

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860368

研究課題名(和文) アミノ酸代謝産物プロファイリングによる抑うつ症状の新規診断・治療法の探索

研究課題名(英文) Prenatal nicotine exposure and inflammation in adulthood affect to tryptophan metabolites and aggravate psychiatric disorders.

研究代表者

村上 由希 (Murakami, Yuki)

同志社大学・研究開発推進機構・助教

研究者番号：50580106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タバコの活性成分であるニコチンは主に喫煙によって摂取され、精神依存だけでなく、多くの神経機能を増強する。特に、喫煙とうつ病の発症は高い相関関係を示す。うつ病の発症には、心身の安定や心に安らぎに関与するセロトニンが不足することが原因であると考えられている。一方、セロトニンは食事から摂取されるトリプトファン(TRP)から合成され、TRP欠乏がうつ病を悪化させると報告されている。本研究では、胎生期のニコチン摂取によって脳内のセロトニンが変化するだけでなく、TRP代謝も影響を受け、さらに出生後の慢性炎症により、うつ病を発症するリスクが高くなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It is not clarified how nicotine exposure during the pregnancy, and then inflammation in adulthood affect behaviors of offspring. In this study, we examined the influence of nicotine exposure during embryonic period (E14-P0) and inflammation induced by IFN-gamma; gene transfection in adulthood on the changes of tryptophan (TRP) metabolites and depression like behavior. We found that embryonic nicotine exposure affected changing TRP metabolites concentrations in serum, especially kynurenic acid (KA), which is antagonist of alpha7nicotinic acetylcholine receptor. We also found nicotine exposure during the embryonic period and inflammation in adulthood exacerbated depression like behavior and anxiety. In conclusion, our results suggest that nicotine in embryonic period affected TRP metabolites and caused imbalance of TRP metabolites. And nicotine exposure during the neuronal development and inflammation in adulthood might be related with onset of psychiatric disorders.

研究分野：病態解析

キーワード：トリプトファン ニコチン 抑うつ 慢性炎症

1. 研究開始当初の背景

喫煙率はうつ病患者において一般人口より高い (40~60% vs 22%)。大うつ病の既往を持つ患者は喫煙依存度が高く、抑うつ状態の患者は禁煙中に大うつ病のエピソードを発症するリスクが高い。これらの多くの疫学的所見は、タバコの生理活性成分であるニコチンが抗うつ作用をもつことを示唆している。さらにニコチンは、ニコチン作動性アセチルコリン受容体 (nAChR) の強力な作動薬である。一方、nAChR の遮断作用を有する抗うつ薬 (プロピオンやノリトリプチリン等) は禁煙治療に有効であり、同時に抗うつ作用も併せ持つ。このように、ニコチンのような強力なアゴニストや遮断作用のあるアンタゴニストが抗うつ作用を発揮する nAChR をターゲットとした新たな治療に期待がもたれている。つまり nAChR の機能を修飾するような物質 (薬剤) が、抑うつ病態の治療戦略になりうる可能性がある。

必須アミノ酸であるトリプトファン (TRP) は、生体内において酸化還元に関与する補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) をはじめ、精神疾患と関連するセロトニン (5-HT)、メラトニン、キヌレニン (KYN) 等の生理活性物質の出発材料として重要である。TRP はメトキシインドール経路により 5-HT・メラトニンなどに代謝され、この経路で産生される代謝産物の欠乏は、抑うつ病態、不眠、生体内の日内変動障害に深く関与している。生体内の TRP の 95% は KYN 経路の第一律速酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase1 (IDO1) と肝臓で主に発現している L-tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) により代謝される。我々の研究成果より、喫煙が TRP-KYN 代謝産物の動態を変化させること、さらに禁煙成功者と失敗者では TRP 代謝産物の動態が明らかに異なることを示した。また、我々は慢性炎症モデル動物において、TRP 代謝産物の動態が変化し、抑うつ様病態を示すことを明らかにした。TRP は抑うつ病態と関係が深い 5-HT の出発材料として重要で、TRP 欠乏食が抑うつ患者における情動を変化させることが報告されている。さらに、TRP 下流代謝産物の一つであるキヌレン酸 (KA) は、nAChR のサブタイプの一つである $\alpha 7$ nAChR のアンタゴニストであり、 $\alpha 7$ nAChR をターゲットとして、ラット線条体における抑制性神経伝達物質を調節している可能性が示唆されている。すなわち、抑うつ病態において、TRP のみならず TRP 代謝産物の動態も重要であり、内因性代謝産物の動態を捉えることが、抑うつ病態の新たな治療法の開発、ならびに発症予測に重要である。しかし、タバコの主成分であるニコチンが、TRP-KYN 代謝経路に与える詳細な影響については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、ニコチンが TRP-KYN 代謝経路に与

