

調査・研究報告書

調査研究課題

ジペプチド摂取による禁煙・記憶向上作用効果を目指した薬理学的研究

所属機関及び調査研究者名

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）・薬物治療学研究室

新田淳美

〒930-0194 富山市杉谷 2630 076-415-8822

共同研究者

日比陽子（名古屋大学医学部附属病院薬剤部）

【要旨】

アルツハイマー型認知症患者ではうつ様症状も観察されることが多く、この症状を緩和することが治療効果の促進および患者のQOLを高めることにもつながる。当研究室で神経保護薬として研究を進めているジペプチドLeu-Ileが様々な精神神経疾患に対する薬理効果を示すことからうつ様症状についても有効なのではないかと考え、今回Leu-Ileの抗うつ効果について検討した。本ジペプチドは、牛乳やワインにも含有されていることが分かっており、サプリメントとしての開発が期待される。強制水泳試験を2週間連続して行ったマウスは水泳時の無動時間が著しく延長しうつ様症状の誘導が確認されたが、毎水泳後にLeu-Ileを経口投与したマウスでは無動時間の延長が抑制されたことから、Leu-Ileが抗うつ作用を持つ可能性が示された。また、強制水泳によりマウス海馬歯状回で減少したBrdU陽性細胞数がLeu-Ile投与により回復し、BDNFの産生促進も見られたことから、BDNFを介した神経細胞増殖促進がLeu-Ileによる抗うつ作用のメカニズムに関与していると考えられる。Leu-Ileをサプリメントとして開発することができれば、非常に有用である可能性が高まった。

【1、研究目的】

アルツハイマー型認知症患者では、うつ様症状も観察されることも多く、治療を困難にする一因となっている。うつ様症状の予防や改善を目的として、安全性の高い物質を、経口など容易に摂取できる形で供給することは社会への貢献度が高いと考えられる。Leu-Ileは培養神経細胞において神経栄養因子の産生を誘導し、神経保護作用を示すことが分かっており(Nitta et al. 2004)、これまでも様々な精神疾患に対して有効で

あることが示されている(Niwa et al 2007)。そこで、今回我々は Leu-Ile の抗うつ効果について検討した。

【2、研究方法】

実験動物

実験には、7週齢 ICR 雄性マウス（日本 SLC、静岡）を使用した。なお、本研究は実施機関の動物実験委員会の承認のもと、Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に基づいて行った。

試薬

Leu-Ile は国産化学(東京、日本)から購入した。BrdU 染色検出キットは Roche Applied Science (Mannheim Germany)から購入した。Total RNA 抽出キットは QIAGEN (東京、日本)から購入した。逆転写酵素および real time RT-PCR 試薬は invitrogen (Carlsbad CA, USA)から購入した。その他の試薬は研究用特級グレードの物を使用した。

強制水泳試験

25°Cの水を 15cm の水深で張った円筒形の水槽にマウスを投入し 6 分間の強制水泳を行い、後半 5 分間における無動時間を赤外線装置により測定した。本実験では 2 週間の連続強制水泳試験を用いて Leu-Ile の抗うつ作用について検討し、Leu-Ile は毎水泳後に経口ゾンデを用いて 0, 150 および 750 · mol/kg を経口投与した。

海馬における増殖細胞数の検討

2 週間の連続強制水泳および Leu-Ile 投与を行ったマウスについて最終投与日に BrdU 75mg/kg を 2 時間毎に 3 回腹腔内投与し、その 24 時間後に脳を固定した。固定脳の凍結後、30 · m スライスを作成し抗 BrdU 抗体により染色した。そして主要な細胞新生部位として報告されている海馬歯状回について BrdU 取り込み細胞を数えた。

Real time RT-PCR

連続強制水泳および Leu-Ile の投与を 5 日間行ったマウスの海馬を採取し、total RNA を調整した。これを用いて cDNA を合成し、Real Time RT-PCR により BDNF の mRNA 量を測定した。Real time PCR の primer は forward 5' -GCAAACATGTCTAT GAGGGTTCG-3' reverse 5' -ACTCGCTAATACT GTCACACACG-3' FAM-TAMRA ラベル probe 5' - ACTCCGACCCTGCCCGCGT-3' を用いた。

【3. 研究結果】

うつ様症状に対する Leu-Ile の効果

毎日 6 分間の強制水泳を 2 週間続けたところ、マウスの無動時間が著しく延長し、

うつ様症状の誘導が観察された。一方、毎水泳後に Leu-Ile を経口投与した群では、1 週間目からコントロール動物に比べ無動時間の減少が見られた (Figure 1)。

