

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590249

研究課題名（和文）前頭前野セロトニン神経系を標的とした精神疾患治療薬開発の基盤研究

研究課題名（英文）Research on serotonergic neurons projecting to the prefrontal cortex as a target of drug development against psychiatric disorders

研究代表者

鈴木 秀典（SUZUKI HIDENORI）

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30221328

研究成果の概要（和文）：成長後に不安様行動が出現する病態モデルラットで、発達期に前頭前野の 5-HT_{1A} セロトニン受容体 mRNA が減少していたが、選択的セロトニン再取り込み阻害薬や 5-HT_{1A} 作動薬の新生仔期治療で行動と併せ改善した。前頭前野にセロトニン神経系を投射する中脳背側縫線核において、GABA 作動性介在ニューロンは 5-HT_{1A}、5-HT_{2A/2C} および 5-HT₇ 受容体を介してセロトニンに対する多様な反応を引き起こした。

研究成果の概要（英文）：In rats with late-emerging anxiety symptoms, decreased expression of 5-HT_{1A} receptor (5-HT_{1A}-R) mRNA was observed in the medial prefrontal cortex (mPFC) before emerging of the abnormal behaviors. Early therapeutic interventions with serotonergic drugs prevented the anxiety symptoms in the rats in association with normalization of 5-HT_{1A}-R mRNA expression. In the dorsal raphe nucleus innervating mPFC, electrophysiology revealed that various current responses were elicited by serotonin in GABAergic cells via multiple 5-HT receptor subtypes, including 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₇.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：5-HT 受容体、中脳背側縫線核、セロトニン神経細胞、GABA 作動性神経細胞、不安障害、選択的セロトニン再取り込み阻害薬、前頭前野、海馬

1. 研究開始当初の背景
心的外傷後ストレス障害 (PTSD) を含む不安障害やうつ病等の気分障害は非常に高い罹

患率を有し、治療薬の開発は我が国のメンタルヘルス対策の最重要課題の一つである。これらの病態仮説として、情動機構を司る神経

回路内の機能異常が提唱されている。すなわち、情動の発現に関わる部位（扁桃体や島、前部帯状回など）と、それらの活動を制御する部位（背側前頭前野など）との均衡が損なわれていると考えられている。事実、先行研究では情動回路の一部である扁桃体の機能亢進や、前頭前野における機能低下が示唆されている (Phillips et al., *Biol Psychiatry*, 2003, 54, 515.)。扁桃体に関しては、PTSDモデルと位置付けられる恐怖条件付け学習機構の責任部位として研究が急速に進展しているが、その制御系としての前頭前野に関しては、研究が立ち後れている。

我々は健康人を対象とした薬理的 fMRI 研究において、注意課題施行中に選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) が、背側前頭前野の脳活動を上昇させることを観察した。扁桃体では反対に脳活動は減少することから、この結果は、セロトニン系薬物が脳部位特異的に効果発現すること、治療標的として前頭前野が重要であることを示している。

一方、動物実験において、ステロイドによるストレス負荷を妊娠ラットにかけたところ、仔ラットは成熟期以降に不安様行動を顕在化させた (Nagano et al., *Neurosci Res*, 2008, 60, 364) が、前頭前野のセロトニン受容体 5-HT_{1A} mRNA は、4 週の時点ですでに低下する予備の結果を得た。すなわち、前頭前野におけるセロトニン神経系の異常に対する適切な早期治療によって病態が改善することを示している。

マウス海馬においては、SSRI の慢性投与がセロトニンに対するシナプス応答を安定化させることを見いだした (Kobayashi et al., *J Neurosci*, 2008, 28, 6272)。この作用は 5-HT₄ 受容体を介しており、細胞内情報伝達系が薬物投与に伴って変化していた。前頭前野には、海馬と同様に 5-HT₄、5-HT_{1A} および 5-HT_{2A}

など複数のセロトニン受容体が発現することが知られているので、病態や治療によってこれらセロトニン受容体特性とそれに起因するシナプス伝達修飾が変化する可能性が高い。

セロトニンによるシナプス伝達修飾作用に関しては、小脳プルキンエ細胞と深部小脳核間の GABA 作動性神経において、シナプス前後で異なる受容体サブタイプによってシナプス伝達が修飾されることを明らかにした。その結果、セロトニンが小脳からの出力パターンをダイナミックに変化させることを報告した (Saitow et al., *J Neurophysiol*, 2009, 101, 1361)。前頭前野においても受容体特異的な修飾機構の存在が推測されるが、解析は未だ行われていない。

前頭前野におけるセロトニン神経系に着目した研究としては、国内では吉岡博士らの *in vivo* 電気生理実験が報告され (Koseki et al., *Synapse*, 2009, 63, 805 他)、その重要性は示されているが、単一細胞レベルでの研究はなされていない。国外では、Zhuo ら限られたグループがスライス標本を用い前頭前野での研究をしているが (Wu et al., 2009, *Mol Brain* 他)、セロトニン神経系に関する報告はない。以上の点を踏まえ、前頭前野セロトニン作動性神経系による修飾機構が精神疾患病態およびその治療標的として重要であり、詳細に検討する必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえ、本研究では精神疾患治療薬開発の標的の 1 つとして前頭前野セロトニン神経系を捉え、その神経機構を包括的に検討することを目的として、以下に挙げる点を中心課題に据えた。