える影響を明らかにし、抑うつ病態の新たな診断・治療法の開発を主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験、ニコチン投与方法ならびに慢性炎症モデルの作製方法

C57BL/6J 系雄マウスならびに妊娠マウスは日本エスエルシー株式会社 (静岡) より購入し、使用した。室温 23 ± 1 、湿度 $55 \pm 5\%$ で、明暗サイクル (明期 8:00-20:00) の実験動物室内で飼育し、餌は自由摂取させた。ニコチン投与方法はニコチン (Sigma) を 2% スクロース水溶液に 0.2 mg/mL となるように混合し、給水瓶を用いて自由に摂取させた。対象群としては、2% スクロース水溶液のみを自由に摂取させた。基礎検討では、8 週齢のオスマウスに 15 日間、ニコチンを経口により摂取させた。その後、ニコチン摂取中断直後、ならびに中断 15 日後に各種行動薬理的試験を行った。妊娠期ニコチン暴露マウスについては Alkam ら (2013) の方法に従い、胎生 14 日目から生後 0 日まで母体にニコチンを経口摂取させた。出生確認後、4 週齢で、母体から離乳し、雌雄に分けて飼育した。その後、8 週齢になった時点で、雄マウスに慢性炎症を惹起した。慢性炎症モデルは、マウス IFN- γ 遺伝子を個体に導入し、長期的に高発現させた。遺伝子導入方法は Liu らの方法 (1999) に従い、pCpG Muv (mouse IFN- γ plasmid) 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。コントロール群には、同様の方法で生理食塩水+control vector (pCpG) のみを尾静脈から注入した。遺伝子導入 4 週間後に各種解析を進めた。

(2) 各種行動薬理的試験

すべての行動薬理的試験について、実験開始 1 時間前よりマウスを実験室 (室温 23 ± 1 、湿度 $55 \pm 5\%$) に馴化させた。

Y 字迷路試験

短期記憶ならびに自発交替行動を評価するために Y 字迷路試験 (Y-maze) を行った。マウスを Y 字迷路のいずれかの Arm の先端に置き、8 分間にわたって、迷路内を自由に探索させ、マウスが移動した Arm の位置を記録した。マウスが測定時間内に移動した Arm 数を Total arm entries とした。さらに連続して異なる 3 つの Arm を選択した組合せを調べ、Percent alternation を算出した。

オープンフィールド試験

基本的行動量や不安様傾向を調べるために、オープンフィールド試験 (Open field test; OFT) を行った。測定には、スキャンネット MV-40 OF (メルクエスト社) を用いた。新奇で広く明るい環境であるオープンフィールド (46 x 46 cm) の中にマウスを入れ、自由に探索させ、一定時間内 (10 分間) のフィールド内の区画移動回数 (Movement)、立ち上がり回数 (Rearing) を測定した。さらに中央部に動物を放置してから動き出すまでの

