

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

2017

西谷 直也

目次

緒言	1
第一章 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.....	3
実験方法.....	4
実験結果.....	6
考察.....	12
第二章 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	15
実験方法.....	16
実験結果.....	21
考察.....	34
総括および結論	36
謝辞	37
発表論文目録	38
参考文献	39

緒言

セロトニン (5-HT) 神経系は中脳に存在する縫線核を起始核とし、脳全体へ神経投射を行っている。5-HT による神経伝達は、摂食や体温調節などの基本的な生命維持機能から情動や意思決定などの高次脳機能に至るまで、様々な行動制御を担うとされている。これまでの基礎および臨床研究より、5-HT 神経機能がうつ病や統合失調症などの精神疾患に深く関与することが示されてきている。特に、うつ病の治療には、脳内 5-HT 濃度を上昇させる選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) が主に用いられるが、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いる。そのため、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考えられてきた。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治療上の重大な問題となるため、新薬創出につながる抗うつ作用メカニズムを解明することが重要である。ケタミンの抗うつ作用には 5-HT 神経伝達の調節が重要であることが示唆されているものの、その詳細な神経回路メカニズムは不明なままであった。さらに、うつや不安などの情動行動制御に 5-HT 神経系が必要であることが示唆されてきているが、5-HT 神経の興奮性を特異的に制御する手法が存在しなかったために、5-HT 神経活動がこれらの行動制御に十分であるかは不明であった。本研究では、ケタミンの 5-HT 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 5-HT 神経活動の役割について検討を行った。結果、新規知見を得たので、以下二章にわけて報告する。

第一章においては、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、ケタミンによる前頭前野 (mPFC) 5-HT 遊離上昇の神経回路メカニズムについて検討を行い、ケタミンは脚橋被蓋核 (PPTg) のコリン作動性神経を活性化し、背側縫線核 (DRN) のグルタミン酸神経シナプス前終末に存在する $\alpha 4 \beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 刺激を介してグルタミン酸遊離を引き起こし、5-HT 神経が有する AMPA 受容体を活性化することで、mPFC での 5-HT 遊離を上昇させることを明らかにした。

第二章においては、マウスおよびラットにおいて 5-HT 神経特異的な興奮性制御を可能とするレンチウイルスベクター (LVV) を開発し、DRN の 5-HT 神経特異的な興奮性制御が情動行動に与える影響について検討した。その結果、局所レーザー光照射による DRN の 5-HT 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 5-HT 神経活動の種差が存在することを明らかにした。

これらの研究成果について以下に論述する。

なお、本文中で使用した略語は以下の通りである。

5-HT	5-hydroxytryptamine, serotonin
ANOVA	analysis of variance
AMPA	2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid
BNST	bed nucleus of the stria terminalis
ChAT	choline acetyltransferase
ChR2	channelrhodopsin-2
CTZ	cyclothiazide
DPSS	diode pumped solid state
DRN	dorsal raphe nucleus
ECD	electrochemical detector
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
GABA	γ -aminobutyric acid
GFP	green fluorescent protein
HPLC	high performance liquid chromatography
LDTg	laterodorsal tegmental nucleus
LVV	lenti viral vector
MDD	major depressive disorder
mPFC	medial prefrontal cortex
MRN	medial raphe nucleus
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
nAChR	nicotinic acetylcholine receptor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PPTg	pedunculopontine tegmental nucleus
SERT	serotonin transporter
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
TPH	tryptophan hydroxylase
TSTA	two-step transcriptional amplification
WPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

第一章

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

大うつ病性障害 (MDD) は、持続する抑うつ気分や関心の低下、自殺念慮などを主症状とする精神疾患であり、重大な公衆衛生上の問題となっている (1)。MDD 患者には、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) などの抗うつ薬を用いた薬物治療が一般的に用いられているが、その治療効果発現には数週間の慢性投与が必要であり、さらには、十分な薬物治療を行っても奏功しない治療抵抗性 MDD が大きな問題となっている (2)。従って、治療効果の発現がより迅速かつ有効性の高い新規抗うつ薬の開発が急務となっている。

近年の臨床研究から、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体遮断薬で麻酔薬として用いられているケタミンが、治療抵抗性 MDD 患者に対して、迅速かつ持続的な抗うつ作用を示すことが報告されている (3, 4)。また、げっ歯類では、ケタミンが強制水泳試験や新規環境下摂食抑制試験といった様々なうつ様行動を評価する試験において抗うつ様作用を発揮し、この作用は AMPA 受容体遮断薬により消失することが示されている (5-7)。さらに、p-クロロフェニルアラニンによる 5-HT の枯渇によっても抗うつ作用は消失することから、ケタミンの抗うつ作用にはグルタミン酸神経伝達および 5-HT 神経伝達が重要であることが示唆される (8, 9)。SSRI と同様に、ケタミンの急性投与は MDD の病態生理に重要な脳領域の一つである内側前頭前野 (mPFC) における 5-HT 濃度を上昇させることが知られている (10)。また、SSRI は DRN に存在する AMPA 受容体を介して 5-HT 神経の発火頻度を増加させることや、縫線核培養切片における 5-HT 遊離量の増加を引き起こすことが報告されているが (11, 12)、ケタミンが 5-HT 遊離上昇を引き起こす神経回路メカニズムは不明である。一方で、Garduño らは、DRN のグルタミン酸神経前終末に存在する $\alpha 4 \beta 2$ nAChR の刺激を介して、DRN におけるグルタミン酸遊離を増加させることで、5-HT 神経の興奮性が増加することを報告している (13)。

そこで、本章では、ケタミンによる mPFC での 5-HT 遊離上昇における DRN 内の AMPA 受容体および $\alpha 4 \beta 2$ nAChR の役割を検討し、さらに、DRN を神経支配するコリン作動性神経核として知られる (14)、脚橋被蓋核 (PPTg) や背外側被蓋核 (LDTg) 役割についても検討した。

実験方法

1) 実験動物

実験にはWistar/ST系雄性ラット (250-320 g; 日本SLC、静岡) を使用した。全ての動物は室温が $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗周期が12時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。実験は全て京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

2) 使用薬物と薬物投与

ケタミン塩酸塩は第一三共プロファーマ (東京) より購入し、皮下投与あるいはマイクロダイアリシスプローブを用いて $1 \mu\text{L}/\text{min}$ で灌流することによって投与した。NBQX、cyclothiazide、NASPMはSigma-Aldrich (St. Louis, USA) より購入した。AMPAおよびDh β EはSanta Cruz Biotechnology (Dallas, USA)、RJR-2403はTocris Bioscience (UK) より購入した。これら薬物は生理食塩水に溶解した。脳内局所投与はガイドカニューレより薬物投与カニューレ (28 G、エイコム) を挿入し、 $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$ で $1 \mu\text{L}$ を投与することで行った。CitalopramはLKT Laboratories Inc. (St. Paul, USA) より購入し、後述のようにRinger液で希釈し灌流した。

3) 脳定位手術

ラットをペントバルビタール (60 mg/kg) 麻酔下で小動物用脳定位固定装置 (成茂、東京) に固定し、脳アトラス (15) に従い、ステンレス製ガイドカニューレ (エイコム、京都) をmPFC (ブレグマより、AP +3.2 mm, ML +0.6 mm, DV +4.0 mm)、DRN (ブレグマより、AP -7.7 mm, ML 0 mm, DV +7.0 mm)、PPTg (ブレグマより、AP -7.8 mm, ML \pm 1.9 mm, DV +7.6 mm)、LDTg (ブレグマより、AP -8.7 mm, ML \pm 0.8 mm, DV +7.0 mm) にそれぞれ埋め込んだ。ガイドカニューレは歯科用セメントおよびビスにて頭蓋に固定した。

神経核の電氣的破壊は、同様にラットを脳定位固定装置に固定して行った。先端部以外を絶縁したステンレスパイプ (30 G) をPPTgあるいはLDTgに挿入し、25 Vの電圧で25秒間の直流電流を流すことで神経核破壊を行った。Sham処置は電流を流さず、ステンレスパイプを挿入した。神経核破壊の7日後より、上述の通りガイドカニューレを埋め込んだ。

4) *In vivo* マイクロダイアリシス

マイクロダイアリシスによる5-HT遊離量の測定は、ガイドカニューレ埋め込みの1-2日後より無麻酔かつ自由行動下にて行った。マイクロダイアリシスプローブ (膜

長：2 mm、外径：0.22 mm、エイコム）をガイドカニューレよりmPFCに挿入し、1 μ M のcitalopramを含むRinger液（147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂）を1 μ L/minで灌流した。灌流液を10分ごとに回収し、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ECD、エイコム）で分析した。5-HTは逆相カラム（PPII-ODS column, 3.0 ϕ ×150 mm; エイコム）で分離して定量した。

5) 凍結切片の作製

マイクロダイアリシスによる測定終了後にガイドカニューレより薬物投与用カニューレを挿入し、Evans Blueを微量投与した。その後、ラットをペントバルビタール麻酔下にて開胸し、0.01 M PBS (pH 7.4) を10 mL 経心灌流することで脱血した後、4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) で経心灌流し、全身を固定した。その後、全脳を採取し、15 % sucrose in 0.01 M PBS に4 °Cにて一晩静置し、ドライアイスにより凍結した。次に、ミクロトーム刃（LEICA819; Leica, Nussloch, Germany）を装着した凍結ミクロトーム（LEICA3000; Leica）を用いて厚さ30 μ m の凍結切片を作製し、MASコート付きスライドガラス（松浪硝子工業株式会社、大阪）に接着させ、凍結切片を風乾後、-80°Cで凍結保存した。Evans Blueにて薬物投与部位を確認し、Nissl染色にてマイクロダイアリシスプローブの設置部位を確認した。いずれかの部位が外れているものについてはデータから除外した。

5) 免疫染色法

スライドガラス上の冠状切片をPBSで15分洗浄後、抗体希釈液（4%ウマ血清を含む0.25 % Triton-X100含有PBS）を用いて、一次抗体を希釈し、4°Cにて一晩反応させた。一次抗体として、goat polyclonal anti-choline acetyltransferase (ChAT) antibody (1:200 ; AB144P, Merck Millipore, Billerica, USA) を用いた。PBSによる洗浄後、遮光し、二次抗体液中で室温にて2時間反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-goat IgG (1:200 ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を抗体希釈液で希釈して用いた。PBSで洗浄後、VECTASHIELD Hard set (H-1400; Vector Laboratories) とカバーガラス（松浪硝子工業）を用いて封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡（Fluoview FV10i、オリンパス株式会社、東京）により画像を取得した。

6) 統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で標記した。二群間の差はStudent's *t*-testあるいは、two-way ANOVAおよびBonferroni *post hoc* testにより解析した。p < 0.05の差を有意であると見なした。

実験結果

ケタミン全身投与によるmPFCでの5-HT遊離上昇におけるDRN内AMPA受容体の役割

mPFCでの5-HT濃度に対するケタミン（1、5または25 mg/kg、皮下投与）の影響を検討した。ケタミンの全身投与は、1 mg/kgでは影響を与えなかったが、5 mg/kgより用量依存的にmPFCにおける5-HT濃度を急速に上昇させた（図1-1A）。この結果はこれまでの研究と一致するものであった（10、16）。次に、AMPA受容体遮断薬の全身投与はケタミンの抗うつ作用を消失するという報告があるため（5、6）、ケタミン全身投与によるmPFCでの5-HT遊離上昇に対するDRN内のAMPA受容体の関与を検討した。ケタミン全身投与の10分前に、AMPA受容体遮断薬であるNBQX（30 nmol）をDRNに微量投与したところ、ケタミンによる5-HT遊離上昇が有意に減弱した（図1-1B）。同様に、Ca²⁺透過性AMPA受容体遮断薬であるNASPM（10 nmol）のDRN内微量投与によっても、ケタミンによるmPFCでの5-HT遊離上昇は抑制された。逆に、DRNへのAMPA（0.1 nmol）およびAMPA受容体脱感作阻害薬であるcyclothiazide（0.1 nmol；CTZ）の同時投与により、投与後20から30分時点において、有意なmPFCでの5-HT濃度の増加が観察されたが、AMPA（0.1 nmol）単独では増加しなかった（図1-1C）。一方で、DRN内へのケタミン（36.5 nmol）の微量投与はmPFCにおける5-HT遊離に影響を与えなかった（図1-1D）。

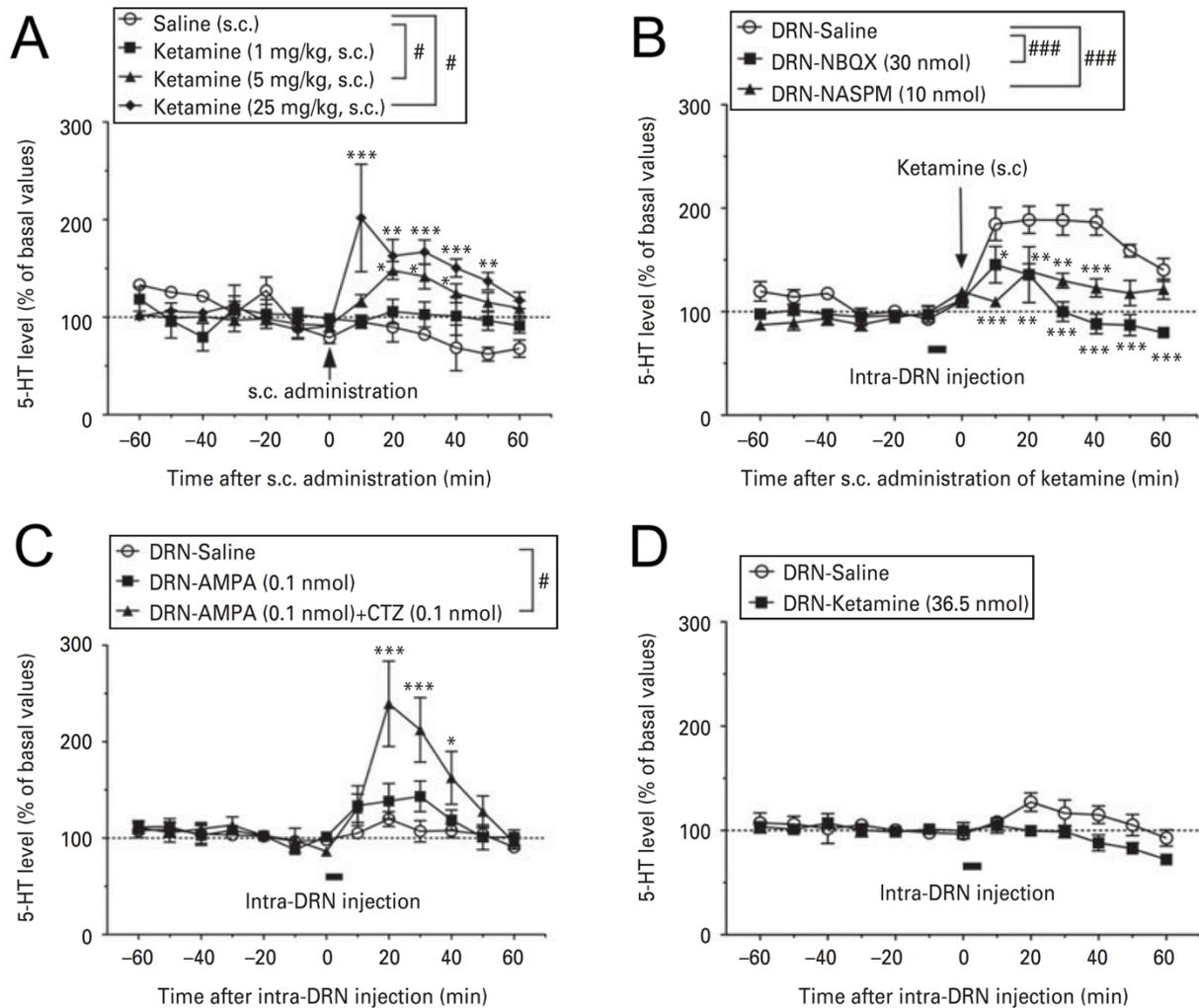


図 1-1 ケタミンは DRN 内 AMPA 受容体の刺激を介して mPFC における 5-HT 遊離を上昇させる

In vivo マイクロダイアリシスにて、mPFC の細胞外 5-HT 濃度を薬物投与の前後 120 分間測定した。(A) 0 分時点で、生理食塩水またはケタミン (1、5 または 25mg/kg) を皮下投与した。n = 3. #p < 0.05 main effect in two-way ANOVA, ***p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05 vs. saline (post-hoc test). (B) -10 から -5 分時点で、生理食塩水、NBQX (30 nmol) または NASPM (10 nmol) を DRN に微量投与した。その後、ケタミン (25 mg/kg) を皮下投与した。n = 3-4. ###p < 0.001 main effect in two-way ANOVA vs. DRN-saline, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 vs. DRN-saline (post-hoc test). (C) 0 から 5 分時点で、生理食塩水、AMPA (0.1 nmol) または AMPA (0.1 nmol) +cyclothiazide (CTZ; 0.1 nmol) を DRN に微量投与した。n = 3-6. ***p < 0.001 *p < 0.05 vs. DRN-saline (post-hoc test). (D) 0 から 5 分時点で、生理食塩水またはケタミン (36.5nmol) を DRN に微量投与した。n = 4.

