

令和元年6月4日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K08268
研究課題名(和文) 1/5-HT1A受容体間相互作用による前頭葉ドパミン神経調節機構の創薬基盤研究

研究課題名(英文) Drug discovery research targeting the novel regulation of prefrontal dopaminergic system by the functional interaction between the sigma1 and serotonin1A receptors

研究代表者
吾郷 由希夫 (AGO, Yukio)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50403027
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経ステロイドの低下状態などのGABAA受容体機能低下時においてのみ、1受容体と5-HT1A受容体の機能的相互作用を介した大脳皮質ドパミン遊離の増強が発揮されることを明らかにした。うつ病、また統合失調症においても、神経ステロイド濃度が減少している例があること、GABAA受容体機能の低下は複数の神経・精神疾患において認められることから、ドパミン神経伝達を活性化する1受容体-5-HT1A受容体の機能的相互作用は、大脳皮質ドパミン神経機能の調節が病態やその治療効果に関与すると考えられる精神疾患での新たな創薬標的となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、神経ステロイドの干渉を抑制することで、大脳皮質ドパミン神経機能調節における1受容体-5-HT1A受容体間の相互作用の存在を見出した。またこの作用には、GABAA受容体の機能変化が密接に関わっていることを明らかにした。本研究の成果は、血中神経ステロイド濃度に応じた抗うつ薬の使い分けや薬剤選択に資する神経化学的基盤を示すものであり、また、神経ステロイドあるいはGABAA受容体機能低下に基づくうつ/不安症状に対して、1受容体-5-HT1A受容体の機能的相互作用による前頭葉ドパミン神経の活性化が有効であるといった臨床薬学的・薬物治療学的意義を有するものである。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrates that the functional interaction between the 5-HT1A and sigma1 receptors activates prefrontal dopaminergic system under the conditions of decreased brain GABAA receptor function and the neurochemical effect is linked to the anxiolytic- and antidepressant-like effects. GABAergic deficits cause behavioral and endocrine abnormalities that are associated with psychiatric disorders such as anxiety, depression and schizophrenia. Although the exact mechanisms for the interactions among the 5-HT1A, sigma1 and GABAA receptors are unknown, these receptors are potential targets for the treatment of psychiatric disorders.

研究分野：中枢神経薬理学

キーワード：シグマ1受容体 5-HT1A受容体 GABAA受容体 相互作用 ドパミン 大脳皮質前頭前野 抗うつ作用 抗不安作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セロトニン(5-HT)再取込み阻害薬(selective serotonin reuptake inhibitor: SSRI)であるフルボキサミンは、シグマ1(σ_1)受容体に対しても親和性を有しており、このことが他のSSRIと異なり臨床での認知機能改善作用に関わっていると考えられている(Iyo et al., *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32(4):1072-1073, 2008)。また、 σ_1 受容体はミトコンドリアに隣接する小胞体に局在し、気分障害や神経変性疾患の治療薬の細胞内標的分子として注目されている(Su et al., *Trends in Pharmacological Sciences* 31:557-566, 2010)。我々は、フルボキサミンなどのSSRIの神経伝達物質遊離に対する作用を解析し、5-HTだけでなくドパミン量の増加を引き起こすことを示し、SSRIの薬理作用発現におけるドパミン神経系の関与を報告した(Ago et al., *Neuropsychopharmacology* 30:43-51, 2005)。また、副腎および睾丸摘出により σ_1 受容体の内因性リガンドである神経ステロイドの血中濃度が低下した状態において、フルボキサミンの前頭葉ドパミン遊離作用が増強されることを見出し、さらにこれが5-HT_{1A}と σ_1 受容体活性化の相互作用によることを明らかにした(Ago et al., *Psychopharmacology* 217:377-386, 2011; Hiramatsu et al., *Neuropharmacology* 75:53-61, 2013; Hasebe et al., *Journal of Pharmacological Sciences* 127:232-235, 2015)。これらの結果は、精神疾患と密接に関連している前頭葉ドパミン遊離が、うつなどの神経ステロイドが低下した病態において5-HT_{1A}受容体、 σ_1 受容体のシグナル間相互作用により調節されることを示している。この病態モデルにおいて見出した“新しい複合的調節機構”に関する研究は、前頭葉ドパミン神経系の機能解析だけでなく新しい創薬戦略へ発展する可能性を有しており、前頭葉ドパミン神経系の複合的調節機構の分子基盤の追究とその創薬ストラテジーへの応用が期待される。

