

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10286

研究課題名(和文) 新規抗不安薬開発を目指した オピオイド受容体を介する抗不安作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanisms of the anxiolytic-like effects induced by delta opioid receptor agonists using conditioned fear test in mice

研究代表者

齋藤 顕宜 (Saitoh, Akiyoshi)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：00366832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、DOP作動薬 KNT-127 / SNC80をモデル薬物として用い、恐怖条件付け試験における不安制御メカニズムについて検討を行った。KNT-127は、抗不安様作用に加え、消去学習促進作用を示した。さらに、KNT-127は、消去学習後に扁桃体および海馬でERK1/2のリン酸化率を上昇させた。興味深いことに、SNC80は、KNT-127と異なり、消去学習促進作用もERK1/2のリン酸化率の増加も示さなかった。以上のことから、DOPの不安制御メカニズムに、扁桃体および海馬 MAPK/ERK シグナルが関与することが、またその作用は、薬物の化学構造に由来することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

恐怖記憶は危険を回避して生存するために不可欠な情動機能であるが、過度な恐怖記憶はPTSDや不安症等の精神疾患の病態に関与することが報告されている。その治療においては、恐怖を獲得した環境を危険でないと学習する“消去学習”を基礎過程とする認知行動療法の有効性が認められているが、現状では繰り返し長期間の治療が必要であることから、消去学習を促進する薬物による治療期間短縮が期待されている。本課題の成果から、KNT-127をリードとした選択的DOP作動薬が、PTSDや恐怖症など恐怖記憶の処理異常を呈する精神疾患に対して、優れた新規治療薬になる可能性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：We reported previously that KNT-127 and SNC80, selective agonists δ -opioid receptor (DOP) agonist had potent anxiolytic-like effects in rodents. In the present study, we investigated the mechanisms of the anxiolytic-like effects induced by DOP agonists using conditioned fear test in mice. KNT-127 and SNC80 produce anxiolytic-like effects on contextual conditioned fear. On the other hand, KNT-127, but not SNC80, facilitated extinction of contextual fear memory. In addition, KNT-127, but not SNC80, increases phosphorylation of ERK1/2 in the AMY and HPC after extinction learning. These results suggested that amygdaloid and hippocampal MAPK/ERK signaling serves as the key mediators of the enhancement of extinction learning of contextual fear memory via DOPs after KNT-127 treatment. We propose that KNT-127 and SNC80 have different mechanisms on extinction learning of fear memory.

研究分野：薬理学

キーワード：オピオイド 受容体 恐怖記憶 不安 情動行動 PTSD 抗不安薬 ERK

1. 研究開始当初の背景

恐怖記憶は危険を回避して生存するために不可欠な情動機能であるが、過度な恐怖記憶は PTSD や不安症等の精神疾患の病態に関与することが報告されている。これらの疾患では、恐怖体験の突発的想起（フラッシュバック）、非常に強い不安・緊張などの症状が長期的に認められ、日常生活に支障をきたすことが知られている。その治療においては、恐怖を獲得した環境を危険でないと学習する“消去学習”を基礎過程とする認知行動療法の有効性が認められているが、現状では繰り返し長期間の治療が必要であることから、現在、消去学習を促進する薬物による治療期間短縮が期待されている。

δ オピオイド受容体 (DOP) は情動に関わる脳部位に多く存在しており、申請者は、これまでに、DOP 作動薬には、強力な抗不安様作用を持つことを明らかにしてきた (1, 2, 3)。最近では、DOP 作動薬が、不安うつ病患者における不安症状を改善するといった臨床報告がされた (4)、加えて、DOP 作動薬には、既存治療薬で問題となっている有害作用 (健忘、ふらつき、アルコール相互作用) が認められない (2)。従って現在、DOP 作動薬は、安全で効果の確かな抗不安薬となることが期待されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは十分に明らかにされておらず、DOP を介した抗不安作用メカニズムの解明が望まれている。

2. 研究の目的

本検討では、DOP 作動薬の抗不安様作用機序解明の一環として、文脈的恐怖条件付けストレス試験における不安の制御メカニズムについて検討を行った。具体的には、異なる構造を持つ複数の選択的 DOP 作動薬 (KNT-127 および SNC80) を用いて、恐怖記憶の想起 (抗不安作用) および消去学習に及ぼす影響について、脳内作用部位およびその分子メカニズムについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 使用動物：実験には雄性 C57BL/6J マウス (8 週齢) を用いた。

