

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713043

研究課題名(和文) オプトジェネティクスによる「うつ病のセロトニン仮説」への挑戦

研究課題名(英文) Testing serotonin hypothesis of depression with optogenetics

研究代表者

大村 優 (Ohmura, Yu)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80597659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：「脳内セロトニンが減るとうつ病になり、脳内セロトニンが増加すればうつ病は改善する」という「うつ病のセロトニン仮説」は一般に広く信じられている。しかし、この仮説は1950年代から存在しているにも関わらず、セロトニンとうつ病もしくはうつ様症状を直接的に結び付ける決定的証拠はいまだに存在しない。本研究は近年発展著しい光遺伝学を用いてこの仮説の検証に取り組んだ。セロトニン神経活動を光照射のON/OFFで操作できる遺伝子改変マウスを用いて脳内セロトニン遊離量を一過性に増加させたところ、マウスのうつ様行動が減少した。しかし、逆に脳内セロトニン遊離量を低下させても、マウスのうつ様行動は増加しなかった。

研究成果の概要(英文)：“Serotonin hypothesis of depression” - decreased serotonin levels in the brain cause depression while increased serotonin levels in the brain attenuate depression - has been widely believed. However there is so far no direct evidence proving the relationships between serotonin and depression/depressive symptoms though the hypothesis was proposed in the 1950s. We addressed this issue by using recently-developed optogenetic tools. We used transgenic mice to manipulate serotonergic activity with light illumination. Our results demonstrated that optogenetic activation of serotonergic neurons decreased depressive-like behavior in mice while optogenetic suppression of serotonergic neurons did not affect it.

研究分野：精神薬理学

キーワード：うつ病 光遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

「脳内セロトニンが減るとうつ病になり、脳内セロトニンが増加すればうつ病は改善する」という非常に単純な「仮説」は一般に広く信じられている。この仮説は主にセロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)が細胞外セロトニン濃度を増加させるという実験的事実と、SSRIがうつ病の治療に有効であるという臨床的知見に依拠している。しかし、この仮説は少なくとも1950年代から存在している(e.g. Kuhn, 1958)にも関わらず、セロトニンとうつ病もしくはうつ様症状を直接的に結び付ける決定的証拠はいまだに存在しない。しかも、直接の関係性を否定する証拠も近年報告されている。例えば、前脳に投射するセロトニン神経の起始核の一つである背側縫線核のセロトニン神経を破壊しても、うつ様行動は増加しない(Lieben et al., 2006)。さらに、うつ様症状の一側面を担うとされる学習性無力感は背側縫線核におけるセロトニン遊離量の低下ではなく、増加によって形成される可能性が示されている(Amat et al., 2005)。このように、議論が50年以上続いているにも関わらず、セロトニンとうつ病の関係については今なお結論を得られていない。これまでの研究には以下のような問題点があるため、結論を導くに至っていないと考えられる。

- 薬物による不可逆的なセロトニン神経破壊は選択性に問題がある上に、二次的な神経システムの変化を引き起こすことがある。
- SSRIは必ずしもセロトニン遊離量のみを増やすものではない。例えばフルボキサミンはシグマ受容体への結合能を持つ。また、SSRIによるセロトニン遊離量の上昇は数時間にわたる持続的なものであり、生理学的なセロトニン遊離の様相とは異なることが予想され、受容体の脱感作が生じる可能性もある。
- セロトニン神経活動および遊離量の記録は自然な状態を反映しているがあくまで関連研究であり、因果関係を示せない。

これらの問題は技術的な問題であり、当時の研究者には他に手段が無かった。しかし近年、光遺伝学(オプトジェネティクス)の発展により、これらの問題を全て解決できる可能性が生じた。研究協力者である田中謙二(慶應大学)と山中章弘(名古屋大学)は最近、遺伝子導入技術を駆使し、中枢セロトニン神経細胞にのみ光受容体であるチャンネルロドプシン2もしくはアーキロドプシンを発現するマウスを作製することに成功し、チャンネルロドプシン2発現マウスについては研究代表者がその妥当性をmicrodialysis法により確認した。チャンネルロドプシン2発現マウスでは、青色光照射によりチャンネルロドプシン2発現細胞にのみNa<sup>+</sup>イオンの細胞内流入が生じる

ため、選択的かつ可逆的にセロトニン神経の活動を上昇させることができる。また、時間的に精密な制御も可能である。便宜上、本報告書内ではこのマウスを「セロトニン神経活動上昇モデルマウス」と呼ぶこととする。さらに、その逆も別種のマウスを用いることで可能となる。セロトニン神経細胞特異的にアーキロドプシンを発現させるマウスでは、黄緑光照射によりプロトン細胞外に汲みだし、発現ニューロンを過分極させるため、選択的かつ可逆的にセロトニン神経の活動を抑制させることができる。このマウスを「セロトニン神経活動低下モデルマウス」と呼ぶことにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3つの問いに答えることであった。

- (1) 脳内セロトニン遊離量の増加はうつ様行動を減少させるのか?
- (2) 脳内セロトニン遊離量の減少はうつ様行動を増加させるのか?
- (3) 脳のどの部位のセロトニン遊離量の増減がうつ様行動に重要なのか?

