

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16369

研究課題名(和文) ストレス誘発性うつ様行動における T 型カルシウムチャンネル機能解析

研究課題名(英文) Function of T-type calcium channel in stress-induced depressive-like behaviors in mice.

研究代表者

矢吹 悌 (Yabuki, Yasushi)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：70756121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：T 型カルシウムチャンネルは低閾値で一過性に開口する電位依存性カルシウムチャンネルである。申請者は、T 型カルシウムチャンネル欠損マウスがストレス性うつ様行動に耐性を示すことを見出した。本研究では、ストレス性うつ様行動における T 型カルシウムチャンネル機能を解明し、創薬研究への発展を目指した。本研究により、ストレス負荷によって前頭前皮質の興奮性/抑制性神経活動の均衡が破綻し、うつ様行動が誘導されることが示唆された。また、遺伝子欠損マウスの検討から、T 型カルシウムチャンネルがストレス負荷による抑制性神経活性化に重要な役割を担っていることが考えられる。現在、治療候補薬の探索を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで T 型カルシウムチャンネルは痛覚反応や睡眠に関与することが知られていたが、本研究により新たに脳におけるストレス応答に重要な役割を果たすことがわかった。脳におけるストレス応答の理解は、精神疾患発症メカニズムを検討する上で非常に重要である。ストレス社会である日本において、うつ病は年々増加しており、うつ病の治療法確立は急務である。本研究はストレスによるうつ病発症メカニズムの一端を明らかにし、創薬研究と繋げる橋渡し研究であり、神経科学の発展と新規抗うつ薬の開発に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：T-type calcium channels characterized by unique electrophysiological features with fast inactivation and slow deactivation kinetics. We have demonstrated that T-type calcium channel knock-out (KO) mice show resistance to stress-induced depressive-like behaviors. In the present study, we tried to investigate the molecular mechanism underlying resistance for stress-induced depressive-like behaviors in T-type calcium channel KO mice and in turn develop the novel therapeutic candidates for depression. We showed that chronic stress may disrupt balance between excitatory and inhibitory neuronal activities in medial prefrontal cortex, resulting in development of depressive-like behaviors in mice. Moreover, analyses using T-type calcium channel KO mice suggest that T-type calcium channels have an important role in stress-induced inhibitory neuronal activation. Now, we keep searching for candidates for novel therapeutics of depression.

研究分野：神経薬理学、神経化学、神経科学

キーワード：T 型カルシウムチャンネル ストレス うつ様行動 神経活動

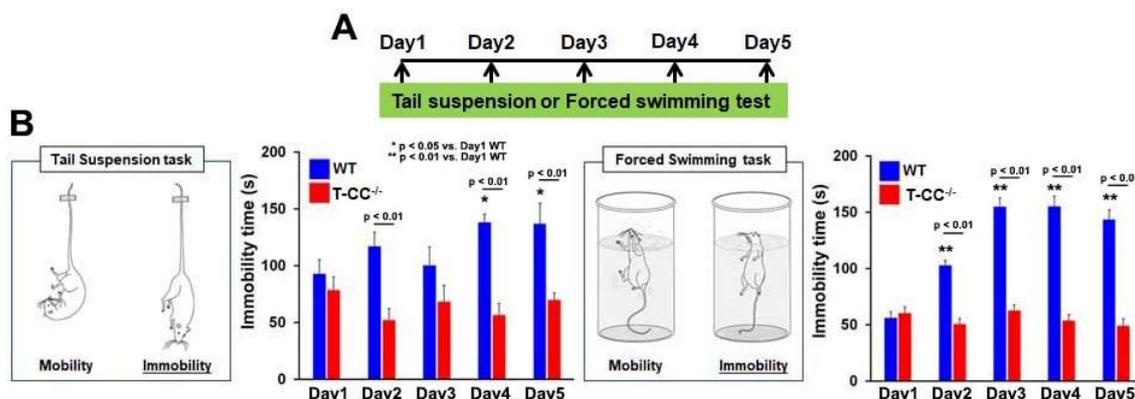
1. 研究開始当初の背景

ストレス社会の日本において、うつ病患者は年々増加しており、現在 100 万人を超えている。自殺者の約 60% はうつ病患者といわれており、うつ病の治療法確立は急務である。抗うつ作用を持つイミプラミンがモノアミン系に作用することから、既存の抗うつ薬はセロトニンやノルアドレナリンを標的としている。しかしながら、十分な改善効果が得られない難治性うつ病患者が増加しており、新規作用機序の抗うつ薬の開発が望まれている。

