

<平成 26 年度助成>

中枢神経系の健康に貢献する食品機能性成分の評価

友永 省三¹⁾・北口 公司²⁾

(¹⁾ 京都大学大学院 農学研究科、²⁾ 岐阜大学 応用生物科学部)

緒言

アルツハイマー病、ハンチントン病およびうつ病などの神経疾患の作用機構において、脳内の免疫担当細胞（ミクログリアやマクロファージ）が活性化されて産生される炎症性サイトカインやキノリン酸（トリプトファン代謝のキヌレニン経路代謝物）の関与が示唆されている¹⁾。本研究では、これに着目した「中枢神経系の健康に貢献する食品機能性成分の評価系の確立」を試みた。更に、立ち上げた評価系を用いて、カルノシンの評価を行った。詳細は以下に述べる。

ミクログリア培養細胞において、IFN- γ やリポ多糖（LPS）による活性化は、炎症性サイトカインの産生を誘導し、キヌレニン経路の律速酵素であるIDO1 発現を誘導してキノリン酸を産生することが報告されている²⁾。そこで、これらを指標として用いることを検討した。

LPS を腹腔内投与したマウスは、脳内の炎症性サイトカインの産生を促進し、投与から 24 時間後のうつ様行動を増加させることからうつモデルとして用いられている^{3,4)}。更に、本モデルで誘導されるうつ様行動には、脳内キノリン酸の増加が関与することが示唆されている⁴⁾。そこで、この脳内キノリン酸の増加を指標として用いることを検討した。

これら評価系を用いて、食肉に多く含まれるジベプチドであるカルノシンの評価を行った。研究代表者の友永は、カルノシンの単回投与が健常ラットにおいて抗うつ様行動を誘導することを報告している⁵⁾。そこで、作用機構の妥当性により優れた今回の評価系を次の段階として用いて、詳細に取り組む意義が

あると考えた。

材料および方法

実験 1) マウスミクログリア細胞株 MG6 をカルノシン (5 mM) 存在下で 6 時間培養した後、LPS もしくは IFN- γ で刺激した。刺激から 6 時間後の Total RNA を回収し、リアルタイム定量 PCR 法を用いて、IDO1、炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6 および TNF- α)、ケモカイン (MIP-2 α) および誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現量を測定した。また、培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法により測定した。更に、培養上清中の低分子代謝物濃度をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) による低分子代謝物の網羅的半定量解析系 (メタボローム解析) を用いて調べた。

実験 2) C57BL/6 系統雄マウスに LPS を腹腔内投与し、24 時間後の全脳および血漿を採取した。体重および摂食量も確認した。全脳内および血漿中のキノリン酸分析 (GC/MS の NCI 法、Smythe らの方法⁶⁾ を一部改変) を行った。

実験 3) C57BL/6 系統雄マウスにカルノシン (1.5 および 3.0 mmol/kg b.w.) を経口投与し、1 時間後に LPS を腹腔内投与した。LPS 投与から 24 時間後の全脳、血漿および肝臓を採取した。全脳および肝臓の低分子代謝物濃度を GC/MS によるメタボローム解析を用いて調べた。更に、血漿中のキノリン酸の分析も実験 2 と同様の方法で行った。全脳内のキノリン酸の分析も試みたが、分析時のトラブルにより定量することができなかった。

結果

実験1) IFN- γ は IDO1 の mRNA 発現を誘導したが、カルノシンの影響は認められなかった(図1)。また、LPS により誘導された IL-1 β 、TNF- α および iNOS の mRNA 発現にもカルノシンは影響を及ぼさなかった。一方、LPS により誘導された IL-6 および MIP-2 α の mRNA 発現は、カルノシンによって有意に抑制された。更に、LPS 刺激後の培養上清中 IL-6 濃度もカルノシン投与により有意に低下した。培養上清における低分子の網羅的半定量解析系では、低分子代謝物は 167 成分検出され、11 成分にカルノシンの影響が認められた。その中には、カルノシンの構成アミノ酸である β -アラニンの増加が認められた(図2)。培養上清においてキノリン酸は検出されたが、LPS による増加は認められなかった。

