

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08075

研究課題名(和文) D体アミノ酸に注目したうつ病の病態解明研究

研究課題名(英文) Reserach of depression focusing on D-amino acids

研究代表者

沼田 周助 (NUMATA, Shusuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：10403726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：気分障害の分子生物学的病態解明目的に、D体とL体のアミノ酸を区別して、ヒト血液ならびにマウス脳でアミノ酸濃度の測定を行った。結果、ヒト血漿で測定可能であったD体アミノ酸は、Asn, Ser, Ala, Proであった。モデル動物脳で測定可能であったD体アミノ酸は、Ser, Asp, Alaであった。ヒト血漿とうつ病にモデル動物脳の両方でD体が測定できるアミノ酸は、SerとAlaであった。うつ病患者、双極性障害患者、対照健常者の血清の総D型アミノ酸濃度を測定し比較をしたが、3群間に有意な違いは認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-アミノ酸は生体内含量が低いものが多いとされているが、詳細な情報が十分に存在していなかった。本研究では、広範囲のD-アミノ酸を同時に測定し、ヒト血液で複数の測定可能なD-アミノ酸を同定し、さらには、そのうちのいくつかは動物脳でも測定可能であることを示した。今後は、これらの測定可能な特定のD-アミノ酸に注目した精神疾患の病態解明が進展すると思われる。

研究成果の概要(英文)：To reveal the molecular biological mechanisms of mood disorders, amino acid concentrations were measured in human blood and mouse brain, distinguishing between D- and L- amino acids. The D- amino acids that could be measured in human plasma were Asn, Ser, Ala, and Pro. The D- amino acids measurable in the model animal brain were Ser, Asp, and Ala. The D- amino acids measurable in both human plasma and animal brain models of depression were Ser and Ala. Serum total D- amino acid concentrations were measured and compared in depressed patients, bipolar patients, and healthy controls, and no significant differences were found between the three groups.

研究分野：分子精神医学分野

キーワード：うつ病 D体アミノ酸 モデル動物 血液

1. 研究開始当初の背景

うつ病は、抑うつ気分や意欲・活動性の低下を特徴とする精神障害である。その有病率は一般人口の 5-8% であり、日本において推計 360 万人から 600 万人の患者がいると言われている。セロトニンなどの神経伝達物質の異常が関与していると考えられているが、その分子生物学的病態は未だ十分に明らかになっておらず、既存の抗うつ薬に対する治療反応率は 70% 程度にとどまっている (Rush AJ et al. Am J Psychiatry 2006)。

近年、科学技術の発達により生体内代謝物を網羅的に測定するメタボローム解析が可能となり、うつ病における複数のアミノ酸濃度の異常が報告されるようになった。タンパク質構成アミノ酸のうち、グリシンを除く 19 種類のアミノ酸には 位に不斉炭素を有し、お互いに光学異性体となる L 体と D 体が存在する。しかしながら、D 体アミノ酸 (D-アミノ酸) は生体内含量が極めて低いものが多く、アミノ酸を L 体と D 体に区別して定量することが技術的に困難であったため、これまでのうつ病研究では、L 体と D 体の総量アミノ酸もしくは L-アミノ酸のみの定量比較が行われてきた。しかしながら、D-セリンについては、早くからその存在が中枢神経系で見出され、N-メチル-D-アスパラギン酸型 (NMDA) グルタミン酸受容体のグリシン結合部位に作用して受容体機能を促進する選択的アゴニストであり、L-グルタミン酸の NMDA 受容体への結合を介した興奮を調整する神経調整因子であることが明らかとなり、これまでにうつ病や統合失調症との関連が報告されている (Taniguchi K et al. Diseases. 2022, MacKay MB et al. Front Psychiatry. 2019)。これらの知見は、D 型アミノ酸特異的な中枢神経における神経伝達制御システムの異常が、精神疾患の生物学的発病機序に深く関わっている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、D 型と L 型のアミノ酸を区別して定量し、うつ病の臨床検体 (血液) とうつ病のモデル動物検体 (血液と脳) に共通するアミノ酸の異常を検討し、うつ病の病態解明とバイオマーカーの開発を試みた。