申請者は、**T 型カルシウムチャンネルを賦活化する化合物 SAK3 を発見した** (*Neuropharmacology*. 2017)。うつ様行動を呈する嗅球摘出 (OBX) マウスに SAK3 (0.5 mg/kg, p.o.) を 2 週間経口投与すると、海馬神経新生を促進し、うつ様行動が改善された (*J Pharmacol Sci*. 2018)。SAK3 の神経新生促進作用および抗うつ作用は T 型カルシウムチャンネル阻害薬 NNC 55-0396 投与により完全に抑制された。この研究成果は、**T 型カルシウムチャンネルがうつ様行動に関与すること示した重要な知見である。**

齧歯類に強制水泳試験などのうつ様行動評価試験を繰り返し処置すると、ストレス誘発性のうつ様行動を呈する^{文献 1), 2)}。実際に、強制水泳試験、懸垂尾試験を繰り返し処置すると野生型マウスでは無動時間が増加していくことから (図 1)、うつ様状態であることがわかる。一方、**T 型カルシウムチャンネル欠損マウスはストレス負荷によるうつ様行動を呈さなかった (図 1)**。ストレスによるうつ病発症の一因として視床下部-下垂体-副腎系 (HPA 系) の異常活性化が知られているが、**T 型カルシウムチャンネルとストレスの関係性は全くわかっていない。**

図1. T 型カルシウムチャンネル欠損マウスはストレス性うつ様行動に耐性を示す



2. 研究の目的

本研究では、**T 型カルシウムチャンネル欠損マウスのストレス誘発性うつ様行動に対する耐性機構を解明し、うつ病治療標的分子と治療候補薬の探索を目的とする。**過去の報告から、ストレス負荷により、前頭前皮質内側部の GABA 神経系が活性化することが報告されている^{文献 3)}。また、T 型カルシウムチャンネルは GABA 神経細胞に発現していることから^{文献 4)}、**T 型カルシウムチャンネル欠損マウスのストレス耐性メカニズムには前頭前皮質内側部の興奮性・抑制性神経伝達の異常が関与していると考えられる。**本研究を遂行するために、**1) ストレス負荷時の興奮性・抑制性神経伝達機構の変化を野生型および T 型カルシウムチャンネル欠損マウスにおいて比較検討する。**また、**2) ストレス負荷時の遺伝子変化を検討し、新規治療標的分子の探索を行う。**HPA 系の関与を検討するために、**3) ストレス負荷時の血中コルチコステロン (CORT) 濃度の測定と**

CORT 慢性投与によるうつ様行動を野生型および T 型カルシウムチャンネル欠損マウスで検討する。以上の検討から、T 型カルシウムチャンネル欠損マウスのストレス耐性のメカニズムを解明すると共に、5) **治療候補薬について検討する。**

3. 研究の方法

1) ストレス負荷時の興奮性・抑制性神経伝達機構の変化

パッチクランプ法によりマウス前頭前皮質内側部の自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) および抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を測定した。免疫組織化学染色法による c-Fos 陽性細胞数を検討した。また、前頭前皮質内側部における T 型カルシウムチャンネルの局在を検討した。*in vivo* マイクロダイアリシス法によるグルタミン酸・GABA 遊離量を測定した。

2) ストレス負荷時の遺伝子変化の検討

ストレスを負荷した野生型および T 型カルシウムチャンネル欠損マウスの前頭前皮質内側部を摘出し、次世代シーケンス解析により、遺伝子変化を解析した。

3) ストレス負荷による血中 CORT 濃度測定と慢性 CORT 投与マウスの解析

ELISA 法により、ストレス負荷時のマウス血中 CORT 濃度を測定した。また、CORT が T 型カルシウムチャンネル活性化に関与するか検討した。CORT 慢性投与によるうつ様行動を野生型および T 型カルシウムチャンネル欠損マウスで検討した。

