

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670122

研究課題名(和文) miRNAによるセロトニン神経機能調節およびその精神疾患における意義に関する研究

研究課題名(英文) A research on the effects of miRNAs on serotonergic neuronal functions

研究代表者

橋本 均 (Hashimoto, Hitoshi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30240849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症等の精神疾患は病態機序が未解明で、生物学的理解の進展が焦眉の課題である。本研究では、精神疾患においてその重要性が示されているセロトニン神経に高発現することを見出した miRNAに着目し、その機能について *in vitro*、*in vivo*において検討を行った。その結果、(1)神経系の発達過程において一部の miRNAが、セロトニン神経の分化に関わる転写因子や、セロトニン神経機能の制御に重要な受容体の発現に影響を与え得ること、(2)成体期のセロトニン神経において一部の miRNAが、セロトニン神経機能に重要な転写因子の発現を減少させるとともにセロトニンの代謝物量を減少させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The understanding of biological mechanisms for psychiatric disorders is important for the development of new therapeutic strategy. Here we focused on the miRNAs highly expressed in serotonergic neurons, one of the most important neurons in mood regulation and hallucination. As a result, we found that (1) in immature brain, a certain miRNA affects the expression level of transcription factors important for normal development of serotonergic neurons and a certain type of serotonin receptor and that (2) in mature brain, a certain miRNA affects the expression level of transcription factors important for normal function of serotonergic neurons and serotonin metabolism.

研究分野：神経薬理学

キーワード：セロトニン miRNA 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

統合失調症などの精神疾患は、病態の機序が未解明であるだけでなく、治療効果も不十分な現状にあり、その生物学的理解の進展が焦眉の課題である。近年、非常に大規模なゲノムワイド関連解析が行われ、調整後の有意水準を充たす関連が7個のローカスにおいて見出されている。驚くべきことに、そのうちの5個のローカスは、miR-137 自身および miR-137 の推定標的遺伝子であったことから、統合失調症と miR-137 の間に強い関連があることが示唆されている。一方で、miR-137 が精神疾患において果たしている役割については全く不明であった。

セロトニン(5-HT)神経は、脳幹に存在する縫線核を起始核とし、大脳皮質、線条体、海馬など多数の脳領域へと投射している。また、その広範な投射領域に対応するように、うつ病態や不安、衝動性、報酬効果など多彩な脳機能に関与することが知られている。特に、うつ病および統合失調症における主要な薬物標的であることから、5-HT シグナル系の適切な制御は精神機能に必須であると考えられている。一方で、5-HT 神経細胞は、脳内に少数しか存在せず、*in vitro* の培養は極めて難しいことから、その詳細な機能解析は困難であった。我々は最近、マウス多能性幹細胞からの5-HT 神経細胞分化系を独自に開発し、5-HT 神経発達において重要な転写因子 *Pet-1* のエンハンサー配列を用いたノックイン ES 細胞と組み合わせることで、高純度の5-HT 神経培養系を作製することに成功している。さらに、この5-HT 神経細胞を用いて、次世代シーケンシングにより発現する miRNA のプロファイリングを行ったところ、miR-375、miR-137 など数種類の miRNA が高発現していることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、5-HT 神経に高発現することを見出した miR-137、miR-139、miR-375 に着目し、精神疾患と密接に関わる5-HT 神経系の発達および機能において、これら miRNA が与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

動物の飼育ならびに実験等はすべて、大阪大学動物実験規定を遵守し、大阪大学動物実験委員会の承認を得て実施した。成体期における miRNA の機能解析には、7週齢の野生型 C57BL/6J 雄性マウスを用いた。

マウス ES 細胞は、E14tg2a EB5 細胞株(現、熊本大学の丹羽博士から供与頂いた)および EB5 細胞を組み換えた ePet-Gluc 組換え ES 細胞株を用いた。また ES 細胞から5-HT 神経への分化誘導は、モルフォゲンの存在下で PA6 細胞と共培養することで行った(Barberi et al., 2003)。

