

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07405

研究課題名（和文）アミノペプチダーゼ機能不全に伴うセロトニン合成神経異常と不安障害発症機構の解明

研究課題名（英文）Dysfunction of ERAP1 induces anxiety disorder via excess serotonin synthesis

研究代表者

後藤 芳邦（GOTO, Yoshikuni）

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：90455345

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体アミノペプチダーゼ1（ERAP1）の酵素活性の低下は不安行動を促進する。本研究ではERAP1遺伝子欠損に伴う不安行動の促進機構を明らかにすることを目的とした。本研究により、脳（特に縫線核）におけるERAP1酵素活性の消失が、セロトニン合成酵素（TPH2）の転写抑制因子（REST）の発現を抑制することでセロトニンの合成を過剰に促進することを明らかにした。そして、ERAP1遺伝子欠損により惹起されるストレス行動は、この過剰なセロトニンが原因であることを示した。したがって、ERAP1は脳内セロトニンの調節因子の一つであり、ERAP1の機能不全が不安障害を惹起しえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにERAP1の高次機能への関与を示唆する知見はなく、現段階で本酵素が精神障害の原因遺伝子となるとの報告はない。ERAP1遺伝子上の一塩基多型の中に酵素活性を70%程度低下させるものが存在することが分かっている。この遺伝子変異のマイナーアレル頻度は、人種問わず>0.4であることから、ERAP1が不安障害の原因遺伝子である可能性が高い。本成果を契機として不安障害の発症機会が理解できれば、明確な線引きの難しい不安障害と類似精神障害間の誤診を防ぐ一助となり得る。

研究成果の概要（英文）：Reduction of enzymatic activity of ERAP1 promotes anxious behaviors. In this study, we elucidated the mechanisms promoting anxious behavior associated with ERAP1 gene deletion.

We found that loss of ERAP1 enzyme activity in the raphe nucleus of the brain promotes excessive serotonin synthesis by suppressing the expression of the tryptophan hydroxylase 2-transcriptional repressor, REST. We also showed that the stress behavior elicited by ERAP1 gene deficiency is due to excess serotonin. Thus, ERAP1 is one of the regulators of serotonin synthesis in the brain and dysfunction of ERAP1 can induce anxiety disorders.

研究分野：生化学

キーワード：アミノペプチダーゼ 不安障害 セロトニン セロトニン神経 TPH2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体アミノペプチダーゼ 1 (ERAP1) は、小胞体内腔において MHC クラス I 分子が提示する抗原ペプチドを生成する酵素である。最近、本酵素の遺伝子欠損 (KO) が、不安行動を惹起することを見出した。具体的には、ERAP1-KO マウスでは野生型 (WT) マウスに比べて不安レベルが高く、且つストレス耐性や活動量、社会性相互作用が低いことを明らかにした。同マウスの脳内では、セロトニン (5-HT) 合成の律速酵素 トリプトファン水酸化酵素 2 (TPH2) および最終合成酵素 芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) が増加しており、脳内 5-HT 量は野生型マウスに比べて 2 倍程度高い値を示す。加えて、5-HT 神経の増加と同神経軸索の形成不全も認められた。近年、不安障害患者の脳内 5-HT レベルが高いことが報告された。これらの結果は、ERAP1 が高次機能の形成に関与し、本酵素機能不全が不安障害を惹起することを示唆する。これまでに、ERAP1 遺伝子上の ERAP1 活性を 70%低下させる塩基多型 rs30187 が非常に高い頻度 (マイナーアレル頻度 0.4) で存在することが分かっている。これらの知見を考え合わせると、ERAP1 が不安障害の原因遺伝子である可能性が高い。