2. 研究の目的

古くより精神疾患の神経化学基盤として脳アミン神経伝達の異常が提唱されている。特に、前頭葉のドパミン神経は認知機能改善作用や抗うつ作用に関わっており、脳アミン神経伝達に関する研究から多くの精神疾患治療薬が開発されている。これらの研究では、単一標的分子の機能に焦点が絞られており、病態を反映した複合的な機能調節は不明である。本研究では、精神疾患の病態と密接に関係している神経ステロイドの低下モデルマウスにおいて見出した前頭葉ドパミン神経系の複数標的分子による調節について、その基盤となる新しいシグナル間相互作用の解明と、その成果に基づく創薬のための新規薬効評価系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)動物

実験には、9週齢のICR系オスマウス、および同週齢のメスマウス(日本エスエルシー株式会社, Hamamatsu)を用いた。全ての動物は、室温:22 ± 1℃, 照明時間:1日12時間(8:00-20:00)の条件下で飼育し、水と固形飼料は自由に摂取させた。搬入日より1週間、各ケージ(24 cm × 17 cm × 12 cm)に4-6匹で飼育し、動物室の環境に馴化後、実験に用いた。なお、動物実験は「大阪大学大学院薬学研究科動物実験規定」に準拠して倫理的に行った。

(2)社会性行動試験

透明なポリカーボネート製ケージ(38 cm × 22 cm × 20 cm)内に試験マウス(オス)を入れ、馴化させた。60分後、異なるケージで飼育した同性同系統で、かつ体重が同程度のintruderマウスを入れ、20分間ビデオ録画した。試験マウスがintruderマウスに対して示した嗅覚行動や毛繕い行動を社会性行動の指標とし、各行動の総時間を計測した。

(3)メス選択性試験

2枚の透明な仕切りで三つの区画に分けたアクリル変性ポリ塩化ビニル製の試験ケージ(42 cm × 50 cm × 30 cm)を設計した。実験室の照度を、試験ケージの中央の区画が400ルクスになるように設定した。9週齢のオスマウスを試験マウスとして試験ケージの中央の区画に入れた。90分間の馴化後、試験マウスと遭遇したことがない、同週齢、同系統のメスおよびオスマウスをintruderマウスとして左右に設置したintruder boxにそれぞれ入れた。その後、試験マウスに10分間、ケージ内を自由に探索させた。その様子をビデオ撮影し、試験マウスが各区画に滞在した時間をANY-maze® video tracking softwareを用いて解析した。

(4)神経伝達物質遊離測定

脳内の細胞外モノアミン遊離量は、*in vivo*脳微小透析法により解析した。イソフルラン麻酔下、大脳皮質前頭前野(ブレグマより1.9 mm前方, 0.5 mm右側方, 頭蓋表面より深さ0.8 mm)にガイドカニューレを挿入固定した。測定時に透析プローブを挿入し、リンゲル液を流速1.0 μL/分で灌流した。サンプルは20分単位で回収し、直ちに高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器システムに連続自動インジェクションし測定した。

(5)細胞内Ca²⁺濃度の測定

細胞内Ca²⁺濃度変化は、Ca²⁺蛍光指示薬Fluo-4/AMを用いた蛍光測定法により解析した。

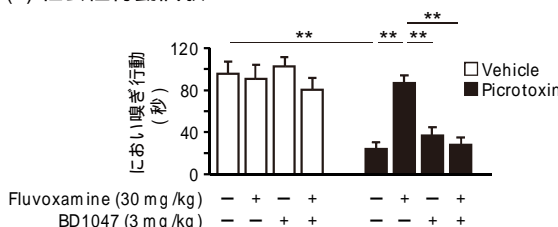
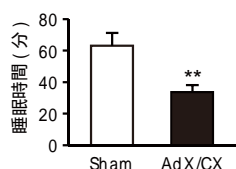
SH-SY5Y 細胞株を 96 ウェルプレートに播種し、コンフルエントになるまで培養した。その後、
 メディウムを 5 μ M Fluo-4/AM, 0.002% pluronic acid, 1 mM probenecid を含む BSS バッファ
 ー(146 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 0.1 % BSA)に置換し、
 37 °C で 30 分間インキュベートすることにより細胞内に Fluo-4/AM を取り込ませ、その後 BSS バ
 ュッファに再度置換した。10 分後、SpectraMax M5e を用いて励起波長 485 nm、蛍光波長 527 nm、
 測定間隔 10 秒で 5 分間測定を行った。細胞内 Ca²⁺濃度変化は、薬物添加前 1 分間の蛍光強度の
 平均値を 1 とし、その割合で表した。

