

抗うつ薬および慢性ストレスに対する
セロトニン神経の報酬応答性変化
に関する研究

2024

好 田 匡 志

目次

緒言	1
第一章	
抗うつ薬および慢性社会的敗北ストレスが 背側縫線核セロトニン神経活動に及ぼす影響の解明	5
実験方法	7
実験結果	11
考察	22
第二章	
抗うつ薬急性投与による 背側縫線核セロトニン神経の報酬応答性減弱の薬理学的解析	25
実験方法	27
実験結果	28
考察	34
結言（総括および展望）	37
謝辞	39
発表論文目録	40
引用文献	41

緒言

うつ病は、気分、認知、意欲の低下および悲観的な考えや抑うつ感情の持続を特徴とする精神疾患であり¹、先進国を中心に世界中で約 2 億 8000 万人が罹患しているといわれている²。環境ストレス因子がうつ病の最も重要なリスク因子の一つである^{3,4}。適切なストレス刺激は、身体的または心理的脅威への適応を促進する⁵が、一方で過度のストレスへの慢性的な曝露は、脳機能の低下を引き起こし、最終的にはうつ病の発症に至る⁶。うつ病の治療には選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）等の抗うつ薬が使用されることが多い⁷⁻⁹。SSRI 等の従来型抗うつ薬を使用した治療では、抗うつ効果発現までには 4-12 週間もの期間を要するため継続的な投与が必要となるが、投与初期の期間には抑うつ症状がかえって悪化することもあり、他者に対する敵意や攻撃性、自殺念慮の懸念がある。また悪心嘔吐等の消化器症状や不安障害、睡眠障害等の副作用のために服薬継続に嫌悪感を示す患者も多い。さらに、うつ病罹患者の約 3 分の 1 において従来の治療法に対して抵抗性を示す治療抵抗性病態に罹患していることが臨床上問題となっている¹⁰⁻¹³。これらの問題を解決するためには、うつ病態とその治療法についての生物学的理解をさらに深めるとともに、その理解に基づいた高い治療効果と速効性を有した新規治療法の創出が必要不可欠である。

これまでの基礎研究から、セロトニン合成酵素であるトリプトファンヒドロキシラーゼ 2（TPH2）遺伝子の機能低下型がうつ病患者より同定されていること¹⁴、その多型に相当するアミノ酸置換を有する遺伝子改変マウスがうつ様行動を示すこと¹⁵が報告されている。また、うつ病発症要因であるストレスに対する耐性や対処において中脳辺縁系に存在するセロトニン神経系が重要な役割を果たすことが示されている^{16,17}。したがって、これらを含む多くの報告から、うつ病とセロトニン神経との間には深い因果関係があることが近年示唆されている。そこで著者は、脳内最大のセロトニン神経核である背側縫線核（DRN）に着目し、DRN セロトニン神経とうつ病との関連性について研究を行ってきた。他の研究グループを含む著者らのグループは、チャネルロドプシンやハロロドプシン等の光感受性タンパク質を目的細胞に発現させることで光による人為的な興奮性・抑制性制御を可能とした光遺伝学的手法（optogenetics）¹⁸を用いた研究において、DRN セロトニン神経の人為的な活性化はオペラント条件付けにおける報酬行動を誘発し¹⁹⁻²¹、さらに抗うつ様効果をもたらすことを報告してきた^{22,23}。これはセロトニン神経とうつ病との因果関係を証明することがうつ病の病態機序解明および根本的な治療法の創出にきわめて重要であることを意味する。この因果関係を証明するためには、セロトニン神経活動変化の結果としてうつ病態および抗うつ効果が誘発されるという「必要性」に加えて、うつ様行動、抗うつ様作用・報酬関連行動によりセロトニン神経活動変動が起こるという「十分性」の両方向の証明が必要不可欠である。現状では光遺伝学等を用いた介入的手法により「必要性」に関する知見が多く報告されている¹⁹⁻²⁴。

また「十分性」については、主に電気生理学等の観察的手法を用いた知見が報告されている²⁵⁻³⁰。しかし電気生理学を用いた実験は麻酔下の動物、あるいは急性単離培養切片を用いたものであるため、うつ病態や薬物等による治療効果に対するセロトニン神経活動変化を生理的条件下で評価したものとは言い難い。また、報酬関連行動等の自発的自由行動に伴う神経活動の測定および評価については、電気生理学的手法のみでは不可能である。そのため、セロトニン神経がうつ病態時および薬物治療時に「いつ」「どのように」活動変化しうるのかについて評価するためには、生存条件下、自由行動下の被験体を対象とした神経活動測定を実施することが重要である。

そこで本研究において、第一章では、自由行動下の動物において特定の細胞集団の神経活動を計測することが可能なファイバーフォトメトリー法を用いて、慢性ストレス負荷および抗うつ薬投与がセロトニン神経活動に与える影響について解析を行った。さらに第二章では、抗うつ薬の投与期間の違いが神経活動応答性に変化を及ぼす分子機序について薬理学的解析を行うとともにそこに関与する神経回路の同定を行った。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

5-HT	5-hydroxytryptamine
AAV	adeno-associated virus
AAV-DJ	AAV serotype DJ
ANOVA	analysis of variance
axon GCaMP	axon-targeted GCaMP
CeA	central amygdala
Cit	citalopram
CMOS	complementary metal oxide semiconductor
CSDS	chronic social defeat stress
Ctrl	control
DREADD	designer receptors exclusively activated by designer drugs
DRN	dorsal raphe nucleus
DSM-5-TR	diagnostic and statistical manual of mental disorder 5 th edition text revision
ECT	electric convulsive therapy
fMRI	functional magnetic resonance imaging
GABA	gamma-aminobutyric acid
GCaMP	Ca ²⁺ probe based on a single GFP molecule with high Ca ²⁺ affinity
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G-protein-coupled receptor
ICD-11	international classification of disease 11 th edition
i.p.	intraperitoneal
LED	light emitting diode
LH	lateral hypothalamus
LHb	lateral habenula
mTph2	mouse Tph2
NAc	nucleus accumbens
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	PBS containing 0.25% Triton TM X-100
PFA	paraformaldehyde

qPCR	quantitative polymerase chain reaction
Res	resilient
SI	social interaction
SNRI	serotonin–noradrenaline reuptake inhibitor
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
Sus	susceptible
TMS	transcranial magnetic stimulation
Tph2	tryptophan hydroxylase 2
TST	tail suspension test
VP	ventral pallidum
VTA	ventral tegmental area

第一章

抗うつ薬および慢性社会的敗北ストレスが 背側縫線核セロトニン神経活動に及ぼす影響の解明

うつ病は報酬感の喪失である無快感症および持続的な抑うつ症状を主徴とする精神疾患であり、報酬情報処理の異常はうつ病態と深く関係している¹。Ca²⁺濃度変化を蛍光強度変化として検出可能な Ca²⁺センサータンパク質（GCaMP6s³¹ 等）を用いて神経活動の測定を行った過去の研究では、背側縫線核（DRN）セロトニン神経はスクロース水や他個体（特に異性）との接触に代表される報酬刺激によって神経活動を上昇させるということが明らかとなっている³²。これらの報告は報酬情報処理における DRN セロトニン神経の重要性を示唆している。

げっ歯類、ヒトの両方において、ストレスへの慢性的な曝露によって快感の消失および報酬に対する嗜好性の減弱が引き起こされることが報告されている^{33,34}。それゆえ、慢性ストレスはうつ病発症の原因になると考えられているが、その背景には DRN セロトニン神経の活動の変調が関連するといわれている¹⁷。*Ex vivo* 電気生理学的測定を行った研究では、大型マウスによる身体的攻撃を 10 日間繰り返し与える慢性社会的敗北ストレス（CSDS）負荷によって作製されたストレス感受性マウスでは、DRN セロトニン神経の活動性が減少したこと、一方でストレス耐性マウスのそれは変化しなかったことが報告されている^{25,26}。しかしながら、慢性ストレスが DRN セロトニン神経の報酬応答性に及ぼす影響については、未だ解明されていない。

SSRI 等の抗うつ薬はうつ病の治療に適用される場合が多い。一方で臨床適用においてはその問題点が多く指摘されており、抗うつ効果発現までに 4-12 週間もの長期にわたる継続的な投与が必要であり、投与初期にはむしろ抑うつ症状が悪化する症例が数多く報告されている^{10,11}。そのため、より効果的で安全な臨床適用のためには、SSRI がセロトニン神経活動に及ぼす影響についてより理解を深める必要がある。麻酔下の動物を用いた過去の電気生理学的検討では、DRN における遅発火および規則発火神経の活動が SSRI の急性投与により抑制され、SSRI の慢性投与により回復することが報告されている²⁷⁻³⁰。これらの知見は SSRI における臨床特性に類似しているものの、抗うつ薬が DRN セロトニン神経の報酬応答性に及ぼす影響については、未だ不明な点が多い。

過去に報告されたこれらの電気生理学的手法を用いた研究では、その電気生理学的特性に基づきセロトニン神経と推定される神経の活動が測定されたと考えられる。しかしながら、近年の基準においてはその細胞種選択性に対する信憑性は低いと考えられ、遺伝学的に同定されたセロトニン神経を対象とした解析を改めて行う必要があるとされている^{35,36}。また *ex vivo* での解析では、麻酔下の動物あるいは急性単離脳切片を解析対象としているため、報酬に対する応答性を直接評価することは極めて困難である。

そこで本章では、自由行動下の動物における神経細胞内の Ca^{2+} 変動をリアルタイムで測定することで Ca^{2+} 変動を神経活動変化として検知することが可能なファイバーフォトメトリー法を用いた神経活動測定を実施した。これを用いて報酬刺激に対するマウス DRN セロトニン神経の活動変化を記録することで、無処置時（健常時）に対する慢性ストレス負荷時、あるいは抗うつ薬の急性・慢性投与時での報酬応答性の変化について比較検討を行った。

実験方法

使用動物

全ての実験は京都大学動物実験委員会（承認番号：19-41）および日本薬理学会の倫理ガイドラインに沿って実施した。実験には成体 C57BL/6JmsSlc 雄性マウス（8-12 週齢、日本エスエルシー）を使用した。すべてのマウスは室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間毎の明暗周期の条件のもと、木製床敷を敷き詰めたプラスチック製飼育容器内で水および餌（MF 飼料、オリエンタル酵母）を自由に摂取できる環境下で飼育した。本研究では、脳定位手術後に斜頸や胴体の回転運動のような異常行動を示した個体についてはすべての実験結果から除外した。

ウイルスベクターの作製と精製

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、先行研究^{21,37}に基づき、若干の修正を加えて作製および精製した。Lenti-X 293T 細胞（タカラバイオ株式会社）を 60-70%コンフルエンスに達するまで培養した後、pHelper 8 μg 、pAAV-DJ Rep-Cap（Cell Biolabs）5 μg 、およびトランスファープラスミド 5 μg をポリエチレンイミン（24765-1, Polysciences）を用いて Lenti-X 293T 細胞にトランスフェクションした。培養後 60-72 時間経過した後、上清を吸引除去し、1 $\times$ gradient buffer 500 μL をディッシュ内の細胞に添加した。細胞をディッシュから剥離した後、細胞懸濁液を回収した。この懸濁液を液体窒素中で 10 分間凍結し、 55°C の水浴で完全に解凍するまで温めた。この凍結-解凍サイクルを 3 回繰り返した後、benzonase（E1014-5KU, Sigma-Aldrich）0.5 μL を懸濁液に添加した。溶解液を 37°C で 60 分間インキュベートした後、 $3000\times g$ で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。不連続密度勾配液として 15%、25%、40%、および 58%の iodixanol を超遠心管内に準備し、得られた上清を密度勾配の最上層に慎重に滴下した。超遠心管内の不連続密度勾配液を 50.4Ti rotor（Beckman-Coulter）を用いて 48,000 rpm（平均 $248,113\times g$ ）で 18°C 、1 時間遠心した。その後、21G の針を装着したシリンジを 40%と 58%の勾配バッファー層の境界下約 1-2 mm の位置に挿入し、約 0.5 mL の溶液を徐々に抽出した。この溶液を分注し、使用時まで -80°C で保存した。作製した AAV ベクターの種類および qPCR 法で測定した力価はそれぞれ以下の通りであった。

- ① mTPH2::Venus（AAV-mTPH2-Venus-WPRE） ; 力価 58.6×10^{12} IU/mL
- ② mTPH2::GCaMP6s（AAV-mTPH2-GCaMP6s-WPRE） ; 力価 40.0×10^{12} IU/mL

脳定位手術

脳定位手術はマウス用脳定位固定装置および固定装置用マイクロマニピュレーター（SR-5M-HT、SMM-100、成茂科学器械研究所）を使用し、Brain Atlas³⁸にしたがって実施した。動物の麻酔には、塩酸メドミジン（0.75 mg/kg、日本全薬工業）、ミダゾラム

(4 mg/kg、アステラス製薬) および酒石酸ブトルファノール (5 mg/kg、Meiji Seika ファルマ) の三種混合麻酔を使用した。また術後覚醒にはアチパメゾール (4.5 mg/kg、共立製薬) を使用した。AAV ベクターは上記①および②を用いた。AAV は 1 μ L をそれぞれの座標に微量投与した。その中心座標は bregma を基準に、DRN (主に腹側 DRN) では体軸方向 (AP) -4.6 mm、内外方向 (ML) +1.15 mm、右脳側へ 20°、頭蓋骨表面から深さ+3.7 mm とした。

ファイバーフォトメトリー (Fiber photometry)

カルシウムシグナルの一過性変化は、先行研究に基づき製作したファイバーフォトメトリー装置を用いて測定した^{39,40}。蛍光シグナルの記録には、LED 光源 (M470L3, Thorlabs) から発せられた 470 nm 波長の青色光をダイクロイックミラー (MD498, Thorlabs) で反射させ、 $\times 10$ 対物レンズ (MRH00101, Nikon) によって光ファイバーの先端に集光した。ファイバーパッチケーブル (MFP_400/430/1100-0.57_2m_FC-ZF1.25(F)_LAF, $\phi 400$ μ m core, 0.57 NA, Doric Lenses) を介して、検出装置とマウス頭部に留置した光ファイバー (光ファイバー: FP400URT, $\phi 400$ μ m core, 0.50 NA, Thorlabs; セラミックフェルール: CFLC440-10, Thorlabs) との間の光を伝送した。ブリーチング (退色効果) を最小限にするため、光ファイバー先端における LED の出力は 0.02–0.03 mW に調整した。GCaMP から発せられる蛍光は CMOS カメラ (CS2100M-USB, Thorlabs) を用いて検出した。生の蛍光シグナルを 10 Hz で画像化し、ImageJ ソフトウェアのプラグイン MicroManager (<https://micro-manager.org/>) を用いて記録した。フォトメトリーのデータ解析においては、個々の試行ごとにデータを分割し解析を行った。蛍光強度変化 ($\Delta F/F_0$) の値は、 $(F-F_0)/F_0$ の式を用いて導出した。ここにおける F_0 とは、イベントの開始 2.0 秒前から 1.0 秒前までの 1.1 秒間の制御時間内で平均化した基準蛍光シグナルのことを指す。

