

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660258

研究課題名(和文) ミュータジェネシス受容体システムDREADDsを用いた精神障害の遺伝子療法の確立

研究課題名(英文) Development of gene-therapy system for psychiatric disorders by mutagenesis DREADDs

研究代表者

菊水 健史(Kikusui, Takefumi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90302596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DREADDsシステムを用い、神経回路特異的に申請者らの確立したうつ病モデルにおける、改善効果を行動レベルと分子レベルで調べた。まず逆行性ウイルスベクターを作成し、このウイルスの逆行性を確認して起始核での2重感染に成功した。前頭葉-扁桃体回路の2重感染マウスを作成し、不安行動を評価した。マウスに外因性のCNOを投与したところ、25例中15例で不安行動の改善を見出した。またグルココルチコイド受容体の細胞内シャペロンタンパク質であるFKBP5遺伝子発現が上昇することを見出した。また高架式十字迷路を用いた不安行動の評価と有意な相関を示し、発現の高い個体では不安が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：DREADDs is artificially expressed receptor system activated by CNO, but not endogenous ligands, and this new technology that enables to control circuit specific or molecular specific modification of neural activity. Using this technic, we challenged to ameliorate depressive/anxiety symptoms in our mouse model by assessing behavior and molecular changes. First, we developed a new AAV retro-transport vector which express CRE, and we used double infections of AAV and successfully introduced DREADDs in the PFC-amygdala circuit. When these mouse were injected with CNO, their anxiety behavior decreased (15 out of 25). In addition, FKBP5, a chaperone protein for glucocorticoid receptor, were increased in the PFC of the early-weaned mice. In addition, the expression level of FKBP5 was negatively correlated with the anxiety level, suggesting that this molecular is responsible for the higher anxiety in the early weaned mice.

研究分野：動物行動学

キーワード：前頭葉 扁桃体 不安 DREADDs

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病は成人の15名に1人が罹患している現代社会の抱える重大な問題である。これまで多くの抗うつ薬が開発されてきたが、その薬効は不十分であり副作用を併せ持つものがほとんどである。その障壁は、「病態神経細胞に特異的に作用する薬物の開発」が困難であったことに尽きる。申請者はこれまでマウスの情動行動や不安行動に関わる神経細胞を同定してきた。さらに早期離乳されたマウスにおける不安亢進とうつ症状が生涯にわたり呈することを見出し、母性環境によるうつ病のモデル作出に成功した。さらにその病態の責任細胞を前頭葉から扁桃体に至る神経回路に同定した。また申請者は Roth らが開発した DREADDs システムを日本でいち早く導入した。DREADDs とはランダムミュータジェネシスで改変された受容体で、内在性のリガンドには反応せず、人工的リガンドの clozapine-N-oxide (CNO)のみで活性化する。DREADDs はその構造特異性、in vivo 神経系における機能、さらには DREADDs を介した刺激が、記憶の想起を強化させることが明らかとなり、行動上の有用性が実証された。申請者のこれまでの研究成果に本システムを導入することで、病態神経細胞の機能を特異的に回復させる基盤が整ったといえる。

### 2. 研究の目的

本研究ではランダムミュータジェネシスによって開発された Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs)を用い、DREADDsGq の遺伝子をコードするアデノ随伴ウイルスを前頭葉のうつ病態神経細胞特異的に導入し、その細胞活性を自由に制御することで、非常に安易かつ安全、副作用のないうつ病の遺伝子治療法のマウスモデル系確立を目指す。本手法は、これまでの薬効で最大の障壁とされてきた、病態神経細胞に特異的に作用する薬物の開発を可能とするだけでなく、遺伝子療法では不可能と言われた症状に応じた効能対処法までも可能にする革新的な動物モデル評価系である。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下2つの課題を行い、「ランダムミュータジェネシス受容体システム

