

情動行動を司る背側縫線核セロトニン神経の
役割に関する研究

2021

永井 佑菜

謹呈

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。
今後とも御指導、御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

令和4年3月23日

永井 佑茉

目次

緒言	1
第一章 サルゲノム中の神経細胞種特異的プロモーター配列の同定	3
実験方法	4
実験結果	7
考察	20
第二章 嗜好/嫌悪の調整における背側縫線核セロトニン神経の役割の解明	22
実験方法	23
実験結果	28
考察	36
第三章 抗うつ作用を司る背側縫線核セロトニン神経回路の解明	39
実験方法	41
実験結果	47
考察	64
総括および結論	67
謝辞	68
発表論文目録	69
参考文献	70

緒言

不安や喜びといった情動の制御は個体の生存に必須であり、情動制御機構の破綻はうつ病をはじめとする精神疾患の発症要因となることが知られている。精神疾患の発症メカニズムを含む様々な脳神経回路の機能を神経回路レベルで明らかにするには、その特定の神経回路の活性のみを亢進あるいは減弱させた際に、いかなる行動の変化が生じるかを個々に明らかにすることが重要である。近年、微生物由来の光感受性タンパク質であるチャネルロドプシン 2 (ChR2) 等を特定の神経に発現させ、光により神経活動を亢進/抑制する技術が神経科学の分野において近年急速に普及している(光遺伝学)。しかし、特定の神経細胞に ChR2 を発現させるツールは齧歯類では広く使用されているものの、非ヒト霊長類ではほとんど開発されていない。そこで第一章では非ヒト霊長類のゲノム配列を使用し、特定の神経細胞に外来遺伝子の発現を可能にするツールの開発を行った。第二章以降では数ある脳内の神経細胞の中で背側縫線核を起始核としたセロトニン (5-HT) 神経回路の活動変化と情動機能の制御に着目し検討を行った。背側縫線核を起始核とした 5-HT 神経回路は気分調整や意思決定などの高次機能に至るまで、様々な情動機能を制御している。特にうつ病の治療では、細胞外の 5-HT 濃度を上昇させる選択的 5-HT 再取り込み阻害薬が広く使用されているものの、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や薬効発揮までに長期間の連続投与が必要なこと、さらには吐き気や不安作用などの副作用が問題となっている。そのため、副作用が少ない画期的な新規抗うつ薬の開発は急務である。しかし様々な脳領域間で多様な神経接続を形成している 5-HT 神経回路の中で、どの亜集団がいかなる情動の制御に関与しているのかといった詳細な神経メカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では第二章においては嗜好と嫌悪の調整、第三章においては抗うつ作用をそれぞれ司る 5-HT 神経回路の同定とそのメカニズムの解明を目指して検討を行った。結果、新規知見を得たので、報告する。

第一章においては、複数の神経細胞種に対して特異性と発現量を決定しているプロモーター領域の単離をマカクサルスの遺伝子配列を使用して行い、結果 7 種類の神経細胞種に対して 80%以上という高い特異性を有するプロモーター配列の単離に成功した。

第二章においては、セロトニン神経特異的な神経活動を制御することを可能としたアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を新たに開発し、背側縫線核の 5-HT 神経回路の活動変化が報酬処理に与える影響について検討した。その結果、腹側被蓋野に投射する背側縫線核セロトニン神経活動が嗜好/嫌悪のバランスを決定していることが明らかとなった。

第三章においては、抗うつ作用を司る背側縫線核セロトニン神経回路の同定とその

神経メカニズムについて検討を行った。その結果、背側縫線核の 5-HT 神経および腹側被蓋野に投射する背側縫線核 5-HT 神経回路の活性化を行うことで、ストレス誘発のうつ様症状が改善することが明らかとなった。さらに、上記の神経細胞あるいは神経回路の活性化により背側海馬歯状回に存在する過去の快感経験時に活性化した神経細胞集団が優先的に再活性化され、これらの効果はドパミン神経伝達を遮断することで減弱することが明らかとなった。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

SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor

SERT: serotonin transporter

LVV: lentiviral vector

AVV: adeno associated viral vector

PBS: phosphate buffered saline

VGLUT3: vesicular glutamate transporter 3

TetO: tTA-dependent enhancer

tTA: tetracycline-controlled transcriptional activator

CSDS: chronic social defeat stress

DRN: dorsal raphe nucleus

VTA: ventral tegmental area

LH: lateral hypothalamus

CeA: central amygdala

NAc: nucleus accumbens

VP: ventral pallidum

mPFC: medial prefrontal cortex

第一章

サルゲノム中の神経細胞種特異的なプロモーター配列の同定

統合失調症や大うつ病性障害など多くの精神疾患の発症の背景には、様々な脳内の神経細胞の機能異常が関与している^{1,2}。これらの疾患の詳細なメカニズムを解明するために、光遺伝学的技術あるいは人工受容体などの遺伝学的ツールが広く使用されている^{3,4}。実際これらの手法を齧歯類に使用することで、上記の疾患の根底にある神経メカニズムが徐々に明らかとなってきた⁵。一方、ヒトとサルの脳では記憶あるいは学習などの高次機能に関して重要な役割を果たす大脳皮質などの構造が類似していることが報告されている。また視床枕核など霊長類にのみ存在し齧歯類には存在しない脳領域も存在しており、ヒトと同様に磁気共鳴画像などの画像診断もサルを用いた研究では可能である。さらにサルの遺伝情報はヒトと相同性が非常に高く、サルは高い知能を有していることから齧歯類では困難な複雑な作業を行うことも可能である^{6,7}。以上から、サルの脳内の神経細胞に遺伝学的ツールを導入することは齧歯類で得られた知見を応用するのに役立つだけでなく、精神疾患の根底にあるメカニズムを解明する上で非常に有用である。

標的とする神経細胞の活動介入あるいは観察を行うためには、特定の神経細胞集団に十分量の外的遺伝子を発現させる必要がある^{8,9}。マウスでは、Cre 依存性マウスあるいはCre 依存性アデノ随伴ウイルスベクターを利用することでこれを実現してきた^{10,11}。一方、サルのように Cre 系統が入手しにくい哺乳類において細胞種特異的な遺伝子の導入を実現させるためには、神経細胞種に対する特異性と発現量を決定している配列であるプロモーター配列の同定が重要な鍵となる。これまでの研究から human synapsin (hSyn) あるいは calmodulin kinase II α (CaMKII α) プロモーター配列を使用することで、それぞれ不特定の神経細胞および興奮性神経細胞を標的とした遺伝子導入が行われている^{12,13}。最近では Stauffer らによりドパミン神経細胞に対し高い特異性と発現量を有する tyrosine hydroxylase (TH) のプロモーター配列が単離され、サルの脳内でドパミン神経の活動を光遺伝学的に制御することが可能となった¹⁴。さらに El-Shamayleh らにより、L7 プロモーター配列を使用することでサルの小脳に存在するプルキンエ細胞の光遺伝学的制御が可能であることが明らかとなった¹⁵。興味深いことに、これらの報告ではマカクサルのゲノム配列から単離したプロモーター配列が齧歯類でも有効であることが確認されている。さらに哺乳類の遺伝子配列を系統的に比較すると、プロモーター領域はイントロン領域やゲノム全体に比べて高度に保存されていることが知られている¹⁶。これらの報告と一致するように、5-HT 合成の律速酵素である tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) のプロモーター領域がマウスとラット間で

保存されており、TPH2 プロモーターを持つレンチウイルスベクター (LVV) を使用することで *in vivo* でセロトニン神経細胞の操作が可能であることが西谷らにより報告された⁹。

そこで本章では、マウスとサルゲノム配列における各遺伝子座の上流領域を比較解析することにより、カニクイザルの somatostatin (SST)、cholecystokinin (CCK)、parvalbumin (PV)、serotonin transporter (SERT)、choline acetyltransferase (ChAT)、substance P (SP)、enkephalin (PENK) のプロモーター候補配列を単離した。レンチウイルスベクター¹⁷を用いて単離したカニクイザルゲノム配列のプロモーター活性をマウスで調べたところ、これらのプロモーター候補配列は神経細胞種ごとに高い特異性を有することが明らかとなった。

実験方法

1) 実験動物

実験には C57BL/6J 系マウス (6-9 週齢: Japan SLC, Shizuoka, Japan) 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」を遵守して行われた。

2) 各神経細胞種の上流配列の単離とウイルスベクターの構築

somatostatin (SST)、cholecystokinin (CCK)、parvalbumin (PV)、serotonin transporter (SERT)、choline acetyltransferase (ChAT)、substance P (SP)、enkephalin (PENK) の各上流配列をカニクイザル (*Macaca fascicularis*) のゲノムDNAからPCR法で単離した。PCRは、KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) またはQ5 DNAポリメラーゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用いて行った。プライマーの塩基配列を表1に示した。PCRで増幅した上流配列をMluI/NotIで処理し、MluI/NotIで処理した pTYF-super-mcTPH2-4.0-Venus-WPREにライゲーションした。ライゲーション反応はすべてDNA Ligation Kit Mighty Mix (Takara bio, Otsu, Japan) を用いて実施した。

表1

Primer name	Sequence (5' to 3')
M-SST-0.3 k-Venus Fw	TTACGCGTgcatgtgtgggagtgaattatgg

M-SST-0.3 k-Venus Rv	TTGCGGCCGCcaaactctaggcgcggatcag
M-CCK-0.5 k-Venus Fw	TTACGCGTtgccatttcccacctacactttg
M-CCK-3.9 k-Venus Fw	AAACGCGTtctaccttgattgctcctgc
M-CCK-0.5, 3.9 k-Venus Rv	AAGCGGCCGCcaccagaaaccggcttag
M-PV-0.7 k-Venus Fw	TTACGCGTgagaccaggaagcaagtagttag
M-PV-1.8 k-Venus Fw	TTACGCGTctgagctgagatgtatggcac
M-PV-0.7,1.8 k-Venus Rv	TTGCGGCCGCgcaactgtttgagcggg
M-SERT-0.5 k-Venus Fw	TTACGCGTgggacagagaggaattagacaagg
M-SERT-1.9 k-Venus Fw	TTACGCGTctctgaatgccagcacctaacc
M-SERT-0.5,1.9 k-Venus Fw	TTACCGGTcctcacatggtctgatctctag
M-vAChT-1.1 k-Venus Fw	TTACGCGTgggggcgaggcaacttctg
M-vAChT-1.9 k-Venus Fw	TTGGCGCGCctgcgtctaagtctgtttgctt
M-vAChT-1.1,1.9 k-Venus Rv	TTGCGGCCgccccacccgatgctcttc
M-SP-0.8 k-Venus Fw	TTACGCGTcagcaagaaagttaggagagaagc
M-SP-1.7 k-Venus Fw	TTACGCGTtttacgtcaccagaccatg
M-SP-0.8,1.7 k-Venus Rv	TTGCGGCCGCgctctttgcctgctgagtg
M-PENK-0.9 k-Venus Fw	TTGGCGCGCtttgtcacctggccgtgtc
M-PENK-2.2 k-Venus Fw	TTACGCGTtcccgaccttgctactgtgatg
M-PENK-0.9,2.2 k-Venus Rv	TTGCGGCCGCgtgcttcgagcctgtct

3) LVVの作製

LVVの作製および精製は既報に従って行った^{9,18}。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ヤ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 μm孔径のPVDF膜 (Millex-HV, Billeria, 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p24 ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) により測定し、約 1×10^{10} IU/mLと推定した。

4) 脳定位手術

マウスはペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下で小動物用脳定位固定装置 (Narishige, Tokyo, Japan) に固定し、脳アトラス¹⁹に従い、LVVを1 μL投与した。各細胞種のプロモーター配列の活性評価は以下の座標で行った。SSTとCCK: 帯状皮質

(ブレグマより AP +0.98 mm、ML +0.3 mm、DV +2.0 mm) あるいはM2皮質 (ブレグマより AP +0.74 mm、ML +1.0 mm、DV +1.5 mm)、PV: 視床網状核 (ブレグマより AP -0.70 mm、ML +1.1 mm、DV +4.2 mm)、SERT: 背側縫線核 (ブレグマより AP -4.3 mm、ML +1.2 mm、DV +3.6 mm)、vAChT: 外側背側被蓋部 (ブレグマより AP -5.0 mm、ML +0.5 mm、DV +3.3 mm)、SPとPENK: 線条体 (ブレグマより AP +0.38 mm、ML +2.0 mm、DV +3.5 mm)。

5) 凍結切片の作製と免疫染色法

LVVの投与1週間後、マウス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15 mL 経心灌流することで脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB: 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 µm の凍結切片を作製し、MAS コート付きスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) に接着させ、凍結切片を風乾後、-80 °C で凍結保存した。スライドガラス上の冠状切片を免透過処理のために0.25% Triton-X100 (Nacalai Tesque) を含むPBSに浸し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、反応させた。各一次抗体の反応条件は表2に記載した。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 488, 594-labeled donkey anti-goat IgG、Alexa Fluor 488, 594-labeled donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-sheep IgG、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rat 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 (Matsunami) を用いて封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i, Olympus, Tokyo, Japan) により画像を取得した。

表2

1 次抗体	ホスト	会社	希釈倍率	反応条件
green fluorescent protein (GFP)	ウサギ	Invitrogen	2000	
green fluorescent protein (GFP)	ヤギ	Frontier Institute	1000	
somatostatin (SST)	ウサギ	Peninsula Laboratories International	500	4°C、~72 時間、抗原賦活化 (citrate buffer、80°C、30 分)

procholecystokinin (CCK)	ウサギ	Frontier Institute	100	4°C、~72 時間、抗原賦活化 (HistoVT One (Nacalai Tesque)、70°C、20 分)
parvalbumin (PV)	ヤギ	Frontier Institute	100	室温、~24 時間、抗原賦活化 (citrate buffer、80°C、30 分)
Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2)	羊	MerckMillipore	500	4°C、~24 時間
choline acetyltransferase (ChAT)	ヤギ	MerckMillipore	200	室温、~24 時間
substance P (SP)	ラット	Abcam	100	4°C、~72 時間、抗原賦活化 (citrate buffer、80°C、30 分)
preproenkephalin (PENK)	ウサギ	Neuromics	500	室温、~24 時間、抗原賦活化 (citrate buffer、80°C、30 分)

6) 解析

値は全て、平均値±標準誤差で標記した。特異性は、レポーター遺伝子である Venus 陽性細胞と各細胞種陽性細胞数の共局在率を測定することで評価した。

実験結果

SST、CCK、PVのプロモーター候補配列の単離と機能検証

大脳皮質に存在する抑制性の神経細胞は SST、CCK、PV 陽性細胞などいくつかのサブタイプに分類される。しかしこれらのサブタイプごとに特異的に作用するプロモーター配列は同定されていない。そこでまず zPicture²⁰ を使用して、マウスとカンクイザルのゲノム配列の相同性を解析した。その結果、SST 遺伝子座の開始コドンの上流に高く遺伝子配列が保存されている領域が存在していることが明らかとなった (図 1A)。次にレポーター遺伝子である Venus の上流に、この高い相同性が確認されたマカクサルゲノム配列を持つ LVV を作製し (LVV-SST-0.3 kb::Venus)、マウスの皮質領域に投与し、1 週間後に免疫組織化学的検討により特異性を評価した。その結果、GFP 免疫陽性細胞の $93.8 \pm 4.1\%$ が SST 免疫陽性であった (n = 4、図 1B)。同様に CCK

遺伝子座の上流においてもマウスとマカクサルゲノム配列を解析し、相同性が高い領域をプロモーター候補配列として分離した (図 2A)。これらのプロモーター候補配列を有している LVV をマウスの皮質領域に投与し特異性を評価した結果、0.5 kb のプロモーター候補配列を有する LVV (LVV-CCK-0.5 kb::Venus) は、GFP 免疫陽性細胞の $88.0 \pm 3.3\%$ が CCK 免疫陽性であった一方で ($n = 3$ 、図 2B、C)、3.9 kb のプロモーター候補配列を有する LVV (LVV-CCK-0.5 kb::Venus) は、GFP 免疫陽性細胞と CCK 免疫陽性細胞の共局在率は $50.9 \pm 3.3\%$ であった ($n = 3$ 、図 2D、E)。さらに PV についても同様に検討したところ、GFP 免疫陽性細胞と PV 免疫陽性細胞の共局在率は、0.8 kb のプロモーター候補配列 (LVV-PV-0.8 kb::Venus) の場合、 $84.0 \pm 1.4\%$ 、1.8 kb のプロモーター候補配列 (LVV-PV-1.8 kb::Venus) の場合、 $79.3 \pm 0.5\%$ であった (図 3A-E)。

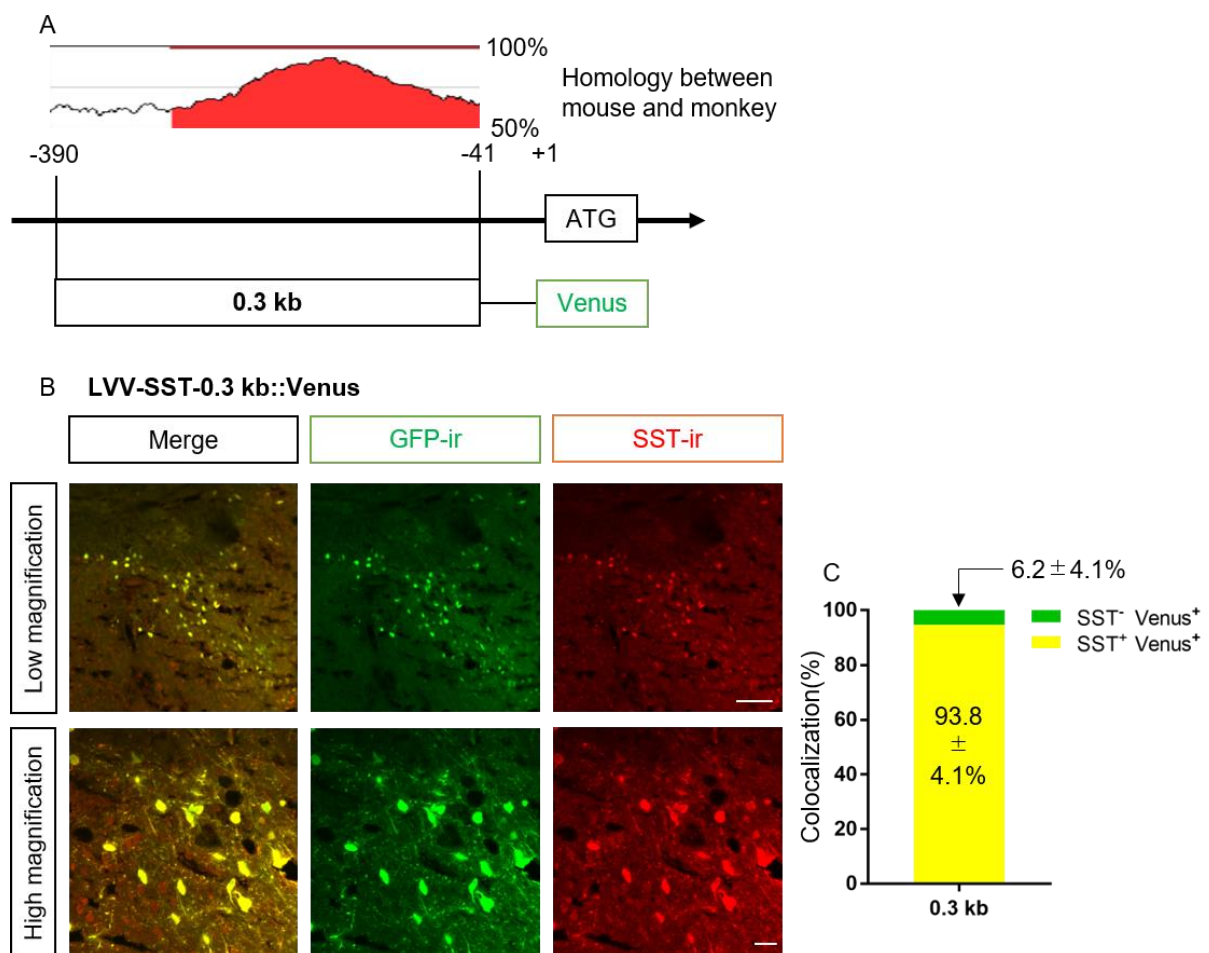


図 1 マウス脳内におけるマカクサル SST プロモーター配列の特異性の検討

(A) 上: マウスとマカクザルの SST 遺伝子における上流領域の配列の類似性。下: 単離したプロモーターの模式図。

(B) LVV-SST-0.3 kb::Venus を投与してから 1 週間後、Venus 発現細胞と SST 発現細胞を免疫組織学的検討により解析した。スケールバー = 100 μ m (低倍率)、20 μ m (高倍率)。

(C) SST と GFP の共局在率。 $n = 4$ 。

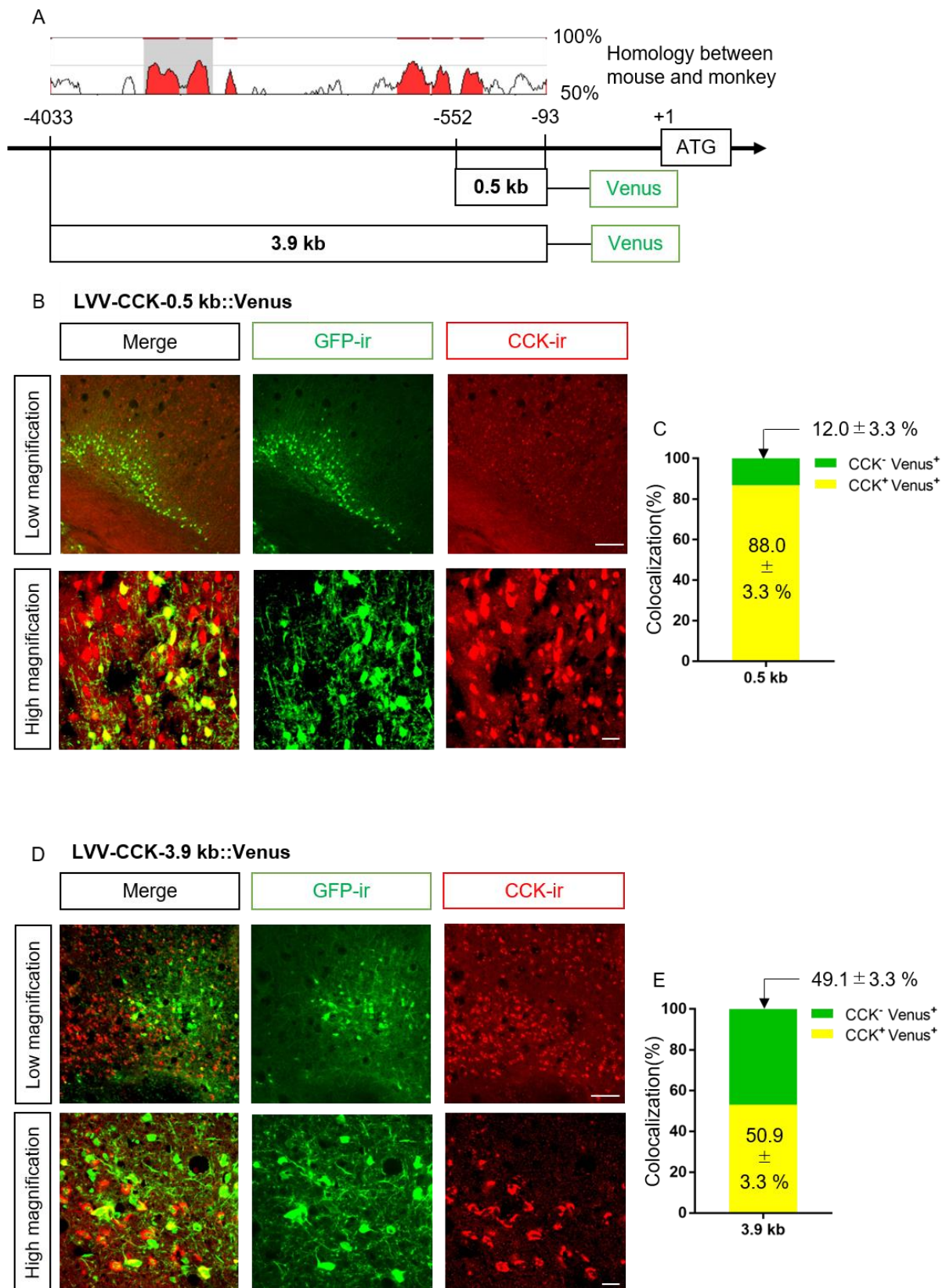


図2 マウス脳内におけるマカクサル CCK プロモーター配列の特異性の検討

(A) 上: マウスとマカクザルの CCK 遺伝子における上流領域の配列の類似性。下: 単離したプロモーターの模式図。

(B,D) LVV-CCK-0.5 kb::Venus (B)、LVV-CCK-3.9 kb::Venus (D) を投与してから 1 週間後、Venus 発

現細胞と CCK 発現細胞を免疫組織学的検討により解析した。スケールバー = 100 μm (低倍率)、
20 μm (高倍率)。

(C,E) CCK と GFP の共局在率。 $n = 3$ 。

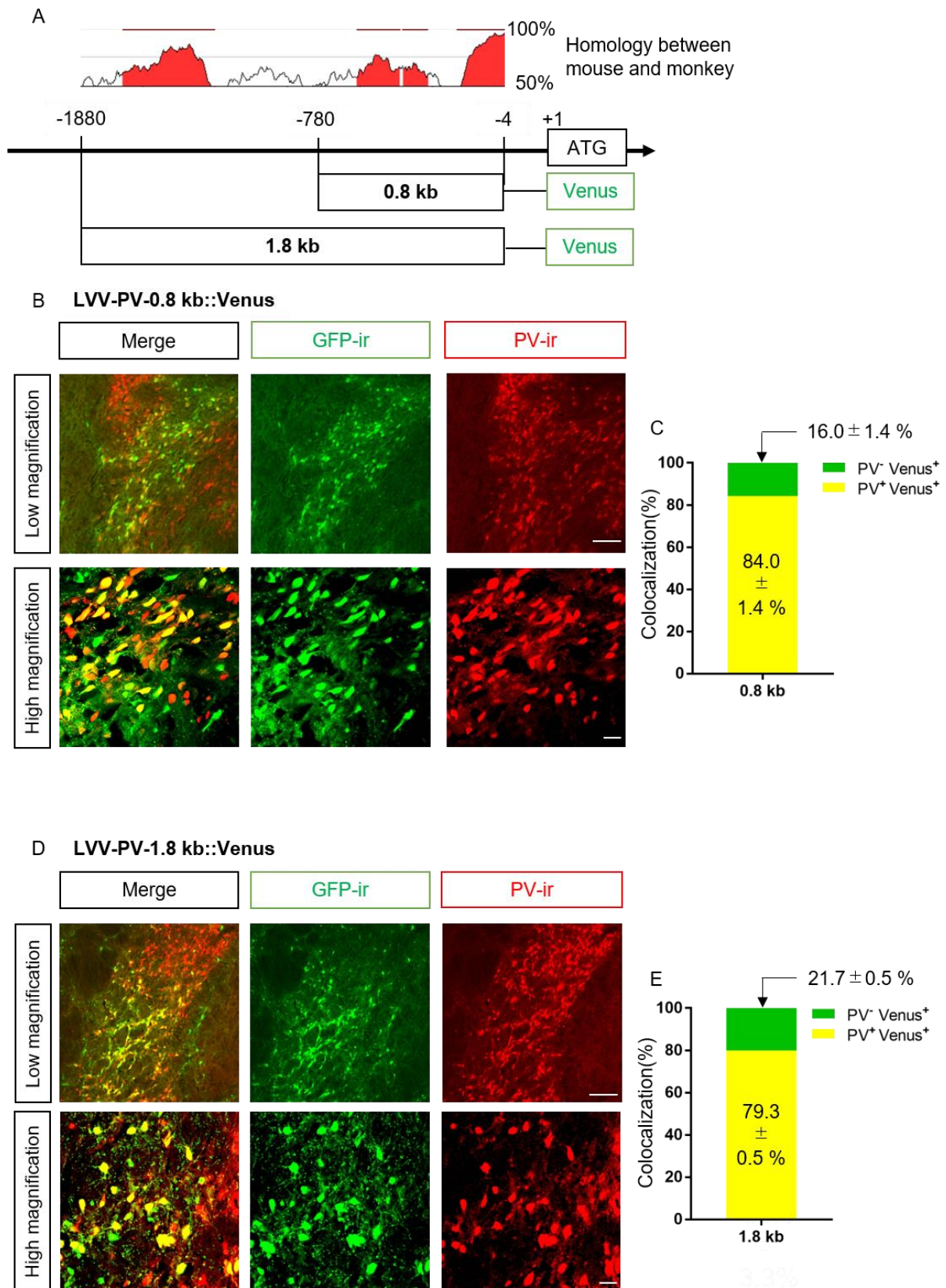


図3 マウス脳内におけるマカクサル PV プロモーター配列の特異性の検討

(A) 上: マウスとマカクザルの PV 遺伝子における上流領域の配列の類似性。下: 単離したプロモーターの模式図。

(B,D) LVV-PV-0.8 kb::Venus (B)、LVV-PV-1.8 kb::Venus (D) を投与してから 1 週間後、Venus 発現細胞と CCK 発現細胞を免疫組織学的検討により解析した。スケールバー = 100 μm (低倍率)、20 μm (高倍率)。

