縫線核セロトニン神経による情動調節機構 —不安と恐怖の神経回路を分離して理解する—

大村 優, 吉岡 充弘

要約: 本稿では不安と恐怖それぞれの制御メカニズムについて、回路、受容体レベルで分離して理解できることを主に縫線核セロトニン神経に焦点を当てて概説する。ラット、マウスを用いた研究により、不安の制御は、「三角中隔核-内側手綱核のコリン作動性神経-脚間核-コルチコトロピン遊離因子受容体タイプ2を発現しない正中縫線核のセロトニン作動性神経」の回路が担っており、恐怖の制御は、「前交連床核-内側手綱核のサブスタンスP作動性神経-脚間核-コルチコトロピン遊離因子受容体タイプ2を発現する正中縫線核のセロトニン作動性神経-腹側海馬CA3領域に発現するセロトニン5-HT₇受容体」の回路が担っていることが推定される。本稿で紹介した知見は、治療すべき対象が「不安」なのか「恐怖」なのかで治療法が明確に分かれうることを、そして治療薬開発もそういった観点から進められるのが望ましいことを示唆している。

1. はじめに

「セロトニンは不安や恐怖に関与している」—聞き慣れた、もしくは聞き飽きたと言えるかもしれない言説だが、長らく他に言いようが無かった。しかし、まともな研究者の前でこのようなことを言ってしまったなら、きっとこう言われるに違いない。「そんなことは分かっているのだよ。そうじゃなくてさあ……」そして、矢継ぎ早に以下のような質問が続くはずである。

- 1) 不安や恐怖を生じている時、何がセロトニン神経の活動を制御しているのか？
- 2) セロトニン神経の起始核は複数あるが、どれが関与しているのか？
- 3) この脳部位へのセロトニン神経投射が関与しているのか？

- 4) そして、どの受容体サブタイプが関与しているのか？
- 5) 不安と恐怖は似ているが別の概念である。上記1)～

4) に関して神経回路も不安と恐怖で分離できるのか？
全て当然の質問である。これらに答えなくては、セロトニンと不安・恐怖との関係を明らかにしたとは言えない。これらの質問は基本的には基礎科学的興味に根差したものではあるが、質問1)や2)に答えることは臨床応用につながる可能性があるし、質問5)に答えることは、その答え次第では、不安障害患者に対する治療方針の決め方を変える可能性がある。

最近の研究の進展により、上記の質問に部分的ではあるが答えられるようになってきた。本稿では我々自身の研究を中心に、これらの質問の答えとなる知見を紹介する。

2. 不安と恐怖の神経回路

不安と恐怖の神経回路について説明する前にこの二つの違いを説明しておく必要があるだろう。簡単に言うなら不安は「特定の対象が無い漠然としたもの」で、恐怖は「特定の対象があるもの」である。例えば、1人で暗いところに行くと何となく心細い気持ちになる、というのは「不安」であり、かつて交通事故で負傷した経験があって、その後事故現場の近くを通るだけで身がすくむ、というのは「恐怖」である。後者は「事故現場」という明確な対象があるからである。一般的に不安には学習過程を必要とせず、恐怖には学習過程が必要になる（蛇や蜘蛛などに対する生得的な恐怖の存在も考えられるが、現時点では見解が分かっている(1)）。

以上の違いを踏まえ、不安の評価には学習過程を経ない高架式十字迷路のような試験を中心に用い、恐怖の評価には特定の場所での電気ショックという学習経

キーワード：セロトニン, 不安, 記憶

北海道大学大学院 医学研究科 神経薬理学分野 (〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目)

E-mail: yohmura@med.hokudai.ac.jp 原稿受領日: 2016年9月20日, 依頼原稿

Title: Raphe serotonergic system modulating emotion — anxiety and fear memory Author: Yu Ohmura, Mitsuhiro Yoshioka

