

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：35308

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560293

研究課題名(和文)骨粗鬆症治療薬ビタミンDの単剤投与は抗うつ活性を有するか？

研究課題名(英文)Vitamin D which is a therapeutic drug of osteoporosis may have antidepressant activity by single administration.

研究代表者

川浦 昭彦(Kawaura, Akihiko)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：00177643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス40匹を4群に分け、1-(OH)D₃を経口投与し、6分間の強制水泳試験を行い、その間の無動時間を測定した。無動時間は対照群と比較して、1-(OH)D₃の濃度が1.0μg/kgの群で有意に減少していた(p<0.01)。1-(OH)D₃が中枢神経薬と作用形式が異なる事を明確にするために、自発運動量の変化をオープンフィールド試験により検討した。マウス40匹を4群に分け、測定の前24時間、3時間、1時間前の3回にわたり1-(OH)D₃を経口投与し、試験を施行した。1-(OH)D₃の単剤投与はすべての濃度で自発運動量に影響を与えなかったことから1-(OH)D₃に抗うつ活性を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of 1-hydroxyvitamin D₃[1-(OH)D₃] on forced swimming test in mice. The animals were given intragastric administration of 0.5, 1.0, 2.0 μg/kg of 1-(OH)D₃ in MCT through a feeding tube. We gave 1-(OH)D₃ orally 24, 3 and 1 hours before a forced swimming test. The total time (seconds) of immobility during this session was recorded and scored for 6 min simultaneously. Intragastric administration of 1-(OH)D₃ of 1.0 μg/kg reduced immobility time in the forced swimming test. We examined a change of the spontaneous momentum in an open field test to prove this reasoning that 1-(OH)D₃ is different from analeptica in effects pattern. 1-(OH)D₃ at all concentration (0.5, 1.0, 2.0 μg/kg) had no effect on the locomotor study compared with control. These results suggest that 1-(OH)D₃ may have antidepressant-like activity.

研究分野：内科学、病理学

キーワード：ビタミンD 強制水泳試験 オープンフィールド試験

1. 研究開始当初の背景

(1)警察庁による自殺の原因・動機などの統計によると、うつ病が原因で自殺する人は平成 21 年度は、6949 人であり、自殺者全体の 43.8%を占め、年々増加傾向にある(警視庁、2010)。

このような状況であるにも拘らず、数種類の抗うつ薬による十分な治療によっても改善しない治療抵抗性のうつ病も存在し(井上猛他、1997)、新規の抗うつ活性をもつ薬剤の開発が急務である。

(2)うつ病患者では海馬の容積の減少がみられ(Videbech P, *et al.*, 2004)、動物実験では海馬の萎縮により、うつ病を含む精神疾患の病態生理に重要な役割を果たす(Hashimoto K, *et al.*, 2004)BDNF(脳由来神経栄養因子)mRNAの発現量は減少している(Moriya J, *et al.*, 2011)。脳内の BDNF 量と血清の BDNF 量との間には正の相関がみられ(Karege F, *et al.*, 2002)、うつ病患者では血清 BDNF 量は減少している(Yoshimura R, *et al.*, 2011)。しかし、抗うつ薬を投与し治療した場合、海馬などの BDNF の発現量が増加する(Chen B, *et al.*, 2001)。また、GDNF(グリア由来神経栄養因子)は脳全体に分布し、血清 GDNF 量はうつ病患者では減少している(Takabayashi M, *et al.*, 2006)。しかし、ラット G6 細胞(グリアのモデル細胞)を用いた実験で抗うつ薬の処置により GDNF の合成・遊離が増加することが報告された(Hisaoka K, *et al.*, 2007)。したがって、BDNF, GDNF の発現量を増加させる薬剤に抗うつ活性があると考えられている。約 10-30%のうつ病患者は既存の抗うつ薬が奏功しない治療抵抗性のうつ病である(Thase ME, *et al.*, 1995)。よって抗うつ活性を有する新たな薬剤が必要とされている。

