

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17078

研究課題名（和文）負の情動と関連した注意選択を担うセロトニン神経回路の解明

研究課題名（英文）Identification of the serotonergic circuit responsible for selective attention associated with aversive stimuli

研究代表者

西谷 直也（Nishitani, Naoya）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：30824792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：負の情動と関連した感覚刺激による注意選択の阻害を評価する実験系を開発し、セロトニン神経の役割を解明することを目指した。この実験系を確立する過程で、空腹時のエサ獲得、すなわち、非常に注意を集中させている場合には、電気ショックと関連させた音であっても、その入力を遮断している可能性が示唆された。そこで、回し車回転行動を報酬とした課題を作製し、その基本的性質を調べ、回し車回転行動への欲求や報酬効果は、エサの場合と同様にドーパミン神経伝達によって制御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

不安障害やうつ病患者では、負の情動と関連した感覚刺激に対し、無視すべき状況でも強く注意を引かれてしまうことが知られる。この注意選択の異常は、治療の障壁や再発リスクとなる。本研究により、マウスにとって生命維持に重要であるエサを報酬とした場合には、不要な刺激が遮断されることが示唆された。一方、娯楽である回し車を報酬とした課題を作成することで、人間が日常生活で発揮するものにより近い注意機能の評価が可能であることが示唆されたことから、これを応用した課題を確立することで、負の情動と関連した感覚刺激による注意選択の阻害を適切に評価できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a new behavioral test to assess the inhibition of selective attention by sensory stimuli associated with aversive events and clarify the role of the serotonergic system. We found that the input of auditory stimulus, even though it was associated with electric shocks, might be blocked when the mice highly focused on the visual stimuli related to reward. In addition, we tried to knock out the serotonergic receptors to clarify their roles in selective attention and successfully achieved in vivo genetic manipulation of the 5-HT1A receptor in a specific brain area and cell type.

研究分野：神経薬理学

キーワード：5-HT 注意

1. 研究開始当初の背景

不安障害やうつ病の治療満足度は依然として低いままである。その一因は、現存の治療法では認知機能の障害が改善しないことにあると考えられる。認知機能の障害は発症エピソードに先行し、寛解期にも残存して再発リスクとなるため、病態の根幹であると指摘されている [Peters et al. 2016]。不安障害・うつ病患者では、不安や恐怖などの負の情動と関連した感覚刺激に対し、無視すべき状況でも強く注意をひかれるという注意選択の異常が知られ、この認知の偏りによって生じる悪循環が病態の根底にあると考えられている [Phillips et al. 2010]。不安障害やうつ病患者に使用される治療薬の多くはセロトニンを増加させるが、寛解後の患者でもこの注意選択の異常は改善していない [Peckham et al. 2010]。また、ヒトを対象とした研究では、細胞外セロトニン濃度の増加は上記の様な注意選択の異常と関連することが報告されている [Fox et al. 2011]。したがって、全脳のセロトニン増加は気分を改善するものの、注意機能は改善できない、あるいは悪化させるために、社会復帰を目指す治療戦略としては不十分であると考えられる。根本治療を目指すには、注意選択の異常を引き起こすセロトニン神経回路を解明した上で、その回路を回避、もしくは抑制出来る介入方法の発見が重要となる。しかし、介入による神経回路の研究が可能なのが歯類では、負の情動と関連した注意選択の評価系が存在しないため、研究が進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、従来情動制御を担うとされてきたセロトニン神経が負の情動と関連する注意選択異常に関わる回路であるという仮説を立て、その検証を試みる。この神経回路の活動を光遺伝学的手法、覚醒下での *in vivo* Ca²⁺イメージング法などにより直接的に観察・操作し、負の情動と関連した注意選択を担う神経基盤を解明し、ストレスによるこの神経回路の機能変化に注意選択障害の原因を探る。これにより、単純なセロトニン増加が不安障害やうつ病の治療につながるという既成概念からの脱却を目指し、不安や抑うつ気分の改善と注意機能の改善を両立させる治療法への手掛かりを得ようとするものである。

