

令和元年5月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05091

研究課題名(和文) 意思決定に關与するセロトニン投射系の同定と薬理的制御

研究課題名(英文) Identification and pharmacological control of serotonergic projection involved in decision making

研究代表者

金子 周司 (Kaneko, Shuji)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60177516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：数多くの精神疾患において意思決定の障害が見られるが、その発生メカニズムについては不明な点が多い。本研究では意思決定において重要なセロトニン神経活動を制御する新たな手法を開発し、その光遺伝学的制御が行動に与える影響について解析した。強力な抗うつ作用を持つことが報告されているケタミンにより、背側縫線核-前頭前野皮質セロトニン神経が活性化することを見出した。また光遺伝学的手法を用いて、背側縫線核セロトニン神経の選択的活性化が抗うつ作用発現に十分であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病や不安障害などの精神疾患は、本邦を含む先進国において、極めて重大な社会問題となっている疾患である。本研究は、極めて効果が高いうつ病の治療薬として近年研究が進んでいるケタミンの作用において、アセチルコリン神経核である脚橋被蓋核が極めて重要な役割を果たしている可能性を見出した。また、光遺伝学的手法を用いることで、背側縫線核セロトニン神経を活性化するだけで、抗うつ作用が引き起こされることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Major depression is a social and economic burden worldwide. Serotonergic signaling has been implicated in the pathophysiology of this disorder. Moreover, clinical studies have indicated that ketamine has a potent antidepressive efficacy. However, the precise mechanisms underlying major depression are still unclear. Here, we used viral vectors capable of efficient and specific transduction of serotonergic neurons in mice and rats for elucidation of serotonergic roles in depression-like behaviors. We found that ketamine activated dorsal raphe serotonin neurons via activation of acetylcholine neurons in the pedunculo-pontine tegmental nucleus. We also found that acute activation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus increases anti-depressive like behaviors in rats and mice. These findings further our understanding of the pathophysiological role of dorsal raphe serotonergic neurons in different species and the role of these neurons as therapeutic targets in major depression.

研究分野：薬理学

キーワード：セロトニン ウイルスベクター うつ病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

うつ病や強迫性障害、注意欠如多動症といった精神疾患は、その名称が表現する中核症状とともに、共通して「意思決定」プロセスに障害を起こす疾患群である。これまでの治療薬は中核症状の改善を目標としており、これらの症状に対してはセロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) に統合失調症治療薬や気分安定薬が併用されるなど経験的な対処がなされるものの、奏効率は低い。また OCD 様の強迫行為や衝動性といった意思決定の障害は、パーキンソン病やアルツハイマー病の薬物治療過程、あるいは薬物依存で観察される例も多く、患者の社会生活に重大な悪影響を及ぼし QOL を低下させることから、その発生メカニズムの解明とともに選択的かつ効果的な治療法の開発が望まれている。

セロトニン神経系は、古くから知られている情動制御という高次脳機能に深く関わるとともに、意思決定プロセスにも関与すると考えられる。それは上述したように SSRI が共通する治療薬として用いられる事に加え、ラットで遅延報酬課題の実行中にセロトニン神経の発火活動が見られるとの報告 (Miyazaki et al., 2012) や、ヒトにおいて短期的な小報酬を我慢して長期的な大報酬を得る課題を実行する際にセロトニン神経核である背側縫線核が活動しているとの報告 (Tanaka et al., 2004) によって示されつつある。しかし、セロトニン神経は縫線核という一群の神経核から上行性および下行性に投射する典型的な widely projecting neuron であり、その投射先が広範に及ぶことから、ドパミン神経系のように各投射経路がどのような生理機能を果たしているのか、ほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

情動制御・意思決定プロセスに必要なセロトニン神経を同定し、そのシナプス制御メカニズムを明らかにすることによって、情動制御・意思決定の障害に対する新しい治療のための方策を創出する。