DREADDs を用いた精神障害の遺伝子療法の確立」を目指す。

1) 申請者が同定した前頭葉から扁桃体へ投射する前頭葉の病態神経細胞特異的に DREADDsGq を導入し、不安行動とうつ様行動が改善するかを調べる。

2) 申請者は病態神経細胞が示す神経栄養因子である BDNF のプロモータ3領域における発現抑制、さらにはその部位のヒストン修飾 (H3K9 のジメチル化) を見出しつつある。そこで DREADDsGq を介した神経細胞の活性化により、病態神経細胞の示すこれらエピジェネティクス変化が改善されるか、すなわち根治療法が可能か否かを調べる、

### 4. 研究成果

1) 逆行性ウイルスベクターとして新たにアデノ随伴ウイルス DJ 型、mCherry-2A-Cre-TTC, FLEX-hrGFP、プロモーターは CMV を名古屋大学山中章弘研に依頼し、作成してもらった。このウイルスの逆行性を確認し、起始核での2重感染に成功した。起始核でのウイルスベクターには平成25年度同様にアデノ随伴ウイルス9型を用いた。前頭葉-扁桃体回路の2重感染マウスを作出し、不安行動を評価した。ベクターによって DREADDs - Gq を発現したマウスに外因性の CNO を投与したところ、25例中15例で不安行動の改善を見出した。2重感染の確認を行ったところ、改善の見られた15例中9例で片側の2重感染が確認された。また残りの6例においても発現神経細胞数はすくないものの、僅かな感染細胞が見つかった。また2重感染の認められなかった15例において、CNO投与で不安行動が低下したものが5例認められた。

2)平成25年度はグルココルチコイド受容体の細胞内シャペロンタンパク質である FKBP5 遺伝子発現が上昇することを見出した。平成26年度には、この遺伝子の転写産物であるタンパク質としても変化するかをウエスタンブロッティングで調べた。FKBP5 蛋白は成長後の早期離乳マウスにおいて、明瞭な発現の上昇は認められなかったものの、高架式十字迷路を用いた不安行動の評価と有意な相関を示し、発現の高い個体では不安が高いことが明らかとなっ

た。またグルココルチコイド受容体の下流カスケードとしてBDNFに着目し、プロモータ特異的 mRNA 発現量を調べた。その結果、BDNF3 のプロモータ特異的な低下を見出した。この低下は早期離乳による恐怖関連記憶の強度と逆相関した。またBDNFのタンパク質量をELISA法で測定したところ、同じく恐怖関連記憶の強度と逆相関した。このことから、BDNFのエピジェネティクス修飾が行動を修飾することが明らかとなった。BDNFの発現制御機構としてクロマチン修飾の中でH3K9me2をターゲットとして測定したが、その発現量には差がなく、他のクロマチン修飾、あるいはDNAメチル化修飾が鍵をにぎることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)すべて査読有り

1: Matsuo T, Hattori T, Asaba A, Inoue N, Kanomata N, Kikusui T, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Genetic dissection of pheromone processing reveals main olfactory system-mediated social behaviors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 20;112(3):E311-20.

2: Mogi K, Takanashi H, Mogi K, Kikusui T. Sex differences in spatiotemporal expression of AR, ER $\alpha$ , and ER $\beta$  mRNA in the perinatal mouse brain. *Neurosci Lett*. 2015 Jan 1;584:88-92.

3: Yasumura M, Yoshida T, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Kanno K, Uemura T, Takao K, Sakimura K, Kikusui T, Miyakawa T, Mishina M. IL1RAPL1 knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. *Sci Rep*. 2014 Oct 14;4:6613.

4: Asaba A, Hattori T, Mogi K, Kikusui T. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front Neurosci*. 2014 Aug 5;8:231.

5: Hattori T, Kanno K, Mogi K, Nishimori K, Mogi K, Kikusui T. Impairment of interstrain social recognition during territorial aggressive behavior in oxytocin receptor-null mice. *Neurosci Res*. 2015 Jan;90:90-4.

6: Mogi K, Ooyama R, Mogi K, Kikusui T. Effects of neonatal oxytocin manipulation on development of social behaviors in mice. *Physiol Behav*. 2014 Jun 22;133:68-75.

7: Asaba A, Okabe S, Mogi K, Kato M, Koshida N, Osakada T, Mogi K, Kikusui T. Developmental social environment imprints female preference for male song in mice. *PLoS One*. 2014 Feb 5;9(2):e87186.