3. 研究の方法

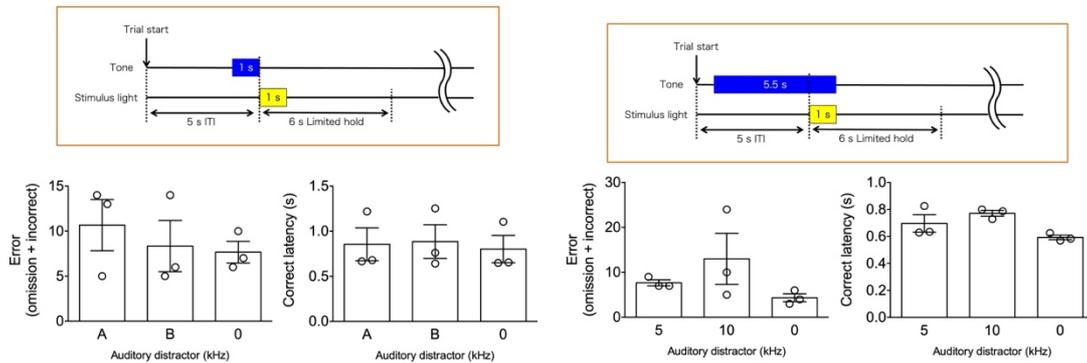
実験には、C57BL/6N 系雄性マウス (8 週齢以上) を使用した。注意機能の測定には 3-選択反応時間課題を用いた。この課題の訓練中は、マウスを元の体重の 85% となるように摂餌制限を行った。実験には Med Associates 社のオペラントボックスを使用した。この課題では、課題の開始後にボックス内の明かりが消え、5 秒の待ち時間の後、ボックス前方に設置された 3 つの穴の中にあるライトがどれかひとつ 1 秒間点灯し、その間を含め 6 秒以内に正しい穴に鼻先を挿入できれば、ボックス後方からペレットが与えられた。ライトが点灯していない穴に鼻先を挿入した場合を *incorrect response*、点灯中に鼻先を挿入しなかった場合を *omission* として、全試行中におけるこれら *error* 数の割合、および正解するまでの潜時 (*correct latency*) を注意機能の指標として用いた。恐怖条件付けには音刺激をキューとして用いる音恐怖条件付けを用いた。フットショックには、足場がグリッドとなったボックスを用いた。30 秒間の音によるキューを提示し、最後の 2 秒間では同時に電気ショックを与え、キュー提示中、およびキュー非提示中のすくみ行動時間を計測した。CRISPR/Cas9 を用いた 5-HT1A 受容体の KO には、C57BL/6N をバックグラウンドとした Cre 依存的 Cas9 ノックインマウスを用いた。このマウスの背側縫線核 (AP: -4.5 mm, ML: 1.5 mm, DV: 2.8 mm, 30°) にマウスの 5-HT1a 受容体遺伝子を標的とした sgRNA (*sgHtr1a*) を有するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、AAV:ITR-U6-sgHtr1a-hSyn-Cre-2A-EGFP-KASH-WPRE-shortPA-ITR を 300 nL 投与した。その後の実験は AAV ベクター投与 6 週間後から行った。

4. 研究成果

負の情動と関連した注意選択の評価系を構築するための事前検討として、条件付けを行っていない中性な音を阻害因子として用いた場合の注意選択への影響について検討した。3-選択反応時間課題において、穴のライトが点灯する前の 5 秒間の待ち時間のうち、最後の 1 秒間に 0 kHz, 8 kHz, 16 kHz の音刺激を提示した際の不正解率、および正解するまでの潜時を評価した。その結果、いずれの周波数の音においても、阻害因子である音提示を開始した初期には不正解数が多い傾向が観察されたが、全体として不正解率および正解するまでの潜時に変化は観察されなかった。次に、阻害因子である音提示の時間を延長し、5 秒間の待ち時間と穴のライト点灯開始から 0.5 秒間の計 5.5 秒間の提示に変更した。この場合でも、不正解率および正解するまでの

潜時に変化は観察されなかった。以上の結果より、情動に関する情報を付加していない音を提示した際には、注意選択の機能は障害されないことが示唆された。

次に、音恐怖条件付けの際に用いた音刺激により注意選択機能が障害されるかについて検討を行った。まず、フットショックの条件について最適化を行った。フットショックの強さについて 0.2 mA, 0.4 mA, 0.6 mA の 3 種類を検討し、0.4 mA および 0.6 mA ですくみ行動が誘発されることを確認した。恐怖条件付けにおけるすくみ行動時間が長すぎる場合、注意選択課題中にもすくみ行動が誘発され課題自体を行わない可能性が懸念されたため、0.4 mA を用いて情動に関連する音刺激による注意選択阻害について検討を行うこととした。まず 3-選択反応時間課題を訓練したマウスにおいて、訓練時とは異なる環境下で音恐怖条件付けを行った。その後、3-選択反応時間課題中の穴のライトが点灯する前の 5 秒間の待ち時間のうち、最後の 1 秒間に恐怖条件付けに用いた音刺激と、条件付けに用いていない中性な音刺激をそれぞれ提示し、不正解率および正解潜時を評価した。その結果、恐怖条件付けに用いた音刺激を提示した場合と中性的な音を提示した場合で有意な差は見られなかった。次に、フットショックの強度を 0.6 mA に変更し同様の検討を行ったが、この場合もそれぞれの評価項目に有意な差は観察されなかった。



