

研究報告書

「ストレス応答代謝産物を基軸としたシナプス病態解析技術の創出」

研究タイプ: 通常型

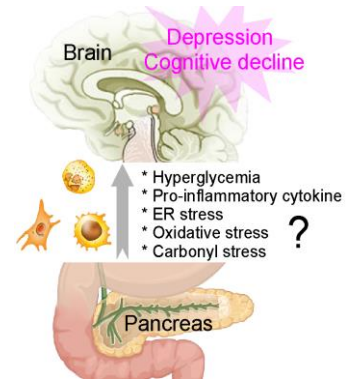
研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 林(高木) 朗子

1. 研究のねらい

WHOより、日本における疾病社会負担の指標であるDALY(disability adjusted life years)が報告され、精神疾患が主要な身体疾患を抜いてトップであることが判明した。一方で、脳機能は脳単独で動作原理が制御されているわけではなく、全身性の細胞応答が大きくかわるといふ、いわゆる“臓器連関”もしくは“病態連関”という概念が提唱され始めている(図1)。例えば、2型糖尿病患者が後にうつ病を発症するオッズ比、逆にうつ病患者が後に2型糖尿病を発症するオッズ比はどちらも有意に高く、精神疾患と糖尿病の併存症(以後、併存症)は、双方向性に両疾患を増悪させることも良く知られている。このように併存症は包括的医療において重要な問題であるにもかかわらず、この問題に取り組む基礎研究者は非常に少ないことも問題である。そこで、本申請では縦断的・多軸的に代謝産物を計測し、行動解析を併用することで、体内環境が中枢神経系の機能に如何に影響を及ぼし個体全体としての機能低下を惹起するかを検証した(研究項目1)。

また、上記のような手法を併用したとしても、精神疾患や多臓器円環の病態生理の全貌を掴み、創薬標的を分子レベルで同定することは長い道のりと思われる。脳機能障害の最終表現型の少なくとも一部はシナプトパチーが担うであろうことは正しいと思われるし、また精神疾患の病態生理として糖化ストレスが関与し、前述の糖尿病が各種精神疾患を増悪させることも良く知られている。シナプトパチーの原因は単一因子に起因するものではなく、また患者由来サンプルや疾患動物モデルで蓄積する終末糖化産物などの疾患関連産物は酵素的・非酵素的に複雑な制御を受けるため、単一の分子に着目した創薬戦略には限界があると思われる。そこで、細胞の表現型(シナプトパチーおよび糖化ストレス産物の細胞内蓄積)に着目したドラッグスクリーニングの技術開発が有効と考えた。神経細胞の形態や、有害な終末糖化産物がどのような細胞内局在で蓄積するかなどの複雑な画像情報を細胞全体の表現系として自動定量するためのハイコンテントスクリーニング法の確立である(研究項目2)。以上の2つの研究戦略を相補的に組み合わせることにより、精神疾患の病態生理をシナプスレベルから行動レベルまで因果律に迫るデザインで理解すること、これらの疾患関連代謝産物を軽減する化合物の創薬基盤の開発に挑戦した。



【図1】多臓器円環: 脳は単独で機能するわけではなく、内蔵環境との関連があり、様々な代謝物が関与する。

2. 研究成果

(1) 概要

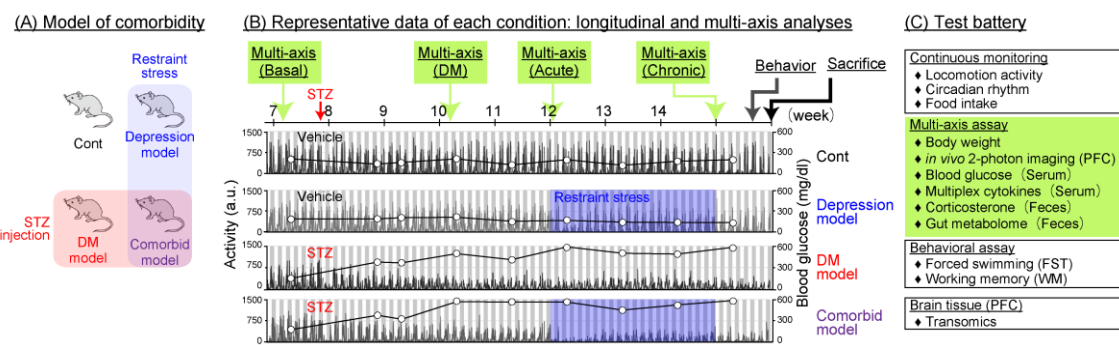
本研究ではうつ病と糖尿病の併存症の病態増悪のメカニズムを調べるために、うつ病モデルとして慢性拘束ストレスモデル、糖尿病モデルとしてストレプトゾトシン単回投与モデル(以後、STZモデル)、上記の2つのモデルを掛け合わせた併存症モデルマウスを作成し、比較検討した(図