ケタミン全身投与によるmPFCでの5-HT遊離上昇におけるDRN内 $\alpha 4\beta 2$ nAChRの役割

次に、ケタミンによるmPFCでの5-HT遊離上昇に対するDRN内 $\alpha 4\beta 2$ nAChRの関与を調べた。 $\alpha 4\beta 2$ nAChR遮断薬であるDH β E (10 nmol) のDRN内局所微量投与は、ケタミン全身投与によるmPFCでの5-HT遊離上昇を減弱させた (図1-2A)。逆に、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR作動薬であるRJR-2403 (0.5 nmol) のDRN内局所微量投与により、mPFCにおける5-HT濃度は投与後20分時点において有意な増加が観察された (図1-2B)。

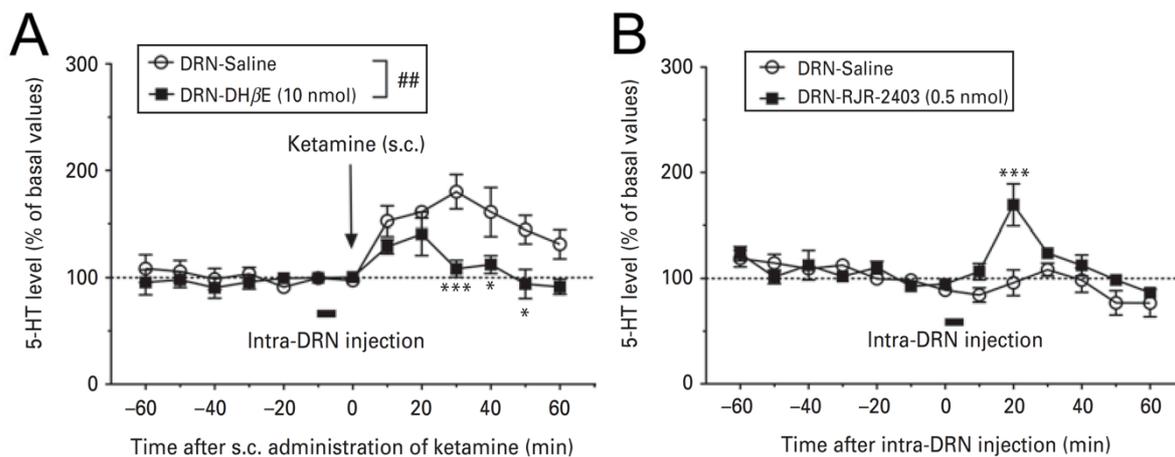


図 1-2 ケタミンはDRN内 $\alpha 4\beta 2$ nAChRの刺激を介してmPFCにおける5-HT遊離を上昇させる

In vivo マイクロダイアリスにて、mPFCの細胞外5-HT濃度を薬物投与の前後120分間測定した。(A) -10から-5分時点に、生理食塩水またはDH β E (10 nmol)をDRNに微量投与した。その後、ケタミン (25 mg/kg)を皮下投与した。n = 4-5. ##p < 0.01 main effect in two-way ANOVA vs. DRN-saline, ***p < 0.001, *p < 0.05 vs. DRN-saline (post-hoc test).

(B) 0から5分時点に、生理食塩水またはRJR-2403 (0.5 nmol)をDRNに微量投与した。n = 3. ***p < 0.001 vs. DRN-saline (post-hoc test).

ケタミン全身投与による mPFCでの5-HT遊離上昇に対してPPTgおよびLDTgの神経核破壊の及ぼす影響

DRNを神経支配するコリン作動性神経細胞は、主にPPTgやLDTgに存在することが知られている (14)。そこで、次にPPTgおよびLDTgを両側性に破壊した際の、ケタミンによるmPFCでの5-HT遊離への影響について検討した。組織学的解析より、PPTg破壊群およびLDTg破壊群では、sham群と比較して有意なChAT陽性コリン作動性神経の減少が確認された (図1-3A-D)。これらのラットを用いて*in vivo*マイクロダイアリシスによる検討を行った。ケタミンの全身投与は、sham群のラットにおいて、mPFCでの5-HT遊離量を急速に増加させた。一方で、PPTg破壊群では、ケタミンによるmPFCでの5-HT遊離上昇を有意に抑制したが (図1-3E)、LDTg破壊群では減弱しなかった (図1-3F)。

ケタミンのPPTg灌流による mPFCでの5-HT遊離上昇におけるDRN内 $\alpha 4 \beta 2$ nAChRおよびAMPA受容体の役割

次にケタミンのPPTgに対する直接的な影響について検討した。ケタミン (0.1 mM) のPPTgへの片側局部灌流は、mPFCにおける5-HT遊離量を有意に増加させ (図1-4A)。従って、ケタミンはPPTgに対する直接的な作用によりmPFCにおける5-HT遊離量を増加させることが示唆された。一方で、LDTgへのケタミン (0.1 mM) 局所灌流は、mPFCにおける5-HT遊離量に影響を与えなかった (図1-4B)。図1-2の結果より、 $\alpha 4 \beta 2$ nAChR遮断薬であるDH β EのDRN内局所投与がケタミン全身投与によるmPFCでの5-HT遊離上昇を抑制したため、DRN内の $\alpha 4 \beta 2$ nAChRがPPTgへのケタミン局所灌流による5-HT遊離上昇にも関与するか検討した。DRNへのDH β E (10 nmol) の局所投与は、PPTgへのケタミン灌流によるmPFCでの5-HT遊離上昇を有意に抑制した (図1-4D)。以前の研究から、 $\alpha 4 \beta 2$ nAChRが5-HT神経細胞体およびDRN内のグルタミン酸作動性神経シナプス前終末に存在することが報告されている (13、17)。そこで、DRN内グルタミン酸作動性神経シナプス前終末の $\alpha 4 \beta 2$ nAChR刺激を介したグルタミン酸遊離上昇が関与しているかを検討した。AMPA受容体遮断薬であるNBQXのDRN内局所投与を行ったところ、DH β Eと同様に、PPTgへのケタミン灌流によるmPFCにおける5-HT遊離上昇を有意に抑制した (図1-4D)。

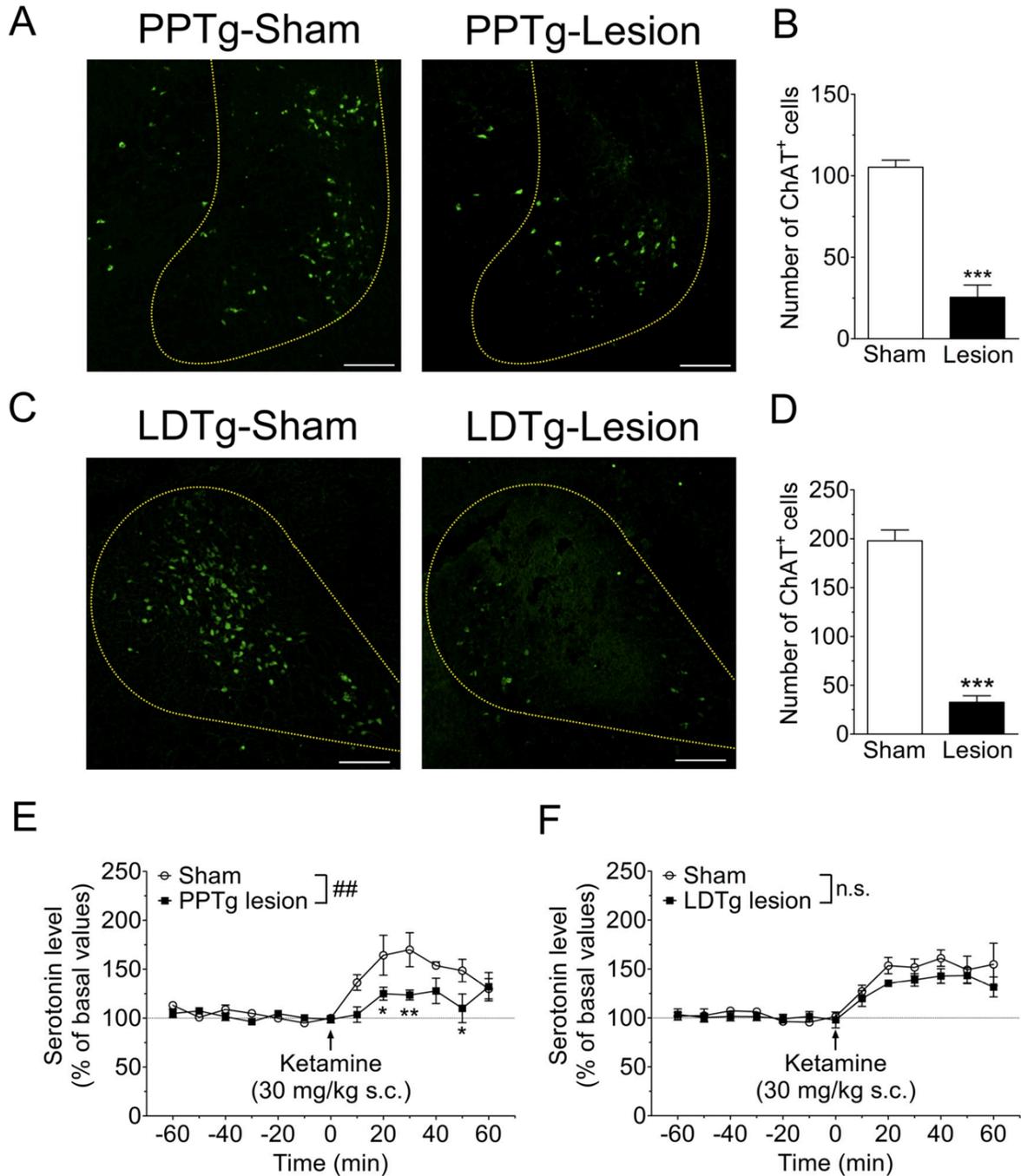


図 1-3 PPTg 神経核破壊はケタミン全身投与による mPFC での 5-HT 遊離上昇を抑制する

(A、C) Sham 群および神経核破壊群 (lesion) における ChAT 免疫陽性細胞の顕微鏡写真の代表例。PPTg 破壊群 (A)、LDTg 破壊群 (C)。(B、D) 神経破壊群による ChAT 免疫陽性細胞数の変化。PPTg 破壊群 (B)、LDTg 破壊群 (D)。スケールバーは 200 μ m を示す。n = 4-5. ***p < 0.001 vs. sham. (E、F) *In vivo* マイクロダイアリシスにて、mPFC の細胞外 5-HT 濃度を薬物投与の前後 120 分間測定した。0 分時点で、ケタミン (30 mg/kg) を皮下投与した。PPTg 破壊群 (E)、LDTg 破壊群 (F) n = 4-5. ##p < 0.01 main effect in two-way ANOVA, **p < 0.01, *p < 0.05 vs. sham.

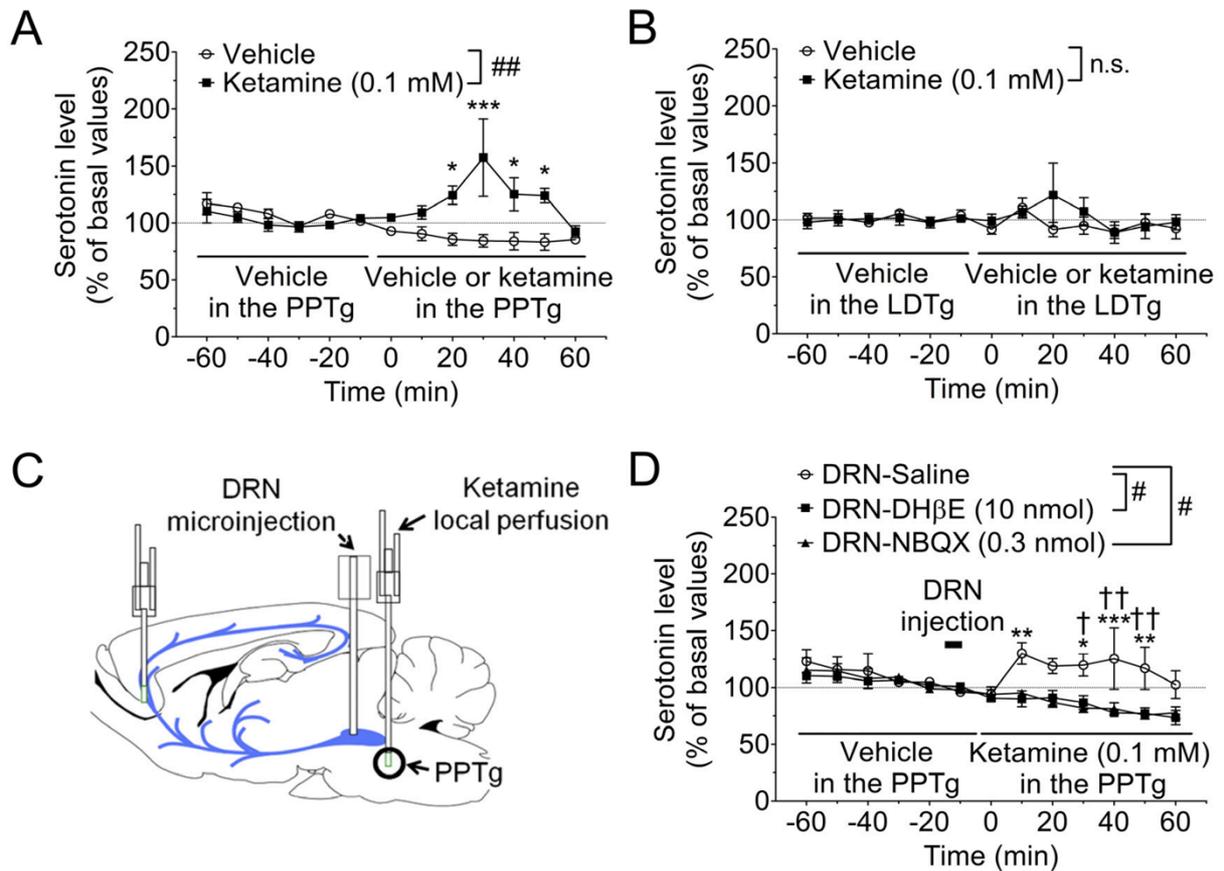


図 1-4 ケタミンの PPTg への灌流は DRN 内の $\alpha 4 \beta 2$ nAChR および AMPA 受容体の刺激を介して mPFC における 5-HT 遊離を上昇させる。

In vivo マイクロダイアリスにて、mPFC の細胞外 5-HT 濃度を薬物投与の前後 120 分間測定した。(A、B) 0 分時点で、PPTg (A) および LDTg (B) へケタミン (0.1 mM) を局所灌流した。n = 3-6. ##p < 0.01 main effect in two-way ANOVA, ***p < 0.001, *p < 0.05 vs. vehicle. (C) 実験の模式図。(D) -15 分から-10 分時点で、 $\alpha 4 \beta 2$ nAChR 遮断薬あるいは NBQX (0.3 nmol) を DRN 内局所投与し、次いでケタミン (0.1 mM) を 0 分時点で PPTg 中に灌流した。n = 4-6. #p < 0.05 main effect in two-way ANOVA, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 vs. DRN-saline.