(C,E) CCK と GFP の共局在率。 $n = 3$ 。

セロトニン作動性、コリン作動性神経細胞のプロモーター候補配列の単離と機能検証

セロトニンやアセチルコリンなどの神経伝達物質は気分調整あるいは学習機能などに対して重要な役割を果たしている^{21,22}。当研究室では以前、マウスとラットの TPH2 遺伝子上流にあるプロモーター配列がマウスとラットのセロトニン神経細胞に対して高い特異性と発現量を有していることを報告した⁹。しかし、霊長類のセロトニン作動性神経細胞やコリン作動性神経細胞に選択的に作用するプロモーター配列に関しては未だ報告されていない。そこで初めにセロトニン神経細胞に対して特異的なマーカー遺伝子として知られているセロトニントランスポーター (SERT) 遺伝子上流領域におけるマウスとマカクザルのゲノム配列の相同性を zPicture²⁰ により解析し、マカクザルにおける SERT のプロモーター候補配列を単離した (図 4A)。LVV の作製後、背側縫線核 (DRN) に投与し免疫組織学的検討を行った結果、プロモーター候補配列が 1.9 kb (LVV-SERT-1.9 kb::Venus) の場合、GFP 免疫陽性細胞の $93.8 \pm 0.9\%$ が TPH 免疫陽性であった ($n = 3$ 、図 4B、C)。一方で、0.5 kb (LVV-SERT-0.5 kb::Venus) の場合の GFP 免疫陽性細胞と TPH 免疫陽性細胞の共局在率は $56.3 \pm 1.4\%$ であった ($n = 3$ 、図 4D、E)。次にコリン作動性神経のマーカー遺伝子である小胞アセチルコリントランスポーター (vAChT) についても同様に検討したところ、GFP 免疫陽性細胞と同じくコリン作動性神経細胞のマーカー遺伝子である choline acetyltransferase (ChAT) 免疫陽性細胞の共局在率は、プロモーター候補配列を 1.8 kb (LVV-vAChT-1.8 kb::Venus) にした場合 $83.1 \pm 3.9\%$ 、1.1 kb (LVV-vAChT-1.1 kb::Venus) の場合 $52.3 \pm 4.8\%$ であった (図 5A-E)。

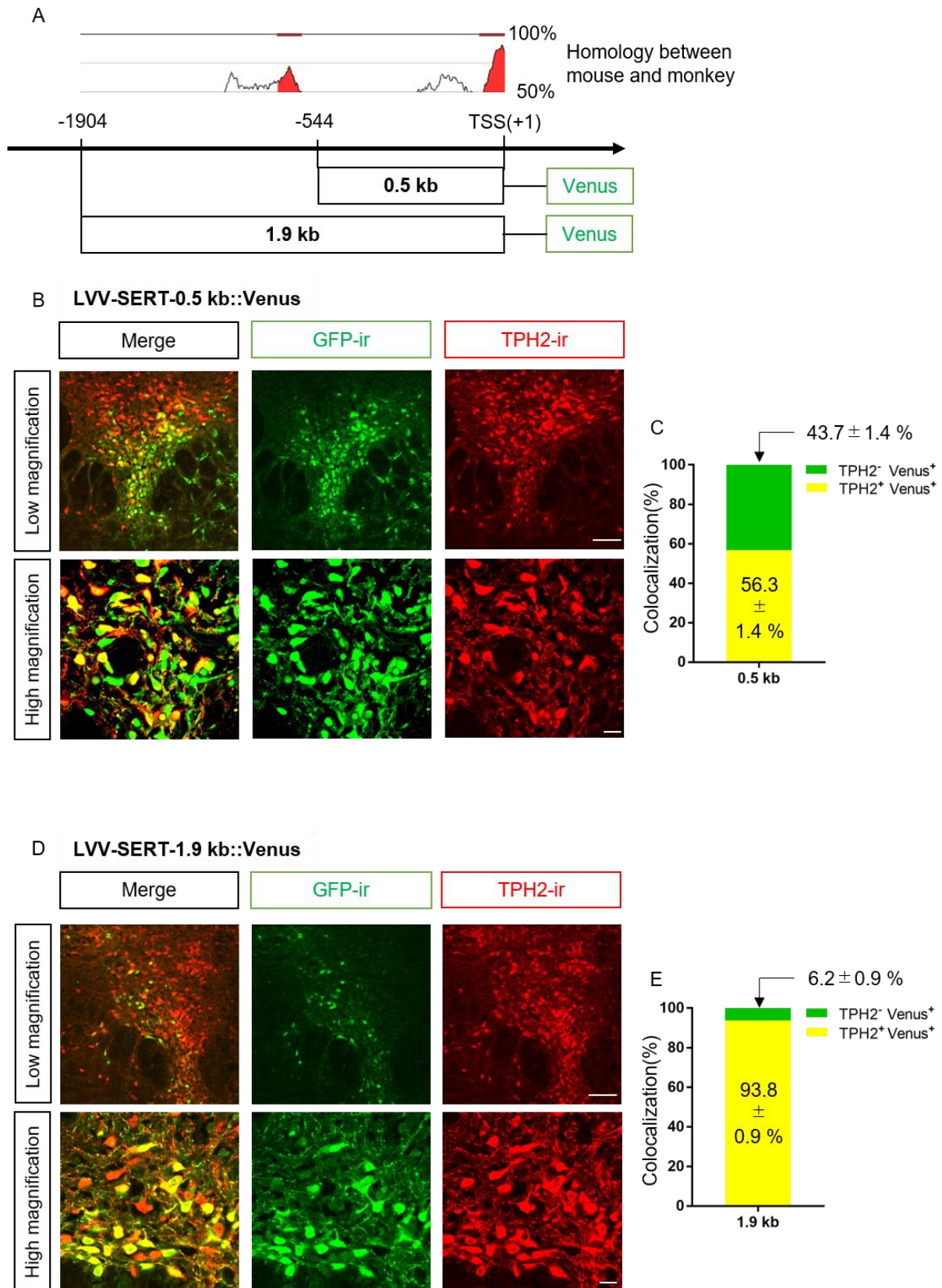


図4 マウス脳内におけるマカクサル SERT プロモーター配列の特異性の検討

(A) 上: マウスとマカクザルの SERT 遺伝子における上流領域の配列の類似性。下: 単離したプロモーターの模式図。

(B,D) LVV-SERT-0.5 kb::Venus (B)、LVV-SERT-1.9 kb::Venus (D) を投与してから 1 週間後、Venus 発現細胞と TPH 発現細胞を免疫組織学的検討により解析した。スケールバー = 100 μm (低倍率)、20 μm (高倍率)。

(C,E) TPH と GFP の共局在率。 $n = 3$ 。

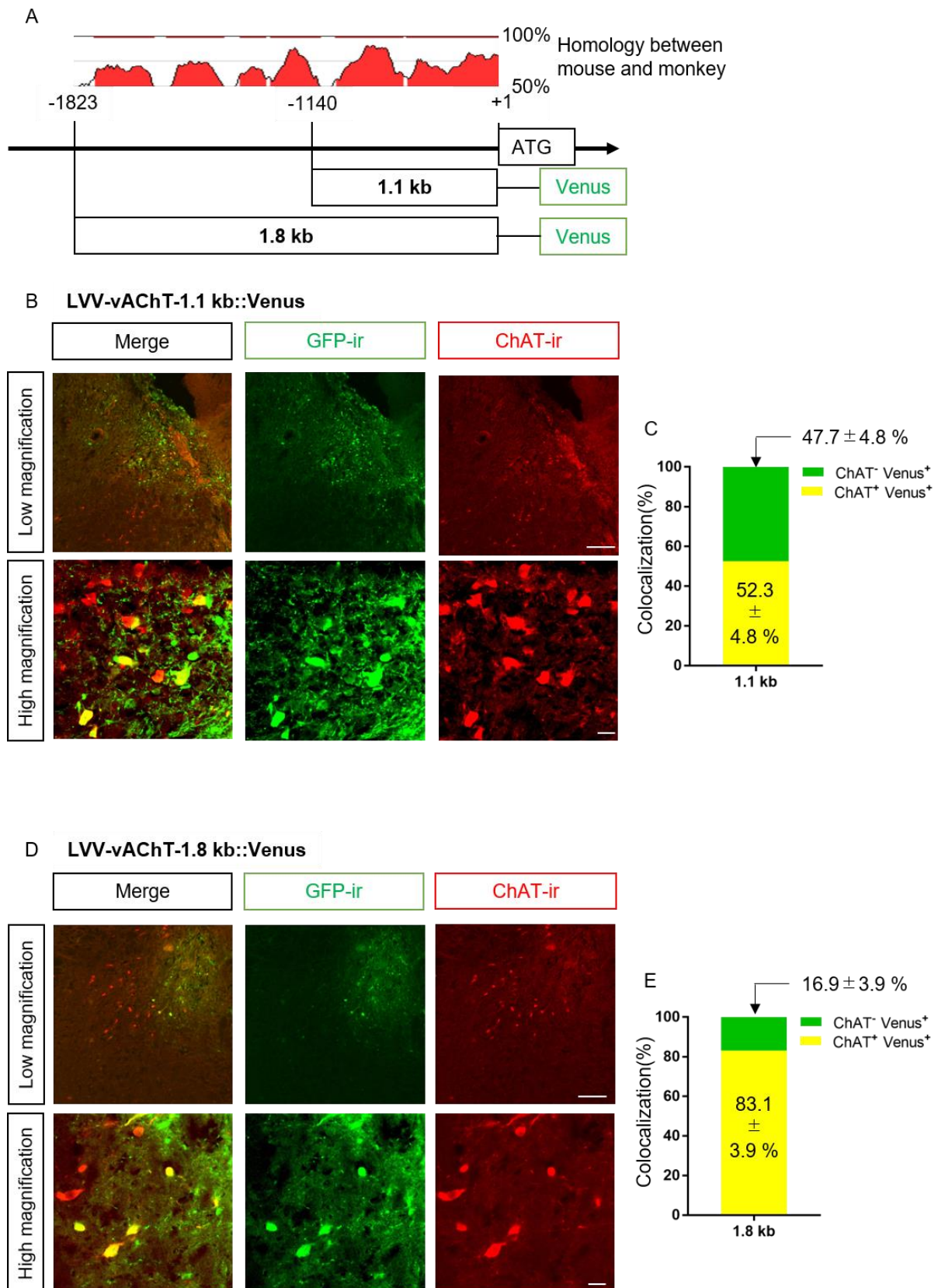


図5 マウス脳内におけるマカクサルvAChTプロモーター配列の特異性の検討

(A) 上: マウスとマカクのvAChT遺伝子における上流領域の配列の類似性。下: 単離したプロモーターの模式図。

(B,D) LVV-vAChT-1.1 kb::Venus (B)、LVV-vAChT-1.8 kb::Venus (D) を投与してから 1 週間後、Venus 発現細胞と ChAT 発現細胞を免疫組織学的検討により解析した。スケールバー = 100 μm (低倍率)、20 μm (高倍率)。

(C,E) ChAT と GFP の共局在率。 $n = 3$ 。

線条体中棘神経細胞のプロモーター候補配列の分離と機能検証

線条体は脳基底核の一部であり、運動機能や意思決定に重要な役割を果たしている^{23,24}。線条体の神経細胞の大部分は中棘ニューロン (MSN) であり、MSN はサブスタンス P (SP) を発現する神経細胞と、エンケファリンを発現する神経細胞に分類される。そこで、SP とエンケファリンの前駆体である preproenkephalin (PENK) について、同様に Zpicture²⁰ を使用することで、マウスとマカクザルにおいてゲノム配列の相同性が高い領域を解析し、プロモーター候補配列の単離後 LVV を作製し線条体に投与した (図 6A、7A)。SP の解析の結果、プロモーター候補配列が 0.8 kb (LVV-SP-0.8 kb::Venus)、1.7 kb (LVV-SP-1.7 kb::Venus) の両方の場合において、GFP 免疫陽性細胞と SP 免疫陽性細胞の高い共局在率が確認された (0.8 kb: $91.7 \pm 3.8\%$ 、1.7 kb: $87.4 \pm 4.9\%$) (図 6B-E)。一方 PENK において、プロモーター候補配列が 0.9 kb (LVV-PENK-0.9 kb::Venus) の場合、 $88.0 \pm 1.7\%$ 、2.2 kb (LVV-PENK-2.2 kb::Venus) の場合、 $61.0 \pm 5.8\%$ であった (図 7B-E)。

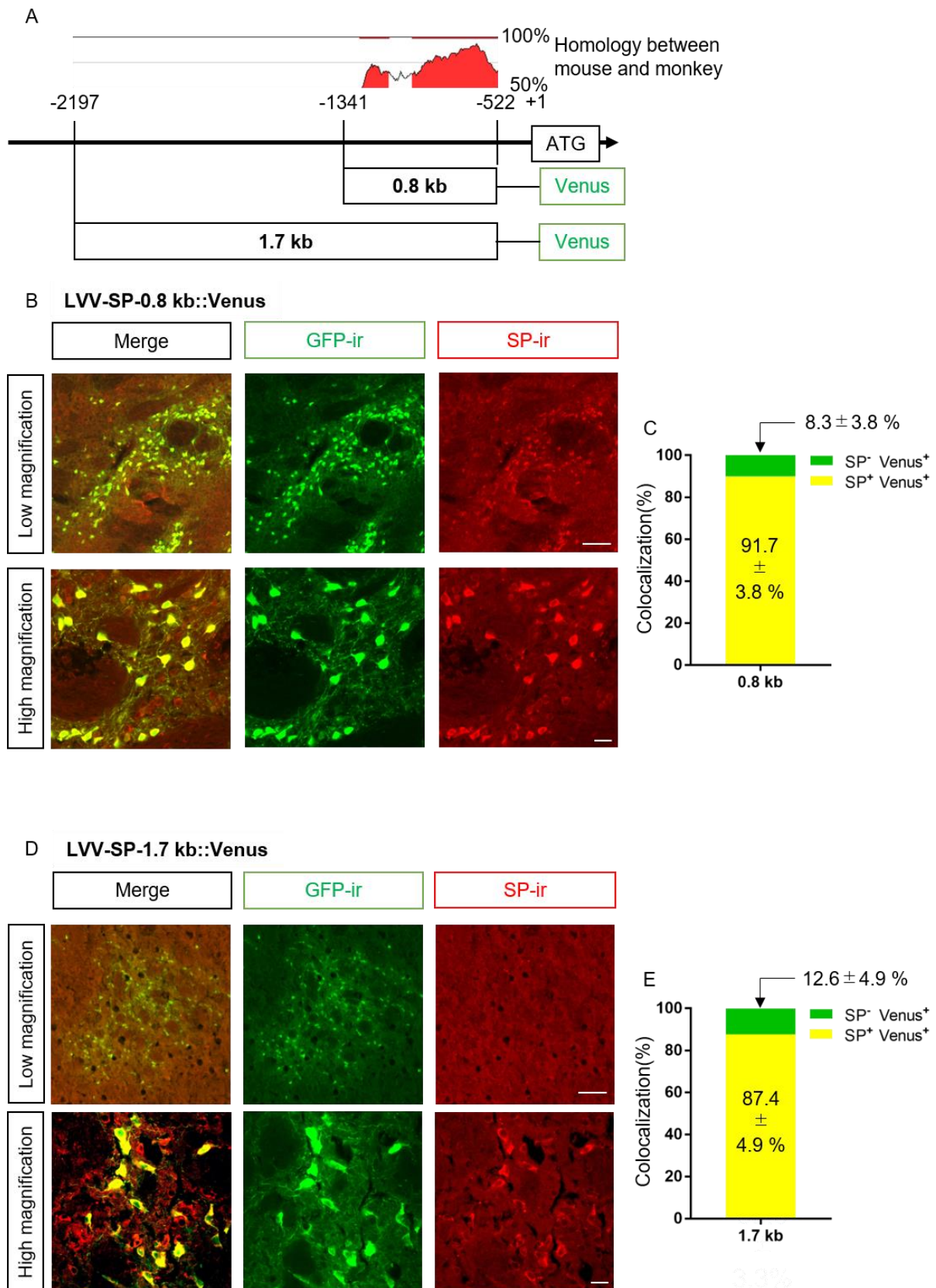


図6 マウス脳内におけるマカクサル SP プロモーター配列の特異性の検討

(A) 上: マウスとマカクザルの SP 遺伝子における上流領域の配列の類似性。下: 単離したプロモーターの模式図。

(B,D) LVV-SP-0.8 kb::Venus (B)、LVV-SP-1.7 kb::Venus (D) を投与してから 1 週間後、Venus 発現細胞と SP 発現細胞を免疫組織学的検討により解析した。スケールバー = 100 μm (低倍率)、20 μm (高倍率)。

(C,E) SP と GFP の共局在率。 $n = 3$ 。

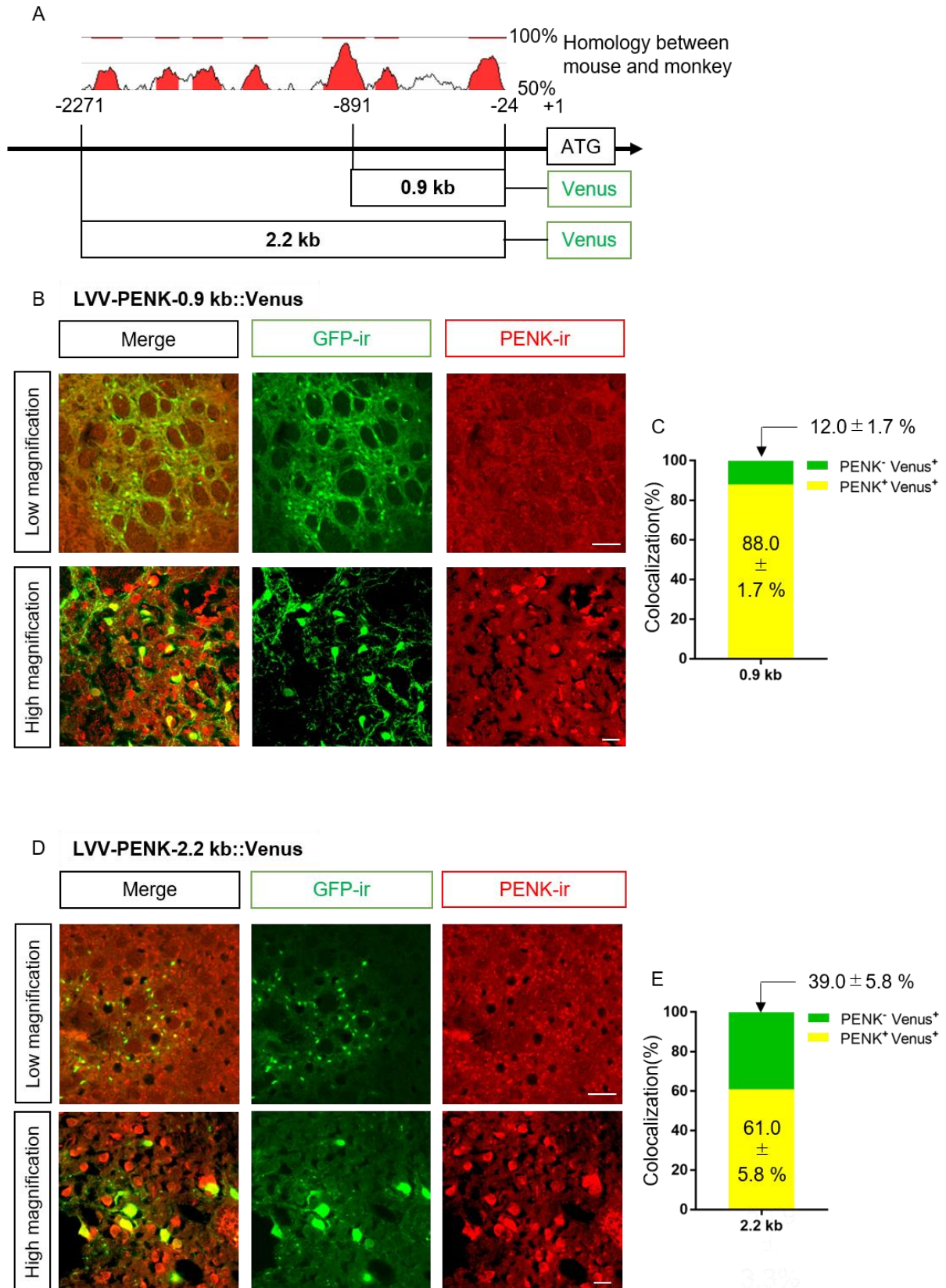


図7 マウス脳内におけるマカクサルPENKプロモーター配列の特異性の検討

(A) 上: マウスとマカクのPENK遺伝子における上流領域の配列の類似性。下: 単離したプロモーターの模式図。

(B,D) LVV-PENK-0.9 kb::Venus (B)、LVV-PENK-2.2 kb::Venus (D) を投与してから1週間後、Venus 発現細胞とPENK発現細胞を免疫組織学的検討により解析した。スケールバー = 100 μm (低倍率)、20 μm (高倍率)。

(C,E) PENK と GFP の共局在率。 $n = 3$ 。

考察

神経細胞に外的遺伝子を特異的に導入させ得るプロモーター配列は非常に有用な技術であるものの、マウス以外の動物種においてその配列はほとんど特定されていない。本研究ではサルとマウスにおいて、種を超えて保存されているプロモーター領域の探索を行い、その特異性をマウスの脳内の神経細胞により評価した。その結果、複数の神経細胞に対して、遺伝子発現を特異的に制御するマカクサルのプロモーター配列の同定に成功した。本研究で明らかにしたプロモーター配列は、マカクザルのような他の生物種においても同様に高い特異性を期待できるものであると考えられる。

近年、微生物由来の光感受性タンパク質であるチャンネルロドプシン2 (ChR2) 等を神経に発現させ、光により神経活動を亢進/抑制する技術が急速に発展している (光遺伝学)³。しかしChR2を非特異的に神経細胞に発現させるだけでは不十分であり、どの神経が精神疾患の発症に関与しているかを明らかにするためには、標的とする神経にのみChR2を十分量発現させることが必要である。本研究では、カニクイザルの複数の遺伝子上流領域を用いることで、マウスの神経細胞に特異的に発現させることができることを示した。一方で単離されたプロモーターの一部は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ものの、これらのプロモーターが生体内での活動を操作するのに十分であるかは明らかとなっていない。Staufferらは、ドパミン神経細胞種のプロモーター配列とCre依存性のウイルスベクターを組み合わせることで、サルのドパミン神経を特異的に光操作することを可能にした¹⁴。そのため本研究で単離したマカクザルのプロモーター配列においても、上記の遺伝子改変技術と併用することで、*in vivo*で種々の神経細胞の活性を操作するのに十分な発現量を有することができることを示唆される。

本研究では、迅速な遺伝子発現のためにLVVを使用した。現在最も汎用的に使用されているウイルスベクターはアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) であり^{25,26}、LVVと同様にAAVも標的細胞で長期的な遺伝子発現が可能である^{27,28}。しかし、一般的なAAVは5 kb以上の遺伝子を搭載することができないのに対し、LVVでは9 kbまで

対応可能である^{29,30}。本研究で同定されたプロモーター配列はいずれにおいても2 kb よりも短いものであるため、導入遺伝子のための十分な余地を残しながらAAVに組み込むことができるものであると考えられる。

本章では、細胞種特異的なプロモーターとして作用する可能性のある配列をマカクザルのゲノム中より同定し、マウスの脳内で特異性を評価した。これらのプロモーター配列は、非ヒト霊長類における細胞種ごとの神経機能の解析を行うにあたって有用なツールとなりえることが期待される。

第二章

嗜好/嫌悪における背側縫線核セロトニン神経の役割の解明

報酬処理は生存あるいは繁殖のための基本的な機能であり、この報酬処理を司る神経回路の機能異常は、大うつ病性障害や統合失調症といった精神疾患の原因となることが知られている³¹⁻³⁵。これまでの研究から、中脳の腹側被蓋野 (VTA) に存在するドパミン (DA) 神経が報酬処理と動機付けに重要な役割を果たしていることが示唆されている^{36,37}。またDA神経に加えて、セロトニン (5-HT) 神経も報酬処理に重要な役割を果たしていることが過去の報告から示唆されている³⁸⁻⁴¹。これまでに5-HT神経の起始核である背側縫線核 (DRN) を自己刺激することで報酬に対する十分な強化学習が得られること⁴²⁻⁴⁵、DRN内に存在する一部分の神経細胞の活動の大きさは報酬の大きさに相関することが明らかとなっている^{6,46}。さらに選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) や5-HT_{1A}受容体阻害薬により細胞外の5-HT濃度を上昇させることで、依存性薬物であるニコチンやアンフェタミンの退薬症状の一種である興味の低下が弱まることが過去に報告されている⁴⁷。一方でドパミントランスポーターあるいはドパミン欠損マウスはコカイによる報酬効果が惹起されるが、この報酬効果は5-HTトランスポーターの寄与によるものであると考えられている^{48,49}。さらにDA神経の活動は5-HTにより調節されることも報告されており⁵⁰、DRNの5-HT神経が報酬処理に重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。

DRNに存在する多数の5-HT神経細胞は、VTA、側坐核 (NAc)、外側視床下部 (LH) などの報酬処理との関連性が示唆されている脳領域に投射していることが知られており、5-HT神経回路の機能変化が報酬系に対して重要な役割を果たすことが示唆されている⁵¹⁻⁵³。実際、DRNの5-HT神経の活動変化が報酬関連行動に与える影響について複数の遺伝子改変マウスを用いて過去に研究されている。LiuらやLiらは報酬行動の一種であるスクロース摂取によりDRNの5-HT神経の活動性が上昇すること⁴⁰、DRNの5-HT神経細胞の活性化により報酬関連行動が惹起されることをePet1-Creマウスを使用して明らかにした³⁹。一方McDevittらは、LiuらやLiらと同じePet1-Creマウスを使用してDRNの5-HT神経を活性化しても報酬関連行動が惹起されないことを報告している⁵⁴。さらにFonsecaらはMcDevittらと同様に、DRNの5-HT神経の活性化により報酬関連行動は惹起されないという結果をSERT-Creマウスを使用して報告している⁵⁵。しかしWangらは最近、SERT-Creマウスを使用し、DRNからVTAへに投射している5-HT神経回路を活性化することで、グルタミン酸および5-HT₃受容体の活性化を介して報酬関連行動が誘導されることを明らかにした⁴¹。このように、DRNの5-HT神経の活性化による脳内報酬系回路に与える影響については未だ明確な結論出しておらず、さらにDRN

