

内因性神経調節物質キヌレン酸を変動させる因子と
栄養成分の解明

To elucidate the factor and nutritional ingredient for changing endogenous
neuromodulator kynurenic acid production

関根 愛莉

2019

Airi Sekine

目次

| | |
|--|----|
| 略語 | 2 |
| 序論 | 3 |
| 1章. 栄養成分によるキヌレン酸産生制御 –アミノ酸の <i>in vitro</i> スクリーニング– | |
| 序論 | |
| 実験方法 | 6 |
| 結果 | 8 |
| 考察 | 15 |
| 2章. 栄養成分によるキヌレン酸産生制御 –大型中性アミノ酸トランスポーターの制御– | |
| 序論 | |
| 実験方法 | 17 |
| 結果 | 19 |
| 考察 | 24 |
| 3章. キヌレン酸産生変動因子の解明 –急性肝炎が脳内キヌレン酸産生におよぼす影響– | |
| 序論 | |
| 実験方法 | 27 |
| 結果 | 28 |
| 考察 | 32 |
| 結論 | 34 |
| 引用文献 | 35 |
| 発表論文 | 45 |
| 謝辞 | 46 |

略語

ALT : alanine amino transferase アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST : aspartate amino transferase アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
 $\alpha 7$ nAChR : $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ ニコチン作動性アセチルコリン受容体
BCH : 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid 2-アミノ 2-ノルボルナンカルボン酸
HPLC : High-Performance-Liquid-Chromatography 高速液体クロマトグラフィー
KAT : kynurenine amino transferase キヌレニンアミノトランスフェラーゼ
KRB : Krebs-Ringer buffer クレブス・リンガー緩衝液
KYNA : kynurenic acid キヌレン酸
KYN : kynurenine キヌレニン
LAT : large neutral amino acid transporter 大型中性アミノ酸トランスポーター
TAA : Thioacetamide チオアセトアミド

Amino acids

Ala : L-Alanine アラニン
Arg : L-Arginine アルギニン
Asn : L-Asparagine アスパラギン
Asp : L-Aspartic acid アスパラギン酸
Cys : L-Cysteine システイン
Gln : L-Glutamine グルタミン
Glu : L-Glutamate グルタミン酸
Gly : L-Glycine グリシン
His : L-Histidine ヒスチジン
Ile : L-Isoleucine イソロイシン
Leu : L-Leucine ロイシン
Lys : L-Lysine リジン
Met : L-Methionine メチオニン
Phe : L-Phenylalanine フェニルアラニン
Pro : L-Proline プロリン
Ser : L-Serine セリン
Thr : L-Threonine スレオニン
Trp : L-Tryptophan トリプトファン
Val : L-Valine バリン

序論

WHO の健康の定義や健康日本 21 で提言されているように、精神的な健康は人が生きるための重要な条件である。厚生労働省がおこなっている患者調査によると、医療機関にかかっている精神疾患の患者数は年々増加しており、平成 26 年には約 390 万人に至っている。内訳としては多いものから順に、うつ病などの気分障害、統合失調症、不安障害、認知症となっており、どの疾患においても患者数は増加か横ばいの傾向である (Fig. 0-1)。精神疾患が引き起こす最も恐ろしい結果は自殺である。自殺時には、約 90% の人が何らかの精神科診断がつく状態であったことが知られている。我が国において、自殺は平成 29 年の 10 歳～44 歳の死因第 1 位、全体でも第 8 位となっており、大きな社会問題となっている。精神疾患を予防することは、日本人において急速に解決しなければいけない課題であるといえる。現在、精神疾患を防ぐための対策として提唱されている方法はストレスをなくすことや睡眠の改善といったものであり、個人の意識に依存する。そこで、栄養学的手法をもちいて脳機能を調節することが可能になれば、精神疾患を日常的に防ぐことができるのではないかと考えた。

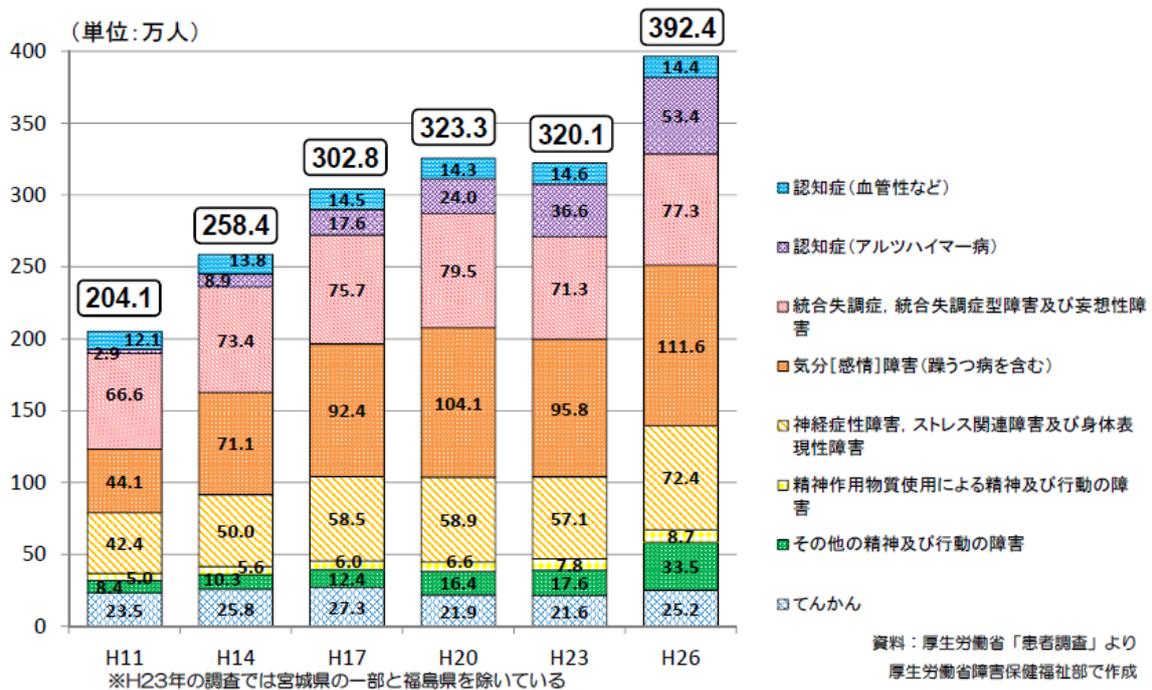


Fig. 0-1 精神疾患を有する総患者数の推移 (疾病別内訳)

厚生労働省“患者調査”より厚生労働省障害保健福祉部が作成したものを引用。

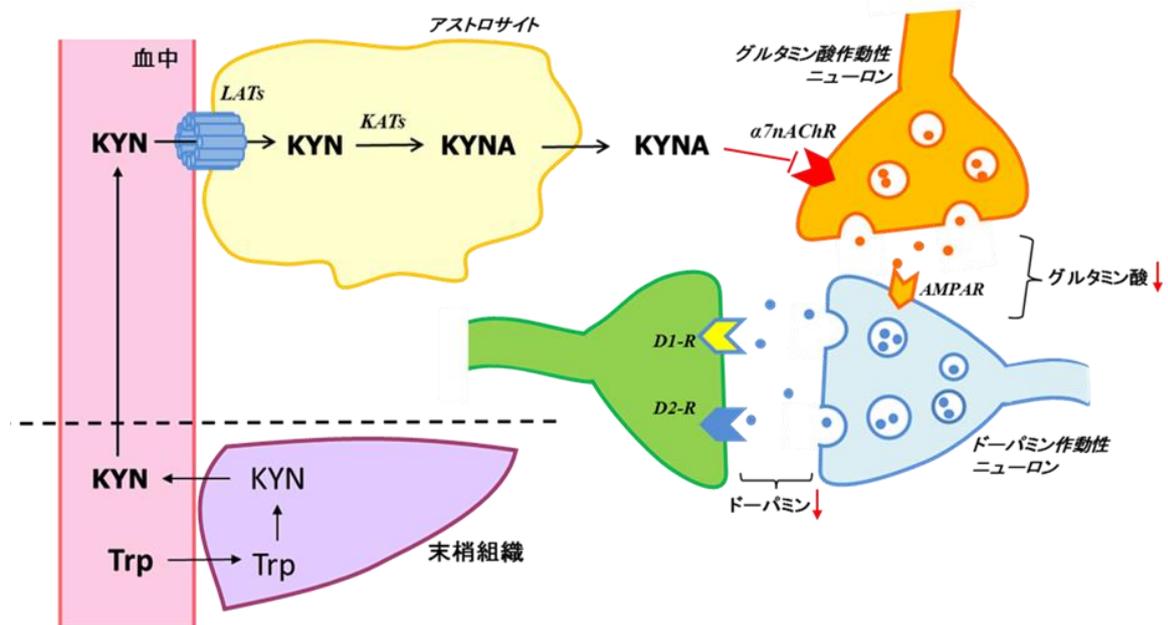


Fig. 0-3 キヌレン酸による神経伝達調節機構

現在、脳内の KYNA 産生を抑制する薬剤の開発は進んでいるが [12], KYNA 産生の上昇を予防する観点の研究はない. 脳内 KYNA を栄養学的手法で制御することが可能になれば, 神経伝達物質放出調節を介した日常的な脳機能保護につながると考えられる. 先行研究より, 高 Trp 食をラットに摂取させると, 脳内 KYNA 産生が亢進し, それに伴いドーパミン放出量が減少することが明らかになった [16]. 食餌によって脳内 KYNA 産生と神経伝達物質放出を調節する可能性が見出された. また, 国内外の KYNA 研究では, 脳内 KYNA が上昇することによる影響や, 実際の精神疾患患者の KYNA 動態については盛んに研究がされているが, 脳内 KYNA が上昇する原因については不明な点が多く, 高 Trp 食やケトン食などの食餌 [16, 17], KYN 代謝遺伝子の変異 [18] が報告されているにすぎない. 脳内 KYNA 代謝異常の原因と機序を解明することは, 統合失調症やうつ病などの精神疾患の予防, 早期発見, 先制医療, 治療に繋がる. 高 Trp 食摂取は血中, 脳内の KYN 量の上昇を介して脳内 KYNA 量を増加させる. 脳内 KYNA 量は KYN 量に依存することから, 末梢 Trp 代謝変動に起因する血中 KYN 濃度の上昇が脳内 KYNA 産生を亢進する可能性を考えた. 以上のことから本研究では, 末梢代謝に着目し脳内 KYNA 産生を変動させる因子と栄養成分を解明することを目的とした.

1 章. 栄養成分によるキヌレン酸産生制御 —アミノ酸の *in vitro* スクリーニング—

1-1. 序論

KYNA は血液脳関門を介してアストロサイトに取り込まれた前駆物質キヌレニン (KYN) から合成される. 脳内の KYN の約 60% は末梢由来であり, KYNA は血液脳関門を通過しないため, 血中の KYNA は脳内には影響しないと考えられる [19, 20]. アストロサイトで合成された KYNA は即座に細胞外液中に放出されるため, 細胞外液中の KYNA は脳内 KYNA 産生に依存している. よって, 脳内 KYNA 産生の制御には, KYN 取り込みの制御と KYNA 合成制御の 2 つが考えられる [21].

KYNA は KYN からキヌレニンアミノトランスフェラーゼ (KAT) を介して合成される. 哺乳類の脳には KAT のアイソザイムは 4 つ存在しており, どれも広い基質選択性をもち, ホモジネートをもちいた酵素活性測定ではさまざまなアミノ酸が KAT 活性を競合阻害することがわかっている [22-24]. よって, アミノ酸が KAT 活性を阻害し, KYNA 産生を抑制する可能性が考えられる. KYN を脳内に取り込むトランスポーターは分岐鎖アミノ酸と芳香族アミノ酸の輸送体として知られている大型中性アミノ酸トランスポーター (LAT) である. LAT の基質であるアミノ酸のほうが KYN よりも LAT に対する親和性が高いことが細胞レベルで分かっている [19, 25-27]. これらのことから, KYNA 産生を抑制する栄養成分としてアミノ酸に着目し, 脳組織切片を用いた *in vitro* 実験にて KYNA 産生に影響をおよぼすアミノ酸をスクリーニングした.

1-2. 実験方法

1-2-1. 実験動物

7-10 週齢の Wistar 系雄ラットを日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) から購入し, 実験に用いた. 実験動物用固形飼料 MF (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) を自由摂取, 自由飲水, 室温 22 ± 2 °C, 湿度 60 ± 10 %, 明暗サイクルは 12 時間 (明期 6 時~18 時) で飼育した. 実験動物の取り扱いには滋賀県立大学における動物実験等に関する規定に従った.

1-2-2. 試薬

L-Kynurenine sulfate salt, KYNA, L-Tyrosine disodium salt hydrate は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A) から購入した. その他のアミノ酸 18 種 (Ala, Arg, Asn, Asp, L-Cysteine hydrochloride Monohydrate, Gln, Sodium L-Glutamate, Gly, His, Ile, Leu, L-Lysine hydrochloride, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Val) はすべて和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した.

Krebs-Ringer buffer (KRB) の組成は NaCl : 118.5 mmol/L, KCl : 4.75 mmol/L, CaCl₂ : 1.77 mmol/L, MgSO₄ : 1.18 mmol/L, NaH₂PO₄ : 16.2 mmol/L, glucose : 5 mmol/L であり, 95% O₂, 5% CO₂ 下で 30 分間バブリングし, pH 7.4 に合わせた. KRB の調製はすべて氷冷下でおこなった.

1-2-3. De novo KYNA 合成実験によるアミノ酸スクリーニング

In vitro でのスクリーニングは、組織切片を用いた *De novo* KYNA 合成実験にておこなった。実験方法は Turski らの方法に従った [20]。ラットは断頭によって屠殺し、脳を解剖し左右の大脳皮質のみを摘出した。摘出した大脳皮質は McIlwain tissue slicer (Muromachi Kikai Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いて切断し、1 mm 角の組織切片とし、実験開始まで KRB に入れて氷冷した (1 時間未満)。

脳組織切片は KRB を入れた 27well のマイクロプレートに 1well あたり 7 個ずつ入れ、Screening test では終濃度 1 mmol/L、Dose-response test では 3 – 3000 $\mu\text{mol/L}$ アミノ酸溶液を各 well に添加した。Screening test の Control、Dose-response test のアミノ酸 0 $\mu\text{mol/L}$ にはアミノ酸を添加せずに KRB を添加した。10 分間プレインキュベート (37°C, 95% O₂ バブリング, 振とう 27 rpm) したのち、終濃度 2 $\mu\text{mol/L}$ の KYN (ラット血中生理的濃度に相当) を添加し、2 時間インキュベート (37°C, 95% O₂ バブリング, 振とう 27 rpm) したのち、氷冷した。well 内の容量は最終的に 1 mL になるようにした。well 内の緩衝液のみを直ちに回収し、1 mol/L HCl を 100 μL 添加し緩衝液サンプルとした。脳組織切片は 500 μL の KRB で 3 回洗浄した後、250 μL の超純水を加えてソニケーター (Powersonic model 50; Yamato Kagaku, Tokyo, Japan) を用いて懸濁液を作成し組織切片サンプルとした。組織切片のうち 50 μL を組織切片のタンパク質定量にもちいた。タンパク量は、Bradford 色素結合法 [28] に基づき、Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate (Bio-Rad laboratories) を用いて測定した。

1-2-4. KYN, KYNA 測定

緩衝液サンプルは HPLC 移動相で 2 倍希釈し、遠心分離した上清を測定に用いた。組織切片サンプルは 6% 過塩素酸と 4:1 の割合で混合して除タンパクをし、遠心分離 (12000 \times g, 10 分, 4°C) した上清を 0.45 μm フィルターで濾過したものを測定に用いた。緩衝液上清中の KYNA 濃度を KYNA 産生量、組織切片中の KYN 濃度を KYN 取り込みの指標とした。

