

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670117

研究課題名(和文)ヒスタミンの分解と再取込み系に関する新規作成KOマウスによる機能研究

研究課題名(英文)Molecular mechanism of brain histamine clearance

研究代表者

谷内 一彦 (Yanai, Kazuhiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50192787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスタミンは脳内で神経伝達物質として機能しており、睡眠やストレス応答などにおいて重要な役割を担っている。我々は神経細胞から放出されたヒスタミンがどのように除去されるかというヒスタミンクリアランス機構について研究を行った。その結果、ヒスタミンを不活化するhistamine N-methyltransferase分子がヒスタミンクリアランスに重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Histamine plays an important role in brain functions such as sleep-wake cycle and stress response. We investigated the molecular mechanism of histamine clearance. We demonstrated that histamine N-methyltransferase, which inactivates histamine, was one of the essential factors for histamine clearance.

研究分野：ヒスタミン研究

キーワード：ヒスタミン

1. 研究開始当初の背景

ヒスタミンは、必須アミノ酸である L-ヒスチジンからヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase, HDC) によって合成される (図 1)。主な産生細胞は、視床下部結節乳頭核に細胞体を持つヒスタミン神経、胃 ECL 細胞、マスト細胞、好塩基球などで、4 種類の GPCR 受容体により機能が発揮される。H1 受容体の機能研究は最近 H1 受容体の X 線解析 (Nature 2011) が報告されたように多くの研究がなされている。またノックアウト (KO) マウスも我々の研究を中心に H1~H4 受容体、HDC で作成されて多くの研究が発表されているが、ヒスタミンの除去に関わる因子の研究が十分に進んでいなかった。

2. 研究の目的

分解系のヒスタミン N-メチルトランスフェラーゼ (HNMT) 遺伝子 KO マウス作成に関してまだ報告されていない。脳におけるヒスタミン分解系である HNMT の機能を KO マウスを用いて明らかにすることは学術的に重要であり、また HNMT 阻害薬などの新しいヒスタミン系の創薬に発展できる可能性がある。脳における神経伝達物質ヒスタミンの増加は、アルツハイマー病になりにくい、抗ストレス・抗疲労作用がある、ミクログリアの機能を健全に保ち神経保護作用がある、認知機能を高める、抗肥満作用があるなど改善効果が期待される。

ヒスタミンには特異的トランスポーターは存在しないために、マスト細胞における取り込みに非特異的トランスポーター OCT3 が関係していると考えられていたが、我々は最近、グリアに発現している非特異的トランスポーター PMAT (plasma membrane monoamine transporter) がヒスタミンの取込に重要な分子であることを明らかにしている (Yoshikawa T, Yanai K, et al. Glia 2013, 61, 905-916)。

脳に主に発現するヒスタミンを分解する酵素 HNMT とヒスタミン再取り込み系として働くことを我々が明らかにしたトランスポーター PMAT の遺伝子ノックアウトマウス (KO) を作成して、“善玉”としての新しいヒスタミン機能を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒスタミン分解と再取り込み系に関する新規ノックアウトマウスを作成して新しい機能研究を行う。具体的に以下の項目を研究する。

- (1)ヒスタミン分解系 HNMT-KO マウス作成による新しい機能解析と HNMT 阻害薬の創薬研究
- (2)非特異的トランスポーター PMAT の conditional KO マウスを作成し、PMAT, によるヒスタミンやモノアミン輸送メカニズムを解明する。

4. 研究成果

- (1)ヒスタミン分解系 HNMT-KO マウス作成による新しい機能解析と HNMT 阻害薬の創薬研究

まず HNMT KO マウスを作製し、各臓器において HNMT が発現していないことを RT-PCR およびウェスタンブロット法を用いて確認した。次に、HNMT KO マウスの組織ホモジネートを用いて HNMT 活性が消失していることも併せて確認を行った。

次に、脳の各部位よりホモジネートを作製し、ヒスタミン濃度を測定したところ、HNMT KO の脳組織で野生型マウスの 5 倍程度に増加しており、HNMT がヒスタミン代謝に必須の酵素であることが明らかとなった (図 1)。

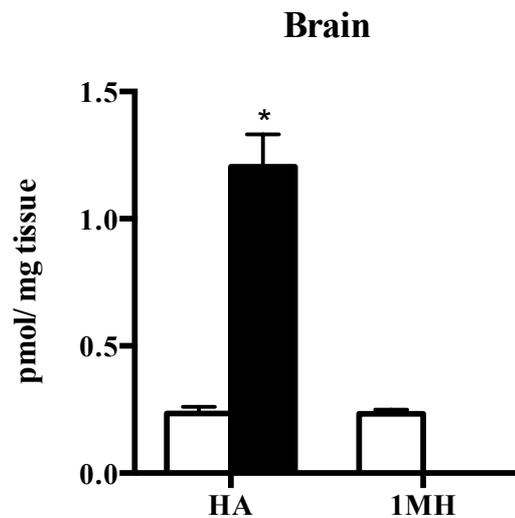


図 1、脳組織におけるヒスタミン及びヒスタミン代謝産物の量。HA:ヒスタミン、1MH:1-メチルヒスタミン (ヒスタミン代謝産物)。white bar: 野生型マウス、black bar: HNMT KO マウス

