

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16381

研究課題名(和文) 神経賦活薬の脳内作用メカニズム解明を目的とした薬物感受性脳細胞の解明

研究課題名(英文) Identification of drug-sensitive ON cells to elucidate the underlying mechanism of CNS-acting drugs

研究代表者

濱田 祐輔 (Hamada, Yusuke)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10806326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経作用薬により賦活される脳神経ネットワークとその薬理作用発現機序の解明を目的として、活性化細胞標識法に従い、中枢神経作用薬に対する“薬物感受性脳細胞”の特性解析および機能解析を行った。中でも、 $\mu$ オピオイド受容体作動薬処置により脳内報酬系に關与する各種神経サブタイプの特異的な活性化が認められた。また、 $\mu$ オピオイド受容体作動薬非存在下、腹側被蓋野内 $\mu$ オピオイド受容体作動薬活性化神経細胞の再活性化により、慢性疼痛下で低下した痛覚閾値の一過性の痛覚変動が認められた。このように、活性化細胞標識法を応用することで中枢神経作用薬の薬物感受性脳細胞の特性解析や機能解析が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経作用薬の primary site となる標的分子は明解となっているものの、実際に各薬物がどのような時間軸・空間軸で標的とする脳領域・細胞に到達し、作用発現を示すのかという分子・細胞メカニズムは不明である。本研究の成果より、遺伝子工学的手法を活用した活性化細胞標識法の応用により、中枢神経作用薬の脳領域・細胞への到達における時間軸や空間軸の違いや作用する標的細胞の違いに関して個別の薬物ごとにプロファイルを比較することが可能となった。このような研究アプローチは、各種中枢神経作用薬の分子細胞薬理的な作用機構を理解するために重要性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the underlying mechanism of CNS-acting drugs, we attempted to perform a characteristic and functional analysis of drug-sensitive ON cells. In this study, we first generated genetically modified mice, which could especially express transgenes in cFos+ activated neurons under the administration of CNS-acting drugs according to the targeted recombination in active population (TRAP) method. Using these mice, we found the activation of neuronal cell subtypes related to brain reward systems by the administration of  $\mu$ -opioid receptor agonist. Furthermore, we demonstrated that optogenetic reactivation of  $\mu$ -opioid receptor agonist-responsive neurons in the ventral tegmental area could transiently modulate the pain threshold under a chronic pain-like state. These findings suggest that the characteristic and functional analysis of drug-sensitive ON cells using TRAP methods may help clarify the underlying pharmacological mechanism of CNS-acting drugs.

研究分野：神経科学

キーワード：活性化細胞標識法 中枢神経作用薬 cFos

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳は、その領域ごとに機能・役割が異なり、さらに細分化すると各脳領域を構成する細胞ごとにサブタイプが存在し、複雑で多様性に富んだヘテロな細胞群で構成されている。脳を介した様々なフェノタイプの発現には、賦活される脳領域・細胞間の神経ネットワークの複雑さを理解することが重要である。一方、中枢神経系に作用する薬物は、精神疾患や神経変性疾患などの治療に広く用いられている。これまでの基礎研究から、各種中枢神経作用薬物の primary site となる標的タンパク質 (受容体や酵素、トランスポーターなど) は明解となっているものの、実際に、各薬物が、どのような時間軸・空間軸で標的とする脳領域・細胞に到達し、作用発現を示すのかという分子・細胞メカニズムは不明である。そのため、中枢神経系に作用する薬物が、標的分子に作用した後に、どのような細胞が活性化され、その統合により賦活される神経ネットワークを明らかにすることは、各薬物の薬理効果の発現機構を考察する上で、非常に重要な課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、各種中枢神経作用薬物により賦活される脳神経ネットワークとその薬理作用発現機序の解明を目的として、Cre-loxP 遺伝子組換えシステムに基づいた遺伝子改変動物を用い、活性化細胞標識 (targeted recombination in active population; TRAP) 法、特定細胞分取法および光遺伝学・薬理遺伝学的手法などの先駆的技術を応用することで中枢神経作用薬に対する“薬物感受性脳細胞”の探索・同定および機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