KYNA と KYN の測定はそれぞれ Shibata ら, Holmes らの方法に従っておこなった [29, 30]。カラムは Tosoh TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 \times 250 nm id, particle size 7 μm)、移動相は 10 mmol/L 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) – アセトニトリル (92:8, v/v)、流速は 1.0 mL/min で溶出した。KYNA 濃度は HPLC-蛍光法 (RF-20Axis; Shimadzu, Kyoto, Japan; 励起波長 344 nm, 蛍光波 398 nm)、KYN 濃度は HPLC-UV 法 (SPD-10AV; Shimadzu; 365 nm wavelength) で検出した。

1-2-5. 統計解析

数値はすべて平均値 \pm SE で示した。3 群以上の比較には One-way ANOVA の Dunnet 法にて検定をおこなった。シグモイド曲線は非線形回帰分析で作成した。KYNA 産生、KYN 取り込みに対する IC₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) は GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) の “log (inhibitor) vs. response” の式を用いて算出した。

それぞれのアミノ酸添加濃度における KYNA 産生と KYN 取り込み阻害率は Control 値に

対するパーセントで表し、線形回帰分析をおこなった。各 KYN 濃度における KYNA 産生と KYN 取り込みの相関も同様に 2 $\mu\text{mol/L}$ KYN 添加の Control 値に対するパーセントで表し、線形回帰分析をおこなった。それぞれについて Pearson の相関係数を算出した。p 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差があるものとみなした。すべての統計解析に GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。

1-3. 結果

KYNA 産生を抑制するアミノ酸のスクリーニング

KYNA 産生を制御するアミノ酸を明らかにするため、タンパク質を構成する 19 種類のアミノ酸をそれぞれ 1 mmol/L 添加し、*in vitro* での KYNA 産生量を測定した。Trp は標準品に代謝産物である KYNA が混在しており、精確な測定ができなかったため本研究では対象から除外した。19 種類のアミノ酸のうち、Leu, Ile, Met, Ala, Tyr, Gln, Glu, Asp の 8 種が KYNA 産生を Control の 40–60% まで抑制し、Phe, Cys は約 25% まで抑制した (Fig. 1-1a)。KYNA 産生を抑制した 10 種のうち、Leu, Ile, Met, Phe, Tyr は組織切片中 KYN 濃度を Control の 50% 以下に抑制した (Fig. 1-1b)。Ala, Cys, Gln, Glu, Asp では Control との差はなかった。Val は組織切片中 KYN 濃度を約 50% まで抑制したが、KYNA 産生は抑制しなかった。

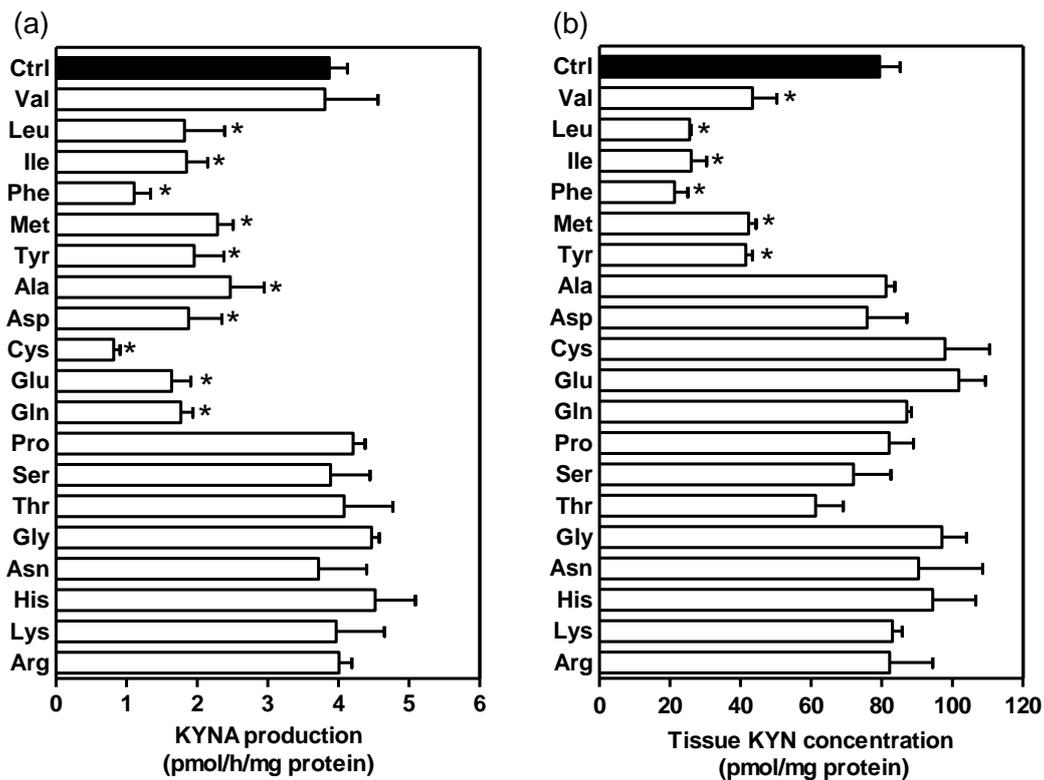


Fig. 1-1 Screening test

1 mmol/L のアミノ酸を添加した時の (a) 大脳皮質組織切片の KYNA 産生量, (b) 組織切片中 KYN 濃度を測定した。値は平均値 \pm SE (n = 3-7), 検定には One way ANOVA の Dunnett 法を用いた。

*p < 0.05 vs Ctrl.

アミノ酸は濃度依存的に KYNA 産生と KYN 取り込みを阻害する

1 mmol/L 添加で KYNA 産生抑制作用を示した 10 種類のアミノ酸について、添加濃度 3 $\mu\text{mol/L}$ –3 mmol/L において KYNA 産生阻害能をさらに明らかにした。すべてのアミノ酸が添加濃度依存的に KYNA 産生を抑制した (Fig. 1-2)。Leu, Ile, Met, Phe, Tyr の 5 つのアミノ酸は組織切片中 KYN 濃度も同様に添加濃度依存的に抑制した (Fig. 1-3)。Ala, Cys, Gln, Glu, Asp は組織切片中 KYN 濃度に影響しなかった。さらに、KYNA 産生、KYN 取り込みに対する IC_{50} を算出した (Table. 1)。KYNA 産生に対する IC_{50} を昇順にあらべると、Phe < Leu < Ile < Glu < Cys < Ala < Met < Asp < Gln < Tyr, KYN 取り込みに対する IC_{50} は、Phe < Leu < Ile < Met < Tyr であった。

アミノ酸による KYN 取り込みの阻害は KYNA 産生に寄与する

KYN 取り込みが KYNA 産生にどのように影響しているかを明らかにするために、組織切片中 KYN 濃度を抑制した 5 つのアミノ酸について KYN 取り込みと KYNA 産生の相関を調べた。5 つのアミノ酸による KYN 取り込み阻害率と KYNA 産生阻害率の間には有意に正の相関が認められた (Leu: $y = 1.04x - 5.6, r = 0.988; p < 0.0001$, Ile: $y = 0.904x + 5.9, r = 0.987; p < 0.0001$, Phe: $y = 1.03x - 7.0, r = 0.945; p < 0.001$, Met: $y = 1.25x - 28.0, r = 0.889; p < 0.01$, Tyr: $y = 0.921x - 7.7, r = 0.967; p < 0.0001$) (Fig. 1-4)。5 つのアミノ酸をあわせたデータにおいても有意に正の相関が認められた ($y = 0.981x - 1.1, r = 0.946; p < 0.0001$) (Fig. 1-4f)。組織切片中 KYN 濃度と KYNA 産生の直接的な関係を明らかにするために、0.4–2 $\mu\text{mol/L}$ の KYN を KRB に添加して培養し、KYNA 産生量と組織切片中 KYN 濃度を測定した。KYNA 産生量と組織切片中 KYN 濃度は 2 $\mu\text{mol/L}$ KYN を添加した Control の値を 100 としたときのパーセントで表した。KYN 添加濃度依存的に KYNA 産生量と組織切片中 KYN 濃度は直線的に増加した (Fig. 1-5a, b)。さらに、KYNA 産生と組織切片中 KYN 濃度との間には強い正の相関が示された ($y = 0.978x - 4.5, r = 0.985; p < 0.01$) (Fig. 1-5c)。傾きの値から、5 つのアミノ酸による阻害能と同様の相関関係を示すことが分かった。これらの結果から、5 つの中性アミノ酸による KYNA 産生抑制作用は組織への KYN 取り込み阻害が寄与していることが示された。

(次ページのグラフ説明)

Fig. 1-2 Dose-response test における KYNA 産生量

(a) Leu, (b) Ile, (c) Phe, (d) Met, (e) Tyr, (f) Ala, (g) Asp, (h) Cys, (i) Gln, (j) Glu の添加による大脳皮質組織切片の KYNA 産生。値は平均値 \pm SE (n = 4-6)、シグモイド曲線は GraphPad Prism 5.0 の非線形回帰分析で作成した。

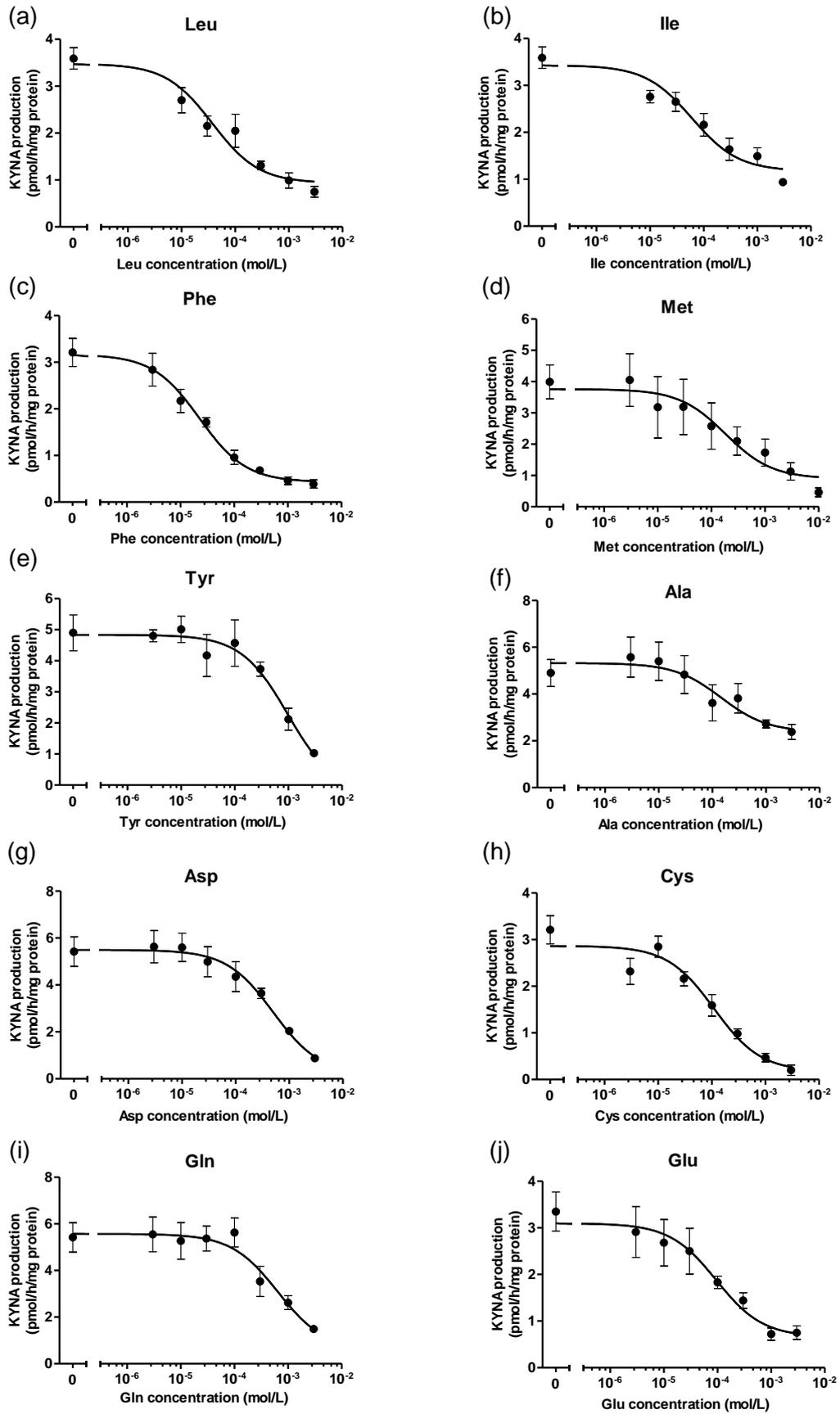


Fig.1-2 (図の説明は前ページ)

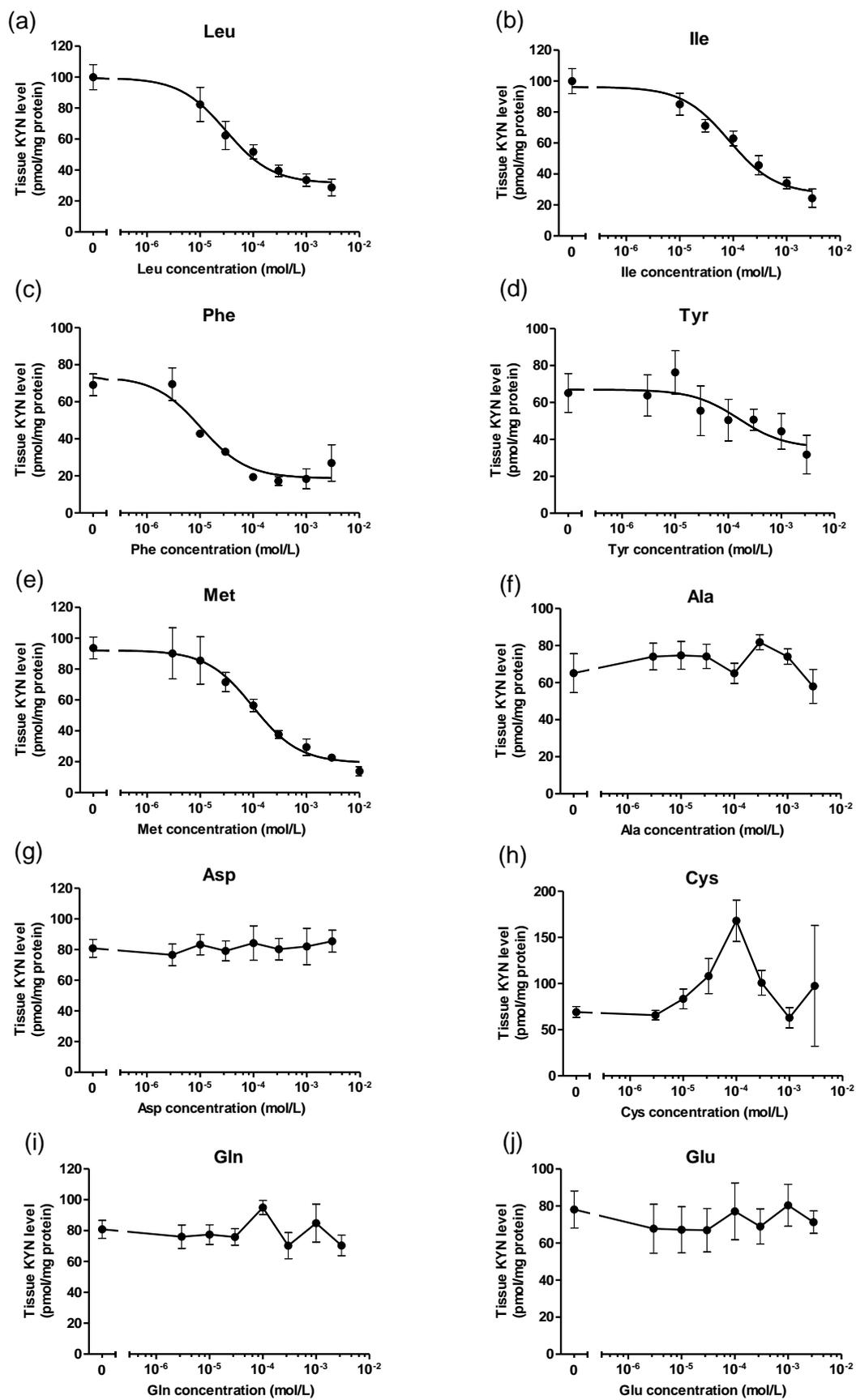


Fig.1-3 (図の説明は次ページ)

(前ページの図表説明)

Fig. 1-3 Dose-response test における大脳皮質 KYN 濃度の結果

(a) Leu, (b) Ile, (c) Phe, (d) Met, (e) Tyr, (f) Ala, (g) Asp, (h) Cys, (i) Gln, (j) Glu の添加による組織切片中 KYN 濃度. 値は平均値±SE (n=4-6), シグモイド曲線は GraphPad Prism 5.0 の非線形回帰分析で作成した.

