

平成30年6月7日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20429

研究課題名(和文)セピアプテリンの脳内モノアミンレベル上昇効果の作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of increase in brain-aromatic monoamines after peripheral administration of sepiapterin

研究代表者

大橋 晶子(OHASHI, Akiko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00571019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳内のセロトニン(5HT)生合成は、律速酵素トリプトファン水酸化酵素の補酵素テトラヒドロbiopterin(BH4)量により調節される。ドーパミン(DA)も同様である。BH4の前駆体であるセピアプテリン(SP)をマウスに末梢投与したところ、脳内BH4、5HT、DAとその代謝産物は経時的かつ容量依存的に増加した。5HT合成能を持つ培養細胞にSPを与えると、5HT合成が促進されたが、同等の効果をBH4で再現するにはSPの数十倍の濃度が必要であった。また血液脳関門モデルにおいて、SPは実用的な透過を示した。これは、投与されたSPのすべてが末梢でBH4に転換せず、一部がSPのまま脳内に到達したことを示した。

研究成果の概要(英文)：Serotonin(5HT) biosynthesis in the brain is controlled by tetrahydrobiopterin(BH4) level. Peripheral dosing of sepiapterin(SP) as a prodrug of BH4 to mice showed significant rise in BH4, 5HT, DA and their metabolites in the brain time- and dose-dependently. 5HT synthesis in a culture cell was promoted by added SP in the medium, while more than 20-fold higher concentration of BH4 was required for the same enhancement. SP showed adequate permeation across in vitro BBB model. These results suggested that not-all SP converted to BH4 in the periphery but partly reached the brain as SP.

研究分野：薬理学

キーワード：セロトニン ドーパミン モノアミン合成促進 テトラヒドロbiopterin補充

1. 研究開始当初の背景

「うつ」は持続的、あるいは反復する心的ストレスによって、脳セロトニン(5HT)神経の失調に陥った精神機能不全とされており、うつ患者の死後脳では5HTレベルが著しく低下している。5HT合成の遺伝的欠損患者に対しては、5HT前駆体が投与されるが、種々の副作用を示すことから厳重な管理が必要である。このため、前駆体の投与はうつ病などには適用されない。一方、5HT神経細胞において、5HT合成の律速酵素(トリプトファン水酸化酵素)の活性が補酵素テトラヒドロピオプテリン(BH4)量によって調節されることが知られているが、BH4は血液脳関門を通過しないため、末梢投与では有効に脳内の5HT合成を促進できない。

現在処方される抗うつ薬の70%程度がSSRI(選択的セロトニン再取り込み阻害薬)であるが、その遅行性(4~6週間)、明瞭な副作用(不安・希死念慮、離脱症状)、低い寛解率(50~60%、プラセボより10~15%高)が問題となっている。これらは、5HTの再利用を長期間抑制することによる、脳5HT量の枯渇の結果と考えられる。

申請者らは、BH4のサルベージ経路前駆体であるセピアプテリン(SP)をプロドラッグとして用いることで脳内5HT量を増加させることに成功した。しかし、その根拠となる「作用機序」は未解明のままである。

2. 研究の目的

SPが抗うつ薬として採用されるためには薬理機構の明瞭化が必須である。これまでの*in vitro*実験系で得られた知見から、末梢投与されたSPは脳5HT神経細胞に取り込まれ、細胞内のBH4サルベージ経路によってBH4に変換、蓄積されることで5HT合成活性を促進することで脳内5HTレベルを上昇させたと考えられた。本研究では、SPの末梢投与時における5HTの合成促進の機構について主にマウス*in vivo*において検証する事を目的とした。すなわち、(1)SPの薬理作用を脳内SP、BH4、5HT量の定量によって生化学的に解析し、(2)SP投与後の脳内5HT生合成活性の測定、(3)SPの血液脳関門透過性の検討、(4)神経細胞モデルにおけるSP取込とBH4蓄積を観察した。また、BH4はドーパミン(DA)合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)の補酵素でもあることから、DA系についても同様の検討を行った。

