

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06930

研究課題名（和文）オピオイド受容体を介した情動調節の神経回路メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanism of neural circuit of emotion regulation through delta-opioid receptors

研究代表者

山田 大輔（Yamada, Daisuke）

東京理科大学・薬学部薬学科・講師

研究者番号：10621302

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）：本研究では、オピオイド受容体作動薬KNT-127が内側前頭前野のPI3K経路、扁桃体のMAPK経路を介して恐怖記憶の消去を促進すること、内側前頭前野前辺縁皮質（PL）から扁桃体基底外側核（BLA）への興奮性投射を光遺伝学的に活性化することにより誘発される不安様行動を有意に抑制することを見出した。また脳スライスパッチクランプ実験において、KNT-127がPL内興奮性シナプス後電流の頻度を抑制すること、すなわちグルタミン酸放出を抑制することを示唆する結果を得た。以上のことから、受容体はPL-BLA神経回路を抑制することにより、抗不安様作用を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病・不安症・恐怖症などの精神疾患患者は強い不安を示すことが知られている。その治療薬として抗うつ薬（選択的セロトニン取り込み阻害薬SSRI）やベンゾジアゼピン系薬物が用いられているが、いずれも副作用を示すことから、治療満足度は高くない。そのため、既存薬とは異なる作用機序を持つより安全性の高い治療薬の開発が求められている。

本研究では、これまでに例のないオピオイド受容体作動薬が示す抗不安様作用、恐怖記憶の消去促進作用のメカニズムの一端を明らかにした。この成果は、今後受容体作動薬を抗うつ・抗不安薬、またはPTSD治療薬として開発するうえで有用な基盤情報を提供するものとなる。

研究成果の概要（英文）：In this study, based on our previous reports, we found that optogenetic activation of the excitatory projections from prelimbic subregion of the medial prefrontal cortex (PL) to basolateral nucleus of the amygdala (BLA) induced anxiety-like behaviors in openfield and elevated plus maze tests in mice. In addition, we discovered that the selective delta-opioid receptor agonist KNT-127 significantly suppresses this optogenetically induced anxiety-like behavior. Further, in patch-clamp experiments in the PL slices, we obtained results suggesting that KNT-127 suppresses the frequency of excitatory postsynaptic currents in the excitatory neurons in the PL, thereby implying the inhibition of glutamate release. From these findings, we propose that the delta-opioid receptors exhibit anxiolytic effects by inhibiting the PL-BLA neural circuit.

研究分野：神経薬理学

キーワード：オピオイド受容体 情動神経回路 不安様行動 内側前頭前野 扁桃体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不安・恐怖は気分障害、不安症等様々な精神疾患に共通して出現する中核的な精神症状であるが、SSRIのような現行の抗うつ薬は遅効性が問題となっており、またベンゾジアゼピン系抗不安薬には筋弛緩、健忘等の副作用が認められることから、新規メカニズムを有する向精神薬の開発が強く求められている状況であった。申請者の所属研究室における先行研究において、独自に開発した選択的オピオイド受容体(DOP)作動薬 KNT-127 が、全身投与により強制水泳試験、嗅球摘出ラットモデルおよび社会的敗北ストレスモデルにおいてうつ様行動、不安様行動を減少させること、内側前頭前野前辺縁皮質(Prelimbic area: PL)内のグルタミン酸量を調節することで不安関連行動を抑制することに加えて、最近恐怖条件づけ試験における恐怖記憶の消去を促進することを見出ししていた。

PLに加えて大脳辺縁系に位置する海馬や扁桃体は、うつ病/不安症患者やその病態モデル動物における機能変化が報告されており、抑うつ/不安病態の解明や治療の標的として注目を集めている。また恐怖記憶の消去時には、これらの脳領域の適切な連携が必要であることが知られている。受容体とその内因性リガンドは、上記 PL、海馬、扁桃体に多く分布していることから、オピオイド神経系はうつ病/不安症の治療標的となる可能性が強く示唆されるが、この事実にも関わらず、受容体による情動調節メカニズムは依然として不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、受容体を介した不安・恐怖の制御メカニズムを明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

