

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

## 視蓋におけるセロトニン輸送体の機能解析と薬物スクリーニング系の確立

研究代表者 佐藤 智美 (医学部 解剖学・産婦人科)

## 緒言

脳の発生過程において、セロトニン(5-HT)は、神経伝達物質としてだけでなく、細胞増殖、神経細胞の分化、神経突起伸長、シナプス形成などの過程において重要な役割を果たすことが報告されている<sup>1)</sup>。セロトニンは、後生動物の主な系統群に広く存在することが知られている、進化的に非常に古くから保存されているモノアミンである<sup>2)</sup>。ヒト成体では、セロトニンの異常が、鬱病や不安障害、統合失調症などの精神疾患に関与することから、セロトニンの細胞外分泌量を制御するセロトニン輸送体(serotonin transporter, SERT)を標的とした選択的セロトニン再取り込み阻害剤(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)は、汎用性の高い向精神薬の一つとなっている。発生過程においても、セロトニン量の恒常性不全が、ヒト精神疾患の病理生理学に関与する可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。しかし、脳の発生過程におけるセロトニンの役割と精神疾患発症との関係は、未だ明らかにされていない<sup>3)</sup>。

本研究は、硬骨魚類ゼブラフィッシュを用いて、発生過程の脳におけるSERTの機能を*in vivo*で明らかにし、脳の発生と機能への影響を個体レベルで解析するための新たなモデル系を確立することを目的とする。硬骨魚類は、分岐分類上、四肢動物の起源であり、哺乳類脳の中脳辺縁系以下の領域は、その構造と機能が保存されていることが報告されている。我々はこれまでに、UV感受性蛍光タンパク質Kaedeを全神経細胞で発現するトランスジェニック系統Tg(*huC:Kaede*)を作成することで、特定の神経回路や神経発生を可視化する実験系を確立し<sup>4,5)</sup>、網膜と視蓋の興奮性神経細胞が可視化されたTg(*brn3a-hsp70:GFP*)トランスジェニック系統と単一神経細胞標識システムを用いて、視蓋神経回路の投射パターンの形成と分子機構を明らかにしてきた<sup>6)</sup>。また、視蓋の脳室下帯において、神経前駆細胞から神経細胞の産生を制御する過程に、統合失調症の原因遺伝子の一つであるニューレグリン1とErbB4が関与することを明らかにした<sup>7)</sup>。本研究では、これまでに確立したゼブラフィッシュ視蓋における実験系を活用し、神経細胞の産生

と回路形成の両方で重要な役割を果たすセロトニン系に着目し、個体発生を通して統合的に解析可能な実験系を確立することで、セロトニン系を標的とした新たな薬物スクリーニング系を確立することを最終的な目的とする。

## 材料と方法

## 1. トランスジェニック系統の飼育・維持

ゼブラフィッシュは、28℃で、14時間/10時間の明暗周期で飼育した。トランスジェニック系統Tg(*brn3a-hsp70:GFP*)<sup>5)</sup>は、網膜と視蓋の神経細胞の発生を可視化するために使用し、Tg(*brn3c:Gal4;UAS:mCherry*)<sup>8)</sup>は、網膜神経節細胞の発生を可視化するために使用し、Tg(*huC:Kaede*)<sup>4)</sup>は、全神経細胞の発生を可視化するために使用した。

## 2. モルフォリーノオリゴヌクレオチドのインジェクション

ゼブラフィッシュ *sert* mRNA に対するアンチセンスモルフォリーノオリゴヌクレオチド(*slc6a4a* AMO)とコントロールの5-base mismatch MO(*slc6a4a* 5mis)は、1 × Danieau buffer (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5.0 mM HEPES pH 7.6)で0.5 mMに希釈し、1-4細胞期の胚にインジェクションを行った。

## 3. セロトニン輸送体阻害剤の処理

5 mMセロトニン輸送体阻害剤(SERT阻害剤)のストック溶液は、E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>)で50, 100, 200 μMに希釈した。授精後9時間胚はProtease (SIGMA P5147, 20 mg/ml E3 medium)に浸けて卵膜を除去後、0.1% DMSO溶液に、授精後30時間以降の胚はピンセットで卵膜除去後、2% DMSO溶液にそれぞれSERT阻害剤を加えたE3 medium中で飼育し、SERT阻害剤溶液は1日毎に新鮮な溶液と交換した。