の5-HT神経の抑制が報酬あるいは嫌悪の増減にどのような影響を与えるのかは未だ解明されていない。

そこで本章では、5-HT 神経に対して選択的に遺伝子を導入する 2 つの異なる方法を使用し、DRN の 5-HT 神経活動の亢進と抑制が報酬あるいは嫌悪に与える影響について光遺伝学的手法により検討した。マウスの tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) プロモーターの制御下で光感受性タンパク質を発現させたアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を新たに作製し、DRN の 5-HT 神経を光遺伝学的に操作することによる報酬関連行動に対する影響を検討した。また、TPH2-tTA 遺伝子改変マウス⁵⁶と tTA 依存性 AAV を併用して、同様の検討を行った。その結果、TPH2 プロモーター制御下の AAV を使用することで、DRN の 5-HT 神経および DRN から VTA へ投射している 5-HT 神経回路 (5-HT^{DRN→VTA}) の光刺激による活動性の亢進は、光活性と関連付けられたノーズポーク行動の回数の上昇および光活性と関連付けられた区域での滞在時間を有意に増加させた。また TPH2-tTA 遺伝子改変技術を使用した場合においても、DRN の 5-HT 神経の光遺伝学的活性化により報酬関連行動が、阻害により嫌悪行動がそれぞれ惹起されることが明らかとなった。これらの結果は、DRN の 5-HT 神経の活動が嗜好/嫌悪のバランスを決定していることを強く示唆している。

実験方法

1) 実験動物

実験には C57BL/6J 系マウス (6-9 週齢: Japan SLC, Shizuoka, Japan)、あるいは TPH2-tTA 遺伝子改変マウス⁵⁶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」を遵守して行われた。

2) ウイルスベクターの構築

PCRは、Q5DNAポリメラーゼ (New England Biolabs, Ipswich, USA) を用いて行った。すべてのライゲーション反応は、T4 DNAリガーゼ (BioAcademia, Osaka, Japan) を用いて行った。AAV-mTPH2-Venus-WPRE (mTPH2::Venus) の構築は以下の様に行った。pTYF-mTPH2-Venus-WPRE⁹をテンプレートとしてPCRでmTPH2-Venus断片を増幅し、pAAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry (Addgene, 44361) とライゲーションすることで mTPH2::Venusを作製した。AAV-mTPH2-CheRiff-EGFP-WPRE (mTPH2::CheRiff) の構

構築は以下の様に行った。CheRiff-EGFP断片をDRH296:FCK-Optopatch2 (Addgene, 51694) からPCR増幅し、mTPH2::VenusにライゲーションすることでmTPH2::CheRiffを作製した。AAV-TetO-Venus (TetO::Venus) の構築は以下の様に行った。pFUW-TetO-OSKM (Addgene, 20321) からPCRによって増幅されたTetO断片およびmTPH2::Venus から PCR によって増幅された Venus 断片を、pAAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry (Addgene, 44361) とライゲーションすることでTetO::Venusを作製したAAV-TetO-CheRiff-EGFP (TetO::CheRiff) の構築は以下の様に行った。CheRiff-EGFP断片をDRH296: FCK-Optopatch2 (Addgene, 51694) からPCR増幅し、TetO::Venus にライゲーションすることで TetO::CheRiff を作製した。AAV-TetO-eArchT-EYFP (TetO::eArchT) の構築は以下の様に行った。eArchT-EYFP断片をmTPH2-eArchT3.0-eYFP-WPRE⁵⁵からPCR増幅し、TetO::VenusにライゲーションすることでTetO::eArchTを作製した。

3) AAVの作製

Lenti-X 293T細胞 (Clontech, Mountain View, USA) を60~70%の培養密度まで増殖させ、8 µgのヘルパーベクター、5 µgのDJベクターおよび5 µgのトランスファープラスミドをpolyethylenimine (Polysciences, Warrington, PA, USA) で感染させた。60~72時間の培養の後、上清を除去した。上清を除去したディッシュ上に、500 µLの1 X グラジエントバッファーを加え細胞を回収した。回収した細胞懸濁液を液体窒素の中に入れ10分間凍結し、細胞が完全に融解するまで55°Cの水浴中に置いた。融解後、20mLのシリンジと23ゲージの針 (Terumo, Tokyo, Japan) を用いて細胞をすりつぶした。上記の作業を3回繰り返したのち、benzonase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を0.5 µL加え37 °Cで45分間恒温放置した。その後、R20A2ローター (Koki Holdings, Tokyo, Japan) 中で3,000 g、15分間の条件で遠心分離を行い、上清を回収した。超遠心チューブに15%、25%、40%、58%の4層の勾配を用意し、ウイルスを含む上澄み液を4層の勾配の最上層に滴下した。その後、50.2Tiローター (Beckman-Coulter, CA, USA) 中で48,000 rpm、18 °C、1時間45分の条件で超遠心分離した。超遠心分離後、18ゲージの針をつけた5mLシリンジを40%グラジエントバッファー層と58%グラジエントバッファー層の境界面から約1~2mm下に挿入し、3 mLの溶液をゆっくりと抽出した。回収した抽出物は、-80 °Cで保存した。AAVの力価をqPCR法で測定し、約 1.0×10^{13} IU/mLと推定した。

4) 脳定位手術

マウスはペントバルビタール (50 mg/kg) あるいは3%イソフルラン (Escain, Pfizer, Tokyo, Japan) 麻酔下で小動物用脳定位固定装置 (Narishige) に固定し、脳アトラス¹⁹に従い、AAVを背側縫線核 (ブレグマよりAP -4.3 mm、ML +1.2 mm、DV +3.6 mm) に1 µLずつ投与した。光照射を行うためウイルス投与の4週間後、光ファイバーカニュー

ーレの先端が標的領域の背側境界のすぐ上に来るようにマウスにカニューレを埋め込んだ。光ファイバーカニューレの埋め込みには、以下の座標を使用した。背側縫線核: DRN (ブレグマより AP -4.3 mm、ML +1.2 mm、DV +3.3 mm、20°)、腹側被蓋野: VTA (AP -3.4 mm、ML ±0.5 mm、DV +4.3 mm)、外側視床下部: LH (AP -2.5 mm、ML ±0.9 mm、DV +4.8 mm)、中央扁桃核: CeA (AP -1.1 mm、ML ±2.5 mm、DV +4.3 mm)、側坐核: NAc (AP +1.5 mm、ML ±0.75 mm、DV +3.9 mm)、腹側淡蒼球: VP (AP +0.3 mm、ML ±1.3 mm、DV +4.6 mm)。

5) *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, Mitsubishi Rayon, Tokyo, Japan) 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 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いて駆動した。mTPH2::CheRiff、mTPH2::Venus、TetO::CheRiff、およびTetO::Venusを投与したマウスはオペラント条件付け試験で装置内に設置された小窓に鼻を突っ込んだ際に青色光 (波長: 473 nm、先端出力: 5 mW、周波数: 20 Hz、照射時間: 10 ms、20 パルス) を照射した。条件付け場所嗜好性試験では、条件付けセッション時に (波長: 473 nm、先端出力: 5 mW、周波数: 20 Hz、照射時間: 10 ms、20 秒on/10秒off) の条件で光照射を行った。TetO::eArchTあるいはTetO::Venusを投与したマウスでは、条件付け場所嫌悪試験の条件付けセッション時に緑色光の照射 (波長: 532 nm、先端出力: 2-2.5 mW) を持続的に行った。

6) 行動試験

光ファイバーカニューレ埋め込みの2-3日後から全ての行動実験を行った。

オペラント条件付け試験

防音箱の内部に小窓 (ENV-303M: Med Associates) を設置したオペラント装置 (15.24 × 13.34 × 12.7 cm, L×W×H; Med Associates, Fairfax, VT, USA) を配置した。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、マウスをオペラント装置内に置き30分間自由に探索させた。マウスがオペラント装置内に設置された小窓に鼻を突っ込むたびに、光ファイバーを介して青色光を照射した。マウスが小窓に鼻を突っ込む回数 (ノーズポーク回数) を測定した。3日間連続して試

験を実施した。

条件付け場所嗜好性試験

条件付け場所嗜好性試験は既報に従って実施した^{57,58}。試験装置は、視覚と触覚の差異により互いを差別化できる同一の大きさの2つの区間で構成されており(15×24×30 cm)、片方の区画は白色で床が粗くなっており、もう片方の区画は黒色で床が滑らかになっている。試験1日目(プレテスト)、光ファイバーパッチコードを接続していないマウスに2つの区間を900秒間自由に探索させ、探索期間中に各区間に滞在した時間をANY-MAZEソフトウェア(ANY maze version 6.0, Stoelting, Wood Dale, IL, USA)を用いて計測した。プレテストで片方の区画に合計時間の80%以上(720秒以上)滞在したマウスは以降の試験を実施しなかった。青色光照射を行う区間はバイアス方式に従って決定した⁵⁹。すなわち、プレテスト時に各マウスがより少ない時間(450秒未満)を過ごした区間を以後光刺激を行う区間(光照射対応区間)とした。試験2日目と3日目(条件付けセッション)に、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、光照射なしで20分間、光刺激を実施しない区画に置いた。4時間以上間隔をあげ、再び各マウスを光ファイバーパッチコードと接続し、光照射対応区画に置いたと同時に、20分間の青色光照射を行った。試験4日目(ポストテスト)、光ファイバーパッチコードを接続していないマウスに2つの区間を900秒間自由に探索させ、探索期間中に各区間に滞在した時間をANY-MAZEソフトウェアを用いて再び計測した。CPPスコアはポストテスト時に光照射対応区画に滞在した時間からプレテスト時に光照射対応区画に滞在した時間を差し引くことで算出した。

条件付け場所嫌悪性試験

試験装置は条件付け場所嗜好性試験視覚と同様のものを使用した。試験1日目(プレテスト)、光ファイバーパッチコードを接続していないマウスに2つの区間を900秒間自由に探索させ、探索期間中に各区間に滞在した時間をANY-MAZEソフトウェアを用いて計測した。プレテストで片方の区画に合計時間の80%以上(720秒以上)滞在したマウスは、以降の試験を実施しなかった。緑色光照射を行う区間はバイアス方式に従って決定した⁵⁹。すなわち、プレテスト時に各マウスがより多い時間(450秒以上)を過ごした区間を以後光刺激を行う区間(光照射対応区間)とした。試験2日目と3日目(条件付けセッション)に、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、光照射なしで20分間、光刺激を実施しない区画に置いた。4時間以上間隔をあげ、再び各マウスを光ファイバーパッチコードと接続し、光照射対応区画に置いたと同時に、20分間の緑色光照射を行った。試験4日目(ポストテスト)、光ファイバーパッチコードを接続していないマウスに2つの区間を900秒

間自由に探索させ、探索期間中に各区間に滞在した時間をANY-MAZEソフトウェアを用いて再び計測した。CPAスコアは、ポストテスト時に光照射対応区画に滞在した時間からプレテスト時に光照射対応区画に滞在した時間を差し引くことで算出した。

7) 凍結切片の作製と免疫染色法

行動試験終了後、マウス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15 mL 経心灌流することで脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB: 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 µm の凍結切片を作製し、MAS コート付きスライドガラスに接着させ、凍結切片を風乾後、-80 °Cで凍結保存した。スライドガラス上の冠状切片を免透過処理のために0.25% Triton-X100を含むPBSに浸し15分洗浄後、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) を抗体希釈液 (4%ウマ血清を含む0.25 % Triton-X100 含有PBS) を用いて希釈し、4°Cで一晩反応させた。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 488-labeled donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-sheep IgG (1:200) 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) とカバーガラスを用いて封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡により画像を取得した。全てのAAVの発現位置と光ファイバーカニューレの挿入位置は、免疫組織化学的手法により確認した。AAVの発現効率や光ファイバーカニューレの挿入に失敗したマウスから得られた行動試験と組織学的検討の結果は除外した。

8) 統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で標記した。統計解析はGraphPad Prism (バージョン8および9, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) で行った。二群間の差はStudent's *t*-testにより、三群以上の差は、two-way repeated ANOVAおよびBonferroni multiple comparisons testにより解析し、 $P < 0.05$ の差を有意であると見なした。また、各集団間の等分散性は*F*-testsあるいはBartlett testsを用いて解析した。等分散性は全ての図において等しかった。

実験結果

マウス TPH2 プロモーターを有するアデノ随伴ウイルスベクターによる DRN の 5-HT 神経特異的な活性化が報酬関連行動に及ぼす影響

これまでの研究から、マウスとラットのTPH2プロモーターを搭載したレンチウイルスベクターが、それぞれマウスとラットの5-HT神経に対して高い選択性をもって外的遺伝子を導入できることが報告されている^{9,17}。本研究ではDRNの5-HT神経細胞体だけでなく5-HTの軸索末端領域における神経活動をも操作するためにマウスのTPH2プロモーターの制御下のもと、興奮性の光感受性タンパク質の一種であるCheRiff⁶⁰を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を新たに作製した。作製したAVVの5-HT神経に対する特異性を検討するために、AAV-mTPH2-Venus-WPRE (mTPH2::Venus) をDRNに投与した。4週間後、多数のVenus免疫陽性細胞が確認され、その $95.5 \pm 0.6\%$ がTPH免疫陽性細胞であった ($n = 4$ 、図1A-D)。さらに、TPH免疫陽性細胞中の $78.8 \pm 4.5\%$ がVenus免疫陽性細胞であった ($n = 4$ 、図1D)。次にDRNの5-HT神経細胞の活性化が報酬関連行動に及ぼす影響を検討するためにオペラント条件付け試験と条件付け場所嗜好性試験を行った。AAV-mTPH2-CheRiff-EGFP-WPRE (mTPH2::CheRiff) あるいはmTPH2::Venusの投与から4週間後に、小窓を設置したオペラント装置内にマウスを置き30分間自由探索させた。mTPH2::Venus、mTPH2::CheRiffのいずれを投与されたマウスもオペラント装置内に設置された小窓に鼻を突っ込むたびに光ファイバーを介して青色光がDRNの5-HT神経に照射され、それぞれのマウスが小窓に鼻を突っ込む回数 (ノーズポーク回数) を測定した。その結果、mTPH2::CheRiffを投与されたマウスはmTPH2::Venus投与群と比較して3日間連続で有意に多いノーズポーク回数を示した (図1E)。一方条件付け場所嗜好試験では、試験1日目 (プレテスト) にマウスに視覚と触覚の性質が異なる2つの区間を900秒間自由に探索させ、探索期間中に各区画に滞在した時間を測定した。試験2日目と3日目は1日目において滞在時間が多かった区画に対し光照射を実施せず20分間置き、4時間以上の間隔をあけた後先ほどとは異なる部屋 (1日目に滞在時間が少なかった区画) に青色光照射下で20分間自由に探索させた。試験4日目に、再び2つの区画を自由に探索させ、1日目と4日目の光照射を行った区画の滞在時間の差 (4日目-1日目、CPPスコア) を測定した。その結果、mTPH2::CheRiffを投与したマウス群は、mTPH2::Venus投与群と比較して有意に高いCPPスコアを示した (図1F、G)。これらの結果から、mTPH2プロモーター制御下のAAVでDRNの5-HT神経を活性化することで、自己刺激行動や場所嗜好性、すなわち報酬関連行動が惹起されることが明らかとなった。

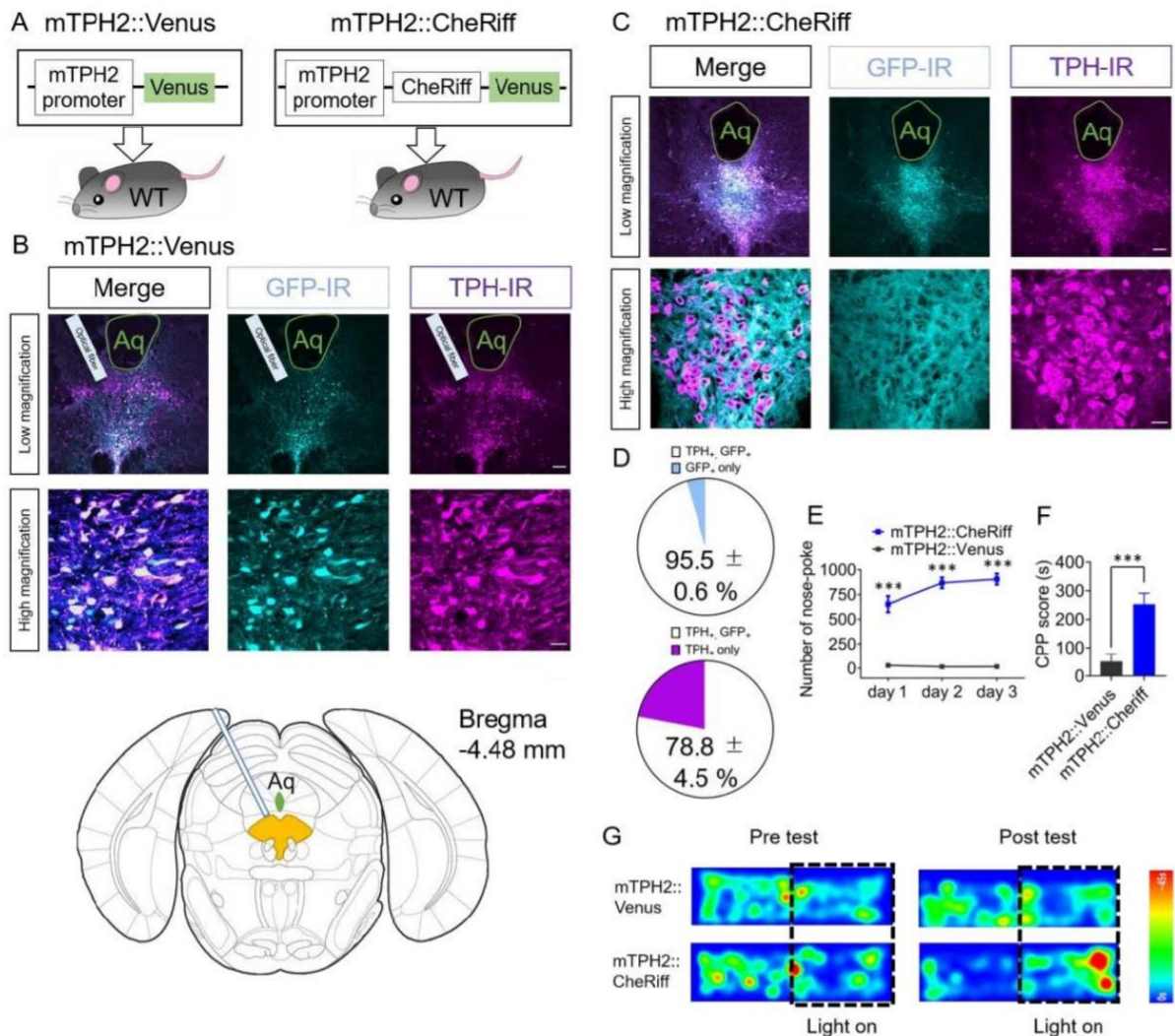


図 1 マウス TPH2 プロモーター制御下での背側縫線核 (DRN) セロトニン神経 (5-HT) の選択的活性化は自己刺激行動と場所嗜好性を誘発する。

(A) AAV 投与の概略図。

(B,C) DRN に mTPH2::Venus または mTPH2::CheRiff を投与した。投与 4 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法により観察した。スケールバー = 100 μ m (低倍率)、20 μ m (高倍率)。Aq: 中脳水道

(D) TPH 免疫陽性細胞と GFP 免疫陽性細胞数の測定結果。上: GFP 免疫陽性細胞中の GFP かつ TPH 免疫陽性細胞の割合。下: TPH 免疫陽性細胞中の GFP かつ TPH 免疫陽性細胞数の割合。n = 4、値 = 平均値 \pm 標準誤差

(E) オペラント条件付け試験におけるノーズポーク回数の結果。n = 7 (Venus), 15 (CheRiff)、値 = 平均値 \pm 標準誤差、***P < 0.001 vs. Venus (1 日目: mTPH2::Venus, 28.9 \pm 2.3, mTPH2::CheRiff, 652.7 \pm 82.5、2 日目: mTPH2::Venus, 15.9 \pm 4.8, mTPH2::CheRiff, 868.4 \pm 55.1、3 日目: mTPH2::Venus, 17.1 \pm 4.9, mTPH2::CheRiff, 906.5 \pm 55.9: two-way repeated-measures ANOVA: Interaction, F(2, 40) = 6.59, P = 0.0034, Time, F(1.218, 24.35) = 5.37, P = 0.024, CheRiff, F(1, 20) = 83.84, P < 0.001: Bonferroni posttests: day1,2,3, ***P < 0.001)。

(F) 条件付け場所嗜好試験における CPP スコアの結果。n = 9 (Venus, CheRiff)、値=平均値±標準誤差、*** $P < 0.001$ vs. Venus (mTPH2::Venus, 51.39 ± 26.53 秒, mTPH2::CheRiff, 253.2 ± 38.2 秒: unpaired t -test: $P = 0.0005$)。

(G) 自由探索時の軌跡の一例。Pre test: 試験 1 日目、Post test: 試験 4 日目、light on: 光照射を行った区間。

WT: 野生型、IR: 免疫反応性

DRN の 5-HT 神経終末の特異的な光活性化が報酬関連行動に及ぼす影響

DRN の 5-HT 神経は腹側被蓋野 (VTA)、外側視床下部 (LH)、中央偏桃体 (CeA)、側坐核 (NAc)、腹側淡蒼球 (VP) など多岐に渡る脳領域に投射していることが知られている^{51,61,62}。そこで、DRN からのどこの脳領域に投射しているセロトニン神経回路が報酬処理に関与しているかを検討した。まず初めに DRN に投与した mTPH2::CheRiff が上記の脳領域まで十分な発現量をもたらしているかを検討するため、AAV の投与 4 週間後 VTA、LH、CeA、NAc、VP を含む冠状切片を作製し、抗 GFP 抗体によって染色を行った。その結果、いずれの脳領域においても強い GFP 免疫応答が確認されたことから、これらの脳領域に十分量の CheRiff が発現していることが示唆される (図 2A-E)。次にこれらの脳領域に光ファイバーを挿入し、DRN の 5-HT 神経投射末端の局所刺激が報酬関連行動にどのような影響をもたらすかを検討するために、オペラント条件付け試験を行った。その結果、DRN から VTA に投射している 5-HT 神経終末の特異的な光活性化を行った場合のみ、顕著なノーズポーク回数の上昇が確認された (図 2F)。以上の結果から、多様な神経接続を有している DRN の 5-HT 神経回路の中で、VTA に投射している DRN の 5-HT 神経回路が報酬関連行動の誘発に重要な役割を果たしていることが示唆される。

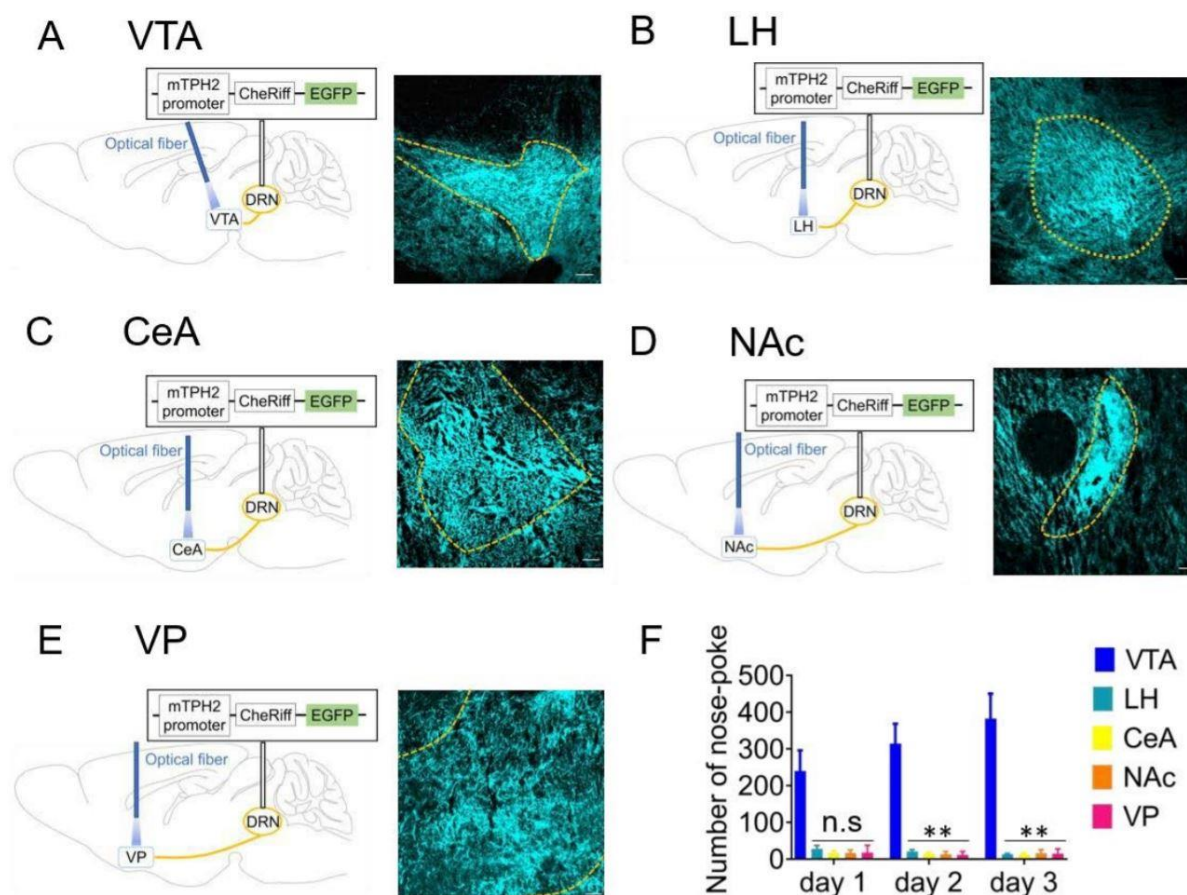


図2 腹側被蓋野 (VTA) に投射する DRN の 5-HT 神経回路の局所的な光刺激は自己刺激行動を誘発する。

(A-E) 左: DRN に mTPH2::CheRiff を投与し、VTA (A)、LH (B)、CeA (C)、NAc (D)、VP (E) に光ファイバーカニューレを挿入した。右: 各脳領域における抗 GFP 抗体で染色した染色図。スケールバー = 100 μ m。

(F) オペラント条件付け試験におけるノーズポーク回数の結果。VTA: $n = 8$, LH: $n = 7$, CeA: $n = 8$, NAc: $n = 8$, VP: $n = 7$, 値=平均値 \pm 標準誤差。** $P < 0.01$ vs. VTA, n.s.: not significant (day 1: VTA, 240.1 ± 56.1 , LH, 28.3 ± 9.4 , CeA, 17.0 ± 5.7 , NAc, 17.4 ± 2.8 , VP, 17.6 ± 7.6 , day 2: VTA, 314.6 ± 53.9 , LH, 21.1 ± 5.0 , CeA, 14.9 ± 3.3 , NAc, 13.6 ± 2.8 , VP, 13.6 ± 2.8 , day 3: VTA, 382.9 ± 67.7 , LH, 14.0 ± 2.2 , CeA, 13.9 ± 3.6 , NAc, 16.5 ± 3.4 , VP 15.4 ± 4.8 : two-way ANOVA: Interaction, $F(8, 66) = 6.298$, $P < 0.001$, Time, $F(1.492, 49.23) = 4.118$, $P = 0.0326$, Area, $F(4, 33) = 26.40$, $P < 0.001$: Bonferroni posttests: day 1, LH: $P = 0.0672$, CeA: $P = 0.0526$, NAc: $P = 0.0536$, VP: $P = 0.0526$ vs. VTA, n.s. day 2, LH: $P = 0.0093$, CeA: $P = 0.0084$, NAc: $P = 0.0082$, VP: $P = 0.0079$ vs. VTA, ** $P < 0.01$, day 3, LH: $P = 0.0095$, CeA: $P = 0.0094$, NAc: $P = 0.0099$, VP: $P = 0.0096$ vs. VTA, ** $P < 0.01$).

