

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06927

研究課題名（和文）モノアミン作動性神経の投射制御にかかわるSlitrk1の役割の解明

研究課題名（英文）Investigations for functional roles in Slitrk1 for the projection of monoaminergic neurons

研究代表者

畑山 実（Hatayama, Minoru）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：50443007

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）：本研究は、Slitrk1というタンパク質の機能に着目し、研究をおこなった。欠損マウスは不安・抑うつに関連した行動を示し、ヒト遺伝学から強迫性障害(OCD)との関連が指摘されている。本研究の成果の詳細はCommunications Biology誌および、Frontiers in molecular neuroscience誌へ報告した。報告では欠損マウスでは、ノルアドレナリン作動性神経の過剰発達と同時に前頭前皮質におけるノルアドレナリン含量が増加していることを発見し、そのメカニズムとして、青斑核の神経突起の伸展に関わるセマフォリン3aシグナルをコントロールする可能性がある点を指摘した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、青斑核からのノルアドレナリン作動性神経の投射にSlitrk1が関与する事が明らかとなった。これまで中枢におけるノルアドレナリン作動性神経の軸索誘導に関する知見は少ない。また、セマフォリン3aのシグナル伝達にも関わっていることから、青斑核神経だけでなく、一般的な誘導分子として機能している可能性があり、今後の展開が期待される。一方で、Slitrk1欠損マウスは不安・抑うつに関わることから、これらの発症原因として幼若期のノルアドレナリンが関与することを示した意義は大きい。これまで、ストレスなどが原因となり得ることが指摘されているが、今後モデル動物としての利用も考えられる。

研究成果の概要（英文）：I focused on a function of Slitrk1 protein in this study. The KO mice show anxiety and depression like behaviors and human genetic studies point out a relationship to Obsessive-Compulsive Disorder (OCD). My findings have been published on Communications Biology (2022) and Frontiers in molecular neuroscience (2023). In these papers, I reported that KO mice had overgrowth of noradrenergic fiber and increased noradrenaline contents in prefrontal cortex. In addition, I found that Slitrk1 modulates Semaphorin3a signaling via physical interaction between Semaphorin3a receptor complex protein. I revealed that Slitrk1 regulates neurite extension of locus coeruleus neurons in vivo and in vitro.

研究分野：脳神経科学

キーワード：ノルアドレナリン Slitrk1 不安・抑うつ 軸索誘導 セマフォリンシグナル

1. 研究開始当初の背景

強迫性障害(OCD)は全人口の2-3%に発症するとされており、神経科学的な背景から自閉症・トゥレット障害・抜毛症などと共に、不安障害として強迫スペクトラム障害の一型ととらえられている。近年の遺伝学的解析から SLITRK1 はこれらの障害との関連が明らかとなった(参考文献1,2)。研究代表者の所属する研究室では、これまでに Slitrk1 欠損マウスが不安・うつ様症状を示し、その原因として、前頭前皮質のノルアドレナリン(NA)含量、側坐核セロトニン代謝産物含量が増加することを報告した(参考文献3)。さらに、患者群に比較的多く見られる SLITRK1 にミスセンス変異を見だし、それらの変異により野生型とは既知の機能に差が生じることが明らかとなった。

一方、Slitrk1 欠損マウスの解析から、NA 線維の密度が約2倍に増加していることを発見した。また、子宮内電気穿孔法により皮質に Slitrk1 を過剰発現させたところ、線維密度が低下した。これらの結果から、Slitrk1 は前頭前皮質において NA 神経線維の生後発達を抑制していると考えられた(図1)。NA 線維は、青斑核から投射するが、欠損マウスでは青斑核の拡大も観察された。これらの観察および実験結果は、Slitrk1 が青斑核神経から投射される神経突起の発達を制御していることが推察されるが、*in vitro* 実験などによる裏付けは十分ではないうえ、そのメカニズムに関する知見も得られていなかった。