2A)。全身性の細胞応答を仮説フリーな網羅的アプローチで計測するために、体重、摂食量、血糖、縦断的 *in vivo* 2 光子励起イメージング、縦断的行動量測定(図 2B)、各タイムポイントでの Multiplex cytokine assay 測定、ストレスレベルの客観的指標の一つであるコルチコステロン測定、同一個体を解剖し前頭野 RNAseq を行った。このように縦断的に同一個体を観察することで(図 2C)、代謝異常や慢性ストレスなどの摂動の前後での活動量を観察する実験系が可能になり、併存症の増悪分子メカニズムについての示唆が得られている。

ハイコンテンツスクリーニングに関しては、統合失調症モデルとして確立している慢性フェンサイクリジン(PCP)モデルを、96 well プレート上でハイコンテンツに自動定量する実験系を構築した。PCP 負荷と同時に、東京大学創薬機構の既知活性化化合物ライブラリ(1280 化合物)を付加し、2 週間培養し、神経細胞の形態(CaMKII)、興奮性シナプス(PSD-95)、終末糖化産物(ペントシジン)の 3 色で多重免疫染色し、ハイコンテンツイメージングを行った。2 段階のスクリーニングの末、18 化合物をヒット化合物とした。そのうちの約半数は、既に神経保護作用があること、もしくは保護作用があることが薬理的に想定される化合物であったが、約半数は、神経科学領域において知名度の低い化合物であった。現在、容量依存性試験、カウンターアッセイなどの 3 次スクリーニングを行っている。使用ライブラリは承認薬などより構成される既知活性化化合物ライブラリであるため、ヒット化合物の個体レベルでの有効性があつた場合、DR(Drug repositioning)へ展開すること、また共同研究のもとで、ヒット化合物を基にした“リード化合物”の創出に挑戦する。

(2) 詳細

(研究項目1)多臓器連関からみた脳機能の解明: 本研究項目ではうつ病と糖尿病の併存症の増悪メカニズムを調べるために、縦断的行動解析、各種代謝産物の測定と *in vivo* 2 光子励起イメージングを併用した。全身的な時空間的ダイナミクス(脳内環境-内臓環境連関)の観点で、併存症の発症や重症化に寄与する神経外因子を探索し、さらには見出された候補因子を操作することで



【図2】多軸的・縦断的評価系: (A) 併存症モデルマウス(B) アクティビティセンサー搭載のホームケージでの活動量計測。このシステムで計測したホームケージ内活動量と、強制水泳試験により評価された無動時間が相関することは確認されており、つまりアクティビティセンサーケージで活動量やうつ病様症状を非侵襲的・縦断的に定量できる。(C) 活動量とともに、*in vivo* 2 光子イメージングとサイトカイン(30 μ l の血清から 23 種類同時測定)、コルチコステロンなどの多軸的パラメーターを 4 点で計測した(基礎値、DM 期、急性ストレス期、慢性ストレス期)。16 週で行動解析(長期記憶、強制水泳)、最後に前頭野を採取し RNAseq を行った。

