

平成21年度

人間健康科学研究科ヘルスプロモーションサイエンス学域

修士論文予備審査会

プログラム・発表要旨

10月29日(木)

16:30 ~ 17:40

12号館 202室

(発表20分、質疑応答10分)

- | | |
|---------------|---|
| 16:30 ~ 17:00 | 大塚友実
運動による抗うつ・抗不安効果の脳内神経機構 |
| 17:10 ~ 17:40 | 多田井幸揮
鉄欠乏ラットへの過剰な鉄投与に対する DMT1 および Ferritin
タンパク質発現の制御機構 |
| 17:50 ~ | 判定会議(13号館 会議室) |

運動による抗うつ・抗不安効果の脳内神経機構

人間健康科学研究科ヘルスプロモーションサイエンス学域
博士前期課程2年 大塚 友実

【研究の背景・目的】

ストレスが蔓延する現代社会において、うつ病や全般性不安障害などの精神疾患が増加しており、深刻な社会問題となっている。これらの精神疾患の発症に関する神経機構はいまだ解明されていない部分も多いが、臨床的にはうつ病患者の脳内セロトニン（5-HT）濃度が低下していること、選択的セロトニン再取り込み阻害剤（SSRI）が抗うつ・抗不安作用をもたらすこと、さらに、うつ病や不安の発症にはストレスホルモンの放出機構（HPA軸）の調節不全が関連していることが知られている。HPA軸の活性はコルチコトロピン放出因子（CRF：corticotropin-releasing factor）神経によって惹起され、またCRFの脳室内投与が不安様行動を起こすことが示唆されている。これらのことから、セロトニン神経の活性化やCRF神経およびHPA軸の正常化が、抗うつ・抗不安効果をもたらす上で重要な要因であることが示唆される。

近年、ラットにおける動物実験から一定期間の運動がストレスに対する不安様行動を改善し、一方では運動が直接的に脳の機能や構造を変化させることが報告されており、ここの健康の維持・増進に運動が効果的であることが示唆されている。しかし、運動による抗うつ・抗不安効果の脳内神経機構や有効な運動条件についてはいまだ明らかではない。

そこで本研究では、運動強度に焦点を当て抗うつ・抗不安効果に関連する脳内神経活動（5-HT神経、CRF神経）に与える運動の影響とその機能的相互作用、および運動による精神的变化（行動変化）について検討することを目的とした。

【方法】

Wistar系雄ラットを用い、異なる強度（コントロール群：0m/min，低強度群：15m/min，高強度群：25m/min）で30分間の急性トレッドミル走を行わせ、運動時の脳内神経活動（背側縫線核の5-HT神経、視床下部室傍核CRF神経など）、及び運動後の精神的变化について検討した。脳内神経活動については、神経活動の指標であるc-Fos発現を用いた免疫組織化学的手法により評価した。運動後の精神的变化については、オープンフィールドテスト、及び高架十字迷路テストの2つの行動学的テストを用いて評価を行った。

本研究で対象とした5-HT神経とCRF神経には、解剖学的に双方向性の連絡があることが確認されており、運動時の神経活動においても相互に作用していることが考えられる。そこでこの5-HT神経とCRF神経の相互作用の実態を確認するために、CRF阻害剤を脳室内投与し、運動時のCRF神経活動が、5-HT神経活動に与える影響を検討する（進行中）。

さらに、CRF神経を介したHPA軸の活性も、運動時の脳内神経活動に影響を及ぼしていると考えられることから、デキサメタゾン（人工のストレスホルモン）を腹腔内投与し、HPA軸活性、すなわち内因性のストレスホルモンが運動時の脳内神経活動に与える影響につい

て検討を行った。

【結果と考察】

運動時の脳内神経活動解析の結果、5-HT 神経活動は低強度運動でのみ有意に活性化した。CRF 神経は強度依存的に活性が高くなる傾向にあり、高強度運動では有意にその活動が高くなった。行動テストによる精神的変化の解析では、オープンフィールドテストにおける行動量に運動強度による顕著な傾向は見られなかったが、高架十字迷路テストで不安行動の減少を示すオープンアーム滞在時間が、低強度群でのみ高い傾向が認められた。これらのことから、急性運動による脳内神経活動や抗うつ・抗不安効果は運動強度によって異なり、低強度運動で有効であることが示唆された。