A 高架式十字迷路試験

B 文脈的恐怖条件付け試験

図1 ラット、マウスにおける不安・恐怖の評価法

A: 不安の評価法の1つである高架式十字迷路の一例。左の写真はマウス用の装置の一例。ラットの場合はより大きい迷路を用いる。右の写真は自動解析装置による解析例。黒線はマウスの実際の行動軌跡を表している。写真で示されているように、マウスは壁の無いスペース（左右のアーム）にはあまり出てこないため、壁の無いスペースでの滞在時間もしくは侵入回数の全体に対する割合を不安水準の指標として用いる。B: 恐怖の評価法の1つである文脈的恐怖条件付け試験の一例。特定の場所で電気ショックを受けた動物（この図ではラット）はホームケージに戻され、約24時間後に再度前日と同じ場所に曝露される。この再曝露の時にはショックは負荷されない。前日と同じ環境にさらされることによって動物は前日の電気ショックの記憶を思い出し、すくみ行動（freezing）やストレス誘発性排便を示す。今回紹介する研究では恐怖の形成過程ではなく発現に注目しているため、薬の投与は主に再曝露の直前に行われている。

験を経る文脈的恐怖条件付け試験を用いてラット、マウスの行動評価を行ってきた（図1）。高架式十字迷路試験ではラット、マウスが壁の無いオープンスペースを生得的に嫌う性質を利用し、動物がオープンスペースに滞在した時間を不安水準の指標とした。文脈的恐怖条件付け試験では、特定の場所で電気ショックを受けた動物を再びその場所に曝露し、その際に表出するすくみ行動（freezing）を恐怖の指標とした。以下、それらの評価法を用いた成果を説明していく。

1) 不安や恐怖を生じている時、何がセロトニン神経の活動を制御しているのか？

セロトニン神経活動を制御する因子として、我々はコルチコトロピン遊離因子（corticotrophin releasing factor: CRF）に着目した。PTSD患者の脳脊髄液中においてCRF濃度が高いという報告があり（2）、CRF受容体のmRNA発現がセロトニン起始核において見られるという報告もあるためである（3）。

我々は電気ショックによって特定の場所に対する恐怖を条件付けられたラットの脳内にカニューレを留置し、セロトニン神経起始核の1つである正中縫線核にCRFを局所投与した（4）。その結果、すくみ行動の発

現率が増加した。同様にCRFを正中縫線核に局所投与しても、高架式十字迷路での不安様行動には影響しなかった。

CRFの受容体は少なくとも2種類（CRF₁受容体、CRF₂受容体；どちらもGsタンパク質共役型の受容体）存在することが確認されているため、それぞれの受容体に選択的な拮抗薬を正中縫線核に局所投与して同様の実験を行った（5）。その結果、CRF₁受容体拮抗薬（antalarmin）の投与ではすくみ行動に影響が無く（図2A）、CRF₂受容体拮抗薬（astressin 2B）によってのみすくみ行動発現率が減少したことから（図2C）、CRF₁受容体ではなくCRF₂受容体刺激が恐怖の発現に必要であることが分かった。同様にCRF₂受容体拮抗薬を正中縫線核に局所投与しても、高架式十字迷路での不安様行動には影響しなかった。

また、すくみ行動発現時に腹側海馬でのセロトニン遊離量が上昇していることをin vivo microdialysisによって見出している。この上昇はCRF₂受容体拮抗薬を正中縫線核に局所投与することで消失する。

以上の結果から、正中縫線核に発現するCRF₂受容体の刺激を介して正中縫線核に存在するセロトニン

図2 正中縫線核へのCRF受容体拮抗薬局所投与による恐怖発現の抑制効果

文脈的恐怖条件付け試験(図1B参照)の再曝露10分前に正中縫線核もしくは背側縫線核へCRF受容体拮抗薬を投与した。A: CRF₁受容体選択的拮抗薬である antalarmin の正中縫線核への局所投与がすくみ行動発現率に与える影響。B: CRF₂受容体選択的拮抗薬 astressin 2B の背側縫線核への局所投与がすくみ行動発現率に与える影響。C: 非選択的CRF受容体拮抗薬である astressin および CRF₂受容体選択的拮抗薬 astressin 2B の正中縫線核への局所投与がすくみ行動発現率に与える影響。*P<0.05。(文献5から改変)