Leu-Ile は海馬における細胞増殖を促進する

2 週間の強制水泳を行ったマウス海馬では、強制水泳をしていないマウスと比較して著しく BrdU 陽性細胞数が減少していたにも関わらず、強制水泳と共に Leu-Ile を投与したマウスでは、BrdU 陽性細胞の減少が抑制されていた (Figure 2)。

Leu-Ile は BDNF 産生を誘導する

細胞新生を回復させる要因のひとつとして、brain derived neurotrophic factor (BDNF) の関与が考えられた。連続強制水泳 5 日目の海馬における BDNF の mRNA 量を real Time RT-PCR により測定したところ、非ストレス群と差がなかったが、連続強制水泳と同時に Leu-Ile 投与を行ったマウスについて、海馬 BDNF mRNA 量が増大していた (Figure 3)。

【4. 考察】

強制水泳試験は、抗うつ薬のスクリーニングに汎用されている方法である。マウスを水槽に投入すると、直後は逃れることを試みて泳ぐが、次第に無動状態となる (絶望の無動)。この無動時間の長短がうつ状態の指標となる。さらに強制水泳試験を連日行うことでうつ様症状が誘導 (無動時間の延長) されることが報告されている (Hitoshi et al 2007)。本実験においては毎日 6 分間の強制水泳を 2 週間続けることでうつ様症状を誘導し、Leu-Ile の影響を検討したところ、毎水泳後に Leu-Ile を経口投与した群では、1 週間目からコントロール動物に比べ無動時間の減少が観察された。Leu-Ile の慢性投与により自発行動量にコントロール動物との差異は観察されなかった (data not shown) ことより、Leu-Ile による無動時間の減少は、運動機能の亢進でなく、抗うつ様作用によるものであると考えられた。

次に、Leu-Ile が抗うつ様作用を示すメカニズムについて検討した。うつ病の患者は海馬が縮小していることが知られている (Czeh et al 2007)。海馬歯状回は脳において細胞増殖が盛んに起こる部位であることから、海馬における細胞のダメージや細胞増殖の抑制がその原因ではないかと考えられるが、詳細なメカニズムについての報告はなされていない。今回用いた連続強制水泳試験に類似した実験条件下のマウス歯状回で細胞増殖抑制が観察されていることから (Hitoshi et al 2007)、本研究でも Leu-Ile が海馬の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。2 週間の連続強制水泳試験後および Leu-Ile 投与の最終日に BrdU を腹腔内投与し、その 24 時間後に固定した脳のスライスの海馬歯状回において BrdU を取り込んでいた細胞を増

殖細胞として数えた。その結果、2週間の強制水泳ストレスは海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞数を著しく減少させたが、Leu-Ileの投与はその減少を抑制していた(Figure 2)。

細胞新生を回復させる要因のひとつとして、brain derived neurotrophic factor (BDNF)の関与が考えられた。BDNFは神経栄養因子であり、細胞死の抑制や細胞増殖に重要な役割を持つ。うつ病患者や病態モデル動物脳ではBDNF量が低下していることが報告されており、モデルラットの脳内にBDNFを投与することによってうつ症状が改善されることが示されている(Shirayama et al 2002)。また、イミプラミンおよびアマンタジンなどの抗うつ薬はラット海馬においてBDNF産生を増大させることも報告されている(Rogoz et al 2007)。そこでLeu-IleがBDNF転写レベルに影響を及ぼすかどうか検討を行うために連続強制水泳およびLeu-Ileの投与を5日間行ったマウスの海馬を採取し、real Time RT-PCRによりBDNFのmRNA量を測定したところ、連続強制水泳と同時にLeu-Ile投与を行ったマウスにおいて海馬BDNF mRNA量が増大していた(Figure 3)。この増大は強制水泳およびLeu-Ileの投与を14日間行ったマウスにおいても同様に認められたことから、Leu-Ileは継続的にBDNFの産生誘導をしていることが示唆された。

これらの結果から、Leu-Ileは海馬BDNF転写を促進することによって歯状回の細胞を保護し、強制水泳ストレスによる細胞新生抑制を阻害している可能性が考えられた。

【まとめ】

本研究成果から、Leu-Ileは経口投与によって抗うつ様作用を示すことが明らかとなり、この作用にはBDNFの産生誘導や細胞新生が関与していることが示唆された。Leu-Ileは食品に含まれていることから安全性が高いと考えられ、サプリメントとして日常的に摂取することでうつ症状が悪化する前に早期に回復させることが期待できるのではないかと考えている。

