

京都大学	博士（薬学）	氏名	西谷直也
論文題目	背側縫線核セロトニン神経による情動行動の制御に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>うつ病の治療には主に選択的セロトニン再取り込み阻害薬が用いられるが、治療効果の発現までに数週間の長期投与が必要なことや、十分な治療を行っても奏功しない治療抵抗性うつ病の存在が問題となっており、作用発現がより迅速かつ効果の高い次世代抗うつ薬の開発が急務となっている。近年、NMDA 受容体遮断薬であるケタミンが治療抵抗性うつ病に対して、極めて迅速に抗うつ作用を発揮することが示され、新規抗うつ薬の候補として注目されている。一方で、ケタミンは依存性などの副作用が問題となるため、新薬創出につながる抗うつ作用メカニズムの解明が重要である。ヒトおよびげっ歯類におけるケタミンの抗うつ作用にはセロトニン神経系が必要であること、さらにケタミンは前頭前野でセロトニン遊離を引き起こすことが分かっていたが、その詳細なメカニズムは不明なままであった。本研究では、ケタミンのセロトニン遊離作用メカニズムの神経回路学的解析および情動行動におけるセロトニン神経活動の役割について検討を行い、以下の新知見を得た。</p> <p>第1章 ケタミンによる前頭前野セロトニン遊離における縫線核 AMPA 型グルタミン酸受容体およびニコチン性アセチルコリン受容体の関与</p> <p>まず、ケタミンの前頭前野セロトニン遊離作用に寄与する神経回路について検討した。ケタミンの全身投与は mPFC でのセロトニン遊離を増大させたが、これは AMPA 受容体遮断薬をセロトニン神経起始核である背側縫線核 (DRN) に局所微量投与することで抑制された。また、DRN への AMPA 受容体刺激薬の局所微量投与は mPFC でのセロトニン遊離を上昇させたが、ケタミン局所微量投与は影響を与えなかった。従って、ケタミンは DRN 以外の神経核に作用することで、DRN におけるグルタミン酸遊離と AMPA 受容体活性化を介して mPFC でのセロトニン遊離を上昇させることが示唆された。そこで次に、このグルタミン酸遊離上昇のメカニズムを検討するため、DRN でのグルタミン酸遊離に対するコリン作動性神経の関与について検討した。<math>\alpha 4 \beta 2</math> ニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体遮断薬を DRN に局所微量投与することで、ケタミンによる mPFC でのセロトニン遊離上昇が抑制され、反対に nACh 受容体刺激薬単独の局所微量投与によりセロトニン遊離が上昇した。また、DRN へ投射するコリン作動性神経の起始核である橋脚被蓋核 (PPTg) を電気破壊したところ、ケタミンによる mPFC でのセロトニン遊離上昇が抑制された。さらに、PPTg へのケタミン局所微量投与により、mPFC でのセロトニン遊離は上昇し、その作用は DRN への AMPA 受容体遮断薬あるいは <math>\alpha 4 \beta 2</math> nACh 受容体遮断薬により抑制された。以上の結果より、ケタミンは PPTg のコリン作動性神経を活性化し、DRN のグルタミン酸神経シナプス前終末に存在する <math>\alpha 4 \beta 2</math> nACh 受容体刺激を介してグルタミン酸遊離を引き起こし、DRN セロトニン神経が有する AMPA 受容体を活性化することで、mPFC におけるセロトニン遊離を上昇させることが示唆される。</p>			