そこで、本研究では Slitrk1 が NA 神経線維の発達をどのような分子機序により制御するかを解明すると共に、疾患由来のミスセンス変異体に機能異常が生じているか検討した。とくにセマフォリン 3a (Sema3a) は一般的な神経の軸索誘導に関して伸展の抑制に関わることが知られていることから、そのシグナル受容に関して注目して研究をおこなった。

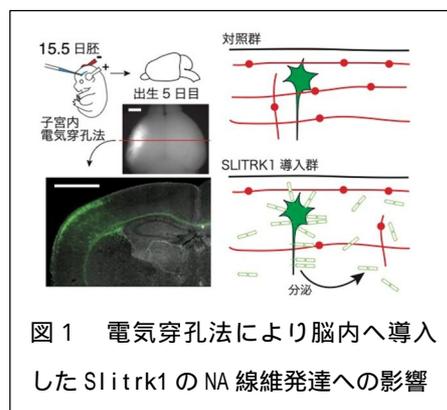


図1 電気穿孔法により脳内へ導入した Slitrk1 の NA 線維発達への影響

参考文献

- (1). Abelson et al., Science. 2005. 310:317-20.
- (2). Bansal et al., Nat Commun. 2018. 9(1):3078.
- (3). Katayama et al., Mol Psychiatry. 2010. 15:177-84.

2. 研究の目的

本研究では

- (1). 「Slitrk1 が NA 作動性神経線維の発達を制御するメカニズムの解明」
- (2). 「Slitrk1 のセロトニン作動性神経の発達への影響の探索」

の上記2点を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 「Slitrk1 が NA 性神経線維の発達を制御するメカニズムの解明」

初代培養青斑核神経に対する Slitrk1 細胞外ドメインおよび Sema3a の作用

これまでの研究代表者による研究で、Slitrk1 欠損マウスでは NA 線維が過剰に発達すること、逆に電気穿孔法による過剰発現系では線維が減少することがわかっている。これら生体内での応答は、必ずしも直接的な作用を観察しているとは言えないため、青斑核細胞を初代培養することで検証した。出生0日目の仔マウスから作成した青斑核を摘出し、初代培養した。これに、Slitrk1 細胞外ドメインを Fc タンパク質に融合した精製タンパク質、あるいは市販のリコンビナント Sema3a タンパク質を培地に添加して、青斑核神経を観察した。Sema3a は一般的な神経細胞で突起伸展を抑制する因子として知られているため使用した。

Slitrk1-L1CAM タンパク質間相互作用の生理的意義の検討

これまでの研究で Slitrk1 と相互作用する分子として L1CAM タンパク質を同定した。本研究ではこの相互作用の特性を明らかにするため QCM(水晶振動子マイクロバランス)装置をもちいた解離定数 k_D や会合速度定数 k_{ON} 、乖離速度定数 k_{OFF} などの測定をおこなった。

L1CAM タンパク質は Sema3a の受容体複合体を構成することから、COS7 をもちいて Sema3a 刺激により生じる受容体の内在化を指標に実験をおこなった。加えて、Slitrk1 は Dynamin1 との相互作用することが解っている。Dynamin1 はクラスリン依存性のエンドサイトーシスにおいて、小胞を細胞膜から切断する際に働く分子である。このことから、PC12 細胞に Slitrk1 を導入し、神経成長因子(NGF)による刺激を与えてエンドサイトーシスをおこさせ、これをタイムラプス撮影することで、Slitrk1 の作用を評価した。また、Sema3a シグナルに与える影響については、COS7 細胞に Slitrk1、L1CAM、Neuropilin1 を導入し、Sema3a を添加

した際に生じる受容体の内在化について Slitrk1 の影響を評価した。

(2) 「Slitrk1 のセロトニン作動性神経の発達への影響の探索」

前頭前皮質におけるモノアミンの定量

組織学的な解析から Slitrk1 欠損マウスでは NA 作動性神経線維が過剰に発達しているが、NA 含量については不明である。そこで HPLC(高速液体クロマトグラフ)をもちいたモノアミンの定量をおこなった。