(2) 恐怖条件付け試験：恐怖条件づけ試験では、1 日目に電気刺激 (0.8 mA、1 秒間、30 秒間隔で 8 回) を与え、2 日目と 3 日目に 1 日目と同じ実験箱に数分間再曝露した。恐怖記憶の程度は、各日の実験時間中にマウスが示したすくみ行動時間を計測することで評価した。

(3) タンパク質分析：タンパク質分析は、恐怖記憶の処理に強く関与する脳部位である内側前頭前皮質 (mPFC)、海馬 (HPC)、扁桃体 (AMY) の 3 部位を対象とした。消去学習に伴って増加することが報告されている ERK1/2 のリン酸化レベルを Western blotting 法により評価した。サンプルは 2 日目の再曝露試験の 60 分後 (試薬投与後 90 分後) に採取した。

(4) 光遺伝学的解析：光遺伝学的解析では、不安の情動神経回路に重要と考えられている海馬-側坐核、海馬-内側前頭前野の神経回路を光操作するため、光開口性陽イオンチャネル・チャネルロドプシン 2 (ChR2) を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを海馬 (腹側海馬 AP-3.2 L3.4 Dv4.25) に局所投与し、投射先の側坐核、内側前頭前野での ChR2 発現と光誘発シナプス伝達の経時変化についてパッチクランプ法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 選択的 DOP 作動薬の消去学習に対する影響についての検討

選択的 DOP 作動薬である KNT-127 (s.c.) 投与群では、saline (s.c.) 投与群に比べて、KNT-127 の濃度依存的に 2 日目、3 日目の再曝露においてすくみ行動時間が有意に短縮した (Fig.1)。一方、SNC80 (s.c.) 投与群では 2 日目のすくみ行動は短縮したが、3 日目のすくみ行動時間は saline 群と同程度であった (Fig.2)。また、naltrindole を前処置することによって KNT-127 の効果は阻害された。これらの結果から、KNT-127 は DOP を介して消去学習促進作用を発揮することが示唆された。一方、SNC80 は消去学習促進作用を持たないことが示唆された。

以上の結果より、選択的 DOP 作動薬の消去学習促進作用は薬物の構造依存的である可能性が示唆された。

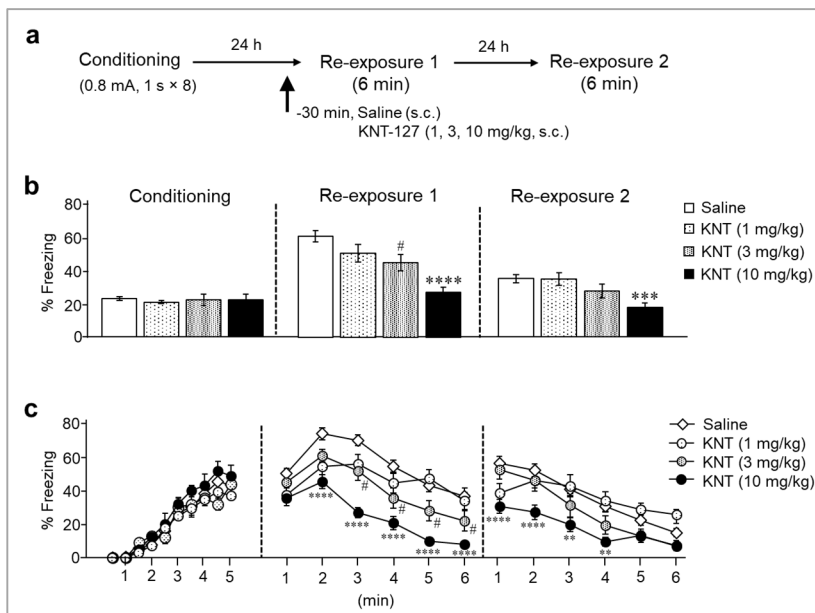


Fig. 1 Subcutaneous administration of KNT-127 exerts anxiolytic-like and extinction-facilitating effects in a dose-dependent manner. **a:** Experimental design. Mice were subcutaneously administered saline or KNT-127 30 min before Re-exposure 1 (6 min). Twenty-four hours after re-exposure 1, fear memory was tested in the same context for 6 min (Re-exposure 2). **b:** Freezing rates of mice during Conditioning, Re-exposure 1, and Re-exposure 2. KNT-127 dose-dependently reduced freezing rates in both Re-exposures 1 and 2. **c:** Time course of the freezing rates of mice during Conditioning, Re-exposure 1, and Re-exposure 2. Data are expressed as the means \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni test.

