

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する基礎的研究

平成 16 年度～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 柴田 克己

I. 総合研究報告

15. トリプトファンニコチンアミド経路の鍵物質であるキノリン酸に関する研究

分担研究者 福岡伸一 青山学院大学 教授

要旨

本研究成果から、ハンチントン病（HD）における神経変性のメカニズムを次のように提案する。ユビキタスに発現する異常伸長ハンチンチンが原因となり、末梢においてトリプトファン代謝異常が起こる。3-hydroxyanthranilate oxygenase の発現上昇および aminocarboxymuconate-semialdehyde decarboxylase (ACMSD) の発現低下により血中キノリン酸（QA）濃度が上昇し、その結果、尿中 QA 濃度も上昇する。一方、中枢においては ACMSD 発現および QPRT 発現の低下により脳内 QA 濃度が上昇する。脳内で上昇した QA はアストロサイトにケモカインの誘導を起こし、ケモカインが炎症反応を引き起こす。この炎症反応によりミクログリアが活性化されサイトカインを放出するとともに、活性化したミクログリアがさらに QA を生成させる。サイトカインは活性酸素種を生成させることで QA の毒性を亢進させ、またミクログリアの indoleamine-2,3-dioxygenase 発現を誘導する。この悪循環の繰り返しが脳内 QA レベルを上昇させ、末梢側と中枢側の両側から脳血液関門を破綻に導く。さらに破綻した脳血液関門から強力なキノリン酸生成能を持つマクロファージが浸入し、さらなる QA 濃度の上昇を引き起こす。脳内濃度が上昇した QA は NR2B サブタイプを含む神経細胞に強く反応し、神経脱落を引き起こす。

(2004 年)

トリプトファン-NAD 経路解析のための
動物モデル設計

食事由来 NAD 必要量を正確に把握するためには、内的な合成経路，すなわちトリプトファン-NAD 経路の寄与率を求める必要がある．最も決定的な方法は，この経路を遮断した状態の実験モデルを作り，そのときの NAD 所要量を求めることである．そこでトリプトファン-NAD 経路の律速酵素であるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPRT) を人為的に欠損させた遺伝子ノックアウトマウスの作出を目指した．

この実験モデルのもうひとつの有用性は，QPRT 欠損によってトリプトファン代謝産物のひとつで神経毒性を持つキノリン酸 (QA) の生体内濃度，特に脳内濃度が上昇する危険性があり，これが神経細胞変性疾患のモデルになりうる点である．また必須アミノ酸トリプトファンの過剰摂取が脳神経細胞に及ぼす影響を解析するためのモデルともなりうる．

QPRT ノックアウトマウスの作出については，遺伝子構造の解析，ノックアウトベクターによる組み換え，組み換え型マウス ES 細胞の選別に成功した．この ES 細胞を用いてキメラマウスの作出に成功した．しかし，複数のキメラマウスを繰り返し産出下にもかかわらず，組み換え遺伝子が生殖細胞系列に移行したマウスを得ることができなかった．現在，再度，キメラマウス産出を試みると共に，生殖細胞系列への移行を妨げる特別な原因の有無を究

明中である．

このため研究方針を変更し，キノリン酸による神経細胞死のメカニズム解明のモデルとして，ハンチントン病 (HD) マウスを用いて検討を進めることにした．

(2005 年度)

ハンチントン病 (HD) マウスにおけるトリプトファン代謝関連酵素群の酵素活性測定

卵巣移植済の 6 週齢雌ハンチントン病トランスジェニックマウス (系統名: B6CBA-Tg(HDExon1)62Gpb/1J stock No: 002810) (以後, HD マウスと略す) を米国ジャクソン研究所より購入した. 交配相手として 6 週齢雄マウス (系統名: C57BL/6NCrlCrl1j) を日本チャールスリバーより購入した. 雌 HD マウスと雄 C57BL/6NCrlCrl1j マウスを交配させ, 仔マウスを誕生させた (これを F1 系とした). 仔マウスは 4 週齢で離乳し, イヤーパンチによる耳標, 尻尾の回収及び体重測定を行った. 以後, 1 週毎に体重を測定した. 回収した尻尾を用い, ジェノタイピング法により, 正常型 (野生型) あるいは HD 型 (ヘテロ型) の遺伝子型を決定した.

