枢神経系に直接インスリンを到達するため中枢神経におけるインスリンシグナル不全を改善できる可能性があり、実際健常者と軽症のアルツハイマー病患者において記憶機能が改善し、画像検査での脳血流量が改善することが報告されている^{13,14}。

2 つ目に酸化ストレスと炎症である。脂肪組織では活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS) 産生酵素である NADPH オキシダーゼの発現が上昇し、抗酸化酵素の SOD(Superoxide dismutase)、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼの発現低下により ROS 産生が促進し酸化ストレスが亢進している¹⁵。脳内においても高脂肪食の摂取は海馬や皮質の酸化ストレスと炎症性サイトカインを上昇させる^{16,17}。また IL-1、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインは血液脳幹門(Blood-brain barrier, BBB)を通過でき、末梢で産生された炎症性サイトカインが脳に影響を与える可能性が考えられている。炎症性サイトカインの 1 種である IL-1 β は海馬の BDNF 発現、神経新生、シナプス増強、LTP、グルタミン酸放出を阻害することが知られており、IL-1 β がアラキドン酸を減少させる脂質過酸化を誘発し、その結果、膜関連機能に影響を与える膜の流動性に影響を及ぼし、神経伝達物質の放出、LTP などに影響を与えている可能性が考えられている¹⁸。

このように酸化ストレスや炎症性サイトカインは神経の機能不全を引き起こす¹⁹。アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患において、過酸化脂質などの酸化ストレスマーカーの上昇も報告されており、酸化ストレスが神経変性疾患に関与することが示唆されているが明確な結論は得られていない²⁰。また、高脂肪食の摂取によって認知機能が低下しているにもかかわらず、炎症性サイトカインに変動が見られない例も複数報告されており^{21,22}、高脂肪食摂取と酸化ストレス、炎症性サイトカインの関係について、明確に明らかにはなっていない。高脂肪食の摂取により脂質過酸化分解生成物の一

つであり、脂質過酸化の主要なマーカーであるマロンジアルデヒド(MDA)が脳内で上昇することが知られている。MDA は脳内の様々な神経細胞に分化する能力を持つ神経前駆細胞の増殖を低下させることから、脳内 MDA の上昇は脳機能低下の 1 因であると考えられている²³。

3 つ目に BDNF(Brain derived neurotrophic factor)の低下である。BDNF は脳由来神経栄養因子と呼ばれるタンパク質であり、受容体である Trk B を介して神経細胞の生存維持、神経突起の伸長促進、神経伝達物質の合成促進などの作用を示す。BDNF は中枢神経系の海馬などに多く存在するが、血液にも存在し BBB を通過することができる。BDNF は精神疾患とも関連しており、BDNF と認知症を診断するテストのスコア(MMSE テスト)との間で正の相関がある²⁴。また高脂肪食の摂取により、海馬の BDNF が低下し、神経新生、シナプス可塑性を低下させ認知能が低下すると考えられている^{23,25}。

4 つ目にミクログリアの活性化である。ミクログリアは脳内の常在免疫細胞であり、活性化したミクログリアは貪食作用を示して病原菌や細胞の残骸を取り除く。高脂肪食の摂取によりミクログリアは活性化するが、このミクログリアの活性化は高脂肪食摂取による酸化ストレス等により損傷を受けたシナプスの残骸等を取り除き脳機能の維持に寄与する一方で、機能しているシナプスをも貪食することで高脂肪食摂取による認知機能の低下を引き起こしていると考えられている²⁶。

このように高脂肪食の摂取が様々なメカニズムによって認知機能をはじめとする脳機能

の低下を誘導する可能性が示されている。

第2節 OXT/OXTR システム

オキシトシン (OXT) は、傍室核 (PVN) と視床上核 (SON) で合成される 9 アミノ酸から成る神経ペプチドホルモンであり、下垂体後葉に突出する軸索によって血液中に分泌される²⁷。OXT は、乳腺、子宮平滑筋、舌、骨組織を含む広範囲の末梢組織において様々な生理機能を有している(peripheral oxytocin)。脳内の視床下部で合成された OXT は、発現ニューロンの軸索を介して各神経核に到達する(central oxytocin)。さらに、OXT は非シナプスのこれらの脳領域で直接放出され拡散により標的神経の受容体へ作用する経路も提唱されている²⁸。

OXTR は q/11 型 G サブユニットに結合した G タンパク質共役型受容体²⁹である。末梢の OXT/OXTR 系は、乳汁排出、分娩、および骨形成の制御などの生理学的作用を有する。OXTR は、PVN、外側中隔核(LS)、海馬、内側扁桃体(MeA)、内側前頭前野(MPOA)、および分界床核(BNST)を含む様々な脳領域で発現している。発現領域によって神経伝達物質が異なり PVN の OXTR 発現ニューロンは、グルタミン酸作動性ニューロンであり、BNST の OXTR 発現ニューロンは GABA 作動性ニューロンであることが知られている³⁰。

OXT/OXTR システムは末梢での射乳や分娩、骨形成制御などの生理作用を持つ。一方、中枢の OXT/OXTR システムは向社会行動であるペア形成(pair bonding)や母性行動(maternal behavior)、共感性行動 (empathetic behavior)、社会行動の社会認知(social recognition)、攻撃行動など様々な社会行動、向社会行動の制御に関わっていると考えられている^{2, 31-34}。

遺伝子改変マウスなどを用いた解析により、脳の領域毎の OXTR の機能が明らかになりつつある。OXT KO マウス、OXTR KO マウス共に社会認知機能の低下が認められているが^{32,35}、海馬の OXTR が社会認知機能を制御しており³⁶⁻³⁸、また扁桃体の OXTR は社会認知機能と恐怖表現を制御していることが知られている^{39,40}。

OXT/OXTR システムが関わる精神疾患に自閉症スペクトラム障害(ASD)が挙げられる。ASD はコミュニケーション障害と限定した興味と反復行動を中核症状とする精神疾患である。げっ歯類においてコミュニケーション障害は社会認知機能によって評価される。社会認知機能は過去に会ったことのある個体か、会ったことのない新奇の個体かを見分ける能力でありコミュニケーションの基盤となる能力とされている。OXT KO、OXTR KO マウスは社会認知機能の低下⁴¹を示すことから ASD 動物モデルとして利用されている。また OXTR は薬理的なターゲットであり、ASD 患者に OXT を経鼻投与すると、社会的コミュニケーションや社会的互恵性が改善されることがヒト研究で示されている^{42,43}。また、バルプロ酸(VPA)を投与した ASD マウスモデルでは、OXT の経鼻投与により、社会的認知機能の改善が観察されている⁴⁴。

社会認知機能は認知機能の 1 種であるが、認知機能には他にも物体認知機能などが存在する。物体認知機能は異なる物体を見分ける能力であるが、OXT/OXTR システムの物体認知機能の制御に関しては必ずしも明らかでなく、特に高脂肪食摂取マウスに対する OXT の末梢投与が物体認識機能に与える影響については不明である。これまでの研究では、末梢投

与された OXT の認知機能に対する効果は、動物モデル間でばらつきがある。例えば、VPA 処理マウスへの OXT の経鼻投与では、社会的認知機能は回復したが、客観的認知機能は改善しなかった⁴⁴。また、Shank3-KO マウスへの OXT の脳室内投与で社会的認知機能が回復することが報告されており⁴⁵、尾部ショックストレス処理ラットへの OXT の経鼻投与でも認知機能が回復することが報告されている⁴⁶。

また OXT の投与は認知機能以外の行動にも影響を与えることが知られている。例えば OXT の末梢投与は、抗うつ効果があることが知られている⁴⁷。また PVN および脳室への OXT 投与は抗不安作用を示す^{48,49}。不安関連行動については、一方で OXT の脳室内投与を繰り返すことで不安作用が生じ抗不安行動に反対の効果を示すこと⁵⁰や OXTR KO マウスでは不安行動は変化しない⁵¹など、評価する動物モデルや行動試験、OXT の投与方法によって OXT/OXTR システムが不安関連行動に与える影響は異なり、未解明の部分も多い。

第3節 肥満と OXT/OXTR システム

OXT KO マウスおよび OXTR KO マウスは有意な体重増加を示す^{31, 52}。OXT/OXTR 系は肥満および/または食物摂取量の制御に強く関与している⁵³。OXT は体重制御と認知機能制御の機能を有しており、OXT は HFD によって引き起こされる認知障害を改善するために効果的であると考えた。一方で、肥満が OXT/OXTR システムに与える影響は不明な部分が多い。例えば血清の OXT レベルは、HFD マウスで減少することが報告されている⁵⁴が、高脂肪食摂取が脳内の OXTR 発現に与える影響は不明である。

第4節 OXTR アゴニスト

OXT の臨床的効果は様々報告されている。健常者への経鼻投与の効果としては、信頼の醸成⁵⁵、心の理解の増加⁵⁶、夫婦間の良い会話反応⁵⁷などのメンタルヘルスに関するものや、チョコレートやクッキー等の間食が減るなどの食欲抑制効果⁵⁸などの摂食行動に関するものなどが報告されている。さらにメタ解析においても顔の認知の改善と仲間集団内での信頼関係の促進が示されている⁵⁹。

自閉症(Autism Spectrum Disorder: ASD)は社会的コミュニケーションおよび対人相互反応における持続的な欠陥と行動・興味・活動の限定された反復的行動を中核症状とする精神疾患の1種である。近年の疫学調査によると有病率は1%を超えると考えられており⁶⁰、本邦においても1.8%と報告されている⁶¹。また罹患による社会的損失が大きい⁶²一方で、これらの中核症状に対して有効な治療薬は無く、治療法の必要性は増大している。

本邦で行われた世界初の大規模な自閉症スペクトラム障害に対するOXTの投薬効果を検証した試験、Japanese Oxytocin Independent Trial (JOIN-T)では、対人場面での振る舞いから専門家が評価した対人コミュニケーションの障害に対するOXTの効果はプラセボ効果を上回らなかったが、視線計測で評価した客観的な社会性の改善効果や常同行動と限定的興味に対するオキシトシンの投与効果は認められた。このようにOXTによる自閉スペクトラム症の主な症状の改善は期待されるものの、対人場面に現れる対人コミュニケーションの障害そのものに対する有効性を示す上では検討すべき事項が残されていることが示されてい

る⁶³。また OXT の経鼻投与が社会性に与える影響についての 17 の 2 重盲検ランダム化比較試験についてのメタアナリシスによれば、OXT の経鼻投与は心の理論(他者の心の状態を推測する機能)、共感性への影響はあるが、社会的認知機能についての影響は認められなかった⁶⁴。

以上のように OXT は自閉症の中核症状への有効性は認められるものの現時点では限定的であり、OXT を薬剤として用いるにはいくつかの課題が考えられる。1 つは血中半減期が短いことである^{65,66}。主要な精神疾患の薬剤の血中半減期は 1 時間以上であるが、OXT の血中半減期は 5 分程度と短く、OXT を血中に投与した場合 30 分後には血中濃度は定常状態に戻る⁶⁷。そのため効果が持続しにくいという課題がある。2 つ目に血液脳関門の通過効率が低いことである。末梢投与した OXT の 0.002% が中枢に到達するとされている⁶⁵。

3 つ目にバソプレシン(AVP)の受容体である V1aR、V1bR、V2R に結合することによる副作用の懸念である⁶⁸。バソプレシンは OXT 同様 9 アミノ酸から成るペプチドホルモンであり、視床下部 PVN 及び SON で産生される下垂体後葉ホルモンであり、OXT とは 2 アミノ酸のみが異なる近縁のホルモンである。V1aR は血管平滑筋、肝臓、副腎、中枢神経系などに分布し、中枢神経系では特に中隔、大脳皮質、海馬に分布しており、V1aR は社会性や不安などに関与することが知られており、例えば AVP のヒトへの投与により不安感が増大する⁶⁹。V2R は腎臓などに分布し水分の再吸収に関与している。近縁のホルモンであるオキシトシンとバソプレシンは受容体間の相同性も高く、ヒトにおいては 42~45%の相同性を

有する。そのためオキシトシンとバソプレシンはそれぞれの受容体を活性化するとされており、オキシトシンを投与した場合、オキシトシン受容体だけでなくバソプレシン受容体も活性化しそれぞれの影響の総和が表現型として現れる。バソプレシンの投与は抗利尿作用や不安感の増大などの可能性が考えられるため、オキシトシンアゴニストには OXTR に対する特異性が求められる。

4つ目に OXT の反復投与による効果の減弱である。OXT の社会的コミュニケーションの障害への効果は単回投与では有効であるが⁷⁰、一方で反復投与では有効性が認められない⁷¹。⁷²この要因として OXT の反復投与により OXT の効果が減弱する可能性が考えられており⁷³、そのメカニズムとしては OXT/OXTR システムのネガティブフィードバックが考えられる。

現在これらの課題を克服すべく、体内での安定性、BBB 透過性や OXTR への特異性を改良した新規オキシトシンアナログや新規経鼻製剤の開発が行われている。

第5節 本研究の目的

このように OXT が抗肥満作用や社会認知機能の改善効果を有することから OXT 及びその受容体アゴニストが肥満に起因する認知機能障害等の諸症状に対する包括的な治療に有効である可能性が考えられた。しかしながら、末梢 OXT 投与が高脂肪食摂取に起因する認知機能障害や不安、うつ様行動に与える影響はこれまでに報告されていない。そこで高脂肪食摂取によって引き起こされる行動異常に対する OXT の治療薬としての可能性を検討するため、高脂肪食摂取マウスにおける末梢 OXT 投与が認知機能や不安、うつ様行動に与える影響を解析した。また、OXT/OXTR システムは社会認知機能に必須であることから、高脂肪食摂取による認知機能障害が OXT/OXTR システムに起因する可能性を考え、高脂肪食摂取が OXT/OXTR システムに与える影響を解析した。これにより高脂肪食摂取による認知機能障害メカニズムの一端が解明できると考えられた。さらに OXT が社会認知機能を改善することから、OXT だけでなく他の OXTR アゴニストについても同様の効果が期待される。これまでに OXTR アゴニストはペプチド性の物質と非ペプチド性の物質が報告されているが、非ペプチド性の物質は化学合成されたものであり、天然物由来の OXTR アゴニストはこれまでに報告されていない。そこで食経験や食品用途等の観点から社会認知機能を改善する天然物由来の OXTR アゴニストの開発を目指し、天然物由来の OXTR 受容体アゴニストの探索を行った。

第1章 高脂肪食摂取マウスにおける OXT の認知機能改善効果の検証

第1節 緒言

高脂肪食摂取により社会認知機能、物体認知機能が低下し、また OXT の投与によって社会認知機能が改善することが知られている。しかしながら、OXT の末梢投与が高脂肪食摂取による認知機能異常などの行動異常に与える影響は不明であった。本章では高脂肪食摂取マウスにおける末梢 OXT 投与が社会的認知機能、物体認知機能、不安行動、うつ様行動に与える影響を評価することで、高脂肪食摂取によって引き起こされる行動異常に対する OXT の治療薬としての可能性を検討した。

