

200918030A

厚生労働科学研究研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

抗パーキンソン病薬（ドーパミン作動薬）のうつ病への有効性を  
検証するプロトコールの作成

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 功刀 浩

平成 22 (2010) 年 5 月

## 目 次

I.	総括研究報告 抗パーキンソン病薬（ドーパミン作動薬）のうつ病への有効性を検証するプロトコ ールの作成-----	1
	功刀 浩	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	6
III.	資料-----	7
IV.	研究成果の刊行物・別刷-----	34

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）

総括研究報告書

抗パーキンソン病薬（ドーパミン作動薬）のうつ病への  
有効性を検証するプロトコールの作成

研究代表者 功刀 浩

国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第三部 部長

研究要旨

本研究は、ドーパミン作動薬（カベルゴリン、プラミペキソール、ロピニロール）の難治性うつ病に対するオープン臨床試験を行い、効果のエフェクトサイズを推量し、安全性（副作用出現）に関する情報を得て、22年度以降に行うRCTのプロトコールを作成することを目的とする。

①抗パーキンソン病薬（ドーパミン作動薬カベルゴリン、プラミペキソール、ロピニロール）によるオープン試験に関しては、研究計画書を作成し国立精神・神経センターの倫理審査通過し、「臨床研究の倫理指針」に基づいて損害保険会社との補償契約を行い、UMINに臨床研究登録を行った後に試験を開始した。その結果、プラミペキソールに関し有効性と安全性に関する予備的結果を得た。

②「難治性うつ病を対象とした抗パーキンソン病薬（ドーパミン作動薬）の無作為化比較対照試験」のプロトコールを作成した。文献検討、オープン試験で得られた情報に基づいて、選択基準、用量、必要症例数、エンドポイント等を設定した。

③また、カベルゴリンについては、前臨床試験による検討も行い、抗うつ効果があることを確認し、そのメカニズムとしてBDNFの発現量の増加があることなどを明らかにした。

分担研究者 なし

A. 研究目的

近年、うつ病患者は増加の一途をたどっており、精神科を受診するうつ病患者も増えて

いる。わが国の自殺者は年間3万人を超えているが、その主要な原因はうつ病である。抗うつ薬治療を受けているにも拘らず自殺を遂げる者も少なくない。したがって、より良いうつ病の治療法の開発は厚生労働行政上、極めて重要な課題である。最近のうつ病患者

の傾向として、典型的なメランコリー型のうつ病とは異なり、比較的軽症であるが難治で遷延するうつ病が、とくに若年者の中で増加していることが指摘されている。この新しいタイプのうつ病には従来の抗うつ薬治療があまり奏功せず、有効な治療法が存在しない。うつ病の病態生理にドーパミン神経伝達の減少が関与していることは以前から知られているが、とりわけ上記のような難治性のうつ病においてドーパミン系の機能不全が主要な役割を果たしている可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。実際、ドーパミンは動機付けや意欲、興味・喜び、集中力・注意力などに関わっているが、これらはいずれもうつ病において障害されている。したがって、ドーパミンアゴニストなどを用いてドーパミンを増加させることにより、うつ病、とくに難治性うつ病の改善が得られる可能性がある。現在臨床で使用されているドーパミンアゴニストには数種類あるが、その一つであるプラミペキソールは、ランダム化プラセボ対照比較試験がすでに複数行われ、難治性うつ病への効果が確認されている<sup>2)</sup>。しかし、我が国における検討はない。他のドーパミンアゴニストの中にカベルゴリンとロピニロールがあり、これらの2剤は症例報告<sup>3)4)</sup>や後方視的調査<sup>5)</sup>、オープン試験<sup>6)</sup>において難治性うつ病に対する効果が報告されているものの、厳密なデザインによる検討はなされておらず、今後ラン

ダム化比較試験(RCT)などによって有効性を検証する必要がある。そこで、これらのドーパミン作動薬の難治性うつ病に対するオープン臨床試験を行い、効果のエフェクトサイズを推量し、副作用出現に関する情報を得て、22年度以降に行うRCTのプロトコールを作成することを目的とする。研究の全体計画を資料1に示す。

#### <参考文献>

- 1) Dunlop BW and Nemeroff CB: Arch Gen Psychiatry 2007; 64:327-337.
- 2) Aiken CB: J Clin Psychiatry 2007; 68:1230-1236.
- 3) Takahashi H et al.: Clin Neuropharmacol. 2003; 26:230-232.
- 4) Pae C et al.: Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry 2008; 32:1087-1088.
- 5) 田中輝明ほか: 精神医学 2006; 48:1182-1188.
- 6) Cassano P et al.: Can J Psychiatry 2005; 50:357-360.

## B. 研究方法

### ①ドーパミン作動薬によるオープン試験

本オープン試験の目的は、引き続き実施予定のランダム化比較対照試験のプロトコールを作成する基礎データを得ることである。本研究に対して文書にて同意が得られた難治性うつ病患者 30 名程度を対象とし、プラミペキソール投与群 15 名とロピニロール投与群 15 名を目標とした(当初、プラミペキソールでなく、カベルゴリンを予定していたが、弁膜症の副作用

の可能性あることから、プラミペキソールに予定を変更した)。未成年や同意能力が欠如している者、重篤な内科疾患を合併している患者、自殺念慮が強い患者などは除外した。うつ病の診断には米国精神医学会が作成したDSM-IV診断を用いた。難治性うつ病の定義は、少なくとも1種類の抗うつ薬の十分量で6週間以上治療したにも拘らず、ハミルトンうつ病評価尺度21項目版(HAM-D-21)得点が15以上である患者とした。報告書作成時点までに、プラミペキソールに関し10例のエントリーがあった(男性4例、女性6例;平均年齢38(±9)歳、臨床診断は大うつ病6例、気分変調症2例、双極II型障害2例)。