(3)近年ではビタミン D が注目されている。

疫学的にビタミン D 不足とうつ病との関連性が指摘され(Hoogendijk WJ, *et al.*, 2008, Ganji V, *et al.*, 2010)、活性型ビタミン D は神経内の BDNF を調整することが報告された(Pozz F, *et al.*, 2013)。また、動物実験では活性型ビタミン D を投与した場合、広くビタミン D 受容体(VDR)を有する(Prüfer K, *et al.*, 1999)脳内における GDNF の発現が誘導される(Naveilhan P, *et al.*, 1996)。よって、抗うつ薬と同様に活性型ビタミン D は、BDNF, GDNF の発現量を増加させることにより、うつ状態を改善する可能性があると推測される

2. 研究の目的

(1)臨床研究においてはうつ病に対するビタミン D の効果は確立していない。冬場では健康者の血中ビタミン D 濃度は低下し、気分が落ち込んでいるが、400 IU, 800 IU のビタミン D を投与すれば回復し(Lansdowne AT, *et al.*, 1998)さらに、うつ病高齢者に 300000 IU のビタミン D を 1 回投与することにより、うつ状態が軽快すること(Zanetidou S, *et al.*, 2011)が報告された。しかし、反対に、ビタミン D 濃度が低いうつ病患者に 6 か月間、1 週間に一回 40000 IU を投与しても効果がなかったとする報告もある(Kjergaard M, *et al.*, 2012)。また抗うつ剤の単独投与では効果は少ないが、ビタミン D を併用した場合にはかなりの効果がみられたとも報告されている(Khoraminy N, *et al.*, 2012)。そこで、動物実験によりうつ病状態に対するビタミン D の単剤投与の効果を検討した。

(2)今回、我々は抗うつ剤の検証に用いられる強制水泳試験により誘導されたマウスのうつ病様状態(Porsolt RD, *et al.*, 1977)に対する、活性型ビタミン D の前駆体である、1-hydroxyvitaminD₃(1(OH)D₃)(DeLuca HF, *et al.*, 1983)の効果を検討し、同時にビタミン D 投与によるマウス脳内の BDNF, GDNF の

発現量の変化を検討した。

3. 研究の方法

(1) 強制水泳試験と BDNF、GDNF の測定

アクリル製の水槽（高さ 24cm、直径 10cm）に、 25 ± 1 に保った温水を 19 cm の高さまで入れた。5 週齢の ICR 系雄性 マウスをチャールズリバー株式会社から購入し、1 週間 MF（オリエンタル酵母株式会社）で飼育した。マウス 40 匹を 4 群に分け 1 群(10 匹)：処置なし、2-4 群（各 10 匹）：1 (OH)D₃ 投与(0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)とし、プレテストは行わず、強制水泳試験の 24 時間、3 時間、1 時間前の 3 回にわたり 1 (OH)D₃ を経口投与し、6 分間の強制水泳試験を行い、その間の無動時間を測定した。

以前、予備実験で行った 1 群(10 匹)：無処置、2 群(10 匹)：中鎖脂肪酸投与、3-5 群(各 10 匹)：1 (OH)D₃ 投与(0.02, 0.04, 0.08 $\mu\text{g}/\text{匹}$)の 5 群に分けた Wistar 系雄性ラット 50 匹に、試薬を投与した 24 時間後に安楽死させ、摘出し冷凍保存していた全脳を用い、今回 BDNF 及び GDNF Emax Immuno Assay System(Promega)を使用し BDNF, GDNF をそれぞれ ELISA 法にて測定した。また各群より 1-2 匹のラット大脳を一次抗体の Rabbit polyclonal to BDNF, GDNF とビオチン標識 2 次抗体 (LSAB2) を使用した免疫染色法により, BDNF, GDNF を染色した。