Table. 1 10 種のアミノ酸の KYNA 産生と KYN 取り込みに対する IC₅₀

| Amino acids | IC₅₀ for KYNA production ($\mu\text{mol/L}$) | IC₅₀ for KYN uptake ($\mu\text{mol/L}$) |
|--------------------|---|--|
| Leucine | 36.9 | 30.4 |
| Isoleucine | 60.1 | 83.6 |
| Phenylalanine | 22.5 | 10.4 |
| Methionine | 184 | 98.6 |
| Tyrosine | 970 | 159 |
| Cysteine | 110 | — |
| Glutamate | 94.9 | — |
| Alanine | 146 | — |
| Aspartate | 502 | — |
| Glutamine | 647 | — |

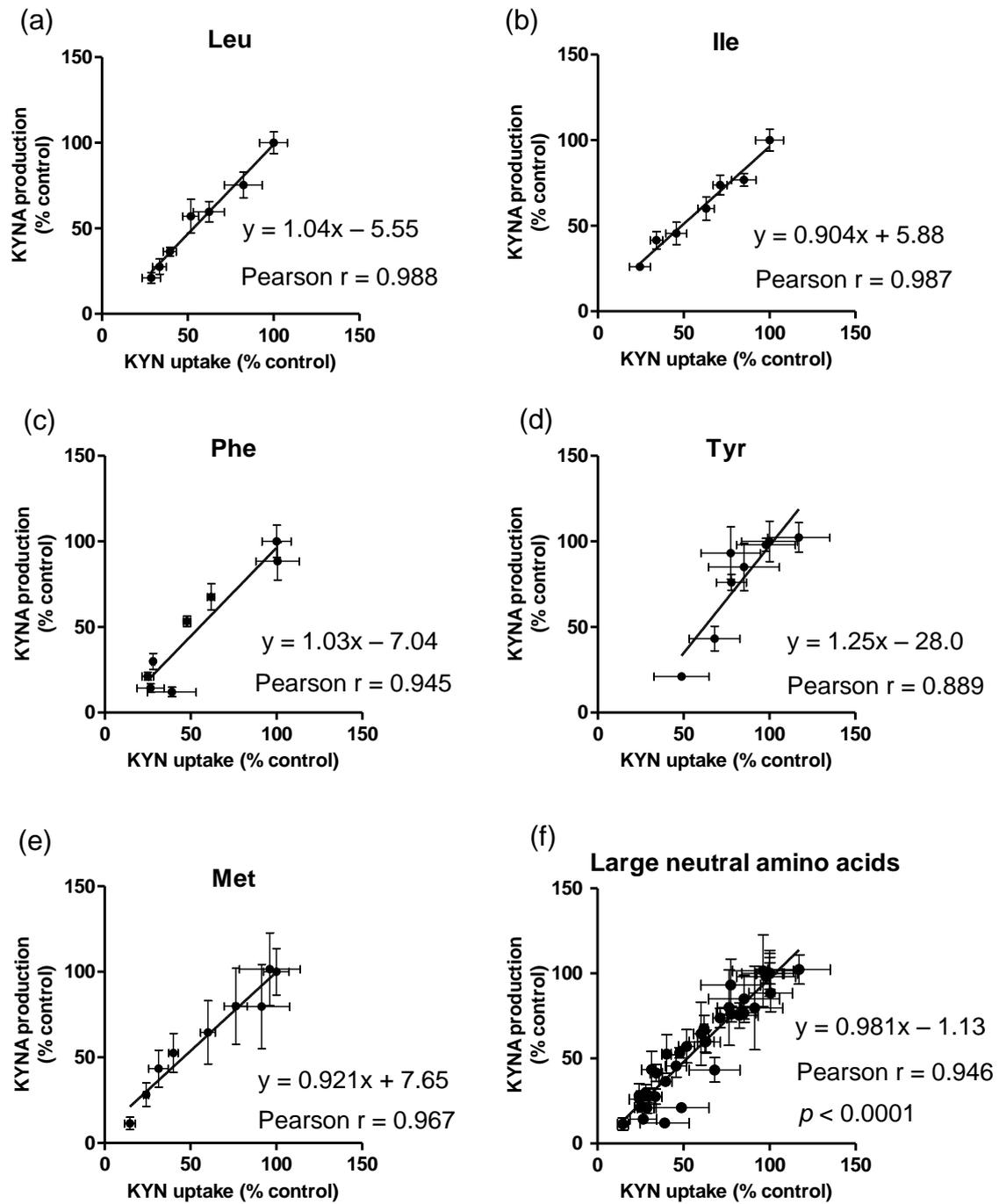


Fig. 1-4 アミノ酸添加による KYN 産生と KYN 取り込み阻害率の相関関係

(a) Leu, (b) Ile, (c) Phe, (d) Tyr, (e) Met, (f) 5つの大型中性アミノ酸の合計。値は平均値±SE (n = 4-6), 回帰直線は GraphPad Prism 5.0 の線形回帰分析で作成した。

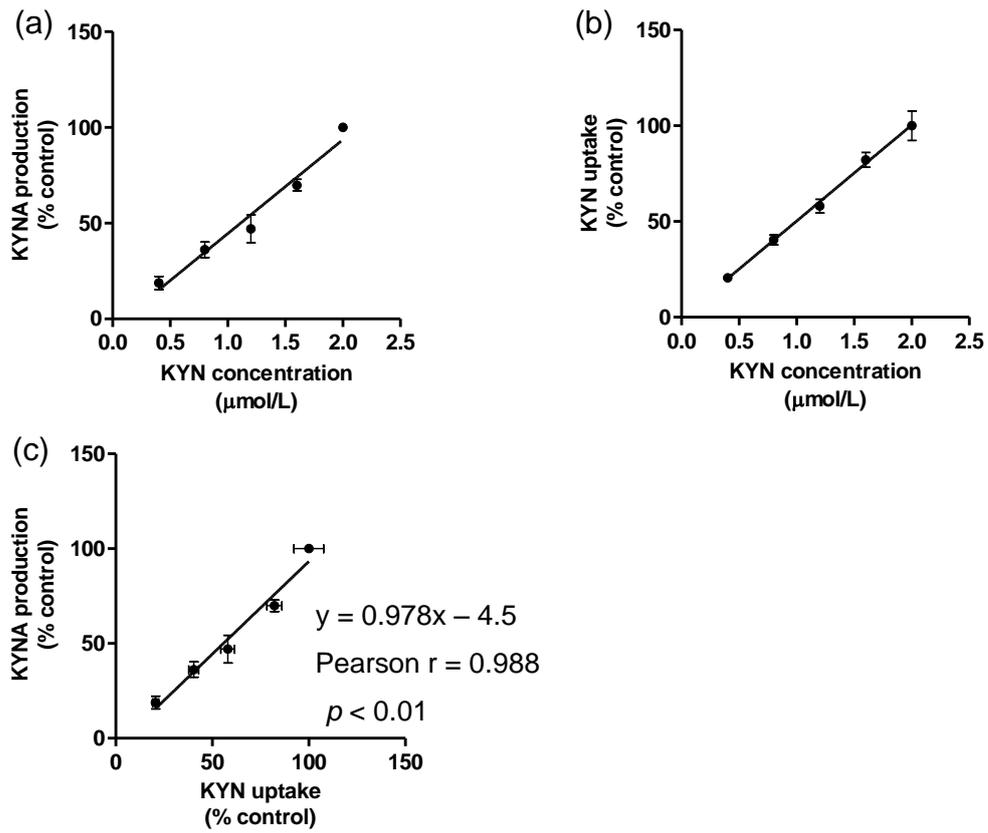


Fig. 1-5 (a) KYN 添加濃度と KYNA 産生の関係, (b) KYN 添加濃度と KYN 取り込みの関係, (c) KYN 取り込みと KYNA 産生の相関関係

値は平均値 \pm SE (n = 3), 回帰直線は GraphPad Prism 5.0 の線形回帰分析で作成した.

1-4. 考察

アミノ酸が KYN 取り込みや KYNA 合成を阻害し脳内 KYNA 産生を抑制する可能性を考え、ラット大脳皮質を用いた *in vitro* 実験でタンパク質を構成するアミノ酸の中から KYNA 産生を抑制するものをスクリーニングした。19 種類のアミノ酸のうち、KYNA 産生を抑制するアミノ酸が 10 種類該当した (Leu, Ile, Phe, Met, Tyr, Ala, Cys, Glu, Gln, Asp)。また、それぞれの IC₅₀ はラットの生理的濃度の範囲であった [26]。10 種類のうち 5 つのアミノ酸 (Leu, Ile, Phe, Met, Tyr) は組織切片中 KYN 濃度も抑制したことから、組織への KYN 取り込みを阻害することで KYNA 産生を抑制したと考える。組織切片中 KYN 濃度に影響しなかった 5 つのアミノ酸 (Ala, Cys, Glu, Gln, Asp) は KYNA 合成を阻害して KYNA 産生を抑制したと考える。

KYN は Na⁺非依存性中性アミノ酸トランスポーターである LAT を介して脳内に輸送される。LAT には LAT1 と LAT2 の 2 つのアイソフォームが存在し、LAT1 は分岐鎖アミノ酸や芳香族アミノ酸を高親和に輸送し、LAT2 は広い基質選択性をもつ [31, 32]。KYN の LAT に対する K_m 値は ~160 μmol/L であり、生理的なラット血中 KYN 濃度 (2 μmol/L) の 80 倍高い値である [19, 25]。LAT1 と LAT2 のどちらで KYN が輸送されるかは明らかになっていないが、今回の実験では KYN 取り込みは LAT1 の基質となるアミノ酸によって阻害されたことから、脳における KYN 取り込みは LAT1 由来であることが示唆された。Leu, Ile, Phe, Met, Tyr に対する LAT1 の K_m 値は 15–30 μmol/L であり、KYN よりも親和性が高い [27]。Gln や Asp は LAT1 の基質になるが親和性が低いため (K_m = 1.5–2 mmol/L)、組織切片中 KYN 濃度には影響をあたえなかったのだと考える。Val は Leu, Ile と同様に組織切片中 KYN 濃度は抑制したが、KYNA 産生には影響しなかった。当研究室では分岐鎖アミノ酸添加食をラットに与える実験を過去におこなっているが (未発表データ)、*in vitro* の結果同様に Val は脳内 KYN 濃度を抑制するが、脳内 KYNA 産生には影響しなかった。また、細胞レベルでは高親和に取り込まれる His は、今回の実験では組織切片中 KYN 濃度に影響を与えなかった (K_m = 12.7 μmol/L)。細胞における LAT の取り込みと実際の脳組織での取り込みは必ずしも一致しないと推察される。

哺乳類の脳においては 4 つの KAT が同定されている。KAT I (glutamine transaminase K, GTK; EC 2.6.1.64), KAT II (2-aminoadipate aminotransferase, ADA; EC 2.6.1.7), KAT III (cysteine conjugate β-lyase 2, CCBL2; EC 4.4.1.13), KAT IV (mitochondrial aspartate aminotransferase, ASAT; EC 2.6.1.1) である。KAT III が脳内の KYNA 産生に関与するかは明らかになっていない。ラットとヒト脳では KAT II が約 60 % を占めているため (KAT I は約 10 %, KAT IV は約 30 %), KYNA 合成においては KAT II が重要である [22]。今回の実験で Glu, Asp, Cys, Gln, Ala は KYN 取り込みには影響せずに KYNA 産生を抑制したことから、KYNA 合成反応を阻害したと考えられる。精製酵素や脳ホモジネートを用いた実験より、Glu と Asp は高親和に KAT II (IC₅₀ はそれぞれ 2.1, 1.2 mmol/L) と KAT IV (IC₅₀ はそれぞれ 0.9, 0.3 mmol/L)

を阻害し、Gln と Cys は KAT I と KAT III を阻害することが分かっている [22, 23, 33]. さらに、Cys の代謝産物であるシステインスルフィン酸は KAT II 活性を阻害し、*in vitro* においてラット脳内 KYNA 産生を阻害することが分かっている [34]. LAT 1 の基質である Leu, Met, Phe には KAT III 活性を阻害するという報告もあるが [23], 今回の実験では KYN 取り込みの抑制が KYNA 産生の抑制に反映されたと考える.

Leu, Ile, Phe, Met, Tyr, Ala, Asp, Cys, Glu, Gln のラット血中生理的濃度は、それぞれ約 150, 90, 60, 50, 70, 400, 10, 10, 700, 80 $\mu\text{mol/L}$ である [26]. 3 $\mu\text{mol/L}$ –3 mmol/L アミノ酸添加による Dose-response test の結果から、KYNA 産生抑制と KYN 取り込み抑制に対する IC_{50} がどのアミノ酸も生理的濃度の範囲であった. よって、10 種のアミノ酸すべてが生理的濃度の範囲で部分的に KYNA 産生を抑制することが示唆された. 今回用いた実験手法による結果は、血液脳関門の LAT による KYN 取り込みと完全に一致しないかもしれないが、*in vivo* においても生理的濃度の血中アミノ酸が脳内 KYNA 産生に影響する可能性が考えられる. また、該当したアミノ酸の血中濃度を上げることで脳内 KYNA 量を抑制することが期待できる.

矛盾するようだが、KYNA は極端に減らせばよいというわけではない. KMO 阻害剤による KYNA の増加はアルツハイマーモデル動物のシナプスの減少を抑制する[35]. 神経変性疾患であるハンチントン病では KYNA/3-ヒドロキシキヌレニン (3-HK)+キノリン酸 (QA) 比が低値を示し、その割合を増やすことで症状が改善する[36, 37, 38]. $\text{Kat}2^{-/-}$ マウスでは、幼齢期で海馬の KYNA 濃度が低下し、自発運動量が亢進するハンチントン病様の表現型を示すことも分かっている [39, 40]. 逆に、統合失調症を代表とする KYNA/3-HK+QA 比が高値を示す状態では、KYNA/3-HK+QA 比を低くすることでその症状は改善される. 脳内の KYNA と 3-HK や QA の割合が生理的濃度の範囲内で維持されていることで、神経や認知機能は正常な状態に維持されていると考えられている. 本研究で明らかにしたアミノ酸は KYNA 産生を生理的濃度の範囲で部分的に制御する可能性があるため、KYNA 調節方法として非常に有用な方法になり得ると考える.