TPH2-tTA 遺伝子改変マウスによる DRN の 5-HT 神経特異的な活性化が報酬関連行動に及ぼす影響

報酬処理に関するDRNの5-HT神経の役割をさらに検討するために、別の遺伝子改変技術を使用して5-HT神経に外的遺伝子を導入した。テトラサイクリン制御性転写活性化因子 (tTA) が5-HT神経に選択的に発現しているTPH2-tTA遺伝子改変マウスに^{56,63,64}、新たに作製したtTA依存性エンハンサーであるTetオペレーター配列 (TetO配列) と光感受性タンパク質を有するAAVをDRNに投射した (図3A)。これらのマウスにおける導入遺伝子の5-HT神経に対する特異性を免疫組織学的検討により評価した。その結果、AAV-TetO-Venus (TetO::Venus) を投与したTPH2-tTAマウスでは、DRNにおいて $95.5 \pm 0.7\%$ のVenus免疫陽性細胞がTPH免疫陽性を示した ($n = 3$, 図3A-D)。さらに $74.5 \pm 3.6\%$ のTPH2免疫陽性細胞がVenus免疫陽性細胞であった ($n = 3$, 図3D)。これらの遺伝子改変マウスを使用してDRNの5-HT神経細胞の活性化が報酬関連行動に及ぼす影響を検討するため、オペラント条件付け試験と条件付け場所嗜好性試験を行った。結果、AAV-TetO-CheRiff-EGFP (TetO::CheRiff) を投与したマウスは、TetO::Venus投与群と比較して3日間連続で有意に多いノーズポーク回数を示した (図3E)。さらに条件付け場所嗜好試験においても、TetO::CheRiff投与マウス群は、TetO::Venus投与群と比較して有意に高いCPPスコアを示した (図3F、G)。以上の結果からTPH2-tTA遺伝子改変マウスを使用し、DRNの5-HT神経を活性化させた場合でも自己刺激行動や場所嗜好性、すなわち報酬関連行動が引き起こされることが明らかとなった。

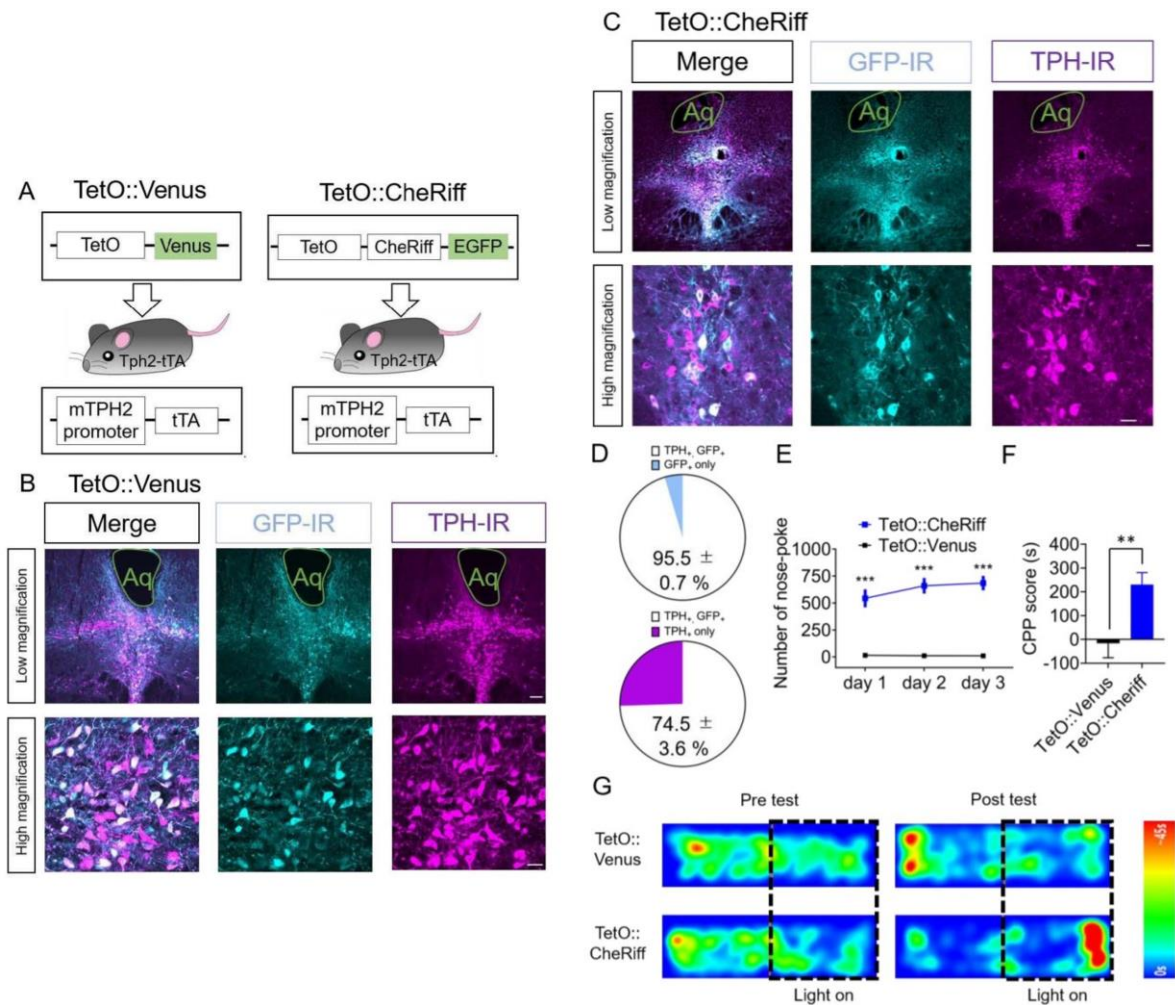


図3 TPH2-tTA 遺伝子改変マウスにおける背側縫線核 (DRN) セロトニン神経 (5-HT) の選択的活性化は自己刺激行動と場所嗜好性を誘発する。

(A) AAV 投与の概略図。

(B,C) TPH2-tTA 遺伝子改変マウスの DRN に TetO::Venus または TetO::CheRiff を投与した。投与 4 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法により観察した。スケールバー = 100 μ m (低倍率)、20 μ m (高倍率)。Aq: 中脳水道

(D) TPH 免疫陽性細胞と GFP 免疫陽性細胞数の測定結果。上: GFP 免疫陽性細胞中の GFP かつ TPH 免疫陽性細胞の割合。下: TPH 免疫陽性細胞中の GFP かつ TPH 免疫陽性細胞数の割合。n = 3、値 = 平均値 \pm 標準誤差

(E) オペラント条件付け試験におけるノーズポーク回数の結果。n = 9 (Venus), 16 (CheRiff)、値 = 平均値 \pm 標準誤差、***P < 0.001 vs. Venus (1 日目: TetO::Venus, 15.4 \pm 6.5, TetO::CheRiff, 544.2 \pm 83.9、2 日目: TetO::Venus, 11.8 \pm 3.6, TetO::CheRiff, 660.4 \pm 72.0、3 日目: TetO::Venus, 10.1 \pm 2.4, TetO::CheRiff, 684.7 \pm 67.5 : two-way repeated-measures ANOVA: Interaction, $F(2, 46) = 2.45$, $P = 0.0972$, Time, $F(1.972, 45.36) = 2.13$, $P = 0.1318$, CheRiff, $F(1, 23) = 44.80$, $P < 0.001$: Bonferroni posttests: day1,2,3, ***P < 0.001)。

(F) 条件付け場所嗜好試験試験における CPP スコアの結果。n = 6 (Venus), 7 (CheRiff)、値=平均値±標準誤差、**P < 0.01 vs. Venus (TetO::Venus, -16.67 ± 60.36 秒, TetO::CheRiff, 230.5 ± 50.1 秒: unpaired t-test: P = 0.0088)。

(G) 自由探索時の軌跡の一例。Pre test: 試験 1 日目、Post test: 試験 4 日目、light on: 光照射を行った区間。

WT: 野生型、IR: 免疫反応性

DRN の 5-HT 神経特異的な光抑制が嫌悪行動に及ぼす影響

最後に、DRN の 5-HT 神経を選択的に阻害した際の嫌悪処理に及ぼす影響を検討した。抑制性の緑色光感受性プロトンポンプである eArchT⁶⁵ を発現する AAV である AAV-TetO-eArchT-eYFP-WPRE (TetO::eArchT) を新たに作製し、TPH2-tTA 遺伝子改変マウスに投与した (図 4A、B)。4 週間後、DRN の 5-HT 神経の選択的抑制が嫌悪処理に与える影響を検討するために条件付け場所嫌悪性試験を行った (図 4A-D)。本試験では条件付け場所嗜好性試験とは異なり、試験 1 日目のプレテスト時に滞在時間が多かった区画に対し緑色光照射下で 20 分間自由に探索させた。その結果、TetO::eArchT 投与群は TetO::Venus 投与群と比較して、CPP スコアが有意に減少した (図 4C、D)。また、DRN の 5-HT 神経の選択的抑制により誘発された嫌悪行動が DRN から VTA へ投射している 5-HT 神経回路によるものかを検討するために、DRN から VTA に投射している 5-HT 神経回路の局所的な抑制を行った際の場所嫌悪性試験を実施した。その結果、TetO::eArchT 投与群は、対照群と比較して CPP スコアが有意に減少した (図 4E-G)。以上の結果から、DRN から VTA に投射している 5-HT 神経回路の活動変化が嗜好/嫌悪のバランスを決定していることが示唆される。

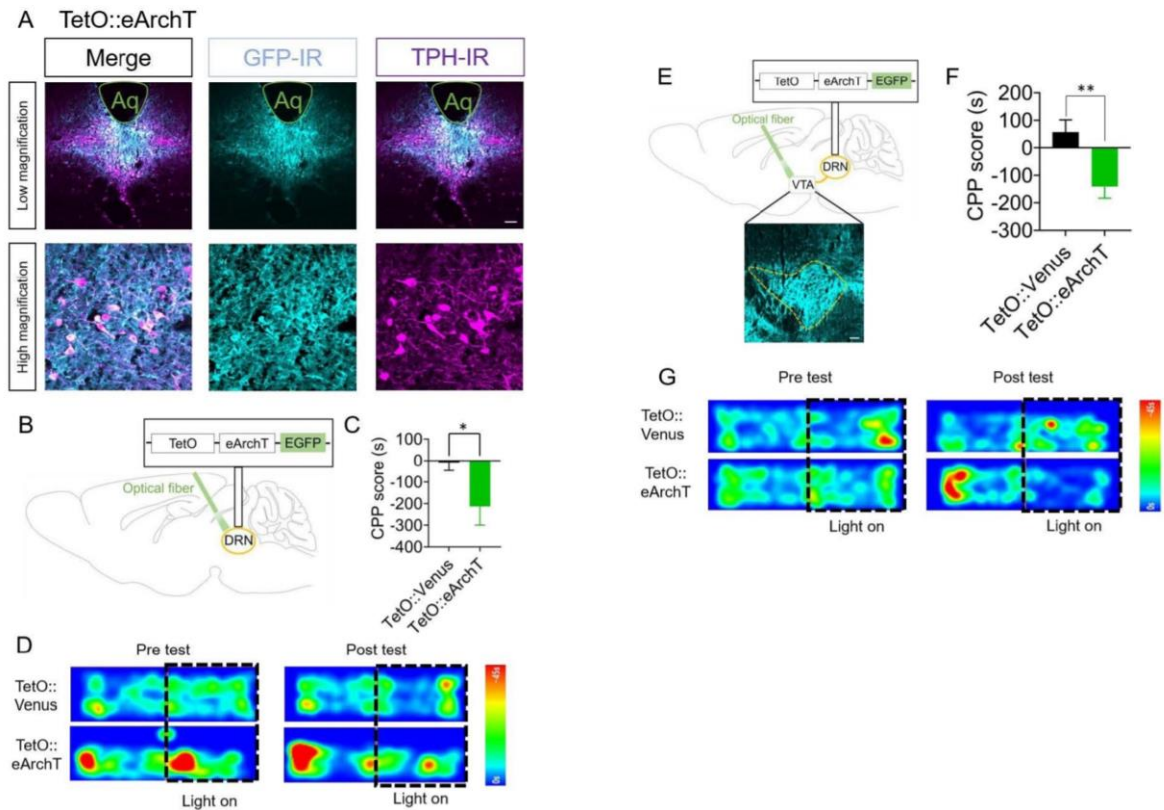


図4 TPH2-tTA 遺伝子改変マウスにおける背側縫線核 (DRN) セロトニン神経 (5-HT) の選択的抑制は場所嫌悪性を誘発する。

(A) TPH2-tTA 遺伝子改変マウスの DRN に TetO::eArchT を投与した。投与 4 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法により観察した。スケールバー = 100 μm (低倍率)、20 μm (高倍率)。Aq: 中脳水道

(B,E) AAV 投与の概略図。

(C,F) 条件付け場所嫌悪性試験における CPP スコアの結果。C: $n = 11$ (Venus), 8 (eArchT)、値=平均値 \pm 標準誤差、* $P < 0.05$ vs. Venus (TetO::Venus, -8.3 ± 38.0 秒, TetO::eArchT, -213.6 ± 85.9 秒: unpaired t -test: $P = 0.028$)。F: $n = 9$ (Venus), 7 (eArchT)、値=平均値 \pm 標準誤差、* $P < 0.01$ vs. Venus (TetO::Venus, 57.3 ± 44.4 秒, TetO::eArchT, -141.1 ± 41.7 秒: unpaired t -test: $P = 0.0067$)。

(D,G) 自由探索時の軌跡の一例。Pre test: 試験 1 日目、Post test: 試験 4 日目、light on: 光照射を行った区間。

IR: 免疫反応性

考察

本章において筆者は 5-HT 神経に対して特異的に遺伝子を導入する 2 つの方法、すなわちマウス TPH2 プロモーターを有する AAV⁹ および TPH2-tTA 遺伝子改変マウス⁵⁶ を用いて、DRN の 5-HT 神経を光遺伝学的に操作することで報酬関連行動に及ぼす影響を検討した。その結果、DRN の 5-HT 神経、あるいは DRN から VTA に投射しているセロトニン神経回路を光活性化することで、光活性と関連付けられた自己刺激行動の強化と条件付け場所嗜好性が誘発されることが明らかとなった。さらに、DRN の 5-HT 神経または DRN から VTA へ投射している 5-HT 神経回路を阻害すると、条件付け場所嫌悪行動が誘発されることも明らかとなった。これらの結果から、DRN から VTA に投射している 5-HT 神経回路が報酬と嫌悪のバランスを調整する主要な因子であることが示唆される。

5-HT は、大うつ病性障害や統合失調症などの精神疾患の病態生理や治療に重要な役割を果たしていることがこれまでの研究より示唆されている。臨床現場では、細胞外 5-HT の再取り込み阻害により 5-HT の神経伝達を促進する薬剤が抗うつ薬として使用されており⁶⁶⁻⁶⁹、マウスやラットを使用した非臨床実験でも、DRN の 5-HT 神経を光遺伝学的に活性化することで抗うつ薬様効果が惹起されることが明らかとなっている^{9,70}。一方で上記の精神疾患に加えて、5-HT 神経が報酬処理に関与していることがこれまでの報告より示唆されている³⁸⁻⁴¹。Liu らは本章とは異なる遺伝子改変技術を使用し、DRN の 5-HT 神経の光活性化が自己刺激の強化や場所嗜好性といった報酬関連行動を誘発するのに十分であることを明らかにした³⁹。最近では、Wang らが同様に本章とは異なる遺伝子改変技術を使用し、DRN から VTA へ投射している 5-HT 神経の光活性化が条件付け場所嗜好性を惹起することを報告している⁴¹。一方、Liu や Wang らが使用した遺伝子改変技術を用いて DRN の 5-HT 神経を光活性化しても、報酬関連行動が惹起されなかったという旨の報告も複数存在しており^{54,55,63,71}、DRN の 5-HT 神経の活動変化が報酬系に与える影響に関しては今後更なる検討が必要である。

2 つの異なる方法を用いて遺伝子導入を試みた本章の研究結果は、DRN の 5-HT 神経の活性化が報酬系に寄与することを明確に示している。しかし筆者らの研究室では以前、本章で使用した同じ TPH2 プロモーターを持つレンチウイルスベクターを使用して DRN の 5-HT 神経の活動を亢進させても、報酬関連行動が惹起されないことを報告した⁹。さらに宮崎らは、TetO 依存性 ChR2 (C128S 変異体) を発現する遺伝子改変マウスと TPH2-tTA 遺伝子改変マウスを交配させることで 5-HT 神経選択的に ChR2 の発現を可能にしたが、これらのマウスに DRN の 5-HT 神経の光刺激を行っても報酬関連行動は誘発されないことを示した⁶³。これらの矛盾は、ePet-Cre マウスを用いた場合でも生じている。Liu らは、ePet-Cre マウスにおいて DRN の 5-HT 神経の活性化

により強い報酬関連行動が誘発されることを示したが、McDevitt らはそうではないことを示した^{39,54}。結果が相反する理由は未だ明らかとなっていないが、1つの可能性としてChR2が発現するコピー数が報酬関連行動の誘発を決定しているのではないかと考えられる。一般に、レンチウイルスベクターの力価は 1×10^{10} /mL程度であり⁹、AAVの力価(1×10^{13} /mL程度)に比べてはるかに低い。またノックインマウスでは、 β -アクチン遺伝子座をノックインすることで高いレベルの導入遺伝子発現が誘導されるもののAAVを用いた場合と比較するとはるかに少ない⁷²。ChR2のコピー数が少ないと考えられるレンチウイルスベクターやノックインマウスを使用した場合に報酬関連行動が惹起されなかったことを考慮すると、矛盾が生じる要因の一つとして考えられる。一方でDRNの5-HT神経は、DRN内に局在する場所によって機能が異なることが示唆されている⁷⁰。本研究では、ブレグマから-4.36 mm ~ -4.72 mmの範囲に主に外的遺伝子を発現させており、上記以外の領域のDRNの5-HT神経を光刺激しても報酬関連行動が生じない可能性も考えられる。さらに、Fonseca らはAAVの血清型の違いがこれらの矛盾に関与している可能性について述べている⁵⁵。Liu らはAAV2/9を使用したのに対し、Fonseca らとMcDevitt らはAAV2/1を使用している^{39,54,55}。本研究で使用したAAVは、血清型2、4、8、9を使用したものであり⁷³、異なる血清型がDRNの5-HT神経のそれぞれの亜集団に遺伝子を導入する可能性も考えられる。

DRNには5-HT作動性、ドパミン作動性、GABA作動性、グルタミン酸作動性といった複数の種類の神経細胞が存在している^{74,75}。さらにDRNの一部の5-HT神経細胞は小胞グルタミン酸トランスポーター3 (VGLUT3)を発現しており^{76,77}、組織学的検討によりVGLUT3陽性5-HT神経細胞は主にDRNの腹側側の領域に存在している一方、VGLUT3陰性の5-HT神経細胞はDRNの背側領域に存在していることが明らかとなっている⁷⁸。またRen らにより腹側領域側の5-HT神経細胞は、主にVTA、LH、NAcに投射していることが報告され⁷⁰、さらにVGLUT3陽性5-HT神経細胞の軸索は、VTAのドパミン神経細胞と興奮性シナプスを形成していることがWang らにより報告された⁴¹。興味深いことにDRNの5-HT神経を光遺伝学的に活性化することで誘発される報酬関連行動は、TPH2やVGLUT3を欠損したマウスで消失することから³⁹、DRNのVGLUT3陽性5-HT神経細胞が5-HT神経が介在する報酬系に重要な役割を果たしていることが考えられる。本研究では、DRNからVTAに投射している5-HT神経回路の活性化によって報酬関連行動が誘発されることが示されたが、グルタミン酸と5-HTの必要性については本研究では追及していない。またDRNからの投射先としてVTA、LH、NAc、CeA、VPの関与を検討したが、他の脳領域に投射されているDRNの5-HT神経回路が、報酬/嫌悪に重要な役割を果たしている可能性も否定できない。一例として、薬物依存性の形成には内側前頭前野 (mPFC) などの脳領域の重要性が指摘されているものの^{57,79,80}、DRNからこれらの脳領域に投射している5-HT神経回路の活動変化が直接報酬処理に関与しているという報告は未だになく、さらなる

行動学的解析が必要である。さらに本研究では DRN の 5-HT 神経を 20Hz の周波数で活性化させた。非ヒト霊長類を用いた報告では、食欲に関連した報酬が DRN の神経細胞の活動を数 Hz から 30Hz 以上に増加させることが示されている⁸¹。これらの報告から本研究における 20Hz での光遺伝学的活性化は、生理的な条件下での活性化を反映していると考えられる。

本章ではさらに、DRNからVTAに投射する5-HT神経回路を光遺伝学的に抑制することで、条件付け場所嫌悪行動を誘発するのに十分であることも明らかにした。報酬と嫌悪のバランスを保つためには、DRNからVTAに投射する5-HT神経回路の活動が必要であることを示したのは、筆者が知る限りでは初めての報告である。一方でVTAのドパミン神経の活動低下により嫌悪反応が誘発されること⁸²、あるいはVTAのドパミン神経の活動を光抑制すると、コカインに対する依存性が低下することがこれまでに報告されている⁸³。DRNからVTAに投射している5-HT神経回路の活動を抑制すると嫌悪行動が惹起されるという本研究の結果を踏まえると、DRNからVTAに投射している5-HT神経回路を選択的に阻害する薬物によって、依存性薬物に対する渴望行動が抑制される可能性が示唆される。一方で本研究では、報酬/嫌悪処理を誘発する詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。過去の知見から、5-HT神経とドパミン神経の相互作用には5-HT_{2A}、2Cおよび5-HT₃受容体が重要な役割を果たしていることが示唆されている^{41,50,84}。さらにLiuらは5-HT_{2A}およびAMPA受容体拮抗薬により、VTAドパミン神経の興奮性が低下することを電気生理学的検討により明らかにした³⁹。また本研究では、VTAに投射するDRNの5-HT神経が嫌悪行動の誘発に重要であることを明らかにしたが、他の脳領域に投射されたDRNの5-HT神経の関与も否定はできない。そのため、VTA以外の脳領域の5-HT神経終末を光遺伝学的に抑制することによる嫌悪処理に関する影響についてはさらなる調査が必要である。

以上、本章ではVTAに投射するDRNの5-HT神経を選択的に光活性化することで自己刺激の増強と条件付け場所嗜好性が誘発されることを明らかにした。さらに同神経回路を抑制することで、条件付け場所嫌悪性が生じることも明らかにした。これらの結果は VTAに投射するDRNの5-HT神経の活動変化が、報酬と嫌悪のバランスを調整するのに重要な因子であることを示唆している。

第三章

抗うつ作用を司る背側縫線核セロトニン神経回路の解明

うつ病は抑うつ症状や興味、快楽の欠如として定義されるアンヘドニアや認知機能障害などを主症状とする精神疾患であり、全世界において重要な健康問題の一つとして考えられている⁸⁵。うつ病患者の治療には主に、選択的セロトニン (5-HT) 再取り込み阻害薬 (SSRI) などの抗うつ薬が第一選択薬として広く用いられていることから、うつ病の発症あるいは治療においてセロトニン神経系が中心的な役割を果たすことが示唆されている^{66-68,86,87}。基礎研究では、非ストレス負荷マウスの背側縫線核 (DRN) に存在するセロトニン神経の活性化により、抗うつ薬様作用が引き起こされることが報告されている^{9,88}。しかし上記の研究が明らかにした知見は、DRN のセロトニン神経の活動亢進が健康な状態における急性のストレスに対する抵抗性を示すというものであり、うつ様状態からの回復に寄与するといったものではない。実際非ストレス負荷マウスではうつ様行動の低下が抗うつ薬の急性投与でもみられるものの、うつ病患者における薬効の発現には数週間にわたる慢性投与が必要であり、作用発現における時間的乖離が問題となっている^{9,89,90}。一方で社会的敗北ストレス (CSDS) は、うつ病モデルマウスとして広く使用されている病態モデル動物である。この病態モデルでは、10 日間の繰り返しの物理的な攻撃により、体重の減少や持続的な社会的逃避行動などを示すいわばストレス感受性マウスが一定数生じる一方で、繰り返しのストレスに対してこれらの症状を示さないストレス抵抗性マウスも存在する^{91,92}。またストレス感受性マウスは急性ではなく慢性的な抗うつ薬の投与により、上記の症状が改善することが報告されている^{93,94}。以上のように、ストレスに対する反応に多様性が生じていることあるいは抗うつ薬の薬効発揮までの時間的乖離が生じていないことなどから、CSDS マウスはヒトのうつ病患者への外挿性が高い病態モデルマウスであると考えられている。加えて、セロトニン神経の活動変化が繰り返しのストレスに対する反応性の決定あるいは、ストレス感受性マウスにおけるうつ様状態からの回復に寄与することがこれまでの研究より明らかとなっている。Challis らは、社会的敗北ストレスに対して脆弱な個体は、ストレスに対して抵抗性を示すあるいはコントロール個体と比較して、DRN のセロトニン神経の興奮性が有意に減少していることを明らかにした。また、ストレス感受性個体でみられるうつ様行動は DRN の GABA 作動性神経の光遺伝学的抑制によって誘発される DRN のセロトニン作動性神経の脱抑制により、改善されることも明らかにした⁹⁵。さらに Zou らにより、CSDS 誘発ストレス感受性マウスは DRN から腹側被蓋野 (VTA) に投射しているセロトニン作動性神経 (5-HT^{DRN→VTA}) の発火頻度が減少していることが報告された⁹⁶。しかし 5-HT^{DRN→VTA}

に引き続き、どの脳領域のどのような神経メカニズムで、抗うつ薬様行動が惹起されているのかは明らかになっていない。

海馬は、感情や認知的側面の調整に重要な役割を果たしていると考えられている⁹⁷⁻⁹⁹。臨床研究においてうつ病患者では、肯定的な過去の出来事を上手く思い出すことができず、その逆に否定的な出来事に対する感受性が上昇していることが報告されている¹⁰⁰⁻¹⁰⁴。実際、うつ症状の改善を目的として肯定的な出来事を繰り返し思い出すという治療法が広く普及している¹⁰⁵⁻¹⁰⁸。一方、齧歯類を使用した近年の基礎研究から、海馬の歯状回に存在する特定の経験時に活性化した神経細胞集団が、その経験時と似たようなあるいはその一部の条件提示により再活性化することで、記憶の呼び起こしが生じるという仮説が提唱されており、この神経細胞集団は「エンGRAM細胞」として報告されている¹⁰⁹⁻¹¹¹。またこの10年間で、電気ショック負荷時などの特定の条件下で活性化した神経細胞を明らかにし、蛍光タンパク質などでそれらの神経細胞を標識する技術の飛躍的発展がもたらされた。さらに、電気ショック負荷などの恐怖記憶と関連付けられた神経細胞（エンGRAM細胞）を人工的に再活性化させることで、顕著な逃避行動が惹起されることが報告されている¹¹²⁻¹¹⁶。他方、うつ病態の形成や改善とエンGRAM細胞の関連性に着目した研究例も存在している¹¹⁷⁻¹¹⁹。**Ramirez**らは、過去の快感経験（雌マウスとの接触）時に活性化した海馬の神経細胞集団（快記憶エンGRAM細胞）を人工的に再活性化させることで、マウスのうつ様症状が改善し、再活性化をやめると同時に抗うつ薬様行動が消失することを報告した¹²⁰。この表現型はDRNのセロトニン神経の活性化による抗うつ薬様行動の誘発が、光活性化時のみ生じるという当研究室の過去の知見と類似したものである⁹。また**Ramirez**らは、10日間の拘束ストレスを負荷した後5日間、過去の快感経験時に活性化した神経細胞を再活性化することで、持続的な抗うつ薬様行動が惹起されることも併せて報告した¹²⁰。同様の表現型として、10日間のCSDSに引き続き、5日間の5-HT^{DRN→VTA}局所的な活性化を行うことで、うつ様行動の改善が誘発されることが**Zou**らにより報告されている⁹⁶。このように活性化時の表現型が極めて類似していることから、セロトニン神経の活動変化と海馬のエンGRAM細胞の間に何らかの関係性が存在することが示唆されるが、この両者の関連性を直接検討した報告は存在しない。