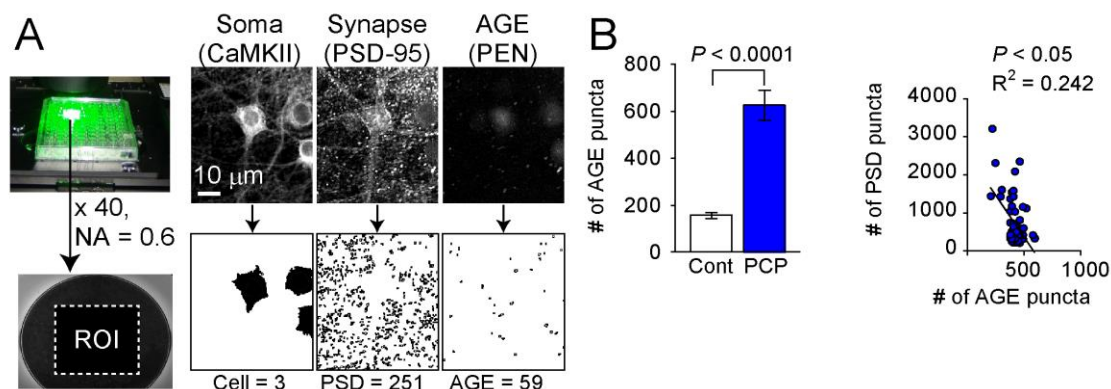
病態責任因子の同定を目指した。使用する動物モデルは、病態生理を惹起するメカニズムが比較的シンプルかつ、その構成性・表現的妥当性が確立されているものを選択した(図 2A)。うつ病モデルとしては社会ストレスモデルとして良く確立している慢性拘束ストレスを、糖尿病のモデルと

してはストレプトゾトシン単回投与モデル(150 mg/kg 単回投与で血糖 300~700 mg/dl の高血糖を誘導。高血糖を呈さない個体は除外:以後、STZモデル)を使用し、STZは脳血管関門を通過せず、膵臓細胞特異的に細胞毒性を発揮しインスリン欠乏を起こす薬理学的モデルである。上記の慢性拘束ストレスと STZ モデルを掛け合わせて併存症モデルマウスを作成し、図 2A の 4 群のマウスを比較検討した。全身性の細胞応答を仮説フリーな網羅的アプローチで計測するために、体重、摂食量、血糖、縦断的 *in vivo* 2 光子励起シナプス、縦断的行動量測定(図 2B)、各タイムポイントでの Multiplex cytokine assay 測定(Bio-Plex, BioRad 社)、ストレスレベルの客観的指標の一つであるコルチコステロン測定、同一個体を解剖し前頭野 RNAseq を行う。図 2B に持続的に 9 週間活動量を測定した 4 匹の例を示す。マウスは 12 時間ごとの明暗サイクルで飼育され、対照マウスでは明期に活動量が低下し、暗期には上昇するという夜行性動物の典型的な概日リズムが観察された(図 2B、最上段、対照マウス)。一方で、慢性ストレス下では、活動期である暗期の活動量が低下し(図 2B、2 段目、うつ病モデル)、糖尿病モデルでは、高血糖誘導とともに概日リズムが障害される個体も観察された(図 2B、3 段目、DM モデル)。このように縦断的に同一個体を観察することで、代謝異常や慢性ストレスなどの摂動の前後での活動量を観察する実験系が可能になった。各データ値や各々の相関図は2*非公開の研究成果に記載した。

(研究項目2)Cell-based ハイコンテンツイメージングによる創薬基盤の創出:研究項目2では、疾患感受性代謝産物である終末糖化産物およびシナプトパチーに着目した Cell-based な低分子化合物スクリーニング系を確立することに注力した(図 3A)。統合失調症モデルとして確立している慢性フェンサイクリジン(PCP)モデルを *in vitro* 病態モデルとして使用した。シナプス保護効果および終末糖化産物を軽減する低分子化合物をスクリーニングするためには、コントロール培養条件と比較した PCP 誘導性の終末糖化産物(ペントシジン、PEN)の蓄積やシナプス障害の程度(Effect size)がスクリーニングに十分なクオリティに到達することが必要である。そこで、培養条件、とりわけサプリメントや微量元素を含む培地組成や分散培養のための条件検討を徹底的に行い、スクリーニングに耐えうる培養系を確立した。ペントシジンの蓄積は多くの神経細胞に同程度蓄積するのではなく、蓄積の程度には細胞により大きな差異があること、また蓄積する細胞内局在にも大きな偏りがあり、一部の樹状突起スパインに高輝度で蓄積していることが観察された。神経細胞内にどのようにペントシジンが蓄積するかは今まで報告がなく、興奮性シナプス後部である樹状突起スパインの一部にペントシジンが蓄積していることは、シナプスにおける局所的な糖化ストレスをはじめと示したと言える。また、ペントシジンの蓄積が多い Well ほど、Well 内の興奮性シナプス数が少ないという負の相関からも(図 3B)、シナプトパチーの一因としての糖化ストレスの関与を示唆している。このようなペントシジン蛍光は、ペントシジンのプレアブソープションで消失することも確認している。