考察

本研究において、DRNへの薬物局所投与と*in vivo*マイクロダイアリシスを用いて、DRN内のAMPA受容体、特にCa²⁺透過性AMPA受容体および $\alpha 4\beta 2$ nAChRの遮断がケタミンによって引き起こされるmPFCでの5-HT遊離上昇を抑制することを示した。一方で、ケタミンによるDRN内のNMDA受容体の遮断は、mPFCにおける5-HT濃度に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、ケタミンが、DRN内のCa²⁺透過性AMPA受容体および $\alpha 4\beta 2$ nAChRの活性化を介してmPFCにおける5-HT遊離を引き起こすことを示唆している。DRN内のAMPA受容体およびNMDA受容体は、5-HT神経の興奮性を調節することが示唆されている(11)。しかしながら、ケタミン全身投与がDRNにおけるグルタミン酸濃度を上昇させるかどうかは不明である。ケタミンの麻酔下用量の全身投与は、GABA介在神経細胞上のNMDA受容体阻害を介して、mPFCにおけるグルタミン酸遊離を促進することが知られている(18、19)。さらに、DRNは、mPFCや外側手綱核、視床下部などの多くの脳領域におけるグルタミン酸作動性神経によって神経支配されている(20)。したがって、これらの脳領域におけるグルタミン酸作動性神経の間接的な活性化が、DRNにおいてグルタミン酸放出を誘導し、mPFCにおける5-HT遊離を引き起こす可能性が考えられる。

DRNは5-HT神経活動を抑制するGABA介在神経細胞を含むため、ケタミンによるGABA介在神経細胞上のNMDA受容体の遮断が局所的にDRN内の5-HT神経を脱抑制し、5-HT遊離上昇を引き起こすと考えられている(21)。一方で、本研究では、ケタミンのDRN内局所投与は5-HT遊離量に影響を与えなかった。以上より、ケタミンは、mPFCなど他の脳領域からのDRNへのグルタミン酸作動性神経入力を増強し、DRNにおける5-HT神経の活性化を引き起こすことが示唆される。この仮説を支持するように、mPFCへのケタミンの灌流は、5-HT遊離を増加させることが報告されている(10、16)。グルタミン酸作動性神経シナプス前末端からのグルタミン酸遊離は、シナプス前終末に存在するnAChRの刺激によっても増強することが知られている(22)。DRNにおいて、この5-HT神経発火の増加は、 $\alpha 4\beta 2$ nAChRの活性化によって引き起こされるが、 $\alpha 7$ nAChRでは引き起こされないことが報告されている(13)。これらの報告と一致して、本研究では、mPFCにおけるケタミンによる5-HT遊離上昇作用には、DRN内の $\alpha 4\beta 2$ nAChR刺激が必要十分であることが示された。また、ケタミンや他のNMDA受容体遮断薬の全身投与が、皮質領域におけるACh遊離量を増加させることが示唆されていることから、(23、24)このようなACh遊離上昇がDRNでも引き起こされている可能性が考えられる。

DRNは、PPTgやLDTgに存在するコリン作動性神経によって神経支配されることが知られている(14)。本研究では、PPTgの両側神経破壊によりケタミンのmPFCにおける5-HT遊離上昇作用が抑制されること、また、PPTgへのケタミン灌流がmPFCにお

ける5-HT遊離を増加させることを示した。さらに、DRN内の $\alpha 4\beta 2nAChR$ またはAMPA受容体の薬理的遮断は、PPTgへのケタミン局所灌流によるmPFCでの5-HT遊離上昇を抑制した。これらの結果は、ケタミンがPPTgに直接作用し、PPTgのDRNへ投射するコリン作動性神経細胞の活性化、それに引き続くDRN内のシナプス前終末に存在する $\alpha 4\beta 2nAChR$ の活性化を介して、mPFCにおける5-HT遊離を引き起こすことを示唆している。驚くべきことに、PPTgとLDTgはともにDRNを神経支配するにも関わらず、LDTgではなく、PPTgのみがケタミンによるmPFCにおける5-HT遊離上昇に関与することが示唆された。この神経核間の相違の説明として、ケタミンがPPTgのコリン作動性神経細胞を優先的に活性化することが考えられる。実際に、LDTgではなくPPTgへのケタミン局所灌流が、ケタミン全身投与の効果を模倣したことが示す様に、これら神経核間ではケタミンへの感受性が異なっていた。

PPTgとLDTgはコリン作動性神経細胞の連続体を形成し、構造および神経化学的に類似の特徴を有する(25)。PPTgおよびLDTgはともにDRNだけでなく腹側被蓋野や線条体、視床を神経支配するが、その神経投射は重複していないことが知られている。PPTgのコリン作動性神経はそれぞれの神経核の外側領域を支配するが、LDTgニューロンは内側領域を神経支配する(26)。一方、O'HearnとMolliverの報告によると、DRNの背側神経ではなく、腹側神経が皮質へ投射することが示唆されている(27)。従って、PPTgはmPFCに投射する5-HT神経に優先的にシナプス形成するという様に、PPTgおよびLDTgがDRN内の異なる亜核を神経支配している可能性があるが、さらなる解剖学的解析が必要である。本研究では、PPTgの局所灌流によってmPFCにおける5-HT遊離が上昇することから、ケタミンがPPTgに直接作用することを強く示唆している。しかし、NMDA受容体遮断薬であるケタミンがどのようにしてPPTgのコリン作動性神経を活性化するかは不明である。仮説として、PPTgがGABA作動性神経およびコリン作動性神経を含むことから(25、28)、上述の様に、ケタミンがGABA作動性介在神経に存在するNMDA受容体を遮断したことによるコリン作動性神経の脱抑制が考えられる。

SSRIのような従来の抗うつ薬は、治療効果を発揮するまでに数週間の投与が必要であることが報告されており、この作用発現における遅延は、5-HT自己受容体活性化による5-HT神経活動の強力な抑制によって部分的に説明することができる(29)。最近、Challisらにより、社会的敗北ストレスがDRNにおけるGABA作動性介在神経の興奮性増強を介して、5-HT神経発火を抑制することが明らかとなった(30)。したがって、このような5-HT神経の興奮性抑制が、うつ病モデル動物においてSSRIの急性投与が有効でない一因であると考えられる。本研究は、ケタミンが、急性のSSRI投与とは異なり、AMPA受容体および $\alpha 4\beta 2nAChR$ を介して5-HT神経活動を急速に活性化することを示唆している。ケタミンの抗うつ薬様作用が5-HTを必要とするという以前の知見(8、9)と併せて、5-HT神経発火を増加させることが迅速な抗うつ作用発現に重要である

可能性があるものの、さらなる行動および電気生理学的検討が必要である。

以上、本章において筆者は、ケタミンがDRN内のAMPA受容体および $\alpha 4 \beta 2$ nAChRの活性化を介してmPFCにおける5-HT遊離を増加させることを明らかにした。さらに、ケタミンはPPTgに直接作用することによってmPFCにおける5-HT遊離を増加させ、これはDRN内の $\alpha 4 \beta 2$ nAChRおよびAMPA受容体の刺激を介したものであることを明らかにした。

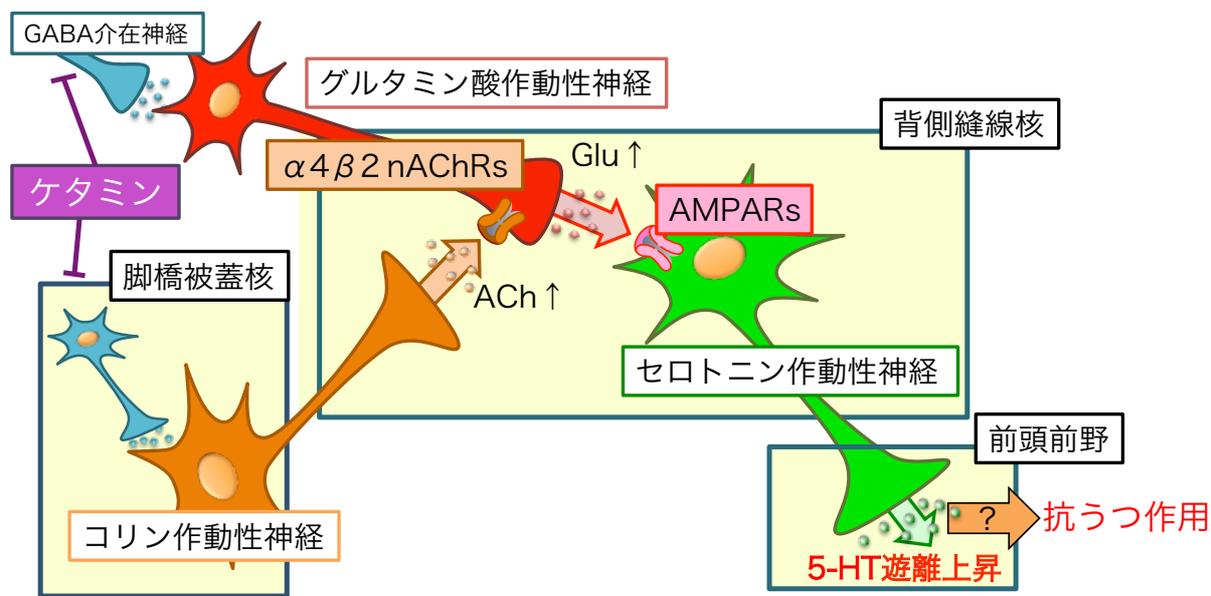


図 1-5 ケタミンによる mPFC での 5-HT 遊離量増加における神経回路メカニズム
 ケタミンは PPTg のコリン作動性神経を活性化し、DRN のグルタミン酸神経シナプス前終末に存在する $\alpha 4 \beta 2$ nACh 受容体刺激を介してグルタミン酸遊離を引き起こし、DRN セロトニン神経が有する AMPA 受容体を活性化することで、mPFC におけるセロトニン遊離を上昇させる。

第二章

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

縫線核を起始核とする5-HT神経は、MDDを含む精神疾患の病因や薬物治療において中心的な役割を果たすと考えられている(31-36)。また、SSRIなど現在治療に用いられているほとんどの抗うつ薬は、脳内の細胞外5-HT濃度を増加させることが報告されている(34)。これまでのマウスを用いた研究では、SSRIおよびケタミンの抗うつ様作用が5-HT神経系に依存することが示されている(31、33)。さらに、脳内における5-HT合成の律速酵素であるtryptophan hydroxylase-2 (TPH2)の遺伝子欠損または不活性化突然変異によって誘発される5-HTの欠乏は、マウスにおいてうつ様行動を増加させることが報告されている(32、35)。さらに、化学遺伝学的手法により、中枢の5-HT神経の活性化が、マウスにおいて抗うつ薬様作用を引き起こすことが明らかになっている(36)。しかしながら、縫線核5-HT神経は、それぞれ異なる神経接続および機能を持つヘテロな神経細胞集団であることが知られている。そのため、どの亜集団が抗うつ作用に関与するのかは依然として不明である。

光遺伝学は、神経細胞の興奮性を高い空間的および時間的分解能で制御することができるため、神経科学分野において広く利用されている(37)。これまでに、遺伝的に標識した5-HT神経にこれらのツールを発現させ、興奮性制御を可能とした遺伝子改変マウスを用いた行動解析が行われてきている(38-42)。これらの研究では、5-HT神経の活性化は不安を増大させること(40、42)、また、報酬への待機時間を延長することが示唆されている(38、39、41)。一方で、行動学的にはマウス系統間において大きな差異があり、種間ではそれ以上の差異があることがよく知られている(43、44)。したがって、遺伝子改変技術の応用が困難であるものの、ラットや非ヒト霊長類などの他の種において、5-HT神経の興奮性制御による行動学的変化を検討することは重要であると考えられる。これには、特定の部位における細胞種特異的に光遺伝学的制御が可能となるような、強力かつ特異的な外来遺伝子発現を行うツールが必要である。現在、TPH-Creトランスジェニックラットは、ラットにおける5-HT神経の特異的な標識に使用されている(45)。しかし、それらの光遺伝学/化学遺伝学的操作による行動への影響は未だ検討されていない。筆者らは以前に、GAL4-p65キメラタンパク質およびGAL4結合配列を利用し、ラットにおいてグリア線維酸性タンパク質やTPH2のような細胞種特異的プロモーターの制御下で強力な遺伝子発現が可能となる二段階転写増幅機構(TSTA)を有するウイルスベクターを作製した(46、47)。

本研究では、マウスおよびラットにおいて5-HT神経の光遺伝学的な神経興奮性制御が可能となる新規レンチウイルスベクター(LVV)を開発し、さらに、DRNにおける5-HT神経特異的な活性化あるいは抑制による情動行動の調節について検討した。

実験方法

1) 実験動物

実験には C57BL/6J 系雄性マウス (6-9 週齢; 日本 SLC、静岡)、Wistar/ST 系ラット新生児 (2-3 週齢; 日本 SLC、静岡) および Wistar/ST 系雄性ラット (6-9 週齢; 日本 SLC、静岡) を使用した。実験は全て京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

2) 脳定位手術

ラットおよびマウスはペントバルビタール (60 mg/kg) 麻酔下で小動物用脳定位固定装置 (成茂、東京) に固定し、脳アトラス (15) に従い、LVVをDRN (ラット: ブレグマより、AP -7.7 mm, ML 0 mm, DV +7.0 mm、新生仔ラット: ラムダより、AP +1.4 mm, ML 0 mm, DV +6.0 mm、マウス: ブレグマより AP -4.4 mm, ML 0 mm, DV +3.4 mm) へそれぞれ1 μ L (マウスおよびラット新生児) あるいは5 μ L (ラット) 投与した。本研究では、TPH2プロモーターの制御下で、eYFP変異体であるVenus (TPH2::Venus)、ChR2変異体であるChETA (TPH2::ChETA)、光活性化プロトンポンプeArchT (TPH2::eArchT、48) を発現するLVVを用いた。ウイルス投与1-2週間後に、光ファイバーカニューレの先端がDRNの背側境界部の真上に配置するように埋め込んだ。行動分析後、全てのマウスは第一章と同様に経心灌流により固定し、LVV感染を蛍光発現細胞の観察により確認した。LVVの投与および光ファイバーの設置に失敗したマウスから得られたデータは除外した。

3) LVVの作製

LVVの作製および精製は、既報に従って行った (49)。Lenti-X 293T細胞 (Clontech、Mountain View、USA) を60-70%の培養密度まで増殖させ、パッケージングベクターおよびシャトルコンストラクトをpolyethylenimine (Polysciences、Warrington、USA) で感染させた。16-18時間の培養の後、上清を採取し、新鮮な培地を加えた。30時間の培養後、上清を回収し、最初の上清と混合した。上清を0.45 μ m孔径のPVDF膜 (Millex-HV、Billerica、Merck Millipore) により濾過し、SW-28ローター (Beckman-Coulter、Brea、USA) 中で23,000 rpmで2時間超遠心分離した。沈殿物をPBSに再懸濁し、-80°Cで保存した。LVVの力価をp24ELISA (BioAcademia、大阪) により測定し、約4-5 \times 10¹⁰ IU/mLと推定した。

4) *In vivo*光遺伝学操作

光ファイバーカニューレは、マルチモードLC/PCセラミックフェルール (外径: 1.25

mm、孔径：270 μm 、Thorlabs、Newton、USA）および、プラスチック光ファイバー（CK10、直径：250 μm 、NA：0.5、三菱レーヨン、東京）を用いて作製した。マウスに埋め込んだ光ファイバーカニューレはロータリージョイント（Doric Lenses、Quebec、Canada）を介して、光ファイバーパッチコード（Doric Lenses）に接続した。ダイオード励起固体（DPSS）レーザー（Beijing Viasho Technology、Beijing、China）から出力されたレーザー光は、ロータリージョイントに接続したFC/PCコリメーター（Thorlabs）を用いて光ファイバーに集光させた。DPSSレーザーは、電気刺激装置（日本光電、東京）を用いて駆動した。srTPH2::ChETA投与ラットおよび、smTPH2::ChETA投与マウス、smTPH2::Venus投与マウスは、青色光（波長：473 nm、先端出力：20 mW、照射時間：5 ms、周波数：20 Hz）を試験開始15分前から試験終了時まで照射した。srTPH2::eArchT投与ラットおよび、smTPH2::eArchT投与マウス、smTPH2::Venus投与マウスでは、緑色光（波長：532 nm、先端出力：10 mW）を試験開始から試験終了時まで照射した。srTPH2::Venus投与ラットの半数に青色光を照射し、残りの半数に緑色光照射を行った。行動試験のいずれにおいても、これら2群間に有意な差は見られなかったため、これら2群を1つの対照群とみなした。