本研究では、第二章で作製したセロトニン合成の律速酵素である tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) のプロモーター配列を有したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を使用し、DRNあるいはDRNからVTAに投射しているセロトニン作動性神経特異的な活性化が抗うつ薬様行動を引き起こすのに十分であるかについて検討を行った。さらに、タモキシフェン (TAM) 依存性のCreレコンビナーゼ活性化システム (CreER^{T2}) を使用し¹²¹⁻¹²³、特定の経験時に活性化した海馬の歯状回の神経細胞に赤色蛍光タンパク質である mCherry を発現させた。その後、DRNのセロトニン神経あるいはDRNからVTAに投射しているセロトニン神経回路の活性化と、上記のエン

グラム細胞の再活性化との関連性について検討を行った。その結果、10日間のCSDSを負荷した後、5日間、DRNのセロトニン神経あるいは5-HT^{DRN→VTA}の局所的な活性化を行うことで持続的な抗うつ薬様作用が生じること、DRNのセロトニン神経あるいは5-HT^{DRN→VTA}の局所的な活性化により快感経験時に活性化した海馬歯状回の神経細胞の再活性化が優先的に引き起こされることが明らかになった。また薬理的な検討から、5-HT^{DRN→VTA}の局所的な活性化による抗うつ薬様効果および快感経験時に活性化した海馬歯状回の神経細胞の優先的な活性化は、ドパミン神経伝達を介在したものであることが明らかとなった。これらの結果は、セロトニンがいかんして抗うつ効果をもたらしているのかに関する新たな知見を与えるものである。

実験方法

1) 実験動物

実験にはC57BL/6J系マウス(6-9週齢: Japan SLC, Shizuoka, Japan)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」を遵守して行われた。

2) タイムコース

行動実験のタイムコースは全て図1に記載した。

図1Aにおいて、すべてのマウスの背側縫線核(DRN)にAAV-mTPH2-Venus、あるいはAAV-mTPH2-CheRiff-eGFPのウイルスベクターを投与し、海馬の歯状回(dDG)にAAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2}とAAV-CMV-DIO-mCherryを投与した。AAVの投与4週間後、DRNに光ファイバーカニューレを挿入した。dDGのエンングラム細胞の標識づけ、社会的敗北ストレス(CSDS)、DRNの5-HT神経の特異的な活性化を行った後、オープンフィールド試験、社会的相互作用試験、尾懸垂試験の行動試験を実施した。これらの行動試験の結果を図2に記載した。行動試験終了の翌日に再びDRNの5-HT神経を特異的に活性化させ、その90分後に経心灌流を行った。その後dDGを含む凍結冠状切片を作製し、免疫染色法によりc-fos、mCherry、c-fosかつmCherry、あるいはDAPI陽性細胞数を測定した。これらの組織学的検討の結果を図4に記載した。

図1Bにおいて、すべてのマウスのdDGにAAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2}と

AAV-CMV-DIO-mCherry、あるいは AAV-CMV-DIO-ChETA-eYFP を投与した。AAV の投与 4 週間後、dDG に光ファイバーカニューレを挿入した。快感経験時に活性化した dDG の神経細胞の標識づけ、CSDS、dDG の快記憶エンングラムの再活性化を行った後、オープンフィールド試験、社会的相互作用試験、尾懸垂試験の行動試験を実施した。これらの行動試験の結果を図 3 に記載した。行動試験終了の翌日に再び dDG の快記憶エンングラムを再活性化させ、その 90 分後に経心灌流を行った。その後 DRN を含む凍結冠状切片を作製し、免疫染色法により c-fos、TPH2、c-fos かつ TPH2、あるいは DAPI 陽性細胞数を測定した。これらの組織学的検討の結果を図 5 に記載した。

図 1C において、すべてのマウスの DRN に AAV-mTPH2-Venus、あるいは AAV-mTPH2-CheRiff-eGFP のウイルスベクターを投与し、dDG に AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} と AAV-CMV-DIO-mCherry を投与した。AAV の投与 4 週間後、VTA に光ファイバーカニューレを挿入した。dDG のエンングラム細胞の標識づけ、CSDS、DRN から VTA に投射している 5-HT 神経の局所的な活性化を行った後、オープンフィールド試験、社会的相互作用試験、尾懸垂試験の行動試験を実施した。行動試験終了の翌日に、再び DRN から VTA に投射している 5-HT 神経を局所的に活性化させ、その 90 分後に経心灌流を行った。その後 dDG を含む凍結冠状切片を作製し、免疫染色法により c-fos、mCherry、c-fos かつ mCherry、あるいは DAPI 陽性細胞数を測定した。これらの行動試験の結果、組織学的検討の結果を図 6 に記載した。

図 1D において、すべてのマウスの DRN に AAV-mTPH2-CheRiff-eGFP のウイルスベクターを投与し、dDG に AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} と AAV-CMV-DIO-mCherry を投与した。AAV の投与 4 週間後、VTA に光ファイバーカニューレを挿入した。快感経験時に活性化した dDG の神経細胞の標識づけの後 CSDS を負荷した。その後、D1 受容体拮抗薬である SCH23390 (0.1mg/kg) と D2 受容体拮抗薬である raclopride (2mg/kg) の混合薬 (D1+D2)、あるいは saline を腹腔内に投与した 20 分後に DRN から VTA に投射している 5-HT 神経の局所的な活性化を行った。光刺激終了後、オープンフィールド試験、社会的相互作用試験、尾懸垂試験の行動試験を実施し、行動試験終了の翌日に、再び D1 受容体拮抗薬である SCH23390 (0.1mg/kg) と D2 受容体拮抗薬である raclopride (2mg/kg) の混合薬 (D1+D2)、あるいは saline (vehicle) を腹腔内に投与し、その 20 分後 DRN から VTA に投射している 5-HT 神経を局所的に活性化させた。90 分後に経心灌流を行い、dDG を含む凍結冠状切片を作製し、免疫染色法により c-fos、mCherry、c-fos かつ mCherry、あるいは DAPI 陽性細胞数を測定した。これらの行動試験の結果、組織学的検討の結果を図 8 に記載した。

3) ウイルスベクターの構築と AAV の作製

AAV-mTPH2-Venus と AAV-mTPH2-CheRiff-EGFP のウイルスベクターは、第二章で作製したものを使用した。AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} のウイルスベクターは、大阪大学から

寄贈されたものを使用した。AAV-CMV-DIO-ChETA-eYFPの構築は、以下のように行った。ChETA-eYFP断片は当研究室で報告した論文で作製したウイルスベクター⁹からPCRで増幅し、CMVプロモーター断片は、pFUW-CMV-DIO-Magneto2.0-sNRpA (Addgene, 74307) からPCRで増幅し、pAAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry (Addgene, 44361) にライゲーションした。AAV-CMV-DIO-mCherryの構築は、以下のように行った。CMVプロモーター断片は、pFUW-CMV-DIO-Magneto2.0-sNRpA (Addgene, 74307) からPCRで増幅し、pAAV-hSyn-DIO-mCherry⁵⁷にライゲーションした。またAAVの精製は第二章で記載した方法と同様の方法で実施した。

4) 脳定位手術

脳定位手術は小動物用脳定位固定装置に固定し、脳アトラス¹⁹に従って行った。ペントバルビタール (50 mg/kg)、3%イソフルラン (Escain, Pfizer, Tokyo, Japan)、あるいは三種混合麻酔 {メデトミジン (0.3 mg/kg) (11747, Kyoritsu seiyaku, Tokyo, Japan)、ミダゾラム (4.0 mg/kg) (59467-70-8, FujiPharma, Tokyo, Japan)、ブトルファノール (5.0 mg/kg) (222866132, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan)}¹²⁴麻酔下で、AAV-mTPH2-Venusあるいは AAV-mTPH2-CheRiff-eGFPをDRN (ブレグマよりAP -4.3 mm、ML +1.2 mm、DV +3.6 mm、20°C) にそれぞれ1 μ L投与した。また、AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2}かつ AAV-CMV-DIO-mCherry、あるいはAAV-CMV-DIO-ChETA-eYFPをdDG (ブレグマよりAP -1.8 mm、ML +0.8 mm、DV +2.2 mm) にそれぞれ0.4 μ Lずつ投与した。光照射を行うため、ウイルス投与の4週間後、光ファイバーカニューレの先端が標的領域の背側境界のすぐ上に来るように、マウスにカニューレを埋め込んだ。光ファイバーカニューレの埋め込みには以下の座標を使用した。DRN (ブレグマよりAP -4.3 mm、ML +1.2 mm、DV +3.3 mm、20°)、VTA (AP -3.4 mm、ML \pm 0.5 mm、DV +4.3 mm)、dDG (AP -1.8 mm、ML \pm 0.8 mm、DV +2.0 mm)。特定の条件下で活性化したdDGの神経細胞を標識する前に少なくとも7日間、脳定位手術からの回復のためにマウスを単飼いし、以降経心灌流を行うまで単飼いで飼育し続けた。

5) エングラム細胞の標識

図2、4、6において、実験に使用するマウスをタモキシフェン (TAM) (T006000, Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) 投与時に体験する特定の経験の種類によって以下の3つのグループに無作為に割り当てた。快感経験 (雌マウスへの曝露、Positive群)、中立経験 (新規ケージの探索、Neutral群)、不快経験 (単回の社会的敗北ストレス、Negative群)。快感経験: 雄マウスのホームケージに雌マウスを1匹 (生後30-40日) 導入し、雄マウスと雌マウスを2時間自由に接触させた。中立経験: 雄マウスをケージのふたが透明な新しいプラスチック製のケージに入れて2時間放置した。1日目、タモキシフェンを投与していない状態でPositive群とNegative群に分類されたマ

ウスに新規ケージの探索を、Neutral群に分類されたマウスに快感経験を体験させた。2日目、TAMを30 mg/mLの濃度でコーン油 (CAS: C8267-500ML, Sigma-Aldrich) に溶解し、Positive群とNeutral群のマウスの腹腔内にそれぞれ3 mgずつ投与した。TAM投与の6時間後、Positive群とNegative群に分類されたマウスは快感経験を、Neutral群に分類されたマウスは中立経験を体験させた。その後すべてのマウスは2日目のそれぞれの経験を体験した後72時間、ホームケージで静かに過ごした。5日目、TAMを30 mg/mLの濃度でコーン油に再び溶解し、Negative群のマウスの腹腔内に3 mg投与した。TAM投与の6時間後、全てのマウスに社会的敗北ストレスを負荷した。この単回の社会的敗北ストレスは、10日間の社会的敗北ストレスの1日目としてみなした。図3、5、8において実験に使用するマウスは全てPositive群に分類した。

6) 社会的敗北ストレス (CSDS)

社会的敗北ストレスは過去の報告¹²⁵に従って実施した。単飼いしていたC57BL/6マウスをICRマウスのホームケージに導入し、1日5分間ICRマウスと接触させた。CSDSの1日目は、エンGRAM細胞の標識の項の5日目に相当し、その後すべてのマウスに9日間連続 (計10日間) で社会的敗北ストレスを与え続けた。ICRマウスの攻撃性のばらつきを最小限にするため、C57BL/6マウスとICRマウスの組み合わせは毎日変更した。社会的相互作用試験は、後述の*In vivo*光遺伝学操作後に実施した。

7) *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セラミックフェルルールおよび、プラスチック光ファイバーを用いて作製した。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を介して、光ファイバーパッチコードに接続した。ダイオード励起固体 (DPSS) レーザー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、電気刺激装置を用いて駆動した。CSDSを実施した後、AAV-mTPH2-VenusおよびAAV-mTPH2-CheRiff-eGFPを投与した図2、4、6において、青色光の照射を1日2回、計5日間実施した (473nm、5mW、10ms、20Hz、20秒オン/10秒オフ)。

AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2}とAAV-CMV-DIO-mCherryまたはAAV-CMV-DIO-ChETA-eYFPを投与した図3、5において、青色光の照射を1日2回、計5日間実施した (473nm、10mW、15ms、20Hz)。光刺激の最終日の翌日から行動試験を実施した。

8) 拮抗薬の投与と光遺伝学操作

図8では、ドパミン (DA) D1受容体拮抗薬であるSCH23390 (0.1mg/kg) (CAS: 125941-87-9, Sigma-Aldrich) とDA D2受容体拮抗薬であるraclopride (2mg/kg) (CAS: 84225-95-6, ab120563, abcam) を0.5%ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む生理食

塩水に溶解した。薬理的介入を伴う光活性化では、体重の1%に相当する量のvehicle (0.5%DMSOを含む生理食塩水) または上記の混合薬を腹腔内に投与し、その20分後に青色光を照射した (473nm、5mW、10ms、20Hz、20秒オン/10秒オフ)。このサイクルを1日2回、計5日間実施した。光刺激の最終日の翌日から行動試験を実施した。

9) 行動試験

オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は以前の報告⁹に記載した方法に従って実施した。白色の亚克力製試験箱 (50×50×50 cm) からなるオープンフィールドを中央部 (25×25 cm) と周辺の外側部に分けた。マウスを試験箱の中心に置き、10分間自由に探索させ、ビデオカメラで軌跡を記録した。記録した動画はビデオ追跡システム (ANY-maze ver4.99, Stoelting, Wood Dale, USA) を用いて自動で分析し、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。

社会的相互作用試験

社会的相互作用試験は以前の報告¹²⁵に記載した方法に従って実施した。まず試験環境への慣れのために、試験箱の片隅に空の金網のケージ (10×6.5 cm) を配置した白色の亚克力製試験箱 (50×50×50 cm) 内にマウスを入れ150秒間自由に探索させた。この時のセッションをNo targetセッションとして定義した。次にICRマウスを入れた金網のケージを先ほどと同じ位置に配置した白色の亚克力製試験箱内に再びマウスを入れ、150秒間自由に探索させた。この時のセッションをTargetセッションとして定義した。マウスの行動はビデオカメラで記録し、記録した動画はビデオ追跡システムを用いて自動で分析し、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。金網ケージの周囲 (14×24 cm) をinteraction zoneとして定義し、各セッションにおけるinteraction zoneにおける滞在時間を測定した。Social interaction ratioは、金網ケージにICRマウスが存在している状態 (Targetセッション) でのinteraction zone滞在時間を、金網ケージにICRマウスが存在していない状態 (No targetセッション) でのinteraction zone滞在時間で割ることで算出した。

尾懸垂試験

尾懸垂試験は、以前の報告⁹に記載した方法に従って行った。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 (PowerLab 2/26, AD Instruments, Dunedin, NZ) に接続し、無動時間を6分間記録した。

10) 単回の光遺伝学的操作と免疫染色

行動試験終了日の翌日、全てのマウスに対して再び単回の光照射を行った。図2、4、6において、AAV-mTPH2-VenusあるいはAAV-mTPH2-CheRiff-eGFPを投与したマウスは5分間の光照射 (473nm、5mW、10ms、20Hz、20秒オン/10秒オフ)、図3、5において、AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} かつ AAV-CMV-DIO-mCherry あるいは AAV-CMV-DIO-ChETA-eYFPを投与したマウスは15分間の光照射 (473nm、10mW、15ms、20Hz)、図8において、AAV-mTPH2-CheRiff-eGFPを投与したマウスはSCH23390 (0.1mg/kg) およびraclopride (2mg/kg)、あるいはvehicleを投与した20分後に5分間の光照射 (473nm、5mW、10ms、20Hz、20秒オン/10秒オフ) を実施した。光活性化の90分後、マウスをペントバルビタール (50 mg/kg) あるいは三種混合麻酔 (メドトミジン (0.3 mg/kg)、ミダゾラム (4.0 mg/kg)、ブトルファノール (5.0 mg/kg))で深く麻酔し、PBSおよび4%パラホルムアルデヒドを経心灌流した。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)、ヒツジポリクローナル抗TPH2抗体 (1:200)、マウスモノクローナル抗c-fos抗体 (1:500: NBP2-50037, Novus Biologicals, CO, USA)、ウサギポリクローナル抗DsRed抗体 (1:500: Cat:632496, TaKaRa, Shiga, Japan)、およびウサギポリクローナル抗チロシンキナーゼ (TH) 抗体 (1:200: AB152, 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)、Alexa Fluor 594標識ロバ抗ヒツジIgG (1:200)、あるいはAlexa Fluor 488または594標識ロバ抗マウスIgG (1:200) 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、Fluoromount/Plus (CA 94588, Diagnostic Biosystems, USA) あるいはDAPI Fluoromount-G (0100-20, Southern Biotech, AL, USA) を用いてガラス上に封入した。免疫蛍光は、レーザー走査共焦点顕微鏡法を用いて撮影した。画像はレーザー走査型共焦点顕微鏡で低倍率 (X10) と高倍率 (X60) で撮影し、FV10i-SWソフトウェアとImageJソフトウェア (National Institutes of Health, MD, USA) で処理した。全てのAAVの発現位置と光ファイバーカニューレの挿入位置は、免疫組織化学的手法により確認した。AAVの発現効率や光ファイバーカニューレの挿入に失敗したマウスから得られた行動試験と組織学的検討の結果は、除外した。また使用する動物の数は、これまでの報告に基づき、十分な統計的検出力が得られるように決定した。

11) 細胞数の計測

細胞数の計測に使用した画像は全てレーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて、60倍の対物レンズを通して取得し、FV10i-SWソフトウェアおよびImageJソフトウェアで処理した。c-fos、mCherry、GFPおよびTPH2発現細胞数は少なくとも3つの異なる画像で定

量化し、全画像間の細胞数を平均化した。

12) 統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で標記した。統計解析はGraphPad Prism (バージョン8 および9) で実施した。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Tukey's multiple comparisons testにより、two-way repeated measures ANOVAはSidak's multiple comparisons testにより解析した。 $P < 0.05$ の差を有意であると見なした。また、各集団間の等分散性は*F*-testsあるいはBartlett testsを用いて解析した。等分散性は図2B左、2D、3E左、3H右、6G左を除いて全ての図において等しかった。そのため図2B左、2D、3E左、3H右、6Gはwelch検定を使用した。

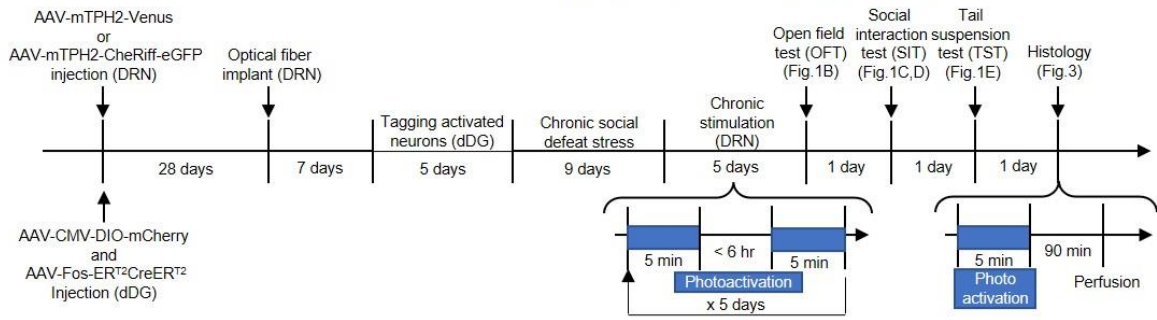
実験結果

DRN の 5-HT 神経特異的な活性化により社会的敗北ストレス誘発うつ様症状の持続的な改善が生じる

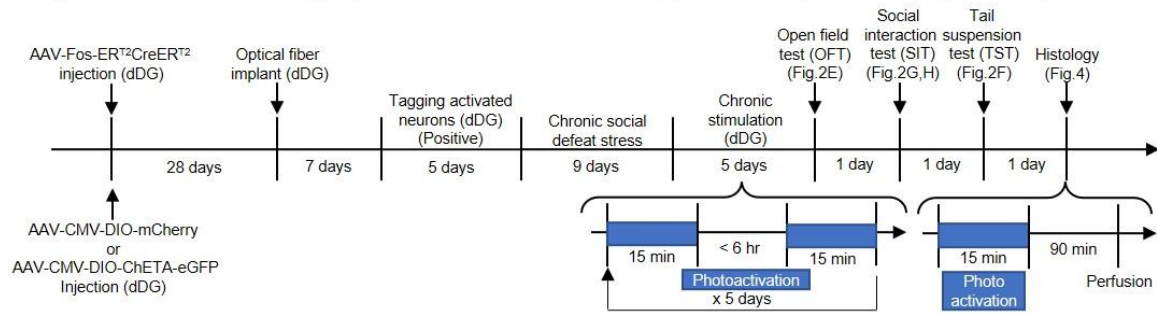
まず初めに社会的敗北ストレスを負荷したマウスにおいて、DRN の 5-HT 神経特異的な活性化が抗うつ薬様効果を誘発するのに十分であるかを評価した。一連の行動実験のタイムコースを図 1A に示した。DRN の 5-HT 神経の光遺伝学的制御のため、AAV-mTPH2-CheRiff-eGFP および AAV-mTPH2-Venus をマウスの DRN に投与し、4 週間後に光ファイバーカニューレをその先端が DRN の背側境界部の真上に位置するように埋め込んだ。免疫組織化学的検討の結果、DRN 内に多数の eGFP および Venus 免疫陽性細胞が確認され、その大多数が TPH2 陽性であった (図 2A)。次に社会的敗北ストレス^{92,125}を 10 日間連続で負荷した後 (CSDS)、1 日 2 回 (波長: 20 Hz、照射時間: 10ms、照射サイクル: 20 秒 on-10 秒 off、先端出力: 5 mw、照射時間: 5 分間) 計 5 日間、青色光を照射することで DRN の 5-HT 神経特異的な活性化を行った。光刺激終了の翌日から、行動量と不安量を評価する試験であるオープンフィールド試験、社交性を評価する試験である社会的相互作用試験、無力感を評価する試験である尾懸垂試験を実施した。オープンフィールド試験の結果、運動活性の指標である総移動距離および抗不安状態の指標である中央部滞在時間に両群間で有意な差は見られなかった (図 2B)。一方で社会的相互作用試験において、CSDS を負荷したのち慢性的に DRN の 5-HT 神経の活性化を受けたマウス (CheRiff 群) は、陰性対照群である Venus 群と比較して標的マウス存在下における interaction zone 滞在時間の延長および social

interaction ratio の上昇を呈した (図 2C、D)。さらに尾懸垂試験においても CheRiff 群の無動時間は Venus 群のそれより有意に減少していた (図 2E)。これらの結果は慢性的に DRN の 5-HT 神経の活動性を亢進させることで、CSDS 誘発うつ様症状の緩和が引き起こされることを示唆している。

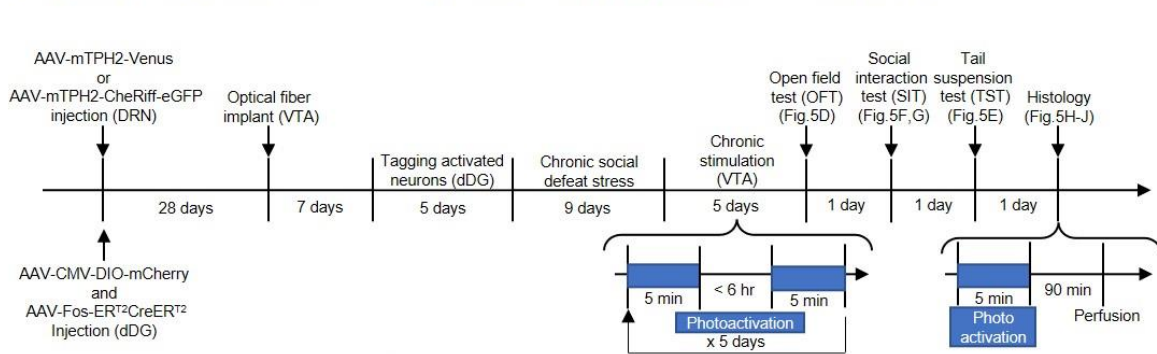
A Optical activation of DRN 5-HT neurons + tagging engram cells (Figure 2,4)



B Optical activation of tagging activated neurons during positive experience (Figure 3,5)



C Optical activation of 5-HT^{DRN}→VTA pathway + tagging engram cells (Figure 6)



D Optical activation of 5-HT^{DRN}→VTA pathway with blocked the function of dopaminergic neurons + tagging engram cells (Figure 8)

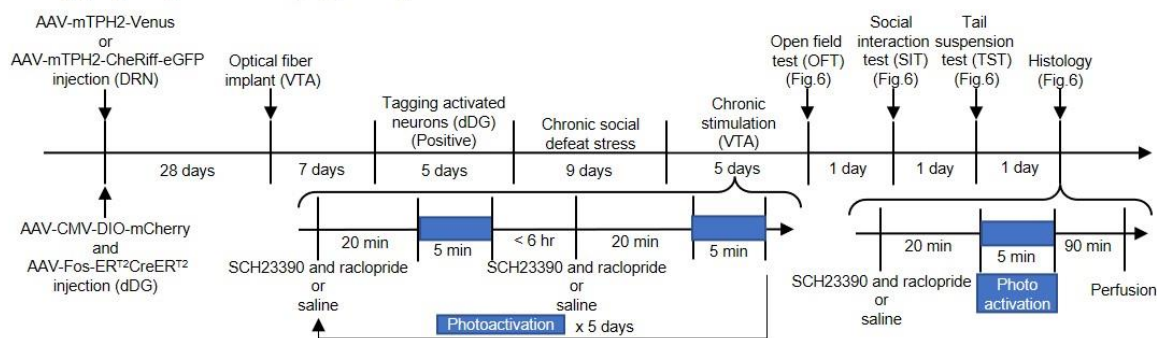


図1 本章における実験計画。

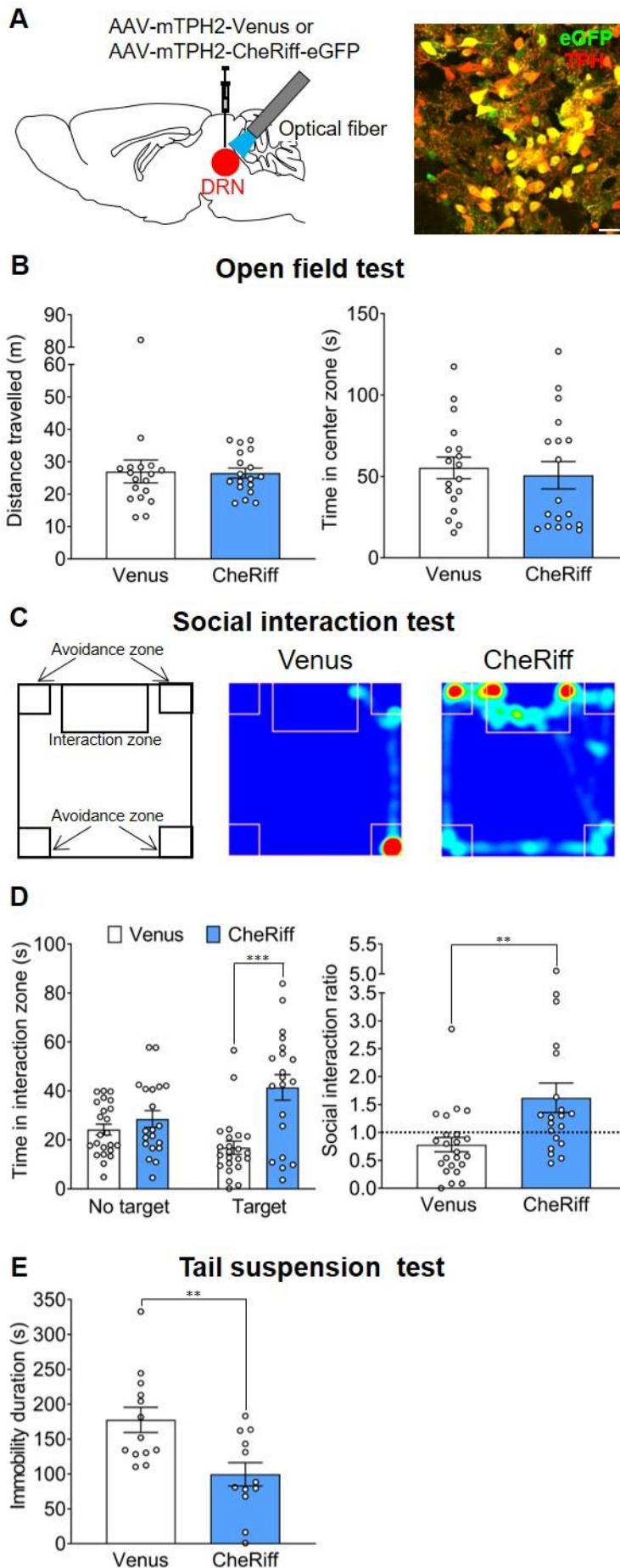


図2 DRNの5-HT神経の活性化によりCSDS誘発うつ様症状が改善する。

(A) 左: AAV-mTPH2-Venusあるいは

AAV-mTPH2-CheRiff-eGFPをDRNに注入した。右: eGFPとTPHの発現確認。スケールバー = 20 μm 。

(B) 運動活性と不安量をオープンフィールド試験で検討した。DRNの5-HT神経の光活性化を行った翌日に総移動距離と中央部の滞在時間を測定した。左: 総移動距離。

