

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月15日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590147

研究課題名（和文）統合失調症病態時におけるD-キヌレニンの生成ならびに代謝の変動解析

研究課題名（英文）Investigation on the production and/or metabolism of D-kynurenine in schizophrenia

研究代表者

福島 健 (FUKUSHIMA TAKESHI)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：00272485

研究成果の概要（和文）：D-キヌレニンという物質は、脳で神経伝達を弱めるキヌレン酸に変化し、この物質変化には統合失調症に関係することがわかってきた D-アミノ酸化酵素 (DAAO) というタンパク質が関与していた。統合失調症のモデル動物の脳では D-キヌレニンからキヌレン酸への物質変化が亢進しており、また、D-キヌレニンは生体内で D 型トリプトファンから生成することも分かった。そして、DAAO による D-キヌレニンからキヌレン酸の生成反応を抑制できる物質（薬）のスクリーニング法（探索・評価方法）を開発した。

研究成果の概要（英文）：D-Kynurenine (D-KYN) was metabolized to kynurenic acid (KYNA), which is an antagonist of NMDA receptor in brain, and D-amino acid oxidase (DAAO), one of the susceptible genes of schizophrenia, was found to be responsible for the production of KYNA from D-KYN. The metabolism of D-KYN to KYNA has been enhanced in the brain of animal model of schizophrenia, and the D-KYN was produced from D-tryptophan. In addition, a screening method for the inhibitor of DAAO was newly developed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：統合失調症、D-キヌレニン、キヌレン酸、D-アミノ酸化酵素、D-トリプトファン、蛍光検出

1. 研究開始当初の背景

統合失調症発症のグルタミン酸仮説では、NMDA 受容体の機能低下が原因とされている。統合失調症患者の脳組織や脳脊髄液では、L-トリプトファン代謝物であるキヌレン酸の濃度上昇が報告されている。

キヌレン酸は NMDA 受容体のアンタゴニ

スト作用を示すので、キヌレン酸濃度の異常な上昇が幻覚、幻聴、引きこもりなどの精神症状を引き起こす一因ではないかと考えられる。

一方、D-アミノ酸代謝を行う D-アミノ酸化酵素 (DAAO) をコードする遺伝子は、統合失調症の疾患感受性遺伝子の一つであり、統合失調症患者の脳内 DAAO 活性の有意な

上昇が 2008 年に報告された。従来、DAAO は脳内 D-セリン (NMDA 受容体のコ・アゴニスト) の代謝・分解に関わるとされ、D-セリン濃度の調節機構に関する研究報告は多いが、DAAO とキヌレン酸との関連性を示す報告はなかった。

しかしながら、研究代表者は、D-キヌレニン を正常ラットに投与した結果、著しい血漿中キヌレン酸の濃度上昇を認め、このキヌレン酸濃度上昇は DAAO による D-キヌレニンの代謝であることを DAAO 阻害剤を使った実験で示した。つまり、D-キヌレニンの第一アミノ基が DAAO により、酸化脱アミノ化を受け、分子内環化が非酵素的に起こりキヌレン酸を生じると考えられる。また、ラットに D-キヌレニンおよび L-キヌレニンを投与した際、D-キヌレニン投与時のほうが、明らかに異常な行動を示していた。これらの実験結果から、D-キヌレニンが統合失調症の疾患感受性遺伝子産物の一つである DAAO とキヌレン酸とを結びつける重要な物質であると推測された。

こうした研究背景から、本研究では下記(1)~(4)を研究の目的とする。

2. 研究の目的

(1) 実験動物 (ラット) 脳における D-キヌレニンからキヌレン酸の生成に関する検討

- ① ラット脳内において、D-キヌレニンからキヌレン酸が実際に生成することを示す。
- ② ラット脳内における D-キヌレニンからキヌレン酸の生成が、DAAO によるものであるか否かを検討する。

(2) ラット生体内における D-トリプトファンから D-キヌレニン、キヌレン酸の生成に関する検討

- ① D-トリプトファンから D-キヌレニン、キヌレン酸が生成するか否か。
- ② 統合失調症のモデルラット脳では、D-トリプトファンから D-キヌレニン、キヌレン酸の生成が亢進しているか否か。
- ③ D-トリプトファン投与後のラット脳内神経伝達物質 (ドパミン) の変動。

(3) in vitro 実験での、DAAO による D-キヌレニンからキヌレン酸の生成を活用する分析方法の開発

- ① DAAO による D-キヌレニンからキヌレン酸の生成を活用する DAAO 阻害物質の評価法。
- ② D-キヌレニンからキヌレン酸の生成を活用するラット脳 DAAO 活性の評価法。

