

科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500305

研究課題名（和文） セロトニン欠乏モデルマウスを用いた脳内モノアミン調節機構とPTSD発症機序の解析

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for the control of monoamine levels in the brain and the etiology of PTSD using serotonin-deficient mice.

研究代表者 一瀬 宏 (Ichinose Hiroshi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：90192492

研究成果の概要（和文）：申請者らが世界で初めて作製したジヒドロプテリジン還元酵素の遺伝子破壊マウスにおいて、セロトニン欠乏が起こり PTSD 様症状を発症する機序について解析した。その結果、本マウスで生じている高フェニルアラニン血症が主な原因となり、高度の脳内セロトニンの欠乏が起きていること、低フェニルアラニン食により血中フェニルアラニン濃度を低下させると、脳内セロトニンも増加することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We first succeeded in generating gene-targeting mice for the dihydropteridine reductase gene. The mice exhibited deficiency in the serotonin contents in the brain and PTSD-like behaviors in a battery of behavioral test. In this study, we explored the molecular mechanism for these abnormalities in the mice. We found that hyperphenylalaninemia in the mice can cause serotonin deficiency in the brain, and that a low-phenylalanine diet deteriorated the serotonin-deficiency in the mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			0
年度			0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：臨床神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳内セロトニンニューロンは、中脳縫線核から広範な脳の領域に投射しており、情動のコントロールに重要な働きをしている。セロトニンニューロンの機能を増強させる働きを持つセロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)は、うつ病など感情障害の治療に広く使われている。しかし、感情障害などの精神疾患の

病態には、まだまだ未解明な部分が多く取り残されている。

(2) テトラヒドロピオプテリン(BH4)は、セロトニン生合成の第一段階酵素であるトリプトファン水酸化酵素の補酵素であり、生体内でのセロトニン合成に必須な化合物である。また、セロトニンと共に重要な神経伝達物質であるドーパミンやノルアドレナリン

の生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素、さらに、フェニルアラニン代謝の初発段階の酵素であるフェニルアラニン水酸化酵素の補酵素としても働いている。BH4は、脳内でグアノシン三リン酸から三段階の酵素反応を経て合成される。トリプトファン水酸化酵素などの水酸化酵素との反応で、BH4は電子供与体として働き、キノノイド型ジヒドロピオプテリンに変換される。キノノイド型ジヒドロピオプテリンを再びBH4に還元する酵素が、ジヒドロプテリジン還元酵素(DPR)である。

(3) 申請者らは、BH4の代謝と神経機能との関連を明らかにするために、世界で初めてマウス *Dpr* 遺伝子を破壊した遺伝子改変マウス、*Dpr-KO* マウスを作製した。ヒト *DPR* 欠損症の患者は、脳内セロトニンやドーパミン・ノルアドレナリンの欠乏と、高フェニルアラニン血症から重篤な症状を示し、多くは乳幼児期に死亡する。そのため、*Dpr-KO* マウスでも重篤な症状が起きることが予想された。しかし、*Dpr-KO* マウスは外見上野生型とほぼ見分けがつかず、成長することがわかった。

(4) *Dpr-KO* マウスの生化学的分析を行ったところ、*Dpr* 活性の低下によると考えられるジヒドロピオプテリンの増加が観察された。しかし、組織内BH4量は野生型と比べて減少していなかった。さらに、脳内モノアミン類の分析から、セロトニンが野生型の約4分の1に低下していること、ドーパミン量は野生型の約7割、ノルアドレナリン量は野生型の約半分にそれぞれ減少していることも明らかとなった。

(5) 脳内モノアミンの減少が明らかとなったため、行動学的な変化を検討するため藤田保健衛生大学の宮川剛教授らのグループと共同して行動バッテリーテストを行った。その結果、フットショックなどの強いストレスを受ける試験の後で、不安様行動が全般的に更新するという特徴的な行動変化が観察された。これは、ヒトで戦争体験や大きな天災、恐怖体験などの後に、その記憶が突然よみがえってきたり(フラッシュバック)、日常生活での不安が強くなったりする心的外傷後ストレス障害(PTSD)と同様の症状と考えられ、*Dpr-KO* マウスがヒトPTSDの動物モデルとなりうることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) *Dpr-KO* マウスにおいてBH4量が低下していかかわらず、セロトニンやノルアドレナリンなどの脳内モノアミンが低下していた。本研究ではまず *Dpr-KO* マウスにおける脳内モノアミン低下の分子機構を明らかとすることを目的とした。

