

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14878

研究課題名(和文)抗鬱薬に対するドラッグデリバリーシステムとしてのラクトフェリンの有用性

研究課題名(英文)Availability of lactoferrin as a drug delivery system for antidepressant

研究代表者

竹内 崇 (Takeuchi, Takashi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20216849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：反復強制水泳(FS)マウスを用いてウシラクトフェリン(bLf)の抗うつ効果を検証した。1%bLf添加飼料を給餌することでFSの無動時間は有意に短縮し、この抗うつ効果は一酸化窒素合成酵素阻害薬および κ -オピオイド受容体阻害薬の前投与によって消失した。一方、既存の抗うつ薬であるFluoxetine、ImipramineおよびPramipexoleとbLfとの相乗効果は認められなかった。BLfは、FS処置による前頭葉のDopamine D2受容体過剰発現をnon-FS群レベルまで改善した。BLfおよびLiposome-bLfを静脈内投与し海馬への移行動態を解析したが、検出限界以下であった。

研究成果の概要(英文)：We investigated an antidepressant like effect of bovine lactoferrin (bLf) in repeated forced-swim (FS) stress mice model. Supplemented bLf (1%) suppressed an immobility time in the FS test. This antidepressant like effect of bLf was disappeared by pre-treatment with a nitric oxide synthase inhibitor or kappa-opioid receptor antagonist. BLf had no effect on the immobility time by combination with fluoxetine, imipramine and pramipexole. While the dopamine D2 receptor mRNA expression in the frontal lobe was significantly increased in the FS treated mice, bLf maintained it as a control level. We couldn't detect transported bLf nor liposomal bLf in the hippocampus following even after the iv injection.

研究分野：獣医臨床検査学

キーワード：行動学 鬱 ストレス ラクトフェリン

1. 研究開始当初の背景

精神疾患の治療に使用される薬剤は血液・脳関門を通過することが必須条件となっており、薬剤の脳組織への到達効率を向上させることができれば、薬剤の効果も得られやすい。鉄結合性糖蛋白であるラクトフェリン(Lf)は、ストレス軽減作用および鎮痛作用を有し、経口摂取したものの一部は脳組織へ到達することが証明されている。これらの報告をもとに、近年、Lfを含有するナノパーティクル、あるいはリポソーム修飾Lfが開発されており、ドラッグデリバリーとしての有用性が期待される。しかしながら、Lfと抗うつ薬の併用による相乗効果に関する報告は見られず、抗うつ薬に対するドラッグデリバリーシステム(DDS)としてLfの有用性についても報告は未だ見当たらない。

2. 研究の目的

動物の精神疾患に対する治療法は現在も発展途上であり、有効な精神安定剤の選択肢も制限されている。しかしながら、種々の問題行動の誘因ともなり得る精神疾患は飼育者にとって大きな心理的負担となり、人と動物の良好な関係を維持する上で解決しなければならない問題である。本研究では、繰り返しストレス負荷することで誘発されるうつ様症状のモデル動物を利用し、抗うつ薬とLfとの相乗効果の検証を試みるとともに、Lfの作用機序の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 海馬へのLf移行動態の解析

血管内に存在するLfの脳実質への移行を検証する目的で、牛乳由来Lf(bLf, 3, 10, 30 mg/kg)またはリポソーム修飾bLf(10, 30 mg/kg)をICR系雄マウスの尾静脈内に投与し、30分後にペントバルビタールナトリウム投与による麻酔下にて生理食塩水の灌流を行い、続いてパラホルムアルデヒドによる灌流固定を行った。直ちに脳を採取し、パラホル

ムアルデヒドによる浸漬固定の後、海馬の薄切切片を作成し、常法に従って抗-bLf抗体による免疫組織化学的解析を行った。

(2) Lfの抗うつ効果ならびに既存の抗うつ薬との併用効果の解析

うつ様症状の改善には三環系抗うつ薬、セロトニン再取込阻害薬(SSRI)、ドーパミン受容体阻害薬等が使用されるが、動物を対象とした治療の検証は十分ではなく、臨床的にも大きな課題となっている。一方、治療薬の検証を目的としてうつ様症状を呈するモデル動物が確立されるなかで、再現性よく慢性的なうつ様症状を発現するモデルとして反復強制水泳モデルが報告されている。本研究では、ICR系雄マウスを水温25℃の水を満たしたシリンダー(直径10cm, 水深10cm)へ入れ、1日目は15分の強制水泳試験(FST)、2日目、7日目および14日目は5分のFSTをそれぞれ実施した。このモデルでは、経過日数にともなって無動時間が延長することから、慢性的なうつ症状を発現することが確認されている。はじめに、Lfによる抗うつ効果を検証するため、1日目のFSTの後、粉末飼料に1%BSAまたは1%bLfを添加し、2日目、7日目および14日目の無動時間を計測した。また、通常飼料で飼育した別の個体を用い、2日目のFSTの30分前にFluoxetine、ImipramineまたはPramipexoleの単独投与、あるいはbLf(100 mg/kg, ip)の併用による無動時間の変化を解析した。

