

論文の和文概要

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
ーイノシン経口投与および運動からみた検討ー

(博士論文の概要)

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、大脳半球を用いて脳内イノシン濃度を高速液体クロマトグラフィにより運動負荷終了1分、30分、60分後に測定した。また、低強度(10 m/min, 30分間)、中強度(20 m/min, 30分間)の運動を負荷し、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。

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 μ M)を添加し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、神経細胞にアデノシン A₁ 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_{2A} 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 μ M)を加えて生細胞数の変化について検討した。さらに、イノシンを添加した神経細胞の 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。

その結果、以下の知見が得られた。

1. 高強度運動負荷終了 1 分後に脳内イノシン濃度が有意に上昇した。対照との差は 33 μ mol/kg 組織であった。
2. 低、中強度の運動を負荷したところ、運動負荷終了 1 分後の脳内イノシン濃度は対照と比較して有意差はみられなかった。対照との差は各々 10 μ mol/kg 組織および 12 μ mol/kg 組織であった。
3. イノシン (0.33mg/g B.W.) の経口投与 1 時間後に脳内イノシン濃度の上昇が確認された。対照との差は 13 μ mol/kg 組織であった。
4. 4 週間のイノシン (0.2mg/g B.W.) 混餌摂取・10 日間の水溶液飲用により、抗うつ効果が確認された。
5. 初代培養したラット胎仔の大脳皮質神経細胞にイノシンを添加したところ、生細胞数の増加が観察され、イノシンの神経保護効果が確認された。また、この神経保護効果はアデノシン A₁, A_{2A} 受容体を介し、MAPK が関与することが確認された。
6. イノシンの抗うつ効果には、海馬の細胞増殖の促進、MAPK リン酸化比の増加、ならびに BDNF mRNA 発現の増加が関与することが確認された。

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。

論文の欧文概要

(Name) Junko MUTO

Title

**Relationship between antidepressive effect of exercise and brain inosine level
—Investigation on the effects of oral administration of inosine and exercise—**

Abstract

The purpose of this study was to investigate the relationship between changes in brain inosine level following exercise and oral inosine and antidepressive effect. In Chapter two, changes in brain inosine levels were examined 1, 30 and 60 minutes after completion of high-intensity exercise using high-performance liquid chromatography (HPLC). Mice were subjected to a treadmill running exercise for 1 minute, with 10-second rests. The starting speed was 30 m/min, which was repeated three times; the speed was then increased by 5 m/min, and the exercise was continued until exhaustion. The cerebral hemisphere was used for the measurement. The effects of different intensities of exercise on brain inosine levels were also examined. Low-intensity exercise comprised 10 m/min for 30 minutes, and middle-intensity exercise comprised 20 m/min for 30 minutes.

In Chapter three, the neuroprotective effect of inosine (0, 10, 30, 100, 300 μ M) was investigated using a primary culture of embryonic rat neocortical neurons. The cells that had survived exposure to inosine were counted. The relevance of neuroprotection of inosine to adenosine A₁ and A_{2A} receptors was investigated using A₁ receptor antagonist, 8-cyclopentyl theophylline (CPT) and A_{2A} receptor antagonist, 8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC). The effect of inosine on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) was examined in the cultured neocortical neurons using Western blotting. The relevance of MAPK phosphorylation of inosine to CPT and CSC was investigated.

In Chapter four, HPLC was used to investigate changes in brain inosine levels following oral administration of inosine (0.33 mg/g B.W.) using

cerebral hemisphere. The antidepressive effect of inosine (0.2 mg/g BW/day, in mixed diet or beverage) was examined using two stress models: chronic unpredictable stress (CUS) and chronic social defeat stress (CSDS). Antidepressive behavior was evaluated using forced swim test or sucrose preference test. Cell proliferation, MAPK phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the hippocampus were determined after oral administration of inosine (0.33 mg/g body weight) to investigate the relationship with antidepressive effect of oral inosine. The following findings were obtained in this study.

1. Brain inosine level significantly increased 1 minute after completion of high-intensity exercise. The gap from the control was 33 $\mu\text{mol/kg}$ tissue.
2. No significant difference was found in brain inosine levels 1 minute after completion of low or middle-intensity exercise. The gap from the control was 10 and 12 $\mu\text{mol/kg}$ tissue, respectively.
3. Brain inosine level significantly increased 1 hour after oral administration of inosine (0.33 mg/g body weight). The gap from the control was 13 $\mu\text{mol/kg}$ tissue.
4. The antidepressive effect was confirmed in mice receiving oral administration of inosine (0.2 mg/g BW/day) in mixed diet for 4 weeks or beverage for 10 days.
5. The number of surviving cells increased after addition of inosine to the medium of embryonic rat neocortical neurons, due to adenosine A₁ and A_{2A} receptors. The neuroprotective effect of inosine was shown to involve signaling via MAPK phosphorylation.
6. The antidepressive effect was confirmed to be related to cell proliferation, MAPK signaling and expression of BDNF mRNA in the hippocampus.

Whole picture of antidepressive mechanism of exercise remains unveiled. From the 1980s onward, research on changes in brain serotonin level or serotonin receptor activity following exercise has been reported. Based on the monoamine hypothesis, where decreased serotonin level in the synaptic cleft of neurons is responsible for depression, antidepressants have been developed. An increase in brain serotonin level due to antidepressants is considered to lead to antidepressive effect.

In the 1990s, increases in vascular endothelial growth factor (VEGF) and

BDNF in the hippocampus were reported to be related to antidepressive effect of exercise. VEGF and BDNF are known to be increased by antidepressants also. Increases in VEGF and BDNF levels are considered to induce neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus, increased viability of neurons, and extension of neurites, and lead to antidepressive effect.

In this research, high-intensity exercise as well as oral inosine resulted in an increase in brain inosine levels, and antidepressive effect of oral inosine (mixed diet for 4 weeks and beverage for 10 days) was newly confirmed. It was also confirmed that neuroprotective effect via adenosine A₁ and A_{2A} receptors, and increases in cell proliferation and BDNF mRNA expression in the hippocampus were related to antidepressive mechanism of inosine. The brain inosine level following high-intensity exercise was increased by 33 $\mu\text{mol/kg}$ tissue compared with the control. Since the gap was larger than 13 $\mu\text{mol/kg}$ tissue, the brain inosine level 1 hour after oral inosine, it is suggested that there is a high possibility that high-intensity exercise should produce neuroprotective effect with the same mechanism observed after oral inosine.

Increases in brain inosine levels after low and middle-intensity exercise (10 and 12 $\mu\text{mol/kg}$ tissue, respectively) was not statistically significant, however, they were similar to 13 $\mu\text{mol/kg}$ tissue, an increase in brain inosine level after oral inosine. Interestingly, antidepressive effect of oral inosine (mixed diet for 4 weeks and beverage for 10 days) was confirmed with lower dose of inosine than single oral administration. Concomitant use of low or middle-intensity exercise with oral inosine was suggested to possibly produce antidepressive effect.

In 2013, Clinical practice guideline for depressive disorder Ver.1.1 was published by the Japanese Society of Mood Disorders. In this guideline, exercise therapy is explained as an adjunctive therapy for patients with mild depression. It is written in the guideline that there is no steady consensus about frequency of exercise, however, three or more frequency of exercise in a week is desirable, and middle-intensity exercise sustained for a certain period of time is recommended. Hence, it is considered meaningful that whether or not antidepressive effect is observed following low or middle-intensity regular training in combination with oral inosine. If any antidepressive effect is confirmed, combination regimen with exercise and oral inosine possibly become applicable.