第2節 実験方法

1. 動物と試験食

日本 SLC より 5 週齢の C57BL/6J 雄マウスを入手した。各群 39 匹のマウスを個飼いし、12 時間明暗サイクルで飼育した。マウスは無作為に 3 群(ND 群：通常食群、HFD 群：高脂肪食群、HFD+OXT 群：高脂肪食+オキシトシン群)に分けた。ND 群には通常食(D12450J；Research diet、New Brunswick、NJ)、HFD および HFD+OXT 群には高脂肪食(D12492；Research diet、New Brunswick、NJ) を与えた。高脂肪食は通常食と比較してラードの含有量を増やした配合とした(Table 1)。マウスは入手後 1 週間、精製飼料(AIN-93G)で馴化飼育を行った後に、10 週間、自由摂食、自由飲水で試験食を投与した。試験は A~C の 3 つの独立した試験を行った(Figure 1)。またマウスの体重は 2 週間に 1 回測定した。すべての動物実験は、東北大学及び日本製粉株式会社の動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

2. OXT の投与

OXT(株式会社ペプチド研究所：日本)は使用前に生理食塩水に溶解した。OXT (1mg/kg) または生理食塩水を、各行動試験の 45 分前に 10ml/kg 体重で腹腔内投与した。ND 群と HFD 群には生理食塩水を、HFD + OXT 群には OXT を投与した。

3. 行動試験

10 週間の試験食投与後に行動試験を実施した(Figure1)。マウスの入ったケージは行動試験の 1 時間前に試験室に移動させ馴化を行い、各行動試験は 1 日から 7 日の間隔を空けて行った。各行動試験後、マウスを個々のケージに戻した。行動試験の解析はビデオトラッキングソフトウェア ANY-maze (Stoeliting 社)若しくはマウスの群を盲検化した上で手動にて測定した。

4. Three chamber test

マウスの社会性と社会認知機能を評価するために Three chamber test を実施した⁷⁴。Three chamber test は 3 室からなる測定箱の両角に配置された刺激マウスに対して探索した時間を計測することで社会性(Sociability)及び社会認知機能(Social recognition)を評価する試験である(Figure 3A)。41×21×35cm のサイズの測定箱を使用し、47 Lux の LED ライトの下で試験を実施した。この試験は 3 つのステージから成り、第 1 ステージでは被験マウスを測定箱に入れ 10 分間自由に探索させ、測定箱への馴化を行った。また自発行動量を測定するため移動距離を測定した。第 2 ステージでは、箱の片方の角にある三角形のメッシュカップの中に、これまで接触したことのない雄の新奇マウスを入れ、被験マウスを 10 分間自由に探索させた。この際、左右の角の配置した新奇マウスと空のメッシュカップに対する探索時間を測定することで社会性を評価した。第 3 ステージでは、社会性の評価で用いた既知マウスと新奇マウスを左右の角に配置し、どちらに探索時間を多く費やすかを測定することで、新奇マウ

スと既知のマウスを見分ける社会認知機能(Social recognition)を評価した。

5. Object recognition test

Object recognition test は物体に対する認知機能を評価する行動試験である(Figure 4A)。正方形のオープンフィールドボックス (40×40×40cm) を使用し、47 Lux の LED ライトの下で試験を実施した。この試験は3つのステージから成り、第1ステージでは被験マウスをオープンフィールドに入れ、10分間自由に探索させることで環境への馴化を行った。24時間後の第2ステージではフィールドの異なる2つの角に同一の2つのオブジェクトを配置し、マウスをフィールドに配置し自由に探索させた。さらに24時間後の第3段階では2つのオブジェクトのうち1つを新奇のオブジェクトに交換し、マウスをフィールドに配置し自由に探索させた。その際の既知オブジェクトと新奇オブジェクトの探索時間を比較することで物体認知機能を評価した。

6. Object location test

Object location test は物体の位置に対する認知機能を評価する行動試験である(Figure 4C)。壁に黒色で図形の絵を描いた正方形のオープンフィールドボックス (40×40×40cm) を使用し、47 Lux の LED ライトの下で試験を実施した。この試験は3つのステージから成り、第1ステージでは被験マウスをフィールドに入れ10分間自由に探索させることで環境への馴

化を行った。24 時間後、第 2 ステージではフィールド異なる 2 つの角に同一の 2 つのオブジェクトを配置し、マウスをフィールドに配置し自由に探索させた。さらに 24 時間後の第 3 段階では 2 つのオブジェクトのうち 1 つのオブジェクトの位置を変更後、マウスをフィールドに配置し自由に探索させた。その際の既知の場所に配置されたオブジェクトと新奇の場所に配置されたオブジェクトの探索時間を比較することで物体の位置に対する認知機能を評価した。

7. Olfactory habituation/dishabituation test

Olfactory habituation/dishabituation test は嗅覚機能を評価する試験である。嗅覚刺激として水道水、バニラ抽出物、レモン抽出物（2 つの非社会的嗅覚刺激）、異なる雄マウスのケージを拭くことによって調製された社会的嗅覚刺激を用いた。被験マウスをホームケージから新しいケージに移し、嗅覚刺激を含まない綿棒をマウスに提示し 30 分馴化させた。その後、嗅覚刺激を染み込ませた綿棒を 3 分間提示した後、同じ匂いのする新鮮な綿棒に交換し、2 分間の間隔で合計 3 回提示した。マウスが綿棒を嗅ぐ時間を測定し嗅覚機能を評価した。

8. Open field test

Open field test は不安行動を評価するために実施した。50×50×40 センチメートル不透明な

グレーのチャンバーを用いて、450 LX の LED ライトの下で行った。

被験マウスをチャンバーに入れて 10 分間馴化させた後に、さらに 10 分間チャンバー内を自由に探索させた。チャンバー内を 100 マスに分割し、中央の 16 マスをセンターゾーンとし、残りの 84 マスをコーナージーンとした。センターゾーンに滞在した合計時間とチャンバー内全体での Freezing time を測定し、不安関連行動を評価した。

9. Tail suspension test

Tail suspension test はうつ様行動を評価するために実施した。被験マウスは、テープを用いて、地面から 20cm 上に 6 分間吊り下げた。マウスの行動はビデオカメラを用いて記録し、最初の 3 分間は馴化に要する時間とし、最後の 3 分間の不動時間を測定した。不動時間の測定はマウスの群を盲検化した上で手動で記録した。

10. Forced swim test

強制水泳試験は、以前に記載されているように、うつ病様行動を評価するために実施した。各マウスを、 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 6 分間、深さ 20cm の水を入れた透明なプレキシグラス製の円筒形容器（高さ 40cm×直径 20cm）に個別に入れた。最初の 3 分間は馴化時間として、最後の 3 分間は分析のために使用した。実験はビデオカメラで記録した。不動時間は、マウス群を盲検化した実験者が手動で記録した。

1 1. 統計解析

すべての値は、平均 ± 標準誤差 (SEM) として表記した。Three chamber test、Object recognition test、Object location test のデータは、Welch の t 検定を用いて解析した。多群比較に関する他の実験データは、Levene 検定により分散を検定した後に、パラメトリック分析として、One way ANOVA 及び Tukey-Kramer 検定、またはノンパラメトリック分析として、Kruskal-Wallis 検定及び Steel-Dwass 検定を行った。0.05 未満の P 値を統計的に有意であるとした。実験データの統計解析は、SPSS (IBM Corp., Armonk, NY, USA) と R を用いて行った。

第3節 結果

1. 高脂肪食摂取が体重に与える影響

高脂肪食の摂取により、通常食に比べて体重の増加が認められた (Kruskal-Wallis test: $p < 0.001$; and Steel-Dwass test $p < 0.001, p < 0.001$)。行動試験を実施する前までの10週間に試験食を投与したため、HFD群とHFD+OXT群は同じ体重の挙動を示した。

2. 高脂肪食摂取マウスの社会認知機能異常に対するOXT投与の効果

第1ステージにおいて自発行動量は高脂肪食の摂取により低下し、OXTの投与による影響は認められなかった (ANOVA: $F_{(2,60)} = 7.99, p = 0.001$; Tukey's test: ND vs HFD, $p = 0.012$; ND vs HFD + OXT, $p = 0.001$; Figure 3B)。一方で、総探索時間はND群、HFD群、HFD + OXT群で差が無かった (ND: $p = 0.37$; HFD: $p = 0.29$; および HFD + OXT: $p = 0.95$) ことから、高脂肪食摂取による自発行動量の低下は探索行動に影響を与えないことが示された (Figure 3C)。

また各群共に左右の空のメッシュカップに同程度の探索時間を示した (ND: $p = 0.37$; HFD: $p = 0.29$; および HFD + OXT: $p = 0.95$) ことから、この試験系において左右のメッシュカップの位置は探索時間に影響を与えないことが示された (Figure 3D)。

第2ステージ(社会性の評価)ではND群、HFD群、HFD + OXT群で新奇マウスに対して長い探索時間を示したことから (ND: $p < 0.005$; HFD: $p < 0.005$; および HFD + OXT: $p <$

0.005 ; Figure 3E)、3 群間で社会性に違いは認められず、高脂肪食の摂取及び OXT の投与が社会性に与える影響は認められなかった。

第 3 ステージ(社会認知機能の評価)では ND 群は新奇マウスに対して多くの探索行動を示したが、HFD 群では探索行動の時間に差が見られなかった。一方で、OXT の投与により新奇マウスに対して多くの探索行動を示した (ND : $p=0.042$ 、HFD : $p=0.79$ 、HFD+OXT : $p=0.048$ 、Figure 3F)。これらの結果から高脂肪食の摂取及び OXT の投与は社会性には影響を与えないが、高脂肪食摂取は社会認知機能を低下させ、OXT の投与は低下した社会認知機能を回復させることが示された。

3. 高脂肪食摂取マウスの物体認知機能異常に対する OXT 投与の効果

Object recognition test において(Figure 4A)、ND 群のマウスは既知物体と比較して新奇物体に長い時間探索行動を示したが、HFD 群のマウスでは同程度の探索時間を示した。一方で、OXT 投与群のマウスは既知物体と比較して新奇物体に長い探索時間を示した (ND : $p=0.016$ 、HFD : $p=0.39$ 、HFD+OXT : $p=0.031$ 、Figure 4B)。これらの結果は高脂肪食の摂取はマウスの物体認識記憶を低下させ、OXT の投与はこれを改善することを示した。

Object location test において(Figure 4C)、ND 群のマウスは、既知の場所にある物体と比較して新奇の場所にある物体に対して長い時間探索行動を示したが、HFD 群のマウスでは同程度の探索時間を示した。一方で、OXT 投与群のマウスは既知の場所にある物体と比較し

て新奇の場所にある物体に対して長い時間探索行動を示した (ND: $p=0.006$, HFD: $p=0.86$, HFD+OXT: $p=0.018$, Figure 4D)。これらの結果により高脂肪食の摂取はマウスの物体位置認知機能を低下させ、OXT の投与はこれを改善することが示された。

4. 高脂肪食摂取マウスの不安関連行動に対する OXT 投与の効果

Open field test により不安関連行動を解析した。HFD 群と HFD + OXT 群のフィールドの中央部分における滞在時間は ND 群に比べて減少した (ANOVA: $F_{(2,26)} = 5.45$, $p = 0.011$; Tukey's test. ND vs HFD, $p = 0.039$; ND vs HFD + OXT, $p = 0.014$)。HFD 群と HFD + OXT 群のフィールド中央部分の滞在時間に差は無かった (Tukey's test: $p = 0.931$; Figure 5A)。Freezing time は、ND 群と HFD 群で同等であった (Levene's test: $p = 0.024$, Kruskal-Wallis test: $p = 0.009$, Steel-Dwass test: $p = 0.84$)。一方、HFD + OXT 群は、ND 群と HFD 群と比較して長い Freezing time を示した (Steel-Dwass test: ND vs HFD + OXT, $p = 0.0017$; HFD vs HFD + OXT, $p = 0.038$; Figure 5B)。

5. 高脂肪食摂取マウスのうつ様行動に対する OXT 投与の効果

Tail suspension test と Forced swim test によりうつ様行動を解析した。Tail suspension test では ND 群、HFD 群、HFD + OXT 群の不動時間に差は見られなかった (ANOVA: $F_{(2,26)} = 0.282$, $p = 0.757$, Figure 5C)。Forced swim test では、OXT 群の不動時間は、HFD 群の不動時間より

も短い傾向にあった (ANOVA : $F_{(2,26)}=2.39$, $p=0.112$; Tukey's test : $p=0.093$)。一方で ND 群と HFD 群の不動時間に差は見られなかった (Tukey's test : $p=0.511$; Figure 5D)。

6. 高脂肪食摂取と OXT 投与が嗅覚機能に与える影響

Olfactory habituation/dishabituation test により嗅覚機能を評価したところ、水道水に浸した最初の綿棒を嗅ぐ時間は、3 群間で同等であった (ANOVA : $F_{(2,21)}=1.29$, $p=0.296$; Figure6)。

レモン、バニラ、社会的な匂いを用いた場合、HFD 群の匂いを嗅ぐ時間は ND 群に比べて減少した (レモン[ANOVA : $F_{(2,21)}=13.3$, $p < 0.001$; Tukey test: $p=0.002$]、バニラ[ANOVA: $F_{(2,21)}=8.43$, $p=0.002$; Tukey test: $p=0.006$]、社会的匂い[ANOVA: $F_{(2,21)}=8.16$, $p=0.002$; Tukey test: $p=0.032$])。またこれらの匂いに対する匂いを嗅ぐ時間は HFD 群と HFD + OXT 群で同等であった (Tukey test : レモン $p=0.682$; バニラ $p=0.979$; 社会的匂い $p=0.462$)。

以上のことから OXT 投与は高脂肪食摂取マウスの嗅覚異常を改善しなかった。

	通常食(ND)	高脂肪食(HFD)
	重量比(%)	重量比(%)
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	506.2	0
Maltodextrin10	125	125
Sucrose	68.8	68.8
Cellulose	50	50
Soybean Oil	25	25
Lard	20	245
Mineral Mix	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1H ₂ O	16.5	16.5
Vitamin Mix	10	10
Choline Bitartrate	2	2
Dye	0.05	0.05

Table1. Composition of mice feed

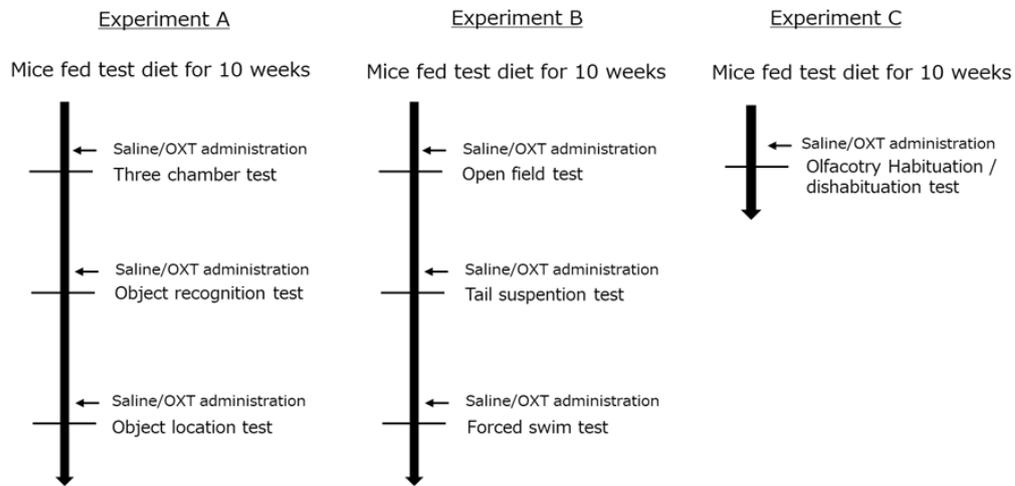


Figure 1. Experimental design

All experiments (A-C) were performed independently. In each experiment, mice were randomly distributed into the following groups: (1) a group fed a normal diet (ND); (2) a group fed a high-fat diet (HFD); and (3) a group fed a high-fat diet and also administrated oxytocin (HFD + OXT). (Experiment A: n = 21, B: n = 10, C: n = 8 mice per group)

