

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460096

研究課題名(和文) 抗うつ治療におけるGs共役型セロトニン受容体の役割と意義の解明

研究課題名(英文) Role of the 5-HT4 receptor in neurogenic activity of chronic fluoxetine in the dentate gyrus and its association with mature granule cell dematuration

研究代表者

瀬木 恵里 (SEGI, ERI)

東京理科大学・基礎工学部・准教授

研究者番号：70378628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：長期のセロトニン選択的再とり込み阻害薬(SSRI)投与により海馬歯状回で神経新生が促進されるが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究ではセロトニン受容体の5-HT4型受容体の役割に着目し、長期SSRI投与による神経新生メカニズム解析を行い以下の成果を得た。(1)5-HT4受容体受容体欠損マウスでは長期SSRI投与による細胞増殖亢進や未成熟神経細胞数の増大が消失した。(2)5-HT4型受容体が海馬歯状回の成熟顆粒神経に強く発現していた。(3)長期SSRI投与による海馬歯状回での神経新生と成熟顆粒神経の若返りは関連していた。

研究成果の概要(英文)：Chronic treatment with selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitors (SSRIs) facilitates adult neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. However, it is largely unknown how the 5-HT4 receptor mediates neurogenic effects in the DG. I addressed this issue using 5-HT4 receptor knockout (5-HT4R KO) mice. Expression of the 5-HT4 receptor was detected in mature GCs but not in neuronal progenitors of the DG. Chronic treatment with the SSRI fluoxetine significantly increased cell proliferation and the number of doublecortin-positive cells in the DG of wild-type mice, but not in 5-HT4R KO mice. I also demonstrated that fluoxetine-induced adult neurogenesis and granule cell dematuration are closely associated, providing new insight into the cellular mechanisms of the neurogenic actions of SSRIs in the hippocampus.

研究分野：医歯薬学

キーワード：海馬 抗うつ薬 神経神経 セロトニン受容体

1. 研究開始当初の背景

うつ病治療の第一選択薬である SSRI はシナプス間隙のセロトニン濃度上昇を引き起こすが、放出したセロトニンがどこでどのような受容体を介して機能しているかは未だ不明な点が多い。その理由の一つに、セロトニン(5-HT)受容体はサブタイプが13種類存在し、複数の細胞内シグナルを介していることが挙げられる。抗うつ薬が作用している脳部位は複数あるが、海馬において長期の抗うつ薬投与により歯状回の神経新生が促進すること、また長期抗うつ投与による行動変化の一部は神経新生が関与していること(Science, 2003)が報告され、抗うつ治療における海馬の細胞変化の重要性が示唆されてきた。

海馬での SSRI の効果に寄与している 5-HT 受容体の候補にはこれまで自己受容体 5-HT_{1A} 受容体(Gi 共役型)や、ポストシナプス側に存在する 5-HT₂ 受容体(Gq 共役型)等が挙げられているが、神経新生を促進する cAMP シグナルと共役している G_s 共役型 5-HT 受容体(5-HT_{4,5,6,7})の関与については未だ不明である。

2. 研究の目的

SSRI によるセロトニンシグナルには未だ不明な点が多いことから、本研究において応募者は海馬における 5-HT₄ 受容体の役割に着目し、長期の抗うつ治療に対する本受容体の機能と意義を解明することを目標として本研究を開始した。その理由として以下の2点が挙げられる。すなわち、(1)5-HT₄ 受容体が海馬に多く発現しており、神経新生を促進する cAMP シグナルと共役していること、(2)SSRI 投与による海馬での成熟神経の機能変化に対する 5-HT₄ 受容体の関与が近年報告されたこと(PNAS, 2008)、である。そこで、5-HT₄ 受容体欠損マウスを入手し、抗うつ治療時における本受容体の役割と意義について、特に海馬での神経新生作用作用について着目して検討を開始した。

具体的には、抗うつ治療における 5-HT₄ 受容体の神経新生作用への関与とそのメカニズム解明、5-HT₄ 受容体の抗うつ様行動変化への寄与、について明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1)使用動物・SSRI 投与