Two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction (Venus vs CheRiff), $t_{23,21} = 0.1369$, $P = 0.8923$, 右: 中央部滞在時間。Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_{34} = 0.4231$, $P = 0.6749$, $n = 18$ (Venus) and (CheRiff)。

(C, D) 社会的逃避行動の影響を社会的相互作用試験で検討した。DRNの5-HT神経の光活性化を行った2日後に試験を行った。(C): Targetセッションにおける軌跡の一例。(D) 左: interaction zone 滞在時間の結果。Two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction (Venus vs CheRiff in Target session), $t_{28,48} = 4.190$, $***P = 0.0002$, 右: social interaction ratio の結果。Two-tailed

unpaired *t*-test with Welch's correction (Venus vs CheRiff), $t_{27.68} = 2.857$, $**P = 0.0080$, $n = 23$ (Venus) and 20 (CheRiff)。

(E) 無力感に対する影響を尾懸垂試験で検討した。DRN の 5-HT 神経の光活性化を行った 3 日後に試験を行った。Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_{23} = 3.147$, $**P = 0.0045$, $n = 13$ (Venus) and 12 (CheRiff)。

値=平均値±標準誤差

快感経験時に活性化した歯状回の神経細胞の再活性化は社会的敗北ストレス誘発うつ様症状を改善する

一連の行動実験のタイムコースを図 1B に示した。特定の経験時に活性化した海馬歯状回 (dDG) の神経細胞を標識するために、タモキシフェン依存性 Cre レコンビナーゼ活性化システムを使用した¹²⁶。タモキシフェン依存性 Cre レコンビナーゼを神経活動性マーカーである *c-fos* 遺伝子のプロモーター下で発現する AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} および CMV プロモーター制御下で Cre 活性依存的に赤色蛍光タンパク質である mCherry を発現する AAV-CMV-DIO-mCherry、あるいは青色光により神経活動を亢進させ得る ChETA-eYFP を発現する AAV-CMV-DIO-ChETA-eYFP を dDG に投与した (図 3A)。AAV を投与した 4 週間後に、光ファイバーカニューレの先端が dDG の背側境界部の真上に位置するように埋め込んだ。数日後タモキシフェン (3 mg/マウス) をマウスの腹腔内に投与し、その 6 時間後に代表的な快経験である雌マウスとの接触を行った (図 3B)。タモキシフェン非投与マウスの dDG では mCherry および eYFP の発現が観察されなかったのに対して、タモキシフェン投与マウスでは多数の mCherry あるいは eYFP の発現が観察された (図 3C、D)。以上の結果から、Cre の活性化はタモキシフェンにより制限されていることが示唆される。次にこの技術を使用し、快経験時に活性化した dDG の神経細胞 (快記憶エングラム) を再活性化することで、CSDS 誘発うつ様行動が改善するかの検討を行った。CSDS を 10 日間負荷した後、光照射により 1 日 2 回、計 5 日間 (20Hz、15ms、5 mw、15 分間) の dDG の快記憶エングラムの再活性化を行った。光刺激終了の翌日から、オープンフィールド試験、社会的相互作用試験および尾懸垂試験を行った。オープンフィールド試験における総移動距離および中央滞在時間には両群間で有意な差は観察されなかった (図 3E)。一方で社会的相互作用試験において、dDG の快記憶エングラムの再活性化を受けたマウス群 (ChETA 群) は、標的マウス存在下における interaction zone 滞在時間の延長および social interaction ratio の上昇を呈した (図 3G、H)。さらに尾懸垂試験においても、快記憶エングラムの再活性化を受けたマウス群 (ChETA 群) では無動時間の有意な減少が観察された (図 3F)。これらの結果は快記憶の想起によってうつ様症状が改善するというを示唆している。

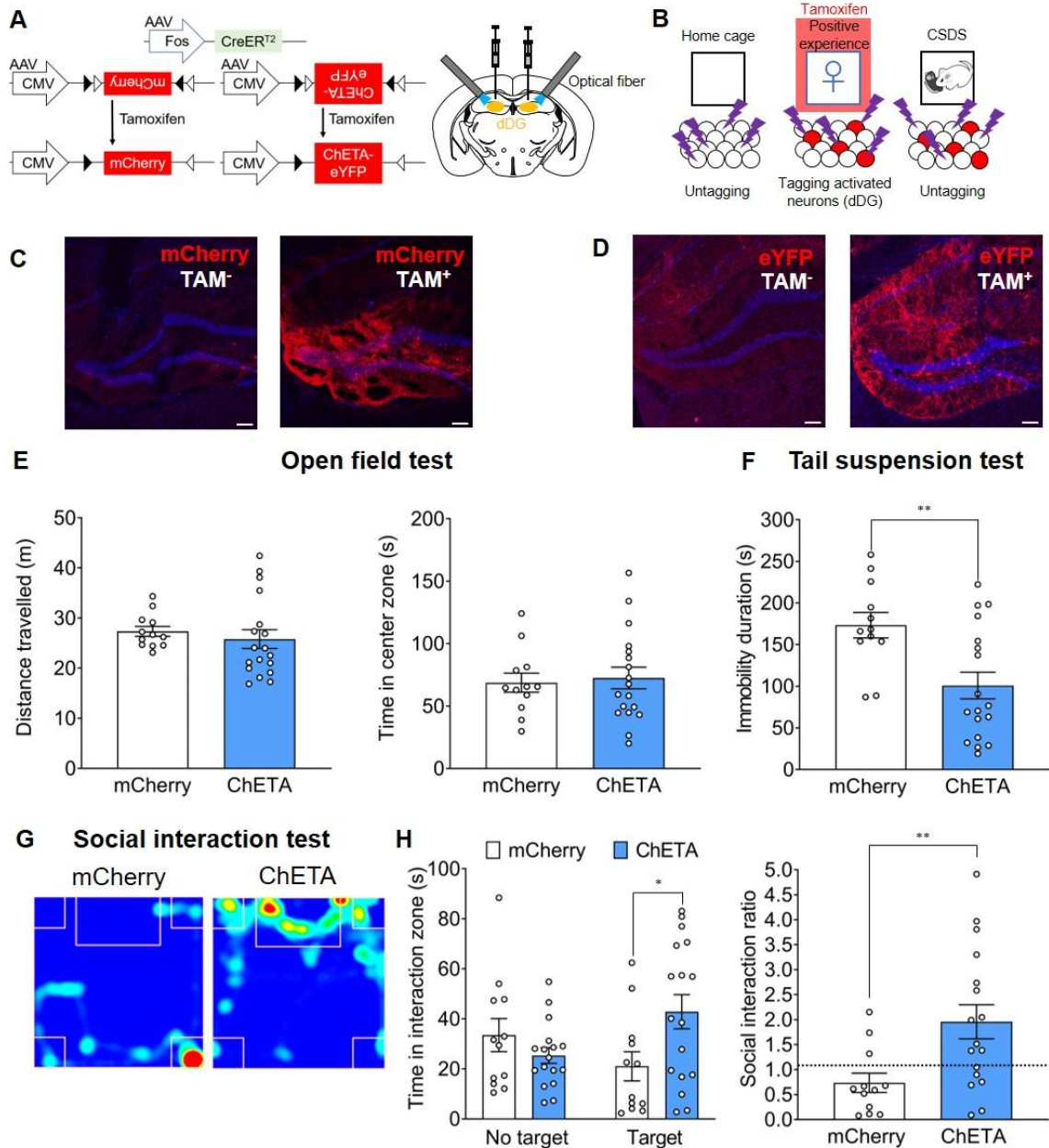


図3 dDGの快記憶エンGRAM細胞の再活性化によりCSDS誘発うつ様症状が改善する。

(A, B) AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2}かつAAV-CMV-DIO-mCherryまたはAAV-CMV-DIO-ChETA-eYFPをdDGに注入した。

(B) 雌マウスと接触を行う6時間前に、タモキシフェン(3mg/マウス)を腹腔内に投与した。

(C) mCherryの発現例。左: タモキシフェン非投与時、右: タモキシフェン投与時。スケールバー=100μm。

(D) eYFPの発現例。左: タモキシフェン非投与時、右: タモキシフェン投与時。スケールバー=100μm。

(E) 運動活性と不安量をオープンフィールド試験で検討した。dDGの快記憶エンGRAM細胞の光活性化を行った翌日に総移動距離と中央部の滞在時間を測定した。左: Two-tailed unpaired *t*-test

with Welch's correction (mCherry vs ChETA), $t_{24.72} = 0.7341$, $P = 0.4698$, 右: Two-tailed unpaired t -test (mCherry vs ChETA), $t_{28} = 0.3002$, $P = 0.7662$, $n = 12$ (mCherry) and 18 (ChETA)。

(F) 無力感に対する影響を尾懸垂試験で検討した。dDG の快記憶エンGRAM細胞の光活性化を行った3日後に試験を行った。Two-tailed unpaired t -test (mCherry vs ChETA), $t_{28} = 3.115$, $**P = 0.0042$, $n = 12$ (mCherry) and 18 (ChETA)。

(G, H) 社会的逃避行動の影響を社会的相互作用試験で検討した。dDG の快記憶エンGRAM細胞の光活性化を行った2日後に試験を行った。(G): Target セッションにおける軌跡の一例。(H) 左: interaction zone 滞在時間の結果。Two-tailed unpaired t -test (mCherry vs ChETA in Target session), $t_{27} = 2.298$, $*P = 0.0296$, 右: social interaction ratio の結果。Two-tailed unpaired t -test with Welch's correction (mCherry vs ChETA), $t_{24.27} = 3.124$, $**P = 0.0046$, $n = 12$ (mCherry) and 17 (ChETA)。

値=平均値±標準誤差

DRN の 5-HT 神経の活性化は快記憶エンGRAMを優先的に再活性化する

前項までの結果から DRN の 5-HT 神経および dDG の快記憶エンGRAMは、その活性化により同様の抗うつ薬様作用を誘発することが明らかとなった。また、代表的な快経験である雌マウスとの接触により DRN の 5-HT 神経の活動が亢進することも報告されている⁴⁰。そこでこの両者の神経活動の間に因果関係が存在するかについて検討を行った。DRN に AAV-mTPH2-Venus あるいは AAV-mTPH2-CheRiff を投与したのち、光ファイバーカニューレを挿入することで DRN の 5-HT の神経活動を光制御できるマウスを作製した。また本マウスの dDG に AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} および AAV-CMV-DIO-mCherry を投与することで、タモキシフェン存在下の特定の経験時に活性化した神経細胞群に mCherry を発現させ得るマウスを作製した (図 4A)。また図 4B のように、マウスを 6 つに群分けした (実験方法の項参照)。タモキシフェン投与の 6 時間後に快経験として雌マウスの提示を、中立経験として新規ケージの曝露を、不快経験として単回の社会的敗北ストレスの負荷をそれぞれ与えることで、各体験時に活性化した dDG の神経細胞群に mCherry を発現させた (図 4B)^{118,120}。その後 10 日間の CSDS、5 日間の光照射による DRN の 5-HT 神経の活性化および行動試験 (図 2) を行った後、DRN の 5-HT 神経の光活性化を再び行った。光活性化の 90 分後、dDG を含む急性単離脳切片を作製し、c-fos 陽性細胞 (DRN の 5-HT 神経の活性化により活動性が亢進した dDG の神経細胞、c-fos⁺)、mCherry 陽性細胞 (各経験時に活性化した dDG の神経細胞、mCherry⁺)、c-fos および mCherry 共陽性細胞 (c-fos⁺mCherry⁺) の数を免疫組織学的手法により計測した (図 4B)。その結果、全 c-fos⁺ に対する c-fos⁺mCherry⁺ の割合 (c-fos⁺mCherry⁺/c-fos⁺)、全 mCherry⁺ に対する c-fos⁺mCherry⁺ の割合 (c-fos⁺mCherry⁺/mCherry⁺)、c-fos⁺mCherry⁺ の総数のいずれもが快経験時に活性化した dDG の神経細胞に mCherry を発現させた CheRiff 投与マウス群 (CheRiff Positive) に

において有意に大きかった (図 4C-F)。以上の結果から DRN の 5-HT 神経の活動亢進により dDG の快記憶エンングラムの優先的な再活性化が生じることが示唆される。

次に dDG の快記憶エンングラムの再活性化による DRN の 5-HT 神経の活動性の変化を検討した。マウスの dDG に AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} および AAV-CMV-DIO-mCherry あるいは AAV-CMV-DIO-ChETA-eYFP を投与した後、光ファイバーカニューレを挿入した (図 5A)。タモキシフェン投与の 6 時間後に快経験として雌マウスを提示し、その際に活性化した dDG の神経細胞群に mCherry あるいは ChETA-eYFP を発現させた (図 5B)。その後 10 日間の CSDS、5 日間の光照射による dDG の快記憶エンングラムの光活性化、行動試験 (図 3) を実施した後、dDG の快記憶エンングラムの光活性化を再び行った。90 分後、DRN を含む急性単離脳切片を作製し、c-fos に対する免疫染色を行うことでセロトニン神経の活動変化を組織学的に解析した。c-fos 陽性細胞 (dDG の快記憶エンングラムの再活性化により活動性が亢進した DRN の神経細胞、c-fos⁺)、セロトニン合成酵素である TPH2 陽性細胞 (セロトニン神経、TPH2⁺)、c-fos および TPH2 共陽性細胞 (c-fos⁺TPH2⁺) の数を計数した (図 5B)。結果、全細胞 (DAPI⁺) に対する c-fos⁺ の割合 (c-fos⁺/DAPI⁺)、全 TPH2⁺ 数に対する c-fos⁺TPH2⁺ の割合 (c-fos⁺TPH2⁺/TPH2⁺)、c-fos⁺TPH2⁺総数に有意な差は観察されなかった (図 5C-F)。

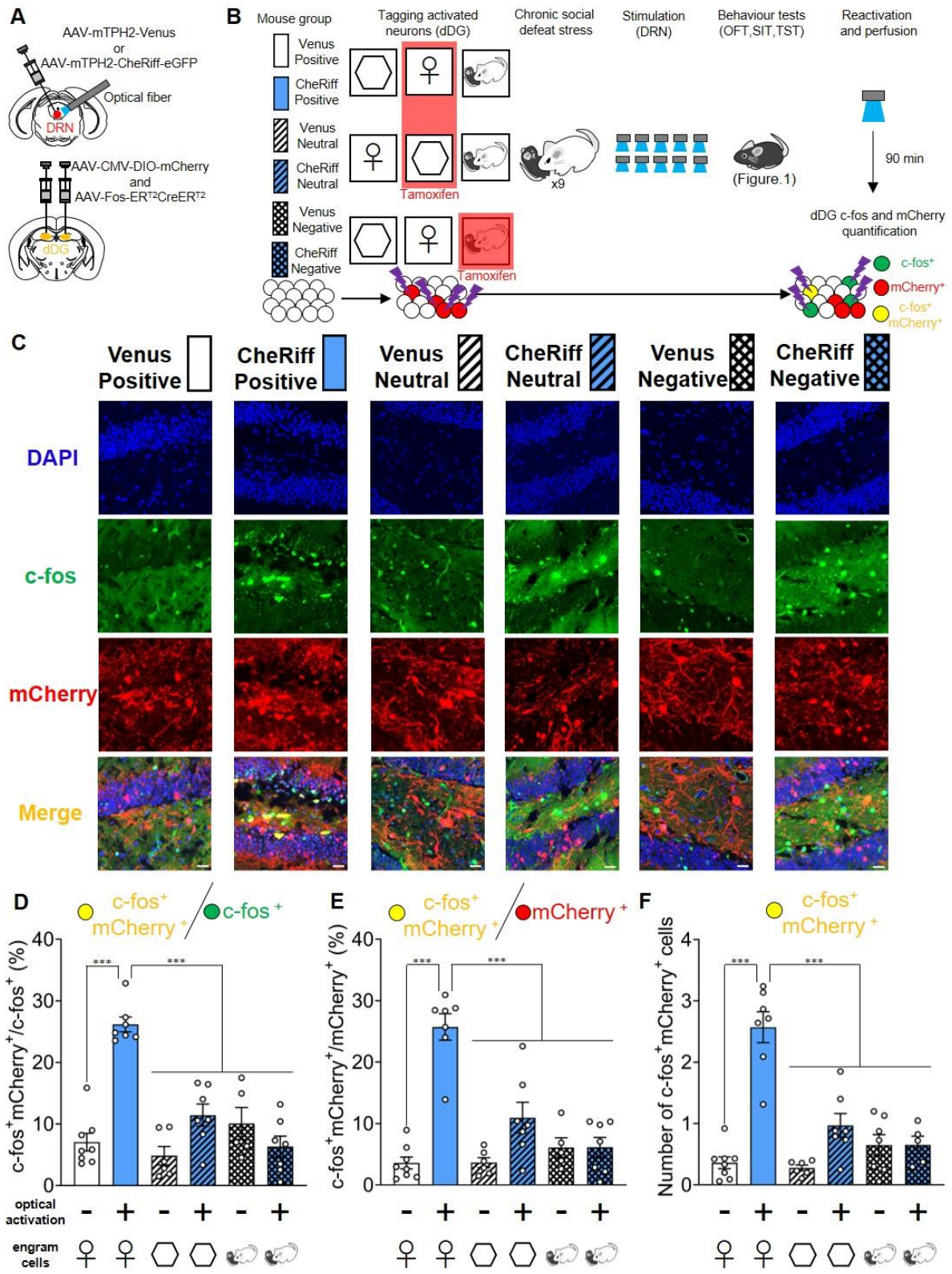


図4 DRNの5-HT神経の活性化は、快経験に関連した歯状回の神経細胞集団を優先的に再活性化する。

(A) AAV投与の概略図。

(B) 実験のタイムコース。雌マークは雌マウスとの接触、六角形は新規ケージの探索をそれぞれ

示す。快体験 (線なし)、新規ケージの探索 (斜線)、ストレス負荷 (網目模様) に関連するエンGRAM細胞をタモキシフェンによって標識した。CheRiff 発現マウス (青色列) または Venus 発現マウス (白色列) に CSDS を負荷した後、光刺激を与えた。行動解析後、再び光刺激を与え、その後免疫組織化学的検討を行った。

(C) 背側海馬の歯状回 (dDG) における DAPI (青)、c-fos (緑)、mCherry (赤) 免疫陽性細胞の一例。スケールバー = 20 μm 。

(D-F) dDG における DAPI、c-fos、mCherry および c-fos かつ mCherry 免疫陽性細胞数を測定した。

(D): Two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons test. Interaction $F_{2,34} = 23.40$, $***P < 0.001$, virus $F_{1,34} = 28.18$, $***P < 0.001$, engram $F_{2,34} = 17.79$, $***P < 0.001$: *post hoc* test: CheRiff-Positive vs other 5 groups, $***P < 0.001$. (E): Two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons test. Interaction $F_{2,34} = 21.25$, $***P < 0.001$, virus $F_{1,34} = 46.86$, $***P < 0.001$, engram $F_{2,34} = 14.63$, $***P < 0.001$: *post hoc* test: CheRiff-Positive vs other 5 groups $***P < 0.001$. (F): Two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons test. Interaction $F_{2,34} = 22.80$, $***P < 0.001$, effect of virus $F_{1,34} = 47.94$, $***P < 0.001$, engram $F_{2,34} = 16.81$, $***P < 0.001$: *post hoc* test: CheRiff-Positive vs other 5 groups $***P < 0.001$. $n = 8$ (Venus-Positive), $n = 7$ (CheRiff-Positive, CheRiff-Neutral and CheRiff-Negative), $n = 6$ (Venus-Neutral) and $n = 5$ (Venus-Negative)。

値=平均値 \pm 標準誤差

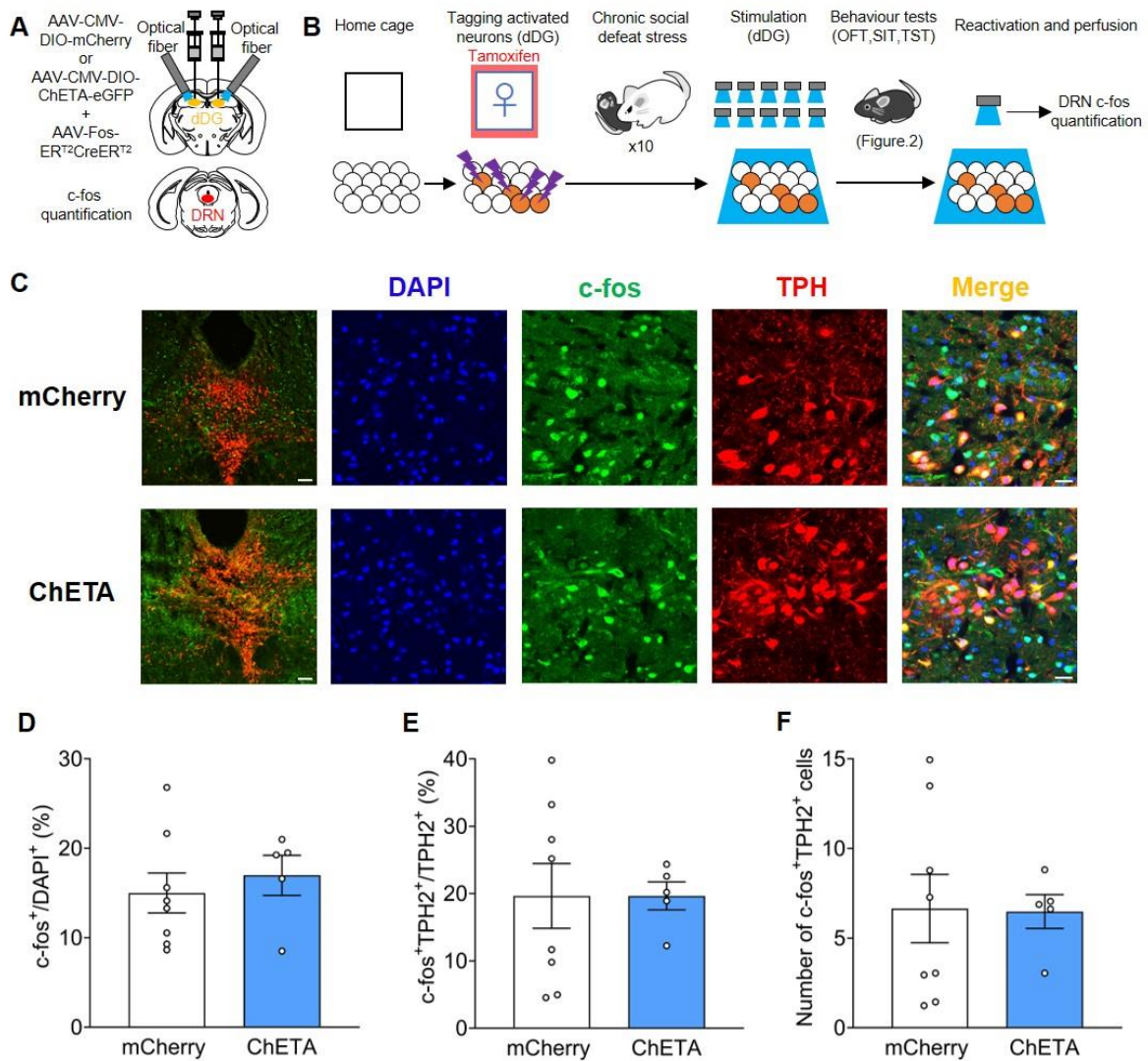


図5 快体験に関連する dDG の神経細胞集団の再活性化は DRN の 5-HT 神経の機能に影響を与えない。

(A) AAV 投与の概略図。

(B) 実験のタイムコース。雌マークは雌マウスとの接触を示す。ChETA 発現マウス (青色列) または mCherry 発現マウス (白色列) に CSDS を負荷した後、光刺激を与えた。行動解析後、光刺激を再び与え、その後免疫組織化学的検討を行った。

(C) 背側被蓋核 (DRN) における DAPI (青)、c-fos (緑)、TPH (赤) 免疫陽性細胞の一例。スケールバー = 100 μ m (低倍率)、20 μ m (高倍率)。

(D-F) DRN における DAPI、c-fos、TPH および c-fos かつ TPH 免疫陽性細胞数を測定した。(D): Two-tailed unpaired *t*-test (mCherry vs ChETA), $t_{11} = 0.5900$, $P = 0.5671$. (E): Two-tailed unpaired *t*-test (mCherry vs ChETA), $t_{11} = 0.0007502$, $P = 0.9994$. (F): Two-tailed unpaired *t*-test (mCherry vs ChETA), $t_{11} = 0.06458$, $P = 0.9497$. $n = 8$ (mCherry) and 5 (ChETA)。

値=平均値 \pm 標準誤差

DRN から VTA に投射する 5-HT 神経終末の局所刺激により社会的敗北ストレス誘発うつ様症状の持続的な改善と快記憶エンングラムの優先的な再活性化が引き起こされる

