

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390149

研究課題名(和文) サイトカイン療法の副作用で併発するうつ病の発症機構の解明とコンパニオン診断

研究課題名(英文) Increases in Tryptophan-kynurenine pathway metabolism following interferon-induced depression

研究代表者

齋藤 邦明 (SAITO, KUNIAKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80262765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス性肝炎の治療で 사용되는 インターフェロン(IFN)の副作用として抑うつ等の神経症場が知られている。

IFN治療中で抑うつ症状を呈した患者群は、抑うつ症状の見られなかった患者群と比較してトリプトファン(TRP)-キヌレニン(KYN)代謝系が著明に亢進していた。また、マウスを用いた実験結果より、インターフェロンにより酵素誘導されるTRP-KYN代謝の律速酵素として知られる indoleamine 2,3-dioxygenase が抑うつ症状の発症に深く関係している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Increases in L-tryptophan (TRP) to L-kynurenine (KYN) pathway metabolism were found in interferon (IFN) treated-HCV patients with depressive symptoms. Further, mice with Interferon (IFN) gene transfection induced indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1), resulting marked increase in TRP to KYN pathway metabolites, which well correlated with depression. The blockade of IDO1 activation prevented the development of depressive-like behavior.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・臨床化学

キーワード：サイトカイン インターフェロン トリプトファン IDO 抑うつ ウイルス性肝炎

### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎患者にはインターフェロン(IFN)、特に IFN- $\alpha$ を中心とした治療が行われ、約50%以上の患者が治癒する。しかし、IFN治療による副作用として風邪様症状、疲労感、不眠、イライラなどの身体的症状、また、うつ病などの精神的症状が発生し、IFN治療中止の大きな要因となっている。すなわち、IFN誘発性うつ発症によるIFN治療中止を未然に防止するため、うつ発症に関連するリスクファクターを特定することは極めて重要である。

Indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)は、必須アミノ酸であるトリプトファン(Trp)を基質としてインターフェロン $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )や腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )などのサイトカインの他、regulatory T cell (T reg)で発現しているCTLA-4と樹状細胞やマクロファージが持つB7と結合することで酵素誘導され、iNOSとともに樹状細胞の抗原提示能やT-cell調節因子として機能している。IDOについて過剰発現と免疫寛容(Muller AJ et al. Nat Med. 2005 11:312-319.)あるいは腫瘍の増殖(Uyttenhove C et al. Nat Med., 9: 1269-1274)との関係が報告され、この分野の研究は世界的に注目されている。IDO酵素誘導に関して、その重要性は前述の如く免疫寛容との関連において、免疫療法等を視野に入れた研究開発が世界的に活発である。一方、IDOを介したTrp-キヌレン(Kyn)経路の代謝産物であるキヌレン酸(KA)、3ヒドロキシキヌレン(3HK)などは、脳神経系で生理活性を有する事で知られている。

### 2. 研究の目的

IDOは、IFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインにより酵素活性が強く誘導され、免疫寛容や腫瘍の増殖との関係で注目されている。近年、インターフェロン $\alpha$ などのサイトカイン治療による合併症として併発するうつ病様病態にIDOが関わっていることが示唆される。本研究は、脳神経疾患、特にC型肝炎などサイトカインを治療薬に使用した際に高頻度で発症するうつ病とIDOの関係にターゲットを絞り、IFN治療中のC型肝炎患者血清およびIFN高発現マウスモデルを用いてTrp-Kyn代謝とインターフェロン誘発性うつ発症との関連について検討する。さらに、サイトカイン治療で発症するうつ病をはじめとした神経症状についてその発症メカニズムの詳細を明らかにし、発症予防に繋がるシステム構築を目指す。