(2) ヒトのPTSDの発症機構はほとんど解明

されていないが、治療にはセロトニンニューロンの活動を増強するSSRIが使われている。そこで、*Dpr-KO* マウスにおける脳内セロトニンの低下とPTSD様行動変化の関連を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Dpr-KO* マウスは、C57Black/6Jマウスと10世代以上交配して純系とした。ピオプテリンの測定は、蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。還元型ピオプテリンは、逆相カラムで分離後on lineで亜硝酸ナトリウム溶液と80度にて混合することにより酸化し、ピオプテリンに変換後に蛍光検出器で定量した。モノアミンおよび代謝物は、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出法により分離定量した。

(2) 組織化学的解析には、マウス脳を4%パラホルムアルデヒドで固定し凍結切片を作製した。抗トリプトファン水酸化酵素抗体は、組換え型ヒトトリプトファン水酸化酵素を抗原として作製した自家製抗体を用いた。

(3) 実験に際しては、文科省告示「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、および、日本学術会議制定「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に則り、東京工業大学動物実験委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) *Dpr-KO* マウスにおける脳内セロトニンの重度な低下が生じた原因として、*Dpr* 欠損によりセロトニンニューロン数が減少している可能性、セロトニンニューロンの発達過程の障害により、脳内に広範に投射するセロトニンニューロンの突起が十分に伸展していない可能性などが考えられた。そこで、セロトニンニューロンの細胞数や形態変化を明らかにするために、組織化学的解析を行った。

Dpr-KO マウスの脳切片を作製し、セロトニンニューロンの細胞体が存在する縫線核を含む切片を自家製抗トリプトファン水酸化酵素抗体で染色し、セロトニンニューロンの細胞数および形態について検討した。野生型マウス脳を同様に処理して、セロトニンニューロンの細胞数を吻側から尾側までKOマウ

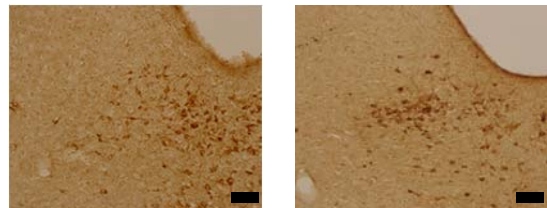


図1、セロトニンニューロン細胞体の存在する縫線核の抗TPH抗体による免疫染色像
野生型(左)と *Dpr-KO* マウス(右)の写真

スと比較検討した。その結果、両者に大きな差がないことが判明した。また、セロトニンニューロンの細胞体の大きさや突起の形状においても大きな差は認められなかった。

〔図1〕

以上の結果は、*Dpr-KO* マウスにおいてセロトニンニューロンの発達や分化に大きな影響は現れていないことを示唆した。

(2) さらに、他のうつ病モデルマウスで観察されている海馬歯状回神経細胞の幼若化が *Dpr-KO* マウスにおいても生じているかについて、未成熟神経細胞のマーカーであるカルレチニンの抗体を用いて検討した。その結果、*Dpr-KO* マウスではセロトニンが顕著に低下しているにもかかわらず、海馬歯状回神経細胞の幼若化は起きていないことが判明した。

(3) ヒト *DPF* 欠損症の患者では BH4 の欠乏から肝臓のフェニルアラニン水酸化酵素活性が低下して高フェニルアラニン血症を起こす。*Dpr-KO* マウスでは肝臓の BH4 量は低下していないが、血中フェニルアラニン量が増加していないか測定した。その結果、中程度の高フェニルアラニン血症を呈していることが判明した。

