

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461730

研究課題名(和文) 新規抗不安薬開発に向けた オピオイド受容体を介する情動制御の機序解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms on the emotional behaviors in mice via delta opioid receptors in prelimbic prefrontal cortex

研究代表者

齋藤 顕宜 (Akiyoshi, Saitoh)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長

研究者番号：00366832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：内側前頭前野前辺縁皮質領域(PL-PFC)において、オピオイド受容体(DOR)作動薬KNT-127は、Na<sup>+</sup>チャンネル活性化薬ベラトリンで誘発された細胞外グルタミン酸(Glu)濃度の増加を抑制させ、同時に不安様行動を回復させた。一方、KNT-127はGluトランスポーター阻害薬TFB-TBOAで誘発された細胞外Glu濃度の増加に影響を及ぼすことなく、不安様行動を回復させた。従って以上の検討から、KNT-127の抗不安様作用メカニズムには、PL-PFCにおけるグルタミン酸放出を抑制させる作用とポストシナプス側の神経細胞を直接抑制させる作用の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The local co-perfusion of a selective opioid receptor (DOR) agonist KNT-127 with a sodium channel activator veratrine in prelimbic medial prefrontal cortex (PL-PFC) diminished the veratrine-induced anxiety-like behaviors and extracellular glutamate levels. Interestingly, KNT-127 diminished a glutamate transporter inhibitor TFB-TBOA-induced anxiety-like behaviors without effect on TFB-TBOA-induced extracellular glutamate levels. These inhibitory effects of KNT-127 were antagonized by the co-perfusion of a DOR antagonist NTI. Based on these results, we suggested that KNT-127 in the PL-PFC reduced anxiety-like behaviors by suppressing the pre/post-synaptically glutamatergic transmission, bidirectionally. We proposed that a DOR agonist KNT-127 that inhibits glutamatergic transmission in the PL-PFC is a possible candidate for a novel anxiolytic.

研究分野：精神薬理学

キーワード：行動薬理 精神薬理

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者は、マウスの内側前頭前野前辺縁皮質領域 (PL-PFC) に電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル活性化薬である veratrine を灌流し神経終末を薬理的に興奮させることで、細胞外グルタミン酸濃度の増加とそれに伴う不安様行動が生じることを報告している (Saitoh et al., 2014)。一方、動物モデルを用いて、新規抗不安薬リード化合物であるオピオイド受容体 (DOR) 作動薬 KNT-127 が抗不安様作用を有することを明らかにしている (Saitoh et al., 2013)。興味深いことに DOR は、PL-PFC に高発現しているにも関わらず (Pradhan et al., 2011)、これまで、PL-PFC 情動調節における DOR の役割については十分明らかにされてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、DOR 作動薬の情動調節メカニズムを明らかとするため PL-PFC に veratrine またはグルタミン酸トランスポーター阻害薬である TFB-TBOA を灌流した薬理的な不安惹起モデルを用い、不安様行動の発現に対する KNT-127 の影響について検討した。

## 3. 研究の方法

実験には C57BL6/N 雄性マウス (7 週齢, 日本 SLC) を使用した。電気化学検出器付高速液体クロマトグラフを用いたマイクロダイアリシス法により、PL-PFC における細胞外グルタミン酸濃度を定量した。マウス PL-PFC に透析プローブを留置し、透析液を灌流させ 2 時間順化させた後、薬物 (veratrine / TFB-TBOA / KNT-127) を含んだ透析液を 30 分間灌流させた。薬物灌流開始 20 分後からの 10 分間にオープンフィールド (OF) 試験を同時に実施し、OF 中心部における滞在時間率及び移動距離率を測定した。情動評価終了後に灌流固定を行い、摘出した脳サンプルを用いて、扁桃体における c-Fos 陽性細胞数を免疫染色法により測定した。

## 4. 研究成果

先行研究と同様に、PL-PFC に veratrine (100  $\mu$ M) を灌流したマウスは、細胞外グルタミン酸濃度の有意な増加と、オープンフィールド (OF) 試験における中心部滞在時間率および移動距離率の有意な減少 (不安惹起) を示した。一方、KNT-127 (30  $\mu$ M) を併用すると、veratrine によって増加した細胞外グルタミン酸濃度は KNT-127 の用量依存的かつ有意に減少した (Fig.1)。