## 第2章 背側縫線核セロトニン神経の光遺伝学的操作が情動行動に与える影響

これまでセロトニン神経の興奮性を特異的に操作する方法は存在せず、セロトニン神経の活性化あるいは抑制が情動行動に及ぼす影響は不明であった。本研究では、新規に作製したウイルスベクターを用いて、光照射により正確な神経活動制御が可能である光遺伝学的ツールをセロトニン神経特異的に導入し、マウスおよびラットのセロトニン神経特異的な制御を行った際の行動学的変化について検討した。マウスおよびラットのトリプトファンヒドロキシラーゼ2 (TPH2) プロモーターを利用し、転写増幅機構を持つレンチウイルスベクターを作製した。本ウイルスをマウスおよびラットの DRN へ投与したところ、レーザー光照射による神経活動の活性化が可能な光依存性カチオンチャネルであるチャンネルロドプシン2 および抑制が可能な光依存性プロトンポンプであるアーキロドプシンの特異的かつ強力な発現が観察された。次に、マウスにおいて DRN セロトニン神経の光活性化および抑制が、うつ様行動・不安様行動に与える影響について検討した。その結果、DRN セロトニン神経の特異的活性化はうつ様行動を改善させたが、不安様行動には影響を与えなかった。また、ラットにおいて同様の実験を行ったところ、DRN セロトニン神経の活性化はうつ様行動を改善させたが、不安様行動には影響を与えなかった。一方で、DRN セロトニン神経の抑制はうつ様行動には影響を与えなかったが、不安様行動を増強した。以上の結果より、マウスおよびラットにおいて、セロトニン神経特異的かつ強力な遺伝子発現を可能とするウイルスベクターの開発に成功し、局所レーザー光照射による DRN セロトニン神経特異的な活性化は抗うつ薬様作用発現に十分であること、また、抑制はラットでのみ不安を増強することから、不安環境下でのセロトニン神経活動の種差が示唆される。

以上、著者は、新規抗うつ薬候補であるケタミンによるセロトニン遊離上昇のメカニズムとして、PPTg に存在するコリン作動性神経の活性化と DRN の  $\alpha 4 \beta 2$  nACh 受容体刺激、それに引き続くグルタミン酸遊離と AMPA 受容体刺激が重要であることを明らかにした。また、セロトニン神経特異的な光遺伝学的ツールの強制発現による興奮性制御を可能とするウイルスベクターを作製・利用し、DRN セロトニン神経の選択的活性化が抗うつ作用を引き起こすことを明らかにした。これらの知見は、うつ病の病態解明および新規抗うつ薬の開発に繋がることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

うつ病の治療には主に選択的セロトニン再取り込み阻害薬が用いられるが、治療効果の発現までに数週間の長期投与が必要なことや、十分な治療を行っても奏功しない治療抵抗性うつ病の存在が問題となっており、作用発現がより迅速かつ効果の高い次世代抗うつ薬の開発が急務となっている。近年、NMDA 受容体遮断薬であるケタミンが治療抵抗性うつ病に対して、極めて迅速に抗うつ作用を発揮することが示され、新規抗うつ薬の候補として注目されている。一方で、ケタミンは依存性などの副作用が問題となるため、新薬創出につながる抗うつ作用メカニズムの解明が重要である。ヒトおよびげっ歯類におけるケタミンの抗うつ作用にはセロトニン神経系が必要であること、さらにケタミンは前頭前野でセロトニン遊離を引き起こすことが分かっていたが、その詳細なメカニズムは不明なままであった。申請者は、ケタミンのセロトニン遊離作用メカニズムの神経回路学的解析および情動行動におけるセロトニン神経活動の役割について検討を行い、以下の新知見を得た。