8: Kato T, Miyata K, Sonobe M, Yamashita S, Tamano M, Miura K, Kanai Y, Miyamoto S, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, Kikusui T, Asahara H, Takada S. Production of Sry knockout mouse using TALEN via oocyte injection. *Sci Rep*. 2013 Nov 5;3:3136.

9: Kikusui T. Analysis of male aggressive and sexual behavior in mice. *Methods Mol Biol*. 2013;1068:307-18.

10: Yoshida S, Esposito G, Ohnishi R, Tsuneoka Y, Okabe S, Kikusui T, Kato T, Kuroda KO. Transport Response is a filial-specific behavioral response to maternal carrying in C57BL/6 mice. *Front Zool*. 2013 Aug 14;10(1):50.

11: Okabe S, Kitano K, Mogi K, Mogi K, Kikusui T. Testosterone inhibits facilitating effects of parenting experience on parental behavior and the oxytocin neural system in mice. *Physiol Behav*. 2013 Jun 13;118:159-64.

12: Kikusui T, Shimokawa Y, Kanbara N, Mogi K, Mogi K. Organizational effects of estrogen on male-type vulnerability to early weaning. *Horm Behav*. 2013 Jun;64(1):37-43.

[学会発表](計24件)

1. 菊水健史: シンポジウム「感覚情報の統合と情動行動表出の脳神経基盤」日本神経科学学会(Neuro2013) 京都国際会議場 2013年6月20-23日.

2. 菅野康太, 菊水健史: 強制音声曝露による雄マウス超音波発生の変化. 日本神経科学学会(Neuro2013) 京都国際会議場 2013年6月20-23日.

3. 岡部祥太, 菊水健史: マウスにおけるアロ養育行動とオキシトシン神経系のテストステロンによる抑制. 日本神経科学学会(Neuro2013) 京都国際会議場 2013年6月20-23日.

4. 浅場明莉, 菊水健史: 雄マウス求愛歌が雌マウスの雄嗜好性と繁殖能力に与える影響. 日本神経科学学会(Neuro2013) 京都国際会議

場 2013年6月20-23日.

