

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07545

研究課題名(和文) 光遺伝学・ゲノム編集を駆使したセロトニン神経系の情動制御機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the serotonergic pathways underlying emotional functions using optogenetics and genome editing

研究代表者

大村 優 (Ohmura, Yu)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：80597659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光遺伝学とCRISPR/Cas9を用いてセロトニン神経の情動調節機構解明に取り組んだ。その結果、正中縫線核-腹側海馬、背側縫線核-腹側被蓋野/黒質、背側縫線核-視床下核という異なるセロトニン神経経路が、それぞれ不安様行動、抗うつ様作用、衝動性抑制作用に関与していることを明らかにした。さらに、不安様行動の誘発には5-HT_{2C}受容体が必要であること、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)の抗うつ様作用は背側縫線核の5-HT_{1A}受容体遺伝子をノックアウトすることで増強されること、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患の治療にはセロトニン神経に作用する薬が広く用いられているが、その治療効果は十分ではない上、しばしば重篤な副作用を引き起こす。これらの問題を解決するためには、それぞれの精神機能を支える明確なセロトニン伝達経路を特定する必要がある。今回の研究成果は、セロトニン神経経路や受容体サブタイプに特異的な治療法の必要性を示唆しており、より効果的で安全な治療法の開発に役立つ重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：We used optogenetic tools and CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing to manipulate serotonergic activity and a specific 5-HT receptor in mice. We found that different serotonergic terminals, ventral hippocampus, ventral tegmental area/substantia nigra, and subthalamic/paraventricular nucleus, are involved in regulating anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects, respectively. Furthermore, we found that the stimulation of the 5-HT_{2C} receptor is required to evoke anxiety-like behavior, but not to exert anti-impulsive effects. We also demonstrated that the antidepressant-like effect of a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) was enhanced by CRISPR/Cas9-mediated 5-HT_{1A} receptor gene knockout in the dorsal raphe nucleus.

研究分野：精神薬理学

キーワード：セロトニン 光遺伝学 オプトジェネティクス ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

セロトニンは情動制御因子として古くから注目されてきた。また、セロトニン神経系作用薬が精神疾患治療薬として既に使われていることから、セロトニン神経系による情動調節機構の解明は基礎科学的にも応用科学的にも重要な課題である。しかし、以下の2つの問題がこの分野の進展を妨げてきた。

- (1) 入力側の選択性：従来の電気刺激法ではセロトニン神経系を選択的に刺激できない。薬物投与方法では可逆性・時間的精密性に問題があり、選択性も十分ではなかった。
- (2) 受信側の選択性：従来の薬理学的操作では14種類も存在するセロトニン受容体サブタイプを脳部位・細胞種特異的に操作することが不可能であった。

本研究では、問題(1)に対しては光遺伝学、問題(2)に対してはCRISPR/Cas9によるゲノム編集を用いて、上記の問題を全て解決しようとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、セロトニン神経系の担う情動機能のうち、不安・抑うつ・衝動性の3つについて、それぞれに関わるセロトニン神経回路を入力元から受信に至るまで全てを明らかにすることであった。

しばしば指摘されるように、単純にセロトニン神経系全体を活性化、不活性化するだけでは「不安は緩和されたが衝動性は増加した」「抑うつ症状は緩和したが不安症状が悪化した」というような問題が生じる。本研究によって情動の種類ごとに神経回路を分離して理解することが出来るようになれば、この問題を回避することが可能になり、副作用が少なく、より効果的な治療薬開発への道筋を提示できるだろう。

3. 研究の方法

(1) 入力側の選択性を高めるために、光受容体チャネルロドプシン2(ChR2)の変異体(C128S)をセロトニン神経選択的に発現させた遺伝子改変マウスを用いて実験を実施した。この変異体は通常のChR2と同様に青色光に反応して開口して神経細胞の活動を上昇させるが、通常と異なり青色光照射を止めた後も持続的に開口して神経活動上昇を継続的に起こし、黄色光照射によって閉口して神経活動を元の状態に戻すことが出来る。この遺伝子改変マウスの脳の各部位に光ファイバーを埋め込み、脳内の特定の場所に光を当てることで、特定のセロトニン神経回路のみを活性化できる。

(2) 受信側の選択性を高めるために、Creタンパク存在下でspCas9を発現する遺伝子改変マウスを用いて実験を実施した。このゲノム編集技術は、真正細菌や古細菌が有する獲得免疫(ファージなどを介した外来DNAの排除機構)を応用した遺伝子操作技術である。標的とする遺伝子配列に対応するガイド配列とsgRNA, Cas9タンパクといった少数のモジュールによって、PAM配列(NGG)さえ含めばどの遺伝子配列も切断できるため、理論上は遺伝子ノックアウトが低コストで可能である。このマウスの特定の脳部位にsgRNAとガイド配列を発現するウイルスベクターを注入することで、特定脳部位の特定のセロトニン受容体サブタイプ遺伝子をノックアウトすることが出来る。