中枢神経作用薬の投与により活性化される“薬物感受性脳細胞”の標識を行うために活性化細胞標識 (targeted recombination in active population; TRAP) 法に基づき、神経活動依存的に発現誘導される cFos 遺伝子のプロモーター制御下で、タモキシフェン存在下、活性化神経細胞特異的に遺伝子組換えが可能な cFos ドライバーマウスを用いた。中枢神経作用薬により活性化される薬物感受性脳細胞の分取は、FACS 法に従い、cFos-GFP マウスの脳組織より GFP 陽性細胞を分取することで行った。中枢神経作用薬の薬物感受性脳細胞の特性解析は、分取した細胞より RT-qPCR 法に従い遺伝子発現解析を行い、細胞プロファイルの評価を行った。中枢神経作用薬の薬物感受性脳細胞の機能解析は、光遺伝学的手法に従って cFos-ChR2 マウスを作製し、特定波長の光照射により薬物感受性脳細胞の再活性化により動物の行動学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) TRAP 法を応用した“薬物感受性脳細胞”の細胞標識法の確立

神経活動依存的に発現誘導される cFos 遺伝子のプロモーター直下にタモキシフェン誘導型 Cre 酵素 (CreER<sup>T2</sup>) を挿入した改変遺伝子配列を有する cFos-CreER<sup>T2</sup> マウスと Cre 酵素存在下でのみ EGFP を発現させることの可能な遺伝子カセットを有する LSL-EGFP マウスを交配させ、タモキシフェン存在下においてのみ、活性化神経細胞特異的に EGFP を発現させることの可能な cFos-CreER<sup>T2</sup>/EGFP マウスの作製を行った。このマウスを用いて、4-hydroxytamokifen の適正条件下での処置により、特定脳領域における各種中枢神経作用薬特異的な EGFP 陽性細胞の発現が認められ、活性化細胞における遺伝子組換え反応の誘導が可能であることが確認さ

れた。

#### (2) 中枢神経作用薬により活性化される“薬物感受性脳細胞”の特性解析

まずは、 $\mu$  オピオイド受容体作動薬を投与した際の薬物感受性脳細胞を GFP 標識し、その細胞群を分取することで遺伝子発現解析を行った。その結果、腹側被蓋野ならびに側坐核領域において、脳内報酬系に関与する各種神経サブタイプの活性化が認められた。一方、同様の手法を用いて、中枢賦活薬であるメタンフェタミンを投与した際の薬物感受性脳細胞の特性解析を行った。その結果、腹側被蓋野ならびに側坐核領域において、脳内報酬系に関与する各種神経サブタイプの活性化が認められたが、その中でも、 $\mu$  オピオイド受容体作動薬投与による活性化神経細胞とは異なる神経細胞群の活性化が認められた。

#### (3) 中枢神経作用薬により活性化される“薬物感受性脳細胞”の機能解析

$\mu$  オピオイド受容体作動薬活性化神経細胞の機能解析を行う目的で、光遺伝学的手法を応用し、 $\mu$  オピオイド受容体作動薬活性化神経細胞を人為的に活性操作した際の痛覚閾値への影響について検討を行った。cFos-CreER<sup>T2</sup> マウスの腹側被蓋野領域に AAV-FLEX-ChR2 ベクターを脳内微量注入することで cFos-ChR2 マウスを作製し、4-hydroxytamokifen 存在下、 $\mu$  オピオイド受容体作動薬を投与することで、腹側被蓋野内  $\mu$  オピオイド受容体作動薬活性化神経細胞特異的に ChR2 を発現誘導させた。こうした条件下、光遺伝学的手法に従い、慢性疼痛モデルにおける腹側被蓋野内  $\mu$  オピオイド受容体作動薬活性化神経細胞の再活性化による痛覚閾値の変化について検討を行った。その結果、 $\mu$  オピオイド受容体作動薬非存在下、腹側被蓋野内  $\mu$  オピオイド受容体作動薬活性化神経細胞の再活性化により、慢性疼痛下で低下した痛覚閾値の一過性の痛覚変動が認められた。

#### (4) 総括

本研究の結果より、TRAP 法に従った活性化細胞標識法の応用により、中枢神経作用薬の投与により活性化される“薬物感受性脳細胞”の特性解析や機能解析が可能となることが示唆された。さらに詳細な解析やモダリティの応用が必要ではあるが、このような研究アプローチを進めることで、中枢神経作用薬の脳領域・細胞への到達における時間軸や空間軸の違いや作用する標的細胞の違いに関して個別の薬物ごとにプロファイルを比較することが可能となり、各薬物の脳を介した薬理効果の発現機序を考察するための重要な機構が明らかになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------