神経細胞の活動が増加し、恐怖発現を導いているものと推測できる。しかしCRF₂受容体を刺激する内因性リガンドは何なのか?という問いには現時点では明確に答えられない。CRF₂受容体を刺激する内因性リガンドは1つではなく、CRF, urocortin, urocortin II, urocortin III など複数のリガンドが存在するためである。

また、上記の研究では不安への影響は観察できなかったが、正中縫線核が不安に関与しないというわけではない。おそらくCRF₂受容体を発現しないセロトニン神経細胞群が不安制御に関与していると思われる。実際、我々はセロトニン神経細胞選択的にチャネルロドプシン2の変異体(C128S)を発現させたマウスの正中縫線核を光刺激することで不安様行動が増えることを見出している(6)。この変異体をセロトニン神経細胞のみに発現したマウスの脳内に光ファイバーを埋めて青色光を照射すると、短い時間(1~2分程度)セロトニン神経の活動だけを選択的に増加させることが可能になる。さらに、黄色光を照射することでセロトニン神経活動を元の活動状態に戻すことができる。そ

こで正中縫線核に向けて1分ごとに1回(500ms)、黄色光と青色光を照射し(図3A)、高架式十字迷路におけるマウスの行動がどう変化するのかを観察した(図3B)。その結果、青色光を照射して正中縫線核のセロトニン神経活動が亢進している時にはマウスのオープンスペース滞在時間は著しく減少、つまり不安様行動が増加した(図3C)。

次に問題となるのは、これらの異なるセロトニン神経細胞群がどこから神経投射を受けているのか、ということである。現時点で明確な証拠はないが、脚間核から正中縫線核への神経投射が密に存在することから(7)、脚間核内の別々の亜核から神経投射を受けている可能性がある。さらに、大阪バイオサイエンス研究所の山口らによって実施された綿密な研究により、中隔の前交連床核から内側手綱核のサブスタンスP陽性神経細胞群への投射が恐怖の制御を、三角中隔核から内側手綱核のコリン作動性神経細胞群への投射が不安の制御を担っていることが示されている(8)。この研究では内側手綱核のサブスタンスP陽性神経細胞群は脚間核の外側部に投射し、内側手綱核のコリン作動性神経細胞群は脚間核の内側部に投射していることも見出している。従って仮説としては、脚間核の外側部から正中縫線核のCRF₂受容体発現セロトニン神経細胞群への投射によって恐怖が制御され、脚間核の内側部からCRF₂受容体を発現しない正中縫線核セロトニン神経細胞群への投射によって不安が制御されるものと考えられる。また、脚間核ではCRF₂受容体のリガンドであるurocortinのmRNAを発現することが報告されていることも、間接的にはこの仮説を支持する(9)。近年のウィルスベクター技術の発展を踏まえると、光遺伝学などの方法を用いてこの仮説を検証することは可能であろう。

2) セロトニン神経の起始核は複数あるが、どれが関与しているのか?

これまでは正中縫線核を中心に話を進めてきたが、前脳に投射するセロトニン神経起始核としては背側縫線核の方が大きく、一般的には背側縫線核に注目して研究が行われることが多い。そこで前節で紹介した恐怖条件付けの実験系を用いて、背側縫線核にもCRF₂受容体拮抗薬を投与したが(図2B)、すくみ行動発現率に影響を与えることは無かった(5)。

不安に関しても同様で、先述のセロトニン神経細胞選択的にチャネルロドプシン2を発現させたマウスを用いて背側縫線核を光刺激しても、高架式十字迷路における不安様行動が増えることは無かった(6)。