腹側被蓋野 (VTA) は報酬処理や感情の調整に対して重要な役割を担う脳領域であり、VTA の機能異常によりアンヘドニアをはじめとするうつ様症状が引き起こされることが示唆されている^{127,128}。また、DRN の 5-HT 神経は VTA に密に投射しており、DRN から VTA に投射している 5-HT 神経 (5-HT^{DRN→VTA}) を活性化することで、抗うつ薬様行動が惹起されることが Zou らにより報告されている⁹⁶。そこで本研究においても 5-HT^{DRN→VTA} を活性化することで、CSDS 誘発うつ様症状が改善するかを検討した。一連の行動実験のタイムコースを図 1C に示した。マウスの DRN に AAV-mTPH2-Venus あるいは AAV-mTPH2-CheRiff を投与したのち光ファイバーカニューレを VTA に挿入した (図 6A)。AAV-mTPH2-CheRiff の投与 4 週間後、VTA において多数の GFP 陽性細胞が確認されたことから、VTA において十分量の CheRiff が発現していることが示唆される (図 6B)。さらに、5-HT^{DRN→VTA} の活性化が dDG の快記憶エンングラムの優先的な再活性化に寄与するかも検討するために、dDG に AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} かつ AAV-CMV-DIO-mCherry を投与した (図 6A)。タモキシフェン投与後、快経験、中立経験、不快経験のいずれかを体験させることで、各経験時に活性化した dDG の神経細胞に mCherry を発現させた。10 日間の CSDS、5 日間の光刺激を行った後、オープンフィールド試験、社会的相互作用試験および尾懸垂試験を行った (図 6C)。オープンフィールド試験における総移動距離および中央滞在時間は両群間で同程度であった (図 6D)。一方で社会的相互作用試験において、5-HT^{DRN→VTA} の光活性化を受けたマウス (CheRiff 群) は、標的マウス存在下における interaction zone 滞在時間の延長および social interaction ratio の上昇を呈した (図 6F、G)。さらに尾懸垂試験においても、CheRiff 群では無動時間の有意な減少が観察された (図 6E)。以上の結果から 5-HT^{DRN→VTA} の活性化は CSDS 誘発うつ様行動の改善を引き起こすことが示唆される。さらに 5-HT^{DRN→VTA} の活性化による dDG のエンングラム細胞の再活性化率について免疫組織化学的手法で検討した。その結果、快経験時に活性化した dDG の神経細胞に mCherry を発現させた CheRiff 投与マウス群 (CheRiff Positive) では他の 5 つの群と比較して、再活性化の指標となる c-fos⁺mCherry⁺/c-fos⁺、c-fos⁺mCherry⁺/mCherry⁺ および c-fos⁺mCherry⁺ の総数が有意に大きかった (図 6H-J)。以上の結果より、5-HT^{DRN→VTA} の活性化により dDG の快記憶エンングラムが優先的に再活性化することで、抗うつ薬様作用が惹起される可能性が示唆される。

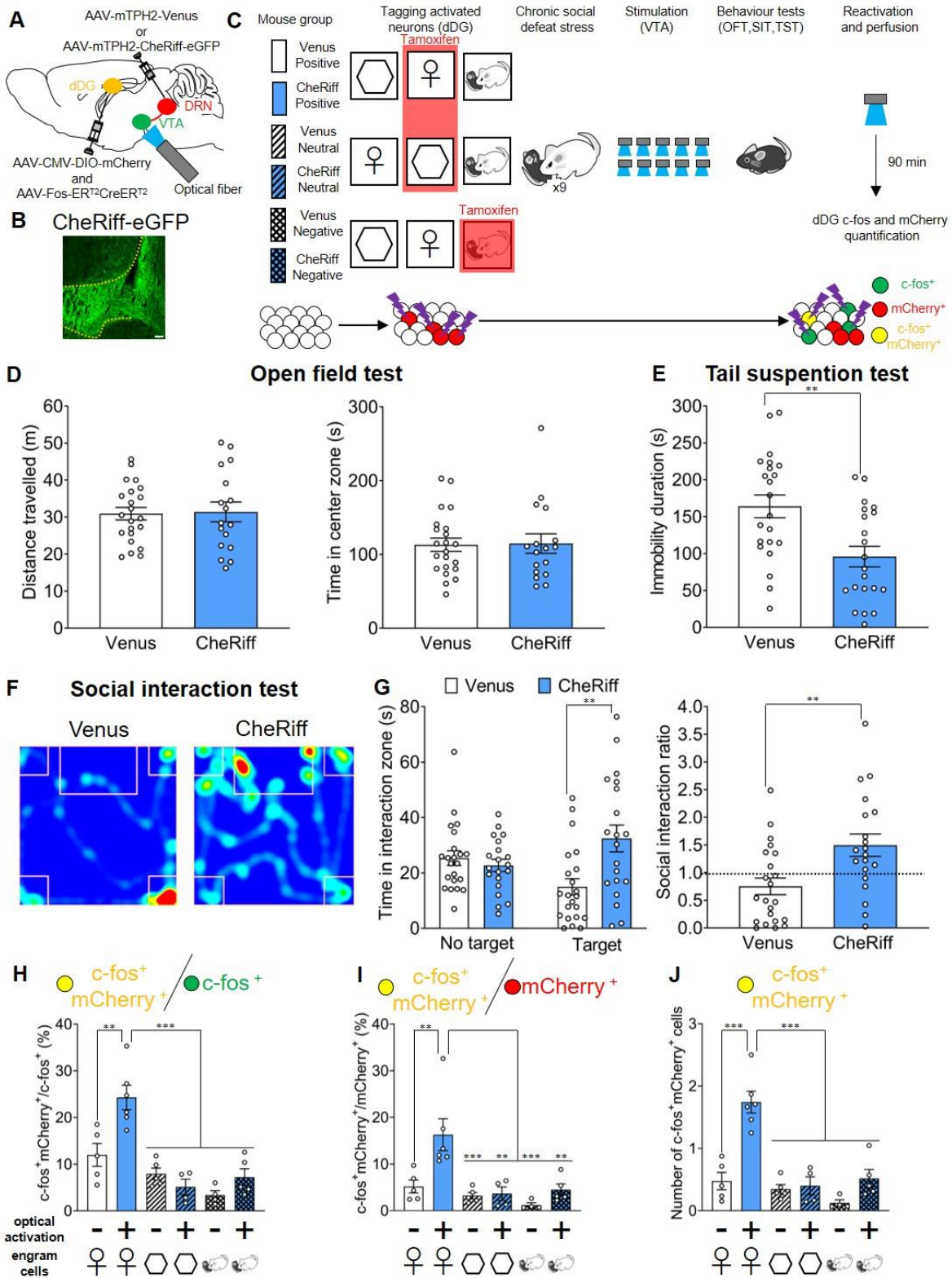


図6 腹側被蓋野 (VTA) に投射する DRN の 5-HT 神経終末の活性化は CSDS 誘発うつ様行動の改善かつ快体験に関連する歯状回の神経細胞集団の優先的な再活性化を引き起こす。

(A) AAV 投与の概略図。

(B) VTA における GFP 免疫陽性細胞の一例。スケールバー = 20 μ m。

(C) 実験のタイムコース。雌マークは雌マウスとの接触、六角形は新規ケージの探索をそれぞれ示す。快体験 (線なし)、新規ケージの探索 (斜線)、ストレス負荷 (網目模様) に関連するエンGRAM細胞をタモキシフェンによって標識づけた。CheRiff 発現マウス (青色列) または Venus 発現マウス (白色列) に CSDS を負荷した後、光刺激を与えた。行動解析後、再び光刺激を与え、その後免疫組織化学的検討を行った。

(D) 運動活性と不安量をオープンフィールド試験で検討した。5-HT^{DRN→VTA} の光活性化を行った翌日に総移動距離と中央部の滞在時間を測定した。左: 総移動距離。Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_{37} = 0.1563$, $P = 0.8767$, 右: 中央部滞在時間。Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_{37} = 0.1055$, $P = 0.9165$, $n = 22$ (Venus) and 17 (CheRiff)。

(E) 無力感に対する影響を尾懸垂試験で検討した。5-HT^{DRN→VTA} の光活性化を行った3日後に試験を行った。Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_{41} = 3.267$, $**P = 0.0022$, $n = 22$ (Venus) and 21 (CheRiff)。

(F, G) 社会的逃避行動の影響を社会的相互作用試験で検討した。5-HT^{DRN→VTA} の光活性化を行った2日後に試験を行った。(F): Target セッションにおける軌跡の一例。(G) 左: interaction zone 滞在時間の結果。Two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction (Venus vs CheRiff in Target session), $t_{31.66} = 3.077$, $**P = 0.0043$, 右: social interaction ratio の結果。Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_{40} = 2.995$, $**P = 0.0047$, $n = 22$ (Venus) and 20 (CheRiff) mice。

(H-J) dDG における DAPI、c-fos、mCherry および c-fos かつ mCherry 免疫陽性細胞数を測定した。(H): Two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons test. Interaction $F_{2,23} = 7.019$, $**P = 0.0042$, virus $F_{1,23} = 6.973$, $*P = 0.0146$, engram $F_{2,23} = 25.14$, $***P < 0.001$: *post hoc* test: CheRiff-Positive vs Venus-Positive, $**P = 0.0019$, CheRiff-Positive vs other 4 groups $***P < 0.001$. (I): Two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons test. Interaction $F_{2,23} = 3.870$, $*P = 0.0356$, virus $F_{1,23} = 8.769$, $**P = 0.0070$, engram $F_{2,23} = 14.63$, $***P < 0.001$: *post hoc* test: CheRiff-Positive vs Venus-Positive, $**P = 0.0049$, CheRiff-Positive vs CheRiff-Neutral, $**P = 0.0025$, CheRiff-Positive vs CheRiff-Negative, $**P = 0.0027$, CheRiff-Positive vs other 2 groups, $***P < 0.001$. (J): Two-way ANOVA with Tukey multiple comparisons test. Interaction $F_{2,23} = 10.87$, $***P < 0.001$, virus $F_{1,23} = 25.60$, $***P < 0.001$, engram $F_{2,23} = 21.66$, $***P < 0.001$: *post hoc* test: CheRiff-Positive vs other 5 groups $***P < 0.001$. $n = 6$ (CheRiff-Positive), $n = 5$ (CheRiff-Negative, Venus-Positive and Venus-Neutral), $n = 4$ (CheRiff-Neutral and Venus-Negative)。

値=平均値±標準誤差

5-HT^{DRN→VTA} の活性化によって誘発される無力感に対する抵抗性と dDG 快記憶エンGRAMの優先的な再活性化はドパミン神経伝達を介在する

腹側被蓋野 (VTA) からの出力はドパミン神経 (DA) がその大部分を担っており、VTA の DA 神経は快情動の生成および報酬関連記憶の保持において重要な役割を担

うことが知られている¹²⁹⁻¹³¹。また VTA の DA 神経の活動性の変化が、うつ様状態からの回復に寄与することが示唆されている¹³²⁻¹³⁵。これらの知見から、5-HT^{DRN→VTA}の活性化による抗うつ薬様作用にドパミン神経伝達が関与しているという仮説をたてた。この仮説を検証するため、初めに CSDS を負荷した後の 5-HT^{DRN→VTA}の活性化が、VTA の DA 神経の活動性の上昇に寄与するかについて検討した。CSDS 負荷後 5-HT^{DRN→VTA}の光刺激を行い、その後 VTA を含む急性単離脳切片を作製し、c-fos 陽性細胞 (5-HT^{DRN→VTA}の局所刺激により活動性の亢進が誘発された VTA の神経細胞、c-fos⁺)、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 陽性細胞 (ドパミン神経のマーカー遺伝子、TH⁺)、c-fos および TH 共陽性細胞 (c-fos⁺TH⁺) の発現を免疫組織化学的手法により計測した。全 TH⁺に対する c-fos⁺TH⁺の割合 (c-fos⁺TH⁺/TH⁺)、c-fos⁺TH⁺および c-fos⁺のそれぞれの総数は、5-HT^{DRN→VTA}の光刺激を行った群 (CheRiff 群) において、有意に大きかった (図 7A-C)。一方で TH⁺の数は、両群間で同程度であった (図 7D)。これらの結果より、VTA に投射する DRN の 5-HT 神経の活性化により VTA の DA 神経の活性化が惹起されることが示唆される。次に、DA 神経伝達が 5-HT^{DRN→VTA}の光刺激により誘発される抗うつ薬様作用および dDG の快記憶エンングラムの再活性化に関与しているかについて検討を行った。全てのマウスの DRN に AAV-mTPH2-CheRiff-eGFP を、dDG に AAV-Fos-ER^{T2}CreER^{T2} および AAV-CMV-DIO-mCherr をそれぞれ投与した。光ファイバーカニューレを VTA に挿入した後、タモキシフェン投与の 6 時間後に雌マウスと接触させることで、快経験時に活性化した dDG の神経細胞に mCherry を発現させた (図 8A、B)。10 日間の CSDS 負荷後、5 日間の光活性化を行う 20 分前に、ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 (0.1mg/kg) およびドパミン D2 受容体拮抗薬である raclopride (2mg/kg) の混合液を腹腔内に投与した (D1+D2 群)。陰性対照マウスには上記の混合薬の代わりに saline を光刺激の 20 分前に投与した (vehicle 群) (図 8B)。5 日間の光刺激が終了した翌日から行動試験を実施した。オープンフィールド試験における総移動距離および中央滞在時間には両群間で有意な差はなかった (図 8C)。また尾懸垂試験における D1+D2 群の無動時間は陰性対照群である vehicle 群と比較して有意に短かった (図 8D)。一方で社会的相互作用試験における標的マウス存在下の interaction zone 滞在時間および social interaction ratio は、両群間で同程度であった (図 8E、F)。一般的に尾懸垂試験は、うつ様症状の中でも無力感や絶望状態から回避を評価する試験として知られており¹³⁶、社会的相互作用試験は引きこもりなどの社会的逃避を評価する試験として知られている⁹¹。これらの知見を踏まえると、CSDS 曝露後 5-HT^{DRN→VTA}の光活性化によりもたらされた無力感や絶望状態からの回避は DA 神経に起因するものの、社会的逃避行動からの回復には異なる神経メカニズムが存在している可能性を示唆している。最後に、5-HT^{DRN→VTA}の光活性化により誘発される dDG の快記憶エンングラムの再活性化におけるドパミン神経伝達の役割について検討した。その結果、快記憶エンングラムの再活性化率の指標となる c-fos⁺mCherry⁺/c-fos⁺、

c-fos⁺mCherry⁺/mCherry⁺、c-fos⁺mCherry⁺の総数のいずれもが D1+D2 群において有意に減少していることが明らかとなった (図 8G-I)。以上の結果より、5-HT^{DRN→VTA} の活性化により誘発される快記憶エンングラムの優先的な再活性化は、ドパミン神経伝達を介していることが示唆される。

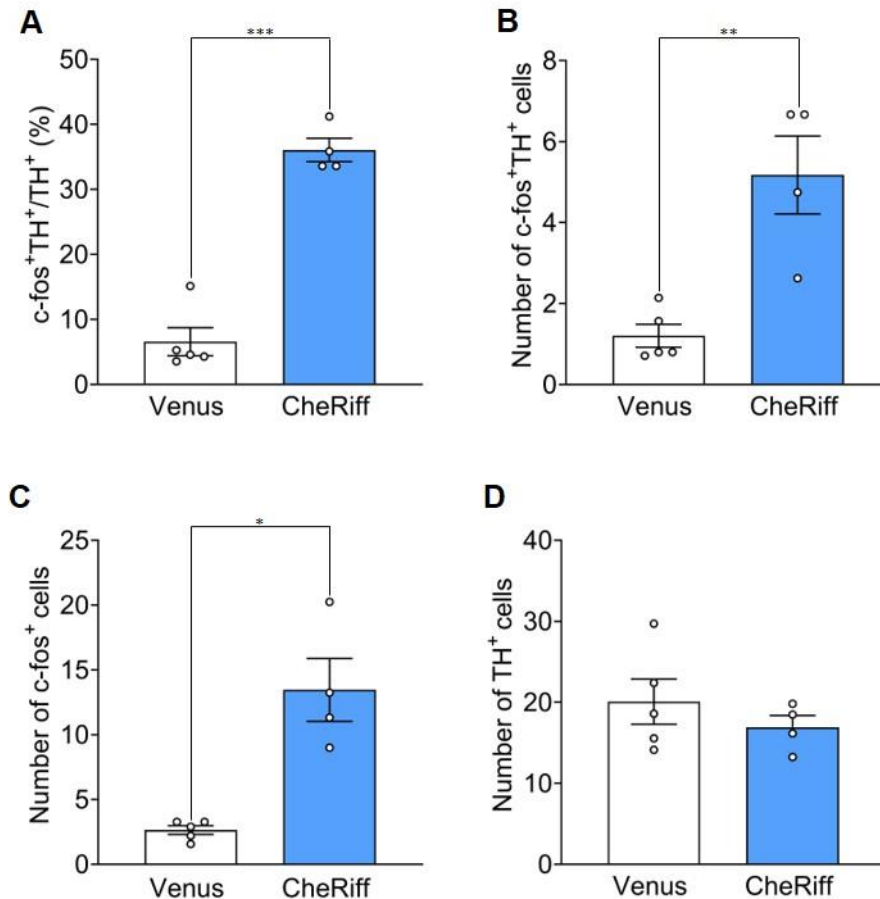


図 7 腹側被蓋野 (VTA) に投射する DRN の 5-HT 神経終末の活性化により VTA の DA 神経の活動性の上昇が誘発される。

(A-D) 5-HT^{DRN→VTA} の光刺激を行った後、VTA における DAPI、c-fos、TH および c-fos かつ TH 免疫陽性細胞数を測定した。(A): Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_7 = 10.12$, $***P < 0.001$, (B): Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_7 = 4.392$, $**P = 0.0032$, (C): Two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction (Venus vs CheRiff), $t_{3.114} = 4.416$, $*P = 0.0199$, (D): Two-tailed unpaired *t*-test (Venus vs CheRiff), $t_7 = 0.9230$, $P = 0.3867$. $n = 5$ (Venus) and 4 (CheRiff)。

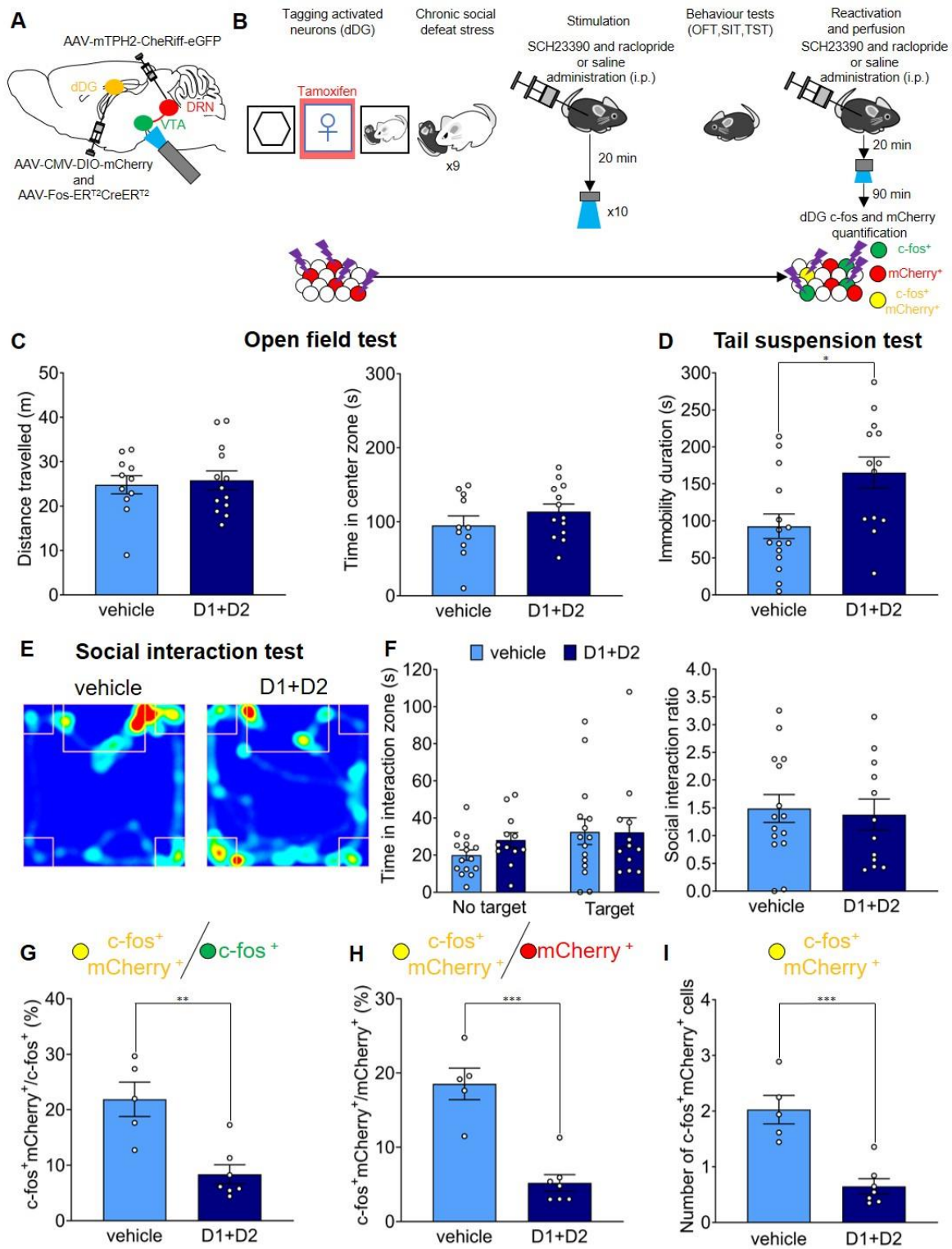


図8 腹側被蓋野 (VTA) に投射する DRN の 5-HT 神経終末の活性化中にドパミン神経伝達を遮断すると CSDS 誘発うつ様行動の改善と快体験に関連した神経細胞集団の再活性化が阻害される。

(A) AAV 投与の概略図。

(B) 実験のタイムコース。雌マークは雌マウスとの接触、六角形は新規ケージの探索をそれぞれ示す。快体験に関連するエンGRAM細胞をタモキシフェンによって標識づけた。CheRiff 発現マウスに CSDS を負荷した後、vehicle (青色) あるいはドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH 23390 (0.1

mg/kg) かつドパミン D2 受容体拮抗薬である raclopride (2 mg/kg) (濃紺色) の混合薬を投与し光刺激を行った。行動解析後、再び拮抗薬の投与と光刺激を与え、その後免疫組織化学的検討を行った。

(C) 運動活性と不安量をオープンフィールド試験で検討した。拮抗薬の投与かつ 5-HT^{DRN→VTA} の光活性化を行った翌日に総移動距離と中央部の滞在時間を測定した。左: 総移動距離。Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2), $t_{22} = 0.3356$, $P = 0.7404$, 右: 中央部滞在時間。Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2), $t_{22} = 1.158$, $P = 0.2593$, $n = 11$ (vehicle) and 13 (D1+D2)。

(D) 無力感に対する影響を尾懸垂試験で検討した。拮抗薬の投与かつ 5-HT^{DRN→VTA} の光活性化を行った 3 日後に試験を行った。Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2), $t_{26} = 2.740$, $*P = 0.0109$, $n = 15$ (vehicle) and 13 (D1+D2)。

(E, F) 社会的逃避行動の影響を社会的相互作用試験で検討した。5-HT^{DRN→VTA} の光活性化を行った 2 日後に試験を行った。(E): Target セッションにおける軌跡の一例。(F) 左: interaction zone 滞在時間の結果。Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2 in Target session), $t_{25} = 0.02156$, $P = 0.9830$, 右: social interaction ratio の結果。Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2), $t_{25} = 0.2902$, $P = 0.7740$, $n = 15$ (vehicle) and 12 (D1+D2)。

(G-I) dDG における DAPI、c-fos、mCherry および c-fos かつ mCherry 免疫陽性細胞数を測定した。(G): Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2), $t_{10} = 4.104$, $**P = 0.0021$, (H): Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2), $t_{10} = 6.026$, $***P < 0.001$, (I): Two-tailed unpaired *t*-test (vehicle vs D1+D2), $t_{10} = 5.173$, $***P < 0.001$, $n = 5$ (vehicle) and 7 (D1+D2)。

考察

本章において著者は、社会的敗北ストレス誘発うつ病モデルマウスにおける DRN の 5-HT 神経あるいは DRN から VTA に投射しているセロトニン神経回路 (5-HT^{DRN→VTA}) の局所刺激による抗うつ薬様効果に対する影響を検討した。その結果、持続的な DRN の 5-HT 神経の活性化と 5-HT^{DRN→VTA} の局所刺激は社会的敗北ストレス誘発うつ様症状を改善することを明らかにした。さらにこれらの 5-HT 神経回路の活性化により背側海馬の歯状回 (dDG) に存在している過去の雌マウスとの接触時に活性化した神経細胞集団 (快記憶エンGRAM) の優先的な再活性化が生じていることが明らかとなった。また、DRN の 5-HT 神経あるいは 5-HT^{DRN→VTA} の局所刺激による社会的敗北ストレス誘発の無力感からの融解と歯状回の快記憶エンGRAM細胞の優先的な再活性化は、ドパミン神経 (DA) の活性化が関与していることが明らかとなった。

本研究はうつ病の治療において、なぜセロトニンの関与が重要なのかを解き明かす基礎的な知見となりうるものである。

DRN の 5-HT 神経回路の変化は気分調整、社会的相互作用、認知機能、攻撃性、意思決定などの様々な情動機能に関与している^{64,137-141}。このように DRN の 5-HT 神経回路が果たす役割は多岐にわたるが、その中でもうつ病の病態生理や治療に関与すると考えられている神経回路の一つが報酬系である。これまでの研究から大うつ病性障害の発症の要因の一つとして、脳内の報酬系を司る神経回路の機能異常が示唆されている¹⁴²。加えて第二章では、DRN の 5-HT 神経あるいは 5-HT^{DRN→VTA} の局所活性化により報酬関連行動が惹起される一方、これらの神経回路を阻害すると嫌悪行動が誘発されることが明らかとなった^{39,41,143}。本章では 5-HT^{DRN→VTA} の光活性化が繰り返しのストレスにより誘発されるうつ様症状を改善すること、あるいは 5-HT^{DRN→VTA} の光活性化により中立記憶や不快記憶エンGRAM細胞と比較して、優先的に dDG の快記憶エンGRAM細胞が再活性化することが明らかとなった。一方で、dDG の快記憶エンGRAM細胞の光活性化は社会的敗北ストレス誘発うつ様行動の改善に顕著な役割を果たしているが、DRN の 5-HT 神経の活動には影響を与えないことも明らかとなった。したがって、5-HT^{DRN→VTA} が関連する脳内報酬系の繰り返しの活性化により dDG の快記憶エンGRAM細胞の優先的な再活性化が引き起こされ、その結果抗うつ薬様作用が生じることが示唆される。エンGRAM細胞に関する既存の研究の多くは、電気ショック時などの恐怖体験時に活性化した神経細胞集団と恐怖記憶の獲得あるいは消去との関連性を検討したものであり、うつ病とエンGRAM細胞の関連性を検討した報告は非常に少ない。さらに、神経新生や dDG に局在する介在神経を介して、5-HT が抗うつ薬様作用の発現に関与していることはこれまでの研究により報告されているものの^{89,144,145}、筆者が知る限りでは、5-HT 神経回路の活性化による抗うつ薬様作用と dDG の快記憶エンGRAM細胞の再活性化による抗うつ薬様作用との直接的な関連性を示したものは今回の研究が初めてである。また近年の興味深い報告として電気ショックなどの恐怖記憶の消去は報酬記憶の獲得により促進され、報酬系の神経回路が恐怖記憶の消去学習に大きく寄与することが示唆されている^{146,147}。さらに Zhang らはストレス感受性マウスでは、攻撃を受けたマウスへの再暴露時にストレス負荷時に活性化した海馬の神経細胞集団（不快記憶エンGRAM細胞）の再活性化が顕著に誘発されていることを報告している¹¹⁸。上記に述べた報告を統括すると、dDG の快記憶エンGRAM細胞が再活性化することで社会的敗北ストレスに関する記憶に対する感受性が低下し、これらの記憶の消去が促進される可能性が考えられるものの、詳細な事柄は明らかではなく今後更なる検討が必要であると考えられる。

VTA に局在している神経細胞の大部分はドパミン (DA) 陽性細胞であり、VTA の DA 神経の活動変化がストレスに対する応答や報酬処理に重要な役割を果たしていることが以前の研究より示唆されている¹³³。Friedman らは、CSDS を 10 日間連続して