音刺激が注意機能に与える影響の検討

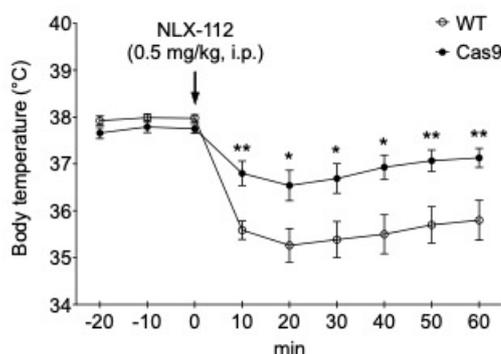
左: A (5 or 8 kHz), B (10 or 16 kHz) の音刺激を 1 秒間提示した場合の不正解率と正解潜時 (n=3)

右: 5 kHz あるいは 10 kHz の音刺激を 5.5 秒間提示した場合の不正解率と正解潜時 (n=3)

上記の検討と並行して、マウスを用い、詳細な神経活動の観察や操作が可能な頭部固定下で“2-選択反応時間課題”と“音恐怖条件づけ”を組み合わせた新たな注意選択課題の開発を試みた。まず、頭部固定化にて左右のレバー押しによる 2-選択反応時間課題の構築を目指した。この課題では、ライトが光った方のレバーを押すことでスクロース水が与えられる。この条件で、自由行動下での 3-選択反応時間課題と同様のスケジュールで訓練を続けたが、マウスはランダムにレバーを押すのみであり、学習が成立しなかった。そのため、レバー押し以外の行動を利用して課題を作成する必要があると考えられた。

上述の恐怖条件付けと 3-選択反応時間課題を組み合わせた課題において、恐怖条件時に使用した音刺激によっても、注意選択が障害されないことが明らかとなった。この原因の一つとして、3-選択反応時間課題ではマウスを通常時の 85% 程度の体重まで摂餌制限しているため、エサへの欲求が大きすぎるために、マウスが報酬に関連する光刺激に集中しすぎ、電気ショックと関連する音刺激に注意を引かれなかったことが考えられた。そこで、新たに回し車(ランニングホイール; RW)の回転行動を報酬とした課題を設計することとした。これまでに、マウスはエサなどの報酬がなくても RW を執拗に回転させることが知られており [Sherwin 1998]、これは、RW 回転行動がマウスにとって報酬として働くことによることが示されている [Iversen 1993]。そこで、RW 回転行動を報酬としたオペラント課題を構築し、その報酬効果や欲求に対する基礎的な検討を行った。2つ設置されたうちの片方の穴に鼻先を挿入すれば RW を 1 分間回転できるような課題を設計し、必要な鼻先挿入回数を 1, 3, 5, 10 と段階的に増加させたところ、マウスは必要数に応じて頻繁に鼻先挿入を行うようになることを確認した。注意選択機能を評価する前に、RW 回転行動による報酬効果および RW 回転行動に対する欲求がエサと同様にドーパミン神経伝達を介したものであるかどうかを検討した。上記の RW 回転行動を報酬としたオペラント課題を十分に訓練し、鼻先挿入回数が安定したマウスを用いて、ドーパミン D1 受容体アンタゴニスト (SCH23390)、および D2 受容体アンタゴニスト (raclopride) を全身投与したところ、D1 受容体アンタゴニスト投与により、欲求の程度の指標と考えられる鼻先挿入回数、および報酬消費行動あるいは運動機能の指標と考えられる 1 回あたりの回転時間が有意に減少した。また、D2 受容体アンタゴニスト投与により鼻先挿入回数のみが有意に減少した。以上の結果より、D1、D2 受容体を介した神経伝達が、RW 回転行動に対する欲求や報酬消費行動に重要であることが明らかとなった。この課題を応用し、生命維持に関わる摂餌の代わりに、娯楽である回し車を報酬として、注意選択機能を評価することにより、人間が日常生活で発揮するものと同程度の注意機能を評価することが可能であると考えられる。

