Girk2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス作製と表現型解析: チペピジンの画期的治療薬としての開発を目指して

創薬・生命薬科学専攻　バイオファーマコース　環境分子保健学分野　本多　幾多郎

現代社会における医療上最も重要な課題の一つは，急増する精神疾患への対策である．

本研究室では，これまでにチペピジンをはじめとした非麻薬性中枢性鎮咳薬が，1) GIRK チャネル活性化電流を抑制すること，2) 脳内モノアミンレベルを上昇させること，3) 鎮咳有効量という一定の用量帯域において，うつ病をはじめとした様々な原因の異なる難治性中枢疾患モデル動物の症状を改善することを明らかにしてきた．さらに，薬理学的研究は，これらの改善作用のいくつかは，脳内の GIRK チャネルの抑制を介したドパミン D_1 受容体の活性化によりもたらされることを明らかにしてきた．これらの知見を踏まえると，中枢性鎮咳薬は中脳辺縁系のドパミンニューロンにおける GIRK チャネルを重要な作用点として中枢機能を改善していることが十分に考えられる．しかし，抗うつ様作用を含む多彩な薬理作用に GIRK チャネルが関わっていることを示す直接的な証拠はない．そこで，チペピジンの抗うつ様作用への GIRK チャネルの関与を実証するために，さらには GIRK チャネルの脳における生理学的役割を追究する糸口を得ることを目的として，まず第一に，脳の広い領域に亘り発現し，さらには中脳辺縁系において最も高発現が認められている GIRK2 を標的とし，Cre-loxP システムを用いた *Girk2* 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの作製に取り組んだ．第二に，このマウスの表現型を神経化学的，電気生理学的，および行動学的手法を用いて解析した．

予てより本研究室において作製された，GIRK2 をコードする遺伝子である *Girk2*/*Kcnj6* に対する floxed *Girk2* マウス作製のためのターゲティングベクターを使用した．エレクトロポレーション法によってこのベクターを導入し，ES 細胞のコロニーを 1176 個ピックアップし PCR 法とサザンブロット法によりスクリーニングした．その結果，相同組換え体クローンの検出には至らなかった．そこで，近年ゲノム編集領域において注目を集めている，CRISPR/Cas システムを用いた検討を行った．標的 exon の両端のアームを認識し nick を導入する D10A 変異体 Cas9 発現ベクターを ES 細胞にターゲティングベクターと同時導入し 72 個のクローンの解析を行った結果，7 個の組換え体クローンを作製することに成功した．さらに，これらのうち 2 個のクローンにおいて，*neo* 遺伝子の抜き取りを行い，5 つのキメラマウスのサブライン，および loxP 挿入マウス（GIRK2^{floxed} マウス）の樹立に成功した．

1. GIRK2^{nes}KO マウスでの検討

GIRK2^{floxed} マウスと脳特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre トランスジ

ェニックマウスを交配することにより，GIRK2^{nes}KO（*Girk2*$^{floxed/floxed}$; Tg（Nestin-Cre））マウスを作製した．

- RT-PCR 法により，GIRK2^{nes}KO マウスの脳において顕著に GIRK2 の mRNA レベルが減少していることを確認した．
- 免疫組織化学的手法により，GIRK2 の高発現が認められる中脳辺縁系や青斑核において，GIRK2 が欠損していることを確認した．
- 行動薬理学的検討において GIRK2^{nes}KO マウスは強制水泳試験において無動時間を短縮させた．一方でオープンフィールド試験において自発運動量に有意な変化はなかった．

2. GIRK2^{DAT}KO マウスでの検討

GIRK2^{floxed} マウスとドパミントランスポーター（DAT）のプロモーターの下流で Cre リコンビナーゼを発現するマウスである DAT-Cre トランスジェニックマウスと交配させることにより，GIRK2^{DAT}KO（*Girk2*$^{floxed/floxed}$; Tg（DAT-Cre））マウスを作製した．

- 免疫組織化学的手法で検討した結果，GIRK2^{DAT}KO マウスの腹側被蓋野および黒質領域において，カテコールアミン神経のマーカーである tyrosine hydroxyrase（TH）と GIRK2 の共局在が認められなかった．
- 電気生理学的手法により，GIRK2^{DAT}KO マウスの腹側被蓋野より急性単離したドパミンニューロンにおいて，ステップパルスを与えた際に観察される I_h 電流およびグルタミン酸を投与した際に観察される内向き電流は，GIRK2^{floxed} マウスの同じ部位から単離したドパミンニューロンで見られるそれぞれの電流と変わりはなかったが，ドパミンおよび $GABA_B$ 受容体アゴニストであるバクロフェンに対しては，GIRK2^{floxed} マウスからのニューロンと異なり，応答を示さなかった．
- 行動薬理学的検討において，GIRK2^{DAT}KO マウスは強制水泳試験において無動時間の短縮を示した．一方でオープンフィールド試験において自発運動量に有意な変化は認められなかった．

本研究において，GIRK2^{floxed} マウスの樹立に成功した．さらに，本研究は中枢における GIRK2 サブユニットを含む GIRK チャネルがうつ様行動に関与することを明らかにし，さらにドパミンニューロンに限局した GIRK チャネルがうつ様行動に重要な役割をもつことを明らかにした．本研究結果は，本分野で得られている GIRK チャネル抑制作用をもつチペピジンなどの中枢性鎮咳薬との結果と一致しており，これらの薬物の作用点解明の一助となることが示唆され，GIRK チャネル研究および新規の中枢疾患治療薬開発の発展に資する知見であると考えられる．