不安様行動の測定には高架式十字迷路試験を、うつ様行動の測定には強制水泳試験を用いた。衝動的行動の測定には我々が開発した3-選択反応時間課題を用いた。高架式十字迷路はマウスが壁のない開けた場所を嫌うことを利用した試験系であり、マウスが壁の無い場所に滞在した時間を不安の指標とする。強制水泳試験は、マウスが水から逃れようとすることを利用した試験系であり、小型の水槽に入れられたマウスが逃げるのを諦めてただ水上に浮かんでいる時間(無動時間)をうつ様状態の指標とする。3-選択反応時間課題は、いわば犬に教えるような「待て」をマウスに教え込むようなものである。この課題はオペラント箱で行われ、オペラント箱の前方に3つの穴があり、後方に給餌箱が設置されている。前方の3つの穴のうち1つが短時間点灯し、点灯した穴にマウスが鼻先を入れると餌が供給されるようにプログラムされている。穴が点灯するまでには待ち時間があり、点灯前に待ちきれずに鼻先を入れること(「待て」の失敗)を衝動的行動とみなす。

これらの行動試験について、上記(1),(2)の方法を適用してセロトニン神経系を操作し、行動試験中の行動が変化するかどうかを観察した。

4. 研究成果

(1) 高架式十字迷路試験実施中に光遺伝学を用いて腹側海馬に投射するセロトニン神経の活動を増加させると、マウスの不安様行動が増加することを見出した。一方、扁桃体や腹側被蓋野などのセロトニン神経終末を操作しても不安様行動に変化はなかった。また、腹側被蓋野に投射するセロトニン神経の活動増加によって、マウスのうつ様行動が減少することを見出した。一方、

扁桃体や腹側海馬などのセロトニン神経終末を操作しても、うつ様行動に変化はなかった。さらに、視床下核に投射するセロトニン神経の活動増加によってマウスの衝動的行動が減少することを見出した。一方、扁桃体のセロトニン神経終末を操作しても衝動的行動に変化はなかった。これまでの結果と考え合わせると、正中縫線核から腹側海馬へのセロトニン神経投射が不安を制御し、背側縫線核から腹側被蓋野へのセロトニン神経投射がうつ様行動を制御し、背側縫線核から視床下核へのセロトニン神経投射が衝動的行動を制御しているものと推定できる。このように、当初の計画通り、光遺伝学によるセロトニン神経の選択的操作によって不安、抑うつ、衝動性を制御するセロトニン神経回路を解明することに成功した。

さらに、関連するセロトニン受容体を特定するために、セロトニン 5-HT_{2C} 受容体欠損マウスを用いたところ、正中縫線核のセロトニン神経活動増加による不安惹起作用が 5-HT_{2C} 受容体欠損マウスでは消失していることが示された。さらに 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬を腹側海馬に局所投与した際にも同様の消失が観察されたことから、正中縫線核からのセロトニン神経投射が腹側海馬で 5-HT_{2C} 受容体を刺激することで不安様行動が増加するものと考えられる。ここまでの成果を論文としてまとめ、英文学術誌 *Neuropharmacology* に発表した。

(2) 特定脳部位の特定のセロトニン受容体サブタイプ遺伝子をノックアウトするための CRISPR/Cas9 技術を確認するため、まずは 5-HT_{1A} 受容体遺伝子のノックアウトを試みた。これは 2018 年 3 月まで助成を受けていた挑戦的萌芽研究 (16K15552) の続きでもある。5-HT_{1A} 受容体遺伝子をこの技術でノックアウトしたマウスの脳組織を使ってシークエンサーで DNA 配列を読むと、シークエンス波形の乱れが出ることを示した。これは遺伝子変異が生じていることを示唆する証拠である。さらに、背側縫線核 5-HT_{1A} 受容体をこの方法でノックアウトすることで、セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の抗うつ様作用が増強することを示した。これは既に先行研究での薬理学的研究で示されている現象と一致することから、*in vivo* での CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトがうまくいっていることを示唆している。挑戦的萌芽研究の成果にこれらの続きの成果を加えて論文としてまとめ、英文学術誌 *Brain Research* に発表した。(1) の成果も含めた発表成果のまとめを図 1 に示す。