反応潜時 (Latency) や中央部への滞在時間を測定することで、不安様行動を観察した。

強制水泳試験

うつ様行動の測定については、抗うつ薬のスクリーニングに汎用で用いられる強制水泳試験 (Forced Swim test; FST) で評価した。試験にはスキャンネット MV-40 AQ (メルクエスト社) を用いた。シリンダーにあらかじめ 13.5 cm の高さまで水道水 (21 ± 0.5) 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。

(3) TRP 代謝産物の測定

各種行動解析終了後にイソフルラン麻酔下にてマウスの下大静脈より血液を採取、室温にて 30 分間放置後、 $2,000 \times g$ で 15 分間遠心し、血清を分離した。血液を採取後、脳を摘出して大脳皮質を採取し、ただちに液体窒素にて凍結した。組織ならびに血清は解析まで -80 にて保管した。TRP 代謝産物を測定するために 10% 過塩素酸にて、除タンパク処理後、 $20,000 \times g$ 、4 で 20 分間遠心し、上清を回収、得られた検体を HPLC で測定した。脳内および血清中の TRP 代謝産物の測定は、Saito ら (2011) の方法 に従った。

(4) 統計解析

データはすべて平均 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で表記した。2 群間での有意差の判定には Student's t-test を用いた。2 つのカテゴリ変数で分類された多群比較については、Two-way Factorial ANOVA と Bonferroni post-test を用いた。交互作用が認められた場合は、2 要因で分類されるすべての組合せを一元配置分散分析で検定を行った後に多重比較検定を行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) ニコチン経口投与による動物の行動変容と TRP-KYN 代謝への影響

マウスに 0.2 mg/mL ニコチンを 15 日間、経口にて自由摂取させ、投与中断直後と中断 15 日後に抑うつ様行動を調べた。その結果、ニコチン中断直後は、抑うつ様行動は観察されず、対照群と比較して、FST における無動時間に有意な差はみられなかった。しかしながら、血清中の TRP 産物のうち、TRP、KA ならびにアントラニル酸 (AA) が減少する傾向にあり、ニコチンが TRP 代謝になんらかの影響を与えている可能性が示唆された。さらに予想に反して、中断 15 日後ではニコチン投与群で有意な FST 無動時間の減少がみられた (図 1)。ニコチンの一過的な抗うつ効果がみられた。しかしながら、TRP 代謝産物は対象群と比較して、変化がなく、ニコチンによる影響は見られなくなった。これらの結果から、ニコチンが一過的に TRP 代謝に影響し、成体で

の抑うつ様行動に影響を与えている可能性が示唆された。しかしながら、経口によるニコチン摂取では、ニコチン依存による抑うつ病態を解析することは困難であると考えられた。

そこで、ニコチン感受性がより高い神経発達期のニコチン暴露モデルにおける TRP 代謝への影響を明らかにすることにした。神経発達期にニコチンを暴露された雄マウスでは、不安障害、社会行動の低下、注意機能障害とドパミンの有意な減少、ノルアドレナリン代謝産物の減少がみられるが、抑うつ様行動は報告されていない (Alkam, 2013)。我々の研究室では、IFN 高発現マウスにおいて、抑うつ様行動が増加し、TRP 代謝の顕著な亢進を確認した。これらのことから、神経発達期にニコチンを暴露された仔マウスが成長し、さらに炎症が惹起された場合、より重篤な抑うつ様の行動障害が引き起こされると考えられた。

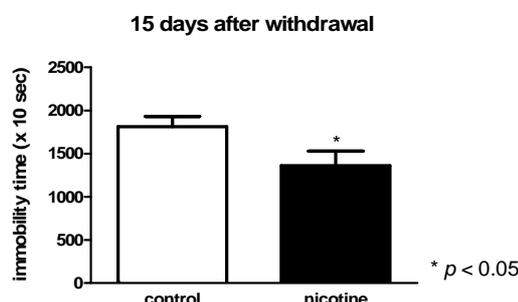


図 1 Effects of nicotine administration on 15 days after withdrawal.