また細胞外ヒスタミン濃度を測定するために、マイクロダイアリス法を用いてヒスタミン濃度を測定したところ、こちらの方法でもヒスタミンが 4 倍以上に増加していることが明らかとなった。

次に行動薬理学的手法を用いて、HNMT KO マウスと野生型マウスを比較検討したところ、HNMT KO マウスの暗期における活動量が有意に低下していることが明らかとなった (図 2)。これは睡眠覚醒サイクルの異常により生じている可能性が考えられたため、今後脳波測定を行い更に検討を加えていく予定である。また HNMT KO マウスではホームケージで飼育している間に、fighting が多く見られ、攻撃性が上昇している可能性も考えられた。こちらに関しても resident intruder test などを追加で行い、更に検討を加える予定である。

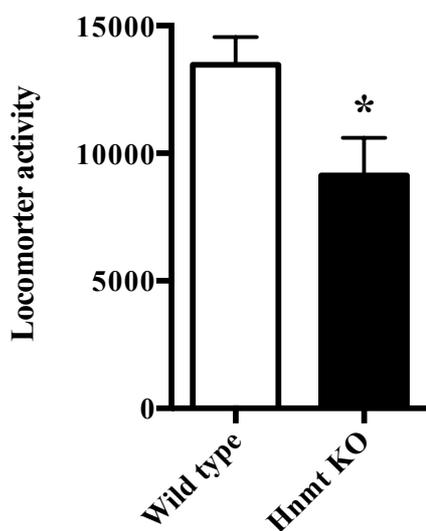


図2：活動期におけるマウスの行動量比較

なお HNMT 阻害剤については大腸菌にてヒト HNMT を作製し、これが酵素活性を有していることを確認している。従来の HPLC を用いたアッセイ法ではハイスループット性が乏しいため、現在蛍光を用いた酵素活性測定法を開発中である。

(2) 非特異的トランスポーター PMAT の conditional KO マウスを作成し、PMAT によるヒスタミンやモノアミン輸送メカニズムを解明する。

こちらについては引き続き conditional KO マウスの作製を行っている段階である。本年中には完成の予定となっている。

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 11 件)

英文原著 (全て査読あり)

- 1) Iida T, Yoshikawa T, Matsuzawa T, Naganuma F, Nakamura T, Miura Y, Mohsen AS, Harada R, Iwata R, Yanai K. Histamine H3 receptor in primary mouse microglia inhibits chemotaxis, phagocytosis, and cytokine secretion. *Glia* 63: 1213-1225, 2015
- 2) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M, Miyake M, Ishikawa Y, Matsuda R, Inami A, Yoshikawa T, Tago T, Funaki Y, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. [(18)F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 42: 1052-61, 2015
- 3) Murakami M, Yoshikawa T, Nakamura T, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D, Kuwasako K, Yanagisawa T, Ono K, Nakaji S,

Yanai K. Involvement of the histamine H1 receptor in the regulation of sympathetic nerve activity. *Biochem Biophys Res Commun* 458: 584-589, 2015

- 4) Suzuki H, Sumiyoshi A, Matsumoto Y, Duffy BA, Yoshikawa T, Lythgoe MF, Yanai K, Taki Y, Kawashima R, Shimokawa H. Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats. *Neuroimage* 105: 84-92, 2015
- 5) Kasajima A, Fujishima F, Morikawa T, Kawasaki S, Konosu-Fukaya S, Shibahara Y, Nakamura T, Yoshikawa T, Iijima K, Koike T, Watanabe M, Shibata C, Sasano H. G-cell hyperplasia of the stomach induces ECL-cell proliferation in the pyloric glands in a paracrine manner. *Pathol Int* 65: 259-263, 2015
- 6) Okamura N, Harada R, Furumoto S, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Tau PET imaging in Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14:500, 2014
- 7) Okamura N, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejaska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, Rowe CC, Villemagne VL. Non-invasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK5105 PET. *Brain* 137: 1762-1771, 2014
- 8) Yoshikawa T, Nakamura T, Shibakusa T, Sugita M, Naganuma F, Iida T, Miura Y, Mohsen A, Harada R, Yanai K. Insufficient intake of L-histidine reduces brain histamine and causes anxiety-like behaviors in male mice. *J Nutr* 144: 1637-1641, 2014
- 9) Nakamura T, Yoshikawa T, Naganuma F, Mohsen A, Iida T, Miura Y, Sugawara A, Yanai K. Role of histamine H3 receptor in glucagon-secreting α TC1.6 cells. *FEBS Open Bio* 5: 36-41, 2014
- 10) Naganuma F, Yoshikawa T, Nakamura T, Iida T, Harada R, Mohsen A, Yamato M, Yanai K. Predominant role of plasma membrane monoamine transporters in monoamine transport in 1321N1, a human astrocytoma-derived cell line. *J Neurochem* 129: 591-601, 2014
- 11) Mohsen A, Yoshikawa T, Miura Y, Nakamura T, Naganuma F, Shibuya K, Iida T, Harada R, Okamura N, Watanabe T, Yanai K. Mechanism of the Histamine H3 Receptor-mediated Increase in Exploratory Locomotor Activity and Anxiety-like Behaviours in Mice. *Neuropharmacology* 81: 188-194, 2014