(4) 統合失調症モデルラット脳での DAAO 発現変動に関する検討

- ① 統合失調症のモデルラット脳での DAAOmRNA の発現変動はあるか否か。
- ② 統合失調症のモデルラット脳での DAAO の酵素活性の変動はあるか否か。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、HPLC-蛍光検出法により生体試料中 D-キヌレニン、キヌレン酸を定量する。ラット脳における実験では、ラット脳マイクロダイアリシスにより検討する。

(2) (1)と同様に D-トリプトファン、D-キヌレニン、キヌレン酸の定量は HPLC-蛍光検出法により行う。統合失調症モデルラットは、ケタミンを連続投与して作製するケタミン処置ラットを使用する。

(3) 市販のブタ腎由来の DAAO を使用した酵素反応実験を行う。D-キヌレニンを反応基質として生成した蛍光物質キヌレン酸の蛍光を測定する。

(4) リアルタイム PCR 法により、ラット脳部位中の mRNA 発現を解析する。また、(3)の方法を用いて、ケタミン処置ラット脳の DAAO 活性を測定する。

4. 研究成果

(1) ラット脳における D-キヌレニンからキヌレン酸の生成に関する検討

① ラット脳マイクロダイアリシス (MD) を用いた実験により、D-キヌレニンをラット脳 (前頭葉皮質) に直接注入した結果、キヌレン酸の生成が、D-キヌレニン濃度依存的に認められた。

② D-アミノ酸酸化酵素 (DAAO) の阻害剤 MPC を、①の実験での D-キヌレニンとともにラット脳に注入した結果、MPC の濃度依存的にキヌレン酸の生成が抑制された。

以上の結果より、ラット脳において、D-キヌレニンからキヌレン酸への代謝生成に、統合失調症の疾患感受性遺伝子産物の一つである D-アミノ酸酸化酵素 (DAAO) の関与が示唆された。

(2) ラット生体内における D-トリプトファンから D-キヌレニン、キヌレン酸の生成に関する検討

①ラットに D-トリプトファンを腹腔内投与した結果、ラット血漿中 D-キヌレン、キヌレン酸濃度の上昇が見られた。また、ラット脳マイクロダイアリス実験により、D-トリプトファン腹腔内投与後、D-トリプトファンが脳へ移行し、脳内でキヌレン酸が生成することが分かった。この生成は、L-トリプトファン投与時とほぼ同等であった。また、D-トリプトファン投与時の方が、L-トリプトファン投与時と比べて、キヌレン酸生成がより長時間持続する傾向が見られた (図 1)。

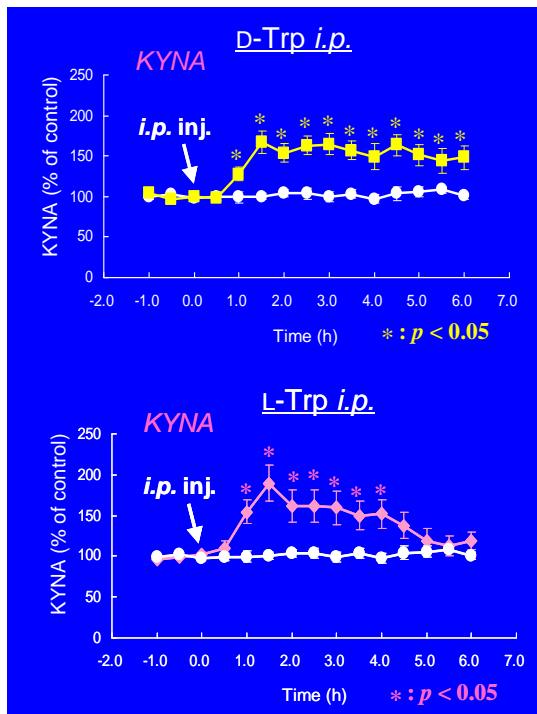


図 1 D-トリプトファン (上) および L-トリプトファン (下) 腹腔内投与時のラット脳内キヌレン酸 (KYNA) の生成推移

② ラット脳マイクロダイアリスにより、ケタミン処置ラットでは、D-トリプトファン投与後の脳内キヌレン酸の生成が、コントロールラットに比べて多くなっていた (未発表データ)。これにより、統合失調症の病態時では、D-トリプトファンから D-キヌレンを経て、NMDA 受容体のアンタゴニスト作用を示すキヌレン酸を生成し易くなっていると思われる。

③ ラット脳マイクロダイアリスにより、D-トリプトファンあるいはL-トリプトファン投与後のラット脳内ドパミン変動を調べた結果、D-トリプトファン投与時にのみ、ドパミンの一過性上昇が観察された (図 2)。D-トリプトファンによるドパミン放出は、報告例が無く、新規性が高いデータである。