3. 研究の方法

(1)SPの薬理作用を脳内BH4、5HT、DA量の定量によって生化学的に解析する
マウスへのSP投与後、脳内ではSPの細胞内への取込とBH4への変換・蓄積の後、TPH酵素活性の促進によって、5HT量の増加が起これらと考えられる。これらの化合物を経時的に定量することで、SPの薬理学的作用を明らかにする。BH4、5HTと5HT関連化合物は、HPLC/

蛍光検出、DAとDA関連化合物はHPLC/ECD検出器を用いて定量する。

(2)SP投与後の脳内5HT生合成活性の測定
脳における5HT合成活性(律速酵素;トリプトファン水酸化酵素活性)を測定することで、SP投与による5HT神経細胞内のBH4増加を確認する。5HT合成活性は、脱炭酸酵素を特異的に阻害(NSD-1015)し、脳内に蓄積した5HT代謝中間体の増加速度によって評価した。DA合成活性においても同様にチロシン水酸化酵素活性を測定することで評価した。

(3)SPの血液脳関門透過性の検討
(血液脳関門*in vitro*再構成モデルをもちいてSPとBH4の血液脳関門透過性を検討した。

(4)モノアミン産生細胞におけるSP取込とBH4蓄積

カテコールアミン合成能を保持し、神経細胞様に分化するラット副腎髄質クロム親和性細胞腫由来のPC12細胞を用いた。PC12細胞にSPを与え、細胞内に蓄積したBH4とDA合成活性を測定した。

4. 研究成果

(1)脳内BH4、5HT、DA量の定量によるSPの薬理作用の解析

SPはBH4のプロドラッグとしている。SP投与後、SPの代謝物であるBH4が、このとき、BH4そのものの投与では、脳内BH4の増大の後に、5HT量の低下が観察された。同じドーズのSP投与では、BH4投与の2倍程度も大量のBH4が脳内に流入し、同時に、5HT、DAのレベル上昇が観察された。SP投与ではBH4投与と同様なモノアミンレベル低下効果と、増加効果が重なって、後者が前者を上回ったと考えられる。BH4のモノアミンレベル低下効果は慎重な検討が必要であるが、SPによる増加効果が確認できた。

(2)SP投与後の脳内5HT、およびDA生合成活性の測定

脳内5HT生合成活性を、Carlsson(1972)らに従って、NSD-1015投与による芳香族アミノ酸脱炭酸酵素の阻害による5-ヒドロキシトリプトファン(5HTP)、DOPAの増加から測定しようとした。しかし、本実験の場合には、BH4の脳内流入によって脳内Trpのレベルが著しく変動し、なおかつNSD-1015そのものによる無視できない程度のTrpレベル変動もあったため、結論を出すに至らなかった。これは、40年以上も行われている方法である。我々の実施方法とCarlsson原法のどちらに問題があるのか更に慎重な検討が必要である。

(3)SPの血液脳関門透過性の検討

SPは濃度、および時間依存的に血液脳関門モデルを透過した。この透過性は5HTPと同程度であった。5HTPは脳内5HT補充に用い

られているもので、末梢と脳内を隔てる血液脳関門のへ実用的な通過性を持つものである。

(4) モノアミン産生細胞における SP 取込と BH4 蓄積

SP の輸送は濃度依存的、双方向性であった。SP を与えた場合には、テトラヒドロ型である BH4 の約 10 倍程度効率よく細胞内に BH4 を蓄積した。この輸送特性は核酸輸送体(ENT)と類似するものであった。これらの結果は、末梢投与した SP が血液脳関門を透過し、神経細胞内に取り込まれ、サルベージ経路によって BH4 に変換、蓄積することでモノアミン合成を促進することを強く示唆した。

(1)~(4)の諸結果と SP への細胞への取込と速やかな BH4 への転化の様式(Ohashi et al. 2011), 更に BH4 の細胞膜通過の困難さ(Sawabe et al.2008)から本実験の結果は以下の 3 点にまとめられる:

投与された SP のすべてが末梢で BH4 に転換せず、一部が SP のまま脳内に到達したことを示した、その少量の SP が脳内に到達し、脳内のモノアミン産生神経細胞に取り込まれた、その SP は神経細胞内の BH4 レベルを引き上げてモノアミン合成が促進された。

<引用文献>

Carlsson A, Davis J. N, Kehr W, Lindqvist M, Atack C.V., Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase Carlsson., 1972, 275(2), 153-168.