## 第1章 ケタミンによる前頭前野セロトニン遊離における縫線核 AMPA 型グルタミン酸受容体およびニコチン性アセチルコリン受容体の関与

まず、ケタミンの前頭前野セロトニン遊離作用に寄与する神経回路について検討した。ケタミンの全身投与は mPFC でのセロトニン遊離を増大させたが、これは AMPA 受容体遮断薬をセロトニン神経起始核である背側縫線核 (DRN) に局所微量投与することで抑制された。また、DRN への AMPA 受容体刺激薬の局所微量投与は mPFC でのセロトニン遊離を上昇させたが、ケタミン局所微量投与は影響を与えなかった。従って、ケタミンは DRN 以外の神経核に作用することで、DRN におけるグルタミン酸遊離と AMPA 受容体活性化を介して mPFC でのセロトニン遊離を上昇させることが示唆された。そこで次に、このグルタミン酸遊離上昇のメカニズムを検討するため、DRN でのグルタミン酸遊離に対するコリン作動性神経の関与について検討した。 $\alpha 4 \beta 2$  ニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体遮断薬を DRN に局所微量投与することで、ケタミンによる mPFC でのセロトニン遊離上昇が抑制され、反対に nACh 受容体刺激薬単独の局所微量投与によりセロトニン遊離が上昇した。また、DRN へ投射するコリン作動性神経の起始核である橋脚被蓋核 (PPTg) を電気破壊したところ、ケタミンによる mPFC でのセロトニン遊離上昇が抑制された。さらに、PPTg へのケタミン局所微量投与により、mPFC でのセロトニン遊離は上昇し、その作用は DRN への AMPA 受容体遮断薬あるいは  $\alpha 4 \beta 2$  nACh 受容体遮断薬により抑制された。以上の結果より、ケタミンは PPTg のコリン作動性神経を活性化し、DRN のグルタミン酸神経シナプス前終末に存在する  $\alpha 4 \beta 2$  nACh 受容体刺激を介してグルタミン酸遊離を引き起こし、DRN セロトニン神経が有する AMPA 受容体を活性化することで、mPFC におけるセロトニン遊離を上昇させることが示唆される。

## 第2章 背側縫線核セロトニン神経の光遺伝学的操作が情動行動に与える影響

これまでセロトニン神経の興奮性を特異的に操作する方法は存在せず、セロトニン神経の活性化あるいは抑制が情動行動に及ぼす影響は不明であった。申請者は、新規に作製したウイルスベクターを用いて、光照射により正確な神経活動制御が可能である光遺伝学的ツールをセロトニン神経特異的に導入し、マウスおよびラットのセロトニン神経特異的な制御を行った際の行動学的変化について検討した。マウスおよびラットのトリプトファンヒドロキシラーゼ 2 (TPH2) プロモーターを利用し、転写増幅機構を持つレンチウイルスベクターを作製した。本ウイルスをマウスおよ

びラットの DRN へ投与したところ、レーザー光照射による神経活動の活性化が可能な光依存性カチオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 および抑制が可能な光依存性プロトンポンプであるアーキロドプシンの特異的かつ強力な発現が観察された。次に、マウスにおいて DRN セロトニン神経の光活性化および抑制が、うつ様行動・不安様行動に与える影響について検討した。その結果、DRN セロトニン神経の特異的活性化はうつ様行動を改善させたが、不安様行動には影響を与えなかった。また、ラットにおいて同様の実験を行ったところ、DRN セロトニン神経の活性化はうつ様行動を改善させたが、不安様行動には影響を与えなかった。一方で、DRN セロトニン神経の抑制はうつ様行動には影響を与えなかったが、不安様行動を増強した。以上の結果より、マウスおよびラットにおいて、セロトニン神経特異的かつ強力な遺伝子発現を可能とするウイルスベクターの開発に成功し、局所レーザー光照射による DRN セロトニン神経特異的な活性化は抗うつ薬様作用発現に十分であること、また、抑制はラットでのみ不安を増強することから、不安環境下でのセロトニン神経活動の種差が示唆される。

以上、申請者は、新規抗うつ薬候補であるケタミンによるセロトニン遊離上昇のメカニズムとして、PPTg に存在するコリン作動性神経の活性化と DRN の  $\alpha 4 \beta 2$ nACh 受容体刺激、それに引き続くグルタミン酸遊離と AMPA 受容体刺激が重要であることを明らかにした。また、セロトニン神経特異的な光遺伝学的ツールの強制発現による興奮性制御を可能とするウイルスベクターを作製・利用し、DRN セロトニン神経の選択的活性化が抗うつ作用を引き起こすことを明らかにした。これらの知見は、うつ病の病態解明および新規抗うつ薬の開発に繋がることが期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 30 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 平成 30 年 4 月 1 日以降