5) 行動試験

ウイルス投与の1-2週間後、光ファイバーカニューレ埋め込みの1-2日後から全ての行動実験を行った。全ての行動実験は明期に実施した。

尾懸垂試験

尾懸垂試験は、マウスに埋め込んだ光ファイバーカニューレを光ファイバーパッチコードと接続した後に行った。馴化後、試験箱（40×40×40 cm）の底面から35 cmの位置に設置したフックにマウスの尾をテープで固定して吊り下げた。フックはトランスデューサー（PowerLab 2/26、AD Instruments、Dunedin、ニュージーランド）に接続した。無動時間を6分間記録した。マウスの行動をビデオカメラで記録し、試験中に後肢を保持したマウスは解析から除外した。

オープンフィールド試験

白色の亚克力製試験箱（ラット：75×75×40 cm、マウス：50×50×50 cm）からなるオープンフィールドを中央部（ラット：35×35 cm、マウス：25×25 cm）と周辺の外側部に分けた。各動物は、試験箱の中心に置き、5分間（ラット）あるいは10分間（マウス）、自由に探索させ、ビデオカメラで記録した。記録した動画は、ビデオ追跡システム（ANY-maze ver4.99、Stoelting、Wood Dale、USA）を用いて自動で解析した。試験時間中の総移動距離と中央部への滞在時間を測定した。

高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は、オープンフィールド試験の翌日に行った。中央のプラットフォーム（ラット：10×10 cm、マウス：5×5 cm）、2本の壁のないオープンアームおよびクローズドアーム（ラット：60×10 cm、マウス：30×5 cm）からなる装置を用いた。各動物を光ファイバーパッチコードと接続し、それぞれ中央へ置き、5分間（ラット）または10分間（マウス）の行動をカメラで記録した。動画は、ビデオ追跡システム（ANY-mazeバージョン4.99）を用いて自動的に解析した。試験中に装置から落下した動物はデータから除いた。

強制水泳試験

強制水泳試験は、高架式十字迷路試験の後に行った。試験の前日に、馴化のため、水を入れた透明なシリンダー（直径：20 cm、深さ：25 cm、25°C±1°C）にラットを入れ、15分間泳がせた。翌日、各ラットを光ファイバーパッチコードと接続し、10分間泳がせ、シリンダーの上部から行動をカメラで記録した。無動時間は、前肢の垂直運動および水平運動を行わない時間として定義した。

6) 免疫染色

動物をペントバルビタールで深く麻酔し、PBSおよび4%パラホルムアルデヒド（Nacalai Tesque）を経心灌流した。灌流固定後、脳を取り出し、15%スクロースを含むPBS中に一晩静置した後に凍結した。その後、凍結ミクロトーム（Leica CM3050S）を用いて厚さ30 μmの凍結冠状切片を作製し、免疫染色まで-80°Cで保存した。免疫染色は、切片を透過処理のために0.25% Triton-X100（Nacalai Tesque）を含むPBSに浸し、次いでウサギポリクローナル抗Green fluorescent protein (GFP) 抗体（1:2000; A-11122、Life Technologies）およびヒツジポリクローナル抗TPH2抗体（1:200; AB1541、Merck Millipore）を4°Cで一晩インキュベートした。その後、Alexa Fluor 488または594標識ロバ抗ウサギIgG（1:200; Life Technologies）およびAlexa Fluor 647標識ロバ抗ヒツジIgG（1:200; Life Technologies）を室温で2時間インキュベートした。次いで切片をPBSで洗浄し、VECTASHIELD（Vector Laboratories、Burlingame、USA）を用いてガラス上に封入した。免疫染色画像は、レーザー走査共焦点顕微鏡法（Fluoview FV10i、オリンパス、東京、日本）を用いて撮影した。

7) 電気生理学

電気生理学的分析は、以前の報告（50）に記載した方法に従って行った。マウスおよびラット新生児はLVV投与後、少なくとも1週間回復させ、イソフルランによる深麻酔下で断頭した。脳を氷冷したcutting solution（120 mM NMDG-Cl、2.5 mM KCl、26 mM NaHCO₃、1.25 mM NaH₂PO₄、0.5 mM CaCl₂、7 mM MgCl₂、15 mM D-グルコー

ス、1.3 mM アスコルビン酸、pH7.2) 中に回収し、ビオラトーム (VT1000S、Leica Biosystems) を用いて中脳冠状スライス (200 μm) を作製し、酸素を加えた人工脳脊髄液 (aCSF; 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM D-グルコース、pH7.3, 32°C) 中に少なくとも1時間インキュベートした。インキュベート後、各スライスを酸素をバブリングしたaCSFが持続的に灌流された記録用チャンバーに移した。各ニューロンを、倍率40の水浸対物レンズ (CarlZeiss、Oberkochen、Germany) およびCCDカメラを備えた直立蛍光顕微鏡で観察し、eYFP陽性ニューロンを記録に用いた。全細胞記録はEPC9増幅器 (HEKA、Pfalz、Germany) を用いて行い、データはPatchmasterソフトウェアを用いて記録した。内部溶液 (140 mM K-グルコン酸、5 mM KCl、10 mM HEPES、2 mM Na-ATP、2 mM MgCl₂、0.2 mM EGTA、KOHでpH7.3に調整) で満たした場合、電極の抵抗は4~7 M Ω であった。全ての実験は、AMPA、NMDAおよびGABA受容体を遮断するために、CNQX (10 μM)、AP-5 (25 μM) およびビククリン (10 μM) の存在下で行った。ChETAによる電流を記録する際には、電位依存性Na⁺チャンネルを遮断するためにテトロドトキシン (1 μM) を灌流した。

8) ウイルスベクターの構築

オリゴデオキシヌクレオチドプライマー (北海道システムサイエンス、札幌) の配列は表1に示した。PCRは、PhusionまたはQ5DNAポリメラーゼ (New England Biolabs、Ipswich、USA) を用いて行なった。すべてのライゲーション反応は、T4 DNAリガーゼ (BioAcademia、大阪) を用いて行なった。rTPH2-Venusの構築は以下の様に行なった。pCSII-Venus-PRE (三好博士、宮脇博士 (共に理化学研究所) より寄贈) をテンプレートとしてPCRでVenus断片を増幅し、NotI/SpeIで消化した後、NotI/SpeIで処理したpTYF-G4BS-rTPH2-GluA1-IRES-Gal4p65 (rTPH2-GluA1) とライゲーションすることでrTPH2-Venusを作製した。rTPH2-Venus-WPRE (srTPH2::Venus) の構築は以下の様に行なった。PCRで増幅したIRES、Gal4p65、WPREおよびSalIで処理したrTPH2-GluA1を用いてIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech、Mountain View、USA) により反応させることでライゲーションした。その後、生成物をNotI/SpeIで処理し、PCRで増幅後にNotI/XbaIで処理したVenus断片とライゲーションすることでsrTPH2 :: Venusを作製した。rTPH2-ChETA-eYFP-WPREおよびrTPH2 eArchT3.0-eYFP-WPREの構築は以下の様に行なった。ChETA-eYFPおよびeArchT3.0-eYFP断片を、pLenti-CaMKII-ChETA-eYFPおよびpLenti-CaMKII-eArchT3.0-eYFP (いずれもAddgeneから入手した) よりPCRで増幅し、AscI/SpeIで処理した後に、MluI/SpeIで処理したrTPH2-GluA1-WPREにライゲーションした。mTPH2-Venus-WPRE (smTPH2::Venus) の構築は以下の様に行なった。マウスTPH2プロモーターをマウスゲノムDNAからPCRで増幅し、SacII/MluIで処理し、SacII/MluIで処理したrTPH2-Venus-WPREにライゲーションした。ChETA-eYFP-WPRE

(smTPH2::ChETA) およびmTPH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE (smTPH2::eArchT) の構築は以下の様に行った。PCRで増幅したChETA-eYFPおよびeArchT3.0-eYFP断片をAscI/SpeIで処理し、MluI/SpeIで処理したmTPH2-GluA1-WPREにライゲーションした。これらプラスミド生成物の配列は、サンガー法 (Fasmac、神奈川) によって確認した。

表 1

Primer name	Sequence (5' to 3')
NotI Venus Fw	ataGCGGCCGCGGATCCACCATG
SpeI Venus Rv	gagACTAGTTTACTTGTACAGCTC
IRES infusion Fw	TCGGATATCCGTCGAGCCCCTCTCCCTCCCCC
IRES infusion Rv	AGACAGTAGCTTCATGGTTGTGGCCATATTATCAT
Gal4p65 infusion Fw	ATGAAGCTACTGTCTTCTATC
Gal4p65 infusion Rv	TCCCTCGATGTTAACTTACCTGGTACCGGGCCC
WPRE infusion Fw	GTTAACATCGAGGGATCAAG
WPRE infusion Rv	GTTATCCCTAGTCGACGATGCGGGGAGGCGGCC
NotI Venus Fw2	actGCGGCCGCCACCATGGTGAGCAAG
XbaI Venus Rv2	atgTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTC
AscI ChETA-eYFP Fw	aatGGCGCGCCAGCCACCATGGACTATGGC
SpeI ChETA-eYFP Rv	ggcACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCAT
AscI eArchT-eYFP Fw	aatGGCGCGCCAGCCACCATGGACCCAATT
SpeI eArchT-eYFP Rv	ggcACTAGTTTACACCTCGTTCTCGTAGCA
SacII mTPH2 Fw	attCCGCGGCACTGTAGAAAGCCTTTCCA
MluI mTPH2 Rv	tatACGCGTACTGCAGTGGCAGCTGCCTG

9) 統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で標記した。二群間の差はStudent's *t*-testにより、三群以上の差は、one-wayあるいはtwo-way ANOVAおよびBonferroni *post hoc* testにより解析した。P < 0.05の差を有意であると見なした。

実験結果

改良型TSTAレンチウイルスベクターによる5-HT神経特異的な導入遺伝子発現

以前に報告したTSTAおよびラットTPH2プロモーターを有するLVV(rTPH2-Venus)は、ラットDRNにおいてeYFP変異体Venusの免疫組織化学的増強の後でのみ検出可能な、中程度の発現しか誘導しなかった(図2-1および2-2)。TSTAによる遺伝子発現増強機構において、TPH2プロモーターの上流に存在するG4BSへのキメラ転写因子GAL4-p65の結合が重要となる。そこで、GAL4-p65をより効率的に発現させるために、上流に存在するIRESの11番目のATGに対してインフレームとなるように改変した(51)。さらに、mRNA安定化配列であるウッドチャック型肝炎ウイルス転写後調節因子(WPRE)を導入遺伝子カセットの3'UTRに配置したLVVを作製し、ラットDRNへ投与したところ、免疫組織化学的増強なしでVenusの蛍光が検出可能であった(rTPH2-Venus-WPRE、図2-1および2-2)。

改良型 TSTA レンチウイルスベクターによるラット 5-HT 神経特異的かつ機能的な光遺伝学的ツールの発現

次に、VenusをChETA-eYFPまたはeArchT-eYFPに置換することで各LVVを作製した(52、53)。これらLVVによる光遺伝学的ツールのセロトニン神経特異的な発現を確認するために、rTPH2-Venus-WPRE(srTPH2::Venus)、rTPH2-ChETA-eYFP-WPRE(srTPH2::ChETA)またはrTPH2-eArchT-eYFP-WPRE(srTPH2::eArchT)をラットのDRNに投与した。LVV投与の1週間後、DRNにおいてVenus免疫陽性細胞の $96.9\pm 0.9\%$ がTPH免疫陽性であり、VenusおよびeYFPの蛍光は免疫組織化学的増強なしで検出可能であった(図2-3A)。srTPH2::ChETAをDRNに投与したラットからDRNを含む急性単離脳切片を作製し、eYFP陽性細胞においてホールセル記録を行ったところ、青色光照射(473 nm, 20 Hz, 5 msec)により、活動電位および、内向き電流が誘発された(図2-3B)。また、srTPH2::eArchT投与ラットの急性単離脳切片のeYFP陽性細胞において、緑色光(532 nm)照射は外向き電流を誘発し、電流注入(100 pA)によって誘発される活動電位発生を抑制した(図2-3B)。これらの結果より、改良型LVVが、ラットの5-HT神経特異的な光遺伝学的制御を行うのに十分な遺伝子発現を誘導することができることが示唆される。

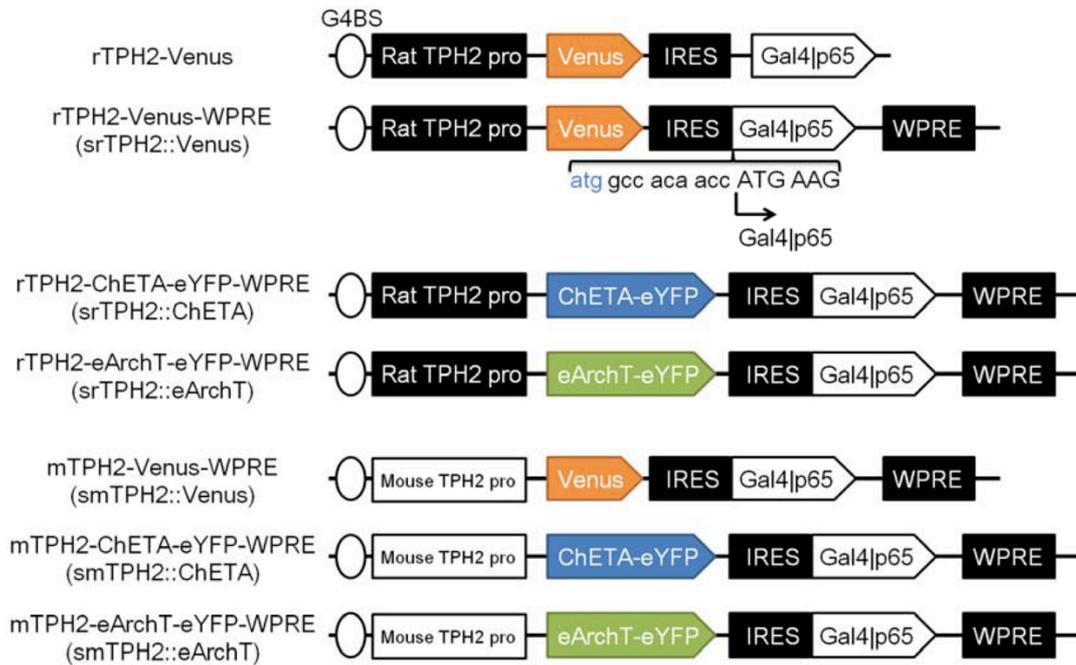


図 2-1 マウスおよびラット TPH2 プロモーターを用いた LVV の模式図

遺伝子発現を上昇させるため、rTPH2-Venus に Gal4p65 および Gal4 結合配列 (G4BS) を付加した。さらに強力な発現を得るため、srTPH2::Venus では IRES と Gal4p65 との間の配列を除去し、下流に WPRE を付加した。5-HT 神経操作の目的で、Venus を ChETA-eYFP および eArchT-eYFP 断片に置換し、srTPH2::ChETA および srTPH2::eArchT をそれぞれ作製した。この LVV をマウスに応用するため、ラット TPH2 プロモーターをマウスオルソログに置き換え、smTPH2::Venus、smTPH2::ChETA および smTPH2::eArchT を作製した。