プラミペキソールはこれまでの治療薬にadd onする形で処方し、0.25 mg/日から開始し、効果をみながら最大3 mg/日まで増量し、12週間の経過観察を行った。治療期間は併用薬の変更は原則として行わなかった。重症度については、2週間ごとにHAM-Dと臨床概括重症度(CGI: clinical global impression)による症状評価を行った(資料2参照)。すなわち、それぞれの薬剤群内において、開始前後でのHAM-D得点を比較することで有効性を検討した。有害事象に関しては、問診、血液検査、心電図などによって得られる非特異的な事象に加え、プラミペキソールとロピニロールそれぞれによくみられる副作用についてリストアップして調査した。なお、これらの薬剤には眠気や突発的睡眠が報告されて

おり、車などの運転を行っているなど、眠気によって重大な事故を生じる可能性がある者は対象に含めなかった。以上によっても重大な有害事象を生じる可能性に備えて、損害保険に加入した。本研究は国立精神・神経センター病院に通院中の患者を対象とするが、同意取得から薬の手渡し、症状・有害事象評価までの全プロセスは、研究代表者と研究協力者堀弘明(精神科医)と臨床心理士が行い、代表研究者が統括した。

#### (倫理面への配慮)

オープン試験はヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)」に従って実施する。国立精神・神経センター倫理委員会の承認を得て行った。

知的障害など同意能力が不十分である者や未成年者は対象としなかった。本研究では薬剤によって起こり得る副作用について被験者に文書を用いて十分説明し、文書での同意を得た。本研究への参加は自由であり、参加を拒否したからといって不利益を受けることは全くないことを説明した。また、研究への参加後は、それぞれの薬による有害事象を注意深く観察した。こういった対応にもかかわらず不可逆性の有害事象が生じた場合の補償に備え、損害保険に加入した。

また、個人情報の漏洩については万全の処置を講じた。得られたデータは、鍵のかかるキャビネット内に保存し、鍵は申請者が管理した。また、

電子情報は、メモリースティックなどの外部記憶装置に保存し、解析にはインターネットに接続されていないコンピュータを用いることにより、ハッカーなどからのアクセスを予防した。さらに、データファイルはパスワードで保護した。

## ② RCTプロトコルの作成

上記のオープン試験によって明らかになった有効性・忍容性をもとに至適用量と比較に必要な被験者数を決定し、これまでの文献も参考にして22年度以降にRCTを行うためのプロトコルを作成した。

## ③ カベルゴリンの抗うつ効果に関する前臨床的検討

カベルゴリンの不安、抑うつへの効果を検討するために、ラットにカベルゴリンを急性投与、あるいは慢性投与し、強制水泳テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テストによって検討した。また、その分子メカニズムの一部を明らかにするために、カベルゴリン慢性投与後のラットの海馬において脳由来神経栄養因子(BDNF)やその受容体、下流シグナルの活性化についてウエスタンブロット法によって検討した。

## C. D. 研究結果、考察

### ① ドーパミン作動薬によるオープン試験

研究計画書を作成し国立精神・神経センターの倫理審査通過し、「臨床研究の倫理指針」に基づいて損害保険会社との補償契約を行い、UMINに臨床研究登録を行った後に試験を開始した。

プラミペキソール投与群への10例のエントリーのうち、気分変調症の2例は早期に脱落した(理由不明)。残り8例のうち5例は現在も経過観察中であり、本結果は予備的段階のものである。しかし、現時点でHAMDの平均点は治療前 $21.4 \pm 4.4$ から治療後 $7.5 \pm 6.5$ へと大きく改善し( $P=0.002$ )、5例が寛解( $HAMD \leq 7$ )に至り、臨床概括評価では著明改善5例、改善1例、やや改善1例、変化なし1例であった。副作用は嘔気2例、眠気2例などであった。

## ② RCTプロトコルの作成

「難治性うつ病を対象とした抗パーキンソン病薬(ドーパミン作動薬)の無作為化比較対照試験」のプロトコルを作成した(資料2、3)。

## ③ カベルゴリンの抗うつ効果に関する前臨床的検討

カベルゴリンの急性投与では、ウイスター系ラット及びウイスター京都系ラット(SSRIが無効な治療抵抗性うつ病のモデル動物)の強制水泳における無動時間を減少させた。しかし、オープンフィールドテストの移動運動量や高架式十字迷路でのオープンアーム滞在時間は減少した。一方、カベルゴリンの慢性投与では、強制水泳における

無動時間が減少したうえ、オープンフィールドテストでの垂直方向での運動が増加し、高架式十字迷路でのオープンアーム滞在時間が増加した。BDNF の発現量が増加し、下流シグナルである extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)の活性化が高まっていた。以上から、ドーパミン作動薬であるカベルゴリンは、急性投与では抗うつ効果はあるが、不安惹起作用があり、慢性投与では、抗うつ効果と抗不安効果の両者があることが示唆された。そのメカニズムにおいて BDNF とその下流で MAP2 系の活性化が関与することが示唆された (P. 11-33 に論文原稿添付)。

## E. 結論

①本結果から、ドーパミン作動薬は治療抵抗性うつ病相に有効であることが示唆された。また、安全性、忍用性も比較的高いと思われた。

②「難治性うつ病を対象とした抗パーキンソン病薬（ドーパミン作動薬）の無作為化比較対照試験」のプロトコールを作成した。これによって、ドーパミン作動薬の効果、安全性が明らかになり、ゲノム情報を用いたテーラーメイド医療が可能になれば、テーラーメイド医療に基づく治験を行う根拠となる。治験によって承認されれば、うつ病患者の早期社会復帰、自殺者減少、医療費削減など、国民の医療・福祉に大きく貢献することが期待される。

③カベルゴリンの前臨床研究の結果は、治療抵抗性うつ病におけるドーパミン作動薬の有効性を支持する結果であり、RCTによる検証する価値があることを改めて明らかにした。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

功刀浩：うつ病の BDNF 仮説. 最新うつ病のすべて (樋口輝彦編) 別冊・医学のあゆみ、医歯薬出版、東京、2010, pp. 184-189.