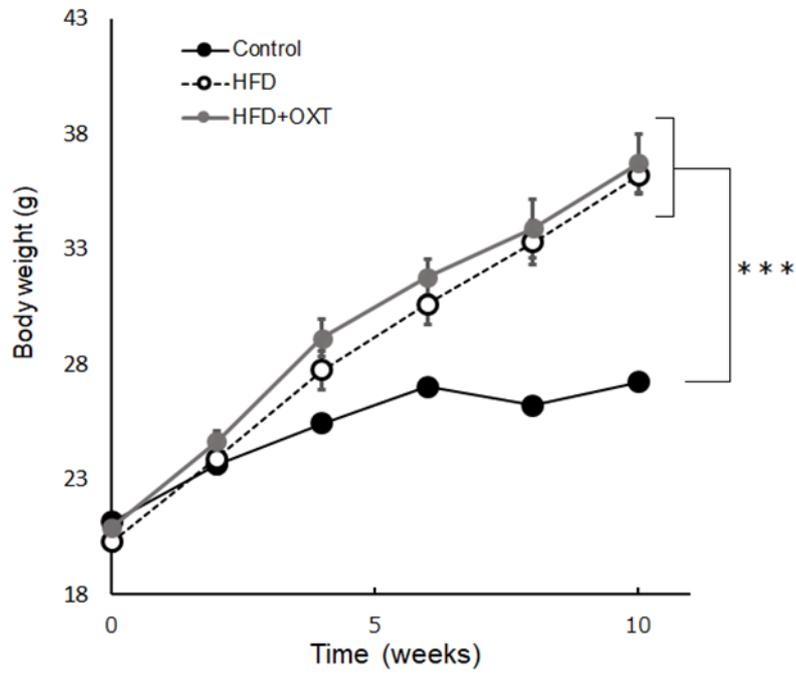


Figure 2. Effect of high-fat diet to body weight

The body weight of each groups before behavioral testing and OXT administration. (n = 8 mice per group). Results are displayed as mean \pm SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005.

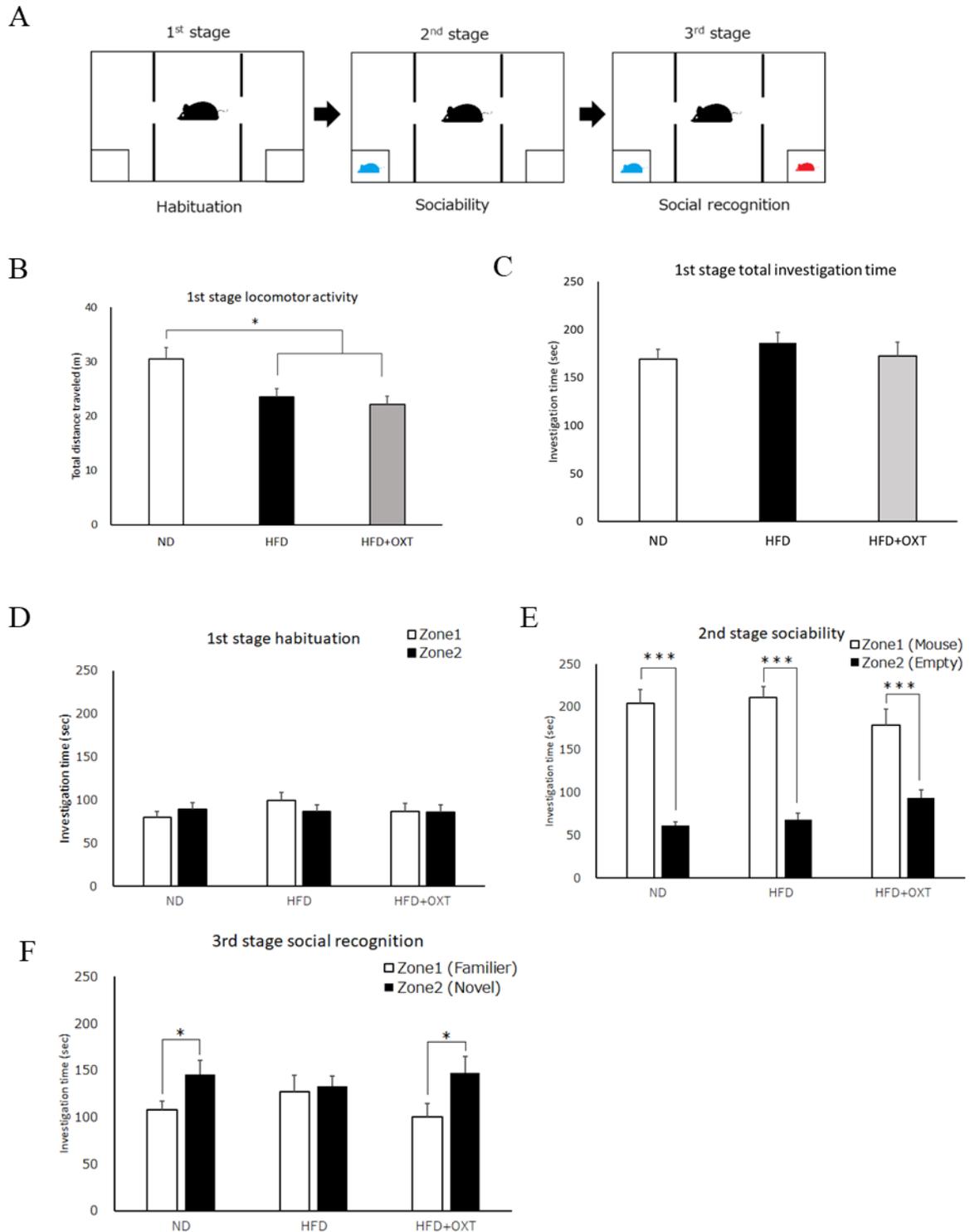


Figure 3. Effect of high-fat diet and oxytocin administration on social interaction and recognition memory

Schematic illustration of the three-chamber test: first stage (habituation); second stage (social interaction) and third stage (social recognition) (A). (B) Locomotor activity. (C-F) Time spent in each zone during 10 min: social interaction (E) and social recognition (F) ($n = 21$ mice per group). Results are displayed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

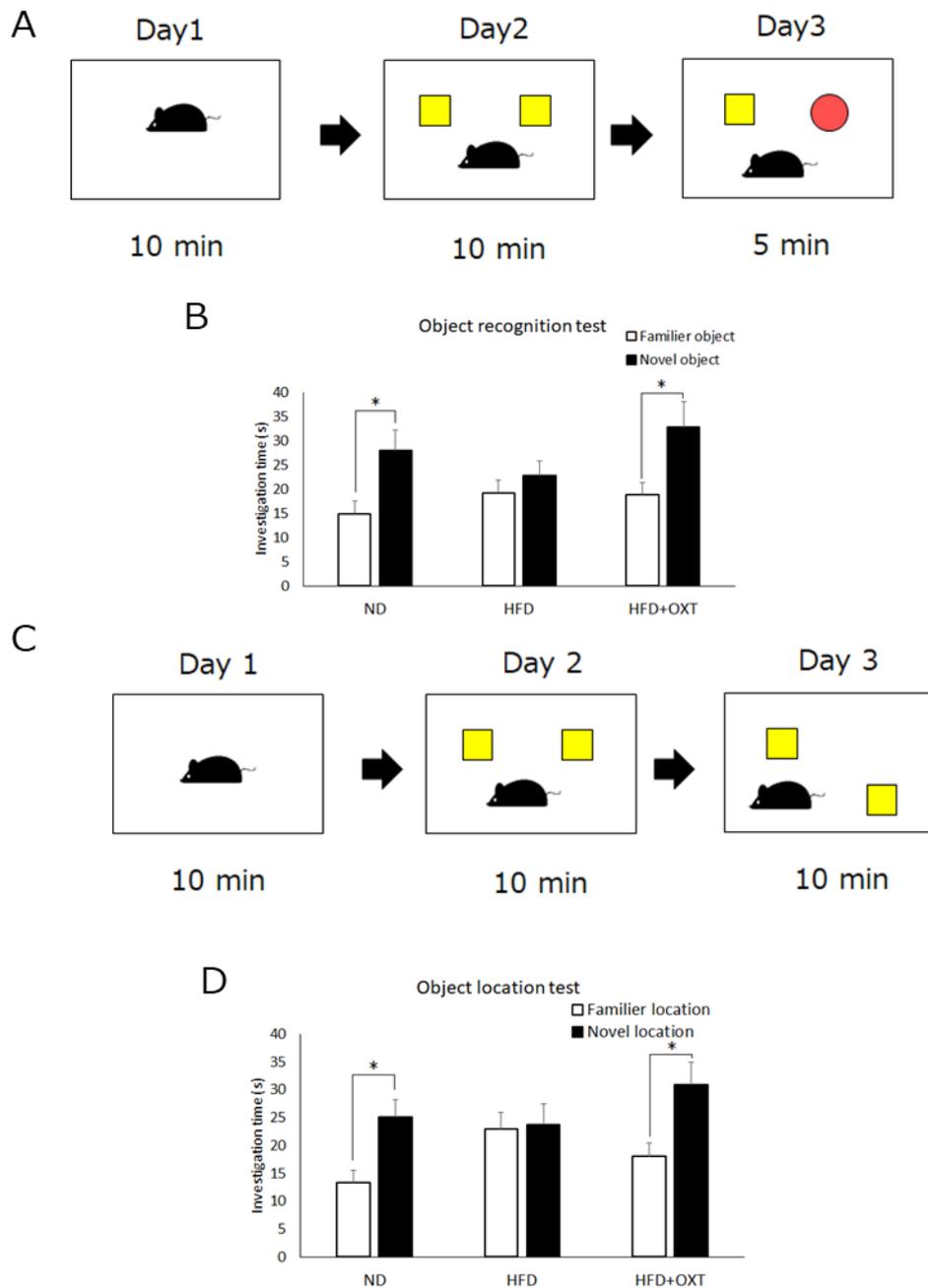


Figure 4. Effect of high-fat diet and oxytocin administration on object recognition memory
 Schematic illustration of object recognition test (A). Time to explore object in day 3 (n = 13 mice per group) (B). Schematic illustration of object location test (C). Time to explore object in day 3 (D; n = 10 mice per group). Results are displayed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

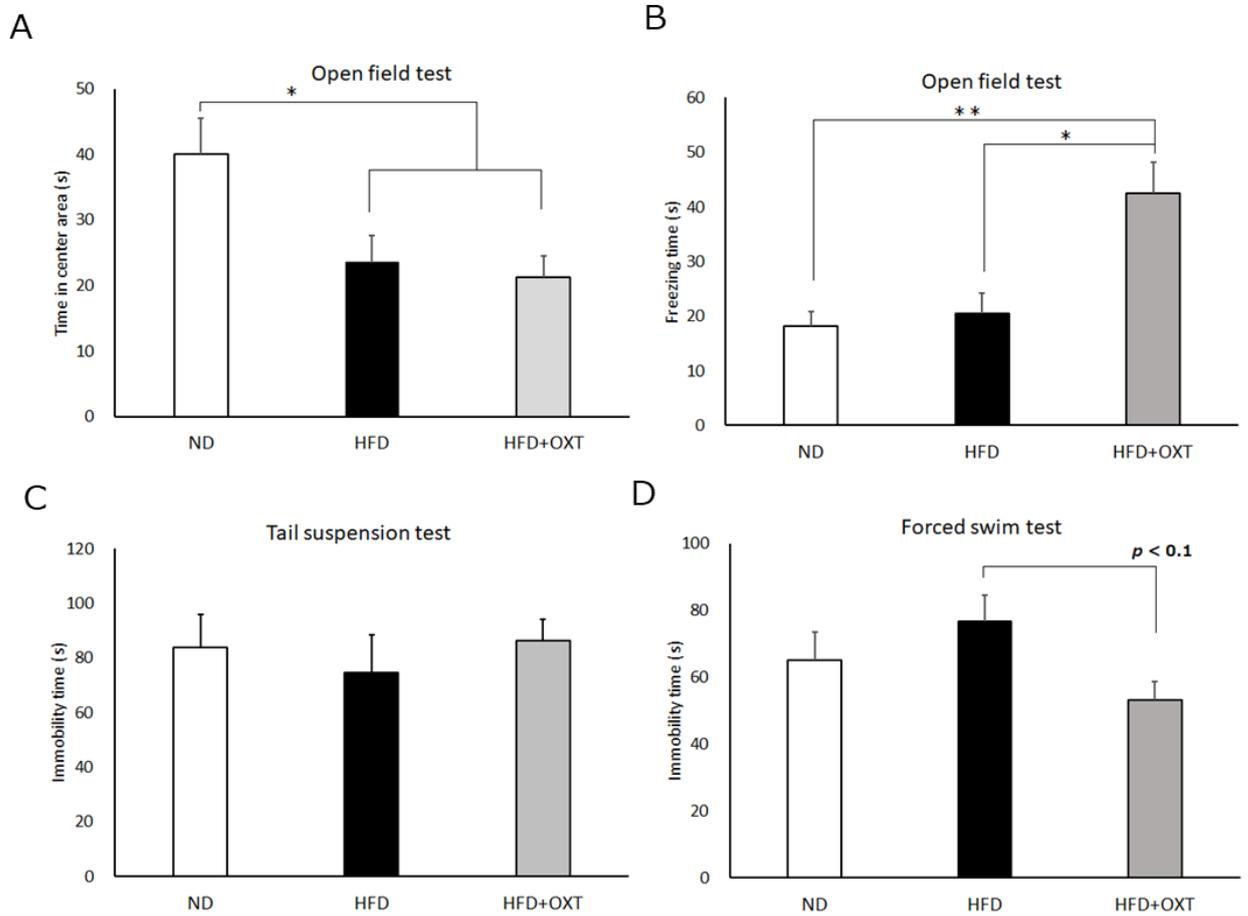


Figure 5. Effect of high-fat diet and oxytocin administration on anxiety behavior, fear-related behavior, and depressive-like behavior

Effect of a high-fat diet and oxytocin administration on the time spent in the center area (A) and on freezing behavior (B) in the open field (n = 9-10 mice per group). Effect of a high-fat diet and oxytocin administration on the immobility time in the tail suspension test (C) and forced swim test (D; n = 9-10 mice per group). Results are displayed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

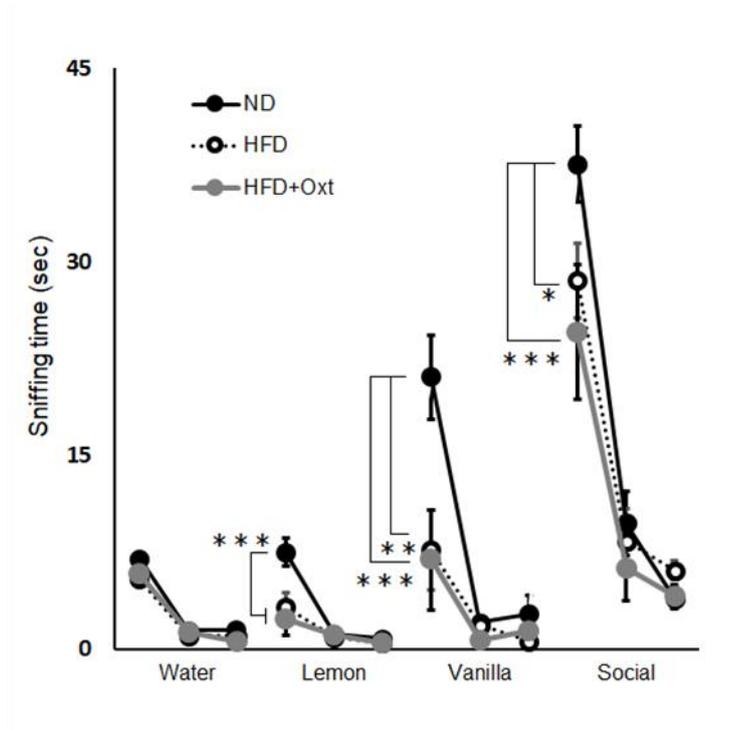


Figure 6. Effect of high-fat diet and oxytocin administration on sensory functions
 Sniffing time for each odor in the olfactory habituation/dishabituation test (n = 8 mice per group). Results are displayed as mean \pm SEM, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005.