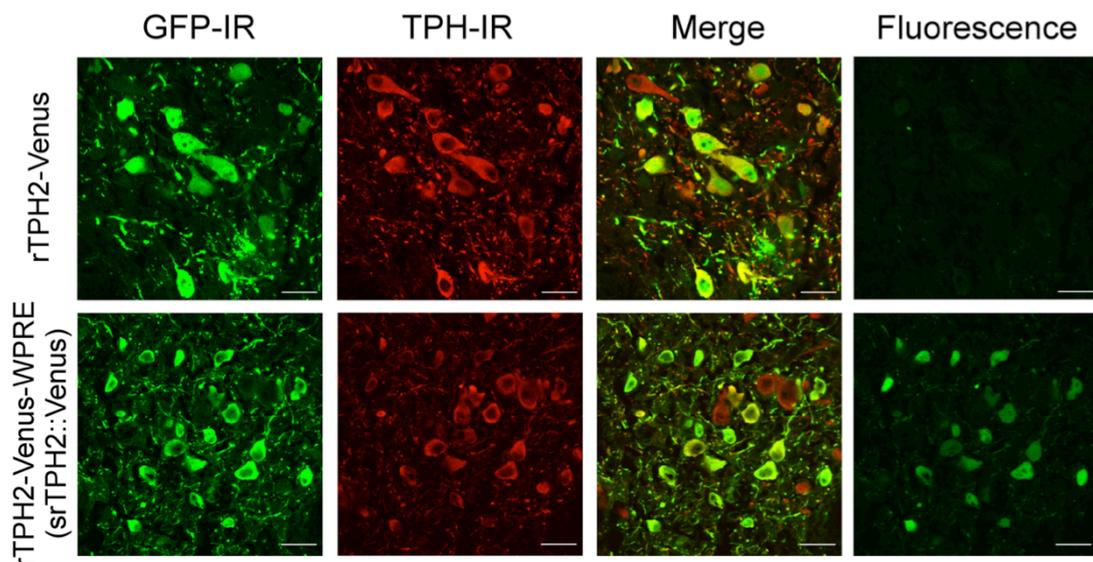
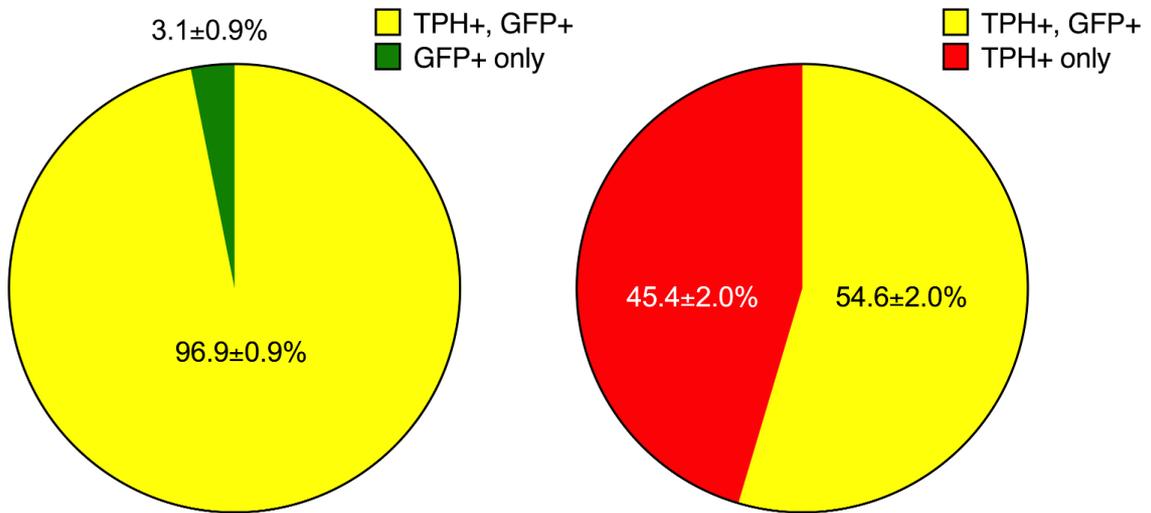
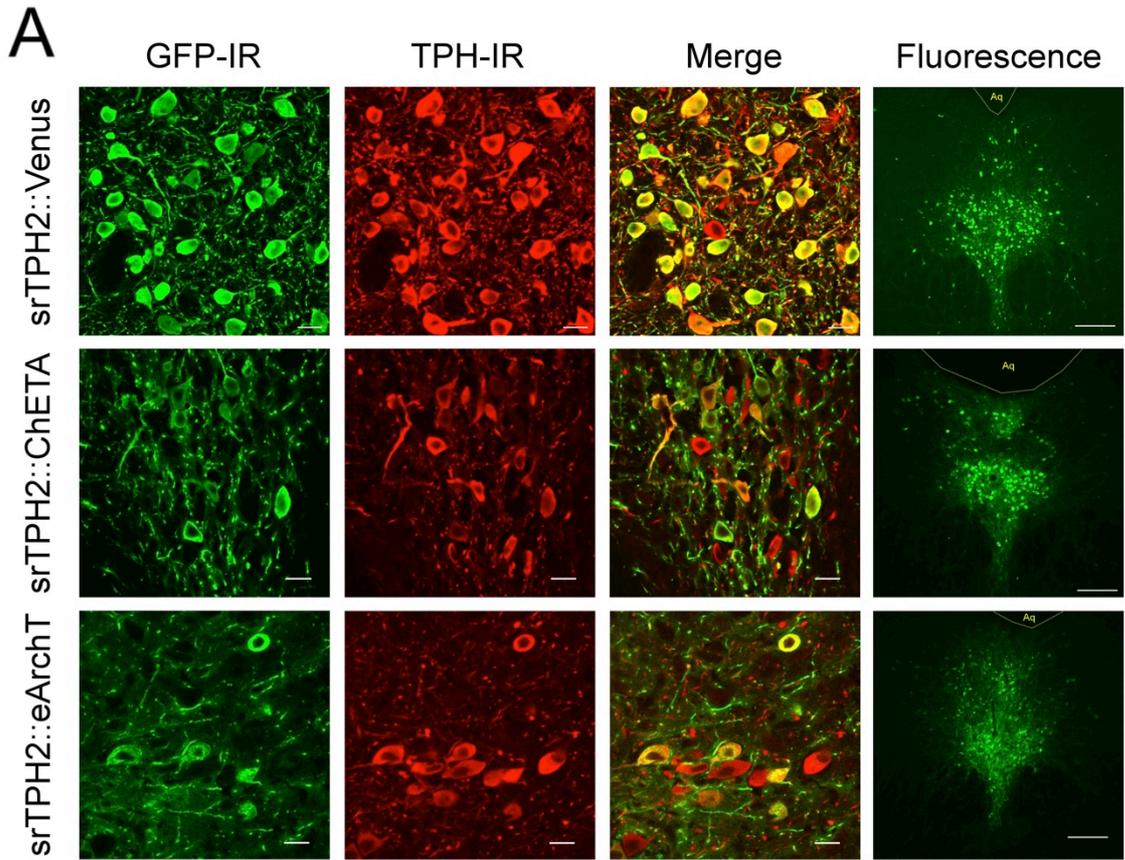


図 2-2 srTPH2::Venus により導入遺伝子発現が上昇する

ラット DRN に rTPH2-Venus または rTPH2-Venus-WPRE (srTPH2::Venus) を投与した。投与 1 週間後に DRN を含む冠状切片を作製し、抗 GFP および抗 TPH 抗体によって染色した。染色後、切片を共焦点顕微鏡により観察した。スケールバーは 20 μm を示す。



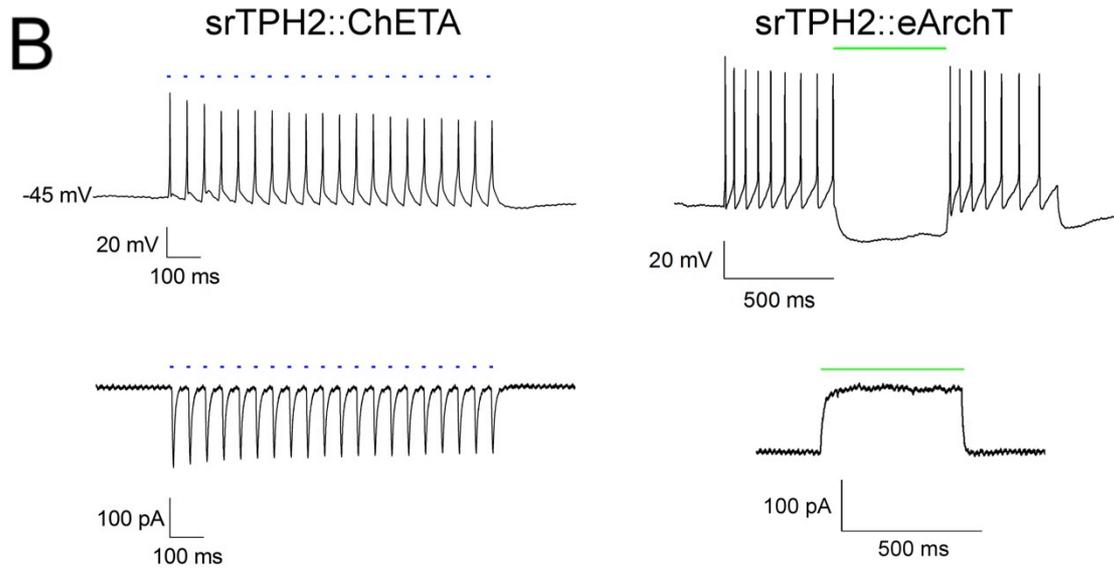


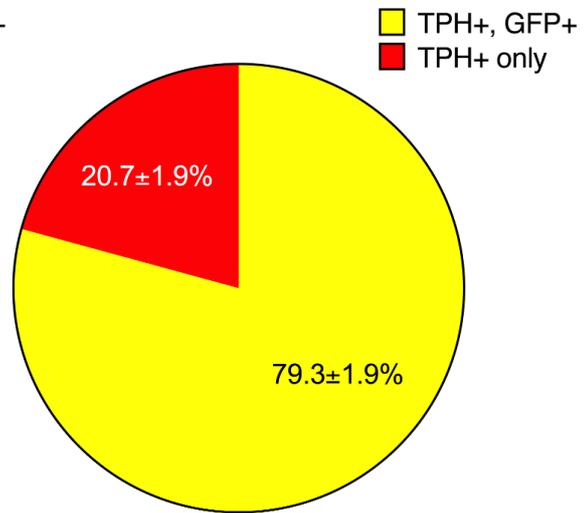
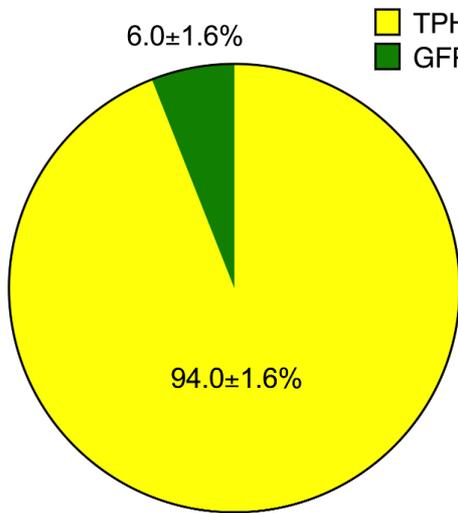
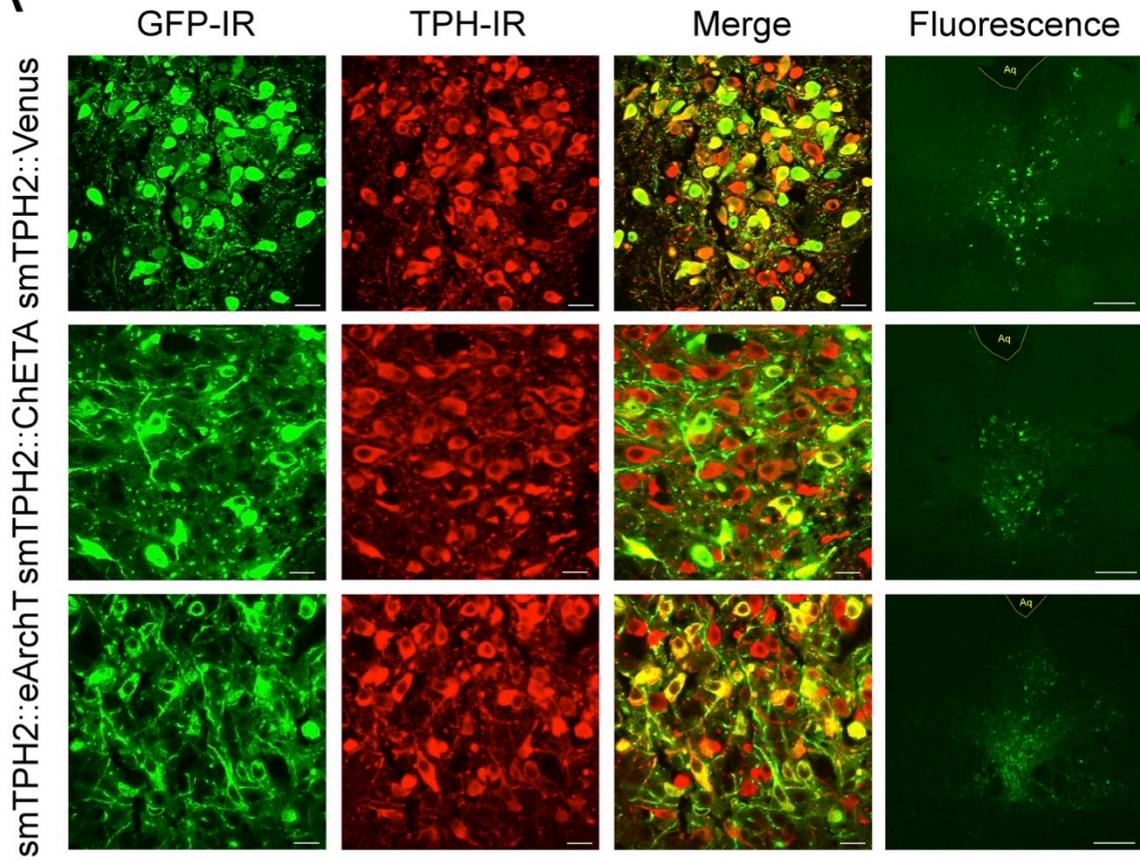
図 2-3 srTPH2 LVV により光遺伝学的ツールの 5-HT 神経特異的かつ機能的な発現が可能である

ラット DRN に srTPH2::Venus、srTPH2::ChETA または srTPH2::eArchT を投与した。(A) LVV 投与 1 週間後、DRN を含む冠状切片を抗 GFP および抗 TPH 抗体によって染色した。切片は共焦点顕微鏡にて画像化した。スケールバーは 20 μm (GFP、TPH、Merge) または 200 μm (Fluorescence) を示す。(B) LVV 投与 1 週間後、厚さ 200 μm の冠状切片を作製し、eYFP 陽性細胞でホールセルパッチクランプ記録を行った。青色光 (20 Hz、5 ms) または緑色光 (0.5 s) を測定中の細胞に照射した。電流固定法 (上) および電位固定法 (下) による記録の代表的なトレースを示した。

改良型 TSTA レンチウイルスベクターによるマウス 5-HT 神経特異的かつ機能的な光遺伝学的ツールの発現

上記ラット TPH2 プロモーターの塩基配列は、マウスにおいてもある程度の相同性が見られたものの、srTPH-Venus はマウスでは機能しなかった。そこで、これらの LVV をマウスに応用するために、ラット TPH2 プロモーターをマウスオルソログに置き換えた (smTPH2::Venus、smTPH2::ChETA および smTPH2::eArchT)。マウス DRN への LVV 投与 1 週間後において、Venus または eYFP 陽性細胞の蛍光は免疫組織化学的増強なしに確認できた。また、Venus 免疫陽性細胞の $94.0 \pm 0.9\%$ が TPH 免疫陽性であった (図 2-4A)。さらに、smTPH2::ChETA 投与マウスから作製した急性単離脳切片の eYFP 陽性細胞において、青色光照射 (20 Hz、5 ms) に応じた内向き電流および活動電位が観察された。また、smTPH2::eArchT 投与マウスでは、緑色光照射に応じた外向き電流が観察され、電流注入による活動電位の発生が抑制された (図 2-4B)。以上より、改良型 LVV は、マウス 5-HT 神経においても、特異的かつ光遺伝学的操作を行うのに十分な遺伝子発現の誘導が可能であることが示唆される。

