

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07745

研究課題名（和文）オキシトシン受容体の脳神経科学的エビデンスに基づく新規アゴニストの探索

研究課題名（英文）Screening research of new agonist system for oxytocin receptor based on scientific evidence based on brain nervous system

研究代表者

日出間 志寿（Hidema, Shizu）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30241558

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：TGF $\alpha$  shedding assayを用いて約12000種についてOXTR新規アゴニストのスクリーニングを行い、2種の候補化合物を選択した。これらの化合物のOXTRへの結合活性をカルシウムイメージングアッセイでみたところ1種の化合物が非常に弱い結合活性が認められ、もう一種は結合活性がみられなかった。MeAに存在するOXTR発現神経はLSへ、LSに存在するOXTR発現神経はCA2に投射する神経回路が向社会的刺激時特異的に活性化することを明らかにした。神経保護作用を持つことが報告されているレスベラトロールがSirt1の発現調節を介しOXTR欠損マウスが示すASD様行動を改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経ホルモンオキシトシンとその受容体であるオキシトシン受容体（OXT-OXTR）システムは自閉症、不安障害、うつ病、健忘症の改善効果が報告され、実用化に備えその詳細なメカニズムの解明が急がれている。本研究では社会行動の際に活性化するOXTR発現神経回路の一端を明らかにした。今後はOXTR発現神経細胞の生理的特徴を解析し、臨床応用を目指す。一方で、ブドウや赤ワインに含まれる抗酸化物質レスベラトロールがOXTR遺伝子欠損マウスの示す、社会性異常を改善することを明らかにした。約1200種の化合物からOXT様作用を示す化合物をスクリーニングし候補として1種の低分子を得た。今後、活性の詳細を解析する。

研究成果の概要（英文）： In 12000 compounds from three libraries, we searched new agonist for Oxt $\alpha$ , we got two candidates by TGF $\alpha$  shedding assay. Next, we selected one compound by Ca $^{2+}$  imaging assay for Oxt $\alpha$ , but the activity was weak compared with Oxt. Analysis of the projections from the OXTR+ neurons in the MeA activated by social stimuli revealed projections to the LS, and from the OXTR+ neurons in the LS activated by social stimuli revealed projections to the CA1. On the other hands, Resveratrol which is known to have anti-oxidative activity, through the regulation of Sirt1 expression prevented the abnormal activation of microglia and ameliorated the ASD-like behavior of Oxt $\alpha$ -KO mice.

研究分野：神経科学

キーワード：オキシトシン オキシトシン受容体 向社会行動

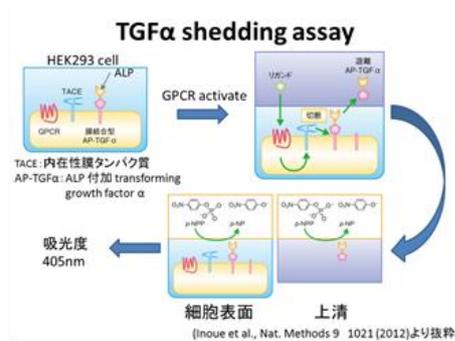
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経ホルモン・オキシトシンとその受容体であるオキシトシン受容体 (OXT-OXTR) システムは自閉症、不安障害、うつ病、健忘症の改善効果が報告されているが詳細なメカニズムは不明である。我が国での精神疾患をかかえる患者の数は近年大幅に増加しており、厚生労働省の調べでは平成 26 年時点で精神疾患により医療機関にかかっている患者数は 390 万人を超えている。そのため、OXT-OXTR が精神・神経疾患の発症のメカニズムあるいは治療、予防にどのように関わるかを明らかにすることが極めて重要である。一方で、我々は OXT 遺伝子欠損マウス (OXT-KO)、OXTR 遺伝子を欠損したマウス (OXTR-KO)、OXTR 発現を可視化できる遺伝子改変マウス (OXTR-Venus)、OXTR 発現細胞特異的に欠失、活性化、不活性化などの制御を可能とする遺伝子改変マウス (OXTR-Cre) を作出した。それらの解析から OXT-KO は社会的健忘症状を OXTR-KO の雄は攻撃性の上昇、雌は母性行動の低下が認められ、社会認識、親和性行動に重要であることが明らかになった。一方で OXT は体内での半減期が短く、血液脳関門を通過できない、短期投与によって社会性の改善がみられるが慢性投与によって OXTR との結合性の変化により効果が逆転する、または見られなくなる、といった体内投与での問題点を有しており、それらの問題点を解消するような OXTR のアゴニストが渴望されていた。