2 章. 食品成分によるキヌレン酸産生制御 –大型中性アミノ酸トランスポーターの制御–

2-1. 序論

1 章にて KAT あるいは LAT の基質となるアミノ酸が *in vitro* において KYNA 産生を抑制した。KAT 活性の調節による脳内 KYNA 産生の制御に関してはさまざまな報告があり、薬剤の開発や、げっ歯類以外にサルなど霊長類をもちいた研究もおこなわれている [12, 41-43]。一方 LAT の制御についての報告はなく、KYNA 産生制御の新たな方法であるといえる。そこで、2 章では LAT による KYNA 産生の制御について、さらに掘り下げて実験をおこなった。

本章では、LAT による脳内 KYN 取り込みと脳内 KYNA 産生との関係をより明確にするため、LAT 阻害剤である 2-アミノ 2-ノルボルナンカルボン酸 (BCH; 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid; Fig. 2-1) を用いて、*in vitro* さらに *in vivo* における脳内 KYN 取り込みと KYNA 産生の関係を明らかにした。

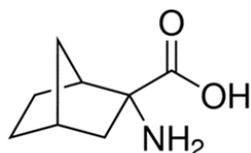


Fig. 2-1

2-アミノ 2-ノルボルナンカルボン酸 (BCH)

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

L-Kynurenine sulfate salt, KYNA, BCH は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A) から購入した。

2-2-2. 実験動物

in vitro 実験には第 1 章と同様に 7 - 10 週齢の Wistar 系雄ラット (日本クレア株式会社から購入) を実験に用いた。 *in vivo* 実験には 8 週齢の BALB/c 系雄マウス (日本クレア株式会社から購入) を実験に用いた。実験動物用固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社から購入) を自由摂取、自由飲水、室温 22±2 °C、湿度 60±10 %、人工照明 (点灯午前 6 時、消灯午後 6 時) 環境下で馴化させた。

2-2-3. *in vitro* による BCH 添加実験

ラット大脳皮質組織切片を用いた *De novo* KYNA 合成実験は第 1 章と同様の方法でおこなった。BCH は緩衝液中の終濃度が 3 μmol/L-3 mmol/L になるように添加した。

2-2-4. 脳内 KAT 活性測定

マウスから全脳を摘出し、直ちに 5 倍量の 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてテフロンホモジナイザーにて均一化し、エンザイムソースとして用いた。マウス脳の KAT 活性測定は Shibata らの方法に基づいておこなった [44]。200 μmol/L KYN, 20 mmol/L HEPES

緩衝液 (pH 7.5), 188 $\mu\text{mol/L}$ ピリドキサル 5 リン酸, 6 mmol/L 2-オキソグルタルを混合した反応液に 30-3000 $\mu\text{mol/L}$ BCH とエンザイムソースを加え, 37°C で 1 時間インキュベートした (全量 500 μL). 70% 過塩素酸を 70 μL 添加し反応を停止させた. 遠心分離 (12000 $\times g$, 10 分, 4°C) し, 得られた上清の KYNA 濃度を測定し, KAT 活性を算出した.

2-2-5. KYN 経口投与による大脳皮質 KYN, KYNA の経時変化

マウスを 4-5 日間馴化させたのち 6 群に分け, すべての群に 100 mg/kg BW の KYN を経口ゾンデにて強制経口投与した. 0, 0.5, 1, 2, 3, 6 時間後に 1 群ずつ屠殺し, 直ちに大脳皮質を摘出し, KYN, KYNA 濃度を測定した.

2-2-6. *in vivo* における BCH の KYNA 産生

マウスを Vehicle 群 ($n=10$), KYN \cdot Vehicle 群 ($n=5$), KYN \cdot BCH 群の 3 群に分け ($n=5$), 5 日間馴化させ, KYN \cdot BCH 群には BCH (200 mg/kg body weight BW) を尾静脈注射し, 即座に KYN (50 mg/kg BW) を強制経口投与した. Vehicle 群には同様のスケジュールで溶媒である生理食塩水 (0.9% NaCl) を静脈注射, 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を強制経口投与し, KYN \cdot Vehicle 群には生理食塩水を静脈注射, KYN 溶液を強制経口投与した. 強制経口投与 1 時間後に屠殺し, 脳組織 (大脳皮質, 海馬, 線条体), 肝臓, 骨格筋として腓腹筋, 血清を採取した. BCH 投与濃度は Kaira らの報告に基づいて決定した [45].

2-2-7. KYN, KYNA 測定

脳組織は 10 倍量の水 (線条体は 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA-2Na 含 0.1 mol/L HCl) を加えソニケーター (Powersonic model 50; ヤマト科学) を用いて均一化した. 肝臓と腓腹筋は 10 倍量の水を加えポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA, Switzerland) を用いて均一化した. 血清は, 断頭し採取した血液を遠心分離 (3500 $\times g$, 30 分, 4°C) して得た. 組織懸濁液と血清は 6% 過塩素酸で除タンパク, 遠心分離 (12000 $\times g$, 10 分, 4°C) し, 得られた上清を HPLC で測定した. KYNA, KYN の測定は 1 章と同様の方法でおこなった.

2-2-8. 統計解析

数値はすべて平均値 \pm SE で示した. シグモイド曲線は非線形回帰分析で作成した. KYNA 産生, KYN 取り込みに対する IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) は GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) の “log (inhibitor) vs. response” の式を用いて算出した.

BCH 添加濃度における KYNA 産生と KYN 取り込み阻害率は 2 $\mu\text{mol/L}$ KYN 添加の Control 値に対するパーセントで表し, 線形回帰分析をおこない Pearson の相関係数を算出した.

3 群以上の比較には One-way ANOVA の Tukey 法を用いて検定を行った. KYN, KYNA の経時変化の結果の解析には Dunnett 法を用いた. p 値が 0.05 未満のとき, 統計学的有意差があるものとみなした. すべての統計解析に GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した.

2-3. 結果

BCH は *in vitro* において濃度依存的に KYN 取り込み, KYNA 産生を阻害する

LAT 阻害剤 BCH を終濃度 3 $\mu\text{mol/L}$ -3 mmol/L になるよう添加し, *in vitro* での KYN 取り込み量, KYNA 産生量を求めたところ, BCH 添加濃度依存的に KYNA 産生量, 組織切片中 KYN 濃度が抑制された (Fig. 2-2a, b). KYNA 産生量に対する IC_{50} は 90.7 $\mu\text{mol/L}$, 組織切片中 KYN 濃度に対する IC_{50} は 97.4 $\mu\text{mol/L}$ であった. BCH による KYN 取り込み阻害が KYNA 産生にどのように影響しているかを明らかにするために, KYN 取り込みと KYNA 産生の相関を調べた. KYN 取り込み阻害率と KYNA 産生阻害率の間には正の相関が認められた (Fig. 2-2c; $y = 0.95x + 2.03$, $r = 0.997$; $p < 0.0001$). KYN 取り込みと KYNA 産生との間に得られた回帰式の傾きより, BCH による KYN 取り込み阻害と KYNA 産生阻害の間には 1:1 の関係が示された. よって, KYNA 産生は LAT を介した KYN 取り込みに依存していることが示唆された.

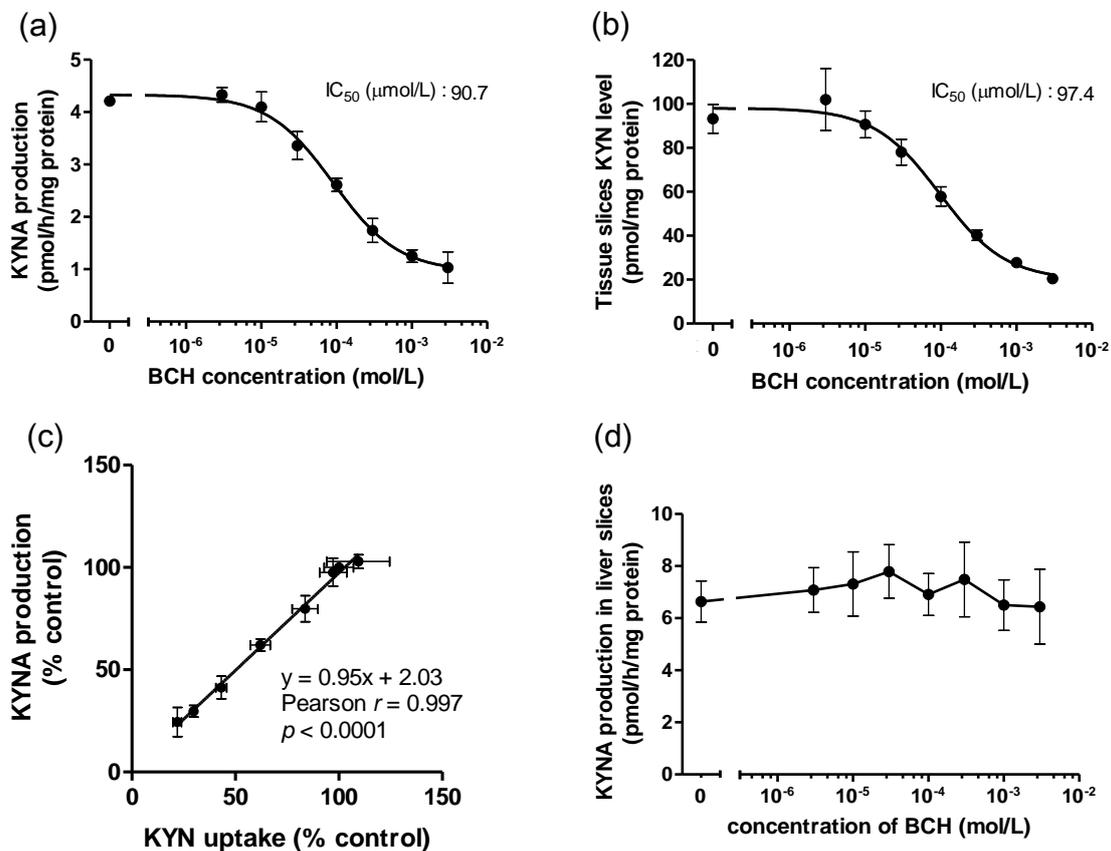


Fig. 2-2 LAT 阻害剤 BCH が KYNA 産生と KYN 取り込みに与える影響

(a) BCH 添加による大脳皮質組織切片の KYNA 産生の阻害曲線, (b) 組織切片中 KYN 濃度の阻害曲線, (c) BCH 添加による KYN 取り込みと KYNA 産生の相関関係, (d) BCH 添加による肝臓組織切片の KYNA 産生量. 値は平均値 \pm SE ($n = 4-6$), シグモイド曲線は非線形回帰分析, 回帰直線は線形回帰分析で作成した. 統計解析, グラフの作成には GraphPad Prism 5.0 を用いた.

KYN 経口投与による大脳皮質 KYN と KYNA の経時変化

KYN の投与条件を決定するため、KYN 経口投与による大脳皮質 KYN, KYNA 濃度の経時変化を明らかにした。KYN (100 mg/kg BW) を経口投与し、0, 0.5, 1, 2, 3, 6 時間後に屠殺した。大脳皮質の KYN 濃度は 0 時間と比較して投与後 0.5 時間と 1 時間に 50 倍、投与後 2 時間に 20 倍高値を示し、投与後 0.5 時間がピークであった (Fig. 2-3a; $p < 0.0001$)。KYNA 濃度は 0.5 時間と 1 時間に 5-6 倍高値を示し、投与後 1 時間がピークであった (Fig. 2-3b; $p < 0.0001$)。KYN, KYNA 濃度ともに投与後 6 時間にはベースレベルに戻った。これらの結果から、*in vivo* BCH 投与実験では KYN 経口投与 1 時間後に屠殺することに決定した。

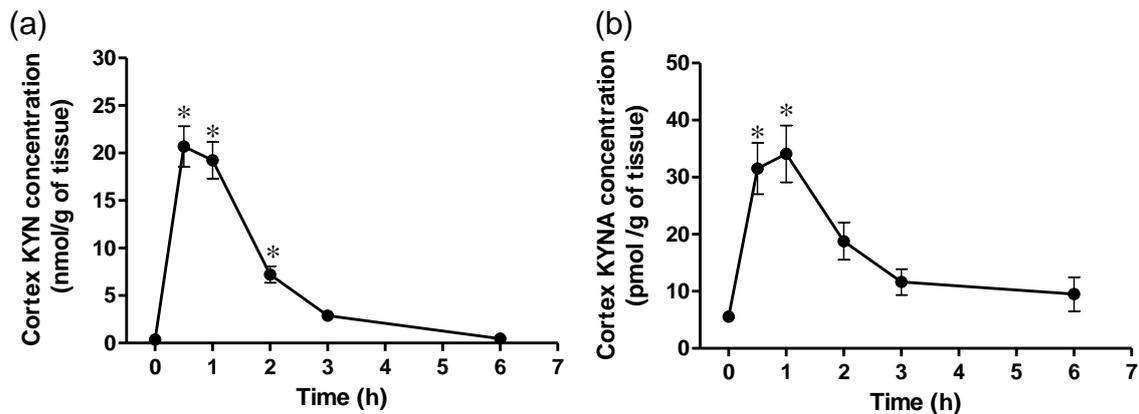


Fig. 2-3 KYN 経口投与による (a) 大脳皮質 KYN 濃度, (b) 大脳皮質 KYNA 濃度の経時変化

KYN (100 mg/kg BW) 経口投与後、0, 0.5, 1, 2, 3, 6 時間後の KYN, KYNA 濃度をそれぞれ示した。値は平均値 \pm SE ($n = 6-8$ /各時間), 投与後 0 時間と比較した。* $p < 0.05$, 検定には One way ANOVA の Dunnett 法を用いた。

BCH は *in vivo* においてマウス脳内 KYNA, KYN 濃度を抑制する

脳内 KYNA 産生に対する BCH の影響を明らかにするために、BCH (200 mg/kg BW) を静脈注射、KYN (50 mg/kg BW) を強制経口投与したマウスの脳組織中 KYN, KYNA 濃度を測定した。KYN・Vehicle 投与群の大脳皮質 KYN 濃度は 7.46 ± 0.32 nmol/g tissue であり、Vehicle 投与群と比較して約 17 倍高値であった (Fig. 2-4a; 0.44 ± 0.09 nmol/g tissue; $p < 0.0001$)。KYN・BCH 投与群では KYN・Vehicle 投与群の約 50% となり、有意に低値を示した ($p < 0.05$)。同様の結果が線条体、海馬についても得られた (Fig. 2-4b, c)。

KYN・Vehicle 投与群の大脳皮質 KYNA 濃度は 27.0 ± 3.9 pmol/g tissue であり、Vehicle 投与群と比較して約 17 倍高値であった (Fig. 2-4d; 2.8 ± 0.5 pmol/g tissue; $p < 0.05$)。KYN・BCH 投与群の大脳皮質 KYN 濃度は 17.9 ± 2.8 pmol/g tissue であり、KYN・Vehicle 投与群の約 70% の値を示した ($p < 0.05$)。同様の結果が線条体、海馬についても得られた (Fig. 2-4e, f)。BCH 単独の投与は脳内 KYN, KYNA 濃度に影響しなかった。これらの結果から、*in vivo* における LAT の阻害は、脳への KYN 取り込みを抑制することで KYNA 産生の増加を抑制することが示唆された。

