

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34428

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893274

研究課題名(和文) 大脳皮質前頭前野 - 背側縫線核の神経活性制御に基づく新たな精神疾患治療戦略の探索

研究課題名(英文) Regulation of activity in dorsal raphe nucleus-prefrontal cortex serotonin system

研究代表者

荒木 良太 (ARAKI, RYOTA)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：90710682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：環境要因はエピジェネティクス制御機構を介して、脳機能に影響を与えられられる。本研究では、離乳期から隔離飼育したマウスが示す異常行動のエピジェネティクス制御機構を解析した。隔離飼育マウスでは背側縫線核において、GABAB1a(GABAB受容体サブユニットの1つ)の発現が増加していた。GABAB1aのプロモーター領域では、DNAメチル化の減少とヒストンH3アセチル化の増加が見られた。行動薬理的検討から、背側縫線核のGABA B受容体が異常行動に関与することが示された。以上より、隔離飼育による異常行動に、背側縫線核GABAB1aのエピジェネティクス制御変動が関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Adverse environments are likely to induce abnormalities in brain function via epigenetic modifications. In this study, we examined epigenetic mechanisms underlying abnormal behaviors of isolation-reared mice. Both mRNA and protein levels of GABAB1a, a GABAB receptor subunit, were increased in the dorsal raphe nucleus (DRN) of isolation-reared mice. Total DNA methylation level at the CpG island of GABAB1a was decreased, and histone H3 was hyperacetylated at a GABAB1a promoter in the DRN of isolation-reared mice. Intra-DRN microinjection of 0.06 nmol baclofen (a GABAB receptor agonist) exacerbated encounter-induced hyperactivity, while microinjection of 0.3 nmol phaclofen (a GABAB receptor antagonist) attenuated encounter-induced hyperactivity and aggressive behavior in isolation-reared mice. These findings suggest that an increase in dorsal raphe GABAB1a expression via DNA hypomethylation and histone H3 hyperacetylation underlies abnormal behaviors in isolation-reared mice.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：背側縫線核 GABAB受容体 エピジェネティクス 環境要因 精神疾患 DNAメチル化 ヒストンアセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症、うつ病、不安障害といった精神疾患の患者数は近年増加の一途を辿っているが、今なお、発症の分子基盤は不明である。また、現在行われている既存薬による治療も表面上の症状を抑える対症療法にすぎず、満足な治療とは言い難い。そこで、病態発症の分子基盤を解明し、その分子基盤に基づく、発症を根本から抑えるような新たな治療戦略の開発が望まれる。

精神疾患の発症には遺伝要因の関与が報告されているが、加えて環境要因の関与、特に発育期の環境の重要性が示唆されている。すなわち、精神疾患の発症における分子基盤を追究するにあたり、発育期の環境要因を考慮した動物モデルでの検討が必要である。離乳期より長期間、社会的に隔離して飼育した長期隔離飼育マウスは、過剰な攻撃行動、社会性行動障害、うつ様行動、不安様行動といった異常行動を示すこと、これら異常行動に対して、種々の抗精神病薬、抗うつ薬、抗不安薬が改善作用を示す。すなわち、本マウスは発育期の環境要因により精神疾患が発症する分子基盤を追究する上で有用なモデルと考えられる。

研究代表者はこれまでに長期隔離飼育マウスに関する行動薬理的解析や神経化学的解析を行い、異常行動改善におけるモノアミン、グルタミン酸神経系の役割について報告してきた (*J. Pharmacol. Sci.*, **118**, 295-298, 2012; *Neuropharmacology*, **60**, 397-404, 2011)。しかし、異常行動発現の分子基盤は依然不明である。これは、従来の分子基盤解析が異常行動発現後に行われており、解析結果に異常行動発現と直接関係のない要因が多く含まれているためと考えられる。

そこで研究代表者は、長期隔離飼育マウスが示す異常行動のうち、攻撃行動や社会性行動障害など新奇マウスと遭遇した際に引き起こされるような異常行動に注目し、異常行動発現時において、リアルタイムに脳内神経活動を解析できる全く新しい実験系を確立した。本実験系を用いて長期隔離飼育マウスの異常行動発現前、発現時、ならびに発現後における脳内の神経活動を解析した結果、異常行動発現時特異的に大脳皮質前頭前野の5-HT神経が過剰に活性化すること、ならびにこの活性化が抗不安薬により抑制されることを見出した (*Neuropsychopharmacology*, **38**, 1535-1547, 2013)。本結果は、異常行動発現時の脳内神経活動変化を捉えた他に類を見ないものであり、長期隔離飼育マウスの異常行動発現、ならびにヒトの精神疾患発症の分子基盤を明らかにする上で重要な発見であると考えられる。