【研究発表】

1. Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Jaaro-Peled H, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K.: Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. **Behav Brain Res.** 206, 32-37 (2010)
2. Ibi D, Nitta A, Ishige K, Cen X, Ohtakara T, Nabeshima T, Ito Y: Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term

- potentiation in the hippocampal CA1 region. **Neurochem Int.**, 56, 77-83. (2010)
3. Alkam T, Nitta A, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T. Oral supplementation with Leu-Ile, a hydrophobic dipeptide, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. **Behav Brain Res.** 210, 184-190 (2010)
 4. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. **Blood.** 115, 4302-4312 (2010)
 5. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Doi H, Kondo N, Mizoguchi H, Nitta A, Yamada K, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Disrupted TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. **J. Neurosci.** 30, 5702-5712 (2010)
 6. Ariyannur PS, Moffett JR, Manickam P, Pattabiraman N, Arun P, Nitta A, Nabeshima T, Madhavarao CN, Namboodiri AM. Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. **Brain Res.** 1335, 1-13. (2010)
 7. Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. **J Neurochem.** 114, 1840-1851 (2010)
 8. Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Fukumitsu, H., Somiya, H., Furukawa, S., Nabeshima, T. and Yamada, K., :Over expression of Piccolo C2A domain induces depression-like behavior in mice. **NeuroReport.** 21,1177-1181 (2010)
 9. Alkam T., Hiramatsu M., Mamiya T., Aoyama Y., Nitta A., Yamada K., Kim HC, Nabeshima T. :Evaluation of object-based attention in mice. **Behav Brain Res.** 220,185-193 (2011)
 10. Furukawa-Hibi Y., Nitta A., Ikeda T., Morishita K., Liu W., Ibi D., Tursun A., Nabeshima T., Yamada K. :The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF **Behav Brain Res.** in press (2011)

11. 新田淳美, 日比陽子, 宮本嘉明, 鍋島俊隆: 薬物依存におけるピッコロの役割. 日本アルコール・薬物医学会雑誌 45 巻 6 号. 525-529 (2010)
12. Nitta A., Alkam R., Furukawa-Hibi Y., Niwa M., Mizoguchi H., Yamada K., and Nabeshima T.: A dipeptide, Leu-Ile, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of ERK in the hippocampus (XXVII CINP congress) (Hong Kong, China, June 6-10,2010)
13. Nitta A., Furukawa-Hibi Y., Yamada K., and Nabeshima T., The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF (70th FIP (International Pharmaceutical Federation) World Congress of Pharmacy/Pharmaceutical Sciences) (Lisboa, Portugal , August,28-September 2, 2010)
14. 新田淳美: 向精神薬と鎮痛剤の依存リスク. スタディグループ7. 第20回日本臨床精神薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会 (仙台, 2010.9.15-17)
15. 新田淳美: 麻薬・覚せい剤依存の怖さを知る, 薬物乱用防止指導員大会, (招待講演) (富山, 2010. 11.29)
16. 新田淳美: 活発な病院実習・薬局実習を行うために. 教育シンポジウム. 平成22年度日本薬学会北陸支部 第122回例会 (金沢, 2010.11. 21)
17. 宮川泰宏, 石黒陽子, 大熊瑞穂, 新田淳美, 永井 拓, 山田清文: 術後せん妄に対するベンゾジアゼピン系薬物の影響. 日本臨床薬理学会 (京都, 2010.12.1-3).
18. 小林資正, 赤池昭紀, 平田 収正, 新田淳美: 先導的薬剤師養成に向けた実践的アドバンスト教育プログラムの共同開発 (シンポジウム S12) 第131回日本薬学会年会 (静岡, 2011.3.28-31)

【引用文献】

Nitta, A, Nishioka, H, Fukumitsu, H, Furukawa, Y, Sugiura, H, Shen, L, and Furukawa, S: Hydrophobic dipeptide Leu-Ile protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factors synthesis. *J. Neurosci. Res.* 78:250–258 (2004)

Niwa, M, Nitta, A, Shen, L, Noda, Y, and Nabeshima, T: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in inhibitory effects of a hydrophobic dipeptide Leu-Ile on morphine-induced sensitization and rewarding effects. *Behav. Brain Res.* 179 (2007) 167–171

Hitoshi, S, Maruta, N, Higashi, M, Kumar, A, Kato, N, and Ikenaka, K: Antidepressant drugs reverse the loss of adult neuronal stem cells following chronic stress. *J. Neurosci. Res.* 85: 3574-3585 (2007)

Czeh, B, and Lucassen, PJ: What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 257: 250-260 (2007)

Shirayama, Y, Chen, ACH, Nakagawa, S, Russell, DS., and Duman, RS: Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.* 22(8): 3251-3261 (2002)