慢性社会的敗北ストレス (CSDS)

CSDS は、先行研究に基づき、若干の修正を加えて実施した^{41–43}。攻撃マウスとしては繁殖経験のある成体 ICR 雄性マウス (12 週齢以上、日本エスエルシー) を用いた。ICR マウスの選別方法として以下の手法を用いた。健康な C57BL/6JmsSlc マウスに対して、攻撃に至るまでの時間および攻撃回数により攻撃性を測定し、攻撃マウスとして CSDS を施行するに適性のある個体のみ選別し実験に使用した。実験に先立ち、C57BL/6JmsSlc 雄性マウスを各々独立して単飼育した。これらのマウスを ICR マウスのホームケージに毎日 5 分間、計 10 日間にわたって繰り返し投入し、ICR マウスからの身体的攻撃を与えた。各マウスの組み合わせは、ICR マウスの攻撃性における変動を最小限に抑えるために毎回変更した。

スクロース水飲水試験 (Sucrose licking test)

試験実施に先立って、試験前日からマウスには 16–24 時間にわたる水分摂取制限を行った。また、試験用給水瓶に対する新規物体探索防止措置として、初めて本試験を実施する個体については計 2 日間の馴化を実施した。試験当日、10%スクロース水溶液(w/v)を満たした給水瓶を設置したケージ (136×208×115 mm、幅×長さ×高さ) 内にマウスを配置した³⁷。試験は自由行動下の環境で 10 分間実施した。スクロース水飲水時のタイムポイントは、記録映像から実験者が手動で抽出した。

社会的相互作用試験 (Social interaction test)

社会的相互作用試験は、CSDS 最終日の翌日以降に実施した。このテストは、先行研究に基づき^{41–43}、若干の修正を加えて実施した。CSDS 負荷マウスをテスト環境への馴化のため、本試験前に何も配置していない状態のオープンフィールド (500×500×500 mm) 内に約 120 秒間保持し自由探索させた。次に、ターゲット無しセッションとして、空のワイヤーメッシュケージ (100×65 mm) をフィールドの側面中央部に配置したオープンフィールド内でマウスを 150 秒間保持し自由探索させた。続いてターゲット有りセッションとして、同じマウスをワイヤーメッシュケージ内に ICR マウスを収容した状態でオープンフィールド内にマウス 150 秒間保持し自由探索させた。試験中のマウスの行動を動画で記録し、移動軌跡は ANY-MAZE ソフトウェア (Stoelting Co.) を用いて解析した。フィールド内の 4 隅 (各 900 mm²) は回避 (Avoidance) ゾーン、ワイヤーメッシュケージの周囲領域 (140×240 mm) は相互作用 (Interaction) ゾーンとして定義した。社会的相互作用比 (SI 比) は、ターゲット有りセッションにおける相互作用ゾーン内の滞在時間を、ターゲット無しセッションでの相互作用ゾーン内の滞在時間で割った値として計算した。観察期間 (150 秒) 中の SI 比をストレス感受性の指標として用いた。

薬物処置

抗うつ薬として、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の一種である塩酸シタロプラム (FWD Chemicals) を用いた。SSRI 急性投与として、シタロプラムを生理食塩水に溶解 (1 mg/mL) し、行動試験の 30 分前にマウスへ腹腔内注射 (10 mg/kg) した。SSRI 慢性投与として、シタロプラムを水道水に溶解 (0.2 mg/mL) し、28 日間にわたり自己飲水投与した^{30,43}。マウスの水の摂取量は 1 日あたり約 3–4 mL であり、マウスの体重は 20–30 g であった。これにより投与量は約 24 mg/kg/日となった。薬物を含む飲料水は遮光し、3–5 日ごとに再調製したものへ交換した。なおこの投与戦略は、尾懸垂試験 (Tail suspension test: TST) においてストレスに対する能動的対処行動を持続的に増加させることを示した以前の報告⁴³に基づいて選択した。

免疫組織化学的検討

動物に三種混合麻酔を使用して麻酔をかけ、PBS を用いた経心灌流にて脱血処置を行った後、0.1 M リン酸緩衝液 (PB) に溶解した 4% パラホルムアルデヒド (PFA) (Nacalai Tesque) で灌流固定を行った。灌流固定後、脳組織を採取し 0.1 M PB に溶解した 15% スクロースに一晩浸して平衡化した後、凍結した。脳はクリオスタット (Leica CM3050S, Leica Biosystems) を用いて厚さ 30 μm で前頭断片に切片化し、免疫組織化学処理まで -80°C で保存した。切片を 0.25% Triton-X 100 (Nacalai Tesque) に浸して透過処理を行い、PBS で洗浄後 rabbit polyclonal anti-GFP antibody (1:2000; A-11122, Life Technologies) および sheep polyclonal anti-tryptophan hydroxylase (TPH) antibody (1:500; AB1541, Merck Millipore) を切片に浸して 4°C で一晩インキュベートした。切片を PBS で洗浄した後、Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit IgG (1:200; Life Technologies) および Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-sheep IgG (1:200; Life Technologies) を浸して室温で 2 時間インキュベートした。再度切片を PBS で洗浄後、Fluoromount/Plus (Diagnostic Biosystems) を切片に滴下しガラススライド内に封入した。蛍光像は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i, Olympus) および FV10i-SW ソフトウェア (Olympus; ImageJ, NIH) を用いて観察した。GFP 陽性、TPH 陽性、および二重陽性神経細胞の定量は各動物につき 3 切片ずつ行い、平均値を算出した。

統計解析

データは平均 (mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) として示し、各実験で用いた動物の数は図または説明に記載した。統計的有意性は Prism (version 9, GraphPad software) を用いて判断した。2 つ以上の実験群間の比較には、One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post hoc test を用いた。2 群間の比較には、unpaired t -test を使用した。分散の比較に用いる F test の p 値が 0.05 未満であった場合、unpaired t -test with Welch's correction を実施した。また、同一動物における 2 時点間の差異は、two-tailed paired Student's t -tests を用いて評価した。フォトメトリー解析では、各時点における $\Delta F/F_0$ の値とベースラインの値を使用して、1000 回の並べ替えを行い、 α レベルを 0.05 としてベースラインの値と比較した³²。全ての統計解析において、 p 値が 0.05 未満 ($p < 0.05$) となった場合を統計的有意であるとみなした。

実験結果

マウス TPH2 プロモーターによるセロトニン神経特異的遺伝子導入

マウストリプトファンヒドロキシラーゼ 2 (mTPH2) プロモーターによるセロトニン神経特異的遺伝子導入の性能を確認するため、mTPH2 プロモーター制御下で蛍光タンパク質 Venus^{22,44} を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-mTPH2-Venus-WPRE (mTPH2::Venus)^{21,37,45}) を作製し背側縫線核 (DRN) に微量投与した。mTPH2::Venus を微量投与したマウスにおいて、免疫組織化学的手法でプロモーターの性能を検証した結果 (図 1A,B)、高い特異性 ($88.5 \pm 2.7\%$) および感染率 ($90.1 \pm 2.5\%$) を確認した ($n = 3$ 、図 1C,D)。

報酬刺激に対する背側縫線核 (DRN) セロトニン神経の報酬応答性の記録

ファイバーフォトメトリー法を用いてセロトニン神経の活動を測定するために、mTPH2 プロモーター制御下でカルシウムセンサー蛍光タンパク質である GCaMP6s³¹ を発現する AAV (AAV-mTPH2-GCaMP6s-WPRE (mTPH2::GCaMP6s)) を作製し DRN に微量投与した。その 3 週間後には DRN 上に光ファイバーカニューレを留置した。先行研究に従って、本研究では DRN の中でも報酬や抗うつ効果に関連があるとされる腹側寄りの DRN を標識座標とした^{21,46}。脳定位手術からの回復を待った後、マウスにとって代表的な報酬刺激の一種である 10%スクロース水溶液を摂取させ、その摂取前後での GCaMP 蛍光の変化を測定した (図 2A–C)。GCaMP の蛍光は、スクロース水の飲水直前からその増加が観察され ($\Delta F/F_0 = 0.046 \pm 0.011$, mean $\pm$ SEM, $p < 0.05$ by permutation test, $n = 4$, 図 2D,E)、先行研究と一致した結果となった^{32,47}。スクロース濃度の減少に伴い、蛍光強度変化量の最大値 (peak $\Delta F/F_0$) は有意に低下しスクロース濃度と peak $\Delta F/F_0$ との間には正の相関が認められた ($R^2 = 0.1456$, $p < 0.0001$, 図 2F)。これらの結果から、先行研究と一貫して、自由行動下のマウスにおいても、報酬刺激は DRN セロトニン神経の活動を上昇させることが確認された。

DRN セロトニン神経の報酬応答性に対する慢性ストレスの影響

DRN セロトニン神経の報酬応答性に対する慢性社会的敗北ストレス (CSDS) の影響を検討するため、自由行動下のマウスにおいてファイバーフォトメトリー法を用いて CSDS 負荷の前後それぞれで、自発的なスクロース水飲水行動時の DRN セロトニン神経の応答性を測定し比較した (図 3A,B)。CSDS 負荷マウスが抑うつ関連行動を示すことについては、社会的相互作用試験にて確認を行った (図 4A)。先行研究^{41,43}に従って、社会的相互作用比 (SI 比 : 抗うつ様効果の指標) に基づいて CSDS 負荷を受けたマウスを、SI 比が 1 未満である個体をストレス感受性マウス (susceptible: Sus)、1 以上である個体をストレス耐性マウス (resilient: Res) として 2 群に分類した (図 4B)。

スクロース水飲水行動による Ca^{2+} 応答は、いずれの群においても CSDS 負荷前後で同程度の値を示した (naïve: peak $\Delta F/F_0 = 0.0867 \pm 0.0167$ (before), 0.076 ± 0.0188 (after), $p = 0.649$, $t_9 = 0.471$ by two-tailed paired Student's t -tests, $n = 10$; resilient: peak $\Delta F/F_0 = 0.0609 \pm 0.0140$ (before), 0.0757 ± 0.0184 (after), $p = 0.264$, $t_9 = 1.19$ by two-tailed paired Student's t -tests, $n = 10$; susceptible: peak $\Delta F/F_0 = 0.0994 \pm 0.0181$ (before), 0.0812 ± 0.0239 (after), $p = 0.464$, $t_{10} = 0.761$ by two-tailed paired Student's t -tests, $n = 11$, 図 3C)。CSDS 負荷前後のスクロース水飲水行動による peak $\Delta F/F_0$ の変化率も、3 群間で有意な差は認められなかった (naïve: $23.3 \pm 23.4\%$; resilient: $37.7 \pm 16.2\%$; susceptible: $23.6 \pm 29.3\%$, $p = 0.891$, $F_{2,28} = 0.116$ by one-way ANOVA, $n = 10-11$, 図 3C, D)。

先行研究では、DRN セロトニン神経の活動が社会的相互作用によっても誘導されることが示されている³²。そこで、社会的相互作用に対する DRN セロトニン神経の応答に与える CSDS の影響について検討した (図 4)。CSDS 負荷後の peak $\Delta F/F_0$ と CSDS 負荷前のそれとの比率は、ストレス感受性マウス (susceptible) で非ストレスマウス (naïve) より高い傾向であった (naïve: $-33.8 \pm 12.0\%$; resilient: $-20.5 \pm 13.4\%$; susceptible: $43.7 \pm 33.2\%$, $p = 0.0550$, $F_{2,27} = 3.61$ (susceptible vs. naïve) by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 10$, 図 4D, E)。これらの結果は、DRN セロトニン神経の報酬応答に対する CSDS の影響がごくわずかであることを示唆している。

DRN セロトニン神経の報酬応答性に対する抗うつ薬投与の影響

DRN セロトニン神経の報酬応答性に対する抗うつ薬投与の影響を検討するため、抗うつ薬の急性・慢性投与の前後それぞれにおいて、自由行動下マウスのスクロース水飲水行動 (図 5) および社会的相互作用行動 (図 6) における DRN セロトニン神経の GCaMP 蛍光を測定し比較した。本研究では先行研究に従い、抗うつ薬として選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の一種であるシタロプラムを使用した^{30,43,48}。まず、抗うつ薬投与前にスクロース水飲水行動に対する DRN セロトニン神経の応答を測定した。その翌日、抗うつ薬の急性投与としてシタロプラム (10 mg/kg) を腹腔内投与し、その 30 分後にスクロース水飲水試験を行った (図 5B)。その結果、シタロプラム急性投与は、スクロース水飲水によって誘発される GCaMP 蛍光の増加を有意に減弱させた (change rate of peak $\Delta F/F_0$: saline: $39.2 \pm 21.9\%$, acute citalopram: $-42.5 \pm 9.86\%$, $p = 0.0039$, $t_{15.3} = 3.40$ by unpaired t -test with Welch's correction; change rate of AUC: saline: $58.1 \pm 34.3\%$, acute citalopram: $-41.0 \pm 20.2\%$, $p = 0.0209$, $t_{22} = 2.49$ by unpaired t -test; $n = 12$ mice, 図 5C, D)。

次に抗うつ薬の慢性投与として、シタロプラムを飲料水に溶解 (0.2 mg/mL) し、4 週間自己飲水させた (約 24 mg/kg/日)^{30,43}。シタロプラム慢性投与終了後に再度スクロース水飲水試験を行った (図 5E, F)。その結果、シタロプラム投与前に記録したスクロース水飲水による GCaMP 蛍光増加は、シタロプラム慢性投与後においても投与前と同程度の蛍光増加を示した (change rate of peak $\Delta F/F_0$: water: $31.7 \pm 21.3\%$, chronic citalopram:

$6.91 \pm 23.1\%$, $p = 0.437$, $t_{22} = 0.791$ by unpaired t -test; change rate of AUC: water: $52.1 \pm 37.9\%$, chronic citalopram: $22.5 \pm 31.0\%$, $p = 0.552$, $t_{22} = 0.604$ by unpaired t -test; $n = 12$ mice, 図 5E, F)。