### 3. 研究の方法

1) インターフェロン持続投与うつ病マウスモデルを用いた病態解析  
インターフェロンをマウスに持続的に腹腔内投与すると、脳内におけるIDOが持続的

に活性化し、さらに神経毒性をもつとされているTrp-Kyn代謝が亢進することで行動異常を発症する(Saito K et al. Brain Res., 546: 151-4)。うつ病様行動の測定は、行動薬理的に広く使われているForced swim test (FST)およびTail suspension test (TST)を用いる。臓器、特に中枢神経系におけるTrpおよび関連代謝産物の濃度測定はHPLCにて行う。またReal time-PCR、ELISA法、FACSなどを用いて、種々のサイトカインの動態や免疫細胞の動態を調べ、それらの変動とIDOとの関係について明らかにする。

#### a) 実験動物

マウス(C57BL/6J、8週齢、 )は清水実験材料株式会社より購入し、実験動物委員会の承認を得て、本学の動物舎(室温 $25 \pm 1$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明暗サイクル7:00-19:00)で飼育した。飼料(オリエンタル酵母工業株式会社、AIN-93G)及び水は自由摂取とした。1週間の馴化期間後、体重に基づいて無作為に群分けし、IFN高発現群としてLiuらの方法に従い、IFNpDNAをマウス体重の約9%量の生理食塩水に溶解し、尾静脈から5秒以内に全量注入した。IFNpDNA投与後、4週間後に強制水泳試験法にてうつ様行動を評価した。行動実験は10:00-18:00の間で行った。

#### b) 強制水泳試験法 (Forced swim test: FST) によるうつ様行動の評価

試験にはスキャンネットMV-40AQ(メルクエスト社)を用いた。実験開始1時間前よりマウスを実験室(室温 $25 \pm 1$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ )にて馴化させた。シリンダーにはあらかじめ13.5cmの高さまで水道水( $22 \pm 1$ )を入れ、その中でマウスを6分間強制的に水泳させ、6分間のうち後半5分間の無動時間を測定した。シリンダーは試験毎に水道水で洗浄した。

#### 2) 脳神経および末梢組織でのIDOの免疫組織染色

C57BL/6J野生型(WT)マウス(6週齢、オス:日本SLC)組織を10%リン酸緩衝ホルマリン液で一晩固定した。標本はパラフィン包埋した後4 $\mu$ mに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、ネガティブコントロール(NC)染色、IDO1免疫染色及びIDO2免疫染色に用いた。免疫染色は、一次抗体として特異性を確認した上記の抗IDO1抗体、抗IDO2抗体を使用し、二次抗体としてLSABkit(Dako)を使用した。NCには免疫前ウサギ血清を一次抗体として使用した。

#### 3) インターフェロン治療製剤により発症したうつ病患者サンプルでの解析

患者の同意が得られたIFN治療中のC型肝炎患者51名の血清を用いた。提供された血清は解析まで-80で保存した。IFN治療中

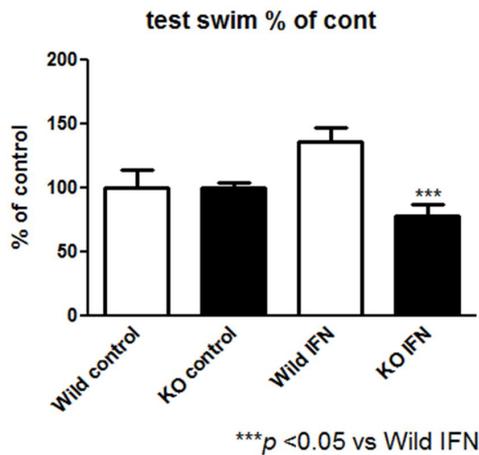


Fig 1 IFN 高発現うつ病マウスにおよぼす IDO 遺伝子欠損の影響

にうつ様症状が認められたため精神科を受診し、診断を受けたケースを“うつ群” “Depression+”と表記し、うつ様症状が認められないまま予定通りに治療を終了したケースを“非うつ群” “Depression-”と表記した。