第4節 考察

HFD の摂取による肥満は生活習慣病の主要なリスク要因の1つであり、高脂肪食摂取が引き起こす行動異常に対する治療法が求められている。肥満はアルツハイマー病、認知機能低下、うつ病様行動、不安行動などの精神疾患と正の相関があることが知られている。高脂肪食摂取による肥満に起因する精神疾患を予防、治療するには肥満の是正だけでなく、行動異常に対する包括的な治療アプローチが必要となる。オキシトシンの投与は社会認知機能を改善させることが知られていたが、物体認知、空間認知を含む認知機能全般や高脂肪食摂取によって誘発される行動異常に与える影響は不明であった。社会認識機能、物体認知機能、物体位置認知機能、不安行動、恐怖関連行動、うつ行動などの高脂肪食摂取マウスで見られる行動異常は OXT/OXTR システムとの関連が報告されており、また高脂肪食の摂取により血中 OXT レベルが減少する⁵⁴ことから、高脂肪食摂取マウスに見られる行動異常の原因の1つは OXT/OXTR シグナル伝達系の低下である可能性が考えられた。そこで OXT 末梢投与により高脂肪食摂取に起因する行動異常を改善することを試みた。本章では高脂肪食摂取マウスにおいてオキシトシンの投与が認知機能をはじめとする行動異常に与える影響を評価した。その結果、本章では高脂肪食摂取マウスへの OXT の末梢投与により、社会認識、物体認識、物体位置記憶の低下が改善されることを示した。一方、高脂肪食摂取マウスでは末梢 OXT 投与により不安関連行動の1種である Freezing behavior が増加することが見出された。

高脂肪食の摂取により HFD 群と HFD + OXT 群の体重が ND 群に比べて増加し、食餌性肥満が誘導されたことを確認した。HFD の摂取は運動量を減少させたが、Three chamber test の第 1 ステージにおいて運動量の減少は探索行動やオブジェクトの識別に影響を与えないことが示されたため、以降の行動試験で認知機能の評価は可能であると考えられた。またオキシトシン投与後の探索行動量に変化は見られなかったことから、オキシトシンは活動レベルとは無関係に認知機能を回復させていることが示唆された。

高脂肪食摂取マウスでは、物体認識、物体位置記憶、不安行動、抑うつ行動など、先行研究と同様の行動異常が観察された。さらに社会認知機能が高脂肪食摂取マウスで減少していることが示された。高脂肪食摂取マウスの社会認知機能に関しては、社会認識記憶の低下が認められた⁸報告と、低下の認められなかった⁷⁵報告が存在する。これらの結果は Three chamber test のプロトコルの違いに起因する可能性がある。例えばマウスが自由に探索できるチャンバーの面積や行動実験時の照度条件の違いなどが原因として考えられる。

社会的コミュニケーションは社会性を有する動物の基本的な能力であるが、コミュニケーション能力の障害は ASD 患者の中核症状であり診断基準となっている。また、社会的記憶の障害は OXTR KO マウス、Shank3 KO マウス、胎児期 VPA 投与マウスなどの ASD 動物モデルに共通して認められており、ASD 発症のメカニズムを解明し、新たな治療法を開発するために着目されている。一方で出生後の環境要因により社会記憶が悪化する動物モデルはほとんど報告されていない。HFD 飼育マウスモデルでは、出生後の環境要因による社

会的記憶の低下が認められたため、他の ASD の動物モデルとは異なる方法で ASD の症状の一端を反映している可能性がある。ASD は先天性の疾患である一方で高脂肪食摂取による社会認知機能の障害は後天的であることから、詳細は不明でありさらなる研究が必要である。しかしながら、社会認知機能が低下する高脂肪食摂取マウスは自閉症などの社会的認知機能障害を伴う精神疾患のメカニズムや治療法の開発に活用できる可能性がある。

オキシトシンの認知機能改善効果は異なる投与経路でも一貫した効果を示している。

ASD のモデルマウスであるバルプロ酸 (VPA) 処理マウスでは OXT の経鼻投与によって社会認知機能は改善したが、物体認知機能は改善しなかった⁴⁴。Shank3 KO マウスでは脳室内 OXT 投与により社会認識が改善された。さらに、鼻腔内 OXT 投与はストレスを受けたラットの物体認識記憶を改善した。このようにオキシトシンによる認知機能の改善は OXT の投与経路だけでなく、動物モデルにも依存する。

高脂肪食摂取マウスへの OXT の末梢投与は Open field test の中央滞在時間に影響を与えなかった。しかし、先行研究においては普通食で飼育された野生型ラットは OXT の末梢投与により Open field test において不安行動の減少を示すことが報告されている⁷⁶。このことは、OXT の不安行動に与える影響がマウスとラットで異なるか、若しくは高脂肪食によって誘導される不安行動は末梢オキシトシン非感受性である可能性が考えられた。

Freezing time は恐怖の程度を示す指標の一つである。高脂肪食摂取マウスへの OXT の投与により Freezing time が増加することが示された。この結果はオスのラットやヒトの男性に

において OXT が不安と恐怖を増強する可能性があるという先行研究を支持するものである⁷⁷。⁷⁸。しかしながら、OXT は不安関連行動に関して投与量や投与経路によっては異なる効果を示す。例えば OXT を i.c.v.投与で 10 ng/h を 15 日間投与した場合には不安を惹起させる作用がある一方⁵⁰、腹腔内投与で 10 mg/kg を投与した場合には抗不安作用が見いだされている⁷⁹。また不安行動を評価する行動試験である 4 プレート試験では、3mg/kg のオキシトシンの腹腔内投与では効果がなかったが、10mg/kg のオキシトシンでは抗不安作用があった⁷⁹。本研究におけるオキシトシンの不安誘発効果は、Open field test の中央滞在時間では認められず、Freezing time のみで認められた。このことから、OXT の不安行動に与える影響は複数の行動試験や用量を用いた多面的な評価が必要である。

高脂肪食摂取マウスの Tail suspension test と Forced swim test による鬱様行動の評価については、先行研究において、高脂肪食摂取によってうつ様行動が増加したとする研究²⁵と増加しないという研究⁸があり結果に一貫性がみられない。うつ様行動は行動テストのバッテリーや周辺環境のような実験的要因によって異なる可能性がある。強制水泳試験では、高脂肪食摂取マウスに OXT を投与すると、抗うつ効果の傾向が見られた。この結果は、先行研究における OXT の抗うつ効果と一致している⁴⁷。

マウスが個々のマウスを識別するための手掛かり(Cue)の1つとして嗅覚が挙げられる⁸⁰。そのため高脂肪食摂取とオキシトシン投与が嗅覚機能に与える影響を評価した。先行研究⁸では、高脂肪食の摂取により非社会的な匂いに対する嗅覚が低下すると報告されていたが、

本研究ではさらに社会的な匂い(他個体の匂い)に対する嗅覚も低下することが明らかとなった。一方、OXT の末梢投与により高脂肪食摂取マウスの非社会的および社会的な匂いに対する嗅覚障害は回復しなかった。これらの結果は、OXT は嗅覚機能以外のメカニズムによって社会認知機能を回復している可能性を示している。

第2章 高脂肪食摂取マウスにおける OXT の認知機能改善メカニズムの解明

第1節 緒言

第1章にて、OXT の腹腔内投与が高脂肪食摂取マウスの社会的・物体認知機能を改善させ、不安様行動の1つである Freezing behavior を増加させることが示された。これらのメカニズムの解明を目指して、高脂肪食の摂取や末梢投与した OXT が脳内に与える影響を解析した。脳内の解析は社会認知機能に関連が報告されている海馬^{37,38}、側方中隔⁸¹、前頭前野、内側扁桃、視床下部について行った。

第2節 実験方法

1. 動物と試験食

第1章と同様に行った。

2. OXT の投与

第1章と同様に行った。

3. サンプリング

RNA の発現解析を行うためマウスへの OXT 投与 105 分後に頸椎脱臼にて安楽死させた後、社会認知機能の関連領域である前頭前野、側方中隔、内側扁桃核、海馬、視床下部の脳サンプルを採取した。脳サンプルの採取はブレインマトリクスで脳をスライスした後に、冷 DEPC PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.8mM KH₂PO₄, 0.1% Diethylpyrocarbonate)中で対象の脳領域をピンセットやハサミで切り出すことで行った。切り出した脳サンプルは RNA later (Thermo Fisher Scientific)に浸漬した後に、翌日 RNA later を除去し RNA の抽出を行うまで-80°Cで保存した。

脳サンプルの採取と同時に採血を行った。血液は凝固させた後に 4 °C 3000rpm で 10 分間遠心分離して血清画分を分離した。血清画分は-80°Cで保存した。

また免疫化学染色を行うため、マウスへの OXT 投与 135 分後に還流固定にて脳サンプル

を採取した。マウスに 2%イソフルランを吸入させ麻酔を施した。十分に麻酔が効いていることを確認した後に、マウスの心臓を露出させ左心室にポンプ接続した針を刺し、右心房をハサミで切断、ポンプにて PBS(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.8mM KH₂PO₄)を全身に灌流させた。PBS を十分に灌流させた後、4% パラホルムアルデヒド (in PBS) を 15 分間灌流させ、全身の固定を行った。脳を取出し、4% パラホルムアルデヒド (in PBS) で一晩後固定を行った。後固定を行った脳を PBS に移し 4 °Cで保存した。

4. RNA の単離と Real-time PCR

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen)を用いて脳組織から Total RNA を単離し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) を用いて逆転写 (RT) を行った。次いで、Thermal Cycler Dice Real Time System III (タカラ、京都、日本) を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。各サンプルについて、 β -アクチンを用いて並列反応を設定した。各反応は Duplicate で行った。リアルタイム PCR 解析では、以下のプライマーを使用した。

OXTR(NM_001081147):

Forward(GGAGCGTCTGGGACGTCAAT), Reverse(AGGAAGCGCTGCACGAGTT);

OXT(XM_006498910):

Forward(TGGCTTACTGGCTCTGACCT), Reverse(AGGCAGGTAGTTCTCCTCCTG);

β -actin(NM_007393):

Forward(AGCCTTCCTTCTTGGGTA), Reverse(GAGCAATGATCTTGATCTTC);

c-fos(NM_010234):

Forward(CAAAGTAGAGCAGCTATCTCC), Reverse(CTCATCTTCAAGTTGATCTGT).

5. 免疫化学染色

固定後 4°C で PBS 中に保存していた脳をスクロース液(30% スクロース in PBS)に入れ脳が液中で沈むまで 72 時間以上 4°C で保存した。スクロース液中で脳が沈んだことを確認した後、脳を取り出し OCT Compound (サクラファインテック社製)で封入した。30 μ m 間隔の脳スライスをクライオスタット (ライカバイオシステムズ) を用いて調製した。調整した切片を 4°C の PBS 中で保存した。切片を PBS で 10 分間 3 回洗浄し、PBST(0.3%Triton X-100, in PBS) 中で 30 分間インキュベート、10 分間 PBS で洗浄した。その後、不活化 Buffer(5%MeOH, 0.2%Triton X-100, 1.5%H₂O₂ in PBS)で 60 分間インキュベートして、切片の内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。切片を PBS で 10 分間洗浄した後、Blocking Buffer (0.3%TritonX-100, 10% Normal Horse Serum in PBS)で 30 分間インキュベートした。

次に 1 次抗体として rabbit Anti-Oxytocin antibody (ImmunoStar, Hudson) を Blocking Buffer に 1:1000 となるように希釈し 4°C で 24 時間インキュベートした。その後、切片を PBS で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体 (ヤギ抗ウサギ I g G ; 1 : 5 0 0 希釈 ; G-2 1 2 3 4 ; サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック) を用いて 4°C で 2 4 時間インキュベートした。切片を顕微鏡 (B Z-X 7 0 0 ; キーエンス株式会社) で観察した。オキシ

トシン陽性細胞の数は、マウス群を盲検化した実験者によって手動で計数し、各マウスからの3枚のスライドの平均値を用いた。

6. 血中オキシトシンの測定

メーカーのプロトコルに従って、C-18 カラムを用いて血液中の血清から OXT を抽出した。

抽出された OXT レベルは、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キット (変動係数<13.3%、変動係数<20.9%、Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, NY, USA) を用いて測定した。

7. 統計解析

第1章と同様に行った。

第3節 結果

1. 高脂肪食の摂取と OXT 投与が OXTR、c-fos 遺伝子の mRNA 発現に与える影響の解析

前頭前野、側部中隔、内側扁桃、視床下部、海馬を含む社会認識関連核における脳 OXTR

および c-fos 遺伝子の mRNA 発現を解析した。前頭前野 (ANOVA : $F_{(2,20)}=1.49$, $p=0.24$)、

側方中隔 (ANOVA : $F_{(2,19)}=1.14$, $p=0.893$) および内側扁桃 (ANOVA : $F_{(2,19)}=3.17$, $p=$

0.732) では、HFD およびその後の OXT の投与および末梢投与は、OXTR の発現に影響を与

えなかった (Figure 7A-C)。視床下部では、OXT 投与マウスの OXTR mRNA 発現は、HFD

群のマウスに比べて減少した (ANOVA : $F_{(2,21)}=5.45$, $p=0.12$; Tukey test : $p=0.01$; Figure 7D)。

また海馬では HFD 群のマウスと OXT 群のマウスの OXTR mRNA 発現は、ND 群のマウス

に比べて低下した (ANOVA : $F_{(2,24)}=6.4$, $p=0.006$; Tukey test : $p=0.015$, $p=0.011$; Figure

7E)。一方、高脂肪食の摂取や末梢 OXT 投与は、前頭前野における c-fos 遺伝子発現に影響

を与えなかった (ANOVA : $F_{(2,20)}=1.83$, $p=0.18$)、側中隔 (ANOVA : $F_{(2,24)}=1.98$, $p=0.159$)、