5. 菅野康太, 菊水健史: 強制音声曝露による雄マウス超音波発生の变化強制音声曝露による雄マウス courtship vocalization の構造変化. 日本行動神経内分泌研究会(JSBN) 鹿児島市レインボー桜島 2013年7月5-7日
6. 石田結子, 菊水健史: 早期離乳が C57BL/6系マウスの恐怖記憶制御と母性行動に与える影響. 日本行動神経内分泌研究会(JSBN) 鹿児島市レインボー桜島 2013年7月5-7日
7. 柴田曜, 菊水健史: イヌにおけるストレス内分泌の発達特性と行動の関連. 日本行動神経内分泌研究会(JSBN) 鹿児島市レインボー桜島 2013年7月5-7日
8. 菊水健史: 特別講演「早期離乳と児への影響」. 日本周産期・新生児医学会学術集会 パシフィコ横浜 2013年7月14日
9. 菊水健史: 基調講演「オキシトシンの社会機能: 個体認知から絆形成、そしてストレス緩衝作用」. プライマルヘルスケア学会 神奈川県鎌倉市鎌倉芸術館 2013年8月29日
10. 菊水健史: 性シグナル伝達神経回路の機能的性差とその構築機構の解明. 新学術領域研究「性差の分子基盤解明」第5回領域会議 佐賀県唐津市 2013年9月5日-8日
11. 園部未来・梶田麻友・永澤美保・嶋雄一・諸橋憲一郎・茂木一孝・菊水健史: 「ステロイドホルモンによるマウス性行動と脳の性差構築過程の解析」. 新学術領域研究「性差の分子基盤解明」第5回領域会議 佐賀県唐津市 2013年9月5日-8日
12. 服部達哉, 茂木一孝・菊水健史: 「性特異的行動発現に関わる神経回路の性差の解明」. 新学術領域研究「性差の分子基盤解明」第5回領域会議 佐賀県唐津市 2013年9月5日-8日
- 外池亜紀子, 寺内豪, 永澤美保, 茂木一孝, 菊水健史
13. イヌのヒトとのコミュニケーション能力の品種差, 関連遺伝子の探索. 日本動物心理学会第73回大会 筑波大学 2013年9月14-15日
14. 片山真希, 永澤美保, 茂木一孝, 菊水健史: 体位や情動の変化がイヌの心拍変動に及ぼす影響. 日本動物心理学会第73回大会 筑波大学 2013年9月14-15日
15. 寺内豪, 永澤美保, 外池亜紀子, 坂田日香理, 茂木一孝, 菊水健史: イヌのヒトとの視線コミュニケーションの犬種差. 日本動物心理学会第73回大会 筑波大学 2013年9月14-15日
16. 小川美里, 菊水健史, 茂木一孝, 永澤美保, 圓史緒理: オキシトシン投与によるヒトへの視線増強の日本犬種と洋犬種の比較. 日本動物心理学会第73回大会 筑波大学 2013年9月14-15日
17. 石尾雪乃, 永澤美保, 茂木一孝, 菊水健史: マウスにおける情動伝染と早期離乳の影響. 日本動物心理学会第73回大会 筑波大学 2013年9月14-15日
18. 下沢 明希, 北川 彩, 永澤 美保, 茂木 一孝, 菊水 健: N-アセチル-D-マンノサミンによる老齡マウスとイヌの認知機能改善. 第156回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 2013年9月20-22日
19. 大山 瑠泉, 永澤 美保, 西森 克彦, 茂木 一孝, 菊水 健史: 新生仔期オキシトシン投与によるオキシトシン欠損マウスの社会行動異常の回復. 第156回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 2013年9月20-22日
20. 蒲原 菜津実, 飯島 希, 井田 久美子, 永澤美保, 茂木 一孝, 菊水 健史: 早期離乳によるグルココルチコイド上昇の中樞作用点解明. 第156回日本獣医学会学術集会 岐阜大学 2013年9月20-22日
21. K. Mogi, S. Tsuchiya, K. Murata, M. Nagasawa, N. Matsuo, T. Kikusui: Cellular localization concerned with pheromonal memory in the accessory olfactory bulb in mice. Neuroscience 2013, San Diego, CA, USA, 9-13 November 2013
22. T. Kikusui, M. Takaki, H. Takanashi, Y. Shimokawa, N. Kanbara, M. Nagasawa, K. Mogi: Neuromolecular mechanisms for sex differences in response to maternal deprivation by early weaning. Neuroscience 2013, San Diego, CA, USA, 9-13 November 2013
23. S. Okabe, C. Tsukamoto, M. Mogi, K. Kato, N. Koshida, K. Mogi, T. Kikusui: Pup ultrasonic vocalizations (USVs) has a individual signature and can trigger retrieving behavior dependently on social experience and gonadal hormones. Neuroscience 2013, San Diego, CA, USA, 9-13 November 2013
- A. Asaba, S. Okabe, M. Mogi, K. Kato, N. Koshida, T. Osakada, T. Matsuo, K. Kobayakawa, R. Kobayakawa, K. Mogi, T. Kikusui: Developmental imprinting of female preference for male song and its multimodal information processing in mice. Neuroscience 2013, San Diego, CA, USA, 9-13 November 2013

24. 菊水健史: 「社会的ストレスと脳機能の変化: 社会経験や発達期環境がどのように脳内で社会認知機構を変容させるか」第32回心身統合BAMIS セミナー筑波大学 2013年12月19日

〔図書〕(計3件)

1. 上田 恵介, 菊水 健史, 坂上 貴之, 岡ノ谷 一夫, 辻 和希 「行動生物学辞典」東京化学同人 2013/11/22
2. 浅場 明莉, 菊水 健史 「観察する目が変わる動物学入門」BERET SCIENCE 2014/7/23
3. 開一夫, 菊水健史, 明和政子, ガーガリ・チブラ, ジョージ・ガーガリ, 友永雅己, 石黒浩, 「母性と社会性の起源」岩波講座 コミュニケーションの認知科学 岩波 2014/8/29

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/a/carazabu.com/car/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

菊水 健史 (KIKUSUI, Takefumi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号: 90302596

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし