

報酬および疼痛制御を担う  
神経機構に関する研究

2021

河合 洋幸



# 目次

緒言 .....	1
第一章 初代培養後根神経節神経の電気生理学的特性に対する ノイロトロピンの作用解析 .....	3
実験方法 .....	4
実験結果 .....	6
考察 .....	9
第二章 正中縫線核セロトニン神経の報酬/罰作用制御に対する役割の解明	11
実験方法 .....	12
実験結果 .....	20
考察 .....	39
総括および結論 .....	43
謝辞 .....	44
発表論文目録 .....	45
引用文献 .....	46

## 緒言

報酬により生起される快情動や、痛みなどの罰刺激により生起される不快情動は、個体の生存に必須の要素である。一方、それらの過剰な生起は薬物依存症やうつ病、神経障害性疼痛など様々な疾患においても観察されることから、その詳細な神経機構の解明は、疾患の生物学的理解に基づく創薬の観点から重要である。

こうした神経機構の解明には、快情動や不快情動に相当する刺激を与えた際に神経がどのように応答するか、また、その惹起された神経活動がどのように行動に影響を及ぼすのかを検討することが必要となる。したがって本研究では、薬理学的手法、電気生理学的手法および光遺伝学的手法によって、神経活動の観察および介入を実施することで、情動の背景にある神経機構を解析した。

これまでの基礎研究から、神経障害性疼痛には後根神経節 (DRG) 神経の異常活動が原因となることが報告されている。また薬物依存症やうつ病の背景にある報酬/罰情報処理において、セロトニン神経の活動変動が重要な役割を果たすことも明らかにされている。現在臨床利用されている神経障害性疼痛治療薬には、中枢神経の下行性疼痛抑制系を賦活化するものが多く存在するが、これら薬剤の DRG 神経に対する影響については不明な点が多く残されている。またセロトニン神経については、これまでに実施されてきた報酬/罰情報処理に関する基礎研究の多くは背側縫線核 (DRN) のセロトニン神経に対するものである。DRN の他に、情動に関与するセロトニン神経起始核として正中縫線核 (MRN) が知られており、報酬/罰情報制御への関連が報告されているが、MRN セロトニン神経が上記の情報処理において果たしている役割を細胞種選択的に明らかにした報告は未だ存在しない。

本研究の第一章では、高い有効性を持つもののその作用機構に未解明の部分が多い鎮痛薬であるノイロトロピンについて、DRG 神経に対する作用を電気生理学的手法により検討した。また第二章では、MRN セロトニン神経に着目し、光遺伝学的手法による選択的な活動計測および介入を用いて、報酬/罰情報処理に対する機能解析を実施した。

本研究により得られた新奇知見は以下の通りである。第一章では、ノイロトロピンが  $K_v$  チャネル電流に作用して、その持続性成分を増強することで DRG 神経活動を抑制することを示し、神経障害性疼痛の抑制に寄与する可能性を明らかにした。第二章では、MRN セロトニン神経が報酬刺激および罰刺激に対して正反対の応答を示し、またその神経活動の模倣はそれぞれ報酬関連行動および嫌悪関連行動を惹起することを明らかにした。さらに、報酬/罰情報処理に対する MRN セロトニン神経の重要な投射領域として脚間核を同定し、脚間核に発現する 5-HT<sub>2A</sub> 受容体が罰刺激情報の伝達を担うことも明らかにした。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

5-HT	5-hydroxytryptamine	K <sub>v</sub>	voltage-gated potassium
5-HT <sup>MRN→IPN</sup>	MRN 5-HT neuron projecting to the IPN	LDTg	laterodorsal tegmental nucleus
5-HT <sup>MRN→MHb</sup>	MRN 5-HT neuron projecting to the MHb	LED	light emitting diode
5-HT <sup>MRN→vHP</sup>	MRN 5-HT neuron projecting to the vHP	LHb	lateral habenula
AAV	adeno-associated virus	MHb	medial habenula
AAVdj	AAV serotype DJ	ML	mediolateral
ANOVA	analysis of variance	mPFC	medial prefrontal cortex
AP	anteroposterior	MRN	median raphe nucleus
axon-GCaMP	axon-targeted GCaMP	mRNA	messenger RNA
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	mTph2	mouse Tph2
c-Fos	cellular homolog of the oncogene of Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma virus	NAc	nucleus accumbens
CMOS	complementary metal oxide semiconductor	NGF	nerve growth factor
CPA	conditioned place aversion	NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
CPP	conditioned place preference	NTP	neurotrophin
Ctrl	control	NU	neurotrophin unit
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	PB	phosphate buffer
dHP	dorsal hippocampus	PBS	phosphate buffered saline
DMSO	dimethyl sulfoxide	PBS-T	PBS containing 0.25% Triton X-100
DPSS	diode-pumped solid-state	PCR	polymerase chain reaction
DRG	dorsal root ganglion	RNA	ribonucleic acid
DRN	dorsal raphe nucleus	RT-PCR	reverse transcription-PCR
DV	dorsoventral	SERT	serotonin transporter
eGFP	enhanced green fluorescent protein	SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein	SNRI	serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid	TCA	tricyclic antidepressant
i.p.	intraperitoneal	Tph	tryptophan hydroxylase
IPN	interpeduncular nucleus	Tph2	tryptophan hydroxylase 2
		vGluT2	vesicular glutamate transporter 2
		vGluT3	vesicular glutamate transporter 3
		vHP	ventral hippocampus
		VTA	ventral tegmental area

## 第一章

# 初代培養後根神経節神経の電気生理学的特性に対する ノイロトロピンの作用解析

神経障害性疼痛は慢性疼痛の一種であり、末梢または中枢の体性感覚神経系の構造的病変や器質的疾患を原因とする。神経障害性疼痛治療は奏効率が低く<sup>1</sup>、多くの報告でアセトアミノフェンや非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) のような従来型鎮痛薬が無効であると示されている<sup>2,3</sup>。現在では、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) や三環系抗うつ薬 (TCA) といった下行性疼痛抑制系を標的とする薬剤が神経障害性疼痛の疼痛コントロールに用いられている<sup>4,5</sup>。これらの薬剤は主として脊髄内のセロトニンおよびノルアドレナリンの細胞外濃度を上昇させることで神経障害性疼痛を抑制している<sup>6</sup>。このような中枢神経系の作用と同様に、末梢神経系についても近年神経障害性疼痛への関与が明らかにされてきている。末梢神経系を抑制するカルシウムチャンネル  $\alpha 2\delta$  リガンドであるガバペンチンおよびプレガバリンが使用され、SNRI や TCA と同等の鎮痛効果が得られることが報告されている<sup>5,7,8,9</sup>。これらの研究から、末梢神経系は新規の鎮痛標的として有力であり、特に神経障害性疼痛に関わる感覚神経系の直接的な抑制作用を有する薬物は新規疼痛治療薬となる可能性がある。

ノイロトロピン (NTP) は、ワクシニアウイルスを接種した家兎の炎症皮膚の非タンパク性抽出物であり、日本を中心とした各国で神経障害性疼痛治療薬として頻用されている。NTP は下行性疼痛抑制系を直接賦活化することが知られており、この賦活化により優れた鎮痛作用を発現すると考えられている<sup>10</sup>。また中枢神経系への作用に加えて、NTP の鎮痛作用において末梢神経系の関与を示唆する報告もある<sup>11,12</sup>。しかしながら、NTP の末梢感覚神経への作用については不明な点が多く残されている。

後根神経節 (DRG) 神経の過剰な活動亢進は神経障害性疼痛の原因として広く知られている<sup>13</sup>。さらに、DRG 神経の過活動の抑制は神経障害性疼痛に対して強い治療効果を持つことが明らかになっており、神経障害性疼痛における DRG 神経活動の重要性および創薬標的としての有用性を示唆している<sup>14</sup>。

カリウム ( $K^+$ ) チャンネルは神経系に広範に分布するイオンチャンネルである。このチャンネル群は膜電位を過分極させることによって神経活動の調節に寄与している<sup>15,16</sup>。数多くの既報が  $K^+$ チャンネルの疼痛プロセスへの関与を報告しており<sup>17,18</sup>、実際に  $K^+$ チャンネル活性化は DRG 神経活動を抑制し、神経障害性疼痛を緩和することが示唆されている<sup>18,19,20</sup>。しかしながら、NTP が DRG 神経の  $K^+$ 電流に与える影響については全く明らかになっていない。

これらの知見に基づき、NTP が DRG 神経の発火特性に影響を与えると仮説を立て、本章では NTP の初代培養 DRG 神経の神経発火への作用、および  $K^+$ チャンネルへの作用

をパッチクランプ法によって検討した。その結果、NTP の持続処置は  $K_v$  電流の持続性成分を増強し、DRG 神経の発火を抑制することが明らかになった。

## 実験方法

### 使用動物

実験には Wistar/ST 雄性ラット（6–9 週齢、Japan SLC）を使用した。全てのラットは室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクルの条件下で飼育され、餌および水は自由に摂取させた。全ての動物は京都大学動物実験委員会の倫理ガイドラインに沿って扱われた。全ての実験プロトコルは京都大学動物実験委員会の許可を得て行われた。

### DRG 神経の初代培養

DRG 神経の初代培養は既報<sup>21</sup>に軽微な修正を加えて実施された。ラットを  $CO_2$  により安楽死させ、胸椎および腰椎の後根神経節を単離した。DRG を Hanks' 平衡塩溶液（含有組成 (mM); 138 NaCl, 5.33 KCl, 0.30  $Na_2HPO_4$ , 0.44  $KH_2PO_4$ , 2.38 HEPES, 5.60 D-glucose, pH 7.3 (NaOH で調整)) に 0.3% コラゲナーゼ type II (Gibco) と 0.4% ディスパーゼ (Gibco) を加えたものに入れて、5%  $CO_2$ 、37 °C で 1 時間酵素処理した。続いてパーコール (Sigma-Aldrich) を Leibovitz's L-15 培地 (Gibco) により 70% および 30% に希釈し、70% パーコール溶液、30% パーコール溶液、酵素処理した細胞懸濁液の順で重層した後、 $1,800 \times g$  で 15 分間遠心分離を行った。70% パーコール溶液と 30% パーコール溶液の界面にある細胞を回収し、L-15 培地で全量 10 mL となるように再懸濁した後、 $300 \times g$  で 10 分間遠心分離した。沈殿を Neuro Medium 含有培地 (Miltenyi Biotec, 2% NeuroBrew-21 (Miltenyi Biotec), 0.5% GlutaMAX supplement (Gibco), 100 U/mL penicillin (Nacalai Tesque), 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Nacalai Tesque), 50 mg/mL 2.5S NGF (Sigma-Aldrich) 含有) に懸濁し、ポリ-L-リジン (Sigma-Aldrich) およびラミニン (Gibco) でコーティングした 10 mm カバーガラスの上に播種して、1 日以上培養した後実験に用いた。

### 薬物処置

実験に用いた NTP は日本臓器製薬株式会社から譲渡を受けた。NTP (Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.) は培養培地で希釈し、DRG 神経を薬物含有培地にて培養することで薬物処置とした。急性処置は NTP を添加したバス溶液を灌流することで行った。NTP の生理活性は neurotrophin unit (NU) で表した。

### 電気生理学的測定

電気生理学的測定はホールセルパッチクランプ法にて室温で検討した。ホールセル記

録は EPC-10 パッチクランプアンプ (HEKA) と Patchmaster software (HEKA) を用いて行い、2.9 kHz でフィルタリングした。

膜容量はアンプによって記録された値を採用し、小型 DRG 神経 (<35 pF) のみを実験に使用した<sup>22</sup>。記録電極は外径 1.5 mm のフィラメント入キャピラリーガラス (Narishige) を P-87 (Sutter) で引いて作製した。バス溶液には以下の溶液を用いた ; (mM) 124 NaCl, 3 KCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 D-glucose、NaOH により pH 7.3 に調整。またカリウム電流測定には、カリウム電流を選択的に測定し、ナトリウムおよびカルシウム電流の寄与を最小限にするため、以下の溶液を用いた ; (mM) 150 choline-Cl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 CoCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 D-glucose、KOH により pH 7.3 に調整。電極溶液には以下の溶液を用いた ; (mM) 140 K-gluconate, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 Na<sub>2</sub>-ATP、KOH により pH 7.2 に調整。アクセス抵抗は内液を充填した状態で 2-7 MΩ であった。

活動電位と閾値電流はカレントクランプ法によって測定し、保持電流は 0 pA に設定した。活動電位数はパルス電流 (0 から 300 pA、50 pA 刻み、250 ms 間) を与えることで取得した。閾値電流は活動電位を発生させる最小限の電流とし、パルス電流 (0 から 700 pA、50 pA 刻み、2 ms 間) を与えることで取得した。

カリウム電流はボルテージクランプ法によって測定し、保持電位は -60 mV に設定した。測定された電流値を標準化のため膜容量で除し、電流密度として比較を行った。電流非依存性カリウムチャネル電流は過分極性のパルス電位 (-120 から -70 mV、10 mV 刻み、500 ms 間) を与えることで取得した。電位依存性カリウム電流はパルス電位 (-30 から +60 mV、10 mV 刻み、250 ms 間) を与えることで取得した。各テストパルス電位を与える直前に、電位依存性カリウム電流全体の測定では膜電位を -80 mV (500 ms 間) に固定し、電位依存性カリウム電流の持続性成分の測定では膜電位を -30 mV (500 ms 間) に固定した。電位依存性カリウム電流の一過性成分は、電位依存性カリウム電流全体を電位依存性カリウム電流の持続性成分で減算することで算出した。アクセス抵抗は 70% 補正した。

## 逆転写 PCR

DRG 神経からの mRNA の抽出は NucleoSpin RNA Kit (Toyobo) を用いて製品プロトコルに従って行った。抽出した mRNA は濃度を揃えた後、ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo) を用いて逆転写を行った。生成された cDNA 断片の PCR 増幅産物は 0.1 μg/mL 臭化エチジウムを含む 2% TAE-アガロースゲルにて電気泳動し、ChemImager 4400 (Alpha Innotech) を用いて紫外光により可視化し、ChemImager v5.5 software (Alpha Innotech) にて画像を保存した。PCR 反応に用いたプライマーは以下のとおりである。K<sub>v</sub>1.1 (570 bp, 5'-TTT ACG AGT TGG GCG AGG AG-3'/5'-AGT GGC GGG AGA GTT TGA AG-3')、K<sub>v</sub>1.2 (423 bp, 5'-GTC TAT CAC CCA GGA ACA TGG AG-3'/5'-GCT CCT GTA GGA



AAG ACC CAG-3'), K<sub>v</sub>2.1 (420 bp, 5'-ACG AGT ACT TCT TCG ACC GC-3'/5'-CGA ACT CGT CTA GGC TCT GC-3'), K<sub>v</sub>2.2 (648 bp, 5'-GAA CCG GAG TGA GGG ATG TA-3'/5'-CAT GTG GAG CTT TCC CGT CC-3')。

#### 統計解析

全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表示した。One-way ANOVA または two-way ANOVA の後に Bonferroni、Tukey または Sidak 検定を用いて、GraphPad Prism (version 8, GraphPad Software) で解析した。危険率 5%未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

## 実験結果

### NTP は DRG 神経の発火活動を減弱させる

NTP が DRG 神経発火に与える影響を検討するため、脱分極性のステップ電流を DRG 神経に与え、誘発される活動電位数を計測した。対照群では DRG 神経に対して  $2.75 \pm 0.50$  (平均 ± 標準誤差、300 pA 注入時) 個のスパイクを惹起した。一方 3 日間の NTP 持続処置 (0.1 or 1 NU/mL) 群では DRG 神経に対して 300 pA 注入時でそれぞれ  $0.93 \pm 0.067$  個および  $0.81 \pm 0.12$  個のスパイクを惹起させ、NTP 持続処置は活動電位の発生を有意に減少させた (図 1-1a, b)。次に、NTP が活動電位の誘発に必要な閾値電流に与える影響について検討した。NTP 群 (0.1 or 1 NU/mL) における閾値電流はそれぞれ  $450.0 \pm 60.55$  pA および  $471.4 \pm 32.47$  pA (平均 ± 標準誤差) であり、対照群 ( $237.5 \pm 20.59$  pA) と比較して有意に高値であった (図 1-1c)。活動電位数と同様に、閾値電流の有意な上昇は 0.1 または 1 NU/mL の NTP 処置で観察され、0.01 NU/mL の NTP 処置では観察されなかった (図 1-1d)。したがって、NTP は DRG 神経の活動性を抑制することが示唆される。

### NTP は DRG 神経における電位非依存性のカリウム電流に影響を与えない

NTP がもたらす活動電位抑制の機序を明らかにするため、まず電位非依存性のカリウム電流を単離した (図 1-2a)。電位非依存性のカリウム電流は、DRG 神経の膜電位を  $-60$  mV に固定し、過分極性のパルス電位を与えた際の電流応答を記録することで測定した。NTP 群は対照群と比較して、過分極性のパルス電位を与えた際の電流応答を有意に変化させなかった (図 1-2b)。このため、NTP が DRG 神経の電位非依存性のカリウム電流に与える影響は小さいものと考えられる。

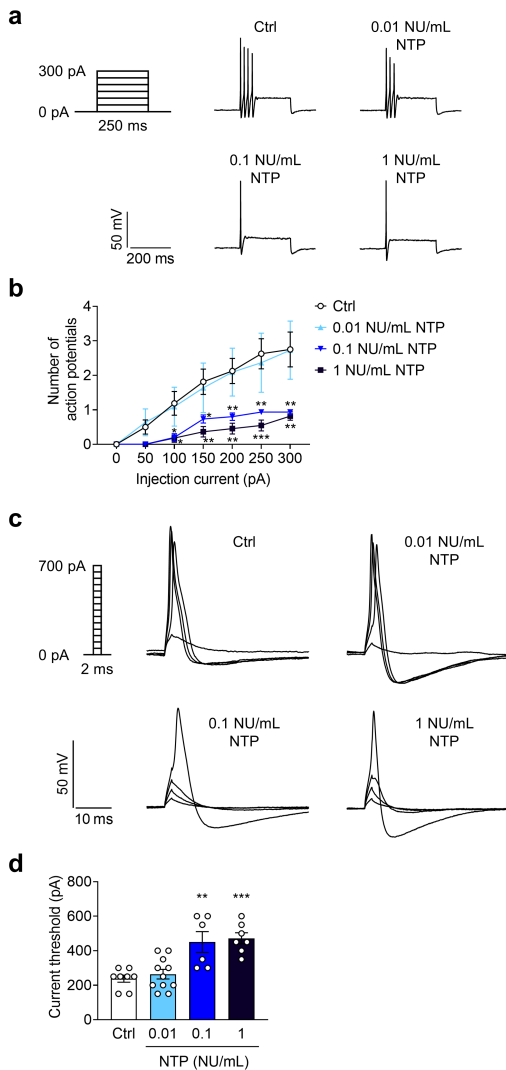


図 1-1 NTP が DRG 神経発火に与える影響  
 a, カレント注入のプロトコル (上部左、0–300 pA in 50 pA increments, 250 ms duration) および 300 pA 注入による代表的な活動電位トレース (右)。  
 b, 対照群 (Ctrl) および NTP 処置 DRG 神経における活動電位数。Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni *post hoc* test, current (0 to 300 pA) × drug (Ctrl or 0.01–1 NU/mL NTP) interaction  $F_{18,294} = 4.458$ ,  $P < 0.0001$ , effect of current  $F_{1,698,83,20} = 52.15$ ,  $P < 0.0001$ , effect of drug  $F_{3,49} = 4.531$ ,  $P = 0.0070$ ; *post hoc* test: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  vs Ctrl.  $n = 16$  (Ctrl), 11 (0.01 NU/mL NTP), 15 (0.1 NU/mL NTP) and 16 (1 NU/mL NTP).  
 c, 閾値電流測定プロトコル (上部左、0 to 700 pA in 50 pA increments, 2 ms duration) および 100, 200, 300, 400 pA 注入時の代表的トレース (右)。  
 d, 対照群 (Ctrl) および NTP 処置 DRG 神経における閾値電流。One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test,  $F_{3,28} = 12.10$ ,  $P < 0.0001$ ; *post hoc* test: Ctrl vs 0.01 NU/mL NTP  $P = 0.9373$ , Ctrl vs 0.1 NU/mL NTP \*\* $P = 0.0019$ , Ctrl vs 1 NU/mL NTP \*\*\* $P = 0.0004$ .  $n = 8$  (Ctrl), 11 (0.01 NU/mL NTP), 6 (0.1 NU/mL NTP) and 7 (1 NU/mL NTP). データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

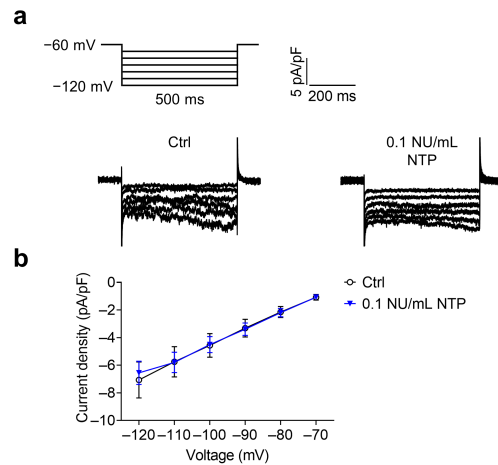


図 1-2 NTP の電位非依存性カリウムチャンネルへの影響  
 a, 過分極パルス (-120 to -70 mV in 10 mV increments; 500 ms duration) によって誘発される内向き電流の代表的トレース。  
 b, 対照群 (Ctrl) および 0.1 NU/mL NTP 処置 DRG 神経より記録された、-120 から -70 mV におけるカリウム電流の電流-電圧曲線。Two-way repeated-measures ANOVA, voltage (-120 to -70 mV) × drug (Ctrl or 0.1 NU/mL NTP) interaction  $F_{5,60} = 0.1669$ ,  $P = 0.9738$ , effect of voltage  $F_{1,035,12,42} = 64.01$ ,  $P < 0.0001$ , effect of drug  $F_{1,12} = 0.004831$ ,  $P = 0.9457$ .  $n = 8$  (Ctrl) and 6 (0.1 NU/mL NTP). データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

## NTP は DRG 神経における電位依存性カリウム電流を増強させる

電位依存性カリウム ( $K_v$ ) チャンネル電流の減弱は神経障害性疼痛の原因となる<sup>23,24</sup>。このため次に、NTP が DRG 神経の電位依存性カリウム電流に与える影響を検討した。 $K_v$  チャンネル電流には 2 つの成分があり、不活性化の速い一過性の成分と、不活性化の遅い持続性の成分に分類できる<sup>25,26</sup>。一過性成分の  $K_v$  電流は  $K_v1.4$  や  $4.1$  サブユニットなどが、また持続性成分の  $K_v$  電流は  $K_v1.1$ 、 $1.2$ 、 $2.1$  および  $2.2$  サブユニットなどがそれぞれ担うと知られている<sup>27,28,29,30,31</sup>。電気生理学的手法を用いて、総電位依存性カリウム電流および電位依存性カリウム電流の持続性成分

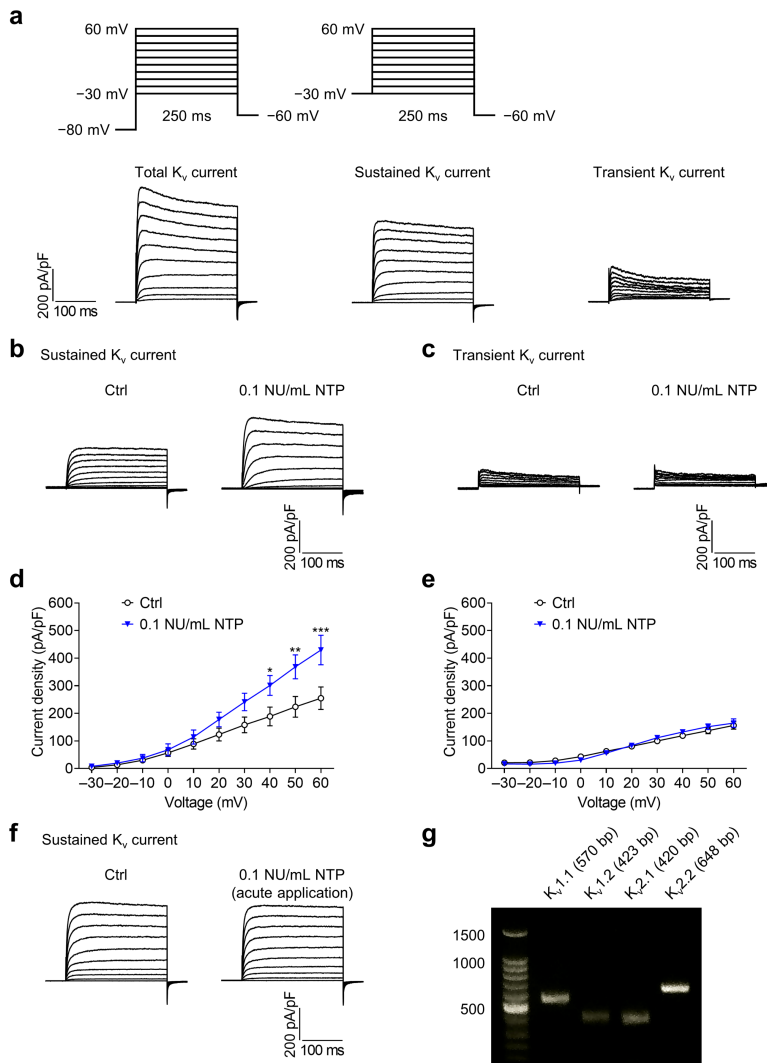


図 1-3 NTP の電位依存性カリウムチャンネルへの影響

a, 総  $K_v$  電流と  $K_v$  電流持続性成分の測定プロトコル (上段)。  $K_v$  電流一過性成分 (下段右) は総  $K_v$  電流 (下段左) から  $K_v$  電流持続性成分を引くことで得た。

b, 対照群 (Ctrl) および 0.1 NU/mL NTP 3 日間処置 DRG 神経における  $K_v$  電流持続性成分の代表例。

c, 対照群 (Ctrl) および 0.1 NU/mL NTP 3 日間処置 DRG 神経における  $K_v$  電流一過性成分の代表例。

d,  $K_v$  電流持続性成分の電流-電圧曲線。 Two-way repeated-measures ANOVA with Sidak *post hoc* test, voltage (-30 to 60 mV)  $\times$  drug (Ctrl or 0.1 NU/mL NTP) interaction  $F_{9,99} = 6.184$ ,  $P < 0.0001$ , effect of voltage  $F_{9,99} = 90.52$ ,  $P < 0.0001$ , effect of drug  $F_{1,11} = 4.268$ ,  $P = 0.0632$ ; *post hoc* test: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  vs Ctrl.  $n = 7$  (Ctrl) and 6 (0.1 NU/mL NTP).

e,  $K_v$  電流一過性成分の電流-電圧曲線。 Two-way repeated-measures ANOVA, voltage (-30 to 60 mV)  $\times$  drug (Ctrl or 0.1 NU/mL NTP) interaction  $F_{9,99} = 1.504$ ,  $P < 0.1570$ , effect of voltage  $F_{9,99} = 170.1$ ,  $P < 0.0001$ , effect of drug  $F_{1,11} = 0.022$ ,  $P = 0.8843$ .  $n = 7$  (Ctrl) and 6 (0.1 NU/mL NTP).

f, 対照群 (Ctrl) および 0.1 NU/mL NTP 急性処置 DRG 神経における  $K_v$  電流持続性成分の代表例。

g, DRG 神経における  $K_v$  チャンネル  $\alpha$  サブユニットの RT-PCR 解析。左端は各分子量子マーカーの泳動位置を示している。

データは平均値  $\pm$  標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

は脱分極性のステップ電位により誘発し、電位依存性カリウム電流の一過性成分は総電位依存性カリウム電流から電位依存性カリウム電流の持続性成分の値を減算することで算出した (図 1-3a)。すなわち、NTP 持続処置が DRG 神経の  $K_v$  電流に与える影響を、一過性および持続性成分に分けて解析した。その結果、NTP の 3 日間持続処置群における DRG 神経の  $K_v$  電流の持続性成分は、対照群と比較して有意に増加していた (図 1-3b, d)。一方で、NTP は  $K_v$  電流の一過性成分には影響を与えなかった (図 1-3c, e)。さらに、NTP の急性処置は  $K_v$  電流の持続性成分を変化させなかった (図 1-3f)。加えて、 $K_v$  電流の持続性成分を担う  $K_v$  チャンネルサブユニット 1.1、1.2、2.1、および 2.2 の、NTP 無処置の DRG 神経における発現が RT-PCR 解析によって確認された (図 1-3g)。以上の結果より、NTP の 3 日間持続処置は DRG 神経における  $K_v$  電流の持続性成分を選択的に増強することが示唆される。

## 考察

NTP は主として日本で神経障害性疼痛に対する鎮痛薬として広く用いられているが、その背景にある薬理作用機序の全容は未解明であった。本章では、NTP が DRG 神経の発火活動を抑制することを示した。さらに、NTP は  $K_v$  電流の持続性成分を増強することも明らかにした。これらの結果は、NTP が  $K_v$  電流の持続性成分を増強することによって、DRG 神経の活動性を抑制していることを示唆している。

$K^+$ チャンネルの中でも  $K_v$  チャンネルは、静止膜電位<sup>32,33</sup> および活動電位<sup>34,35</sup> の制御を介した神経活動調節において重要な役割を果たしている<sup>36,37,38</sup>。一般的に  $K_v$  チャンネルを介した電流は、そのチャンネル動態によって持続性の  $K_v$  電流と一過性の  $K_v$  チャンネルに分類できる<sup>29,39</sup>。持続性  $K_v$  電流は長い時間続く一方で、一過性  $K_v$  電流は短時間でのみ発生する。以前の機能的検討では、持続性  $K_v$  電流は膜電位の再分極やスパイク間の過分極に必須であると指摘されている<sup>40,41,42</sup>。一方で一過性  $K_v$  電流は典型的には活動電位発生後の再分極を遅延させ、反復発火を抑制すると考えられている<sup>38</sup>。本章での検討によって説明される、NTP が持続性  $K_v$  電流の増強を介して DRG 神経活動を抑制するという示唆は、 $K_v$  電流増強が DRG 神経の発火活動を抑制するという過去の報告<sup>23,24</sup> と合致している。

NTP は下行性疼痛抑制系を賦活化すると知られている<sup>10,43,44</sup>。一方で NTP は、下行性疼痛抑制系を障害した中枢性神経障害性疼痛モデルにも有効であることが明らかとなっている<sup>45</sup>。これらの報告は、下行性疼痛抑制系以外の神経系が NTP の鎮痛作用に寄与することを示唆していた。この仮説を支持するように、以前の報告において NTP の急性投与は神経ペプチドサブスタンス P の放出を減少させることが明らかにされている<sup>12</sup>。しかしながら、神経障害性疼痛に寄与する末梢神経系において NTP の作用は十分に検討されてこなかった。本章にて見出した NTP の持続性  $K_v$  電流増強作用は、この末梢神経系への NTP の作用メカニズムの一端を明らかにしたものである。

本検討では NTP3 日間持続処置が持続性  $K_v$  電流を増強させた一方で、急性処置では持続性  $K_v$  電流を変化させなかった。この時間的乖離を説明し得る仮説として、NTP の下流シグナルカスケードの活性化が考えられる。実際、NTP は神経成長因子 (NGF) シグナリングを活性化させて、下流の種々のプロテインキナーゼを活性化させることが以前の報告で明らかとなっている<sup>46</sup>。この NGF シグナリング活性化を介して、NTP が翻訳後修飾による  $K_v$  チャンネルの膜上移行を促進しているという可能性がある。例えば、NGF 処置は mRNA 発現を変動させることなしに  $K_v2.1$  の膜上発現を増加させることが報告されている<sup>47</sup>。また  $K_v$  チャンネルのリン酸化は、その翻訳後修飾様式の一つであるが、 $K_v2.1$  のような遅延整流性  $K^+$ チャンネルのセリン残基のリン酸化は膜上移行を促進することが確認されている<sup>48,49</sup>。以上の報告と本章での結果から、NTP 誘発の持続性  $K_v$  電流増強には、NGF シグナリングの活性化が背景にある可能性が考えられる。一方で中

中枢神経系では、NTP がノルアドレナリン神経において直接的に内向き電流を誘発させるという報告<sup>50</sup>もなされていることから、NTP は下行性疼痛抑制系と末梢神経系に対して異なる作用機序で調節を行っている可能性が高く、本章での結果によって NTP の末梢神経系への独自の作用が解明されたと考えられる。

本章において、NTP は培養 DRG 神経の活動性を抑制し、それは  $K_v$  電流の持続性成分の増強を介することが明らかにされた。得られた知見は NTP が中枢神経系と末梢神経系両方に作用するという仮説をより強固にし、NTP の独特な鎮痛作用機序の一端を解明したものである。

## 第二章

### 正中縫線核セロトニン神経の 報酬/罰作用制御に対する役割の解明

報酬や罰の情報処理は個体の生存に必須である<sup>51,52,53,54,55,56,57,58,59,60</sup>。この情報処理の背景にある神経活動の異常は、外部刺激に対する価値判断の異常に繋がり、薬物依存症およびうつ病を含む精神疾患患者において頻繁に観察される<sup>61,62,63</sup>。したがって報酬および罰の情報処理の基盤となる神経メカニズムを深く理解することは高い重要性を持つと考えられる。過去の報告から、この情報処理におけるセロトニンの重要性が明らかとなっている。背側縫線核 (DRN) および正中縫線核 (MRN) は主なセロトニン起始核として知られているが、ほとんどの研究は DRN に焦点を当てたものである。これまでに、DRN セロトニン神経の光遺伝学的活性化は報酬作用を引き起こすことが報告されており<sup>64,65</sup>、また DRN セロトニン神経は報酬刺激および罰刺激によって活性化することが報告されている<sup>66,67,68,69,70,71</sup>。しかしながら、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の全身投与は DRN および MRN の投射領域の双方において細胞外セロトニン濃度を上昇させるが<sup>72,73,74</sup>、明確な報酬効果を示さない<sup>75,76,77,78</sup>。これらの一見矛盾する結果は、報酬および罰の情報処理に対して DRN と正反対の役割を果たしている別のセロトニン神経の存在を強く示唆している。

いくつかの報告では報酬/罰刺激の情報処理に対する MRN の重大な役割が示されている。セロトニン神経に選択的ではないものの、MRN の薬理的阻害は条件付け場所嗜好性とエタノール探索行動を誘発する<sup>79,80</sup>。一方、MRN の電気刺激は報酬に関連付けられたレバー押し行動を抑制する<sup>81</sup>。近年では、細胞種選択的な神経活動記録と活動制御によって、嫌悪刺激が小胞グルタミン酸トランスポーター2 (vGluT2) 発現 MRN グルタミン酸神経を活動上昇させること、またそれらの神経の活性化が場所嫌悪を誘発することが報告されている<sup>82</sup>。しかしながら、vGluT2 発現 MRN グルタミン酸神経とは投射領域を異にする MRN セロトニン神経に関しては、その役割の多くは明らかにされていない。報酬/罰刺激の情報処理における MRN セロトニン神経の詳細な役割を明らかにするため、本章では MRN セロトニン神経の報酬/罰刺激に対する応答を細胞種選択的に記録し、さらに投射領域選択的な神経活動記録も実施した。続いて、セロトニン神経活動の活性化および抑制が報酬/罰刺激それぞれにより惹起される行動を引き起こすのに十分であるか検証するために、得られた神経活動を模した活動調節を行った。これらの検討により得られた知見は、快/不快情動の均衡制御について、DRN と対となる MRN の作用を回路特異的に解明し、さらに関連する 5-HT 受容体サブタイプについても初めて実証したものである。

## 実験方法

### 使用動物

実験には C57BL/6J 雄性マウス (7-11 週齢、Japan SLC) を使用した。全てのマウスは室温  $22 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクルの条件下で、6 匹を超えない範囲で一つのケージ内で飼育され、餌および水は自由に摂取させた。全ての動物は京都大学動物実験委員会の倫理ガイドラインに沿って扱われた。全ての実験プロトコルは京都大学動物実験委員会の許可を得て行われた。

### ウイルスベクターの作製と精製

アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は既報にしたがって作製した<sup>65</sup>。コンフルエンス 60-70%にした Lenti-X 293T 細胞 (Clontech) に、pHelper を 8  $\mu\text{g}$ 、pAAVdj Rep-Cap (Cell Biolabs) を 5  $\mu\text{g}$ 、トランスファープラスミドを 5  $\mu\text{g}$  を混合して、ポリエチレンイミン (Polysciences) を用いてトランスフェクションした。60-72 時間後、上清を除去し、各プレートに 500  $\mu\text{L}$  の 1 $\times$  Gradient Buffer を加えて細胞を収集した。細胞懸濁液はイオジキサノール密度勾配遠心法により精製した。ウイルスベクター溶液のタイターは定量 PCR で測定され、そのタイターは概ね  $1.0 \times 10^{13}$  vg/mL であった。

### 脳定位手術

マウスはイソフルランで麻酔し、Franklin と Paxinos による脳図譜<sup>83</sup>にしたがって、マウス用脳定位固定装置 (Narishige) を用いて定位脳手術を実施した。AAV は 1  $\mu\text{L}$  微量投与され、その中心座標は bregma を基準に、MRN では体軸方向 (AP) -4.3 mm、内外方向 (ML) 0 mm、背腹軸における深さ (DV) +4.5 mm、および DRN では AP -4.3 mm、ML 0 mm、DV +3.4 mm とした。AAV はセロトニン合成酵素である Tph2 遺伝子プロモーターを用いて設計し、セロトニン神経に選択性を持たせた。本章では Venus (Tph2-Venus)<sup>84</sup>、ChR2 バリエントの CheRiff (Tph2-CheRiff-eGFP)<sup>85</sup>、光活性化プロトンポンプ eArchT (Tph2-eArchT-eYFP)<sup>86</sup>、蛍光カルシウムプローブ GCaMP6s (Tph2-GCaMP6s)<sup>87</sup>、および軸索標的 GCaMP6 である axon-GCaMP6s (Tph2-axon-GCaMP6s)<sup>88</sup> 遺伝子をコードする AAVdj を用いた。

ファイバーフォトメトリー法による検討および光遺伝学的手法を用いた検討では、マウスはウイルス投与後 0 から 2 週間後に、標的領域に光ファイバーが留置された。光ファイバー先端の座標 (bregma 縫合を基準) は以下の通りである。MRN; AP -4.3 mm, ML 0 mm, DV +4.5 mm、脚間核 (IPN); AP -3.8 mm, ML 0 mm, DV +4.7 mm、腹側海馬 (vHP); AP -3.1 mm, ML 3.5 mm, DV +3.7 mm、内側手綱核 (MHb); AP -1.7 mm, ML 0.2 mm, DV +2.4 mm、DRN; AP -4.3 mm, ML 0 mm, DV +3.4 mm。ファイバーフォトメトリー実験においてファイバーは片側性に留置され、光遺伝学的介入実験においては vHP および

MHb では両側性に留置された (vHP; AP -3.1 mm, ML  $\pm$ 3.5 mm, DV +3.7 mm from bregma, MHb; AP -1.7 mm, ML  $\pm$ 0.2 mm, DV +2.4 mm from bregma)。光ファイバーはセラミック製フェルルールを通じて標的部位に挿入され、歯科用セメントによって固定、留置された。手術後のマウスの回復期間は少なくとも7日間とし、十分な回復の後に行動実験に使用した。

レトロビーズを用いた検討は、マウスの IPN (AP -3.8 mm, ML 0 mm, DV +4.9 mm from bregma)、vHP (AP -3.1 mm, ML 3.5 mm, DV +3.7 mm from bregma) または MHb (AP -1.7 mm, ML 0.2 mm, DV +2.4 mm from bregma) に、Green Retrobeads IX (Lumafluor) を 100 nL 投与することで行った。

薬理的検討では、ガイドカニューレによって薬物を局所投与した。ガイドカニューレ (CXG-5.1 (T), Eicom) はカニューレ先端座標が IPN 内部 (AP -3.8 mm, ML 0 mm, DV +4.9 mm from bregma) となるよう挿入され、歯科用セメントによって固定、留置された。ガイドカニューレ留置後にダミーカニューレ (CXD-5.1 (T), Eicom) を挿入し、薬物投与まで投与経路を保護した。手術後のマウスの回復期間は少なくとも7日間とし、十分な回復の後に行動実験に使用した。

#### 組織学的検討

行動解析の後、全てのマウスはペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) または三種混合麻酔 (0.3 mg/kg メデトミジン、4.0 mg/kg ミダゾラム、5.0 mg/kg ブトルファンール) によって麻酔された。麻酔下でマウスはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 経心灌流による脱血および 4%パラホルムアルデヒド (Nacalai Tesque) 含有リン酸バッファー (PB) 経心灌流による固定を受けた。経心灌流固定の後、全脳を摘出して、15%スクロース含有 PBS 中で一晩冷蔵 (4 °C) 静置した。全脳は -80 °C で凍結し、クリオスタット (Leica CM3050S; Leica Biosystems) にて 30  $\mu$ m 厚の冠状切片を作製した。作製した冠状切片は観察まで -80 °C で保管した。

免疫組織化学的検討では、スライドガラス上の冠状切片は 0.25% Triton X-100 (Nacalai Tesque) 含有 PBS (PBS-T) で 15 分洗浄および透過処理された。その後、一次抗体希釈液中で 4 °C にて一晩反応させた。反応後冠状切片を PBS によって洗浄し、二次抗体希釈液中で室温 (25 °C)、遮光下にて 2 時間反応させた。一次抗体および二次抗体は、それぞれ 5%ウマ血清含有 PBS-T および 2%ウマ血清含有 PBS-T 中に希釈した。使用した一次抗体および二次抗体、また希釈率は以下の通りである。一次抗体; rabbit polyclonal anti-green fluorescent protein antibody (1:2000; A-11122, Thermo Fisher Scientific)、sheep polyclonal anti-tryptophan hydroxylase (Tph) antibody (1:200; AB1541, Merck Millipore)、goat polyclonal anti-serotonin transporter (SERT) antibody (1:200; HTT-Go-Af970, Nittobo Medical)、mouse monoclonal anti-c-Fos antibody (2H2) (NBP2-50037, Novus Biologicals)。二次抗体; Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rabbit IgG (1:200; A-21207, Thermo Fisher Scientific)、



Alexa Fluor 647-labeled donkey anti-sheep IgG (1:200; A-21448, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit IgG (1:200; A-21206, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-goat IgG (1:200; A-11058, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-sheep IgG (1:200; A-11016, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 647-labeled donkey anti-mouse IgG (1:200; A-31571, Thermo Fisher Scientific)。二次抗体処置後、切片をPBSにより洗浄し、Fluoromount/Plus (K048, Diagnostic BioSystems) または DAPI Fluoromount-G (0100-20, Southern Biotech) によって封入した後に観察に使用した。レトロビーズについては免疫染色を行わず、レトロビーズ自体の蛍光を観察した。蛍光は laser scanning confocal microscopy (FV10i, Olympus) を用いて観察した。AAV 感染は免疫組織化学的に確認され、標的部位に対して AAV 感染が認められなかった個体、およびファイバー先端またはカニューレ先端が標的領域から外れて留置されている個体に関しては解析から除外した。各実験において使用したマウスの個体数は、実験的によく用いられる匹数以上とし、近年の既報と同程度の個体数とした<sup>66,88,89,90,91</sup>。

標的領域 (MRN、IPN、vHP、MHb および DRN) への AAV 感染、ファイバー留置、カニューレ留置の確認は、マウス脳図譜<sup>83</sup>にしたがって解剖学的に目印となる標識部位を基準として実施した。AAV の特異性および感染率は、AP -4.16 mm から AP -4.48 mm (from bregma) までの少なくとも 3 枚の冠状切片において、MRN 内の Tph 陽性細胞数および AAV 標識細胞数を計数することで算出した。対象の冠状切片の観察画像は laser scanning confocal microscopy (FV10i, Olympus) を用いて対物 10 倍および対物 60 倍で撮影し、FV10i-SW software (Olympus) および ImageJ software (National Institutes of Health) を用いて画像処理した。

#### ファイバーフォトメトリー

蛍光シグナルの検出のため、既報<sup>92,93</sup>を参考にしてファイバーフォトメトリーシステムを作製した。青色励起光は 470-nm LED (M470L3 or M470L4, Thorlabs) から射出され、ダイクロイックミラー (MD498, Thorlabs) によって反射を受け、10 倍の対物レンズ (MRH00101, Nikon) を介して集光された上でファイバーパッチケーブル (M123L01 and M73L01, Thorlabs) のファイバー先端へと照射された。ファイバーパッチケーブルのもう一方の先端はマウスに留置された光ファイバーに接続することで脳領域特異的な光照射を可能にした。ブリーチングを最小限にするために、LED 出力は光ファイバー先端において 0.02–0.03 mW とするよう調節した。取得した蛍光はバンドパスフィルター (FBH520-40, Thorlabs) を介してフィルタリングされ、チューブレンズ (58-520, Nikon) によって集光された後に CMOS カメラ (CS2100M-USB, Thorlabs) へと集められた。CMOS カメラは ImageJ software plugin である Micro-Manager<sup>94</sup>によって制御され、蛍光は画像として 10 Hz で撮影された。

フォトメトリーのデータ解析では、取得された画像に基づいてファイバー領域を対象

領域として設定し、各画像において平均蛍光強度を計算した。また、取得した蛍光には、標的脳領域由来の蛍光以外に外因性かつ非蛍光由来の光シグナルが混入するため、この影響を除外するために取得画像のファイバー外領域を対象領域として設定し、上記と同様に各画像において平均蛍光強度を計算した。このオフセットは各画像において計算されたファイバー領域の平均蛍光強度から減算され、減算後の値を各時点における平均蛍光強度  $F$  とした。この平均蛍光強度  $F$  を用いて、蛍光変動値 ( $\Delta F/F_0$ ) を算出し、解析に用いた。 $\Delta F/F_0$  は  $(F-F_0)/F_0$  を算出することで、すなわち、各時点における平均蛍光強度  $F$  からベースライン蛍光  $F_0$  を減算し、その差を  $F_0$  で除することで導かれる。ここで、 $F_0$  はトリガーとなるイベントの発生を 0 秒としたときの、トリガー発生前 1 秒間の平均蛍光強度  $F$  の平均値として設定した。なお、DRN セロトニン神経に対するフォトメトリー解析では、ベースライン蛍光  $F_0$  は既報<sup>66</sup>と同様に、トリガーイベントの発生 0.5 秒前からさらに 1.5 秒前までの期間の平均蛍光強度  $F$  の平均値とした。

#### オプトジェネティクスによる活動調節

マウスに留置された光ファイバーをファイバーパッチケーブルに接続して実施した。励起光は半導体レーザー励起固体 (DPSS) レーザー (Beijing Viasho Technology) から射出され、FC/PC コリメーターによって光ファイバーに収束された後、接続されたファイバーパッチケーブルへと照射された。DPSS レーザーはパルス幅変調信号の生成のためマイクロコントローラー (Arduino SRL) の制御下で駆動させた。Tph2-eArchT マウスおよび Tph2-Venus マウスに対しては、条件付け場所嗜好性試験のコンディショニングセッションを通して緑色光を照射した (波長 532 nm、ファイバー先端の光強度 5 mW、20 秒継続点灯/10 秒消灯、細胞体または軸索末端に照射)。自己刺激試験ではこれらのマウスに対して、ノーズポーク直後に短い緑色光照射を与えた (ファイバー先端の光強度 5 mW、3 秒継続点灯、細胞体に照射)。Tph2-CheRiff マウスおよび Tph2-Venus マウスに対しては、条件付け場所嫌悪性試験のコンディショニングセッションを通して青色光を照射した (波長 473 nm、ファイバー先端の光強度 5 mW、20 秒点滅 (20 Hz、10 ms 点灯/40 ms 消灯、duty 比 20%) /10 秒消灯、細胞体または軸索末端に照射)。また two-bottle choice 試験において、光照射に対応付けられたボトルを介してスクロース水を飲水する間、同様の条件で青色光照射を与えた (波長 473 nm、ファイバー先端の光強度 5 mW、20 秒点滅 (20 Hz)/10 秒消灯、細胞体に照射)。c-Fos 発現細胞の定量では、マウスは条件付け場所嗜好性嫌悪性試験と同じ大きさのチャンバーにマウスを入れ、同様の条件で 20 分間青色光を照射した (波長 473 nm、ファイバー先端の光強度 5 mW、20 秒点滅 (20 Hz)/10 秒消灯、細胞体に照射)。

#### 行動実験

##### スクロース水飲水試験

マウスは試験開始 3 日前から、1 日に 13–18 時間絶水された。試験を開始する前に、マウスを 1 日 5–8 時間テストケージ（幅 20.8 cm、奥行き 13.6 cm、高さ 11.5 cm）に移し、2 日間テストケージ内で 10% (w/v) スクロース水を自由飲水させることで順応させた。翌日に、マウスはファイバーケーブルを取り付けられ、10%スクロース水入りのボトルを設置したテストケージに移された。試験およびファイバーフォトメトリー記録は 10 分間実施し、その間マウスは自由に行動させた。マウスは試験中スクロース水を自由に摂取可能であった。リッキング行動の開始時刻は撮影された動画を解析することにより決定された。異なる濃度のスクロース水を与えた際の蛍光応答の比較については、上述のように 2 日間マウスを絶水させた。その後、マウスはファイバーケーブルを取り付けられ、10%スクロース水入りのボトルと 0.5%スクロース水入りのボトルをテストケージ内で交互に提示された。

#### 条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験

CPP 試験は既報<sup>95,96</sup>に軽微な変更を加えた上で実施された。CPP 装置は異なる触覚と視覚の手掛かりを持った、2 つの同じ大きさのコンパートメントから構成された（寸法：幅 15 cm、奥行き 24 cm、高さ 30 cm）。一方のコンパートメントはエンボス加工された底面を持ち、白く配色された。もう一方のコンパートメントは滑らかな底面を持ち、黒く配色された。Day 1 のプレテストでは、マウスにパッチケーブルを付けずに 900 秒間 2 つのコンパートメント間を自由探索させた。その後、各コンパートメントにおける滞在時間を ANY-maze tracking software (version 6.0, Stoelting) を用いて測定した。プレテストにおいて、一方のコンパートメントに全体の 80%を超える時間 (>720 秒) 滞在した場合、またはコンパートメントの一度の滞在時間が 200 秒を超える場合は、以降の検討から除外することとした（検討を通して、この基準によって除外された個体は存在しなかった）。検討には bias-like protocol<sup>97</sup>を使用し、プレテストにおいて滞在時間がより短かった（450 秒を下回った）コンパートメントを、そのマウスに光照射を与えるコンパートメントと定めた。Day 2 および 3 のコンディショニングセッションでは、マウスはパッチケーブルを取り付けられ、2 つのグループに分けられた。一日のコンディショニングの前半に、一方のグループのマウスについては、光照射に関連付けられたコンパートメントに 20 分間置かれて、光照射を与えられた。もう一方のグループのマウスについては、光照射に関連しないコンパートメントに 20 分間置かれた。コンディショニング後半では、前半において光照射されたグループのマウスは光照射に関連しないコンパートメントに 20 分間置かれた。反対に、前半において光照射を受けなかったグループのマウスは光照射に関連付けられたコンパートメントに 20 分間置かれて、光照射を与えられた。マウスのグループ分けおよびコンディショニングの順番はランダムに決定された。また、一日のコンディショニングの前半から少なくとも 4 時間の間隔を空けた後に、後半のコンディショニングを開始した。Day 4 のポストテストでは、マウスにパッ

ケーブルを取り付けずに、プレテストと同様に2つのコンパートメント間を自由に動き来させた。その後、各コンパートメントにおける滞在時間を測定し、CPP スコアを算出した。CPP スコアは光照射に関連付けられたコンパートメントにおいて、ポストテストでの滞在時間（秒）からプレテストでの滞在時間（秒）を減算することで導出した。

#### ノーズポーク試験（オペラント条件付けを用いた脳内自己刺激試験）

オペラントチャンバー（寸法：幅 15.24 cm、奥行き 13.34 cm、高さ 12.7 cm、Med Associates）は防音室の中に設置し、ノーズポーク用のポート（ENV-303M; Med Associates）を取り付けた。ポートへのノーズポークによって、光ファイバーを介して標的領域に緑色光が照射された（波長 532 nm、1 パルス、3 秒間）。光照射は各ノーズポークに応答して実施された。マウスにファイバーパッチケーブルを接続し、オペラントチャンバー内に置いた後に、標的領域への自己刺激を 30 分間実行させた。この自己刺激試験を 4 日間連続でマウスに実施させ、各日のノーズポーク回数を計数した。

#### テールピンチ試験

マウスにファイバーパッチケーブルを接続し、テストケージ（寸法：幅 20.8 cm、奥行き 13.6 cm、高さ 11.5 cm）に置いた。マウスは最低 5 分テストケージ内に置き、慣らした後にテストを開始した。実験者がマウスの尾を挟むことで罰刺激とした。ピンチには bulldog serrefine clamp (18050-50, Fine Science Tools) を使用し、全てのマウスにおいて同じ実験者がテールピンチを担当した。ピンチは動物への苦痛を最小限にするため、20 秒以上は行わなかった。標的領域由来の蛍光応答はピンチの前後において記録し、ピンチした時刻は録画した動画を解析することで決定した。

#### 条件付け場所嫌悪性 (CPA) 試験

実験装置は CPP 試験と同一のものを使用した。CPP 試験と同じくプレテスト (900 秒、検討を通してこの基準によって除外された個体は存在せず) を実施した。プレテストにおいてマウスがより長く (450 秒を上回って) 滞在したコンパートメントを、光照射に関連付けられたコンパートメントと決定した。Day 2 および 3 のコンディショニングセッションでは、マウスはファイバーパッチケーブルを接続された。一日のコンディショニングの前半に、一方のグループのマウスは光照射に関連付けられたコンパートメントに 20 分間置かれて、光照射を与えられた。もう一方のグループのマウスは、光照射に関連しないコンパートメントに光照射をせずに 20 分間置かれた。コンディショニング後半では、前半において光照射されたグループは光照射に関連しないコンパートメントに 20 分間置かれた。反対に、前半において光照射を受けなかったグループは光照射に関連付けられたコンパートメントに 20 分間置かれて、光照射を与えられた。マウスのグループ分けおよびコンディショニングの順番はランダムに決定された。また、一日の

コンディショニングの前半から少なくとも 4 時間の間隔を空けた後に、後半のコンディショニングを開始した。Day 4 のポストテストでは CPP 試験と同じく、マウスにパッチケーブルを取り付けずに、プレテストと同様に 2 つのコンパートメント間を自由に行き来させた。その後、各コンパートメントにおける滞在時間を測定し、CPA スコアを算出した。CPA スコアは光照射に関連付けられたコンパートメントにおいて、ポストテストでの滞在時間 (秒) からプレテストでの滞在時間 (秒) を減算することで導出した。

薬物処置を伴う CPA 試験では、マウスは vehicle (1% DMSO in saline)、WAY-100635 (0.5 mg/kg, 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, CAS: 634908-75-1; Abcam) または MDL-100907 (0.5 mg/kg, 5-HT<sub>2A</sub> antagonist, CAS: 139290-65-6; R&D Systems) を、20 分間のコンディショニングの 30 分前に腹腔内投与された<sup>98,99,100</sup>。脳内局所への微量投与を伴う CPA 試験では、コンディショニングに光照射を使用した試験においては、マウスは vehicle (1% DMSO in saline, 0.2 µL)、WAY-100635 (1 µg in 0.2 µL) または MDL-100907 (0.1 µg in 0.2 µL) を、20 分間のコンディショニングの 5 分前に IPN に局所投与された<sup>101,102,103,104,105</sup>。コンディショニングに光照射を使用しない試験においては、マウスは vehicle (saline, 0.5 µL) または TCB-2 (0.05 µg in 0.5 µL, 5-HT<sub>2A</sub> agonist, CAS: 912342-28-0; Tocris) を、20 分間のコンディショニングの 5 分前に IPN に局所投与された。

## 二瓶選択試験

マウスは各セッションの前に 13 から 18 時間絶水させた。コンディショニングセッションでは、マウスをテストケージ (寸法: 幅 20.8 cm、奥行き 13.6 cm、高さ 11.5 cm) 内に置き、マウスから見て左右に配置された、独立した 2 本のボトルを介して 10%スクロース溶液を飲水させた。30 分間のコンディショニングを一日に 2 回実施し、各コンディショニング間において 4 時間以上の間隔を空けた。各コンディショニングセッションにおける、各ボトルを介した飲水量 (g) を記録した。テストセッションでは、マウスにファイバーパッチケーブルを接続し、独立した 2 本のボトルを介して 10%スクロース溶液を飲水させた。一方のボトルは光照射と関連付けられ (ON bottle)、もう一方のボトルは光照射と関連付けないボトル (OFF bottle) とした。光照射はマウスが ON bottle の先端を舐めている時間を通して実施した。ON bottle と OFF bottle の配置は、初回および 2 回目のテストセッションにおいて入れ替えられた。各テストセッションにおける、各ボトルを介した飲水量 (g) を記録した。マウスのボトル嗜好性および左右のボトル配置が与える飲水への影響を最小限にするため、初回および 2 回目のテストセッションにおける各ボトルでの飲水量を合計した。

## c-Fos 陽性細胞の定量

c-Fos 陽性細胞の定量に用いられたマウスは他の実験には使用されていない。前述の手法と同じく、MRN セロトニン神経に Venus または CheRiff を導入したマウスに対し

て青色光の照射を行った。光照射開始から 90 分後に、マウスを脱血、固定して脳を摘出した。組織学的検討の項目で記載したように、脳を切片化し、染色を実施した。MRN、IPN、vHP または MHb を含んだ少なくとも 3 枚の異なる切片において c-Fos 陽性細胞数を計数し、各切片における c-Fos 陽性細胞数を平均した。

#### 薬物処置

薬理的阻害を用いた CPA 試験では、vehicle または薬物をコンディショニングの 30 分前に腹腔内に投与した。脳内局所投与を用いた CPA 試験では、マウス IPN に微量投与用のガイドカニューレ (CXG-5.1 (T), Eicom) を留置した。コンディショニングの 5 分前に、マイクロシリンジ (7002KH, Hamilton) およびポリエチレンチューブを取り付けたインジェクションカニューレ (CXMI-5.4 (T), Eicom) を用いて、vehicle または薬物を IPN (AP -3.8 mm, ML 0 mm, DV +4.9 mm from bregma) 内に投与した。投与溶液はシリンジポンプ (KDS 100, KD Scientific) を用いて 0.2  $\mu$ L/min の速度で投与した。インジェクションカニューレは投与終了後 1-3 分経過するまで留置し、その後ゆっくりと引き抜いた。続いて、ダミーカニューレをガイドカニューレに取り付けた。

#### データ解析

データは平均  $\pm$  標準誤差で記述した。統計的有意性は R (version 4.0.3) および GraphPad Prism (version 8 and 9, GraphPad Software) を用いて判断した。2 つの独立したグループ間の差異は two-tailed unpaired Student's *t*-test を用いて比較した。同一個体の 2 つの時点における差異は two-tailed paired Student's *t*-test を用いて比較した。フォトメトリー試験では、各時点における  $\Delta F/F_0$  の値とベースラインの値を使用して、1,000 回の並べ替えを行い、 $\alpha$  レベルを 0.05 としてベースラインの値と比較した<sup>66</sup>。群比較に関しては、データは one-way または two-way analysis of variance (ANOVA) を使用し、続いて Tukey 検定を実行して比較した。あるいは、two-way repeated-measures ANOVA を使用し、続いて Sidak 検定を実行して比較した。全ての統計解析において、*P* 値が 0.05 未満 (*P* < 0.05) となった場合を統計的有意であるとみなした。各群の分散は *F* test または Bartlett test により解析した。分散は図 2-6d、2-10e、2-10l、2-10q、2-10r および 2-12h に記載のデータを除いて同等であった。そのため、図 2-6d、2-10e、2-10l、2-10q、2-10r および 2-12h に記載されたデータにおいては two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction を用いて解析を実施した。

## 実験結果

### 報酬刺激は MRN セロトニン神経を抑制し同神経の抑制は報酬様作用を誘発する

MRN セロトニン神経の活動変動を記録するため、マウストリプトファンヒドロキシラーゼ 2 (Tph2) プロモーター制御下で GCaMP6s (蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  プローブ) 遺伝子<sup>87</sup> または Venus 遺伝子<sup>84</sup> を発現するように設計したアデノ随伴ウイルス (AAV) を MRN に投与した<sup>65,106</sup>。Venus 発現マウスの組織学的解析により、Tph2 プロモーターの高い選択性および感染率を確認した (specificity:  $91.4 \pm 2.5\%$ ; coverage:  $95.4 \pm 1.4\%$ ;  $n = 5$ ; 図 2-1a-d)。続いて、自由行動マウスに対してファイバーフォトメトリー法を適用し、スクロース溶液 (報酬刺激として使用) の飲水前後における MRN セロトニン神経の活動変動を記録した (図 2-1e-i, 2-2a-d)。同一個体での検討において、GCaMP 由来蛍光はスクロース溶液飲水直後に減少し始め、またその蛍光減少は溶液のリッキングを通して持続した。さらに、これらの飲水行動に依存した蛍光変化はほぼ全ての試行で観察された (図 2-1g, h)。加えて、測定した全てのマウスにおいて MRN 由来 GCaMP 蛍光はスクロース溶液のリッキング後に減少し始めた (図 2-1i)。GCaMP マウスおよび Venus マウスにおける、蛍光変動値  $\Delta F/F_0$  の最大値の平均はそれぞれ  $-2.51 \pm 0.78\%$  および  $-0.31 \pm 0.45\%$  であった (平均  $\pm$  標準誤差,  $n = 7$  (GCaMP) and  $n = 6$  (Venus) mice;  $t_{11} = 2.317$ ,  $*P = 0.0408$ ; 図 2-2e)。MRN セロトニン神経の活動変動と報酬刺激の客観的価値との間の関連性を検討するため、10% および 0.5% のスクロース溶液をマウスに与え、消費した際のそれぞれの GCaMP 蛍光変化を比較した。結果として、0.5% のスクロース溶液リッキング後の蛍光変化は、10% のスクロース溶液リッキング後の蛍光変化と比較して有意に小さいものであった (図 2-1j)。

MRN 活動の減少と報酬関連行動との因果関係を明らかにするため、MRN セロトニン神経の光遺伝学的抑制がマウス行動に与える影響を、条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験を用いて検討した<sup>65,97</sup>。光遺伝学的抑制のため、MRN セロトニン神経に選択的にアーキドプシン (eArchT、光活性化プロトンポンプ) を導入した<sup>86</sup> (図 2-1k, l)。プレテストセッションでは、マウスに 2 つのコンパートメント (チャンバー) から成る CPP 装置内を自由に行き来させた。2 つのチャンバーは異なる色および異なる触感を持ち、マウスの識別を促進させた。自由探索の後、各チャンバー内での滞在時間を解析した。翌日のコンディショニングセッションでは、移動範囲を 2 つのチャンバーの内の片方のみ制限した上で、マウスを 20 分間自由探索させた。その後少なくとも 4 時間の間隔を空け、もう片方のチャンバーにて 20 分間自由探索させた。ここで、プレテストにおいて滞在時間の短かったチャンバー内でマウスが探索する際は、MRN に緑色光を照射した (20 秒光照射、10 秒光照射無しのサイクルを繰り返す)。また、プレテストにおいて滞在時間の長かったチャンバー内でマウスが探索する際は、光照射を実施しなかった。これらと同じコンディショニングを翌日も同じく繰り返し、連続 2 日間のコンディショ

ニングが終了した次の日にポストテストを行った。ポストテストセッションでは、プレテストと同じように、2つのチャンバー間をマウスに自由に行き来させ、各チャンバーにおける滞在時間を記録して解析した。効果の指標には CPP スコアを用いた。CPP スコアは、ある操作の報酬様作用を定量化する指標であり、光遺伝学的操作を実行したチャンバーにおける滞在時間に対して、ポストテストセッションとプレテストセッションでの差分（光刺激したチャンバーにおけるポストテストでの滞在時間（秒） - 光刺激したチャンバーにおけるプレテストでの滞在時間（秒））によって定義される。eArchT マウスの CPP スコアは、Venus マウスの CPP スコアに対して有意に高値であった（図 2-1m）。ポストテストセッションにおいて、eArchT マウスは Venus マウスと比較して僅かに自発運動活性が上昇していたが（図 2-2f）、上昇の程度が小さいため、光刺激したチャンバーにおける滞在時間の増加が自発運動量の増加によって影響された可能性は低いと考えられる。さらにこの結果と一致して、光遺伝学的抑制と関連付けられたチャンバーへの滞在時間は、eArchT マウスではプレテストと比較してポストテストで有意に増加したのに対して、Venus マウスでは変化しなかった（図 2-1n）。一方で、1 サイクルで 20 秒の光遺伝学的抑制は、ファイバーフォトメトリー記録によって観察された活動減少時間よりも長い（図 2-1g-i）。したがって、ファイバーフォトメトリー法で記録された MRN の短時間の抑制が報酬関連行動を制御するのに十分であるのかを、オペラント条件付けを利用した試験によってさらに検討した。この試験では、光遺伝学的抑制はマウスがノーズポークを行った直後の 3 秒間のみ適用された（図 2-1o）。結果として、eArchT マウスにおいて 30 分間の試験中に記録されたノーズポークの回数は時間依存的に増加した（図 2-1p）。これらの結果から、MRN セロトニン神経の活動抑制は報酬探索行動を強化することが示唆される。



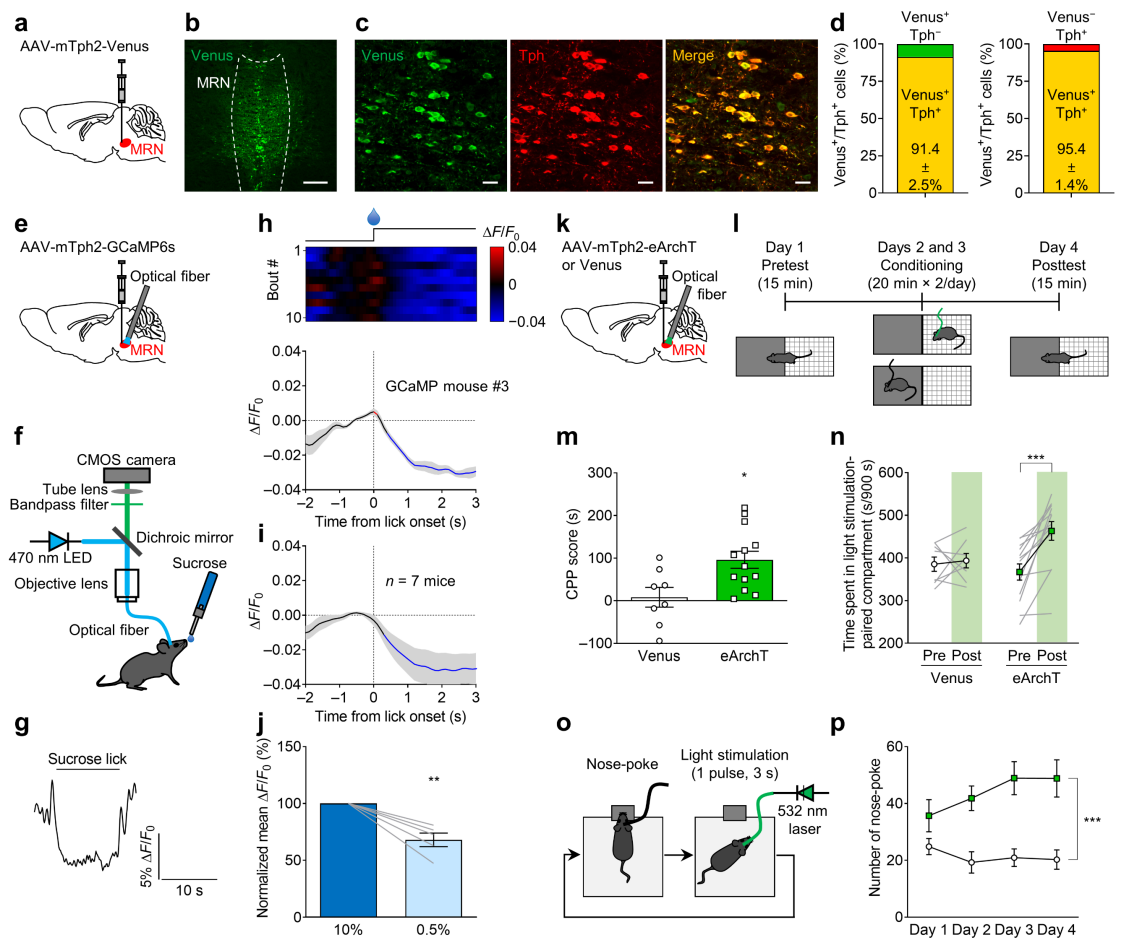


図 2-1 MRN セロトニン神経は報酬刺激によって抑制され、同神経の抑制は条件付け場所嗜好性および自己刺激を誘発する

a, b, MRN への AAV-mTph2-Venus 投与。Scale bar = 200  $\mu$ m.

c, d, 導入遺伝子 (Venus; green) および Tph2 (red) の MRN における免疫染色および共局在率。Scale bars = 20  $\mu$ m.  $n = 5$  mice.

e, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

f, ファイバーフォトメトリー装置の概略図。

g, スクロース水飲水前後における GCaMP6s 蛍光変化の代表的なトレース。

h, Top: GCaMP シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行につき 1 回のリッキングボートにおける蛍光変化を示した。Bottom: マウス 1 匹の試験中に記録された MRN 由来 GCaMP シグナルの平均トレース。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。赤線および青線部はそれぞれ、ベースライン蛍光に対して統計的に有意に蛍光上昇および低下したことを表している ( $P < 0.05$ ; permutation test)。  $n = 10$  bouts.

i, マウス 7 匹分の MRN 由来 GCaMP 蛍光変化。ベースライン蛍光に対して統計的に有意な蛍光低下を青線で示した ( $P < 0.05$ ; permutation test)。

j, 10%および 0.5%のスクロース水を飲水した際の GCaMP 蛍光応答の比較。Two-tailed paired  $t$ -test  $t_4 = 5.365$ ,  $**P = 0.0058$ ,  $n = 5$  mice.

k, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

l, CPP 試験の概略図。Day 1 ではマウスに 2 つのコンパートメント間を光照射無しで自由探索させた (pretest: 15 min)。Day 2 および 3 では光照射を用いてマウスに 1 日につき 2 回のコンディショニングを実施した (20 min  $\times$  two times per day)。Day 4 ではマウスに再度 2 コンパートメント間を光照射無しで自由探索させた (posttest: 15 min)。

m, Venus マウスおよび eArchT マウスの CPP スコア。光照射に関連付けられたコンパートメントにおいてポストテストでの滞在時間からプレテストの滞在時間を減算することでスコアを算出した (two-tailed unpaired  $t$ -test (Venus vs eArchT),  $t_{19} = 2.804$ ,  $**P = 0.0113$ ,  $n = 8$  (Venus) and 13 (eArchT) mice)。

n, 光照射に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間変化 (eArchT: two-tailed paired  $t$ -test (eArchT Pre vs eArchT Post),  $t_{12} = 4.810$ ,  $***P = 0.0004$ ,  $n = 13$  mice; Venus: two-tailed paired  $t$ -test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_7 = 0.3553$ ,  $P = 0.7328$ ,  $n = 8$  mice)。

o, ノーズポークを用いた自己刺激試験の模式図。

p, 連続 4 日間の自己刺激試験で記録されたノーズポーク回数の推移 (two-way repeated-measures ANOVA, virus (Venus or eArchT)  $\times$  time (day 1, 2, 3 or 4) interaction  $F_{3,60} = 1.925$ ,  $P = 0.1351$ , effect of virus  $F_{1,20} = 38.40$ ,  $***P < 0.001$ , effect of time  $F_{3,60} = 0.7157$ ,  $P = 0.5464$ ,  $n = 12$  (Venus) and 10 (eArchT) mice)。

データは平均値  $\pm$  標準誤差で表記した。またエラーバーにより標準誤差を示した。

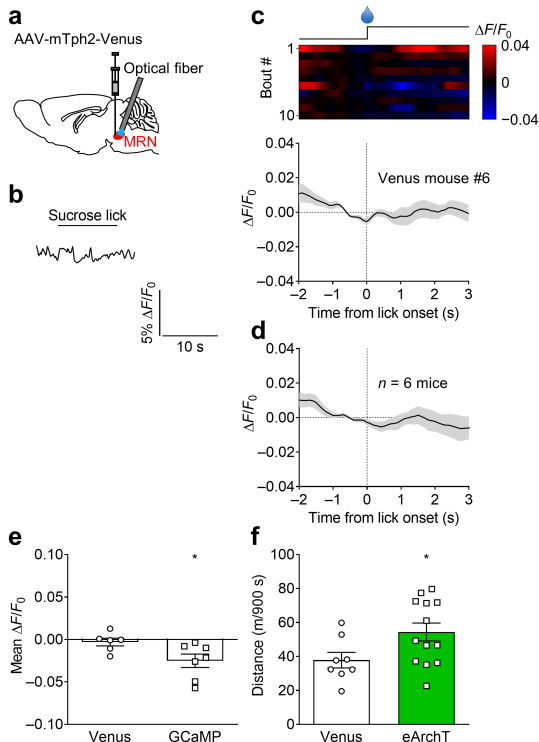


図 2-2 Venus 発現マウスにおける報酬刺激による蛍光変化および MRN セロトニン神経の光遺伝学的抑制が自発活動性に与える影響

a, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。  
 b, スクロース水飲水前後における Venus 蛍光変化の代表的なトレース。  
 c, Top: Venus シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行につき 1 回のリッキングポートにおける蛍光変化を示した。Bottom: マウス 1 匹の試験中に記録された MRN 由来 Venus シグナルの平均トレース。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。 $n = 10$  bouts。  
 d, マウス 6 匹分の MRN 由来 Venus 蛍光変化。  
 e, Venus および GCaMP マウスにおける、飲水開始後 3 秒間の平均  $\Delta F/F_0$  の比較 (two-tailed unpaired  $t$ -test (Venus vs GCaMP),  $t_{11} = 2.317$ ,  $*P = 0.0408$ ,  $n = 6$  (Venus) and 7 (GCaMP) mice)。  
 f, CPP 試験のポストテストセッションにおける Venus および eArchT マウスの移動距離 (two-tailed unpaired  $t$ -test (Venus vs eArchT),  $t_{19} = 2.176$ ,  $*P = 0.0424$ ,  $n = 8$  (Venus) and 13 (eArchT) mice)。  
 データは平均値  $\pm$  標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

### 罰刺激は MRN セロトニン神経を活性化し同神経の活性化は罰様作用を誘発する

罰刺激に対する MRN セロトニン神経の活動応答を観察するため、テールピンチ (罰刺激として使用) 前後での MRN 由来 GCaMP 蛍光を測定した (図 2-3a, b)。GCaMP 蛍光は全てのマウスにおいてテ

ールピンチ後に上昇した (図 2-3c)。また、ピンチの対照処置 (マウスにクランプを近付けるが、テールピンチは行わない処置) の後には GCaMP 蛍光の上昇は観察されなかった (図 2-4d-f)。GCaMP マウスおよび Venus マウスにおける、蛍光変動値  $\Delta F/F_0$  の最大値の平均はそれぞれ  $3.36 \pm 0.68\%$  および  $0.04 \pm 0.54\%$  であった (平均  $\pm$  標準誤差,  $n = 7$  mice;  $t_{12} = 3.813$ ,  $*P = 0.0025$ ; 図 2-4a-c)。

MRN 活動の上昇と罰関連行動との因果関係を明らかにするため、マウス MRN セロトニン神経に CheRiff (興奮性の光遺伝学的アクチュエーター)<sup>85</sup> を導入し、留置した光ファイバーを介して MRN に光照射を行い、行動記録した (図 2-3d)。神経活動マーカー c-Fos を発現する MRN セロトニン神経の細胞数は、20 分間の光照射 (20 Hz) 後において、Venus マウスと比較して CheRiff マウスで有意に増加していた (図 2-5a-c)。この結果から、MRN セロトニン神経への CheRiff の発現および青色光の照射による活性化が確認された。MRN セロトニン神経の光遺伝学的活性化が罰様作用に与える影響を検討するため、条件付け場所嫌悪性 (CPA) 試験を実施した (図 2-3e)。効果の指標には CPA スコアを用いた。CPA スコアは、ある操作の罰様作用を定量化する指標であり、光遺伝学的操作を実行したチャンバーにおける滞在時間に対して、ポストテストセッションとプレテストセッションでの差分 (光刺激したチャンバーにおけるポストテストでの滞在時間 (秒) - 光刺激したチャンバーにおけるプレテストでの滞在時間 (秒)) によって定義される。CheRiff

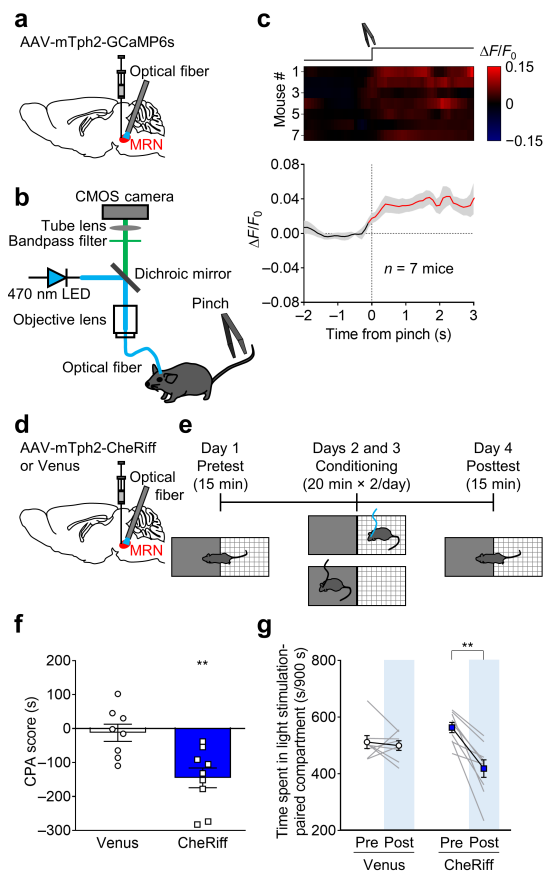


図 2-3 MRN セロトニン神経は罰刺激によって活性化され、同神経の活性化は条件付け場所嫌悪性を誘発する  
 a, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。  
 b, ファイバーフォトメトリー装置の概略図およびテールピンチ試験の模式図。  
 c, Top: GCaMP シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行はそれぞれ 1 回の試行における蛍光変化を示し、1 匹につき 1 回のみ試験を実施した。n = 7 mice。Bottom: マウス 7 匹分の MRN 由来 GCaMP 蛍光変化。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。ベースライン蛍光に対して統計的に有意な蛍光上昇を赤線で示した ( $P < 0.05$ ; permutation test)。  
 d, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。  
 e, CPA 試験の概略図。Day 1 ではマウスに 2 コンパートメント間を光照射無しで自由探索させた (pretest: 15 min)。Day 2 および 3 では光照射を用いてマウスに 1 日 2 回のコンディショニングを実施した (20 min × two times per day)。Day 4 では再度 2 コンパートメント間を光照射無しで自由探索させた (posttest: 15 min)。  
 f, Venus および CheRiff マウスの CPA スコア。光照射関連コンパートメントにおいてポストテストでの滞在時間からプレテストの滞在時間を減算しスコアを算出した (two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{15} = 3.401$ ,  $**P = 0.0040$ ,  $n = 8$  (Venus) and 9 (CheRiff) mice)。  
 g, 光照射に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間変化 (CheRiff: two-tailed paired *t*-test (CheRiff Pre vs CheRiff Post),  $t_8 = 4.998$ ,  $**P = 0.0011$ ,  $n = 9$  mice; Venus: two-tailed paired *t*-test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_7 = 0.4957$ ,  $P = 0.6353$ ,  $n = 8$  mice)。データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

マウスの CPA スコアは、Venus マウスの CPA スコアに対して有意に低値であった (図 2-3f, 2-4g)。この結果と一致して、光遺伝学的活性化と関連付けられたチャンパーへの滞在時間は、CheRiff マウスではプレテストと比較してポストテストで有意に減少したのに対して、Venus マウスでは変化しなかった (図 2-3g)。すなわち、中立的な文脈において MRN セロトニン神経活動を活性化することは、その文脈に対する回避的な行動を惹起することが示唆された。

続いて、MRN セロトニン神経の短時間活性化がスクロース水の有する報酬性を抑制し得るか否かを明らかにするため、スクロース水摂取直後に MRN セロトニン神経を活性化させる検討を行った (図 2-6)。検討には二瓶選択試験を用いた。この試験において、マウスは 2 本の 10% スクロース水 (報酬として使用) 入りのボトルを、マウスから見て左右に提示された。2 本のボトルの内 1 本が光照射と関連付けられており、マウスがボトル先端へのリッキングを介して報酬消費をする度に、マウス脳内へ光照射が与えられた (図 2-6a, b)。CheRiff マウスにおいて、光照射 (20 Hz) に関連付けたボトルからのスクロース溶液の飲水量は、光照射に関連付けられていないボトルからの飲水量と比較して有意に減少した (図 2-6c)。一方で、Venus マウスにおいては各ボトルからの飲水量は変化しなかった。また、各マウス群の総飲水量は変化しなかった (図 2-6d)。これらの結果から、MRN セロトニン神経の活動活性化はスクロース水の有する報酬効果を抑制し得ることが示唆される。

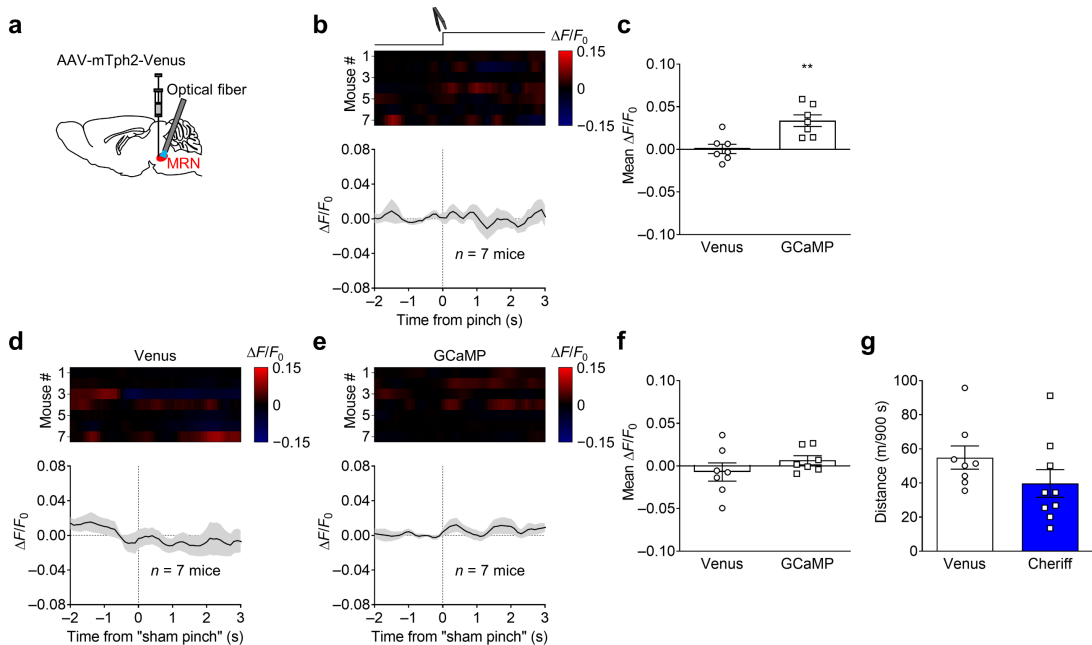


図 2-4 Venus 発現マウスにおける罰刺激による蛍光変化および MRN セロトニン神経の光遺伝学的活性化が自発活動性に与える影響

a, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

b, Top: Venus シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行はそれぞれ 1 回の試行における蛍光変化を示し、1 匹につき 1 回のみ試験を実施した。n = 7 mice。Bottom: マウス 7 匹分の MRN 由来 Venus 蛍光変化。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。

c, Venus および GCaMP マウスにおける、テールピンチ後 3 秒間の平均  $\Delta F/F_0$  の比較 (two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs GCaMP),  $t_{12} = 3.813$ ,  $**P = 0.0025$ ,  $n = 7$  mice per group)。

d, e, Top: “sham pinch”における Venus (d) および GCaMP (e) シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。Sham pinch は、マウスにクランプを近付けるがピンチはしない試行のことを指す。また、マウスの尾に最もクランプが接近した時刻を 0 秒と定義した。各行はそれぞれ 1 回の試行における蛍光変化を示し、1 匹につき 1 回のみ試験を実施した。n = 7 mice per group。Bottom: マウス 7 匹分の MRN 由来 Venus (d) および GCaMP (e) 蛍光変化。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。

g, CPA 試験のポストテストセッションにおける Venus および CheRiff マウスの移動距離 (two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{15} = 1.416$ ,  $P = 0.1773$ ,  $n = 8$  (Venus) and 9 (CheRiff) mice)。

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

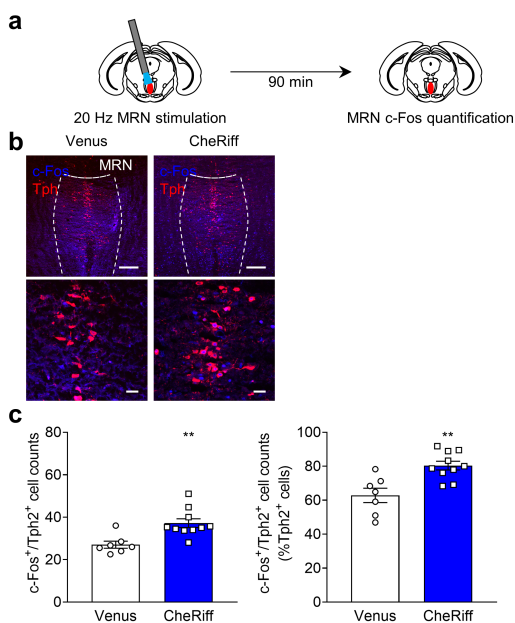


図 2-5 MRN 光遺伝学的活性化による c-Fos 発現誘導

a, 実験の概略図。AAVdj-mTph2-CheRiff-eGFP をマウス MRN に投与し、光ファイバーを MRN 上に挿入、留置した。MRN への光照射 (20 Hz) から 90 分後にマウス脳を摘出し、MRN における c-Fos 発現を解析した。

b, MRN 内 c-Fos 陽性細胞 (blue) および Tph 陽性細胞 (red) の代表図。Scale bars indicate 200  $\mu\text{m}$  (top) and 20  $\mu\text{m}$  (bottom)。

c, MRN c-Fos 陽性細胞の定量結果。Left: c-Fos/Tph 共陽性細胞数 (two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{15} = 3.588$ ,  $**P = 0.0027$ ,  $n = 7$  (Venus) and 10 (CheRiff) mice)。Right: Tph 陽性細胞と比較した c-Fos/Tph 共陽性細胞率 (two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{15} = 3.758$ ,  $**P = 0.0019$ ,  $n = 7$  (Venus) and 10 (CheRiff) mice)。

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

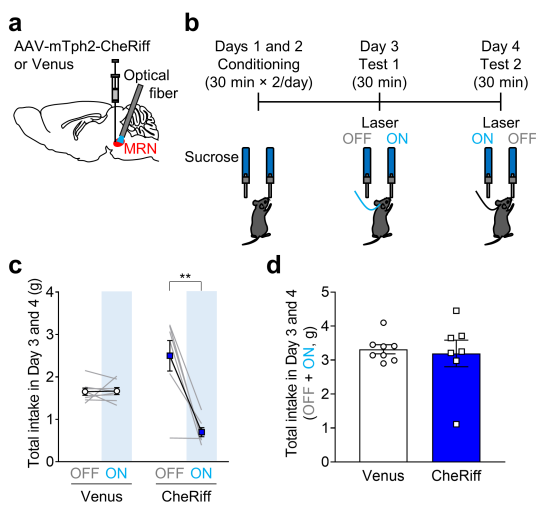


図 2-6 MRN セロトニン神経活動活性化が報酬消費に与える影響

a, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。  
b, 二瓶選択試験の模式図。Day 1 および 2 においてマウスに 2 つの独立したボトルからスクロース水を飲水させた (conditioning: 30 min x 2/day)。光照射は実施しなかった。Day 3 および 4 において、コンディショニングセッションと同様にマウスに飲水させたが、一方のボトルに対してリッキングを行った際に青色光 (20 Hz) を照射した。光照射に関連付けるボトルは day 3 および 4 間で入れ替えた。  
c, 各ボトルにおける day 3 および 4 の合計飲水量。Two-way repeated-measures ANOVA with Sidak *post hoc* test, virus (Venus or CheRiff) x light (ON or OFF) interaction  $F_{1,13} = 26.97, P = 0.0002$ , effect of virus  $F_{1,13} = 0.09712, P = 0.7603$ , effect of light  $F_{1,13} = 26.01, P = 0.0002$ ; *post hoc* test: Valued condition OFF-CheRiff vs ON-CheRiff  $***P < 0.001, n = 8$  (Venus) and 7 (CheRiff) mice).  
d, Day 3 および 4 の総飲水量 (各ボトルにおける day 3 および 4 の合計飲水量の和) Two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction (Venus vs CheRiff),  $t_{7,378} = 0.2949, P = 0.7762, n = 8$  (Venus) and 7 (CheRiff) mice. データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

## MRN セロトニン神経は脚間核、腹側海馬および内側手綱核へ密に投射する

どのセロトニン神経経路が報酬や罰の情報処理を制御するのか検証するため、まず MRN-脚間核 (IPN) 経路に着目した。IPN はニコチンの嗜好性制御に重要な領域として知られており<sup>107,108</sup>、さらに MRN セロトニン神経の順行性トレーシングを行った既報においても、IPN は MRN セロトニン神経から密な神経投射を受けるこ

とが明らかにされている<sup>109</sup>。MRN セロトニン神経の IPN への神経投射を確認するため、eGFP を導入する AAV を用いて順行性標識実験を実施した。具体的には、CheRiff-eGFP 発現マウスの IPN 含有切片に対して、導入した eGFP およびセロトニン神経軸索のマーカであるセロトニントランスポーター (SERT) の免疫組織化学染色を行うことで神経投射を検証した。結果として、IPN に eGFP および SERT 共陽性の線維状構造が観察された (図 2-7a, b)。さらに、軸索末端から細胞体へ逆行性伝播する蛍光ラテックス粒子レトロビーズを用いて、逆行性標識を行った。レトロビーズを IPN に投与し、投与後最低 1 週間経過した後に MRN セロトニン神経を含有する切片を観察したところ、Tph2 陽性細胞にレトロビーズ蛍光が観察された (図 2-7e, f)。IPN に加えて、同様の順行性標識を腹側海馬 (vHP) および内側手綱核 (MHb) においても実施した結果、eGFP 陽性の線維状構造が両領域において観察された。近年の報告では、MHb は報酬および罰の情報処理に不可欠な領域であることが示されている<sup>110,111,112</sup>。vHP においても、背側海馬 (dHP) ではなく vHP が、接触および忌避行動を制御すること、また嫌悪性の捕食者の匂いの情報を処理することが明らかとなっている<sup>113,114</sup>。そこでさらに、CheRiff-eGFP マウスに対する eGFP および SERT の免疫組織化学染色を、vHP および MHb にも実施した。IPN での結果と同様に、eGFP および SERT 陽性の線維状構造、またそれらの共局在の両方において観察された。さらに、逆行

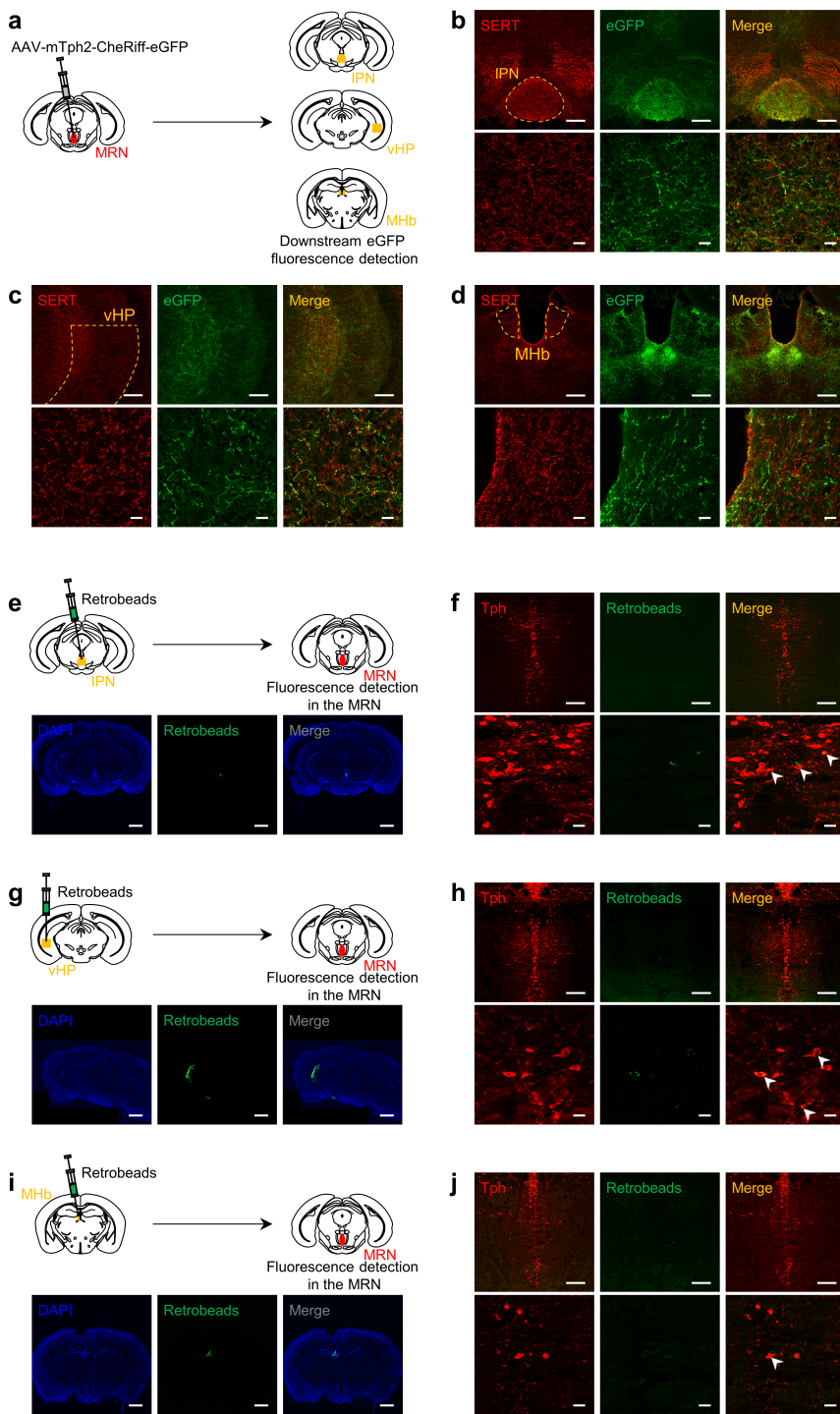


図 2-7 MRN 由来セロトニン投射の同定

a-d, 順行性標識の模式図 (a) および免疫染色像。AAV-mTph2-CheRiff-eGFP を MRN に投与したマウスにおける eGFP 蛍光を、IPN (b)、vHP (c) および MHb (d) にて確認した。SERT: serotonin transporter. Scale bars = 200 μm (top) and 20 μm (bottom).

e-j, 逆行性標識の模式図および各脳領域の蛍光像。マウス IPN (e)、vHP (g) または MHb (i) にレトロビーズを投与し、IPN (f)、vHP (h) または MHb (j) から逆行性に標識された MRN 神経を観察した。白矢じりは共局在した細胞を示している。Scale bars = 1 mm (e, g, i), 200 μm (top, f, h, j), and 20 μm (bottom, f, h, j).

性標識試薬レトロビーズを vHP (図 2-7g, h) および MHb (図 2-7i, j) に投与し、MRN セロトニン神経にてその蛍光を観察したところ、細胞体においてレトロビーズ蛍光が確認された。MRN セロトニン神経の活動亢進が、これらの脳領域の神経を活性化するか検討するため、MRN セロトニン神経を光遺伝学的に活性化した条件において、これらの脳領域の c-Fos 発現を定量した。すなわち、CheRiff マウス、Venus マウスのそれぞれに、MRN へ 20 分間の光照射 (20 Hz, 10-ms ON and 40-ms OFF (20% duty cycle)) を与え、その 90 分後に IPN、vHP、および MHb にて c-Fos 発現細胞数を定量した (図 2-8)。結果として、IPN では CheRiff マウスにおける c-Fos 陽性細胞が Venus

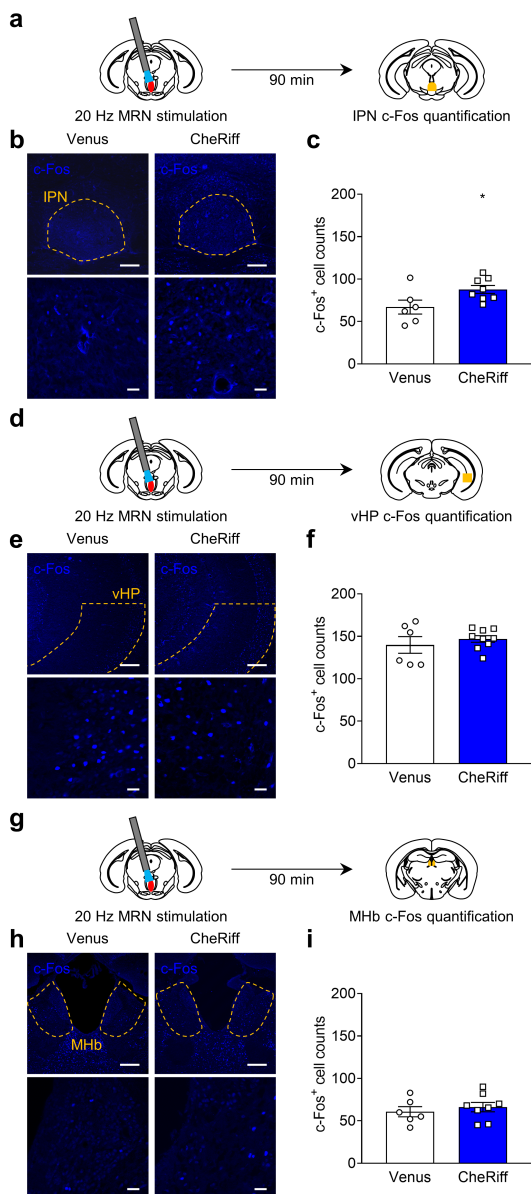


図 2-8 MRN 光遺伝学的活性化による IPN、vHP および MHb における c-Fos 発現誘導

a, d, g, 実験の概略図。AAVdj-mTph2-CheRiff-eGFP をマウス MRN に投与し、光ファイバーを MRN 上に挿入、留置した。MRN への光照射 (20 Hz) から 90 分後にマウス脳を摘出し、IPN (a)、vHP (d) および MHb (g) における c-Fos 発現を解析した。

b, e, h, IPN (b)、vHP (e) および MHb (h) 内 c-Fos 陽性細胞 (blue) の代表図。Scale bars indicate 200  $\mu$ m (top) and 20  $\mu$ m (bottom)。

c, f, i, IPN (c)、vHP (f) および MHb (i) における c-Fos 陽性細胞の定量結果。IPN: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{12} = 2.329$ ,  $*P = 0.0382$ ,  $n = 6$  (Venus) and 8 (CheRiff) mice; vHP: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{13} = 0.7657$ ,  $P = 0.4575$ ,  $n = 6$  (Venus) and 9 (CheRiff) mice; MHb: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{12} = 0.6630$ ,  $P = 0.5199$ ,  $n = 6$  (Venus) and 8 (CheRiff) mice。

データは平均値  $\pm$  標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

マウスと比較して有意に増加していた。その一方で、vHP および MHb では CheRiff マウスと Venus マウスの間に c-Fos 陽性細胞数に差は観察されなかった (IPN:  $n = 6$  (Venus) and  $n = 8$  (CheRiff),  $t_{12} = 2.329$ ,  $*P = 0.0382$ , 図 2-8a-c; vHP:  $n = 6$  (Venus) and  $n = 9$  (CheRiff),  $t_{13} = 0.7657$ ,  $P = 0.4575$ , 図 2-8d-f; MHb:  $n = 6$  (Venus) and  $n = 8$  (CheRiff),  $t_{12} = 0.6630$ ,  $P = 0.5199$ , 図 2-8g-i)。これらの結果は、MRN セロトニン神経の光遺伝学的活性化は IPN において神経活動の亢進を惹起するというを示唆している。

### 報酬刺激は IPN および vHP に投射する MRN セロトニン神経経路を抑制し同神経経路の抑制は報酬様作用を誘発する

MRN セロトニン神経の神経末端における活動変動を測定するために、MRN セロトニン神経に対して、神経末端に高効率で輸送される GCaMP6s 変異体の axon-GCaMP6s を導入した<sup>88</sup>。AAV を MRN に投与した後、光ファイバーを IPN (図 2-9a, 2-10a)、vHP (図 2-9h, 2-10g) または MHb (図 2-9o, 2-10m) に挿入、留置することで、IPN、vHP、MHb それぞれに投射する MRN セロトニン神経由来の axon-GCaMP6s 蛍光を選択的に記録した。IPN から取得した axon-GCaMP6s 蛍光は、MRN セロトニン神経の細胞体での検討 (図 2-1i) と同様に、スクロース消費中に減少した (図 2-9b-d)。vHP から取得した axon-GCaMP6s 蛍光に関しても、スクロース消費中において減少が観察された (図 2-9i-k)。しかしながら、その減少の程度は MRN および IPN の場合と比較して小さかった。またこれらの蛍光減少の程度は、いずれ

の脳領域においても対照群である Venus マウスと比較して有意に大きかった (IPN:  $n = 7$  mice per group,  $t_{7.895} = 4.302$ ,  $**P = 0.0027$ ; vHP:  $n = 6$  mice per group,  $t_{10} = 4.228$ ,  $**P = 0.0018$ ; 図 2-10b–e, 2-10h–k)。一方で MHb における蛍光変化は、axon-GCaMP6s マウスにおいてスクロースリッキングの 2 から 3 秒後において若干の減少が観察された (図 2-9p–r) もの、その減少の程度は僅かであり、Venus マウスと同程度の変化量であった ( $n = 6$  mice per group,  $t_{5.561} = 1.458$ ,  $P = 0.1990$ ; 図 2-10n–q)。

上記の特異的な MRN セロトニン神経経路の活動変動が報酬関連行動の制御に関与するか検討するため、これらの神経経路を選択的に抑制し、CPP 試験によってその影響を検証した。AAV-mTph2-eArchT または AAV-mTph2-Venus を MRN に投与し、光ファイバーを IPN、vHP または MHb に挿入、留置することで、神経経路特異的な活動抑制を可能とした (図 2-9e, l, s)。IPN および vHP へのコンディショニングセッション中の光照射は、eArchT マウスにおいて Venus マウスと比較して有意に CPP スコアを増加させた (図 2-9f, m, 2-10f, l)。加えて、eArchT マウスにおいては光照射と関連付けられたチャンバーへの滞在時間がプレテストと比較してポストテストで有意に増加していた (図 2-9g, n)。一方で、MHb へのコンディショニングセッション中の光照射は CPP スコアに有意な影響を与えなかった。また光照射と関連付けられたチャンバーへの滞在時間にも影響を与えなかった (図 2-9t, u, 2-10r)。これらの結果より、IPN に投射する MRN セロトニン神経経路 (5-HT<sup>MRN→IPN</sup> 経路)、および vHP に投射する MRN セロトニン神経経路 (5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路) はそれぞれ、報酬情報に応答するだけでなく、それらに付随する情動変化を誘発する役割を果たすことが示唆される。

図 2-9 (次頁) 報酬刺激に対する MRN セロトニン神経の投射選択的な応答および投射選択的活動抑制が場所嗜好性に与える影響

a, h, o, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

b, i, p, スクロース水飲水前後における IPN (b)、vHP (i) および MHb (p) 由来 axon-GCaMP6s 蛍光変化の代表的トレース。

c, j, q, Top: IPN (c)、vHP (j) および MHb (q) において取得した axon-GCaMP シグナルのヒートマップ (red–blue, high–low)。各行につき 1 回のリッキングポートにおける蛍光変化を示した。Bottom: マウス 1 匹の試験中に記録された IPN (c)、vHP (j) および MHb (q) 由来 axon-GCaMP シグナルの平均トレース。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。ベースライン蛍光に対して統計的に有意な蛍光低下を青線で表した ( $P < 0.05$ ; permutation test)。 $n = 10$  bouts。

d, k, r, マウス 7 (IPN) または 6 (vHP and MHb) 匹分の IPN (d)、vHP (k) および MHb (r) 由来 axon-GCaMP 蛍光変化。ベースライン蛍光に対して統計的に有意な蛍光低下を青線で示した ( $P < 0.05$ ; permutation test)。

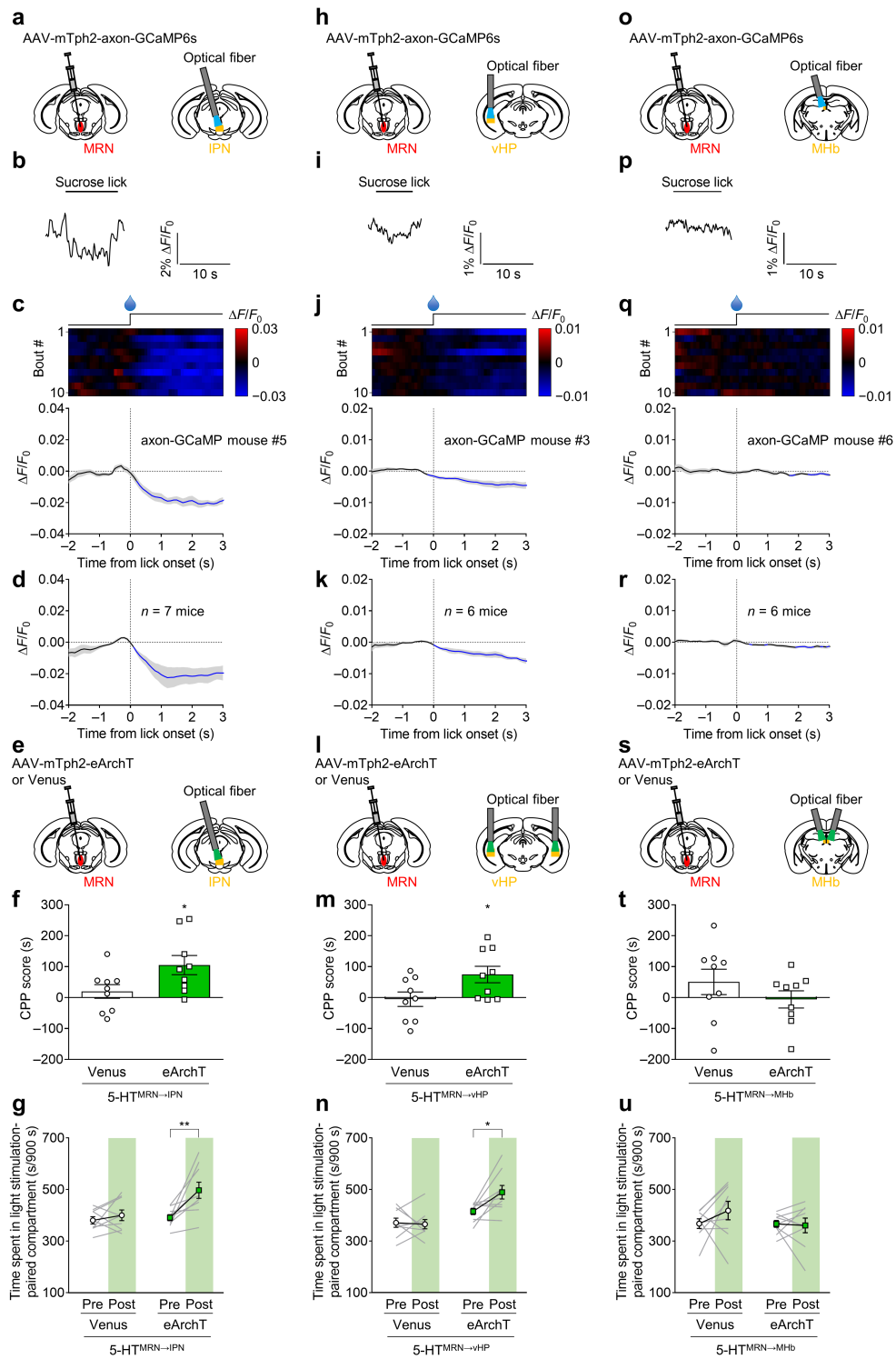
e, l, s, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

f, m, t, IPN (f)、vHP (m) および MHb (t) 光照射時の Venus マウスおよび eArchT マウスの CPP スコア。5-HT<sup>MRN→IPN</sup> および 5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路の抑制は CPP を誘発した (IPN: two-tailed unpaired  $t$ -test (Venus vs eArchT),  $t_{16} = 2.237$ ,  $*P = 0.0399$ ,  $n = 9$  mice; vHP: two-tailed unpaired  $t$ -test (Venus vs eArchT),  $t_{16} = 2.260$ ,  $*P = 0.0382$ ,  $n = 9$  mice; MHb: two-tailed unpaired  $t$ -test (Venus vs eArchT),  $t_{16} = 1.141$ ,  $P = 0.2705$ ,  $n = 9$  mice)。

g, n, u, IPN (g)、vHP (n) および MHb (u) 光照射時の、光照射関連コンパートメントにおける滞在時間変化。eArchT マウスにおいて IPN および vHP への光照射に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間が増加した (IPN-eArchT: two-tailed paired  $t$ -test (eArchT Pre vs eArchT Post),  $t_8 = 3.486$ ,  $**P = 0.0082$ ,  $n = 9$  mice; IPN-Venus: two-tailed paired  $t$ -test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_8 = 0.8922$ ,  $P = 0.3983$ ,  $n = 9$  mice; vHP-eArchT: two-tailed paired  $t$ -test (eArchT Pre vs eArchT Post),  $t_8 = 2.800$ ,  $*P = 0.0232$ ,  $n = 9$  mice; vHP-Venus: two-tailed paired  $t$ -test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_8 = 0.2371$ ,  $P = 0.8186$ ,  $n = 9$  mice; MHb-eArchT: two-tailed paired  $t$ -test (eArchT Pre vs eArchT Post),  $t_8 = 0.2155$ ,  $P = 0.8347$ ,  $n = 9$  mice; MHb-Venus: two-tailed paired  $t$ -test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_8 = 1.233$ ,  $P = 0.2527$ ,  $n = 9$  mice)。

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。





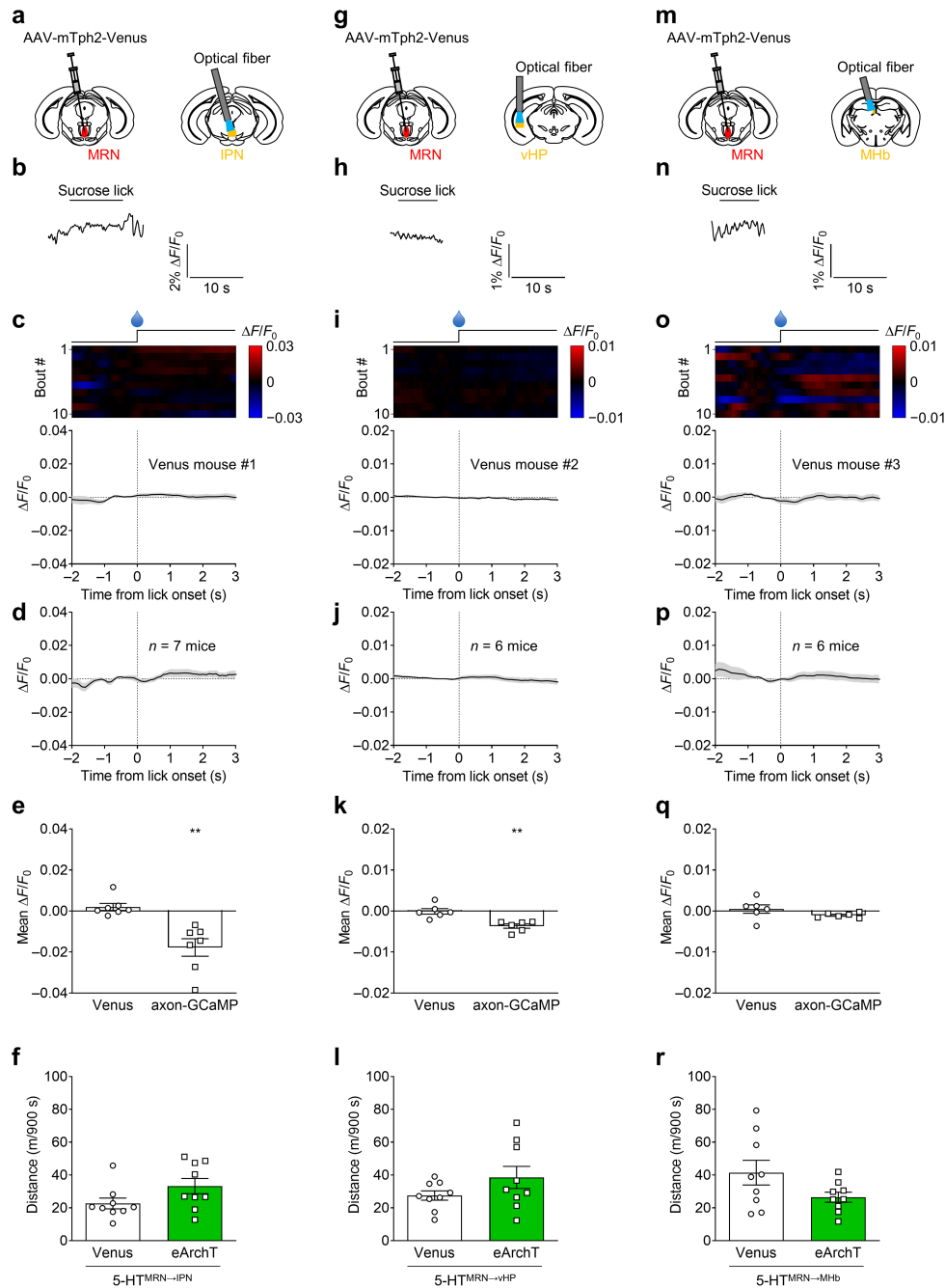


図 2-10 Venus 発現 MRN セロトニン神経の報酬刺激に対する経路選択的応答および MRN セロトニン神経の経路選択的抑制による自発活動性への影響

a, g, m, IPN (a), vHP (g) および MHb (m) における AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

b, h, n, スクローズ水飲水前後における IPN (b), vHP (h) および MHb (n) 由来 Venus 蛍光変化の代表的なトレース。

c, i, o, Top: Venus シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行につき 1 回のリッキングポートにおける蛍光変化を示した。Bottom: マウス 1 匹の試験中に記録された IPN (c), vHP (i) および MHb (o) 由来 Venus シグナルの平均トレース。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。n = 10 bouts。

d, j, p, マウス 7 (IPN) または 6 (vHP, MHb) 匹分の IPN (d), vHP (j) および MHb (p) 由来 Venus 蛍光変化。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。

e, k, q, Venus および axon-GCaMP マウスにおける、飲水開始後 3 秒間の IPN (e), vHP (k) および MHb (q) での平均  $\Delta F/F_0$  の比較。IPN: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs axon-GCaMP),  $t_{7.895} = 4.302$ ,  $**P = 0.0027$ ,  $n = 7$  mice per group; vHP: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs axon-GCaMP),  $t_{10} = 4.228$ ,  $**P = 0.0018$ ,  $n = 6$  mice per group; MHb: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs axon-GCaMP),  $t_{5.561} = 1.458$ ,  $P = 0.1990$ ,  $n = 6$  mice per group。

f, l, r, CPP 試験のポストテストセッションにおける Venus および eArchT マウスの移動距離。IPN (f): two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs eArchT),  $t_{16} = 1.865$ ,  $P = 0.0807$ ,  $n = 9$  mice per group; vHP (l): two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs eArchT),  $t_{10.75} = 1.517$ ,  $P = 0.1580$ ,  $n = 9$  mice per group; MHb (r): two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs eArchT),  $t_{10.58} = 1.840$ ,  $P = 0.0939$ ,  $n = 9$  mice per group。

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

### 罰刺激は IPN および vHP に投射する MRN セロトニン神経経路を活性化し同神経経路の活性化は罰様作用を誘発する

続いて、マウスに罰刺激を負荷した条件において、MRN セロトニン神経の各経路の活動変動を測定した (図 2-11a, f, k, 2-12a, e, i)。報酬刺激に対する応答 (図 2-9) と同様に、テールピンチ後の axon-GCaMP6s 蛍光は IPN および vHP での検討において有意に上昇したが、MHb での検討においては有意な変化は観察されなかった (図 2-11b, g, l, 2-12b, f, j)。しかしながら、IPN での蛍光変化は罰刺激の直後に観察された一方で、vHP での蛍光変化は罰刺激の 1 から 2 秒後に観察された。したがって、報酬/罰刺激の情報処理に対し、IPN へのセロトニン投射は vHP へのセロトニン投射と比較してより一次的な作用を持つと推測した。また、IPN および vHP 由来の axon-GCaMP6s 蛍光変化は Venus マウスのそれと比較して有意に大きかった一方で、MHb 由来の蛍光については axon-GCaMP6s マウスと Venus マウスとの間で有意な差は観察されなかった (IPN:  $n = 6$  (Venus) and  $n = 7$  (axon-GCaMP) mice,  $t_{11} = 4.124$ ,  $**P = 0.0017$ ; vHP:  $n = 6$  mice per group,  $t_{10} = 2.437$ ,  $*P = 0.0350$ ; MHb:  $n = 6$  mice per group,  $t_{10} = 1.962$ ,  $P = 0.0782$ ; 図 2-12c, g, k)。

観察された神経経路活動の上昇と不快情動関連行動の発現との因果関係を検証するため、CheRiff または Venus を MRN に導入し、光ファイバーを IPN、vHP または MHb に挿入した (図 2-11c, h, m)。CPA 試験において、IPN および vHP への光照射は有意に CPA スコアを減少させた (図 2-11d, i, 2-12d, h)。また、光照射と関連付けられたチャンバーへの滞在時間も有意に減少した (図 2-11e, j)。一方で、MHb への光照射は CPA スコアおよび光照射と関連付けられたチャンバーへの滞在時間に有意な影響を与えなかった (図 2-11n, o, 2-12l)。これらの結果をまとめると、 $5\text{-HT}^{\text{MRN} \rightarrow \text{IPN}}$  および  $5\text{-HT}^{\text{MRN} \rightarrow \text{vHP}}$  経路は罰情報の処理において中心的な役割を果たすことが示唆される。

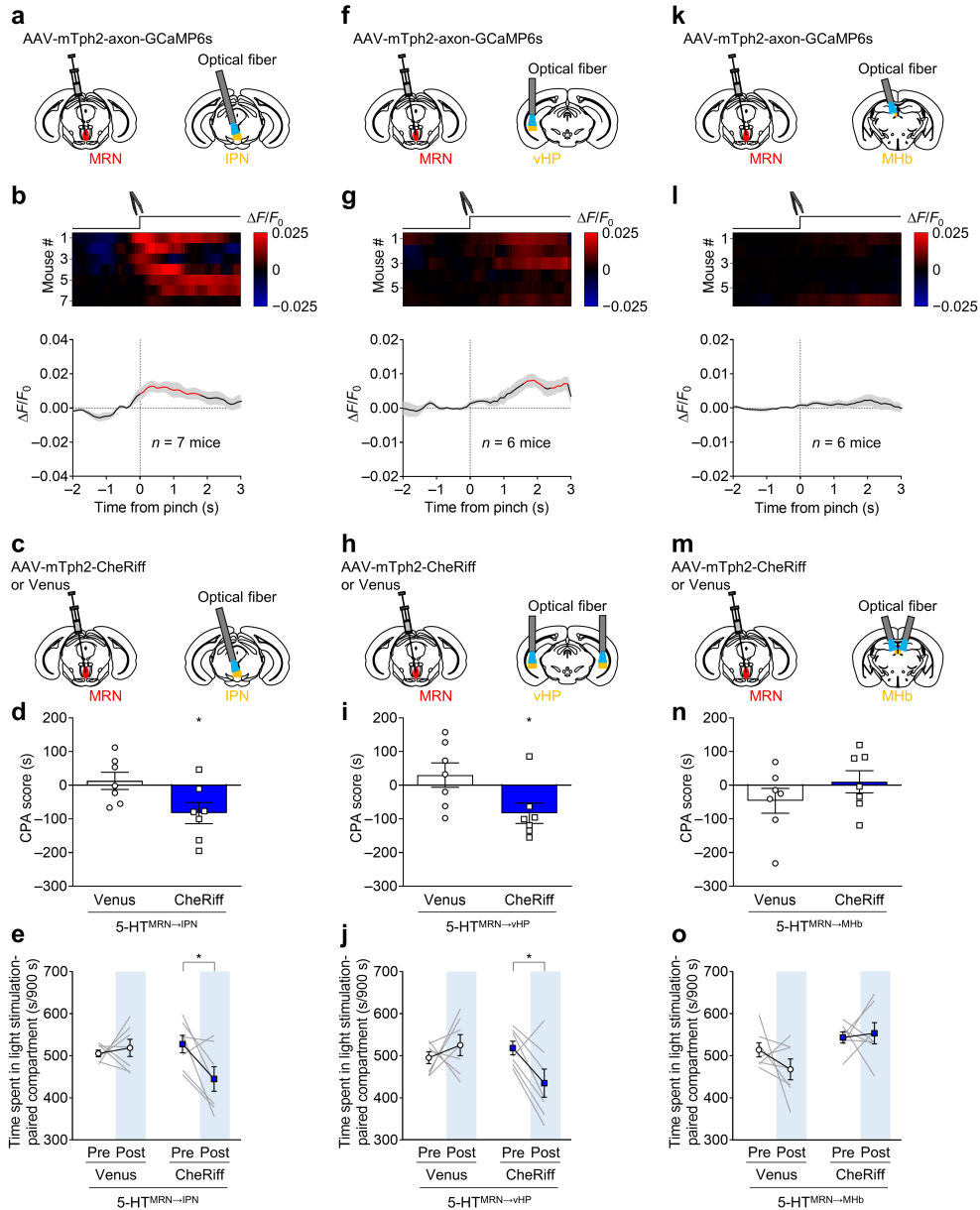


図 2-11 罰刺激に対する MRN セロトニン神経の投射選択的な応答および投射選択的活動亢進が場所嫌悪性に与える影響

a, f, k, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。  
b, g, i, Top: IPN (b), vHP (g) および MHb (i) から取得した axon-GCaMP シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行はそれぞれ 1 回の試行における蛍光変化を示し、1 匹につき 1 回のみ試験を実施した。n = 7 (IPN) or 6 (vHP and MHb) mice。Bottom: マウス 7 (IPN) または 6 (vHP and MHb) 匹分の IPN (b), vHP (g) および MHb (i) 由来 axon-GCaMP 蛍光変化。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。ベースライン蛍光に対して統計的に有意な蛍光上昇を赤線で示した ( $P < 0.05$ ; permutation test)。  
c, h, m, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。  
d, i, n, IPN (d), vHP (i) および MHb (n) 照射時の Venus マウスおよび CheRiff マウスの CPA スコア。5-HT<sup>MRN→IPN</sup> および 5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路の活性化は CPA を誘発した (IPN: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{12} = 2.367$ ,  $*P = 0.0356$ ,  $n = 7$  mice; vHP: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{12} = 2.407$ ,  $*P = 0.0331$ ,  $n = 7$  mice; MHb: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff),  $t_{12} = 1.146$ ,  $P = 0.2742$ ,  $n = 7$  mice)。  
e, j, o, IPN (e), vHP (j) および MHb (o) 照射時の、照射関連コンパートメントにおける滞在時間変化。CheRiff マウスにおいて IPN および vHP への照射に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間が減少した (IPN-CheRiff: two-tailed paired *t*-test (CheRiff Pre vs CheRiff Post),  $t_6 = 2.642$ ,  $*P = 0.0385$ ,  $n = 7$  mice; IPN-Venus: two-tailed paired *t*-test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_6 = 0.5121$ ,  $P = 0.6268$ ,  $n = 7$  mice; vHP-CheRiff: two-tailed paired *t*-test (CheRiff Pre vs CheRiff Post),  $t_6 = 2.756$ ,  $*P = 0.0330$ ,  $n = 7$  mice; vHP-Venus: two-tailed paired *t*-test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_6 = 0.8309$ ,  $P = 0.4378$ ,  $n = 7$  mice; MHb-CheRiff: two-tailed paired *t*-test (CheRiff Pre vs CheRiff Post),  $t_6 = 0.3089$ ,  $P = 0.7678$ ,  $n = 7$  mice; MHb-Venus: two-tailed paired *t*-test (Venus Pre vs Venus Post),  $t_6 = 1.259$ ,  $P = 0.2549$ ,  $n = 7$  mice)。データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

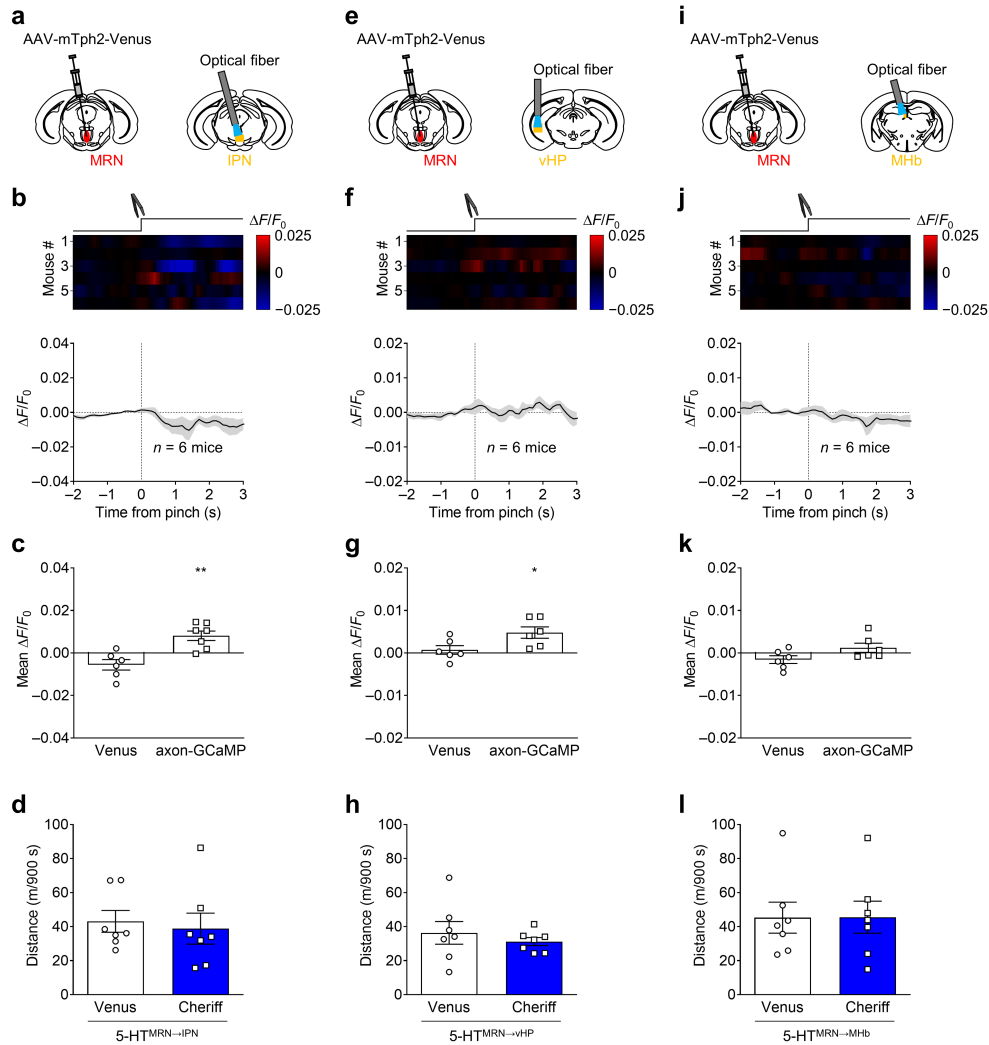


図 2-12 Venus 発現 MRN セロトニン神経の罰刺激に対する経路選択的応答および MRN セロトニン神経の経路選択的活性化による自発活動性への影響

a, e, i, IPN (a), vHP (e) および MHb (i) における AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

b, f, j, Top: Venus シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行はそれぞれ 1 回の試行における蛍光変化を示し、1 匹につき 1 回のみ試験を実施した。n = 7 mice。Bottom: マウス 6 匹分の IPN (b), vHP (f) および MHb (j) 由来 Venus 蛍光変化。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。

c, g, k, Venus および axon-GCaMP マウスにおける、テールピンチ後 3 秒間の IPN (c), vHP (g) および MHb (k) での平均  $\Delta F/F_0$  の比較。IPN: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs axon-GCaMP),  $t_{11} = 4.124$ ,  $**P = 0.0017$ ,  $n = 6$  (Venus) and 7 (axon-GCaMP) mice; vHP: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs axon-GCaMP),  $t_{10} = 2.437$ ,  $*P = 0.0350$ ,  $n = 6$  mice per group; MHb: two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs axon-GCaMP),  $t_{10} = 1.962$ ,  $P = 0.0782$ ,  $n = 6$  mice per group。

d, h, i, CPA 試験のポストテストセッションにおける Venus および Cheriff マウスの移動距離。IPN (d): two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs Cheriff),  $t_{12} = 0.3838$ ,  $P = 0.7079$ ,  $n = 7$  mice per group; vHP (h): two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs Cheriff),  $t_{7,460} = 0.7213$ ,  $P = 0.4927$ ,  $n = 7$  mice per group; MHb (i): two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs Cheriff),  $t_{12} = 0.02146$ ,  $P = 0.9832$ ,  $n = 7$  mice per group。

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

## MRN セロトニン神経活動活性化による罰情報処理には IPN の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体活性化が不可欠である

どのセロトニン (5-HT) 受容体によって MRN 由来のセロトニンシグナルが媒介されるのかを検討するため、5-HT 受容体アンタゴニストおよびアゴニストの作用を検証した。以前の報告より、5-HT<sub>1A</sub> 受容体および 5-HT<sub>2A</sub> 受容体のアンタゴニストの全身投与は、電気ショックおよび薬物誘発場所嫌悪において発現するフリージング行動を緩和することが知られている<sup>115,116,117</sup>。そこで CPA 試験のコンディショニング 30 分前に WAY-100635 (0.5 mg/kg; 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist)、MDL-100907 (0.5 mg/kg; 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist) または vehicle (saline) を腹腔内投与し、薬物処置による CPA への影響を観察した (図 2-13a, b)。MRN への光照射は、vehicle 群において有意に CPA スコアを減少させた一方で、WAY-100635 群および MDL-100907 群においては CPA スコアの減少作用が消失していた (図 2-13c, 2-14a)。同様に、光照射と関連付けたチャンバーに対する滞在時間の減少についても、vehicle 群では観察された一方で WAY-100635 群および MDL-100907 群においては観察されなかった (図 2-13d)。

どの脳領域がこれらの作用の責任領域であるのか同定するため、次にアンタゴニストの局所投与を実施した。前述の検討では、5-HT<sup>MRN→IPN</sup> 経路は 5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路と比較して、より迅速かつ顕著に報酬/罰刺激に応答することを見出しており、加えて、MRN セロトニン神経を光遺伝学的に活性化した際の c-Fos 陽性細胞増加が、IPN では観察される一方で vHP ないし MHb では観察されないことも見出している (図 2-8)。そこで各アンタゴニストを IPN 内に局所投与し、その影響を評価することとした (図 2-13e)。薬物処置は CPA 試験のコンディショニング 5 分前に行い、インジェクションカニューレを使用して WAY-100635 (1 μg in 0.2 μL)、MDL-100907 (0.1 μg in 0.2 μL) または vehicle (saline, 0.2 μL) の IPN 局所投与を実施した (図 2-13f)。結果として、MDL-100907 の IPN 局所投与により、MRN 活性化により誘発される CPA スコア減少効果が消失した。WAY-100635 群および vehicle 群においてはこの作用は観察されなかった (図 2-13g, 2-14b)。さらに、光照射に関連付けられたチャンバーへの滞在時間減少についても、vehicle 群および WAY-100635 群で観察された一方で、MDL-100907 群においては観察されなかった (図 2-13h)。続いて、IPN 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の活性化が罰関連行動の発現に十分であるか検討するために、5-HT<sub>2A</sub> 受容体アゴニストを IPN に局所投与し、その影響を CPA 試験にて評価した (図 2-13i)。コンディショニングセッションにおいて光照射は行わず、コンディショニング 5 分前に TCB-2 (0.05 μg in 0.5 μL) または vehicle (saline, 0.5 μL) を IPN に局所投与することで条件付けを行った (図 2-13j)。TCB-2 群において CPA スコアは有意に減少し、加えて薬物処置に関連付けられたチャンバーへの滞在時間も有意に減少した (図 2-13k, l)。以上の結果は、罰刺激の情報処理に対して IPN の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体が不可欠な役割を果たすことを示している。

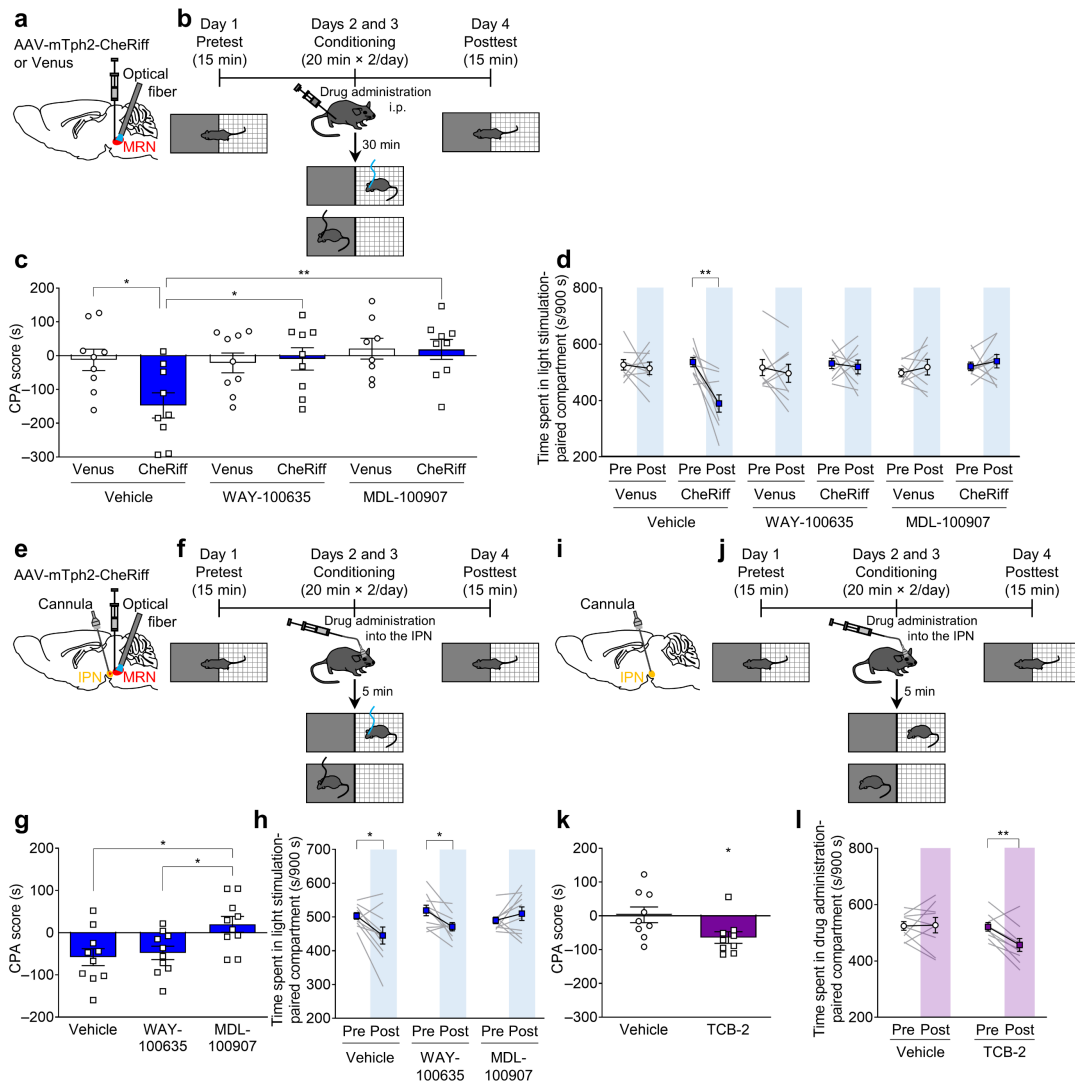


図 2-13 セロトニン受容体活動調節が場所嫌悪性に与える影響

a, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

b, CPA 試験の概略図。Day 1 では、マウスに 2 つのコンパートメント間を照射無しで自由探索させた (pretest: 15 min)。Day 2 および 3 では、照射を用いてマウスに 1 日につき 2 回のコンディショニングを実施した (20 min × two times per day)。コンディショニング全てにおいて (すなわち、マウス 1 匹につき計 4 回)、マウスはコンディショニング 30 分前に vehicle (1% DMSO in saline)、WAY-100635 (0.5 mg/kg) または MDL-100907 (0.5 mg/kg) を腹腔内投与された。Day 4 では、マウスに再度 2 コンパートメント間を照射無しで自由探索させた (posttest: 15 min)。

c, 各群における Venus マウスおよび CheRiff マウスの CPA スコア。MRN セロトニン神経への照射によって誘発される CPA は WAY-100635 および MDL-100907 の全身投与により減弱した (two-way ANOVA with Tukey *post hoc* test, virus (Venus or CheRiff) × drug (vehicle, WAY-100635, or MDL-100907) interaction  $F_{2,47} = 3.215$ ,  $*P = 0.0491$ , effect of virus  $F_{1,47} = 2.539$ ,  $P = 0.1178$ , effect of drug  $F_{2,47} = 4.907$ ,  $*P = 0.0116$ ; *post hoc* test: Venus-Vehicle vs CheRiff-Vehicle  $*P = 0.0465$ , CheRiff-Vehicle vs CheRiff-WAY-100635  $*P = 0.0401$ , CheRiff-Vehicle vs CheRiff-MDL-100907  $**P = 0.0073$ .  $n = 9$  (Venus-Vehicle, CheRiff-Vehicle, Venus-WAY-100635, CheRiff-WAY-100635 and CheRiff-MDL-100907) and 8 (Venus-MDL-100907))。

d, 照射関連コンパートメントにおける滞在時間変化。Vehicle を投与された CheRiff マウスは照射に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間が減少したが、WAY-100635 または MDL-100907 を投与された CheRiff マウスにおいては滞在時間減少が観察されなかった (CheRiff-Vehicle: two-tailed paired *t*-test (Pre vs Post),  $t_8 = 3.959$ ,  $**P = 0.0042$ ,  $n = 9$  mice; CheRiff-WAY-100635: two-tailed paired *t*-test (Pre vs Post),  $t_8 = 0.3798$ ,  $P = 0.7140$ ,  $n = 9$  mice; CheRiff-MDL-100907: two-tailed paired *t*-test (Pre vs Post),  $t_8 = 0.6239$ ,  $P = 0.5501$ ,  $n = 9$  mice)。

e, AAV 投与、ファイバー留置およびカニューレ留置の模式図。

f, CPA 試験の概略図。Day 1 では、マウスに 2 つのコンパートメント間を照射無しで自由探索させた (pretest: 15 min)。Day 2 および 3 では、照射を用いてマウスに 1 日につき 2 回のコンディショニングを実施した (20 min × two times per day)。コンディショニング全てにおいて (すなわち、マウス 1 匹につき計 4 回)、マウスはコンディショニング 5 分前に vehicle (1% DMSO in saline, 0.2  $\mu$ L)、WAY-100635 (1  $\mu$ g in 0.2  $\mu$ L) または MDL-100907 (0.1  $\mu$ g in 0.2  $\mu$ L) を IPN に局所投与された。Day 4 では、マウスに再度 2 コンパートメント間を照射無しで自由探索させた (posttest: 15 min)。

g, 各群における Venus マウスおよび CheRiff マウスの CPA スコア。Vehicle および WAY-100635 を IPN 局所投与された CheRiff マウスは CPA スコアが減少した一方、MDL-100907 の IPN 局所投与は CPA スコアに影響を与えなかった (one-way ANOVA with Tukey *post hoc* test,  $F_{2,27} = 5.327$ ,  $*P = 0.0112$ ; *post hoc* test: Vehicle vs MDL-100907  $*P = 0.0153$ , WAY-100635 vs MDL-100907  $*P = 0.0374$ , Vehicle vs WAY-100635  $P = 0.9208$ .  $n = 10$  mice)。

h, 照射関連コンパートメントにおける滞在時間変化。Vehicle または WAY-100635 を IPN 局所投与した CheRiff マウスにおいては照射に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間が減少したが、MDL-100907 を IPN 局所投与した CheRiff マウスにおいては滞在時間減少は観察されなかった (Vehicle: two-tailed paired *t*-test (Pre vs Post),  $t_9 = 2.897$ ,  $*P = 0.0177$ ,  $n = 10$  mice; WAY-100635: two-tailed paired *t*-test (Pre vs Post),  $t_9 = 3.009$ ,  $*P = 0.0147$ ,  $n = 10$  mice; MDL-100907: two-tailed paired *t*-test (Pre vs Post),  $t_9 = 1.053$ ,  $P = 0.3196$ ,  $n = 10$  mice)。

i, カニューレ留置の模式図。

j, CPA 試験の概略図。Day 1 では、マウスに 2 つのコンパートメント間を自由探索させた (pretest: 15 min)。Day 2 および 3 では、薬物処置によってマウスに 1 日につき 2 回のコンディショニングを実施した (20 min × two times per day)。コンディショニング全てにおいて (すなわち、マウス 1 匹につき計 4 回)、マウスはコンディショニング 5 分前に vehicle (saline, 0.5  $\mu$ L) または TCB-2 (0.05  $\mu$ g in 0.5  $\mu$ L) を IPN に局所投与された。Day 4 では、マウスに再度 2 コンパートメント間を自由探索させた (posttest: 15 min)。試験を通して照射は実施しなかった。

k, vehicle 処置マウスおよび TCB-2 処置マウスの CPA スコア。TCB-2 処置マウスは vehicle 処置マウスと比較して CPA スコアが減少した (two-tailed unpaired *t*-test (Vehicle vs TCB-2),  $t_{16} = 2.321$ ,  $*P = 0.0338$ ,  $n = 9$  mice per group)。

l, 薬物処置に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間変化。TCB-2 を IPN 局所投与されたマウスは薬物処置に関連付けられたコンパートメントでの滞在時間が減少した (TCB-2: two-tailed paired *t*-test (TCB-2 Pre vs TCB-2 Post),  $t_8 = 3.725$ ,  $**P = 0.0058$ ,  $n = 9$  mice; Vehicle: two-tailed paired *t*-test (Vehicle Pre vs Vehicle Post),  $t_8 = 0.1262$ ,  $P = 0.9027$ ,  $n = 9$  mice)。