内側扁桃 (ANOVA : $F_{(2,22)}=5.57$, $p=0.557$)、視床下部 (ANOVA : $F_{(2,20)}=0.66$, $p=0.936$;

Figure 7F-I) では、c-fos 遺伝子の発現に影響を与えなかった。海馬では、HFD マウスおよび

OXT 投与マウスは、ND マウスに比べて c-fos mRNA の発現低下を示した (ANOVA : $F_{(2,23)}$

$=7.62$, $p=0.003$; Tukey test : $p=0.017$, $p=0.003$; Figure 7J)。

2. 高脂肪食の摂取と OXT 投与が OXT 遺伝子の mRNA 発現に与える影響の解析

視床下部は OXT を合成する脳の領域の 1 つであり、視床下部の OXT 遺伝子の mRNA の発現を解析した。視床下部では高脂肪食の摂取は OXT 遺伝子発現に影響を与えなかった。一方、OXT 群では、OXT の遺伝子発現は、HFD 群のそれと比較して増加した (ANOVA : $F_{(2,24)} = 3.87$, $p = 0.035$; Tukey test : $p = 0.049$; Figure 7K)。これにより末梢 OXT 投与により高脂肪食摂取マウスの OXT 遺伝子発現が増加したことが示された。

3. 高脂肪食の摂取と OXT 投与が体重と血中 OXT に与える影響の解析

高脂肪食を摂取したマウス(HFD 群、HFD+OXT 群)の体重は、通常食を摂取したマウス (ND 群) と比較して増加した (Kruskal-Wallis test : $p < 0.001$; Steel-Dwass 検定 : $p < 0.001$)。OXT または生理食塩水を投与した後の血清 OXT を分析したところ、OXT 投与マウスでは、ND マウスおよび HFD マウスに比べて血清 OXT のレベルが上昇した (Kruskal-Wallis 検定 : $p < 0.01$; Steel-Dwass 検定 : $p < 0.001$, $p < 0.001$; Figure 7L)。

4. 高脂肪食の摂取と OXT 投与が PVN の OXT 発現に与える影響の解析

PVN における OXT 発現を免疫染色にて解析した (Figure 8A:ND、7B:HFD、7C:HFD+OXT)。OXT を投与したマウスでは、HFD を投与したマウスに比べて、PVN における OXT 発現細胞数が増加していた (Kruskal-Wallis 検定 : $p < 0.05$; Steel-Dwass 検定 : $p < 0.05$) (Figure 7D)。

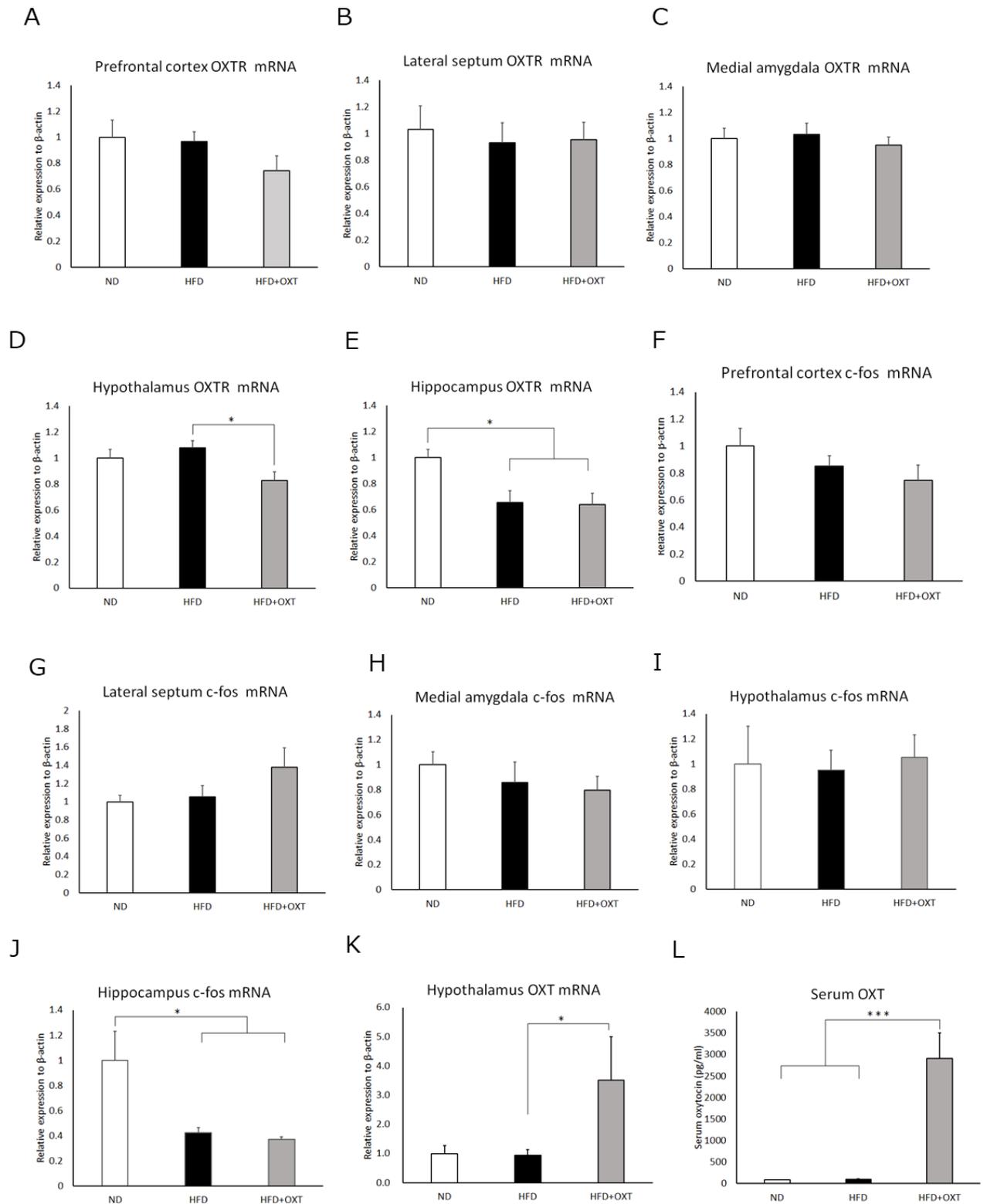


Figure 7. Effect of high-fat diet and oxytocin administration on mRNA expression and serum OXT
 Expression of *c-fos*, *OXTR*, and *OXT* mRNA was measured by real-time PCR (n = 6-10 mice per group). *c-fos* mRNA expression in social recognition-related brain areas (prefrontal cortex, lateral septum, medial amygdala, hypothalamus, and hippocampus) (A-E). *OXTR* mRNA expression in the above-mentioned brain regions (F-J). *OXT* mRNA expression in the hypothalamus (K). Serum oxytocin (L). Results are displayed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$.

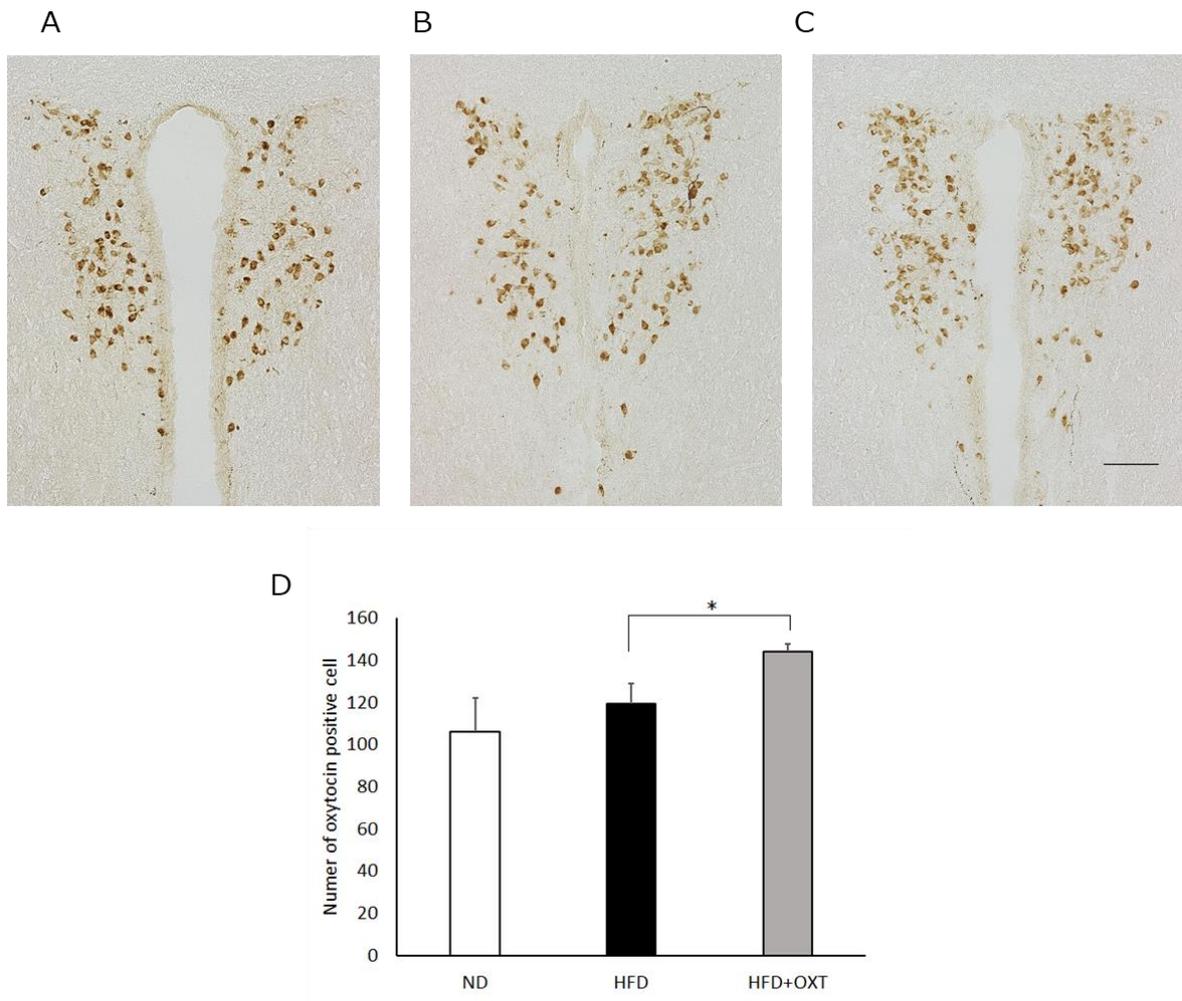


Figure 8. Effect of high-fat diet and oxytocin administration on OXT expression in the PVN

Expression of OXT protein in the PVN was measured by immunohistochemistry. Photographs showing OXT immunoreactivity (brown cell body profiles) in the PVN (A:ND, B:HFD, C:HFD+OXT mice). Number of OXT expressing cells after IP injection of OXT in PVN (n = 4-5 mice per group) (D). Scale bar: 100 μ m. Results are displayed as mean \pm SEM, * p < 0.05.

第4節 考察

先行研究において OXT/OXTR システムと社会認識機能、物体認知機能、物体位置認知機能、不安行動、恐怖関連行動、うつ行動が関係していることが報告されており、これらの行動異常が高脂肪食摂取マウスにも見られることから、OXT/OXTR システムが高脂肪食摂取マウスの行動異常メカニズムに関与していると考えられた。そこで高脂肪食を給餌したマウスの脳内 OXT、OXTR、c-fos の mRNA 発現を評価した。

高脂肪食摂取により海馬の OXTR と c-fos の発現が低下していた。c-fos は最初期遺伝子の 1 つであり、神経活性化のマーカーとして用いられている。海馬の神経新生は CA3 の pyramidal neuron に発現している OXTR によっても制御されており⁸²、高脂肪食摂取マウスにおいて OXTR の発現低下が海馬の機能低下につながっている可能性が考えられた。また海馬の OXTR は社会認知機能に必須であることから³⁶、海馬の OXTR の発現低下が社会認知機能の低下の原因の 1 つである可能性が考えられた。また海馬は物体認知機能を担う脳領域の 1 つであり、高脂肪食摂取による海馬の c-fos の低下は物体認知機能の低下の原因の 1 つである可能性が考えられた。海馬に発現する OXTR は神経新生をはじめ社会認知機能の維持に必要であることから、海馬の OXTR 発現ニューロンが高脂肪食摂取マウスへの OXT 投与による社会認知機能の回復に関与している可能性が考えられたが、本研究では OXT の投与が海馬の OXTR、c-fos に与える影響は認められなかった。今後、OXTR 発現ニューロンが検出可能な OXTR-EYFP ノックインマウス⁴⁹を用いて、末梢 OXT 投与が海馬

OXTR ニューロンの活性化に与える影響を評価する必要がある。

末梢 OXT 投与は高脂肪食摂取マウスの視床下部における OXTR mRNA の発現を減少させた。先行研究では OXT を 10 ng/h で 15 日間、慢性的に側脳室に注入すると、背側中隔 (DLS)、基底側扁桃、内側扁桃、扁桃核 (CeA) における OXTR のリガンド結合能が減少し、不安行動が増加する⁵⁰。また OXT の慢性的な脳室内投与はラットにおける Arc および VMH の OXTR のダウンレギュレーションを引き起こす⁵³。これらの研究は、OXT/OXTR 系における負のフィードバック機構の存在を示唆しており、本研究の結果はこれを支持しているように考えられた。

高脂肪食摂取マウスへの OXT の末梢投与は視床下部における OXT mRNA 発現を増加させた。さらに、PVN ではオキシトシン陽性細胞が増加した。中枢 OXT 投与が視床下部の OXT 合成および血流への放出を誘導する⁸³ことを考えると、これらの結果は中枢だけではなく末梢 OXT 投与によっても中枢の OXT の合成を促進すること示していると考えられる。OXT のポジティブフィードバックについては、PVN と SON の OXT 発現ニューロンにも OXTR が発現していることから、正のフィードバックループが示唆されている⁸⁴。本研究のデータは末梢投与した OXT が視床下部の OXT mRNA の発現を上昇させ、OXT 産生を促進したところから OXT のポジティブフィードバックの存在を支持するものであった。

血中の OXT 濃度への高脂肪食の摂取による影響は認められなかったが、OXT の投与により血中 OXT 濃度が上昇していた。しかしながら、OXT 投与により増加した OXT が内因性

OXT の増加に因るものか、投与した OXT 自体が血中に移行し濃度が上昇しているかは不明である。先行研究では高脂肪食摂取マウスでは血中 OXT が減少していた⁵⁴。一方、本研究では高脂肪食は血中の OXT 濃度に影響を与えなかった。OXT は加齢により減少することが知られておりマウスの年齢が結果に影響を与えた可能性が考えられる。

以上のように高脂肪食摂取による社会認知機能の低下の原因として海馬の OXTR と c-fos の発現の低下が1つの可能性として考えられた。また末梢 OXT の投与による内因性の OXT の合成若しくは分泌・投射の促進が社会認知機能の改善に寄与した可能性が考えられた。

第3章 認知機能改善食品素材の開発を目指した天然物由来 OXTR アゴニストの探索

第1節 緒言

前章までの結果から、末梢投与した OXT は社会認知機能と物体認知機能を改善し、さらに中枢の mRNA 発現を上昇させ、OXT の産生を促進させることが明らかになった。OXT の末梢投与により認知機能が改善したことから、OXTR アゴニストを末梢投与することで同様の効果が得られる可能性が考えられた。