### 2. 研究の目的

OXT は、健康な社会生活のための薬効が期待されるものの、投与方法や半減期の問題点があり、さらに、詳細なメカニズムが不明なため、OXT・OXTR 受容体 (OXTR) に影響を与える OXT 以外の物質の開発や、その下流の伝達経路の解析が必須である。当研究計画は *in vitro* assay により天然成分や化合物ライブラリーから新規 OXTR アゴニストをスクリーニングし、我々が独自に開発した複数の OXT, OXTR 遺伝子変換マウスを用いて、得られた候補化合物の向社会行動テストによる評価をするとともに OXTR を介した神経回路とその生理的意義を明らかにする。



### 3. 研究の方法

①新規 OXTR アゴニストの *in vitro* スクリーニング系として TGF $\alpha$  shedding assay を (Inoue et al., Nat. Methods (9) 1021-(2012)) (図 1) を用いた。東北大学所有の化合物ライブラリー、東京大学創薬機構 (DDI) 所有の GPCR 関連化合物ライブラリー、キリン株式会社より提供を受けた果汁抽出物、岩手大学から提供を受けた天然物抽出物サンプルなど約 12000 種について 1 次スクリーニングを行い、選別したサンプルについて 2 次スクリーニングで再現性をとり、3 次スクリーニングでは濃度依存性をみるとともに、OXTR と類縁の AVPR

図 1

についても同様のアッセイを行い特異性の確認をおこなう。

②神経活動依存的、OXTR 発現特異的に蛍光発色するアデノ随伴ウイルス AAV-FLEX-eSARE-Tdtomato (eSARE: 神経活性化マーカー遺伝子 Arc の強力なエンハンサー SARE 配列 5 個と最少単位のプロモーターをタンデムにつなげた人工プロモーター。Cre 依存的に eSARE の制御下で蛍光タンパク質 TdTomato を発現する) を OXTR-Cre マウスに感染させ社会行動の刺激を与えた際にどの OXTR 神経回路が活性化するかを明らかにする。

③自閉症モデルマウスであるバルプロ酸投与マウスの社会行動改善に効果を持つことが報告されているポリフェノール・レスベラトロールが OXT-OXTR システムに影響を与えるか否かを行動試験および TGF $\alpha$  shedding assay による OXTR 結合性で解析する。

### 4. 研究成果

①TGF $\alpha$  shedding assay の 3 次スクリーニングの結果、DDI 由来の化合物 X, Y の 2 種類が選別された。これらについてカルシウムイメージングアッセイによって選別化合物のシグナル伝達をみた。その結果、化合物 X が弱い活性を示したが、濃度依存性はみいだせず、現在検証中である (図 2)。

②扁桃体内側核から外側中核に投射している OXTR 発現神経、外側中核から海馬 CA1 に投射する OXTR 発現神経が社会行動特異的に活性化することを明らかにした (図 3)。今後は明らかにした神経のサブタイプを明らかにし、OXTR 発現神経細胞の生理的、形態的特徴を解析する。

③レスベラトロールは 30mg/kg・単回・腹腔内投与によって OXTR 遺伝子欠損マウスの社会行動異常を改善することが明らかとなった (図 4)。レスベラトロールは TGF $\alpha$  shedding assay では OXTR 結合性を示さなかったが、OXTR 遺伝子欠損によって HDAC である Sirt1 の発現が減少し、レスベラトロール投与によってその発現が回復することが明らかとなった。