4. 研究成果

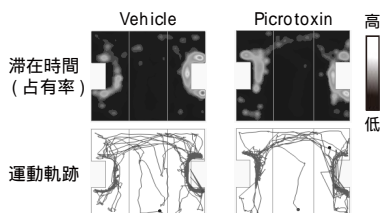
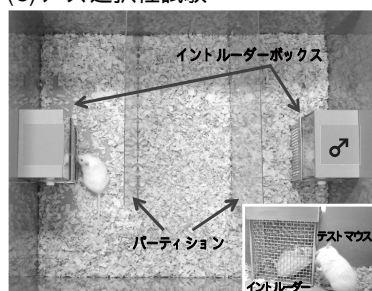
(1) γ 1 受容体 - 5-HT_{1A} 受容体間相互作用の発現を制御するキープレーヤー: GABA_A 受容体

これまでの検討から、 γ 1 受容体や 5-HT_{1A} 受容体のアゴニスト単独による大脳皮質ドパミン遊離は、偽手術(sham)マウスと副腎摘出/去勢(adrenalectomy/castration: AdX/CX)マウスとで差がみられないこと、両薬物相互作用によるドパミン遊離増強は、生理条件下(偽手術)ではみられないことを明らかにしている(Ago et al., Psychopharmacology 217:377-386, 2011; Hiramatsu et al., Neuropharmacology 75:53-61, 2013)。このことから、 γ 1 受容体 - 5-HT_{1A} 受容体間相互作用の発現には、副腎摘出/去勢で影響を受け、かつこれら受容体とは異なる分子に作用する神経ステロイドの関与が推察された。神経ステロイドの多くが GABA_A 受容体のリガンドとしても働いていることに着目し(Belelli and Lambert, Nature Reviews. Neuroscience 6(7):565-575, 2005)、相互作用発現における GABA_A 受容体の関与について検証した。Adx/CX マウスでは sham マウスに比べ、ペントバルビタールにより誘発される睡眠の時間が減弱しており、GABA_A 受容体機能が低下している可能性がうかがえた(図 1A)。 γ 1 受容体と 5-HT_{1A} 受容体のアゴニストの併用による Adx/CX マウスでの大脳皮質ドパミン遊離増強作用は、ベンゾジアゼピン受容体アゴニストであるジアゼパムにより抑制され、逆に、正常マウスにおいては GABA_A 受容体アンタゴニストであるピクロトキシンの前投与により、Adx/CX マウスでの結果と同様に、 γ 1 受容体と 5-HT_{1A} 受容体の共活性化による前頭葉ドパミン遊離の増強作用が再現された。以上のことは、GABA_A 受容体機能が低下した条件下(神経ステロイドの低下状態などを含む)において、 γ 1 受容体と 5-HT_{1A} 受容体の機能的相互作用を介したドパミン遊離調節機構が働くことを示唆するものである。