(2) オープンフィールド試験

1 (OH)D₃ が中枢興奮薬と作用様式が異なる事を明確にするために、自発運動量の変化をオープンフィールド試験にて調べた。マウス 40 匹を 4 群に分け、1 群(10 匹)：処置なし、2-4 群（各 10 匹）：1 (OH)D₃ 投与（各 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）とし、自発運動量測定の 24 時間、3 時間、1 時間前の 3 回にわたり 1 (OH)D₃ を経口投与し、オープンフィールド試験を施行した。マウスをフィールド（底：

40cm × 23cm、高さ：18 cm）の中央に置き、10 分間行動解析装置にて行動を記録した。記録の終了後、トラッキングシステムによって測定されたマウスの総移動距離を、Excel 上に数値を表示し計算することによりデータの解析をおこなった。

(3) 統計学的解析は一元配置分散分析にて行い、群間に差異がみられた場合、ダネット法による多重比較を行った。

4. 研究成果

(1) マウスの無動時間は 1 (OH)D₃ の濃度が 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までは濃度依存的に減少したが、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ではコントロールの状態にもどった。対照群と比較して、1 (OH)D₃ の濃度が 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の群で有意に無動時間の減少がみられた ($p < 0.01$)。 (図)

(2) 全脳において免疫染色法で確認された BDNF 及び GDNF 量は各群とコントロール群との間で有意差をみとめなかった。

(3) 表にオープンフィールド試験の実験結果を示す。強制水泳試験で用いた、1 (OH)D₃ の単独投与はすべての濃度で自発運動量に影響を与えなかった(表)。

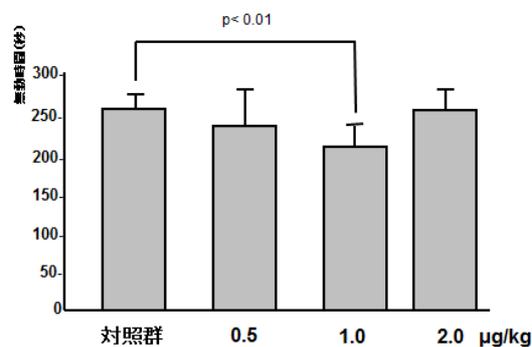


図 強制水泳試験における1 α (OH)D₃の効果

表 オープンフィールド試験における自動運動量

投与群	自発運動量(cm)		
	(mean	±	SD)
対照	442.5	±	83.97
1 (OH)D ₃ (0.5 μg/kg)	366.0	±	159.33
1 (OH)D ₃ (1.0 μg/kg)	355.2	±	137.31
1 (OH)D ₃ (2.0 μg/kg)	390.1	±	143.20

(4)経口投与された 1 (OH)D₃ は肝臓で活性型ビタミン D である 1,25(OH)₂D₃ に代謝され(DeLuca HF, *et al.*, 1983)、大脳辺縁系に広く存在する(Prüfer K, *et al.*, 1999)ビタミン受容体に結合し作用が発揮される。

(5)今回のマウスの強制水泳試験により、1 (OH)D₃ は対照群と比較して、濃度依存的に、うつ病状態を反映する無動時間を短縮させる傾向を有することが示された。多くの抗うつ薬は無動時間を短縮させることが報告されている(Porsolt RD, *et al.*, 1977)。しかし、覚せい剤や抗コリン作用薬にも同様の無動時間を短縮させる効果のあることが知られている(Shimazu S, *et al.*, 2005)。1 (OH)D₃ には覚せい剤の作用を有する報告はなく、自発運動量の差をみるオープンフィールド試験の結果でも既存の抗うつ薬と同様、自発運動量の変化がみられなかったことから、1 (OH)D₃ に抗うつ活性を有する可能性が示唆された。特に、ビタミン D は抗うつ薬との併用(Khoraminy N, *et al.*, 2012)ではなく、単独でも抗うつ活性を有する可能性が示された。

