

(論文題目)

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－

(英 訳)

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

2015年11月

武藤 順子

**Junko MUTO**

## 目 次

第 1 章 緒 言	1
I. 運動による抗うつ効果	2
II. イノシンの生理作用と神経保護効果	3
第 2 章 運動による脳内イノシン濃度の変化	6
I. 目的	7
II. 方法	8
III. 結果	11
IV. 考察	13
V. まとめ	17
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	18
I. 目的	19
II. 方法	20
III. 結果	24
IV. 考察	26
V. まとめ	27
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	28
I. 目的	29
II. 方法	31
III. 結果	38
IV. 考察	47
V. まとめ	52
第 5 章 総括および今後の展望	54

参考文献 · · · · · 58

謝 辭

## 第 1 章

### 緒 言

## I. 運動による抗うつ効果

うつ病は、現代社会において大きな損失をもたらしている。WHO は世界の死亡率と疾病負荷を総合的に評価した障害調整生命年 disability-adjusted life year (以下, DALY) を 2002 年について算出し、2030 年の DALY を予測した<sup>1)</sup>。2002 年、障害や早死により失われた年数が長かった項目は、1 位が周産期環境、2 位が下気道感染症、3 位が後天性免疫不全症候群であり、単極性うつ病が 4 位であったが、2030 年には単極性うつ病が後天性免疫不全症候群に次いで 2 位になると予測されている。また、2030 年の DALY を所得別にみると、所得の高い国ではうつ病が 1 位になることが予測されている。

厚生労働省統計情報部の患者調査<sup>2)</sup>によると、国内で精神疾患により医療機関にかかっている患者数は 2011 年で約 320 万人であり、2002 年の 1.2 倍に増加している。中でもうつ病や双極性障害などを含む気分障害が多い。うつ病患者の医療機関への受診率は低いとされており<sup>3)</sup>、患者数はこれより多いと推測される。

厚生労働省労働基準局の「脳・心臓疾患と精神障害の労災補償状況」<sup>4)</sup>によると、うつなど「心の病」で 2013 年度に労災請求をした人は 1400 人を超え、これまでで最も多いという。30 代が全体の 4 割近くを占め、働き盛りの年代がストレスを強く受けていることが推測される。

運動をすると気分がリフレッシュされることは経験的に知られている。1980 年代以降、運動の抗うつ効果に関する論文が多く発表されており、運動がうつに対して有効であると結論づける研究が多い<sup>5-10)</sup>。2013 年にアップデートされた Cochrane Database Systematic Review<sup>11)</sup>によると、運動は心理療法や薬物療法と同等の抗うつ効果を有すると結論づけている。Blumenthal ら<sup>12)</sup>は、運動療法と薬物療法の抗うつ効果を比較する研究を実施した。うつ病患者 156 名 (50-77 歳) を有酸素運動群 (45 分間、ウォーキングかジョギング)、抗うつ剤投与群 (セルトラリン 50-200mg/日)、運動と抗うつ剤の併用群の 3 群に割り付けた。被験者にウォーキングまたはジョギングを最大心拍数の 70-85% の強度で 30 分間実施させた。16 週間の介入の結果、3 群ともうつ症状が改善し、6 割以上がうつ病の診断基準から外れたという。その後、Babyak ら<sup>13)</sup>は、この研究の 6 ヶ月後の追跡調査を行い、有酸素運動群、抗うつ剤投与群、運動と抗うつ剤の併用群ともに各々 60%、66%、69% が臨床的に寛解したと報告した。このため著者らは、有酸素運動は高齢うつ病患者にとって選択的セロトニン再取り込み阻害薬 selective serotonin reuptake inhibitor (以下, SSRI) であるセルトラリンと同等の抗うつ効果を示すと結論づけている。Trivedi ら<sup>14)</sup>は、SSRI

で寛解に至らなかったうつ病患者を低運動量群（4 kcal/kg/week）または高運動量群（16 kcal/kg/week）の2つの運動療法に振り分け、12週間運動を負荷した。著者らは、寛解率は15.5%と28.3%であり、高運動量群で寛解率が高かったと報告している。

## II. イノシンの生理作用と神経保護効果

イノシンは核酸誘導体のヌクレオシドで、肉や魚などに含まれる有機化合物である。食品中のイノシン含有量に関する研究報告は少ないが、イノシンの前駆物質であるイノシン酸 inosine monophosphate（以下、IMP）は日本人の食生活に欠かすことのできない味成分の一つであり、煮干（IMP含有量863mg/100g）、鰹節（687mg/100g）、しらす干し（439mg/100g）、アジ（265mg/100g）、豚肉（122mg/100g）などに多く含まれていることが知られている<sup>15)</sup>。

1980年代初頭、ロシアのウエイトリフティング選手がイノシンをサプリメントとして摂り始めて以来、運動能力が向上する可能性が知られるようになり<sup>16)</sup>、疲労軽減などの目的でイノシンが使用されるようになった。しかし、その後の研究により、イノシンの疲労軽減や運動能力に及ぼす作用について科学的根拠は定かではなく、研究成績<sup>17,18)</sup>も多く報告されていない。

イノシンが疲労軽減に効果があるといわれる根拠の一つに、イノシンが2,3-ジフォスフォグリセリン 2,3-diphosphoglycerate（以下、2,3-DPG）の前駆物質であることが関係していると思われる。すなわち、2,3-DPGはヘモグロビンと結合することで酸素解離曲線を右方移動するため、その結果酸素が血中に放出され、疲労を軽減する可能性があると推測されるためである。Akerblomら<sup>19)</sup>は、赤血球をクエン酸デキストロースアデニン溶液中で16日または35日間保存し、そこにイノシンを加えると2,3-DPGが増加し、その後ヘモグロビンの酸素解離度が高くなると報告している。この酸素解離度の増加がin vivoでも確認されれば、イノシン摂取により2,3-DPG濃度が増加し、運動中の筋肉への酸素供給が増し、疲労が軽減する可能性が示唆される。しかし、de Verdierら<sup>20)</sup>は、10mmolのイノシンを被験者に静脈内投与し、3時間後に2,3-DPG濃度が8%増加することを確認したものの、測定可能なヘモグロビン酸素解離度の増加を示すデータを得ることはできなかったという。

イノシンには、虚血時の心筋収縮力を高める効果があるといわれている。Czarneckiら<sup>21)</sup>は、麻酔下でイヌの冠動脈左前下行枝にイノシンを注入し、心筋の収縮機能の部分的回

復を確認し報告した。単離したラットの心臓を用いた研究<sup>22)</sup>では、冠動脈血流を70%に低下させた軽度虚血下において、ヒポキサンチンまたはイノシンを0.02mmol/lの濃度で還流したところ、アデノシン三リン酸 adenosine triphosphate (以下、ATP) とグアノシン三リン酸 guanosine triphosphate (以下、GTP) の合成速度が2倍になることが確認されたという。これは、サルベージ回路を介してATPやGTPの産生に至るためと推測される。

イノシンの摂取が筋収縮のエネルギー源の補給に役立つとすれば、イノシンはアスリートにとって有用なサプリメントとなりうる。Williamsら<sup>17)</sup>は、高強度のトレーニングを受けている男女ランナーを対象とし、イノシンを1日6000mg、2日間摂取させたが、3マイル走の運動能力や有酸素性能力の改善には至らなかったと報告している。また、イノシン100mg、コエンザイムQ10 100mg、ビタミンE 200IU、チトクロームC 500mgの入ったカプセルをトライアスロン選手に4週間投与する二重盲験プラセボ試験<sup>23)</sup>では、自転車エルゴメーターによる運動負荷試験の結果、疲労困憊に至るまでの時間に有意な差はみられなかったという。Starlingら<sup>16)</sup>は、自転車競技選手にイノシンを1日5000mg、5日間投与し、有酸素性および無酸素性の両作業能力に対するイノシンの効果を検討した。Wingate bike testを用いた無酸素性作業能力に関する検討では、イノシン群とプラセボ群を比較して有意な差はみられなかった。Supramaximal cycling testでは、最大酸素摂取量の125%に相当する負荷を与え、疲労困憊までの時間を測定したところ、イノシン群ではプラセボ群と比較して疲労困憊までの時間が有意に10秒短縮されたという。しかし、イノシンの疲労軽減効果や運動能力に対する効果を検討した研究報告はきわめて少なく、この効果を確認するためには、今後さらなる研究が必要と思われる。

核酸代謝物であるアデノシンおよびイノシンは細胞外に低濃度で存在し、損傷、虚血、炎症などのストレス下においてその濃度が増加するという<sup>24)</sup>。アデノシンと比べると、イノシンの生理学的役割に関する研究報告は多くはない。しかし、1990年代から、イノシンには神経保護効果のあることが報告されている。Marianneら<sup>25)</sup>の報告によると、ラットのグリア細胞を低濃度グルコースおよびミトコンドリア呼吸鎖阻害の環境下で培養すると細胞生存率が低下するが、アデノシンおよびイノシンを添加することで細胞生存率が維持されたという。また、ラットにトレッドミル走を負荷し、脳内のアデノシンならびにイノシン濃度が増加したという、運動とプリン作動性物質との関連性を示唆する研究結果<sup>26)</sup>も報告されている。これらの知見から、運動がうつ予防や改善に役立つメカニズムの一つ

に、核酸代謝物のイノシンを介する作用も関与している可能性があるとの仮説をたてるに至った。

イノシンの前駆物質であるアデノシンは、脳室内投与によりアデノシン A<sub>1</sub> および A<sub>2A</sub> 受容体を介して抗うつ効果を示すことがマウスで確認されている<sup>27)</sup>。また、A<sub>1</sub> 受容体の活性化が抗うつ効果を示すことがラットを用いた研究で報告されている<sup>28)</sup>。しかし、イノシンの経口投与で抗うつ効果がみられるか否かは定かではない。

そこで、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することとした。つぎに第 3 章では初代培養したラット胎仔の大脳皮質神経細胞を用いて、イノシンの神経保護効果とそのメカニズムについて検討し、第 4 章ではイノシン経口投与後の脳内イノシン濃度の変化と抗うつ効果の有無について検討し、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に実験計画および研究課題を構築した。

## 研究課題

- 1) 運動による脳内イノシン濃度の変化 (第 2 章)
- 2) 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 (第 3 章)
- 3) 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 (第 4 章)

## 第 2 章

運動による脳内イノシン濃度の変化

## I. 目的

運動による抗うつ効果に関連する因子には、脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (以下、BDNF)<sup>29)</sup>、血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (以下、VEGF)<sup>30)</sup>、セロトニン<sup>31)</sup>、 $\gamma$ アミノ酪酸<sup>32)</sup>などが知られているが、運動による抗うつ効果のメカニズムの全貌はいまだ明らかになってはいない。

近年、動物を対象とした研究で、運動により脳内の核酸代謝物が増加することを確認した成績が報告されている。Dworak ら<sup>26)</sup>によると、Wistar ラットに中強度（トレッドミルの速度を 15m/min から 30 分かけて 20m/min に増加させた。）または高強度（トレッドミルの速度を 15m/min から 60 分かけて 25m/min に増加させた。）の運動を負荷したところ、脳内イノシン濃度が対照と比較してそれぞれ 2.29 倍および 4.25 倍高かったという。筆者らは、高強度運動中の神経細胞のエネルギー基質は主にグルコースであり、グルコースからの ATP 産生が亢進され、代謝物であるイノシンが増加したと説明している<sup>33)</sup>。この研究報告以降、運動とイノシンの関係を検討する研究報告はほとんどない。

そこで、第 2 章ではマウスにトレッドミル走による運動を負荷する実験を行い、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することとした。

## II. 方法

### 1. 実験動物と飼育環境

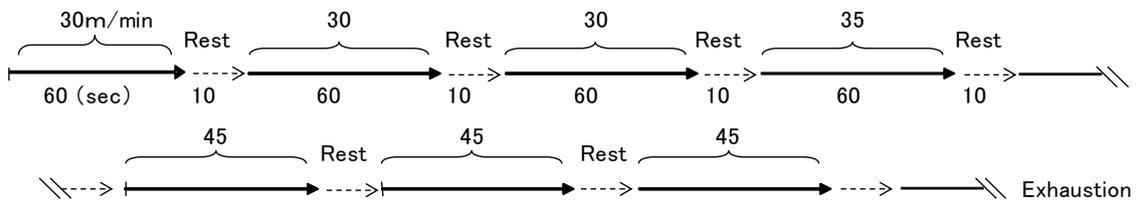
マウスは、アルミ製飼育ケージ (32×21.5×10.5cm) で 5 匹ずつ飼育した。飼育室は室温 24℃、湿度 50~60%、照明は午前 8 時点灯、12 時間の明暗サイクルに管理され、餌と水は自由摂取させた。本研究は、日本医科大学の「実験動物を対象とした研究に関する動物実験倫理委員会規定」に基づいて行われた (整理番号 23-216)。

高強度運動負荷終了後の脳内イノシン濃度の経時変化を調べるために、ICR マウス 30 匹 (7 週齢, オス, 平均体重 32.4±1.1g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan) を対象として、このうち 25 匹を運動負荷終了 1 分, 30 分, 60 分後に脳内イノシン濃度を測定する 3 群に区分した (各々 n=9, n=8, n=8)。

異なる運動強度が脳内イノシン濃度に与える影響について検討するために、ICR マウス 16 匹 (7 週齢, オス, 平均体重 31.9±0.9g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan) を低強度運動群および中強度運動群の 2 群に区分した (各々 n=8, n=8)。

### 2. 運動プロトコール

いずれの運動強度のマウスも、運動に慣れさせるために、実験に先立ちトレッドミル KN-73 TREAD-MILL (Natsume Seisakusho Co., Ltd., Japan) を用いて、1 日 1 回 10m/min の速度で 10 分走らせ、これを 1 日おきに 3 回行った。対照群のマウスには運動を負荷しなかった。高強度運動群では、マウスに速度 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、これを疲労困憊に至るまで継続した (Figure 1)。低強度運動群では速度 10m/min で、中強度運動群では速度 20m/min でそれぞれ 30 分間のトレッドミル走をマウスに負荷した。中強度運動群の速度は、先行研究をもとに乳酸性作業閾値を超えないレベルに設定した<sup>34)</sup>。



**Figure 1.**

**Protocol of high-intensity exercise**

ICR mice (7 weeks, male) 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. KN-73 TREAD-MILL was used.

### 3. 脳組織の処理と HPLC 測定

高強度運動負荷終了後 1 分, 30 分, 60 分の時点でマウスを断頭し脳を単離し, 左右半球に切り分けた. 大脳半球の重量を測定し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した. 中強度および低強度運動群は, 運動負荷終了 1 分後に断頭し, 高強度運動群と同様の方法でサンプルを取得, 保存した.

大脳半球を凍結粉碎し, 脳重量の 7 倍量の 12% トリクロロ酢酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) でホモジネートし遠心分離 (15,000 rpm  $\times$  10 分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) した. 上清 200  $\mu\text{l}$  に 0.5M トリオクチルアミン (トリオクチルアミン : クロロホルム = 1 : 3.3) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) を同量加え, これを vortex mix し氷上で 10 分間静置した. 遠心分離 (12,000 rpm  $\times$  3 分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) にて得られた上清を, 紫外分光器付き高速液体クロマトグラフィ high performance liquid chromatography (以下, HPLC) (SPD-10A, SHIMADZU CORPORATION, Japan) で分析した<sup>35,36</sup>. 標準品として, アデノシン, イノシン, ヒポキサンチン, キサンチンおよび尿酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) を用いた. 緩衝液は, <A> 100mM リン酸バッファー ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  60mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40mM, pH=6), <B> 100mM リン酸バッファー ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  60mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40mM, メタノール 25%, pH=6)を用いた.

### 4. 統計処理

測定値は重量でノーマライズし, 平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) で示した. 群間の差は一元分散分析で解析し, Fisher's PLSD post hoc test を用いて統計処理を行った. 統計学的有意差は \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  とした. 統計解析はエクセル 2007 ver.1.00 を用いた.