各 miRNA の過剰発現には、EF1 プロモーター下で、各 miRNA の pre-miRNA を含む配

列が転写されるレンチウイルスベクターを作製し用いた。各 miRNA の機能阻害は、各 miRNA に結合することでその作用を阻害する Tough Decoy 配列を、マウス U6 プロモーター下で発現するレンチウイルスベクターを作製し使用した。レンチウイルスベクターの作製は、既報に従った(Takahashi et al., 2014)。各遺伝子の発現量はリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その他の実験については、常法に従った。

4. 研究成果

5-HT 神経に高発現している miRNA が、その発達過程においてどのような作用を有するか明らかにするため、以下の検討を行った。Pet-1 エンハンサー下流で分泌型ルシフェラーゼを発現させることで、5-HT 神経への分化を経時的に観察可能な ePet-Gluc-ES 細胞を、5-HT 神経に分化させた。各 miRNA を過剰発現させるレンチウイルスベクターを分化開始2日目に感染させ、分化開始2,4,6,8,10,12,14日目に培養上清を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、miR-139 発現群において、分化開始8日目以降で、ルシフェラーゼ活性の有意な低下が観察された。また、分化開始から14日後の細胞を回収し、5-HT 神経分化に関わる遺伝子の発現量を調べたところ、*Pet-1*、*Mash1*、*Lmx1b* の発現低下が観察された。5-HT 神経は、神経管の腹側領域に発生することから、その正常な発生には Shh 濃度勾配による腹側-背側軸の形成が重要であると考えられている。そこで、Shh シグナル関連遺伝子の発現について同様に検討したところ、miR-139 過剰発現群において、*Shh* の発現が有意に低下し、*Ptch1*、*Gli2*、*Gli3* の発現が有意に上昇していた。また、miR-375 の過剰発現によって *Shh* の発現が有意に上昇した。これらの結果は、miR-139 が Shh シグナル伝達に影響を与えると同時に、5-HT 神経分化を負に制御している可能性を示唆している。また、5-HT 神経で特に高度に濃縮されていることを見出している miR-375 が、*Shh* の発現を正に制御することで、*Shh* 濃度勾配に影響を与えている可能性が示唆される。

5-HT 神経の活動は、自己受容体である 5-HT_{1A} 受容体により、恒常的に抑制を受けていることから、5-HT_{1A} 受容体シグナルは、5-HT 神経の活性化レベルを制御する重要な因子であると考えられている。そこで、5-HT_{1A} 受容体遺伝子(*Htr1A*)の発現に対する、各 miRNA の作用について *in vitro* で検討するため、*Htr1A* を高発現しているマウス初代培養海馬神経細胞を用いた実験を行った。その結果、miR-137 を過剰発現することで *Htr1A* 発現の減弱が、miR-137 の機能阻害を行うことで *Htr1A* 発現の上昇が、それぞれ観察された。次に、成体期の海馬神経における miR-137 の作用について明らかにするため、成体マウスの海馬において、miR-137 の過剰発現および機能阻害を行ったが、*Htr1A* 遺伝

子発現への有意な作用は観察されなかった。初代培養海馬神経が、成体の神経細胞に比して幼若であることを考えると、miR-137 による *Htr1A* 発現制御は、神経系の発達過程において特異的に見られる現象である可能性が考えられるが、今後さらなる検討が必要と考えられる。

次に、これらの miRNA がヒトの神経発生過程で果たしている役割について明らかにするため、ヒト iPS 細胞を用いた検討を行った。ヒト iPS 細胞を神経幹細胞へと分化誘導する際に、各 miRNA の過剰発現を行ったが、分化後の神経幹細胞の腹側化や背側化は観察されなかった。今回用いた分化誘導法は、神経管の前後軸方向への制御を行わないものであったこと、5-HT 神経は神経管のやや後方に位置する菱脳節において選択的に発生することから、今後 GSK3 シグナルレベルの適切な制御により前後軸を限局した状態で miRNA の作用を検討していく予定である。