先行研究により、DOP 作動薬 KNT-127 による抗不安様作用に関与することが示唆されていた PL と、その投射を受ける情動中枢・扁桃体基底外側核(BLA)に注目し、光遺伝学を用いて PL から BLA への神経回路(PL-BLA 回路)の活動を制御した際の不安様行動の変化を検討した。光感受性陽イオンチャネル Channelrhodopsin 2 (ChR2) と蛍光タンパク YFP を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)を雄性 C57BL/6J マウスの PL に投与した。5-6 週間後、BLA に青色 LED カニューレを留置し、行動試験(オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験)によってマウスの不安様行動を評価した。また、PL-BLA 回路活性化によって誘発される不安様行動に対する KNT-127 の作用を検討した。

また、DOP 作動薬による PL 内グルタミン酸神経伝達への影響を直接確認するために、脳スライスパッチクランプ法を用いて PL の第 2/3 層二存在する興奮性神経細胞から自発的興奮性シナプス後電流(sEPSC)を記録した。加えて電位依存性 Na⁺チャネルブロッカー Tetrodotoxin (TTX) 存在下で微小興奮性シナプス後電流(mEPSC)を記録した。また、PL 第 5/6 層の電気刺激による誘発興奮性シナプス後電流(eEPSC)を記録した。解析は、s/mEPSC の発生頻度・振幅、短時間間隔で 2 回の電気刺激を行った際に誘発される eEPSC の振幅の比率(ベアパルス比)、さらに刺激記録電極から印加した電流に反応して生じる活動電位の発生閾値・発生頻度など、神経細胞の受動的膜特性について実施した。

4. 研究成果

まず、PL-BLA 回路活性化と不安様行動の関連性を明らかにするため、行動試験中に BLA を青色光刺激した。ChR2 発現マウスは、対照の YFP 発現マウスに比べて、オープンフィールド試験におけるフィールド中央滞在時間が有意に短縮し(図 1a)、高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在率が減少した(図 1b)。これらの結果はいずれも、PL-BLA 回路の活性化によって不安様行動が惹起されたことを示す結果である。次に、全身投与によって抗不安様作用を示すことが知られている KNT-127 を高架式十字迷路試験を実施する 30 分前に皮下投与したところ、高架式十字迷路におけるオープンアーム滞在時間の低下およびオープンアーム侵入回数の低下がキャンセルされた(図 1c,d)。すなわち、KNT-127 は抗不安様作用を示すことが明らかとなった。この結果は、KNT-127 の抗不安様作用に PL-BLA 回路の DOP が関与することを示唆している。

次に、KNT-127 の作用部位候補と考えられる PL 内 DOP と興奮性シナプス伝達について検討を行ったところ、PL を含む脳スライスに KNT-127 を灌流処置することにより、sEPSC および mEPSC の発生頻度が有意に減少した一方、両者の振幅、立ち上がり時間、減衰時間には影響を与えなかった(図 2)。この mEPSC の発生頻度に対する KNT-127 の作用は、PL スライスに DOP アンタゴニスト Naltrindole (NTI) で pre-incubation することによって消失した(図 2d-g)。また、eEPSC のベアパルス比は KNT-127 の灌流によって増大し、NTI の pre-incubation によって消失した(図 3)。以上の結果は、KNT-127 は PL 内の DOP を介して、プレシナプスからのグルタミン酸放出を抑制することを示唆している。すなわち、先行研究で得られた Na⁺チャネル活性化薬 Veratrine の局所灌流で誘発される PL 内グルタミン酸濃度の上昇と不安様行動を KNT-127 が抑制したメカニズムとして、PL 第 2/3 層のグルタミン酸作動性シナプスにおけるグルタミン酸放出を抑制す

る可能性が強く示唆された。

最後に、KNT-127の灌流処置前後で、PL第2/3層の興奮性神経細胞における活動電位の発生頻度が有意に減少した(図4a)。この背景として、神経細胞が活動電位を発生するために必要な最小刺激電流Rheobaseが、KNT-127灌流により有意に増大することが明らかとなった(図4b)。そして、これらの変化はNTIのpre-incubationにより消失した。一方、KNT-127灌流は活動電位の振幅・閾値や神経細胞膜の静置膜電位、神経細胞の静置膜電位、入力抵抗、時定数には影響を与えなかった(図4c-g)。以上の結果から、KNT-127は神経細胞の膜興奮性を低下させる作用を有することが示唆された。