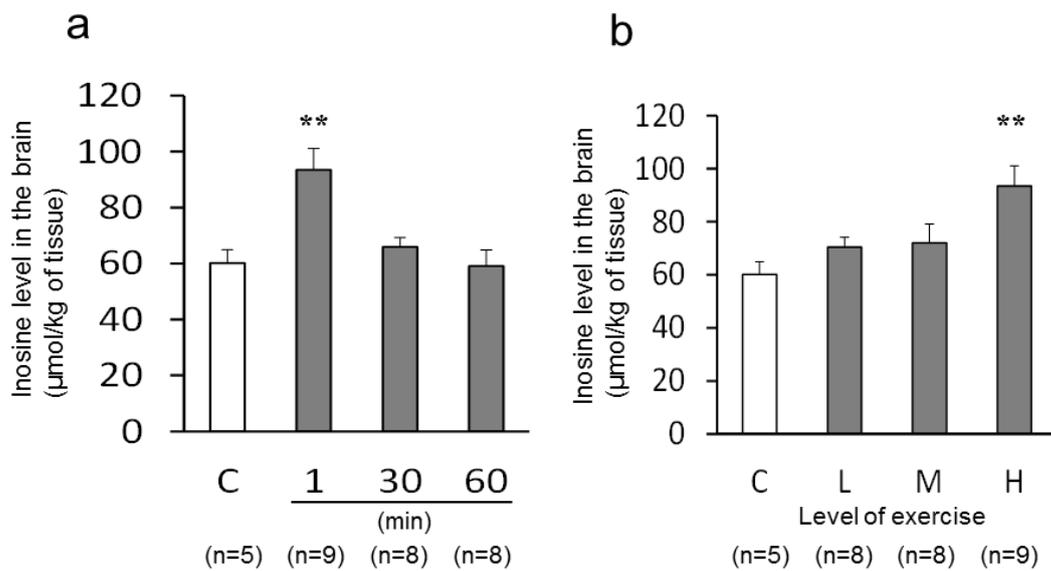
### III. 結果

#### 1. 高強度運動負荷後の脳内イノシン濃度の経時変化

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, 対照群 ( $60 \pm 5 \mu\text{mol/kg}$  組織) と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示した (Figure 2a). 対照群との差は  $33 \mu\text{mol/kg}$  組織, 濃度比は 1.55 であった. 運動負荷終了 30 分後 ( $66 \pm 3 \mu\text{mol/kg}$  組織) および 60 分後 ( $59 \pm 6 \mu\text{mol/kg}$  組織) には脳内イノシン濃度は対照群と同等まで低下した. マウスが走り終えた時のトレッドミルの平均速度は  $48.9 \pm 2.3 \text{m/min}$ , 平均走行時間は  $21.8 \pm 4.9$  分であった.

#### 2. 異なる強度の運動負荷後の脳内イノシン濃度の変化

マウスに低強度および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, 低強度 ( $70 \pm 4 \mu\text{mol/kg}$  組織) および中強度 ( $72 \pm 7 \mu\text{mol/kg}$  組織) とともに対照群 ( $60 \pm 5 \mu\text{mol/kg}$  組織) と比較してわずかに高値を示したが, 統計学的に有意な差はみられなかった (Figure 2b). 対照群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.



**Figure 2.**

**Inosine level in the brain after exercise**

Changes in inosine levels in the brain after high-intensity exercise at the indicated times (a), changes in inosine levels in the brain 1 minute after low (L), moderate (M), and high (H) intensity exercises (b). Data represent mean  $\pm$  SE. \*\* $P < 0.01$ , versus Control (C).

## VI. 考察

マウスに高強度運動を負荷し、運動負荷終了 1 分後に脳内イノシン濃度が対照と比較して有意に高値を示し、30 分および 60 分後には対照と同等な濃度まで低下することが確認された。運動後の脳内イノシン濃度を経時的に測定した研究成績は他に報告されていないので、この上昇が運動負荷終了直後にみられた一過性の変化か数分間に渡って持続する変化なのかについては今後さらに検討を要する課題であるが、興味深い現象と思われた。

高強度運動の負荷終了直後に脳内イノシン濃度が上昇したメカニズムの一つとして、脳内で ATP の産生や代謝が亢進し、その代謝物のイノシンが増加した可能性が推測される。高強度運動には注意力や集中力が求められることから、神経細胞の活動を維持するために脳内のエネルギー需要が高まり、ATP の産生が亢進した結果、脳内イノシン濃度が上昇したと思われる。Huston ら<sup>40)</sup>は、ラットの覚醒時および鎮静時における海馬のアデノシンの日内変動を調べた。その結果、海馬アデノシン濃度はラットの活性時（夜間）で鎮静時（昼間）と比較して高い傾向にあり、活発に活動している時間帯に海馬アデノシン濃度が増えたことから、身体活動量と脳の ATP 代謝が関係している可能性を指摘している。本研究の対象はラットではなくマウスであるが、高強度運動により身体活動量が増加し脳内で ATP の消費が増え、その代謝物のイノシンが増加した可能性が推測され、Huston らの報告を支持する成績となった。さらにまた、脳細胞が低酸素、低グルコースなどに暴露されると、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が低下し、細胞質の ADP/ATP 比の増加することが知られている<sup>37,38)</sup>。その結果アデニレートキナーゼが活性化され、2 分子の ADP から ATP と AMP が産生され、イノシン産生の亢進にいたると推測される。脳細胞内のイノシン濃度は ATP 濃度の 1/1000 程度と考えられるため<sup>39)</sup>、細胞内に存在する ATP 量で十分イノシンが産生されると推察される。

さらに、高強度運動により筋肉内で ATP が代謝されイノシンが産生され、循環血により脳に運ばれた可能性があるとして推測される。放射活性のトレーサーを用いた実験で、イノシンは血液脳関門を通過することが確認されている<sup>41)</sup>。また、血液脳関門のイノシン特異的トランスポーターも同定されている<sup>42)</sup>。運動負荷により筋肉内の ATP は ADP や AMP に代謝される。ADP は短時間で ATP に再合成され、筋収縮のエネルギー源として利用される。筋肉中では AMP は IMP やアデノシンを経てイノシンに分解され、その後ヒポキサンチン、キサンチンを経て尿酸に分解される。しかし、Zhao ら<sup>43)</sup>の研究結果によると、筋肉内のイノシン濃度は運動負荷終了 5 分後に有意に増加したという。著者らは、7 名の男

性被験者（年齢  $23.9 \pm 2.3$  歳，体重  $74.4 \pm 3.6$ kg）に疲労困憊に至る 30 秒の自転車運動を  
負荷し，外側広筋から筋サンプルを採取したところ，筋肉内のイノシン濃度は安静時で  
 $0.02 \pm 0.004$ mmol/kg dry mass，運動負荷終了 5 分後で  $0.43 \pm 0.07$ mmol/kg dry mass に  
増加したと報告している．また，Dudzinska ら<sup>44)</sup>は，男性被験者（平均年齢 22 歳）に自  
転車エルゴメーターの高強度運動（初速度：70rpm，3 分毎に 20W ずつ増加する）を負荷  
して，血中イノシン濃度を測定したところ，安静時には  $0.1 \mu\text{mol/L}$  であった濃度が運動負  
荷終了 30 分後には  $1.1 \mu\text{mol/L}$  に増加したという．しかし本研究では，脳内イノシン濃度  
は運動負荷終了 1 分後に上昇し，30 分後に対照レベルに低下していたことから，増加した  
イノシンが筋肉由来とは考えにくい．

プリンヌクレオチドの de novo 合成では，リボース-5-リン酸から IMP が合成され ATP  
および GTP となるが，この IMP からイノシンが産生される．Mikami ら<sup>36)</sup>は，ラットに  
30m/min のトレッドミル走を負荷し，2 分毎に 5m/min ずつ速度を上げて，これを疲労困  
憊まで継続した．運動負荷終了 1 時間後に  $^{14}\text{C}$ -グリシンを腹腔内投与し，肝臓の de novo  
合成により産生されたアデニンヌクレオチドの分解物を測定した．肝臓および尿中の  $^{14}\text{C}$ -  
活性は，運動負荷終了 5 時間後に対照と比較してどちらも有意に増加しており，肝臓にお  
けるアデニンヌクレオチドの de novo 合成は高強度運動により高まることが確認された．  
また，高強度運動によりプリンヌクレオチドの分解が亢進し，高尿酸血症の危険性が高ま  
ることも知られている．しかし，この 2 つの機序で産生されるイノシンは，運動終了 1 分  
後に観察された脳内イノシン濃度の上昇に関与する可能性は低いと推測された．

本研究では運動を負荷したマウスの脳内イノシン濃度は高強度運動負荷終了後のみ有  
意に上昇することが確認され，対照と比較して 1.55 倍であった．Dworak らの研究<sup>26)</sup>で  
は中強度，高強度運動負荷終了後の脳内イノシン濃度はそれぞれ 2.29, 4.25 倍に上昇して  
おり，本研究で得られた成績より高値を示した．彼らの研究では運動負荷終了後のどの時  
点で計測したのか詳細な説明がなく単純に比較することはできないが，本研究ではラット  
ではなくマウスを用いたこと，ならびに断頭から脳を単離して測定するまでの手順に違い  
があった可能性のあることなどが一因と推測された．しかし，Dworak らの研究報告では，  
脳内イノシン濃度は高強度運動後に  $105 \mu\text{mol/kg}$  組織に増加したという．マウスを用いた  
本研究では高強度運動後に  $93 \mu\text{mol/kg}$  組織にまで増加しており，ラットを用いた Dworak  
らの研究成績と類似している点は興味深い．

うつ病に対する運動療法は現在，補助的治療法としての位置づけである．うつを改善す

るために必要な運動の種類，強度，頻度について多くの研究が行われている<sup>45-50)</sup>。

Doynes<sup>45)</sup>は，うつ病女性患者 40 名 (18-35 歳) をランニング群と筋力トレーニング群に分けて運動を負荷し，いずれの群においても対照と比べて高い抗うつ効果が確認されたと報告している。同様に，Martinsen<sup>46)</sup>の研究では，精神障害の診断と統計マニュアル-III-R によりうつ病，気分変調症，他の分類には入らないうつ病に分類された患者 (男性 37 名，女性 61 名，平均年齢 41 歳) を，有酸素運動群 (速歩，ジョギング) と無酸素運動群 (筋力トレーニング，リラクゼーション，ストレッチ) に無作為に割り付けた。週 3 回，1 日 1 時間，8 週間の運動を負荷したところ，両群ともうつ状態の改善を認めたという。Mead<sup>47)</sup>の研究によると，有酸素運動による抗うつ効果は認められるものの，ウェイトトレーニングおよび混合トレーニングの方が大きな介入効果が認められたと報告しており，有酸素運動と無酸素運動を組み合わせることにより，推奨する運動の選択肢が広がると考えられる。

Teychenne<sup>48)</sup>が発表した身体活動とうつ発症リスクに関する review によると，6 つの観察研究のうち 4 研究において，高強度の身体活動が低強度と比較してうつ症状の発生リスク低下と関連していると報告した。また，12 の介入研究のうち，3 研究において中強度と高強度の身体活動ともに対照と比較してうつの症状を改善すると報告されている。Dunn<sup>49)</sup>は，軽度から中等度のうつ病患者 80 名 (20-45 歳) を対象とした無作為臨床試験で，強度の異なる運動の治療効果について研究した。患者は，12 週間の試験期間において，対照群 (ストレッチ，週 3 回)，低強度群 (7 kcal/kg/week の有酸素運動を週 3 または 5 回)，中～高強度群 (17.5 kcal/kg/week の有酸素運動を週 3 または 5 回) のいずれかに割り振られた。その結果，すべての群でうつ症状が改善されたが，中～高強度群における改善率 (47%) は，低強度群 (30%) ならびにストレッチ群 (29%) と比較して有意に高値であったと報告している。Singh<sup>50)</sup>は，ウェイトトレーニングの抗うつ効果を低強度と高強度で比較した。うつ病患者 60 名 (60 歳以上) を最大挙上重量 repetition maximum (以下，1RM) の 80% を負荷する高強度運動群または 1RM の 20% を負荷する低強度運動群に無作為に分け，マシンを使った 8 種目のトレーニングを 1 日 3 セット，週 3 日，8 週間負荷した。被験者は全員，通常プライマリケア医によるうつ病治療を受け，対照はプライマリケア医によるうつ病治療のみを受けた。その結果，高強度運動群は低強度運動群および通常治療群と比較してうつ症状が有意に改善されたという。

しかし、一般のフィールドで高強度運動を実施できる対象者は限られているため、低、中強度運動によりうつを改善する方法を開発することも重要であり、その一手段として低、中強度運動にイノシンの経口投与を併用してみる意義があると思われる。そこで、第3章ではイノシンの神経保護効果について検討し、第4章ではイノシン経口投与による抗うつ効果について検討することとした。

## V. まとめ

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, 濃度比は 1.55 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. 目的

1990年代から、神経細胞の生存率や軸索伸展に関するイノシンの研究成績が報告されている。Monicaら<sup>51)</sup>の研究によると、初代培養したマウス脊髄細胞の生存率は低酸素状態で低下するが、イノシンを前もって培地に添加することにより、低酸素状態においても細胞生存率がイノシンの濃度依存的に増加することを確認したという。Tomaselliら<sup>52)</sup>は、ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫から樹立された細胞株であるPC12細胞および初代培養した小脳顆粒神経細胞の細胞生存率が、低酸素状態においてもイノシンを添加することにより増加することを確認し、イノシンが関与する神経保護効果に mitogen-activated protein kinas (以下、MAPK) シグナルが必須な経路であると指摘している。また、金魚の網膜神経細胞にイノシンを添加することにより、神経細胞の軸索が伸展することが報告<sup>53)</sup>されている。これには成長関連タンパク質-43 や T $\alpha$  チューブリンなどのシグナル分子の遺伝子アップレギュレーションが関与しているという。In vivo の研究<sup>54)</sup>では、ラットの皮質脊髄路を片側切断した後、感覚運動皮質にイノシンを注入したところ、切断した側を含む広範囲にわたる大脳皮質の軸索側枝の伸展が確認されたという。また、中枢神経系を損傷したラットにおいて、イノシンが軸索再生および軸索出芽を増加させ、身体機能の回復を促進させることが報告<sup>55)</sup>されている。イノシンはアデノシン A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub> 受容体と結合し、それぞれが特異的な薬理学的特性を有する<sup>56,57)</sup>。先行研究<sup>58)</sup>によると、初代培養した神経細胞に対するイノシンの保護効果が、A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストで前処理することにより減弱したと報告されている。イノシンが A<sub>2A</sub> および A<sub>3</sub> 受容体を介して、オバリン誘発性アレルギー性気道炎症を調節する研究成績<sup>59)</sup>が示されている。また、Guinzbergら<sup>60)</sup>は、イノシンが A<sub>3</sub> 受容体を介して、肝細胞のグリコーゲン分解や糖新生を増加させることを報告している。イノシンの神経保護効果は、小脳顆粒神経細胞<sup>61)</sup>や脊髄細胞<sup>51)</sup>の初代培養では報告されているが、大脳皮質の初代培養では確認されていない。

そこで第3章では、ラット胎仔の大脳皮質神経細胞を初代培養し、イノシンが神経細胞の生細胞数に与える影響を調べ、イノシンの作用が A<sub>1</sub> および A<sub>2A</sub> 受容体を介するか否かを明らかにすることを目的とする。さらに、イノシンが MAPK リン酸化に与える影響を検討する。

## II. 方法

### 1. 大脳皮質の初代培養

ラット胎仔の大脳皮質を初代培養するために、E16.5日の妊娠 Wistar ラット (Sankyo Labo Service Corporation, Japan) 1腹の胎仔をとりだし、ピンセット INOX5 (Katena Products Inc., USA) を用いて顕微鏡下で大脳皮質を切り出した。これをシャーレ上で剃刀 (TED PELLA, USA) を用いてカッティングした後、0.25%トリプシン (Gibco-BRL, USA) 5ml を加え細胞をシャーレから剥がし、50ml チューブ (Falcon, USA) に移した<sup>62)</sup>。このチューブを 37°C 恒温槽につけ、時々震盪しながら 10 分間インキュベートした。DNase I (Roche, Switzerland) 500 $\mu$ l, 血清 fetal bovine serum (Gibco-BRL, USA) 1ml, minimal essential medium (以下, MEM 培地) (Invitrogen, USA) 9ml を加えた。MEM 培地には、あらかじめ 1% L-グルタミン酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) および 0.1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma, Japan) を添加しておいた。遠心分離 (1000rpm $\times$ 5 分, 4°C) した後、上澄み液を吸引除去し、1% 血清培地 5ml を加え、5ml のピペットで 10 回サスペンドして細胞をばらばらにした。100 $\mu$ l のエッペンドルフチップ 2-200 T.I.P.S singles (Eppendorf, Germany) を先端につけた 5ml ピペットで全量を 1 回で吸い取り、40 $\mu$ m メッシュのセルストレイナー (Becton Dickinson, USA) を通し、細胞塊を除去した。得られた細胞液 20 $\mu$ l を同量のトリパンプルー (KOJIN BIO, Japan) と混ぜ、この細胞液の生細胞数を血球計算版にて計測し、ウェルの面積あたりの細胞数が  $5 \times 10^6$  cell/cm<sup>2</sup> になるように 1% 血清 MEM 培地を加え調製した。あらかじめポリエルリジン poly-L-lysine (以下, PLL) (Sigma-Aldrich, USA) でコーティングした 48 ウェルマルチプレート (NUNC, USA) に、濃度調整した細胞液 250 $\mu$ l を添加した。3 時間培養 (温度 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, 湿度 95%) しプレート面の細胞の生着を確認した後、アストロサイトの増殖を抑えるために、培地を 0.1% プトレシン (Sigma-Aldrich, USA) を含む 0.5% ITS-MEM 培地 insulin transferrin selenite-MEM (ITS Premix) (Becton Dickinson, USA) に替えた。本プロトコールの培養細胞は、neuron-specific class III beta-tubulin (TuJ1) 抗体 (Sigma-Aldrich, USA) および glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Merck Millipore, Germany) で染色し、95% が神経細胞であることを確認した。