A



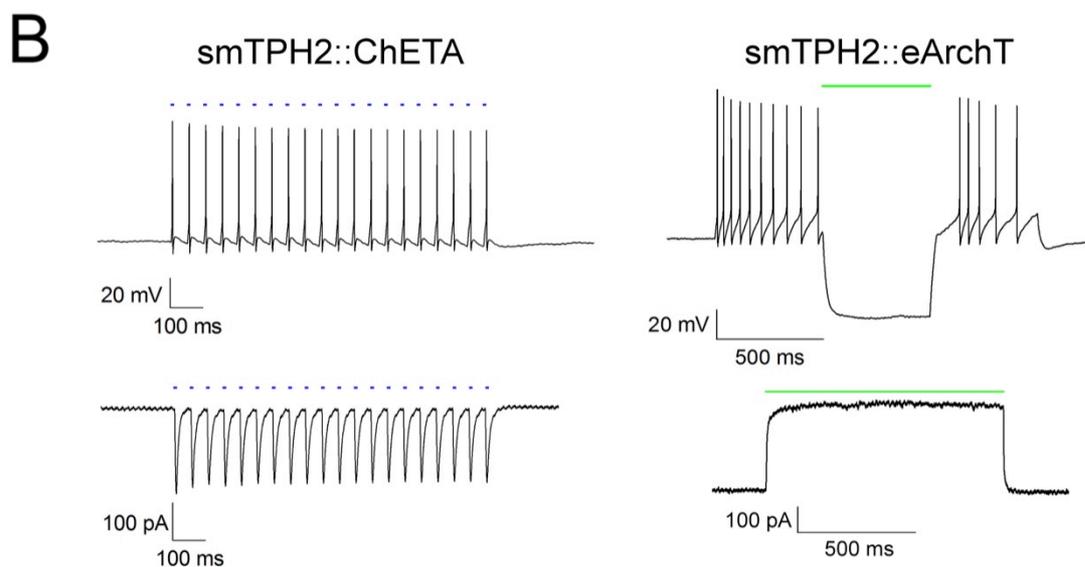


図 2-4 smTPH2 LVV により光遺伝学的ツールの 5-HT 神経特異的かつ機能的な発現が可能である

マウス DRN に smTPH2::Venus、smTPH2::ChETA または smTPH2::eArchT を投与した。

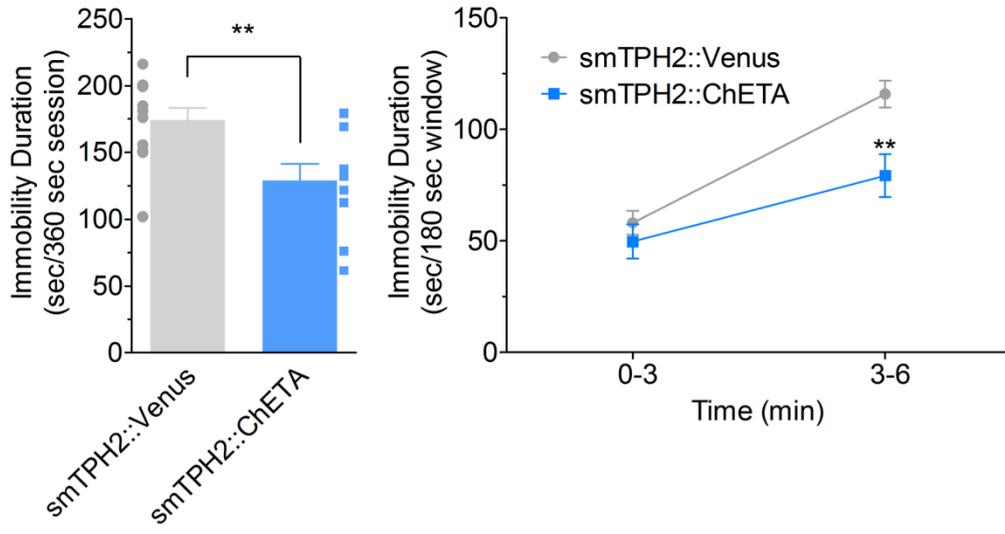
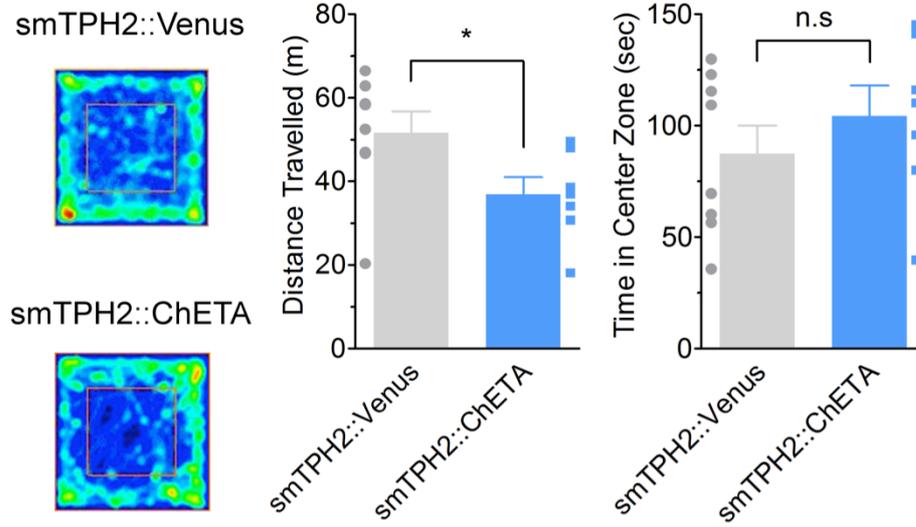
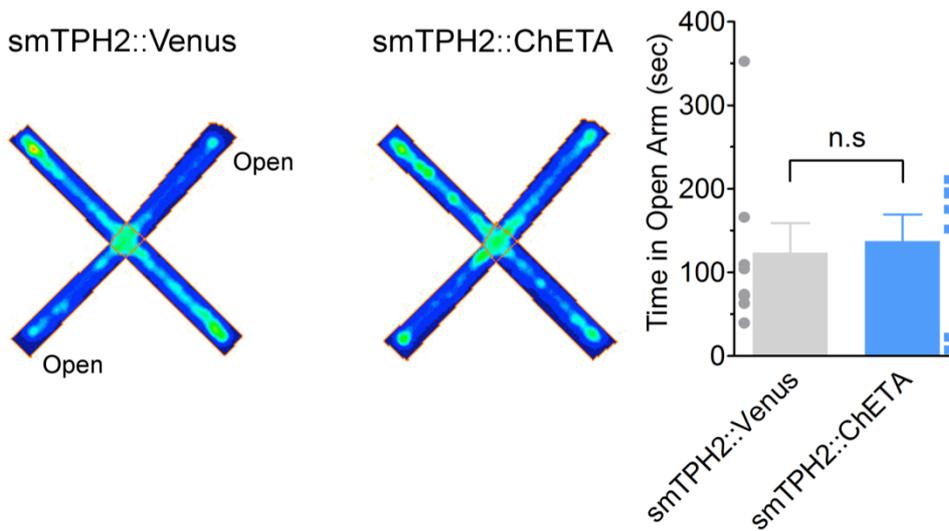
(A) 投与 1 週間後、DRN を含む冠状切片を抗 GFP および抗 TPH 抗体によって染色した。切片は共焦点顕微鏡にて撮影した。スケールバーは 20 μm (GFP、TPH、Merge) または 200 μm (Fluorescence) を示す。(B) LVV 投与 1 週間後、厚さ 200 μm の冠状切片を作製し、eYFP 陽性細胞でホールセルパッチクランプ記録を行った。青色光 (20 Hz、5 ms) または緑色光 (0.5 s) を測定中の細胞に照射した。電流固定法 (上) および電位固定法 (下) による記録の代表的なトレースを示した。

マウス DRN の 5-HT 神経特異的な活性化が情動行動に及ぼす影響

まず、マウス DRN の 5-HT 神経の活性化が抗うつ薬様効果に十分であるかどうかを評価するために、マウス DRN への smTPH2::ChETA 投与 1 週間後に、尾懸垂試験を行った (図 2-5A)。この試験は、動物の無動を無力感とみなして評価するものであり、抗うつ薬のスクリーニングとして一般的に用いられている。DRN への青色光照射下で、smTPH2::ChETA 投与マウスは、smTPH2::Venus 投与群と比較して、有意に無動時間が短縮した (図 2-5A)。次に、この無動時間の短縮が運動量の増加に起因する可能性を除外するために、オープンフィールド試験を行ったところ、smTPH2::ChETA 投与群は、青色光照射下で smTPH2::Venus 投与群と比較して、有意に運動量が減少していた (図 2-5B)。これらの結果は、DRN の 5-HT 神経特異的な活性化が、マウスにおいて抗うつ薬様作用を引き起こすことを示唆している。一方で、これまでに、5-HT が不安様行動の制御にも関与していることが示唆されているため (34, 40, 42)、不安様行動についても同様に検討を行った。しかし、smTPH2::ChETA あるいは smTPH2::Venus を投与したマウスにおいて、青色光照射下でオープンフィールドの中央部滞在時間に有意な差は見られなかった (図 2-5B)。また、高架式十字迷路試験において、smTPH2::ChETA 投与群のオープンアーム滞在時間は、smTPH2::Venus 投与群と同程度であった (図 2-5C)。これらの結果から、DRN の 5-HT 神経特異的な活性化は、ストレス対処行動を増加させるが、抗不安あるいは不安惹起作用の誘発には十分でないことが示唆される。

図 2-5 マウス DRN 5-HT 神経の特異的な活性化は抗うつ様作用を示す

(A) DRN への smTPH2::ChETA あるいは smTPH2::Venus の投与 1 週間後、DRN への青色光照射下で、6 分間の尾懸垂試験中における無動時間を測定した。青色光は、試験の 15 分前から試験の終了まで 20 Hz, 5 ms で照射した。6 分間 (左) または前半 3 分間および後半 3 分間 (右) における無動時間を表す。n = 12 (Venus), 10 (ChETA). **P < 0.01 vs. Venus, two-way ANOVA; Interaction, $F_{1,20} = 4.79$, $P = 0.041$, Time, $F_{1,20} = 45.98$, $P < 0.0001$, Opto, $F_{1,20} = 8.38$, $P = 0.009$; Bonferroni posttests; 0-3, $P > 0.05$, 3-6, $P < 0.01$. (B) DRN への smTPH2::ChETA あるいは smTPH2::Venus 投与 1 週間後に、オープンフィールド試験における総移動距離 (中央) および中心部滞在時間 (右) を測定した。青色光は、試験の 15 分前から試験の終了まで 20 Hz, 5 ms で照射した。n = 8 (Venus), 7 (ChETA). *P < 0.05 vs. Venus. n.s.: not significant. (C) オープンフィールド試験の 1 日後、DRN への青色光照射下における、高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在時間を測定した。青色光は、試験の 15 分前から試験終了まで 20 Hz, 5 ms で照射した。n = 8 (Venus), 7 (ChETA). n.s.: not significant.

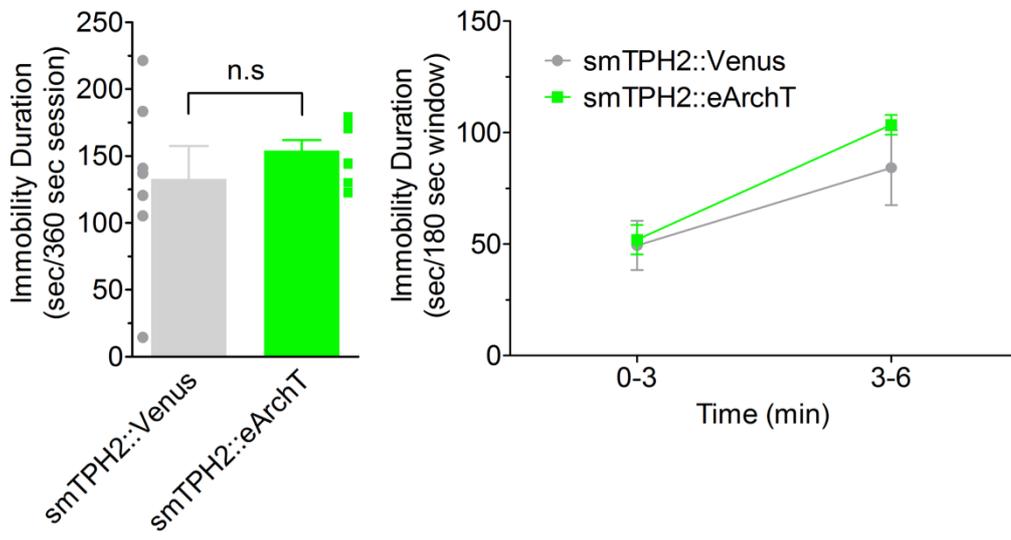
A**B****C**

マウス DRN の 5-HT 神経特異的な抑制が情動行動に及ぼす影響

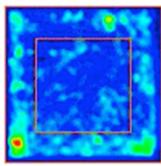
次に、smTPH2::eArchT を用いてマウス DRN の 5-HT 神経を特異的に抑制した際の情動行動への影響について検討した。尾懸垂試験において、smTPH2::eArchT 投与群および smTPH2::Venus 群の間で、緑色光照射下での無動時間に有意な差は見られなかった (図 2-6A)。この結果より、DRN の 5-HT 神経特異的な抑制が、うつ様行動を誘発するのに十分ではないことが示唆される。さらに、smTPH2::eArchT 投与群では、緑色光照射下でのオープンフィールド試験における運動量および中央部滞在時間は、smTPH2::Venus 群と同程度であった (図 2-6B)。さらに、高架式十字迷路試験では、smTPH2::eArchT 投与群および smTPH2::Venus 群において緑色光照射下でのオープンアーム滞在時間は同程度であった (図 2-6C)。以上の結果より、DRN の 5-HT 神経特異的な抑制は、運動量および不安様行動に影響を及ぼすのに十分ではないことが示唆される。

図 2-6 マウス DRN 5-HT 神経の特異的な抑制は情動行動に影響を与えない

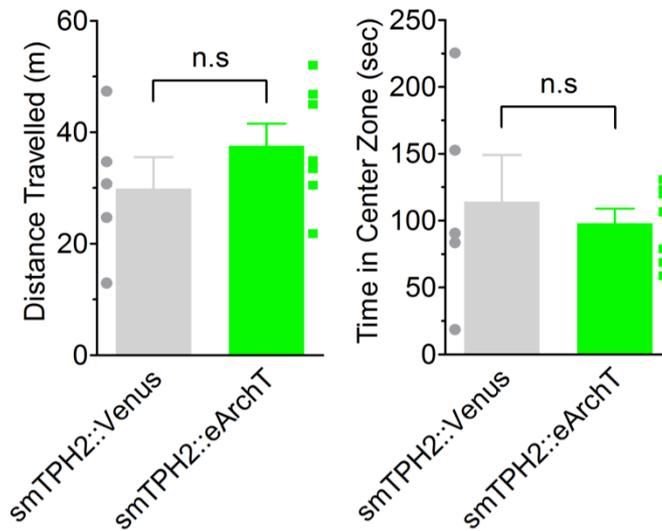
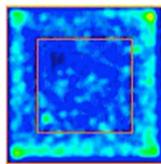
(A) DRN への smTPH2::eArchT あるいは smTPH2::Venus 投与 1 週間後、DRN への緑色光照射下で、尾懸垂試験における無動時間を測定した。緑色光は試験中、持続的に照射した。6 分間 (左) または前半 3 分間および後半 3 分間 (右) における無動時間を表す。n = 7 (Venus), 9 (eArchT). n.s.: not significant. (B) DRN への smTPH2::eArchT あるいは smTPH2::Venus 投与 1 週間後に、DRN への緑色光照射下で、オープンフィールド試験における総移動距離 (中央) および中心部滞在時間 (右) を測定した。緑色光は試験中、持続的に照射した。n = 5 (Venus), 7 (eArchT). n.s.: not significant. (C) オープンフィールド試験の 1 日後、DRN への緑色光照射下における、高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在時間を測定した。緑色光は、試験中、持続的に照射した。n = 6 (Venus), 8 (eArchT). n.s.: not significant.

