

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893204

研究課題名(和文) オプトジェネティクスを応用した特異的セロトニン神経刺激による強迫性障害の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the neural system of obsessive-compulsive disorder using the optogenetic stimulation of serotonergic neuron

研究代表者

酒井 雄希 (Sakai, Yuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：60714475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： 麻酔下マウスで海馬を対象としたオプトジェネティクス特異的刺激を行うことで、マウス機能的MRIで光刺激による変化を全脳評価できることが確認できた(Takata 2015)。無麻酔でマウス用MR画像を撮像する実験系を確立し、オプトジェネティクスを用いた刺激を行っても、体動アーチファクトがほとんど起きないことを確認した。麻酔下と覚醒下や、セロトニン作動性抗うつ薬投与前後での検討では有意な差を検出し、高い精度で測定できていることが確認できた。

ヒトOCD患者の安静時機能的MRIデータ収集を行い、脳ネットワークを対象とした判別解析にて、線条体・前頭葉ネットワークと関連した仮説を裏付ける結果が得られた。

研究成果の概要(英文)： We conducted optogenetic stimulation in the hippocampus of anesthetized transgenic mice and confirmed that we could evaluate brain-wide responses using functional magnetic resonance imaging (fMRI) (Takata 2015). We constructed experimental system which can evaluate the brain response evoked by optogenetic stimulation in non-anesthetized mice and confirmed there are few motion artifacts. We found that there are significant differences in brain networks between anesthetized and non-anesthetized condition or before and after administration of serotonin enhancers using our novel system.

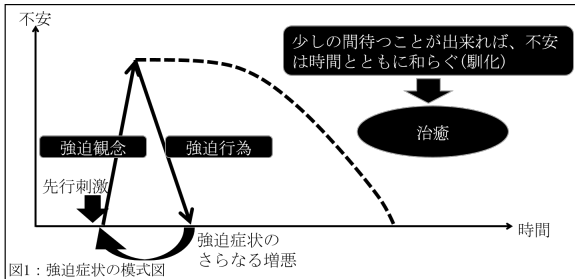
We have collected the human resting-state fMRI data of patients with obsessive-compulsive disorder (OCD) to achieve the translational research of serotonergic system. Our preliminary results showed the possibility that we could discriminate OCD patients from healthy subjects especially using the brain networks though the striatum or frontal cortex consistent with our hypothesis.

研究分野：精神疾患

キーワード：強迫性障害 機能的MRI(fMRI) オプトジェネティクス セロトニン

1. 研究開始当初の背景

強迫性障害 (obsessive-compulsive disorder: OCD) は、長時間の手洗いや鍵の確認など、繰り返しの行動によって特徴づけられる精神疾患である。繰り返しの行動は、患者自身が過剰であると認識しているにもかかわらず行われ、社会的活動や人間関係を顕著に障害するに至る。生涯有病率が 1.6%と高い上 (Kessler, 2005) 障害の人生に与える影響は身体疾患を含めても全疾病の中で 20 位にランクされ (Michaud, 2006) 病態解明が急務である。繰り返しの行動には、強迫観念に伴う不安を強迫行為で即座に解消したいという衝動的行動選択が関与していると考えられている。この行動は患者自身も長期的に見れば不利な選択であることを自覚しているにもかかわらず衝動的に繰り返される (図 1)。



OCD の生物学的背景としては、セロトニン機能障害・前頭皮質-腹側線条体回路の過活動が提唱されている (図 2 Sakai, 2011) が、それらを臨床症状と有機的に結びつけた包括的病態モデルは存在しない。

一方、低セロトニン状態は小さな即時報酬と大きな遅延報酬の選択 (「異時点間選択問題」) において、前者を過度に選ぶ「衝動的選択」を引き起こすことが知られている。近年、計算モデルを用いた機能的 MRI 解析によって、腹側線条体が短期的報酬予測、背側線条体が長期的報酬予測に関与し、低セロトニン状態では衝動的短期的報酬予測に関連した腹側線条体の活動が優位となることが明らかにされ、衝動的選択の神経基盤として注目されてきた (Tanaka, 2007)。

これらの知見に基づいて、我々は、OCD にみられる衝動的行動選択には、セロトニン機能障害と関連した「前頭皮質-腹側線条体回路優位な脳活動」が関わっていると仮説だて、OCD 患者を対象に機能的 MRI を用いて実証してきた (図 2,3)。

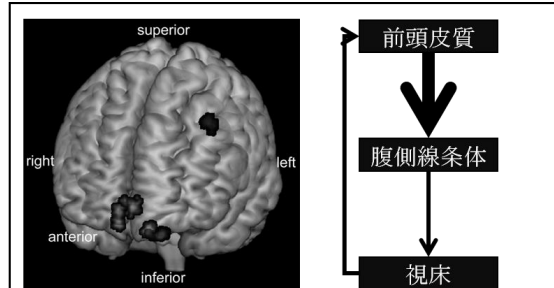


図2: 強迫性障害患者において、健常対照群と比較して、腹側線条体との機能的結合が有意に強い脳領域 (Sakai 2011)

