背側縫線核セロトニン神経による情動調節機構 —抗うつ薬の作用機構の解析から—

永安 一樹^{1,2)}, 金子 周司²⁾

要約: セロトニン神経は、黒質線条体路・中脳辺縁系のように投射元-投射先の関係が概ね1対1対応しているドパミン神経と異なり、多対多対応しており、このことがその機能解析の大きな足かせとなっている。本稿では、投射元の一つである背側縫線核に的を絞り、薬物の局所注入や、急性単離切片における電気生理学的解析、セロトニン神経機能を *in vitro* で解析できる縫線核脳切片培養系を用いて、治療抵抗性うつ病に対して治療効果を有する化合物が背側縫線核のセロトニン神経機能にどのような影響を与えるのかを概説する。その上で、うつ病や不安などの情動調節におけるセロトニン神経の機能を、神経回路レベルで解き明かすために今後必要となるであろうツールについても述べる。

1. はじめに

セロトニン神経は、中脳から延髄にかけて分布する縫線核を起始核とする神経系であり、大脳皮質・海馬・線条体・視床下部から脊髄に至るまで、中枢・末梢神経系のほとんど全ての領域に投射を行っている(1, 2)。その広汎な投射領域に対応するように、情動調節・攻撃性・行動の柔軟性・体温調節・摂食・疼痛制御など様々な脳機能における重要性が示されているものの(3)、それぞれの機能において重要なセロトニン神経回路が、どこからどこへの投射であるのかという点についてはほとんど明らかになっていない。

情動障害の一形態であるうつ病におけるセロトニンの重要性は、(A) セロトニン神経伝達を促進するイミプラミンなどの三環系抗うつ薬や、フルオキセチンなどの選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) が、臨床上有効な抗うつ薬であること(4)、(B) セロトニ

ンの原料であるトリプトファン量の減少が、治療後のうつ病患者に症状の再発を引き起こすこと(5)により支持される。一方で、上記抗うつ薬による薬物治療が奏効しない例も多数に及ぶことが報告されており(6)、いわゆる治療抵抗性うつ病として知られている。近年、この治療抵抗性うつ病に対して、統合失調症治療薬であるオランザピンと SSRI の合剤、あるいは解離性麻酔薬であるケタミンが有効である可能性が示唆されているが(7, 8)、これら薬剤がセロトニン神経機能に与える影響には不明な点が多く残されている。

我々は、*in vitro* セロトニン神経培養系やマイクロダイアリシス法、電気生理学的解析手法を用いて、前掲の抗うつ効果を示す薬物が、背側縫線核セロトニン神経機能に与える影響を解析してきた。その結果、ケタミンは AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) とニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して、オランザピンは 5-HT₆ 受容体への阻害作用を介して、それぞれセロトニン神経機能の亢進作用を有することを見出した(9, 10)。本稿では、これら治療抵抗性うつ病の治療効果が報告されている化合物のセロトニン神経機能への作用メカニズムについて述べる。

2. ケタミンの背側縫線核セロトニン神経への作用

ケタミンは、フェンシクリジンの誘導体として合成された NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害薬であり(11)、ヒトを含む多数の哺乳類において麻酔薬として広く用いられている。症例数は少ないものの、低用量のケタミンに抗うつ作用があることを示唆する報告が 2000 年に Berman らによりなされ(12)、2006 年には治療抵抗性うつ病患者においても同様の抗うつ効果が

キーワード: セロトニン, 抗うつ薬

¹⁾ 大阪大学大学院 薬学研究科 附属創薬センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

²⁾ 京都大学大学院 薬学研究科 生体機能解析学分野 (〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

E-mail: nagayasu@pharm.kyoto-u.ac.jp 原稿受領日: 2016 年 9 月 29 日, 依頼原稿

Title: Pharmacological approach for elucidating the role of dorsal raphe serotonin neurons in mood/emotion regulation

Author: Kazuki Nagayasu, Shuji Kaneko

得られることがZarateらにより報告された(13)。以降そのメカニズムの解明を目指して、げっ歯類を用いた研究が行われ、ケタミンの抗うつ薬様効果が、AMPAの阻害薬であるNBQXの処置あるいは脳内のセロトニンを枯渇させるPCPAの前処置により消失することが報告されている(14, 15)。

そこで我々は、うつ病に関与する脳部位の一つである内側前頭前野皮質 (mPFC) に着目し(16)、本領域でのセロトニン濃度に与えるケタミンの効果についてマイクロダイアリス法により検討した。その結果、ケタミンの投与により、用量依存的な mPFC 内セロトニン濃度の上昇が観察された (図 1a)。また、この上昇は、AMPA の阻害薬である NBQX あるいは Ca^{2+} 透過性 AMPAR の阻害薬である NASPM の背側縫線核内への前処置により有意に減弱した (図 1b)。さらに、AMPA 及び AMPAR の脱感作阻害薬のシクロチアジド (CTZ) を背側縫線核内に投与することで、mPFC におけるセロトニン濃度の上昇が見られた。これらの結果は、ケタミンによる mPFC 内セロトニン遊離に背側縫

線核 AMPAR の活性化が必要であること、背側縫線核 AMPAR の活性化が mPFC 内セロトニン遊離を引き起こす上で十分であることを示している。一方で、背側縫線核内にケタミンを直接注入しても、mPFC におけるセロトニン濃度は変化しなかったことから、上記の作用は他の神経核の活性化を介した間接的なものである可能性が示唆される。

背側縫線核に投射する神経核は多数存在するが、背側縫線核セロトニン神経への興奮性の入力である sEPSC の頻度が $\alpha_4\beta_2$ nAChR の活性化により増加することから(17)、次に $\alpha_4\beta_2$ nAChR に対するリガンドを用いた検討を行った。その結果、 $\alpha_4\beta_2$ nAChR 阻害薬である DH β E の背側縫線核内投与により、ケタミン誘発性の mPFC セロトニン濃度上昇が有意に減弱すること (図 1c)、 $\alpha_4\beta_2$ nAChR 刺激薬である RJR-2403 の背側縫線核内投与により、mPFC セロトニン濃度の上昇が引き起こされることをそれぞれ見出した。これらの結果は、ケタミンによる mPFC 内セロトニン遊離における $\alpha_4\beta_2$ nAChR の重要性を示している (図 1d)。

図1 ケタミン投与による前頭前野セロトニン濃度の変化と背側縫線核内 AMPAR および $\alpha_4\beta_2$ nAChR の役割

(a) ケタミンあるいは生理食塩水を皮下投与した際の、前頭前野セロトニン濃度をマイクロダイアリス法により測定した。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. saline group. # $P<0.05$, two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc tests. (b, c) ケタミンを皮下投与する10分前から5分前にかけて、NBQX, NASPM (b) あるいは DH β E (c) を背側縫線核内に局所注入した後、ケタミンを投与した際の、前頭前野セロトニン濃度をマイクロダイアリス法により測定した。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. saline group. ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc tests. (d) ケタミンの背側縫線核セロトニン神経への作用の模式図。5-HT: セロトニン。(文献9より引用)

3. オランザピンの背側縫線核セロトニン神経への作用

オランザピンは、同じく抗精神病薬であるクロザピンを元に開発された非定型抗精神病薬の一つであり、ドパミン、セロトニン、アドレナリン、ヒスタミンなどの活性アミン受容体の阻害作用を持つ。うつ病に対する治療効果という文脈においては、SSRIであるフルオキセチンとオランザピンの共処置が、治療抵抗性うつ病に対して、それぞれの単剤による治療よりも優れた効果を有する可能性が、Shelton らにより報告され(18)、2006年にはCorya らが同様の結果を、より大規模な臨床研究により得ている(19)。しかしながら、このオランザピンによるSSRIの治療効果の増強の背景にある分子メカニズムの詳細は不明であった。