#### 4. 研究成果

##### 1) インターフェロン持続投与うつ病マウスモデルを用いた病態解析

IFN 高発現マウス血清中の TRP 有意な減少、KYN およびその下流の代謝産物である 3 ヒドロキシキヌレニン (3-HK) の増加が認められた。マウス脳内においても 3HK の顕著な増加が認められた。IDO1 活性の強い誘導によってみられたうつ病様行動は、IDO1 遺伝子欠損マウスにおいて、改善が認められた (Fig. 1)。さらにマウス脳内においてみられた TRP 代謝産物の変動は IDO1 遺伝子欠損マウスではみられなかった (Fig. 2)。

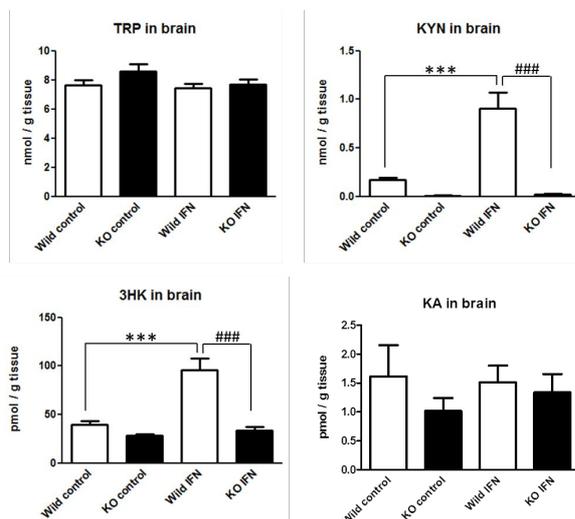


Fig 2. IFN 高発現うつ病マウスにおける Trp 代謝におよぼす IDO 遺伝子欠損の影響

##### 2) 脳神経および末梢組織での IDO の免疫組織染色

マウス組織から mRNA を抽出し、RT-PCR にて IDO1, IDO2 の mRNA の発現の有無を検討した。IDO1 は大腸と精巣上体で発現が認められ、IDO2 は大脳皮質、小脳、肝臓、腎臓、精巣上体で発現が認められた。

脳神経系では IDO2 のみの発現が確認された。免疫染色を行い IDO2 陽性細胞の特定を行った。大脳皮質の神経細胞、小脳のプルキンエ細胞、脈絡叢においてそれぞれ発現が確認された。

##### 3) インターフェロン治療製剤により発症したうつ病患者サンプルでの解析

うつ群において、IFN 治療開始からうつ診断までの平均日数は 86 日、IFN 治療中止前時点の平均日数は 105 日、IFN 治療中止後時点の平均日数は 279 日であった。治療開始前から治療開始 2 週間後・4 週間後における Trp、Kyn、3HK、3HAA の動態を検討した。

その結果、Trp はうつ群・非うつ群ともに治療に伴った減少が見られた。特にうつ群では Trp の減少幅が大きく、治療中止によって Trp の値が治療前の水準に回復した。Kyn はうつ群・非うつ群ともに IFN 治療によって増加傾向を示した。3HK はうつ群・非うつ群ともに治療開始 2 週間後から増加した。特にうつ群では急激な増加が認められ、治療中止によって治療前の水準まで戻った。3HAA、AA、KA はうつ群・非うつ群ともに IFN 治療による著明な変動は確認できなかった。

本研究により、IFN 治療によるうつ発症例では、うつ非発症例に比べて Kyn、3HK の増加量が大きく、特に 3HK の増加が顕著であることが明らかとなった。また、治療開始早期の段階で Trp-Kyn 代謝産物動態の変動が確認できたことから、IFN 治療によるうつ発症を早期に同定できる可能性が示唆された。

本研究結果は、(1) ハイドロダイナミクス法により IFN を高発現マウスがサイトカイン療法で発症するうつ病の疾患モデルとして有用である事 (2) IFN 投与により Trp-Kyn 代謝系の著明な増加が認められ、セロトニン経路とは独立した細胞毒性を有する Kyn 代謝の亢進がうつ発症の 1 つの危険因子であることを明らかにした。

#### 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 13 件)

1) Effects of various phytochemicals on indoleamine 2,3-dioxygenase 1 activity: galanal is a novel, competitive inhibitor of the enzyme.