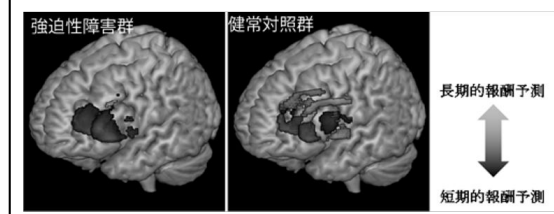


図3: 強迫性障害患者は異時点間選択課題中に衝動的行動選択と関連した腹側線条体優位な脳活動を示した (投稿準備中)

一方、チャンネルロドプシン (ChR2) の遺伝子導入と光照射を組み合わせた神経活動操作技術であるオプトジェネティクスが注目を集めている。この技術によって、関心領域の、興味のある神経細胞群だけを操作することが可能となった。ヒトを対象とした研究ではセロトニンの前駆物質であるトリプトファンを調整することなどで低セロトニン状態を作り、セロトニン神経の機能低下を模倣できる。しかしセロトニン神経の特異的な機能亢進は不可能である。そこで、実験の対象をマウスに変更し、セロトニン神経の選択的刺激を行うことにした。なぜなら研究協力者である田中謙二博士らによって、ChR2 をセロトニン神経特異的に発現するマウスが樹立され (Tanaka, 2012)、セロトニン神経核である縫線核に留置した光ファイバーにより照射を行い、セロトニン神経活動を可逆的かつ時間的に精密に制御できるからである。

これまで述べてきた通り、セロトニン神経の活動は、

1) 異時点間選択課題における衝動的行動選択、

2) 衝動的行動選択と関連した前頭皮質-腹側線条体回路優位な脳活動

を調整していることが予想される。そこで、

A) オプトジェネティクスを用いたセロトニン神経特異的の刺激が、マウスにおける衝動的行動選択や脳活動をどのように変化させるか詳細に調べることができ、

B) ヒト OCD 患者におけるセロトニン作動性抗うつ薬による治療前後の知見と比較検討することで、包括的な OCD 病態モデルを確立することが出来るとの着想を得た

2. 研究の目的

1) セロトニン神経細胞の特異的な刺激がどのようにマウスの衝動的行動選択を変化させるかを明らかにする

2) 局所的脳活動・脳ネットワーク活動がセロトニン神経刺激によってどのように変化するかをマウス用 fMRI と c-fos マッピングにて明らかにする

3) マウスの行動変化・局所脳活動変化・脳ネットワーク変化それぞれの相互関係を明らかにし、OCD 患者におけるセロトニン作動性抗うつ薬投与前後での変化と比較検討する

3. 研究の方法

光でセロトニン神経だけを任意のタイミングで刺激できるマウスを用いて下記 1)2)3)の研究を行い、ヒト OCD 患者を対象に 4)の研究を行い、最終的に両者を統合させたトランスレーショナルリサーチを展開する。
<平成 25 年度>

1) **無麻酔下でマウス用 MR 画像を撮像する実験系を確立する**

遺伝子改変マウス飼育・光ファイバー留置手術・マウス用 MR 機器での撮像に関しては、実験系を確立済みである。現在は麻酔下での撮像を実施しているが、1ヶ月間、1日1回のハンドリングによって、in vivo 電気生理学的解析が可能になるほどマウスが閉鎖空間に慣れ、数時間の電気記録に耐えることが知られている。まずはハンドリングによる慣れと頭部の固定だけで機能的 MRI 撮像を行い、体動などのアーチファクトを独立成分分析などの手法を使って除外できることを確認し、無麻酔下での撮像を可能とする。

2) **特異的セロトニン神経刺激による衝動的行動選択の変化を解析する**

衝動的行動選択を評価する課題としては、ラットにおいて確立された課題である 5 - 選択反応時間課題を改変し使用する。現時点で、オプトジェネティクスの技術を用いることで時間的に精密にセロトニン神経活動を制御し(Tanaka, 2012)、その状態で行動解析が可能な技術を確立している(図 4)。マウスが反応を抑制して待っているタイミングでセロトニン神経刺激を行うことで衝動的行動選択を抑制できることを、前述の課題で確認する。また、刺激のタイミングを変えることで、どのようなタイミングでの刺激が最適かを詳細に検討する。