本研究は、日本医科大学の「実験動物を対象とした研究に関する動物実験倫理委員会規定」に基づいて行われた (整理番号 23-216)。

## 2. 生細胞数の計測

初代培養した大脳皮質神経細胞の生細胞数に対するイノシンの作用を調べるために、細胞が生着した 48 ウェルマルチプレートの各ウェルにイノシン（最終濃度 0, 10, 30, 100, 300 $\mu$ M）添加培地を加え、24 時間培養した。イノシン添加濃度は先行研究<sup>52,63,64</sup>を参考に設定した。イノシン添加 24 時間後に生細胞を Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, USA) で染色した。顕微鏡で 40 倍に拡大し、1 ウェルにつきランダムに選んだ 4 視野の生細胞数を目視で計測し、各濃度 5 ウェルの平均値を算出した (n=5)。

生細胞数は、目視に加え比色定量法により確認した。細胞が生着した 96 ウェルマルチプレートの各ウェルにイノシン（最終濃度 0, 10, 30, 100, 300 $\mu$ M）添加培地を加え、24 時間培養した。イノシン添加 24 時間後に水溶性テトラゾリウム化合物 (NACALAI TESQUE, Japan) を培地に添加し、生細胞の数に比例して生成されるホルマザンの吸光度を吸光度測定機 Labsystems Multiskan JX (Thermo Fisher Scientific Inc., New Zealand) を用い、波長 450nm で計測した。各濃度 4 ウェルの平均値を算出した (n=4)。

神経突起を有する生細胞数、ならびに細胞体の直径より長い神経突起を有する生細胞数に対するイノシンの作用を調べるために、細胞が生着した 48 ウェルマルチプレートの各ウェルにイノシン（最終濃度 0, 10, 30, 100, 300 $\mu$ M）添加培地を加え、24 時間培養した。顕微鏡で 40 倍に拡大し、1 ウェルにつきランダムに選んだ 4 視野の生細胞数を目視で計測し、各濃度 5 ウェルの平均値を算出した (n=5)。

イノシンを神経細胞に短時間添加し、その後非添加培地に替えて、生細胞数に対するイノシンの作用を調べた。細胞が生着した 48 ウェルマルチプレートの各ウェルにイノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加培地を加え、2 時間培養した後、非添加培地に替えて、さらに 24 時間培養した。この他に、イノシン（最終濃度 0, 100 $\mu$ M）添加培地を加えたウェルを 24 時間培養した。培養終了後に生細胞を Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, USA) で染色した。顕微鏡で 40 倍に拡大し、1 ウェルにつきランダムに選んだ 4 視野の生細胞数を目視で計測し、6 ウェルの平均値を算出した (n=6)。

イノシンがアデノシン受容体を介して作用することを確認するために、2 種類のアデノシン受容体アンタゴニストをイノシン添加前に培地に加え、イノシン添加後の生細胞数を計測した。用いたアデノシン受容体アンタゴニストは、A<sub>1</sub>受容体アンタゴニストの 8-シクロペンチルテオフィリン 8-cyclopentyl theophylline (以下, CPT) (Sigma-Aldrich, USA) と A<sub>2A</sub>受容体アンタゴニストの 8-3-クロロスチリルカフェイン 8-(3-chlorostyryl) caffeine

(以下, CSC) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) であった. まず, 細胞が生着した 48 ウェルマルチプレートの各ウェルに, CTP (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 時間培養した後, イノシン (最終濃度 100 $\mu$ M) 添加培地に替え, さらに 24 時間培養した. この他に, イノシン (最終濃度 0, 100 $\mu$ M) 添加培地を加えたウェルを 24 時間培養した. 培養終了後に生細胞を Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldorich, USA) で染色した. 顕微鏡で 40 倍に拡大し, 1 ウェルにつきランダムに選んだ 4 視野の生細胞数を目視で計測し, 各々 5 ウェルの平均値を算出した (n=5).

### 3. 神経細胞の MAPK およびリン酸化 MAPK の測定

#### 3-1. MAPK の測定に用いる神経細胞のサンプル採取

イノシン添加濃度と MAPK リン酸化との関係を調べるために, 直径 3.5cm のシャーレ (NUNC, USA) で神経細胞を培養した. 面積あたりの細胞数が  $5 \times 10^6$  cell/cm<sup>2</sup> になるように 1% 血清 MEM 培地で調製した神経細胞を, PLL コートしたシャーレに添加し, 24 時間培養した. 翌日, 血清を含まない MEM 培地で神経細胞を 4 時間培養した後, イノシン (最終濃度 0, 10, 30, 100, 300 $\mu$ M) 添加培地または陽性対照のアデノシン (300 $\mu$ M) 添加培地をシャーレに加えた. 10 分後に培地を吸い取り, 当日調製した lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 mM orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 10% protease inhibitor cocktail, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) を 200 $\mu$ l 添加し, シャーレを軽く回して全体に lysis buffer がゆきわたるようにした. lysis buffer をスクレイパー (Sumitomo Bakelite, Japan) で集め, ピペットで回収した. 各濃度 3 シャーレの平均値を算出した (n=3).

イノシンによる MAPK リン酸化の経時変化を調べるために, 上記の方法で細胞を培養し, イノシン (最終濃度 100, 300 $\mu$ M) 添加培地をシャーレに加え, 添加後 5 分, 10 分, 20 分後の時点で培地を吸い取り, 上記の方法により lysis buffer を用いて細胞を回収した. 各時点 3 シャーレの平均値を算出した (n=3).

イノシンの MAPK リン酸化がアデノシン受容体を介するか否かを調べるために, 上記の方法で細胞を培養し, 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 時間培養した. その後イノシン (最終濃度 100 $\mu$ M) 添加培地に替え, 10 分後に上記の方法により lysis buffer で細胞を回収した. この他に, イノシン (最終濃度

0, 100 $\mu$ M) 添加培地を加えたシャーレを 24 時間培養した. 各々 5 シャーレの平均値を算出した (n=5).

### 3-2. ウェスタンブロッティング法

回収した lysis buffer を遠心分離 (15000 rpm $\times$ 5 分, 4 $^{\circ}$ C,) し, 得られた上清 150 $\mu$ l に 4 $\times$ ドデシル硫酸ナトリウム sodium dodecyl sulfate (以下, SDS) を 50 $\mu$ l 加え, 98 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱したのち, -80 $^{\circ}$ C で保存した. このサンプル (タンパク量 6 $\mu$ g) を 10-12%SDS-ポリアクリルゲル電気泳動で分離した後, ゲルをフッ化ポリビニリデンメンブレン (ATTO, Japan) 上に転写し, 5%スキムミルク入り Tween20-Tris HCl Buffered Saline (以下, TTBS) で 60 分ブロッキングした. その後, MAPK の一次抗体として 1000 倍に希釈した p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody (Cell signaling technology, USA), リン酸化 MAPK の一次抗体として 500 倍に希釈した phospho-p44/42 (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) mouse mAb antibody (Cell signaling technology, USA) をメンブレンに加え, 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした. 翌日, MAPK の二次抗体として 3000 倍に希釈した goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology, USA), リン酸化 MAPK の二次抗体として 3000 倍に希釈した goat anti-mouse IgG (H+G) HRP (Cell signaling technology, USA) を反応させた. Immunostar LD (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) でタンパクを発光させ, LAS-1000 mini image analyzer (Fuji Film Company, Japan) で検出し, Image Gauge ver. 4.0 (Fuji Film Company, Japan) でタンパクを定量した. MAPK リン酸化比は, リン酸化 MAPK/MAPK $\times$ 100 で算出した.

## 4. 統計処理

測定値は, 平均値 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ SE) で示した. 群間の差は一元分散分析で解析し, Fisher's PLSD post hoc test を用いて統計処理を行った. 統計学的有意差は\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  とした. 統計解析はエクセル 2007 ver.1.00 を用いた.

### III. 結果

#### 1. 神経細胞の生細胞数に対するイノシンの効果

Wister ラットの胎仔から単離した大脳皮質神経細胞を 48 ウェルマルチプレートで培養し、イノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加培地を加えた。翌日、イノシン添加培地の細胞は非添加培地と比較して神経突起を多く伸展していた（Figure 3a）。イノシン添加培地の生細胞数は、非添加培地と比較して、イノシン最終濃度 30, 100, 300 $\mu$ M で有意（30, 100 $\mu$ M :  $P < 0.01$ ; 300 $\mu$ M :  $P < 0.05$ ）に高値を示した（Figure 3b）。さらに比色定量法により生細胞数を計測したところ、イノシン最終濃度 30, 100, 300 $\mu$ M で有意（30 $\mu$ M :  $P < 0.05$ ; 100, 300 $\mu$ M :  $P < 0.01$ ）に高値を示すことが確認された（Figure 3c）。

神経突起を有する生細胞数、ならびに細胞体より長い神経突起を有する生細胞数も、イノシン添加培地において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（Figure 3d,e）。

神経細胞にイノシン添加培地を加え 2 時間のみ培養し、その後非添加培地に替えて 24 時間培養したところ、生細胞数は非添加培地と比較して有意（ $P < 0.01$ ）に増加することが確認された（Figure 3f）。

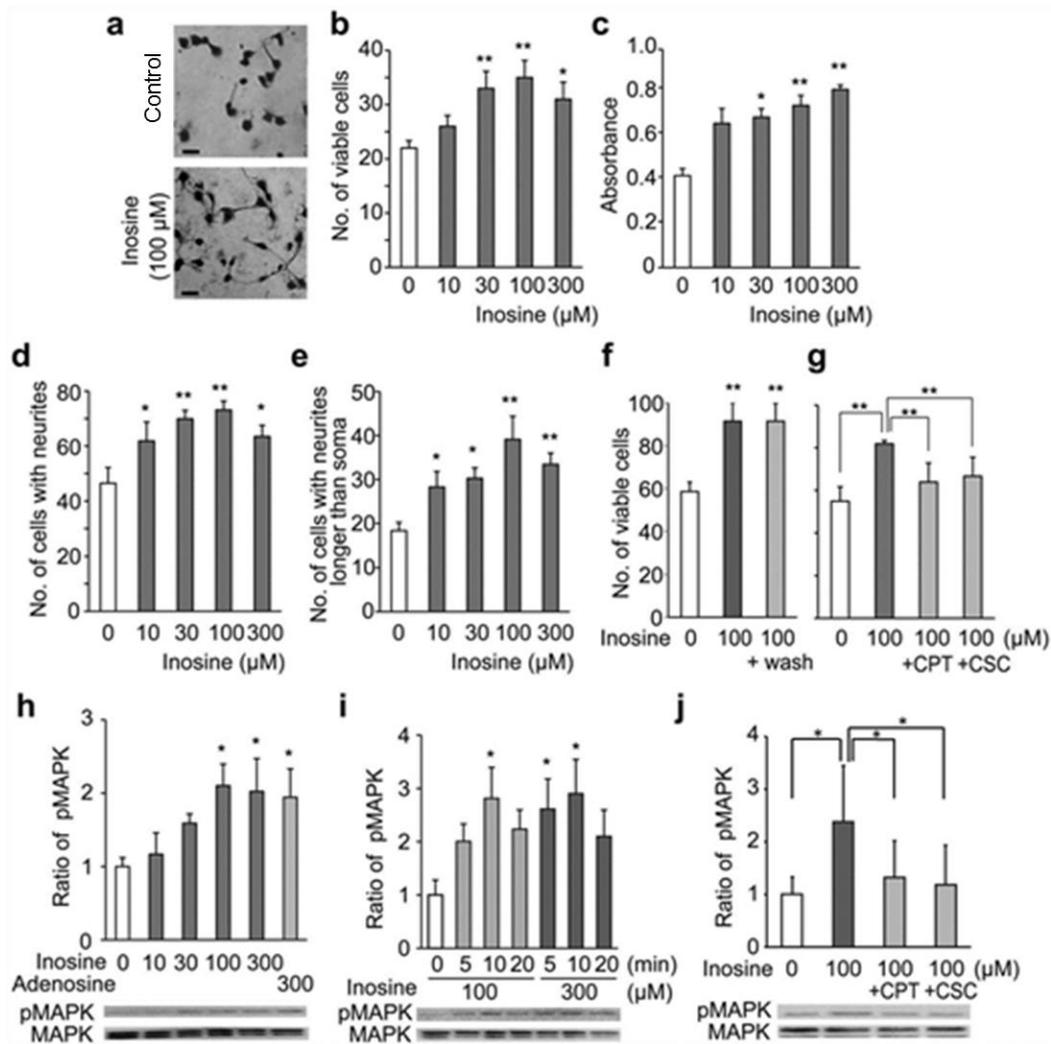
イノシンの作用がアデノシン受容体を介するか否かを調べるために、神経細胞に CPT（最終濃度 1  $\mu$ M）添加培地または CSC（最終濃度 1 $\mu$ M）添加培地を加え、その後イノシンを添加して生細胞数を計測した。CPT または CSC を添加した培地の生細胞数は、イノシン添加培地と比較して有意（ $P < 0.01$ ）に低値を示した（Figure 3g）。

#### 2. 神経細胞の MAPK リン酸化比に対するイノシンの効果

イノシン添加 10 分後に回収した神経細胞の MAPK リン酸化比は、イノシン添加培地（最終濃度 100, 300 $\mu$ M）で非添加培地と比較して有意（ $P < 0.05$ ）に高値を示した（Figure 3h）。

イノシン添加 5 分, 10 分, 20 分後に回収した神経細胞の MAPK リン酸化比は、イノシン（最終濃度 100 $\mu$ M）添加 10 分後、およびイノシン（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それぞれ有意（ $P < 0.05$ ）に高値を示した（Figure 3i）。

アンタゴニストの CPT または CSC を前もって添加することにより、神経細胞の MAPK リン酸化比は、イノシン添加培地と比較して有意（ $P < 0.05$ ）に低値を示した（Figure 3j）。



**Figure 3.**

**Inosine promotes neuronal viability, neurite outgrowth and phosphorylation of MAPK.**

Surviving neurons stained with CBB, scale bar: 20  $\mu\text{m}$  (a), effect of inosine on cell viability ( $n = 5$ ) (b), effect of inosine on cell viability measured by a colorimetric method ( $n = 4$ ) (c), effect of inosine on viability of cells bearing neurites ( $n = 5$ ) (d), effect of inosine on viability of cells extending neurites longer than the soma ( $n = 5$ ) (e), effect of transient treatment with inosine on neuronal viability ( $n = 6$ ) (f), inhibitory effects of adenosine receptor antagonists on neurotrophic function of inosine ( $n = 5$ ) (g), inosine-induced phosphorylation of MAPK in neurons ( $n = 3$ ) (h), time course analyses of phosphorylation of MAPK ( $n = 3$ ) (i), inhibitory effects of CPT or CSC on inosine-induced phosphorylation of MAPK ( $n = 5$ ) (j). Data represent mean  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , versus 0  $\mu\text{M}$  of inosine. (b, c, d, e, f, h and i) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , versus 100  $\mu\text{M}$  of inosine. (g and j)

## VI. 考察

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、生細胞数ならびに神経突起を有する生細胞数が有意に増加することが確認された。これらの神経細胞保護効果は、イノシンが軸索や樹状突起を伸展させるという研究成績<sup>53,64)</sup>や、PC12細胞の継代培養で神経細胞を増殖するという報告<sup>52)</sup>を支持するものである。神経細胞にイノシンを2時間のみ添加し、その後非添加培地に替えて翌日観察すると、生細胞数はイノシン添加培地と同等に高値を示した。これは、マウスの脳内イノシン濃度が一過性に上昇することで、その後脳内イノシン濃度が低下しても細胞増殖が促進されることを示唆している。高強度運動負荷終了後30分の時点で脳内イノシン濃度が低下したことを考慮すると神経細胞にイノシンをより短時間暴露し、生細胞数が増加するか否かを今後検討する必要があると思われる。