3. 研究の方法

薬物投与によるセロトニン遊離を経時的に測定するため、マイクロダイアリシス法を用いた。実験には Wistar/ST 系雄性ラット (250-320 g; 日本 SLC、静岡) を使用した。全ての動物は室温が 24 ± 1 、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。実験は全て京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。ラットをペントバルビタール (60 mg/kg) 麻酔下で小動物用脳定位固定装置 (成茂、東京) に固定し、脳アトラスに従い、ステンレス製ガイドカニューレ (エイコム、京都) を mPFC (ブレグマより、AP +3.2 mm, ML +0.6 mm, DV +4.0 mm)、DRN (ブレグマより、AP -7.7 mm, ML 0 mm, DV +7.0 mm)、PPTg (ブレグマより、AP -7.8mm, ML ± 1.9 mm, DV +7.6 mm)、LDTg (ブレグマより、AP -8.7 mm, ML ± 0.8 mm, DV +7.0 mm) にそれぞれ埋め込んだ。ガイドカニューレは歯科用セメントおよびビスにて頭蓋に固定した。神経核の電氣的破壊は、同様にラットを脳定位固定装置に固定して行った。先端部以外を絶縁したステンレスパイプ (30 G) を PPTg あるいは LDTg に挿入し、25 V の電圧で 25 秒間の直流電流を流すことで神経核破壊を行った。Sham 処置は電流を流さず、ステンレスパイプを挿入した。神経核破壊の 7 日後より、上述の通りガイドカニューレを埋め込んだ。マイクロダイアリシスによる 5-HT 遊離量の測定は、ガイドカニューレ埋め込みの 1-2 日後より無麻酔かつ自由行動下にて行った。マイクロダイアリシスプローブ (膜長: 2 mm、外径: 0.22 mm、エイコム) をガイドカニューレより mPFC に挿入し、1 μ M の citalopram を含む Ringer 液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂) を 1 μ L/min で灌流した。灌流液を 10 分ごとに回収し、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD、エイコム) で分析した。5-HT は逆相カラム (PPII-ODS column, 3.0 \times 150mm; エイコム) で分離して定量した。

マウスおよびラットのセロトニン神経活動を特異的に制御するため、ウイルスベクターによるセロトニン神経特異的な光遺伝学的ツールの発現を行った。実験には C57BL/6J 系雄性マウス (6-9 週齢; 日本 SLC、静岡)、Wistar/ST 系ラット新生児 (2-3 週齢; 日本 SLC、静岡) および Wistar/ST 系雄性ラット (6-9 週齢; 日本 SLC、静岡) を使用した。実験は全て京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。ラットおよびマウスはペントバルビタール (60 mg/kg) 麻酔下で小動物用脳定位固定装置 (成茂、東京) に固定し、脳アトラス (15) に従い、LVV を DRN (ラット: ブレグマより、AP -7.7 mm, ML 0 mm, DV +7.0 mm、新生仔ラット: ラムダより、AP +1.4mm, ML 0 mm, DV +6.0 mm、マウス: ブレグマより AP -4.4 mm, ML 0 mm, DV +3.4 mm) へそれぞれ 1 μ L (マウスおよびラット新生児) あるいは 5 μ L (ラット) 投与した。本研究では、TPH2 プロモーターの制御下で、eYFP 変異体である Venus (TPH2::Venus)、ChR2 変異体である ChETA (TPH2::ChETA)、光活性化プロトンポンプ eArchT (TPH2::eArchT, 48) を発現する LVV を用いた。ウイルス投与 1-2 週間後に、光ファイバーカニューレの先端が DRN の背側境界部の真上に配置するように埋め込んだ。行動分析後、全てのマウスは第一章と同様に経心灌流により固定し、LVV 感染を蛍光発現細胞の観察により確認した。LVV の投与および光フ

アイバーの設置に失敗したマウスから得られたデータは除外した。LVV の作製および精製は、既報に従って行った。Lenti-X 293T 細胞 (Clontech, Mountain View, USA) を 60-70% の培養密度まで増殖させ、パッケージングベクターおよびシャトルコンストラクトを polyethylenimine (Polysciences, Warrington, USA) で感染させた。16-18 時間の培養の後、上清を採取し、新鮮な培地を加えた。30 時間の培養後、上清を回収し、最初の上清と混合した。上清を 0.45 μm 孔径の PVDF 膜 (Millex-HV, Billerica, Merck Millipore) により濾過し、SW-28 ローター (Beckman-Coulter, Brea, USA) 中で 23,000 rpm で 2 時間超遠心分離した。沈殿物を PBS に再懸濁し、 -80°C で保存した。LVV の力価を p24ELISA (BioAcademia, 大阪) により測定し、約 $4\text{-}5 \times 10^{10}\text{IU/mL}$ と推定した。行動試験は常法に従い実施した。

4. 研究成果

まずはじめに、セロトニン神経活動を外来性に引き起こし得る刺激について検討を行った。既存の抗うつ薬であるセロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) は、セロトニンの再取り込みを防ぐことで、シナプス間隙のセロトニン濃度を上昇させるため、セロトニン神経活動自体は抑制するという特徴があり、セロトニン神経活動を外来性に引き起こし得る刺激としては適切ではないと考えられる。そこで、近年、SSRI や SNRI とは異なるメカニズムで、迅速に抗うつ作用を引き起こすことが報告されている、麻酔薬ケタミンに着目し、検討を行った。