2 アドレナリン受容体刺激がセロトニン神経線維の発達へ及ぼす作用

Slitrk1 欠損マウスではセロトニン神経線維の異常が検出されている。そこで過剰な NA がセロトニン神経に与える影響を調べるため、出生後に 2 アドレナリン受容体刺激薬であるクロニジンを投与した後、セロトニン作動性神経線維を染色して Slitrk1 欠損マウスと同様な形態を示すか確認した。

4. 研究成果

本研究の成果は、これまでの研究結果も含めて 2 報の論文として報告した(主な発表論文等の項を参照)。

これらの論文では、まず、Slitrk1 欠損マウスの出生後から幼若期の表現型について、Slitrk1 欠損マウスにはオスで生後 3 週以降、10%程度の低体重であることが明らかにした。超音波発声についても、生後 4 日目から 14 日目にかけて調べた結果、発生回数がメスで少なく、最大音量はオスメス共に低下する時期があった。超音波発声のパターンについての解析ではオスメスともに異常が認められた(図 2)。オープンフィールド試験においては生後 4 週目以降で有意差が検出され、5 週齢では強制水泳試験でも有意な不動時間の増加が観察された。

脳の組織学的な所見として、NA 作動性神経の線維を免疫染色して観察した結果、1 週齢において前頭前皮質において過剰な発達が認められた(図 3)。また線維の瘤状構造については1週でその大きさが拡大していた。同時期の青斑核を観察すると、NA トランスポーター陽性面積の比較で肥大化していた。一方でセロトニン作動性神経についても同様に免疫染色像の観察から、1 週で瘤状構造の拡大が前頭前皮質において認められた。組織学的な所見から、前頭前皮質におけるモノアミンの定量をおこなったところ、NA 含量の増加が明らかになった。

