

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15125

研究課題名(和文)細胞体セロトニン遊離を選択的に阻害する遺伝学的ツールの開発と神経回路創薬への応用

研究課題名(英文)Genetic tools for circuit-based drug discovery

研究代表者

永安 一樹(Nagayasu, Kazuki)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00717902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳は、無数の神経細胞が互いに情報伝達を繰り返すことで機能している。この情報伝達は、(1)細胞体における発火(2)軸索における活動電位の伝播(3)軸索終末における神経伝達物質の遊離という3段階を経て行われるが、セロトニン神経やドパミン神経においては、細胞体からも神経伝達物質が遊離することが知られている。本研究では、この細胞体からの伝達物質遊離を抑制し得ると考えられるminiSOGのセロトニン神経特異的な発現を可能とするためのプラットフォームとして、ウイルスベクターを用いた手法の確立を目指し、以下の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Neural transmission is achieved through three steps of biological processes. Depolarization and firing at cell somata, propagation of action potential, and release of neurotransmitters from nerve terminals. Different from other types of neurons, serotonin neurons and dopamine neurons release their transmitters from cell somata. However, physiological significance of this type of transmitter release is still unknown. In this research, we established viral-vector based platform for expressing miniSOG, a genetic tool for photo-inducible organelle inactivator, specifically in serotonin neurons.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ウイルスベクター セロトニン

1. 研究開始当初の背景

脳は、無数の神経細胞が互いに情報伝達を繰り返すことで機能している。この情報伝達は、(1) 細胞体における発火 (2) 軸索における活動電位の伝播 (3) 軸索終末における神経伝達物質の遊離という3段階を経て行われるが、セロトニン神経やドパミン神経においては、細胞体からも神経伝達物質が遊離することが知られている (Nieoullon et al., 1977; Hery et al., 1982)。細胞体から遊離したセロトニンは、抑制性の自己受容体である 5-HT_{1A} 受容体を刺激しセロトニン神経活動を抑制していると想定されてきたが、細胞体からの遊離のみを制御する手法は存在せず、その生理的意義の解明には至っていない。

近年、このような細胞内小器官選択的な機能不全を任意のタイミングで誘導できる手法として、miniSOG (Lin et al., 2013) が報告されている。miniSOG は、活性酸素種である一重項酸素を光依存的に産生することで、近傍に存在するタンパク質を不活性化する遺伝学的ツールの一つであり、シナプス小胞に局在させることで、光依存的かつ局所的に神経伝達物質の遊離を抑制することができることが示されている。一方で、このような遺伝学的ツールをセロトニン神経特異的に発現させるためのプラットフォームについては未だ報告がほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、miniSOG のセロトニン神経特異的な発現を可能とするためのプラットフォームとして、ウイルスベクターを用いた手法の確立を目指し、以下の検討を行った。

3. 研究の方法

全ての動物実験は「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「京都大学動物実験規程」を遵守し、京都大学動物実験委員会の承認を受け実施した。

レンチウイルスベクターの構築及び産生、精製は以前の報告に従って行った (Takahashi et al., 2013)。作製したウイルスの機能評価は、精製後のウイルスベクターを、マウス背側縫線核に投与した一週間後に、外来遺伝子とセロトニン神経マーカーである TPH2 に対する免疫組織化学的解析を行うことで実施した。

4. 研究成果

セロトニン神経特異的な遺伝子として、セロトニン合成の律速酵素である TPH2 遺伝子に着目し、そのプロモーター配列を用いたレンチウイルスベクターを構築した。約 2kb の上流配列を有するウイルスベクターを用いて、その特異性および発現強度について免疫組織化学的手法、電気生理学的手法を用いて解析した。その結果、マウスプロモーターを用いた場合、ラットプロモーターを用いた場合のいずれの場合でも、95%以上の高い

特異性が得られたこと、抗体による増感を伴うことなく外来遺伝子 Venus の蛍光を観察することができたことから、約 2kb の TPH2 プロモーターを用いることで、セロトニン神経特異的かつ強力に外来遺伝子を発現可能であることが明らかになった (図 1)。

次に、miniSOG の機能を確認する上で必須となる、セロトニン神経を外来性に活動させる刺激について検討を行った。既存の抗うつ薬であるセロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) は、セロトニンの再取り込みを防ぐことで、シナプス間隙のセロトニン濃度を上昇させるため、セロトニン神経活動自体は抑制するという特徴があり、セロトニン神経活動を外来性に引き起こし得る刺激としては適切ではないと考えられる。そこで、近年、SSRI や SNRI とは異なるメカニズムで、迅速に抗うつ作用を引き起こすことが報告されている、麻酔薬ケタミンに着目し、検討を行った。

うつ病と関連の深い脳部位である前頭前野皮質に透析プローブを埋め込み、リングル液を恒常的に灌流し、灌流後の液を HPLC により連続的に分析することで、前頭前野皮質のセロトニン濃度を経時的に測定した。ケタミン (30 mg/kg) をラットに皮下投与することにより、前頭前野皮質セロトニン濃度は上昇した。次に、このセロトニン濃度上昇が、再取り込み阻害によるものではなく、セロトニン神経活動の亢進を介したものであることを示すため、背側縫線核セロトニン神経活動を制御しているアセチルコリン神経核である、背外側被蓋核 (LDTg) および脚橋被蓋核 (PPTg) を電氣的に傷害させたラットを用いて検討を行った。その結果、PPTg 傷害により、ケタミンの前頭前野皮質セロトニン遊離作用は有意に減弱した。一方、LDTg 傷害は、ケタミンの前頭前野皮質セロトニン遊離に有意な影響を与えなかった。

さらに、前頭前野皮質セロトニン遊離に対するケタミンの PPTg への直接作用を検討するとともに、セロトニン再取り込みの場である前頭前野へのケタミンの影響を完全に排除して検討を進めるため、PPTg にケタミンを灌流する検討を行った。その結果、PPTg にケタミン (0.1 mM) を灌流するだけで、前頭前野皮質セロトニン遊離は有意に増加した。一方で、LDTg へのケタミンの灌流は、前頭前野皮質セロトニン遊離に有意な影響を与えなかった。さらに、PPTg へのケタミン灌流によるセロトニン遊離は、背側縫線核への AMPA 型グルタミン酸受容体阻害薬 NBQX (0.3 nmol) あるいは $\alpha 4 \beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬 DH β E (10 nmol) の前投与によりほぼ完全に抑制された。これらの結果は、ケタミンが、PPTg のアセチルコリン神経を活性化させることで、背側縫線核セロトニン神経を間接的に活性化させ、前頭前野皮質セロトニン濃度を上