イノシンはA<sub>1</sub>、A<sub>2A</sub>およびA<sub>3</sub>受容体と結合することが報告されており、特に神経調整機能にかかわる受容体はA<sub>1</sub>およびA<sub>2A</sub>とされる<sup>56,57)</sup>。アデノシンの鎮静効果や抗不安効果のほとんどは、神経細胞やグリア細胞の表面にあるA<sub>1</sub>受容体を介して行われるという<sup>65)</sup>。A<sub>1</sub>受容体が活性化すると、後シナプスニューロンの神経興奮の低下や、前シナプスニューロンの神経伝達物質の放出抑制が生じる。一方、A<sub>2A</sub>受容体の機能に関しては様々な研究報告がある。PC12細胞を低酸素に暴露すると細胞死に至るが、これに対しプリンヌクレオシドがA<sub>2A</sub>受容体を活性化して神経保護効果を示すと報告されている<sup>66)</sup>。また、海馬のA<sub>2A</sub>受容体を活性化するとBDNFのシナプス伝達を促進するという研究成果も報告されている<sup>67)</sup>。本研究では、初代培養したラット胎仔の大脳皮質神経細胞に対するイノシンの細胞保護効果がA<sub>1</sub>およびA<sub>2A</sub>受容体アンタゴニストにより抑制されることが確認された。

イノシンを神経細胞に添加すると5-10分で迅速にMAPKリン酸化比が有意に増加することが観察された。アデノシン受容体とMAPKリン酸化との関係は、イノシンの細胞保護効果において明らかに重要な役割を果たすと報告されている<sup>52,63)</sup>。A<sub>1</sub>、A<sub>2A</sub>受容体アンタゴニストであるCPTやCSCによりMAPKリン酸化が阻害されたが、これは先行研究<sup>58)</sup>の成績を支持するものであった。

## V. まとめ

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 A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストの CPT（最終濃度 1 $\mu$ M）添加培地または A<sub>2A</sub> 受容体アンタゴニストの CSC（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（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. 目的

長期間のストレスにより、海馬歯状回顆粒細胞下層 **subgranular zone** (以下、**SGZ**) の神経新生が低下することが動物実験で明らかになっているが<sup>68)</sup>、近年、運動により海馬の神経新生が増加するという研究成績が報告されている<sup>69,70)</sup>。加齢マウスをランニングホイールのあるケージで 45 日間飼育した研究<sup>71)</sup>では、1 日 4 時間の運動で神経新生が増加することが確認された。さらにまた電気痙攣法<sup>72)</sup>や抗うつ剤投与<sup>73)</sup>により神経新生が増加することも確認されている。神経新生に関与する因子の一つに **BDNF** がある。Li<sup>43)</sup>らは、**BDNF** 特異的受容体である **tyrosine receptor kinase B** (以下、**TrkB**) 欠損マウスに自由回転運動を負荷しても、海馬歯状回の神経新生は確認されず、神経新生に **BDNF** シグナルが関連することを報告している。**BDNF** は神経細胞の生存や分化に重要な役割を果たすといわれており、ストレスにより脳の **BDNF** が低下すると報告されている<sup>74)</sup>。動物実験<sup>75)</sup>や臨床研究<sup>76)</sup>によると、脳の **BDNF** は抗うつ剤治療に加えて運動でも増加するという。Rasmussen ら<sup>77)</sup>によると、マウスにトレッドミル運動を負荷したところ、2 時間後に **BDNF mRNA** が海馬と大脳皮質でピークを示したという。自由回転ランニングホイールを設置したケージでラットを飼育した研究<sup>78)</sup>では、2~7 日で脳内の **BDNF mRNA** が、海馬と大脳皮質において増加することが確認された。Liu ら<sup>29)</sup>は、2 つの異なる運動が **BDNF** に与える効果を調べた。彼らの研究では、マウスに中強度のトレッドミル走とランニングホイールによる自発運動を負荷したところ、どちらの運動においても **BDNF-TrkB** 受容体経路が活性化されたという。さらに、トレッドミル走では海馬と扁桃核、ランニングホイールによる自発運動では海馬が最も活性化され、運動の種類により活性化される部位が異なることが確認されたという。

近年、運動により骨格筋で **BDNF**、インターロイキン 6, 8 などの生理活性物質が産生されることが報告されている<sup>79-81)</sup>。Mathews ら<sup>79)</sup>は、8 名の男性被験者に 2 時間の自転車運動を最大酸素摂取量の 60% の強度で負荷し、筋バイオプシーを実施した。著者らは、筋由来の **BDNF** は循環血に放出されることなく筋肉内にとどまり、脳への影響は少ないものと結論づけている。ところで、海馬の神経新生は微小管の近くにみられることが報告<sup>82)</sup>されており、血管新生と神経新生の関連性が指摘されている。Heine ら<sup>83)</sup>は、ストレス誘発性の海馬神経新生の低下は毛細血管の近くで観察され、慢性ストレスによる血流量の低下が血管密度の減少につながると推測している。Kiuchi ら<sup>84)</sup>は、マウスに中強度のトレッドミル走を負荷することによりうつ様行動が予防され、ストレスにより減少した海馬の血

管面積が改善されることを報告している。さらに、著者らはこの血管面積の改善は、VEGF 阻害剤により抑制されることを確認しており、血管新生と VEGF の関連性が示唆されたという。Febel ら<sup>85)</sup>も、運動により海馬の神経新生が起こるメカニズムに、VEGF が重要な因子として働くことを報告している。海馬における VEGF の発現が抗うつ剤のフルオキセチンやデシプラミンにより増加することや<sup>86)</sup>、VEGF 受容体阻害剤が抗うつ剤の効果を抑制すること<sup>87)</sup>が報告されており、VEGF が抗うつ剤の作用機序に関与していることが示唆される。

第 2 章では、高強度運動をマウスに負荷し、運動負荷終了 1 分後に脳内イノシン濃度が上昇することが確認された。第 3 章では、イノシンを添加すると初代培養したラット胎仔の脳皮質神経細胞の生細胞数が増加し、この神経保護効果は A<sub>1</sub> および A<sub>2A</sub> 受容体を介すること、ならびに MAPK リン酸化が関与することが明らかになった。第 4 章では、イノシンの経口投与後の脳内イノシン濃度の変化を測定し、イノシン経口投与による抗うつ効果の有無について検討し、抗うつ効果が発現するメカニズムについて検討することを目的とする。

## II. 方法

### 1. イノシン経口投与後の脳内イノシン濃度の測定

マウスは、アルミ製飼育ケージ (32×21.5×10.5cm) で 5 匹ずつ飼育した。飼育室は室温 24℃、湿度 50~60%、照明は午前 8 時点灯、12 時間の明暗サイクルに管理され、餌と水は自由摂取させた。本研究は、日本医科大学の「実験動物を対象とした研究に関する動物実験倫理委員会規定」に基づいて行われた (整理番号 23-216)。

イノシン経口投与後の脳内イノシン濃度の経時変化を調べるために、ICR マウス 30 匹 (7 週齢, オス, 平均体重 31.9±1.2g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan) 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 時間後に断頭し脳を単離した (各々 n=10, n=10)。ただちに大脳半球を左右に切り分け、重量を測定したのち-80℃で凍結保存した。脳内イノシン濃度の HPLC による測定は、第 2 章 II. 方法 3. に示した方法で行った。

### 2. 抗うつ効果の行動解析

#### 2-1. Chronic unpredictable stress と強制水泳試験

4 週間の予測不可能な慢性ストレス chronic unpredictable stress (以下, CUS) を負荷したマウスのうつ様行動に対するイノシンの効果を強制水泳試験により検討した。C57BL/6j マウス 30 匹 (7 週齢, オス, 平均体重 22.7±1.3g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan) を対象とし、このうち 20 匹に CUS を負荷し、イノシン混餌群と通常餌群に分けた (各々 n=10, n=10)。餌は、粉末飼料 MF (Oriental East, Japan) に熱湯 (80℃) を加えて形成した。イノシン混餌は、1 日のイノシン摂取量が 0.2mg/g B.W. になるよう計算し、イノシンを粉末飼料 MF に 1mg/g の割合で加え形成した。イノシン混餌群にはイノシン混餌を、通常餌群には粉末飼料 MF を用いて形成した通常餌を 4 週間与えた。餌の入った容器は毎日重量を測定し、前日との差を 1 日の摂餌量とした。ケージ内に餌がこぼれているかどうかを確認し、こぼれていた場合はその重量を容器に戻して計測をした。CUS を負荷するマウスは、アルミ製飼育ケージを 6 分割した区分 (10×10×10cm) で 1 匹ずつ飼育し、ストレスを負荷しない対照群のマウス (n=10) は、アルミ製飼育ケージで 5 匹ずつ飼育した。

CUS とは、異なるストレスを不規則な順序で毎日数週間与えるストレスモデルである。このストレスにより絶望や無気力などの行動変容が起こることが知られている。CUS を負

荷するマウスには、1日2種類のストレスを朝と晩に負荷した<sup>88)</sup>。朝の時間帯（9時～12時）に行ったストレスは、拘束（3h, 6回）、寒冷ストレス（4℃, 3h, 5回）、ケージ回転（100rpm, 3h, 5回）、強制水泳（水温 18℃, 5min, 3回）、ラットの床敷（3h, 4回）、ラットと対面（3h, 5回）、夜の時間帯（18～翌朝 9時）に行ったストレスは、夜間照明（5回）、湿った床敷（4回）、過密飼育（10匹/ケージ, 4回）、断食断水（4回）、ケージ傾斜（45° , 5回）、ストロボ照明（5回）であった。

CUS 負荷終了後、全てのマウスを対象として強制水泳試験を行った<sup>89)</sup>。マウスを逃避不可能な水槽に入れると、最初は水槽から逃げ出そうとしてもがき泳ぎ回るが、次第にそのような行動は減り、水面から鼻だけを出し、浮いているための最小の動きしかなくなる。強制水泳試験では、この動かない状態である時間（以下、無動時間）を計測してうつ状態を評価した。25℃の水をいれたシリンダー（高さ：20cm, 直径：15cm）にマウスを1匹ずつ入れ、ビデオカメラでマウスの動きを6分間録画した。後半の4分間における無動時間をストップウォッチで計測した。

## 2-2. ストレス感受性の高いマウスのスクリーニング

ストレスに対する感受性の高いマウスを選別する目的で、社会的行動試験を行った<sup>90)</sup>。 ” ストレスを受ける黒マウス” として C57BL/6j マウス 48 匹（6 週齢, オス, 平均体重 21.7±1.7g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan）を用い、プラスチック製飼育ケージで 5 匹ずつ飼育した。 ” ストレスを与える白マウス” として ICR マウス 24 匹（8 週齢, オス, Sankyo Labo Service Corporation, Japan）を用い、アルミ製飼育ケージを 2 分割した区分（15×20×10cm）で 1 匹ずつ飼育した。 ” ストレスを受ける黒マウス” を ” ストレスを与える白マウス” の区分に 1 日 10 分間入れて社会的ストレス（臭いをかぐ, 威嚇する, 噛むなど）を負荷した黒マウスは、毎日異なる白マウスの区分に入れ、3 日間連続してストレスを負荷した。

つぎに、社会的行動試験によりストレス感受性を評価した。まず、オープンフィールド試験の装置（40×40×40cm）の壁際にマウス一匹が入る程度の空の小ケージ（8×8×8cm）を置いた。 ” ストレスを受ける黒マウス” をオープンフィールド試験の装置に入れ 150 秒間その動きをビデオ撮影した。続いて、壁際に置いた空の小ケージの中に白マウスを入れ、さらに 150 秒間撮影した。小ケージ周辺 7cm 以内を interaction zone と定義し、黒マウスが interaction zone にいた時間を Smart Junior ver.1.0.06（Panlab, Spain）を用いて

計測した。

ストレス感受性の指標である percentage of time in interaction zone は、以下の式で算出した。100×（”ストレスを与える白マウス”存在下で”ストレスを受ける黒マウス”が interaction zone にいた時間/白マウス不在で黒マウスが interaction zone にいた時間）。白マウスが入っている小さなケージに近づかない黒マウスは、”ストレスを与える白マウス”に対するストレス感受性が高いと判断した。

社会的行動試験を実施した黒マウス 48 匹のうちから percentage of time in interaction zone が 100 未満であったストレス感受性の高い黒マウス 24 匹を、つぎに行う慢性社会的敗北ストレス chronic social defeat stress（以下、CSDS）の対象として選定した。

### 2-3. Chronic social defeat stress 負荷試験

CSDS は、社会的に優位な個体から慢性的に攻撃を受けるストレスモデルである。敗北した個体にはうつ様行動がみられるようになる。

社会的行動試験により選別したストレス感受性の高い黒マウス 24 匹をイノシン水溶液飲用群と水飲用群に分けたが、試験期間中に両群とも 2 匹ずつ死亡し、各群 10 匹となった（各々 n=10, n=10）。アルミ製飼育ケージを 2 分割しその 1 つを広区分（15×20×10cm）とし、もう 1 つの広区分をさらに 2 分割し小区分（15×10×10cm）とした。7 週齢の”ストレスを受ける黒マウス”を小区分で、9 週齢の”ストレスを与える白マウス”を広区分で 1 匹ずつ飼育した。

イノシン水溶液は、1 日のイノシン摂取量が 0.2mg/g B.W.となるよう計算し、イノシン 1mg を水 1ml に溶解し調製した。イノシン水溶液飲用群にはイノシン水溶液を、水飲用群には水を 10 日間与えた。餌は固形飼料 MF（Oriental Yeast, Japan）を与えた。ストレスを負荷しない対照群のマウス（n=12）は、アルミ製飼育ケージを 4 分割した区分（15×10×10cm）で 1 匹ずつ飼育した。

”ストレスを受ける黒マウス”を”ストレスを与える白マウス”の区分に 1 日 10 分間入れストレスを受けさせた<sup>91)</sup>。ストレス負荷の後、黒マウスは白マウスに隣接する小区分に居住させた。両区分の仕切り板には穴が開いていて、臭いも姿もわかるようになっていた。黒マウスは毎日異なる白マウスからストレスを受けた後、隣接する小区分で 24 時間飼育した。

10 日間の CSDS 負荷の後黒マウス 20 匹と対照群 12 匹を対象にショ糖嗜好性試験を行

った<sup>92)</sup>。マウスは元来シヨ糖水を好んで摂取するが、過剰なストレスを与えるとこの嗜好性が低下する。この嗜好性の低下は、うつ病の診断項目に含まれる「興味、喜びの著しい減退」に類似すると推測される。テスト開始3日前からケージに2本の給水ボトルを設置し、片方に1%シヨ糖水、片方に水をいれ、自由に選べるようにした。ボトルの設置場所は毎日左右を交換した。夜間の12時間(20:00~8:00)の摂取量を調べるため、試験開始の前日から各ボトルの重量を測定した。試験は2日連続で行った。シヨ糖嗜好率は、(シヨ糖水の摂取量/シヨ糖と水の摂取量)×100で算出した。

なお、シヨ糖嗜好性試験を実施した翌日に、この黒マウス20匹と対照群12匹を対象に社会的行動試験を再度実施し、ストレス感受性について再評価した。

#### 2-4. オープンフィールド試験

CSDSがマウスの不安様行動および自発運動に与える影響、ならびにイノシン水溶液投与による変化についてオープンフィールド試験で検討した<sup>75)</sup>。CSDSの実験の対象となった32匹のマウスを、1匹ずつオープンフィールド試験の装置(40×40×45cm)のすみに入れ、マウスの動きを10分間ビデオ撮影した。マウスが床面の中央ゾーン(10×10cm)を横切った頻度 frequency of entry to the center, マウスの移動距離 distance traveled, マウスの静止時間 resting time を Smart Junior ver.1.0.06 (Panlab, Spain) を用いて分析した。

#### 3. イノシン経口投与およびCUSを受けたマウスの海馬におけるBrdU陽性細胞の計測

イノシンの経口投与が海馬歯状回SGZにおける細胞増殖に影響を与えるか否かについて検討した。ICRマウス19匹(7週齢, オス, 平均体重34.0±0.8g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan)に5-ブロモ-2-デオキシウリジン 5-bromo-2-deoxyuridine (以下, BrdU) (Sigma-Aldorich, USA) を50mg/kg B.W.の濃度で腹腔内投与し、このうち10匹にイノシン(0.33mg/g B.W.)水溶液を直後に経口投与した<sup>93)</sup>。24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で開胸し、左心室より採血後、生理食塩水で還流し全身の脱血を行った。脳の半球を4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)に浸して一晩振盪しながら固定した。その後、マイクロスライサーLEICA VT 1000S (Leica Microsystems, Germany)により厚さ40μmの切片を作成し、これを免疫組織化学的分析に用いた。まず、組織中の内因性ペルオキシダーゼ不活化