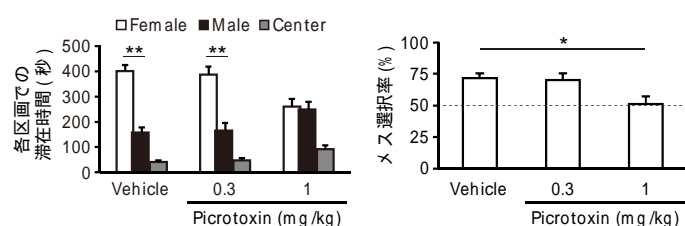
(A) ペントバルビタール誘発睡眠 (B) 社会性行動試験



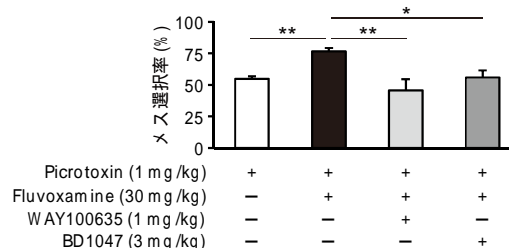
(C) メス選択性試験



(D) メス選択性行動に対するピクロトキシンの作用



(E) ピクロトキシンの誘発アンヘドニアに対するフルボキサミンの作用



【図 1】 GABA_A 受容体の機能低下によるうつ/不安様行動の発現と、 γ 1 受容体 / 5-HT_{1A} 受容体を介するフルボキサミンの改善作用。(A) 副腎摘出/去勢によるペントバルビタール(50 mg/kg)誘発睡眠の減弱。データは平均値 \pm 標準誤差 (n = 12)。Sham; 偽手術, AdX/CX; 副腎摘出/去勢。(B) ピクロトキシンの (1 mg/kg) による不安様行動の発現 (社会性行動の低下) とフルボキサミンの作用。フルボキサミンによる改善は、 γ 1 受容体アンタゴニストである BD1047 により抑制される。データは平均値 \pm 標準誤差 (n = 10)。(C) メス選択性試験。マウスの性的指向を利用した意欲評価試験であり、オスマウスはメスとの遭遇を好み、メスのいる区画への滞在が長い(メス選

採率が高い)。(D)ピクロトキシンはメス選択性行動を低下させ、アンヘドニア様状態がみられる。データは平均値±標準誤差(n=10)。(E)ピクロトキシン誘発アンヘドニアに対するフルボキサミンの作用。フルボキサミンによる改善は、BD1047ならびに5-HT_{1A}受容体アンタゴニストであるWAY100635により抑制される。データは平均値±標準誤差(n=10)。*；5%有意水準。**；1%有意水準。

(2) 1受容体 - 5-HT_{1A}受容体間相互作用の行動学的意義

1受容体と5-HT_{1A}受容体の機能的相互作用の行動学的意義を明らかにするため、GABA_A受容体機能の低下に基づく病態モデルマウスに対する作用を検討した。GABA_A受容体アンタゴニストであるピクロトキシンにより、社会性行動の低下や、明暗試験および高架式十字迷路試験において不安様行動の増加が認められるが、これらの不安様行動の増加は 1受容体アゴニスト作用を有するフルボキサミンによって改善されたが(図1B)、1受容体に作用しないパロキセチンでは影響はみられなかった。このフルボキサミンによる抗不安作用は、1受容体アンタゴニストBD1047によって拮抗された。マウスのうつ様行動に関して解析を行ったところ、メス選択性試験(Female encounter test)(図1C)において、ピクロトキシンにより無快感症(anhedonia: アンヘドニア)といったうつ関連行動がみられ(図1C, D)、この行動変化はフルボキサミン(図1E)や、1受容体アゴニストと5-HT_{1A}受容体アゴニストの併用により改善されたが、パロキセチンやその他 1受容体に作用しない抗うつ薬であるデシプラミンやデュロキセチンによっても改善されなかった。1受容体と5-HT_{1A}受容体の共活性化は、ピクロトキシン投与マウスにおいて大脳皮質前頭前野のドーパミン遊離を増強させること、アンヘドニアの改善作用がドーパミン D_{2/3}受容体アンタゴニストであるラクロプリドにより拮抗されたことから、GABA_A受容体機能が低下した状態においてみられるうつ/不安症状に対し、1受容体と5-HT_{1A}受容体の機能的相互作用による前頭葉ドーパミン神経系の活性化が治療的役割を示すことが示唆された。