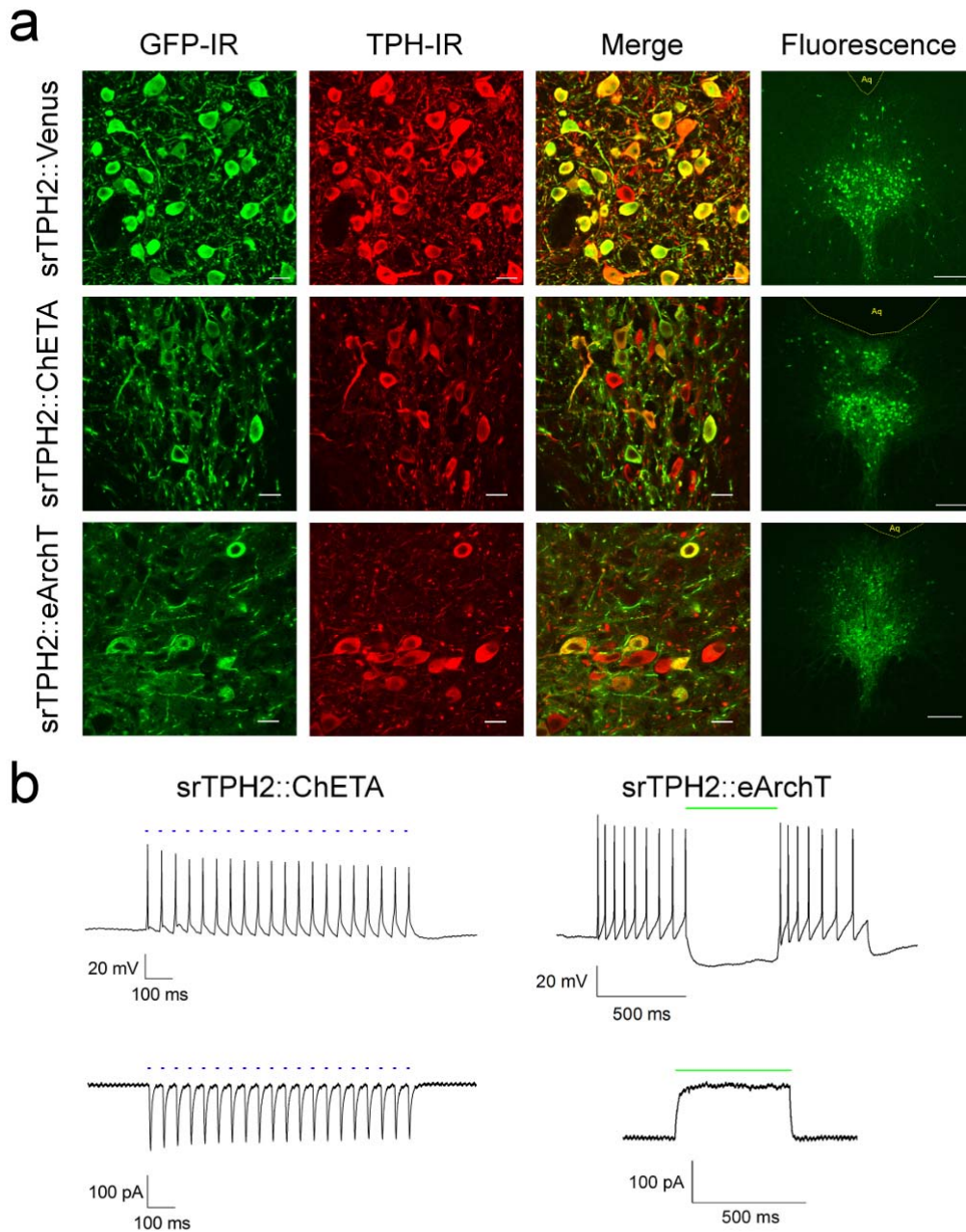


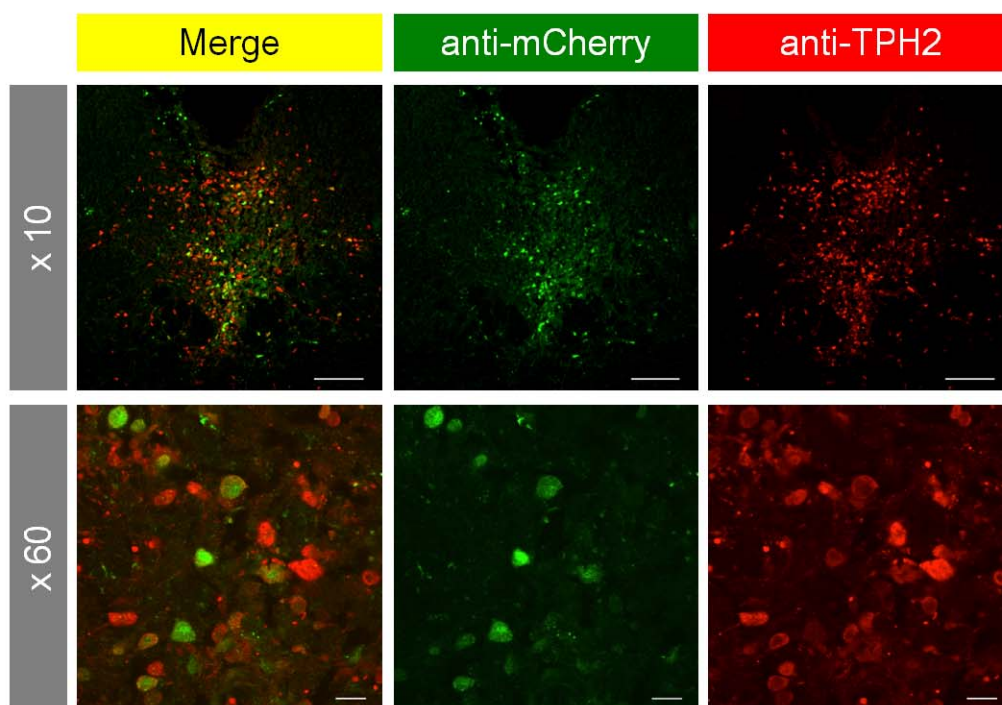
図1. ラット TPH2 プロモーターを有するウイルスベクターによる外来遺伝子のセロトニン神経特異的発現. (a, 左、中左、中右) 外来遺伝子として用いた Venus, ChETA-eYFP, eArchT-eYFP を抗 GFP 抗体により, セロトニン神経を抗 TPH 抗体によりそれぞれ染色した. (a, 右) Venus および eYFP の蛍光. (b) eYFP 陽性細胞に光照射を行った際の膜電位変化および電流応答.