### 2. 研究の目的

本研究では、ERAP1-KO が引き起こす不安行動の分子機構を解明することを目的とした。そのために今回、以下の 5 項目 (1.脳内における ERAP1 と 5-HT 合成酵素の発現分布、2.ERAP1-KO に伴う摂食量と体重の経時的測定、3.ERAP1-KO に伴う 5-HT 合成機構、4.ERAP1-KO に伴う神経突起形成異常の分子機構、5.ERAP1-KO に伴う不安行動に対する 5-HT 受容体阻害剤の効果) について明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)脳内における ERAP1 と 5-HT 合成酵素の発現分布

野生型マウスの全脳を摘出し、脳領域別に切り分け、各領域中に含まれる ERAP1 および TPH2 mRNA 発現量を Real-Time PCR 法により定量した。

#### (2)ERAP1-KO に伴う摂食量と体重の経時的測定

野生型および ERAP1-KO マウス (1-12 ヶ月齢) の食餌量と体重を経時的に測定した。

#### (3)ERAP1-KO に伴う 5-HT 合成機構

野生型および ERAP1-KO マウスの脳室下帯由来の神経幹細胞をベスタチンもしくはベスタチンエステル (100  $\mu$ M) で 24 時間処理した後、二種の 5-HT 合成酵素 (TPH2、AADC) の mRNA 量を Real-Time PCR 法により定量した。また、野生型および E309Q (酵素活性喪失型) 変異体 ERAP1 を強制発現した同細胞についても上記三遺伝子発現量を同様の方法で定量した。

野生型および ERAP1-KO マウスの全脳抽出液中の 3 種の TPH2 遺伝子転写調節因子 (REST、GFI-1、NeuroD) mRNA 量について、Real-Time PCR 法により定量した。

#### (4)ERAP1-KO に伴う神経突起形成異常

ERAP1-KO 神経幹細胞の浮遊培養時のニューロスフィアの大きさ (直径) を経時的に測定し、野生型マウス由来の神経幹細胞のものと比較した。

ERAP1-KO 神経幹細胞を神経細胞へと分化させた際に観察される神経突起の長さ、分岐数を測定し、野生型マウス由来の神経細胞と比較した。

野生型および ERAP1-KO マウスの全脳抽出液中の神経成長因子 NGF および NGF 受容体 (NGFR) mRNA 発現量を Real-Time PCR 法により定量した。

#### (5)ERAP1-KO に伴う不安行動に対する 5-HT 受容体阻害剤の効果

ERAP1-KO マウスを Metergolin (終濃度 20-40  $\mu$ g/1kg-bodyweight/day) および Ketanserin (40  $\mu$ g-120  $\mu$ g/kg-bodyweight/day) を含む飲料水を用いて、二週間以上飼育した後、尾懸垂試験、社会性相互作用試験 (3 チャンバー試験)、高架式十字迷路試験を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1)脳内における ERAP1 と 5-HT 合成酵素の発現分布

ERAP1 と TPH2 の脳内発現パターンを明らかにするため、脳内各領域 (大脳、小脳、海馬、嗅球、下垂体) と 5-HT 合成領域 (縫線核) における両者の mRNA 発現量を定量したところ、TPH2 の

発現が高い領域(=縫線核)では、ERAP1 の発現量も高いことが分かった。ERAP1 遺伝子欠損が TPH2 の発現を抑制することを考慮すると、この結果は ERAP1 が縫線核における 5-HT の過剰な合成を恒常的に抑制していることを示唆する。

#### (2)ERAP1-KO に伴う摂食量と体重の経時的測定

ERAP1-KO マウスは不安亢進に伴う活動期活動量の低下が認められることを既に明らかにしている。この行動が、マウスの食事量と共に体重に及ぼす影響を解析した。その結果、ERAP1-KO は食事量には影響を及ぼさず、一方で体重の増加を促進することが分かった(図1)。すなわち、ERAP1-KO は運動不足が原因で体重増加を招くことが示された。