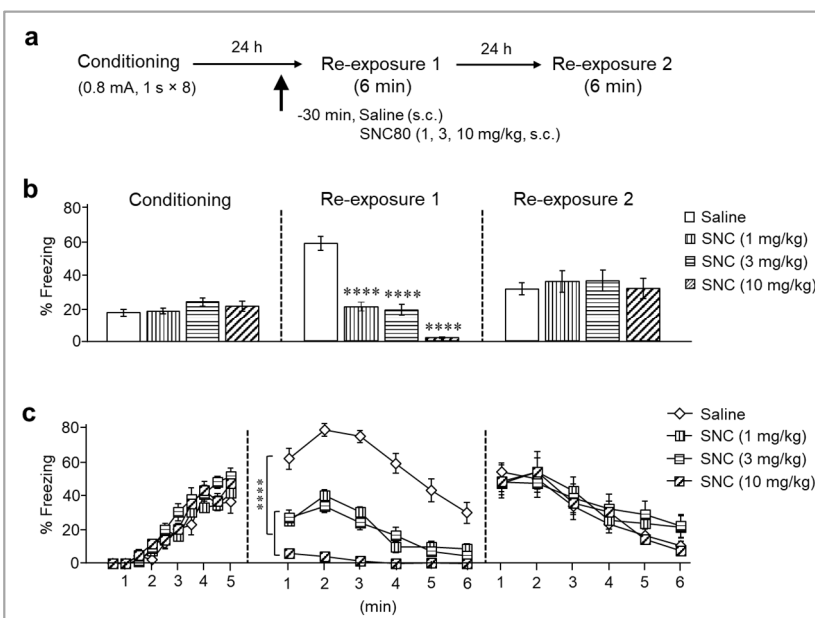


Fig. 2 Subcutaneous administration of SNC80 exerts anxiolytic-like, but not extinction-facilitating effects. **a:** Experimental design. Mice were subcutaneously administered saline or SNC80 30 min before Re-exposure 1 (6 min). Twenty-four hours after Re-exposure 1, fear memory was tested in the same context for 6 min (Re-exposure 2). **b:** Freezing rates of mice during Conditioning, Re-exposure 1, and Re-exposure 2. SNC80 significantly reduced freezing rates during Re-exposure 1, but not during Re-exposure 2. **c:** Time course of the freezing rates of mice during Conditioning, Re-exposure 1, and Re-exposure 2. Data are expressed as the means \pm SEM. **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni test.

(2) KNT-127 の消去学習促進作用に関与している脳部位の探索

KNT-127 投与群は saline 群と比較して HPC、AMY において ERK1/2 のリン酸化率を上昇させたが、mPFC では変化が見られなかった (Fig.3b)。また SNC80 投与群では KNT-127 投与群で変化の見られた HPC と AMY においてもリン酸化率は saline 投与群と同程度であった (Fig.3c)。

次に、ERK1/2 のリン酸化率を上昇させた脳部位に KNT-127 を局所投与した。その結果、AMY 内投与では 2 日目の再曝露においてすくみ行動が有意に減少したが、3 日目は PBS 群と同程度であった。一方、HPC では KNT-127 は 2 日目、3 日目の再曝露において PBS 群と同程度のすくみ行動を示した。

以上の結果より、KNT-127 は AMY を介して抗不安様作用を示している可能性が示唆された。消去学習は脳内の様々な部位の神経ネットワークによって起きていることが知られている。今後は阻害剤の局所投与で消去学習に関与する脳部位を探索する必要がある。