すべての動物は12時間の明暗周期で通常飼育した。5-HT₄ 受容体欠損マウスは C57Bl/6 にバッククロスしたものを Jackson Laboratory より入手した。ヘテロ交配した動物から受容体欠損マウスと野生型マウスを得た。実験は6週齢から12週齢の動物を用いた。X線照射実験では C57Bl/6 マウスを日本 SLC より購入した。すべての実験は、京都大学動物実験委員会の承認を得て行った。フルオキセチン(LKT Lab)は 22 mg/kg 投与量で21日間腹腔内投与した。コントロールとして生理食塩水の投与を行った。

(2)モノアミンの測定

組織の 5-HT やその代謝物 5-HIAA の測定は、既報(Nagayasu et al. 2010)に準じて行った。海馬と縫線核を単離し、ホモジナイズした。5-HT、5-HIAA の測定は HPLC-ECD(Eicom)を用いて測定し、総タンパク濃度で補正した。in vivo ダイアリシスによるセロトニン放出量の測定はガイドカニューラを海馬に挿入して脳脊髄液を回収した。実験の1日前にガイドカニューラを挿入し、当日はリンガー液(1 ul/min)で灌流しながら透析液を回収した。5-HT の測定は HPLC-ECD(Eicom)を用いて測定した。

(3)免疫組織染色

フルオキセチン投与終了後に BrdU(150 mg/kg, Sigma)を腹腔内投与した。2時間後にマウスを灌流固定し、30 μm 厚の凍結脳切片を作成した。BrdU 免疫染色では、組織をスライドガラスに貼り付けた後、クエン酸処理・塩酸処理を行い、ホウ酸で中和した。10%ウマ血清の入った PSB 溶液でブロッキングを行った後、抗 BrdU 抗体(Serotec)でインキュベートした。その他の免疫染色では 10%ウマ血清の入った PSB 溶液でブロッキングを行った後、抗 Doublecortin 抗体(Santa Cruz)、抗 Calbindin 抗体(Sigma)、抗 beta-galactosidase 抗体(MP)、抗 NeuN 抗体(Millipore)、抗 calretinin 抗体(Millipore)にてインキュベートした。洗浄後、それぞれに対応する二次抗体でインキュベートし、HRP 標識ではジアミノベンチジン(DAB)染色で発色した。

(4)BrdU 標識細胞・ダブルコルチン陽性細胞・カルピンジン染色像の定量化
 BrdU 標識された細胞の定量は既報 (Segi-Nishida et al. 2008) に準じて行った。海馬全体の脳切片から 6 枚ごとに染色を行い、海馬歯状回の顆粒細胞下層に存在する BrdU 陽性細胞を定量した。合計の細胞数を 6 倍したものを 1 匹あたりの顆粒細胞下層での増殖細胞数と見なした。ダブルコルチン陽性細胞の定量は海馬切片 3-4 枚から歯状回エリアを区画し、その中にあるダブルコルチン陽性細胞数を定量し、歯状回の面積あたりの細胞数を算出した。カルピンジン染色の定量は海馬の染色写真から 16-bit の白黒変換を行い、ImageJ による染色強度の定量化を行った。

(5)in situ ハイブリダイゼーション
 既報 (Segi-Nishida et al. 2013) に準じて行った。5-HT₄ 受容体 cDNA を PCR にてクローニングし、ジゴキシゲニン標識したリボプローブ (Roche) を作成した。海馬切片上でリボプローブをインキュベーションした後、抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche) を用いて、5-HT₄ 受容体 mRNA 発現細胞を検出した。

(6)定量化遺伝子発現測定
 トータル RNA を歯状回より抽出し、逆転写反応を行った (Invitrogen)。定量リアルタイム PCR はサイバーグリーンを用いた検出 (Roche) を行った。18S rRNA 量で補正を行った。増幅したバンドの特異性は電気泳動にて確認した。