(3) 相互作用による前頭葉ドーパミン神経機能を反映する *in vitro* 薬効評価モデルの検討

5-HT_{1A}受容体と 1受容体の細胞内シグナルにおける相互作用を解析するため、ドーパミン系神経モデル細胞として汎用されるヒトSH-SY5Y細胞を用いて、細胞内Ca²⁺濃度変化を指標とした両受容体機能の評価系の構築について検討を行った。SH-SY5Y細胞において、5-HT_{1A}受容体と 1受容体のmRNAが発現していることをRT-PCR法により確認した。選択的 1受容体アゴニストSKF-10047ならびに5-HT_{1A}受容体アゴニスト8-OH-DPATはそれぞれ用量依存的に細胞内Ca²⁺濃度を増加させた。しかしながら、SKF-10,047と8-OH-DPATの共処置を行っても、両アゴニスト単独による細胞内Ca²⁺濃度増加以上の増強はみられなかった。またラット副腎褐色細胞腫PC12細胞を用いて、遊離ドーパミン量(basalおよび高カリウム刺激)に対するSKF-10,047、8-OH-DPATの作用を検討したが、両薬物単独ならびに併用処置ともに影響はみられなかった。以上から *in vitro* においては、*in vivo* を反映するような 1受容体と5-HT_{1A}受容体間の機能的相互作用はみられず、脳内での複雑な神経回路機構が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Haruki Kawase, Yukio Ago, Megumi Naito, Momoko Higuchi, Yuta Hara, Shigeru Hasebe, Shinji Tsukada, Atsushi Kasai, Takanobu Nakazawa, Tadashi Mishina, Hiroyuki Kouji, Kazuhiro Takuma, Hitoshi Hashimoto. mS-11, a mimetic of the mSin3-binding helix in NRSF, ameliorates social interaction deficits in a prenatal valproic acid-induced autism mouse model. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 176:1-5, 2019. 査読有。

DOI:10.1016/j.pbb.2018.11.003

Shu Higashida, Hirotaka Nagai, Kazuki Nakayama, Ryota Shinohara, Masayuki Taniguchi, Midori Nagai, Takatoshi Hikida, Satoshi Yawata, Yukio Ago, Shiho Kitaoka, Shuh Narumiya, Tomoyuki Furuyashiki. Repeated social defeat stress impairs attentional set shifting irrespective of social avoidance and increases female preference associated with heightened anxiety. **Scientific Reports** 8(1):10454, 2018. 査読有。

DOI:10.1038/s41598-018-28803-1

Naosuke Morikawa, Masashi Tachibana, Yukio Ago, Hiroshi Goda, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi. LY341495, an mGluR2/3 antagonist, regulates the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells and inhibits melanoma tumor growth. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 41(12):1866-1869, 2018. 査読有。

DOI:10.1248/bpb.b18-00055

吾郷 由希夫. うつ/不安症状に対する 1受容体 - セロトニン 1A受容体の機能的相互作用による治療・創薬戦略. **医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス「シリーズ：神経・精神疾患の原因探索と創薬に向けた研究の展開」** 49(8):550-556, 2018. 査読無。

Yukio Ago, Shigeru Hasebe, Naoki Hiramatsu, Hitoshi Hashimoto, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Psychopharmacology of combined activation of the serotonin_{1A} and 1 receptors. **European Journal of Pharmacology** 809:172-177, 2017. 査読有。

DOI:10.1016/j.ejphar.2017.05.035

Yuta Hara, Yukio Ago, Momoko Higuchi, Shigeru Hasebe, Takanobu Nakazawa, Hitoshi Hashimoto, Toshio Matsuda, Kazuhiro Takuma. Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. **Hormones and Behavior** 96:130-136, 2017. 査読有.

DOI:10.1016/j.yhbeh.2017.09.013

Yukio Ago, Atsuko Hayata-Takano, Takuya Kawanai, Ryosuke Yamauchi, Shuto Takeuchi, Jesse D. Cushman, Abha K. Rajbhandari, Michael S. Fanselow, Hitoshi Hashimoto, James A. Waschek. Impaired extinction of cued fear memory and abnormal dendritic morphology of the prelimbic and infralimbic cortices in VPAC2 receptor (*VIPR2*)-deficient mice. **Neurobiology of Learning and Memory** 145:222-231, 2017. 査読有.

DOI:10.1016/j.nlm.2017.10.010

Tatsunori Tanaka, Yukio Ago, Chiaki Umehara, Emina Imoto, Shigeru Hasebe, Hitoshi Hashimoto, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Role of prefrontal serotonergic and dopaminergic systems in encounter-induced hyperactivity in methamphetamine-sensitized mice. **The International Journal of Neuropsychopharmacology** 20(5):410-421, 2017. 査読有.