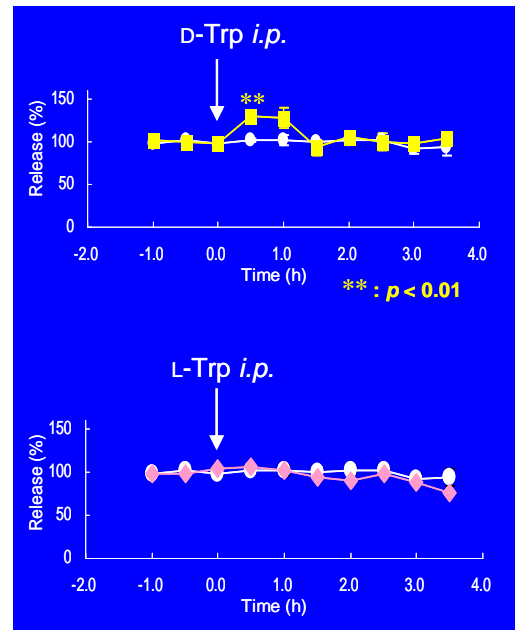


図 2 D-トリプトファン (上) および L-トリプトファン (下) 腹腔内投与時の脳内ドパミン放出

(3) *in vitro* 実験での、DAAO による D-キヌレンからキヌレン酸の生成を活用する分析方法の開発

① 市販のブタ腎 DAAO を酵素として用い、D-キヌレンを基質とした *in vitro* 実験により、現在使用されている統合失調症治療薬の DAAO 活性阻害の評価を行うことができた (図 3)。この方法は、DAAO 活性の阻害物質をスクリーニングする方法としての活用が可能である。

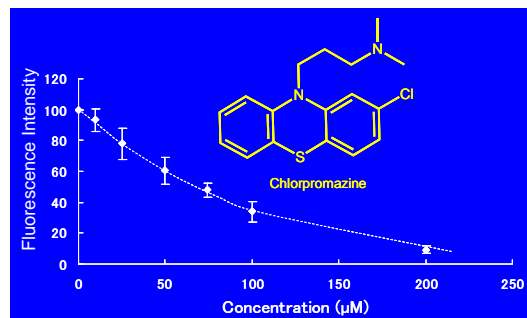


図 3 統合失調症治療薬 (クロルプロマジン) の濃度-DAAO 活性阻害曲線

② ①の方法を応用し、ラット脳組織中の DAAO 活性の測定法を開発した。この方法により、ラット小脳で最も DAAO 活性が高く、大脳では DAAO 活性が低いことが分かった。この結果は、従来法での結果と一致するものであり、本法の信頼性が確認された。

(4) 統合失調症モデルラット脳での DAAO 発現変動に関する検討

① リアルタイム PCR の常法に従い、ラット脳 DAAO mRNA 発現を調べた結果、上記の(3)②の結果と同様に、DAAO mRNA の発現は、小脳で最も高く、大脳では低かった。この実験の検討過程で、文献で報告されている DAAOmRNA のリアルタイム PCR 法は、精度が低いことが分かったので、使用する試薬、反応条件、組織の採取量を検討し、精度が高い方法を開発した(投稿中)。この方法で、現在、ケタミン処置ラット脳における DAAO mRNA 発現変動を検討している。

② 上記(3)②の方法で、ケタミン処置ラット脳各部位の DAAO 酵素活性を検討した結果、コントロールラットに比べて、有意差が示されなかった。今後、更なる検討が必要である。

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 25 件)

① Iizuka H, Watanabe S, Koshikawa M, Matsumoto Y, Aoyama Y, Ichiba H, Nabeshima T, Fukushima T: Decreased L-tryptophan concentration in distinctive brain regions of mice treated repeatedly with phencyclidine Anal Bioanal Chem. 査読有, in press. DOI: 10.1007/s00216-013-7010-2

② Ohashi H, Iizuka H, Yoshihara S, Otani H, Kume M, Sadamoto K, Ichiba H, Fukushima T: Determination of L-tryptophan and L-kynurenine in human serum by using LC-MS after derivatization with (R)-DBD-PyNCS. Int J Trp Res. 査読有, in press.