(1) 前脳に投射するセロトニン神経の起始核は背側縫線核と正中縫線核である。どちらか片方ずつを青色光照射してセロトニン神経活動を増加させ、うつ様行動が減少するか否かを「セロトニン神経活動上昇モデルマウス」を用いて検証する。

(2) 次に、背側縫線核と正中縫線核のどちらか片方ずつを黄緑色光照射することによりセロトニン神経活動を低下させ、うつ様行動が増加するか否かを「セロトニン神経活動低下モデルマウス」を用いて検証する。

(3) さらに、縫線核のような起始核ではなく、セロトニン神経の投射先に光を照射することにより、脳のどの部位のセロトニン遊離が特にうつ様行動に重要なのかを特定する。

## 3. 研究の方法

うつ様行動の測定には主に尾懸垂試験、強制水泳試験を用いる。尾懸垂試験、強制水泳試験は逃避不可能なストレスを負荷された際の無動時間を測定し、行動学的絶望の程度を推し量るものである。

光照射のために、光ファイバーをマウス脳内に埋め込み留置する。その上で、上記行動測定中にLEDもしくはレーザー光源によってファイバー先端より青色光もしくは黄色光を照射する。

## 4. 研究成果

(1) 「セロトニン神経活動上昇モデルマウス」を用いて背側縫線核のセロトニン神経活動を青色光によって上昇させたところ、尾懸垂試験、強制水泳試験における無動時間の減少が観察された。つまり、セロトニン神経活動の増加がうつ様行動を抑制した。特に強制水泳試験では水泳行動 swimming の増加が観

察され、壁をよじ登ろうとする climbing 行動は変化しなかった。これは swimming がセロトニン神経系によって制御されているとする先行研究とも一致する。その一方で、正中縫線核のセロトニン神経活動を増加させても、尾懸垂試験、強制水泳試験における無動時間は変化しなかった。つまり、うつ様行動の変化は生じなかった。これは、背側縫線核のセロトニン神経が選択的にうつ様行動に参与していることを示唆している。

(2)「セロトニン神経活動低下モデルマウス」を用いた検証を行うために、その妥当性を microdialysis 法により確認した。縫線核黄色光照射によってセロトニン遊離の減少を確認し、良好な結果を得た。この結果に基づき、まずは背側縫線核のセロトニン神経活動を黄色光によって低下させたところ、強制水泳試験における無動時間は増加せず、むしろ減少することが観察された。詳細な行動解析を行ったところ、これは主に壁をよじ登ろうとする climbing の増加によることが判明した。Climbing はセロトニン神経ではなくノルアドレナリン神経系によって制御されていると考えられているため、セロトニン神経の活動抑制によってノルアドレナリン神経系の脱抑制が生じた可能性がある。一方で、正中縫線核のセロトニン神経活動を黄色光によって低下させたところ、強制水泳試験における無動時間は変化しなかった。以上の結果から、少なくとも短期的にはセロトニン神経活動の低下がうつ様行動を引き起こすことはないと考えられる。

(3)「セロトニン神経活動上昇モデルマウス」を用いてセロトニン神経投射部位での局所的な調節を行うために、まずは microdialysis 法により十分なセロトニン遊離量変化を起こせる条件を確認した。その結果、少なくとも前頭前野、扁桃体といった脳部位においては十分なセロトニン遊離量増加を投射部位への光照射によって引き起こせることを確認できた。この結果に基づき、前頭前野、扁桃体それぞれに光ファイバーを埋め込んでセロトニン神経活動を操作したが、強制水泳試験における無動時間の変化は生じなかった、先行研究によればこれらの脳部位はうつ様行動に参与する可能性が高いと示唆されていたため、意外な結果であった。この結果を踏まえ、背側線条体、側坐核、腹側海馬、中隔、腹側被蓋野/黒質といった情動行動との関連が示唆されている脳領域を網羅的に検討していった。これらの脳領域はどの領域もセロトニン神経投射を密に受けていることが分かっている。これらの脳領域に光ファイバーを埋め込んで青色光で刺激し、セロトニン遊離量を増加させた結果、腹側被蓋野/黒質を照射した場合にのみ、有意な行動変化が生じ、強制水泳試験における無動時間の減少が観察された。他の領域(背側線条体、側坐核、腹側海馬、中隔)を光照射しても行動変化は生じなかった。腹側被蓋野