そこで我々は、*in vitro* でセロトニン神経機能を測定可能な縫線核脳切片培養系を用いて、オランザピンがセロトニン神経機能に与える影響について解析した。オランザピンの処置により、細胞外セロトニン濃度の有意な上昇が見られたが、その上昇量はわずかであった。一方で、SSRIであるフルオキセチンあるいはシタロプラムとオランザピンを共処置することで、SSRI単独処置の場合と比べて有意かつ顕著な細胞外セロトニン濃度の上昇が観察されたことから、オランザピンが*in vitro* においてもSSRIの効果を増強する可能性が示唆される。セロトニン神経機能は、その近傍に存在するGABA神経によって恒常的に抑制されていることから(20)、オランザピンによるセロトニン遊離の増加作

用が、GABA神経の抑制を介したものであるのか否か検討した。GABA_A受容体(GABA_AR)の阻害薬であるビククリンを処置することで、細胞外セロトニン濃度は濃度依存的かつ有意に上昇したことから、本培養系においても、*in vivo* と同様のGABA神経による抑制が存在することが示唆される(図2上部)。一方、ビククリンの存在下ではオランザピンによる細胞外セロトニン濃度上昇作用は消失していたことから、オランザピンのセロトニン遊離作用におけるGABA神経の関与が示唆される。次に、オランザピンが縫線核内セロトニン神経およびGABA神経活動に与える影響を直接的に解析するため、急性単離スライスにおける電気生理学的解析を行った。その結果、オランザピンの灌流により、背側縫線核内GABA神経の活動が有意に抑制されること、セロトニン神経の活動が有意に亢進することがそれぞれ見出された。これらの結果は、オランザピンが縫線核内のGABA神経活動を抑制することで、セロトニン神経活動を亢進させている可能性を示唆している。

前述のようにオランザピンは多数の受容体に対する阻害作用を有するため、次にオランザピンのどの受容体への作用が、このセロトニン神経機能亢進に重要であるのかを、縫線核脳切片培養系および電気生理学的手法を用いて解析した。その結果、5-HT₆受容体の選択的阻害薬であるSB399885の処置により、オランザピンによる作用は完全に模倣された。また、SB399885の存在下では、オランザピンによる細胞外セロトニン濃度上昇作用は消失していた。これらの結果は、オランザピンがGABA神経に存在する5-HT₆受容体を阻害することでその活動を抑制し、このGABA神経の抑制を介してセロトニン神経活動の亢進を引き起こす、すなわち脱抑制のメカニズムにより、SSRIの作用を増強する可能性を示唆している(図2下部)。さらに、5-HT₆受容体の阻害がSSRIの抗うつ薬様効果を増強するか検討するため、抗うつ薬のスクリーニングに使われる尾懸垂試験を用いて解析を行った(21)。SB399885のみの投与では、うつ状態の指標として用いられる無動時間に有意な影響を与えなかったが、SB399885と無動時間を単独では減少させない用量のSSRIを共処置することで、有意かつ顕著な無動時間の減少が見られたことから、5-HT₆受容体の阻害作用が、*in vivo* においてもSSRIの作用を増強する可能性が示唆される。

4. おわりに

本稿では、治療抵抗性うつ病に対して有効性が示さ

図2 オランザピンによる背側縫線核セロトニン神経活動亢進のメカニズム
(上段) 背側縫線核内のGABA神経が遊離するGABAは、セロトニン神経をGABA_ARを介して抑制する。(下段) オランザピンあるいは5-HT₆Rの阻害薬SB399885は、GABA神経の活動を抑制することで、セロトニン神経への抑制を減弱させ、結果的にセロトニン神経活動を亢進させる。