のために、切片に 3%過酸化水素/メタノール溶液を加え 30 分間反応させた。リン酸緩衝液 phosphate-buffered saline (以下, PBS) で 5 分×3 回洗浄した後, 30mM クエン酸緩衝液を加え, 65°C で 2 時間反応させた。クエン酸緩衝液を加え 10 分間反応させ洗浄したのち, 2M の塩酸を加え 37°C で 30 分間反応させた。0.1M ホウ酸液で 10 分間, PBS で 5 分×3 回洗浄した後, M.O.M.マウス IgG ブロッキング試薬 (Vector Laboratories, USA) を加え 1 時間反応させた。PBS で 5 分×3 回洗浄した後, protein concentrate 液を加え 5 分間反応させた。500 倍に希釈した抗 BrdU 抗体 (Roche, Switzerland) を加え, 振盪しながら 4°C で 2 晩反応させた。PBS で洗浄し, 250 倍に希釈した 2 次抗体 biotinylated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, USA) を加えて室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後, AB 試薬を加え室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後, 過酸化水素水に溶解した 3,3-Diaminobenzidine (Sigma-Aldorich, USA) を加え, 染色が完了した切片を PBS で洗浄した。スライドガラスに切片を張り付け乾燥させ, PermaFluor (Thermo Fisher Scientific Inc., New Zealand) で透徹した。光学顕微鏡 ECLIPSE E400 (Nikon, Japan) で海馬歯状回 SGZ を観察して BrdU 陽性細胞数を計測した。計測に際しては, 1 匹あたり 3 切片を用いた。

また, CUSを負荷したマウスの海馬における細胞増殖の変化も同様の方法で調べた。CUS 負荷試験期間の3週目の連続した3日間にC57BL/6j マウス30匹すべてを対象として, BrdU (50mg/kg B.W.) を1日1回腹腔内投与した。4週間のCUS負荷終了後に上記の方法でBrdU陽性細胞数を計測した。抗BrdU抗体は, 100倍に希釈したマウスモノクローナル抗体 (BD Pharmingen, USA) を用いた。

#### 4. イノシン経口投与後の海馬における MAPK およびリン酸化 MAPK の測定

イノシン経口投与後のマウスの海馬における MAPK リン酸化比の変化をウェスタンブロットティング法により検討した。ICR マウス 30 匹 (7 週齢, オス, 平均体重 32.9±0.9g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan) 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 時間後に断頭した (各々 n=7, n=5, n=6, n=6)。ただちに海馬を単離し-80°Cで保存した。海馬は凍結粉碎し, 海馬重量の 10 倍量の lysis buffer (調製方法は第 3 章 II.方法 3-1.に記載) を加えてホモジネートし, 第 3 章 II.方法 3-2.に示した方法で MAPK リン酸化比を算出した。

## 5. 海馬の BDNF mRNA 発現の測定

### 5-1. イノシン経口投与後の海馬における BDNF mRNA 発現

ICR マウス 40 匹 (7 週齢, オス, 平均体重  $33.2 \pm 0.8$ g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan) を対象として, このうち 30 匹にイノシン ( $0.33$ mg/g B.W.) 水溶液を経口投与し, 1, 2, 4 時間後に断頭した (各々  $n=10$ ,  $n=10$ ,  $n=10$ ). ただちに海馬を単離して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した. RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて, 凍結粉碎した海馬サンプルから Total RNA を抽出し, Takara PCR Cycle (Takara Bio, Japan) により cDNA を合成し, PCR Thermo Cycler (Takara Bio, Japan) を用いて BDNF mRNA を算定した. BDNF mRNA の発現はグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下, GAPDH) でノーマライズした. プライマーとプローブのシーケンスは以下のとおりである.

#### BDNF

F primer: 59-ACCATAAGGACGCGGACTTG-39

R primer: 59-GAGGCTCCAAAGGCACTTGA-39

probe: 59-ACACTTCCCGGGTGATGCTCAGCA-39

#### GAPDH

F primer: 59-CATCACTGCCACCCAGAAGA-39

R primer: 59-ATGTTCTGGGCAGCC-39

probe: 59-TGGATGGCCCCTCTGGAAAGCTG-39

### 5-2. イノシン経口投与後の海馬における BDNF mRNA 発現に対するアデノシン受容体アンタゴニストの影響

ICR マウス 37 匹 (7 週齢, オス, 平均体重  $33.8 \pm 1.4$ g, Sankyo Labo Service Corporation, Japan) を対象として, このうち 14 匹にイノシン ( $0.33$ mg/g B.W.) 水溶液を投与し 2 時間後に断頭し, 8 匹に  $A_1$  受容体アンタゴニストの 8-シクロペンチル-1,3-ディプロピルキサンチン 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (以下, DPCPX) (Sigma-Aldrich, USA) を腹腔内投与 ( $2\mu\text{g/g}$  B.W.) し, 30 分後にイノシン ( $0.33$ mg/g B.W.) 水溶液を投与し, イノシン投与 2 時間後に断頭し, 8 匹に DPCPX を腹腔内投与し, 2 時間 30 分後に断頭した (各々  $n=14$ ,  $n=8$ ,  $n=8$ ). ただちに海馬を単離して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し, 上記の方法により BDNF mRNA 発現を測定した.

## 6. 統計処理

測定値は、平均値±標準誤差（mean±SE）で示した。群間の差は一元または二元分散分析で解析し、Fisher's PLSD post hoc test を用いて統計処理を行った。統計学的有意差は\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  とした。統計解析はエクセル 2007 ver.1.00 を用いた。

### III. 結果

#### 1. イノシン経口投与後の脳内イノシン濃度の変化

イノシン経口投与後の脳内イノシン濃度を HPLC により測定した (Figure 4a). 経口投与 1 時間後の脳内イノシン濃度 ( $119 \pm 5 \mu\text{mol/kg}$  組織) は対照 ( $105 \pm 5 \mu\text{mol/kg}$  組織) と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に上昇し, 2 時間後には  $109 \pm 3 \mu\text{mol/kg}$  組織へ低下した (Figure 4b). イノシン経口投与 1 時間後の脳内イノシン濃度と対照との差は,  $13 \mu\text{mol/kg}$  組織であった.

#### 2-1. CUS における強制水泳試験と海馬歯状回 SGZ の細胞増殖

CUS を 4 週間負荷した後強制水泳試験を行い, イノシン混餌摂取がマウスのうつ様行動に与える影響について検討した. 強制水泳試験における無動時間は, 通常餌群 ( $162 \pm 12$  秒) で対照群 ( $92 \pm 10$  秒) と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値であった. 一方, イノシン混餌群の無動時間 ( $108 \pm 8.1$  秒) は通常餌群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低値であった (Figure 5a).

海馬歯状回 SGZ の BrdU 陽性細胞数は, 通常餌群 ( $3409 \pm 256/\text{mm}^3$ ) で対照群 ( $6823 \pm 198/\text{mm}^3$ ) と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低値を示した. 一方, イノシン混餌群の BrdU 陽性細胞数 ( $6402 \pm 317/\text{mm}^3$ ) は通常餌群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値であった (Figure 5b,c). 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.

#### 2-2. CSDS とショ糖嗜好性試験

CSDS を 10 日間負荷した後ショ糖嗜好性試験を行い, イノシン水溶液の飲用がマウスのうつ様行動に与える影響について検討した. CSDS を負荷した 4 週間における摂餌量, 摂水量および体重は, ストレスの有無, イノシン水溶液飲用の有無にかかわらず有意差はみられなかった (Figure 6a,b,c).

ショ糖嗜好率は水飲用群 ( $65.8 \pm 4.2\%$ ) で対照群 ( $81.6 \pm 2.4\%$ ) と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低値を示した. 一方, イノシン水溶液飲用群のショ糖嗜好率 ( $80.1 \pm 4.1\%$ ) は水飲用群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値を示した (Figure 6e). イノシン水溶液飲用群が 10 日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.

### 2-3. CSDS と社会的行動試験

CSDS を 10 日間負荷した後社会的行動試験を行った。Percentage of time in interaction zone が、水飲用群 ( $6 \pm 3\%$ ) およびイノシン水溶液飲用群 ( $8 \pm 3\%$ ) で対照群 ( $146 \pm 8\%$ ) と比較してともに有意 ( $P < 0.01$ ) に低値を示した (Figure 6d)

### 2-4. オープンフィールド試験

CSDS がマウスの不安様行動および自発運動に与える影響、ならびにイノシン水溶液飲用による変化についてオープンフィールド試験で検討した。オープンフィールド装置の中央ゾーンを横切った頻度が、水飲用群で対照群と比較して低下傾向を示したが、イノシン水溶液飲用群で水飲用群と比較して低下の予防傾向が示された (Figure 6f)。しかし、統計学的有意差には至らなかった。移動距離および静止時間ともに群間で有意な差はみられなかった (Figure 6g,h)。

## 3. イノシン経口投与後の海馬歯状回 SGZ の細胞増殖の変化

イノシン経口投与後の海馬歯状回 SGZ の細胞増殖の変化について検討した。BrdU 陽性細胞数は、イノシン経口投与 24 時間後 ( $6917 \pm 549/\text{mm}^3$ ) に対照群 ( $4033 \pm 255/\text{mm}^3$ ) と比較して、有意 ( $P < 0.05$ ) に高値を示した (Figure 7a,b)。

## 4. イノシン経口投与後の海馬 MAPK リン酸化比の変化

イノシン経口投与後の海馬 MAPK リン酸化比の変化について検討した。MAPK リン酸化比は、イノシン投与 2 時間後 ( $1.8 \pm 0.54$ ) に対照群 ( $1 \pm 0.1$ ) と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値を示し、8 時間後に  $1 \pm 0.2$  へ低下した (Figure 8)。

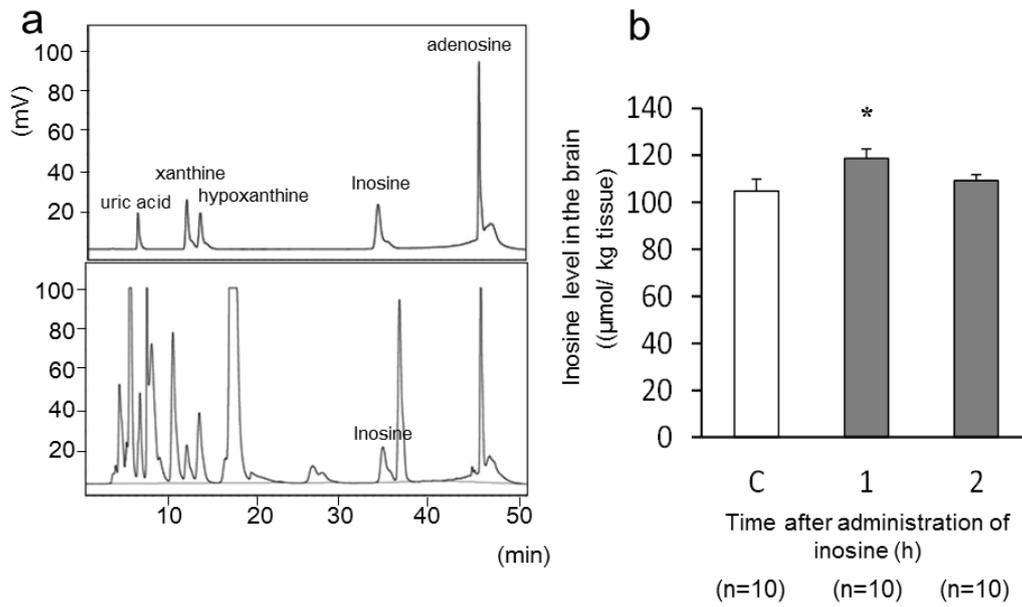
## 5. 海馬 BDNF mRNA 発現の変化

### 5-1. イノシン経口投与後の海馬 BDNF mRNA 発現の変化

イノシン経口投与後の海馬 BDNF mRNA 発現は、イノシン経口投与 2 時間後 ( $1.8 \pm 0.12$ ) に対照群 ( $1 \pm 0.12$ ) と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示し、4 時間後に  $1.3 \pm 0.28$  へ低下した (Figure 9a)。

## 5-2. イノシン経口投与後の海馬における BDNF mRNA 発現に対するアデノシン受容体アンタゴニストの影響

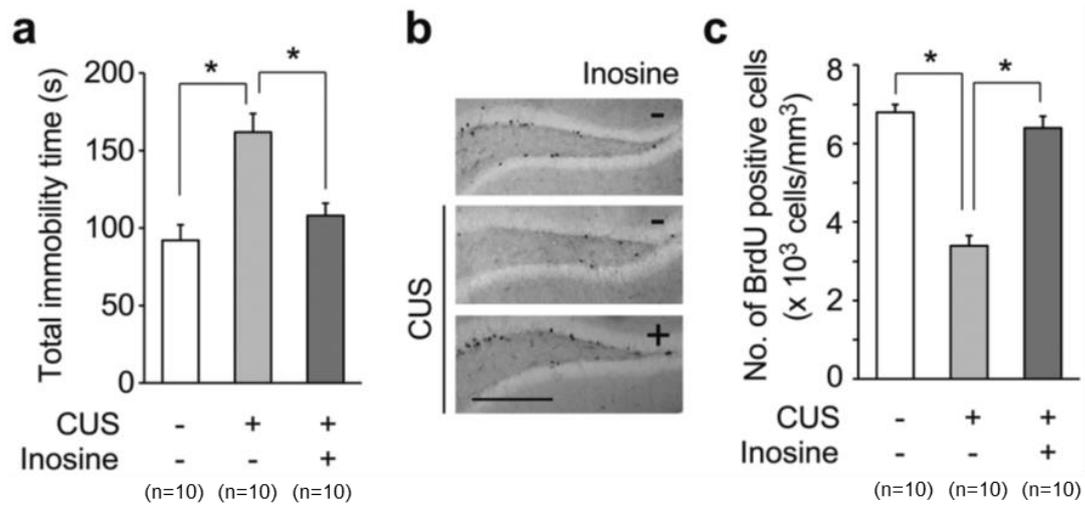
A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストの DPCPX を投与した後イノシンを投与したマウスの BDNF mRNA 発現 ( $1.4 \pm 0.21$ ) は、イノシン投与群 ( $1.8 \pm 0.21$ ) と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低値を示した。DPCPX のみを投与した群の BDNF mRNA 発現 ( $1.1 \pm 0.11$ ) もイノシン投与群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に低値を示した (Figure 9b)。



**Figure 4.**

**Inosine is increased in the brain after its single oral administration.**

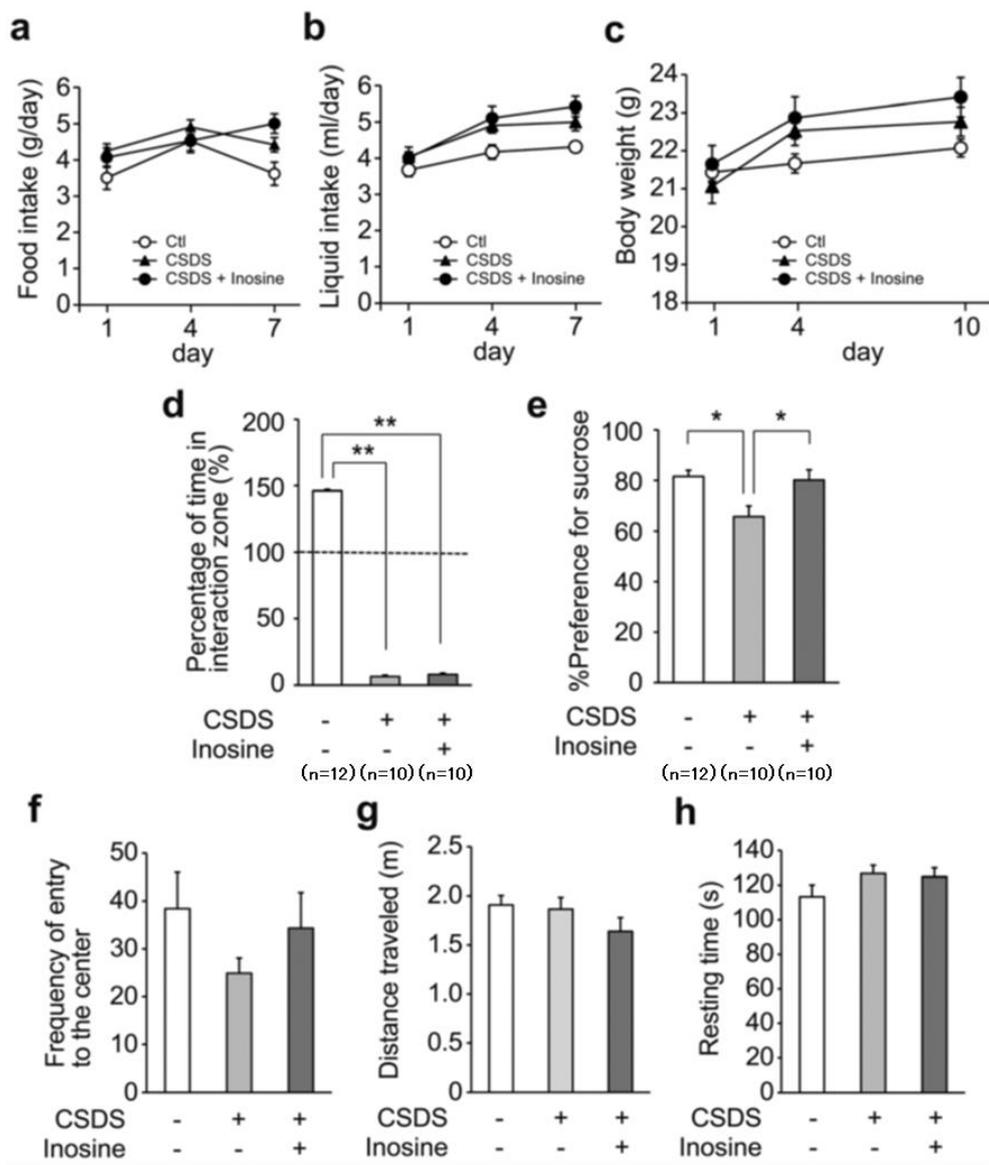
Chromatogram of a standard mixture (the upper) and that of the supernatant of homogenized brain of untreated mouse (the lower) (a), changes in inosine levels in the brain after administration of inosine (b). Data represent mean  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , versus Control (C).