また、注意選択機能における 5-HT 受容体の役割を検討するために、CRISPR/Cas9 技術を用いた *in vivo* の 5-HT 受容体欠損について検討を行った。5-HT 受容体は 14 サブタイプが同定されているが、これらの役割を検討するために、それぞれの受容体への選択性の高い薬物を用いた薬理的検討やノックアウトマウスを用いた検討がこれまで行われてきた。しかし、全ての受容体に対して選択性の十分に高い阻害薬が存在しないことや、それぞれの受容体をノックアウトしたマウスを用いた検討は作製・飼育費用の観点からも現実的ではないことから、より簡便に 5-HT 受容体の役割を解析できる方法が必要であった。そこで、CRISPR/Cas9 技術を用い、成体マウスの特定の脳部位において 5-HT 受容体をノックアウトすることを目指した。5-HT_{1A} 受容体は、体温調節における機能がよく知られており、5-HT_{1A} 受容体アゴニストを全身投与することで、体温が低下することが報告されている。そこで、はじめに 5-HT_{1A} 受容体を標的として、機能的ノックアウトが可能かどうかを検討した。マウス 5-HT_{1A} 受容体遺伝子、*Htr1a* を標的とするガイド RNA を 3 種類作製し、標的配列-EGFP を強制発現させた HEK 細胞を用いて、切断効率を調べたところ、全てのガイド RNA で同程度の切断効率であることが示された。そこで、ガイド RNA₁ を使用して、移行の検討を行うこととした。次に、ガイド RNA₁ と神経細胞特異的に *cre* リコンビナーゼを同時に発現する AAV: ITR-U6-sgHtr1a-hSyn-Cre-2A-EGFP-KASH-WPRE-shortPA-ITR を Cre 依存的 Cas9 ノックインマウスの背側縫線核に投与したところ、Cre と Cas9 が共局在することが確認できた。AAV ベクターを投与した背側縫線核からゲノム DNA を抽出し、*resolvase* および TIDE analysis を用いた変異導入の確認を行ったところ、約 10-20% 程度の切断効率であることが示された。この AAV を用いて、背側縫線核の 5-HT_{1A} 受容体をノックアウトしたマウスに対し、5-HT_{1A} 受容体アゴニストである NLX-112 を投与したところ、コントロール AAV ベクターを投与したマウスと比較し、有意に体温低下が抑制されることが明らかとなった。以上より、今回用いた方法で 5-HT_{1A} 受容体を機能的にノックアウトすることが可能であることが示唆された。この手法を他の 5-HT 受容体に応用することで、負の情動を担う注意選択機能における 5-HT 受容体の役割を解明することが可能であると考えられる。負の情動と関連した注意選択の評価系の確立には至らなかったものの、本成果により、生命維持に直結するような環境下でエサを報酬とした課題では、注意選択は障害されにくいことが明らかとなり、マウスを用いて RW 回転行動を報酬とした注意選択課題を確立することで、より人の日常生活での注意選択を反映するような注意機能を評価できる可能性が考えられた。AAV ベクターを用いて、CRISPR/Cas9 による特定の脳部位での 5-HT 受容体ノックアウト手法も確立できたことから、今後負の情動と関連する注意選択機能における 5-HT の役割について明らかにしていきたい。



NLX-112 投与時の体温変化
 NLX-112 (0.5 mg/kg, i.p.) 投与によって、5-HT_{1A} ノックアウト AAV ベクターを背側縫線核へ投与した Cas9 ノックインマウスでは、WT マウスに比べ体温低下が有意に抑制された。

n = 8-10

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chu Jinling, Deyama Satoshi, Li Xueting, Motono Mei, Otoda Atsuki, Saito Atsushi, Esaki Hirohito, Nishitani Naoya, Kaneda Katsuyuki	4. 巻 743
2. 論文標題 Role of 5-HT1A receptor-mediated serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex in acute restraint stress-induced augmentation of rewarding memory of cocaine in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135555 ~ 135555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.135555	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 Nagai Yuma, Takayama Kaito, Nishitani Naoya, Andoh Chihiro, Koda Masashi, Shirakawa Hisashi, Nakagawa Takayuki, Nagayasu Kazuki, Yamanaka Akihiro, Kaneko Shuji	4. 巻 21
2. 論文標題 The Role of Dorsal Raphe Serotonin Neurons in the Balance between Reward and Aversion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2160 ~ 2160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21062160	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 Nishitani Naoya, Sasamori Hitomi, Ohmura Yu, Yoshida Takayuki, Yoshioka Mitsuhiro	4. 巻 141
2. 論文標題 Blonanserin 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 Nagai Yuma, Nishitani Naoya, Yasuda Masaharu, Ueda Yasumasa, Fukui Yuto, Andoh Chihiro, Shirakawa Hisashi, Nakagawa Takayuki, Inoue Ken-ichi, Nagayasu Kazuki, Kasparov Sergey, Nakamura Kae, Kaneko Shuji	4. 巻 518
2. 論文標題 Identification of neuron-type specific promoters in monkey genome and their functional validation in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 619 ~ 624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.08.101	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河合洋幸、永井佑菜、好田匡志、西谷直也、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 正中縫線核セロトニン神経-脚間核経路の報酬制御における役割の解明
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤千紘、萩原雅子、西谷直也、永安一樹、白川久志、金子周司
2. 発表標題 うつ病の分子メカニズム解明へ向けた背側縫線核セロトニン神経特異的な網羅的遺伝子発現変動解析
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakuri/

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