れている化合物が、既存の抗うつ薬の作用点であるセロトニン神経系の機能に対して、どのような作用をどのようなメカニズムで与えるのか、という点について薬理的な見地から評価を行った。しかしながら、薬理的な手法のみでの解析には限界があることも事実であり、セロトニン神経そのものの機能やセロトニン神経を支配している上流の神経核の機能を解明するためには、大村ら・宮崎らが用いているような、トランスジェニックマウスと光遺伝学あるいは化学遺伝学的手法の組み合わせが極めて有効であると考えられる。一方で、マウスにおける解析が困難な、複雑なタスクにおける特定の神経細胞種の機能を明らかにしていく上では、ラットや非ヒト霊長類への外挿性に優れるアデノ随伴ウイルスベクターやレンチウイルスベクター、狂犬病ウイルスベクターなどのツールが必要となると考えられる。我々も現在、ラット／マウスの TPH2 遺伝子上流配列を用いたレンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターを開発しており、光遺伝学的手法と組み合わせることで背側縫線核セロトニン神経の機能亢進が、抗うつ薬様作用の発現に十分であることをマウスにおいて見出している。また、Wardenらは、ラット前頭前野皮質から背側縫線核へ投射する興奮性神経細胞を光遺伝学的手法により刺激することで、強制水泳試験における水泳行動（後肢のバタつき）が誘発されることを報告しており、抗うつ行動の発現における背側縫線核の重要性が示されている(22)。

このような光遺伝学的介入→行動変化といった研究が多く行われている一方で、あるセロトニン神経回路がどのようなコンテキストでどの程度活動しているのか、あるいは神経と神経の接続部であるシナプスの数やその活動が、経験によりどのように変化するのか、といった点は多くが不明なままである。SplitGFPの再構成を指標として特定の神経間のシナプス結合を特異的に定量する GRASP 法や、それを応用したシナプス

活動の定量が、キイロショウジョウバエにおいては実用化され、一部はげっ歯類においてもその有効性が示されつつあるため(23,24)、今後、このようなシナプス数／シナプス活動を特定の回路間で可視化／定量するようなツールが用いられることで、神経活動の観察がより詳細になされるものと考えられる。

謝辞：本稿は、筆者らが論文として報告した研究成果を中心にまとめたものです。各論文の共著者の方々に、この場を借りて感謝の意を表させていただきます。また、大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野の橋本均先生、東京慈恵会医科大学薬理学講座の榎山俊彦先生、京都大学医学部附属病院薬剤部の中川貴之先生、京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の白川久志先生には大変お世話になりました。心よりお礼申し上げます。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Azmitia EC, et al. *J Comp Neurol*. 1978;179:641-667.
- 2) Dahlström A, et al. *Acta Physiol Scand*. 1964;60:293-294.
- 3) Lucki I. *Biol Psychiatry*. 1998;44:151-162.
- 4) Cipriani A, et al. *Lancet*. 2009;373:746-758.
- 5) Smith KA, et al. *Lancet*. 1997;349:915-919.
- 6) Rush AJ, et al. *Am J Psychiatry*. 2006;163:1905-1917.
- 7) Nelson JC, et al. *Am J Psychiatry*. 2009;166:980-991.
- 8) Bobo WV, et al. *Depress Anxiety*. 2016;33:698-710.
- 9) Nishitani N, et al. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;17:1321-1326.
- 10) Asaoka N, et al. *Neuropharmacology*. 2015;95:261-268.
- 11) Domino EF, et al. *Clin Pharmacol Ther*. 1965;6:279-291.
- 12) Berman RM, et al. *Biol Psychiatry*. 2000;47:351-354.
- 13) Zarate CA Jr, et al. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63:856-864.
- 14) Maeng S, et al. *Biol Psychiatry*. 2008;63:349-352.
- 15) Gigliucci V, et al. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;228:157-166.
- 16) Drevets WC, et al. *Brain Struct Funct*. 2008;23:93-118.
- 17) Garduño J, et al. *J Neurosci*. 2012;32:15148-15157.
- 18) Shelton RC, et al. *Am J Psychiatry*. 2001;158:131-134.
- 19) Corya SA, et al. *Depress Anxiety*. 2006;23:364-372.
- 20) Liu R, et al. *Brain Res*. 2000;873:34-45.
- 21) Steru L, et al. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85:367-370.
- 22) Warden MR, et al. *Nature*. 2012;492:428-432.
- 23) Macpherson LJ, et al. *Nat Commun*. 2015;6:10024.
- 24) Kim J, et al. *Nat Methods*. 2011;9:96-102.