## 結果

## 1. セロトニン輸送体の発現抑制

脳の発生過程において、SERTがどのような役割を担っているのかを明らかにするために、まず、全神経細胞でKaedeを発現するTg(*huC:Kaede*)

トランスジェニックシステムを用いて、アンチセンスモルフォリーノオリゴ (slc6a4a AMO) のインジェクションによる SERT の発現抑制を行った。Slc6a4a AMO をインジェクションした胚の視蓋では、放射状グリア細胞の自己増殖が起こっている授精後 24 時間で、胚全体の形態に大きな変化は見られなかったが、頭部が僅かに縮小しているのが観察された。

## 2. セロトニン輸送体阻害剤の処理

Slc6a4a AMO のインジェクションによる表現型が、SERT の発現抑制によるものであるかを検証するため、SERT 阻害剤による処理を行った。SERT の機能的阻害が、視蓋の神経回路形成にどのように影響するのかを検証するため、網膜と視蓋の神経細胞で GFP を発現する Tg (*brn3a-hsp70:GFP*) トランスジェニック胚を用いた。まず、授精後 6 時間からの原腸陥入後、頭部原基が顕著となる授精後 9 時間から 100  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理すると、視蓋神経細胞が十分に発生する授精後 54 時間で、頭部が僅かに縮小し、視蓋で GFP を発現する神経細胞領域も僅かに減少しているのが観察された。50  $\mu$ M SERT 阻害剤処理においても、同様の傾向が見られた。一方、視蓋の脳室帯において放射状グリア細胞の増殖と神経前駆細胞の産生が盛んに行われている授精後 30 時間から、100  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理すると、授精後 9 時間からの処理で観察された頭部の縮小と視蓋 GFP 陽性領域の減少は認められなかった。次に、授精後 30 時間から 200  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理し、網膜軸索の投射と視蓋樹状突起の発達が盛んに行われている授精後 80 時間で観察すると、視蓋の GFP 陽性神経細胞領域が僅かに縮小する傾向が観察された。さらに、授精後 54 時間から 500  $\mu$ M SERT 阻害剤で処理すると、授精後 80 時間以降に致死となることが判明した。

## 3. 網膜視蓋神経回路における網膜軸索と視蓋樹状突起の選択的可視化

SERT の機能阻害による神経回路形成への影響をより詳細に解析するため、網膜軸索と視蓋樹状突起をそれぞれ区別して、同時に可視化可能なトリプルトランスジェニックシステム Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry;brn3a-hsp70:GFP*) を作成した。これまで用いていた Tg (*brn3a-hsp70:GFP*) システムは、網膜軸索と視蓋樹状突起の両方で GFP を発現するため、両者を区別することが難しかった。一方、Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry*) は、網膜神経節細胞でのみ転写活性化因子 Gal4 を発現するため、UAS 認識配列の下流で、網膜軸索を特異的に mCherry で標識することができ、同様に網膜神経節細胞選択的に任意の分子を発現させることも可能である。Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry;brn3a-hsp70:GFP*) を用いることで、網膜神経節細胞特異的に発現させた分子の、網膜軸索と視蓋神経細胞に対する影響を同時に解析することが可能となった。

## 考 察

本研究では、ゼブラフィッシュ胚を用いて、脳の発生における SERT の発現抑制と機能阻害による影響を解析した。SERT の発現抑制により、授精後 24 時間で頭部が僅かに縮小することから、SERT は、発生初期において、放射状グリア細胞の増殖に関与する可能性が示唆された。授精後 9 時間からの SERT 阻害剤処理によっても、SERT 発現阻害と同様の頭部の僅かな縮小が認められた。一方、授精後 30 時間からの阻害剤処理では、同様の表現型は認められなかったことから、SERT は、放射状グリア細胞から神経前駆細胞の産生ではなく、神経幹細胞を含む放射状グリア細胞の増殖に関与する可能性が示唆された。また、授精後 30 時間から SERT 阻害剤で処理すると、視蓋の神経細胞領域が僅かに縮小していたことから、SERT は、発生後期においては、神経前駆細胞から神経細胞の産生、または網膜視蓋神経回路の発達、或はその両方に関与している可能性が示唆された。発生過程において、ゼブラフィッシュ *sert* は、授精後 3 日目で視蓋前野間脳群 (pretectal diencephalic cluster) と、哺乳類脳と同様に縫線核に局所的に発現していることが報告されている<sup>9)</sup>。このような局所的発現を示す SERT が、どのように放射状グリア細胞の増殖や、視蓋神経細胞の産生、神経回路形成に関与し得るのか、セロトニンを分泌するセロトニン神経系の発達やセロトニン受容体の発現、分布なども考慮しながら、さらに詳細に解析する必要がある。

