

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14919

研究課題名（和文）幹細胞技術と光遺伝学を用いた細胞移植によるうつ病治療への挑戦

研究課題名（英文）Identification of antidepressive serotonin projection as a possible target of cell transplantation therapy

研究代表者

永安 一樹 (Nagayasu, Kazuki)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00717902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：解剖学的にも機能的にも多様なセロトニン神経回路網から、抗うつ作用を司るセロトニン神経回路を光遺伝学的手法を用いて探索し、背側縫線核 腹側被蓋野セロトニン神経がアンヘドニアの抑制作用を有する可能性を示唆する結果を得た。また、ヒト幹細胞のセロトニン神経への分化誘導手法の条件検討および分化後神経の機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セロトニン神経自体も、その受容体であるセロトニン受容体も、脳全体に広く投射、分布していることから、セロトニン神経全体の活性化や、脳全体のセロトニン受容体の刺激/阻害のみでは、副作用なく抗うつ作用のみを引き起こすことは困難である。本研究により、各セロトニン神経投射の個別の機能解析が可能となり、報酬効果に関わる投射の同定に至ったことから、今後同様の解析を継続することで、副作用なく抗うつ作用のみを引き起こす医薬品の開発に資する知見を得ることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Major depression and anxiety disorders are a social and economic burden worldwide. Serotonergic signaling has been implicated in the pathophysiology of these disorders and thus has been a crucial target for pharmacotherapy. However, the precise mechanisms underlying these disorders are still unclear. Here, we used species-optimized lentiviral and adeno-associated viral vectors, capable of efficient and specific transduction of serotonergic neurons in mice and rats for elucidation of serotonergic roles in anxiety-like behaviors and active coping behavior in both species. By using these vectors, we found that activation of dorsal raphe serotonin neurons elicited rapid antidepressant-like effect in mice and rat and that activation of VTA-projecting dorsal raphe serotonin neurons induced strong reward-like effect.

研究分野：薬理学

キーワード：セロトニン 抗うつ薬 光遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体は、複数の臓器が密接に連携しあうことで個体としての機能を保っている。その機能欠損は、個体の生命機能に大きな障害をもたらす、疾患の発症につながる。2004年にWHOがまとめた、健康寿命の損失を評価に加えた疾患負荷の統計によると、先進国における疾患負荷の最大の原因が、うつ病であることが示されている。従って、うつ病の治療満足度の向上は、健康寿命の延長に資する重要な課題であると考えられる。

うつ病の治療法としては、抗うつ薬による薬物療法が主流であるが、定義によるものの約30%の患者が治療抵抗性を示すことが大きな問題となっている。この治療抵抗性うつ病を克服する上で、電気けいれん療法や、脳内に電極を埋め込み持続的に刺激を行う脳深部刺激療法が有効であることが示されている (Mayberg et al., *Neuron*. 2005)。しかし、電気けいれん療法では記憶障害の副作用が見られることや繰り返しの処置が必要であること (The UK ECT Review Group, *Lancet*. 2003)、脳深部刺激では留置した電極への感染や (Mayberg et al., 2005) 周囲の電磁波による誤作動の危険性があることが問題となる。従って、高い有効性と安全性を併せ持ち、副作用が少ない新たなうつ病治療選択肢の創出は、うつ病の治療満足度の向上に大きく貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、開発してきたセロトニン神経特異的ウイルスベクターと、光照射時のみ神経を活性化できる ChR2 を用いた光遺伝学的解析を組み合わせ、どこからどこへ投射するセロトニン神経回路が、副作用なくストレス耐性獲得を引き起こすか解明し、同定した投射先にヒト iPS 細胞由来セロトニン神経を移植することで、慢性ストレス負荷マウスで見られる行動異常を正常化できるか明らかにする。これらを通じストレス耐性セロトニン回路を同定しその機構を解明するとともに、前臨床において細胞移植によるうつ病治療の可能性を検証する。

3. 研究の方法

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、レンチウイルスベクター (LVV) を DRN (ラット: プレグマより、AP -7.7 mm, ML 0 mm, DV +7.0 mm、新生仔ラット: ラムダより、AP +1.4 mm, ML 0 mm, DV +6.0 mm、マウス: プレグマより 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、全ての動物は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 の投与および光ファイバーの設置に失敗した動物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 μ m 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 $^{\circ}$ C で保存した。LVV の力価を p24ELISA (BioAcademia、大阪) により測定し、約 4.5×10^{10} 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