(3) Lfの抗うつ効果における作用機序の解析

Lfによる抗うつ効果について脳内オピオイド系の関与を明らかにする目的で、Naloxone hydrochloride dihydrate(NX): 10 mg/kg およびDIPPA hydrochloride(DIPPA): 1 mg/kgの前投与による影響を解析した。さらに、脳内一酸化窒素の関与を明

らかにする目的で、一酸化窒素合成酵素阻害薬である N -Nitro- L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME): 10 mg/kg および 7-Nitroindazole monosodium salt (7-NI): 25 mg/kg の前投与による無動時間の変化を解析した。

(4) 血漿コルチコステロン基礎分泌量の解析

14 日目まで FST を行い、各 FST 終了 30 分後に尾静脈から 0.1 ml 採血した。さらに FST 終了翌日 (15 日目) に前述の方法で採血を行った。全ての血液はヘパリン処理し、遠心分離した血漿を Corticosterone ELISA Kit を用いて血漿コルチコステロン濃度を測定した。

(5) Lf が海馬 BDNF に及ぼす影響

反復 FST 処置 3 日目のマウスを使用し、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で断頭し、脳を摘出した。直ちに海馬組織を約 30mg 採取し、PBS を添加してホモジナイズしたのち、上清中の BDNF 含量を BDNF 測定キットを用いて測定した。

(6) Lf が脳の神経伝達物質受容体発現に及ぼす影響

反復 FST 処置 3 日目および 15 日目のマウスを使用し、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で断頭し、脳を摘出した。直ちに前頭葉、海馬、線条体および縫線核の各部位から脳サンプルを 10 から 30 mg 採取し、total RNA を抽出した。常法により cDNA を合成し、リアルタイム PCR により 5-HT1A, 5-HT2A, Dopamine D1 および D2 の各受容体 mRNA 発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 海馬への Lf 移行動態の解析

bLf の 3, 10, 30 mg/kg 投与群の全ての個体において、海馬の抗-bLf 陽性像は確認できなかった。同様の手法で、リポソーム修飾 bLf (10, 30 mg/kg) をマウスの尾静脈内に投与して検証したが、海馬組織に抗-bLf 抗体陽性像は確認できなかった。

以上の結果から、海馬組織への Lf 移行量は検出限界以下であると考えられた。

(2) Lf の抗うつ効果ならびに既存の抗うつ薬との併用効果の解析

各 FST における 5 分間 (1 日目では最初の 5 分間) のうちの無動時間を図 1 に示した。1% bLf 添加飼料群 (FS+bLf 群) は 1% BSA 添加飼料群 (FS+BSA 群) に比べ、すべての FST において無動時間は短縮する傾向にあり、特に 2 日目では有意差が確認された。

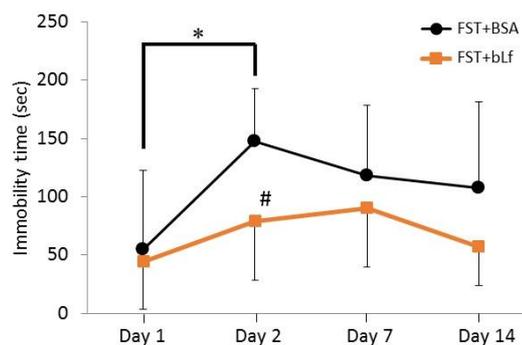


図 1 bLf による抗うつ効果

Mean \pm SD, *P<0.05 vs. Day1, #P<0.05 vs. FST+BSA 群.

また、Fluoxetine、Imipramine および Pramipexole と Lf との併用では、無動時間は抗うつ剤単独投与よりも増加傾向となり、既存の抗うつ剤の作用に拮抗するものであった。

(3) ラクトフェリンの抗うつ効果における作用機序の解析

非特異的NOS阻害薬であるL-NAME 10 mg/kgを2日目のFST 30分前に腹腔内投与したところ、FS+ BSA+ L-NAME 群ではFS+ BSA+ saline 群と比較し、無動時間に変化は認められなかった。しかし、FS+ bLf+ L-NAME 群ではFS+ bLf+ saline 群に比べ、無動時間は増加する傾向にあった。

nNOS 特異的阻害薬である7-NI (25 mg/kg)を2日目のFST 30分前に腹腔内投与したFS+ BSA+ 7-NI 群は、FS+ BSA+ saline 群に対して無動時間が有意に短縮した。一方、FS+ bLf+ L-NAME 群では、FS+ bLf+ saline 群に比べ無動時間は増加する傾向が認められた。

非特異的オピオイド受容体阻害薬であるナロキソン (NX) 10 mg/kgを2日目のFST 30分前に腹腔内投与したFS+ BSA+ NX 群は、FS+ BSA+ saline 群に対して有意に無動時間が短縮した。一方、FS+ bLf+ NX 群とFS+ bLf+ saline 群では、無動時間に変化は認められなかった。

-オピオイド受容体阻害薬であるDIPPA 1 mg/kgを2日目のFST 60分前に腹腔内投与したFS+ BSA+ DIPPA 群では、FS+ BSA+ saline 群と比較し、無動時間に変化は認められなかった。しかし、FS+ bLf+ DIPPA 群はFS+ bLf+ saline 群に比べ、無動時間が増加する傾向にあった。