オキシトシンはペプチドであり、経口投与により胃で消化されるため経口投与には適さない。高脂肪食摂取に起因する認知機能障害を改善する、安価に日常的に摂取可能な機能性食品素材の開発を目指して天然物由来 OXTR アゴニストの探索を行った。

第2節 実験方法

1. Dual Luciferase Assay (DLA)用ベクターの調製

OXTR の活性化を検出するために、Dual Luciferase Assay (Promega)を用いた。pGL4.30 と pF9A CMV hRluc-neo Flexi Vector (Promega)に ヒト由来 OXTR cDNA が導入された pF9A OXTR (+) vector を Promega 社及びかざさゲノムテクノロジーズより購入した。また擬陽性の確認を行うため pF9A OXTR vector から OXTR cDNA を除去した pF9A OXTR (-) vector を調製した。pF9A OXTR (-) vector は pF9A OXTR (+) vector を制限酵素 SgfI (Promega)と PmeI (Promega)で処理し、DNA Ligation Kit (Takara)でセルフライゲーションさせることで得た (Figure 9A)。

2. DLA 用細胞株の樹立

細胞はヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞を用いた。培地は DMEM high glucose medium (Sigma)に Penicillin-Streptomycin (Gibco) 終濃度 各 100U/ml、牛胎児血清 FBS (Gibco) 終濃度 10%、Non-essential amino acid(NEAA) (Gibco) 終濃度 1%を含むもので行った。

pF9A OXTR (+) vector と pGL4.30 を安定的に発現する細胞株の樹立を行った。pGL4.30 を Fugene HD transfection reagent (Promega)を用い HEK293 細胞に導入し、その後 Hygromycin (Thermo Fisher Scientific)を終濃度 500 μ g/ml となるように培地に添加し、10 日間以上薬剤選択を行った。薬剤選択により得られたコロニーをピックアップし、pGL4.30 が安定的に発現

する細胞株を得た。次に、同様に pF9A OXTR (+) vector を Fugene HD transfection reagent を用いて pGL4.30 安定発現細胞株に導入し、G418 (Roche) と Hygromycin をそれぞれ終濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した培地で培養し 10 日以上薬剤選択を行った。薬剤選択により得られたコロニーをピックアップし、pF9A OXTR (+) vector と pGL4.30 が Stable に発現する細胞株(以下 OXTR(+))株を得た。pF9A OXTR (-) vector と pGL4.30 が Stable 発現する細胞株(以下 OXTR(-))株についても同様の方法により得た。

3. Dual Luciferase Assay

HEK293 細胞、OXTR (+)細胞株、OXTR(-)細胞株を 5×10^4 cell/well となるようにコラーゲンコートした白色 96well plate に播種した。翌日、培地を除去し、調整した下記の 4 種類の培地を 75 $\mu\text{l/well}$ となるように添加した。培地は DMEM high glucose medium (Sigma) に Penicillin-Streptomycin (Gibco) 終濃度 100U/ml、牛胎児血清 FBS (Gibco) 終濃度 10%、Non-essential amino acid(NEAA) (Gibco) 終濃度 1%、G418 (Roche) と Hygromycin をそれぞれ終濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ を含むもの培地を用いた。Blank は上述の培地に DMSO が終濃度 0.5%となるように添加し調整した。ポジティブコントロール 1 は NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) response element を活性化させる PMA(ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート:Sigma)と Ionomycin (Sigma)を終濃度 100ng/ml と 1 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。ポジティブコントロール 2 は MQ に溶かした OXT を終濃度 10^{-5}M となるように DMEM に溶解さ

せ、さらに DMSO を終濃度 0.5%となるように添加した。被験サンプルは DMSO に溶けた被験サンプルを DMEM に 0.5%の濃度になるように溶かした。それぞれの培地 75 μ l を添加後 4 時間 37°C 5%CO₂ 下でインキュベートし、その後 Dual-Luciferase Reporter Assay System と発光検出プレートリーダー(Tecan, infinit PRO 200)を用いてホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼのシグナルを検出した。

[調整した培地]

Blank: DMEM + 0.5% DMSO

ポジティブコントロール 1 : DMEM + PMA + Ionomycin

ポジティブコントロール 2 : DMEM + Oxytocin

被験サンプル : DMEM + 0.5% 被験サンプル

4. OXTR アンタゴニスト処理

OXTR アンタゴニストを加える場合は被験サンプルを含む培地を入れる 1 時間前に OXTR のアンタゴニストである L-371,257 (Tocris) を終濃度 1×10^{-6} M となるように DMEM に添加し前処理を行った。前処理後、被験サンプルを添加した培地に L-371,257 を終濃度 1×10^{-6} M となるように共添加した。シグナルの評価は上記と同様に行った。

5. DLA データ処理

DLA system によりホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの発現量を検出した。ウミシイタケルシフェラーゼの発現は NFAT response element の下流にあり、OXTR シグナルの活性化によって誘導されるシグナルである。一方でホタルルシフェラーゼは OXTR シグナルに関係なく恒常的に発現しており、ホタルルシフェラーゼの発現により細胞濃度や細胞毒性を補正することが出来る。

HEK293 細胞に Blank 液を添加したシグナル値はバックグラウンドになるため、各シグナル値から差し引いた。その上で、各ウェルにおいてウミシイタケルシフェラーゼのシグナル値 / ホタルルシフェラーゼのシグナル値となるようにシグナル値の計算を行った。

さらに OXTR(+) 細胞株 に Blank 液を添加したシグナル値を 1 とした際の被験サンプルのシグナル値を算出し、これを各被験サンプルの最終的なシグナル値とした。すなわち最終的に算出したシグナル値が 1 であれば、Blank と同等で NFAT response element の活性化起きておらず、1 より高ければ NFAT response element の活性化が起きていると判断される。

6. サンプルの評価

京都薬科大生薬学分野 松田教授より分与頂いた R₁-barrigenol を用いて以下の 3 つの実験を行った。

実験 1. OXTR(+)細胞株を用いて OXT の容量反応性を評価することで DLA が OXTR ア

ゴニスト活性を評価出来ているかを確認した。OXT は終濃度 10^{-3}M ~ 10^{-10}M となるように調製した。

実験2. OXTR(+)細胞株を用いて R₁-barrigenol の OXTR アゴニスト能と OXTR アンタゴニストによるシグナルへの影響を評価した。R₁-barrigenol は終濃度 10^{-5}M となるように調製した。

実験3. OXTR(+)細胞株を用いて R₁-barrigenol の OXTR アゴニスト能の濃度依存性を評価した。R₁-barrigenol は終濃度 10^{-4}M ~ 10^{-7}M となるように調製した。

実験4. OXTR(-)細胞株を用いて R₁-barrigenol の OXTR 非特異的シグナルについて評価した。R₁-barrigenol は終濃度 10^{-4}M ~ 10^{-7}M となるように調製した。

第3節 結果

1. DLA

構築した OXTR(+) 細胞株を用いて OXT の OXTR アゴニスト活性を評価したところ容量反応性が確認され DLA が機能していることを確認した(Figure 9B)。京都薬科大学生薬学分野から分与頂いた植物エキスイブラリを評価したところ、R₁-barrigenol に OXTR アゴニスト活性が確認された。さらに、R₁-barrigenol の OXTR アゴニスト活性が OXTR アンタゴニストによってキャンセルされることが確認された(Figure 9C)。また OXT の添加によってシグナルが上昇し、OXTR アンタゴニストによってそのシグナルが低下していることから DLA により OXTR アゴニスト活性が評価出来ていることが確認されている(Figure 9C)。

さらに R₁-barrigenol の OXTR アゴニスト活性に濃度依存性が確認され、また、OXTR(-)細胞株を用いて OXTR 非依存的なシグナルについて検討したところ、OXTR(-)ではシグナルが検出されなかったことから R₁-barrigenol の添加によるシグナル上昇は OXTR 依存的なシグナルであり R₁-barrigenol は OXTR アゴニスト活性を有することが示された(Figure 9D-E)。

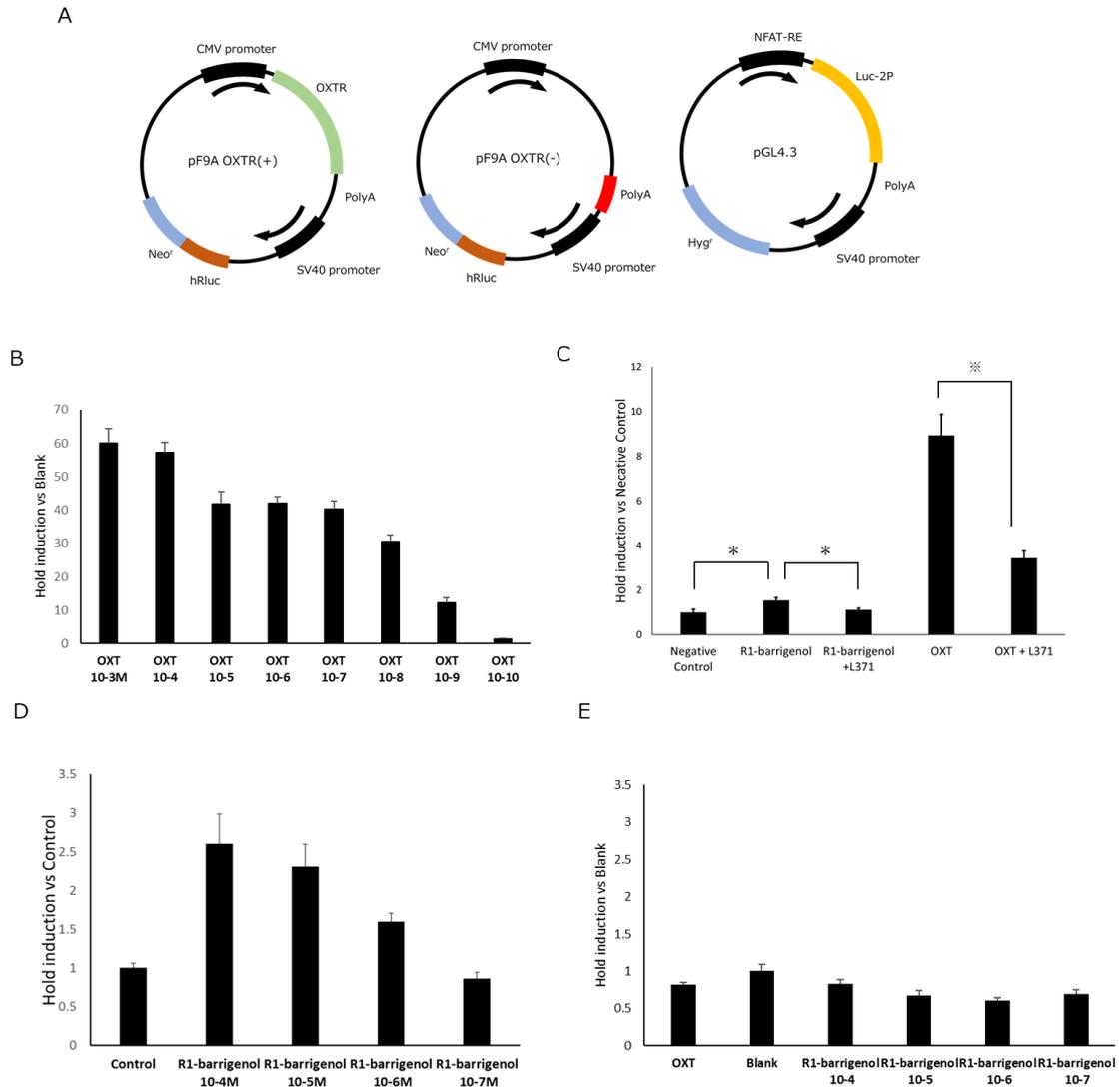


Figure.9 The screening for natural OXTR agonists by dual luciferase assay.
 A. Vector construct for DLA B,C,D. Evaluation of OXTR agonist activity of R₁-barrigenol by DLA.
 E. Evaluation of OXTR- independent activity of R₁-barrigenol.
 Results are displayed as mean ± SEM, * Fisher's PLSD ($p < 0.05$) ※ t-test ($p < 0.05$)

第4節 考察

これまでに天然物由来の OXTR アゴニストは報告されていなかったが、本章では DLA を用いて天然物由来の OXTR アゴニストの候補物質を発見することに成功した。

OXTR の安定発現細胞株である OXTR(+)細胞株を用いて、R₁-barrigenol の OXTR アゴニスト活性を評価したところ R₁-barrigenol の添加によって Blank に比べてシグナルが上昇し、その上昇は OXTR アンタゴニストの添加によってキャンセルされた。またその活性には濃度依存性が確認された。

本研究で用いた DLA は OXTR の下流シグナルであるカルシウムイオンに応答して活性化される NFAT response element を使用して OXTR の活性化を評価している。そのため OXTR 以外のカルシウム動員系の GPCR の活性化やイオンチャンネルの活性化や様々な刺激によってもシグナルが上昇する可能性がある。そのため、OXTR を遺伝子導入により発現していない OXTR(-)細胞株を用いて擬陽性の確認を行ったところシグナル上昇は認められなかった。以上のことから OXTR(+)細胞株における R₁-barrigenol によるシグナル上昇は OXTR 依存的なシグナルであり、R₁-barrigenol が OXTR アゴニスト活性を有することが示された。

今後は R₁-barrigenol の OXTR アゴニスト活性を EC₅₀ などの薬理学パラメーターにより評価を行い、OXT や既存の OXTR アゴニストとの比較を行う必要がある。現段階で得られている OXT と R₁-barrigenol の容量反応曲線を比較すると Hold induction で示される R₁-barrigenol の OXTR アゴニスト活性は OXT のそれと比較して低く、R₁-barrigenol は OXTR

のパーシャルアゴニストである可能性が考えられた。R₁-barrigenol が OXTR のパーシャルアゴニストである場合、R₁-barrigenol が OXTR と相互作用することで本来のリガンドである OXT の結合を阻害し OXTR アンタゴニストとして機能する可能性も考えられた。また OXTR と類縁のバソプレシン受容体(V1aR)同様の可能性が考えられた。しかしながら、現段階で R₁-barrigenol と OXTR の結合性については不明であり、また生体内においても R₁-barrigenol が直接 OXTR に作用するか、内在性の OXT を誘導することで機能を発揮するかは不明であり、今後の解析が必要である。

アゴニストとは受容体に結合し活性化する物質であり、現時点では R₁-barrigenol の OXTR への結合性については評価できておらず、R₁-barrigenol が OXTR アゴニストと断定は出来ない。今後は R₁-barrigenol と OXTR の結合についても検討を行い、R₁-barrigenol の OXTR アゴニストとしての評価を行う予定である。

また、R₁-barrigenol の構造類縁体の OXTR アゴニスト活性を評価し、構造活性相関を検討することにより、より OXTR アゴニスト活性が強い化合物の探索を行うことができると考えられる。実用化の観点では R₁-barrigenol が生体内で機能を有するか評価を行う必要があり、動物試験による OXTR アゴニスト能の評価が必要と考えられた。