**Figure 5.**

**Antidepressive effect and increase in cell proliferation of inosine in CUS test**

Total immobility time in Forced swim test (a), brain sections immunostained with anti-BrdU antibody, scale bar: 100  $\mu$ m (b), the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus (c). Data represent mean  $\pm$  SE. \* $P$ <0.05, versus CUS without inosine.



**Figure 6.**

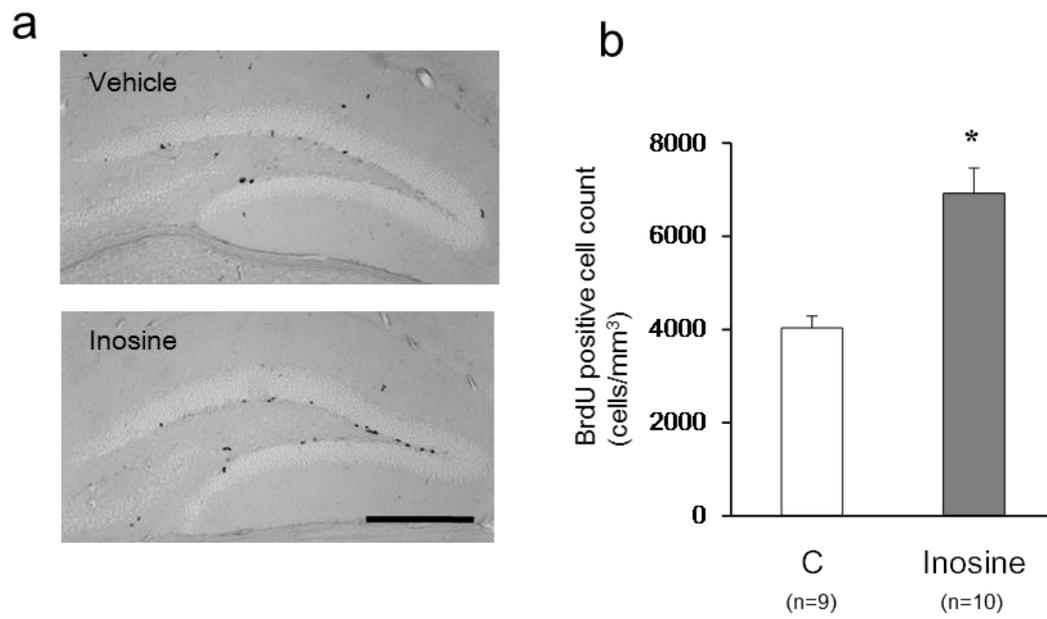
**Antidepressive effect and influence in Open field test of inosine in CSDS test**

Food intake, liquid intake and body weight of the mice in CSDS test (a, b and c), social interaction (d)

\*\* $P < 0.01$  versus Control, sucrose preference (e) \* $P < 0.05$  versus CSDS without inosine, frequency of

entry to the center in the arena (f), distance traveled (g), and resting time (h) in Open field test. Data

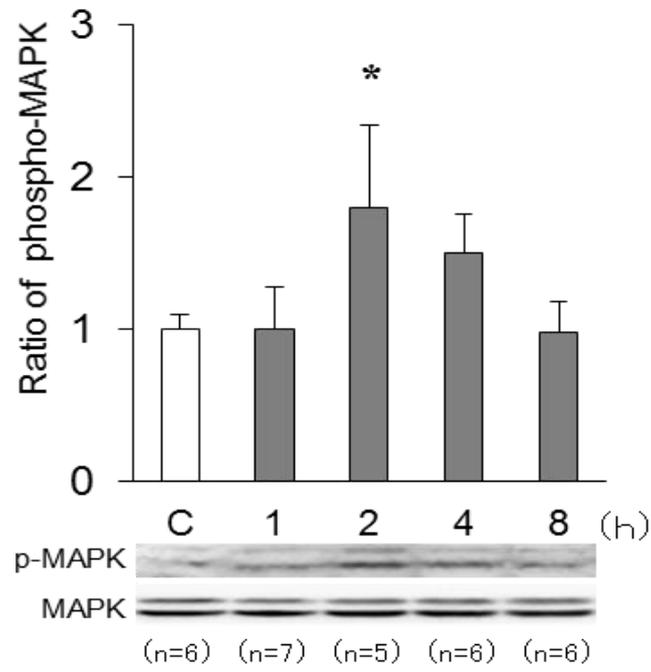
represent mean  $\pm$  SE.



**Figure 7.**

**Single oral administration of inosine enhances cell proliferation in the hippocampus.**

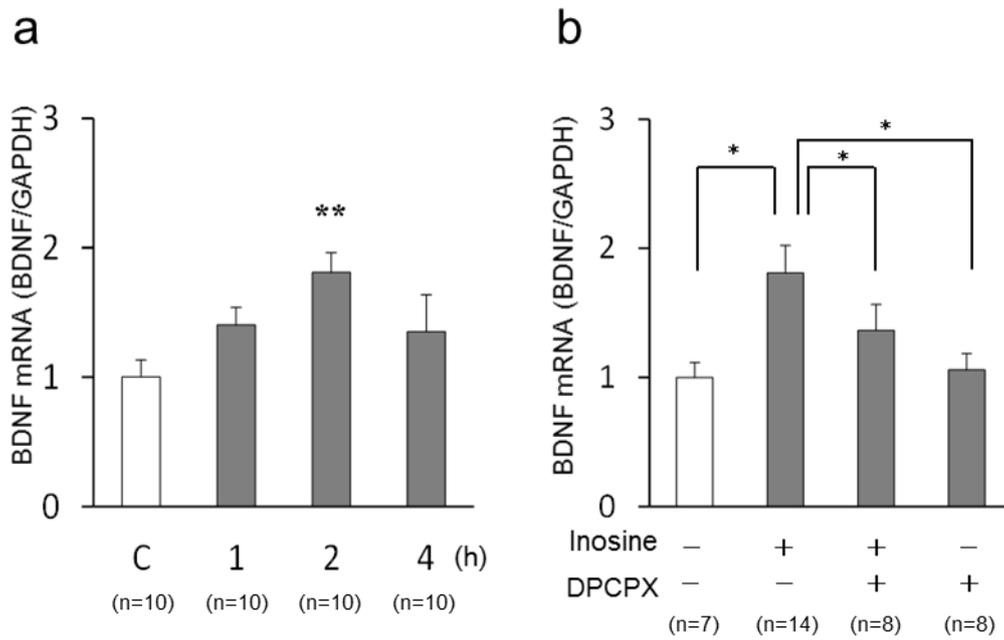
Brain sections immunostained with anti-BrdU antibody, scale bar: 100  $\mu\text{m}$  (a), the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus (b). Data represent mean  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , versus Control (C).



**Figure 8.**

**Single oral administration of inosine enhances phosphorylation of MAPK in the hippocampus.**

Data represent mean ± SE. \* $P < 0.05$ , versus Control (C).



**Figure 9.**

**Single oral administration of inosine enhances transcription of BDNF in the hippocampus.**

Quantitation of BDNF transcript level after oral administration of inosine (a)  $**P < 0.01$  versus Control (C), inhibitory effect of adenosine A<sub>1</sub> antagonist, DPCPX on BDNF transcript level (b)  $*P < 0.05$  versus 100  $\mu$ M of inosine. Data represent mean  $\pm$  SE.

## IV. 考察

### 1. イノシン経口投与による脳内イノシン濃度の変化

イノシンが神経細胞の軸索再生や伸展に与える影響を検討した先行研究<sup>94,95)</sup>では、腹腔内投与または脳室内投与が用いられている。2013年、Kasterら<sup>96)</sup>が報告したイノシンの抗うつ効果に関する研究では、マウスにイノシン 0.001-0.005mg/g B.W.を腹腔内投与している。イノシンは経口投与後に小腸上皮や肝細胞から迅速に吸収され血中へ移行することから<sup>97)</sup>、本研究では経口投与後の脳内イノシン濃度の変化について検討した。

マウスにイノシン 0.33mg/g B.W.を経口投与した1時間後に脳内イノシン濃度は119±5μmol/kg 組織へ上昇し、2時間後には低下した。血液に移行したイノシンは、ほとんどがヒポキサンチン、キサンチン、尿酸に代謝されるが、一部の未変化体のイノシンが脳に移行した可能性が、この現象の一因として推測された<sup>97)</sup>。イノシンの血漿中濃度はμM オーダー以下であることから<sup>97)</sup>、血液の混入による上昇はないと考えられる。

有効成分がイノシンである医薬品イノシンプラノベクスが持田製薬株式会社から販売されている。イノシンプラノベクスのインタビューフォーム<sup>98)</sup>によると、効能又は効果として亜急性硬化性全脳炎患者における生存期間の延長と記載されている。薬物動態に関する項目の中で、放射性同位元素で標識したイノシン 100mg/kg をラットに経口投与したところ<sup>14</sup>C-イノシンは投与30分～1時間後に最高血中濃度に達し、投与12時間後までに消失したという。また、放射性同位元素で標識したイノシン 100mg/kg をラットに経口投与した1時間後の臓器内放射能濃度は、消化管を除くと腎臓が高く、次いで肝臓であり、脳の放射能濃度は0.56±0.04μg eq. inosine/gであったと記載されており、経口投与したイノシンがわずかではあるが脳で検出されることが確認されている。

イノシン経口投与1時間後の脳内イノシン濃度は対照と比較して13μmol/kg 組織ほど上昇していることが確認された。これは低、中強度運動負荷終了1分後の脳内イノシン濃度の対照との差(10, 12μmol/kg 組織)と同等の値であった。イノシンの投与量の0.33mg/g B.W.は、体重60kgの健常男性に1日1回10gのイノシン酸を経口摂取させた先行研究<sup>99)</sup>を参考に算出したが、運動の抗うつ効果と脳内イノシン濃度の関係を調べる上で、本研究で用いた経口投与量はおおむね妥当であったと考えられた。

### 2. イノシン経口投与による抗うつ効果

まず4週間のCUSを負荷したマウスにおいてイノシンによる抗うつ効果を検討した。

イノシンはイノシンプラノベクスの安定性試験<sup>98)</sup>において固体状態で 50°C, 36 ヶ月安定であることが確認されていることから、混餌で与えても有効成分が分解されることなくマウスに摂取されたと考えられる。この実験に用いたイノシン混餌投与量 (0.2mg/g B.W./day) は、脳内イノシン濃度の測定に用いた経口投与量 (0.33mg/g B.W.) より低く設定した。これは、後者が単回投与であったのに対して、CUS を負荷した実験では 28 日間継続して摂取させるためであった。

CUS は様々なストレスを繰り返しマウスに与えることで、うつ病の症状に含まれる快感消失や無力感を生じるとされている。4 週間の CUS を受けた通常餌群のマウスに強制水泳試験を行ったところ無動時間 (絶望の行動指標) が延長されうつ様行動が確認された。しかし、CUS を負荷したイノシン混餌群のマウスの無動時間は対照と同等であり、イノシン混餌群ではうつ様行動が観察されないことが確認された。

社会的行動試験では、対照のマウスは “ストレスを与える白マウス” がいる小さなケージ周辺の interaction zone に長く滞在し、白マウスに対して興味を持っていることが推測された。一方、CSDS を負荷したマウスは、イノシン水溶液飲用の有無にかかわらず interaction zone の滞在時間が短く、自分に “ストレスを与えた白マウス” を記憶しており、恐怖を感じていることが推測された。

シヨ糖嗜好率の低下は「これまで楽しんできた活動に興味や喜びを感じられない」という、うつ病の典型的な症状と一致しているとされる<sup>100)</sup>。水飲用群のシヨ糖嗜好率は低下しうつ様行動が観察されたが、イノシン水溶液飲用群のシヨ糖嗜好率は対照と同等であり、CSDS を負荷してもうつ様行動が観察されないことが確認された。イノシンプラノベクスは沸騰水中 6 時間加熱しても有効成分は安定であると報告<sup>98)</sup>されているが、CSDS を負荷した実験では、混餌から水溶液の形態に変更してイノシンを投与することとし、イノシン摂取量をより正確に把握することができたと推測された。

本研究では、4 週間のイノシン混餌摂取または 10 日間のイノシン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 (0.33mg/g B.W./day) よりも少ない投与量 (0.2mg/g B.W./day) にもかかわらず、抗うつ効果が確認されたことは興味深い。現在アメリカでパーキンソン病の治療薬としてイノシンの臨床試験が行われている。医薬品としての安全性を検討する研究報告<sup>101)</sup>の中に、「興味深いことに、イノシン投与は臨床試験期間のうつ症状の軽度悪化を防ぐように思われる。」と記載されている。しかし、この抗うつ効果がイノシン由来かその代謝物の尿酸由来なのかについては定かではなく、今後さ

らに検討してみる意義のある課題であろう。

イノシンはプリン体であるため、多く摂取すると体内の尿酸値が上昇し、ヒトによっては高尿酸血症などの有害事象に至る可能性がある<sup>102)</sup>、イノシンプラノベクスのインタビュフォーム<sup>98)</sup>には、1日50-100mg/kgのイノシンを3-4回に分けて服用するよう記載されている。3回に分けて服用するとして1回0.033mg/kgまでは医薬品としての安全性が確認されていることになる。本研究ではイノシンプラノベクスよりも多い量をマウスに投与しており、今後安全性を考慮した適切な投与量についてさらに検討する必要があると思われる。

### 3. イノシンによる抗うつ効果のメカニズム

アデノシンの抗うつ効果を調べた研究<sup>27)</sup>では、A<sub>1</sub>およびA<sub>2A</sub>受容体を介して抗うつ効果が確認されたと報告されている。私たちが得た研究成績によると、イノシンも同様にA<sub>1</sub>およびA<sub>2A</sub>受容体を介して抗うつ効果を示すことが確認された。うつに関するアデノシン受容体の神経調整システムは複雑である。アデノシンの抗うつ効果が報告<sup>27)</sup>されている一方、A<sub>2A</sub>受容体アンタゴニストに抗うつ効果があるという研究報告<sup>103)</sup>もある。アデノシンの神経伝達系は、セロトニン<sup>104)</sup>、コルチコトロピン<sup>105)</sup>などの神経伝達調整とも関係があることが報告されている。イノシンによる抗うつ効果もA<sub>1</sub>およびA<sub>2A</sub>受容体を介する作用以外にも多様な経路が関与している可能性は否定できず、今後の検討を有する課題と思われる。

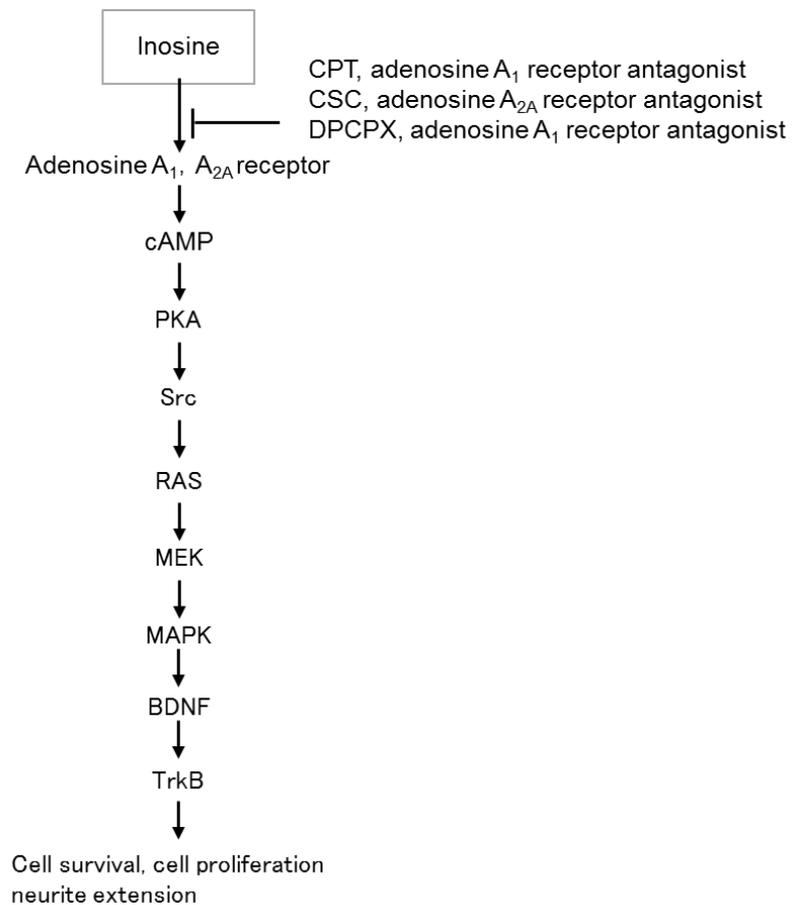
本研究では、イノシン経口投与24時間後に海馬歯状回SGZのBrdU陽性細胞数が有意に増加し、細胞増殖の促進が確認された。しかし、本研究ではBrdU免疫染色のみを行い、神経細胞の同定のための染色を行わなかったため、実験結果に関しては神経新生という言葉を使わずに細胞増殖と表現している。これまでに、A<sub>1</sub>受容体の活性化により神経幹細胞の増殖が誘発されるという報告があり<sup>106)</sup>、イノシンによる細胞増殖の促進作用には、A<sub>1</sub>受容体活性が関与することが推測された。

