

# 論文の和文要旨

氏名 武藤 順子

(博士論文の題目)

運動の抗うつ効果と脳内イノシン濃度との関係  
—イノシン経口投与および運動からみた検討—

(博士論文の要旨)

## 第1章 緒言

本研究は、運動負荷およびイノシン経口投与による脳内イノシン濃度の変化と抗うつ効果との関係について明らかにすることを目的とした。第2章では、マウスにトレッドミル走による運動を負荷して、脳内イノシン濃度の変化を観察し、負荷する運動強度の差が脳内イノシン濃度に与える影響について検討した。

第3章では、イノシンの神経保護効果について検討した。初代培養した Wistar ラット胎仔の大脳皮質神経細胞にイノシン（最終濃度 0, 10, 30, 100, 300 $\mu$ M）添加培地を加えて生細胞数を計測した。つぎにイノシンの作用がアデノシン受容体を介するか否かを明らかにするために、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニスト 8-cyclopentyl theophylline (CPT) 添加培地またはアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体アンタゴニスト 8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC) 添加培地（各々最終濃度 1 $\mu$ M）を加えて生細胞数の変化について検討した。さらに、イノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加培地を加えた神経細胞の mitogen-activated protein kinase (MAPK) リン酸化比の変化を調べ、CPT または CSC を添加して MAPK リン酸化比の変化について検討した。

第4章では、イノシン（0.33mg/g B.W.）経口投与後に脳を単離し、大脳半球を用いて脳内イノシン濃度の変化を調べた。つぎに予測不可能な慢性ストレス chronic unpredictable stress (CUS) または慢性社会的敗北ストレス chronic social defeat stress (CSDS) を負荷したマウスにイノシン（0.2mg/g B.W./day）を4週間混餌摂取または10

日間水溶液として飲用させた後、強制水泳試験またはショ糖嗜好性試験を実施してイノシンの抗うつ効果について調べた。また、イノシン (0.33mg/g B.W.) を経口投与したマウスの海馬における細胞増殖、MAPK リン酸化比ならびに brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA 発現を測定し、イノシン経口投与による抗うつ効果との関係について検討した。

## 第2章 運動による脳内イノシン濃度の変化

### I. 方法

1. ICR マウス 30 匹 (7 週齢, オス) を対象とし、このうち 25 匹に高強度運動 (速度 30m/min のトレッドミル走を 1 分間負荷し、10 秒間の休憩をはさみ 3 回実施し、つぎに速度を 5m/min 上げて同様に 3 回行わせ、疲労困憊に至るまで継続する。) を負荷し、運動負荷終了 1 分、30 分および 60 分後に脳を単離した (各々 n=9, n=8, n=8)。大脳半球を用いて脳内イノシン濃度を high performance liquid chromatography (HPLC) により測定した。
2. ICR マウス 16 匹 (7 週齢, オス) に低強度 (10 m/min, 30 分間) または中強度 (20 m/min, 30 分間) の運動を負荷し (各々 n=8, n=8), 運動負荷終了 1 分後に単離した脳のイノシン濃度を測定した。

### II. 結果

1. 高強度運動負荷終了 1 分後の脳内イノシン濃度 ( $93 \pm 8 \mu\text{mol/kg}$  組織) は、対照と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示し、運動終了 30 分および 60 分後には対照と同等まで低下した。対照との差は  $33 \mu\text{mol/kg}$  組織であった。
2. 低、中強度運動を負荷したマウスの運動終了 1 分後の脳内イノシン濃度は、対照と比較してわずかに高値を示したが、統計学的に有意差はみられなかった。対照との差は低強度運動群で  $10 \mu\text{mol/kg}$  組織、中強度運動群で  $12 \mu\text{mol/kg}$  組織であった。

