

令和元年6月20日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14965

研究課題名(和文)中枢ヒスタミン神経系の機能解析と病態モデルへの展開

研究課題名(英文)Functions of central histaminergic neurons in pathological model

研究代表者

長沼 史登(NAGANUMA, Fumito)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：80780519

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)：ヒスタミン代謝酵素Hnmt-flox脳内にAAV-Creを微量注入することにより、注入脳部位でヒスタミン量が増加する。ヒスタミン増加は、視床下部では自発運動量の増加に、扁桃体では攻撃行動が増加することが明らかになった。一方、ヒスタミン合成酵素Hdc-floxの視床下部へのAAV-Cre注入は、脳内ヒスタミン量を減少させ、不安様行動の増加、自発運動量、攻撃行動の減少を認めた。以上から、ヒスタミン神経系は、視床下部においては、自発運動量や不安様行動に、扁桃体においては攻撃行動に、それぞれ関与していることが示唆された。本研究により、中枢ヒスタミン神経系の脳部位毎の機能解析が可能な手法が確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の中枢ヒスタミン研究では、主にノックアウトマウスを用いた研究が行われてきたが、代償性機構が無視できなかった。しかしながら、本研究で確立したAAV微量注入法では、成体マウスで遺伝子操作を行うため、代償性機構をある程度無視出来る。さらに、ヒスタミン神経系の役割を脳部位毎に、gain-of-functionまたはloss-of-function両面から検討できる。本研究で確立した方法により脳部位別のヒスタミン神経系の役割がさらに明らかとなれば、疾病によって脳部位ごとに様々な神経活動の異常が認められるヒスタミン神経系が、それぞれの病態にどのように影響を与えているのか明確に出来ると期待される。

研究成果の概要(英文)：Microinjection of AAV-Cre into brain regions of Hnmt (a histamine-metabolizing enzyme)-flox mice increased histamine concentration in the injected regions. Increased histamine in hypothalamus increased locomotor activity, whereas that in amygdala increased aggression behaviors, respectively. On the other hand, in Hdc (histamine synthetase)-flox mice, microinjection of AAV-Cre into hypothalamus decreased brain histamine and induced the anxiety-like behaviors and suppressed locomotor activity and aggression behaviors. These results showed that histaminergic neurons were important for locomotor activity in hypothalamus and aggression behaviors in amygdala, suggesting that histaminergic neurons have a different role in various brain regions. In addition, this study could develop the new methods to study each functions of brain histamine depend on each brain regions.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ヒスタミン 条件的遺伝子欠損 AAVベクター

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

1. 研究開始当初の背景

中枢ヒスタミン神経系は、視床下部外側の結節乳頭核にその神経核を持ち、脳全体にその神経繊維を投射している。中枢ヒスタミン神経系は、自発運動量、睡眠覚醒、攻撃性といった様々な生理機能に関与し、多くの病態においてその神経系の活動異常が報告されている。中枢ヒスタミン神経系の機能解析は、主にノックアウトマウスの表現系を解析することで行われてきたが、代償性機構が無視できないという問題があった。さらに、病態におけるヒスタミン神経系の活動異常は、病態によって異なる脳部位で起きている可能性が報告されている。このことから、ヒスタミンの持つ生理機能も、脳部位によって異なる可能性が示唆されていたが、従来のノックアウトマウスを用いた方法では、脳部位毎のヒスタミン神経系の機能解析は困難であった。

2. 研究の目的

成体マウスの脳局所にウイルスベクターを微量注入し、注入脳部位のみでヒスタミン神経系の活動を調節する。それに伴う表現系を行動薬理的に解析することで、脳部位毎のヒスタミン神経系の役割を明確にすることが本研究の目的である。これに加え、実際の病態モデルにおいても脳局所でのヒスタミン神経系の活動調節を行い、病態との関連性の検討を行う。

3. 研究の方法

本研究では Cre-LoxP システムにより、条件的遺伝子組換えを行う。具体的には、ヒスタミン合成酵素 histidine decarboxylase (Hdc)-flox マウス、およびヒスタミン代謝酵素 histamine N-methyl transferase (Hnmt)-flox マウスの脳局所に Cre recombinase を発現するウイルスベクター (AAV-Cre) を微量注入し、それぞれの酵素を欠損させる。これにより、Hdc-flox では注入脳部位で合成酵素が欠損し、ヒスタミン量が減少する、一方 Hnmt-flox マウスでは代謝酵素が欠損し、ヒスタミン量が増加することが期待される。この手法により、AAV-Cre 注入脳部位のみヒスタミン神経系の活動を亢進または、低下させることが出来るため、それに伴う、それぞれの表現系に関して以下の行動薬理学的手法により解析する。

自発運動量：Open field test

不安様行動：Elevated-plus maze, (Open field test)