CUSを負荷した通常餌群のマウスでは、海馬歯状回SGZのBrdU陽性細胞数が有意に低値を示したが、CUSを負荷してもイノシン混餌群では通常餌群と比較してBrdU陽性細胞数は有意に高値を示し、ストレスを受けても細胞増殖が抑制されないことが確認された。海馬歯状回SGZの神経新生が抗うつ剤により促進されるという研究成績は多く報告されており、抗うつ効果発現の一因として神経新生が深くかかわっていることは明白になっ

てきていると思われる<sup>107-109)</sup>。

イノシン経口投与 2 時間後に、海馬の MAPK リン酸化と BDNF mRNA 発現が有意に増加した。MAPK リン酸化後に BDNF mRNA 発現が増加するという研究報告があることから<sup>110,111)</sup>、イノシンによる MAPK リン酸化の増加が海馬の BDNF mRNA 発現の増加の一因と考えられた。イノシンによる BDNF mRNA 発現の増加は、A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストである DPCPX により部分的に阻害されたことから、イノシンが A<sub>1</sub> 受容体を介して BDNF mRNA に影響を与えたことが示唆された。うつ病患者では海馬の BDNF が減少することが報告されている。Karege F ら<sup>112)</sup>の研究では、自殺したうつ病患者のうち薬物投与を受けなかった患者の海馬 BDNF 濃度は対照と比べて低かったが、向精神薬の投与を受けた患者の海馬 BDNF 濃度は対照と差がなかったという。うつ病患者の脳における BDNF 濃度の低下は、年齢や性別に関係ないとされており、自殺行為の病態生理学的側面を説明する重要な役割を果たすと考えられている<sup>113)</sup>。本研究においてイノシン経口投与後に海馬の BDNF mRNA 発現の増加が確認されたことから、イノシンによる抗うつ効果のメカニズムの一端を BDNF が担っている可能性が示唆される。海馬と同様に、血清 BDNF 濃度もうつ病患者で低下することが報告<sup>114,115)</sup>されている。Shimizu ら<sup>115)</sup>の研究によると、ハミルトンうつ病評価尺度得点と血清 BDNF 濃度との間に負の相関関係が示され、血清 BDNF 濃度の低下はうつ状態と関連することが示唆されたという。

イノシンの神経栄養因子として考えられるメカニズムを Figure 10 にまとめた<sup>52,116)</sup>。神経細胞においてイノシン濃度が増加すると、A<sub>1</sub> および A<sub>2A</sub> 受容体を介するシグナルが伝達され MAPK がリン酸化され、その後 BDNF の増加に至り、生細胞数の増加や神経突起伸展が促進され、海馬の細胞増殖が促進されることが推測された。これらの神経保護効果は A<sub>1</sub> および A<sub>2A</sub> 受容体アンタゴニストにより阻害されることが確認されが、このほかにも多様な経路が関与している可能性があり、今後さらに検討を要する課題であると思われる。



**Figure 10.**

**Possible neurotrophic mechanism of inosine via MAPK and BDNF**

Based on the results obtained in the research and other reviews of previous reports<sup>52,116</sup>, inosine is supposed to activate signaling cascade involving cAMP, PKA, Src, RAS, MEK and MAPK via adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. It is known that MAPK activation is followed by BDNF expression. BDNF binds to TrkB resulting in increases in cell survival, cell proliferation, and neurite extension. CPT and CSC decreased activation of MAPK and enhancement of cell survival induced by inosine. DPCPX suppressed expression of BDNF induced by inosine. Abbreviations are 8-cyclopentyl theophylline (CPT), 8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC), 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA), sarcoma (Src), rat sarcoma (RAS), mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and tyrosine kinase B (TrkB).

## V. まとめ

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 群間で有意な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も 3 群間で有意な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

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、ラット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 $\mu$ M）の神経保護効果について検討した。つぎにイノシンの神経保護効果がアデノシン受容体を介するか否かを調べるために A<sub>1</sub> および A<sub>2A</sub> 受容体アンタゴニストを用いて検討した。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、mitogen-activated protein kinase（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。

本研究で得られた結果を以下に示す。

1. ICR マウスに高強度運動を負荷し、運動負荷終了 1 分後に脳内イノシン濃度（ $93\pm 8\mu\text{mol/kg}$  組織）が有意（ $P<0.01$ ）に上昇することが確認された。対照との差は  $33\mu\text{mol/kg}$  組織であった。（第2章）
2. ICR マウスに低、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。対照との差は各々  $10\mu\text{mol/kg}$  組織および  $12\mu\text{mol/kg}$  組織であった。（第2章）
3. ICR マウスにイノシン（0.33mg/g BW）を経口投与し、1 時間後に脳内イノシン濃度（ $119\pm 5\mu\text{mol/kg}$  組織）が有意（ $P<0.05$ ）に上昇することが確認された。対照との差は  $13\mu\text{mol/kg}$  組織であった。（第4章）

4. CUS を負荷した C57BL/6J マウスにイノシン (0.2mg/g BW) 混餌を 4 週間摂取させた後、強制水泳試験において抗うつ効果が確認された。(第 4 章)
5. CSDS を負荷した C57BL/6J マウスにイノシン (0.2mg/g BW) 水溶液を 10 日間飲用させた後、ショ糖嗜好性試験において抗うつ効果が確認された。(第 4 章)
6. ラット胎仔の脳皮質神経細胞の初代培養 (第 3 章)
  - 1) イノシン添加培地の生細胞数が非添加培地と比較して有意 ( $P < 0.01-0.05$ ) に高値を示した。
  - 2) 神経細胞に  $A_1$  受容体アンタゴニストの 8-cyclopentyl theophylline (CPT) または  $A_{2A}$  受容体アンタゴニストの 8-(3-chlorostyryl) caffeine (CSC) (各々最終濃度  $1\mu\text{M}$ ) を添加した後イノシン (最終濃度  $100\mu\text{M}$ ) 添加培地を加えたところ、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。
7. イノシン (0.33mg/g BW) 経口投与した ICR マウスの海馬 (第 4 章)
  - 1) 投与 24 時間後に海馬歯状回顆粒細胞下層 subgranular zone (SGZ) の神経細胞数が対照と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に高値を示した。
  - 2) 投与 2 時間後に海馬 BDNF mRNA 発現が対照と比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示した。

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<sup>31,117</sup>。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「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)<sup>85</sup> や BDNF<sup>77</sup> 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<sub>1</sub>およびA<sub>2A</sub>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33μmol/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13μmol/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。

#### 今後の展望

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, 12μmol/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（13μmol/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<sup>118)</sup>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。

## 参考文献

1. Mathers, C.D., Loncar, D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine* 3 (11): 2011-2030.
2. 厚生労働省大臣官房統計情報部, 人口動態保健社会統計課, 保健統計室患者統計係. (2011) 平成 23 年 患者調査 (傷病分類編) . 21-74.
3. 川上憲人. (2006) こころの健康についての疫学調査に関する研究, 総括研究報告書. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業) 1.
4. 厚生労働省労働基準局労災補償部補償課職業病認定対策室. (2014) 平成 25 年度「脳・心臓疾患と精神障害の労災補償状況」公表 平成 27 年 6 月 27 日. 14,21.
5. Josefsson, T., Lindwall, M., Archer, T. (2014) Physical exercise intervention in depressive disorders: meta-analysis and systematic review. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 24 (2): 259-272.
6. Silveira, H., Moraes, H., Oliveira, N., Coutinho, E.S., Laks, J., Deslandes, A. (2013) Physical exercise and clinically depressed patients: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychobiology* 67 (2): 61-68.
7. Bridle, C., Spanjers, K., Patel, S., Atherton, N.M., Lamb, S.E. (2012) Effect of exercise on depression severity in older people: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Psychiatry* 201 (3): 180-185.
8. Kugler, J., Seelbach, H., Kruskemper, G.M. (1994) Effects of rehabilitation exercise programmes on anxiety and depression in coronary patients: a meta-analysis. *The British journal of clinical psychology / the British Psychological Society* 33 ( Pt 3) 401-410.
9. Sjosten, N., Kivela, S.L. (2006) The effects of physical exercise on depressive symptoms among the aged: a systematic review. *International journal of geriatric psychiatry* 21 (5): 410-418.
10. North, T.C., McCullagh, P., Tran, Z.V. (1990) Effect of exercise on depression. *Exercise and sport sciences reviews* 18 379-415.
11. Cooney, G.M., Dwan, K., Greig, C.A., Lawlor, D.A., Rimer, J., Waugh, F.R., McMurdo, M., Mead, G.E. (2013) Exercise for depression. *The Cochrane database of systematic reviews* 9 CD004366.
12. Blumenthal, J.A., Babyak, M.A., Moore, K.A., Craighead, W.E., Herman, S., Khatri,

- P., Waugh, R., Napolitano, M.A., Forman, L.M., Appelbaum, M., Doraiswamy, P.M., Krishnan, K.R. (1999) Effects of exercise training on older patients with major depression. *Arch Intern Med* 159 (19): 2349-2356.
13. Babyak, M., Blumenthal, J.A., Herman, S., Khatri, P., Doraiswamy, M., Moore, K., Craighead, W.E., Baldewicz, T.T., Krishnan, K.R. (2000) Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. *Psychosomatic medicine* 62 (5): 633-638.
  14. Trivedi, M.H., Greer, T.L., Church, T.S., Carmody, T.J., Grannemann, B.D., Galper, D.I., Dunn, A.L., Earnest, C.P., Sunderajan, P., Henley, S.S., Blair, S.N. (2011) Exercise as an augmentation treatment for nonremitted major depressive disorder: a randomized, parallel dose comparison. *The Journal of clinical psychiatry* 72 (5): 677-684.
  15. 栗原堅三. (1998) 味と香りの話. 岩波新書:東京 19.
  16. Starling, R.D., Trappe, T.A., Short, K.R., Sheffield-Moore, M., Jozsi, A.C., Fink, W.J., Costill, D.L. (1996) Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. *Med Sci Sports Exerc* 28 (9): 1193-1198.
  17. Williams, M.H., Kreider, R.B., Hunter, D.W., Somma, C.T., Shall, L.M., Woodhouse, M.L., Rokitski, L. (1990) Effect of inosine supplementation on 3-mile treadmill run performance and VO<sub>2</sub> peak. *Med Sci Sports Exerc* 22 (4): 517-522.
  18. McNaughton, L., Dalton, B., Tarr, J. (1999) Inosine supplementation has no effect on aerobic or anaerobic cycling performance. *International journal of sport nutrition* 9 (4): 333-344.
  19. Akerblom, O., de Verdier, C.H., Garby, L., Hogman, C. (1968) Restoration of defective oxygen-transport function of stored red blood cells by addition of inosine. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 21 (3): 245-248.
  20. de Verdier, C.H., Westman, M. (1973) Intravenous infusion of inosine in man: effect on erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate concentration and on blood oxygen affinity. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 32 (3): 205-210.
  21. Czarnecki, W., Mathison, R., Harmsen, E., Tyberg, J.V. (1992) Inosine--a natural modulator of contractility and myocardial blood flow in the ischemic heart?

- American heart journal 124 (6): 1446-1459.
22. Harmsen, E., de Tombe, P.P., de Jong, J.W., Achterberg, P.W. (1984) Enhanced ATP and GTP synthesis from hypoxanthine or inosine after myocardial ischemia. *Am J Physiol* 246 (1 Pt 2): H37-43.
  23. Snider, I.P., Bazzarre, T.L., Murdoch, S.D., Goldfarb, A. (1992) Effects of coenzyme athletic performance system as an ergogenic aid on endurance performance to exhaustion. *International journal of sport nutrition* 2 (3): 272-286.
  24. Hasko, G., Sitkovsky, M.V., Szabo, C. (2004) Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci* 25 (3): 152-157.
  25. Jurkowitz, M.S., Litsky, M.L., Browning, M.J., Hohl, C.M. (1998) Adenosine, inosine, and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation. *J Neurochem* 71 (2): 535-548.
  26. Dworak, M., Diel, P., Voss, S., Hollmann, W., Struder, H.K. (2007) Intense exercise increases adenosine concentrations in rat brain: implications for a homeostatic sleep drive. *Neuroscience* 150 (4): 789-795.
  27. Kaster, M.P., Rosa, A.O., Rosso, M.M., Goulart, E.C., Santos, A.R., Rodrigues, A.L. (2004) Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. *Neurosci Lett* 355 (1-2): 21-24.
  28. Marek, G.J. (2012) Activation of adenosine(1) receptors induces antidepressant-like, anti-impulsive effects on differential reinforcement of low-rate 72-s behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 341 (2): 564-570.
  29. Liu, Y.F., Chen, H.I., Wu, C.L., Kuo, Y.M., Yu, L., Huang, A.M., Wu, F.S., Chuang, J.I., Jen, C.J. (2009) Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol* 587 (Pt 13): 3221-3231.
  30. Jiang, P., Dang, R.L., Li, H.D., Zhang, L.H., Zhu, W.Y., Xue, Y., Tang, M.M. (2014) The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Evid Based*

- Complement Alternat Med 2014 729827.
31. Kim, T.W., Lim, B.V., Kim, K., Seo, J.H., Kim, C.J. (2015) Treadmill exercise alleviates stress-induced impairment of social interaction through 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation in rats. *J Exerc Rehabil* 11 (4): 192-197.
  32. Schoenfeld, T.J., Rada, P., Pieruzzini, P.R., Hsueh, B., Gould, E. (2013) Physical exercise prevents stress-induced activation of granule neurons and enhances local inhibitory mechanisms in the dentate gyrus. *J Neurosci* 33 (18): 7770-7777.
  33. Schurr, A. (2006) Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate. *J Cereb Blood Flow Metab* 26 142-152.
  34. Saito, T., Soya, H. (2004) Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 (3): R484-490.
  35. Zhang, Y., Geiger, J.D., Lutt, W.W. (1991) Improved high-pressure liquid chromatographic-fluorometric assay for measurement of adenosine in plasma. *Am J Physiol* 260 (4 Pt 1): G658-664.
  36. Mikami, T., Kitagawa, J. (2006) Intense exercise induces the degradation of adenine nucleotide and purine nucleotide synthesis via de novo pathway in the rat liver. *Eur J Appl Physiol* 96 (5): 543-550.
  37. Koos, B.J. (2011) Adenosine A<sub>2a</sub> receptors and O<sub>2</sub> sensing in development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301 (3): R601-622.
  38. Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (4): 251-262.
  39. Mo, H., Chen, Y., Huang, L., Zhang, H., Li, J., Zhou, W. (2013) Neuroprotective effect of tea polyphenols on oxyhemoglobin induced subarachnoid hemorrhage in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2013 743938.
  40. Huston, J.P., Haas, H.L., Boix, F., Pfister, M., Decking, U., Schrader, J., Schwarting, R.K. (1996) Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats. *Neuroscience* 73 (1): 99-107.
  41. Isakovic, A.J., Abbott, N.J., Redzic, Z.B. (2004) Brain to blood efflux transport of

- adenosine: blood-brain barrier studies in the rat. *J Neurochem* 90 (2): 272-286.
42. Parkinson, F.E., Damaraju, V.L., Graham, K., Yao, S.Y., Baldwin, S.A., Cass, C.E., Young, J.D. (2011) Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Curr Top Med Chem* 11 (8): 948-972.
  43. Zhao, S., Snow, R.J., Stathis, C.G., Febbraio, M.A., Carey, M.F. (2000) Muscle adenine nucleotide metabolism during and in recovery from maximal exercise in humans. *Journal of applied physiology* 88 (5): 1513-1519.
  44. Dudzinska, W., Lubkowska, A., Dolegowska, B., Safranow, K. (2010) Blood uridine concentration may be an indicator of the degradation of pyrimidine nucleotides during physical exercise with increasing intensity. *Journal of physiology and biochemistry* 66 (3): 189-196.
  45. Doyne, E.J., Ossip-Klein, D.J., Bowman, E.D., Osborn, K.M., McDougall-Wilson, I.B., Neimeyer, R.A. (1987) Running versus weight lifting in the treatment of depression. *Journal of consulting and clinical psychology* 55 (5): 748-754.
  46. Martinsen, E.W., Hoffart, A., Solberg, O. (1989) Comparing aerobic with nonaerobic forms of exercise in the treatment of clinical depression: a randomized trial. *Comprehensive psychiatry* 30 (4): 324-331.
  47. Mead, G.E., Morley, W., Campbell, P., Greig, C.A., McMurdo, M., Lawlor, D.A. (2008) Exercise for depression. *The Cochrane database of systematic reviews* (4): CD004366.
  48. Teychenne, M., Ball, K., Salmon, J. (2008) Physical activity and likelihood of depression in adults: a review. *Preventive medicine* 46 (5): 397-411.
  49. Dunn, A.L., Trivedi, M.H., Kampert, J.B., Clark, C.G., Chambliss, H.O. (2002) The DOSE study: a clinical trial to examine efficacy and dose response of exercise as treatment for depression. *Controlled clinical trials* 23 (5): 584-603.
  50. Singh, N.A., Stavrinou, T.M., Scarbek, Y., Galambos, G., Liber, C., Fiatarone Singh, M.A. (2005) A randomized controlled trial of high versus low intensity weight training versus general practitioner care for clinical depression in older adults. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 60 (6): 768-776.