3. 研究の方法

ヒト血液研究

患者 (うつ病と双極性障害) と精神疾患を有しない健常対照者から静脈採血を行い、血漿・血清を採取した。除タンパクおよび蛍光誘導処理後、二次元 high performance liquid chromatography (HPLC) 精密分析法を用いて、His, Asn, Ser, Gln, Arg, Asp, Gly, Glu, Thr, Ala, Pro, Met, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Lys, Cys, Tyr の D 型と L 型のアミノ酸濃度を定量した。血清 D 型 Ser 濃度については D-serine colorimetric kit を用いて定量した。血清総 D 型アミノ酸濃度は total D-Amino Acid Assay kit を用いて定量した。血漿の L 型 Glu 濃度については酵素法により定量した。

動物研究

(1) JPS 投与モデルマウス: 生後 9 週目にリポポリサッカリド (Lipopolysaccharide, LPS; serotype 0127:B6; 0.83mg/kg) をマウス (ICR, オス) に投与し、うつ病モデルマウスを作成した。LPS 投与後 28 時間後にマウスの前頭葉皮質、海馬、線条体、および血漿を採取した。

(2) 水浸拘束ストレスモデルマウス: C57BL/6 (6 週齢, オス) をコニカルチューブに入れて拘束した状態で顔にかからないまでの深さの水に浸漬し 3 時間放置した。これを 2 週間毎日与え、脳組織と血液を採取し、血清を得た。

(3) 社会的敗北ストレスモデルマウス: C57BL/6 (8 週齢, オス) を 16-24 週齢の ICR マウスが

居るマウスケージに入れ、10 分間直接的な攻撃を受けさせる。その後、透明で穴の空いた板で仕切りを入れ、直接的な攻撃は受けないものの、ICR マウスに監視された状態で匂いもする感覚的なストレスを継続的に翌日まで与えられた。この直接的・感覚的なストレスを 10 日間連続で行った。これらのストレス負荷マウス、ならびにストレスを与えられていない対照のマウスから脳組織と血液を採取し、血清を得た。

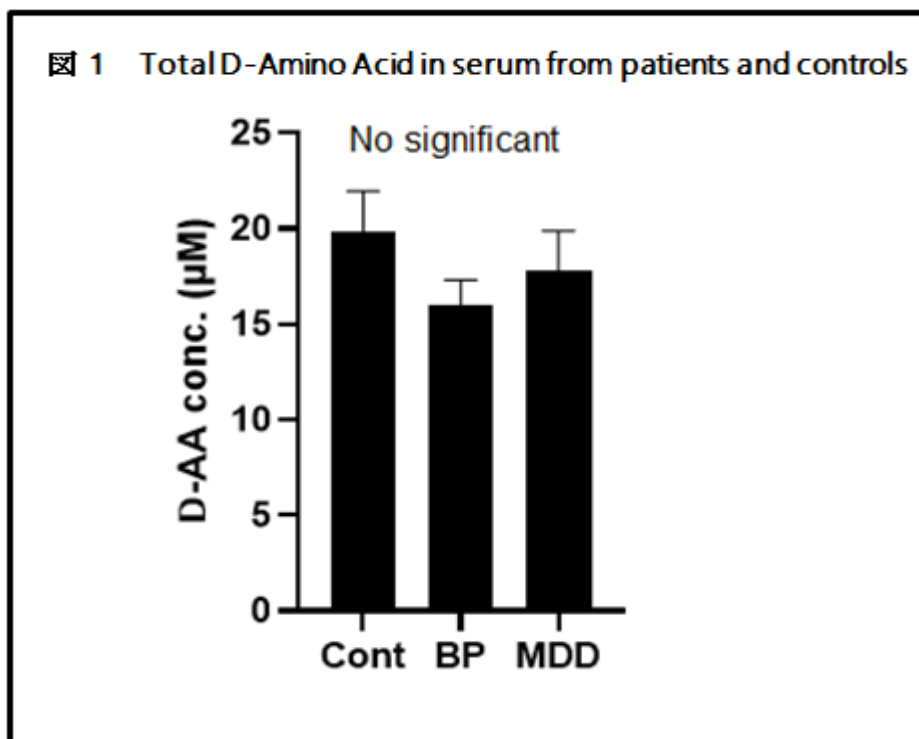
(1) については二次元 HPLC 法で D 型、L 型アミノ酸を定量するとともに、L 型 Glu 濃度については酵素法により定量した。(2) (3) については D-serine colorimetric kit を使用して脳と血清中 D-serine 濃度を測定した。