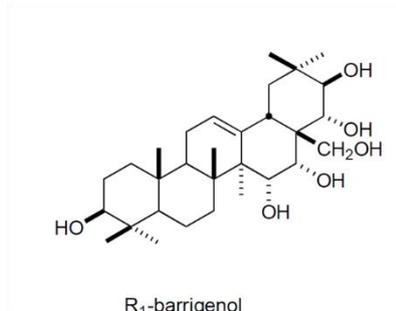
R₁-barrigenol は茶(*Camellia sinensis*)の花⁸⁵やトベラ(*Pittosporum tobira*)の葉や実⁸⁶に含まれるトリテルペン類の 1 種である(Figure10.A)。茶花中には chakasaponin I, chakasaponin II, chakasaponin III, desacyl-chakasaponin II などの配糖体として、トベラ中には 21-*O*-angeloyl-R₁-

barrigenol などのアシル化体として存在する(Figure10.B)。これまでに R1-barrigenol の体内動態に関する報告は無いが、配糖体は腸内細菌によってアシル化体は体内のエステラーゼによって加水分解され吸収されるとされ R₁-barrigenol は配糖体、アシル化体の形で摂取しても体内に吸収される可能性が考えられる。

R1-barrigenol の機能性についてはほとんど報告されていないが、バクテリアに対する抗菌作用が報告されている⁸⁷。R₁-barrigenol の誘導体である 28-O-isobutyryl-21-O-angeloyl-R1-barrigenol と 3-O-β-D-6-O-methylglucuronopyranosyl-21,22-di-O-angeloyl-R1-barrigenol に神経抗炎症作用があると報告されており⁸⁸、R₁-barrigenol が抗炎症作用を持つ可能性が考えられた。

R₁-barrigenol の毒性についてはこれまでに報告されていないが、R1-barrigenol の誘導体である 28-O-[β-l-6-rhamnopyranosyl]-R1-barrigenol に毒性(LD50 = 1.11 ± 0.23 mg/kg)が報告されている⁸⁹ため、R₁-barrigenol についても毒性の評価が必要と考えられた。

A



B

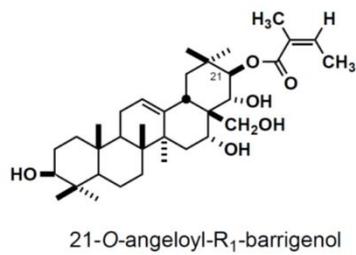
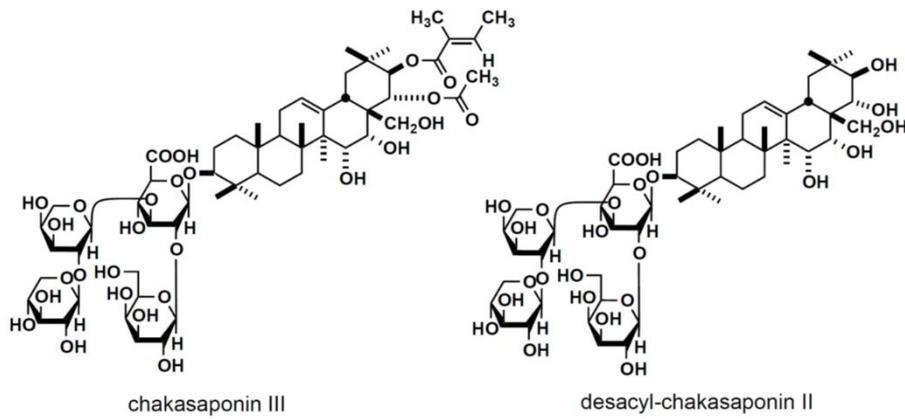
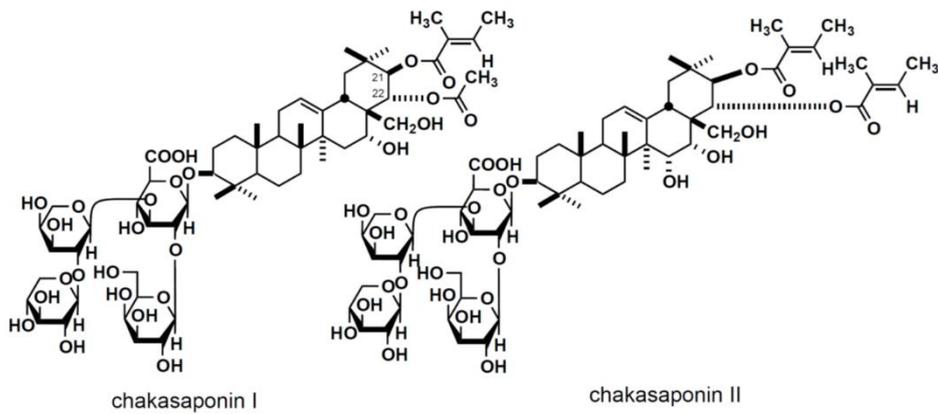


Figure.10 Chemical structure of R₁-barrigenol and R₁-barrigenol derivative
A. R₁-barrigenol
B. R₁-barrigenol glycoside and R₁-barrigenol acylated form.

第4章 総合考察

本研究では高脂肪食に起因する認知機能障害等の精神性障害に対する OXT の効果及びそのメカニズムの検討を行い、高脂肪食に起因する精神性障害に対する新たな予防、治療法の検討を目的とした。

第1章では高脂肪食によって誘導される精神性障害に対する末梢 OXT 投与の効果について検討を行った。これまで OXT の投与は社会的認知機能を改善することが知られていたが、本研究によって OXT の末梢投与が社会的、非社会的認知機能の両方を改善することが示された。このことは OXT/OXTR システムが社会認知機能だけではなく物体認知機能も含んだ広範囲な認知機能の改善に寄与する可能性を示した。さらに副作用として不安様行動が惹起される可能性を示した。

OXT の投与による認知機能の改善について、これまで OXT が社会的認知機能と物体認知機能の両方を改善するという報告はなく、OXT が広く認知機能を改善することを示した意味でこの結果は非常に意義深いと考えられた。

OXTR KO マウスは社会認知機能が障害されていることから示されるように社会認知機能に OXT/OXTR システムは必須である。また OXT 投与による社会的認知機能の改善は、雄性ラットにおいて、静脈内投与⁹⁰、経鼻投与⁴⁴により確認されており、複数の投与経路によって OXT 投与の社会的認知機能の改善作用が認められている。本研究の結果はこれら先行研究の結果を支持するものであった。

一方で物体認識機能と OXT/OXTR シグナルについては、雄マウスに OXTR アンタゴニストを脳室内投与した場合や、OXT ノックアウトマウスも空間記憶性能の変化を示さず³⁵、海馬の OXTR は物体認識には必須ではなく³⁶、脳内の OXT / OXTR システムは物体認知機能においてマイナーな役割を果たしていると考えられている²⁸。一方 OXT の慢性脳室内投与は、雄性ラットで 7 日間の投与により物体認識を改善し⁹¹、OXT の経鼻投与もストレスを受けたラットで認知機能を改善する⁴⁶。一方で経鼻 OXT 投与は VPA 投与マウスの物体認識能を改善しなかった⁴⁴。このように OXT の物体認知機能に与える影響は動物モデルや投与経路に依存する可能性があるが、本研究では高脂肪食摂取マウスへの OXT の単回投与により物体認知機能が回復することを示した。この結果は OXT/OXTR システムの物体認知機能制御メカニズムの解明に寄与すると考えられる。

第 2 章では高脂肪食の摂取が OXT/OXTR 系に与える影響と、OXT による認知機能改善メカニズムを検討した。高脂肪食摂取が脳内の OXT/OXTR システムに与える影響についてはこれまでにほとんど報告がなかったが、本研究で高脂肪食摂取が海馬特異的に OXTR の発現を低下させることを明らかにし、高脂肪食摂取による海馬 OXTR 発現の低下が社会認知機能の原因の 1 つである可能性を示した。また末梢 OXT 投与により中枢 OXT の合成が促進されることを示した。このことは末梢 OXT 投与による内因性の OXT の合成促進が認知機能改善効果と関係している可能性を示している。

本研究では将来的に末梢投与により高脂肪食摂取や肥満に起因する行動異常を改善する

OXT 若しくはそのアゴニストの開発を目的としているため、本実験では末梢投与により OXT の機能を評価した。末梢投与した OXT が認知機能を改善する経路については中枢と末梢においていくつかの経路が考えられた。

1 つは中枢において投与された OXT が直接脳に移行し、認知機能関連領域の OXTR を活性化させることで認知機能を回復させている可能性である。アカゲザルにおいて末梢投与された OXT は BBB を通過し脳に到達する⁹²ことから、投与した OXT は BBB を通過して脳内に到達している可能性が考えられた。また、高脂肪食の摂取は BBB の機能障害を引き起こし、BBB 透過性を増加させること⁹³もこの可能性を支持する要因の 1 つである。脳内に到達した OXT は直接社会認知関連領域の OXTR/OXTR シグナルを活性化している可能性と、PVN の OXT 合成促進や各領域への投射など⁸³を介して OXT/OXTR シグナルを活性化させている可能性が考えられた。

2 つ目は末梢投与された OXT が末梢迷走神経を介して PVN の OXT ニューロンを活性化し⁹⁴、また PVN で合成される内部 OXT の放出を増加させる⁹⁵ことにより、OXT/OXTR シグナルが活性化している可能性である。末梢投与した OXT が迷走神経の OXTR を介して孤束核に入力され、PVN の OXT ニューロンが活性化し摂食抑制効果が発揮される^{94,96}などの報告もあり、本研究においても末梢 OXT/OXTR シグナルが中枢に作用し認知機能の改善に寄与している可能性が考えられた。

OXT の投与によって視床下部の OXTR の発現が減少したが、この結果は OXT/OXTR シ

システムのネガティブフィードバックの可能性⁵³を支持するものであった。OXT/OXTR システムのネガティブフィードバックは OXT を精神疾患の薬剤として用いる課題の 1 つである OXT の反復投与による効果の減弱メカニズムの 1 つとして考えられている。

本研究では高脂肪食摂取マウスにおいて OXT が認知機能に与える影響の評価を目的とした。OXT は摂食抑制などの抗肥満作用を持つことから、慢性投与を行った場合、高脂肪食の摂取が抑制され、OXT が認知機能に与える影響と OXT の高脂肪食摂取の抑制の効果が混在する可能性が考えられたため、本研究では単回投与で OXT を投与したが、OXT の慢性投与も認知機能の改善に寄与する可能性も考えられる。OXTR KO マウスは海馬の神経新生が低下しており、OXT/OXTR システムが海馬の神経新生の維持に関与することから⁸²、OXT の慢性投与が海馬の神経新生を介して認知機能を改善する可能性も考えられた。

3 章において OXTR アゴニストとして見出された R₁-barrigenol については今後動物でその機能を評価する必要があるが、R₁-barrigenol を末梢投与した際にも上述の BBB を通過し直接脳に移行して効果を発揮する経路と、末梢 OXTR を活性化させ迷走神経を介して中枢の OXT/OXTR システムを活性化させる経路が考えられる。

R₁-barrigenol の BBB 透過性についてはこれまでに報告されておらず今後検討が必要である。BBB は分子量約 500 以上の物質を透過しにくく、脂溶性の物質を透過しやすい性質を持つ。R₁-barrigenol は分子量 506.7 で脂溶性であり、さらに R₁-barrigenol と類似の構造を持つカルノシンやカルノソールは BBB を透過することが知られていることから R₁-

barrigenol は BBB を透過する可能性があると考えられた。

またヒトとマウスにおいて OXT の単回投与と慢性投与で、脳内代謝物や遺伝子発現が異なり、特に慢性投与においてのみグルタミン酸系のシグナルが変化するなど、投与方法によって効果が異なることが示されており⁹⁷、R1-barrigenol の有効性評価についても単回、慢性投与両方での評価が必要であると考えられる。

以上のように、本研究では高脂肪食摂取マウスへの OXT の末梢投与により社会的認知機能、物体認知機能、物体位置認知機能が改善したことから OXT が社会認知機能をはじめとする認知機能全般の治療薬に成りうる可能性を示した。またこのことは天然物由来 OXTR アゴニストの候補物質として初めて同定された R₁-barrigenol が末梢投与により認知機能を改善する可能性があることを示している。これらの結果は天然物由来の OXTR アゴニストは高脂肪食摂取に起因する認知機能障害の改善、予防だけでなく、OXT/OXTR システムが関係する摂食制御、母性行動制御、攻撃行動制御などこれまでにない新しい機能を持った食品の開発に貢献できると期待される。

参考文献

- [1] Pasinetti GM, Eberstein JA. Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2008; **106**: 1503-14.
- [2] Laitinen MH, Ngandu T, Rovio S, *et al*. Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based study. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2006; **22**: 99-107.
- [3] Fitzpatrick S, Gilbert S, Serpell L. Systematic review: are overweight and obese individuals impaired on behavioural tasks of executive functioning? *Neuropsychology review*. 2013; **23**: 138-56.
- [4] Pan A, Sun Q, Czernichow S, *et al*. Bidirectional association between depression and obesity in middle-aged and older women. *International journal of obesity (2005)*. 2012; **36**: 595-602.
- [5] Garipey G, Nitka D, Schmitz N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *International journal of obesity (2005)*. 2010; **34**: 407-19.
- [6] Buchenauer T, Behrendt P, Bode FJ, *et al*. Diet-induced obesity alters behavior as well as serum levels of corticosterone in F344 rats. *Physiology & behavior*. 2009; **98**: 563-9.
- [7] Yaseen A, Shrivastava K, Zuri Z, Hatoum OA, Maroun M. Prefrontal Oxytocin is Involved in Impairments in Prefrontal Plasticity and Social Memory Following Acute Exposure to High Fat Diet in Juvenile Animals. *Cerebral cortex (New York, NY: 1991)*. 2019; **29**: 1900-9.
- [8] Takase K, Tsuneoka Y, Oda S, Kuroda M, Funato H. High-fat diet feeding alters olfactory-, social-, and reward-related behaviors of mice independent of obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2016; **24**: 886-94.
- [9] Zemdegs J, Quesseveur G, Jarriault D, Penicaud L, Fioramonti X, Guiard BP. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *British journal of pharmacology*. 2016; **173**: 2095-110.
- [10] Koopman KE, Booij J, Fliers E, Serlie MJ, la Fleur SE. Diet-induced changes in the Lean Brain: Hypercaloric high-fat-high-sugar snacking decreases serotonin transporters in the human hypothalamic region. *Mol Metab*. 2013; **2**: 417-22.
- [11] Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, *et al*. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology*. 2010; **75**: 764-70.
- [12] Soeda Y, Tsuneki H, Muranaka H, *et al*. The inositol phosphatase SHIP2 negatively regulates insulin/IGF-I actions implicated in neuroprotection and memory function in mouse brain. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2010; **24**: 1965-77.
- [13] De Felice FG, Lourenco MV, Ferreira ST. How does brain insulin resistance develop in

Alzheimer's disease? *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2014; **10**: S26-32.

[14] Crane PK, Walker R, Hubbard RA, *et al*. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med*. 2013; **369**: 540-8.

[15] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, *et al*. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 2004; **114**: 1752-61.

[16] Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, *et al*. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol*. 2010; **219**: 25-32.

[17] Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, *et al*. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *J Neurochem*. 2010; **114**: 1581-9.