51. Litsky, M.L., Hohl, C.M., Lucas, J.H., Jurkowitz, M.S. (1999) Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. *Brain Res* 821 (2): 426-432.
52. Tomaselli, B., Nedden, S.Z., Podhraski, V., Baier-Bitterlich, G. (2008) p42/44 MAPK is an essential effector for purine nucleoside-mediated neuroprotection of hypoxic PC12 cells and primary cerebellar granule neurons. *Mol Cell Neurosci* 38 (4): 559-568.
53. Benowitz, L.I., Jing, Y., Tabibiazar, R., Jo, S.A., Petrusch, B., Stuermer, C.A., Rosenberg, P.A., Irwin, N. (1998) Axon outgrowth is regulated by an intracellular purine-sensitive mechanism in retinal ganglion cells. *J Biol Chem* 273 (45): 29626-29634.
54. Benowitz, L.I., Goldberg, D.E., Irwin, N. (2002) Inosine stimulates axon growth in vitro and in the adult CNS. *Prog Brain Res* 137 389-399.
55. Benowitz, L.I., Carmichael, S.T. (2009) Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiol Dis* 37 (2): 259-266.
56. Ralevic, V., Burnstock, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50 (3): 413-492.
57. Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53 (4): 527-552.
58. Souza, L.F., Horn, A.P., Gelain, D.P., Jardim, F.R., Lenz, G., Bernard, E.A. (2005) Extracellular inosine modulates ERK 1/2 and p38 phosphorylation in cultured Sertoli cells: possible participation in TNF- $\alpha$  modulation of ERK 1/2. *Life Sci* 77 (24): 3117-3126.
59. da Rocha Lapa, F., de Oliveira, A.P., Accetturi, B.G., de Oliveira Martins, I., Domingos, H.V., de Almeida Cabrini, D., de Lima, W.T., Santos, A.R. (2013) Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub> receptors. *Purinergic signalling* 9 (3): 325-336.
60. Guinzberg, R., Cortes, D., Diaz-Cruz, A., Riveros-Rosas, H., Villalobos-Molina, R.,

- Pina, E. (2006) Inosine released after hypoxia activates hepatic glucose liberation through A3 adenosine receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (5): E940-951.
61. zur Nedden, S., Tomaselli, B., Baier-Bitterlich, G. (2008) HIF-1 alpha is an essential effector for purine nucleoside-mediated neuroprotection against hypoxia in PC12 cells and primary cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 105 (5): 1901-1914.
62. Asoh, S., Ohsawa, I., Mori, T., Katsura, K., Hiraide, T., Katayama, Y., Kimura, M., Ozaki, D., Yamagata, K., Ohta, S. (2002) Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (26): 17107-17112.
63. Tomaselli, B., Podhraski, V., Heftberger, V., Bock, G., Baier-Bitterlich, G. (2005) Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 MAPK activation. *Neurochem Int* 46 (7): 513-521.
64. Irwin, N., Li, Y.M., O'Toole, J.E., Benowitz, L.I. (2006) Mst3b, a purine-sensitive Ste20-like protein kinase, regulates axon outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (48): 18320-18325.
65. Paul, S., Elsinga, P.H., Ishiwata, K., Dierckx, R.A., van Waarde, A. (2011) Adenosine A(1) receptors in the central nervous system: their functions in health and disease, and possible elucidation by PET imaging. *Curr Med Chem* 18 (31): 4820-4835.
66. Kobayashi, S., Millhorn, D.E. (1999) Stimulation of expression for the adenosine A2A receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection. *J Biol Chem* 274 (29): 20358-20365.
67. Diogenes, M.J., Fernandes, C.C., Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A. (2004) Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J Neurosci* 24 (12): 2905-2913.
68. Mineur, Y.S., Belzung, C., Crusio, W.E. (2007) Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* 150 (2): 251-259.
69. van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2 (3): 266-270.
70. Fuss, J., Ben Abdallah, N.M., Vogt, M.A., Touma, C., Pacifici, P.G., Palme, R., Witzemann, V., Hellweg, R., Gass, P. (2009) Voluntary exercise induces anxiety-like

- behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20 (3): 364-376.
71. van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H. (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25 (38): 8680-8685.
  72. Madsen, T.M., Treschow, A., Bengzon, J., Bolwig, T.G., Lindvall, O., Tingstrom, A. (2000) Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 47 (12): 1043-1049.
  73. Liu, Q., Yu, J., Mao-Ying, Q.L., Mi, W.L., Li, B., Wang, Y.Q., Wang, J., Wu, G.C. (2008) Repeated clomipramine treatment reversed the inhibition of cell proliferation in adult hippocampus induced by chronic unpredictable stress. *Pharmacogenomics J* 8 (6): 375-383.
  74. Filho, C.B., Jesse, C.R., Donato, F., Giacomeli, R., Del Fabbro, L., da Silva Antunes, M., de Gomes, M.G., Goes, A.T., Boeira, S.P., Prigol, M., Souza, L.C. (2015) Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na(+),K(+)-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: Antidepressant effect of chrysin. *Neuroscience* 289 367-380.
  75. Zheng, H., Liu, Y., Li, W., Yang, B., Chen, D., Wang, X., Jiang, Z., Wang, H., Wang, Z., Cornelisson, G., Halberg, F. (2006) Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behav Brain Res* 168 (1): 47-55.
  76. Laske, C., Banschbach, S., Stransky, E., Bosch, S., Straten, G., Machann, J., Fritsche, A., Hipp, A., Niess, A., Eschweiler, G.W. (2010) Exercise-induced normalization of decreased BDNF serum concentration in elderly women with remitted major depression. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* 13 (5): 595-602.
  77. Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M.V., Leick, L., Hart, E., Secher, N.H., Pedersen, B.K., Pilegaard, H. (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Experimental physiology* 94 (10): 1062-1069.
  78. Neeper, S.A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C.W. (1996) Physical activity

- increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* 726 (1-2): 49-56.
79. Matthews, V.B., Astrom, M.B., Chan, M.H., Bruce, C.R., Krabbe, K.S., Prelovsek, O., Akerstrom, T., Yfanti, C., Broholm, C., Mortensen, O.H., Penkowa, M., Hojman, P., Zankari, A., Watt, M.J., Bruunsgaard, H., Pedersen, B.K., Febbraio, M.A. (2009) Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52 (7): 1409-1418.
80. Febbraio, M.A., Pedersen, B.K. (2005) Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exercise and sport sciences reviews* 33 (3): 114-119.
81. Stranska, Z., Svacina, S. (2015) [Myokines - muscle tissue hormones]. *Vnitřní lékařství* 61 (4): 365-368.
82. Yamashima, T., Tonchev, A.B., Vachkov, I.H., Popivanova, B.K., Seki, T., Sawamoto, K., Okano, H. (2004) Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 14 (7): 861-875.
83. Heine, V.M., Zareno, J., Maslam, S., Joels, M., Lucassen, P.J. (2005) Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. *Eur J Neurosci* 21 (5): 1304-1314.
84. Kiuchi, T., Lee, H., Mikami, T. (2012) Regular exercise cures depression-like behavior via VEGF-Flk-1 signaling in chronically stressed mice. *Neuroscience* 207 208-217.
85. Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C.J., Palmer, T.D. (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18 (10): 2803-2812.
86. Warner-Schmidt, J.L., Duman, R.S. (2007) VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (11): 4647-4652.
87. Greene, J., Banasr, M., Lee, B., Warner-Schmidt, J., Duman, R.S. (2009) Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of

- antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization. *Neuropsychopharmacology* 34 (11): 2459-2468.
88. Banasr, M., Valentine, G.W., Li, X.Y., Gourley, S.L., Taylor, J.R., Duman, R.S. (2007) Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry* 62 (5): 496-504.
89. Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266 (5604): 730-732.
90. Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K., Nestler, E.J. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131 (2): 391-404.
91. Hollis, F., Wang, H., Dietz, D., Gunjan, A., Kabbaj, M. (2010) The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl)* 211 (1): 69-77.
92. Covington, H.E., 3rd, Maze, I., LaPlant, Q.C., Vialou, V.F., Ohnishi, Y.N., Berton, O., Fass, D.M., Renthal, W., Rush, A.J., 3rd, Wu, E.Y., Ghose, S., Krishnan, V., Russo, S.J., Tamminga, C., Haggarty, S.J., Nestler, E.J. (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* 29 (37): 11451-11460.
93. Hodes, G.E., Hill-Smith, T.E., Lucki, I. (2010) Fluoxetine treatment induces dose dependent alterations in depression associated behavior and neural plasticity in female mice. *Neurosci Lett* 484 (1): 12-16.
94. Wu, M.M., You, S.W., Hou, B., Jiao, X.Y., Li, Y.Y., Ju, G. (2003) Effects of inosine on axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Neurosci Lett* 341 (1): 84-86.
95. Zai, L., Ferrari, C., Subbaiah, S., Havton, L.A., Coppola, G., Strittmatter, S., Irwin, N., Geschwind, D., Benowitz, L.I. (2009) Inosine alters gene expression and axonal projections in neurons contralateral to a cortical infarct and improves skilled use of

- the impaired limb. *J Neurosci* 29 (25): 8187-8197.
96. Kaster, M.P., Budni, J., Gazal, M., Cunha, M.P., Santos, A.R., Rodrigues, A.L. (2013) The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A2A receptors. *Purinergic signalling* 9 (3): 481-486.
97. Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Cheng, J., Takahashi, S., Tsutsumi, Z., Ka, T., Hada, T. (2002) Effect of inosine on the plasma concentration of uridine and purine bases. *Metabolism* 51 (4): 438-442.
98. 持田製薬株式会社. (2010) イソプリノシン錠 400mg インタビューフォーム 2010年7月(改定第2版) 日本標準商品分類番号 87629. 3-18.
99. Mikami, T., Yoshino, Y., Ito, A. (2000) Does a relationship exist between the urate pool in the body and lipid peroxidation during exercise? *Free Radic Res.* 32 (1): 31-39.
100. Katz, R.J. (1982) Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav* 16 (6): 965-968.
101. Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., Beal, M.F., Cudkowicz, M.E., Curhan, G.C., Hare, J.M., Hooper, D.C., Kieburtz, K.D., Macklin, E.A., Oakes, D., Rudolph, A., Shoulson, I., Tennis, M.K., Espay, A.J., Gartner, M., Hung, A., Bwala, G., Lenehan, R., Encarnacion, E., Ainslie, M., Castillo, R., Togasaki, D., Barles, G., Friedman, J.H., Niles, L., Carter, J.H., Murray, M., Goetz, C.G., Jaglin, J., Ahmed, A., Russell, D.S., Cotto, C., Goudreau, J.L., Russell, D., Parashos, S.A., Ede, P., Saint-Hilaire, M.H., Thomas, C.A., James, R., Stacy, M.A., Johnson, J., Gauger, L., Antonelle de Marcaida, J., Thurlow, S., Isaacson, S.H., Carvajal, L., Rao, J., Cook, M., Hope-Porche, C., McClurg, L., Grasso, D.L., Logan, R., Orme, C., Ross, T., Brocht, A.F., Constantinescu, R., Sharma, S., Venuto, C., Weber, J., Eaton, K. (2014) Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol* 71 (2): 141-150.
102. 山中寿. (2012) 高尿酸血症・通風の治療ガイドライン 2012年追補ダイジェスト版. 第2版 (メディカルレビュー社): 16.
103. Yamada, K., Kobayashi, M., Shiozaki, S., Ohta, T., Mori, A., Jenner, P., Kanda, T. (2014) Antidepressant activity of the adenosine A2A receptor antagonist,

- istradefylline (KW-6002) on learned helplessness in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 231 (14): 2839-2849.
104. Okada, M., Nutt, D.J., Murakami, T., Zhu, G., Kamata, A., Kawata, Y., Kaneko, S. (2001) Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci* 21 (2): 628-640.
105. Scaccianoce, S., Navarra, D., Di Sciuillo, A., Angelucci, L., Endroczi, E. (1989) Adenosine and pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Neuroendocrinology* 50 (4): 464-468.
106. Migita, H., Kominami, K., Higashida, M., Maruyama, R., Tuchida, N., McDonald, F., Shimada, F., Sakurada, K. (2008) Activation of adenosine A1 receptor-induced neural stem cell proliferation via MEK/ERK and Akt signaling pathways. *J Neurosci Res* 86 (13): 2820-2828.
107. Jiang, L., Liu, C., Tong, J., Mao, R., Chen, D., Wang, H., Huang, J., Li, L. (2014) Fluoxetine pretreatment promotes neuronal survival and maturation after auditory fear conditioning in the rat amygdala. *PLoS One* 9 (2): e89147.
108. Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., Saravia, F. (2006) Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 23 (6): 1539-1546.
109. Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S. (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20 (24): 9104-9110.
110. Zhang, L., Xu, T., Wang, S., Yu, L., Liu, D., Zhan, R., Yu, S.Y. (2012) Curcumin produces antidepressant effects via activating MAPK/ERK-dependent brain-derived neurotrophic factor expression in the amygdala of mice. *Behav Brain Res* 235 (1): 67-72.
111. Duman, C.H., Schlesinger, L., Kodama, M., Russell, D.S., Duman, R.S. (2007) A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 61 (5): 661-670.
112. Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., La Harpe, R. (2005) Neurotrophin

- levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* 136 (1-2): 29-37.
113. Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Conley, R.R., Roberts, R.C., Tamminga, C.A., Pandey, G.N. (2003) Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Archives of general psychiatry* 60 (8): 804-815.
114. Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., Aubry, J.M. (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109 (2): 143-148.
115. Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., Iyo, M. (2003) Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54 (1): 70-75.
116. Nassar, N.N., Abdel-Rahman, A.A. (2015) Brain stem adenosine receptors modulate centrally mediated hypotensive responses in conscious rats: A review. *Journal of advanced research* 6 (3): 331-340.
117. Dey, S., Singh, R.H., Dey, P.K. (1992) Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. *Physiol Behav* 52 (6): 1095-1099.
118. 伊賀淳一, 大森哲郎, 小笠原一能, 尾崎紀夫, 神庭重信, 杉山暢宏, 富田真幸, 野村総一郎, 渡邊衡一郎. (2013) 日本うつ病学会治療ガイドライン II. 大うつ病性障害 2013 Ver.1.1. 日本うつ病学会 27.

## 謝 辞

大学卒業から何年もたって大学院に入学し新たな分野で勉強しなおし今日に至るまで様々な面でご指導を賜り、何度も論文の書き方を教えてくださいました日本体育大学大学院体育科学研究科健康科学・スポーツ医科学系教授 大野 誠 先生に心よりの感謝を申し上げます。

実験に関してご指導頂きました日本医科大学スポーツ科学教室准教授 三上 俊夫 先生に深く感謝いたします。

細胞培養から論文作成まで丁寧にご指導頂きました東京都健康長寿医療センター老化制御研究チーム研究副部長 大澤 郁郎 先生に深く感謝いたします。

統計解析など研究の基本を教えてくださいました東京理科大学理工学部助教 向本 敬洋 先生，実験のコツを詳細に教えてくださいました共立女子短期大学准教授 中島早苗 先生に厚くお礼申し上げます。

やさしく寄り添ってくれた父，母，妹に感謝いたします。

最後に，常に励まして応援してくれた夫と娘に心から感謝します。