上記のスクリーニング系に、東京大学創薬機構の既知活性化合物ライブラリ(1280 化合物)を付加し、2 週間培養し、神経細胞の形態(CaMKII)、興奮性シナプス(PSD-95)、終末糖化産物(ペントシジン)の 3 色で多重免疫染色し、ハイコンテンツイメージングを行った。1 次スクリーニングでは、興奮性シナプス数(PSD puncta 数)、終末糖化産物(PEN puncta 数)などの定量値を基に判断し、培養神経細胞に良好な効果を有する化合物のうち、+2SD の効果を有する 81 化合物を得た(図6、2*非公開の研究成果に記載)。この中の大部分は擬陽性であることも予想されたが、擬陰性で Hit 化合物を見失うリスクを回避するため、1 次スクリーニングの上位 234 化合物を 2 次スクリーニングにかけたところ、1 次スクリーニングと同様の基準で 79 化合物がヒット基準を満たした

(再現率 34%)。その中でも、もっとも良好なスコアを呈した 18 化合物をヒット化合物とした(ヒット率 1.4%)。そのうちの約半数は、既に神経保護作用があること、もしくは保護作用があることが薬理的に想定される化合物であったが、約半数は神経科学領域においてほぼ無名の化合物であった(非公開)。現在、容量依存性試験、カウンターアッセイなどの 3 次スクリーニングを行っている。



【図 3】Cell-based ハイコンテンツイメージング: (A) 各 well には、統合失調症の *in vitro* 病態モデルとして利用されているフェンサイクリジンおよび既知活性化化合物が添加。自動撮影の後、半自動で目的構造物を自動定量(ROI 一部エリアだけ強拡大)。(B) ペントシジンの蓄積が多い Well ほど、Well 内の興奮性シナプス数が少ないという負の相関が観察され、シナプトパチーの一因としての糖化ストレスの関与を示唆している。

3. 今後の展開

(研究項目1) 上述の予備実験によって、うつ病モデルに糖尿病モデルが併存すると、慢性ストレス解除後も抑うつ状態が遷延し、このようなレジリエンスの障害はうつ病や糖尿病の単独モデルでは観察されないことが確認できており、併存症モデルのレジリエンスを定量的・客観的に解析できる状態であると考えている。ここで見出された病態責任因子の候補に関しては、その因果性を検証するための操作実験も計画している。例えば、特定の代謝物を変動させるための化合物を脳微小循環デバイスを用いて大脳皮質へ直接投与したり、また図 4(非公開項目)で見出されたサイトカインのノックアウトマウスや中和抗体などを併用し、2 光子スパインイメージングや行動解析の結果がどのように変化するか検証していく。このように多軸的・縦断的全身評価系、縦断的 *in vivo* 2 光子励起イメージング、前頭野マルチオミクス解析などの分野横断的な最先端計測系を結集させ、これらの臓器連関を統御する分子・細胞基盤を仮説フリーの網羅的アプローチで解明し、さらにそのメカニズムに立脚した新たな介入戦略開発やバイオマーカーへの探索の基盤となりうる基礎研究を推進する。

(研究項目2) 糖化ストレスとシナプトパチーに着目し、疾患代謝関連産物とシナプトパチーを軽減する化合物を見出すことは、さまざまな精神・神経疾患に対する新規の治療薬として有用と思われる。今回の研究課題で見出されたヒット化合物のヒット・ヴァリデーションを行う。使用ライブラリは承認薬などより構成される既知活性化化合物ライブラリであるため、ヒット化合物の個体レベルでの有効性があった場合、DR(Drug repositioning)へ展開すること、また共同研究のもとで、ヒット化合物を基にした“リード化合物”の創出に挑戦する。

またスクリーニング系の高効率化のため、教師ありの Deep learning 手法を用いて、細胞全体の表現系を自動定量するための、AI 創薬手法の確立を試みている最中である。Deep learning を用