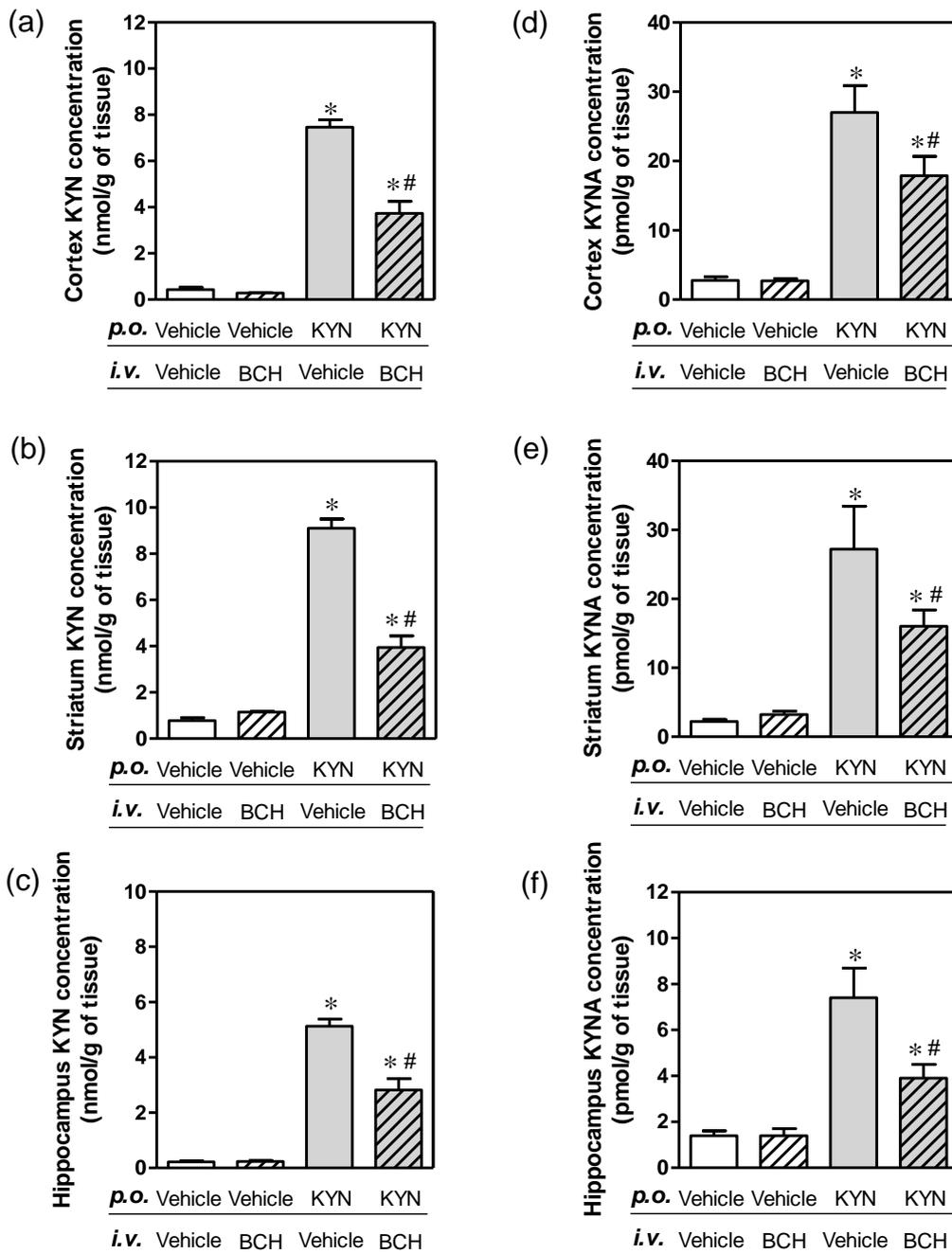


Fig. 2-4 LAT 阻害剤 BCH 投与による脳組織中 KYN, KYNA 濃度

(a) 大脳皮質 KYN 濃度, (b) 線条体 KYN 濃度, (c) 海馬 KYN 濃度, (d) 大脳皮質 KYNA 濃度, (e) 線条体 KYNA 濃度, (f) 海馬 KYNA 濃度. マウスには Vehicle, BCH (200 mg/kg BW, *i.v.*), KYN (50 mg/kg BW, *p.o.*) のそれぞれか, KYN と BCH の両方を投与した. 値は平均値±SE (n=5-10), * $p < 0.05$ vs Vehicle 群, # $p < 0.05$ vs KYN 投与群, 検定には One way ANOVA の Tukey 法を用いた.

in vivo BCH 投与による末梢 KYN, KYNA 濃度

BCH が末梢への KYN 取り込み, KYNA 産生にあたる影響を明らかにするために, 腓腹筋, 肝臓, 血清中 KYN, KYNA 濃度を測定した. 腓腹筋 KYN, KYNA 濃度は, KYN・Vehicle 投与群で Vehicle 投与群の 13 倍高値を示した (Fig. 2-5a, d; $p < 0.05$). 肝臓 KYN, KYNA 濃度は KYN・Vehicle 投与群で Vehicle 投与群の約 2.8 倍高値を示したが, 腓腹筋と比べると両群間の差は少なかった (Fig. 2-5b, e; $p < 0.05$). 腓腹筋では脳組織と同様に, KYN・BCH 投与群で KYN・Vehicle 投与群と比べて有意に低値を示したが (Fig. 2-5a, d; $p < 0.05$), 肝臓では KYN・Vehicle 投与群と KYN・BCH 投与群の間に有意差はなかった (Fig. 2-5b, e; $p < 0.05$). 血清では, KYN・BCH 投与群で KYN, KYNA 濃度が高値を示した (Fig. 2-5c, f; $p < 0.05$). すべてにおいて, 脳組織と同様に BCH 単独の投与は骨格筋, 肝臓および血清の KYN, KYNA 濃度に影響しなかった.

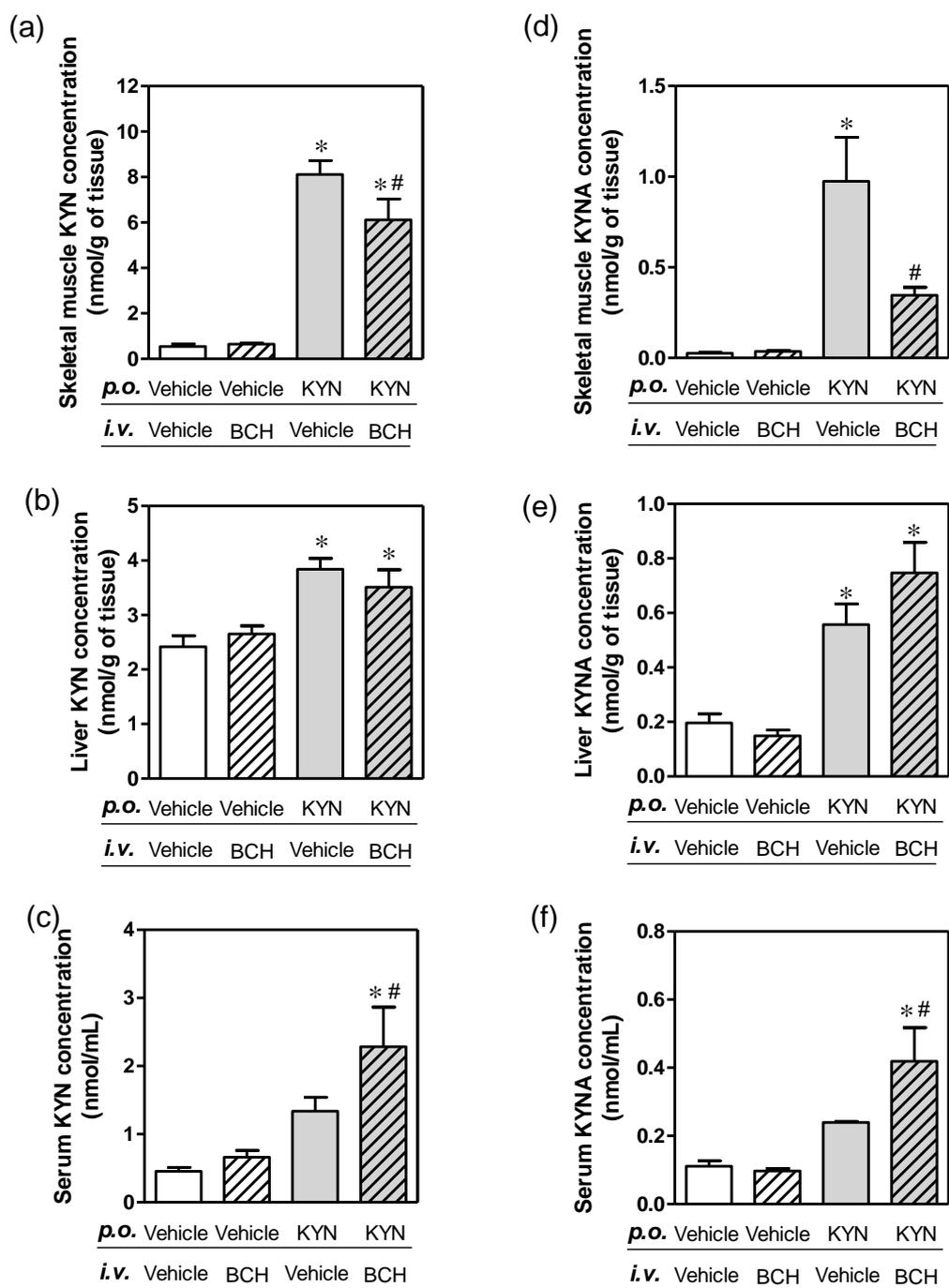


Fig. 2-5 LAT 阻害剤 BCH 投与による末梢 KYN, KYNA 濃度

(a) 骨格筋 KYN 濃度, (b) 肝臓 KYN 濃度, (c) 血清中 KYN 濃度, (d) 骨格筋 KYNA 濃度, (e) 肝臓 KYNA 濃度, (f) 血清中 KYNA 濃度. 値は平均値±SE (n=5-10), * $p < 0.05$ vs Vehicle 群, # $p < 0.05$ vs KYN 投与群, 検定には One way ANOVA の Tukey 法を用いた.

2-4. 考察

本章では、LAT による脳内 KYN 取り込みと脳内 KYNA 産生との関係をより明確にするため、LAT 阻害剤である BCH を用いて、*in vitro* さらに *in vivo* における脳内 KYN 取り込みと KYNA 産生の関係を明らかにした。*in vitro* 実験では、BCH 添加によって濃度依存的に KYNA 産生と KYN 取り込みが抑制された。*in vivo* 実験では、KYN 投与による脳内 KYN・KYNA 産生の上昇が BCH 投与によって抑制された。これらの結果から、BCH を用いた LAT の阻害は脳への KYN 取り込みを抑制し、それに伴って KYNA 産生を抑制することが示唆された。本研究は、脳内 KYNA 産生における LAT 制御の重要性を示す初めての報告である。

1 章でも述べた通り、LAT は細胞膜に存在する Na⁺非依存性中性アミノ酸トランスポーターであり、LAT1 と LAT2 の 2 つのアイソフォームがある。12 回膜貫通型の LAT と 1 回膜貫通型の 4F2hc がジスルフィド結合したヘテロ 2 量体がアミノ酸輸送体として機能する [46]。LAT1 は bulky な側鎖をもった大型中性アミノ酸（分岐鎖や芳香族）を高親和に輸送し、LAT2 は基質選択性が広く、小型の中性アミノ酸（Ala や Ser など）も基質とする [47, 48]。LAT は個々の細胞に栄養としてのアミノ酸を供給する目的のほか、特に LAT1 は脳毛細血管や胎盤の合飽体栄養細胞に存在し、血液脳関門や胎盤関門における大型中性アミノ酸の透過を担っている [49]。LAT1 は癌細胞に過剰発現し、その栄養供給に用いられているという報告から、癌治療のターゲットとして多く研究されている。今回用いた BCH は 1960 年代にアミノ酸トランスポーター研究のために合成された人工アミノ酸であり [50]、LAT の阻害剤として主に腫瘍細胞株を用いた研究において広く使用されている [51, 52]。BCH は LAT1 と LAT2 両方の基質となり [53]、げっ歯類に投与しても代謝されずに尿中にそのまま排出される [50, 55]。1 章の結果より、KYN は LAT1 で主に輸送されると考えられる。LAT1 の特異的な阻害剤は甲状腺ホルモンであるトリヨードチロニンやがん治療薬であるメルファランなどがあるが、生体への影響を考慮し、今回はマウスへの生体投与の例もある BCH を用いた [45]。細胞から KYN を排出するトランスポーターとその制御については不明である。細胞から Trp を排出するトランスポーターとしては TAT1 があり、腎臓と骨格筋に高発現している。KYN も TAT1 を介して排泄されている可能性が考えられる。今回得られた結果から、BCH は *in vitro*、さらに *in vivo* において脳内の KYN 取り込みを阻害するということが明確に示された。KYN 経口投与によるマウスの脳内 KYN、KYNA 濃度は 0.5-1 時間後にピークに達した。このことから、経口投与した KYN はマウスの脳内に直ちに取り込まれ、KYNA に代謝されることが示された。*in vitro* 実験において、BCH による KYN 取り込みと KYNA 産生の阻害率は 1 対 1 の正の相関を示し (Fig. 2-2c)、1 章の KYNA 産生は KYN 取り込みに依存するという結果 (Fig. 1-5c) と一致する。また、データは掲載していないが、BCH は脳の KAT 活性には全く影響しなかった。これらのことから、BCH による KYNA 産生の抑制は、KAT 活性ではなく、KYN 取り込みにのみ依存することが明らかになった。

Agudelo らの報告より、骨格筋の KYN 代謝が変化することによって血中の KYN が変化し、脳内の KYN 代謝の変動やそれに伴う鬱症状を引き起こすということが明らかになった [55]、よって本研究では末梢の KYN, KYNA 産生も測定し、末梢組織との関連も明らかにした。骨格筋では脳組織と同様に KYN 投与による KYN, KYNA 濃度の増加が BCH 投与で抑制されたが、肝臓では BCH の投与は KYN, KYNA 濃度に影響せず、肝臓の組織切片を用いた *in vitro* 実験においても BCH は KYNA 産生に作用しなかった。LAT1 は脳、血液脳関門、脾臓、胎盤、卵巣、精巣、癌細胞に、LAT2 は小腸、腎臓、脳、骨格筋、胎盤、卵巣、精巣に発現しており、肝臓にはどちらの LAT も発現していない [47, 48]。今回得られた骨格筋と肝臓の結果は LAT の局在と一致するものであった。肝臓において LAT が発現していないことは、KYN 投与による KYN, KYNA 濃度の増加も他の組織と比べて少なかったことにも影響していると考えられる。KYN は Na⁺依存性と非依存性のどちらの状態においても輸送されることが分かっている。LAT は Na⁺非依存性であるため、何らかの Na⁺依存性の KYN トランスポーターが肝臓に存在し、高濃度の KYN が存在する場合にわずかに肝臓に KYN を取り込むのではないかと推測する。また、血清では KYN のみを投与した群よりも、KYN・BCH 群で KYN, KYNA 濃度が高値を示した。BCH の投与によって、LAT が発現している組織への KYN 取り込みが抑制されたことで、取り込まれなかった KYN が血中に余ったのではないかと考える。肝臓と非肝臓組織は異なる Trp 代謝経路をもつ。肝臓では、Trp はアセチル CoA や NAD に合成に使われる [56]。ナイアシン欠乏ラットを用いた実験では、外因性の KYN はナイアシン合成には利用されないという報告がある [57]。また、TDO ノックアウトマウスを用いた報告では、血中の KYN は肝臓ではなく非肝臓組織由来であるということが示唆されている [58]。これらの報告から、通常は血中の KYN は肝臓にほとんど取り込まれず、利用もされず、肝臓で Trp から代謝された KYN がそのまま血中に放出されることはないと考えられる。逆に非肝臓組織には Trp から NAD を合成する経路は存在せず、KYN は血中から取り込まれ、放出もされうる [57]。本研究では、組織への KYN 取り込みと KYNA 合成という観点においても肝臓と非肝臓組織では異なる特徴をもつということを明らかにした。

1 章でも述べた通り、薬理的な KYNA 産生制御に関する報告は数多くあり、ほとんどが KAT 活性の調節に着目したものである [59-62]。本研究は *in vivo* で LAT を制御することによって KYNA 産生を抑制させた初めての報告である。また、KYNA の前駆体としてだけではなく、KYN は脳内の炎症性サイトカインを惹起させる作用があり、鬱症状との関連が報告されている [55, 63, 64]。LAT の制御による KYN 調節は、鬱症状の改善にも寄与しうると考えられる。LAT1 はがん研究の分野において盛んに研究がされており、がん治療の目的ですでに LAT1 特異的阻害薬が開発され、臨床研究がなされている [65-67]。本研究の結果は、LAT1 治療薬の精神疾患治療への新たな作用を示すものだと期待できる。

食餌由来の大型中性アミノ酸が LAT を介して神経伝達物質を調節することがいくつか報告されている。例えば, Trp の割合が多い α -ラクトアルブミンの摂取はラットの脳内 Trp 量やセロトニン合成ならびに放出を増加させる [68,69]。分岐鎖アミノ酸摂取によって脳内のチロシン取り込み, ドーパミン合成が低下する [70]。序論でも示したが, 高 Trp 食摂取によってラット脳内 KYNA 産生が末梢 KYN の増加に伴って上昇し, KYNA 産生上昇を介したドーパミン放出が抑制されるという報告や [16], 高脂肪・低タンパク・低炭水化物食であるケトン食を長期間摂取することで, ラット脳内 KYNA 濃度が上昇するという報告がある [17]。1 章および 2 章の結果より, 食事によるアミノ酸の摂取が脳内 KYNA 産生を調節しうると考えられる。

2 章では LAT による脳内 KYN 取り込みと脳内 KYNA 産生との関係をより明確にするため, LAT 阻害剤である BCH が *in vitro* と *in vivo* における脳内 KYN 取り込みと KYNA 産生におよぼす影響をあきらかにした。結果, 脳内 KYNA 産生制御における LAT 制御の重要性が示された。LAT の基質となるアミノ酸の摂取が, ドーパミンやグルタミン酸などの神経伝達物質放出を調節することが期待できる。KYNA は統合失調症やアルツハイマー, KYN はストレス性のうつ症状など, さまざまな精神疾患と関連している。LAT に着目した KYN と KYNA の調節は, あらゆる精神疾患に立ち向かえる可能性を秘めていると考えられる。

3章. キヌレン酸産生変動因子の解明 –急性肝炎が脳内キヌレン酸産生におよぼす影響–

3-1. 序論

1章, 2章では脳内 KYNA 産生を制御する栄養成分を探索し, アミノ酸, 特に LAT の基質となる大型中性アミノ酸の有用性を明らかにした. 本章ではもう一つの課題である脳内 KYNA 産生変動因子の解明を目的とする. 1, 2章の成果は, キヌレン酸産生が誘発する高次脳機能低下はアミノ酸によって調節できることを示している. しかし, この作業仮説を証明するためには, キヌレン酸産生亢進が生じる因子を明らかにし, その作用部位と作用機序を解明する必要がある.