### 2. 学会発表

Chiba S, Ninomiya M, Richards M, Kajiyama Y, Izumi A, Kunugi H: Antidepressive Properties of Dopamine Receptor Agonist Cabergoline The 1st Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 第 39 回日本神経精神薬理学会 年会, 2009年11月13日、京都

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌（主なもの）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
功刀浩	うつ病の BDNF 仮説	医学のあゆみ	別冊	184-189	2010



資料1

研究の全体計画

《目的》ドーパミン作動薬の難治性うつ病患者への有効性の検討

ドーパミン作動薬(プラミペキソール、ロピニロール)を用いた  
オープン試験

エフェクトサイズ推定・安全性情報の収集

プロトコール(実施計画書)作成  
(至適用量・必要症例数・補償措置の決定)

《多施設共同研究》 「難治性うつ病を対象とした抗パーキン  
ソン病薬(ドーパミン作動薬)の無作為化比較対照試験」

有効性・安全性の証明、治療反応性を予測する要因の解明

テーラーメイド医療に基づく治験

承認申請

《期待される効果》 うつ病患者の早期社会復帰、  
自殺者減少、医療費削減

21年度

22年度以降

**臨床試験用評価スケール\_サマリーシート**

患者 ID : \_\_\_\_\_

患者イニシャル : \_\_\_\_\_

評価者名 : \_\_\_\_\_

日付 : \_\_\_\_\_ ドーパミンアゴニスト投与開始後\_\_\_\_週

**HAM-D (Hamilton Depression Rating Scale)**

1. 抑うつ気分		2. 罪責感		3. 自殺	
4. 入眠困難		5. 中途覚醒		6. 早朝覚醒	
7. 仕事と活動		8. 精神運動制止		9. 精神運動激越	
10. 不安の精神症状		11. 不安の身体症状		12. 食思不振	
13. 全身の身体症状		14. 性的関心		15. 心気症	
16. 体重減少		17. 病識欠如		18. 日内変動	
19. 離人症		20. 被害関係念慮		21. 強迫症状	

HAM-D-21 total score: \_\_\_\_\_

**MADRS (Montgomery Asberg Depression Rating Scale)**

1. 外見に出される悲しみ		2. 言葉で表現された悲しみ	
3. 内的緊張		4. 睡眠減少	
5. 食欲減退		6. 集中困難	
7. 制止		8. 感情を持ってないこと	
9. 悲観的思考		10. 自殺思考	

MADRS total score: \_\_\_\_\_

**CGI (Clinical Global Impression)**

1. 重症度 (CGI-S) : \_\_\_\_\_

- 1. 正常 (Normal, not at all ill)、2. 精神疾患の境界線上 (Borderline mentally ill)、
- 3. 軽度の精神疾患 (Mildly ill)、4. 中等度の精神疾患 (Moderately ill)、
- 5. 顕著な精神疾患 (Markedly ill)、6. 重度の精神疾患 (Severely ill)、
- 7. 非常に重度の精神疾患 (Among the most extremely ill patients)

2. 改善度 (CGI-I) : \_\_\_\_\_

- 1. 著明改善 (Very much improved)、2. 中等度改善 (Much improved)、3. 軽度改善 (Minimally improved)、4. 不変 (No change)、5. 軽度悪化 (Minimally worse)、
- 6. 中等度悪化 (Much worse)、7. 著明悪化 (Very much worse)

## 資料3

# 「難治性うつ病を対象とした抗パーキンソン病薬(ドーパミン作動薬)の無作為化比較対照試験」 実施計画／プロトコール

- 国立精神・神経センター、北海道大学、信州大学などを拠点とした関連病院による多施設共同プラセボ対照無作為化二重盲検並行群間比較試験
  - UMINに登録し、無作為割り付けを行う。
- 対象
  - 難治性うつ病患者150名を対象とし、50名ずつpramipexole投与群、ropinirole投与群、プラセボ群に無作為に振り分ける。
  - 包含基準: 大うつ病(DSM-IV)に合致し、少なくとも1種類の抗うつ薬の十分量で6週間以上治療したにも拘らず、ハミルトンうつ病評価尺度21項目版(HAM-D)得点が15以上である20~65歳の患者。
  - 除外基準: 未成年や同意能力が欠如している者、重篤な内科疾患を合併している患者、自殺念慮が強い患者、車の運転を行う患者など
- 薬物投与法
  - 研究参加までに服薬している薬物に対する付加療法
  - Pramipexole: 0.25mg/日から投与開始し、症状に応じて3mgまで増量
  - Ropinirole: 0.5mg/日から投与開始し、症状に応じて4mg/日まで増量する。
- 評価項目
  - ハミルトンうつ病評価尺度(HAM-D)
  - MADRS (Montgomery Asberg Depression Rating Scale)
  - 臨床概括評価 (CGI)
  - 主要評価項目(エンドポイント): HAM-D合計得点の50%以上の減少
  - 副次評価項目: MADRAS, CGI, HAMDスコアの変化、寛解率、ドロップアウト
  - 有害事象
    - UKU副作用評価尺度日本語版を用いた問診
    - 血液検査、心電図(治療前、2週間後、8週間後)
- 治療反応性を予測するゲノム情報の探索
  - 採血⇒ゲノムDNA抽出
  - 遺伝子チップによる網羅的遺伝子解析
  - 効果を予測する遺伝子、副作用を予測する遺伝子の解明
  - ⇒テーラーメイド医療に基づいた治験へ