(7)統計
 すべてのデータは平均値 ± SEM で表示した。2 グループでの比較では Student t テストで、複数の要因がある場合での比較は 2 要因分散分析法を用い、post hoc テストとして Bonferroni 法を用いた。すべての統計は PRISM (GraphPad) ソフトを用いた。

4. 研究成果

(1)5-HT₄ 受容体欠損マウスの海馬・縫線核における 5-HT レベル
 5-HT₄ 受容体欠損 (KO) マウスの SSR1 反応性に関する解析を行うにあたり、通常状態での

5-HT レベルに変化がないかを検討した。海馬と縫線核における 5-HT とその代謝物 5-HIAA の組織含有量を測定したところ、野生型 (WT) と受容体欠損 (KO) マウスでは認められなかった。また SSR1 を投与した時の細胞外 5-HT 量の変化も in vivo ダイアリシス法で検討したところ、両者で違いは認められなかった (図 1)。これらの結果から、C57BL/6 背景の 5-HT₄ 受容体欠損マウスではセロトニン代謝に著明な異常が起きていないことが示唆された。

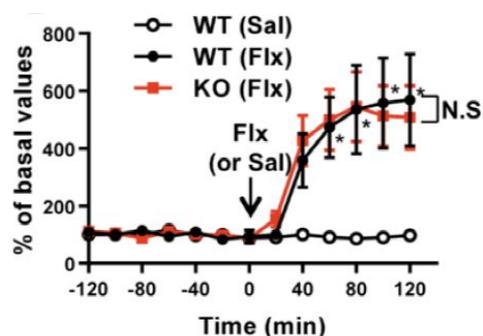


図 1 .SSRI 投与による細胞外セロトニン量の変化

(2)SSRI 誘導性の神経新生促進における 5-HT₄ 受容体の必要性
 SSR1 投与による海馬神経新生作用への 5-HT₄ 受容体の役割を検討するために、21 日間の SSR1 (フルオキセチン) の投与を行い、投与後の増殖細胞数と未成熟神経細胞数の評価を行った。増殖細胞数はフルオキセチン投与直後の BrdU 取り込み陽性細胞で評価した。未成熟神経はダブルコルチンの染色陽性細胞とした。その結果、野生型 (WT) で認められた SSR1 投与による増殖細胞数と未成熟神経数の増大は 5-HT₄ 受容体 (KO) 欠損マウスでは認められなかった (図 2)。一方、生理食塩水投与では両者に差は認められなかった。

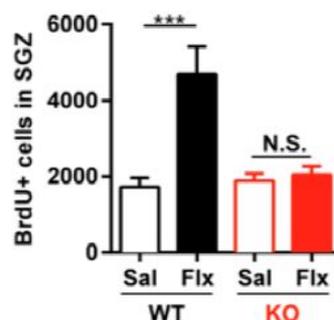


図 2 .SSRI 投与による海馬歯状回での増殖細胞数の変化

(3)海馬における 5-HT₄ 受容体発現細胞の同定

5-HT₄ 受容体の作用点を検討するために、5-HT₄ 受容体 mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で検出したところ、歯状回の成熟顆粒神経層に強いシグナルが認められた(図3)。成熟神経マーカー、神経前駆細胞マーカーと 5-HT₄ 受容体レポーター(ガラクトシダーゼ)の二重染色を行ったところ、5-HT₄ 受容体は未成熟神経には発現しておらず、成熟神経に発現していることが明らかとなった。このことから、SSRI 投与によって増大した 5-HT はまず成熟神経に発現している 5-HT₄ 受容体を活性化し、そこから何らかのシグナルを伝達させることで間接的に神経前駆細胞の増殖を促進させている可能性が考えられた。

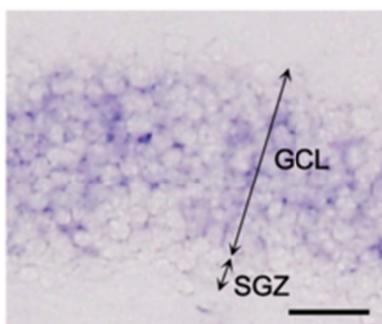


図3 海馬歯状回での 5-HT₄ 受容体発現(GCL: 成熟顆粒神経層、SGZ: 顆粒神経下層)