セロトニンはアミノ酸のトリプトファンから合成されるが、脳内トリプトファンは、フェニルアラニンやチロシンおよび分枝鎖アミノ酸と共に、中性アミノ酸トランスポーターにより血中から脳内に取り込まれる。血中フェニルアラニン濃度が他のアミノ酸濃度に比べて相対的に高いと、中性アミノ酸トランスポーターによる脳内へのトリプトファンの輸送を拮抗的に阻害し、結果として脳内トリプトファン量が低下してセロトニン生合成量も低下する。マウスフェニルアラニン水酸化酵素遺伝子に変異を持つ *Pah^{enu2}* マウスでは、高フェニルアラニン血症から脳内セロトニンが低下することが知られている。

Dpr-KO マウスでの脳内セロトニンの低下も血中フェニルアラニン量が増加しているためであるかを検討するために、マウスを低フェニルアラニン食で飼育して血中フェニルアラニン量を低下させたときに、脳内セロトニン量が増加するか調べた。

ラット・マウスの精製飼料として標準的に使われている AIN-76 の組成から、タンパク質源であるカゼインの代わりにフェニルアラニン以外のアミノ酸を添加した飼料を作製した。フェニルアラニンは飲水中に 0.2% の濃度となるように添加した。このような組成の飼料で *Dpr-KO* マウスおよび野生型マウスを 1 ヶ月間飼育した後に、脳内モノアミン含量を測定し比較した。

その結果、低フェニルアラニン食で飼育することにより、*Dpr-KO* マウスの脳内セロトニン量、ドーパミン量、および、ノルアドレナリン量は増加し、ほぼ野生型と同じレベルと

なることがわかった。ドーパミンおよびノルアドレナリン量は、ほぼ野生型と同じ量まで増加したが、セロトニン量については野生型の 63% の増加にとどまった。これは、今回の条件では *Dpr-KO* マウスの血中フェニルアラニン濃度が野生型と同じまでには低下せず、やや高い濃度であったためであると考えられた。

以上の結果は、*Dpr-KO* マウス脳内でのセロトニンを初めとしたモノアミン含量の低下が、高フェニルアラニン血症に起因していることを示唆した。

(4) 一方、*Dpr* は脳内でも発現しており、*Dpr* 欠損が脳内ニューラル・ネットワークに影響を及ぼしている可能性を否定することはできない。この可能性を明らかにするために、今後脳内でのみ *Dpr* をノックアウトした脳特異的 *Dpr* ノックアウトマウスを作製し解析する必要がある。

また、*Dpr-KO* マウスを低フェニルアラニン食で飼育して脳内セロトニン量を野生型と同程度まで増加させた状態で、PTSD 様行動変化が観察されるかについて、今後さらに解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

1. Homma, D., Katoh, S., Tokuoka, H. & Ichinose, H. The role of tetrahydrobiopterin and catecholamines in the developmental regulation of tyrosine hydroxylase level in the brain. *Journal of Neurochemistry* (2013) in press 査読あり doi:10.1111/jnc.12287
2. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Yoshida, R., Fukaya, T., Morita, R., Kimura, A., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., and Yoshimura, A. (2013). Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nature Immunology*, 14:230-237. 査読あり doi: 10.1038/ni.2520
3. Lee, N.-C., Shieh, Y.-D., Chien, Y.-H., Tzen, K.-Y., Yu, I.-S., Chen, P.-W., Hu, M.-H., Hu, M., Muramatsu, S., Ichinose, H., et al. (2013). Regulation of the dopaminergic system in a murine model of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurobiology of disease*, 52:177-90. 査読あり doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.005