4 . 研究成果

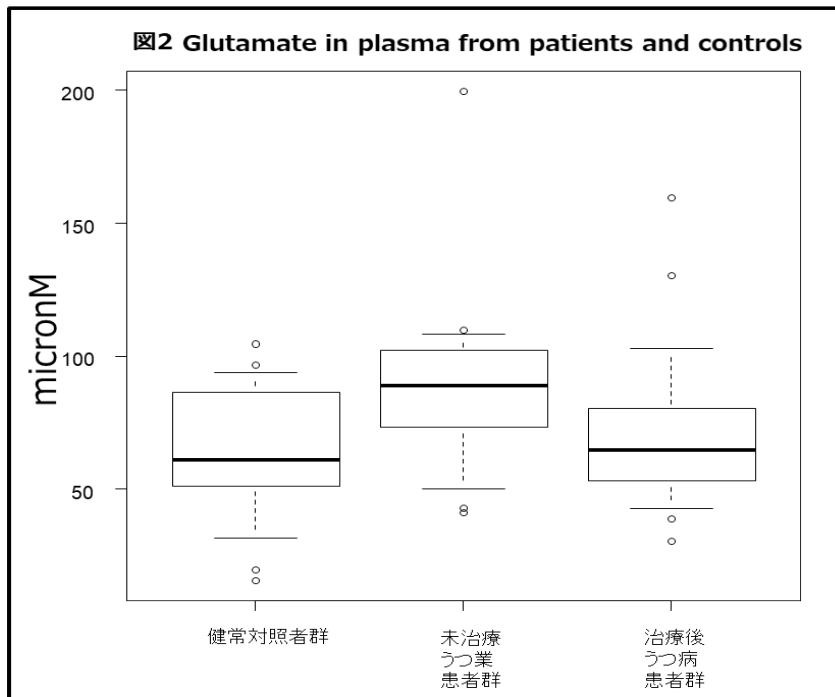
ヒト血漿で測定可能であった L 型アミノ酸は、His, Asn, Ser, Gln, Arg, Asp, Gly, Glu, Thr, Ala, Pro, Met, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Lys, Cys, Tyr であった。ヒト血漿で測定可能であった D 型アミノ酸は、Asn, Ser, Ala, Pro であった。

マウス脳で測定可能であった L 型アミノ酸は、His, Asn, Ser, Gln, Arg, Asp, Gly, Glu, Thr, Ala, Pro, Met, Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Lys, Cys, Tyr であった。マウス脳で測定可能であった D 型アミノ酸は、Ser, Asp, Ala であった。ヒト血漿とマウス脳の両方で D 型が測定可能なアミノ酸は、Ser と Ala であった。