## 第3章 大脳皮質神経細胞の初代培養におけるイノシンの神経保護効果

### I. 方法

1. Wistar ラット一腹の胎仔の大脳皮質神経細胞を初代培養しイノシン (最終濃度 0, 10, 30, 100, 300  $\mu\text{M}$ ) 添加培地を加えて、24 時間後に目視および比色定量法によ

り生細胞数を計測した。神経突起を有する生細胞数も計測した。

2. 神経細胞にイノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加培地を加え、2 時間培養した後非添加培地に替え、24 時間培養後に生細胞数を計測した
3. 神経細胞に CPT（最終濃度 1 $\mu$ M）添加培地または CSC（最終濃度 1 $\mu$ M）添加培地を加え、1 時間後にイノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加培地に替え、24 時間培養後に生細胞数を計測した。
4. 神経細胞にイノシン（最終濃度 0, 10, 30, 100, 300 $\mu$ M）添加培地を加え、10 分後に lysis buffer を加え細胞を回収し、得られた細胞液の MAPK およびリン酸化 MAPK をウェスタンブロッティング法により測定した。つぎに、神経細胞にイノシン（最終濃度 100, 300 $\mu$ M）添加培地を加え、添加 5 分, 10 分, 20 分後の MAPK およびリン酸化 MAPK を測定した。さらに、神経細胞に CPT（最終濃度 1 $\mu$ M）添加培地または CSC（最終濃度 1 $\mu$ M）添加培地を加えた後イノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加培地を加えて、MAPK およびリン酸化 MAPK の変化を検討した。

## II. 結果

1. 初代培養した大脳皮質神経細胞の生細胞数は、イノシン（最終濃度 30, 100, 300 $\mu$ M）添加培地で非添加培地と比較して有意（30, 100 $\mu$ M :  $P < 0.01$ , 300 $\mu$ M :  $P < 0.05$ ）に高値を示した。吸光度測定においても、生細胞数はイノシン（最終濃度 30, 100, 300 $\mu$ M）添加培地で非添加培地と比較して有意（30 $\mu$ M :  $P < 0.05$ , 100, 300 $\mu$ M :  $P < 0.01$ ）に高値を示した。
2. 神経突起を有する生細胞数、および細胞体より長い神経突起を有する生細胞数は、イノシン添加培地で非添加培地と比較して有意（神経突起 10, 300 $\mu$ M :  $P < 0.05$ ; 30, 100 $\mu$ M :  $P < 0.01$ ; 細胞体より長い神経突起 10, 30 $\mu$ M :  $P < 0.05$ ; 100, 300 $\mu$ M :  $P < 0.01$ ）に高値を示した。
3. 神経細胞をイノシン添加培地で 2 時間培養し、その後、非添加培地に替えて 24 時間培養したところ、生細胞数はイノシン非添加培地と比較して有意（ $P < 0.01$ ）に高値を示した。
4. 神経細胞を CPT または CSC（各々最終濃度 1 $\mu$ M）添加培地で 1 時間培養し、その後イノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加培地で 24 時間培養したところ、生細胞数はイノシン添加培地と比較して、どちらも有意（ $P < 0.01$ ）に低値を示した。
5. MAPK リン酸化比はイノシン（最終濃度 100, 300 $\mu$ M）添加培地で非添加培地と

比較して有意 ( $P<0.05$ ) に高値を示した。経時変化の実験では、MAPK リン酸化比はイノシン (最終濃度 100 $\mu$ M) 添加 10 分後、イノシン (最終濃度 300 $\mu$ M) 添加 5 分、10 分後で非添加培地と比較して有意 ( $P<0.05$ ) に高値を示した。

6. 神経細胞を CPT または CSC (各々最終濃度 1 $\mu$ M) 添加培地で 1 時間培養し、その後イノシン (最終濃度 100 $\mu$ M) 添加培地で 24 時間培養したところ、MAPK リン酸化はイノシン添加培地と比較して、どちらも有意 ( $P<0.05$ ) に低値を示した。