うつ病と関連の深い脳部位である前頭前野皮質に透析プローブを埋め込み、リンゲル液を恒常的に灌流し、灌流後の液を HPLC により連続的に分析することで、前頭前野皮質のセロトニン濃度を経時的に測定した。ケタミン (30 mg/kg) をラットに皮下投与することにより、前頭前野皮質セロトニン濃度は上昇した。次に、このセロトニン濃度上昇が、再取り込み阻害によるものではなく、セロトニン神経活動の亢進を介したものであることを示すため、背側縫線核 (DRN) セロトニン神経活動を制御しているアセチルコリン神経核である、背外側被蓋核 (LDTg) および脚橋被蓋核 (PPTg) を電気的に傷害させたラットを用いて検討を行った。その結果、PPTg 傷害により、ケタミンの前頭前野皮質セロトニン遊離作用は有意に減弱した。一方、LDTg 傷害は、ケタミンの前頭前野皮質セロトニン遊離に有意な影響を与えなかった。

さらに、前頭前野皮質セロトニン遊離に対するケタミンの PPTg への直接作用を検討するとともに、セロトニン再取り込みの場合である前頭前野へのケタミンの影響を完全に排除して検討を進めるため、PPTg にケタミンを灌流する検討を行った。その結果、PPTg にケタミン (0.1 mM) を灌流するだけで、前頭前野皮質セロトニン遊離は有意に増加した。一方で、LDTg へのケタミンの灌流は、前頭前野皮質セロトニン遊離に有意な影響を与えなかった。さらに、PPTg へのケタミン灌流によるセロトニン遊離は、背側縫線核への AMPA 型グルタミン酸受容体阻害薬 NBQX (0.3 nmol) あるいは $4\text{-}2$ ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬 DHE (10 nmol) の前投与によりほぼ完全に抑制された。これらの結果は、ケタミンが、PPTg のアセチルコリン神経を活性化させることで、背側縫線核セロトニン神経を間接的に活性化させ、前頭前野皮質セロトニン濃度を上昇させている可能性を強く示唆している。従って、ケタミンを用いることで、SSRI や SNRI と異なりセロトニン神経活動を直接活性化させ得ることが示された。

次に、このセロトニン神経活動が情動機能に与える影響を詳細に解析するため、特定の神経核に存在するセロトニン神経のみの活動を任意のタイミングで制御する手法の開発を行った。セロトニン神経のみに外来遺伝子を高発現させるウイルスベクター (Benzekhroufa et al., 2009) を用いて検討を行ったが、予想に反してその発現量は低かった。そこで、上記ベクターシステム中で用いている IRES と GAL4 の間の配列および TPH2 プロモーターの最適化を行ったところ、無染色でも外来遺伝子 GFP の蛍光が観察可能な、極めて高い発現を実現することができた。次に、セロトニン神経の活動を光遺伝学的に制御するため、青色光で神経活動を亢進できる ChETA (smTPH2::ChETA および srTPH2::ChETA) および緑色光で神経活動を抑制できる eArchT (smTPH2::eArchT および srTPH2::eArchT) を上記ウイルスに組み込んだ。

まず、マウス DRN のセロトニン神経の活性化が抗うつ薬様効果に十分であるかどうかを評価するために、マウス DRN への smTPH2::ChETA 投与 1 週間後に、尾懸垂試験を行った。この試験は、動物の無動を無力感とみなして評価するものであり、抗うつ薬のスクリーニングとして一般的に用いられている。DRN への青色光照射下で、smTPH2::ChETA 投与マウスは、smTPH2::Venus 投与群と比較して、有意に無動時間が短縮した。次に、この無動時間の短縮が運動量の増加に起因する可能性を除外するために、オープンフィールド試験を行ったところ、smTPH2::ChETA 投与群は、青色光照射下で smTPH2::Venus 投与群と比較して、有意に運動量が減少していた。これらの結果は、DRN のセロトニン神経特異的な活性化が、マウスにおいて抗うつ薬様作用を引き起こすことを示唆している。一方で、これまでに、セロトニンが不安様行動の制御にも関与していることが示唆されているため (34, 40, 42)、不安様行動についても同様に検討を行った。しかし、smTPH2::ChETA あるいは smTPH2::Venus を投与したマウスにおいて、青色光照射下でオープンフィールドの中央部滞在時間に有意な差は見られなかった。また、高架式十字迷路試験において、smTPH2::ChETA 投与群のオープンアーム滞在時間は、smTPH2::Venus 投与群と同程度であった。これらの結果から、DRN のセロトニ