昇させている可能性を強く示唆している。従って、ケタミンを用いることで、SSRI や SNRI と異なりセロトニン神経活動を直接活性化させ得ることが示された (Kinoshita et al., 2018)。

次に、確立したセロトニン神経特異的ウイルスベクターを用いることで、miniSOG のセロトニン神経特異的発現が可能か否か検討した。その結果、マウス TPH2 プロモータ

ーを用いたウイルスベクターに miniSOG を搭載することで、2種類の miniSOG いずれもセロトニン神経特異的に発現させることが可能であることが明らかになった (図2)。一方で、TPH2 の染色像から、細胞毒性がわずかにある可能性が示唆されることから、今後、適切な発現量に制御することで、miniSOG を用いたシナプス小胞の場所特異的機能抑制が可能となると考えられる。

I
a LVV-sinmTPH2-SYP1-miniSOG-T2A-mCherry



b LVV-sinmTPH2-miniSOG-VAMP2-T2A-mCherry

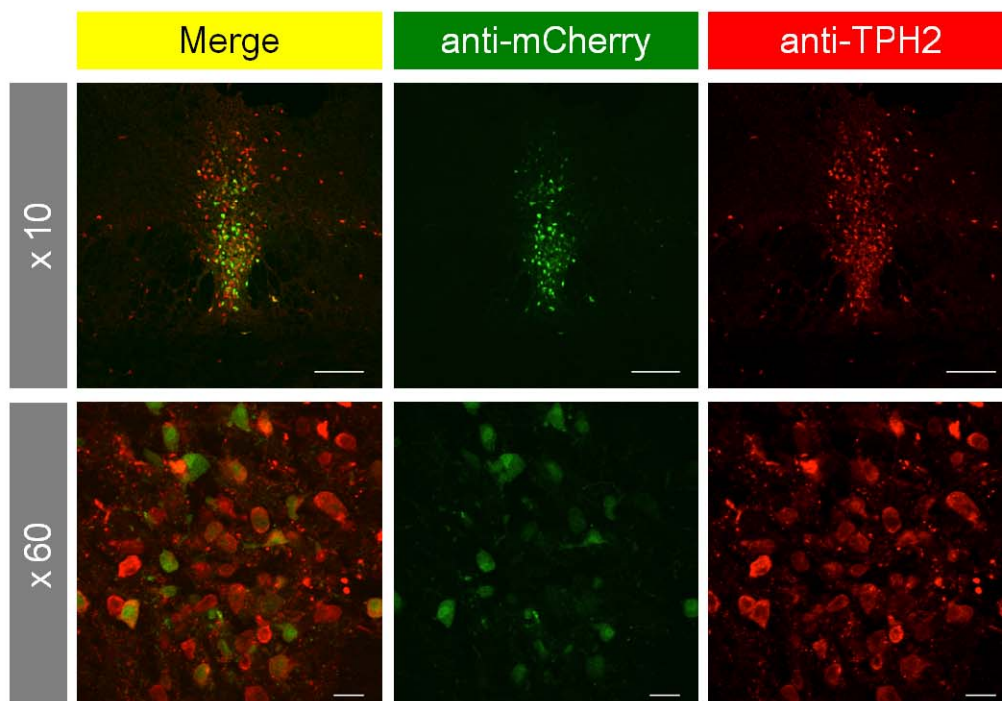


図2. マウス TPH2 プロモーターを有するウイルスベクターによる miniSOG のセロトニン神経特異的発現.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件) (全て査読有)

- ① Matsumura K, Nakazawa T, Nagayasu K, Gotoda-Nishimura N, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani

- N, Yamamori H, Yasuda Y, Hashimoto R, Hashimoto H. De novo POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. *J Mol Psychiatry*. 2016;4:1.
- ② Asaoka N, Kawai H, Nishitani N, Kinoshita H, Shibui N, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. A new designer drug 5F-ADB activates midbrain dopaminergic neurons but not serotonergic neurons. *J Toxicol Sci*. 2016;41(6):813-816.
- ③ Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Kanoh T, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Ohi K, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Kasai A, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Takuma K, Ogawa A, Baba A, Hashimoto H. Prostaglandin D2 signaling mediated by the CRTH2 receptor is involved in MK-801-induced cognitive dysfunction. *Behav Brain Res*. 2016;314:77-86.
- ④ Nagayasu K. Elucidation of the Role of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons in Mood Regulation Using Pharmacological and Viral Vector-based Approaches. *Yakugaku Zasshi*. 2017;137(3):341-346.
- ⑤ Nagayasu K, Kaneko S. Pharmacological approach for elucidating the role of dorsal raphe serotonin neurons in mood/emotion regulation. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2017;149(1):44-47.
- ⑥ Oyama S, Dogishi K, Kodera M, Kakae M, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Pathophysiological Role of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 in a Mouse Long-Lasting Cystitis Model Induced by an Intravesical Injection of Hydrogen Peroxide. *Front Physiol*. 2017;8:877.
- ⑦ Miyake T, Nakamura S, Meng Z, Hamano S, Inoue K, Numata T, Takahashi N, Nagayasu K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. Distinct Mechanism of Cysteine Oxidation-Dependent Activation and Cold Sensitization of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel by High and Low Oxaliplatin. *Front Physiol*. 2017;8:878.
- ⑧ Sukeishi A, Isami K, Hiyama H, Imai S, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Colchicine alleviates acute postoperative pain but delays wound repair in mice: roles of neutrophils and macrophages. *Mol Pain*. 2017;13:1744806917743680.
- ⑨ Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr Res*. 2017;181:75-82.
- ⑩ Shirakawa H, Katsumoto R, Iida S, Miyake T, Higuchi T, Nagashima T, Nagayasu K, Nakagawa T, Kaneko S. Sphingosine-1-phosphate induces Ca²⁺ signaling and CXCL1 release via TRPC6 channel in astrocytes. *Glia*. 2017;65(6):1005-1016.
- ⑪ Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue KI, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H. High-Speed and Scalable Whole-Brain Imaging in Rodents and Primates. *Neuron*. 2017;94(6):1085-1100.e6.
- ⑫ Asaoka N, Nishitani N, Kinoshita H, Kawai H, Shibui N, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Chronic antidepressant potentiates spontaneous activity of dorsal raphe serotonergic neurons by decreasing GABAB receptor-mediated inhibition of L-type calcium channels. *Sci Rep*. 2017;7(1):13609.
- ⑬ Kinoshita H, Nishitani N, Nagai Y, Andoh C, Asaoka N, Kawai H, Shibui N, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Ketamine-Induced Prefrontal Serotonin Release Is Mediated by Cholinergic Neurons in the Pedunculopontine Tegmental Nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018;21(3):305-310.
- ⑭ Miyanohara J, Kakae M, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, Arai K, Shirakawa H, Kaneko S. TRPM2 Channel Aggravates CNS

Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. J Neurosci. 2018;38(14):3520-3533.

- ⑮ Ohashi K, Deyashiki A, Miyake T, Nagayasu K, Shibasaki K, Shirakawa H, Kaneko S. TRPV4 is functionally expressed in oligodendrocyte precursor cells and increases their proliferation. Pflugers Arch. 2018;470(5):705-716.

〔学会発表〕（計 2 2 件）

- ① 木ノ下晴子、西谷直也、浅岡希美、河合洋幸、澁井紀宏、永井佑茉、安藤千紘、永安一樹、白川久志、中川貴之、金子周司：ケタミンの前頭前野セロトニン遊離作用におけるアセチルコリン神経核の関与（第 132 回 日本薬理学会近畿部会、平成 29 年 1 1 月）
- ② 澁井紀宏、西谷直也、永井佑茉、安藤千紘、浅岡希美、河合洋幸、木ノ下晴子、白川久志、中川貴之、大村優、永安一樹、金子周司：ゲノム編集技術を用いた脳神経核特異的セロトニン受容体欠損マウス作製の試み（第 67 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 29 年 1 0 月）
- ③ Nozomi Asaoka, Naoya Nishitani, Hiroyuki Kawai, Haruko Kinoshita, Norihiro Shibui, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko: Chronic antidepressant treatment increases pacemaker activity of dorsal raphe serotonergic neurons. （第 90 回日本薬理学会年会、平成 29 年 3 月）など

〔図書〕（計 0 件）

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/channel/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永安 一樹 (NAGAYASU, Kazuki)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：00717902

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

金子 周司 (KANEKO, Shuji)

京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：60177516

(4) 研究協力者

該当なし