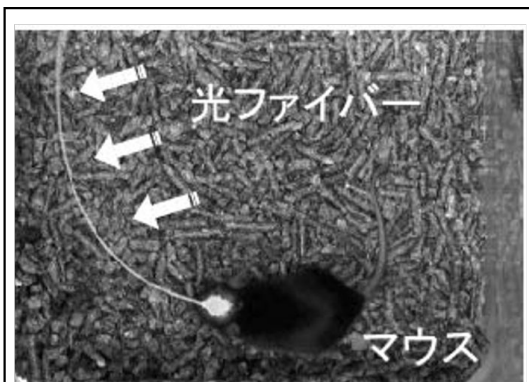


図4: セロトニン神経活動を精密に制御しながら行動解析が可能

3) **マウス安静時脳ネットワークとセロトニン神経刺激による変化を解析する**

慶應義塾大学から実験動物中央研究所にマウスを運搬し、マウス用 MR 機器内で安静時機能的 MRI を撮像する。線条体内に網羅的に関心領域 (Region of interest : ROI) を設定し、全脳で seed based functional connectivity 解析を行うことで、申請者がヒトにおいて実証したのと同様に (Sakai 2011) マウスにおいても解剖学的に妥当な皮質-線条体回路が描出できることを確認する。これを光照射によるセロトニン神経特異的の刺激条件と光照射なしの 2 条件で撮像し、比較することで、セロトニン神経刺激による安静時脳ネットワーク変化を評価する。

4) ヒト OCD 患者におけるベースラインデータの収集

これまで申請者は、ヒト OCD 患者において安静時機能的 MRI・異時点間選択問題中の機能的 MRI を用いることで、衝動的行動選択の神経基盤が強迫症状に関連していることを明らかにしてきた (Sakai 2011、研究目的 図 2,3 参照)。これをセロトニン作動性抗うつ薬の使用を伴った状態で行うことで、セロトニンの臨床症状・脳機能への影響を評価する。

ベースラインにおいて強迫性障害の重症度を Y-BOCS にて評価し、データ収集には梶井町放射線診断科クリニックに設置された 3 テスラのフィリップス社製 MRI を用いる。

<平成 26 年度>

5) 特異的セロトニン神経刺激によるマウス局所脳機能変化を解析する

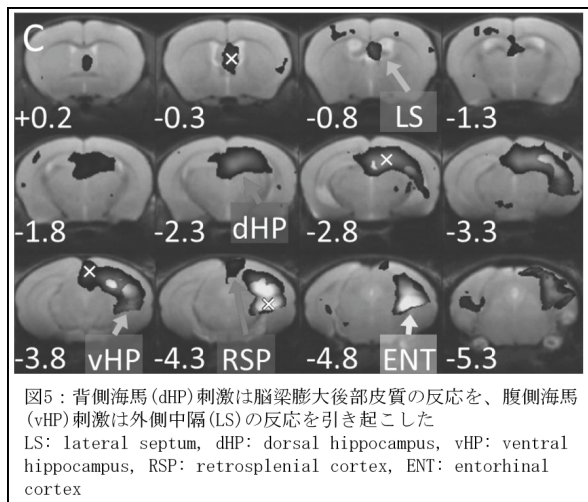
慶應義塾大学から実験動物中央研究所にマウスを運搬し、特異的セロトニン神経刺激による局所脳機能変化を c-fos マッピング・マウス用機能的 MRI にて全脳で評価する。2)で衝動的行動選択を抑制すると示されたプロトコルでの特異的セロトニン刺激がどのような脳機能変化を起こしてい

るかを検討する。

マウス用機能的 MRI での評価に加えて、c-fos 発現を指標に神経細胞の興奮・伝播の様子を詳細に検討する。

4. 研究成果

オプトジェネティクスを用いた特異的神経刺激を、マウスにおいて機能的 MRI で全脳評価できることを確認するために、まずは麻酔下マウスにて背側海馬・腹側海馬を対象として予備実験とその評価を行った。全脳の脳活動変化を機能的 MRI で評価できることが確認でき、特に海馬外の活動として背側海馬刺激は脳梁膨大後部皮質の反応を、腹側海馬刺激は外側中隔の反応を引き起こすことを確認した。その結果は国際誌にアクセプトされた(図 5、Takata, 2015)。



次に無麻酔下でマウス用 MR 画像を撮像する実験系を確立し、オプトジェネティクスを用いた刺激を行っても、開発した固定方法を用いることで体動アーチファクトがほとんど起きないことを確認した。しかし、当初予定していた 7T の MR 機器では想定していた解析に対して、信号雑音比がやや不十分であることが判明し、沖縄科学技術大学院大学の 11.7T の MR 機器での撮像を行う研究計画へ変更を行った。再度沖縄科学技術大学院大学にて無麻酔下での撮像を可能とする実験系を立ち上げ、問題なく撮