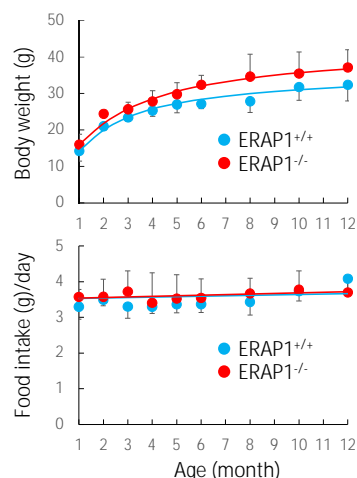


図1. ERAP1 遺伝子欠損マウスの体重と食餌量

#### (3)ERAP1-KO に伴う 5-HT 合成機構

細胞外のアミノペプチダーゼ活性を阻害するベスタチンは TPH2 および AADC の発現に影響を及ぼさなかったが、細胞内アミノペプチダーゼ活性を抑制するベスタチンエステルは両遺伝子発現を亢進した。また、ERAP1-KO 神経幹細胞における野生型 ERAP1 の強制発現は、上記両 5-HT 合成遺伝子の発現を低下させたが、E309Q 変異体 ERAP1 ではそのような効果は認められなかった(図2)。以上より、ERAP1 は自身の酵素活性を介して 5-HT 合成遺伝子の発現を抑制していることが示された。

5-HT 合成において TPH2 は律速酵素である。そこで、ERAP1-KO マウスの全脳中の TPH2 転写調節因子の発現量を調べたところ、TPH2 の強力な発現抑制因子として知られる REST 遺伝子の発現が ERAP1-KO に伴い 20-30%低下することが分かった。一方で、他の因子(GFI-1 や NeuroD) の発現量については ERAP1-KO の影響は認められなかった。

以上の結果をまとめると、ERAP1 遺伝子欠損に伴う 5-HT 量の増加は、ERAP1 活性の喪失によって REST 遺伝子の発現が抑制され、その結果 TPH2 (および AADC) の発現が亢進されることが原因であることが分かった。

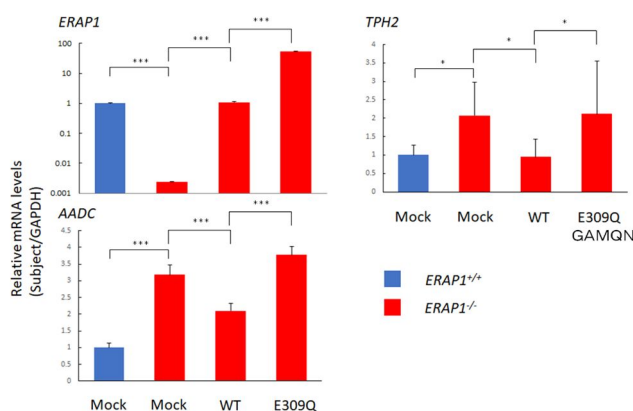


図2 野生型もしくは変異体 ERAP1 を発現させた ERAP1 遺伝子欠損神経幹細胞における各遺伝子発現量

#### (4)ERAP1-KO に伴う神経突起形成異常

ERAP1 遺伝子欠損細胞のニューロスフィア直径は、時間依存的に野生型細胞に比べて大きくなり、培養 5 日目には野生型細胞のおよそ 2 倍を示した。また、上記両神経幹細胞を神経細胞へと分化させたところ、野生型神経では分化刺激から 4 日目まで神経突起の伸長が認められたが、遺伝子欠損神経では刺激 2 日目以降は伸長が認められなくなった。一方、細胞体から伸長する突起数は野生型細胞ではほとんど変化しなかったが、遺伝子欠損細胞では時間と共に増加し、刺激 4 日目には野生型細胞の 2 倍の値を示した。加えて、遺伝子欠損神経の神経突起上の分岐は野生型神経に比べて常に 2~3 倍程度多かった。以上の結果は、ERAP1 遺伝子欠損が神経の伸長や剪定を調節していることを示唆する。