(2) 胎生期ニコチン暴露ならびにマウス IFN- γ 遺伝子導入による成体期のマウス行動への影響

胎生期のニコチン暴露に対して、もっとも感受性の高い E14-P0 において、ニコチン暴露後、成長したマウスに IFN- γ 遺伝子導入によって慢性炎症を惹起した。このマウスで、各種行動試験を行い、ニコチンと慢性炎症による影響を評価した。その結果、雄マウスにおいていくつかの行動変容が観察された。Y 字迷路では、ニコチン暴露、IFN 遺伝子導入いずれの影響も見られなかった (data not shown)。ニコチン暴露+IFN 遺伝子導入群では非暴露群+IFN 遺伝子導入群と比較して、抑うつ様行動の増悪、不安行動の増加が見られた (図 2)。

(3) 胎生期ニコチン暴露ならびにマウス IFN- γ 遺伝子導入が成体期のマウス血中および脳内の TRP 代謝に与える影響

胎生期 (E14-P0) ニコチンの暴露と慢性炎症が TRP 代謝へ与える影響を検討した。その結果、血中 TRP 代謝産物のうち、 $\alpha 7nAChR$ のアンタゴニストである KA がニコチン暴露群で有意に減少した (表 1)。また AA も減少傾向

にあったが、3-ヒドロシキアントラニル酸 (3-HAA) は増加傾向にあった (表 1)。さらに、成長後、IFN- γ 遺伝子導入により、IDO1 活性を持続的に誘導すると、血中 KYN の有意な増加が認められたが、胎生期のニコチン暴露と非暴露群間で有意な差は見られなかった (表 1)。また脳では、ニコチン暴露により血清と同様に KA, AA が減少傾向にあった。IFN- γ 遺伝子導入により脳内の KYN が顕著に増加した (表 1)。

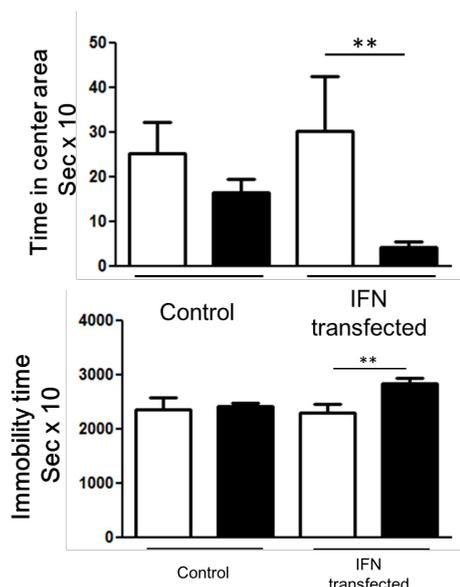


図2 Effects of nicotine admiration and IFN- γ -gene transfection on performance in behavioral tests.

(a)open field test, (b) forced swim test. Mean \pm SEM, ** p <0.05 versus pCpG injected without nicotine exposure.

表1 Effect of prenatal nicotine exposure and IFN- γ -gene transfection on TRP metabolites

Serum	TRP (μ M)	KYN (μ M)	KA (nM)	AA (nM)	3-HAA (nM)
control+	72.9 \pm	0.99 \pm	154.6	77.8	267.1 \pm
pCpG	4.3	0.1	\pm 17.5	\pm 8.4	34.2
control+	66.7 \pm	1.94 \pm	86.4 \pm	54.8	318.9 \pm
pCpGMu γ	5.1	0.1**	21.4**	\pm 8.1	41.1
Nicotine+	70.4 \pm	0.93 \pm	96.1 \pm	58.96	334.8 \pm
pCpG	2.9	0.1	7.4**	\pm 4.7	14.9
Nicotine+	67.4 \pm	1.92 \pm	69.0 \pm	58.3	374.3 \pm
pCpGMu γ	2.3	0.1**	5.1**	\pm 4.1	19.6
Brain	nmol / g wet tissue		pmol / g wet tissue		
control+	17.0 \pm	2.68 \pm	34.6 \pm	10.3	20.2 \pm
pCpG	0.6	0.0	2.9	\pm 1.0	0.9
control+	14.3 \pm	3.12 \pm	35.1 \pm	6.24	23.7 \pm
pCpGMu γ	3.8	0.4	8.7	\pm 1.2	4.3
Nicotine+	14.81	2.65 \pm	26.8 \pm	7.45	21.1 \pm
pCpG	\pm 0.4	0.0	4.0	\pm 0.5	0.3
Nicotine+	12.6 \pm	3.28 \pm	17.0 \pm	7.69	23.5 \pm
pCpGMu γ	0.3	0.2**	3.4	\pm 0.7	0.7