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。

一方、上記のレンチウイルスベクターを用いた場合の外來遺伝子の発現量は、軸索終末の光刺激には十分ではないことが、免疫組織化学的解析の結果より示唆され、特異性を維持しながら、その発現量を向上させる必要があると考えられた。そこで、濃縮による高タイターウイルスの取得が容易なアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)による、セロトニン神経特異的遺伝子発現を行った。上記と同じ TPH2 遺伝子プロモーターを含む AAV を作製し、マウス背側縫線核に投与したのち、免疫組織化学的手法によりその特異性を評価した。その結果、LVV を用いた場合とほぼ同等あるいはそれ以上の高い特異性(95.5%)を有しながら、軸索終末においても外來遺伝子の発現が確認できるような、高い遺伝子発現を引き起こすことができることが明らかになった。次に、この AAV を用いて、うつ病の一症状であるアンヘドニアを抑制し得るような、報酬効果を有するセロトニン神経投射の同定を行った。DRN セロトニン神経の密な投射が見られる複数の神経核に光ファイバーを埋め込み、DRN セロトニン神経の各神経核における終末を選択的に刺激/抑制した際の、報酬/嫌悪効果について条件付け場所嗜好性試験、オペラント装置を用いた自己刺激実験を用いて評価した。その結果、腹側被蓋野に投射するセロトニン神経を刺激することで顕著な報酬作用が引き起こされた一方、同投射を抑制することで顕著な嫌悪作用が引き起こされた。これらの結果は、DRN 腹側被蓋野セロトニン神経投射が、報酬と嫌悪の制御において重要な働きをしていることを示している。

ヒト幹細胞をセロトニン神経へと迅速に分化誘導するため、セロトニン神経発生における重要な転写因子群を幹細胞に過剰発現させたところ、2 種類の転写因子の発現のみで、2 週間以内にセロトニン神経が得られることを見出した。さらに、得られた細胞の機能解析、分化条件の検討を行い、得られた神経がセロトニン合成能、遊離能、神経としての活動性を有していること、本分化系が細胞外因子の影響を受けづらい高い頑健性を有するものであること、をそれぞれ見出した。本成果により、細胞移植によるうつ病治療の可能性についての検証が可能になったと考

えられることから、今後、同定した投射先に分化細胞を移植した際の行動学的変化を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 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	4. 巻 44
2. 論文標題 Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology.	6. 最初と最後の頁 721-732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-018-0254-y.	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 該当する
1. 著者名 Asaoka N, Nishitani N, Kinoshita H, Nagai Y, Hatakama H, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S	4. 巻 6
2. 論文標題 An Adenosine A2A Receptor Antagonist Improves Multiple Symptoms of Repeated Quinpirole-Induced Psychosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0366-18.2019.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0366-18.2019.	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 Andoh C, Nishitani N, Hashimoto E, Nagai Y, Takao K, Miyakawa T, Nakagawa T, Mori Y, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S.	4. 巻 1704
2. 論文標題 TRPM2 confers susceptibility to social stress but is essential for behavioral flexibility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 68-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.09.031	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 Isami K, Imai S, Sukeishi A, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S.	4. 巻 74
2. 論文標題 The impact of mouse strain-specific spatial and temporal immune responses on the progression of neuropathic pain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Behav Immun.	6. 最初と最後の頁 121-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2018.08.013.	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 Tsutsui M, Hirase R, Miyamura S, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, Shirakawa H, Kaneko S.	4. 巻 38
2. 論文標題 TRPM2 Exacerbates Central Nervous System Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Increasing Production of CXCL2 Chemokines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 8484-8495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2203-17.2018.	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7件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kazuki Nagayasu, Shuji Kaneko
2. 発表標題 The role of serotonin in emotion and decision making
3. 学会等名 The 92nd Annual Meeting of the JPS (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤千紘、西谷直也、澁井紀宏、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 セロトニン神経伝達の亢進が悲観的な意思決定に及ぼす影響
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田沙也香、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 A1型活性化アストロサイトにおけるサイトカイン産生メカニズムの解析
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮村咲映、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 マウス多発性硬化症モデルにおけるTRPC3/6 の役割
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田沙織、富澤恵里、三宅崇仁、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 ミクログリアにおけるTRPV4 刺激によるIL-10 産生メカニズムの解析
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋佳奈、出屋敷綾音、三宅崇仁、永安一樹、柴崎眞志、白川久志、金子周司
2. 発表標題 オリゴデンドロサイト前駆細胞におけるTRPV4開口は増殖を促進する
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kawai, Nozomi Asaoka, Takahito Miyake, Kazuki Nagayasu, Takayuki Nakagawa, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko
2. 発表標題 Neurotrophin inhibits neuronal activity through potentiation of sustained Kv currents in primary cultured DRG neurons
3. 学会等名 18th World Congress of basic and clinical pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/channel/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----