負荷した後に、VTA の DA 神経を 5 日間慢性的に光活性化させることで、社会的敗北ストレスに対して感受性が高いマウスで見られた VTA の DA 神経の活動が正常化され、CSDS 誘発うつ病様行動が改善することを報告した¹³⁴。また VTA に投射している DRN の 5-HT 神経の光活性化は、ドパミン放出を促進しており⁴¹ (図 7)、さらに本研究結果から 5-HT^{DRN→VTA} の活性化を行う前に DA の D1 および D2 受容体を一過性に遮断することで、無力感に対する抵抗性と dDG の快記憶エンGRAM細胞の優先的な再活性化が減衰することが明らかとなった (図 8)。一方で、5-HT^{DRN→VTA} の活性化により誘発される社会的回避の改善は、ドパミン神経伝達を阻害しても消失しなかった。このことから、抗うつ薬様効果に寄与する DRN の 5-HT 神経回路はうつ病として一括りにされている症状ごとに異なることが示唆される。本研究では、社会的回避行動を改善する要因を見出すことはできなかったものの、上記の要因に関連する可能性が考えられるいくつかの興味深い知見が提案されている。例えば、内側前頭前野 (mPFC) の長期記憶^{148,149}、扁桃体基底部 (BLA) の恐怖記憶の消去¹⁵⁰、腹側淡蒼球 (VP) の parvalbumin 陽性細胞¹⁵¹ などが挙げられるが、これらの機構が 5-HT^{DRN→VTA} 経路による抗うつ効果発症機構と関連しているかは今後さらに検討する必要がある。また近年のうつ病の動物モデルを用いた複数の研究から、うつ様状態を生じさせる原因となるストレスの種類に応じて、うつ様状態の病態形成や回復に関わる神経基盤が異なる可能性が提唱されている¹²⁷。例えば、慢性的な軽度のストレスによりうつ様状態を誘発するモデルマウスでは、VTA の DA 神経の活動性の低下が観察され、急性の VTA の DA 神経の光刺激により、軽度のストレスにより誘発されたうつ様症状が改善することが報告されている¹³³。他方、本研究で使用した社会的敗北ストレスモデルでは、VTA の DA 神経の発火率は増加し、社会的敗北ストレスを負荷している最中に急性の VTA の DA 神経を活性化することで、ストレスに関する感受性が増大することが報告されている¹³²。さらに Zhou らは、中央扁桃体 (CeA) に局在するソマトスタチン陽性細胞に投射する DRN の 5-HT 神経を活性化することで、慢性的な痛みにより誘発されるうつ様行動は抑制されるものの、社会的敗北ストレスにより誘発されるうつ様症状は改善されないことを尾懸垂試験により明らかにした¹⁵²。以上の知見と本研究結果から、うつ病の発症原因ごと、さらには症状ごとに異なる治療戦略を形成していくことが今後重要であると考えられる。

本研究では、DRN の 5-HT 神経および VTA に投射する DRN の 5-HT 神経回路を選択的に刺激することで抗うつ薬様効果が十分に得られることを証明した。さらに、上記の神経回路を活性化することで dDG の快記憶エンGRAM細胞が優先的に再活性化され、これらの効果は DA 神経の機能を遮断することで減弱することが示された。以上の研究結果は、セロトニンによる抗うつ薬様作用の機構をより深く理解するための有益な知見となる可能性を秘めたものであり、大うつ病性障害の新規治療薬の開発につながる基礎的知見を提供するものである。

総括および結論

本研究において著者は、以下の新規知見を得た。

1. 細胞種特異的なプロモーター配列をマカクザルのゲノム中より同定し、マウスの脳内で特異性を評価した。その結果、somatostatin (SST)、cholecystokinin (CCK)、parvalbumin (PV)、serotonin transporter (SERT)、choline acetyltransferase (ChAT)、substance P (SP)、enkephalin (PENK) の7種類の神経細胞種に対して80%以上という高い特異性を有するプロモーター配列の単離に成功した。
2. 5-HT 神経に対して選択的に遺伝子を導入するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を新たに作製し、DRN の5-HT 神経を光遺伝学的に操作することによる報酬関連行動に対する影響を検討した。その結果 DRN の5-HT 神経および DRN から腹側被蓋野 (VTA) へ投射している5-HT 神経回路 (5-HT^{DRN→VTA}) の光刺激による活動性の亢進は、光活性と関連付けられたノーズポーク行動の回数の上昇および光活性と関連付けられた区域での滞在時間を有意に増加させた。また DRN の5-HT 神経ならびに5-HT^{DRN→VTA} の抑制により嫌悪行動がそれぞれ惹起されることが明らかとなった。
3. 社会的敗北ストレス誘発うつ病モデルマウスにおける DRN の5-HT 神経あるいは DRN から VTA に投射しているセロトニン神経 (5-HT^{DRN→VTA}) の局所刺激による抗うつ薬様効果に対する影響を検討した。その結果、持続的な DRN の5-HT 神経の活性化と5-HT^{DRN→VTA} の局所刺激は社会的敗北ストレス誘発うつ様症状を改善することを明らかにした。さらにこれらの5-HT 神経回路の活性化により背側海馬の歯状回 (dDG) に存在している過去の雌マウスとの接触時に活性化した神経細胞集団 (快記憶エンGRAM) の優先的な再活性化が生じていることが明らかとなった。また、5-HT^{DRN→VTA} の局所刺激による社会的敗北ストレス誘発の無力感からの融解と歯状回の快記憶エンGRAM細胞の優先的な再活性化は、ドパミン神経 (DA) の活性化が関与していることが明らかとなった。

本研究は、うつ病を初めとする精神疾患の治療ターゲットの創出という創薬の観点だけでなく、ヘテロな患者からなる精神疾患の治療に極めて有望と考えられている「患者の層別化」と「個別化医療」への基礎的知見にもつながると考えられる。

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大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、並びに、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金沢大学医薬保健研究域薬学系薬理学研究室 金田 勝幸 先生、出山 諭司 先生、西谷 直也 先生、北海道大学大学院医学研究院神経薬理学教室 吉岡 充弘 先生、大村 優 先生、京都大学医学部附属病院薬剤部 中川 貴之 先生、名古屋大学環境医学研究所ストレス受容・応用研究部門神経系分野II 山中 章弘 先生、大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野 橋本均 先生、笠井 淳司 先生、勢力 薫 先生、関西医科大学医学部医学科生理学講座 中村 加枝 先生、上田 康雅 先生、安田 正治 先生、University of Bristol, Department of physiology and pharmacology の Professor Sergey Kasparov に深く感謝いたします。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 河合 洋幸さん、渋井 紀宏さん、安藤 千紘さん、好田 匡志さん、福井 悠斗さん、高山 海都さん、木坂 優里さん、萩原 雅子さん、森下 雛子さん、大谷 鈴華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ならびに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父 照佳、妹 智菜、祖父、伯母に感謝します。最後に研究に専念できるよう支えてくれた妻 加純に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究の一部は以下の論文にて公表した。

1) Identification of neuron-type specific promoters in monkey genome and their functional validation in mice

(サルゲノム中の神経細胞種特異的プロモーター配列の同定)

Yuma Nagai, Naoya Nishitani, Masaharu Yasuda, Yasumasa Ueda, Yuto Fukui, Chihiro Andoh, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Ken-ichi Inoue, Kazuki Nagayasu, Sergey Kasparov, Kae Nakamura, Shuji Kaneko

2019年8月23日発行 Biochemical and Biophysical Research Communications 第518巻
第4号 619頁～624頁に**掲載**

2) The Role of Dorsal Raphe Serotonin Neurons in the Balance between Reward and Aversion
(嗜好/嫌悪の調節における背側縫線核セロトニン神経の役割の解明)

Yuma Nagai, Kaito Takayama, Naoya Nishitani, Chihiro Andoh, Masashi Koda, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Kazuki Nagayasu, Akihiro Yamanaka, Shuji Kaneko

2020年3月21日発行 International Journal of Molecular Sciences 第21巻第6号 2160
頁に**掲載**

参考文献

1. Harrison, P. J. & Weinberger, D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: On the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* **10**, 40–68 (2005).
2. Pittenger, C. & Duman, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 88–109 (2008).
3. 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).
4. Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S. & Roth, B. L. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5163–5168 (2007).
5. Gomez, J. L. *et al.* Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*. **357**, 503–507 (2017).
6. Nakamura, K., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* **28**, 5331–43 (2008).
7. Isa, T., Yamane, I., Hamai, M. & Inagaki, H. Japanese macaques as laboratory animals. *Exp. Anim.* **58**, 451–457 (2009).
8. Knobloch, H. S. *et al.* Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* **73**, 553–566 (2012).
9. 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).
10. Madisen, L. *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* **13**, 133–40 (2010).
11. Madisen, L. *et al.* A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat. Neurosci.* **15**, 793–802 (2012).
12. Diester, I. *et al.* An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat. Neurosci.* **14**, 387–97 (2011).
13. Klein, C. *et al.* Cell-Targeted Optogenetics and Electrical Microstimulation Reveal the Primate Koniocellular Projection to Supra-granular Visual Cortex. *Neuron* **90**, 143–151 (2016).
14. Stauffer, W. R. *et al.* Dopamine Neuron-Specific Optogenetic Stimulation in Rhesus Macaques. *Cell* **166**, 1564-1571.e6 (2016).
15. El-Shamayleh, Y., Kojima, Y., Soetedjo, R. & Horwitz, G. D. Selective Optogenetic Control of Purkinje Cells in Monkey Cerebellum. *Neuron* **95**, 51-62.e4 (2017).

16. Dermitzakis, E. T. & Clark, A. G. Evolution of transcription factor binding sites in Mammalian gene regulatory regions: conservation and turnover. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1114–21 (2002).
17. Benzekhrouta, 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**, 681–688 (2009).
18. 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).
19. Lein, E. S. *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168–176 (2007).
20. Ovcharenko, I., Loots, G. G., Hardison, R. C., Miller, W. & Stubbs, L. zPicture: Dynamic alignment and visualization tool for analyzing conservation profiles. *Genome Res.* **14**, 472–477 (2004).
21. Lucki, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry* **44**, 151–162 (1998).
22. Picciotto, M. R., Higley, M. J. & Mineur, Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* **76**, 116–129 (2012).
23. Albin, R. L., Young, A. B. & Penney, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* **12**, 366–75 (1989).
24. Balleine, B. W., Delgado, M. R. & Hikosaka, O. The Role of the Dorsal Striatum in Reward and Decision-Making. *J. Neurosci.* **27**, 8161–8165 (2007).
25. Samaranch, L. *et al.* Adeno-Associated Virus Serotype 9 Transduction in the Central Nervous System of Nonhuman Primates. *Hum. Gene Ther.* **23**, 382–389 (2012).
26. Oguchi, M. *et al.* Double virus vector infection to the prefrontal network of the macaque brain. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
27. Hastie, E. & Samulski, R. J. Adeno-Associated Virus at 50: A Golden Anniversary of Discovery, Research, and Gene Therapy Success—A Personal Perspective. *Hum. Gene Ther.* **26**, 257–265 (2015).
28. Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, 317–334 (2017).
29. Wu, Z., Yang, H. & Colosi, P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* **18**, 80–86 (2010).
30. Lentz, T. B., Gray, S. J. & Samulski, R. J. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* **48**, 179–188 (2012).

31. Costello, C. G. Depression: Loss of Reinforcers or Loss of Reinforcer Effectiveness? - Republished Article. *Behav. Ther.* **47**, 595–599 (2016).
32. Pizzagalli, D. A., Iosifescu, D., Hallett, L. A., Ratner, K. G. & Fava, M. Reduced hedonic capacity in major depressive disorder: evidence from a probabilistic reward task. *J. Psychiatr. Res.* **43**, 76–87 (2008).
33. Der-Avakian, A. & Markou, A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci.* **35**, 68–77 (2012).
34. Hall, G. B. C., Milne, A. M. B. & MacQueen, G. M. An fMRI study of reward circuitry in patients with minimal or extensive history of major depression. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **264**, 187–198 (2014).
35. Strauss, G. P., Waltz, J. A. & Gold, J. M. A review of reward processing and motivational impairment in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* **40**, 107–116 (2014).
36. Spanagel, R. & Weiss, F. The dopamine hypothesis of reward: Past and current status. *Trends Neurosci.* **22**, 521–527 (1999).
37. Wise, R. A. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 483–494 (2004).
38. Kirby, L. G., Zeeb, F. D. & Winstanley, C. A. Contributions of serotonin in addiction vulnerability. *Neuropharmacology* **61**, 421–432 (2011).
39. Liu, Z. *et al.* Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron* **81**, 1360–1374 (2014).
40. Li, Y. *et al.* Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
41. 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).
42. Rompre, P. P. & Miliareisis, E. Pontine and mesencephalic substrates of self-stimulation. *Brain Res.* **359**, 246–259 (1985).
43. Rompré, P. P. & Boye, S. Localization of reward-relevant neurons in the pontine tegmentum: a moveable electrode mapping study. *Brain Res.* **496**, 295–302 (1989).
44. Van Der Kooy, D., Fibiger, H. C. & Phillips, A. G. An analysis of dorsal and median raphe self-stimulation: Effects of para-chlorophenylalanine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **8**, 441–445 (1978).
45. Fakhoury, M., Rompré, P. P. & Boye, S. M. Role of the dorsal diencephalic conduction system in the brain reward circuitry. *Behav. Brain Res.* **296**, 431–441 (2016).
46. Weixin, Z., Li, Y., Feng, Q. & Luo, M. Learning and Stress Shape the Reward Response Patterns of Serotonin Neurons. *J. Neurosci.* **37**, 1181–17 (2017).

47. Harrison, A. A., Liem, Y. T. B. & Markou, A. Fluoxetine combined with a serotonin-1A receptor antagonist reversed reward deficits observed during nicotine and amphetamine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* **25**, 55–71 (2001).
48. Rocha, B. A. *et al.* Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat. Neurosci.* **1**, 132–7 (1998).
49. Hnasko, T. S., Sotak, B. N. & Palmiter, R. D. Cocaine-conditioned place preference by dopamine-deficient mice is mediated by serotonin. *J. Neurosci.* **27**, 12484–12488 (2007).
50. De Deurwaerdère, P. & Di Giovanni, G. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic systems: Therapeutic implications. *Prog. Neurobiol.* **151**, 175–236 (2017).
51. Azmitia, E. C. & Segal, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **179**, 641–667 (1978).
52. Ishimura, K. *et al.* Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* **91**, 265–270 (1988).
53. Luo, M., Zhou, J. & Liu, Z. Reward processing by the dorsal raphe nucleus: 5-HT and beyond. *Learn. Mem.* **22**, 452–460 (2015).
54. McDevitt, R. A. *et al.* Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: Differential participation in reward circuitry. *Cell Rep.* **8**, 1857–1869 (2014).
55. Fonseca, M. S., Murakami, M. & Mainen, Z. F. Activation of dorsal raphe serotonergic neurons promotes waiting but is not reinforcing. *Curr. Biol.* **25**, 306–315 (2015).
56. 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.* **17**, 1777–1783 (2014).
57. 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**, 1–11 (2020).
58. 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).
59. 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).
60. Hochbaum, D. R. *et al.* All-optical electrophysiology in mammalian neurons using

- engineered microbial rhodopsins. *Nat. Methods* **11**, 825–33 (2014).
61. Vertes, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* **313**, 643–668 (1991).
 62. 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).
 63. Miyazaki, K. W. *et al.* Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr. Biol.* **24**, 2033–2040 (2014).
 64. Miyazaki, K. *et al.* Reward probability and timing uncertainty alter the effect of dorsal raphe serotonin neurons on patience. *Nat. Commun.* **9**, 2048 (2018).
 65. Mattis, J. *et al.* Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat. Methods* **9**, 159–72 (2011).
 66. Byerley, W. F., Reimherr, F. W., Wood, D. R. & Grosser, B. I. Fluoxetine, a selective serotonin uptake inhibitor, for the treatment of outpatients with major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* **8**, 112–5 (1988).
 67. Muijen, M., Roy, D., Silverstone, T., Mehmet, A. & Christie, M. A comparative clinical trial of fluoxetine, mianserin and placebo in depressed outpatients. *Acta Psychiatr. Scand.* **78**, 384–90 (1988).
 68. Feighner, J. P. & Overø, K. Multicenter, placebo-controlled, fixed-dose study of citalopram in moderate-to-severe depression. *J. Clin. Psychiatry* **60**, 824–30 (1999).
 69. Ressler, K. J. & Nemeroff, C. B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress. Anxiety* **12 Suppl 1**, 2–19 (2000).
 70. Ren, J. *et al.* Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. *Cell* 1–16 (2018). doi:10.1016/j.cell.2018.07.043
 71. Browne, C. J. *et al.* Dorsal raphe serotonin neurons inhibit operant responding for reward via inputs to the ventral tegmental area but not the nucleus accumbens: evidence from studies combining optogenetic stimulation and serotonin reuptake inhibition. *Neuropsychopharmacology* **44**, 793–804 (2019).
 72. Tanaka, K. F. *et al.* Expanding the Repertoire of Optogenetically Targeted Cells with an Enhanced Gene Expression System. *Cell Rep.* **2**, 397–406 (2012).
 73. Grimm, D. *et al.* In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses. *J. Virol.* **82**, 5887–5911 (2008).
 74. Jacobs, B. L. & Azmitia, E. C. Structure and function of the brain serotonin system.

- Physiol. Rev.* **72**, 165–230 (1992).
75. Charara, A. & Parent, A. Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* **15**, 111–27 (1998).
 76. Gras, C. *et al.* A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* **22**, 5442–5451 (2002).
 77. Hioki, H. *et al.* Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *J. Comp. Neurol.* **518**, 668–686 (2010).
 78. Ren, J. *et al.* Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *Elife* **8**, 1–36 (2019).
 79. Tzschentke, T. M. & Schmidt, W. J. Functional heterogeneity of the rat medial prefrontal cortex: Effects of discrete subarea-specific lesions on drug-induced conditioned place preference and behavioural sensitization. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 4099–4109 (1999).
 80. Otis, J. M., Dashew, K. B. & Mueller, D. Neurobiological dissociation of retrieval and reconsolidation of cocaine-associated memory. *J. Neurosci.* **33**, 1271–1281 (2013).
 81. Hayashi, K., Nakao, K. & Nakamura, K. Appetitive and aversive information coding in the primate dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* **35**, 6195–6208 (2015).
 82. Tan, K. R. *et al.* GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* **73**, 1173–83 (2012).
 83. Solecki, W. B. *et al.* Effects of brief inhibition of the ventral tegmental area dopamine neurons on the cocaine seeking during abstinence. *Addict. Biol.* 1–13 (2019). doi:10.1111/adb.12826
 84. Di Giovanni, G. & De Deurwaerdère, P. New therapeutic opportunities for 5-HT_{2C} receptor ligands in neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Ther.* **157**, 125–162 (2016).
 85. Kupfer, D. J., Frank, E. & Phillips, M. L. Major depressive disorder: New clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* **379**, 1045–1055 (2012).
 86. Mann, J. J. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* **21**, 99S–105S (1999).
 87. Köhler, S., Cierpinsky, K., Kronenberg, G. & Adli, M. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. *J. Psychopharmacol.* **30**, 13–22 (2016).
 88. Teissier, A. *et al.* Activity of Raphe Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Rep.* **13**, 1965–1976 (2015).
 89. Sagi, Y. *et al.* Emergence of 5-HT_{5A} signaling in parvalbumin neurons mediates delayed antidepressant action. *Mol. Psychiatry* **25**, 1191–1201 (2020).

90. Katz, M. M. *et al.* Onset and early behavioral effects of pharmacologically different antidepressants and placebo in depression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 566–579 (2004).
91. Krishnan, V. *et al.* Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* **131**, 391–404 (2007).
92. Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O. & Russo, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* **6**, 1183–1191 (2011).
93. 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. U. S. A.* **112**, 2557–2562 (2015).
94. Berton, O. *et al.* Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*. **311**, 864–868 (2006).
95. Challis, C. *et al.* Raphe GABAergic Neurons Mediate the Acquisition of Avoidance after Social Defeat. *J. Neurosci.* **33**, 13978–13988 (2013).
96. Zou, W. J. *et al.* A discrete serotonergic circuit regulates vulnerability to social stress. *Nat. Commun.* **11**, 1–13 (2020).
97. Fanselow, M. S. & Dong, H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* **65**, 7–19 (2010).
98. O'Reilly, R. C. & McClelland, J. L. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: Avoiding a trade-off. *Hippocampus* **4**, 661–682 (1994).
99. Dale, E. *et al.* Effects of serotonin in the hippocampus: How SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectr.* **21**, 143–161 (2016).
100. Bower, G. H. Commentary on mood and memory. *Behav. Res. Ther.* **25**, 443–55 (1987).
101. Gotlib, I. H. *et al.* Coherence and specificity of information-processing biases in depression and social phobia. *J. Abnorm. Psychol.* **113**, 386–398 (2004).
102. Hamilton, J. P. & Gotlib, I. H. Neural Substrates of Increased Memory Sensitivity for Negative Stimuli in Major Depression. *Biol. Psychiatry* **63**, 1155–1162 (2008).
103. Koster, E. H. W., De Raedt, R., Leyman, L. & De Lissnyder, E. Mood-congruent attention and memory bias in dysphoria: Exploring the coherence among information-processing biases. *Behav. Res. Ther.* **48**, 219–225 (2010).
104. Gaddy, M. A. & Ingram, R. E. A meta-analytic review of mood-congruent implicit memory in depressed mood. *Clin. Psychol. Rev.* **34**, 402–416 (2014).
105. Seligman, M. E. P. Positive Psychology: A Personal History. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **15**, 1–23 (2019).

106. Fredrickson, B. L. The role of positive emotions in positive psychology. The broaden-and-build theory of positive emotions. *Am. Psychol.* **56**, 218–26 (2001).
107. Sin, N. L. & Lyubomirsky, S. Enhancing well-being and alleviating depressive symptoms with positive psychology interventions: a practice-friendly meta-analysis. *J. Clin. Psychol.* **65**, 467–87 (2009).
108. Wong, P. T. P. Existential positive psychology and integrative meaning therapy. *Int. Rev. Psychiatry* **32**, 565–578 (2020).
109. Frankland, P. W., Josselyn, S. A. & Köhler, S. The neurobiological foundation of memory retrieval. *Nat. Neurosci.* **22**, 1576–1585 (2019).
110. Josselyn, S. A. & Tonegawa, S. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*. **367**, (2020).
111. Schacter, D. L., Eich, J. E. & Tulving, E. Richard Semon’s theory of memory. *J. Verbal Learning Verbal Behav.* **17**, 721–743 (1978).
112. Liu, X. *et al.* Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* **484**, 381–385 (2012).
113. Ramirez, S. *et al.* Creating a false memory in the hippocampus. *Science*. **341**, 387–91 (2013).
114. Redondo, R. L. *et al.* Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature* **513**, 426–430 (2014).
115. Roy, D. S. *et al.* Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer’s disease. *Nature* **531**, 508–512 (2016).
116. Roy, D. S., Muralidhar, S., Smith, L. M. & Tonegawa, S. Silent memory engrams as the basis for retrograde amnesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E9972–E9979 (2017).
117. Chen, B. K. *et al.* Artificially Enhancing and Suppressing Hippocampus-Mediated Memories. *Curr. Biol.* **29**, 1885-1894.e4 (2019).
118. Zhang, T. R. *et al.* Negative memory engrams in the hippocampus enhance the susceptibility to chronic social defeat stress. *J. Neurosci.* **39**, 7576–7590 (2019).
119. Doucette, E. *et al.* Social behavior in mice following chronic optogenetic stimulation of hippocampal engrams. *Neurobiol. Learn. Mem.* **176**, (2020).
120. Ramirez, S. *et al.* Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. *Nature* **522**, 335–339 (2015).
121. Ye, L. *et al.* Wiring and Molecular Features of Prefrontal Ensembles Representing Distinct Experiences. *Cell* **165**, 1776–1788 (2016).
122. Guenther, C. J., Miyamichi, K., Yang, H. H., Heller, H. C. & Luo, L. Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: Targeted recombination in

- active populations. *Neuron* **78**, 773–784 (2013).
123. Denny, C. A. *et al.* Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron* **83**, 189–201 (2014).
 124. Kirihara, Y., Takechi, M., Kurosaki, K., Kobayashi, Y. & Kurosawa, T. Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Exp. Anim.* **62**, 173–80 (2013).
 125. Andoh, C. *et al.* TRPM2 confers susceptibility to social stress but is essential for behavioral flexibility. *Brain Res.* **1704**, 68–77 (2019).
 126. Matsuda, T. & Cepko, C. L. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1027–1032 (2007).
 127. Kaufling, J. Alterations and adaptation of ventral tegmental area dopaminergic neurons in animal models of depression. *Cell Tissue Res.* 59–71 (2019).
doi:10.1007/s00441-019-03007-9
 128. Douma, E. H. & de Kloet, E. R. Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **108**, 48–77 (2020).
 129. Wittmann, B. C. *et al.* Reward-related fMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus-dependent long-term memory formation. *Neuron* **45**, 459–467 (2005).
 130. Russo, S. J. & Nestler, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 609–625 (2013).
 131. Castillo Díaz, F., Caffino, L. & Fumagalli, F. Bidirectional role of dopamine in learning and memory-active forgetting. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **131**, 953–963 (2021).
 132. Chaudhury, D. *et al.* Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* **493**, 532–536 (2013).
 133. Tye, K. M. *et al.* Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* **493**, 537–541 (2013).
 134. Friedman, A. K. *et al.* Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience. *Science.* **344**, 313–9 (2014).
 135. Wook Koo, J. *et al.* Essential Role of Mesolimbic Brain-Derived Neurotrophic Factor in Chronic Social Stress–Induced Depressive Behaviors. *Biol. Psychiatry* **80**, 469–478 (2016).
 136. Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. & Simon, P. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* **85**, 367–370 (1985).
 137. Walsh, J. J. *et al.* 5-HT release in nucleus accumbens rescues social deficits in mouse autism model. *Nature* (2018). doi:10.1038/s41586-018-0416-4

138. Dölen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W. & Malenka, R. C. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature* **501**, 179–184 (2013).
139. Marcinkiewicz, C. A. *et al.* Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature* **537**, 97–101 (2016).
140. Mosienko, V. *et al.* Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl. Psychiatry* **2**, e122-9 (2012).
141. Takahashi, A., Shimamoto, A., Boyson, C. O., DeBold, J. F. & Miczek, K. A. GABAB receptor modulation of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus and escalation of aggression in mice. *J. Neurosci.* **30**, 11771–11780 (2010).
142. Stanton, C. H., Holmes, A. J., Chang, S. W. C. & Joormann, J. From Stress to Anhedonia: Molecular Processes through Functional Circuits. *Trends Neurosci.* **42**, 23–42 (2019).
143. Nagai, Y. *et al.* The role of dorsal raphe serotonin neurons in the balance between reward and aversion. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–17 (2020).
144. Nazzi, S., Maddaloni, G., Pratelli, M. & Pasqualetti, M. Fluoxetine Induces Morphological Rearrangements of Serotonergic Fibers in the Hippocampus. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 3218–3224 (2019).
145. Medrihan, L. *et al.* Initiation of Behavioral Response to Antidepressants by Cholecystokinin Neurons of the Dentate Gyrus. *Neuron* **95**, 564-576.e4 (2017).
146. Felsenberg, J. *et al.* Integration of Parallel Opposing Memories Underlies Memory Extinction. *Cell* **175**, 709-722.e15 (2018).
147. Zhang, X., Kim, J. & Tonegawa, S. Amygdala Reward Neurons Form and Store Fear Extinction Memory. *Neuron* **105**, 1077-1093.e7 (2020).
148. Kitamura, T. *et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science.* **356**, 73–78 (2017).
149. DeNardo, L. A. *et al.* Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nat. Neurosci.* **22**, 460–469 (2019).
150. Sengupta, A. & Holmes, A. A Discrete Dorsal Raphe to Basal Amygdala 5-HT Circuit Calibrates Aversive Memory. *Neuron* 1–17 (2019). doi:10.1016/j.neuron.2019.05.029
151. Knowland, D. *et al.* Distinct Ventral Pallidal Neural Populations Mediate Separate Symptoms of Depression. *Cell* **170**, 284-297.e18 (2017).
152. Zhou, W. *et al.* A neural circuit for comorbid depressive symptoms in chronic pain. *Nat. Neurosci.* **22**, (2019).