4) 治療候補薬の探索

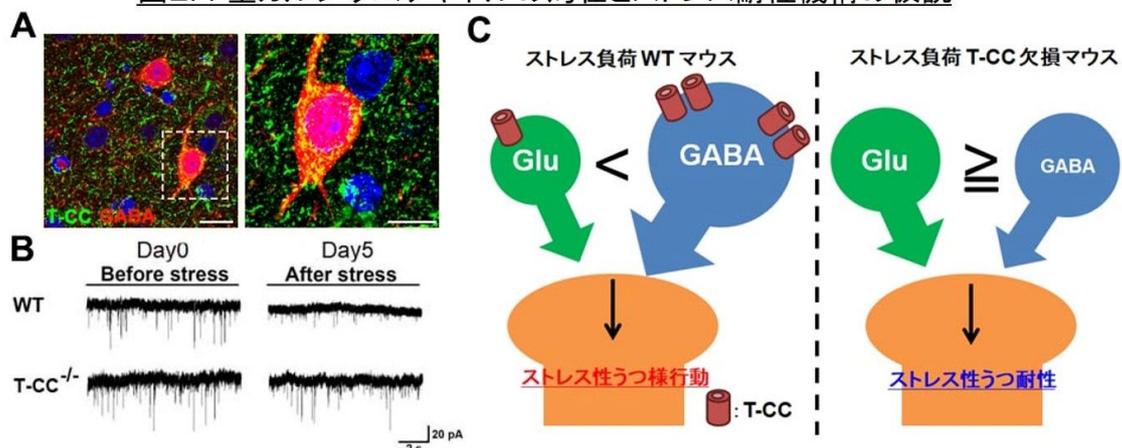
ストレス性うつ様行動を抑制する化合物を行動試験により評価した。

4. 研究成果

1) ストレス負荷時の興奮性・抑制性神経伝達機構の変化

ストレス負荷により、野生型マウスの前頭前皮質内側部では sEPSC の frequency および amplitude 共に低下するが、T 型カルシウムチャンネル欠損マウスではそのような変化はみられなかった (図 2B)。同様に、sIPSC を測定した結果、野生型マウスではストレス負荷により GABA 抑制性神経伝達が亢進していたが、T 型カルシウムチャンネル欠損マウスでは顕著な変化はみられなかった。また、前頭前皮質内側部においても T 型カルシウムチャンネルは GABA 神経細胞に局在していた (図 2A)。さらに、c-Fos 陽性細胞を定量したところ、ストレス負荷は野生型マウス前頭前皮質内側部の GABA 抑制性神経を活性化することがわかった。*in vivo* マイクロダイアリシス法によるグルタミン酸・GABA 遊離によっても同様の結果を得た。これら結果は、T 型カルシウムチャンネルがストレス負荷による GABA 神経細胞活性化に必須であることを示唆している。また、

図2. T 型カルシウムチャンネルの局在とストレス耐性機構の仮説



ストレス性うつ様行動には前頭前皮質内側部の GABA 神経細胞活性化による興奮性/抑制性 (E/I) バランスの破綻が関与することが考えられる (図 2C)。現在、その詳細について解析を進めている。

2) ストレス負荷時の遺伝子変化の検討

野生型および T 型カルシウムチャンネル欠損マウスの前頭前皮質内側部をストレス負荷前後で摘出し、次世代シーケンスによる解析を行った。ストレス負荷により、野生型マウスでは約 500 遺伝子が増加していたが、T 型カルシウムチャンネル欠損マウスではほとんど遺伝子変化がみられなかった。つまり、遺伝子発現レベルでストレス耐性が形成されていることが示唆される。現在、バイオインフォマティクスによる網羅解析により、その詳細を検討中である。

3) ストレス負荷による血中 CORT 濃度測定と慢性 CORT 投与マウスの解析

T 型カルシウムチャンネル欠損マウスは CORT 慢性投与によるうつ様行動にも耐性を示した。一方、ストレス負荷により野生型および T 型カルシウムチャンネル欠損マウスともに血中 CORT 濃度が上昇した。このことは、T 型カルシウムチャンネルは HPA 系には影響を与えず、ストレス性うつ様行動を制御していることを示唆している。