一方、社会的相互作用に対する DRN セロトニン神経の応答は、急性または慢性シタロプラム投与のいずれにおいても有意な変化を示さなかった (図 6D–G)。つまり、DRN セロトニン神経の報酬応答性については、スクロース水による報酬ではシタロプラム急性投与で減弱され、慢性投与後にそれが回復するという効果が見られたが、社会的報酬に対する応答は影響を受けなかった。

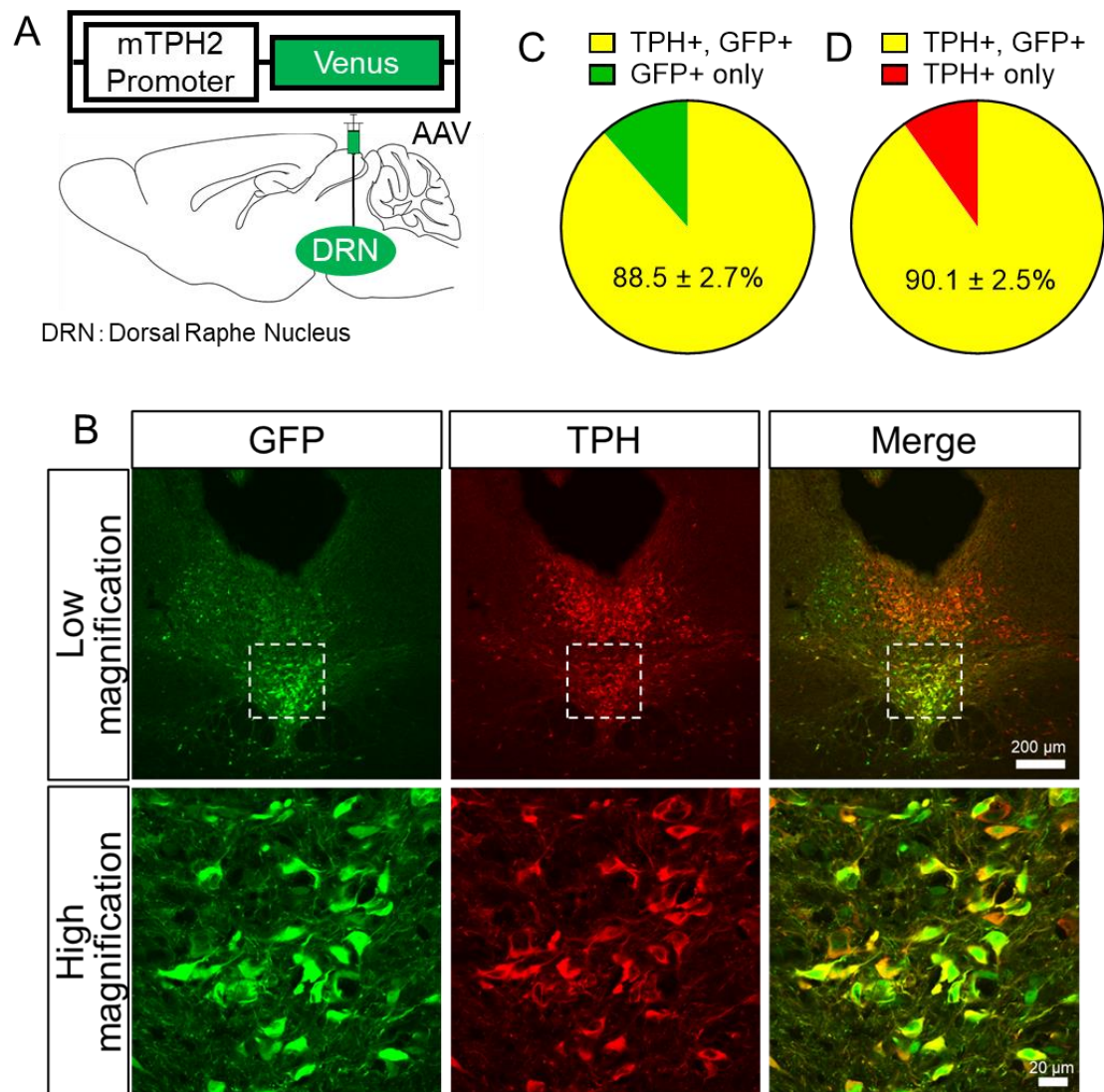


図 1. マウス TPH2 プロモーター搭載 AAV によるセロトニン神経特異的遺伝子導入の免疫組織化学的検証

(A) AAV (mTPH2::Venus) 注入部位の模式図。

(B) AAV 注入後の DRN 領域の抗 GFP および抗 TPH 抗体を用いた免疫染色の代表画像。スケールバーは 200 μm (Low) および 20 μm (High)。

(C) GFP 陽性細胞における二重陽性細胞割合の平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=3$)。特異性の評価。

(D) TPH 陽性細胞における二重陽性細胞割合の平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n=3$)。ウイルスベクターの感染効率の評価。

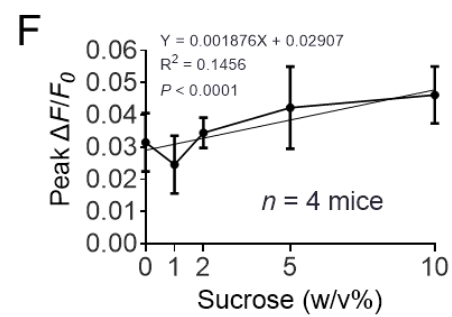
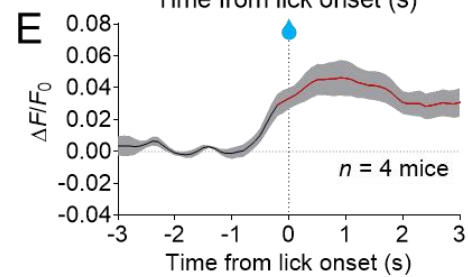
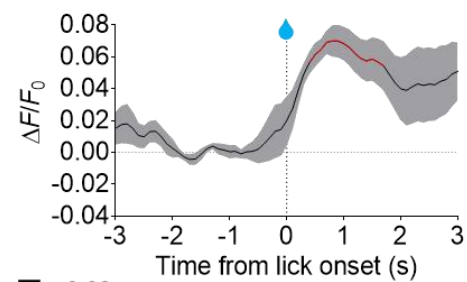
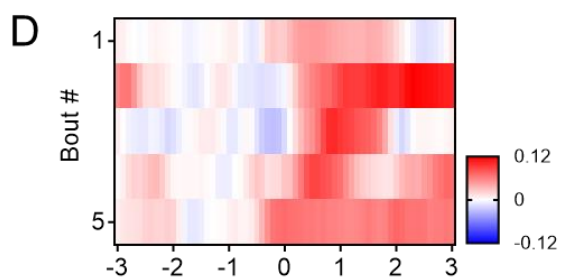
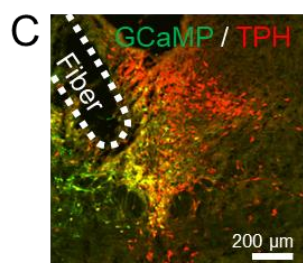
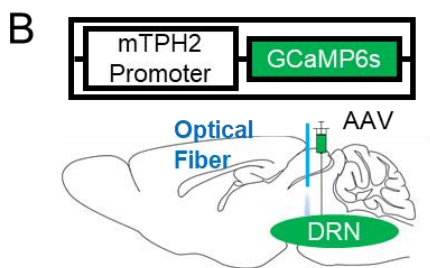
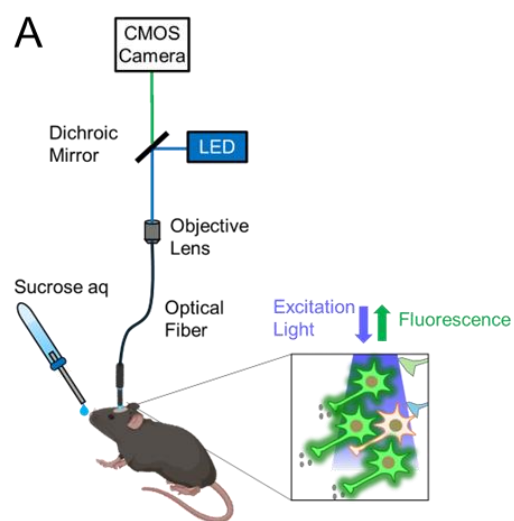


図 2. 自由行動下の動物に対するセロトニン神経特異的 Ca^{2+} シグナル変動の測定

(A) ファイバーフォトメトリー装置の模式図。試験用ケージ内でスクロース水溶液に自由にアクセスできる雄性 C57BL/6JmsSlc マウスから、GCaMP6s を発現する DRN セロトニン神経の Ca^{2+} シグナル変動が記録された。

(B) AAV (mTPH2::GCaMP6s) 注入部位および光ファイバー留置位置の模式図。

(C) mTPH2::GCaMP6s の注入およびファイバー留置位置を示す DRN の代表的な免疫染色画像（白線）。スケールバーは 200 μm 。

(D) 行動試験中のスクロース水飲水行動に関連する Ca^{2+} シグナル。上段：各スクロース水飲水行動開始時点の Ca^{2+} シグナルのヒートマップ。行は各飲水行動を表し、ここに示す代表マウスからは 5 回の飲水行動を記録した。右側のカラースケールは $\Delta F/F_0$ を示す。下段：各飲水行動の Ca^{2+} シグナル変動値の平均値を示す。太線と影付き領域はそれぞれ平均値と標準誤差を示す。赤線はベースラインからの有意な増加を示す ($p < 0.05$, $F_{100,400} = 4.24$ by permutation test, $n = 5$ events)。

(E) マウス 4 匹分の Ca^{2+} シグナル変動の平均。赤線はベースラインからの有意な増加を示す ($p < 0.05$, $F_{100,300} = 8.48$ by permutation test, $n = 4$ mice)。

(F) スクロース水溶液の濃度に応じた蛍光変化の用量反応曲線。データは平均値 $\pm$ 標準誤差として表示。

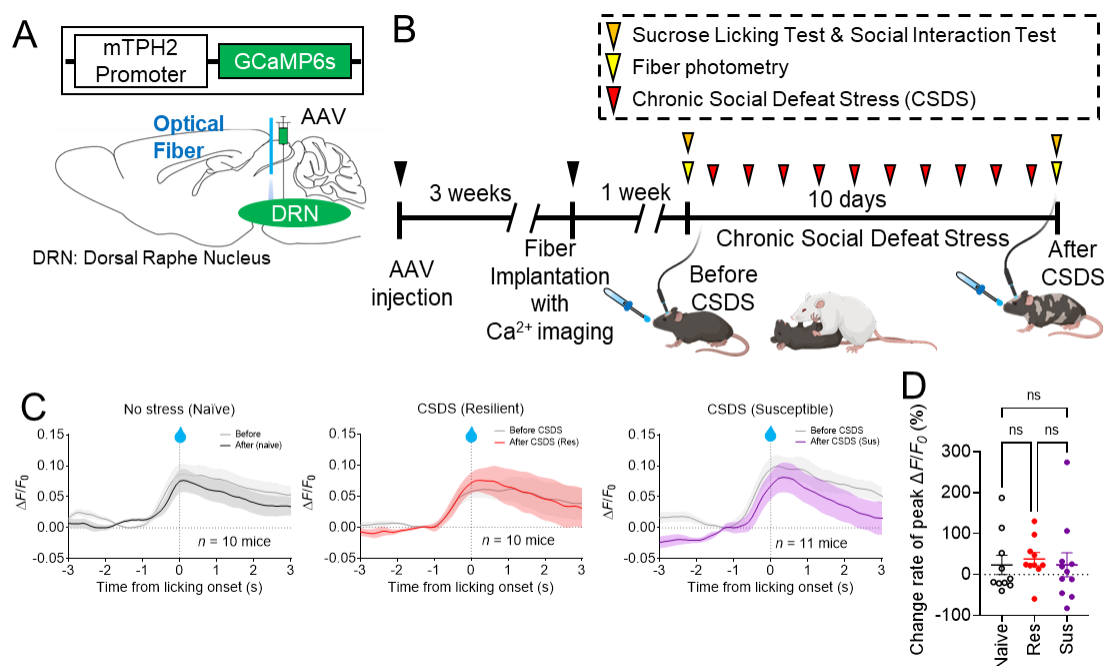


図 3. 慢性社会的敗北ストレス（CSDS）負荷前後におけるスクロース水飲水行動時の DRN セロトニン神経活動の測定およびその比較

(A) AAV (mTPH2::GCaMP6s) 注入部位および光ファイバー留置位置の模式図。
 (B) 実験スケジュール。CSDS では、C57BL/6JmsSlc マウスに対して大型 ICR マウスによる身体的攻撃を 1 日 5 分間、計 10 日間毎日与えた。
 (C) 行動試験中のスクロース水飲水行動に関連する Ca²⁺シグナル。左図は非ストレスマウス（対照群）、中央図はストレス耐性マウス、右図はストレス感受性マウスをそれぞれ示す。薄灰色線は CSDS 実施前、色付き線は CSDS 実施後のスクロース水飲水試験の値をそれぞれ示す。
 (D) スクロース水飲水行動に関連する Ca²⁺シグナルの最大変化量（peak $\Delta F/F_0$ ）の CSDS 前後での変化率。データは平均値±標準誤差として表示。p = 0.891, F_{2,28} = 0.1156, n = 10–11 by one-way ANOVA。