攻撃行動：Resident-intruder test

睡眠覚醒：脳波筋電図測定

記憶学習：Passive avoidance test

4. 研究成果

【Hdc-flox マウスを用いた研究】

研究計画時点では、逆行性ウイルスベクターを用いて標的脳部位に投射しているヒスタミン神経系の Hdc のみを欠損させる予定であったが、逆行性ウイルスの性能または感染効率、または投射繊維の数などが関与していると考えられる問題により、条件検討の段階で予定通りに研究が進まなかった。そのため、まずは Hdc が限局して発現している結節乳頭核 (視床下部外側) に AAV-Cre を微量注入し、脳における Hdc を欠損させて検討を行うことにした。これらの検討は成体マウスで行ったため、従来のノックアウトマウスと異なり、代償性機構が抑えられたモデルであると考えられる。その結果、AAV 注入 3 週間後、各脳部位において HPLC でヒスタミン量を測定した結果、大脳皮質、視床下部においてヒスタミン量の有意な現象が認められた。次に、行動解析を行った結果、自発運動量の低下、不安様行動の増加、攻撃行動の減少、および覚醒時間の短縮など、これまでヒスタミン神経系の関与が示唆されていた表現系を得ることが出来た。これらの結果と、従来のノックアウトマウスで得られていた表現系は、代償性機構に関わらず、脳内ヒスタミン神経系が直接的に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

【Hnmt-flox マウスを用いた研究】

Hnmt は Hdc とは異なり、脳の広い範囲に発現しており、ヒスタミン神経終末から放出されるヒスタミンを不活化し、ヒスタミン濃度を調節していると考えられている。まず本研究では、Hnmt の全身ノックアウトで認められている睡眠覚醒 (活動量) と、攻撃性に着目し、これらに重要とされる視床下部、または扁桃体に AAV-Cre を打ち込み検討を行った。まず、AAV-Cre を視床下部、扁桃体、Hnmt-flox マウスそれぞれに打ち込んだ結果、Cre 発現のレポーターとなる GFP が、注入部位のみに発現していることを組織学的に確認した。次に、自発運動量を測定した結果、視床下部 AAV-Cre 注入群において暗期の自発運動量が増加することが明らかになった。一方、扁桃体 AAV-Cre 注入群においては Resident-intruder test により、攻撃時間の延長が認められた。本研究より、中枢ヒスタミン神経系が、視床下部においては自発運動量に、扁桃体においては攻撃行動に、それぞれ重要な役割を果たしていることが初めて示された。

本研究ではこれらの基礎的な機能解析に加え、実際に疾病モデルを用いた検討を予定していたが、AAV ウイルスの作製法や、微量注入法の確立に時間がかかり、計画の全てを実施することはできなかった。しかしながら、本方法により、中枢ヒスタミン神経系を脳部位毎に

loss-of-function および gain-of-function 両面から検討できる方法を確立できたことが本研究の成果である。ヒスタミン神経系は、近年病態によって、様々な脳部位で異なる活動異常が起きていることが報告されている。そのため今後、本研究で確立した方法を用いることで、ヒスタミン神経系の各脳部位での機能がより明確になれば、病態毎のヒスタミン神経系の役割がより明らかになると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

F Naganuma, D Kroeger, SS Bndaru, G Absi, JC Madara, R Vetrivelan. Lateral hypothalamic neurotensin neurons promote arousal and hyperthermia. *PLoS Boil.* 2019 DOI: 10.1371/journal.pbio.1002518. 査読あり

F Naganuma, SS Bandaru, G Absi, MJ Chee, R Vetrivelan. Melanin-concentrating hormone neurons promote rapid eye movement sleep independent of glutamate release. *Brain Struct Funct.* 2019 Jan;224(1):99-110. DOI: 10.1007/s00429-018-1766-2. 査読あり

F Naganuma, SS Bandaru, G Absi, CE Mahoney, TE Scammell, R Vetrivelan. Melanin-concentrating hormone neurons contribute to dysregulation of rapid eye movement in narcolepsy. *Neurobiol Dis.* 2018 Dec; 120:12-20. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.08.012. 査読あり

F Naganuma, T Nakamura, T Yoshikawa, T Iida, Y Miura, A Karpati, T Matsuzawa, A Yanai, A Mogi, T Mochizuki, N Okamura, K Yanai. Histamine N-methyltransferase regulates aggression and the sleep-wake cycle. *Sci Rep.* 7(1):15899. Nov 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-16019-8. 査読あり

T Iida, T Yoshikawa, A Karpati, T Matsuzawa, H Kitano, A Mogi, R Harada, **F Naganuma**, T Nakamura, K Yanai. JNJ10181457, a histamine H3 receptor inverse agonist, regulates in vivo microglial functions and improves depression-like behaviors in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jul 1;488(3):534-540. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.081. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

F Naganuma, T Nakamura, R Vetrivelan, N Okamura. Melanin-concentrating hormone (MCH) neurons contribute to dysregulation of rapid eye movement (REM) sleep in narcolepsy-model mouse. The 92nd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (第 92 回日本薬理学会年会) (3-O-18), March 14-16th 2019.

F Naganuma, SS Bandaru, G Absi, M Chee, R Vetrivelan. Role of Glutamate Produced by Melanin-Concentrating Hormone Neurons in Sleep-wake Regulation. *Neuroscience*2018. Nov. 3-7th, 2018.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。