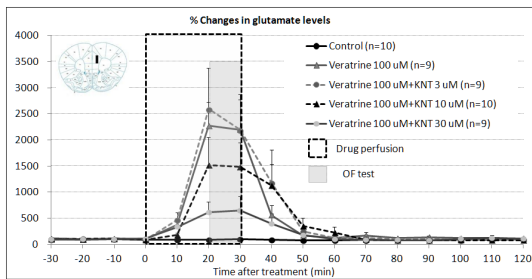


Fig. 1. Percentage change in extracellular glutamate levels in the PL-PFC after the local perfusion of the selective DOR agonist KNT-127 with the sodium channel activator veratrine. After the stabilization of the extracellular glutamate levels, the perfusion medium was switched to perfusion medium with veratrine (100  $\mu$ M) or veratrine (100  $\mu$ M)+KNT-127 (3–30  $\mu$ M) for 30 min (0–30 min, dotted line). The OF test was performed simultaneously with veratrine perfusion for 20–30 min (closed column). The glutamate levels are expressed as a percentage of the basal levels, calculated from 4 consecutive samples before the perfusion of veratrine was initiated. Each column represents the mean and SEM.

このとき、veratrine によって減少した OF 試験における中心部滞在時間率及び中心部移動距離率は KNT-127 の用量依存的かつ有意に増加した ( Fig. 2 )。

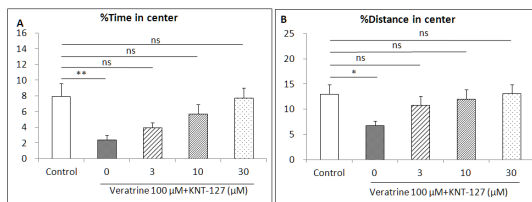


Fig.2. Behavior in the OF test after local perfusion in the PL-PFC of the selective DOR agonist KNT-127 with the sodium channel activator veratrine. Panel A shows the percentage of time spent in the center area after the local perfusion of veratrine or veratrine+KNT-127 in the PL-PFC. Panel B shows the percentage of the distance traveled in the center area after the local perfusion of veratrine or veratrine+KNT-127 in the PL-PFC. Each column represents the mean and SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, ns (no significant effect) vs. control groups.

このことから、KNT-127 が細胞外グルタミン酸を減少させることにより抗不安様作用を発現した可能性が考えられた。

興味深いことに、ベラトリン灌流で認められた扁桃体各亜核における c-Fos 陽性細胞数の有意な増加は、KNT-127 の併用により消失した。従って、KNT-127 は PL-PFC から扁桃体に投射している神経回路を制御し抗不安様作用を示すことが示唆された ( Fig.3 )。

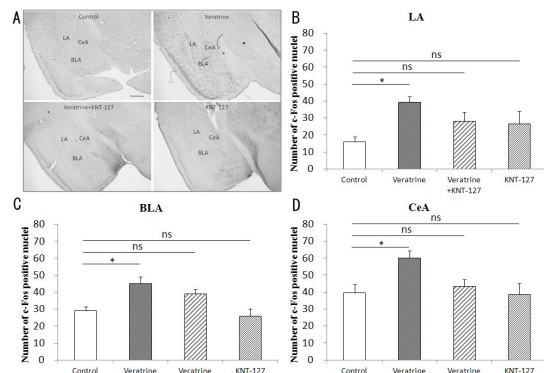


Fig.3 Immunoreactivity of c-Fos in the amygdala after the local perfusion of drugs into the PL-PFC. Representative photomicrographs of c-Fos expression in the amygdala after the local perfusion of perfusion medium (control), veratrine (100  $\mu$ M), veratrine (100  $\mu$ M)+KNT-127 (30  $\mu$ M), and KNT-127 (30  $\mu$ M) in the PL-PFC (A). Scale bar=200  $\mu$ m. Immunoreactive nuclei of c-Fos in the lateral amygdala (LA) (B), basolateral amygdala (BLA) (C), and central nucleus of the amygdala (CeA) (D) were quantified after the local perfusion of drugs into the PL-PFC. The data represent the mean and the SEM. \* $p$ <0.05, ns (no significant effect) vs. control group.