4. Fukuda, S., Horiguchi, M., Yamaguti, K., Nakatomi, Y., Kuratsune, H., Ichinose, H., and Watanabe, Y. (2013). Association of monoamine-synthesizing genes with the depression tendency and personality in chronic fatigue syndrome patients. *Life Sciences*, 92:183-186. 査読あり
doi: 10.1016/j.lfs.2012.11.016
 5. Kishi, T., Ichinose, H., Yoshimura, R., Fukuo, Y., Kitajima, T., Inada, T., Kunugi, H., Kato, T., Yoshikawa, T., Ujiike, H., et al. (2012). GTP cyclohydrolase 1 gene haplotypes as predictors of SSRI response in Japanese patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 142:315-322. 査読あり
doi: 10.1016/j.jad.2012.05.004
 6. Kanao, T., Sawada, T., Davies, S.-A., Ichinose, H., Hasegawa, K., Takahashi, R., Hattori, N., and Imai, Y. (2012). The nitric oxide-cyclic GMP pathway regulates FoxO and alters dopaminergic neuron survival in *Drosophila*. *PLoS one*. 7:e30958. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0030958
 7. Yagi, H., Sanechika, S., Ichinose, H., Sumi-Ichinose, C., Mizukami, H., Urabe, M., Ozawa, K., and Kume, A. (2012). Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice after liver-targeted gene therapy. *Neuroreport*, 23:30-34. 査読あり
doi:10.1097/WNR.0b013e32834e3a87
 8. Tokuoka, H., Muramatsu, S., Sumi-Ichinose, C., Sakane, H., Kojima, M., Aso, Y., Nomura, T., Metzger, D., and Ichinose, H. (2011). Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection. *Journal of Biological Chemistry*. 286:43549-43558. 査読あり
doi: 10.1074/jbc.M111.284729
 9. Sekiya, T., Kashiwagi, I., Inoue, N., Morita, R., Hori, S., Waldmann, H., Rudensky, A., Ichinose, H., Metzger, D., Chambon, P., et al. (2011). The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *Nature Communications*. 2:269. 査読あり
doi: 10.1038/ncomms1272
 10. Koshiba, S., Tokuoka, H., Yokoyama, T., Horiuchi, E., Ichinose, H., and Hasegawa, K. (2011). Biopterin levels in the cerebrospinal fluid of patients with PARK8 (I2020T). *Journal of Neural Transmission*, 118:899-903. 査読あり
doi: 10.1007/s00702-011-0587-8
 11. Homma, D., Sumi-Ichinose, C., Tokuoka, H., Ikemoto, K., Nomura, T., Kondo, K., Katoh, S., and Ichinose, H. (2011). Partial biopterin deficiency disturbs postnatal development of the dopaminergic system in the brain. *Journal of Biological Chemistry*. 286:1445-1452. 査読あり
doi: 10.1074/jbc.M110.159426
 12. Sumi-Ichinose, C., Ichinose, H., Ikemoto, K., Nomura, T., and Kondo, K. (2010). Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: regulation of dopaminergic neural transmission by tyrosine hydroxylase protein at nerve terminals. *Journal of Pharmacological Science*, 114:17-24. 査読あり
doi: JST.JSTAGE/jphs/09R28FM
- [学会発表] (計 7 件)
1. 一瀬宏他、家族性パーキンソン病 PARK8 患者の脳脊髄液中バイオプテリン代謝の解析、第 9 回神経科学研究会、2011 年 11 月 26 日東京
 2. 一瀬宏、モノアミン・バイオプテリン代謝 改変マウスを用いたモノアミンニューロンの制御機構と発達変化の解析、第 64 回日本自律神経学会総会、2011 年 10 月 28 日、秋田市
 3. Hiroshi Ichinose et al. Difference in biopterin metabolism between patients with PARK8 (I2020T) and those with sporadic Parkinson's disease. *Genomic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) 2011*, 2011 年 9 月 20 日 Illinois, USA
 4. Hiroshi Ichinose, Tetrahydrobiopterin: As a regulator of monoamine signals in the brain. *The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases*. 2011 年 8 月 4 日富山市
 5. 原慶賢 他、ジヒドロプテリジン還元酵素 ノックアウトマウスにおけるセロトニンニューロンの組織化学的解析、日本ビタミン学会第 63 回大会、2011 年 6 月 5 日広島市
 6. 堀口美恵子他、慢性疲労症候群患者と健康者における GTP cyclohydrolase I 遺伝子多型の解析、第 7 回日本疲労学会総会 学術総会、2011 年 5 月 21 日名古屋市

7. 一瀬宏、ビオプテリンとドーパミン-線条体におけるドーパミンシグナルの調節機構、第25回大脳基底核研究会、2010年7月31日福島市

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 宏 (Ichinose Hiroshi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：90192492

(2) 研究分担者

徳岡 宏文 (Hirofumi Tokuoka)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：10452020

(3) 連携研究者

なし ()