## 2. 研究の目的

このような背景において、本研究では発育

期の環境要因による異常行動発現の分子基盤を明らかにするために、長期隔離飼育マウスを用い、大脳皮質前頭前野の5-HT神経の過剰な活性化のメカニズムを追究する。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

長期隔離飼育マウスは、3週齢の ddY 系雄性マウスを、6週間以上周囲の見えない灰色のケージ (24×17×12 cm) において1匹で飼育することにより作成した。対象群には、同じ大きさの透明なケージにおいて5~6匹で群飼育したものをを用いた。

### (2) 遺伝子発現解析

マウスの背側縫線核または大脳皮質前頭前野を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、抽出した total RNA 1 µg から cDNA を合成した。合成した cDNA に含まれる標的遺伝子量は real-time PCR 法により測定した。データは β-actin を内部標準遺伝子として補正した相対値で表した。

### (3) 蛋白質発現解析

マウスの背側縫線核を採取し、ウェスタンブロット法により GABA<sub>B1a</sub> タンパク質の発現量を解析した。

### (4) DNA メチル化解析

マウスの背側縫線核または大脳皮質前頭前野からゲノム DNA を抽出し、パイサルファイト処理を行った。パイサルファイト処理を施した DNA を鋳型とし、PCR 法により CpG アイランドを増幅しクローニングした。各サンプルにつき8~10クローンの塩基配列を解析した。

### (5) ヒストンアセチル化解析

マウスの背側縫線核を採取し、ホルムアルデヒドを用いて DNA とタンパク質を架橋した後に DNA を断片化した。免疫沈降は抗アセチル化ヒストン H3 抗体と、抗アセチル化ヒストン H4 抗体を用いて行った。real-time PCR により、免疫沈降 DNA とインプット DNA 中の GABA<sub>B1</sub> 遺伝子プロモーター領域の定量を行った。

### (6) 背側縫線核への薬物投与

ガイドカニューレを背側縫線核 (ブレグマから後方 4.4mm、右側 1.5mm、26度の角度で深さ 3.8mm) に設置し、1週間の回復期間の後に行動実験を行った。マウス1匹あたり 0.2 µl の薬液を5分間かけて投与し、10分後に行動実験を行った。薬物はリンゲル液 (147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 6.0) に溶解した。

#### (7)エンカウンター刺激負荷と行動解析

透明なアクリルケージ (30×30×35cm)に網目状の仕切りを設置し、residentとして群飼育または隔離飼育マウスを大きい区画に入れ、3時間の馴化の後、intruderとして同週齢の新奇マウスを小さい区画に入れた。その後20分間のresidentの行動をANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL)を用いて解析した。

#### (8)攻撃行動の解析

隔離飼育マウスと9週齢のddY系雄性マウスを測定用ケージ(24×17×12cm)に入れ、20分間行動をビデオ撮影した。隔離飼育マウスが示した噛み付き行動を攻撃行動と定義し、攻撃行動の時間を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) GABA 神経関連遺伝子の mRNA 発現量の解析

大脳皮質前頭前野の5-HT神経は背側縫線核から投射しており、その活性はグルタミン酸神経系やGABA神経系により制御されていることから、まず、隔離飼育マウスの背側縫線核と大脳皮質前頭前野において、グルタミン酸/GABA神経関連遺伝子のmRNA発現量を解析した。その結果、隔離飼育マウスでは背側縫線核において、GABA<sub>B</sub>受容体サブユニットの1つであるGABA<sub>B1a</sub>のmRNA発現量が有意に増加していた。一方で、他のグルタミン酸/GABA神経関連遺伝子のmRNA発現量に変化は見られなかった。また、大脳皮質前頭前野ではいずれの遺伝子のmRNA発現量にも変化は見られなかった。

#### (2) GABA<sub>B1a</sub> タンパク質の発現量の解析

隔離飼育マウスの背側縫線核においてGABA<sub>B1a</sub>のmRNA発現量が増加していたことから、次にGABA<sub>B1a</sub>のタンパク質発現量を解析した。その結果、隔離飼育マウスの背側縫線核ではmRNA発現量の増加と同様に、GABA<sub>B1a</sub>のタンパク質発現量の有意な増加が確認された。