# 資料4

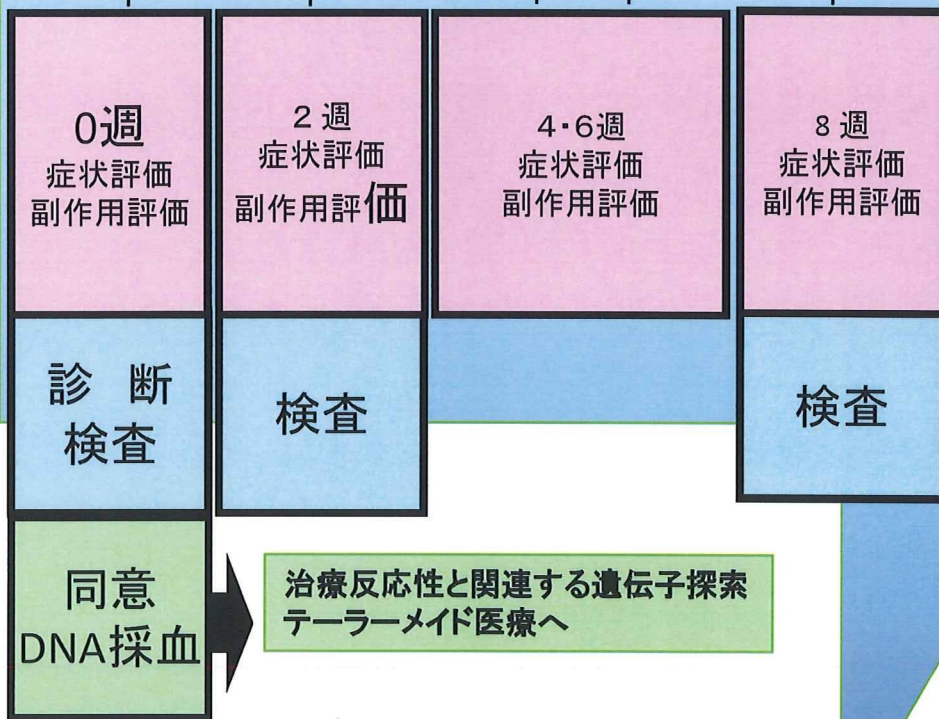
## 多施設共同プラセボ対照無作為1 二重盲検並行群間比較試験



包含基準	除外基準
治療抵抗性うつ病HAMD>15、 20-65歳	重篤な内科疾患合併 自殺念慮が強い等

登録  
無作為  
割付  
(UMIN)

従来の抗うつ薬治療 + pramipexole/ropinirole/placebo  
(各50例)



1  
2  
3  
4  
5  
6 **Cabergoline, a dopamine receptor agonist, has an antidepressant-like property and**  
7 **enhances brain-derived neurotrophic factor signaling**  
8  
9

10  
11 Shuichi Chiba<sup>a</sup>, Tadahiro Numakawa<sup>a,b</sup>, Midori Ninomiya<sup>a,c</sup>, Hyung Shin Yoon<sup>d</sup>, Hiroshi Kunugi<sup>a,b</sup>  
12  
13

14  
15 a, Department of Mental Disorder Research, National Institute of Neuroscience, National Center of  
16 Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan  
17

18  
19 b, CREST of Japan Science and Technology Corporation, Saitama, Japan  
20  
21

22  
23 c, Department of Pharmacology, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda  
24 University, Tokyo, Japan  
25

26  
27 d, Department of Physiology, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Brain Research Institute,  
28 Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea  
29

30  
31 Address for correspondence: H. Kunugi, M.D., Ph.D.

32  
33 Department of Mental Disorder Research, National Institute of Neuroscience, National Center of  
34 Neurology and Psychiatry, 4-1-1, Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo, 187-8502, Japan  
35  
36

37  
38 E-mail address: hkunugi@ncnp.go.jp

39  
40 Telephone number: +81-42-346-1714

41  
42 Fax number: +81-42-346-1714  
43  
44  
45

46 **Acknowledgments of funding and grants**

47  
48 This study was supported by the Health and Labor Sciences Research Grants (Research on Psychiatric  
49 and Neurological Diseases and Mental Health; Clinical Research for Development of Preventive  
50 Medicine and New Therapeutics) (H.K.), the JST, CREST (T.N., H.K), the Program for Promotion of  
51 Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO)  
52 (H.K.), and Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science  
53 (JSPS) (H.K.). The authors declare no conflict of interest.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

*Rationale* Dopamine agonists have been implicated in the treatment of depression. Cabergoline is an ergot derivative with a high affinity to dopamine D<sub>2</sub>-like receptors; however there have been few preclinical studies on its antidepressant-like effects.

*Materials and methods* Behavioral effects of cabergoline were examined in rats using forced swimming (FST), novelty-suppressed feeding (NST), open field (OFT), and elevated-plus maze (EPT) tests. In a single treatment paradigm, behaviors of rats were analyzed four hours after single injection of cabergoline (s.c., 0-4 µmol/kg). In a repeated-treatment paradigm, OFT, EPT, FST were conducted on days 11, 12, 13-14, respectively, during daily cabergoline injections (s.c., 0.5 µmol/kg), and then hippocampus was removed 24 hours after the last injection. NST was conducted in a separate experiment at day 14. Western blotting was used for the analysis of the protein levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the activation of intracellular signaling molecules.

*Results* Single injection of cabergoline demonstrated decreased immobility in FST and distance-traveled during 0-10 minutes in OFT, while time spent and entry into open arms were increased at 4 µmol/kg. When cabergoline was repeatedly administered, immobility in FST and the latency of feeding in NSF were significantly reduced, whilst vertical movement was increased in OFT. The time in closed arms was tended to be decreased in EPT. Expression of BDNF and activation of extracellular signal-regulated kinase 1 were up-regulated after the chronic administration of cabergoline.

*Conclusions* Cabergoline exerts antidepressant- and anxiolytic-like effects which may be mediated by potentiation of intracellular signaling of BDNF.

**Keywords:** Antidepressant, Anxiety, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Cabergoline, Depression, Dopamine receptor agonist, Extracellular signal-regulated kinase (ERK), Locomotor activity

## Introduction

The current first line treatments of depressive disorder are serotonin-selective reuptake inhibitors (SSRI), serotonin-noradrenalin reuptake inhibitors (SNRI), and tricyclic antidepressants; however, a substantial proportion of depressed patients are refractory to such treatments (Keller 2005). Dopamine receptor agonists have been thought as one of the promising candidates to improve outcomes of patients with treatment-resistant and nonremitting depression (Dunlop and Nemeroff 2007). Cabergoline is an ergot derivative and dopamine D<sub>2</sub> receptor-like agonist with a lower affinity to D<sub>1</sub>-like, adrenergic, and serotonergic receptors (Millan et al. 2002). Its agonistic effect on dopamine receptors has been utilized in therapies for Parkinson's disease and hyperprolactinaemia. Depression is one of the common complications in Parkinson's disease (Yamamoto 2001) and decreased dopamine transmission has been suggested as one of the causes of this phenomenon (Lemke 2008). Indeed, dopamine receptor agonists

1  
2  
3  
4  
5  
6 such as pramipexole and pergolide demonstrated their effectiveness both on depression and motor  
7 functioning in patients with Parkinson's disease (Rektorová et al. 2003; Lemke et al. 2005, 2006;  
8 Leentjens et al. 2009). Patients with treatment-resistant depression were also subjected to administration  
9 of dopamine-receptor agonist in addition to contemporary antidepressants, and favorable results were  
10 reported with regard to pramipexole (Lattanzi et al. 2002), bromocriptine (Inoue et al. 1996) and  
11 pergolide (Izumi et al. 2000). Takahashi et al. (2003) reported that cabergoline was effective in two cases  
12 of refractory depression as a supplementation therapy to an SNRI milnacipran. However, detailed  
13 mechanism underlying antidepressant-like effects of dopamine receptor agonists including cabergoline is  
14 still unclear.  
15  
16  
17  
18

19  
20 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is one of the neurotrophins and thought to play an  
21 important role both in the etiopathology of depression and the action of antidepressants (Castrén et al.  
22 2007; Duman and Monteggia 2006; Adachi and Kunugi 2008). BDNF binds to its high-affinity receptor  
23 TrkB and low-affinity receptor p75 (Huang and Reichardt 2001), and exerts its biological effects through  
24 various intracellular pathways including ERK, and inositol trisphosphate kinase (PI3K)-Akt signalings  
25 (Huang and Reichardt 2001; Kaplan and Miller 1997). BDNF is suggested to be involved in neuronal  
26 differentiation, survival, and synaptic plasticity (Poo 2001). Recently, we reported that its important roles  
27 in the regulation of synaptic transmission in cultured hippocampal and cortical neurons (Kumamaru et al.  
28 2008; Numakawa et al. 2009). Changes in the expression of BDNF in patients with depression have been  
29 reported in the hippocampus which is one of the important regions in mood regulation. For example,  
30 mRNA and protein levels of BDNF were decreased in the postmortem hippocampus of depressive  
31 patients (Dunham et al. 2009) and animal models of depression (Grønli et al. 2006). Treatment with  
32 antidepressants up-regulates the expression of BDNF in the hippocampus of patients with depression  
33 (Chen et al. 2001) and animals (Nibuya et al. 1995). The BDNF up-regulation was also observed after  
34 other antidepressive treatments including chronic electroconvulsive therapy (Nibuya et al. 1995). These  
35 studies suggest that BDNF may be involved in the final common pathway in the action of the  
36 antidepressive therapies.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 Dopamine signaling may play a significant role in the regulation of BDNF expression.  
46 Dopamine-receptor agonists are shown to increase the BDNF levels in cultured astroglial (Ohta et al.  
47 2003) and neuronal cells (Küppers and Beyer 2001; Du et al. 2005). In contrast, haloperidol, an  
48 antipsychotic drug which antagonizes D<sub>2</sub> receptor, decreased the expression of BDNF in the brain  
49 (Angelucci et al. 2000; Dawson et al. 2001), although some atypical antipsychotics were reported to  
50 increase BDNF levels (Fumagalli et al. 2004; Parikh et al. 2004). Ohta et al. (2004) found that  
51 cabergoline induced BDNF up-regulation in cultured astrocytes. However, it is unclear whether  
52 administration of cabergoline induces the expression of BDNF *in vivo*.  
53  
54  
55  
56  
57

58 These previous studies prompted us to test the hypothesis that cabergoline has an  
59 antidepressant-like property that is mediated through enhanced BDNF expression in the hippocampus.  
60 Here, we investigated the effects of acute/chronic systemic cabergoline administration in the behavioral



1  
2  
3  
4  
5  
6 tests which are useful for screening of antidepressants and anxiolytics [i.e. forced swim test (FST),  
7 novelty-suppressed feeding test (NST), open field test (OFT) and elevated-plus maze test (EPT)].  
8 Antidepressant-like effect was also analyzed using Wistar-Kyoto rats, an innate animal model of  
9 depression (Paré 1989). Furthermore, we tried to elucidate the possible molecular mechanism underlying  
10 the action of cabergoline by examining changes in the expression of BDNF, TrkB and p75, as well as  
11 activation of ERK and Akt, downstream signalings of TrkB.  
12  
13  
14  
15