Ohashi A, Sugawara Y, Mamada M, Harada Y, Sumi T, Anzai N, Aizawa S, Hasegawa H., Membrane transport of sepiapterin and dihydrobiopterin by equilibrative nucleoside transporters: a plausible gateway for the salvage pathway of tetrahydrobiopterin biosynthesis., 2011, 102, 18-28.

Sawabe K, Yamamoto K, Harada Y, Ohashi A, Sugawara Y, Matsuoka H, Hasegawa H., Cellular uptake of sepiapterin and push-pull accumulation of tetrahydrobiopterin., 2008, 94(4), 410-416

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 4 件)

1. Ohashi A, Mamada K, Harada T, Naito M, Takahashi T, Aizawa S, Hasegawa H., Organic anion transporters, OAT1 and

OAT3, are crucial biopterin transporters involved in bodily distribution of tetrahydrobiopterin and exclusion of its excess., Mol Cell Biochem., 査読有り, 2017, 435, 97-108. doi: 10.1007/s11010-017-3060-7.

2. Oguri Y, Fujita Y, Abudukadier A, Ohashi A, Goto T, Furuya F, Obara A, Fukushima T, Matsuo N, Kim M, Hosokawa M, Kawada T, Hasegawa H, Inagaki N., Tetrahydrobiopterin activates brown adipose tissue and regulates systemic energy metabolism., 査読有り, 2017, 2, 91981. doi: 10.1172/jci.insight.91981.

3. Tsukune N, Naito M, Kubota T, Ozawa Y, Nagao M, Ohashi A, Sato S, Takahashi T., Lamin A overexpression promotes osteoblast differentiation and calcification in the MC3T3-E1 preosteoblastic cell line., 査読有り, 2017, 488, 664-670. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.110. Epub 2017 Feb 22.

4. Ohashi A, Saeki Y, Harada T, Naito M, Takahashi T, Aizawa S, Hasegawa H., Tetrahydrobiopterin Supplementation: Elevation of Tissue Biopterin Levels Accompanied by a Relative Increase in Dihydrobiopterin in the Blood and the Role of Probenecid-Sensitive Uptake in Scavenging Dihydrobiopterin in the Liver and Kidney of Rats., 査読有り, 2016, 11, e0164305. doi: 10.1371/journal.pone.0164305. eCollection 2016.

[学会発表](計 16 件)

1. 大橋晶子, 内藤昌子, 高橋富久, 原田智紀, 長谷川宏幸, 有機陰イオン輸送体は BH4 の尿中排出に関わる, 第 31 回日本ブテリジン研究会, 2017

2. 大橋晶子, 内藤昌子, 高橋富久, テトラヒドロビオプテリン(BH4)の尿中排出への有機陰イオン輸送体 OAT1 と OAT3, の関与, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017

3. 大橋晶子, 原田智紀, 内藤昌子, 高橋富久, 相澤信, 長谷川宏幸, セピアプテリンの末梢投与による脳内トリプトファンレベルの変動, 日本ビタミン学会第 69 回大会, 2017

4. Yasuo Oguri, Yoshihito Fujita, Abulizi Abudukadier, Akiko Ohashi, Tsuyoshi Goto, Futoshi Furuya, Akio Obara, Toru Fukushima, Naomi Matsuo, Minji Kim, Masaya Hosokawa, Teruo Kawada, Hiroyuki Hasegawa, Nobuya Inagaki Tetrahydrobiopterin Activates Brown Adipose Tissue and Regulates Energy and Glucose Metabolism