Rogoz, Z, Skuza, G, Legutko B: Repeated co-treatment with imipramine and amantadine induces hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *J. Physiol. Pharm.* 58: 219-234 (2007)

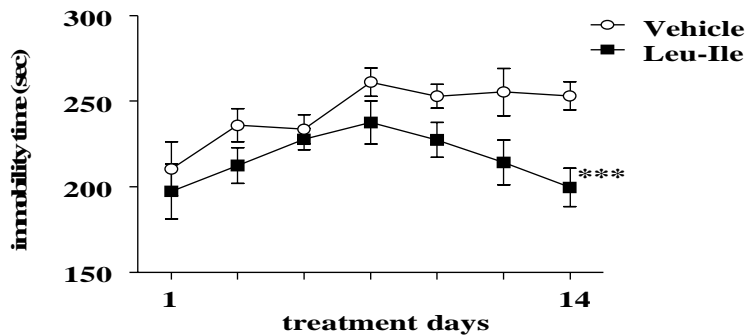


Figure 1. Leu-Ile inhibited the increase of immobility time Mice swam 6min per day for 14days and Leu-Ile (750 μ mol/kg) p.o. treated after every swimming. Immobility time was measured in last 5min of swimming time. Values indicate the mean \pm SE (n=6). ***P<0.0001 vs vehicle

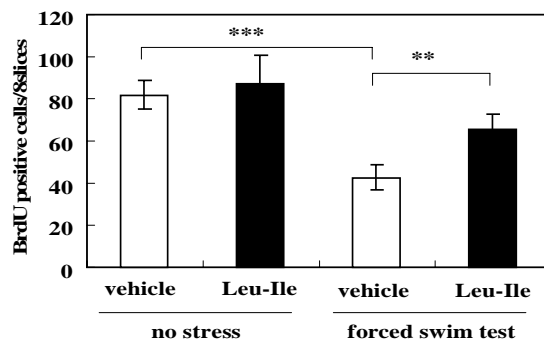


Figure 2. Effect of Leu-Ile treatment on BrdU uptake to the dentate gyrus After 2 weeks of chronic forced swim test and Leu-Ile (750 μ mol/kg) treatment, BrdU 75mg/kg was injected for 3 times every 2 hours. 24 hours later, brain was fixed by 4% paraformaldehyde and 30 mm-thick coronal brain sections were cut on a cryostat and mounted on slices. BrdU-positive cells in the dentate gyrus were detected by BrdU labeling and detection kit 2. Total number of BrdU-positive cells are expressed as the sum of the 8-slices. Values indicate the mean \pm SE (n=4). ***P<0.001 vs no stress contol, **P<0.05 vs vehicle of forced swim test

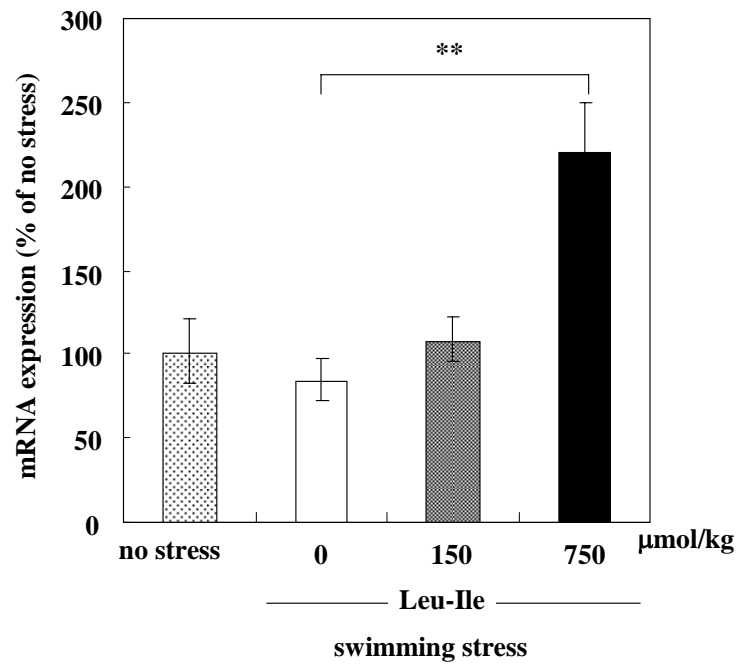


Figure 3. Leu-Ile induced BDNF transcription in hippocampus of stressed mice
 Total RNAs were prepared from hippocampus of chronic forced swim test and Leu-Ile p.o. treated mice for 5days. Values indicate the mean \pm SE (n=4). **P<0.01 vs 0 μ mol/kg