A**B**

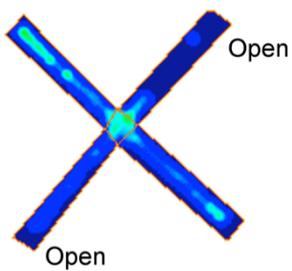
smTPH2::Venus



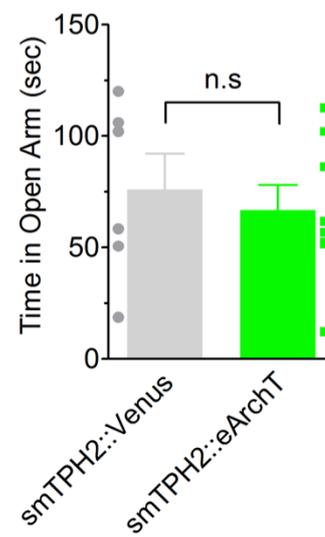
smTPH2::eArchT

**C**

smTPH2::Venus



smTPH2::eArchT

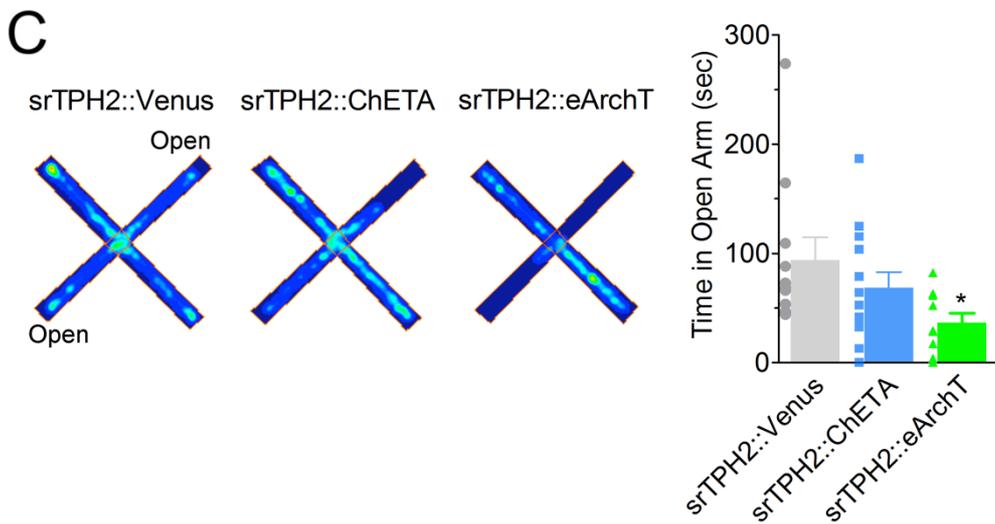
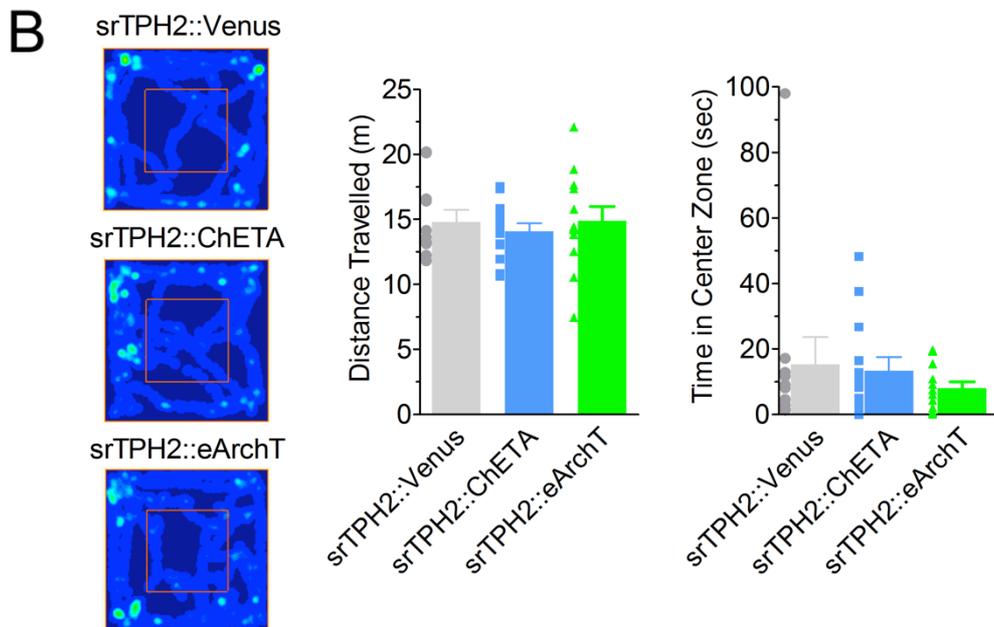
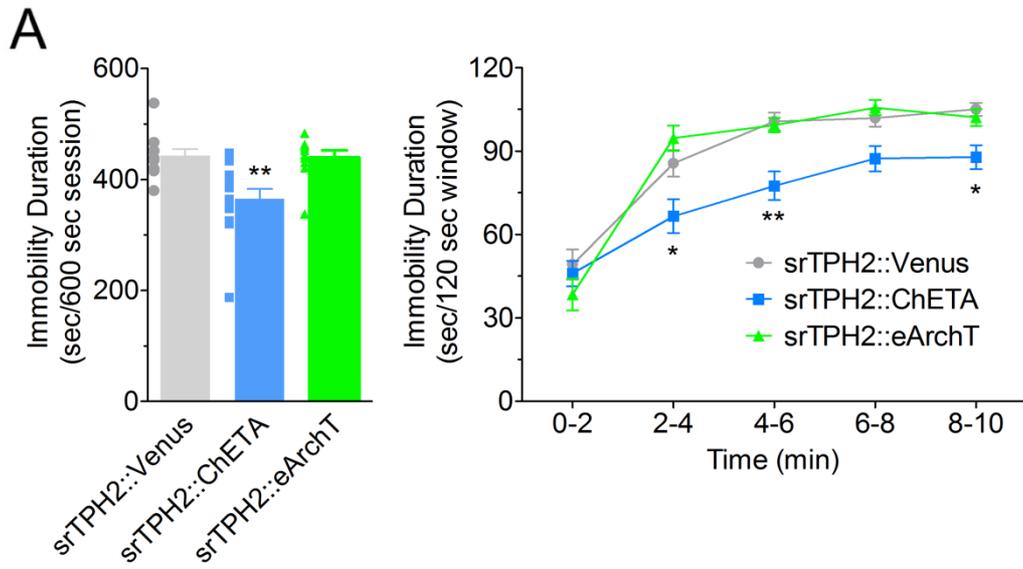


ラット DRN の 5-HT 神経特異的な興奮性制御が情動行動に及ぼす影響

マウスと同様に、ラットにおいても情動行動に対する DRN の 5-HT 神経特異的な興奮性制御の影響を検討するために、強制水泳試験、オープンフィールド試験および高架式十字迷路試験を行った (図 2-7A-C)。強制水泳試験において、srTPH2::ChETA 投与群では、srTPH2::Venus 投与群 (図 2-7A) と比較して無動時間が減少していたが、srTPH2::eArchT 投与群は srTPH2::Venus 投与群と同程度であった。また、オープンフィールド試験では、srTPH2::Venus、srTPH2::ChETA および srTPH2::eArchT 投与群の間で総移動距離に有意な差は見られなかった。これらの結果より、DRN の 5-HT 神経特異的な刺激がラットにおいて抗うつ様作用を引き起こすことが示唆される。さらに、srTPH2::Venus、srTPH2::ChETA あるいは srTPH2::eArchT 投与群でのオープンフィールド試験において、中央部滞在時間に有意な差はみられなかった (図 2-7B)。しかしながら、高架式十字迷路試験では、srTPH2::eArchT 投与群では、srTPH2::Venus 投与群と比較してオープンアーム滞在時間が有意に減少していた (図 2-7C)。一方、srTPH2::ChETA 投与群におけるオープンアーム滞在時間は、srTPH2::Venus 投与群と同程度であった (図 2-7C)。以上の結果より、DRN の 5-HT 神経特異的な抑制は、試験パラダイムに依存するものの、ラットにおいてのみ不安惹起作用を有することが示唆される。

図 2-7 ラット DRN 5-HT 神経の特異的な興奮性制御はうつ様行動および不安様行動に影響を与える

(A) ラット DRN への srTPH2::Venus、srTPH2::ChETA あるいは srTPH2::eArchT の投与 1 週間後、DRN への光照射下で、オープンフィールド試験および高架式十字迷路試験、強制水泳試験を行った。試験全体 (左) および、試験中の 2 分毎 (右) における無動時間を表す。n = 11 (Venus), 13 (ChETA), 10 (eArchT). *P < 0.05, **P < 0.01 vs. Venus. two-way ANOVA; Interaction, $F_{8, 124} = 3.70$, $P = 0.0007$, Time, $F_{4, 124} = 112.50$, $P < 0.0001$, Opto, $F_{2, 124} = 8.96$, $P = 0.0009$; Bonferroni posttests; Venus vs. ChETA 0-2, $P > 0.05$, 2-4, $P < 0.05$, 4-6, $P < 0.01$, 6-8, $P > 0.05$, 8-10, $P < 0.05$. (B) ラット DRN への srTPH2::Venus、srTPH2::ChETA あるいは srTPH2::eArchT 投与 1 週間後、DRN への光照射下でオープンフィールド試験における総移動距離 (中央) および中央部滞在時間 (右) を測定した。n = 11 (Venus), 13 (ChETA), 12 (eArchT). (C) オープンフィールド試験の 1 日後、DRN への光照射下で、高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在時間を測定した。n = 11 (Venus), 13 (ChETA), 11 (eArchT). *P < 0.05 vs. Venus.



考察

本研究では、ラットおよびマウスの 5-HT 神経特異的かつ強力な外来遺伝子導入が可能となる新規 LVV を開発した。さらに、この LVV を利用することで、マウスおよびラットにおいて 5-HT 神経特異的な光遺伝学的操作が可能であることが示唆された。これまで、光遺伝学的技術を用いた 5-HT 神経機能の解明には、遺伝子改変マウスがよく利用されているが (38-42)、ラットにおいて 5-HT 神経特異的な光遺伝学的操作が情動行動へ及ぼす影響を調べたのは本研究が初めてである。また、本研究におけるマウスおよびラット TPH2 プロモーターの効力の差を考慮すると、今回用いたげっ歯類の配列について非ヒト霊長類におけるオルソログを用いることで、よりヒトへの外挿性が高く、げっ歯類よりはるかに複雑な行動試験が可能とされるものの、遺伝子改変が困難である非ヒト霊長類における 5-HT 神経特異的な制御を行うために有用であると期待される (53)。

本研究では、これらの LVV を用いて、DRN の 5-HT 神経特異的な刺激が、マウスおよびラットにおいて抗うつ薬様作用を引き起こすのに十分であることを示した。これまでの薬理学的手法や神経核破壊、神経核の電気刺激を用いた実験から、5-HT 神経がうつ様行動および不安様行動に重要な役割を果たすことが報告されており (54-59)、抗うつ作用の発現に関しては、これらの報告に一致するものであった。今回用いた尾懸垂試験は、抗うつ薬の評価にしばしば用いられるものであるが (60)、抗うつ薬の急性投与は非ストレス負荷マウスの無動時間すなわちうつ様行動を低下させる一方で、実際のうつ病患者への薬物治療としては、数週間にわたる抗うつ薬の慢性投与が必要であり、作用発現における時間的な乖離が問題となっている。したがって、うつ病の病態時における抗うつ薬様作用発現に対する 5-HT 神経活性化の重要性を検討するためには、社会的敗北ストレスや慢性拘束ストレスなどのうつ病モデル動物を用いたさらなる行動学的解析が必要である。

抗うつ薬様作用に加えて、ラット DRN の 5-HT 神経特異的な光遺伝学的抑制は、オープンフィールド試験においては不安関連行動に影響を与えなかったが、高架式十字迷路試験において不安関連行動を増加させた。高架式十字迷路試験は、高さおよび開放空間に対する無条件恐怖を利用するが、オープンフィールド試験は開放空間への恐怖を利用している (61)。したがって、上記 2 試験間における 5-HT 神経活動パターンは異なる可能性があり、それにより、この矛盾は部分的に説明できるかもしれないが、そのためには、これら試験中における 5-HT 神経活動を記録することにより、神経活動パターンを解析することが必要である。一方で、マウスにおいて、DRN の 5-HT 神経特異的な光遺伝学的抑制は不安関連行動に影響を与えなかった。この理由として、マウスにおいて、光照射による神経活動抑制が不十分であったことが考えられる。しかしながら、*ex vivo* では緑色光照射によって十分な神経活動の抑制が可能であること

が電気生理学的に確認されている。さらに、免疫組織化学によって定量した結果から、DRN の 5-HT 神経における LVV の感染率は、不安関連行動に影響が見られたラットと比較して、マウスにおいて高かったことから、*in vivo* におけるさらなる電気生理学的解析が必要であるものの、光照射による神経活動抑制が不十分であることに起因する可能性は低い。もう一つの理由として考えられるのは、5-HT 神経の抑制による作用が動物種間で異なるという可能性である。実際に、5-HT 神経の発火率を低下させる 5-HT_{1A} 受容体刺激薬である 8-OH-DPAT の急性投与は、ラットにおいては抗不安作用を引き起こすものの、マウスにおいてその作用が見られないという報告は、この可能性を支持するものである (62, 63)。

これまでの研究から、5-HT は不安行動の制御に重要な役割を果たすと考えられてきている (64-66)。しかし、SSRI の長期治療がヒトの不安を改善する一方で (67)、SSRI 治療初期に不安が増加するという矛盾する報告が存在する (57, 69)。特に、DRN ではなく正中縫線核 (MRN) の電気刺激あるいは神経毒による破壊が不安様行動を減少させるという以前の報告 (54, 56) と一致して、MRN の 5-HT 神経特異的な刺激が不安を惹起するということが明らかにされていることから (42)、DRN に比較して MRN がより不安制御に寄与していると考えられる。一方で、DRN の薬理的な神経活動抑制が学習性恐怖応答を消去することや、DRN の GABA 作動性神経の光遺伝学的抑制が社会的敗北ストレスによって誘発される社会的回避行動を改善することから (30)、DRN の 5-HT 神経が不安制御に一部関与することも考えられる。最近、Marcinkiewicz らにより、マウスにおいて DRN から分界条床核 (BNST) へ投射する 5-HT 神経の特異的な刺激が不安を惹起することが示された (40) が、本研究および Ohmura らによる報告では、マウス DRN の 5-HT 神経の刺激は不安関連行動に影響を与えないことを示している (42)。本研究では、DRN の 5-HT 神経全体を刺激して実験を行ったが、DRN の 5-HT 神経は広汎な脳領域との間で神経回路を形成しているため (71-76)、その一部の神経回路が抗不安作用をコードし、BNST へ投射する 5-HT 神経を含む別の神経回路が不安惹起作用をコードしている可能性も考えられる。上記に述べたような複雑な 5-HT 神経回路の中で、どの神経回路がうつや不安の制御に関与するのかは未だ不明である。精神疾患病態の根底にある神経回路学的メカニズムを解明するために、単一の 5-HT 神経回路が情動制御に果たす役割を解明することが、今後の重要な課題であると考えられる。

本研究は、マウスおよびラットにおいて、5-HT 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 の 5-HT 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を明らかにした。また、DRN の 5-HT 神経特異的な抑制は、種差があるものの、ラットでは不安を増強することを明らかにした。