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。



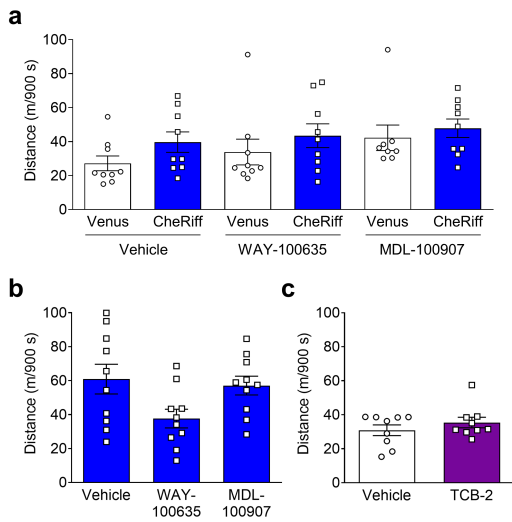


図 2-14 薬物処置を伴う MRN セロトニン神経の光遺伝学的活性化による自発活動性への影響

a, 薬物腹腔内投与後の CPA 試験のポストテストセッションにおける Venus および CheRiff マウスの移動距離。Two-way ANOVA with Tukey *post hoc* test, virus (Venus or CheRiff) × drug (vehicle, WAY-100635, or MDL-100907) interaction  $F_{2,47} = 0.1441$ ,  $P = 0.8662$ , effect of virus  $F_{1,47} = 3.119$ ,  $P = 0.0839$ , effect of drug  $F_{2,47} = 1.638$ ,  $P = 0.2052$ ,  $n = 9$  (Venus-Vehicle, CheRiff-Vehicle, Venus-WAY-100635, CheRiff-WAY-100635 and CheRiff-MDL-100907) and 8 (Venus-MDL-100907) mice.

b, 5-HT 受容体阻害薬 IPN 局所投与後の CPA 試験のポストテストセッションにおける vehicle、WAY-100635 および MDL-100907 投与マウスの移動距離。One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test,  $F_{2,27} = 3.402$ ,  $*P = 0.0481$ ; *post hoc* test: Vehicle vs WAY-100635  $P = 0.0553$ , Vehicle vs MDL-100907  $P = 0.9160$ , WAY-100635 vs MDL-100907  $P = 0.1238$ .  $n = 10$  mice per group.

c, 5-HT 受容体刺激薬 IPN 局所投与後の CPA 試験のポストテストセッションにおける vehicle および TCB-2 マウスの移動距離。Two-tailed unpaired *t*-test (Vehicle vs TCB-2),  $t_{16} = 1.033$ ,  $P = 0.3168$ ,  $n = 9$  mice per group.

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

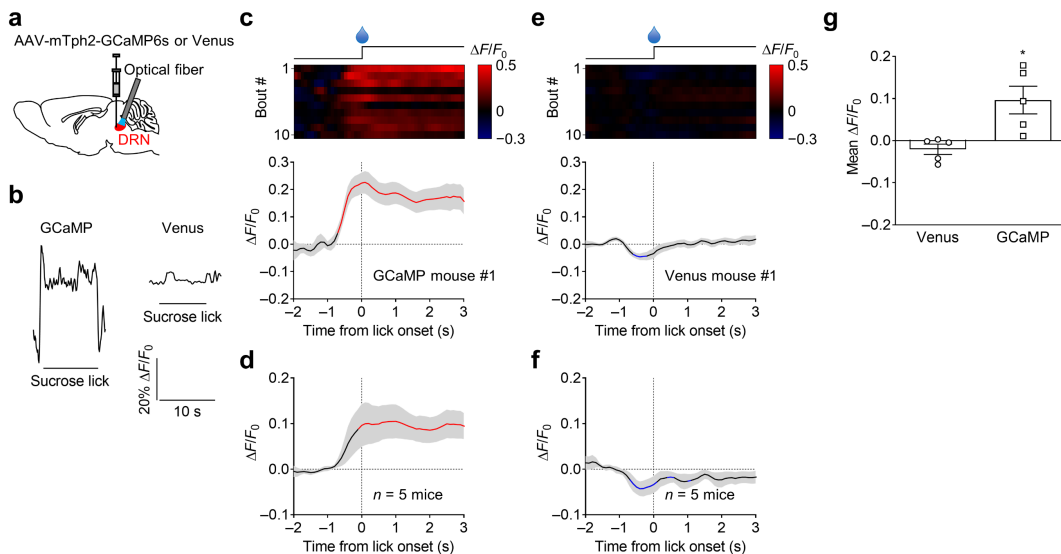


図 2-15 DRN セロトニン神経は報酬刺激によって活性化される

a, AAV 投与およびファイバー留置の模式図。

b, スクロース水の飲水前後における GCaMP (left) および Venus (right) 蛍光変化の代表的なトレース。

c, e, Top: GCaMP (c) および Venus (e) シグナルのヒートマップ (red-blue, high-low)。各行につき 1 回のリッキングポートにおける蛍光変化を示した。Bottom: マウス 1 匹の試験中に記録された DRN 由来 GCaMP (c) および Venus (e) シグナルの平均トレース。線および陰影部はそれぞれ平均値および標準誤差を示している。赤線および青線はそれぞれ、ベースライン蛍光に対して統計的に有意に蛍光上昇および低下したことを表している ( $P < 0.05$ ; permutation test).  $n = 10$  bouts.

d, f, マウス 5 匹分の DRN 由来 GCaMP (d) および Venus (f) 蛍光変化。ベースライン蛍光に対する統計的に有意な蛍光上昇および低下を、赤線および青線で図示した ( $P < 0.05$ ; permutation test).

g, Venus および GCaMP マウスにおける飲水開始後 3 秒間の平均  $\Delta F/F_0$  の比較 (two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs GCaMP),  $t_8 = 3.333$ ,  $*P = 0.0103$ ,  $n = 5$  mice per group).

データは平均値 ± 標準誤差で表記し、エラーバーにより標準誤差を示した。

## 考察

セロトニンはモノアミン神経伝達物質の一種であり、報酬/罰情報、情動制御、あるいは記憶といった多様な脳機能に関連すると知られている<sup>118,119</sup>。本研究において、光遺伝学的手法を駆使した細胞種選択的な活動記録および活動調節を通して、MRN セロトニン神経が報酬および罰の情報処理に重要な役割を果たすことが明らかにされた。さらに、それらの情報処理を同等に担う MRN 経路として IPN への投射経路を同定した。以前の報告から、MRN および IPN はそれぞれ個別に、負の感情価を伴う刺激を処理することが知られている<sup>79,80,81,82,107,108</sup>。著者はこれらの発見をより選択的かつ直接的な手法によってセロトニン神経特異的に検証し、MRN から IPN へ投射するセロトニン神経経路の報酬/罰情報処理に対する役割を明らかにした。本研究では MRN セロトニン神経選択的な活動記録および介入を実施したが、MRN 内の vGluT2 発現グルタミン酸神経に関しても本結果と同様の結果が示されている<sup>82</sup>。MRN セロトニン神経の作用が MRN vGluT2 発現グルタミン酸神経の作用と識別可能かについては、さらなる研究が必要と考えられる。また、報酬および罰情報の適切な処理に不可欠な神経経路として、5-HT<sup>MRN→IPN</sup> 経路を同定した。罰刺激が MRN セロトニン神経活動を亢進させ、またそれらの神経の光遺伝学的活性化は IPN において c-Fos 陽性細胞数を増加させることを明らかにした。以前の研究では、急性のニコチン退薬は IPN 神経活動を上昇させることが示されており、加えて背外側被蓋核 (LDTg) に投射する IPN 神経の活性化は嫌悪情報に関連付けられた場所嫌悪性を誘発することが知られている<sup>101,108</sup>。MRN セロトニン神経によって活性化される IPN 神経の投射パターンが未だ明らかでないものの、これらの知見を踏まえると、5-HT<sup>MRN→IPN</sup> 経路活動の調節は、依存性薬物の摂取により惹起される退薬症状の治療に有益である可能性が考えられる。本検討ではさらに、IPN の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の活性化は条件付け場所嫌悪性の獲得に必要なことを明らかにした。興味深いことに、5-HT<sub>2A</sub> 受容体の逆アゴニストはニコチン慢性投与ラットにおける退薬症状を緩和することが以前の研究より報告されている<sup>120,121</sup>。前述の、急性ニコチン退薬により IPN 神経活動が亢進するという既報と統合すると、5-HT<sub>2A</sub> 受容体を発現する IPN 神経はニコチンの退薬症状発現や症状治療に重大な役割を果たす可能性がある。

スクロース水摂水による報酬刺激は MRN セロトニン神経活動を抑制した (図 2-1f-i) 一方で、既報および本検証では DRN セロトニン神経活動を亢進した<sup>66,67</sup> (図 2-15a-g)。近年の報告では、DRN セロトニン神経の活動活性化は、主として腹側被蓋野 (VTA) への投射を介して報酬関連行動を引き起こすことが示されている<sup>64,65</sup>。これらの報告は DRN セロトニン神経活動が報酬シグナルを制御することを示唆している。一方で、解剖学的検討により IPN から外側手綱核 (LHb) への投射が報告されている<sup>122</sup>。また Lammel らは、LHb から VTA への入力は主に皮質に投射するドパミン神経を活性化し、それらの活性化が嫌悪情動を誘発することを報告している<sup>89</sup>。したがって罰刺激による

5-HT<sup>MRN→IPN</sup> 経路の活性化は、負の価値をコードする LHb-VTA-mPFC(内側前頭前皮質) 経路を活性化する可能性が考えられる。加えて以前の研究は、LDTg に投射する IPN 神経活性化が VTA に投射する LDTg 神経を抑制し、場所嫌悪性を惹起することを明らかにしている<sup>108</sup>。興味深いことに、中脳辺縁系ドパミン神経は LDTg から投射を受けるが、その経路の活性化は場所嗜好性を誘発する<sup>89</sup>。これらをまとめると、罰刺激による 5-HT<sup>MRN→IPN</sup> 経路活性化が、正の価値をコードする LDTg-VTA-NAc (側坐核) 経路を抑制する可能性も考えられる。また一方で、DRN の小胞グルタミン酸トランスポーター3 (vGluT3) 発現神経はセロトニンも含有し、中脳辺縁系ドパミン神経に強く投射している<sup>123</sup>。また Wang らは、VTA に投射する DRN セロトニン神経を活性化した結果、NAc における細胞外ドパミン量が増加し、場所嗜好性が惹起されることを明らかにしている<sup>124</sup>。すなわち、報酬刺激による DRN セロトニン神経活動亢進は、正の価値をコードする VTA-NAc 経路を活性化する。以上を総合すると、LHb 経路の活性化または LDTg 経路の抑制を誘発する IPN 投射 MRN 由来シグナリングは、VTA-NAc 経路を活性化する DRN 由来シグナリングと対となって VTA ドパミン神経を制御することが示唆される。すなわち、MRN および DRN 由来のシグナリングは VTA ドパミン神経に統合され、それらのバランスの変化によって表現型が規定されると考えられる。したがって、MRN セロトニン神経の活動活性化/抑制がどの程度中脳辺縁系のドパミン神経の活動性に影響するか、今後精査する必要があるだろう。これらの知見から考えると、SSRI は MRN および DRN の両方でセロトニン神経伝達を増強させ、反対の価値をコードしているこれらの個別のセロトニン伝達を亢進させる。そのため SSRI は大うつ病におけるアンヘドニアに対して有効性が低いのかもしれない。この観点に基づくと、MRN および DRN セロトニン神経の間で異なる発現様式を示す遺伝子<sup>125,126</sup> は、セロトニン神経伝達の経路選択的な調節を介して大うつ病を治療しうる、理想的な創薬標的となるだろう。

本研究ではまた、vHP に投射するセロトニン神経の活動性が報酬/罰刺激に応答して変動するが、この変化量は IPN のものと比較し時間的に遅れることも見出した (図 2-9 および 2-11)。5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路が恐怖記憶および不安状態を調節するという以前の報告<sup>127,128</sup> を考慮すると、罰刺激に対してこの経路は、情報処理そのものに関わるというよりも、むしろ情報処理の間接的あるいは二次的な作用を媒介している可能性がある。また、5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路は報酬/罰刺激の情報処理に対して直接的ではない可能性はあるが、この経路は目的指向行動中に活性化しているということにも注目しなければならない<sup>129</sup>。この持続した活動活性化が目的指向行動の持続とその達成をもたらしている一方で、マウスはこの持続活性を嫌悪的あるいはストレスとして感受している可能性が考えられる。持続した目的指向行動には vHP のセロトニン 5-HT<sub>3</sub> 受容体が必要である一方<sup>129</sup>、恐怖記憶および不安作用は vHP の 5-HT<sub>7</sub> 受容体および 5-HT<sub>2c</sub> 受容体がそれぞれ調節に関与している<sup>128,130</sup>。本研究で見出した 5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路の報酬/罰情報制御を担っている 5-HT 受容体サブタイプについては不明であるが、さらなる薬理的検討を行うこと

で、本経路が報酬/罰情報制御において果たしている役割の全容を明らかにすることができると思われる。

MRN 投射領域として、本検討では IPN、vHP および MHb に焦点を当てたが、その他の投射領域が報酬/罰刺激情報の処理に関与することを必ずしも否定するものではない。例えば、MRN セロトニン神経は vHP のみならず dHP にもその神経投射が存在する。Luchetti らは二光子カルシウムイメージング法を MRN から dHP に投射するセロトニン神経経路に適用することで、この経路における 2 種類のセロトニン投射を同定している<sup>131</sup>。彼らはこの 2 種類の投射は報酬および運動にそれぞれ応答することを見出しており、また報酬提示と関連付けられた場所にマウスが置かれている時間中、5-HT<sup>MRN→dHP</sup> 経路の抑制が減弱することも発見している。この経路とは対照的に、本研究では 5-HT<sup>MRN→vHP</sup> 経路および 5-HT<sup>MRN→IPN</sup> 経路は報酬刺激に対して負の方向に、そして罰刺激に対して正の方向に応答することをそれぞれ明らかにした。MRN セロトニン神経のこうした多様性の理由として、セロトニン神経集団内に存在する多様性が背景にあると考えられる。すなわち、異なる脳領域に投射する神経集団がそれぞれ存在し、報酬に対して反対の応答を示していると考えられる。注目すべきこととして、近年のシングルセル RNA シークエンス解析によって、MRN および DRN セロトニン神経はその発現遺伝子の多様性から 10 以上のクラスターに分割できることが明らかにされている<sup>125,126</sup>。加えて、本検討では AAV は MRN に存在するセロトニン神経のほとんどに感染している (図 2-1b-d) が、Luchetti らの検討では MRN セロトニン神経の小集団にのみ AAV が感染している<sup>131</sup> (Luchetti ら、図 2B より)。したがって、これらの神経集団それぞれが異なる投射を持ち、異なった様式で報酬に応答する可能性がある。

MHb は報酬や情動、および意思決定の処理に中心的な役割を果たしている<sup>110,132,133</sup>。この神経核は MRN セロトニン神経から密な投射を受けるものの<sup>109</sup> (図 2-7)、5-HT<sup>MRN→MHb</sup> 経路の活動調節は CPP 試験および CPA 試験において有意な変化を示さなかった (図 2-9 および 2-11)。過去の報告からは、MHb 神経活動はニコチンによって亢進し<sup>134</sup>、また MHb 内のニコチン受容体活性化は NAc における細胞外ドパミン濃度を上昇させることが示されており<sup>135</sup>、依存性薬物の作用発現において MHb の重要な役割が示唆されている。この知見と一致して、ニコチン受容体アンタゴニストの MHb 局所投与はニコチン慢性投与マウスに対して退薬症状を惹起させる<sup>136</sup>。さらに興味深いことに、ニコチン受容体アンタゴニストの MHb 局所投与はモルヒネ自己投与を抑制させる一方でスクロースへの応答性は変化させない<sup>111</sup>。したがって、5-HT<sup>MRN→MHb</sup> 経路の調節は、スクロースによる報酬刺激ではなく、依存性薬物慢性投与後の報酬関連行動に影響する可能性が考えられる。

本研究において著者は、報酬および罰刺激の情報処理に重要な神経として MRN セロトニン神経を同定し、同神経の IPN への投射が特にその情報処理において重要であることも示した。加えて、本研究では MRN セロトニン神経の活動亢進によって誘発され

る罰様作用を IPN の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体が担っていることも示した。IPN の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体シグナリングの基盤となるメカニズムをさらに同定することで、報酬/罰情報処理に対するより深い洞察を得ることが可能となり、さらにはこうした情報処理異常が背景にある、薬物依存および大うつ病といった精神疾患の生物学的基盤に対しても、さらなる理解を得ることができるだろう。

## 総括および結論

本研究においては、報酬および疼痛制御を担う神経機構に関して検討を行い、以下の知見を得た。

### 第一章

- ・初代培養 DRG 神経に対する NTP の 3 日間持続処置は、電流注入時の発火回数を減少させた。
  - ・初代培養 DRG 神経に対する NTP の 3 日間持続処置は、閾値電流を上昇させた。
  - ・NTP 3 日間持続処置は初代培養 DRG 神経において  $K_v$  チャネル電流の持続性成分を増強させた。
- これらの結果は、NTP が  $K_v$  チャネル電流の持続性成分増強を介して DRG 神経の活動を抑制することを示唆するものである。

### 第二章

- ・MRN セロトニン神経活動は報酬および罰刺激に応答して低下および上昇した。
  - ・MRN セロトニン神経の活動抑制および活動亢進は報酬関連行動および嫌悪関連行動を誘発した。
  - ・MRN セロトニン神経活動亢進による作用は、報酬消費の抑制に十分であった。
  - ・MRN セロトニン神経から IPN および vHP へ投射する神経経路は、報酬および罰刺激に応答して活動低下および上昇した。
  - ・MRN セロトニン神経から IPN および vHP へ投射する神経経路の活動抑制および活動亢進は、報酬関連行動および嫌悪関連行動を誘発した。
  - ・IPN 5-HT<sub>2A</sub> 受容体阻害時の MRN セロトニン神経活動亢進は、嫌悪関連行動を誘発しなかった。
  - ・IPN 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の薬理的活性化は嫌悪関連行動を誘発した。
- これらの結果は、報酬/罰刺激の情報処理における MRN セロトニン神経の役割を回路選択的に解明し、関連する 5-HT 受容体サブタイプについても明らかにしたものである。

以上、著者は電気生理学的手法により、神経障害性疼痛治療薬 NTP の新規作用機序として、持続性  $K_v$  チャネル電流増強を介した DRG 神経活動の抑制作用を見出した。また光遺伝学的解析により、MRN セロトニン神経の IPN 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介した報酬/罰情報処理機構を見出した。上記の知見は、神経障害性疼痛や依存症、うつ病の病態解明および新薬の創出に資する基礎的知見となるものである。

## 謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長・准教授 中川貴之 先生ならびに京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、助教 永安一樹 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました和歌山県立医科大学薬学部医療薬学部門部門長・教授 赤池昭紀 先生、富山大学大学院総合医薬学研究科教授 久米利明 先生、神戸薬科大学薬学部講師 泉安彦 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、共同研究者として多大なる御協力および御助言を頂きました北海道大学大学院医学研究院教授 吉岡充弘 先生、講師 大村優 先生、助教 Youcef Bouchekioua 先生、慶應義塾大学文学部助教 兎田幸司 先生、また後根神経節神経初代培養に関して御指導および御助言を頂きました京都大学医学部附属病院薬剤部講師 今井哲司 先生、小柳円花 博士、ノイロトロピンおよび関連情報の提供に関して御協力を頂きました日本臓器製薬株式会社 内木充 先生、河村稔 先生に深く感謝いたします。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言を頂きました京都大学大学院医学研究科特定助教 浅岡希美 先生、京都大学大学院薬学研究科助教 三宅崇仁 先生、金沢大学医薬保健研究域助教 西谷直也 先生をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。また、本研究の遂行に多大なる御協力を頂きました、好田匡志 学士、森下雛子 さん、永井佑菜 修士、安藤千紘 学士に心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた木ノ下晴子 学士、富澤恵里 学士、平瀬僚 学士、緋山遥 修士、樋口拓哉 修士、楊秋斌 修士、鈴木茉莉 学士、田中景吾 学士に心から御礼を述べると共に、宗可奈子 博士、土岸広治 博士、勇昂一 博士、宮之原遵 博士、川原田宗一 博士、長島卓也 博士、Soni Siswanto 博士、山城茉弓 学士、長岡巧樹 修士、澁井紀宏 学士、福井悠斗 修士、高山海都 学士、木坂優里 さん、萩原雅子 さん、大谷鈴華 さんをはじめとする京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました日本学術振興会および日本薬学会会長井記念薬学研究奨励支援事業に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えてくださりました父 正浩、母 和代、弟 信治、弟 俊英および両祖父母に心から感謝いたします。

## 論文発表目録

### 第一章

初代培養後根神経節神経の電気生理学的特性に対するノイロトロピンの作用解析

Neurotrophin inhibits neuronal activity through potentiation of sustained  $K_v$  currents in primary cultured DRG neurons

Hiroyuki Kawai, Nozomi Asaoka, Takahito Miyake, Kazuki Nagayasu, Takayuki Nakagawa, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko.