(4)海馬歯状回における神経新生と脱成熟現象との関連性

近年長期の SSRI 投与により海馬歯状回の成熟顆粒細胞が脱成熟(機能的に未成熟表現系を示す)状態へと変化し、この変化に 5-HT₄ 受容体が寄与していることが報告された(Kobayashi et al. 2010)。そこで SSRI 投与による神経新生と脱成熟現象の関係性を検討するために、X 線照射を行い神経新生を止めた時に脱成熟現象が認められるかを検討した。X 線照射により神経新生が完全に抑制された状態で、SSRI を投与したところ、脱成熟に関わる表現形(成熟神経マーカー発現の減少)が認められ、少なくとも脱成熟は神経新生と独立して起きる現象であることが明らかとなった。

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4件)

- (1) Sakaida M, Sukeno M, Imoto Y, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Okuno Y, Segi-Nishida E*: Electroconvulsive seizure-induced changes in gene expression in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. *J Psychopharmacology*, 27(11):1058-1069, 2013 査読あり
doi: 10.1177/0269881113497612.
- (2) Morimoto K, Shirata N, Taketomi Y, Tsuchiya S, Segi-Nishida E, Inazumi T, Kabashima K, Tanaka S, Murakami M, Narumiya S, Sugimoto Y: Prostaglandin E2-EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *J Immunology* 192:1130-1137, 2014 査読あり
doi: 10.4049/jimmunol.1300290.
- (3) Tani, Y., Isobe, Y., Imoto, Y., Segi-Nishida E, Sugimoto, Y., Arai, H., and Arita, M: Eosinophils control the resolution of inflammation and draining lymph node hypertrophy through the proresolving mediators and CXCL13 pathway in mice. *FASEB J* 28(9):4036-4043, 2014. 査読あり
doi: 10.1096/fj.14-251132
- (4) Imoto Y., Kira T., Sukeno M., Nishitani N., Nagayasu K., Nakagawa T., Kaneko S., Kobayashi K., Segi-Nishida E*: Role of the 5-HT₄ receptor in chronic fluoxetine treatment-induced neurogenic activity and granule cell dematuration in the dentate gyrus. *Mol Brain*, 8:29, 2015 査読あり
doi: 10.1186/s13041-015-0120-3

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 瀬木(西田)恵里、井本有基、吉良俊彦、小林克典 SSRI 長期投与による海馬神経新生における 5-HT₄ 受容体の役割 第 36 回日本神経科学大会 京都国際会議場(京都) 2013 年 6 月 20-23
- (2) Segi-Nishida E., Kira T., Imoto Y. Kobayashi K., The Role of 5-HT₄ receptor in hippocampal neurogenesis increased by chronic SSRI treatment. Society for Neuroscience, San Diego (USA) Nov. 12, 2013(ポスター発表)
- (3) 瀬木(西田)恵里 神経成熟マーカー発現制御からみた海馬歯状回活性化による若返り機構 (シンポジウム発表) 第 37 回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(横浜) 2014 年 9 月 12-14
- (4) 瀬木(西田)恵里 神経活性依存的な海馬神経の成熟制御: 精神疾患の新たな治療戦略(シンポジウム発表) 第 89 回薬理学会年会 パシフィコ横浜(横浜) 2016 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 瀬木(西田)恵里: DNA マイクロアレイ解析による脂質メディエーターの機能研究、遺伝子医学 MOOK24 号、最新生理活性脂質研究(編者・青木淳賢、杉本幸彦、村上誠) 99-104, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~biost/lab/segi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬木 恵里 (SEGI ERI)

東京理科大学 基礎工学部 生物工学科
准教授

研究者番号: 70378628

(1) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

(4) 協力研究者

井本 有基(IMOTO YUKI)