また、デキサメタゾン前投与により、CRF 神経活動が抑制され、さらに、低強度運動特異的な 5-HT 神経活性の増加も見られなくなった。これは血中のストレスホルモン増加、すなわち HPA 軸の過剰な活性化が、5-HT 神経活動抑制の一因であることを示唆しており、このことが高強度運動時に 5-HT 神経活動が増加しなかった一因であると考えられる。

以上のことから、運動が脳内神経活動や行動（精神的変化）に変化をもたらし、それが運動強度依存的であることが示唆された。さらに、デキサメタゾン投与の実験から、運動強度による神経活動の違いは内因性ストレスホルモンの状態に大きく影響を受けることが示唆された。つまり、運動による抗うつ・抗不安効果には、5-HT 神経の活性化が重要であり、その活動は CRF 神経活動や内因性ストレスホルモンの状態によって調節されていると考えられる。従って、効果的な抗うつ・抗不安効果を得るためには、CRF 神経活動やストレスホルモンの著しい増加を伴わない低強度運動が有効であると考えられる。

鉄欠乏ラットへの過剰な鉄投与に対する DMT1 および Ferritin タンパク質発現の制御機構

人間健康科学専攻 ヘルスプロモーションサイエンス系
栄養・食品科学分野 博士前期課程 2 年 多田井 幸揮

【背景・目的】

生体が鉄欠乏状態であると、消化管での鉄の吸収率は高くなる。この現象は十二指腸の非ヘム鉄輸送体である DMT1（管腔側）および FPN1（基底膜側）タンパク質発現の亢進と血液中 TIBC（Total Iron Binding Capacity）の上昇によると考えられ、この時、粘膜細胞内で鉄を貯蔵する Ferritin (Ft) タンパク質発現は低下する。Frazer et.al. (Gut,2003) は、鉄欠乏ラットに極めて過剰な鉄を投与すると、十二指腸の鉄関連タンパク質の mRNA およびタンパク質の発現が数時間で変動することを報告しているが、鉄吸収能が亢進した十二指腸への過剰鉄投与が DMT1 や Ft に及ぼす影響についての詳細な報告は少ない。

鉄関連タンパク質の mRNA には IRE (Iron Responsible Element) と呼ばれるステムループ構造を持つ配列が存在し、IRP (Iron Responsible Protein) タンパク質との相互作用により、安定性や翻訳制御がコントロールされると考えられている。この IRE/IRP 系は IRP を介して細胞内鉄濃度をモニターする機構であるが、小腸粘膜細胞における働きについては不明である。

そこで本研究では小腸管腔から粘膜細胞への鉄の取り込みが管腔内の鉄濃度によって調節されるメカニズムを明らかにするため、粘膜上の鉄輸送体 DMT1 と細胞内鉄貯蔵体 Ft の発現コントロールについて解析した。実験 1 では貧血で鉄吸収が亢進したラットに過剰な鉄を投与し、DMT1 と Ft の mRNA およびタンパク質へ影響を及ぼす時間を検討し、さらに管腔内鉄濃度による影響を調べた。実験 2 では、十二指腸の DMT1 および Ft タンパク質発現への IRE/IRP 系の関与について、DMT1 は mRNA の安定性制御で、Ft は mRNA の翻訳制御でタンパク質発現をコントロールしていると仮定し、DMT1 total mRNA (with and without IRE) と DMT1 with IRE mRNA 発現の減少パターンの比較、また Ft では IRE と IRP の結合を間接的に解析することでこの仮説を検証した。

【方法】

実験 1：鉄投与が鉄欠乏ラット十二指腸鉄関連タンパク質に及ぼす影響

4 週齢の Wister 系雄ラットを鉄無添加飼料で 3 週間飼育し鉄欠乏ラットを作成した。

実験 1-1) 鉄欠乏ラットに鉄を 10mg 含む 10mM HCl 溶液 1ml を胃内投与し、3~12 時間後に粘膜上皮細胞を採取した。mRNA 発現は taqman probe を用いた realtime PCR 法により定量的解析を行った。DMT1 タンパク質の発現は western blot 法により、Ft タンパク質は ELISA 法により検討した。