しかし、以上の結果は、背側縫線核が恐怖や不安に

図3 正中縫線核セロトニン神経活動の選択的活性化による不安惹起作用

セロトニン神経細胞選択的にチャンネルロドプシン2の変異体 (C128S) を発現させたマウスを用いた (n=9). この変異体をセロトニン神経細胞のみに発現したマウスの脳内に光ファイバーを埋めて青色光を照射すると、短い時間 (1~2分程度) セロトニン神経の活動だけを選択的に増加させることが可能になる。さらに、黄色光を照射することでセロトニン神経活動を元の活動状態に戻すことができる。そのため、黄色光照射時をコントロールとして比較している。さらにこの変異体をセロトニン神経細胞のみに発現したマウス (bigenic) とこの変異体を発現しない同腹仔 (WT or monogenic) でも比較を行った。A: 高架式十字迷路試験を実施する4分間、正中縫線核に向けて1分ごとに1回 (500 ms), 黄色光と青色光を照射した。B: 高架式十字迷路におけるマウスの行動がどう変化するのかを観察した。白線はマウスの実際の行動軌跡を表している。写真で示されているように、青色光を照射した時にはマウスは壁の無いスペース (左右のアーム) にはあまり出てこない。C: 青色光を照射して正中縫線核のセロトニン神経活動が亢進している時にはマウスのオープンスペース滞在時間は著しく減少, つまり不安様行動が増加した。D: 青色光を照射して正中縫線核のセロトニン神経活動が亢進させても、高架式十字迷路における移動距離, つまり自発運動量は変化しなかった。* $P < 0.05$. (文献6より転載)

関与しないということを必ずしも意味するものではない。まず、背側縫線核には CRF_2 受容体を発現しない神経細胞も多く存在するはずであるし、セロトニン神経細胞以外の神経細胞も多く存在する (10)。また、上記のネガティブな結果は恐怖の「発現」や生得的な不安に限った話であり、恐怖を形成する段階や社会性不安に背側縫線核が関与するという証拠は数多く存在する (11, 12)。

つまり、恐怖の発現や生得的な不安に限定すれば、背側縫線核ではなく正中縫線核がそれらの制御に関与しているものと考えられる。

3) どの脳部位へのセロトニン神経投射が関与しているのか?

1) で触れた山口らの研究では、中隔の前交連床核も三角中隔核も正中縫線核から神経投射を受けていることが示されている (8)。この投射がセロトニン神経細胞によるものかどうかは確かめられていないが、仮にそうだとすれば中隔-内側手綱核-脚間核-正中縫線

核-中隔というループ回路が形成されることになる (図5参照)。このようなループ回路が本当にあるのか、そしてあるとすればそのようなループ回路が情動情報の処理にどのような役割を果たすのか、という問題は非常に興味深い。

しかし、このループの外への回路も当然ながら存在する。例えば正中縫線核から腹側海馬へは密な神経投射がある (13)。文脈的恐怖条件付け試験における再曝露時のすくみ行動表出時に腹側海馬でのセロトニン遊離量が上昇していること、そしてその上昇は CRF_2 受容体拮抗薬を正中縫線核に局所投与することで消失することから (5), CRF_2 受容体を発現する正中縫線核のセロトニン神経細胞群は腹側海馬に神経投射しており、恐怖発現の際にその活動を上げていると考えられる。

不安制御に関与する正中縫線核セロトニン神経細胞の投射先はまだ不明だが、ラットを用いた実験で腹側海馬のセロトニンが関与する可能性が指摘されている (14)。

図4 腹側海馬への5-HT 受容体拮抗薬局所投与による恐怖反応の抑制効果

A: 文脈的恐怖条件付け試験の再曝露 10 分前に腹側海馬へセロトニン受容体拮抗薬を投与した。B, D: セロトニン 5-HT₇ 受容体選択的拮抗薬である SB269970 だけが恐怖反応の指標であるすくみ行動とストレス誘発性排便を抑制した。C, E: 他のサブタイプ (5-HT_{1A}, 2A, 2C, 3, 4, 6 受容体) に対するセロトニン受容体拮抗薬を投与しても恐怖反応を抑制することは無かった。一方、セロトニン 5-HT₄ 受容体選択的拮抗薬である GR113808 は恐怖条件付け試験での再曝露に伴う排便を促進した。* $P < 0.05$ 。(文献 15 より転載)

4) そして、どの受容体サブタイプが関与しているのか?