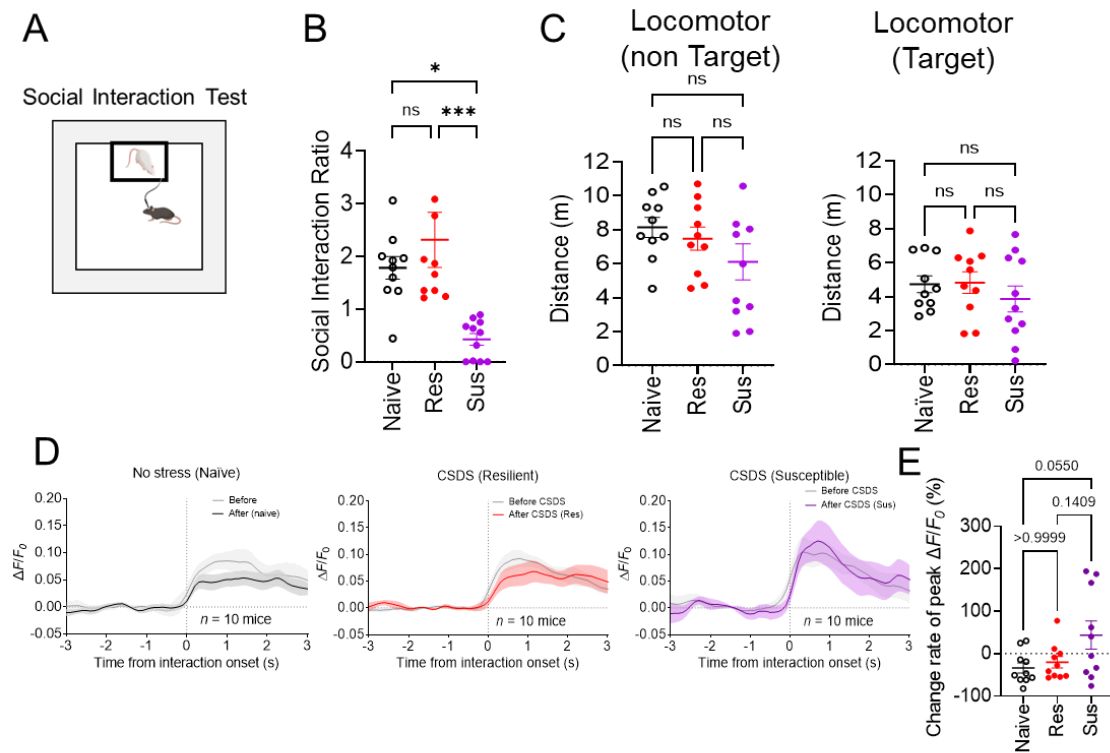


図 4. 慢性社会的敗北ストレス (CSDS) 前後の社会的相互作用における DRN セロトニン神経活動の測定およびその比較

- (A) 社会的相互作用試験の模式図。白色マウス (ICR マウス) がワイヤーメッシュ内のターゲット、黒色マウス (C57BL/6JmsSlc マウス) が被験体。
- (B) 社会的相互作用比 (Social Interaction Ratio) はストレス感受性マウスで有意に低下 (平均値 $\pm$ 標準誤差、 $p < 0.05$, $*** p < 0.001$, $F_{2,28} = 9.320$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 10-11$)。
- (C) 社会的相互作用試験中の総移動距離 (平均値 $\pm$ 標準誤差。左: ターゲット無しセッション、 $F_{2,28} = 1.617$; 右: ターゲット有りセッション、 $F_{2,28} = 0.6891$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 10-11$)。
- (D) 行動試験中のターゲットとの社会的相互作用行動に関連する Ca^{2+} シグナル、左; 非ストレスマウス (対照群)、中央; ストレス耐性マウス、右; ストレス感受性マウス。薄灰色線は CSDS 実施前、色付き線は CSDS 実施後の社会的相互作用試験の値をそれぞれ示す。
- (E) 社会的相互作用行動に関連する Ca^{2+} シグナルの最大変化量 (peak $\Delta F/F_0$) の CSDS 前後での変化率。CSDS 後、ストレス感受性マウスの社会的相互作用行動に関連する Ca^{2+} シグナルは増加傾向であった。データは平均値 $\pm$ 標準誤差として表示。 $p = 0.0550$ (susceptible vs naïve), $F_{2,27} = 3.608$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 10-11$ 。

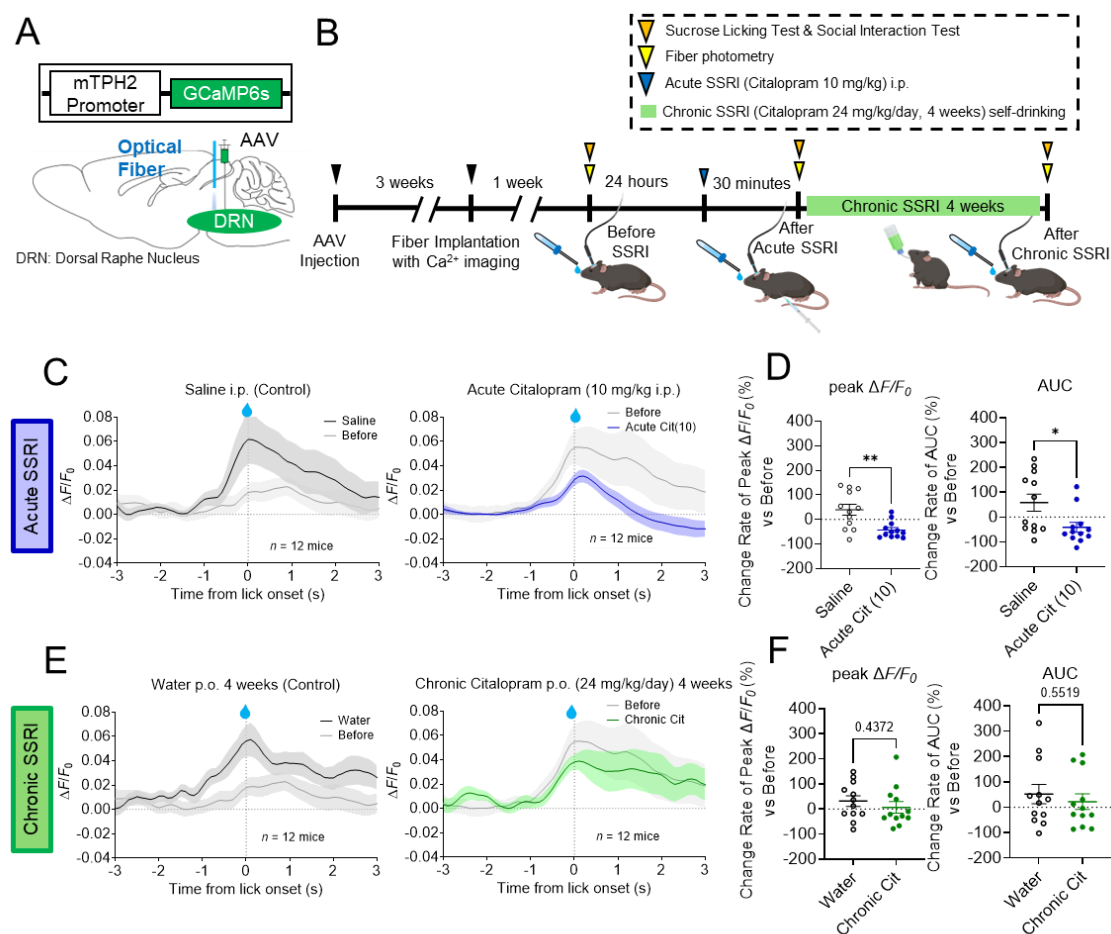


図 5. SSRI 急性投与および慢性投与前後におけるスクロース水飲水行動時の DRN セロトニン神経活動の測定およびその比較

(A) AAV 注入部位および光ファイバー留置位置の模式図。

(B) 実験スケジュール。

(C, E) 行動試験中のスクロース水飲水行動に関連する Ca²⁺シグナル。1 日目には薬物投与を行う前の未処置セッションを実施 (C, E 各図の Before、薄灰色線)。1 日後、SSRI 急性投与セッションを実施し、スクロース水飲水試験の 30 分前にシタロプラムを腹腔内に投与 (10 mg/kg) (C 右、青線)。SSRI 慢性投与セッションは、4 週間にわたりシタロプラムを飲料水に溶解 (0.2 mg/mL) し自己飲水投与 (約 24 mg/kg/日、4 週間) (E 右、緑線)。

(D) 左図：スクロース水飲水行動に関連する Ca²⁺シグナルの最大変化量 (peak $\Delta F/F_0$) のシタロプラム急性投与前後での変化率。* $p = 0.0039$, $t_{15.3} = 3.40$, $F_{11,11} = 4.94$ by unpaired t -test with Welch's correction, $n = 12$ 。右図：シタロプラム急性投与前後での AUC の変化率。* $p = 0.0209$, $t_{22} = 2.49$, $F_{11,11} = 2.89$ by unpaired t -test, $n = 12$ 。データは平均値±標準誤差として表示。

(F) 左図：スクロース水飲水行動に関連する Ca²⁺シグナルの最大変化量 (peak $\Delta F/F_0$) のシタロプラム慢性投与前後での変化率。 $p = 0.437$, $t_{22} = 0.791$, $F_{11,11} = 1.17$ by unpaired t -test, $n = 12$ 。右図：シタロプラム慢性投与前後での AUC の変化率。 $p = 0.552$, $t_{22} = 0.604$, $F_{11,11} = 1.49$ by unpaired t -test, $n = 12$ 。データは平均値±標準誤差として表示。

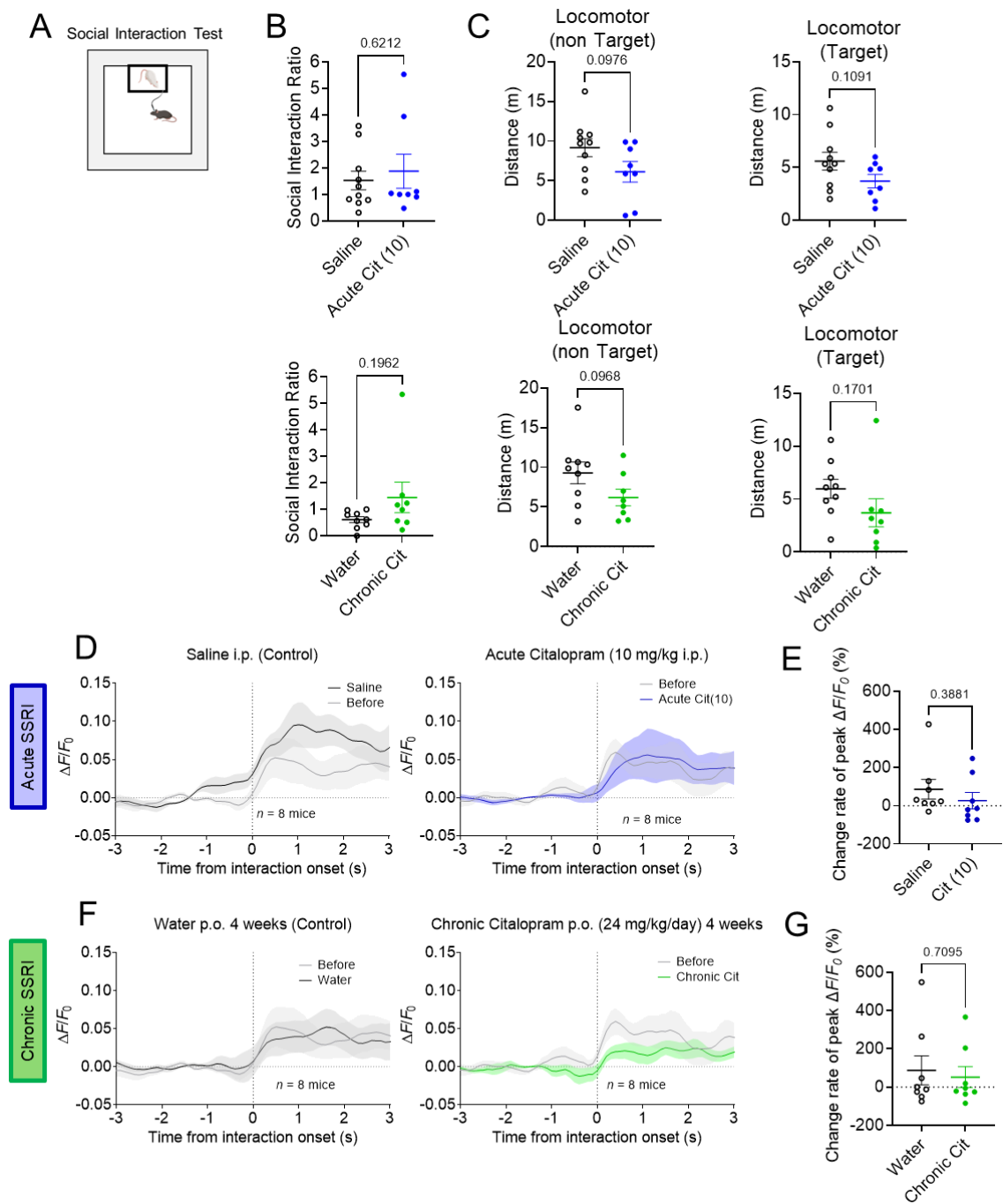


図 6. SSRI 急性投与および慢性投与前後における社会的相互作用行動時の DRN セロトニン神経活動の測定およびその比較

(A) 社会的相互作用試験の模式図。

(B) SSRI 急性投与および慢性投与後の社会的相互作用比 (Social Interaction Ratio) (上段：急性、下段：慢性)。上段： $p = 0.621$, $t_{16} = 0.504$, $F_{7,9} = 2.71$ by unpaired t -test, $n = 8-10$ 。下段： $p = 0.196$, $t_{7.51} = 1.42$, $F_{7,8} = 24.6$ by unpaired t -test with Welch's correction, $n = 8-9$ 。データは平均値±標準誤差として表示。

(C) 社会的相互作用試験中の総移動距離 (上段：急性、下段：慢性)。上段左図： $p = 0.0976$, $t_{16} = 1.76$, $F_{7,9} = 1.06$ by unpaired t -test, $n = 8-10$ 。上段右図： $p = 0.109$, $t_{16} = 1.70$, $F_{9,7} = 2.25$ by unpaired t -test, $n = 8-10$ 。下段左図： $p = 0.0968$, $t_{15} = 1.77$, $F_{8,7} = 1.97$ by unpaired t -test, $n = 8-9$ 。下段右図： $p = 0.170$, $t_{15} = 1.44$, $F_{7,8} = 1.94$ by unpaired t -test, $n = 8-9$ 。データは平均値±標準誤差として表示。

(D, F) 行動試験中のターゲットとの社会的相互作用行動に関連する Ca^{2+} シグナル。

(D, F 各図の Before：未処置セッション、薄灰色線。D 右図：シタロプラム急性投与、青線。F 右図：シタロプラム慢性投与、緑線。)

(E, G) 社会的相互行動に関連する Ca^{2+} シグナルの最大変化量 ($\text{peak } \Delta F/F_0$) のシタロプラム投与前後での変化率 (E：急性投与、G：慢性投与)。(E) $p = 0.388$, $t_{14} = 0.891$, $F_{7,7} = 1.48$ by unpaired t -test, $n = 8$ 。(G) $p = 0.710$, $t_{14} = 0.380$, $F_{7,7} = 1.95$ by unpaired t -test, $n = 8$ 。データは平均値±標準誤差として表示。