HD マウスの肝臓および腎臓における Trp 代謝関連酵素 (3-HAO, ACMSD, QPRT) の酵素活性を測定し, HD マウスにおける Trp 代謝異常の有無を調べた. HD マウスが, 8 週齢まで正常に発育した後, 顕著に体重が減少し, 11 週齢で HD に特徴的な舞踏運動を示した事より, 8 週齢を発症前, 11 週齢を発症後とし, 8 週齢, 11 週齢における正常型, HD 型の肝臓, 腎臓における 3-HAO, ACMSD, QPRT の酵素活性を測定した.

QA 生成に関わる 3-HAO の活性は肝臓の方が腎臓よりも 7~8 倍程度高く, 週齢に

よる有意な差は観察されなかった. 正常マウスと HD マウスを比較すると, 両臓器, 両週齢とも HD マウスで活性が上昇しており, 11 週齢の肝臓においては有意 ($P<0.05$) に上昇していた.

QA 生成を抑制する ACMSD の活性は腎臓の方が肝臓よりも高く, 週齢による有意な差は観察されなかった. 正常マウスと HD マウスを比較すると, 両臓器, 両週齢とも HD マウスで活性が低下しており, 8 週齢, 11 週齢の肝臓においては有意 ($P<0.05$ (8 週齢), $P<0.01$ (11 週齢)) に低下していた.

QA を消去する QPRT の活性は肝臓の方が腎臓よりも 3~4 倍程度高く, 週齢による有意な差は観察されなかった. 正常マウスと HD マウスの比較でも有意な差は観察されなかった.

HD マウスにおけるトリプトファン代謝産物の定量

肝臓における ACMSD 活性の低下と 3-HAO 活性の上昇は, 血中 QA 濃度の上昇を誘引すると考えられたので, 血液成分を反映する尿中の Trp 代謝産物量を測定した. 8 週齢, 11 週齢における正常マウス, HD マウスの尿中 AnA, XA, KA, 3-HA, QA を HPLC を用いて定量し, クレアチニン量で補正を行った.

正常マウスと HD マウスを比較すると, AnA は 8 週齢, 11 週齢ともに HD マウスで低下傾向にあり, 8 週齢で有意 ($p<0.005$) に低下していた. KA も 8 週齢,

11 週齢ともに HD マウスで低下傾向にあった。QA は 8 週齢，11 週齢ともに HD マウスで上昇傾向にあり，8 週齢で有意 ($p<0.05$) に上昇していた。XA は測定の不具合により一部データが得られなかった。3-HA は傾向性が見られなかった。

HD マウスにおけるトリプトファン代謝関連酵素群の遺伝子発現解析

末梢におけるトリプトファン代謝異常から，脳内においても同様な代謝異常が生じている可能性が推察された。そこで，HD マウス的大脑皮質，小脳，線条体および海馬における Trp 代謝関連酵素 (3-HAO, ACMSD, QPRT, IDO) の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。脳内におけるトリプトファン代謝関連酵素の酵素活性は非常に低く，酵素活性測定法では脳内トリプトファン代謝異常が観察できないため，リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を試みた。

3-HAO は 8 週齢において HD マウス的大脑皮質，小脳で有意 ($p<0.05$) に低下していた。他の部位では遺伝子型の違いによる有意な差は観察されなかったが，HD マウス小脳の 8 週齢と 11 週齢とを比較すると 11 週齢で発現上昇していた。

ACMSD は 8 週齢において HD マウス的大脑皮質，小脳で有意 ($p<0.05$) に低下し，11 週齢においても HD マウス的大脑皮質で有意 ($p<0.001$) に低下していた。遺伝子型の違いによる有意な差は他の

部位では観察されなかった。

QPRT は 8 週齢において HD マウス的小脳，線条体で有意 ($p<0.05$ (小脳)， $p<0.001$ (線条体)) に低下し，11 週齢においても HD マウス的小脳で有意 ($p<0.01$) に低下していた。遺伝子型の違いによる有意な差は他の部位では観察されなかったが，小脳において他の部位よりも 3 倍程度 QPRT は高発現であった。IDO は 8 週齢において HD マウス的小脳，海馬で低下傾向であり，海馬では有意 ($p<0.05$) に低下していた。11 週齢においても HD マウス的大脑皮質，線条体，海馬で有意 ($p<0.05$ (大脑皮質)， $p<0.001$ 線条体)， $p<0.005$ (海馬)) に低下していた。遺伝子型の違いによる有意な差は他の部位では観察されなかったが，線条体では他の部位よりも顕著に IDO が高発現であった。