## 16 **Materials and methods**

### 17 **Animals and experimental design**

18  
19 All the experimental procedures were approved by the ethics review committee for animal  
20 experimentation at the National Institute of Neuroscience, Japan and done with every efforts to minimize  
21 the number of animals used and their sufferings. Male Wistar and Wistar-Kyoto rats were purchased from  
22 Charles River Japan (Yokohama, Japan) at 6 weeks old, and housed in standard laboratory condition  
23 (22-24 °C, 40-60% humidity, 3:00 pm light on, 3:00 am light off). Rats were kept in polycarbonate cages  
24 in groups, and laboratory chaws and water were available *ad libitum*. All rats were handled daily for a  
25 few minutes from 7 weeks old. Cabergoline (Mylan Pharmaceutical, Tokyo, Japan) and fluvoxamine  
26 (Meiji-seika, Tokyo, Japan) were dissolved in 0.5% carboxymethyl cellulose (Sigma, St. Louis, MO,  
27 U.S.A.) in sterilized water. In the acute treatment paradigm, behaviors of rats were analyzed 4 hours  
28 after single injection (from 8:00 to 10:00 am) of cabergoline (0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 µmol/kg B.W., s.c.)  
29 or 1 hour after fluvoxamine treatment (138 µmol/kg B.W., p.o). In the chronic treatment paradigm, OFT,  
30 EPT, FST were conducted at days 11, 12, 13-14, respectively, during repeated injections of cabergoline  
31 (s.c. s.i.d. at 3:00 pm, 0.5 µmol/kg B.W.). The hippocampus was removed from the rat 24 hours after the  
32 last injection of cabergoline in the chronic treatment regimen. The sample was quickly frozen on dry ice  
33 after the removal and stored at -80 °C until used. NST was conducted at day 14 of the chronic treatment  
34 regimen in a separate experiment. The doses of cabergoline were according to a previous study on an  
35 animal model of Parkinson's disease (Miyagi et al. 1996). The schedule of repeated administration was  
36 chosen because two weeks are needed for antidepressants to change behaviors in several animal models  
37 of the depression (Gambarana et al. 2001).  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 50 **Behavioral tests**

51  
52 *FST*: A modified version of FST (Detke et al. 1995), which consisted of 2 swim sessions, was carried  
53 out. In the first swim session, the rat was introduced into a plastic cylinder (40 cm depth, 20 cm  
54 diameter) filled with 25 cm deep water of 23-25 °C, and forced to swim for 15 minutes. Twenty-four  
55 hours after the first session, the rat was reintroduced into the same cylinder, and their 5-minutes  
56 swimming was observed. The behavior of the rat was recorded on videorecorder (SONY, Tokyo,  
57 Japan). After each swim session, the rat was removed from the cylinder, dried with paper towels, placed  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6 in the resting cages for 20 minutes, and then returned to their home cages. Water in the cylinder was  
7 renewed between sessions.  
8

9 Analysis was done on data from the second session of the FST in the acute, and day 14 (FST)  
10 in the chronic treatment-regimen. Behavioral measures of the rat were defined as follows: 1) immobility -  
11 floating in the water without active moving of their limbs and making only slight movements necessary to  
12 keep its head above water; 2) swimming - moving more than necessary to keep its head above water and  
13 their forelimbs being in the water; 3) climbing - actively trying to climb the wall of the cylinder with their  
14 forelimbs above the water; 4) diving - diving into water and their entire body being submerged. The time  
15 was manually recorded when each one of the behaviors had started. The time a rat displayed one of the  
16 behaviors was calculated by subtraction of the start time from the end time of the behavior.  
17

18 *NST*: Rats were deprived from food for at least 16 hours before the experiment and introduced into an  
19 openfield apparatus (100 cm x 100 cm x 40 cm) with the rat chow on the filter paper placed in the center  
20 of the field. Behavior was recorded from the charged-coupled device (CCD) camera above the field.  
21 Latency of feeding was measured manually. If the feeding did not happen within 10 minutes, the  
22 latency was recorded as 10 minutes.  
23

24 *OFT*: Voluntary movements during 30-minutes test were monitored by introducing the rat into the  
25 openfield apparatus using a CCD camera, and images were captured on Macintosh computer by the  
26 Image OF software (modified software based on the NIH image program developed at the U.S. National  
27 Institute of Mental Health; modified by O'Hara & Co., Tokyo, Japan). Distance traveled and time spent  
28 in the central square that was enclosed by the peripheral zone 20 cm from the wall were automatically  
29 calculated by the Image OF software. Rearing and grooming behaviors were also recorded.  
30

31 *EPT*: Elevated-plus maze has two closed arms that have 50-cm high walls around the arm (10 cm width,  
32 50 cm length; east and west) and two open arms that have 0.5-cm ridges around the arms (10 cm width,  
33 50 cm length; north and south). The maze was elevated 40 cm from the floor. The rat was introduced into  
34 the eastern arm of the closed arms and allowed to move freely for 15 minutes. Behaviors were monitored  
35 with a CCD camera and recorded on the Macintosh computer with the Image-EP software (modified  
36 software based on the NIH image program developed at the U.S. National Institute of Mental Health;  
37 modified by O'Hara & Co., Tokyo, Japan). Total duration of the time spent and entries into each arms  
38 were obtained with the Image-EP software. Rearing and grooming behaviors were also recorded.  
39

40 Behaviors were assessed by a rater who was blind to the cabergoline- or vehicle-treatment  
41 status of each rat.  
42

#### 43 Western blotting

44 The separated hippocampus was homogenized in lysis buffer and the protein concentration in the sample  
45 was determined before the western blotting assay as previously reported (Numakawa et al. 2003, 2004,  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

2009). The equivalent amounts of total protein were assayed for each immunoblotting. Primary antibodies were used at the following dilutions: anti-Akt (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, U.S.A.), anti-pAkt (1:1000, Cell Signaling), anti-ERK (1:1000, Cell Signaling), anti-pERK (1:1000, Cell Signaling), anti-p75 (1:1000, Promega, Madison, WI, U.S.A.), anti-TrkB (1:1000, BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.), and anti-BDNF (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.) antibodies.

#### Data analysis

All data were expressed as mean  $\pm$  standard error (SEM). Behavioral data were analyzed with repeated analysis of variance (ANOVA) or one-way ANOVA, followed by *post hoc* Student's t-test or Dunnett method if appropriate. Data obtained from western blotting were analyzed by Student's t-test. Outliers were removed if the Smirnov-Grubbs test was significant. The R software (version 2.7.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used for the statistical analysis. The statistical significance was considered when *p* value was less than 0.05.