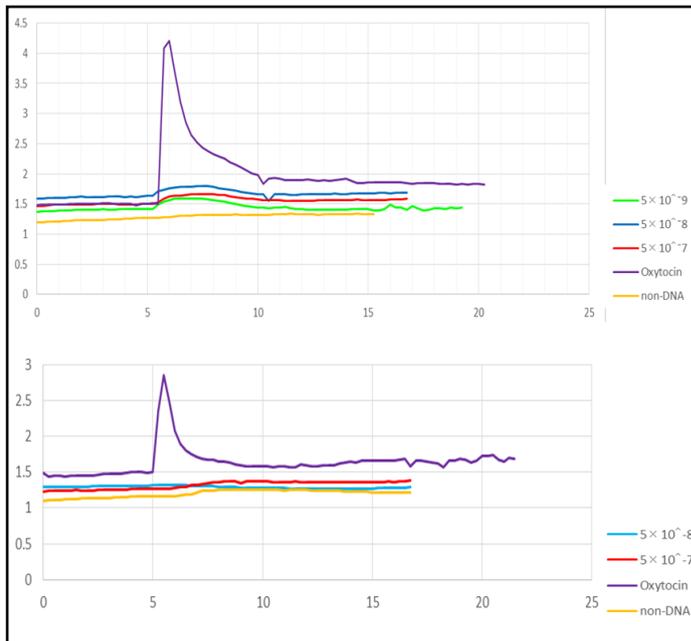


図2. 化合物XのCa<sup>2+</sup>イメージング(上)と化合物YのCa<sup>2+</sup>イメージングの結果

HEK293t細胞にOxtr-mCherry-pcDNAプラスミドを一過的にトランスフェクションし基質fura2と化合物を加え、経時的に細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を計測した結果。化合物Xでわずかな上昇がみられた。