実験2) LPS は、マウスの摂食量や増体重量を減少させた。また、脳内および血漿中キノリン酸濃度を増加させた(図3)。

実験3) LPS は、実験2と同様に摂食量および増体重量を減少させたがカルノシンによる影響は認められなかった。また、LPS は血漿中キノリン酸濃度を増加させたがカルノシンの影響は認められなかった(図4)。低分子代謝物は、脳では 56 成分、肝臓では 62 成分同定されたが、カルノシンによる影響は認められなかった。

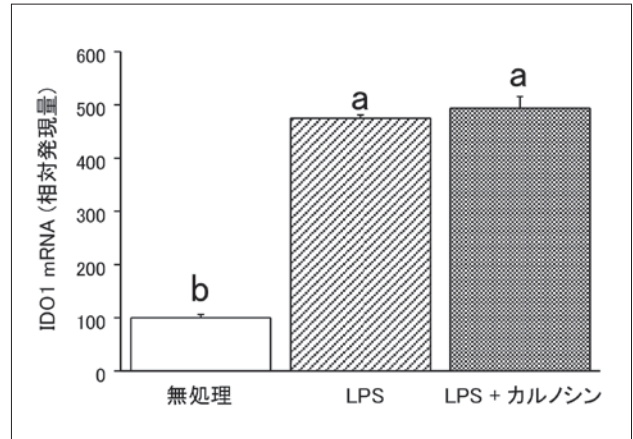


図1 IFN- γ により活性化されたマイクログリア細胞株におけるカルノシンの添加がIDO1mRNA発現量に及ぼす影響
平均値±標準誤差、各n=3、異符号間で有意(P<0.05)

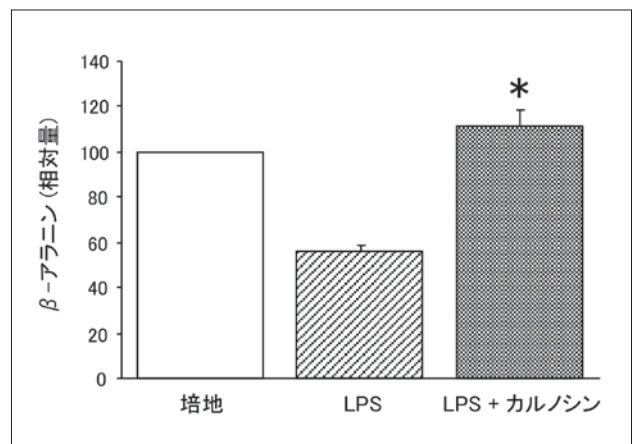


図2 LPSにより活性化されたマイクログリア細胞株におけるカルノシンの添加が培養上清中 β -アラニン濃度に及ぼす影響
平均値±標準誤差、培地はn=1、他は各n=3、*LPS群に対して有意(P<0.05)