考察

背側縫線核 (DRN) セロトニン神経は、スクロース水等の物理的報酬刺激、他個体との接触によって生じる社会的報酬、および学習後の報酬関連手がかり刺激を含むさまざまな刺激によって活性化されることが報告されている^{32,47}。これらの知見は *in vivo* での自由行動下の動物に対するファイバーフォトメトリー法を用いた研究によって確認されている。しかし一方で、慢性ストレスや抗うつ薬がセロトニン神経活動に与える影響については、電気生理学的手法を用いた研究が中心である。この手法では麻酔下あるいは急性単離脳切片での解析のため、報酬獲得といった自発的な行動に対するセロトニン神経の応答性に与える慢性ストレスあるいは抗うつ薬の影響について評価することは極めて困難である²⁵⁻³⁰。また、ファイバーフォトメトリー法は、自由行動下の動物における特定の神経集団の活動を測定するために広く用いられているが、治療薬などが神経活動に与える影響を調べた研究は比較的少ない^{49,50}。そこで本研究では、自由行動下のマウスにおいてファイバーフォトメトリー法を用いることで、報酬刺激に対する DRN セロトニン神経の応答性を測定するとともに慢性ストレスおよび抗うつ薬負荷がそれらに与える影響について検討し解析を行った。

今回の検討では、慢性社会的敗北ストレス (CSDS) 負荷後のストレス感受性マウス、ストレス耐性マウス、ストレス負荷をかけていない非ストレスマウス (対照群) の 3 群それぞれにおいて報酬に対する DRN セロトニン神経の応答性を比較したが、その結果 3 群間いずれにおいても有意差は認められなかった。これに対して Challis らは過去の急性単離脳切片による電気生理学的手法を用いた *ex vivo* 研究において、CSDS 後のストレス感受性マウスで DRN セロトニン神経の興奮性が低下していたことを報告している²⁵。この報告と本研究で得られた結果を合わせた知見は、CSDS 負荷によって興奮性が低下した状態にある DRN セロトニン神経に対して他の神経核からの興奮性入力が増加することで神経興奮性が補われるといった神経学的メカニズムが存在する可能性があることを示唆している。過去の研究によると、ストレス負荷後のストレス感受性マウスにおいて、攻撃的なマウスとの社会的相互作用によって外側手綱核 (LHb) のグルタミン酸作動性神経の興奮性が増加することが報告されている⁵¹。また *ex vivo* による研究では、LHb 神経に対する光遺伝学的刺激によってその投射先である DRN セロトニン神経の興奮性を増加させることも報告されている⁵²。これらの知見を総合することで、『ストレス感受性マウスにおいては、LHb 神経が自身の活動を上昇させることによって慢性ストレスによって生じた DRN セロトニン神経の興奮性低下を補完するというストレス対処機構がある』といった仮説が考えられる。しかしながら、このような仮説の検証には、LHb-DRN 回路を光遺伝学等の介入手法を用いて操作するといったさらなる解析が必要である。

過去の研究により、SSRI 急性処置が DRN セロトニン神経の活動を抑制し、この効果

は SSRI 慢性処置後には消失することが示されている²⁷⁻³⁰。これらの研究では、電気生理学的特性に基づきセロトニン神経と推定される神経細胞種の活動が測定されたが、近年の研究はこの従来の基準に疑問を投げかけており、遺伝学的に同定されたセロトニン神経を解析する必要性が示されている^{35,36}。このような背景のもと本研究では、遺伝学的に同定された DRN セロトニン神経においてシタロプラム急性処置がスクロース水への応答を有意に減弱させ、この減弱した応答が 4 週間のシタロプラム慢性投与により回復することを見出した。本研究により得られた知見は、麻酔下動物での *in vivo* 電気生理学的研究の知見²⁷を拡張し、SSRI 急性投与後のセロトニン神経の報酬刺激への応答性の減弱と、SSRI 慢性投与後の回復を初めて明らかにするものである。なお、本研究において、シタロプラムの急性投与は腹腔内投与、慢性投与は自己飲水による経口投与にて実施した。腹腔内投与での慢性投与を選択しなかった理由としては、4 週間の連日にわたる侵襲的な投与処置がマウスに及ぼす心理的・身体的ストレスの影響を回避するためであった。当然ながら、スクロース水への応答の違いが投与経路の違いに起因する可能性も十分に考えられるため、これらのバイアスに対しては今後のさらなる検証が必須である。

本研究では、著者のグループの過去の研究報告に基づき^{30,43}、代表的な SSRI としてシタロプラムを選択し実験を実施した。当然ながら、他の先行研究ではシタロプラムに加えてフルオキセチンやエスシタロプラム等の他の SSRI についての検討も散見される^{10,27}。これらの従来型 SSRI の共通点としてはセロトニントランスポーターに対する阻害作用を有することであり、本研究で観察された急性投与によるセロトニン神経の報酬応答性の抑制および慢性投与後のその回復が他の SSRI によっても引き起こされる可能性は十分にあると考えられる。著者のグループの過去の *in vitro* 研究において、SSRI (シタロプラムおよびフルオキセチン)、SNRI (デュロキセチン、ベンラファキシン、ミルナシプラン)、および三環系抗うつ薬 (イミプラミンおよびデシプラミン) を含むさまざまな抗うつ薬の急性および持続的な曝露がラット縫線核急性単離脳切片培養における細胞外セロトニン濃度に与える影響を調査した。そこでは細胞外セロトニン濃度の変化をセロトニン作動性活動の指標として用いた。その結果、セロトニントランスポーターを阻害する抗うつ薬による慢性処置は、急性処置と比較して、一貫して細胞外セロトニン濃度の顕著な増加を引き起こすことが明らかになった⁴⁸。この結果は、セロトニントランスポーターへの阻害作用を有する他の抗うつ薬においても本研究で観察された事象を生じさせる可能性を示唆するものである。

本研究において著者は、自由行動下の動物に対するファイバーフォトメトリー法を用いた神経活動測定により、慢性ストレスによって社会的報酬刺激に対する DRN セロトニン神経の活動性は上昇傾向となる一方で、スクロースによる報酬応答性は慢性ストレス負荷後もほとんど変化が見られないことを見出した。また、シタロプラム急性投与がスクロース水飲水による報酬刺激に対する DRN セロトニン神経の活性化を減弱させる

こと、および慢性投与がそれを回復させることを初めて明らかにした。これらに起因する分子基盤をより詳細に追究することによって、セロトニン神経活動とうつ病との因果関係に関する生物学的理解をより詳細に深めることが可能となるだろう。

第二章

抗うつ薬急性投与による背側縫線核セロトニン神経の報酬応答性減弱の薬理的解析

うつ病態においてセロトニン 1A 受容体 (5-HT_{1A} 受容体) が重要な役割を担っていることが多くの研究から報告されている。 5-HT_{1A} 受容体は Gi/o 共役型の GPCR である。セロトニン神経とそのポストシナプス側の神経の両方で 5-HT_{1A} 受容体が発現しているが、ストレス応答においては、プレシナプスの 5-HT_{1A} 受容体とポストシナプスのそれとは役割が対照的であることが知られている⁵³。ポストシナプスの 5-HT_{1A} 受容体はセロトニン作動性の神経伝達を媒介しているため、それにより抗うつ様効果を誘発する。 5-HT_{1A} 受容体作動薬であるブスピロンは不安障害やうつ病の治療薬として使用されている⁵⁴。一方で、プレシナプスの 5-HT_{1A} 受容体は自己受容体としてセロトニン神経の活動を抑制することで、抗うつ薬の効果を制限することがある⁵³。SSRI などの抗うつ薬はセロトニンの再取り込みを阻害することで細胞外セロトニン濃度を上昇させ、それに伴ってプレシナプスの 5-HT_{1A} 自己受容体やポストシナプスの 5-HT_{1A} 受容体はセロトニンによる刺激を受ける⁵⁵。麻酔下の動物を用いた電気生理学的検討では、DRN におけるセロトニン神経の活動が SSRI の急性投与により 5-HT_{1A} 自己受容体の活性化を介して抑制され、SSRI の慢性投与により回復することが報告されている²⁷⁻²⁹。この根拠と一貫して、 5-HT_{1A} 自己受容体を高レベルで発現しているマウスは、低発現マウスと比較してストレスに対する脆弱性がより顕著であるという報告がなされている⁵⁶。したがって、 5-HT_{1A} 自己受容体の発現低下は抗うつ薬の作用機序の根底にあると考えられている。しかしながら、電気生理学で得られた知見はあくまでも麻酔下の動物あるいは死後脳を用いた切片培養系におけるものである。そのため、これらの知見のみでは、本来自由行動下で観察されるべきはずの報酬獲得行動に関連した DRN セロトニン神経の応答性に対する抗うつ薬投与の影響を説明するには不十分である。

DRN は広範な領域にセロトニン神経投射を行っており、解剖学的観点から見た DRN セロトニン神経の異質性が複数の先行研究により報告されている^{46,57}。また DRN セロトニン神経は報酬応答に関連する重要な神経核であり³²、腹側被蓋野 (VTA) や側坐核 (NAc)、外側視床下部 (LH) 等の関連領域への投射経路を形成している⁵⁸⁻⁶¹。他のグループを含む著者のグループの過去の報告では、遠心性の DRN セロトニン神経の中でも特に VTA へ投射する回路において、光遺伝学的な活性化により報酬行動を誘発し^{20,21}、反対に抑制することで嫌悪行動を惹起すること^{21,24}を明らかにしている。これらの知見から、DRN からの複数の投射経路のうち DRN-VTA 経路が報酬刺激に対する応答に深く関与する可能性が示唆される。一方で、この神経回路が本研究の第一章で見出したような抗うつ薬の影響を受ける DRN セロトニン神経を含む回路であるかは明らかにされ

ていない。

そこで本章では、ファイバーフォトメトリー法に加えて薬理学的手法を用いることで、抗うつ薬の DRN セロトニン神経報酬応答性変化に対する 5-HT_{1A} 受容体の関与を検証するとともに、DRN-VTA 経路に対する抗うつ薬投与の影響についても検討した。

実験方法

使用動物

第一章に準ずる。

ウイルスベクターの作製と精製

第一章に準ずる。

本章より新たに以下の AAV を作製した。qPCR 法で測定した力価は以下の通りであった。

mTPH2::axon GCaMP6s (AAV-mTPH2-axon GCaMP6s-WPRE) ; 力価 7.91×10^{12} IU/mL

脳定位手術

第一章に準ずる。

本章より新たに取り上げた脳領域の脳定位座標を以下に記す。

腹側被蓋野 (VTA) : AP -3.1 mm、ML +0.7 mm、背腹軸における深さ (DV) +4.5 mm。

ファイバーフォトメトリー (Fiber photometry)

第一章に準ずる。

スクロース水飲水試験 (Sucrose licking test)

第一章に準ずる。

薬物処置

第一章に準ずる。

本章より新たに使用した薬物の詳細を以下に記す。

5-HT_{1A} 受容体拮抗薬 : (S)-WAY100135 ジヒドロ塩酸塩 (Tocris Bioscience) を生理食塩水に溶解し、行動試験の 30 分前に腹腔内注射した。

免疫組織化学的検討

第一章に準ずる。

統計解析

第一章に準ずる。

実験結果

抗うつ薬急性投与による DRN セロトニン神経の報酬応答性減弱に対するセロトニン 1A 受容体拮抗薬の効果

抗うつ薬急性投与が DRN セロトニン神経のスクロース水飲水による報酬応答を減弱させる薬理学的メカニズムを明らかにするため、セロトニン 1A 受容体 (5-HT_{1A} 受容体) 拮抗薬の効果を検討した。5-HT_{1A} 受容体拮抗薬として (S)-WAY100135 を使用した⁶²。薬物投与前 (未処置状態) でのスクロース応答の記録を実施した数日後、シタロプラム (10 mg/kg) と (S)-WAY100135 (0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 20 mg/kg、隔日) の併用投与を試験 30 分前に行った (図 7)。その結果、急性シタロプラム単独投与が引き起こす DRN セロトニン神経のスクロース水飲水行動に対する報酬応答性の減弱が、(S)-WAY100135 用量依存的に応答性増加方向へと回復した (図 7C)。

シタロプラム単独投与群と、シタロプラムと低用量 (S)-WAY100135 (3.0 mg/kg) との併用投与群との間には有意差は見られなかった (change rate of peak $\Delta F/F_0$: saline: $36.1 \pm 36.5\%$, (S)-WAY100135 (3.0 mg/kg): $20.7 \pm 15.0\%$, citalopram: $-63.1 \pm 5.21\%$, citalopram + (S)-WAY100135 (3.0 mg/kg): $-26.4 \pm 20.9\%$, $p = 0.0077$ (saline vs. citalopram), $p = 0.720$ (citalopram vs. citalopram + (S)-WAY100135), $p = 0.161$ (saline vs. citalopram + (S)-WAY100135), $F_{3,37} = 4.35$; change rate of AUC: saline: $49.9 \pm 38.6\%$, (S)-WAY100135 (3.0 mg/kg): $10.1 \pm 21.5\%$, citalopram: $-93.0 \pm 9.11\%$, citalopram + (S)-WAY100135 (3.0 mg/kg): $-50.5 \pm 36.1\%$, $p = 0.00530$ (saline vs. citalopram), $p > 0.999$ (citalopram vs. citalopram + (S)-WAY100135), $p = 0.106$ (saline vs. citalopram + (S)-WAY100135), $F_{3,37} = 5.12$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 10-11$ mice, 図 7D, E)。一方で、シタロプラムと高用量 (S)-WAY100135 (20 mg/kg) との併用群では、シタロプラム単独投与による DRN セロトニン神経の報酬応答性減弱が有意に緩和され、応答性は増加方向へと回復した (change rate of peak $\Delta F/F_0$: saline: $7.80 \pm 30.8\%$, (S)-WAY100135 (20 mg/kg): $-13.2 \pm 8.82\%$, citalopram: $-63.1 \pm 11.6\%$, citalopram + (S)-WAY100135 (20 mg/kg): $13.1 \pm 22.0\%$, $p = 0.0370$ (saline vs. citalopram), $p = 0.0229$ (citalopram vs. citalopram + (S)-WAY100135), $p > 0.999$ (saline vs. citalopram + (S)-WAY100135), $F_{3,27} = 3.62$; change rate of AUC: saline: $-0.12 \pm 21.5\%$, (S)-WAY100135 (20 mg/kg): $-33.4 \pm 9.88\%$, citalopram: $-117.8 \pm 21.3\%$, citalopram + (S)-WAY100135 (20 mg/kg): $-43.3 \pm 17.6\%$, $p = 0.0006$ (saline vs. citalopram), $p = 0.0448$ (citalopram vs. citalopram + (S)-WAY100135), $p = 0.756$ (saline vs. citalopram + (S)-WAY100135), $F_{3,27} = 7.79$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 7-9$ mice, 図 7F, G)。これらの結果は、抗うつ薬急性投与は 5-HT_{1A} 自己受容体の活性化を介してスクロース報酬刺激に応答した DRN セロトニン神経の活性化を減弱させることを示唆している。

