

特集 1 うつ病の解明と新規治療標的の探索—基礎と臨床の双方向アプローチ—

2. 光遺伝学とゲノム編集によるセロトニン神経操作を用いたうつ様行動の神経機構解明

大村 優*

抄録：セロトニン再取り込み阻害薬を代表とするセロトニン関連薬は精神疾患の治療薬として幅広く用いられているが、治療効果が不十分なうえにしばしば深刻な副作用を伴い、作用機序も不明瞭である。その理由の1つとしては、これまでの研究は神経毒破壊や薬理学的方法を用いてきたために、二次的効果や代償効果、非選択的効果の可能性を否定できなかったことが考えられる。しかし、近年発展著しい光遺伝学とゲノム編集技術によって、上記の問題は理論上回避可能になった。本稿ではこれらの技術を用いて、うつ病とその治療にかかわるセロトニン神経経路の解明に取り組んできた筆者らの研究例を紹介する。

日本生物学的精神医学会誌 33 (4) : 155-159, 2022

Key words : serotonin, raphe, optogenetics, CRISPR/Cas9, depression

はじめに

脳内セロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT) 神経系を標的とした薬はさまざまな精神疾患の治療薬として用いられている。例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) はうつ病や強迫性障害、5-HT_{1A} 受容体部分作動薬は不安障害、5-HT_{2A} 受容体拮抗薬は統合失調症の治療に用いられている。しかし、その効果は不十分で、作用機序にも不明な点が多い。本特集のテーマであるうつ病に限ってみても、うつ病患者の約半数は最初の投薬治療に反応しない¹⁶⁾。SSRI はシナプス間隙の細胞外セロトニン濃度を上昇させるが、それだけでは治療効果の作用機序として不十分な説明である。5-HT 受容体サブタイプが 14 種類も存在することや²⁾、背側縫線核と正中縫線核に由来するセロトニン神経が脳・間脳・中脳のほぼすべての領域に投射していることを踏まえると、作用する脳部位もしくは 5-HT 受容体サブタイプによってうつ症状に対する効果が異なる可能性が高いことは容易に想像できる。つまり、SSRI の効果が不十分な理由として、特定の脳部位もしくは 5-HT 受容体サブタイプへの作用がうつ症

状を悪化させている可能性も考えられるのである。例えば、SSRI の投薬により不安増悪の副作用が低頻度 (7.5%) ながら現れることが知られている⁸⁾。うつ病患者の 50% 以上が何らかの不安障害を併発することを踏まえると⁹⁾、これは看過できない副作用である。実際、不安増悪の副作用を経験した患者では寛解率が半減する⁸⁾。したがって、うつ病の投薬治療法を改善していくためには、その治療効果の作用機序と同時に、不安増悪のようにうつ病の寛解を妨げる副作用の機序を解明することが必要となる。ほかにも、衝動性亢進などが SSRI の副作用として重要な問題であるが、衝動性については紙面の都合上割愛する。興味のある方は、ぜひ別の論文をご参照いただきたい^{12, 13)}。

さて、これらの作用機序を詳細に解明するために、実験動物を用いた研究が数多く行われてきた。しかし、従来の方法ではセロトニン神経だけを特異的かつ可逆的に操作することができなかった。電気的・化学的破壊法では急性効果と慢性効果を区別できないうえに、特定種類の神経のみを脱落させることも難しい。セロトニン神経系に作用する薬物を投与する方法もあるが、薬物の選択性が保証されるのはご

Elucidation of the neural mechanisms of depressive-like behavior by manipulating the serotonergic system using optogenetics and genome editing

*北海道大学大学院医学研究院薬理学分野 神経薬理学教室 (〒060-8638 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目) Yu Ohmura : Department of Neuropharmacology, Hokkaido University Faculty of Medicine, N15 W7, Sapporo, Hokkaido 060-8638, Japan