## Results

### Behavioral effects of single cabergoline administration

In FST, Wistar rats showed more active climbing as the dose of the drug increased [ $F(1,38) = 6.9, p = 0.013$ ; Fig. 1a], and exhibited significantly longer duration of climbing at the doses of 1.0 ( $167 \pm 23$  sec;  $t = 3.5, p = 0.005$ ) and 2.0  $\mu\text{mol/kg}$  B.W. ( $154 \pm 16$  sec;  $t = 2.9, p = 0.022$ ) in comparison with the vehicle-treated group ( $87 \pm 13$  sec). The total duration of swimming was not significantly different after treatment with any dose of cabergoline [ $F(1,38) = 1.0, p = 0.32$ ]. The cabergoline-treated rats showed significantly less immobility compared with that of the vehicle-treated group in a dose-dependent manner [ $F(1,38) = 15.3, p < 0.001$ ;  $75 \pm 14$  sec,  $t = 2.6, p = 0.045$  at 0.5  $\mu\text{mol/kg}$ ;  $42 \pm 12$  sec,  $t = 4.2, p < 0.001$  at 1.0  $\mu\text{mol/kg}$ ;  $39 \pm 13$  sec,  $t = 4.3, p < 0.001$  at 2.0  $\mu\text{mol/kg}$ ]. In addition, the latency of immobile posture was increased in a dose-dependent fashion [ $F(1,38) = 4.9, p = 0.032$ ] and significantly longer at 1.0  $\mu\text{mol/kg}$  ( $160 \pm 23$  sec,  $t = 3.0, p = 0.017$ ; Fig. 1b) than vehicle treatment ( $59 \pm 12$  sec). A few rats (3/40) displayed diving, and no dose-dependent response was observed.

As expected, Wistar-Kyoto rats showed significantly shorter climbing [ $F(2,1,46) = 75, p < 0.001$ ; Fig. 1c] and swimming [ $F(2,1,46) = 35, p < 0.001$ ], and longer immobility [ $F(2,1,46) = 174, p < 0.001$ ] in comparison with Wistar rats. Cabergoline treatment in Wistar-Kyoto rats demonstrated significantly increased climbing ( $28 \pm 8$  sec;  $t = 2.4, p = 0.047$ ) and a trend for reduced immobility ( $217 \pm 10$  sec;  $t = 2.0, p = 0.097$ ), although no significant changes in immobility ( $p = 0.49$ ) were observed in fluvoxamine-treated group. In Wistar rats, reduction in the immobility by cabergoline ( $61 \pm 16$  sec,  $t = 3.1, p = 0.01$ ) and a trend of the same direction by fluvoxamine ( $78 \pm 26$  sec,  $t = 2.1, p = 0.08$ ) were observed.

1  
2  
3  
4  
5  
6 In NST, non-significant effect was shown in the Wistar rats after single cabergoline  
7 administration on the latency of feeding in the novel environment ( $597 \pm 3$  sec in vehicle,  $526 \pm 52$  sec in  
8 cabergoline group;  $t = 1.4$ ,  $p = 0.22$ ; Fig. 1d).  
9

10  
11 In OFT, Wistar rats were treated with cabergoline at three doses (0, 0.25 and 1.0  $\mu\text{mol/kg}$   
12 B.W.) and its behavior was monitored for 30 minutes. Distance traveled (horizontal movement; Fig. 2a)  
13 and the number of rearing (vertical movement; Fig. 2b) decreased as the time passed [ $F(5,10,75) = 27.3$ ;  $p$   
14  $< 0.001$  for distance;  $F(5,10,75) = 31.4$ ,  $p < 0.001$  for rearing]. There was an interactive effect between  
15 distance and time [ $F(5,10,75) = 2.66$ ,  $p = 0.008$ ], and distance was decreased in the 1.0  $\mu\text{mol/kg}$  B.W.  
16 dose group during 0-5 ( $9.1 \pm 2.1$  m,  $p = 0.037$ ) and 5-10 minutes ( $7.1 \pm 1.2$  m,  $p = 0.023$ ) periods  
17 compared to the vehicle-treatment group ( $16.5 \pm 2.1$  m,  $13.1 \pm 1.9$  m during 0-5 and 5-10 minutes periods,  
18 respectively). However, no significant effect of cabergoline was observed in the total distance traveled  
19 during the 30-minutes test [ $F(1,16) = 1.5$ ,  $p = 0.24$ ; Fig. 2c]. Cabergoline had no significant effect on total  
20 number of rearing [ $F(1,16) = 1.0$ ,  $p = 0.32$ ; Fig. 2d], time spent in center [ $F(1,15) = 0.13$ ,  $p = 0.72$ ; Fig.  
21 2e], or grooming behaviors [ $F(1,16) = 0.51$ ,  $p = 0.54$ ; Fig. 2f].  
22  
23  
24  
25  
26