腹側被蓋野（VTA）へ投射する DRN セロトニン神経の報酬応答性に対する抗うつ薬の効果

DRN セロトニン神経は報酬応答に関連する重要な神経核であり³²、報酬に関連のある投射先として、腹側被蓋野（VTA）、外側視床下部（LH）、扁桃体中心核（CeA）、腹側淡蒼球（VP）、および側坐核（NAc）といった複数の投射経路を形成していることが知られている⁵⁸⁻⁶¹。これらの脳領域のうち DRN からの神経投射を最も密に受けている領域を同定するため、DRN に AAV（mTPH2::Venus）を微量投与した後、各投射領域における単位面積当たりの Venus の蛍光強度を測定した。その結果、VTA の単位面積当たりの蛍光強度は他の領域よりも有意に高く、DRN から VTA への高密度な神経投射が確認された（ $p < 0.0001$; VTA vs other regions, $F_{4,17} = 32.3$, one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison post hoc test; $n = 4-5$ mice, 図 8）。

VTA は報酬処理において最も重要な神経核の 1 つである⁶³。VTA に投射する DRN セロトニン神経終末への光遺伝学的な活性化は報酬行動を強化することが報告されている^{20,21}。本研究では、VTA に投射する DRN セロトニン神経の活動を測定し、報酬刺激が DRN-VTA セロトニン神経終末の活動応答に及ぼす影響を調べた。神経軸索末端への効率的な GCaMP 輸送のため、mTPH2 プロモーター制御下で軸索標的型 GCaMP（axon GCaMP6s⁶⁴）を発現するための AAV（mTPH2::axon GCaMP6s）を作製し DRN へ微量投与した。また光ファイバーは右脳 VTA 上に留置した。脳定位手術からの回復の後に、スクロース水飲水に対する VTA に投射する DRN セロトニン神経の報酬応答性を測定した（図 9A, B）。スクロース水飲水により、DRN-VTA 神経終末において GCaMP 蛍光がベースラインと比較して有意に増加した（ $\Delta F/F_0 = 0.0025 \pm 0.00061$, $p < 0.05$ by permutation test, $n = 3$ mice, 図 9C 左）。この結果は、VTA に投射する DRN セロトニン神経が報酬によって活性化されることを示している。次に、急性および慢性の抗うつ薬投与が DRN-VTA セロトニン神経回路の活動に与える影響を検討するため、抗うつ薬投与後にスクロース水飲水に対するセロトニン神経の報酬応答性を測定した。シタロプラム急性投与（10 mg/kg、腹腔内投与）を受けたマウスでは、スクロース水飲水中の GCaMP 蛍光に有意な変化はみられなかった（ $\Delta F/F_0 = 0.0010 \pm 0.00078$, $p > 0.05$ by permutation test, $n = 3$ mice, 図 9C 中央）。一方、シタロプラム慢性投与（0.2 mg/mL、約 24 mg/kg/日、4 週間、自己飲水）を受けたマウスでは、スクロース水飲水中の GCaMP 蛍光はベースラインと比較して有意な増加がみられた（ $\Delta F/F_0 = 0.0040 \pm 0.00060$, $p < 0.05$ by permutation test, $n = 3$ mice, 図 9C 右）。これらの結果より、DRN-VTA セロトニン神経投射経路は、報酬刺激に対する応答性を示す経路であることが同定された。またこの経路は、抗うつ薬投与によってその報酬応答性に影響を受ける DRN セロトニン神経の主な投射経路であることが示唆される。

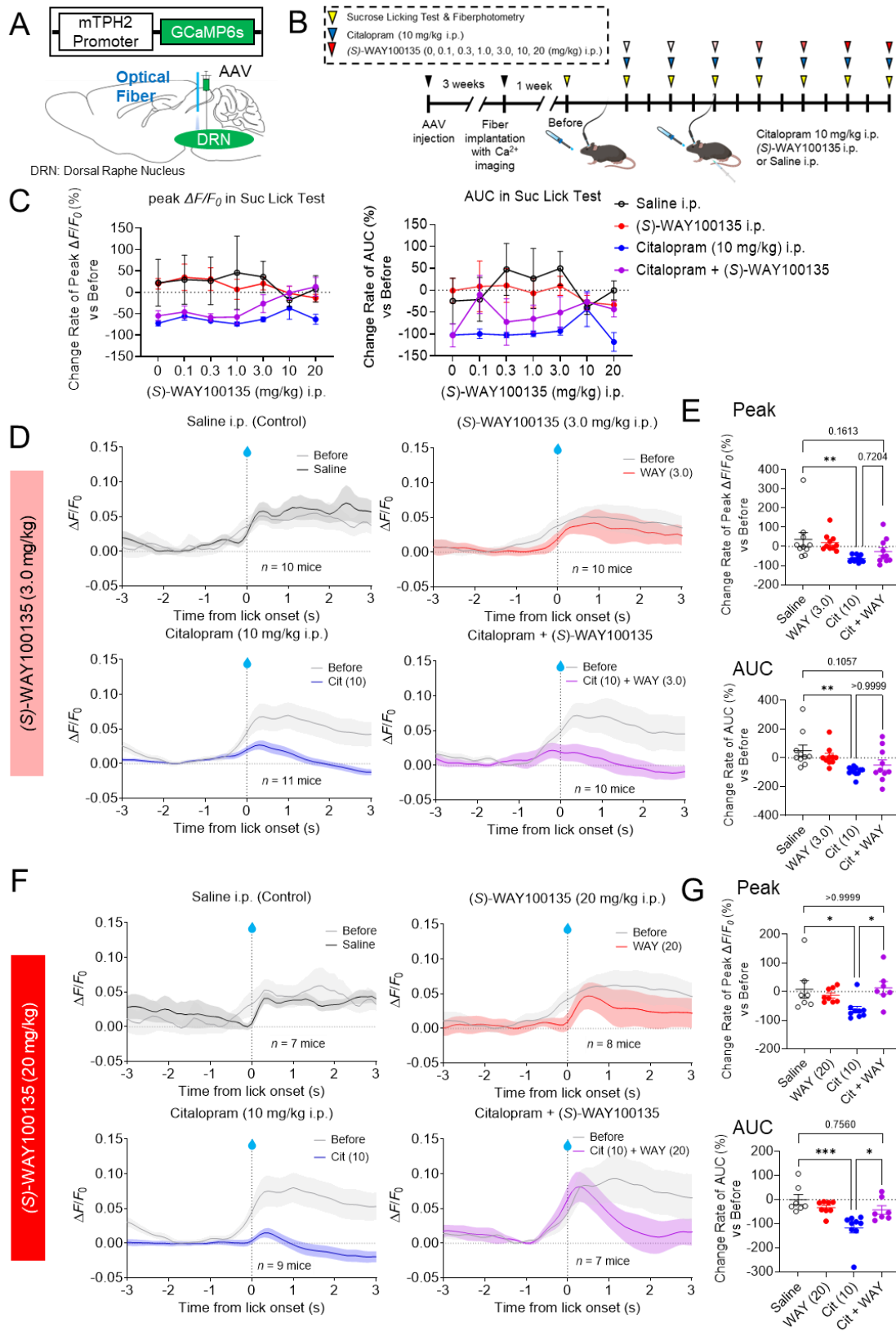


図 7. SSRI 急性投与による DRN セロトニン神経のスクロース応答性の減弱に対する 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の効果

(A) AAV 注入部位および光ファイバー留置位置の模式図。

(B) 実験スケジュール。5-HT_{1A} 受容体拮抗薬として(S)-WAY100135 を用いた。(S)-WAY100135 は最も低い濃度から開始し、1 日おきに濃度を変更して投与した。

(C) 行動試験中のスクロース水飲水行動に関連する Ca²⁺シグナルの最大変化量 (peak $\Delta F/F_0$) および AUC の変化率と(S)-WAY100135 濃度の用量反応曲線。データは平均値±標準誤差として表示。 $n = 7-11$ 。(左 : peak $\Delta F/F_0$ 、右 : AUC)。

(D, E) 低用量(S)-WAY100135 (3.0 mg/kg、腹腔内投与) の代表図。Peak $\Delta F/F_0$: ** $p = 0.0077$ (saline vs citalopram), $p = 0.720$ (citalopram vs citalopram + WAY), $p = 0.161$ (saline vs citalopram + WAY), $F_{3,37} = 4.35$ 。AUC: ** $p = 0.00530$ (saline vs citalopram), $p > 0.999$ (citalopram vs citalopram + WAY), $p = 0.106$ (saline vs citalopram + WAY), $F_{3,37} = 5.12$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 10-11$ 。データは平均値±標準誤差として表示。

(F, G) 高用量(S)-WAY100135 (20 mg/kg、腹腔内投与) の代表図。Peak $\Delta F/F_0$: * $p = 0.0370$ (saline vs citalopram), * $p = 0.0229$ (citalopram vs citalopram + WAY), $p > 0.999$ (saline vs citalopram + WAY), $F_{3,27} = 3.62$ 。AUC: *** $p = 0.0006$ (saline vs citalopram), * $p = 0.0448$ (citalopram vs citalopram + WAY), $p = 0.756$ (saline vs citalopram + WAY), $F_{3,27} = 7.79$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, $n = 7-9$ 。データは平均値±標準誤差として表示。

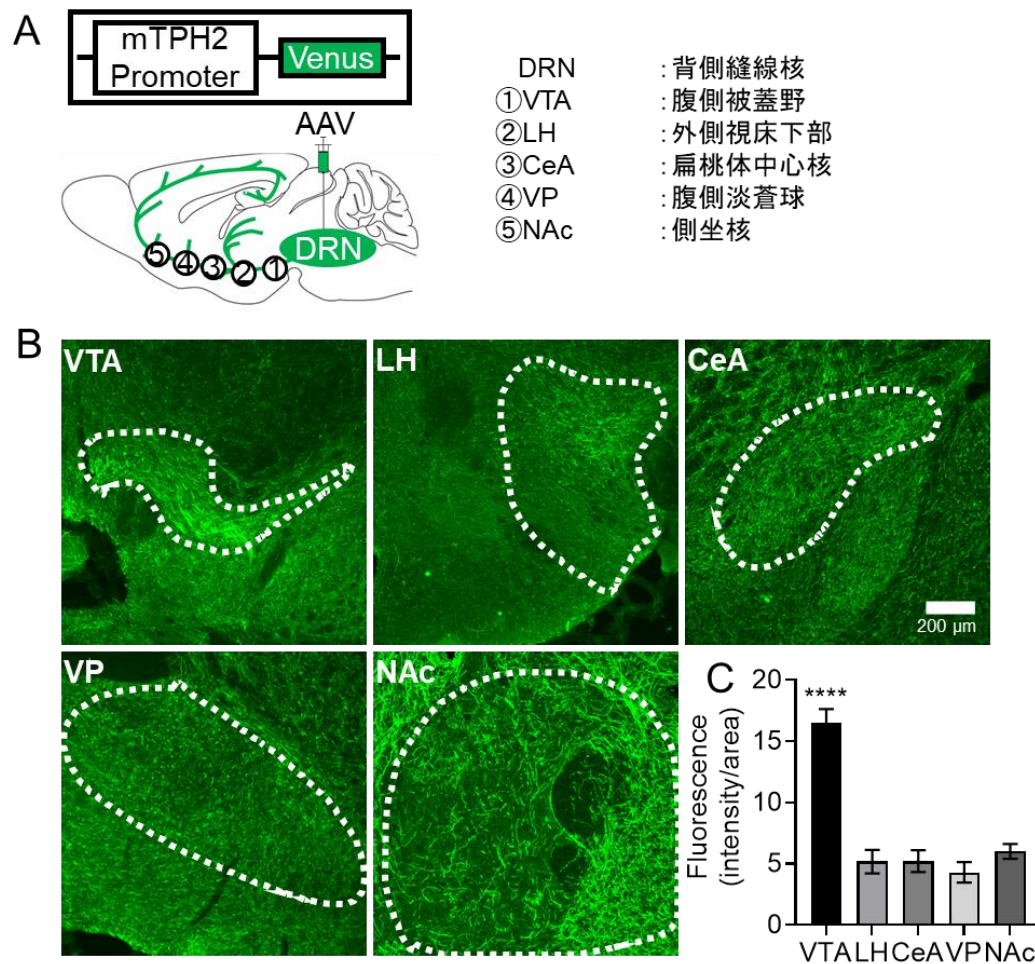


図 8. DRN セロトニン神経の投射密度に関する免疫組織化学的検討

(A) AAV (mTPH2::Venus) 注入部位と神経投射領域の模式図。

(B) 腹側被蓋野 (VTA)、外側視床下部 (LH)、扁桃体中心核 (CeA)、腹側淡蒼球 (VP)、および側坐核 (NAc) における DRN セロトニン神経の軸索終末の画像。スケールバーは 200 μm 。

(C) 各終末領域における Venus 蛍光強度の定量。**** $p < 0.0001$ (VTA vs other regions), $F_{4,17} = 32.3$ by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison test, $n = 4-5$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差として表示。