③ Owada Y, Takahashi M, Iwasa S, Ichiba H, Sadamoto K, Fukushima T: Enantiomeric separation of tolperisone and eperisone by reversed-phase HPLC with cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)-coated chiral column. Biomed Chromatogr. 査読有, in press. DOI: 10.1002/bmc.2892

④ Kozaki A, Iwasa S, Hosoda S, Nishiguchi Y, Nakayama M, Ichiba H, Fukushima T: Fluorimetric assay for D-amino acid oxidase activity in rat brain homogenate by using D-kynurenine as a substrate. Biosci Trends 査読有, 6(5): 241-247, 2012. DOI: 10.5582/bst.2012.v6.5.241

⑤ Yoshihara S, Otani H, Tsunoda M, Ishii K, Iizuka H, Ichiba H, Fukushima T: Alterations in extracellular tryptophan and dopamine concentrations in rat striatum following peripheral administration of D- and L-tryptophan: An in vivo microdialysis study. Neurosci Lett 査読有, 526: 74-78, 2012. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.07.046

⑥ Ichiba H, Hanami K, Yagasaki K, Tanaka M, Ito H, Fukushima T: A novel flow-injection analysis system for evaluation of antioxidants by using sodium dichloroisocyanurate as a source of hypochlorite anion. Drug Discoveries Ther. 査読有, 6(1): 44-48, 2012. DOI: 10.5582/ddt.2012.v6.1.44

⑦ Song Z, Ge D, Ishii K, Yamada H, Toriumi K, Watanabe H, Nabeshima T, Fukushima T: Determination of N-acetylaspartic acid concentration in the mouse brain using HPLC with fluorescence detection. Biomed Chromatogr 査読有, 26: 147-151, 2012. DOI: 10.1002/bmc.1639

⑧ Haruta N, Iizuka H, Ishii K, Yoshihara S, Ichiba H, Fukushima T: Alteration in the plasma concentration of a DAAO inhibitor, 3-methylpyrazole-5-carboxylic acid, in the ketamine-treated rats and the influence on the pharmacokinetics of plasma D-tryptophan. Proc Jpn Acad Ser B. 査読有, 87: 641-648, 2011. DOI: 10.2183/pjab.87.641

⑨ Iwasa S, Tabara H, Song Z, Nakabayashi M, Yokoyama Y, Fukushima T: Inhibition of D-amino acid oxidase activity by antipsychotic drugs evaluated by a fluorometric assay using D-kynurenine as substrate. Yakugaku Zasshi 査読有, 131: 1111-1116, 2011. https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/131/7/131_7_1111/_pdf

⑩ Iizuka H, Ishii K, Hirasa Y, Kubo K, Fukushima T: Fluorescence determination of D- and L-tryptophan concentrations in rat plasma following administration of tryptophan enantiomers using HPLC with pre-column derivatization. J Chromatogr B 査読有, 879: 3208-3213, 2011. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.02.014

⑪ Ishii K, Iizuka H, Ogaya T, Song Z, Fukushima T: Comparative study on kynurenic acid production in the rat striatum by tryptophan enantiomers: an in vivo microdialysis study.

Chirality 査読有, 23: E12–E15, 2011.
DOI: 10.1002/chir.20938

⑫ Iizuka H, Hirasa Y, Kubo K, Ishii K, Toyo'oka T, Fukushima T: Enantiomeric separation of D, L-tryptophan and D, L-kynurenine by HPLC using pre-column fluorescence derivatization with *R*(-)-DBD-PyNCS. Biomed Chromatogr. 査読有, 25: 743-747, 2011.
DOI: 10.1002/bmc.1525

⑬ Song Z, Ogaya T, Ishii K, Ichiba H, Iizuka H, Fukushima T: Utilization of kynurenic acid produced from D-kynurenine in an in vitro assay of D-amino acid oxidase activity. J Health Sci. 査読有, 56: 341-346, 2010.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/56/3/56_3_341/_pdf

⑭ Ishii K, Ogaya T, Song Z, Iizuka H, Fukushima T: Changes in the plasma concentrations of D-kynurenine and kynurenic acid in rats after intraperitoneal administration of tryptophan enantiomers. Chirality 査読有, 22: 901-906, 2010.
DOI: 10.1002/chir.20850

⑮ Ogaya T, Song Z, Ishii K, Fukushima T: Changes in extracellular kynurenic acid concentrations in rat prefrontal cortex after D-kynurenine infusion: An in vivo microdialysis study. Neurochem Res. 査読有, 35: 559-563, 2010.
DOI: 10.1007/s11064-009-0099-1

[学会発表] (計 32 件)

① 桑 美里, ケタミン連続投与ラット血漿中トリプトファン及びその代謝物濃度の変動解析, 日本薬学会第 133 年会, 2013. 03. 28 横浜.