(1) 病態モデル動物におけるセロトニンに

よる修飾機構異常の解明

(2) 電気生理学的变化及び行動変化を裏付ける遺伝子発現の検討

(3) 前頭前野におけるセロトニンによるシナプス伝達修飾機構の詳細と発達変化の解析

(4) 新たなin vivo実験系を駆使したセロトニンによる修飾機構の解明

3. 研究の方法

(1) 電気生理学実験

げっ歯類（マウス、ラット）脳スライス標本を用いて、電気生理学的に興奮性及び抑制性神経伝達に対するセロトニンの作用を調べた。関与する受容体サブタイプについて薬理的に検討した。

(2) 分子生物学実験

病態モデルあるいは治療薬投与でセロトニンによる修飾機構はどのような変化を受けるかについて、複数のセロトニン受容体サブタイプ mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。

(3) 行動実験

野生型および病態モデル動物に関して、治療薬投与が行動にどのような影響を与えるかを、不安関連行動を中心として観察した。評価系として、オープンフィールド試験、明暗選択試験、高架式十字迷路試験を用いた。

4. 研究成果

(1) 病態モデル動物におけるセロトニンによる修飾機構異常の解明および行動変化を裏付ける遺伝子発現の検討

疾患モデル系を用いて、セロトニン神経系の病態への関与およびセロトニン神経系修飾による治療の有用性について検討した。

① 妊娠期母体にストレス因子としてデキサメタゾンを投与することによって、生まれた仔において発達期に前頭前野の 5-HT_{1A} セロ

トニン受容体 mRNA と脳由来神経栄養因子の減少が先行して観察され、成長後に不安様行動が出現することを見出した。この仔を生後 3 週間選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) で処置すると、これら分子変化および行動異常が回復した。さらに、この回復機構に関与するセロトニン受容体サブタイプを明確にするために、5-HT_{1A} 受容体作働薬の効果を検討した。生後 3 週間 5-HT_{1A} 受容体作働薬を処置すると、これら分子変化および行動異常が回復することが明らかになった。不安障害発症の防止に向けて、前頭前野 5-HT_{1A} 受容体機能改善による早期介入療法の可能性が示唆された。

② SSRI を成体マウスに 4 週間慢性経口投与することによって、ホームケージの活動が不安定化し、不安様行動が亢進することが観察された。これらの行動変化は電気生理学および生化学的に検討した結果、海馬歯状回神経細胞の幼若化と関連していることを見いだした。これらの変化は、5-HT₄ セロトニン受容体ノックアウトマウスでは見られなかったことから、5-HT₄ 受容体が SSRI の効果発現に関与すると考えられた。同時に D₁ ドパミン受容体を介するシナプス伝達増強も亢進することが明らかになった。これと並行して放射性リガンド結合実験によって D₁ ドパミン受容体が歯状回特異的に増加していた。このドパミン応答の亢進作用は 5-HT₄ ノックアウトマウスでも観察され、5-HT₄ は関与しないことも明らかになった。これらの結果は、現在の気分障害および不安障害治療薬である SSRI の有効性と問題点を示唆しており、今後の治療薬開発に重要な情報であると考えられる。

(2) セロトニンによるシナプス伝達修飾機構の薬理的・電気生理学的解析

セロトニンニューロン細胞体が分布し、前頭

前野を含む上位中枢に広汎な軸索を投射している中脳背側縫線核 (DRN) に焦点をあて、セロトニンニューロンの活動を修飾している GABA 作動性介在ニューロンについて電気生理学的検討を行った。この目的のために、green fluorescent protein (GFP) の発現を glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 promoter で制御することによって、GABA 含有ニューロンを選択的に可視化できる遺伝子改変マウスを用いた。背側縫線核正中部に位置する GFP 陰性細胞のほとんどが TPH 陽性 (セロトニンニューロン) であった。この GFP 陰性細胞と比較して、GFP 陽性細胞 (GABA ニューロン) は静止膜電位が浅く、活動電位閾値が深く、膜抵抗が高いという特性を有した。GFP 陽性細胞ではセロトニンにより 78% で内向き電流、15% で外向き電流が惹起され、7% で無反応であった。受容体サブタイプ選択的薬物による実験結果から、セロトニンに対する縫線核 GABA ニューロンの多様な反応は単一の受容体効果ではなく、5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} および 5-HT₇ 受容体などの相互作用・相殺効果によって惹起されることが明らかとなった。これらの結果は、セロトニン神経系異常を伴う精神神経疾患病態の解明に向けて、基盤となる神経生理学的情報を提供し、セロトニン受容体が関与する新たな治療戦略の開発につながるものと考えられる。