いた自動化画像撮像および解析技術により、目視観察での作業を自動識別のシステムに置き換えることにより、大きなパラメータ空間を現実的にスクリーニングできるようになる。この技術が確立した暁には、他の様々な創薬研究に展開することが期待され、その波及効果は非常に大きなものになると思われる。また、本申請で提唱したハイコンテンツ化合物スクリーニングと、それと対極をなす2光子励起顕微鏡による *in vivo* シナプスイメージング系による化合物効果の実証は、私が運営する研究室で遂行可能であり、このようなアカデミアでの泥臭いムーブメントにおいて何らかの知見や化合物を得ることが出来たならば、手詰まり感を見せている精神疾患創薬フィールドにとって起爆剤になる可能性を秘める。

4. 自己評価

項目1に関しては、うつ病と糖尿病の併存症マウスモデルを世界で初めて確立し、その解析の大部分を終えた。同一個体の末梢血を縦断的に採取し、サイトカインなどの代謝産物を経時的に計測し、行動パラメーターと共に解析することで、慢性ストレス負荷後のストレス脆弱性を予測できる予後バイオマーカー候補を幾つか同定した(図4、非公開項目)。これらの末梢由来サイトカインの中には、前頭前野サンプルで行ったRNAseqによる網羅的に導出されたシグナル伝達経路とも整合性があり(図5、非公開項目)、バイオマーカーとしての妥当性をモデルマウスを使って検証していくべきと考えている。妥当性が確認された後の展開としては、併存症増悪の分子メカニズム探索の糸口として生物学的に探究していく方向性、および臨床教室との共同研究のもと臨床研究として患者サンプルで検証していく二つの方向がありうる。全く新しいモデルの確立をゼロから始め3年半でここに至ったことは、論文発表や特許申請こそ今後の課題であるが、申請目標を実質的に達成できたと考えている。

項目2に関しては、Cell-based スクリーニング法に耐えうる培養系の最適化に相当な時間を費やしたものの、大脳皮質初代神経細胞を用いたスクリーニング基盤の確立は達成出来たと考えている。また2段階のスクリーニングにより、18化合物をヒット化合物として見出されており、このうち半数は神経保護効果が想定される化合物であり、ポジティブコントロールがヒット化合物として数多くあがっていることは、スクリーニングが妥当に行われたことを示唆している。今後、ヒット・バリエーションおよび *in vivo* での効果の検証に進行していく。進捗に若干の遅れがあったが、ラボの移転で研究が中断した期間が実質1年間あることも考えれば、目標到達としては十分だと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep.* 2018 Aug 21;24(8):2196–2210.
2. Okazaki H, Hayashi-Takagi A, Nagaoka A, Negishi M, Ucar H, Yagishita S, Ishii K, Toyozumi T, Fox K, Kasai H. Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines. *Neurosci Lett.* 2018 Apr 3;671:99–102.
3. Zhang JC, Yao W, Qu Y, Nakamura M, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Han M, Shirayama Y, Hayashi-Takagi A, Hashimoto K. Increased EphA4-ephexin1 signaling in the medial prefrontal cortex plays a role in depression-like phenotype. *Sci Rep.* 2017 Aug

2;7(1):7133.

4. Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, Ishii K, Shirai F, Yagishita S, Akagi T, Ichiki T, Kasai H. Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. *Sci Rep*. 2016 May 25;6:26651.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(総説)Hoshiya Y, Wada T, Hayashi-Takagi A (CA). Synaptic Ensemble Underlying the Selection and Consolidation of Neuronal Circuits during Learning. *Front Neural Circuits*. 2017 Mar 2;11:12.

(総説) Shirai F, Hayashi-Takagi A (CA). Optogenetics: Applications in psychiatric research. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2017 Jun;71(6):363-372.

(総説)Hayashi-Takagi A (CA).

Synapse pathology and translational applications for schizophrenia. *Neurosci Res*. 2017 Jan;114:3-8.

(招待講演) Hayashi-Takagi A. Wide-Field Mapping of Hebbian Synaptic Potentiation Using Synaptic Optoprobes
Gordon Research Conference, Lucca, Italy, 2017

(招待講演) Hayashi-Takagi A. Functional connectomics using synaptic optogenetics and an activity-dependent neuronal tracing
Cold Spring Harbor - Asia Meetings, Suzhuo, China, 2016