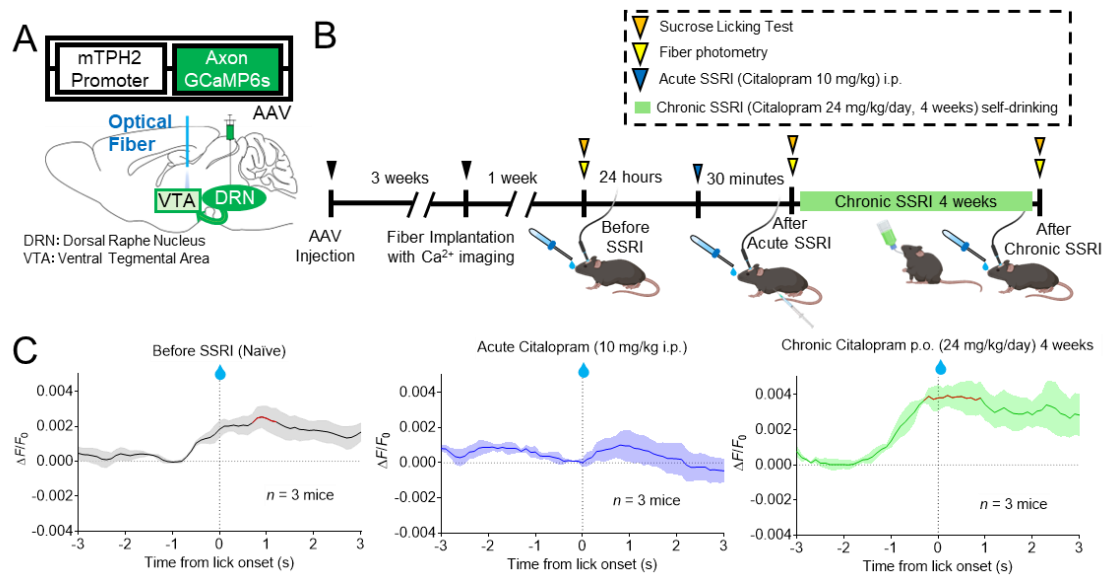


図 9. 報酬刺激に対する DRN-VTA セロトニン神経回路の活動測定およびそれに対する SSRI の効果

(A) AAV (mTPH2::axon GCaMP6s) 注入部位と光ファイバー留置位置の模式図。
 (B) 実験スケジュール。
 (C) 行動試験中のスクロース水飲水行動に関連する Ca^{2+} シグナル。左：シタロプラム投与前（未処置セッション）。中央：シタロプラム急性投与後（10 mg/kg、腹腔内投与）。右：シタロプラム慢性投与後（24 mg/kg/日、4 週間、自己飲水）。赤線はベースラインからの有意な増加を示す（左： $p < 0.05$, $F_{100,200} = 2.61$ 、中央： $p > 0.05$, $F_{100,200} = 2.16$ 、右： $p < 0.05$, $F_{100,200} = 3.89$ 、permutation test、 $n = 3$ ）。太線と影付き領域はそれぞれ平均値と標準誤差を示す。

考察

過去の研究により、SSRI 急性処置が 5-HT_{1A} 自己受容体の活性化を介して DRN セロトニン神経の活動を抑制し、この効果は 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の処置によって速やかに消失することが示されている²⁷。これらの電気生理学的手法を用いた研究によって得られた知見はあくまでも麻酔下の動物を対象として得られたものであるため、自発的な自由行動の結果生じるセロトニン神経の報酬反応（活動変化）に対しても適用させるには根拠が不十分である。このような背景から本研究ではファイバーフォトメトリー法を用いた DRN セロトニン神経活動の測定を行い、その結果として 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬である(S)-WAY100135 と SSRI との併用投与はシタロプラム単独投与後のスクロース水に対する応答の低下を用量依存的に軽減することを見出した。この知見は、麻酔下動物での *in vivo* 電気生理学的研究の知見²⁷を拡張し、SSRI 急性処置後のセロトニン神経の報酬刺激への反応低下は 5-HT_{1A} 受容体を介したものであること、そして SSRI と 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の併用投与は短期間で DRN セロトニン神経の報酬応答性を回復させることを可能にするということを初めて明らかにしたものである。

本研究では、SSRI と 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の併用投与は SSRI 慢性投与と類似して DRN セロトニン神経の報酬応答性を回復させうることを見出した。この知見は、過去の電気生理学的な知見によって提唱されている『5-HT_{1A} 自己受容体の脱感作仮説⁶⁵』が SSRI 急性投与で減弱した DRN セロトニン神経の報酬応答性を SSRI 慢性投与が回復させるメカニズムを考える上でも有用であるということを示唆している。先行研究による組織学的検討では、高濃度の 5-HT_{1A} 受容体作動薬（8-OH-DPAT）をラットに静脈内投与することで DRN 神経細胞膜上に発現する 5-HT_{1A} 受容体の細胞内へのエンドサイトーシスが促進されたことを報告している⁶⁶。SSRI によってプレシナプス上のセロトニントランスポーターが阻害されるとシナプス間隙のセロトニン再取り込み量が低下し、その結果、細胞外セロトニン濃度が増加することで 5-HT_{1A} 受容体等のセロトニン受容体が活性化される。SSRI 慢性投与によって、シナプス間隙に遊離したセロトニンが 5-HT_{1A} 受容体に対して持続的に刺激し続けることで 5-HT_{1A} 受容体の脱感作が生じる。それによって 5-HT_{1A} 自己受容体のセロトニン神経に対する抑制が解除（脱抑制）されることが、スクロース水に対するセロトニン神経の報酬応答性の回復につながったと考えられる。

一方で SSRI と 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の併用投与と SSRI 単独慢性投与との間には報酬に対する応答増加の時間的パターンにおいて顕著な違いが見られた。5-HT_{1A} 受容体拮抗薬はスクロース水誘発性のセロトニン神経活動増加の初期段階での短期的な応答のみを回復させたのに対し、SSRI 慢性投与では初期段階を含めた長期的な応答が回復した。これら両者の活動増加パターンの違いを説明するためには、SSRI 慢性投与後のセロトニン神経報酬応答の増加には 5-HT_{1A} 自己受容体に加えて他の因子も関与している可能

性を考慮する必要がある。Challis らは、DRN 内部において GABA 作動性神経がセロトニン神経に投射しその神経活動を抑制することを示している²⁵。さらに、DRN の GABA 作動性神経には Gq 共役型 GPCR である 5-HT_{2B} 受容体が発現しており、その活動を正に調節することが報告されている⁶⁷⁻⁶⁹。SSRI 急性処置によって誘発されるシナプス間隙での細胞外セロトニン濃度の増加は、DRN セロトニン神経に発現する 5-HT_{1A} 自己受容体と、DRN の GABA 作動性神経に発現する 5-HT_{2B} 受容体の両方を活性化し、協調的にセロトニン神経の活動を抑制する可能性がある。この仮説に対してはさらなる検討が必要であるものの、SSRI 慢性投与は DRN セロトニン神経に発現する 5-HT_{1A} 自己受容体のみならず、DRN の GABA 作動性神経に発現する 5-HT_{2B} 受容体の脱感作も誘発する可能性があり、その結果、SSRI、5-HT_{1A} 受容体拮抗薬、5-HT_{2B} 受容体拮抗薬の 3 剤併用投与が SSRI 慢性投与の効果をさらに鮮明に模倣できる可能性があると考えられる。

複数の先行研究により、解剖学的観点から見た DRN セロトニン神経の異質性が報告されている^{46,57}。特に全脳コネクトーム解析により、背側/背外側 DRN セロトニン神経は主に扁桃体、外側手綱核、視床核などの皮質下領域に投射する一方で、腹側 DRN セロトニン神経は眼窩前頭皮質、嗅内皮質、梨状葉皮質などの前側皮質領域を支配することが明らかにされている⁴⁶。この報告では、嫌悪刺激が皮質投射性 DRN セロトニン神経を抑制する一方で扁桃体投射性セロトニン神経を活性化することが示されている。これは DRN セロトニン神経の機能的異質性を示唆している⁴⁶。このような背景のもと本研究では、mTPH2 プロモーター^{21,22}を組み込んだウイルスベクターによって標的化された DRN セロトニン神経の投射パターンが、これまでの報告^{46,61}と類似していることを確認した。また、DRN セロトニン神経が扁桃体や視床下部などの他の脳領域と比較して、腹側被蓋野 (VTA) に対してより多くの神経投射を行っていることを見出した。

本研究では、axon GCaMP6s⁶⁴を使用して、VTA に投射する DRN セロトニン神経の報酬応答性を測定した。この DRN-VTA 回路はスクロース水飲水行動によって活性化され、DRN の中でも VTA 投射性の DRN セロトニン神経が報酬信号を符号化することを示している。さらに、スクロース水飲水試験の結果に基づき、VTA における DRN セロトニン神経終末は、DRN セロトニン神経の細胞体と同様にシタロプラムの急性および慢性処置の影響を受けた。VTA は報酬処理に関与する最も重要な脳部位の一つであり、報酬応答における主要な神経伝達物質であるドパミンを合成する多くの神経細胞を含む領域である⁷⁰。VTA への電気刺激によって側坐核 (NAc) では細胞外ドパミン濃度が増加する。これは脳内自己刺激パラダイムにおいて正の強化因子として機能する⁷¹。電気生理学的検討では、中脳ドパミン神経の活動が、報酬予測誤差すなわち受け取った報酬と予測された報酬の差を符号化し学習のための指導信号として作用することを示唆している⁷²。以上の知見を総合すると、本研究の組織学的解析結果は、VTA に投射する DRN セロトニン神経が報酬処理において重要な役割を果たしていることを示唆している。他の先行研究とともに、本研究は一貫して、VTA 投射性 DRN セロトニン神経の活性化が

正の価値を、抑制が負の価値を持つことを示している^{21,24}。

以上、本研究では、自由行動下の動物に対するファイバーフォトメトリー法および薬理学的手法を用いた検討により、SSRI 急性処置がスクロース水飲水行動による DRN セロトニン神経の活性化を減弱させるメカニズムとして 5-HT_{1A} 自己受容体を介したものであることを見出した。また、SSRI と 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の併用投与が、SSRI 慢性投与の効果を短期間で部分的に模倣しうることを明らかにした。加えて、神経回路選択的な検討により DRN-VTA セロトニン経路が報酬信号の符号化を担い、加えて抗うつ薬の影響を受ける回路であることを同定した。これらの知見は、治療効果発現が迅速でありかつ神経回路選択的な新規抗うつ薬の開発に新たな示唆を与えるものである。

結言（総括および展望）

本研究においては、慢性ストレスおよび抗うつ薬が背側縫線核（DRN）セロトニン神経の報酬応答性に及ぼす影響、その薬理学的作用機序、および関連する神経投射経路について検討を行い、以下の知見を得た。

第一章

- ・ 慢性ストレスは、スクロース報酬刺激に応答した DRN セロトニン神経の活動性にほとんど影響を与えなかった。
- ・ 慢性ストレスは、ストレス感受性を示したマウスでのみ、他個体との接触による社会的報酬刺激に応答した DRN セロトニン神経の活動性を上昇させる傾向を示した。
- ・ SSRI 急性投与は、スクロース報酬刺激に応答した DRN セロトニン神経の活動性を減弱させた。
- ・ SSRI 慢性投与は、SSRI 急性投与によって減弱された DRN セロトニン神経の報酬応答性を回復させた。
- ・ SSRI 投与は、投与期間によらず、他個体との接触による社会的報酬刺激に応答した DRN セロトニン神経の活動性にほとんど影響を与えなかった。

これらの結果は、慢性ストレスおよび抗うつ薬が報酬応答に関連した DRN セロトニン神経活動に対して部分的に影響を及ぼしうる可能性があることを示唆するものである。

第二章

- ・ SSRI 単独急性投与によるセロトニン神経の報酬応答性の減弱は、5-HT_{1A} 受容体拮抗薬との併用急性投与により回復した。
- ・ DRN-VTA セロトニン神経投射経路は、報酬刺激に応答した活動性の上昇を示した。
- ・ DRN-VTA セロトニン神経投射経路の報酬応答性は、SSRI 急性投与によって減弱し、SSRI 慢性投与によって回復した。

これらの結果は報酬応答に関連した DRN セロトニン神経活動に対する抗うつ薬の作用メカニズムを薬理学的に解明し、さらに報酬信号の符号化および抗うつ薬の影響を受ける神経回路についても明らかにしたものである。

以上、本研究により著者は生理的条件下でのマウス背側縫線核セロトニン神経活動解析を通して、慢性ストレスおよび抗うつ薬投与が報酬応答に関連した神経活動に対して部分的に影響を与えうる可能性があることを見出した。また、抗うつ薬の報酬関連神経

活動応答に対する薬理学的作用機序を解明した。これらの知見は、ストレス下あるいは抗うつ薬投与下といったヒトでの状況により近い条件におけるセロトニン神経活動変化の分子機序の一端を明らかにしたものであり、うつ病の病態機序解明および速効性のある新規抗うつ薬開発に資する知見を提供しうるものである。

SSRI 等の従来型抗うつ薬を用いたうつ病治療の臨床上の課題を克服するためには副作用が少なく、速効性のある新規治療法の開発が必須である。報酬情報処理の異常による無快感症等の治療には、本研究により得られた SSRI と 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の併用投与による知見が有効であると思われる。しかし一方で、経口や貼付等による全身投与が大多数を占める従来の薬物治療の戦略には限界があるとも思われる。なぜなら、うつ病等の精神疾患の場合、症状やそれに関連する脳領域・病態機序は患者毎に多種多様であり、それに加えて全身投与では副作用のリスクを無視できないからである。そのため今後の精神医療には、患者個々の状態に合わせた『個別化医療』の実現が必須であると考ええる。現在では電気痙攣療法（ECT）や経頭蓋磁気刺激療法（TMS）等が実施されているが⁷³、これらは安全性や倫理性の観点のほか、細胞種選択性に乏しいこと等の理由から改善が求められる。そこで、著者が考える将来の展望として以下のことを提案したい。医師による DSM-5-TR や ICD-11 等に基づいた問診に加えて fMRI 等の脳神経活動測定を活用し、その結果に基づいた神経回路・細胞種選択的な介入治療法の構築を行うことは、副作用が極めて少なく、高い速効性・有効性を兼ね備えた新規治療につながると考えられる。チャンネルロドプシンを用いた光遺伝学や DREADD 等の化学遺伝学的介入手法を非侵襲的にヒトに応用できればより理想的である。また治療効果の評価に関しては、患者本人からの申告や医師・薬剤師等による問診に加えて、バイオマーカー等による客観的指標に基づいた評価項目の創出も必要であると考ええる。本研究により DRN セロトニン神経の 5-HT_{1A} 受容体が報酬応答性に影響を与えうることが示唆されるため、5-HT_{1A} 受容体の活性や発現レベルの測定は無快感症にとっては有用なバイオマーカーとなる可能性が高いと考えられる。ただし、5-HT_{1A} 受容体は多くの脳領域に発現しているため、領域特異的な測定が必須となる。加えて、症状ごとに適切なバイオマーカーを選択する必要もあるだろう。したがって、これら新規うつ病治療法開発の実現には、本研究のような脳領域・神経回路選択的に病態や症状と神経活動との因果関係を証明した知見がさらに多く蓄積される必要がある。今後の精神医療の発展のため、著者を含めた多くの研究者によるさらなる研究成果の創出に期待したい。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科准教授 永安一樹 先生、ならびに京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科教授 井上飛鳥 先生に深く感謝いたします。

研究生生活を始めるにあたり多くの御指導、御助言を頂きました大阪公立大学大学院医学研究科助教 河合洋幸 先生をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。また、本研究の遂行に多大なる御協力を頂きました京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野および薬品作用解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際して、京都大学名誉教授 故藤多哲朗 先生のご遺志に基づき設立されました「藤多仁生奨学金」に多大なる経済的御支援を賜りました。藤多先生をはじめ、ご遺族、関係されましたすべての皆様に深く感謝いたします。また、国立研究開発法人科学技術振興機構により設立されました「次世代研究者挑戦的研究プログラム（機構 SPRING プログラム）」にも多大なる経済的御支援を賜りました。関係されましたすべての皆様に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えてくださりました父 禎、母 佳保里、兄 充志、および親族の皆様に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究による成果は以下に掲載された。

Koda M, Kawai H, Shirakawa H, Kaneko S, Nagayasu K.