(2006 年度)

キノリン酸薬理作用の電気生理学的解析

トリプトファン代謝異常が脳内で観察された事より, QA が脳内に蓄積している可能性が示唆された. そこで, QA が神経脱落を引き起こす作用機序を明らかにするために, パッチクランプ法による電気生理学的解析を大脳皮質帯状回の神経細胞に対して行った.

2 週齢~4 週齢の Wistar ラットをハロセン麻酔後, 素早く脳を取り出し不必要な部分をトリミングした. スライサーを用い, 95%O₂, 5%CO₂ でバブルした氷冷塩化コリン溶液 (ナトリウム-コリン置換 ACSF)

(120 mM NaCl, 3 mM KCl, 28 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 22 mM Glucose, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂) 中で厚さ 400 μ m のスライス標本を作製した. スライス標本は ACSF (12 mM NaCl, 0.3 mM KCl, 2.6 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 15 mM Glucose, 8 mM MgCl₂) が飽和し 95%O₂, 5%CO₂ でバブルしたチャンバー中に静置し, 室温で 2 時間程度の回復期間をおいた後, 測定に用いた. 還流速度: 2 ml/min, 還流液温度: 室温で実験を行った. 記録電極は内液: K-methane 溶液 (150 mM K-methanesulphonate, 5 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 5 mM Na-HEPES, 3 mM Mg-ATP, 0.4mM Na-GTP) 抵抗: 6-10M Ω のもを用いた. 薬液の投与法は還流法と局所法を使い分け, 局所法では刺激電極内液を QA: 10 mM, NMDA: 500 μ M とした.

QA による神経細胞の興奮は QA 濃度依存的に増加した. また NMDA レセプターアンタゴニストの AP-5 と NMDA レセプター NR2B サブタイプ特異的アンタゴニストの ifenprodil によりキノリン酸による神経興奮が抑制された. 競合阻害剤である AP-5 存在下で, QA および NMDA の NMDA レセプターに対する親和性を調べた結果, QA に対して異なる親和性を示す細胞種が確認された. 一方, それらの細胞種における NMDA に対する親和性に差はみられなかった. 本実験に用いられた神経細胞には NMDA レセプターサブタイプのうち NR2A と NR2B の局在が報告されている. これらのことから, QA に対する親和性の違いは細胞膜上に分布するサブタイプの違いによると考えられた. さらに, 非競合阻害剤である ifenprodil 存在下で, QA と NMDA による神経興奮を解析した結果, QA は NR2B に対する反応性が高く, NMDA は NR2A に対する反応性が高いことが明らかになった.

考察および総括

本研究では、HD マウス末梢組織におけるトリプトファン代謝経路の異常を発見した。特に、肝臓では、3-HAO 活性が有意に上昇し、ACMSD 活性が有意に低下した。肝臓において、ACMS 生成酵素である 3-HAO 活性の上昇と ACMS を消去する ACMSD 活性の低下が ACMS 量の増加を引き起こし、またキノリン酸 (QA) を消去する QPRT 活性が変動しないことで、結果として QA 量を増加させると考察できる。実際、HD マウスの尿中トリプトファン代謝産物測定では、尿中 QA 濃度が有意に上昇しており、先の考察と一致する。抗結核薬ピラジナミド摂取やフタル酸エステル摂取による腎臓、肝臓 ACMSD 活性の低下が、尿中 QA 濃度の上昇を誘導することが報告されており、ACMSD 活性の低下が QA の生成の増加に深く関わることを推察できる。さらに、肝臓の機能として消化管から吸収された栄養に富む血液を肝門脈から受け取り、様々な栄養物の代謝や貯蔵を行うこと、尿は血液が腎臓の糸球体で濾過されたもので、血液成分の反映であるということより、末梢における ACMSD 活性の低下が血中 QA 濃度の上昇を誘導し、血液を反映する尿中の QA 濃度が上昇したと考察できる。腎臓切除による腎機能低下ラットが、肝臓 ACMSD 活性の低下や尿中、血清中の QA 濃度の上昇を示すだけでなく、脳脊髄液、大脳皮質、小脳、海馬線条体、視床においてもキノリン酸濃度の上昇を示すという報告より、末梢における代謝異常が中枢のキノリン酸濃度の上昇に影響する可能性がある。