(4) 血漿コルチコステロン基礎分泌量の解析

ストレスによるコルチコステロン分泌応答を解析するため、各FSTの30分後に採血し、血漿コルチコステロン濃度を測定した。FST処置を行った群(FS+BSA群およびFS+bLf群)ではnon-FS群に比較し、FST 30分後の血漿コルチコステロン濃度は顕著に上昇し、Two-way ANOVA 解析では、2日目(F(1,18)

=92.19)、7日目(F(1,18)=39.51)および14日目(F(1,18)=24.15)の全てにおいてFST処置の有無により有意な上昇が確認された(図2)。

bLf添加飼料群ではBSA添加飼料群よりも血漿コルチコステロン濃度は低値を示す傾向にあったが、有意差は認められなかった。

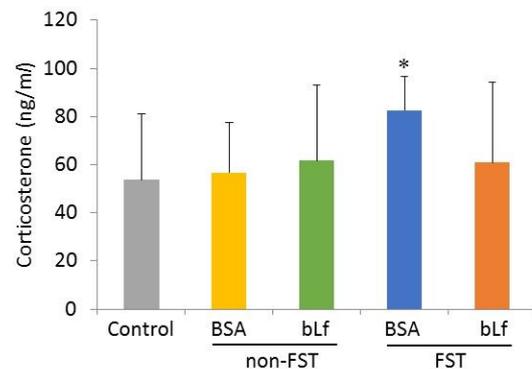


図2 15日目の血漿コルチコステロン濃度
Mean ± SD, *P<0.05 vs. non-FST-BSA.

(5) Lfが海馬BDNFに及ぼす影響

マウスに1% BSAまたは1% bLf添加飼料を給餌し、3日目の海馬におけるBDNF含有量を測定した。Non-FSでは、Lf群はcontrol群に対して有意にBDNF含有量を増加させた。しかしFS+BSA群とFS+Lf群のBDNF含有量に明らかな差は認められなかった(図3)。

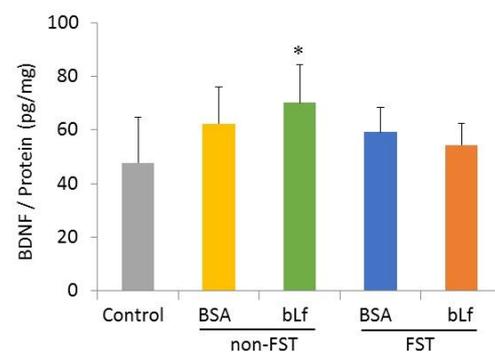


図3 15日目の海馬BDNF含量の比較
Mean ± SD, *P<0.05 vs. Control.

(6) Lfが脳の神経伝達物質受容体発現に及ぼ

す影響

マウスに 1% BSA 添加飼料または 1% bLf 添加飼料を給餌し、3 日目の脳各部位での 5-HT および Dopamine 受容体 mRNA 発現量の変化を解析した。

FS + BSA 群では BSA 群に比較し、海馬における 5-HT_{1A} 受容体 mRNA 発現量が有意に減少した。また、FS + BSA 群の 5-HT_{2A} 受容体 mRNA 発現量は、BSA 群と比較し、前頭葉では有意に減少し、縫線核においては有意に増加した。一方、Dopamine D1 および D2 受容体 mRNA 発現量は、脳 4 部位全てにおいて有意差は認められなかった。

また、15 日目の脳各部位での受容体発現を解析したところ、前頭葉における D2 受容体 mRNA 発現量は、FS+BSA 群で有意に増加したのに対し、FS+bLf 群では non-FS 群と同レベルであった。

以上の結果から、Lf の脳実質への移行量は検出限界以下であり、脳内の局在を明らかにすることはできなかった。しかしながら、Lf を経口摂取することで反復強制水泳によるうつ様症状は有意に軽減され、血漿コルチコステロンの上昇も抑制することが確認された。

Fluoxetine, Imipramine および Pramipexole と Lf との併用による相乗効果は確認できなかった。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

- (1) Takeuchi T: Multifunction of milk-derived iron-binding protein (lactoferrin) for the central nervous system. 6th International Conference and Exhibition on Nutrition, 14th, Sep, 2016, San Antonio (USA).

- (2) 下橋香奈・杉山晶彦・竹内 崇: 反復強制水泳モデルマウスにおけるラクトフェリンの抗鬱効果とオピオイドおよび NO の関与 . 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 9 月 8 日, 「日本大学 (神奈川県・藤沢市)」.

- (3) Takeuchi T, Sugiyama A, Murata D, Sato A, Kagaya S and Hoshino T: FC domain of IgG conjugated lactoferrin shows an enhancement of antinociception after continuous infusion into jugular vein in rat. XIIth International Conference of Lactoferrin. 4th, Sep, 2015, 「ウエスティンナゴヤキャッスル (愛知県・名古屋市)」.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 崇 (TAKEUCHI Takashi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号 : 20216849

(2) 連携研究者

竹内 崇師 (TAKEUCHI Takashi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号 : 10325061