Mean \pm SEM, ** p <0.01 versus pCpG injected

without nicotine exposure, ** p <0.01 versus that with nicotine.

喫煙と各種精神疾患の関係について多くの疫学的な調査や研究が行われ、統合失調症、うつ病および不安症などの精神疾患と喫煙の関連が示唆されている。さらに動物モデルを用いた研究により胎生期に喫煙の影響を受けると脳発達に重要な神経回路の発達障害を引き起こし、不安などの情動障害および注意機能障害が認められることが報告されている。一方で、必須アミノ酸である TRP はうつ病の病態に関わる 5-HT の出発材料として重要であり、TRP-KYN の第一律速酵素で、炎症性サイトカインによって誘導される IDO1 がうつ病に関与している可能性が示唆されている。さらに我々の研究により *in vitro* においてニコチンおよびその代謝産物がこの TRP 代謝酵素である IDO1 誘導に影響することを明らかにした。本研究は、胎生期のニコチン暴露が TRP 代謝に与える影響を明らかにし、さらに成長したマウスで炎症が惹起された時、抑うつ様行動障害の増悪に影響するかを行動薬理学的手法によって検討した。本研究により胎生期のニコチン暴露により、TRP 代謝産物の動態が変化することが示された。さらに胎生期ニコチン暴露+IFN- γ 遺伝子導入群において、非暴露+IFN- γ 遺伝子導入群と比較して、抑うつ様行動や不安傾向の顕著な増悪を示した。

ニコチン作動性アセチルコリン受容体 (α 7AChR) を介したシグナルは NF- κ B を抑制する一方、JAK/STAT シグナルを活性化する。また炎症性サイトカインによって IDO1 は、NF- κ B、JAK/STAT 経路を介して誘導される。すなわち、ニコチンによる α 7AChR を介したシグナルと IDO1 誘導シグナルにはなんらかの関与があると考えられた。今後、胎生期ニコチン暴露による α 7nAChR、および抑うつに関係している α 4 β 2nAChR の発現変動ならびに TRP 代謝産物、特に α 7nAChR のアンタゴニストである KA の影響を明らかにする必要があると考えられる。さらに抑うつ様行動ならび不安障害が増悪した原因について、5-HT だけでなく、脳内モノアミン含量を詳細に解析し、ニコチン暴露ならびに成長後の炎症が中枢神経系に及ぼす影響を明らかにする必要があると考えられ、課題が残された。

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9件)

Tomoyuki Tashiro, Yuki Murakami, Toshitaka Nabeshima, Kuniaki Saito 他 3名. Kynurenine 3-monooxygenase is implicated in antidepressants-responsive depressive-like behaviors and