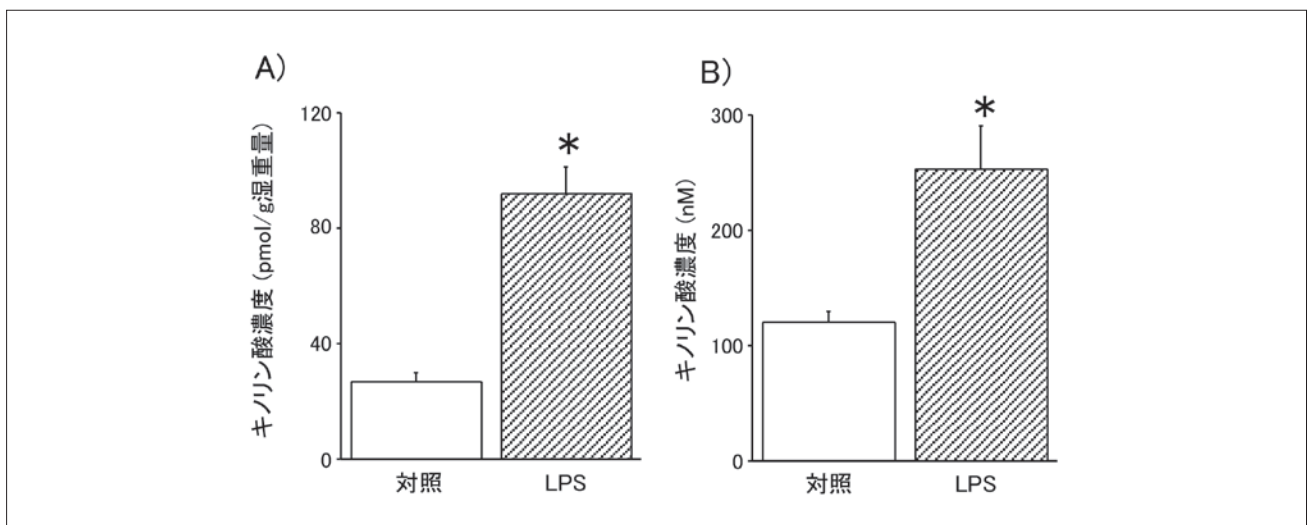


図3 マウスにおけるLPSの腹腔内投与が脳内および血漿中キノリン酸濃度に及ぼす影響
A) 全脳、B) 血漿、平均値±標準誤差、各n=6-9、*対照群に対して有意(P<0.05)

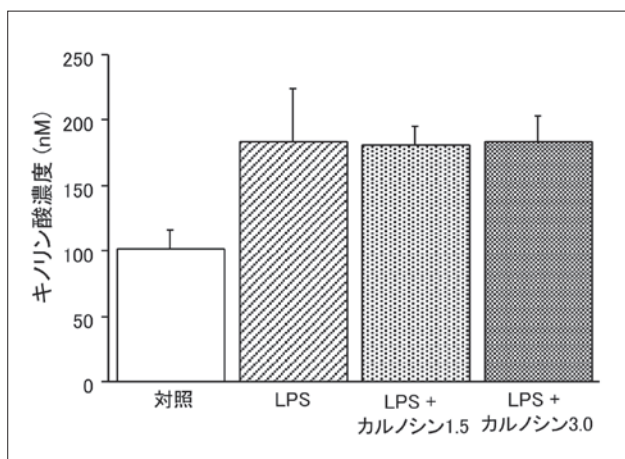


図4 マウスにおけるLPSの腹腔内投与が血漿中キノリン酸濃度に及ぼす影響
平均値±標準誤差、各n=6

考 察

実験1の結果から、カルノシンはミクログリアの活性化時における炎症性サイトカインの発現や産生を一部抑制することが示唆された。一方で、IFN- γ により誘導されたIDO1の発現には影響を及ぼさなかった。今回、キヌレニン経路の重要な律速酵素のひとつであるIDO1発現に影響を及ぼさなかったため、キノリン酸濃度に及ぼす影響までは確認しなかった。しかしながら、下流にあるキヌレニン経路の他酵素を制御する可能性も残されていることから、今後他酵素に着目した実験とキノリン酸濃度に及ぼす影響を確認する必要があるかもしれない。一方、LPSの投与により培養上清中キノリン酸が増加しなかったことは、先行研究²⁾と異なる結果となった。これは、今回用いたミクログリアは、参考とした先行研究²⁾と種類が異なることなど幾つかの実験条件の違いが影響しているのかもしれない。また、LPS投与による細胞上清において、幾つかの代謝物がカルノシンによる影響を受けたことは、今後の展開を考える上で有意義な情報だと考えられる。中でも、カルノシンの構成アミノ酸のひとつである β -アラニンがカルノシンの投与により増加していることは興味深い。これは、培地に含まれている血清中に多く含まれている可能性が高いカルノシン分解酵素が働いたことによるかもしれない。 β -アラニンは、

複数の抑制性神経伝達物質受容体に働くが、ミクログリアには様々な神経伝達物質受容体が存在することから、カルノシンによる効果が β -アラニンを介した作用なのかは今後検討の余地がある。また、もうひとつの構成アミノ酸であるヒスチジンにも着目する価値がある。なぜなら、ミクログリアは、ヒスチジンからヒスチジン脱炭酸酵素を介してヒスタミンを産生し、ヒスタミン受容体も存在することが報告されているからである。したがって、カルノシン自身だけでなく、両構成アミノ酸の作用も考慮した研究を行う必要がある。以上より、少なくともカルノシンには、活性化ミクログリアにおける炎症性サイトカインやケモカインの発現を一部抑制することが明らかとなった。これは、カルノシンの神経保護効果として新たな作用機構である可能性があることから、今後、更なる研究を行う必要がある。