先述したとおり, 骨格筋の KYN 代謝が変化することによって血中の KYN が変化し, 脳内の KYN 代謝の変動やそれに伴う鬱症状を引き起こすという報告がある [55]. 先行研究より, 高 Trp 食摂取によって脳内 KYNA 産生が増加し, ドーパミン放出が低下する[16]. また, 2章で示した通り BCH の投与は骨格筋や血清など末梢の KYN にも影響を与えていた. これらのことから, 末梢の Trp 代謝の変化が脳内 KYN, KYNA に影響することが考えられる. 末梢の主要な Trp 代謝臓器は肝臓であり, 肝臓において Trp は KYN 経路を経て NAD に合成される. KYN 経路の律速酵素はトリプトファン 2,3 デオキシゲナーゼ (TDO) である. 肝炎によって KYN 経路の代謝が変動することがいくつか報告されている. オロチン酸誘発性脂肪肝ではラットの肝臓中 TDO 活性が低下する [71]. D-ガラクトサミンや四塩化炭素誘発性の肝炎ではラットの尿中 Trp 代謝産物排泄量の変動する [72, 73]. これらの報告から, 本章では末梢トリプトファン代謝異常を示す疾患として急性肝炎に着目し, 脳内キヌレン酸産生への影響を明らかにすることを目的とした. 急性肝炎を誘発する薬剤としてよく用いられている肝毒素であるチオアセトアミド(TAA; Fig. 3-1)を投与し, 脳や末梢の KYN, KYNA 産生を明らかにした.

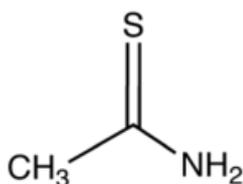


Fig. 3-1
チオアセトアミド (TAA)

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

L-Kynurenine sulfate salt, KYNA は Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A) から購入した. TAA は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した. GPT/ALT-PIII, GOT/AST-PIII のフジドライケムスライドは富士フイルム株式会社 (Tokyo, Japan) から購入し, それぞれアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性の測定に用いた.

3-2-2. TAA 投与急性肝炎モデル

Wistar 系雄ラット (230-260g) を日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) から購入し、実験に用いた。実験動物用固形飼料 MF (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) を自由摂取、自由飲水させ、室温 22 ± 2 °C、湿度 60 ± 10 %、明暗サイクルは 12 時間 (明期 6 時~18 時) で飼育した。

急性肝炎モデルは TAA (200 mg/kg, n=6) を 1 日 1 回、3 日間腹腔投与し作成した [74]。Vehicle 群には生理食塩水を同様に投与した (n=7)。最終投与から 24 時間後に屠殺し、脳組織 (大脳皮質、海馬、線条体) と肝臓を摘出し測定に用いた。血清は、断頭し採取した血液を遠心分離 ($3500 \times g$, 30 分, 4°C) して得た。血清 ALT, AST の値はフジドライケム 3500V (富士フイルム株式会社) を用いて測定した。組織の処理, KYNA と KYN の測定は 2 章と同様におこなった。

3-2-3. 肝臓中 TDO 活性測定

肝臓の一部を 5 倍量の 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えてテフロンホモジナイザーにて均一化し、エンザイムソースとして用いた。TDO 活性の測定は Fukuwatari らの方法に基づいておこなった [75]。0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0), 0.5 mol/L Trp を含んだ反応液にエンザイムソースを添加し (全量 1500 μL), 37°C , 60 分間インキュベートした。70% 過塩素酸を 60 μL 添加し反応を停止させた。遠心分離 ($12000 \times g$, 10 分, 4°C) し、得られた上清の KYN 濃度を測定し、TDO 活性を算出した。

3-2-4. 統計解析

数値はすべて平均値 \pm SE で示した。GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) による Unpaired *t*-test を統計解析に使用した。*p* 値が 0.05 未満のとき、統計学的有意差があるものとみなした。

3-3. 結果

急性肝炎が脳内 KYNA, KYN 濃度におよぼす影響

TAA 投与により、血清 ALT と AST の値はそれぞれ $482 \pm 69\text{U/L}$, $124 \pm 12\text{U/L}$ であり、Vehicle 投与の約 2 倍、4 倍の値であった (Table. 3-1)。

TAA 誘発急性肝炎が脳内 KYNA 産生におよぼす影響を明らかにするために、TAA (200 mg/kg BW) を投与したラットの脳内 KYNA, KYN 濃度を測定した。TAA 投与群の大脳皮質 KYNA 濃度は $16.7 \pm 4.0\text{ pmol/g tissue}$ であり、Vehicle 投与群の約 2 倍高値であった (Fig. 3-2a; $7.3 \pm 1.0\text{ pmol/g tissue}$, $p < 0.05$)。同様の結果が線条体と海馬においても得られた (Fig. 3-2b, c)。大脳皮質 KYN 濃度は、TAA 投与群で $1.00 \pm 0.10\text{ nmol/g tissue}$ であり、Vehicle 投与群の約 1.6 倍であった (Fig. 3-3a; $1.00 \pm 0.10\text{ nmol/g tissue}$, $p < 0.05$)。同様の結果が線条体と海馬においても得られた (Fig. 3-3b, c)。

Table. 3-1 TAA 誘発性急性肝炎ラットにおける血清トランスアミナーゼ活性

| | Vehicle | TAA |
|-----------|------------|---------------|
| AST (U/L) | 200 ± 7.17 | 482 ± 69.2*** |
| ALT (U/L) | 31 ± 0.92 | 124 ± 11.5*** |

値は平均値±SE (n=6-7), *** $p < 0.001$ vs Vehicle 投与群, 検定には unpaired t -test を用いた.

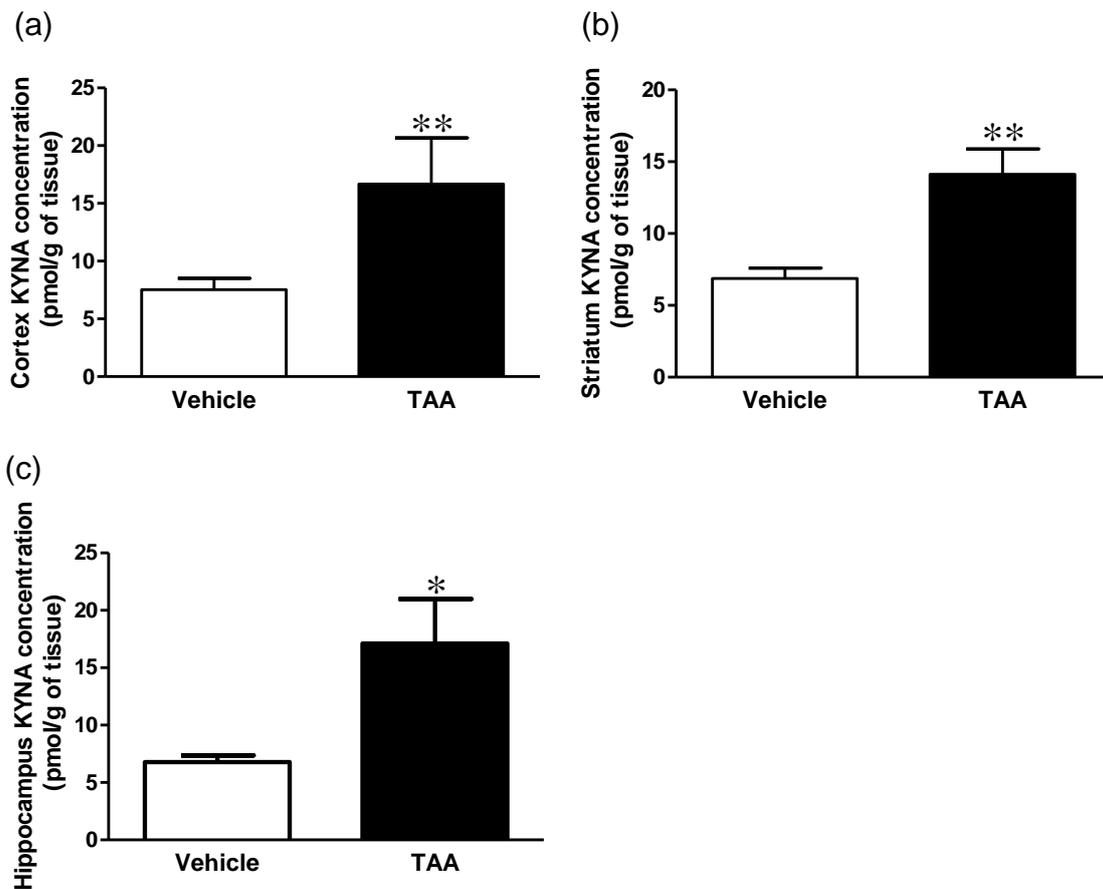


Fig. 3-2 TAA 誘発性急性肝炎における (a) 大脳皮質, (b) 線条体, (c) 海馬の KYNA 濃度

ラットには Vehicle または TAA (200 mg/kg BW, i.p.) を投与した. 値は平均値±SE (n=6-7), * $p < 0.05$,

** $p < 0.01$ vs Vehicle 投与群, 検定には unpaired t -test を用いた.

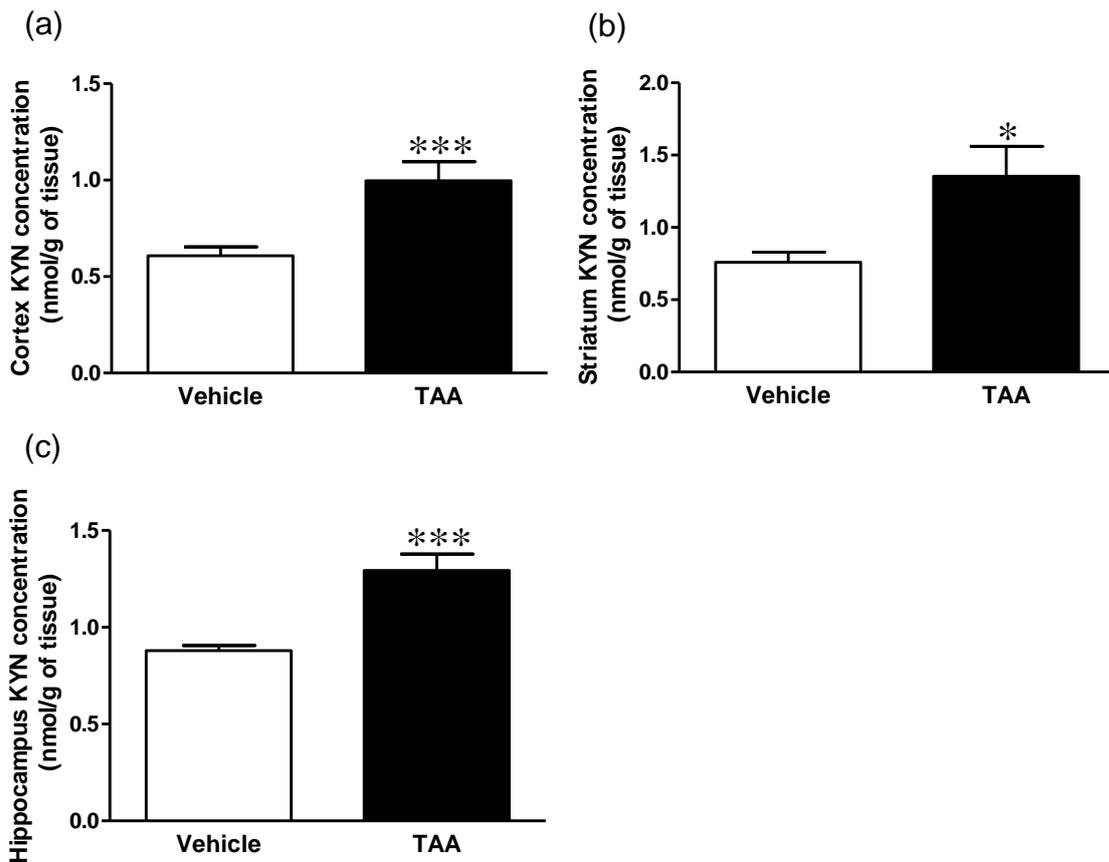


Fig. 3-3 TAA 誘発性急性肝炎における (a) 大脳皮質, (b) 線条体, (c) 海馬の KYN 濃度
 ラットには Vehicle または TAA (200 mg/kg BW, i.p.) を投与した. 値は平均値±SE (n =6-7), * $p < 0.05$,
 *** $p < 0.005$ vs Vehicle 投与群, 検定には unpaired t -test を用いた.

急性肝炎が末梢 KYNA, KYN 濃度におよぼす影響

血清中 KYN 濃度は, TAA 投与群で 20.5 ± 3.0 nmol/mL であり, Vehicle 投与群の約 2 倍高値であった (Fig. 3-4a; 9.4 ± 1.7 nmol/mL, $p < 0.001$). 同様に, 肝臓中 KYN 濃度は, TAA 投与群で 1.11 ± 0.16 nmol/g tissue であり, Vehicle 投与群の約 3 倍高値であった (Fig. 3-4b; 0.40 ± 0.03 nmol/g tissue, $p < 0.001$). 血清, 肝臓中 KYNA 濃度はどちらも TAA 投与による影響は受けなかった. (Fig. 3-4c, d).

TAA 投与群の肝臓 TDO 活性は 0.63 ± 0.09 μ mol/hr/g tissue であり, Vehicle 投与群の約 60% の値であった (Table. 3-2; 1.06 ± 0.11 μ mol/hr/g tissue, $p < 0.05$).