(6)1 (OH)D₃ の効果はその濃度が 1.0 μg/kg までは濃度依存的に減少したが、2.0 μg/kg ではコントロールの状態にもどった。臨床例で 25(OH)D₃ の効果において血清濃度の作用閾値は狭いことが報告されていた(Sohl E, *et al.*, 2015)ことより、今回の場合も同様である可能性がある。今後、1 (OH)D₃ の投

与用量の種類を増やし、その効果を見ることが必要である。

(7)BDNF は 27-kDa のポリペプチドであり、末梢及び中枢神経の生存、分化、成長に重要な働きを有することが認められている(Huang Z, *et al.*, 2011, Schinder AF, *et al.*, 2000)。さらに、血中 BDNF 量はうつ病患者では減少しているが(Yoshimura R, *et al.*, 2011)、抗うつ薬で治療したうつ病患者の剖検例において、海馬の BDNF の免疫活性が増加している(Chen B, *et al.*, 2001)。

GDNF は中脳ドーパミン神経の栄養因子としてラットのグリア細胞から抽出される(Airaksinen MS, *et al.*, 2002)。気分障害患者の血中 GDNF 濃度は健常者のそれと比較して有意に低下しているが(Takabayashi M, *et al.*, 2006)、抗うつ剤の服用により増加することが報告されている(Zhang X, *et al.*, 2010)。

(8)以上の報告より、今回、肝臓で代謝された 1 (OH)D₃ の活性型である 1,25(OH)₂D₃(DeLuca HF, *et al.*, 1983)が抗うつ剤と同様に海馬における BDNF および GDNF の発現量を増加させ、抗うつ活性を発揮したものと推測される。しかし、今回の動物実験で全脳における BDNF, GDNF 量にビタミン D の投与による変動が認められなかった。よって、ビタミン D による抗うつ活性は、BDNF, GDNF の関与以外のメカニズムにより発揮される可能性が考えられる。1960 年代に提唱されたモノアミン仮説(Cooper JR, *et al.*, 1996)に基づき、抗うつ作用にセロトニン、ノルアドレナリンが関与することが提唱されている(Slattey DA, *et al.*, 2004, Nestler EJ, *et al.*, 2002)。先行研究で抗うつ作用にセロトニンも関与することが強制水泳試験により示唆され(Detke MJ, *et al.*, 1995, Cryan JF *et al.*, 2005)、同時にセロ

トニンの合成がビタミンDにより活性化される(Patrick RP, *et al.*, 2015)ことも報告されている。すなわち、ビタミンDはセロトニンの合成を介して抗うつ活性を有する可能性がある」と推測される。

それらを実証するために、今後各群間における脳内のセロトニン量を測定する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- 1 秋山純一、高須賀純一、野中紘士、矢田智大、川浦昭彦、中嶋正明、加納良男、畦五月、龍田尚美、平上二九三、ラット骨折モデルによる高濃度人工炭酸浴の骨折治癒への影響- TGF- β 1の血中濃度変化と組織学的観察による検討-、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、16号、2015、1-6
- 2 加納良男、平上二九三、川浦昭彦、元田弘敏、小池好久、秋山純一、井上茂樹、河村顕治、Akt 酵素活性に変異を誘導したヒト正常繊維芽細胞の解析、吉備国際大学保健福祉研究所研究紀要、査読無、2015、16号、17-20

[学会発表] (計1件)

藤田理恵、川浦昭彦、長田美和、古屋あゆみ、山本きよみ、大平禎司、伊藤達賀、浅川智哉、介護予防教室を利用する二次予防対象者における、転倒関連因子の改善と糖尿病の影響、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川浦 昭彦 (KAWAURA Akihiko)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：00177643

(2) 研究分担者

北村 佳久 (KITAMURA Yoshihisa)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40423339

秋山 純一 (AKIYAMA Jyunichi)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・准教授

研究者番号：00309600

水谷 雅年 (MIZUTANI Kasatoshi)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：30108170