実験2において、LPSの腹腔内投与が、先行研究と同様に24時間後の脳内および血中のキノリン酸濃度を増加させることを確認した。従って、脳内キノリン酸の蓄積に及ぼす影響の評価系として用いることができることが示唆された。

実験3では、LPSにより血中のキノリン酸濃度は増加したが、カルノシンはこの増加に影響を及ぼさなかった。本実験では、前述したように脳内キノリン酸含量が分析できなかったことが悔やまれる。今後、同様の実験を行い脳サンプルの分析を行う予定である。また、血中キノリン酸濃度に影響を及ぼさなかったことや、全脳や肝臓のメタボローム解析結果からLPSによる影響が緩和された低分子代謝物が見出されなかったことから、全身におけるキノリン酸合成促進を緩和する効果は認められなかった可能性が考えられる。実験1の結果から考えると、ミクログリアのみを採取して各種分析を行うことが有用かもしれない。また、投与量や投与回数異なる条件での実験も視野に入れていきたい。

以上より、ミクログリア細胞株においてカルノシンの神経保護効果における作用機構の手がかりを得ることができた。LPSをマウスに単回投与することにより、キノリン酸の蓄積に着目した評価系として

用いることができる可能性が示唆された。今後、今回得られた結果を基に、評価系の更なる検討とカルノシンの作用機構解明に着手していきたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なる研究助成金を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci.* 13(7):465-77. 2012.
- 2) Wang Y, Lawson MA, Dantzer R, Kelley KW. LPS-induced indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated in an interferon-gamma-independent manner by a JNK signaling pathway in primary murine microglia. *Brain Behav Immun.* 24(2):201-9. 2010.
- 3) Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9(1):46-56. 2008.
- 4) Walker AK, Budac DP, Bisulco S, Lee AW, Smith RA, Beenders B, Kelley KW, Dantzer R. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice. *Neuropsychopharmacology.* 38(9):1609-16. 2013.
- 5) Tomonaga S, Yamane H, Onitsuka E, Yamada S, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Furuse M. Carnosine-induced antidepressant-like activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 89(4):627-32. 2008.
- 6) Smythe GA, Braga O, Brew BJ, Grant RS, Guillemin GJ, Kerr SJ, Walker DW. Concurrent quantification of quinolinic, picolinic, and nicotinic acids using electron-capture negative-ion gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 301(1):21-6. 2002.

Evaluation of functional foods for improving brain health

Shozo TOMONAGA¹⁾, and Kohji KITAGUCHI²⁾

¹⁾ *Graduate School of Agriculture, Kyoto University*

²⁾ *Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University*

In the pathophysiologies of psychiatric disorders such as Alzheimer disease, Huntington disease, and depression, inflammatory cytokines and quinolinic acid, which is one of the metabolites of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism, released from activated microglia play important roles. In the present study, we attempted to establish methods focused on these species to evaluate functional foods that contribute to brain health. Then, we attempted to evaluate the bioactive dipeptide, carnosine using these methods. In the mouse microglial cell line MG6, carnosine was unable to attenuate the IFN γ -induced mRNA expression of IDO1, which is an important limiting enzyme of the kynurenine pathway. On the other hand, carnosine attenuated the LPS-induced mRNA expression of IL-6 and MIP-2 α in the microglia. Under the applied experimental conditions, β -alanine, which is one of the constituents of carnosine, was increased in the medium by carnosine administration, suggesting that carnosine had been degraded. Therefore, not only carnosine, but also its constituents may be involved in the observed effects. The intraperitoneal injection of LPS increases brain and plasma quinolinic acid levels in mice. Therefore, we attempted to evaluate the effects of carnosine on these mice. The oral administration of carnosine was unable to influence the plasma quinolinic acid levels induced by LPS. However, in the present study, we were unable to confirm the effects on brain quinolinic acid levels, due to analytical troubles. These results suggest that while further improvements will be needed, we were able to establish two methods to evaluate functional foods that could contribute to brain health. Furthermore, the effects of carnosine found in the present study are important, and should thus be investigated in detail in future study.