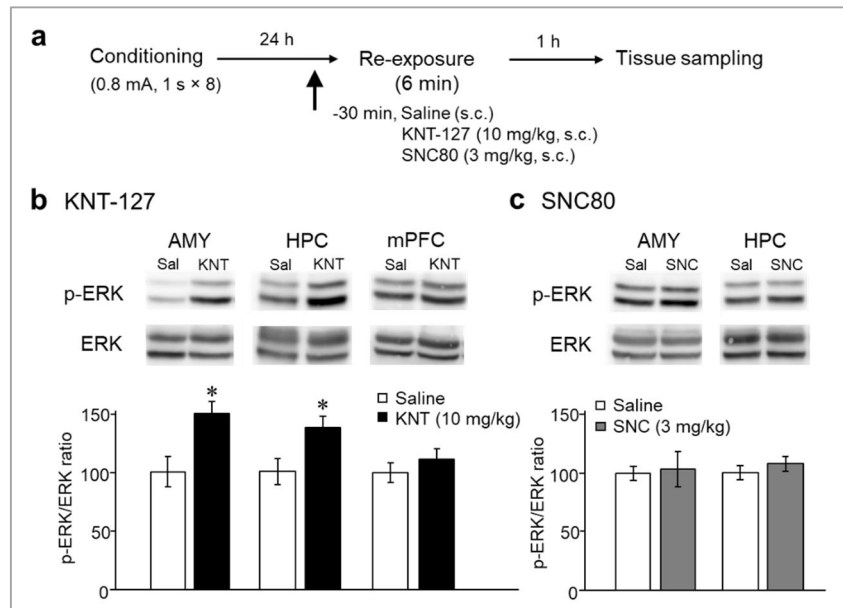


Fig. 3 KNT-127, but not SNC80, increases ERK1/2 in the amygdala (AMY) and hippocampus (HPC) after Re-exposure 1. **a**: Experimental design. Mice were subcutaneously administered saline, KNT-127, and SNC80 30 min before the 6-min Re-exposure session. Sixty minutes after Re-exposure, brain tissues from the AMY, HPC, and medial prefrontal cortex (mPFC) were collected. Then, the levels of phosphorylated extracellular-signal regulated kinase (ERK) (p-ERK) and total ERK after administration of KNT-127 and SNC80 were assessed using immunoblotting. **b**: Effect of KNT-127 (10 mg/kg) on the levels of phosphorylation of ERK in the brain. Representative blotting (top). The ratio of p-ERK to total ERK was increased significantly in the HPC and AMY. **c**: Effect of SNC80 (3 mg/kg) on the level of phosphorylation of ERK in the brain. Representative blotting (top). No significant effect was observed in brain samples from the SNC80-treated mice. Data are the means \pm SEM. * $P < 0.05$, Data are expressed as the means \pm SEM.

(3) KNT-127 の消去学習促進作用に関与している神経回路の探索

情動神経回路特異的な解析を行うため、海馬からの投射特異的に活性制御する光遺伝学的手法の検討を行った。その結果、AAV 局所投与後 5 週間目以降では、側坐核において、6 週間目以降では、内側前頭前野でチャンネルロドプシン 2 (ChR2) 発現が確認された (Table 1)。光誘発性シナプスにおいては、AAV 投与後 6 週間目に側坐核で、8 週間目に内

側前頭前野で十分なシナプス伝達が観察され、ChR2 が、十分に発現していることが示唆された。

以上の結果から、光応答性陽イオンチャネルである ChR2 を情動関連の脳部位に安定的に発現させる条件を確立し、光照射でシナプス伝達の誘発に成功した。本研究課題から、DOP 作動薬の抗不安作用メカニズムを神経回路レベルで解析可能な技術を構築することができた。今後はこの技術を応用して、さらに詳細な検討を加える予定である。

Table1 ウイルス発現の経時的変化

| | 5week | 6week | 7week | 8week |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| PL | - | - | - | + |
| IL | - | + | ++ | ++ |
| NAc | ++ | +++ | +++ | +++ |
| BLA | - | - | + | + |

PL : Prelimbic prefrontal cortex (内側前頭前野前辺縁皮質) IL : infralimbic prefrontal cortex (内側前頭前野下辺縁皮質) NAc : Nucleus accumbens (側坐核) BLA : Basolateral amygdala (扁桃体基底外側核)