最後に、同定した miRNA が、成体期の 5-HT 神経に与える影響について明らかにするため、最大の 5-HT 神経核である背側縫線核において miRNA を過剰発現あるいは機能阻害する検討を行った。その結果、一部の miRNA を過剰発現させることで、5-HT 神経機能に関わる遺伝子発現を調節する転写因子である *Lmx1b* の発現が減少することを見出した。さらに、当該 miRNA の過剰発現により、5-HT の代謝産物である 5-HIAA 組織含有量の低下が観察された。*Lmx1b* 自体は転写因子であることを併せて考えると、これらの結果は、当該 miRNA が、*Lmx1b* 発現量を減少させ、その下流の遺伝子の発現量を調節することで、セロトニン神経機能に影響を与えている可能性を示唆している。今後、*Lmx1b* の下流で発現変動している遺伝子を同定するとともに、miRNA 過剰発現後の行動学的変化について検討する必要があると考えられる。

(引用文献)

Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, and Studer L.

Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice.

Nat. Biotechnol. 2:1200-1207, 2003

Takahashi A, Nagayasu K, Nishitani N, Kaneko S, Koide T.

Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse.

PLoS One 9:e94657, 2014

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 30 件)

Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Tanaka M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto R, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H.

High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates

Neuron 査読有 in press, 2017

Fujita Y, Masuda K, Bando M, Nakato R, Katou Y, Tanaka T, Nakayama M, Takao K, Miyakawa T, Tanaka T, Ago Y, Hashimoto H. Shirahige K, Yamashita T

Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior.

J. Exp. Med. 査読有 214 (5):1431-1452, 2017

DOI: 10.1084/jem.20161517

Seiriki K, Kasai A, Kuwaki T, Nakazawa T, Yamaguchi S, Hashimoto H.

Critical involvement of the orbitofrontal cortex in hyperlocomotion induced by NMDA receptor blockade in mice

Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 480(4): 558-563, 2016

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.089

Kasai A, Kakihara S, Miura H, Okada R, Hayata-Takano A, Hazama K, Niu M, Shintani N, Nakazawa T, Hashimoto H.

Double In situ Hybridization for MicroRNAs and mRNAs in Brain Tissues

Front. Mol. Neurosci. 査読有 9:216, 2016

DOI: 10.3389/fnmol.2016.00126

Nakamachi T, Ohtaki H, Seki T, Yofu S, Kagami N, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Nark L, Lanekoff I, Kiss P, Farkas J, Reglodi D, Shioda S.

PACAP suppress dry eye signs by stimulating tear secretion.

Nat. Commun. 査読有 7: 12034, 2016

DOI: 10.1038/ncomms12034

Hashimoto R, Nakazawa T, Tsurusaki Y, Yasuda Y, Nagayasu K, Matsumura K, Kawashima H, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Fujino H, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Takeda M, Matsumoto N, Hashimoto H.

Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder.

J. Human Genet. 査読有 61: 199-206, 2016

DOI: 10.1038/jhg.2015.141

Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Hashimotodani Y, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Yokoyama K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders.

Nat. Commun. 査読有 7: 10594, 2016

DOI: 10.1038/ncomms11466

[学会発表](計 27 件)

橋本均

CNS 創薬を支援する疾患モデルの開発
日本安全性薬理研究会第 8 回学術年会
2017 年 2 月 11 日 東京大学(東京)

橋本均

精神疾患の分子機構の解析と創薬に向けた疾患モデル研究
第 61 回脳の医学・生物学研究会
(招待講演)
2016 年 8 月 20 日 名古屋大学(愛知)

大住康晃

セロトニン神経機能に関わる遺伝子発現に対する miRNA の作用

第 128 回日本薬理学会近畿部会

2015 年 11 月 20 日 千里ライフサイエンスセンター(大阪)

橋本均

脳病態を解明するモデル動物の全脳イメージング

第 6 回脳表現型の分子メカニズム研究会(国際学会)

2015 年 11 月 15 日 コンベンションルーム AP 品川アネックス I ルーム(東京)

橋本均

Roles of PACAP in Depression-Like Behavior

12th International Symposium on VIP/PACAP and Related Peptides

(国際学会)

2015 年 9 月 23 日 カッパドキア(トルコ)

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院 薬学研究科 神経薬理学分野 HP

<http://molpharm.umin.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 均 (HASHIMOTO, Hitoshi)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30240849

(4) 研究協力者

永安 一樹 (NAGAYASU, Kazuki)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00717902