/ 黒質を照射した場合の行動変化パターンは(1)での背側縫線核(セロトニン神経の起始核)刺激時の行動変化パターンと一致しており、背側縫線核から腹側被蓋野/黒質へのセロトニン神経投射がうつ様行動に重要であることが示唆された。

以上の結果から、「脳内セロトニンが減るとうつ病になり、脳内セロトニンが増加すればうつ病は改善する」という非常に単純な「仮説」は、前半は否定され、後半は部分的に支持された。ただし、長期的にセロトニン神経活動が低下した場合にうつ病を引き起こす可能性は残されている。

今回の成果によってうつ病に参与するセロトニン神経回路が部分的に解明された。今後はさらに参与する受容体の種類を解明することによって新規抗うつ薬開発への手掛かりを得ることが期待できるだろう。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Corresponding author の場合\*印をつけた。

Ohmura Y\*, Sasamori H, Tsutsui-Kimura I, Izumi T, Yoshida T, Yoshioka M.

Varenicline Provokes Impulsive Action by Stimulating  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Infralimbic Cortex in a Nicotine Exposure Status-Dependent Manner. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 査読有, 154, 2017, 1-10, DOI: 10.1016/j.pbb.2017.01.002

Ohmura Y\*, Yoshida T, Konno K, Minami M, Watanabe M, Yoshioka M. Serotonin 5-HT7 receptor in the ventral hippocampus modulates the retrieval of fear memory and stress-induced defecation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 査読有, 19, 2016, pyv131, DOI:10.1093/ijnp/pyv131

Chiba H, Mitsui T, Kitta T, Ohmura Y, Moriya K, Kanno Y, Yoshioka M, Shinohara N. The role of serotonergic mechanism in the rat prefrontal cortex for controlling the micturition reflex: an in vivo microdialysis study. *Neurourology and Urodynamics*, 査読有, 35, 2016, 902-907, DOI: 10.1002/nau.22843

大村優, 吉岡充弘: 縫線核セロトニン神経による情動調節機構 不安と恐怖の神経回路を分離して理解する. *日本薬理学雑誌*, 査読無, 149, 2017, 27 - 33, DOI: 10.1254/fpj.149.27

Warthen D, Lambeth P, Ottolini M, Shi Y, Barker B, Gaykema R, Newmyer B, Ohmura Y, Perez-Reyes E, Guler A, Patel M, Scott M. Activation of pyramidal neurons in mouse medial prefrontal cortex

enhances food seeking behavior while reducing impulsivity in the absence of an effect on food intake. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 査読有, 10, 2016, Article 63, DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00063  
Tsutsui-Kimura I, Ohmura Y, Izumi T, Matsushima T, Amita H, Yamaguchi T, Yoshida T, Yoshioka M. Neuronal codes for the inhibitory control of impulsive actions in the rat infralimbic cortex. *Behavioural Brain Research*, 査読有, 296, 2016, 361-372, DOI: 10.1016/j.bbr.2015.08.025  
Lyttle K, Ohmura Y\*, Konno K, Yoshida T, Izumi T, Watanabe M, Yoshioka M. Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. *Brain Research*, 査読有, 1616, 2015, 88-100, DOI:10.1016/j.brainres.2015.04.058  
Tsutsui-Kimura I, Yoshida T, Ohmura Y\*, Izumi T, Yoshioka M. Milnacipran remediates impulsive deficits in rats with lesions of the ventromedial prefrontal cortex. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 査読有, 18, 2015, pii: pyu083, DOI:10.1093/ijnp/pyu083  
Ohmura Y\*, Tanaka F K, Tsunematsu T, Yamanaka A\*, Yoshioka M: Optogenetic Activation of Serotonergic Neurons Enhances Anxiety-Like Behavior in Mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 査読有, 17, 2014, 1777-1783, DOI: 10.1017/S1461145714000637

〔学会発表〕(計4件)

大村優, 吉田隆行, 吉岡充弘: 恐怖記憶の想起・消去に関わるセロトニン神経系回路. 第90回日本薬理学会, 2017年3月15日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

大村優: 縫線核セロトニン神経による情動調節機構 - 光遺伝学を用いて -. 第89回日本薬理学会, 2016年3月11日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

大村優, 田中謙二, 木村生, 常松友美, 山中章弘, 吉岡充弘: 光遺伝学による中枢セロトニン神経の操作は不安および衝動性を変化させる. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

大村優: 光遺伝学による中枢セロトニン神経の選択的制御を用いてセロトニン再取り込み阻害薬の作用機序を考える. 第87回日本薬理学会, 2014年3月20日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 優 (OHMURA YU)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 80597659

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

田中 謙二 (TANAKA KENJI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 30329700

山中 章弘 (YAMANAKA AKIHIRO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号: 60323292