Slitrk1 欠損マウスの組織学的な所見をまとめると

- (1) NA 線維の過剰発達
- (2) NA 線維の瘤状構造の拡大
- (3) 青斑核の肥大化
- (4) セロトニン神経の瘤状構造の拡大であった。

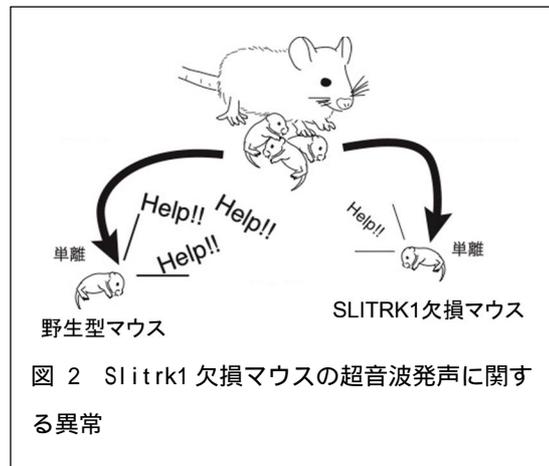


図 2 Slitrk1 欠損マウスの超音波発声に関する異常

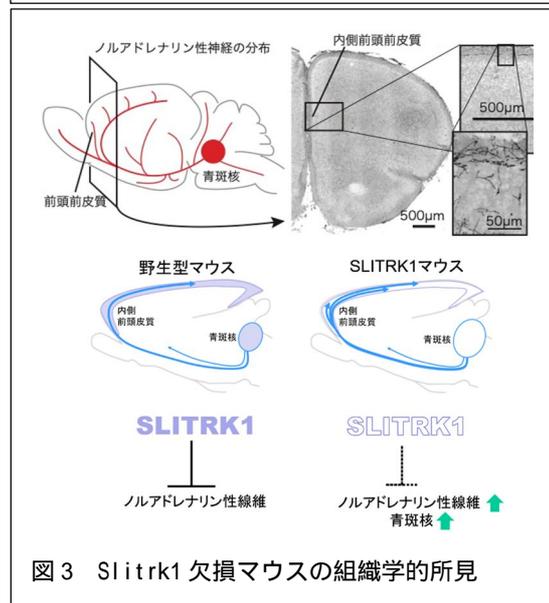


図 3 Slitrk1 欠損マウスの組織学的所見

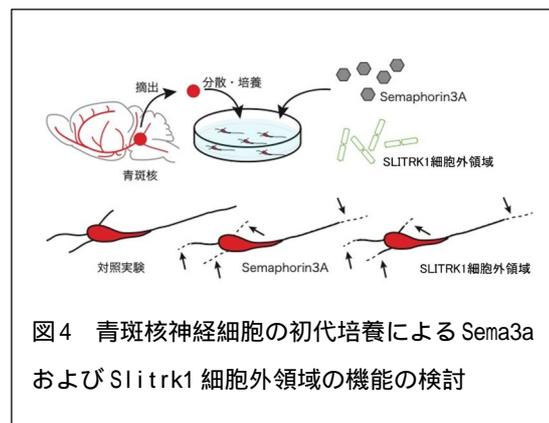


図 4 青斑核神経細胞の初代培養による Sema3a および Slitrk1 細胞外領域の機能の検討

セロトニン神経の瘤状構造の拡大が 2NA 受容体刺激により生じることを示すため、生後 3 日目から、2NA 受容体アゴニストであるクロニジンを腹腔内投与して、生後 7 日目に観察した。その結果、Slitrk1 欠損マウスに見られた瘤状構造の拡大がおきていた。この観察から、セロトニン作動性神経の変化は、NA 刺激の増加に伴う変化である可能性が考えられた。次に、NA 線維の過剰発達についてそのメカニズムを追究するため、前頭前皮質における軸索誘導分子について mRNA 量を野生型と比較すると、Sema3a の減少が明らかとなった。NA 神経の誘導に Sema3a が関与するか確認するため、青斑核神経を初代培養し、Sema3a を培地に添加すると、総突起長と分枝などで抑制的に作用することが明らかとなった。また、Slitrk1 自身も分泌される可能性が指摘されていることから、Slitrk1-FC 融合タンパク質についても検討した結果、Sema3a 同様の抑制作用をもっていた(図 4)。

ヒトにおける不安や抑うつとの関連を調べるため、統合失調症および双極性障害の患者に由来する Slitrk1 のミスセンス変異を探索したところ、S330A ならびに A444S という 2 つの変異が患者に多く見つかった(図 5)。これらの変異体の機能性について野生型と比較した結果、突起伸展や分枝に対する機能に異常が認められた。また、上述の NA 神経の突起伸展に対する作用についても、A444S で野生型と比較して統計学的に有意な抑制作用の低下が観察された。

Slitrk1 の機能に対する分子的なメカニズムを追究するため、Slitrk1 と結合しうるタンパク質を探索した。その結果、L1CAM ファミリー分子、Dynamin1 分子が同定された。L1CAM タンパク質は Sema3a の受容体である Neuropilin1 と複合体を形成して Sema3a の受容に関わることが知られている。そこで L1CAM-Slitrk1 結合が Sema3a のシグナル受容に与える影響を調べた。その結果、Slitrk1 は Sema3a による受容体の内在化を抑制していた。Sema3a 受容体の内在化はクラスリン依存性のエンドサイトーシスであり、Slitrk1 と結合する Dynamin1 分子がその過程で関与することから、Slitrk1 はこれらの分子と結合することで作用すると考えられる(図 6)。また、Slitrk1 ミスセンス変異により L1CAM ファミリー分子との結合にどのような影響が生じるか確かめるため QCM(水晶振動子マイクロバランス)装置をもちいて調べた結果、L1CAM との結合では野生型との違いは検出されず、Neurofascin との結合については解離定数や会合速度定数などで統計学的に有意な差が認められた。

本研究により、以下のことが明らかとなった

- (1) Slitrk1 タンパク質の Sema3a シグナルへの関与
- (2) 青斑核神経の突起伸展の Sema3a および Slitrk1 による抑制
- (3) 疾患由来ミスセンス変異体における結合能および機能の異常

これらの成果から、NA 作動性神経細胞の発達過程において、Slitrk1 が重要な役割を持つことを明らかにした。また、新生仔期のノルアドレナリンの過剰がその後の神経回路形成に影響をおよぼす可能性を示唆している。一方、ミスセンス変異体の解析から、精神疾患と SLITRK1 との関係を示す知見を示したといえる。S330A 変異は現生人類に特異的なアミノ酸が祖先型に戻るといふ変異であることから、脳の進化を考察する上で重要な手がかりとなる。しかし、これらの変異は非常に希であることから、SLITRK1 自体が疾患のリスク因子であるかという点については、大規模な解析が求められ、本研究から十分な結論を得ることはできない。

なお、研究成果について発表した論文に関する日本語の解説記事を長崎大学医学部医科薬理学教室のホームページに掲載した。

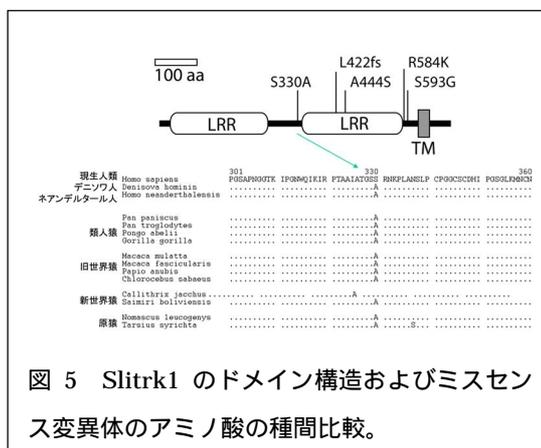


図 5 Slitrk1 のドメイン構造およびミスセンス変異体のアミノ酸の種間比較。

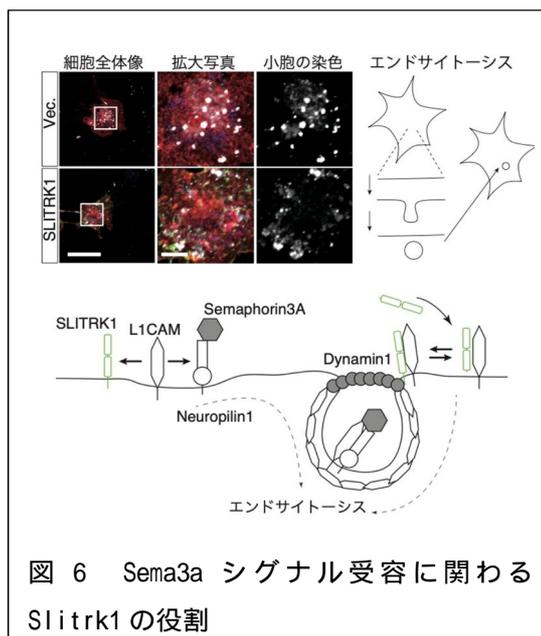


図 6 Sema3a シグナル受容に関わる Slitrk1 の役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hatayama M, Katayama KI, Kawahara Y, Matsunaga H, Takashima N, Iwayama Y, Matsumoto Y, Nishi A, Yoshikawa T, Aruga J	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 SLITRK1-mediated noradrenergic projection suppression in the neonatal prefrontal cortex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03891-y	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 Hatayama M, Aruga J	4. 巻 15
2. 論文標題 Developmental control of noradrenergic system by SLITRK1 and its implications in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1080739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2022.1080739	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果について発表した論文に関する日本語解説記事を長崎大学医科薬理学教室のホームページに掲載した。 https://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/recent15.html https://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/recent16.html
--

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
研究協力者	有賀 純 (Aruga Jun)		

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
---------	---------