#### (3) GABA<sub>B1</sub> 遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化の解析

これまでの検討から、隔離飼育といった環境要因により背側縫線核のGABA<sub>B1a</sub>の発現量が増加することを見出してきた。そこで、こうした環境要因による遺伝子発現の変動にエピジェネティクス制御の変化が関与していると推測した。DNAのメチル化は、CpGサイトと呼ばれるシトシンとグアニンが並んだジヌクレオチドのシトシンにおいて生じることが知られている。多くの遺伝子のプロモーター領域にはCpGサイトが集中しているCpGアイランドが存在しており、このCpGアイランドにおけるDNAのメチル化が遺伝子の転写を調節していると考えられている。GABA<sub>B1</sub>遺伝子にはGABA<sub>B1a</sub>と

GABA<sub>B1b</sub>といった2つの主要なスプライシングバリエーションが存在するが、これらのスプライシングバリエーションの転写は異なるプロモーター領域を介して調節されていることが知られている。GABA<sub>B1a</sub>とGABA<sub>B1b</sub>の転写開始点周辺にはそれぞれCpGアイランドが存在しており(以下、GABA<sub>B1a</sub>転写開始点周辺に存在するCpGアイランドをCpGアイランド1、GABA<sub>B1b</sub>転写開始点周辺に存在するCpGアイランドをCpGアイランド2とする)、CpGアイランド1におけるDNAのメチル化がGABA<sub>B1a</sub>の転写を、CpGアイランド2におけるDNAのメチル化がGABA<sub>B1b</sub>の転写を調節していると考えられる。そこで我々は、隔離飼育マウスの背側縫線核においてCpGアイランド1とCpGアイランド2におけるDNAのメチル化を解析した。その結果、隔離飼育マウスではCpGアイランド1のDNAのメチル化が有意に減少していた。一方で、CpGアイランド2のDNAのメチル化は集団飼育マウスと隔離飼育マウスとで違いは見られなかった。また、隔離飼育マウスの背側縫線核で見られたようなCpGアイランド1におけるDNAのメチル化の減少は、大脳皮質前頭前野においては見られなかった。

#### (4) GABA<sub>B1</sub> 遺伝子プロモーター領域におけるヒストンのアセチル化の解析

メチル化したDNAにはメチル化DNA結合タンパクを介してヒストン脱アセチル化酵素が結合し、近傍のヒストンを脱アセチル化して転写を抑制することが知られている。そこで我々は、隔離飼育マウスの背側縫線核において、GABA<sub>B1</sub>遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンH3サブユニットとヒストンH4サブユニットのアセチル化の割合を解析した。その結果、隔離飼育マウスではGABA<sub>B1a</sub>の転写開始点周辺においてヒストンH3のアセチル化が有意に増加していた。一方でGABA<sub>B1b</sub>の転写開始点周辺においては、ヒストンH3のアセチル化に変化は見られなかった。ヒストンH4のアセチル化は、GABA<sub>B1a</sub>、GABA<sub>B1b</sub>の両方の転写開始点周辺において変化は見られなかった。こうした結果から、GABA<sub>B1a</sub>の転写開始点周辺において、DNAメチル化が減少することによりヒストンH3のアセチル化が増加し、GABA<sub>B1a</sub>の転写が亢進する可能性が考えられた。

#### (5) 異常行動発現における背側縫線核の GABA<sub>B</sub> 受容体機能の関与の解析

隔離飼育マウスでは環境要因によるエピジェネティクス制御の変化を介して、背側縫線核のGABA<sub>B1a</sub>の発現量が増加すると考えられる。このGABA<sub>B1a</sub>の増加により背側縫線核におけるGABA<sub>B</sub>受容体の機能に変化が生じること、異常行動が発現すると推測される。そこで我々は、背側縫線核のGABA<sub>B</sub>受容体機能と異常行動との関連性を明らかにするために、GABA<sub>B</sub>受容体リガンドの背側縫

線核内投与が隔離飼育マウスの異常行動に与える影響について解析した。GABA<sub>B</sub> 受容体アゴニスト baclofen(0.06 nmol)の背側縫線核内投与は、隔離飼育マウスが示すエンカウンター刺激による多動反応を増悪させた。一方で、GABA<sub>B</sub> 受容体アンタゴニスト phaclofen(0.3 nmol)の背側縫線核内投与は、多動反応を抑制した。また、phaclofen(0.3 nmol)の背側縫線核内投与は隔離飼育マウスの攻撃行動も有意に抑制した。これらの結果は、背側縫線核の GABA<sub>B</sub> 受容体の機能が、エンカウンター刺激による多動反応や攻撃行動といった隔離飼育マウスの異常行動に関与していることを示している。

#### 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2件)

1. Araki R, Hiraki Y, Yabe T. Genipin attenuates lipopolysaccharide-induced persistent changes of emotional behaviors and neural activation in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central amygdala nucleus. *Eur. J. Pharmacol.*, 741, 1-7, 2014. 査読有.