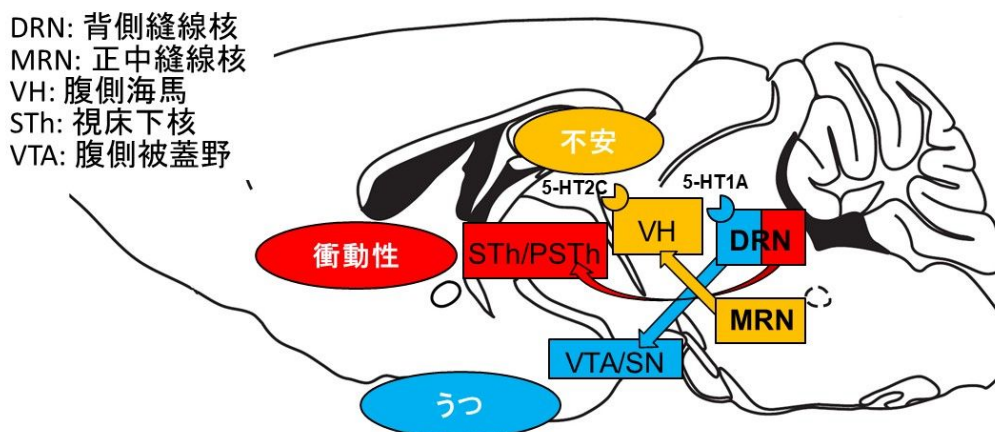


図1. 不安、うつ、衝動性を制御するセロトニン神経回路と受容体サブタイプ

また、先述のように、背側縫線核から視床下核に投射するセロトニン神経の活動増加によってマウスの衝動的行動が減少することを見出してきた。関連する 5-HT 受容体サブタイプをゲノム編集によって特定する前に、まず、各種 5-HT 受容体拮抗薬を視床下核に投与することでおおよその見通しを得ることを試みた。しかし、どの拮抗薬を用いても、背側縫線核刺激による衝動性抑制作用は減弱しなかった。

近年の研究によれば、背側縫線核のセロトニン神経はグルタミン酸を共放出することが示されていることから、可能性としてはグルタミン酸の関与が推測される。そこで方針を変え、ゲノム編集によってセロトニン合成酵素である TPH2 の遺伝子もしくは小胞性グルタミン酸トランスポーター-VGLUT3 の遺伝子をノックアウトし、セロトニンとグルタミン酸のどちらがこれまで観察してきた行動に関与するのかを探ることとした。ここではこれまで用いてきた spCas9 ではなく、その後見出された saCas9 を用いた。従来の spCas9 と比べて saCas9 は遺伝子配列が短く、ウイルスベクターで発現させることが出来る。この方法が実現できれば、遺伝子改変マウスを維持するコストを減らすことが出来る。その予備検討として免疫染色によるタンパク発現の欠損確認を行い、TPH2 に関してはゲノム編集によって TPH2 発現が減少していることを確認できた。同様に saCas9 を用いて VGLUT3 のノックアウトを試みたが、VGLUT3 については設計したガイド配列のいずれにおいてもゲノム編集を生じさせることが出来なかった。これらの試みについては今後の課題とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nebuka Mao, Ohmura Yu, Izawa Shuntaro, Bouchekioua Youcef, Nishitani Naoya, Yoshida Takayuki, Yoshioka Mitsuhiro	4. 巻 379
2. 論文標題 Behavioral characteristics of 5-HT2C receptor knockout mice: Locomotor activity, anxiety-, and fear memory-related behaviors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 112394 ~ 112394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2019.112394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishitani Naoya, Sasamori Hitomi, Ohmura Yu, Yoshida Takayuki, Yoshioka Mitsuhiro	4. 巻 141
2. 論文標題 Blonanserine suppresses impulsive action in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 127 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.09.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Izawa Shuntaro, Chowdhury Srikanta, Miyazaki Toh, Mukai Yasutaka, Ono Daisuke, Inoue Ryo, Ohmura Yu, Mizoguchi Hiroyuki, Kimura Kazuhiro, Yoshioka Mitsuhiro, Terao Akira, Kilduff Thomas S., Yamanaka Akihiro	4. 巻 365
2. 論文標題 REM sleep-active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1308 ~ 1313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aax9238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohmura Yu, Tsutsui-Kimura Iku, Sasamori Hitomi, Nebuka Mao, Nishitani Naoya, Tanaka Kenji F., Yamanaka Akihiro, Yoshioka Mitsuhiro	4. 巻 167
2. 論文標題 Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107703 ~ 107703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2019.107703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishitani Naoya, Ohmura Yu, Nagayasu Kazuki, Shibui Norihiro, Kaneko Shuji, Ohashi Akiko, Yoshida Takayuki, Yamanaka Akihiro, Yoshioka Mitsuhiro	4. 巻 1719
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing reveals that neuronal 5-HT1A receptors in the dorsal raphe nucleus contribute to body temperature regulation in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 243 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasamori Hitomi, Ohmura Yu, Yoshida Takayuki, Yoshioka Mitsuhiro	4. 巻 844
2. 論文標題 Noradrenaline reuptake inhibition increases control of impulsive action by activating D1-like receptors in the infralimbic cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 17 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.11.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yu Ohmura
2. 発表標題 Distinct serotonergic systems regulate anxiogenic, antidepressant-like, and anti-impulsive effects
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohmura Y, Tanaka F K, Yamanaka A, Yoshioka M.
2. 発表標題 Distinct serotonergic systems regulate anxiety, depression, and impulsivity.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasamori H, Ohmura Y, Yoshioka M.
2. 発表標題 Noradrenaline reuptake inhibition increases control of impulsive action by activating D1-like receptors in the infralimbic cortex.
3. 学会等名 The 15th International Neuroscience and Biological Psychiatry Regional ISBS Conference (Asia) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関