Yamamoto R, Yamamoto Y, Imai S,

- Fukutomi R, Ozawa Y, Abe M, Matuo Y, **Saito K**.  
PLoS One. 2014 Feb 12;9(2):e88789. doi:  
10.1371/journal.pone.0088789. eCollection  
2014. PMID: 24533148
- 2) Kynurenine production mediated by  
indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates  
liver injury in HBV-specific CTL-induced  
fulminant hepatitis.  
Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T,  
Hoshi M, Ando T, Takamatsu M, Hara A,  
Moriwaki H, **Saito K**, Seishima M.  
Biochim Biophys Acta. 2014 Apr 24. pii:  
S0925-4439(14)00102-1. doi:  
10.1016/j.bbdis.2014.04.015. [Epub ahead  
of print] PMID: 24768802
- 3) Induction of HBsAg-specific cytotoxic T  
lymphocytes can be up-regulated by the  
inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase  
activity.  
Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, **Saito K**,  
Moriwaki H, Seishima M.  
Immunology. 2014 Mar 3. doi:  
10.1111/imm.12274. [Epub ahead of print]  
PMID: 24580128
- 4) Effects of indoleamine 2,3-dioxygenase  
deficiency on high-fat diet-induced hepatic  
inflammation.  
Nagano J, Shimizu M, Hara T, Shirakami  
Y, Kochi T, Nakamura N, Ohtaki H, Ito H,  
Tanaka T, Tsurumi H, **Saito K**, Seishima M,  
Moriwaki H.  
PLoS One. 2013 Sep 9;8(9):e73404. doi:  
10.1371/journal.pone.0073404. eCollection  
2013. PMID: 24039933
- 5) IDO1 plays an immunosuppressive role  
in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced  
colitis in mice.  
Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi  
M, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, **Saito K**,  
Hara A.  
J Immunol. 2013 Sep 15;191(6):3057-64.  
doi: 10.4049/jimmunol.1203306. Epub 2013  
Aug 16. PMID: 23956437
- 6) Remarkable role of indoleamine  
2,3-dioxygenase and tryptophan  
metabolites in infectious diseases:  
potential role in macrophage-mediated  
inflammatory diseases.  
**Murakami Y**, Hoshi M, Imamura Y, Arioka  
Y, **Yamamoto Y**, **Saito K**.  
Mediators Inflamm. 2013;2013:391984.  
doi: 10.1155/2013/391984. Epub 2013 Feb  
18. Review. PMID: 23476103
- 7) Species and cell types difference in  
tryptophan metabolism.  
**Murakami Y**, **Saito K**.  
Int J Tryptophan Res. 2013 Jul 21;6(Suppl  
1):47-54. doi: 10.4137/IJTR.S11558. Print  
2013. PMID: 23922502
- 8) (-)-Epigallocatechin gallate inhibits the  
expression of indoleamine 2,3-dioxygenase  
in human colorectal cancer cells.  
Ogawa K, Hara T, Shimizu M, Nagano J,  
Ohno T, Hoshi M, Ito H, Tsurumi H, **Saito  
K**, Seishima M, Moriwaki H.  
Oncol Lett. 2012 Sep;4(3):546-550. Epub  
2012 Jun 15. PMID: 23741252
- 9) Remarkable role of indoleamine  
2,3-dioxygenase and tryptophan  
metabolites in infectious diseases:  
potential role in macrophage-mediated  
inflammatory diseases.  
**Murakami Y**, Hoshi M, Imamura Y, Arioka  
Y, **Yamamoto Y**, **Saito K**.  
Mediators Inflamm. 2013;2013:391984.  
doi: 10.1155/2013/391984. Epub 2013 Feb  
18. Review. PMID: 23476103
- 10) Studies on tissue and cellular  
distribution of indoleamine  
2,3-dioxygenase 2: the absence of IDO1  
upregulates IDO2 expression in the  
epididymis.  
Fukunaga M, **Yamamoto Y**, Kawasoe M,  
Arioka Y, **Murakami Y**, Hoshi M, **Saito K**.  
J Histochem Cytochem. 2012  
Nov;60(11):854-60. doi:  
10.1369/0022155412458926. Epub 2012  
Aug 15. PMID: 22895526
- 11) Inhibition of increased indoleamine  
2,3-dioxygenase activity attenuates  
Toxoplasma gondii replication in the lung  
during acute infection.  
**Murakami Y**, Hoshi M, Hara A, Takemura  
M, Arioka Y, **Yamamoto Y**, Matsunami H,  
Funato T, Seishima M, **Saito K**.  
Cytokine. 2012 Aug;59(2):245-51. doi:  
10.1016/j.cyto.2012.04.022. Epub 2012 May  
18. PMID: 22609210
- 12) L-tryptophan-kynurenine pathway  
metabolites regulate type I IFNs of acute  
viral myocarditis in mice.  
Hoshi M, Matsumoto K, Ito H, Ohtaki H,  
Arioka Y, Osawa Y, **Yamamoto Y**,  
Matsunami H, Hara A, Seishima M, **Saito  
K**.  
J Immunol. 2012 Apr 15;188(8):3980-7. doi:  
10.4049/jimmunol.1100997. Epub 2012  
Mar 14.