Effect of antidepressants and social defeat stress on the activity of dorsal raphe serotonin neurons in free-moving animals. *J Pharmacol Sci.* 2025 Feb;157(2):113-123.

doi: 10.1016/j.jphs.2025.01.001. Epub 2025 Jan 2.

引用文献

1. Rizvi SJ, Pizzagalli DA, Sproule BA, Kennedy SH. Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Jun;65:21-35.
2. World Health Organization. Depressive disorder (depression). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
3. Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):525-46.
4. Slavich GM, Irwin MR. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychol Bull*. 2014 May;140(3):774-815.
5. Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):459-66.
6. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):434-45.
7. Byerley WF, Reimherr FW, Wood DR, Grosser BI. Fluoxetine, a selective serotonin uptake inhibitor, for the treatment of outpatients with major depression. *J Clin Psychopharmacol*. 1988 Apr;8(2):112-5.
8. 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*. 1988 Sep;78(3):384-90.
9. Feighner JP, Overø K. Multicenter, placebo-controlled, fixed-dose study of citalopram in moderate-to-severe depression. *J Clin Psychiatry*. 1999 Dec;60(12):824-30.
10. Schlaepfer TE, Agren H, Monteleone P, Gasto C, Pitchot W, Rouillon F, Nutt DJ, Kasper S. The hidden third: Improving outcome in treatment-resistant depression. *J Psychopharmacol*. 2012;26:587-602.
11. Strawn JR, Mills JA, Poweleit EA, Ramsey LB, Croarkin PE. Adverse Effects of Antidepressant Medications and their Management in Children and Adolescents. *Pharmacotherapy*. 2023 Jul;43(7):675-690.
12. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: A STAR*D report. *Am J Psychiatry*. 2006;163:1905-1917.
13. Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med*. 2008;358:55-68.
14. Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schüle C, Eser D, Rupprecht R, Möller HJ, Bondy B, Ackenheil M. SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform

- (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol Psychiatry*. 2004 Nov;9(11):1030-6.
15. Mosienko V, Bert B, Beis D, Matthes S, Fink H, Bader M, Alenina N. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl Psychiatry*. 2012 May 29;2(5):e122.
 16. Kraus C, Castrén E, Kasper S, Lanzenberger R. Serotonin and neuroplasticity - Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Jun;77:317-326.
 17. Ressler KJ, Nemeroff CB. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety*. 2000;12 Suppl 1:2-19.
 18. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. 2005 Sep;8(9):1263-8.
 19. Liu Z, Zhou J, Li Y, Hu F, Lu Y, Ma M, Feng Q, Zhang JE, Wang D, Zeng J, Bao J, Kim JY, Chen ZF, El Mestikawy S, Luo M. Dorsal raphe neurons signal reward through 5-HT and glutamate. *Neuron*. 2014;81:1360–1374.
 20. Wang HL, Zhang S, Qi J, Wang H, Cachope R, Mejias-Aponte CA, Gomez JA, Mateo-Semidey GE, Beaudoin GMJ, Paladini CA, Cheer JF, Morales M. Dorsal raphe dual serotonin-glutamate neurons drive reward by establishing excitatory synapses on VTA mesoaccumbens dopamine neurons. *Cell Rep*. 2019;26:1128–1142.e7.
 21. Nagai Y, Takayama K, Nishitani N, Andoh C, Koda M, Shirakawa H, Nakagawa T, Nagayasu K, Yamanaka A, Kaneko S. The role of dorsal raphe serotonin neurons in the balance between reward and aversion. *Int J Mol Sci*. 2020;21:2160.
 22. Nishitani N, Nagayasu K, Asaoka N, Yamashiro M, Andoh C, Nagai Y, Kinoshita H, Kawai H, Shibui N, Liu B, Hewinson J, Shirakawa H, Nakagawa T, Hashimoto H, Kasparov S, Kaneko S. Manipulation of dorsal raphe serotonergic neurons modulates active coping to inescapable stress and anxiety-related behaviors in mice and rats. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44:721–732.
 23. Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I, Sasamori H, Nebuka M, Nishitani N, Tanaka KF, Yamanaka A, Yoshioka M. Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*. 2020;167:107703.
 24. Zou WJ, Song YL, Wu MY, Chen XT, You QL, Yang Q, Luo ZY, Huang L, Kong Y, Feng J, Fang DX, Li XW, Yang JM, Mei L, Gao TM. A discrete serotonergic circuit regulates vulnerability to social stress. *Nat Commun*. 2020 Aug 24;11(1):4218.
 25. Challis C, Boulden J, Veerakumar A, Espallergues J, Vassoler FM, Pierce RC, Beck SG, Berton O. Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social

- defeat. *J Neurosci*. 2013;33:13978–13988.
26. Challis C, Beck SG, Berton O. Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:43.
 27. El Mansari M, Sánchez C, Chouvet G, Renaud B, Haddjeri N. Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: An *in vivo* electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1269–1277.
 28. Hajós M, Gartside SE, Sharp T. Inhibition of median and dorsal raphe neurones following administration of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1995;351:624–629.
 29. Czachura JF, Rasmussen K. Effects of acute and chronic administration of fluoxetine on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2000;362:266–275.
 30. Asaoka N, Nishitani N, Kinoshita H, Kawai H, Shibui N, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Chronic antidepressant potentiates spontaneous activity of dorsal raphe serotonergic neurons by decreasing GABAB receptor-mediated inhibition of L-type calcium channels. *Sci Rep*. 2017;7:13609.
 31. Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*. 2013;499:295–300.
 32. Li Y, Zhong W, Wang D, Feng Q, Liu Z, Zhou J, Jia C, Hu F, Zeng J, Guo Q, Fu L, Luo M. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat Commun*. 2016;7:10503.
 33. Krishnan V, Han MH, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC, Ghose S, Reister R, Tannous P, Green TA, Neve RL, Chakravarty S, Kumar A, Eisch AJ, Self DW, Lee FS, Tamminga CA, Cooper DC, Gershenfeld HK, Nestler EJ. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 2007;131:391–404.
 34. Fawcett J, Clark DC, Scheftner WA, Gibbons RD. Assessing anhedonia in psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry*. 1983;40:79–84.
 35. Allers KA, Sharp T. Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods *in vivo*. *Neuroscience*. 2003;122:193–204.
 36. Kocsis B, Varga V, Dahan L, Sik A. Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1059–1064.

37. Kawai H, Bouchekioua Y, Nishitani N, Niitani K, Izumi S, Morishita H, Andoh C, Nagai Y, Koda M, Hagiwara M, Toda K, Shirakawa H, Nagayasu K, Ohmura Y, Kondo M, Kaneda K, Yoshioka M, Kaneko S. Median raphe serotonergic neurons projecting to the interpeduncular nucleus control preference and aversion. *Nat Commun.* 2022;13:7708.
38. Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. New York, NY: Academic Press; 2007.
39. Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, Lammel S, Mirzabekov JJ, Airan RD, Zalocusky KA, Tye KM, Anikeeva P, Malenka RC, Deisseroth K. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell.* 2014;157:1535–1551.
40. Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, Young NP, Kauvar I, Jennings JH, Lerner TN, Berndt A, Lee SY, Ramakrishnan C, Davidson TJ, Inoue M, Bito H, Deisseroth K. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat Methods.* 2016;13:325–328.
41. Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc.* 2011;6:1183–1191.
42. Andoh C, Nishitani N, Hashimoto E, Nagai Y, Takao K, Miyakawa T, Nakagawa T, Mori Y, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. TRPM2 confers susceptibility to social stress but is essential for behavioral flexibility. *Brain Res.* 2019;1704:68–77.
43. Andoh C, Otani S, Noguchi T, Hagiwara M, Nishitani N, Kawai H, Fukui Y, Koda M, Morishita H, Nomura K, Oki M, Hori H, Shirakawa H, Kaneko S, Nagayasu K. Transcriptional landscape of the dorsal raphe serotonin neurons rendering stress resiliency. *bioRxiv*. Published online March 25, 2024.
44. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.* 2002;20:87–90.
45. Nagai Y, Kisaka Y, Nomura K, Nishitani N, Andoh C, Koda M, Kawai H, Seiriki K, Nagayasu K, Kasai A, Shirakawa H, Nakazawa T, Hashimoto H, Kaneko S. Dorsal raphe serotonergic neurons preferentially reactivate dorsal dentate gyrus cell ensembles associated with positive experience. *Cell Rep.* 2023;42:112149.
46. Ren J, Friedmann D, Xiong J, Liu CD, Ferguson BR, Weerakkody T, DeLoach KE, Ran C, Pun A, Sun Y, Weissbourd B, Neve RL, Huguenard J, Horowitz MA, Luo L. Anatomically defined and functionally distinct dorsal raphe serotonin sub-systems. *Cell.* 2018;175:472–487.e20.
47. Zhong W, Li Y, Feng Q, Luo M. Learning and stress shape the reward response patterns of serotonin neurons. *J Neurosci.* 2017;37:8863–8875.
48. Nagayasu K, Kitaichi M, Nishitani N, Asaoka N, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S.

- Chronic effects of antidepressants on serotonin release in rat raphe slice cultures: high potency of milnacipran in the augmentation of serotonin release. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16:2295–306.
49. Wei C, Han X, Weng D, Feng Q, Qi X, Li J, Luo M. Response dynamics of midbrain dopamine neurons and serotonin neurons to heroin, nicotine, cocaine, and MDMA. *Cell Discov.* 2018;4:60.
 50. Yoshida K, Drew MR, Mimura M, Tanaka KF. Serotonin-mediated inhibition of ventral hippocampus is required for sustained goal-directed behavior. *Nat Neurosci.* 2019;22:770–777.
 51. Wang D, Li Y, Feng Q, Guo Q, Zhou J, Luo M. Learning shapes the aversion and reward responses of lateral habenula neurons. *eLife.* 2017;6:e23045.
 52. Hernandez Silva JC, Pausic N, Marroquin Rivera A, Labonté B, Proulx CD. Chronic social defeat stress induces pathway-specific adaptations at lateral habenula neuronal outputs. *J Neurosci.* 2024;44:e2082232024.
 53. Albert PR, Vahid-Ansari F. The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior. *Biochimie.* 2019;161:34–45.
 54. Dimitriou EC, Dimitriou CE. Bupropion augmentation of antidepressant therapy. *J Clin Psychopharmacol.* 1998;18:465–469.
 55. Tatsumi M, Jansen K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of neuroleptics at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol.* 1999;368:277–283.
 56. Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED. 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron.* 2010;65:40–52.
 57. Paquelet GE, Carrion K, Lacefield CO, Zhou P, Hen R, Miller BR. Single-cell activity and network properties of dorsal raphe nucleus serotonin neurons during emotionally salient behaviors. *Neuron.* 2022;110:2664–2679.e8.
 58. Azmitia EC, Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1978;179:641–667.
 59. Ishimura K, Takeuchi Y, Fujiwara K, Tominaga M, Yoshioka H, Sawada T. Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci Lett.* 1988 Sep 12;91(3):265–70.
 60. Luo M, Zhou J, Liu Z. Reward processing by the dorsal raphe nucleus: 5-HT and beyond. *Learn Mem.* 2015 Aug 18;22(9):452–60.
 61. Muzerelle A, Scotto-Lomassese S, Bernard JF, 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.* 2016;221:535–561.

62. Fletcher A, Bill DJ, Bill SJ, Cliffe IA, Dover GM, Forster EA, Haskins JT, Jones D, Mansell HL, Reilly Y. WAY100135: a novel, selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol.* 1993;237(2-3):283-291.
63. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jun;5(6):483-94.
64. Broussard GJ, Liang Y, Fridman M, Unger EK, Meng G, Xiao X, Ji N, Petreanu L, Tian L. *In vivo* measurement of afferent activity with axon-specific calcium imaging. *Nat Neurosci.* 2018;21:1272–1280.
65. Albert PR, Lemonde S. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist.* 2004 Dec;10(6):575-93.
66. Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M, Descarries L. Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci.* 2001 Nov 1;21(21):8378-86.
67. Cathala A, Devroye C, Drutel G, Revest JM, Artigas F, Spampinato U. Serotonin 2B receptors in the rat dorsal raphe nucleus exert a GABA-mediated tonic inhibitory control on serotonin neurons. *Exp Neurol.* 2019;311:57–66.
68. Cathala A, Lucas G, López-Terrones E, Revest JM, Artigas F, Spampinato U. Differential expression of serotonin 2B receptors in GABAergic and serotonergic neurons of the rat and mouse dorsal raphe nucleus. *Mol Cell Neurosci.* 2022;121:103750.
69. Belmer A, Quentin E, Diaz SL, Guiard BP, Fernandez SP, Doly S, Banas SM, Pitychoutis PM, Moutkine I, Muzerelle A, Tchenio A, Roumier A, Mameli M, Maroteaux L. Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43:1623–1632.
70. Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1971;82:1–48.
71. Fiorino DF, Courty A, Fibiger HC, Phillips AG. Electrical stimulation of reward sites in the ventral tegmental area increases dopamine transmission in the nucleus accumbens of the rat. *Behav Brain Res.* 1993;55:131–141.
72. Schultz W. Dopamine reward prediction-error signalling: A two-component response. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17:183–195.
73. Guo B, Zhang M, Hao W, Wang Y, Zhang T, Liu C. Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression. *Transl Psychiatry.* 2023 Jan 9;13(1):5.