【大村 優 E-mail : yohmura@med.hokudai.ac.jp】

く限られた一部の薬物だけである。特に 5-HT 受容体は構造の類似したサブタイプが 14 種類もあることに注意が必要である。また、一般的には薬物の効果は数分から数時間持続し、活性代謝物の影響も考慮しなくてはならないので、投薬後に観察された行動変化は間接的・二次的な薬物の効果による可能性を否定できない。もちろん、臨床的にはそれらの二次的な効果や非選択的な効果も含めて薬理作用なのであるが、原理を解明する段階ではそれらの効果は障害となる。最初の目標は原理を解明することであり、「理論上どの経路、受容体を狙えばよいか」がわかってしまえば、後は薬学・化学者の仕事である。

近年発展著しい光遺伝学とゲノム編集技術を用いれば、上記の障害は回避可能である。光遺伝学は、植物や古細菌がもっている光受容体の遺伝子を動物の遺伝子に組み込むというものである⁵⁾。遺伝子工学により光受容体をセロトニン神経にのみ発現させることで、脳のセロトニン神経活動の選択的・可逆的操作を光照射の ON-OFF で行うことが可能になる。さらに、5-HT 受容体サブタイプの遺伝子をゲノム編集で操作することで、受容体選択性の問題も解決できる。ゲノム編集にはさまざまな方法があるが、筆者らは clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated proteins (CRISPR/Cas9) という手法を用いている。この方法は真正細菌や古細菌が有する獲得免疫（ファージなどを介した外来 DNA の排除機構）を応用した遺伝子編集技術であり、2020 年のノーベル化学賞を受賞した革新的技術である⁶⁾。標的とする遺伝子配列に対応するガイド配列と sgRNA, Cas9 タンパクといった少数のモジュールによって、PAM 配列さえ含めばどの遺伝子配列も切断できる。CRISPR/Cas9 法では少数のモジュールがあればよいので、ウイルスベクターでの導入が可能であり、目的の脳部位に限定して遺伝子変異を誘導できる。以下では、これらの技術を用いてうつ病とその治療にかかわるセロトニン神経経路の解明に取り組んできた筆者らの研究を紹介する。

1. 背側縫線核から腹側被蓋野へのセロトニン神経経路活性化が抗うつ様作用をもたらす

セロトニン神経を特異的に操作するために、セロトニン神経細胞選択的に C128S という光受容体チャネルロドプシン 2 (ChR2) の変異体を発現する遺伝子改変マウスを用いた。この遺伝子改変マウスの

脳内に光ファイバーを埋めて青色の光を当てると、短時間 (1 ~ 2 分程度) 光が照射された部位のセロトニン神経活動だけを選択的に増加させることができる。さらに、上昇したセロトニン神経活動を黄色光を当てることでベースラインに戻すこともできる。このマウスは慶應義塾大学の田中謙二教授、名古屋大学の山中章弘教授より譲渡されたもので、理化学研究所のバイオリソースセンター (RIKEN BRC) からも入手可能である (RBRC05846, RBRC05454, RBRC05453)。

抗うつ様作用の評価のためには、強制水泳試験を用いた。この試験では水槽内にマウスを置き、一定時間泳がせる (通常は 6 分程度)。マウスは最初は激しく泳ぎ回って水槽から脱出しようとするが、1 ~ 2 分経過すると逃げられないことを学習し、あきらめて泳がなくなる。その後はほとんどの時間、ただ水面に浮かんでいるか、呼吸を維持するための最低限の動きしかなくなる。この無動状態は行動学的絶望状態とよばれ、SSRI などの抗うつ薬を投与すると改善することが知られているので¹⁴⁾、マウスが積極的逃避行動をみせるようになる、泳ぐようになることをもって抗うつ様作用とみなす。