PMID: 22422885 [PubMed - indexed for MEDLINE]

13) Posttranslational modification of indoleamine 2,3-dioxygenase.

Fujigaki H, Seishima M, **Saito K.**  
Anal Bioanal Chem. 2012 Jun;403(7):1777-82. doi: 10.1007/s00216-012-5946-2. Epub 2012 Mar 31. Review. PMID: 22460077

〔学会発表〕(計 4 件)

Saito, K

Recent advances of biomarker discovery in biological fluids by using Mass Spectrometry  
8th International Conference of Clinical Laboratory Automation (招待講演)  
4/11-12, 2013 Seoul, Korea

Imai, R Yamamoto, Y Yamamoto, Y Katayagi, R Fukutomi, M Abe, Y Ozawa, K Saito

Labdane-type diterpene, constituent from myoga which are traditional Japanese food inhibit enzyme activity and gene expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1  
Milan, Italy 2013年08月22日□2013年08月27日

齋藤邦明 疾患メタボローム・疾患プロテオミクス解析 仙台市  
2013年11月15日□2013年11月16日

山本梨絵, 山本康子, 今井伸二郎, 松尾雄志, 小澤好夫, 阿部雅子, 福富竜太, 齋藤邦明 免疫調節因子インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ1の新規阻害剤探索: フィトケミカルを中心として  
第36回日本分子生物学会年会 2013年12月04日~2013年12月04日

〔図書〕(計 1 件)

Murakami Y, Imamura Y, Mitani S, Hoshi M, Arioka Y, Yamamoto Y, Seiyama A, Saito K.

Tumor Necrosis factor  
Nova Science Publishers, Inc.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 関節リウマチ患者における生物学的製剤の有効性の予測方法  
発明者: 齋藤邦明、坪井彩、山本康子  
権利者: 国立大学法人京都大学

種類:

番号: 特願 2013-127092

出願年月日: 2013年6月18日

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saito-lab-kyotouniv.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤邦明 (SAITO KUNIAKI)

京都大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号: 80262765

(2) 研究分担者

山本康子 (YAMAMOTO YASUKO)

京都大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号: 00331869

村上由希 (MURAKAMI YUKI)

京都大学大学院・医学研究科・研究員

研究者番号: 50580106