実験 1-2) 鉄欠乏ラットに鉄を 200、500、1000、3500 μ g 含む 10mM HCl 溶液 1ml を胃内投与し、6 時間後に粘膜上皮細胞を採取し、上記と同様に分析した。

実験 2：IRE/IRP 系による DMT1、Ft タンパク質発現の制御

実験 1 で採取した粘膜上皮細胞を用い、DMT1 with IRE mRNA は realtime PCR 法によ

り、IRP1 タンパク質は western blot 法により解析し、また Ft の IRE と IRP の結合量を解析するにあたり、IRE に蛍光修飾した plobe を合成した。粘膜上皮細胞から採取した IRP1 と plobe を結合させることにより、bandshift assay で IRE/IRP 複合体由来の IRP1 の解析を行う予定である。

【結果】

実験 1

実験 1-1) DMT1 では過剰鉄(10 mg)の投与 3 時間で mRNA 発現が極めて低下し、12 時間まで低値を維持した。一方、タンパク質の発現量は徐々に減少した。Ft ではタンパク質は投与後 3 時間でコントロールレベルまで急速に増加し、12 時間後に約 3 倍まで増加した。この時、mRNA 発現は変化しなかった。

実験 1-2) 鉄 200 μ g の投与では、DMT1mRNA 発現は変動しなかったが、500 μ g~3500 μ g で DMT1 mRNA 発現が低下した。投与 6 時間ではタンパク質発現量に対する影響は認められなかった。Ft mRNA 発現は 200 μ g ~ 3500 μ g のいずれの濃度においても変動しなかった。タンパク質発現量は曝される投与鉄濃度の上昇に伴い増加した。

実験 2 : DMT1 withIRE mRNA 発現は DMT1mRNA (with and without IRE) 発現と同様に 3 時間で低下し 12 時間まで低下した状態のままであった。IRP1 タンパク質発現量は徐々に減少した。IRE と IRP1 の結合量の解析は十二指腸粘膜細胞から抽出した IRE/IRP 由来の IRP1 と Total IRP1 発現量を比較することにより行う。現在 bandshift assay を用いた IRE/IRP1 複合体由来の IRP1 の解析を進めている。

<考察>

200 μ g の鉄はラットに対してほぼ 1 食分 (1 日摂取量の 1/3) に相当するが、この量の投与は貧血ラットの DMT1 や Ft 発現に影響を及ぼさなかった。500 μ g 以上の鉄投与における鉄の投与時間や投与濃度が DMT1 と Ft の mRNA およびタンパク質へ及ぼす影響についてまとめると、DMT1 タンパク質の減少は mRNA の減少を伴うのに対して、Ft タンパク質量の変化に mRNA 発現量の変動を伴わなかった。このことにより、過剰な鉄に対するタンパク質発現の制御が DMT1 では mRNA の発現量の減少により、Ft では mRNA の翻訳制御により行われていることが示唆された。加えて、200 μ g を超えると DMT1mRNA 発現の低下を示すことが認められ、この事はある鉄濃度を境に DMT1 タンパク質発現抑制の On/Off が入れ替わる事を明らかにした。

DMT1 では DMT1 total mRNA と DMT1 withIRE mRNA 発現において過剰鉄の投与に対して同様な減少パターンを示した。十二指腸の DMT1mRNA はその大部分が withIRE 同異体であり、過剰な鉄に応答する DMT1 タンパク質発現は IRE/IRP 系の安定性制御により調節されていると推察できる。Ft では Ft タンパク質発現が IRE/IRP 系による翻訳制御で調節されていることを明らかにするために、現在、IRE/IRP 複合体由来の IRP1 量の解析中である。

IRE/IRP 系は十二指腸粘膜細胞において機能しないと言われているが、過剰な鉄の投与に対する DMT1 タンパク質発現がこの系によりコントロールされていることが本研究により明らかとなった。