次に、PL-PFC に TFB-TBOA (3 $\mu$ M) を灌流したところ、veratrine を灌流した場合と同様に、細胞外グルタミン酸濃度の有意な増加と OF 試験における中心部滞在時間率及び中心部移動距離率の有意な減少を示した。一方、KNT-127 (30  $\mu$ M) を併用しても TFB-TBOA によって増加した細胞外グルタミン酸濃度の増加は減少しなかった。このとき予想に反して、TFB-TBOA によって減少

した OF 試験における中心部滞在時間率及び中心部移動距離率は有意に回復した。この結果は、細胞外グルタミン酸濃度の上昇は抑制せずとも KNT-127 が抗不安様作用を有していることを示しており、そのメカニズムとして、KNT-127 が PL-PFC から扁桃体に投射する神経細胞を直接抑制することで抗不安様作用を示したと考えられた。

さらに本課題では、DOR が調節する情動神経回路を明らかにするために、オプトジェネティクスを用いた検討についても試みた。まずはじめに、聴覚性恐怖記憶を司る脳内経路の一つと考えられる聴覚野 扁桃体外側核線維連絡をオプトジェネティクス手法により選択的に活性化する実験系を確立させた。その結果、当該シナプス伝達の可塑的変化と聴覚性恐怖記憶の強弱の間に相関を見出した。本手法は、DOR を介する情動制御のメカニズム解明に資するものと考えられた。

以上の検討から、KNT-127 の抗不安様作用メカニズムに、PL-PFC におけるプレシナプス側のグルタミン酸放出を抑制させる作用と、PL-PFC のポストシナプス神経細胞を直接抑制させる作用が関与する可能性を明らかにすることができた。今後、KNT-127 の DOR を介した情動調節メカニ

ムをさらに詳しく解析することで、新規抗不安薬の開発につながることを期待される。

#### <引用文献>

- Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Oct;32(10):581-90.
- Saitoh A, Sugiyama A, Yamada M, Inagaki M, Oka JI, Nagase H, Yamada M. The novel  $\delta$  opioid receptor agonist KNT-127 produces distinct anxiolytic-like effects in rats without producing the adverse effects associated with benzodiazepines. *Neuropharmacology*. 2013, 67:485-493.
- Saitoh A, Ohashi M, Suzuki S, Tsukagoshi M, Sugiyama A, Yamada M, Oka JI, Inagaki M, Yamada M. Activation of the prelimbic medial prefrontal cortex induces anxiety-like behaviors via NMDA receptor-mediated glutamatergic neurotransmission in mice. *J Neurosci Res*. 2014, 92:1044-1053.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Suzuki S, Saitoh A, Ohashi M, Yamada M, Oka JI, Yamada M. The infralimbic and prelimbic medial prefrontal cortices have differential functions in the expression of anxiety-like behaviors in mice. *Behav Brain Res*. 2016; 304:120-124. 査読あり  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.044>

Gotoh L, Saitoh A, Yamada M, Fujii H, Nagase H, Yamada M. Effects of repeated treatment with the delta opioid receptor agonist KNT-127 on hyperemotionality in olfactory-bulbectomized rats. *Behav Brain*

Res. 2017; 323:11-14. 査読あり  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.008>

〔学会発表〕(計3件)

齋藤顕宜、山田光彦：グルタミン酸神経系に作用する新しい抗うつ薬・抗不安薬の開発．第89回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県）2016年3月9-11日

齋藤顕宜、鈴木聡史、早田暁伸、大橋正誠、山田美佐、長瀬博、岡淳一郎、山田光彦：内側前頭前野前辺縁皮質領域のオピオイド受容体は扁桃体へ投射しているグルタミン酸神経伝達を抑制し不安様行動を改善する．第46回日本神経精神薬理学会年会、COEX(韓国ソウル)2016年7月2-3日

関口正幸：不飽和脂肪酸バランスによる条件性恐怖記憶のコントロール．第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会合同年会、福岡国際会議場（福岡県）2016年9月8-10日．

齋藤顕宜、鈴木聡史、大橋正誠、早田暁伸、山田美佐、岡淳一郎、長瀬博、山田光彦：内側前頭前野前辺縁皮質でオピオイド受容体作動薬KNT-127はマウスのペラトリン誘発性不安様行動を減弱する．第90回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール(長崎県)、2017年3月15-17日．

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

齋藤 顕宜 (SAITOH, Akiyoshi)  
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長  
研究者番号：00366832

### (2)研究分担者

山田 美佐 (YAMADA, Misa)  
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・研究員

研究者番号：10384182

関口 正幸 (SEKIGUCHI, Masayuki)  
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・室長

研究者番号：80260339

岡 淳一郎 (OKA, Jun-ichiro)  
東京理科大学・薬学部薬学科・教授  
研究者番号：40134613

山田 光彦 (YAMADA, Mitsuhiro)  
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・部長

研究者番号：60240040

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

該当なし