先述の遺伝子改変マウスを用いて強制水泳試験を実施し、背側縫線核のセロトニン神経活動を青色光照射で活性化させると、無動状態にあったマウスが泳ぐようになることが観察された¹²⁾。そして、その水泳行動は黄色光照射によって消失した。つまり、背側縫線核のセロトニン神経活動変化に連動して積極的な逃避行動も変化したのである。しかし、その一方で、もう 1 つの代表的なセロトニン神経起始核である正中縫線核のセロトニン神経活動を青色光で活性化しても、積極的逃避行動は増加しなかった。抗うつ様作用を担っているのは背側縫線核であり、正中縫線核は別の機能に参与していることが示唆された。さらに、腹側被蓋野のセロトニン神経終末に直接青色光を照射すると、背側縫線核を照射したときと同様の逃避行動増加がみられた。腹側海馬や扁桃体のセロトニン神経終末を活性化してもそのような変化はみられなかった。以上の結果を総合すると、背側縫線核から腹側被蓋野へのセロトニン神経経路の活性化が抗うつ様作用をもたらすものと考えられる。

2. 正中縫線核から腹側海馬への セロトニン神経経路活性化が 5-HT_{2C} 受容体刺激を介して 不安惹起作用をもたらす

不安様行動の評価には、高架式十字迷路試験を用いた。マウスは壁のないオープンスペースを嫌うが、抗不安薬を与えることでオープンスペースを探索する時間が増加することが知られている。逆に不安が惹起されていれば、オープンスペースの滞在時間が減少するとされている³⁾。

先述の遺伝子改変マウスを用いて高架式十字迷路試験を実施し、正中縫線核のセロトニン神経活動を青色光照射で活性化させると、マウスは壁のないオープンスペースにほとんど入らなくなり、不安様行動を示した。この傾向は黄色光照射によってセロトニン神経活動をベースラインに戻すと速やかに消失した¹¹⁾。しかし、背側縫線核のセロトニン神経活動を青色光で活性化しても、不安様行動は増加しなかった。つまり、先述の抗うつ様作用とは逆に、背側縫線核ではなく、正中縫線核のセロトニン神経活動が不安を制御していると解釈できる。

さらに、腹側海馬のセロトニン神経終末に直接青色光を照射すると、正中縫線核を照射したときと同様の不安様行動増加がみられた。腹側被蓋野や扁桃体のセロトニン神経終末を活性化してもそのような変化はみられなかった。加えて、正中縫線核のセロトニン神経活動増加による不安惹起作用は、5-HT_{2C} 受容体遺伝子欠損マウスでは消失し、腹側海馬に5-HT_{2C} 受容体拮抗薬を局所投与することでも消失した¹²⁾。総合すると、正中縫線核から腹側海馬へのセロトニン神経経路の活性化が5-HT_{2C} 受容体を刺激することで不安惹起作用をもたらすものと考えられる。

3. 背側縫線核 5-HT_{1A} 受容体の阻害が SSRI の抗うつ様効果を促進する

SSRI の抗うつ作用にかかわる5-HT 受容体サブタイプを特定するために、CRISPR/Cas9 法を用いて背側縫線核の5-HT_{1A} 受容体をノックアウトした。薬理学研究によってすでにSSRI と5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の併用が抗うつ作用を増強する可能性が指摘されており¹⁾、今回はCRISPR/Cas9 法の導入にあたり、それらの薬理的知見の追試と、作用部位の特定を試みたことになる。結果として、背側縫線核の5-HT_{1A} 受容体をノックアウトしたマウスでは、

単独では抗うつ様作用を発揮しない低用量のSSRI を投与したときに、強制水泳試験での無動時間が低下し、積極的な逃避行動が増加した¹⁰⁾。つまり、背側縫線核の5-HT_{1A} 受容体機能を抑制することで、SSRI の抗うつ様作用が促進された。