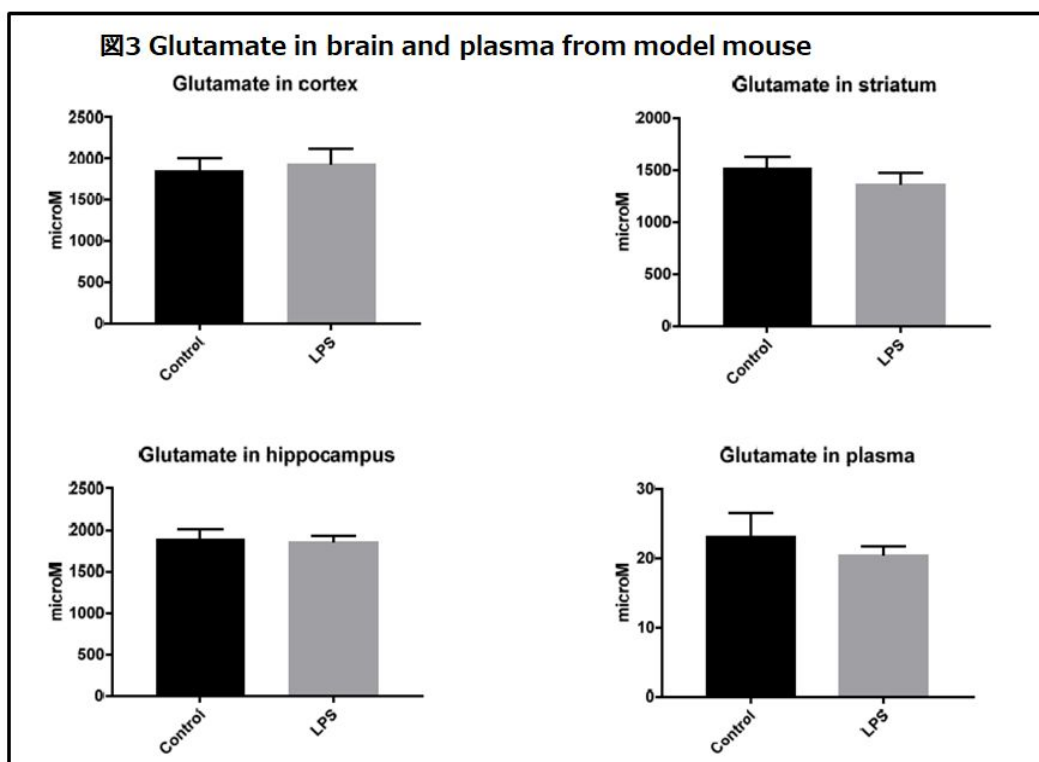
そこで、ヒト血清ならびにうつ病モデルマウスの脳と血清の D 型 Ser 濃度を D-serine colorimetric kit を用いて定量したが、いずれも検出限界閾値濃度以下で定量できなかった。うつ病患者 (Major depressive disorder: MDD) 78 名、双極性障害患者 (Bipolar disorder: BP) 61 名、精神疾患のない対照健常者 (Controls: Cont) 78 名の血清総 D 型アミノ酸濃度を total D-Amino Acid Assay kit を用いて定量し比較した。結果、3 群間で統計学的有意な差異は認めなかった (図 1)。



既報の我々の研究で Capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) による測定でうつ病において高 Glu 血症を認めたことから (Umehara H et al. Sci rep 2017)、独立したサンプルセットを用いて酵素法により血漿の L 型グルタミン濃度を測定した。結果、治療前後のうつ病患者群 (17 名) と対照健常者群 (21 名) の 3 群間で違いを認める傾向があった ($p=0.057$) (図 2)。



続いて、LPS 投与うつ病モデルマウス(N=5)と対照モデルマウス(N=5)から脳組織（皮質、線条体、海馬）と血漿を採取し、酵素法により L 型グルタミン濃度を定量し比較した。結果、皮質、線条体、海馬、血漿、いずれも、2 群間で有意な違いを見出すことができなかった（図 3）。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 沼田周助	4. 巻 37
2. 論文標題 うつ病の予後マーカー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 精神科	6. 最初と最後の頁 599-605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木下誠、沼田周助、大沼徹、大森哲郎
2. 発表標題 双極性障害の末梢血を用いたDNAメチル化修飾解析研究
3. 学会等名 第38回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸田 裕之 (TODA Hiroyuki) (00610677)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・精神科学・准教授 (82406)	
研究分担者	朴 秀賢 (BOKU Shuken) (60455665)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・准教授 (17401)	
研究分担者	古賀 農人 (KOGA Minori) (70744936)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・精神科学・助教 (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------