本研究の結果、DOPの活性化は、不安様行動を惹起するPL-BLA神経回路のうち、PL第2/3層におけるグルタミン酸放出の抑制および神経細胞膜興奮性を低下させることによって、PL内興奮性神経伝達を抑制し、抗不安様作用を発現することが明らかとなった。

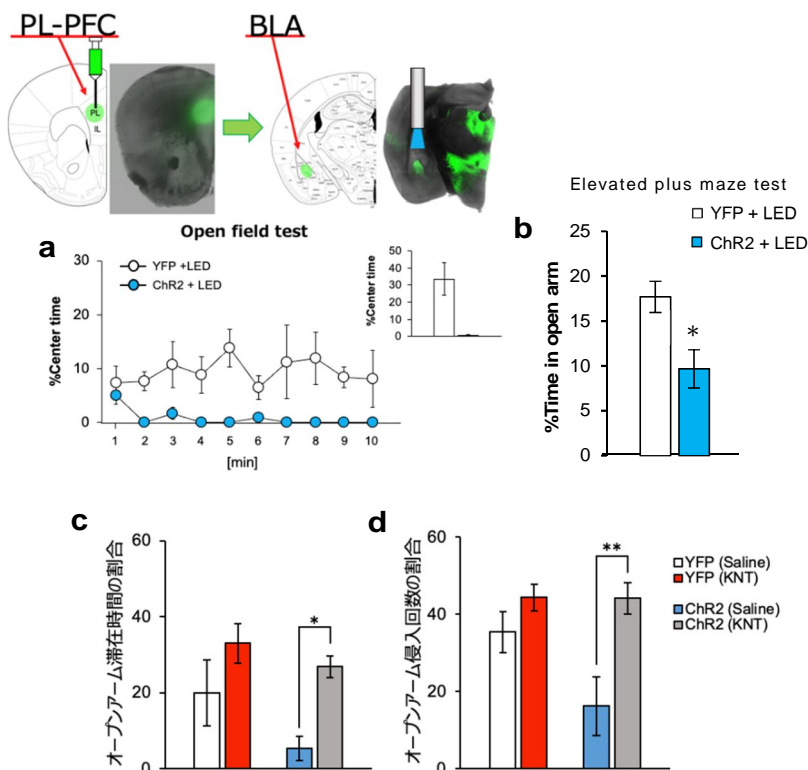


図1：PL-BLA神経回路の活性化による不安様行動の誘発と

DOP作動薬の抗不安様作用

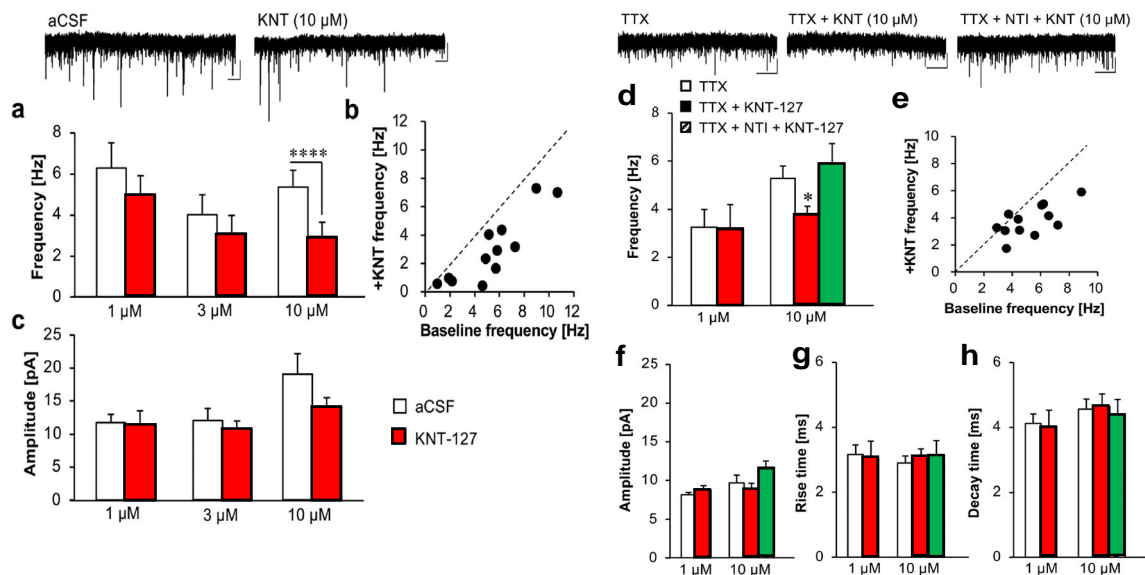


図2 : PL第2/3層のsEPSCおよびmEPSCに対するKNT-127灌流の作用

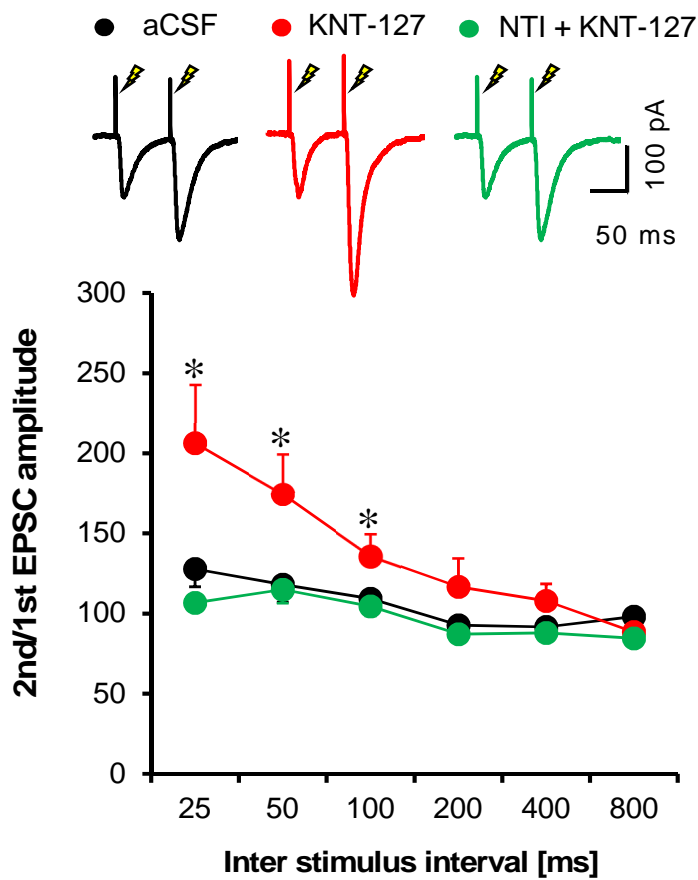


図3 : PL第2/3層のeEPSCのペアパルス比に対するKNT-127灌流の作用

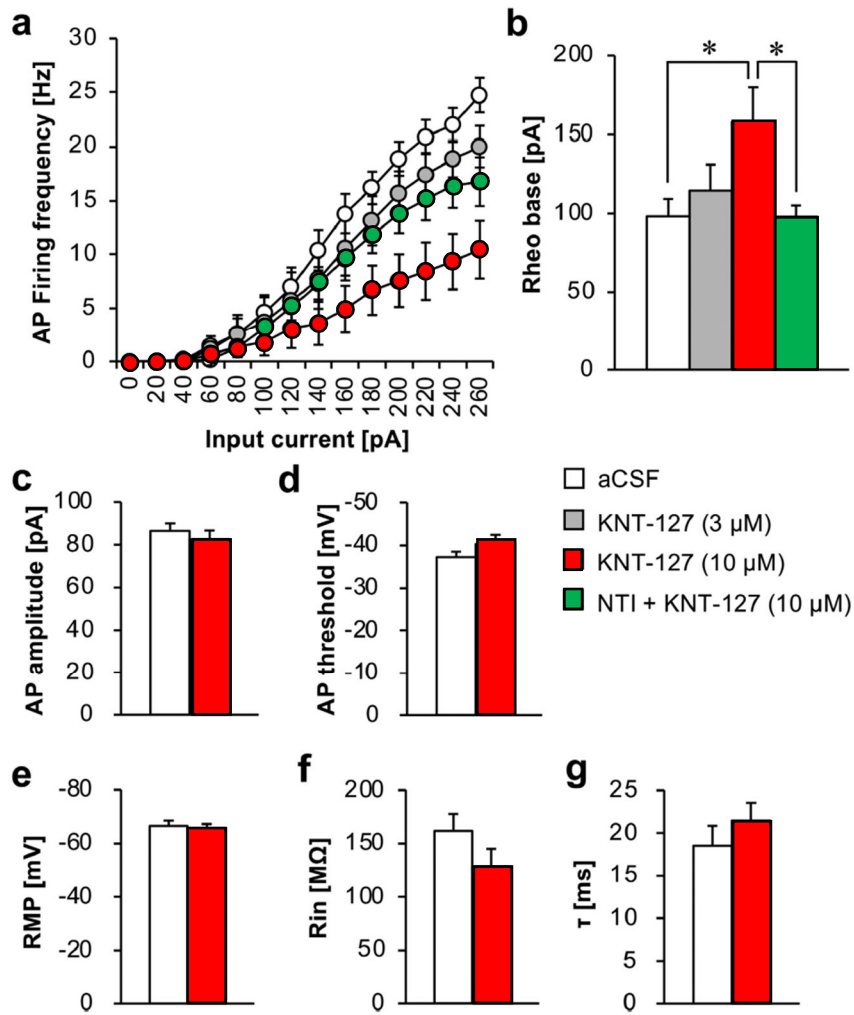


図4：PL第2/3層の興奮性神経細胞の受動的膜特性に対するKNT-127灌流の作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada D, Takahashi J, Iio K, Nagase H, Saitoh A.	4. 巻 560
2. 論文標題 Modulation of glutamatergic synaptic transmission and neuronal excitability in the prelimbic medial prefrontal cortex via delta-opioid receptors in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical & Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 192-198
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 Kawaminami A, Yamada D, Yanagisawa S, Shirakata M, Iio K, Nagase H, Saitoh A	4. 巻 16