## 第 4 章 イノシン経口投与による脳内イノシン濃度の変化と抗うつ効果

### I. 方法

1. ICR マウス 30 匹 (7 週齢, オス) を対象として, このうち 20 匹にイノシン (0.33mg/g B.W.) 水溶液を経口投与し, 1, 2 時間後に脳を単離し, 大脳半球を用いて脳内イノシン濃度を HPLC により測定した (各々  $n=10$ ,  $n=10$ ).
2. C57BL/6j マウス 30 匹 (7 週齢, オス) を対象として, このうち 20 匹に CUS を負荷し, イノシン (0.2mg/g B.W./day) 混餌 (イノシン混餌群) または通常餌 (通常餌群) を与えた (各々  $n=10$ ,  $n=10$ ). 強制水泳試験を行い, マウスの動きを撮影した画像をもとに無動時間を計測した. また, CUS 終了時に海馬歯状回顆粒細胞下層 subgranular zone (SGZ) の 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 陽性細胞数を計測した.
3. C57BL/6j マウス 32 匹 (7 週齢, オス) を対象として, このうち 20 匹に CSDS を負荷し, イノシン (0.2mg/g B.W./day) 水溶液 (イノシン水溶液飲用群) または水 (水飲用群) を与え, ショ糖嗜好性試験を行いショ糖嗜好率を計算した (各々  $n=10$ ,  $n=10$ ).
4. CSDS の実験の対象となった C57BL/6j マウス 32 匹を 1 匹ずつオープンフィールド試験の装置にいれ, 社会的行動試験を行い, percentage of time in interaction zone を算出した.
5. CSDS の実験の対象となった C57BL/6j マウス 32 匹を 1 匹ずつオープンフィールド試験の装置にいれ, マウスの動きを 10 分間ビデオ撮影し, 行動を解析した.
6. ICR マウス 19 匹 (7 週齢, オス) を対象として, このうち 10 匹にイノシン (0.33mg/g B.W.) 水溶液を経口投与し, 24 時間後の海馬歯状回 SGZ の BrdU 陽性細胞数を計測した.

7. ICR マウス 30 匹 (7 週齢, オス) を対象として, このうち 24 匹にイノシン (0.33mg/g B.W.) 水溶液を経口投与し, 1, 2, 4, 8 時間後の海馬 MAPK リン酸化比を計算した (各々  $n=7$ ,  $n=5$ ,  $n=6$ ,  $n=6$ ).
8. ICR マウス 40 匹 (7 週齢, オス) を対象として, このうち 30 匹にイノシン (0.33mg/g B.W.) 水溶液を経口投与し, 1, 2, 4 時間後の海馬 BDNF mRNA 発現を測定した (各々  $n=10$ ,  $n=10$ ,  $n=10$ ).
9. ICR マウス 37 匹 (7 週齢, オス) を対象として, このうち 14 匹にイノシン (0.33mg/g B.W.) 水溶液を投与し, 8 匹に  $A_1$  受容体アンタゴニストの 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) を腹腔内投与し, 30 分後にイノシン (0.33mg/g B.W.) 水溶液を投与し, イノシン投与 2 時間後に BDNF mRNA 発現を測定した. 8 匹に DPCPX を投与し, 2 時間 30 分後に BDNF mRNA 発現を測定した (各々  $n=14$ ,  $n=8$ ,  $n=8$ ).

## II. 結果

1. イノシン (0.33mg/g B.W.) 経口投与 1 時後に, 脳内イノシン濃度 ( $119 \pm 5 \mu\text{mol/kg}$  組織) が対照と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値を示した. 対照との差は  $13 \mu\text{mol/kg}$  組織であった.
2. CUS を 4 週間負荷したマウスにおける強制水泳試験の無動時間は, イノシン (0.2mg/g B.W.) 混餌群で通常餌群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低値を示した. BrdU 陽性細胞数はイノシン混餌群で通常餌群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値を示した. イノシン混餌群が 4 週間に摂取したイノシンの平均摂取量は  $0.19 \text{mg/g B.W./day}$  であった.
3. CSDS を 10 日間負荷したマウスにおけるショ糖嗜好性試験では, イノシン水溶液飲用群のショ糖嗜好率が水飲用群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値を示した. 試験期間を通して, 体重, 摂餌量, 摂水量のいずれも 3 群間で有意差はみられなかった. イノシン水溶液飲用群が 10 日間に摂取したイノシンの平均摂取量は  $0.21 \text{mg/g B.W./day}$  であった.
4. CSDS を 10 日間負荷したマウスにおける社会的行動試験の percentage of time in interaction zone は, 水飲用群とイノシン (0.2mg/g B.W.) 水溶液飲用群ともに対照と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に低値であった.
5. CSDS を 10 日間負荷したマウスにおけるオープンフィールド試験では, 中央ゾーンにマウスが入った頻度, 移動距離および静止時間とも 3 群間で有意差はみられなかった.