像が行えることを確認した。麻酔下と覚醒下の状態の比較や、セロトニン作動性抗うつ薬投与前後での比較の予備的検討では有意な差を検出することができ、実験系が高い精度で確立できていることが確認でき、共同演者として学会発表を行った。前述の理由で実験計画の進捗には遅れがみられているが、オプトジェネティクスを用いた特異的セロトニン神経刺激データの収集を開始する予定である。

ヒト OCD 患者の安静時機能的 MRI データ収集は、セロトニン作動性抗うつ薬投与中の患者・無投薬の患者を対象に大規模に横断的に実施した。解析手法として、実験計画では線条体内に網羅的に関心領域を設定し、全脳で seed based functional connectivity 解析を行う予定であったが、「関心領域の設定方法など仮説駆動型で場合によっては恣意的になりうること」「近年機械学習を応用した判別解析を大規模脳ネットワークに応用し、より汎化性の高い解析をすることが可能となったこと」を理由に、判別解析を行う方針へと変更を行った。大規模脳ネットワークを対象とした判別解析にて、仮説に基づかないデータ駆動型のアプローチでも線条体・前頭葉などを含む回路の異常を含めて仮説を裏付ける結果が得られてきているが、高いレベルの汎化性を立証するには外部データを入手する必要がある。現時点で入手可能な OCD 患者の公開データベースは存在しないため、つながりのある海外研究者にアプローチを行い、独立な外部データの入手に努めている。

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4件)

1. Takata, N., K. Yoshida, Y. Komaki, M.

Xu, Y. Sakai, K. Hikishima, M. Mimura, H. Okano and K. F. Tanaka. "Optogenetic Activation of Ca1 Pyramidal Neurons at the Dorsal and Ventral Hippocampus Evokes Distinct Brain-Wide Responses Revealed by Mouse Fmri." *PLoS One* 10, no. 3 (2015): e0121417. 査読有

2. 衝動性と強迫性 ~ 計算論的アプローチによる疾患研究、田中沙織・酒井雄希・成本 迅、分子精神医学 2015. 査読無
3. Nakamae, T., Y. Sakai, Y. Abe, S. Nishida, K. Fukui, K. Yamada, M. Kubota, D. Denys and J. Narumoto. "Altered Fronto-Striatal Fiber Topography and Connectivity in Obsessive-Compulsive Disorder." *PLoS One* 9, no. 11 (2014): e112075. 査読有
4. Hirosawa, R., J. Narumoto, Y. Sakai, S. Nishida, T. Ishida, T. Nakamae, Y. Takei and K. Fukui. "Reduced Dorsolateral Prefrontal Cortical Hemodynamic Response in Adult Obsessive-Compulsive Disorder as Measured by near-Infrared Spectroscopy During the Verbal Fluency Task." *Neuropsychiatr Dis Treat* 9, (2013): 955-62. 査読有

[学会発表](計7件)

1)特別講演

1. デコーディッドニューロフィードバック法による精神疾患の治療可能性
酒井 雄希
第37回日本神経科学大会(ランチョンセミナー) 2014年9月12日
2. ワークショップ「最先端脳科学セミナー」 ヒト脳機能画像研究
酒井 雄希

第 110 回日本精神神経学会学術総会
2014 年 6 月 27 日

3. 精神疾患(認知症・強迫性障害・摂食障害)の基礎知識と最新の研究成果
- 食行動異常と脳画像研究 -

酒井 雄希

味の素株式会社イノベーション研究所における摂食と精神疾患・ニューロイメージングに関する講演
2014 年 1 月 30 日

II)シンポジウム

1. 精神疾患と fMRI –その応用可能性–
酒井 雄希
マウス精神疾患モデル MRI 研究会
2015 年 1 月 10 日

2. Altered Striatal Specialization for
Reward Prediction in OCD
Yuki Sakai
Cambridge-KPUM-ATR OCD
conference 2014 年 12 月 6 日

III)国際学会、国外発表

1. Neural Substrates for Altered Reward Prediction in Psychiatric Disorders with Serotonergic Dysfunction.
Yuki Sakai, Saori Tanaka, Seiji Nishida, Takashi Nakamae, Kei Yamada, Kenji Doya, Kenji Fukui^a, Jin Narumoto
International Symposium on Prediction and Decision Making 2013 年 10 月 13 日
2. Altered Striatal Functional Specialization for Reward Prediction in non-medicated patients with Obsessive-Compulsive Disorder.
Yuki Sakai, Jin Narumoto, Saori Tanaka, Seiji Nishida, Takashi Nakamae, Kei Yamada, Kenji Doya, Kenji Fukui

The 4th World Congress of Asian
Psychiatry 2013 年 8 月 20 日

〔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 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

酒井雄希

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院)

精神機能病態学 特任講師

研究者番号 : 60714475

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

なし。