る。

HD マウス脳各部位におけるトリプトファン代謝関連酵素の遺伝子発現解析より、ACMSD 発現量が正常マウスと比較して低下あるいは同等である事を見出した。さらに QPRT 発現量も低下あるいは同等であり、これらの遺伝子発現量の低下は QA 生成を促進させる。HD 患者では 3-HAO 活性が上昇し、AD 患者では組織染色による発現が上昇していると報告されているが、今回の結果とは一致しない。本実験では週齢差をなくすために、発症が確認されずとも 11 週齢を発症とした。一方、上記 2 例は発症後死後脳における報告であることが大きく異なる。HD マウスにおける ACMSD および QPRT 発現量が発症前の 8 週齢でも低下していたより、両遺伝子の発現量の低下が病態発症の引き金となり、また、病態進行の促進要因であった可能性も考えられる。8 週齢、11 週齢の時点に加え、さらに詳細な検討が必要である。

ホールセルパッチクランプ法により、QA が NMDA レセプター NR2B サブタイプに対し、強い反応性を示すことを発見した。NR2B サブタイプは HD 患者で選択的神経脱落が起こる線条体に強く発現するサブタイプである。本実験では線条体特異的な ACMSD および QPRT 発現量の低下が起きていない。しかし、選択的神経脱落が、部位による QA 生成量の違いではなく、部位による QA に対する感受性の違いに起因している可能性がある。本実験で観察された神経興奮は $100 \mu\text{M}$ 以上の QA 濃度を必要とした。初代神経培養に対する QA の毒性

濃度は数時間～数日の暴露期間で数百 μM レベルであり、数週間の暴露期間で数百 nM レベルであった。これらの報告から慢性的な QA の暴露であれば低濃度でも神経細胞に損傷を与えることも可能性がある。HD における脳内 QA レベルは不明であるが、HIV 感染では QA 濃度が μM レベルに達すると報告されており、十分に QA が毒性を示す濃度である。さらに、QA はフリーラジカルの生成能を持つことが報告されており、また HD 患者脳内で上昇し、フリーラジカル生成能を持つ 3-HK と QA との共暴露によりその毒性が増加する。さらに、QA がミトコンドリアに作用しミトコンドリア機能不全を起こすとの報告もある。さらに、NMDA レセプターアンタゴニストとして作用する KA が HD で低下している報告もあり、本研究の尿中 KA 濃度の低下とも一致する。このように、QA は NMDA レセプターに対する興奮毒性を示すだけでなく、活性酸素種の生成やミトコンドリアの機能不全の誘導などの複合作用によって神経細胞の脱落を引き起こすと考察できる。

本研究から、HD における神経変性のメカニズムを次のように提案する。ユビキタスに発現する異常伸長ハンチンチンが原因となり、末梢においてトリプトファン代謝異常が起こる。3-HAO の発現上昇および ACMS の発現低下により血中 QA 濃度が上昇し、その結果、尿中 QA 濃度も上昇する。一方、中枢においては ACMSD 発現および QPRT 発現の低下により脳内 QA 濃度が上昇する。脳内で上昇した QA はアストロサ

イトにケモカインの誘導を起こし、ケモカインが炎症反応を引き起こす。この炎症反応によりミクログリアが活性化されサイトカインを放出するとともに、活性化したミクログリアがさらに QA を生成させる。サイトカインは活性酸素種を生成させることで QA の毒性を亢進させ、またミクログリアの IDO 発現を誘導する。この悪循環の繰り返しが脳内 QA レベルを上昇させ、末梢側と中枢側の両側から脳血液関門を破綻に導く。さらに破綻した脳血液関門から強力なキノリン酸生成能を持つマクロファージが浸入し、さらなる QA 濃度の上昇を引き起こす。脳内濃度が上昇した QA は NR2B サブタイプを含む神経細胞に強く反応し、神経脱落を引き起こす。