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 28 件)

- ①Gocho Y, Sakai A, Yanagawa Y, Suzuki H, Saitow F. Electrophysiological and pharmacological properties of GABAergic cells in the dorsal raphe nucleus. *J Physiol Sci*, 63:147-154, (2013) 査読有 DOI:10.1007/s12576-012-0250-7

- ②Kobayashi K, Haneda E, Higuchi M, Suhara T, Suzuki H. Chronic fluoxetine selectively upregulates dopamine D1-like receptors in the hippocampus. *Neuropsychopharmacol.* 37:1500-1508, 2012. 査読有 DOI:10.1038/npp.2011.335

- ③Nagano M, Liu M, Inagaki H, Kawada T, Suzuki H. Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone. *Neuropharmacology* 63:292-300, 2012. 査読有 DOI:10.1016/j.neuropharm.2012.03.027

- ④Marutani T, Yahata N, Ikeda Y, Ito T, Yamamoto M, Matsuura M, Matsushima E, Okubo Y, Suzuki H, Matsuda T. Functional magnetic resonance imaging study on the effects of acute single administration of paroxetine on motivation-related brain activity. *Psychiatry Clin Neurosci.* 65: 191-198, 2011. 査読有 DOI: 10.1111/j.1440-1819.2011.02189.x.

- ⑤Kobayashi K, Ikeda Y, Suzuki H. Behavioral destabilization induced by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Mol Brain.* 4:12, 2011. 査読有 DOI: 10.1186/1756-6606-4-12.

- ⑥Murano M, Saitow F, Suzuki H. Modulatory effects of serotonin on glutamatergic synaptic transmission and long-term depression in the deep cerebellar nuclei. *Neurosci*, 172: 118-128. (2011) 査読有 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.037

- ⑦Kobayashi K, Ikeda Y, Sakai A, Yamasaki N, Haneda E, Miyakawa T, Suzuki H.

Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants. Proc Natl Acad Sci USA. 107:8434-8439, 2010. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.0912690107

[学会発表] (計 71 件)

- ①牛腸義宏, 齋藤文仁, 柳川右千夫, 坂井敦, 鈴木秀典. マウス背側縫線核におけるニューロンの電気生理学的特性. 第 90 回日本生理学会大会, 2013. 3. 27-29, タワーホール船堀 (東京)
- ②永野昌俊. 胎児期ストレス誘導性の行動異常とセロトニンシグナリング. 第 18 回「性と生殖」公開シンポジウム 第 5 回早稲田大学-日本医科大学合同シンポジウム, 2012. 12. 22, 早稲田大学国際会議場(東京)
- ③永野昌俊, 劉明妍, 鈴木秀典. フルオキセチンによる早期介入が胎生期にグルココルチコイドに暴露されたラットにおけるセロトニン神経系と行動の異常を改善する. 第 35 回日本神経科学大会, 2012. 9. 18-21, 名古屋国際会議場(愛知)
- ④牛腸義宏, 齋藤文仁, 柳川右千夫, 鈴木秀典. 縫線核における GABA 作動性ニューロンの形態的特徴と電気生理学的特性の解析. 第 35 回日本神経科学大会, 2012. 9. 18-21, 名古屋国際会議場(愛知)
- ⑤齋藤文仁, 鈴木秀典. 小脳核苔状線維におけるモノアミン作動性受容体のクロストーク. 活性アミンに関するワークショップ, 2012. 8. 24, 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス(北海道)
- ⑥小林克典, 三ヶ原靖規, 長濱健一郎, 鈴木秀典. セロトニン 5-HT₄ 受容体欠損マウスにおける恐怖条件付けのメス特異的な亢進. 日本神経科学大会, 2011. 9. 14-17, パシフィック横浜 (神奈川)
- ⑦Nagano M, Liu M, Ozawa H, Suzuki H.

Effects of early intervention with fluoxetine on anxiety-related behaviors induced in prenatally glucocorticoid exposed rats. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma 2010) 2010. 7. 17-23
Copenhagen (Denmark)

[図書] (計 1 件)

- ①Saitow F, Hirono M, Suzuki H. Springer, Serotonin and Synaptic Transmission in the Cerebellum. In: Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders, (eds. M. Manto, D.L. Gruol, J.D. Schmahmann, N. Koibuchi, F. Rossi) 2012. 8. pp915-926.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nms.ac.jp/nms/pharmacol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 秀典 (SUZUKI HIDENORI)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30221328

(2) 研究分担者

齋藤 文仁 (SAITOW FUMIHITO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20360175

永野 昌俊 (NAGANO MASATOSHI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60271350

小林 克典 (KOBAYASHI KATSUNORI)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10322041

坂井 敦 (SAKAI ATSUSHI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30386156

佐藤 寛栄 (SATO HIROMASA)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50386744

(3) 連携研究者
該当者なし ()
研究者番号 :