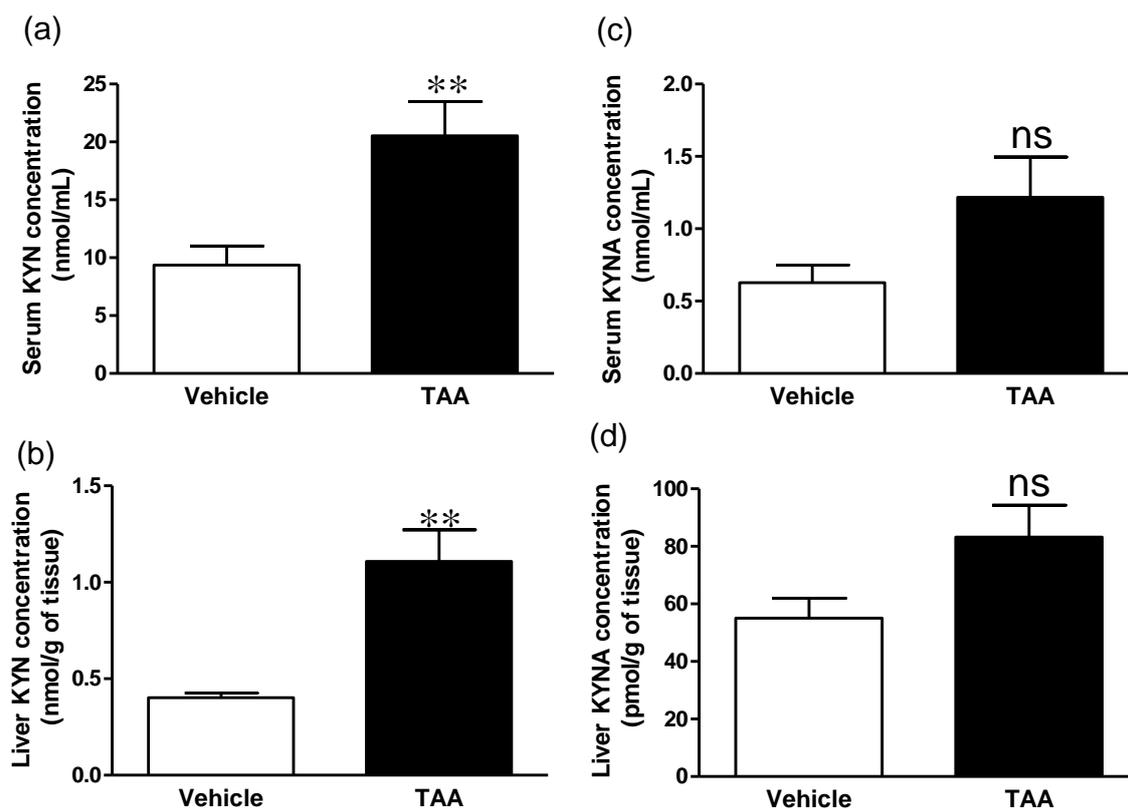


Fig. 3-4 TAA 誘発性急性肝炎における (a) 血清, (b) 肝臓中の KYN 濃度, (c) 血清, (d) 肝臓中の KYNA 濃度

ラットには Vehicle または TAA (200 mg/kg BW, i.p.) を投与した。値は平均値±SE (n=6-7), ** $p < 0.01$ vs Vehicle 投与群, 検定には unpaired t -test を用いた。

Table. 3-2 TAA 誘発性急性肝炎ラットにおける肝臓 TDO 活性

| | Vehicle | TAA |
|------------------------------------|-------------|--------------|
| Liver TDO ($\mu\text{mol/hr/g}$) | 1.06 ± 0.11 | 0.63 ± 0.09* |

値は平均値±SE (n=6-7), * $p < 0.05$ vs Vehicle 投与群, 検定には unpaired t -test を用いた。

3-4. 考察

TAA は肝臓でシトクローム P450 やフラビン含有モノオキシゲナーゼによって求電子代謝物である TAA S-Oxide に代謝される。これが小葉中心領域（中心静脈に接した部分）に架橋形成壊死やリンパ球浸潤を引き起こし、肝細胞壊死を惹起する [76]。いわゆる薬物性肝障害を誘発する。本研究では、TAA 誘発性の急性肝炎が脳内の KYNA 産生と末梢の Trp 代謝におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。TAA 投与により、ラットの脳内 KYNA 産生は増加し、脳内および血中の KYN も同様に増加した (Fig. 3-2, 3)。1 章と 2 章より、脳内の KYNA 産生は LAT による KYN 取り込みに依存することが分かっている。よって、急性肝炎は血中 KYN の上昇を誘発し、それに伴って、脳内への KYN 取り込みと KYNA 産生を増加させることが示唆された。TAA 誘発性肝炎モデルでは、脳内の KATII 発現が増加し KYNA 産生が上昇するという報告がある [77, 78]。本研究において脳内と血中の KYN が上昇することが示されたことから、急性肝炎による KYNA 濃度の上昇には、KATII の変化だけでなく、末梢の Trp-KYN 代謝の変化も寄与していると示唆される。

TDO は KYN 経路の律速酵素であり、主に肝臓に存在する。TDO のアイソザイムであるインドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ (IDO) は肺、小腸、脳などの非肝臓組織や、マクロファージ、樹状細胞に存在する [79]。TDO を欠損させた TDO ノックアウトマウスでは、肝臓での Trp 代謝がおこなわれないかわりに、非肝臓組織の IDO 由来の KYN によって血漿中の KYN 濃度が高値を示すことが報告されている [80]。急性肝炎により TDO 活性が低下し、血清の KYN 量が高値を示した。この結果は、TDO ノックアウトマウスの報告と一致している。肝臓の KYN 量も血清の結果と一致して高値であった。IDO は IFN- γ や TNF- α などの炎症性サイトカインによって誘導されることでも知られている。LPS の投与による炎症は IDO を誘導し、血中や脳の KYN を上昇させる [81]。TAA 誘発性急性肝炎においても IL-1 β や TNF- α が増加するため [82]、本研究における脳と血中 KYN の上昇はそれら炎症性サイトカインによる IDO 誘導が関与している可能性も考えられる。IDO の誘導による Trp の枯渇ならびに KYN の増加は、T 細胞の増殖抑制やアポトーシスをもたらすことで免疫抑制に働いている。IDO はヒトでは非自己と接する胎盤、肺、小腸、大腸に発現しており、胎児に対する免疫寛容や病原菌に対する過剰な免疫反応を抑制するなど、重要な役割を担っていると考えられている [83]。この免疫システムへの関与がそれらの組織において KYN 経路が存在する生理的意義と推測されている。

肝炎と関連する精神疾患としては肝性脳症が有名である。本研究では検証はしていないが、今回用いた TAA の投与方法によって、昏迷や高アンモニア血症、脳内アンモニアの高値といった肝性脳症様の兆候が生じることが報告されている [84]。また、他の肝性脳症モデルではドーパミン神経伝達が阻害され、それに伴ってうつや不安症状、学習や運動機能障害が生じることが報告されている [85, 86]。序論で述べたように、KYNA の増加は脳内ドーパミン放出を抑制することから、TAA 投与モデルにおける KYNA 産生の増加がドーパミン

神経伝達に関与している可能性が考えられる。また、肝性脳症の初期には、うつや統合失調症様の症状が表れる [88, 89, 90]。先述のとおり KYNA は統合失調症や認知機能障害、KYN はうつ様症状を誘発する[4, 5, 6, 91, 92]。これらのことから、急性肝炎による KYNA 産生の増加は、肝性脳症の発症や初期症状に寄与している可能性が示唆される。KYNA 産生の増加はグルタミン酸放出を抑制する作用があるが、TAA 誘発肝性脳症モデルでは細胞外液中グルタミン酸濃度が増加する [78]。他の報告でも、急性肝炎による肝性脳症では、グルタミン酸の再取り込み阻害や放出増加によってグルタミン酸神経伝達が増大することが示されている [93, 94]。このモデルでは KYN 投与によってさらに KYNA 濃度を高めることでグルタミン酸濃度上昇が抑制された。TAA 誘発肝性脳症によって生じるグルタミン酸神経伝達増大は同時に生じる程度の KYNA 増加量では影響されず、さらに極端に KYNA を増やすことで、KYNA の $\alpha 7nAChR$ を介した放出抑制作用が機能すると推測する。

KYN は KYNA 以外にも kynureninase によってアンスラニル酸, kynurenine 3-monooxygenase によって 3-HK に代謝される。3-HK への代謝が肝臓での NAD 合成における主経路である。Kynurenine 3-mono oxygenase の SNP をもったヒトの脳脊髄液中 KYNA 濃度が高いという報告があり、統合失調症患者にもこの SNP を持つ人が存在する[18, 95, 96]。統合失調症発症と SNP の有無との関係についてなど不明な点もあるが、脳内 KYNA 亢進と精神疾患が実際にヒトでも起こりうることを示す重要なエビデンスである。現時点で肝機能と精神疾患の関わりを言及する報告は乏しいが、肝機能低下が精神疾患や高次脳機能低下を誘発する新しい因子となるかもしれない。

本章では、TAA 誘発性急性肝炎が血清 KYN 濃度上昇を介して脳内 KYN, KYNA 濃度を上昇させることを明らかにした。血中 KYN 濃度は、末梢の Trp 代謝変動の影響をうけることが示唆された。肝炎以外にも腎不全において末梢 Trp 代謝が変動することが報告されている[97]。具体的には、腎不全では肝臓の TDO 活性が高くなることで血中や脳脊髄液中の KYN 濃度が上昇することが分かっている。グルカゴンは TDO 活性を上昇させる作用が分かっており、腎臓で主に代謝されるグルカゴンの血中濃度が腎不全によって上昇したことが原因であるとされている。このように、様々な組織における代謝変化が末梢の KYN 代謝に影響していることから、脳内 KYNA 産生変動は、全身のあらゆる代謝変化が複雑に作用することで生じていると推測される。栄養学的アプローチを用いて脳内 KYNA 産生を変動させ、高次脳機能低下や精神疾患を予防／改善することが期待できると考えられる。

結論

本学位請求論文は、末梢代謝に着目し脳内 KYNA 産生を変動させる因子と食品成分を解明することを目的として研究をおこなった。KYNA 産生を抑制する食品成分としてアミノ酸に着目しスクリーニングした結果、タンパク質を構成するアミノ酸のうち 10 種のアミノ酸がキヌレン酸産生抑制作用を示した。そのうちの 5 種が LAT の基質であり、これまで KYNA 研究で着目されていない制御方法であったことから、LAT 阻害剤を用い脳内 KYN 取り込みと KYNA 産生との関係を明らかにした。この成果は、キヌレン酸産生が誘発する高次脳機能低下はアミノ酸によって調節できることを示している。

また、KYNA 産生が変動する因子として肝疾患に着目し、TAA 誘発性急性肝炎では末梢 KYN 代謝が変動し、脳内 KYN, KYNA 濃度が上昇することを明らかにした。肝機能低下が KYNA 産生を増加させる因子の 1 つであるということ、さらには、脳内 KYNA の変動を考える場合、全身の Trp 代謝に着眼し統合的に理解することが必要であることを見出した。

本研究は、アミノ酸摂取や末梢代謝といった基礎栄養学的な視点から精神疾患を予防／改善するための基礎研究と位置付けられる。アミノ酸スクリーニングの発展として、本研究室ではアミノ酸添加食摂取による KYNA 産生について実験をおこなっており、スクリーニングで該当したアミノ酸が *in vivo* においても KYNA 産生を抑制することが概ね明らかになっている。今後さらに KYNA 産生抑制作用を示すアミノ酸どうしの相互作用や KYNA 抑制に適した組成などに発展させることで、精神疾患に対する機能性食品の開発や創薬に繋げることができる。また、本研究で明らかにした急性肝炎の結果を皮切りに、末梢における KYNA 代謝の臓器相関と、脳内 KYNA や脳機能への寄与を網羅的に解明することで、精神疾患の予防、早期発見、治療に応用できると考える。本研究は、栄養学的アプローチによる精神疾患予防を実現する一助となるだろう。

引用文献

1. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89(1):73-120.
2. Carpenedo R, Pittaluga A, Cozzi A, Attucci S, Galli A, Raiteri M, Moroni F (2001) Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur J Neurosci* 13:2141–2147.
3. Rassoulpour A, Wu HQ, Ferré S, Schwarcz R (2005) Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *J Neurochem* 93:762–765.
4. Erhardt S, Schwieler L, Emanuelsson C, Geyer M (2004) Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biol Psychiatry* 56:255-260.
5. Chess AC, Bucci DJ (2006) Increased concentration of cerebral kynurenic acid alters stimulus processing and conditioned responding. *Behav Brain Res* 170:326-332.
6. Chess AC, Simoni MK, Alling TE, Bucci DJ (2007) Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophr Bull* 33:797-804.
7. Chess AC, Landers AM, Bucci DJ (2009) L-Kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behav Brain Res* 201:325-331.
8. Amori L, Wu HQ, Marinozzi M, Pellicciari R, Guidetti P, Schwarcz R (2009a) Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum. *Neuroscience* 159:196-203.
9. Zmarowski A, Wu HQ, Brooks JM, Potter MC, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP (2009) Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release. *Eur J Neurosci* 29:529-538.
10. Konradsson-Geuken A, Wu HQ, Gash CR, Alexander KS, Campbell A, Sozeri Y, Pellicciari R, Schwarcz R, Bruno JP (2010) Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience* 169:1848-1859.

11. Potter MC, Elmer GI, Bergeron R, Albuquerque EX, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R (2010) Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology* 35:1734-1742.
12. Kozak R, Campbell BM, Strick CA, Horner W, Hoffmann WE, Kiss T, Chapin DS, McGinnis D, Abbott AL, Roberts BM, Fonseca K, Guanowsky V, Young DA, Seymour PA, Dounay A, Hajos M, Williams GV, Castner SA (2014) Reduction of brain kynurenic Acid improves cognitive function. *J Neurosci* 34:10592-10602.
13. Erhardt S, Blennow K, Nordin C, Skogh E, Lindstrom LH, Engberg G (2001) Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 313:96–98.
14. Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu HQ, Medoff D, Tamminga CA, Roberts RC (2001) Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50:521-530.
15. Linderholm KR, Skogh E, Olsson SK, Dahl ML, Holtze M, Engberg G, Samuelsson M, Erhardt S (2010) Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. *Schizophr Bull* 38:426-432.
16. Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K. (2011) High tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum. *J Neurochem* 118:796-805.
17. Żarnowski T, Chorągiewicz T, Tulidowicz-Bielak M, Thaler S, Rejdak R, Żarnowski I, Turski WA, Gasior M (2012) Ketogenic diet increases concentrations of kynurenic acid in discrete brain structures of young and adult rats. *J Neural Transm* 119:679-684.
18. Lavebratt C, Olsson S, Backlund L, Frisé L, Sellgren C, Priebe L, Nikamo P, Träskman-Bendz L, Cichon S, Vawter MP, Osby U, Engberg G, Landén M, Erhardt S, Schalling M (2014) The KMO allele encoding Arg452 is associated with psychotic features in bipolar disorder type 1, and with increased CSF KYNA level and reduced KMO expression. *Mol Psychiatry* 19(3):334-41.
19. Fukui S, Schwarcz R, Rapoport SI, Takada Y, Smith QR (1991) Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56:2007–2017
20. Gál EM, Sherman AD (1980) L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. *Neurochem Res* 5:223-39.

21. Turski WA, Gramsbergen JB, Trailer H, Schwarcz R (1989) Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine. *J Neurochem* 52:1629-1639.
22. Okuno E, Nakamura M, Schwarcz R (1991) Two kynurenine aminotransferases in human brain. *Brain Res* 542:307-12.
23. Guidetti P, Amori L, Sapko MT, Okuno E, Schwarcz R (2007) Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing in the mammalian brain. *J Neurochem* 102:103-111.
24. Han Q, Cai T, Tagle DA, Li J (2010) Thermal stability, pH dependence and inhibition of four murine kynurenine aminotransferases. *BMC Biochem* 11:19. doi: 10.1186/1471-2091-11-19
25. Speciale C, Hares K, Schwarcz R, Brookes N (1989) High-affinity uptake of L-kynurenine by a Na⁺-independent transporter of neutral amino acids in astrocytes. *J Neurosci* 9:2066-2072.
26. Asai Y, Bajotto G, Yoshizato H, Hamada K, Higuchi T, Shimomura Y (2008) The effects of endotoxin on plasma free amino acid concentrations in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 54:460-466.
27. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H (2001) Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514:291-302.
28. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
29. Shibata K (1998) Fluorimetric micro-determination of kynurenic acid, an endogenous blocker of neurotoxicity, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 430:376-380.
30. Holmes EW (1988) Determination of serum kynurenine and hepatic tryptophan dioxygenase activity by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 172:518-525.
31. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto Ki, Uchino H, Takeda E, Endou H. (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem*. 273:23629-32.

32. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274:19745-19751.
33. Han Q, Robinson H, Cai T, Tagle DA, Li J (2009) Biochemical and structural properties of mouse kynurenine aminotransferase III. *Mol Cell Biol* 29:784-793.
34. Kocki T, Luchowski P, Luchowska E, Wielosz M, Turski WA, Urbanska EM. (2003) L-Cysteine sulphinate, endogenous sulphur-containing amino acid, inhibits rat brain kynurenic acid production via selective interference with kynurenine aminotransferase II. *Neuroscience Letters* 346:97-100.
35. Zwillling D, Huang SY, Sathyaikumar KV, Notarangelo FM, Guidetti P, Wu HQ, Lee J, Truong J, Andrews-Zwillling Y, Hsieh EW, Louie JY, Wu T, Scearce-Levie K, Patrick C, Adame A, Giorgini F, Moussaoui S, Laue G, Rassoulpour A, Flik G, Huang Y, Muchowski JM, Masliah E, Schwarcz R, Muchowski PJ (2011) Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell* 145: 863-74.
36. Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. (2004) Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 17: 455-61.
37. Pearson SJ, Reynolds GP (1992) Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 144: 199-201.
38. Guidetti P, Reddy PH, Tagle DA, Schwarcz R. (2000) Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model. *Neurosci Lett* 283: 233-5.
39. Alkondon M, Pereira EF, Yu P, Arruda EZ, Almeida LE, Guidetti P, Fawcett WP, Sapko MT, Randall WR, Schwarcz R, Tagle DA, Albuquerque EX (2004) Targeted deletion of the kynurenine aminotransferase ii gene reveals a critical role of endogenous kynurenic acid in the regulation of synaptic transmission via alpha7 nicotinic receptors in the hippocampus. *J Neurosci* 24: 4635-48.
40. Yu P, Di Prospero NA, Sapko MT, Cai T, Chen A, Melendez-Ferro M, Du F, Whetsell WO Jr, Guidetti P, Schwarcz R, Tagle DA (2004) Biochemical and phenotypic abnormalities in kynurenine aminotransferase II-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24: 6919-30.

41. Amori L, Wu HQ, Marinozzi M, Pellicciari R, Guidetti P, Schwarcz R (2009a) Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum. *Neuroscience* 159:196-203.
42. Amori L, Guidetti P, Pellicciari R, Kajii Y, Schwarcz R (2009b) On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. *J Neurochem* 109:316-325.
43. Dounay AB, Anderson M, Bechle BM, Campbell BM, Claffey MM, Evdokimov A, Evrard E, Fonseca KR, Gan X, Ghosh S, Hayward MM, Horner W, Kim JY, McAllister LA, Pandit J, Paradis V, Parikh VD, Reese MR, Rong S, Salafia MA, Schuyten K, Strick CA, Tuttle JB, Valentine J, Wang H, Zawadzke LE, Verhoest PR (2012) Discovery of brain-penetrant, irreversible kynurenine aminotransferase II inhibitors for schizophrenia. *ACS Med Chem Lett* 3:187-92
44. Shibata K (1987) Tryptophan-niacin metabolism in alloxan diabetic rats and partial prevention of alloxan diabetes by nicotinamide. *Agric Biol Chem* 51:811–816
45. Kaira K, Sunose Y, Ohshima Y, Ishioka NS, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, Oriuchi N, Itoh H, Nagamori S, Kanai Y, Yamaguchi A, Segawa A, Ide M, Mori M, Oyama T, Takeyoshi I (2013) Clinical significance of L-type amino acid transporter 1 expression as a prognostic marker and potential of new targeting therapy in biliary tract cancer. *BMC Cancer* 13:482–493
46. Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M (2013) The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* 34:139–158
47. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto Ki, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998) Expression cloning and characterization of a transport for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273:23629–23632
48. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y (1999) Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274:19745–19751
49. Christensen HN (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70:43-77.

50. Christensen HN, Cullen AM. (1969a) A bicyclic amino acid to improve discriminations among transport systems. *J Biol Chem* 244:1510–1520
51. Kim CS, Cho SH, Chun HS, Lee SY, Endou H, Kanai Y, Kim do K (2008) BCH, an inhibitor of system L amino acid transporters, induces apoptosis in cancer cells. *Biol Pharm Bull* 31:1096–1100
52. Park NS, Kim SG, Kim HK, Moon SY, Kim CS, Cho SH, Kanai Y, Endou H, Kim do K (2008) Characterization of amino acid transport system L in HTB-41 human salivary gland epidermoid carcinoma cells. *Anticancer Res* 28:2649–2655
53. Morimoto E, Kanai Y, Kim DK, Chairoungdua A, Choi HW, Wempe MF, Anzai N, Endou H (2008) Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human L-type amino acid transporters. *J Pharmacol Sci* 108:505-16
54. Christensen HN, Cullen AM (1969b) Behavior in the rat of a transport-specific, bicyclic amino acid. Hypoglycemic action. *J Biol Chem* 244:1521–1526
55. Agudelo LZ, Femenía T, Orhan F, Porsmyr-Palmertz M, Goiny M, Martinez-Redondo V, Correia JC, Izadi M, Bhat M, Schuppe-Koistinen I, Pettersson AT, Ferreira DMS, Krook A, Barres R, Zierath JR, Erhardt S, Lindskog M, Ruas JL (2014) Skeletal muscle PGC-1 α 1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell*. 159: 33-45
56. Terakata M, Fukuwatari T, Kadota E, Sano M, Kanai M, Nakamura T, Funakoshi H, Shibata K (2013) The niacin required for optimum growth can be synthesized from L-tryptophan in growing mice lacking tryptophan-2,3-dioxygenase. *J Nutr* 143:1046–1051
57. Krehl WA, Bonner D, Yanofsky C (1950) Utilization of niacin precursors and derivatives by the rat and neurospora. *J Nutr* 41:159–172
58. Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, Hayakawa T, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T (2009) Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol Brain* 2:8
59. Amori L, Wu HQ, Marinozzi M, Pellicciari R, Guidetti P, Schwarcz R (2009a) Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum. *Neuroscience* 159:196–203

60. Pocivavsek A, Wu HQ, Potter MC, Elmer GI, Pellicciari R, Schwarcz R (2011) Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology* 36:2357–2367
61. Amori L, Guidetti P, Pellicciari R, Kajii Y, Schwarcz R (2009b) On the relationship between the two branches of the kynurenic pathway in the rat brain in vivo. *J Neurochem* 109:316–325
62. Dounay AB, Anderson M, Bechle BM, Campbell BM, Claffey MM, Evdokimov A, Evrard E, Fonseca KR, Gan X, Ghosh S, Hayward MM, Horner W, Kim JY, McAllister LA, Pandit J, Paradis V, Parikh VD, Reese MR, Rong S, Salafia MA, Schuyten K, Strick CA, Tuttle JB, Valentine J, Wang H, Zawadzke LE, Verhoest PR (2012) Discovery of brain-penetrant, irreversible kynurenic aminotransferase II inhibitors for schizophrenia. *ACS Med Chem Lett* 3:187–192
63. Claes S, Myint AM, Domschke K, Del-Favero J, Entrich K, Engelborghs S, De Deyn P, Mueller N, Baune B, Rothermundt M (2011) The kynurenic pathway in major depression: haplotype analysis of three related functional candidate genes. *Psychiatry Res* 188:355–360
64. Müller N, Schwarz MJ (2007) The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry* 12:988–1000
65. Oda K, Hosoda N, Endo H, Saito K, Tsujihara K, Yamamura M, Sakata T, Anzai N, Wempe MF, Kanai Y, Endou H (2010) L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci* 101:173–179
66. Wempe MF, Rice PJ, Lightner JW, Jutabha P, Hayashi M, Anzai N, Wakui S, Kusuhara H, Sugiyama Y, Endou H (2012) Metabolism and pharmacokinetic studies of JPH203, an L-amino acid transporter 1 (LAT1) selective compound. *Drug Metab Pharmacokinet* 27:155–161
67. Yun DW, Lee SA, Park MG, Kim JS, Yu SK, Park MR, Kim SG, Oh JS, Kim CS, Kim HJ, Kim JS, Chun HS, Kanai Y, Endou H, Wempe MF, Kim do K (2014) JPH203, an L-type amino acid transporter 1-selective compound, induces apoptosis of YD-38 human oral cancer cells. *J Pharmacol Sci*. 124:208–217
68. Choi S, Disilvio B, Fernstrom MH, Fernstrom JD (2009) Meal ingestion, amino acids and brain neurotransmitters: effects of dietary protein source on serotonin and catecholamine synthesis rates. *Physiol Behav* 98:156-62

69. Orosco M, Rouch C, Beslot F, Feurte S, Regnault A, Dauge V (2004) Alpha-lactalbumin-enriched diets enhance serotonin release and induce anxiolytic and rewarding effects in the rat. *Behav Brain Res* 148:1-10
70. Fernstrom JD (2013) Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids* 45:419-30
71. Fukuwatari T, Morikawa Y, Sugimoto E, Shibata K (2002) Effects of fatty liver induced by niacin-free diet with orotic acid on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1196–1204
72. Egashira Y, Komine T, Ohta T, Shibata K, Sanada H (1997) Change of tryptophan- niacin metabolism in D-galactosamine-induced liver injury in rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 43:233–239
73. Egashira Y, Isagawa A, Komine T, Yamada E, Ohta T, Shibata K, Sanada H (1999) Tryptophan- niacin metabolism in liver cirrhosis rat caused by carbon tetrachloride. *J Nutr Sci Vitaminol* 45:459–469
74. Hilgier W, Kocki T, Obara-Michlewska M, Turski WA, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2014) Modulation by kynurenine of extracellular kynurenate and glutamate in cerebral cortex of rats with acute liver failure. *Pharmacol Rep* 66: 466–470
75. Fukuwatari T, Ohta M, Sugimoto E, Sasaki R, Shibata K (2004) Effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate, a putative endocrine disrupter, on enzyme activities involved in the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1672:67–75
76. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT (2009) Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 29: 783–788
77. Hilgier W, Olson JE (1994) Brain ion and amino acid contents during edema development in hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 62: 197–204
78. Hilgier W, Kocki T, Obara-Michlewska M, Turski WA, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2014) Modulation by kynurenine of extracellular kynurenate and glutamate in cerebral cortex of rats with acute liver failure. *Pharmacol Rep* 66: 466–470

79. Terakata M, Fukuwatari T, Kadota E, Sano M, Kanai M, Nakamura T, Funakoshi H, Shibata K (2013) The niacin required for optimum growth can be synthesized from L-tryptophan in growing mice lacking tryptophan-2,3-dioxygenase. *J Nutr* 143: 1046–1051.
80. Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, Hayakawa T, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T (2009) Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol Brain* 2: 8
81. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R (2009) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 14: 511–522
82. Faleiros BE, Miranda AS, Campos AC, Gomides LF, Kangussu LM, Guatimosim C, Camargos ER, Menezes GB, Rachid MA, Teixeira AL (2014) Up-regulation of brain cytokines and chemokines mediates neurotoxicity in early acute liver failure by a mechanism independent of microglial activation, *Brain Res* 1578: 49–59
83. Yamazaki F, Kuroiwa T, Takikawa O, Kido R (1985) Human indolylamine 2,3-dioxygenase Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem J* 230: 635-38
84. Pluta R, Albrecht J (1984) Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat, Clinical observations. *Neuropatol. Pol* 22: 379–385
85. Borkowska HD, Oja SS, Oja OS, Saransaari P, Hilgier W, Albrecht J (1999) N-methyl-D-aspartate-evoked changes in the striatal extracellular levels of dopamine and its metabolites in vivo in rats with acute hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett* 268:151-4
86. Dhanda S, Sandhir R (2015) Role of dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in behavioral alterations observed in rodent model of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res* 286:222-35
88. Malaguarnera M, Bella R, Vacante M, Giordano M, Malaguarnera G, Gargante MP, Motta M, Mistretta A, Rampello L, Pennisi G (2011) Acetyl-L-carnitine reduces depression and improves quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol* 46: 750–759.

89. Felipo V, Ordoño JF, Urios A, El Mlili N, Giménez-Garzó C, Aguado C, González-Lopez O, Giner-Duran R, Serra MA, Wassel A, Rodrigo JM, Salazar J, Montoliu C (2012) Patients with minimal hepatic encephalopathy show impaired mismatch negativity correlating with reduced performance in attention tests. *Hepatology* 55: 530–539
90. Swaminathan M, Ellul MA, Cross TJ (2018) Hepatic encephalopathy: current challenges and future prospects. *Hepat Med* 10: 1–11
91. Claes S, Myint AM, Domschke K, Del-Favero J, Entrich K, Engelborghs S, De Deyn P, Mueller N, Baune B, Rothermundt M (2011) The kynurenine pathway in major depression: haplotype analysis of three related functional candidate genes. *Psychiatry Res* 188: 355–360
92. Müller N, Schwarz MJ (2007) The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry* 12: 988–1000
93. Hilgier W, Anderzhanova E, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J (2003) Taurine reduces ammonia- and N-methyl-D-aspartate-induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radicals in microdialysates of the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 468: 21-5
94. Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V (2000) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology* 31: 709-15.
95. Aoyama N, Takahashi N, Saito S, Maeno N, Ishihara R, Ji X, Miura H, Ikeda M, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Yoshida K, Iwata N, Inada T, Ozaki N (2006) Association study between kynurenine 3-monooxygenase gene and schizophrenia in the Japanese population. *Genes Brain Behav* 5: 364-8.
96. Holtze M, Saetre P, Engberg G, Schwieler L, Werge T, Andreassen OA, Hall H, Terenius L, Agartz I, Jönsson EG, Schalling M, Erhardt S (2012) Kynurenine 3-monooxygenase polymorphisms: relevance for kynurenic acid synthesis in patients with schizophrenia and healthy controls. *J Psychiatry Neurosci* 37: 53-7.
97. Saito K, Fujigaki S, Heyes MP, Shibata K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M (2000) Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: 565-72.

発表論文

1. Sekine A, Okamoto M, Kanatani Y, Sano M, Shibata K, Fukuwatari T. Amino acids inhibit kynurenic acid formation via suppression of kynurenine uptake or kynurenic acid synthesis in rat brain in vitro. SpringerPlus. 2015; 4:48.
2. Sekine A, Kuroki Y, Urata T, Mori N, Fukuwatari T. Inhibition of Large Neutral Amino Acid Transporters Suppresses Kynurenic Acid Production Via Inhibition of Kynurenine Uptake in Rodent Brain. Neurochemical Research. 2016; 41(9):2256-66.
3. Sekine A, Fukuwatari T. Acute liver failure increases kynurenic acid production in rat brain via changes in tryptophan metabolism in the periphery. Neuroscience letter. 2019; 701:14-19.

謝辞

本研究は滋賀県立大学大学院人間文化科学研究科生活文化学専攻健康栄養部門でおこなわれたものです。指導教員の福渡努教授には本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。学部ならびに修士時代の指導教員であった柴田克己先生（現・甲南女子大学医療栄養学部 医療栄養学科 教授）には、研究者の本質や研究の基礎となる科学的かつ論理的な考え方をご教授いただきましたことを感謝いたします。動物の飼育や実験についてだけでなくプライベートな相談にも乗っていただいた佐野光枝准教授に感謝の意を表します。研究を進める上での確なご助言を頂き、様々なお話から研究者としての視野を広げてくださった森紀之先生（現・同志社女子大学生活科学部 食物栄養科学科 准教授）に感謝の意を表します。この研究を共にした岡本美沙希さん、金谷侑香さん、黒木裕介さん、浦田朋実さん、キヌレン酸研究をテーマに研究を共にした東山沙織さん、築地未佳さん、山本ちひろさん、楠本晶子さんに心から感謝いたします。働きながら学位を取得することをお許しいただき、温かく見守って下さいました龍谷大学食品栄養学科の教員ならびに実験・実習助手の皆様に感謝の意を表します。最後に、尊い命を捧げてくれたラットとマウスに感謝するとともに、ご冥福をお祈りいたします。御世話になった皆様に心から感謝とお礼の気持ちを申し上げたく、謝辞に代えさせていただきます。