3) で述べた証拠に基づけば不安と恐怖を制御するセロトニン神経の投射先は主に腹側海馬だと推定されるが、そうなると問題は 14 種類も存在するセロトニン受容体サブタイプのうち、どれが恐怖もしくは不安に関与するか、ということである。

恐怖記憶に関しては我々が関連受容体を最近同定した(15)。文脈的恐怖条件付け試験における再曝露の直前にセロトニン 5-HT₇ 受容体拮抗薬を腹側海馬に局所投与することで恐怖発現の指標であるすくみ行動およびそれに随伴して生じる排便数が減少することを見出している(図4)。他のサブタイプ (5-HT_{1A}, 2A, 2C, 3, 4, 6 受容体) に対するセロトニン受容体拮抗薬を投与しても恐怖発現を抑制することは無かった。また、in situ hybridization 法を用いた組織学的検

討により、5-HT₇ 受容体は主に海馬の CA3 領域に発現していること、hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) チャネルと共発現していることも見出している。さらに海馬スライスを用いた電気生理学的検討から、海馬 CA3 領域の錐体細胞上に発現する 5-HT₇ 受容体刺激を介して HCN チャネルが活性化して入力に対する感度が上昇することが示されている。電気ショック負荷によっても入力感度は上昇し、その上昇は 5-HT₇ 受容体拮抗薬の灌流によって抑制される。つまり、恐怖記憶の形成時に腹側海馬 CA3 領域における 5-HT₇ 受容体-HCN チャネル経路の機能亢進が生じることで恐怖発現が促進されているものと推定される。

不安制御に関与するセロトニン受容体サブタイプはまだ不明だが、ラットを用いた実験で腹側海馬のセロ

類が未確定であったり、関与する受容体の種類が一部不明であったりとまだまだ検証すべき点は多く残されているものの、不安と恐怖の神経回路の大部分は分離できるということはほぼ確実である。これは言い換えれば、経験と観察から定義された情動の種類に対応して物質の実体として存在する神経回路が分離できるということでもあり、基礎科学的に重要な意味を持っている。なぜならこれは情動に関する生物学的見方と人文・社会科学的見方（哲学・心理学など）を統合することであり、「情動」をより深く理解することに他ならないからである。応用科学的な観点に立てば、本稿で紹介した知見は、治療すべき対象が「不安」なのか「恐怖」なのかで治療法が明確に分かれうること、そして治療薬開発もそういった観点から進められるのが望ましいことを示唆している。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Thrasher C, et al. J Exp Child Psychol. 2016;142:382-390.
- 2) Baker DG, et al. Am J Psychiatry. 1999;156:585-588.
- 3) Bittencourt JC, et al. J Neurosci. 2000;20:1142-1156.
- 4) Ohmura Y, et al. Eur J Pharmacol. 2008;584:357-360.
- 5) Ohmura Y, et al. Neuropsychopharmacology. 2010;35:1271-1278.
- 6) Ohmura Y, et al. Int J Neuropsychopharmacol. 2014;17:1777-1783.
- 7) Groenewegen HJ, et al. J Comp Neurol. 1986;249:65-102.
- 8) Yamaguchi T, et al. Neuron. 2013;78:537-544.
- 9) Bittencourt JC, et al. J Comp Neurol. 1999;415:285-312.
- 10) Hioki H, et al. J Comp Neurol. 2010;518:668-686.
- 11) Maier SF, et al. Behav Neurosci. 1995;109:404-412.
- 12) Challis C, et al. J Neurosci. 2013;33:13978-13988.
- 13) Azmitia EC, et al. J Comp Neurol. 1978;179:641-667.
- 14) Alves SH, et al. Behav Pharmacol. 2004;15:37-43.
- 15) Ohmura Y, et al. Int J Neuropsychopharmacol. In press. doi:10.193/ijnp/pyv131.
- 16) Davis M. Annu Rev Neurosci. 1992;15:353-375.
- 17) LeDoux JE. Annu Rev Neurosci. 2000;23:155-184.