まとめと今後の展望 —さらなる受容体サブタイプの追求と、 セロトニンのうつ病仮説の検証へ—

以上の結果(図1)を踏まえると、SSRI の抗うつ作用の作用機序としては、背側縫線核から腹側被蓋野へのセロトニン神経経路の活性化が関与していると推定される。そしてその経路を活性化するには背側縫線核の5-HT_{1A} 受容体機能を抑えるのが1つの手段として考えられる。しかし、背側縫線核の自己受容体として機能する5-HT_{1A} 受容体だけを標的とした投薬は、実際には困難である。セロトニン神経の投射部位でポストシナプス側に発現する5-HT_{1A} 受容体の機能はまた異なることが予想されるので、全身性に5-HT_{1A} 受容体機能を抑制しても、思ったような抗うつ作用の増強作用は得られないかもしれない。ほかにも妥当な分子標的を見いだすためには、腹側被蓋野に発現する5-HT 受容体サブタイプのうち、どの受容体サブタイプが抗うつ作用に関与するのかを特定することが必要だろう。また、SSRI の副作用である不安惹起作用の機序としては、正中縫線核から腹側海馬へのセロトニン神経経路の活性化が関与していると推定できる。そしてその副作用を回避するには、5-HT_{2C} 受容体の機能を抑えるのが1つの手段となるかもしれない。

しかし、今回紹介した成果の解釈にはいくつか注意が必要であることも述べておきたい。例えば、これらの成果は①あくまで急性効果を観察したものであること、②一部のうつ様症状しかみていないこと、③モデル動物を用いているわけではないこと、④光遺伝学によるセロトニン神経活動増加によって、グルタミン酸放出も同時に増えている可能性があること、などに注意して欲しい。特に④は光遺伝学の限界ともいえる。近年の研究でかなりの割合のセロトニン神経が小胞グルタミン酸トランスポーター(vesicular glutamate transporter 3: VGLUT3)を共発現しており⁷⁾、セロトニンだけでなくグルタミン酸も放出することが示されている¹⁵⁾。今後の研究で、これらの問題を解決していく予定であり、すでに④の問題には取り組み始めている。CRISPR/Cas9 によるセロトニン合成酵素遺伝子 tryptophan

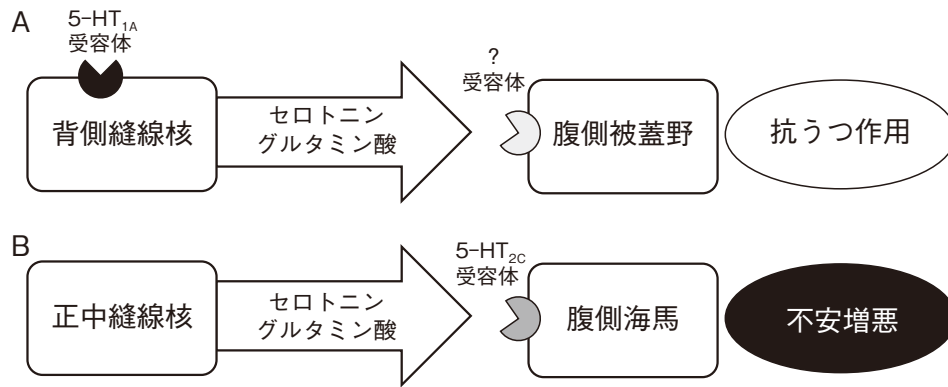


図1 抗うつ薬の治療効果、副作用の機序にかかわるセロトニン神経経路

A: 治療効果の機序。抗うつ効果は背側縫線核から腹側被蓋野に投射するセロトニン神経経路が活性化することで生じることが光遺伝学を用いた実験結果から推定されるが、腹側被蓋野での関与受容体は不明である。背側縫線核の5-HT_{1A}受容体の機能を抑制することで、抗うつ薬の治療効果は増強されることがゲノム編集を用いた実験結果から推定される。また、グルタミン酸の共放出が関与する可能性もあり、この点はゲノム編集によって解明可能である。
 B: 副作用の機序。抗うつ薬の副作用としての不安増悪は、正中縫線核から腹側海馬に投射するセロトニン神経経路が活性化することで生じることが光遺伝学を用いた実験結果から推定される。この副作用は腹側海馬に発現する5-HT_{2C}受容体刺激を介していると考えられる。