網膜視蓋神経回路では、網膜からのトポグラフィックな軸索投射パターンと視蓋神経細胞の樹状突起の発達が、視覚入力依存的に変化することが知られている。これまで、網膜軸索や視蓋樹状突起の発達を個別に解析した報告は多いが、網膜軸索と視蓋樹状突起の両方を同時に観察した例はあまりない。統合失調症などの精神疾患や自閉症などの発達障害では、機能的神経回路の入力と出力のバランスを表す感覚運動ゲーティング (sensorimotor gating) に異常を示すことが報告されており<sup>10)</sup>、神経回路の正常な機能を司る構造的基盤である回路形成における影響を検証する上で、網膜視蓋神経回路は、その規則的な投射パターンと詳細に解析された回路形成機構から、非常に優れたモデル系である。今後は、本研究で確立したトリプルトランスジェニックシステム Tg (*brn3c:Gal4;UAS:mCherry;brn3a-hsp70:GFP*) などを用いて、SERT 阻害剤の神経回路形成における影響とその作用機序を解析して行きたい。

## 引用文献

- 1) Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 1002-12.
- 2) Lillesaar C. The serotonergic system in fish. *J Chemical Neuroanat* 2011; 41: 294-308.

- 3) Homberg JR, Schubert D, Gaspar P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 60-5.
- 4) Sato T, Takahoko M, Okamoto H. HuC:Kaede, a useful tool to label neural morphologies in networks in vivo. *Genesis* 2006; 44: 136-42.
- 5) Aizawa H, Goto M, Sato T, Okamoto H. Temporally regulated asymmetric neurogenesis causes left-right difference in the zebrafish habenular structures. *Dev Cell* 2007; 12: 87-98.
- 6) Sato T, Hamaoka T, Aizawa H, Hosoya T, Okamoto H. Genetic single-cell mosaic analysis implicates ephrinB2 reverse signaling in projections from the posterior tectum to the hindbrain in zebrafish. *J Neurosci* 2007; 27: 5271-9.
- 7) Sato T, Sato F, Kamezaki A, Sakaguchi K, Tanigome R, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Neuregulin 1 Type II-ErbB Signaling Promotes Cell Divisions Generating Neurons from Neural Progenitor Cells in the Developing Zebrafish Brain. *PLoS One* 2015; 10: e0127360.
- 8) Xiao T, Baier H. Lamina-specific axonal projections in the zebrafish tectum require the type IV collagen Draqnet. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1529-37.
- 9) Norton WH, Folchert A, Bally-Cuif L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *J Comp Neurol* 2008; 511: 521-42.
- 10) Geyer MA. The family of sensorimotor gating disorders: comorbidities or diagnostic overlaps? *Neurotox Res* 2006; 10: 211-20.

#### 研究成果リスト

#### 学会発表

- 1) Sato T, Sato F, Kamezaki A, Sakaguchi K, Tanigome R, Kawakami K, Sehara A. NRG1-ErbB4 signaling promotes generation of neurons from neural progenitor cells in the developing brain. 第58回日本神経化学学会大会, 平成27年9月, 大宮
- 2) 佐藤智美, 佐藤文規, 亀崎青沙, 坂口和弥, 谷米竜馬, 梶原 健, 永島雅文, 川上浩一, 瀬原淳子. ニューレグリン-ErbBシグナルは脳室下帯において基底前駆細胞から神経細胞を生み出す分裂を促進する, 第38回日本分子生物学会年会 (BMB2015), 平成27年12月, 神戸