(4) 結論

DOP 作動薬 KNT-127 / SNC80 をモデル薬物として用い、恐怖条件付け試験における不安の制御メカニズムについて検討を行った。その結果、KNT-127 は、抗不安様作用に加え、消去学習促進作用を示した。さらに、KNT-127 は、消去学習後に扁桃体および海馬で ERK1/2 のリン酸化率を上昇させることが明かになった。興味深いことに、SNC80 は、KNT-127 と異なり、消去学習促進作用も ERK1/2 のリン酸化率の増加も示さなかった。

以上のことから、DOP の不安制御メカニズムに、扁桃体および海馬 MAPK/ERK シグナルが関与することが、またその作用は、薬物の化学構造に由来することが示唆された。

本研究課題から、KNT-127 をリードとした選択的 DOP 作動薬は、PTSD や恐怖症など恐怖記憶の処理異常を呈する精神疾患に対して、優れた新規治療薬になる可能性を示唆することができた。

5 . 参考文献

- (1) Saitoh, A., Kimura, Y., Suzuki, T., Kawai, K., Nagase, H. and Kamei, J. (2004). "Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective delta-opioid agonist, in behavioral models in rodents." *J Pharmacol Sci* 95(3): 374-380.
- (2) Saitoh, A., Sugiyama, A., Yamada, M., Inagaki, M., Oka, J. and Nagase, H. and Yamada, M. (2013). "The novel δ opioid receptor agonist KNT-127 produces distinct anxiolytic-like effects in rats without producing the adverse effects associated with benzodiazepines." *Neuropharmacology* 67: 485-493.
- (3) Saitoh, A., Sugiyama, A., Nemoto, T., Fujii, H., Wada, K., Oka, J., Nagase, H. and Yamada, M. (2011). "The novel δ opioid receptor agonist KNT-127 produces antidepressant-like and antinociceptive effects in mice without producing convulsions." *Behav Brain Res* 223(2): 271-279.
- (4) Richards EM, Mathews DC, Luckenbaugh DA, Ionescu DF, Machado-Vieira R, Niciu MJ, Duncan WC, Nolan NM, Franco-Chaves JA, Hudzik T, Maciag C, Li S, Cross A, Smith MA, Zarate CA Jr. (2016). "A randomized, placebo-controlled pilot trial of the delta opioid receptor agonist AZD2327 in anxious depression." *Psychopharmacology* 233(6): 1119-30.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Yamada D, Yanagisawa S, Yoshizawa K, Yanagita S, Oka JI, Nagase H, Saitoh A. | 4. 巻 160 |
| 2. 論文標題 Selective agonists of the μ -opioid receptor, KNT-127 and SNC80, act differentially on extinction learning of contextual fear memory in mice. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neuropharmacology | 6. 最初と最後の頁 107792 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2019.107792 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 柳澤祥子、山田大輔、長瀬博、斎藤顕宜 |
| 2. 発表標題 文脈的恐怖条件づけ試験における選択的 μ オピオイド受容体作動薬の消去学習に対する影響 |
| 3. 学会等名 第139回日本薬学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Daisuke Yamada, Shoko Yanagisawa, Shinya Yanagita, Jun-Ichiro Oka, Hiroshi Nagase, Akiyoshi Saitoh. |
| 2. 発表標題 Selective agonists for μ -opioid receptor, KNT-127 and SNC80, differentially act on extinction learning of contextual fear memory in mice |
| 3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akiyoshi Saitoh, Daisuke Yamada, Shoko Yanagisawa, Shinya Yanagita, Jun-Ichiro Oka, Hiroshi Nagase |
| 2. 発表標題 KNT-127, but not SNC80, facilitates extinction learning of contextual fear memory via delta opioid receptor in mice |
| 3. 学会等名 International Narcotics Research Conference 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 山田 美佐 (Yamada Misa) (10384182) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・科研費研究員 (82611) | |
| 研究分担者 | 岡 淳一郎 (Oka Jun-ichiro) (40134613) | 東京理科大学・薬学部薬学科・教授 (32660) | |
| 研究分担者 | 山田 光彦 (Yamada Mitsuhiro) (60240040) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・部長 (82611) | |
| 研究分担者 | 関口 正幸 (Sekiguchi Masahiro) (80260339) | 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・室長 (82611) | |
| 研究分担者 | 山田 大輔 (Yamada Daisuke) (10621302) | 東京理科大学・薬学部薬学科・助教 (32660) | |