6. イノシン (0.33mg/g B.W.) 経口投与 24 時間後に、海馬歯状回 SGZ の BrdU 陽性細胞数は対照と比較して有意 ( $P<0.05$ ) に高値を示した。
7. イノシン (0.33mg/g B.W.) 経口投与 2 時間後に、海馬の MAPK リン酸化比は対照と比較して有意 ( $P<0.05$ ) に高値を示した。
8. イノシン (0.33mg/g B.W.) 経口投与 2 時間後に、海馬の BDNF mRNA 発現は対照と比較して有意 ( $P<0.01$ ) に高値を示した。
9. イノシン (0.33mg/g B.W.) 経口投与の前に DPCPX を投与することにより、BDNF mRNA 発現はイノシン投与群と比較して有意 ( $P<0.05$ ) に低値を示した。

## 第 5 章 総括および今後の展望

運動による抗うつ効果のメカニズムの全貌はいまだ解明されていない。1980 年代以降、運動による脳内のセロトニン濃度の変化やセロトニン受容体活性に関する研究成績が報告されている。脳細胞のシナプス間隙におけるセロトニン濃度の減少がうつの原因であると考えられる「モノアミン仮説」をベースに、抗うつ剤が開発されている。抗うつ剤投与により、脳内のセロトニン濃度が増加し抗うつ効果の発現することが知られている。

1990 年代になると、運動による抗うつ効果には、海馬における vascular endothelial growth factor (VEGF) や BDNF の増加などが関与するという研究結果が報告された。これらは運動だけでなく抗うつ剤投与による増加も報告されている。VEGF や BDNF の増加は、海馬歯状回の神経細胞の増殖、神経細胞の生存率の増加、神経突起の伸展につながり、抗うつ効果に至ると考えられている。

本研究では高強度運動負荷およびイノシン経口投与のいずれにおいても脳内イノシン濃度の増加することが確認された。つぎに、4 週間のイノシン混餌摂取または 10 日間の水溶液飲用によりイノシンによる抗うつ効果が確認された。イノシンによる抗うつ効果には、 $A_1$  および  $A_{2A}$  受容体を介した神経保護効果、海馬の細胞増殖の促進、海馬の BDNF mRNA 発現の増加が関与している可能性が確認された。なお、高強度運動負荷終了後の脳内イノシン濃度は対照と比較して  $33\mu\text{mol/kg}$  組織上昇しており、イノシン経口投与 1 時間後にみられた  $13\mu\text{mol/kg}$  組織の上昇と比べて大きかったことから、高強度運動負荷後にもイノシン経口投与ないし摂取と同じメカニズムで神経保護効果が発揮される可能性の高いことが示唆された。

本研究では、低、中強度運動後の脳内イノシン濃度の上昇 (各々 10,  $12\mu\text{mol/kg}$  組織)

は統計学的に有意ではなかったが、イノシン経口投与後の脳内イノシン濃度の上昇（ $13\mu\text{mol/kg}$  組織）と同等のレベルであった。4週間のイノシン混餌摂取または10日間の水溶液飲用により抗うつ効果が確認されたが、単回のイノシン経口投与量よりも少ない投与量にもかかわらず、抗うつ効果が確認されたことは興味深く、低、中強度の運動にイノシン経口投与を併用することで、抗うつ効果の得られる可能性が示唆された。

2013年、日本うつ病学会からうつ病性障害の治療ガイドライン Ver.1.1 が発表された。この中で、軽症うつ病患者に対して補助的な治療法として運動療法があげられている。一部抜粋すると、「運動の頻度については一定した見解はほとんどないが、週に3回以上の運動が望まれ、また強度は中等度のものを一定時間継続することが推奨される。」としている。そこで、低強度ないし中強度の定期的なトレーニングに加えてイノシンを経口摂取することにより、抗うつ効果が得られるか否かについて今後検討してみる意義は大きく、十分な抗うつ効果が確認されれば、より実用的な方法の開発につながる可能性があると考えられる。