[学会発表] (計 13 件) (全て査読あり)

- 1) 中村正帆、吉川雄朗、長沼史登、飯田智光、三浦大和、谷内一彦、イソフルラン麻酔における神経ヒスタミンとヒスタミン H1 受容体の役割、第 88 回日本薬理学会、2015 年 03 月 18 日~2015 年 03 月 20 日、名古屋

国際会議場(愛知県名古屋市)

2) 三浦大和、**吉川雄朗**、中村正帆、長沼史登、飯田智光、**谷内一彦**、骨格筋特異的 Ext1 欠損マウスの解析、第 88 回日本薬理学会、2015 年 03 月 18 日~2015 年 03 月 20 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

3) **谷内一彦**、岡村信行、原田龍一、古本祥三、多胡哲郎、古川勝敏、岩田鍊、田代学、荒井啓行、工藤幸司、タウ PET プローブ [18F]THK- 5351 の開発と臨床評価、第 88 回日本薬理学会、2015 年 03 月 18 日~2015 年 03 月 20 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

4) 長沼史登、**吉川雄朗**、三浦大和、柳生彩乃、中村正帆、**谷内一彦**、Histamine N-methyltransferase ノックアウトマウスの解析、第 88 回日本薬理学会、2015 年 03 月 18 日~2015 年 03 月 20 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

5) 長沼史登、**吉川雄朗**、中村正帆、三浦大和、堀米愛、**谷内一彦**、Histamine N-methyltransferase ノックアウトマウスの行動解析、第 24 回神経行動薬理若手研究者の集い、2015 年 03 月 17 日~2015 年 03 月 17 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

6) **吉川雄朗**、中村正帆、長沼史登、三浦大和、**谷内一彦**、脳内ヒスタミン研究におけるマイクロダイアリシスの使用について、第 25 回マイクロダイアリシス研究会(招待講演)、2014 年 12 月 20 日~2014 年 12 月 20 日、お茶の水女子大学(東京都文京区)

7) 三浦大和、**吉川雄朗**、長沼史登、中村正帆、**谷内一彦**、マウスにおける低親和性トランスポーターの輸送能解析、第 18 回日本ヒスタミン学会、2014 年 10 月 10 日~2014 年 10 月 11 日、ホテルニューアルカイク(兵庫県尼崎市)

8) 長沼史登、**吉川雄朗**、三浦大和、中村正帆、**谷内一彦**、Histamine N-methyltransferase ノックアウトマウスの解析、第 18 回日本ヒスタミン学会、2014 年 10 月 10 日~2014 年 10 月 11 日、ホテルニューアルカイク(兵庫県尼崎市)

9) **吉川雄朗**、中村正帆、柴草哲朗、杉田麻友、長沼史登、飯田智光、三浦大和、モフセンアタイエブ、原田龍一、**谷内一彦**、低ヒスチジン食によりマウス脳内ヒスタミン含量が減少し、不安様行動が惹起される、第 18 回日本ヒスタミン学会、2014 年 10 月 10 日~2014 年 10 月 11 日、ホテルニューアルカイク(兵庫県尼崎市)

10) **吉川雄朗**、原田龍一、古本祥三、渋谷勝彦、岩田鍊、**谷内一彦**、無細胞蛋白質合成法を用いた PET イメージングプローブ作製、第 65 回日本薬理学会北部会、2014 年 09 月 26 日~2014 年 09 月 27 日、コラッセ福島(福島県福島市)

11) **吉川雄朗**、長沼史登、三浦大和、柳生彩乃、**谷内一彦**、ヒスタミン代謝酵素欠損マウスの解析、第 65 回日本薬理学会北部会、2014

年 09 月 26 日~2014 年 09 月 27 日、コラッセ福島(福島県福島市)

12) Tadaho Nakamura, **Takeo Yoshikawa**, **Kazuhiko Yanai**, Expression and Function of Histamine H3 receptor in Pancreatic Islets. 17th world congress of basic & clinical pharmacology. 2014 年 07 月 13 日~2014 年 07 月 18 日. ケープタウン(南アフリカ)

13) Fumito Naganuma, **Takeo Yoshikawa**, Tadaho Nakamura, Tomomitsu Iida, Yamato Miura, **Kazuhiko Yanai**. The mechanism of monoamine transport by human astrocytes. 17th world congress of basic & clinical pharmacology. 2014 年 07 月 13 日~2014 年 07 月 18 日. ケープタウン(南アフリカ)

[図書]

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内 一彦 (YANAI, KAZUHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50192787

(2) 研究分担者

渡邊 建彦 (Watanabe Takehiko)
東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授
研究者番号：70028356

吉川 雄朗 (Yoshikawa, Takeo)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70506633