DOI:10.1093/ijnp/pyw115

Shigeru Hasebe, Yukio Ago, Yuji Watabe, Satoshi Oka, Naoki Hiramatsu, Tatsunori Tanaka, Chiaki Umehara, Hitoshi Hashimoto, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Anti-anhedonic effect of selective serotonin reuptake inhibitors with affinity for sigma-1 receptors in picrotoxin-treated mice. **British Journal of Pharmacology** 174(4):314-327, 2017. 査読有.

DOI:10.1111/bph.13692

Yukio Ago, Shigeru Hasebe, Naoki Hiramatsu, Kazuya Mori, Yuji Watabe, Yusuke Onaka, Hitoshi Hashimoto, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda. Involvement of GABA_A receptors in 5-HT_{1A} and σ_1 receptor synergism on prefrontal dopaminergic transmission under circulating neurosteroid deficiency. **Psychopharmacology** 233(17):3125-3134, 2016. 査読有.

DOI:10.1007/s00213-016-4353-3

[学会発表](計9件)

吾郷 由希夫. 動物モデルを用いた精神疾患の病態メカニズム解析と創薬基盤研究. 一般社団法人予防薬理学研究所キックオフシンポジウム, 大阪, 2019年3月13日.

Shinji Tsukada, Kosuke Higashino, Sumiko Kunimoto, Nigel H. Greig, Toshio Matsuda, Hitoshi Hashimoto, Yukio Ago. Inhibition of butyrylcholinesterase improves prepulse inhibition deficits and enhances M₁ muscarinic acetylcholine receptor-mediated responses via ghrelin signaling in mice. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), Kyoto, July 1-6, 2018.

塚田 信司, 東野 功典, 国本 寿美子, Nigel H. Greig, 橋本 均, 中川 晋作, 吾郷 由希夫. ブチリルコリンエステラーゼ阻害剤は内因性グレリンシグナルを促進して認知機能障害を改善する:ムスカリン M₁ 受容体との機能的相互作用の関与. 第24回創剤フォーラム若手研究会, 神戸, 2018年9月22日.

吾郷 由希夫, 東野 功典, 国本 寿美子, 塚田 信司, Nigel Greig, 松田 敏夫, 橋本 均. ブチリルコリンエステラーゼ阻害によるプレパルスインヒビション障害の改善:グレリンシグナルを介したムスカリン M₁ 受容体機能亢進の関与. 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会 合同年会, 札幌, 2017年9月28-30日.

吾郷 由希夫, 長谷部 茂, 樋口 桃子, 橋本 均, 田熊 一敬, 松田 敏夫. Selective serotonin reuptake inhibitors with affinity for σ_1 receptors exert anti-anhedonic effect in picrotoxin-induced model of anxiety/depression. 第60回日本神経化学会大会, 仙台, 2017年9月7-9日.

吾郷 由希夫, 東野 功典, 国本 寿美子, 塚田 信司, Nigel H. Greig, 松田 敏夫, 橋本 均. ブチリルコリンエステラーゼ阻害によるグレリンシグナルの活性化を介した中枢ムスカリン M₁ 受容体機能の亢進. 第14回GPCR研究会, 東京, 2017年5月12-13日.

梅原 千晶, 吾郷 由希夫, 田中 辰典, 長谷部 茂, 橋本 均, 田熊 一敬, 松田 敏夫. メタンフェタミン退薬時の社会的刺激による多動反応と前頭前野セロトニン、ドパミン神経系の活性化. 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 2017年3月15-17日.

川瀬 啓生, 吾郷 由希夫, 長谷部 茂, 岡 智史, 田熊 一敬, 松田 敏夫, 橋本 均. 雌性マウスを用いた意欲・報酬探索行動評価試験. 第129回日本薬理学会近畿部会, 広島, 2016年6月24日.

田中 辰典, 吾郷 由希夫, 梅原 千晶, 長谷部 茂, 橋本 均, 田熊 一敬, 松田 敏夫. 精神的ストレスによる覚せい剤精神病の再燃現象におけるセロトニン受容体の関与. 第13回GPCR研究会, 東京, 2016年5月13-14日.

〔その他〕

ホームページ等

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

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田熊 一敬

ローマ字氏名：(TAKUMA, Kazuhiro)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院歯学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 90289025