総括および結論

本研究において著者は、ケタミンの 5-HT 遊離作用における神経回路学的メカニズムおよび情動行動における 5-HT 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。

1. *In vivo* マイクロダイアリシス法を用いた検討により、新規抗うつ薬候補であるケタミンが、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 $\alpha 4 \beta 2$ nAChR 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増加させることを明らかとした。
2. マウスおよびラットにおいて、5-HT 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、本ウイルスベクターを用いた光遺伝学的手法の導入により、局所レーザー光照射による DRN の 5-HT 神経特異的な活性化が抗うつ薬様作用発現に十分であることを明らかにした。また、DRN の 5-HT 神経特異的な抑制は、種差があるものの、ラットでは不安を増強することを明らかにした

以上、著者は、うつ病の病態生理において重要な役割を果たすと考えられている mPFC での、新規抗うつ薬候補ケタミンによる 5-HT 遊離作用において、DRN における AMPA 受容体および $\alpha 4 \beta 2$ nAChR の刺激が重要であることを示し、さらに、これら受容体の活性化には、ケタミンによる PPTg のコリン作動性神経活性化が必要であることを明らかにした。また、5-HT 神経特異的かつ強力な遺伝子発現を可能とする LVV を新規に作製し、光遺伝学的ツールをマウスおよびラットに導入することで、人為的に DRN の 5-HT 神経興奮性制御を行い、5-HT 神経がうつや不安などの情動行動に対して果たす役割を明らかにした。本研究成果は、PPTg のコリン作動性神経など DRN の上流に存在する神経系による 5-HT 神経興奮性の制御を標的とした新規抗うつ薬の創製に結びつく基礎的知見を提供するものである。

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えて頂き、終始懇切な御指導と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、終始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、京都大学大学院薬学研究科助教 永安一樹 先生、並びに終始多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 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京都大学名誉教授 赤池昭紀 先生、京都大学大学院薬学研究科准教授 久米利明 先生、神戸薬科大学薬学部講師 泉安彦 先生（元京都大学大学院薬学研究科助教）に深く感謝いたします。また、ウイルスベクターの作製に当たり多大なる御指導と御助言を頂きました University of Bristol, Department of Physiology and Pharmacology Professor Sergey Kasparov、Dr. Liu Beihui、Dr. James Hewinson に深く感謝いたします。研究生活を始めるに当たり、多大なる御指導と御助言を頂きました、金野真和 博士、崎元-趙萌 博士、崎元伸哉 博士、勇昂一 博士、土岸広治 博士、宗可奈子 博士をはじめ、諸先輩方に心から感謝致します。共同研究者として本研究にご協力いただきました京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野 浅岡希美 学士、山城茉弓 学士、永井佑茉 学士、木ノ下晴子 さん、河合洋幸 君、澁井紀宏 君、安藤千紘 さんに心から感謝いたします。そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院生体機能解析学分野 三宅崇仁 博士、宮之原遵 修士、朝倉佳代子 さん、景山慶子 さん、ならびに、互いに切磋琢磨し合えた京都大学大学院生体機能解析学分野、薬品作用解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう支えて下さった母 紀美子、弟 信吾、妹 美佐子、祖父 宮内英幸、祖母 宮内敬子、妻 美里、息子 直暁に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究は以下の論文にて公表済みおよび公表予定である。

- 1) Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex.
(縫線核 AMPA 受容体およびニコチン性アセチルコリン受容体はケタミンによる前頭前野 5-HT 遊離を調節する)
(Naoya Nishitani, Kazuki Nagayasu, Nozomi Asaoka, Mayumi Yamashiro, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa and Shuji Kaneko)
平成 26 年 8 月発行 The international journal of neuropsychopharmacology 第 17 巻第 8 号 1321 頁～1326 頁に掲載

- 2) Ketamine-induced prefrontal serotonin release is mediated by cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus
(ケタミンによる前頭前野セロトニン遊離は脚橋被蓋核のコリン作動性神経により調節される)
(Haruko Kinoshita, Naoya Nishitani, Yuma Nagai, Chihiro Andoh, Nozomi Asaoka, Hiroyuki Kawai, Norihiro Shibui, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa and Shuji Kaneko)
The international journal of neuropsychopharmacology に掲載決定

- 3) Optogenetic manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors
(背側縫線核セロトニン神経の光遺伝学的操作は逃避不能ストレスへの能動的対処および不安関連行動を制御する)
(Naoya Nishitani, Kazuki Nagayasu, Nozomi Asaoka, Mayumi Yamashiro, Haruko Kinoshita, Hiroyuki Kawai, Norihiro Shibui, Beihui Liu, James Hewinson, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Hitoshi Hashimoto, Sergey Kasparov, Shuji Kaneko)
英文雑誌に投稿中

参考文献

- 1 Belmaker, R.H. & Agam, G. Major depressive disorder. *N. Engl. J. Med.* 358, 55–68 (2008).
- 2 Trivedi, M.H. et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am. J. Psychiatry* 163, 28–40 (2006).
- 3 Berman, R.M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry* 47, 351–4 (2000).
- 4 Zarate, C.A, Singh, J. & Manji, H.K. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* 59, 1006–20 (2006).
- 5 Maeng, S. et al. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol. Psychiatry* 63, 349–52 (2008).
- 6 Autry, A.E. et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475, 91–5 (2011).
- 7 Duman, R.S. & Voleti, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.* 35, 47–56 (2012).
- 8 Fukumoto, K., Iijima, M. & Chaki, S. Serotonin-1A receptor stimulation mediates effects of a metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonist, 2S-2-amino-2-(1S,2S-2-carboxycycloprop-1-yl)-3-(xanth-9-yl)propanoic acid (LY341495), and an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine, in the. *Psychopharmacology (Berl)*. 231, 2291–98 (2014).
- 9 Gigliucci, V. et al. Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism. *Psychopharmacology (Berl)*. 228, 157–166 (2013).
- 10 Amargós-Bosch, M., López-Gil, X., Artigas, F. & Adell, A. Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9, 565–73 (2006).
- 11 Gartside, S.E., Cole, a J., Williams, a P., McQuade, R. & Judge, S.J. AMPA and NMDA receptor regulation of firing activity in 5-HT neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3001–8 (2007).
- 12 Nagayasu, K., Kitaichi, M., Shirakawa, H., Nakagawa, T. & Kaneko, S. Sustained Exposure to 3,4-Methylenedioxymethamphetamine Induces the Augmentation of

- Exocytotic Serotonin Release in Rat Organotypic Raphe Slice Cultures. *J. Pharmacol. Sci.* 113, 197–201 (2010).
- 13 Garduño, J. et al. Presynaptic $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Increase Glutamate Release and Serotonin Neuron Excitability in the Dorsal Raphe Nucleus. *J. Neurosci.* 32, 15148–57 (2012).
- 14 Woolf, N.J. & Butcher, L.L. Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res. Bull.* 23, 519–40 (1989).
- 15 Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press, 2006).
- 16 López-Gil, X. et al. Importance of inter-hemispheric prefrontal connection in the effects of non-competitive NMDA receptor antagonists. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 945–56 (2012).
- 17 Galindo-Charles, L. et al. Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62, 601–15 (2008).
- 18 Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A. & Daly, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 17, 2921–7 (1997).
- 19 Homayoun, H. & Moghaddam, B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 27, 11496–500 (2007).
- 20 Amargós-Bosch, M., Adell, A. & Artigas, F. Antipsychotic drugs reverse the AMPA receptor-stimulated release of 5-HT in the medial prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 102i, 550–61 (2007).
- 21 Boothman, L., Raley, J., Denk, F., Hirani, E. & Sharp, T. In vivo evidence that 5-HT(2C) receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 149, 861–9 (2006).
- 22 McGehee, D.S., Heath, M.J., Gelber, S., Devay, P. & Role, L.W.L. Nicotine Enhancement of Fast Excitatory Synaptic Transmission in CNS by Presynaptic Receptors. *Science.* 269, 1692–6 (1995).
- 23 Kim, S., Price, M., Olney, J. & Farber, N. Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by GABAergic and $\alpha 2$ -adrenergic agonists. *Mol. Psychiatry* 344–52 (1999).
- 24 Nelson, C.L., Burk, J.A., Bruno, J.P. & Sarter, M. Effects of acute and repeated systemic administration of ketamine on prefrontal acetylcholine release and sustained

- attention performance in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 161, 168–79 (2002).
- 25 Wang, H.L. & Morales, M. Pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci*. 29:340–58 (2009).
- 26 Mena-Segovia, J. & Bolam, J.P. Rethinking the Pedunculo-pontine Nucleus: From Cellular Organization to Function. *Neuron* 94, 7–18 (2017).
- 27 O'Hearn, E. & Molliver, M.E. Organization of raphe-cortical projections in rat: a quantitative retrograde study. *Brain Res Bull*. 13(6):709-726 (1984).
- 28 Ford, B., Holmes, C.J., Mainville, L. & Jones, B.E. GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J Comp Neurol*. 363(2):177-96 (1995).
- 29 Gardier, A.M., Malagié, I., Trillat, A.C., Jacquot, C. & Artigas, F. Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol* 10:16–27. (1996).
- 30 Challis, C. et al. Raphe GABAergic Neurons Mediate the Acquisition of Avoidance after Social Defeat. *J. Neurosci*. 33, 13978–88 (2013).
- 31 Fukumoto, K., Iijima, M., & Chaki, S. The antidepressant effects of an mGlu2/3 receptor antagonist and ketamine require AMPA receptor stimulation in the mPFC and subsequent activation of the 5-HT Neurons in the DRN. *Neuropsychopharmacol*. 41, 1046-1056 (2016).
- 32 Mosienko, V. et al. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl. Psychiatry* 2, e122 (2012).
- 33 O'Leary, O.F., Bechtholt, A.J., Crowley, J.J., Hill, T.E., Page, M.E., & Lucki, I. Different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 192, 357-71. (2007).
- 34 Ressler, K.J., and Nemeroff, C.B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress. Anxiety*. 12, 2-19. (2000).
- 35 Sachs, B.D., Ni, J.R., & Caron, M.G. Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112, 2557-62 (2015).
- 36 Teissier, A. et al. Activity of Raphe Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Rep*. 13, 1965–76 (2015).
- 37 Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K.

- Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–8 (2005).
- 38 Fonseca, M.S., Murakami, M. & Mainen, Z.F. Activation of dorsal raphe serotonergic neurons promotes waiting but is not reinforcing. *Curr. Biol.* 25, 306–15 (2015).
- 39 Liu, Z., Zhou, J., Li, Y., Hu, F., Lu, Y., Ma, M., Feng, Q., Zhang, J.E., Wang, D. & Zeng, J. et al. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron* 81, 1360–74 (2014).
- 40 Marcinkiewicz, C.A. et al. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature* 537, 97–101 (2016).
- 41 Miyazaki, K. W. et al. Optogenetic Activation of Dorsal Raphe Serotonin Neurons Enhances Patience for Future Rewards. *Curr. Biol.* 24, 2033–40 (2014).
- 42 Ohmura, Y., Tanaka, K. F., Tsunematsu, T., Yamanaka, A. & Yoshioka, M. Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2, 1–7 (2014).
- 43 Crabbe, J.C., Wahlsten, D., & Dudek, B.C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284, 1670–72 (1999).
- 44 D’Hooge, R., & De Deyn, P.P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36, 60–90. (2001).
- 45 Weber, T., Schönig, K., Tews, B., & Bartsch, D. Inducible gene manipulations in brain serotonergic neurons of transgenic rats. *PLoS One* 6, e28283 (2011).
- 46 Benzekhroufa, K., Liu, B.H., Teschemacher, A.G. & Kasparov, S. Targeting central serotonergic neurons with lentiviral vectors based on a transcriptional amplification strategy. *Gene Ther.* 16, 681–8 (2009).
- 47 Gourine, A.V. et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571–5 (2010).
- 48 Mattis, J. et al. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat. Methods* 9, 159–72 (2011).
- 49 Takahashi, A., Nagayasu, K., Nishitani, N., Kaneko, S. & Koide, T. Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. *PLoS One* 9, e94657 (2014).
- 50 Asaoka, N. et al. Olanzapine augments the effect of selective serotonin reuptake inhibitors by suppressing GABAergic inhibition via antagonism of 5-HT₆ receptors in the dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology.* 95, 261–68 (2015).
- 51 Davies, M.V., & Kaufman, R.J. The sequence context of the initiation codon in the encephalomyocarditis virus leader modulates efficiency of internal translation

- initiation. *J. Virol.* 66, 1924-32 (1992).
- 52 Gunaydin, L.A. et al. Ultrafast optogenetic control. *Nat. Neurosci.* 13, 387–92 (2010).
- 53 Hayashi, K., Nakao, K., & Nakamura, K. Appetitive and aversive information coding in the primate dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* 35, 6195-6208 (2015).
- 54 Andrade, T.G.C.S. & Graeff, F.G. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 70, 1–14 (2001).
- 55 Lieben, C.K.J., Steinbusch, H.W.M. & Blokland, A. 5,7-DHT lesion of the dorsal raphe nuclei impairs object recognition but not affective behavior and corticosterone response to stressor in the rat. *Behav. Brain Res.* 168, 197–207 (2006).
- 56 Konno, K. et al. Early postnatal stress affects the serotonergic function in the median raphe nuclei of adult rats. *Brain Res.* 1172, 60–6 (2007).
- 57 Harada, T., Sakamoto, K. & Ishigooka, J. Incidence and predictors of activation syndrome induced by antidepressants. *Depress. Anxiety* 25, 1014–9 (2008).
- 58 Yalcin, I., Coubard, S., Bodard, S., Chalon, S. & Belzung, C. Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 200, 497–507 (2008).
- 59 Lim, L.W. et al. Electrical stimulation alleviates depressive-like behaviors of rats: Investigation of brain targets and potential mechanisms. *Transl. Psychiatry* 5, e535-14 (2015).
- 60 Cryan, J.F., Mombereau, C. & Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 571–625 (2005).
- 61 Sudakov, S.K., Nazarova, G.A., Alekseeva, E.V., & Bashkatova, V.G. Estimation of the level of anxiety in rats: differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and Vogel's conflict test. *Bull Exp Biol Med.* 155, 295-7 (2013).
- 62 Collinson, N., & Dawson, G.R. On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT_{1A} partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635. *Psychopharmacology (Berl)* 132, 35-43 (1997).
- 63 Rodgers, R.J., Cole, J.C., Cobain, M.R., Daly, P., Doran, P.J., Eells, J.R., & Wallis, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav. Pharmacol.* 3, 621-34 (1992).

- 64 Lucki, I. Serotonin receptor specificity in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry*. 57:5-10.21 (1996).
- 65 Lucki, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry* 44, 151–62 (1998).
- 66 Sandford, J.J., Argyropoulos, S.V. & Nutt, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs - Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol. Ther.* 88, 197–212 (2000).
- 67 Zohar, J. & Westenberg, H.G. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. 403:39-49 (2000).
- 68 Silva, R.C.B. & Brandão, M.L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: An ethological analysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 209–16 (2000).
- 69 Birkett, M.A. et al. Acute anxiogenic-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors are attenuated by the benzodiazepine diazepam in BALB/c mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98, 544–51 (2011).
- 70 Weissbourd, B. et al. Presynaptic Partners of Dorsal Raphe Serotonergic and GABAergic Neurons. *Neuron* 83, 645–62 (2014).
- 71 Dorocic, I.P. et al. A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* 83, 663–78 (2014).
- 72 Ogawa, S.K., Cohen, J.Y., Hwang, D., Uchida, N. & Watabe-Uchida, M. Organization of Monosynaptic Inputs to the Serotonin and Dopamine Neuromodulatory Systems. *Cell Rep.* 8, 1105–18 (2014).
- 73 Moore, R.Y., Halaris, A.E. & Jones, B.E. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J. Comp. Neurol.* 180, 417–38 (1978).
- 74 Der-Avakian, A. & Markou, A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci.* 35, 68–77 (2012).
- 75 McDevitt, R.A. et al. Serotonergic versus Nonserotonergic Dorsal Raphe Projection Neurons: Differential Participation in Reward Circuitry. *Cell Rep.* 8, 1857–69 (2014).