さらに、神経突起の形成に関与する NGF と NGFR の発現量を ERAP1-KO マウスの全脳抽出液を用いて解析した。その結果、同遺伝子欠損は、NGF の発現量に影響を及ぼさなかったが、NGFR の発現量が 10-30%減少することが分かった。この結果は、ERAP1 遺伝子欠損神経が神経成長シグナルを受容し難くなっており、神経可塑性に影響を及ぼすことを予想させる。

#### (5)ERAP1-KO に伴う不安行動に対する 5-HT 受容体阻害剤の効果

ERAP1-KO マウスへの 5-HT 受容体阻害剤 Metergol in および Ketanserin の経口投与が、ERAP1 遺伝子欠損に伴って低下する尾懸垂試験時の無動時間(ストレスに対する耐性)を野生型マウスと同程度まで緩和することを明らかにした。一方で、ERAP1 遺伝子欠損マウスへの同薬剤投与は侵入者マウスに対する臭いかぎ行動(社会性)には影響を及ぼさず、高架式十字迷路試験に至っては ERAP1 遺伝子欠損で認められるオープンアーム滞在時間の低下(不安レベルの亢進)をさらに増悪した。以上の結果は、ERAP1 遺伝子欠損に伴う 5-HT 合成酵素の発現亢進と神経突起形成不全によって複雑な脳内 5-HT 動態が生じていることを示唆する。

以上の結果より、ERAP1 機能不全は、脳内 5-HT の過剰合成とその輸送に関与する神経突起形

成異常を惹起することで、脳領域別に脳内 5-HT の過不足を誘発すると考えられる。その結果、5-HT 過剰性の異常行動( ストレス耐性の低下)と 5-HT 不足による異常行動( 不安レベルの亢進) が認められるようになると考えられる。また、上記現象の分子機構として ERAP1 活性喪失による TPH2 転写抑制因子の発現抑制や NGF シグナリング不全による神経突起形成異常が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Goto Yoshikuni, Nakamura Takahiro J., Ogawa Kenji, Hattori Akira, Tsujimoto Masafumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Reciprocal Expression Patterns of Placental Leucine Aminopeptidase/Insulin-Regulated Aminopeptidase and Vasopressin in the Murine Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2020.00168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsujimoto Masafumi, Aoki Kazuma, Goto Yoshikuni, Ohnishi Atsushi	4. 巻 169
2. 論文標題 Molecular and functional diversity of the oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 409 ~ 420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsujimoto Masafumi, Aoki Kazuma, Ohnishi Atsushi, Goto Yoshikuni	4. 巻 43
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 beyond Antigenic Peptide-Processing Enzyme in the Endoplasmic Reticulum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 207 ~ 214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00857	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 辻本 雅文、青木 一真、大西 敦、後藤 芳邦	4. 巻 91
2. 論文標題 多機能性酵素としての小胞体アミノペプチダーゼ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 666 ~ 680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Yuko, Akimoto Yoshihiro, Ikemoto Mamoru, Goto Yoshikuni, Ishikawa Anna, Ohta Sakura, Takase Yumi, Kawakami Hayato, Tsujimoto Masafumi, Yanoshita Ryohei	4. 巻 27
2. 論文標題 Stability of human salivary extracellular vesicles containing dipeptidyl peptidase IV under simulated gastrointestinal tract conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101034 ~ 101034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 後藤芳邦、津元裕樹、三浦ゆり、遠藤玉夫、野元裕、辻本雅文、中西雅之
2. 発表標題 Trypanosoma brucei 由来VSGによるマクロファージの活性化
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斎藤朱里、後藤芳邦、中村孝博、小川健司、服部明、辻本雅文
2. 発表標題 小胞体アミノペプチダーゼ1遺伝子欠損は、セロトニン合成を亢進することで不安を誘発する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤芳邦、辻本雅文、野元裕、中西雅之
2. 発表標題 Trypanosoma brucei に対する宿主マクロファージの生体防御反応
3. 学会等名 第90回 日本寄生虫学会 第32回 日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------