[18] Murray CA, Lynch MA. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci*. 1998; **18**: 2974-81.

[19] Singh RB, Gupta S, Dherange P, *et al*. Metabolic syndrome: a brain disease. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2012; **90**: 1171-83.

[20] Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews Drug discovery*. 2004; **3**: 205-14.

[21] Kaczmarczyk MM, Machaj AS, Chiu GS, *et al*. Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; **38**: 1553-64.

[22] Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem*. 2012; **98**: 25-32.

[23] Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters*. 2010; **482**: 235-9.

[24] Laske C, Stransky E, Leyhe T, *et al*. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 2006; **113**: 1217-24.

[25] Wu H, Liu Q, Kalavagunta PK, *et al*. Normal diet Vs High fat diet - A comparative study: Behavioral and neuroimmunological changes in adolescent male mice. *Metabolic brain disease*. 2018; **33**: 177-90.

[26] Cope EC, LaMarca EA, Monari PK, *et al*. Microglia Play an Active Role in Obesity-Associated Cognitive Decline. *J Neurosci*. 2018; **38**: 8889-904.

[27] Ludwig M. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *Journal of neuroendocrinology*. 1998; **10**: 881-95.

- [28] Jurek B, Neumann ID. The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. *Physiological reviews*. 2018; **98**: 1805-908.
- [29] Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological reviews*. 2001; **81**: 629-83.
- [30] Dabrowska J, Hazra R, Guo JD, Dewitt S, Rainnie DG. Central CRF neurons are not created equal: phenotypic differences in CRF-containing neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis. *Frontiers in neuroscience*. 2013; **7**: 156.
- [31] Takayanagi Y, Kasahara Y, Onaka T, Takahashi N, Kawada T, Nishimori K. Oxytocin receptor-deficient mice developed late-onset obesity. *Neuroreport*. 2008; **19**: 951-5.
- [32] Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, *et al*. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; **102**: 16096-101.
- [33] Horie K, Inoue K, Suzuki S, *et al*. Oxytocin receptor knockout prairie voles generated by CRISPR/Cas9 editing show reduced preference for social novelty and exaggerated repetitive behaviors. *Hormones and behavior*. 2019; **111**: 60-9.
- [34] Walum H, Young LJ. The neural mechanisms and circuitry of the pair bond. *Nature reviews Neuroscience*. 2018; **19**: 643-54.
- [35] Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature genetics*. 2000; **25**: 284-8.
- [36] Raam T, McAvoy KM, Besnard A, Veenema AH, Sahay A. Hippocampal oxytocin receptors are necessary for discrimination of social stimuli. *Nat Commun*. 2017; **8**: 2001.
- [37] Chiang MC, Huang AJY, Wintzer ME, Ohshima T, McHugh TJ. A role for CA3 in social recognition memory. *Behavioural brain research*. 2018; **354**: 22-30.
- [38] Hitti FL, Siegelbaum SA. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*. 2014; **508**: 88-92.
- [39] Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci*. 2001; **21**: 8278-85.
- [40] Viviani D, Charlet A, van den Burg E, *et al*. Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science*. 2011; **333**: 104-7.
- [41] Pobbe RL, Pearson BL, Defensor EB, *et al*. Oxytocin receptor knockout mice display deficits in the expression of autism-related behaviors. *Hormones and behavior*. 2012; **61**: 436-44.
- [42] Watanabe T, Abe O, Kuwabara H, *et al*. Mitigation of sociocommunicational deficits of autism through oxytocin-induced recovery of medial prefrontal activity: a randomized trial. *JAMA psychiatry*. 2014; **71**: 166-75.
- [43] Watanabe T, Kuroda M, Kuwabara H, *et al*. Clinical and neural effects of six-week administration of oxytocin on core symptoms of autism. *Brain : a journal of neurology*. 2015; **138**:

3400-12.

- [44] Hara Y, Ago Y, Higuchi M, *et al.* Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. *Hormones and behavior*. 2017; **96**: 130-6.
- [45] Harony-Nicolas H, Kay M, du Hoffmann J, *et al.* Oxytocin improves behavioral and electrophysiological deficits in a novel Shank3-deficient rat. *eLife*. 2017; **6**: e18904.
- [46] Park S-H, Kim Y-J, Park J-C, Han J-S, Choi S-Y. Intranasal Oxytocin following Uncontrollable Stress Blocks Impairments in Hippocampal Plasticity and Recognition Memory in Stressed Rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2017; **20**: 861-6.
- [47] Arletti R, Bertolini A. Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression. *Life sciences*. 1987; **41**: 1725-30.
- [48] Blume A, Bosch Oj Fau - Miklos S, Miklos S Fau - Torner L, *et al.* Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus.
- [49] Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue K, *et al.* Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci*. 2009; **29**: 2259-71.
- [50] Peters S, Slattery DA, Uschold-Schmidt N, Reber SO, Neumann ID. Dose-dependent effects of chronic central infusion of oxytocin on anxiety, oxytocin receptor binding and stress-related parameters in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; **42**: 225-36.
- [51] Lee HJ, Caldwell HK, Macbeth AH, Tolu SG, Young WS, 3rd. A conditional knockout mouse line of the oxytocin receptor. *Endocrinology*. 2008; **149**: 3256-63.
- [52] Camerino C. Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocin-deficient mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; **17**: 980-4.
- [53] Freeman SM, Ngo J, Singh B, Masnaghetti M, Bales KL, Blevins JE. Effects of Chronic Oxytocin Administration and Diet Composition on Oxytocin and Vasopressin 1a Receptor Binding in the Rat Brain. *Neuroscience*. 2018; **392**: 241-51.
- [54] Zhang G, Bai H, Zhang H, *et al.* Neuropeptide exocytosis involving synaptotagmin-4 and oxytocin in hypothalamic programming of body weight and energy balance. *Neuron*. 2011; **69**: 523-35.
- [55] Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005; **435**: 673-6.
- [56] Domes G, Heinrichs M, Michel A, Berger C, Herpertz SC. Oxytocin improves "mind-reading" in humans. *Biological psychiatry*. 2007; **61**: 731-3.
- [57] Ditzen B, Schaer M, Gabriel B, Bodenmann G, Ehlert U, Heinrichs M. Intranasal oxytocin increases positive communication and reduces cortisol levels during couple conflict. *Biological psychiatry*. 2009; **65**: 728-31.
- [58] Ott V, Finlayson G, Lehnert H, *et al.* Oxytocin reduces reward-driven food intake in

humans. *Diabetes*. 2013; **62**: 3418-25.

[59] Van IMH, Bakermans-Kranenburg MJ. A sniff of trust: meta-analysis of the effects of intranasal oxytocin administration on face recognition, trust to in-group, and trust to out-group. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; **37**: 438-43.

[60] Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, *et al*. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*. 2012; **5**: 160-79.

[61] Kawamura Y, Takahashi O, Ishii T. Reevaluating the incidence of pervasive developmental disorders: impact of elevated rates of detection through implementation of an integrated system of screening in Toyota, Japan. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2008; **62**: 152-9.

[62] Buescher AV, Cidav Z, Knapp M, Mandell DS. Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. *JAMA pediatrics*. 2014; **168**: 721-8.

[63] Yamasue H, Okada T, Munosue T, *et al*. Effect of intranasal oxytocin on the core social symptoms of autism spectrum disorder: a randomized clinical trial. *Molecular psychiatry*. 2018.

[64] Keech B, Crowe S, Hocking DR. Intranasal oxytocin, social cognition and neurodevelopmental disorders: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2018; **87**: 9-19.

[65] Mens WB, Witter A, van Wimersma Greidanus TB. Penetration of neurohypophyseal hormones from plasma into cerebrospinal fluid (CSF): half-times of disappearance of these neuropeptides from CSF. *Brain research*. 1983; **262**: 143-9.

[66] Gazis D. Plasma half-lives of vasopressin and oxytocin analogs after iv injection in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1978; **158**: 663-5.

[67] Amico JA, Seitchik J, Robinson AG. Studies of oxytocin in plasma of women during hypocontractile labor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1984; **58**: 274-9.

[68] Passoni I, Leonzino M, Gigliucci V, Chini B, Busnelli M. Carbetocin is a Functional Selective Gq Agonist That Does Not Promote Oxytocin Receptor Recycling After Inducing β - Arrestin-Independent Internalisation. *Journal of neuroendocrinology*. 2016; **28**: n/a.

[69] Thompson RR, George K, Walton JC, Orr SP, Benson J. Sex-specific influences of vasopressin on human social communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; **103**: 7889-94.

[70] Aoki Y, Yahata N, Watanabe T, *et al*. Oxytocin improves behavioural and neural deficits in inferring others' social emotions in autism. *Brain : a journal of neurology*. 2014; **137**: 3073-86.

[71] Benner S, Yamasue H. Clinical potential of oxytocin in autism spectrum disorder: current issues and future perspectives. *Behavioural pharmacology*. 2018; **29**: 1-12.

[72] Yamasue H, Domes G. Oxytocin and Autism Spectrum Disorders. *Current topics in*

behavioral neurosciences. 2018; **35**: 449-65.

- [73] Owada K, Okada T, Munesue T, *et al*. Quantitative facial expression analysis revealed the efficacy and time course of oxytocin in autism. *Brain : a journal of neurology*. 2019; **142**: 2127-36.
- [74] Nadler JJ, Moy SS, Dold G, *et al*. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav*. 2004; **3**: 303-14.
- [75] Zilkha N, Kuperman Y, Kimchi T. High-fat diet exacerbates cognitive rigidity and social deficiency in the BTBR mouse model of autism. *Neuroscience*. 2017; **345**: 142-54.
- [76] Uvnas-Moberg K, Ahlenius S Fau - Hillegaard V, Hillegaard V Fau - Alster P, Alster P. High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats.
- [77] Grillon C Fau - Krinsky M, Krinsky M Fau - Charney DR, Charney Dr Fau - Vytal K, Vytal K Fau - Ernst M, Ernst M Fau - Cornwell B, Cornwell B. Oxytocin increases anxiety to unpredictable threat.
- [78] Guzman YF, Tronson Nc Fau - Jovasevic V, Jovasevic V Fau - Sato K, *et al*. Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors.
- [79] Ring RH, Malberg JE, Potestio L, *et al*. Anxiolytic-like activity of oxytocin in male mice: behavioral and autonomic evidence, therapeutic implications. *Psychopharmacology*. 2006; **185**: 218-25.
- [80] Noack J, Richter K, Laube G, Haghgoo HA, Veh RW, Engelmann M. Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2010; **94**: 568-75.
- [81] Lukas M, Toth I, Veenema AH, Neumann ID. Oxytocin mediates rodent social memory within the lateral septum and the medial amygdala depending on the relevance of the social stimulus: male juvenile versus female adult conspecifics. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; **38**: 916-26.
- [82] Lin YT, Chen CC, Huang CC, Nishimori K, Hsu KS. Oxytocin stimulates hippocampal neurogenesis via oxytocin receptor expressed in CA3 pyramidal neurons. *Nat Commun*. 2017; **8**: 537.
- [83] Deblon N, Veyrat-Durebex C, Bourgoin L, *et al*. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. *PloS one*. 2011; **6**: e25565.
- [84] Ludwig M, Leng G. Intrahypothalamic vasopressin release. An inhibitor of systemic vasopressin secretion? *Advances in experimental medicine and biology*. 1998; **449**: 163-73.
- [85] Yoshikawa M, Morikawa T, Yamamoto K, Kato Y, Nagatomo A, Matsuda H. Floratheasaponins A-C, acylated oleanane-type triterpene oligoglycosides with anti-hyperlipidemic activities from flowers of the tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of natural*

products. 2005; **68**: 1360-5.

[86] D'Acquarica I, Di Giovanni MC, Gasparrini F, *et al.* Isolation and structure elucidation of four new triterpenoid estersaponins from fruits of *Pittosporum tobira* ait. *Tetrahedron*. 2002; **58**: 10127-36.

[87] Oh JH, Jeong YJ, Koo HJ, *et al.* Antimicrobial activities against periodontopathic bacteria of *Pittosporum tobira* and its active compound. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014; **19**: 3607-16.

[88] Chen G, Xie Y, Zhou D, *et al.* Chemical constituents from shells of *Xanthoceras sorbifolium*. *Phytochemistry*. 2020; **172**: 112288.

[89] Balderas-López JL, Alfaro-Romero A, Monroy A, López-Villafranco ME, Rivero-Cruz JF, Navarrete A. Toxic rather than neuropharmacological effect of *Ternstroemia sylvatica* fruits and identification of 28-O-[β -1-6-rhamnopyranosyl]-R1-barrigenol as a new compound with toxic effects in mice. *Pharmaceutical biology*. 2013; **51**: 1451-8.

[90] Popik P, Vetulani J, van Ree JM. Low doses of oxytocin facilitate social recognition in rats. *Psychopharmacology*. 1992; **106**: 71-4.

[91] Havranek T, Zatkova M, Lestanova Z, *et al.* Intracerebroventricular oxytocin administration in rats enhances object recognition and increases expression of neurotrophins, microtubule-associated protein 2, and synapsin I. *Journal of neuroscience research*. 2015; **93**: 893-901.

[92] Lee MR, Scheidweiler KB, Diao XX, *et al.* Oxytocin by intranasal and intravenous routes reaches the cerebrospinal fluid in rhesus macaques: determination using a novel oxytocin assay. *Molecular psychiatry*. 2018; **23**: 115-22.

[93] Cordner ZA, Tamashiro KL. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiology & behavior*. 2015; **152**: 363-71.

[94] Iwasaki Y, Kumari P, Wang L, Hidema S, Nishimori K, Yada T. Relay of peripheral oxytocin to central oxytocin neurons via vagal afferents for regulating feeding. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019; **519**: 553-8.

[95] Zhang G, Cai D. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011; **301**: E1004-12.

[96] Iwasaki Y, Maejima Y, Suyama S, *et al.* Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating hyperphagia and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015; **308**: R360-9.

[97] Benner S, Aoki Y, Watanabe T, *et al.* Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. *Molecular psychiatry*. 2018.

謝辞

本研究を進めるにあたり終始あたたかいご指導を賜りました仲川教授に心から感謝致します。本研究を行うきっかけを与えて下さり、多大なご指導を頂きました福島県立医科大学 西森特任教授に深く感謝致します。本博士論文を査読頂き有機化学的な側面からのご指導を頂きました桑原教授、山下教授に深く感謝申し上げます。

技術的な相談から研究全般に関する悩みについて親身になって相談に乗って頂きました東北大学医学部 笠原好之 講師に深く感謝致します。分子生物学分野の皆様には実験の手法から研究生活に至るまで様々なサポートを頂きましてありがとうございました。

貴重な研究試料の提供を頂きました、京都薬科大学 松田教授に深く感謝申し上げます。また学術研究の機会を頂きました、日本製粉株式会社 イノベーションセンター 日野前センター長、間センター長、宮下副センター長に深く感謝致します。

また研究の方向性や会社業務との両立についてご相談に乗って頂きました福光主幹に深く感謝致します。時に私を明るく励まし、実験の技術的なサポートを頂きました譲原氏には心から感謝致します。大学への長期出張にあたり様々なサポートを頂きました山下センター員、大越センター員、安田センター員、鈴木センター員をはじめとする日本製粉イノベーションセンターの皆様には深くお礼申し上げます。

最後に私を支えてくれた妻 諒子に感謝します。

林 遼太郎