② Takeshi Fukushima, Determination of tryptophan and kynurenic acid concentrations in rats after intraperitoneal administration of tryptophan enantiomers. 13th International Society for Tryptophan Research (ISTRY 2012), 2012. 11. 09, Sydney (Australia).

③ Misato Kume, Increased kynurenic acid concentration in rat plasma by repeated ketamine administration. 13th International Society for Tryptophan Research (ISTRY 2012), 2012. 11. 09, Sydney (Australia).

④ Hideaki Iizuka, Fluorimetric determination of L-tryptophan in serum or brain homogenate of

Sprague-Dawley rats by HPLC using precolumn fluorescence derivatization with *R*(-)-DBD-PyNCS. 13th International Society for Tryptophan Research (ISTRY 2012), 2012. 11. 08, Sydney (Australia).

⑤ 神前杏奈, ラット脳ホモジネート中 D-アミノ酸化酵素活性の蛍光アッセイ法の開発 第 56 回 日本薬学会関東支部大会, 2012. 10. 13, 東京.

⑥ 大谷隼斗, ラット線条体マイクロダイアリシスによる D-および L-トリプトファン投与時における脳内トリプトファン およびドパミン濃度の変動解析 第 56 回 日本薬学会関東支部大会, 2012. 10. 13, 東京.

⑦ 田原翔志, 市販中枢作用薬の D-アミノ酸化酵素活性阻害効果の検討 第 25 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2012) 2012. 08. 09, 東京.

⑧ 渡邊祥子, (*R*)-(-)-DBD-PyNCS を用いるプレカラム蛍光誘導体化法によるマウス脳内トリプトファンの HPLC-蛍光定量, 第 33 回 日本トリプトファン研究会学術集会, 2011. 12. 04, 船橋.

⑨ Takeshi Fukushima, Determination of neuroactive compounds by HPLC with fluorescence detection in pre-clinical and clinical researches (Keynote Lecture IV). The 7th Joint Seminar on Biomedical Sciences, 2011. 10. 13, 14 Hat Yai (Thailand).

⑩ 岩佐澄子, Fluorescent assay for D-amino acid oxidase Inhibitor utilizing the production of kynurenic acid 第 55 回 日本薬学会関東支部大会, 2011. 10. 08, 千葉.

⑪ 飯塚英昭, *R*(-)-DBD-PyNCS を用いるプレカラム蛍光誘導体化によるトリプトファン光学異性体腹腔内投与におけるラット血漿中の D-および L-トリプトファンの HPLC による蛍光定量 第 55 回 日本薬学会関東支部大会, 2011. 10. 08, 千葉.

⑫ 岩佐澄子, キヌレン酸生成を活用する D-アミノ酸化酵素阻害物質の新規蛍光アッセイ法, 第 7 回 D-アミノ酸研究会, 2011. 09. 09, 東京.

⑬ 石井香那, ラット脳マイクロダイアリシスによる Trp 光学異性体腹腔内投与時のキヌレン酸変動解析 日本薬学会第 131 年会, 2011. 03. 30, 静岡.

⑭ 福島 健, HPLC を用いる脳および血漿中トリプトファン代謝物の蛍光定量, 第 11 回 関東支部談話会, 2011. 03. 18, 東京.

⑮ 福島 健, D-アミノ酸酸化酵素による D-キヌレニンからキヌレン酸への代謝生成とその応用, 第 32 回 日本トリプトファン研究会, 2010. 12. 05, 彦根.

⑯ 石井香那, Trp 光学異性体投与によるラット血漿及び脳内キヌレン酸の変動解析 第 32 回 日本トリプトファン研究会, 2010. 12. 05, 彦根.

⑰ 福島 健, HPLC-蛍光検出による生体分子の定量とその応用研究 ~D-serine や NAA の定量法の話を中心に, 名城大学学術フロンティア推進事業特別講演会, 2010. 12. 03, 名古屋.

⑱ Takeshi Fukushima, Comparative study on the kynurenic acid production in rat between tryptophan enantiomers. 22nd International Symposium on Chirality (ISCD 2010), 2010. 7. 14, Sapporo.

⑲ 福島 健, HPLC による生体分子の蛍光定量法とその応用 (教育講演), 第 14 回 神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム, 2010. 6. 4, 静岡.

⑳ 石井香那, ラット脳マイクロダイアリシスによる Trp 光学異性体投与時の Trp 及びその代謝物の変動解析, 第 14 回 神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム, 2010. 6. 4, 静岡.

[その他]

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/phar/Analchem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 健 (FUKUSHIMA TAKESHI)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号: 00272485

(2) 研究分担者

西口 慶一 (NISHIGUCHI YOSHIKAZU)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号: 60459823

(3) 連携研究者

該当なし