2. 論文標題 Selective μ -opioid receptor agonist, KNT-127, facilitates contextual fear extinction via infralimbic cortex and amygdala in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 808232
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 Saitoh A, Kawaminami A, Yamada D	4. 巻 12
2. 論文標題 Are μ -Opioid Receptor Agonists with Facilitating Effects on Fear Extinction Learning Candidates for the Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Basic and Clinical Pharmacy	6. 最初と最後の頁 92-94
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 山田大輔, 齋藤顕宜	4. 巻 5
2. 論文標題 情動調節における μ オピオイド受容体の役割とそのメカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 84-89
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山田大輔、斎藤顕宜
2. 発表標題 オピオイド 受容体を介した情動制御メカニズム
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田大輔、河南絢子、白方基揮、飯尾啓太、長瀬博、斎藤顕宜
2. 発表標題 オピオイド 受容体を介した恐怖記憶制御とその脳内メカニズムの検討
3. 学会等名 第40回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤顕宜、山田大輔、長瀬博
2. 発表標題 オピオイド 受容体をターゲットとした向精神薬開発
3. 学会等名 第40回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Yamada, Misaki Ohashi, Toshinori Yoshioka, Tomoki Omata, Kenjiro Matsumoto, Riho Kobayashi, Kotaro Okano, Momoka Nakatani, Keita Iio, Hiroshi Nagase, Shinichi Kato, Akiyoshi Saitoh.
2. 発表標題 Delta-opioid receptors in the insular cortex participate in the regulation of intestinal motility change induced by emotional chronic social defeat stress in mice
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 第1回CJK国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田大輔、齋藤顕宜
2. 発表標題 恐怖記憶の消長における オピオイド神経系の役割
3. 学会等名 第30回神経行動薬理若手研究者の集い（第94回日本薬理学会年会サテライトシンポジウム）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田大輔、飯尾啓太、長瀬博、齋藤顕宜
2. 発表標題 内側前頭前野におけるデルタオピオイド受容体を介したグルタミン酸作動性シナプス伝達の修飾
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田大輔、飯尾啓太、長瀬博、齋藤顕宜
2. 発表標題 オピオイド 受容体を介した内側前頭前野グルタミン酸神経伝達と神経細胞膜興奮性の修飾
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田大輔、齋藤顕宜
2. 発表標題 情動行動制御における オピオイド受容体の役割
3. 学会等名 BPCNP/PPPP 4学会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2022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	斎藤 顕宜 (Saitoh Akiyoshi) (00366832)	東京理科大学・薬学部薬学科・教授 (32660)	

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