ン神経特異的な活性化は、ストレス対処行動を増加させるが、抗不安あるいは不安惹起作用の誘発には十分でないことが示唆される。次に、smTPH2::eArchT を用いてマウス DRN のセロトニン神経を特異的に抑制した際の情動行動への影響について検討した。尾懸垂試験において、smTPH2::eArchT 投与群および smTPH2::Venus 群の間で、緑色光照射下での無動時間に有意な差は見られなかった。この結果より、DRN のセロトニン 神経特異的な抑制が、うつ様行動を誘発するのに十分ではないことが示唆される。さらに、smTPH2::eArchT 投与群では、緑色光照射下でのオープンフィールド試験における運動量および中央部滞在時間は、smTPH2::Venus 群と同程度であった。さらに、高架式十字迷路試験では、smTPH2::eArchT 投与群および smTPH2::Venus 群において緑色光照射下でのオープンアーム滞在時間は同程度であった。以上の結果より、DRN の 5-HT 神経特異的な抑制は、運動量および不安様行動に影響を及ぼすのに十分ではないことが示唆される。

マウスと同様に、ラットにおいても情動行動に対する DRN のセロトニン神経特異的な興奮性制御の影響を検討するために、強制水泳試験、オープンフィールド試験および高架式十字迷路試験を行った。強制水泳試験において、srTPH2::ChETA 投与群では、srTPH2::Venus 投与群と比較して無動時間が減少していたが、srTPH2::eArchT 投与群は srTPH2::Venus 投与群と同程度であった。また、オープンフィールド試験では、srTPH2::Venus、srTPH2::ChETA および srTPH2::eArchT 投与群の間で総移動距離に有意な差は見られなかった。これらの結果より、DRN のセロトニン神経特異的な刺激がラットにおいて抗うつ様作用を引き起こすことが示唆される。さらに、srTPH2::Venus、srTPH2::ChETA あるいは srTPH2::eArchT 投与群でのオープンフィールド試験において、中央部滞在時間に有意な差はみられなかった。しかしながら、高架式十字迷路試験では、srTPH2::eArchT 投与群では、srTPH2::Venus 投与群と比較してオープンアーム滞在時間が有意に減少していた。一方、srTPH2::ChETA 投与群におけるオープンアーム滞在時間は、srTPH2::Venus 投与群と同程度であった。以上の結果より、DRN の 5-HT 神経特異的な抑制は、試験パラダイムに依存するものの、ラットにおいてのみ不安惹起作用を有することが示唆される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 31 件)

- 1 Asaoka N, Nishitani N, Kinoshita H, Nagai Y, Hatakama H, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: An adenosine A2A receptor antagonist improves multiple symptoms of repeated quinpirole induced psychosis. *eNeuro* 6:0366-18 (2019)
- 2 Nishitani N, Nagayasu K, Asaoka N, Yamashiro M, Andoh C, Nagai Y, Kinoshita H, Kawai H, Shibui N, Liu B, Hewinson J, Shirakawa H, Nakagawa T, Hashimoto H, Kasparov S, Kaneko S: Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology* 44:721-732 (2019)
- 3 Tsutsui M, Hirase R, Miyamura S, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, Shirakawa H, Kaneko S: TRPM2 exacerbates central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing production of CXCL2 chemokines. *J Neurosci* 38:8484-8495 (2018)
- 4 Isami K, Imai S, Sukeishi A, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: The impact of mouse strain-specific spatial and temporal immune responses on the progression of neuropathic pain. *Brain Behav Immun* 74:121-132 (2018)
- 5 Miyanohara J, Kakae M, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, Arai K, Shirakawa H, Kaneko S: TRPM2 channel aggravates CNS inflammation and cognitive impairment via activation of microglia in chronic cerebral hypoperfusion. *J Neurosci* 38:3520-3533 (2018)
- 6 Kinoshita H, Nishitani N, Nagai Y, Andoh C, Asaoka N, Kawai H, Shibui N, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: Ketamine-induced prefrontal serotonin release is mediated by cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol* 21:305-310 (2018)
- 7 Asaoka N, Nishitani N, Kinoshita H, Kawai H, Shibui N, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: Chronic antidepressant potentiates spontaneous activity of dorsal raphe serotonergic neurons by decreasing GABAB receptor-mediated inhibition of L-type calcium channels. *Sci Rep* 7:13609 (2017)
- 8 Miyake T, Nakamura S, Zhao M, So K, Inoue K, Numata T, Takahashi N, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S: Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nat Commun*, 7: 12840 (2016)

等 31 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/channel/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：永安 一樹

ローマ字氏名：Kazuki Nagayasu

所属研究機関名：京都大学

部局名：薬学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：00717902

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中川 貴之

ローマ字氏名：Takayuki Nakagawa

研究協力者氏名：白川 久志

ローマ字氏名：Hisashi Shirakawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。