- American Diabetes Association
77th Scientific Sessions 2017
5. 小栗靖生, 藤田義人, Abulizi Abdulkadier, 大橋晶子, 後藤剛, 古谷太志, 小原章央, 福島徹, 松尾奈緒, Kim Minji, 細川雅也, 河田照雄, 長谷川宏幸, 稲垣暢也 テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪制御機構に関与し全身の糖・エネルギー代謝を調節する 第 60 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2017
 6. 小栗靖生, 藤田義人, Abulizi Abdulkadier, 大橋晶子, 後藤剛, 古谷太志, 小原章央, 福島徹, 松尾奈緒美, Kim Minji, 細川雅也, 河田照雄, 長谷川宏幸, 稲垣暢也 テトラヒドロピオプテリンによる褐色脂肪制御機構の解明 第 31 回 日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2017
 7. 小栗靖生, 藤田義人, Abulizi Abdulkadier, 大橋晶子, 後藤剛, 古谷太志, 小原章央, 福島徹, 松尾奈緒美, Kim Minji, 細川雅也, 河田照雄, 長谷川宏幸, 稲垣暢也 テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ全身の糖・エネルギー代謝を制御する 第 20 回 日本病態栄養学会年次学術集会 2017
 8. 大橋晶子, 原田智紀, 内藤昌子, 高橋富久, 相澤信, 長谷川宏幸, 細胞外のテトラヒドロピオプテリンがセロトニン生合成活性に与える影響, 第 20 回 活性アミンに関するワークショップ, 2016
 9. 大橋晶子, 原田智紀, 内藤昌子, 高橋富久, 相澤信, 長谷川宏幸, 2'-deoxysepiapterin (isosepiapterin) の in vivo 生成について, 第 30 回日本プテリジン研究会, 2016
 10. 大橋晶子, 笠原正彰, 内藤昌子, 高橋富久, 肥満細胞におけるテトラヒドロピオプテリンによるセロトニン生合成の促進, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
 11. 内藤昌子, 笠原正彰, 大橋晶子, 高橋富久, 軟骨細胞分化と増殖制御における promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) 転写因子の役割について, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
 12. 大橋晶子, 内藤昌子, 高橋富久, 原田智紀, 長谷川宏幸, セピアプテリンの末梢投与による脳内カテコールアミン生合成の促進, 日本ビタミン学会第 68 回大会, 2016
 13. 小栗靖生, 藤田義人, Abulizi Abdulkadier, 大橋晶子, 後藤剛, 古谷太志, 小原章央, 福島徹, 松尾奈緒美, Kim Minji, 細川雅也, 河田照雄, 長谷川宏幸, 稲垣暢也 テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪組織を活性化し糖・エネルギー代謝を制御する 第 28 回 分子糖尿病学シンポジウム 2016
 14. 小栗靖生, 藤田義人, 古谷太志, 松尾奈

- 緒美, 屋山勝俊, 小原章央, Abulizi Abdulkadier, 大橋晶子, 長谷川宏幸, 鶴山竜昭, 細川雅也, 稲垣暢也 eNOS 補酵素テトラヒドロピオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明 第 30 回プテリジン研究会 2016
15. 小栗靖生, 藤田義人, Abulizi Abdulkadier, 大橋晶子, 後藤剛, 古谷太志, 小原章央, 福島徹, 松尾奈緒美, Kim Minji, 細川雅也, 河田照雄, 長谷川宏幸, 稲垣暢也 テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ, 全身のエネルギー・糖代謝を制御する 第 37 回日本肥満学会 2016
 16. 小栗靖生, 藤田義人, Abulizi Abdulkadier, 大橋晶子, 後藤剛, 古谷太志, 小原章央, 福島徹, 松尾奈緒美, Kim Minji, 細川雅也, 河田照雄, 長谷川宏幸, 稲垣暢也 テトラヒドロピオプテリンは褐色脂肪機能を活性化させ, 全身の糖・エネルギー代謝を制御する 第 21 回日本肥満学会アディポサイエンス・シンポジウム 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
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
(1) 研究代表者
大橋 晶子 (OHASHI, Akiko)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号: 00571019

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()