2. Araki R, Ago Y, Hasebe S, Nishiyama S, Tanaka T, Oka S, Takuma K, Matsuda T. Involvement of prefrontal AMPA receptors in encounter stimulation-induced hyperactivity in isolation-reared mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 17, 883-893, 2014. 査読有.

[学会発表](計11件)

1. 酒井樹生、平城陽介、西田将治、太田圭祐、細木美沙、倉本展行、松本欣三、荒木良太、矢部武士「隔離飼育による異常行動と背側縫線核 GABA<sub>B1a</sub> のエピジェネティックな発現制御の関連性」日本薬学会第135年会、デザインクリエイティブセンター神戸(兵庫、神戸)、2015年3月25-28日

2. 西田将治、平城陽介、松本欣三、荒木良太、矢部武士「隔離飼育による5 $\alpha$ -reductase type Iの減少におけるDNAメチル化の関与」日本薬学会第135年会、デザインクリエイティブセンター神戸(兵庫、神戸)、2015年3月25-28日

3. 荒木良太、矢部武士「幼弱期隔離飼育による異常行動と背側縫線核 GABA<sub>B</sub> 受容体のエピジェネティクス制御」第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知、名古屋)、2015年3月18-20日

4. 平城陽介、西田将治、酒井樹生、太田圭

祐、細木美沙、倉本展行、松本欣三、荒木良太、矢部武士「長期隔離飼育マウスの異常行動発現における背側縫線核 GABA<sub>B1a</sub> のエピジェネティックな発現制御の関与」第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知、名古屋)、2015年3月18-20日

5. 岡田亮、韓ヨウ羽、藤原博典、津島遼平、趙キ、荒木良太、矢部武士、松本欣三「隔離飼育マウス行動障害に対する甘麦大棗湯の改善効果の検討」第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知、名古屋)、2015年3月18-20日

6. 岡田亮、津島遼平、韓ヨウ羽、藤原博典、荒木良太、矢部武士、松本欣三「隔離飼育マウス行動障害に対する酸棗仁湯の改善効果の検討」第65回日本薬理学会北部会、コラッセふくしま(福島、福島)、2014年9月26-27日

7. 荒木良太、吾郷由希夫、田熊一敬、矢部武士、松田敏夫「長期隔離飼育マウスのエンカウンター刺激による多動発現におけるAMPA受容体の関与」次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2014、近畿大学東大阪キャンパス(大阪、東大阪)、2014年8月30日

8. 平城陽介、白井顕子、新井雄太、伊藤真理子、日向克高、荒木良太、矢部武士「Sickness behaviorを改善する植物由来化合物の探索」日本薬学会第134年会、熊本市総合体育館(熊本、熊本)、2014年3月27-30日

9. Kazuhiro Takuma, Shigeru Hasebe, Tatsunori Tanaka, Saki Nishiyama, Yuko Maeda, Ryota Araki, Yukio Ago, Toshio Matsuda. 「Neurochemical and behavioral responses of psychiatric disorder model mice to social encounter.」The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2013), San Diego, USA, 9-13 November, 2013.

10. 西山早紀、荒木良太、吾郷由希夫、田中辰典、長谷部茂、田熊一敬、松田敏夫「精神疾患モデルへのエンカウンター刺激による行動異常発現におけるAMPA受容体の役割」第124回日本薬理学会近畿部会、京都薬科大学(京都、京都)、2013年11月1日

11. 田中辰典、長谷部茂、吾郷由希夫、荒木良太、西山早紀、井本絵実奈、田熊一敬、松田敏夫「精神障害モデルマウスにおける個体間相互作用応答性の異常」第23回日本臨床精神神経薬理学会、第43回日本神経精神薬理学会、沖縄コンベンションセンター(沖縄、宜野湾)、2013年10月24-26日

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-shoyak/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒木 良太 ( ARAKI RYOTA )

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：90710682