4) 治療候補薬の探索

既存の T 型カルシウムチャンネル阻害薬がストレス性うつ様行動を抑制するか検討した。遺伝子欠損マウスと同様に、T 型カルシウムチャンネル阻害薬を投与したマウスではストレス性うつ様行動が軽減された。現在、詳細な解析を行っている。

参考文献 : 1) J Neurosci Methods. 195(2):200-5. (2011); 2) J Vet Med Sci. 79(11):1803-1806.;3) Neuroscience . 332:1-12. (2016); 4) J Neurosci. 31(38):13546-61. (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 Asamitsu S., Yabuki Y. (equal contribution), Ikenoshita S., Kawakubo K., Kawasaki M., Usuki S., Nakayama Y., Adachi K., Kugoh H., Ishii K., Matsuura T., Nanba E., Sugiyama H., Fukunaga K. & Shioda N.	4. 巻 7(3)
2. 論文標題 CGG repeat RNA G-quadruplexes interact with FMRpolyG to cause neuronal dysfunction in fragile X-related tremor/ataxia syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances.	6. 最初と最後の頁 eabd9440.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yabuki Y., Matsuo K., Yu M., Xu J., Sakimura K., Shioda N. & Fukunaga K.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Cav3.1 t-type calcium channel is critical for cell proliferation and survival in newly generated cells of the adult hippocampus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Physiol (Oxf).	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Yabuki Y., Liu J., Kawahata I., Izumi H., Shinoda Y., Koga K., Ueno S., Shioda N. & Fukunaga K.	4. 巻 21(6)
2. 論文標題 Fatty Acid Binding Protein 3 Enhances the Spreading and Toxicity of α -Synuclein in Mouse Brain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Asamitsu S., Imai Y., Yabuki Y., Ikenoshita S., Takeuchi M., Kashiwagi H., Tanoue Y., Fukuda T. & Shioda N.	4. 巻 531(1)
2. 論文標題 Identification and immunohistochemical characterization of G-quadruplexes in mouse brain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 67-74.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Yabuki Y.	4. 巻 140(10)
2. 論文標題 Role of T-type Calcium Channels in Regulating Neuronal Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi.	6. 最初と最後の頁 1207-1212.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 矢吹 悌, 塩田 倫史 & 福永 浩司.	4. 巻 51 (14)
2. 論文標題 T 型カルシウムチャネルによる神経新生調節と創薬	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 34-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Shioda N., Yabuki Y., Asamitsu S.	4. 巻 154(6)
2. 論文標題 rnals and books. 1. Shioda N., Yabuki Y., Asamitsu S. [The potential of G-quadruplexes as a therapeutic target for neurological diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi.	6. 最初と最後の頁 294-300.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 矢吹 悌
2. 発表標題 脳における T 型カルシウムチャネルの役割
3. 学会等名 日本薬学会東北支部 第18回生物化学若手研究者セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢吹 悌、塩田 倫史、福永 浩司
2. 発表標題 神経薬理学的な T 型カルシウムチャネルの脳機能解析
3. 学会等名 次世代薬理セミナー2019 in 那覇 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢吹 悌、塩田 倫史、福永 浩司
2. 発表標題 神経薬理学的な T 型カルシウムチャネルの脳機能解析
3. 学会等名 第41回 東北薬学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasushi Yabuki & Kohji Fukunaga
2. 発表標題 T-type calcium channels are critical for adult mouse hippocampal neurogenesis.
3. 学会等名 The 6th Asian College of Neuropsychopharmacology Congress (AsCNP 2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎 萌、朝光 世煌、矢吹 悌、塩田 倫史
2. 発表標題 新規RNAG4結合タンパク質DNAPT6の同定及びマウス脳における機能解析
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川久保 厚佑、朝光 世煌、矢吹 悌、塩田 倫史
2. 発表標題 ARX遺伝子GCGリピート伸長はRNAグアニン四重鎖を介してARXタンパク質の翻訳抑制を引き起こす
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹 悌、前田 康平、溝端 知宏、河田 康志、朝光 世煌、塩田 倫史
2. 発表標題 RNAグアニン四重鎖は -シヌクレインの液-固相転移を促進する
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
研究協力者	松尾 和哉 (Matsuo Kazuya)		
研究協力者	許 晶 (Xu Jing)		

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		
カナダ	University of Calgary	Cumming School of Medicine	