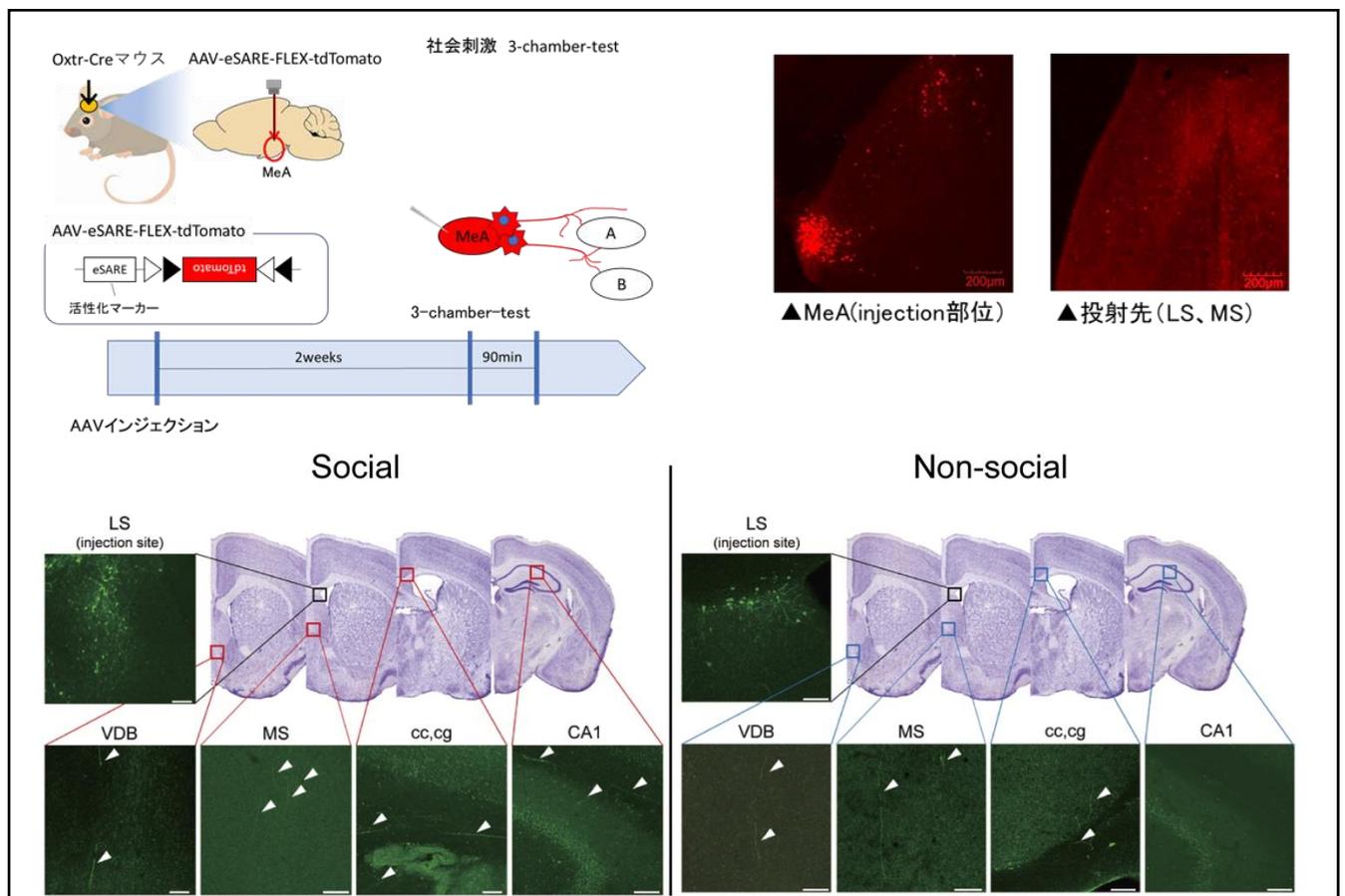


図3. 社会行動刺激時に活性化されるOxtr発現ニューロンの投射先解析  
社会刺激時にMeAからLSへの投射とLSから海馬CA1への神経回路の活性化が可視化された。

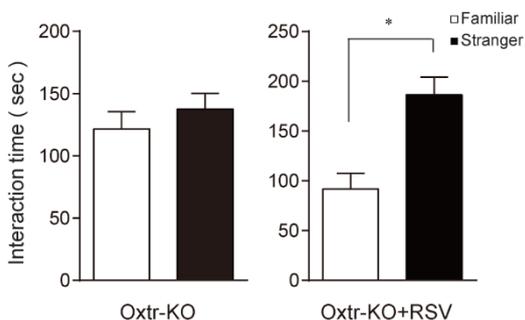


図4・社会記憶を計測する3chamber試験を行った結果。Oxtr遺伝子欠損マウスは社会記憶能力の低下により慣れ親しんだマウス(familiar)と新規のマウス(stranger)を区別できないためアプローチ時間に差がみられない。これに対しレスバトロールを投与したOxtr遺伝子欠損マウスは社会記憶能力の改善により、より新規マウスへのアプローチ時間が長くなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Osada K, Ohta T, Takai R, Miyazono S, Kashiwayanagi M, Hidema S, Nishimori K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Oxytocin receptor signaling contributes to olfactory avoidance behavior induced by an unpleasant odorant.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Open.	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.029140	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 該当する

1. 著者名 Horie K, Inoue K, Suzuki S, Adachi S, Yada S, Hirayama T, Hidema S, Young LJ, Nishimori K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Oxytocin receptor knockout prairie voles generated by CRISPR/Cas9 editing show reduced preference for social novelty and exaggerated repetitive behaviors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Horm Behav.	6. 最初と最後の頁 30326-X
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yhbeh.2018.10.011.	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 該当する

1. 著者名 Otsuka A, Jinguji A, Maejima Y, Kasahara Y, Shimomura K, Hidema S, Nishimori K.	4. 巻 x
2. 論文標題 LGR4 is essential for R-spondin1-mediated suppression of food intake via pro-opiomelanocortin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451	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 該当する

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 堀合真知、木野崎萌、矢田紗織、日出間志寿、西森克彦
2. 発表標題 Activation of Oxt <sup>r</sup> + neurons in LS improve abnormal social behaviors
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀江 謙吾 安達 紗希 矢田 紗織 日出間 志寿 西森 克彦
2. 発表標題 The male&nbsp;&Oxtr&nbsp;&K0 prairie voles showed higher obsessive behavior and decreased paternal behavior
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢田紗織、堀江謙吾、日出間志寿、西森克彦
2. 発表標題 Analysis of empathic neural circuit regulated by oxytocin
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚 彩乃、日出間 志寿、西森 克彦
2. 発表標題 アルコール摂取による有害効果への内在性オキシトシン系の抑制機能について
3. 学会等名 2019年度農芸化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 遼太郎、日出間 志寿、福光 聡、仲川 清隆、西森 克彦
2. 発表標題 高脂肪食摂取マウスにおける社会記憶の低下と末梢オキシトシン投与による社会記憶改善効果
3. 学会等名 2019年度農芸化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日出間志寿、矢田紗織、堀江謙吾、林遼太郎、水上浩明、西森克彦
2. 発表標題 内側視索前野のオキシトシン受容体発現ニューロンは乳汁射出を制御する
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木野崎萌、堀合真知、宮崎慎至、矢田紗織、日出間志寿、西森克彦
2. 発表標題 MeAのOxtrシグナルはVPA投与マウスのASD様行動を改善する
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀合真知、木野崎萌、矢田紗織、日出間志寿、西森克彦
2. 発表標題 自閉症モデルマウスにおけるOxt作用機構の解析
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日出間志寿、矢田紗織、水上浩明、高橋友海、西森克彦
2. 発表標題 Analysis of Oxytocin receptor in LS on maternal behavior
3. 学会等名 日本動物行動関連学会・研究会合同大会（行動2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢田紗織、堀江謙吾、日出間志寿、西森克彦
2. 発表標題 オキシトシンが制御する共感性の神経回路の解明
3. 学会等名 日本動物行動関連学会・研究会合同大会（行動2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 矢田紗織、堀江謙吾、日出間志寿、西森克彦
2. 発表標題 Analysis of empathic neural circuit regulated by oxytocin
3. 学会等名 第9回光操作研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Zachary T. Nolan, Shizu Hidema, Katsuhiko Nishimori, Yongsoo Kim
2. 発表標題 Whole Brain Mapping of the Developmentally Regulated Expression of the Oxytocin Receptor.
3. 学会等名 北米神経科学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 SHINJI MIYAZAKI, SHIZU HIDEMA, KATSUHIKO NISHIMORI
2. 発表標題 "Prenatal minocycline treatment alters synaptic protein expression, in oxytocin receptor-knockout mice "
3. 学会等名 北米神経科学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saori Yada, Kengo Horie, Shizu Hidema, Katsuhiko Nishimori
2. 発表標題 Analysis of empathic neural circuit regulated by oxytocin.
3. 学会等名 北米神経科学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀合真知、木野崎萌、矢田紗織、日出間志寿、西森克彦
2. 発表標題 LSのOxt-Oxtrシグナルは自閉症モデルマウスの異常な行動を改善する
3. 学会等名 2017年度生命科学系合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kengo Horie, Saori Yada, Saki Adachi, Shingo Suzuki, Takashi Hirayama, Tomokazu Fukuda, Shizu Hidema, Katsuhiko Nishimori
2. 発表標題 Generation and analysis of Oxtr KO and Oxtr ires-Cre KI prairie voles by CRISPR/Cas
3. 学会等名 2017年度生命科学合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shizu Hidema, Saori Yada, Shinji Miyazaki, Kengo Horie, Ryotaro Hayashi, Hiroaki Mizukami, Katsuhiko Nishimori
2. 発表標題 母性行動における外側中隔オキシトシン受容体の機能
3. 学会等名 2017年度日本生理学会大会
4. 発表年 2018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	長 由扶子  (Cho Yuko)  (60323086)	東北大学・農学研究科・助教    (11301)	