Journal of Pharmacological Sciences (2018) 137, 313–316. doi: 10.1016/j.jphs.2018.05.005. に掲載

### 第二章

正中縫線核セロトニン神経の報酬/罰作用制御に対する役割の解明

未発表



## 引用文献

1. Cohen, S. P. & Mao, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ* **348**, f7656 (2014).
2. Wiffen, P. J. et al. Paracetamol (acetaminophen) with or without codeine or dihydrocodeine for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* **12**, CD012227 (2016).
3. Moore, R. A., Chi, C. C., Wiffen, P. J., Derry, S. & Rice, A. S. C. Oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* **10**, CD010902 (2015).
4. Sindrup, S. H., Otto, M., Finnerup, N. B. & Jensen, T. S. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **96**, 399–409 (2005).
5. Finnerup, N. B., Sindrup, S. H. & Jensen, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain* **150**, 573–581 (2010).
6. Micó, J. A., Ardid, D., Berrocoso, E. & Eschalier, A. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 348–354 (2006).
7. Boyle, J. et al. Randomized, placebo-controlled comparison of amitriptyline, duloxetine, and pregabalin in patients with chronic diabetic peripheral neuropathic pain: impact on pain, polysomnographic sleep, daytime functioning, and quality of life. *Diabetes Care* **35**, 2451–2458 (2012).
8. Shneker, B. F. & McAuley, J. W. Pregabalin: a new neuromodulator with broad therapeutic indications. *Ann. Pharmacother.* **39**, 2029–2037 (2005).
9. Finnerup, N. B., Otto, M., McQuay, H. J., Jensen, T. S. & Sindrup, S. H. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* **118**, 289–305 (2005).
10. Okai, H., Furue, H. & Yoshimura, M. Electrophysiological evidence for the involvement of facilitation of descending pain inhibitory system in the antinociceptive action of neurotropin. *Pain Res.* **23**, 11–18 (2008).
11. Isonaka, R., Takenami, T., Katakura, T. & Kawakami, T. Neurotropin inhibits axonal transport in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* **543**, 101–104 (2013).
12. Taneda, K., Tominaga, M., Tengara, S., Ogawa, H. & Takamori, K. Neurotropin inhibits both capsaicin-induced substance P release and nerve growth factor-induced neurite outgrowth in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Clin. Exp. Dermatol.* **35**, 73–77 (2010).
13. Chung, J. M. & Chung, K. Importance of hyperexcitability of DRG neurons in

- neuropathic pain. *Pain Pract.* **2**, 87–97 (2002).
14. Wang, J. G., Strong, J. A., Xie, W. & Zhang, J. M. Local inflammation in rat dorsal root ganglion alters excitability and ion currents in small-diameter sensory neurons. *Anesthesiology* **107**, 322–332 (2007).
  15. Catacuzzeno, L., Fioretti, B., Pietrobon, D. & Franciolini, F. The differential expression of low-threshold K<sup>+</sup> currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurones. *J. Physiol.* **586**, 5101–5118 (2008).
  16. Wang, X. C. et al.  $\alpha$ -Dendrotoxin-sensitive K<sub>v</sub>1 channels contribute to conduction failure of polymodal nociceptive C-fibers from rat coccygeal nerve. *J. Neurophysiol.* **115**, 947–957 (2016).
  17. Yang, E. K., Takimoto, K., Hayashi, Y., De Groat, W. C. & Yoshimura, N. Altered expression of potassium channel subunit mRNA and  $\alpha$ -dendrotoxin sensitivity of potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy. *Neuroscience* **123**, 867–874 (2004).
  18. Fan, L. et al. Impaired neuropathic pain and preserved acute pain in rats overexpressing voltage-gated potassium channel subunit K<sub>v</sub>1.2 in primary afferent neurons. *Mol. Pain* **10**, 8 (2014).
  19. Blackburn-Munro, G. & Jensen, B. S. The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **460**, 109–116 (2003).
  20. Roza, C. & Lopez-Garcia, J. A. Retigabine, the specific KCNQ channel opener, blocks ectopic discharges in axotomized sensory fibres. *Pain* **138**, 537–545 (2008).
  21. Imai, S. et al. Taxanes and platinum derivatives impair schwann cells via distinct mechanisms. *Sci. Rep.* **7**, 5947 (2017).
  22. Sun, W. et al. Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive c-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats. *Brain* **135**, 359–375 (2012).
  23. Ritter, D. M. et al. Dysregulation of K<sub>v</sub>3.4 channels in dorsal root ganglia following spinal cord injury. *J. Neurosci.* **35**, 1260–1273 (2015).
  24. Pongs, O. Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett.* **452**, 31–35 (1999).
  25. Everill, B., Rizzo, M. A. & Kocsis, J. D. Morphologically identified cutaneous afferent DRG neurons express three different potassium currents in varying proportions. *J. Neurophysiol.* **79**, 1814–1824 (1998).
  26. Matsumoto, S., Yoshida, S., Takahashi, M., Saiki, C. & Takeda, M. The roles of I<sub>D</sub>, I<sub>A</sub> and I<sub>K</sub> in the electrophysiological functions of small-diameter rat trigeminal ganglion neurons. *Curr. Mol. Pharmacol.* **3**, 30–36 (2012).

27. Mathie, A., Woollorton, J. R. A. & Watkins, C. S. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen. Pharmacol.* **30**, 13–24 (1998).
28. Murakoshi, H. & Trimmer, J. S. Identification of the K<sub>v</sub>2.1 K<sup>+</sup> channel as a major component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**, 1728–1735 (1999).
29. Rasband, M. N. et al. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13373–13378 (2001).
30. Malin, S. A. & Nerbonne, J. M. Delayed rectifier K<sup>+</sup> currents, I<sub>K</sub>, are encoded by K<sub>v</sub>2 α-subunits and regulate tonic firing in mammalian sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **22**, 10094–10105 (2002).
31. Winkelman, D. L. B., Beck, C. L., Ypey, D. L. & O'Leary, M. E. Inhibition of the A-type K<sup>+</sup> channels of dorsal root ganglion neurons by the long-duration anesthetic butamben. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 1177–1186 (2005).
32. Zhao, X. et al. A long noncoding RNA contributes to neuropathic pain by silencing Kcna2 in primary afferent neurons. *Nat. Neurosci.* **16**, 1024–1031 (2013).
33. Hu, H. J. et al. The K<sub>v</sub>4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* **50**, 89–100 (2006).
34. Vydyanathan, A., Wu, Z. Z., Chen, S. R. & Pan, H. L. A-type voltage-gated K<sup>+</sup> currents influence firing properties of isolectin B4-positive but not isolectin B4-negative primary sensory neurons. *J. Neurophysiol.* **93**, 3401–3409 (2005).
35. Tsantoulas, C. et al. K<sub>v</sub>2 dysfunction after peripheral axotomy enhances sensory neuron responsiveness to sustained input. *Exp. Neurol.* **251**, 115–126 (2014).
36. Takeda, M. et al. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol. Pain* **7**, 5 (2011).
37. Hao, J. et al. K<sub>v</sub>1.1 channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. *Neuron* **77**, 899–914 (2013).
38. Kirchhoff, C., Leah, J. D., Jung, S. & Reeh, P. W. Excitation of cutaneous sensory. Nerve endings in the rat by 4-aminopyridine and tetraethylammonium. *J. Neurophysiol.* **67**, 125–131 (1992).
39. Tsantoulas, C. et al. Sensory neuron downregulation of the K<sub>v</sub>9.1 potassium channel subunit mediates neuropathic pain following nerve injury. *J. Neurosci.* **32**, 17502–17513 (2012).
40. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).
41. Blaine, J. T., Taylor, A. D. & Ribera, A. B. Carboxyl tail region of the K<sub>v</sub>2.2 subunit

- mediates novel developmental regulation of channel density. *J. Neurophysiol.* **92**, 3446–3454 (2004).
42. Johnston, J., Forsythe, I. D. & Kopp-Scheinpflug, C. Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability. *J. Physiol.* **588**, 3187–3200 (2010).
  43. Hata, T., Kita, T., Itoh, E. & Oyama, R. Mechanism of the analgesic effect of neurotrophin an extract from the inflamed skin of vaccinia virus inoculated rabbits , has been observed clinically to be effective for treating pain in patients with lumbago , SMON and other neuropathies . *Jpn. J. Pharmacol.* **48**, 165–173 (1988).
  44. Kawamura, M., Ohara, H., Go, K., Koga, Y. & Ienaga, K. Neurotrophin induces antinociceptive effect by enhancing descending pain inhibitory systems involving 5-HT<sub>3</sub> and noradrenergic  $\alpha_2$  receptors in spinal dorsal horn. *Life Sci.* **62**, 2181–2190 (1998).
  45. Kudo, T., Kushikata, T., Kudo, M., Kudo, T. & Hirota, K. Antinociceptive effects of neurotrophin in a rat model of central neuropathic pain: DSP-4 induced noradrenergic lesion. *Neurosci. Lett.* **503**, 20–22 (2011).
  46. Fukuda, Y. et al. Neurotrophin promotes NGF signaling through interaction of GM1 ganglioside with Trk neurotrophin receptor in PC12 cells. *Brain Res.* **1596**, 13–21 (2015).
  47. Sharma, N., D'Arcangelo, G., Kleinklaus, A., Halegoua, S. & Trimmer, J. S. Nerve growth factor regulates the abundance and distribution of K<sup>+</sup> channels in PC12 cells. *J. Cell Biol.* **123**, 1835–1843 (1993).
  48. Cerda, O. & Trimmer, J. S. Analysis and functional implications of phosphorylation of neuronal voltage-gated potassium channels. *Neurosci. Lett.* **486**, 60–67 (2010).
  49. Redman, P. T. et al. Apoptotic surge of potassium currents is mediated by p38 phosphorylation of K<sub>v</sub>2.1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 3568–3573 (2007).
  50. Okai, H., Okazaki, R., Kawamura, M., Yoshimura, M. Excitatory effect of Neurotrophin® on noradrenergic neurons in rat locus coeruleus. *Life Sci.* **136**, 79–86 (2015).
  51. Nieh, E. H. et al. Inhibitory input from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area disinhibits dopamine neurons and promotes behavioral activation. *Neuron* **90**, 1286–1298 (2016).
  52. Xiao, C. et al. Cholinergic mesopontine signals govern locomotion and reward through dissociable midbrain pathways. *Neuron* **90**, 333–347 (2016).
  53. Li, Y. et al. Rostral and caudal ventral tegmental area GABAergic inputs to different dorsal raphe neurons participate in opioid dependence. *Neuron* **101**, 748–761.e5 (2019).
  54. Tan, K. R. et al. GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* **73**, 1173–1183 (2012).
  55. LeGates, T. A. et al. Reward behaviour is regulated by the strength of hippocampus–

- nucleus accumbens synapses. *Nature* **564**, 258–262 (2018).
56. Golden, S. A. et al. Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward. *Nature* **534**, 688–692 (2016).
  57. Kim, J. et al. Rapid, biphasic CRF neuronal responses encode positive and negative valence. *Nat. Neurosci.* **22**, 576–585 (2019).
  58. Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* **459**, 837–841 (2009).
  59. Paton, J. J., Belova, M. A., Morrison, S. E. & Salzman, C. D. The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature* **439**, 865–870 (2006).
  60. Hayashi, K., Nakao, K. & Nakamura, K. Appetitive and aversive information coding in the primate dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* **35**, 6195–6208 (2015).
  61. Volkow, N. D. & Morales, M. The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell* **162**, 712–725 (2015).
  62. Hu, H. Reward and aversion. *Annu. Rev. Neurosci.* **39**, 297–324 (2016).
  63. Kranz, G. S., Kasper, S. & Lanzenberger, R. Reward and the serotonergic system. *Neuroscience* **166**, 1023–1035 (2010).
  64. Liu, Z. et al. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron* **81**, 1360–1374 (2014).
  65. Nagai, Y. et al. The role of dorsal raphe serotonin neurons in the balance between reward and aversion. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2160 (2020).
  66. Li, Y. et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat. Commun.* **7**, 10503 (2016).
  67. Zhong, W., Li, Y., Feng, Q. & Luo, M. Learning and stress shape the reward response patterns of serotonin neurons. *J. Neurosci.* **37**, 8863–8875 (2017).
  68. Inaba, K. et al. Neurons in monkey dorsal raphe nucleus code beginning and progress of step-by-step schedule, reward expectation, and amount of reward outcome in the reward schedule task. *J. Neurosci.* **33**, 3477–3491 (2013).
  69. Cohen, J. Y., Amoroso, M. W. & Uchida, N. Serotonergic neurons signal reward and punishment on multiple timescales. *eLife* **4**, e06346 (2015).
  70. Nakamura, K., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* **28**, 5331–5343 (2008).
  71. Bromberg-Martin, E. S., Hikosaka, O. & Nakamura, K. Coding of task reward value in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* **30**, 6262–6272 (2010).
  72. Bosker, F. J., Klomp makers, A. A. & Westenberg, H. G. M. Effects of single and repeated oral administration of fluvoxamine on extracellular serotonin in the median

- raphe nucleus and dorsal hippocampus of the rat. *Neuropharmacology* **34**, 501–508 (1995).
73. Romero, L., Bel, N., Artigas, F., de Montigny, C. & Blier, P. Effect of pindolol on the function of pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors: in vivo microdialysis and electrophysiological studies in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* **15**, 349–360 (1996).
  74. McQuade, R. & Sharp, T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J. Neurochem.* **69**, 791–796 (1997).
  75. Risinger, F. O. Fluoxetine's effects on ethanol's rewarding, aversive and stimulus properties. *Life Sci.* **61**, PL 235–242 (1997).
  76. Subhan, F., Deslandes, P. N., Pache, D. M. & Sewell, R. D. E. Do antidepressants affect motivation in conditioned place preference? *Eur. J. Pharmacol.* **408**, 257–263 (2000).
  77. Hiranita, T., Soto, P. L., Newman, A. H. & Katz, J. L. Assessment of reinforcing effects of benztrapine analogs and their effects on cocaine self-administration in rats: comparisons with monoamine uptake inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **329**, 677–686 (2009).
  78. Nutt, D. et al. The other face of depression, reduced positive affect: the role of catecholamines in causation and cure. *J. Psychopharmacol.* **21**, 461–471 (2007).
  79. Fletcher, P. J., Ming, Z. H. & Higgins, G. A. Conditioned place preference induced by microinjection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)*. **113**, 31–36 (1993).
  80. Dzung Lê, A. et al. Intra-median raphe nucleus (MRN) infusions of muscimol, a GABA-A receptor agonist, reinstate alcohol seeking in rats: role of impulsivity and reward. *Psychopharmacology (Berl)*. **195**, 605–615 (2008).
  81. Graeff, F. G. & Silveira Filho, N. G. Behavioral inhibition induced by electrical stimulation of the median raphe nucleus of the rat. *Physiol. Behav.* **21**, 477–484 (1978).
  82. Szőnyi, A. et al. Median raphe controls acquisition of negative experience in the mouse. *Science* **366**, eaay8746 (2019).
  83. Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* 3rd edn (Academic Press, 2007).
  84. Nagai, T. et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* **20**, 87–90 (2002).
  85. Hochbaum, D. R. et al. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat. Methods* **11**, 825–833 (2014).
  86. Mattis, J. et al. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative

- analysis of microbial opsins. *Nat. Methods* **9**, 159–172 (2012).
87. Chen, T. W. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295–300 (2013).
  88. Broussard, G. J. et al. In vivo measurement of afferent activity with axon-specific calcium imaging. *Nat. Neurosci.* **21**, 1272–1280 (2018).
  89. Lammel, S. et al. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* **491**, 212–217 (2012).
  90. Yang, H. et al. Nucleus accumbens subnuclei regulate motivated behavior via direct inhibition and disinhibition of VTA dopamine subpopulations. *Neuron* **97**, 434–449.e4 (2018).
  91. Yang, H. et al. Pain modulates dopamine neurons via a spinal–parabrachial–mesencephalic circuit. *Nat. Neurosci.* **24**, 1402–1413(2021).
  92. Gunaydin, L. A. et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* **157**, 1535–1551 (2014).
  93. Kim, C. K. et al. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat. Methods* **13**, 325–328 (2016).
  94. Edelstein, A. D. et al. Advanced methods of microscope control using  $\mu$ Manager software. *J. Biol. Methods* **1**, e10 (2014).
  95. Zhang, T. et al. Activation of GABAergic neurons in the nucleus accumbens mediates the expression of cocaine-associated memory. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 1084–1088 (2018).
  96. Zhang, T. et al. Glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex mediate the formation and retrieval of cocaine-associated memories in mice. *Addict. Biol.* **25**, e12723 (2020).
  97. Tzschentke, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* **56**, 613–672 (1998).
  98. Fletcher, P. J., Grottick, A. J. & Higgins, G. A. Differential effects of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist M100,907 and the 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist SB242,084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology* **27**, 576–586 (2002).
  99. Boutrel, B., Monaca, C., Hen, R., Hamon, M. & Adrien, J. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT<sub>1A</sub> knock-out mice. *J. Neurosci.* **22**, 4686–4692 (2002).
  100. Smith, R. L., Barrett, R. J. & Sanders-Bush, E. Discriminative stimulus properties of 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane [(±)DOI] in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)*. **166**, 61–68 (2003).

101. Zhao-Shea, R., Liu, L., Pang, X., Gardner, P. D. & Tapper, A. R. Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. *Curr. Biol.* **23**, 2327–2335 (2013).
102. Taylor, S. R. et al. GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* **522**, 3308–3334 (2014).
103. Nunes-de-Souza, R. L., Canto-de-Souza, A. & Rodgers, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice: influence of site of injection and prior test experience. *Brain Res.* **927**, 87–96 (2002).
104. Canto-de-Souza, A., Nunes-de-Souza, R. L. & Rodgers, R. J. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res.* **928**, 50–59 (2002).
105. Nair, S. G. et al. Role of dorsal medial prefrontal cortex dopamine D1-family receptors in relapse to high-fat food seeking induced by the anxiogenic drug yohimbine. *Neuropsychopharmacology* **36**, 497–510 (2011).
106. Nishitani, N. et al. Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology* **44**, 721–732 (2019).
107. Ables, J. L. et al. Retrograde inhibition by a specific subset of interpeduncular  $\alpha 5$  nicotinic neurons regulates nicotine preference. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 13012–13017 (2017).
108. Wolfman, S. L. et al. Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nat. Commun.* **9**, 2710 (2018).
109. Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J. F., Soiza-Reilly, M. & Gaspar, P. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct. Funct.* **221**, 535–561 (2016).
110. Fowler, C. D., Lu, Q., Johnson, P. M., Marks, M. J. & Kenny, P. J. Habenular  $\alpha 5$  nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* **471**, 597–601 (2011).
111. Glick, S. D., Ramirez, R. L., Livi, J. M. & Maisonneuve, I. M. 18-Methoxycoronaridine acts in the medial habenula and/or interpeduncular nucleus to decrease morphine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **537**, 94–98 (2006).
112. Boulos, L. J. et al. Mu opioid receptors in the medial habenula contribute to naloxone aversion. *Neuropsychopharmacology* **45**, 247–255 (2020).
113. Pentkowski, N. S., Blanchard, D. C., Lever, C., Litvin, Y. & Blanchard, R. J. Effects of



- lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 2185–2196 (2006).
114. Schumacher, A., Vlassov, E. & Ito, R. The ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus is critical for learned approach-avoidance decision making. *Hippocampus* **26**, 530–542 (2016).
  115. Sengupta, A. & Holmes, A. A discrete dorsal raphe to basal amygdala 5-HT circuit calibrates aversive memory. *Neuron* **103**, 489–505.e7 (2019).
  116. Hagsäter, S. M. et al. A complex impact of systemically administered 5-HT<sub>2A</sub> receptor ligands on conditioned fear. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **24**, 749–757 (2021).
  117. Macedo, C. E., Martinez, R. C. R., Albrechet-Souza, L., Molina, V. A. & Brandão, M. L. 5-HT<sub>2</sub>- and D<sub>1</sub>-mechanisms of the basolateral nucleus of the amygdala enhance conditioned fear and impair unconditioned fear. *Behav. Brain Res.* **177**, 100–108 (2007).
  118. Olivier, B. Serotonin: a never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* **753**, 2–18 (2015).
  119. Fernandez, S. P. et al. Constitutive and acquired serotonin deficiency alters memory and hippocampal synaptic plasticity. *Neuropsychopharmacology* **42**, 512–523 (2017).
  120. Zaniewska, M., McCreary, A. C., Wydra, K. & Filip, M. Effects of serotonin (5-HT)<sub>2</sub> receptor ligands on depression-like behavior during nicotine withdrawal. *Neuropharmacology* **58**, 1140–1146 (2010).
  121. Malin, D. et al. Inverse agonists of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor reduce nicotine withdrawal signs in rats. *Neurosci. Lett.* **713**, 134524 (2019).
  122. Lima, L. B. et al. Afferent and efferent connections of the interpeduncular nucleus with special reference to circuits involving the habenula and raphe nuclei. *J. Comp. Neurol.* **525**, 2411–2442 (2017).
  123. de Jong, J. W. et al. A neural circuit mechanism for encoding aversive stimuli in the mesolimbic dopamine system. *Neuron* **101**, 133–151.e7 (2019).
  124. Wang, H. L. et al. Dorsal raphe dual serotonin-glutamate neurons drive reward by establishing excitatory synapses on VTA mesoaccumbens dopamine neurons. *Cell Rep.* **26**, 1128–1142.e7 (2019).
  125. Okaty, B. W. et al. Multi-scale molecular deconstruction of the serotonin neuron system. *Neuron* **88**, 774–791 (2015).
  126. Ren, J. et al. Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *eLife* **8**, e49424 (2019).
  127. Ohmura, Y. et al. The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the ventral hippocampus is involved in the retrieval of fear memory through the corticotropin-releasing factor type 2 receptor. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1271–1278 (2010).

128. Ohmura, Y. et al. Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology* **167**, 107703 (2020).
129. Yoshida, K., Drew, M. R., Mimura, M. & Tanaka, K. F. Serotonin-mediated inhibition of ventral hippocampus is required for sustained goal-directed behavior. *Nat. Neurosci.* **22**, 770–777 (2019).
130. Ohmura, Y. et al. Serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor in the ventral hippocampus modulates the retrieval of fear memory and stress-induced defecation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, 1–12 (2016).
131. Luchetti, A. et al. Two functionally distinct serotonergic projections into hippocampus. *J. Neurosci.* **40**, 4936–4944 (2020).
132. Kobayashi, Y. et al. Genetic dissection of medial habenula-interpeduncular nucleus pathway function in mice. *Front. Behav. Neurosci.* **7**, 17 (2013).
133. Xu, C. et al. Medial habenula-interpeduncular nucleus circuit contributes to anhedonia-like behavior in a rat model of depression. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 238 (2018).
134. Shih, P. Y. et al. Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in subdivisions of medial habenula. *J. Neurosci.* **34**, 9789–9802 (2014).
135. McCallum, S. E., Cowe, M. A., Lewis, S. W. & Glick, S. D.  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors in the medial habenula modulate the mesolimbic dopaminergic response to acute nicotine in vivo. *Neuropharmacology* **63**, 434–440 (2012).
136. Salas, R., Sturm, R., Boulter, J. & De Biasi, M. Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J. Neurosci.* **29**, 3014–3018 (2009).