27 In EPT, the cabergoline-treated animals (4  $\mu\text{mol/kg}$  B.W.) spent more time in open arms  
28 ( $163 \pm 45$  sec for cabergoline vs.  $61 \pm 13$  sec for vehicle,  $t = 3.2$ ,  $p = 0.008$ ; Fig. 3a) and less time in  
29 closed arms ( $515 \pm 82$  sec for cabergoline vs.  $744 \pm 30$  sec for vehicle,  $t = 3.6$ ,  $p = 0.003$ ) compared to the  
30 vehicle control. The cabergoline treatment slightly, but not significantly, reduced the number of entries  
31 into open arms at two doses ( $1.4 \pm 0.4$  and  $2.2 \pm 0.5$  at 0.25 and 1  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively; Fig. 3b). A  
32 remarkable increase in open arm-entry was observed in the 4  $\mu\text{mol/kg}$  group compared to vehicle ( $9.4 \pm$   
33  $3.0$  for cabergoline vs.  $3.2 \pm 0.5$  for vehicle,  $t = 3.2$ ,  $p = 0.007$ ). There was a significant interaction between  
34 time and doses on distance traveled [ $F(1,1,76) = 5.1$ ,  $p = 0.027$ ; Fig. 3c]. Clear reductions in the distance  
35 traveled were observed in cabergoline-treated group from 0 to 5 ( $t = 2.5$ ,  $p = 0.047$  in 0.25 and  $t = 3.1$ ,  $p =$   
36  $0.011$  in 1  $\mu\text{mol/kg}$ ) and from 5 to 10 minutes ( $t = 2.6$ ,  $p = 0.035$  in 1  $\mu\text{mol/kg}$ ). Total distance [ $F(1,36) =$   
37  $0.81$ ,  $p = 0.37$ ; Fig. 3f] and the number of rearing were not different between groups [ $F(1,36) = 0.28$ ,  $p =$   
38  $0.60$ ; Fig. 3d and Fig. 3g]. There was a trend toward reduced percentage of entries into open arms at 0.25  
39  $\mu\text{mol/kg}$  ( $t = 2.1$ ,  $p = 0.09$ ; Fig. 3e). A decrease in grooming behavior was also observed at 4  $\mu\text{mol/kg}$   
40 group ( $t = 4.3$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 3h).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

#### 50 Behavioral effects of chronic cabergoline administration

51  
52 In FST, there were significant reduction in immobility ( $99 \pm 14$  for cabergoline vs.  $143 \pm 15$  sec for  
53 vehicle;  $t = -2.3$ ,  $p = 0.035$ ; Fig. 4a) and significant increase in swimming ( $116 \pm 14$  for cabergoline vs.  
54  $71 \pm 9$  sec for vehicle;  $t = 3.0$ ,  $p = 0.01$ ). Latency of the immobile behavior was not significantly different  
55 between the two groups ( $t = -0.15$ ,  $p = 0.88$ ; Fig. 4b).  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6 In NST, Wistar rats demonstrated a significant reduction in the latency of feeding in the novel  
7 environment after the chronic administration of cabergoline ( $562 \pm 38$  sec in vehicle,  $395 \pm 63$  sec in  
8 cabergoline group;  $t = 2.3$ ,  $p = 0.04$ ; Fig. 4c).  
9

10  
11 In OFT, the cabergoline-treated rats showed slightly longer distance traveled compared with  
12 the vehicle-treated rats, although the difference did not reach statistical significance [ $F(1,14) = 1.0$ ,  $p =$   
13  $0.33$ ; Fig. 5a and 5c]. The cabergoline treatment also induced significant increase in the number of  
14 vertical movements [ $F(1,14) = 8.9$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 5b]. Total number of rearing was increased after the  
15 treatment ( $94 \pm 10$  vs.  $55 \pm 9$ ;  $t = 3.0$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 5d). No significant differences were observed in the  
16 time spent in the center area ( $t = 1.2$ ,  $p = 0.29$ ; Fig. 5e) or grooming ( $t = -0.85$ ,  $p = 0.41$ ; Fig. 5f).  
17  
18

19  
20 In EPT, cabergoline-treated rats demonstrated trends towards a decrease in the time in closed  
21 arms ( $t = -2.0$ ,  $p = 0.071$ ; Fig. 6a), as well as an increase in the time in center ( $t = 1.7$ ,  $p = 0.096$ ) and total  
22 frequency of entry ( $t = 2.1$ ,  $p = 0.051$ ; Fig. 6b). There was a tendency of more active locomotion during  
23 the 15-minutes test [ $F(1,14) = 3.3$ ,  $p = 0.09$ ; Fig. 6c and 6f]. No significant difference was found in the  
24 number of rearing ( $t = 0.47$ ,  $p = 0.65$ ; Fig. 6d and 6g), and percentage of entries into open arms per total  
25 number ( $t = 0.83$ ,  $p = 0.42$ ; Fig. 6e). There was a trend for decreased time of grooming by the treatment ( $t$   
26  $= -1.89$ ,  $p = 0.079$ ; Fig. 6h).  
27  
28  
29  
30  
31

### 32 **Effects of chronic cabergoline administration on BDNF protein expression and its related signaling**

33  
34 As shown in Fig. 7a and 7b, the chronic cabergoline treatment induced a 1.6-fold increase in the  
35 expression level of BDNF ( $t = 4.6$ ,  $p = 0.002$ ) in the homogenates from hippocampus. In contrast, no  
36 significant differences were detected in the expression levels of either BDNF receptor i.e., p75 ( $t = 1.4$ ,  $p$   
37  $= 0.21$ ) or TrkB ( $t = 1.3$ ,  $p = 0.22$ ). When we examined down-stream signals of TrkB, marked activation  
38 (phosphorylation) of ERK1 (pERK1,  $t = 3.5$ ,  $p = 0.008$ ; Fig. 7c and 7d) was observed (1.9 times higher  
39 than vehicle control). The same increasing tendency was caused by chronic cabergoline in the pERK2  
40 level ( $t = 2.0$ ,  $p = 0.074$ ). On the other hand, no significant difference was observed in the pAkt that is  
41 another down-stream signal of TrkB ( $t = 0.8$ ,  $p = 0.44$ ). In our system, total expression of ERK1/2 or Akt  
42 was not altered by chronic cabergoline (Fig. 7c).  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 50 **Discussion**

51  
52 The present study demonstrated that cabergoline reduced immobility in both acute and chronic treatment  
53 regimen. In NST, the delay in the first feeding was shortened by the repeated administration of this  
54 substance. Single treatment with low dose cabergoline decreased distance traveled in OFT/EPT, while the  
55 high-dose treatment increased the time spent as well as the number of entries into open arms in EPT.  
56 Chronic treatment with cabergoline increased the number of rearing in OFT and tended to increased the  
57 distance-traveled in EPT. In addition, our system showed that the two-week treatment with cabergoline  
58 increased the protein level of BDNF and activation of ERK1 in hippocampus.  
59  
60