hydroxylase 2 (TPH2) のノックアウトによって、理論上グルタミン酸放出には影響を与えずに、セロトニン放出のみを減らせるはずである。さらに、脳部位特異的にセロトニン合成酵素遺伝子をノックアウトしたマウスでうつ様行動をさまざまな角度から評価することで、①～③の問題の解決につながる可能性もある。この取り組みは、古くからある「うつ病のセロトニン仮説」の検証でもあり⁴⁾、半世紀以上にわたる疑問に答えを与えるかもしれない。今回紹介したようなツールを用いてセロトニン神経の役割を明らかにしていくことで、抗うつ薬として広く使用されているSSRIはなぜ効き、そしてなぜ副作用が生じるのか、どうやってその副作用を防げばよいのか、という問題が解決されていくだろう。

本論文に記載した筆者らの研究に関して、すべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Artigas F, Celada P, Laruelle M, et al (2001) How does pindolol improve antidepressant action? Trends Pharmacol Sci, 22 : 224-228.
- 2) Barnes NM and Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology, 38 : 1083-1152.
- 3) Carobrez AP and Bertoglio LJ (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior : the elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev, 29 : 1193-1205.
- 4) Coppen A (1967) The biochemistry of affective disorders. Br J Psychiatry, 113 : 1237-1264.
- 5) Deisseroth K (2015) Optogenetics : 10 years of microbial opsins in neuroscience. Nat Neurosci, 18 : 1213-1225.
- 6) Doudna JA and Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346 : 1258096.
- 7) Hioki H, Nakamura H, Ma YF, et al (2010) Vesicular glutamate transporter 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. J Comp Neurol, 518 : 668-686.
- 8) Jha MK, Minhajuddin A, South C, et al (2018) Worsening anxiety, irritability, insomnia, or panic predicts poorer antidepressant treatment outcomes : Clinical utility and validation of the Concise Associated Symptom Tracking (CAST) Scale. Int J Neuropsychopharmacol, 21 : 325-332.
- 9) Kessler RC, Nelson CB, McGonagle KA, et al (1996) Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population : results from the US National Comorbidity Survey. Br J Psychiatry Suppl, 17-30.
- 10) Nishitani N, Ohmura Y, Nagayasu K, et al (2019) CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing reveals that neuronal 5-HT_{1A} receptors in the dorsal raphe

- nucleus contribute to body temperature regulation in mice. *Brain Res*, 1719 : 243-252.
- 11) Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, et al (2014) Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 17 : 1777-1783.
- 12) Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I, Sasamori H, et al (2020) Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*, 167 : 107703.
- 13) Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I and Yoshioka M (2014) Anti-impulsivity drugs and their mechanisms of action. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 34 : 41-48.
- 14) Petit-Demouliere B, Chenu F and Bourin M (2005) Forced swimming test in mice : a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* , 177 : 245-255.
- 15) Sengupta A, Bocchio M, Bannerman DM, et al (2017) Control of amygdala circuits by 5-HT neurons via 5-HT and glutamate cotransmission. *J Neurosci*, 37 : 1785-1796.
- 16) Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, et al (2006) Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D : implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*, 163 : 28-40.

■ ABSTRACT

Elucidation of the neural mechanisms of depressive-like behavior by manipulating the serotonergic system using optogenetics and genome editing

Yu Ohmura

Department of Neuropharmacology, Hokkaido University Faculty of Medicine

Serotonin reuptake inhibitors and other serotonin-related drugs are widely used to treat psychiatric disorders, but their therapeutic effects are inadequate and often accompanied by severe side effects, and their mechanisms of action are unclear. One reason for this may be that previous studies have used neurotoxin or pharmacological methods, and thus the possibility of secondary, compensatory, or non-selective effects could not be ruled out. However, with the rapid development of optogenetics and gene editing technologies in recent years, the above problems can theoretically be avoided. This paper will introduce some examples of our research using these technologies to elucidate the serotonergic pathways involved in depression and its treatment.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 33 (4) : 155-159, 2022)