monoaminergic dysfunctions.
Behavioural Brain Research (査読有),
Vol. 317, 2017, pp279-285
Yuki Murakami, Yukio Imamura, Makiya
Nishikawa, Yoshinobu Takakura,
Takatoshi Nabeshima, Hyoung-Chun Kim,
Kuniaki Saito 他 10 名. Depressive
symptoms as a side effect of
Interferon- therapy induced by
induction of indoleamine
2,3-dioxygenase 1. Sci Rep (査読有),
Vol. 6.29920, 2016, pp1-12
Yukio Imamura, Yuki Murakami, Takeshi
Shimazu, Takashi Jin 他 8 名. Effect of
histone acetylation on
N-methyl-D-aspartate 2B receptor
subunits and interleukin-1 receptors
in association with
nociception-related somatosensory
cortex dysfunction in a mouse model of
sepsis. Shock (査読有), Vol. 45(6),
2016, pp660-667
Hidetoshi Matsunami, Kazuhiro
Watanabe, Yuki Murakami, Makoto
Hayashi 他 6 名. Gastro Jejunal Inner
Lumen Bypass Device Inhibits the
Growth of Pigs. J Diabetic
Complications Med.(査読有) Vol. 1(1),
2016, pp1-4
Yukio Imamura, Takashi Jin, Yuki
Murakami, Akitoshi Seiyama 他 7 名.
Continual Dynamics of Prefrontal
Oxyhemoglobin Patterns during Emotion
and feeling in Humans. Journal of
Multidisciplinary Engineering Science
Studies (JMESS) (査読有), Vol.1(1),
2015, pp6-11
Yukio Imamura, Tomoyuki Tashiro, Yuki
Murakami, Satoko Mitani 他 6 名. Novel
Portable Electroencephalograph for
Monitoring Human Brain Activity Prior
to Anxiety with Balloon Popping
Stimuli. Horizons in Neuroscience Res.
(査読有) Vol. 18, 2015, pp155-167
濱田雄一郎, 今村行雄, 村上由希,
三谷智子 他 2 名. 「大規模災害時における
行政職員の派遣に伴うストレス軽減につ
いて」日本集団災害医学会誌 (査読有)
vol.19 (2), 2014, pp142-149
桜井雅史, 村上由希, 齋藤邦明 他 4 名.
「健康管理のデータベース化と解析手
法」医療と検査機器・試薬 (査読無),
vol.37(4), 2014, pp437-441
三谷智子, 村上由希, 今村行雄. 「阪
神・淡路大震災、東日本大震災の直接死・
災害関連死からみる高齢者の脆弱性」日
本保健医療行動科学会雑誌 (査読有) vol.
29(1), 2014, pp23-30

[学会発表](計 5 件)

「神経発達障害に関連した遺伝子欠損動
物における行動解析とトリプトファン代
謝の変化」村上由希. 第 37 回日本トリ
プトファン研究会「東京農業大学(東京都
世田谷区)」2016.12.11

「Depressive symptoms, as a side
effect of Interferon-alpha therapy
induced by induction of indoleamine
2,3-dioxygenase 1.」Yuki Murakami,
Hyoung-Chun Kim, Toshitaka Nabeshima,
Kuniaki Saito 他 5 名. 30th The
International College of
Neuropsychopharmacology 「ソウル(韓
国)」2016.7.3

「薬剤誘発性うつ病様病態におけるトリ
プトファン代謝の役割」村上由希、齋藤
邦明. 第 55 回日本臨床化学会年次学術
集会「大阪大学コンベンションセンター
(大阪府吹田市)」2015.10.31

「個別化先制医療の実現に向けたデー
タベースの構築」村上由希、桜井雅史、齋
藤邦明. 日本健康科学学会第 30 回学術
大会「アクトシティ浜松(静岡県浜松市)」
2014.9.21

「A survey on the practitioner's
attitude toward a novel influenza
pandemic.」Masanori Tsujii, Yuki
Murakami, Yukio Imamura, Satoko Mitani.
The 12th Asia Pacific Conference on
Disaster medicine 「東京ドームホテル
(東京都文京区)」2014.9.17

[図書](計 1 件)

Yuki Murakami, Hiroyasu Ito, Kuniaki
Saito. Human press 「Tryptophan
metabolism: Implications for
biological processes, health and
disease」, 2015 「pp382(pp95-120)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 由希 (MURAKAMI, Yuki)

同志社大学・研究開発推進機構・助教

研究者番号: 50580106