



Title	不安、恐怖記憶におけるセロトニン5-HT _{2c} 受容体の役割に関する研究
Author(s)	根深, 真央
Description	配架番号 : 2551
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14085号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14085
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94602
Type	doctoral thesis
File Information	Mao_Nebuka.pdf



学 位 論 文

不安、恐怖記憶におけるセロトニン 5-HT_{2C} 受容体
の役割に関する研究

(Studies on the roles of the serotonin 5-HT_{2C}
receptor in anxiety and fear memory)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

根 深 真 央

学 位 論 文

不安、恐怖記憶におけるセロトニン 5-HT_{2C} 受容体
の役割に関する研究

(Studies on the roles of the serotonin 5-HT_{2C}
receptor in anxiety and fear memory)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

根 深 真 央

目次

発表論文目録および学会発表目録

要旨

略語表

緒言

第1章 5-HT_{2c}受容体欠損マウスにおける不安と恐怖記憶関連行動の特徴

1.1. 方法

1.1.1 使用動物・飼育環境

1.1.2. 新奇環境における自発運動活性

1.1.3. 高架式十字迷路試験

1.1.4. Zero maze 試験

1.1.5. 文脈的恐怖条件付け試験

1.1.6. 統計解析

1.2 結果

1.2.1. 新奇環境における自発運動活性

1.2.2. 高架式十字迷路試験

1.2.3. Zero maze 試験

1.2.4. 文脈的恐怖条件付け試験

1.3 考察

第2章 正中縫線核 5-HT 神経活動誘発性不安様行動における 5-HT_{2c}受容体阻害薬の効果

2.1. 方法

2.1.1. 使用動物・飼育環境

2.1.2. 外科的措置

2.1.3. 脳内微小透析法

2.1.4. 薬物投与方法

2.1.5. In vivo 光照射

2.1.6. 高架式十字迷路試験

2.1.7. 統計解析

2.2. 結果

2.2.1. 腹側海馬 5-HT 神経終末の光遺伝学的活性化による細胞外 5-HT 濃度変化

2.2.2. 腹側海馬 5-HT 神経終末の光遺伝学的活性化による不安様行動の変化

2.2.3. 正中縫線核5-HT神経細胞の光遺伝学的活性化による不安様行動増加作用に対する腹側海馬への5-HT_{2c}受容体拮抗薬投与の効果

2.3. 考察

結論

謝辞

利益相反

引用文献

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Nebuka M, Ohmura Y, Izawa S, Bouchekioua Y, Nishitani N, Yoshida T, Yoshioka M. Behavioral Characteristics of 5-HT_{2C} Receptor Knockout Mice: Locomotor activity, Anxiety-, and Fear Memory-related Behaviors. Behavioural Brain Research, in press.

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, in press.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 根深真央, 大村優, 吉田隆行, 吉岡充弘: セロトニン 5-HT_{2C} 受容体ノックアウトにより恐怖記憶の消去は促進する、第 47 回日本神経精神薬理学会、第 39 回日本生物学的精神医学会合同年会、札幌 (2017. 9. 28~30) 薬理学会年会
2. 根深真央、大村 優、吉岡 充弘: セロトニン 5-HT_{2C} 受容体が自発運動活性、不安、恐怖記憶の制御に果たす役割の解明、The roles of serotonin 5-HT_{2C} receptor in locomotor activity, anxiety, and fear memory (1-SS-67, 2-P-016)、第 92 回日本薬理学会年会、大阪 (2019. 3. 14~16)

要旨

【背景と目的】

不安障害と心的外傷後ストレス障害は、現代における重要な社会問題であるが、これらに対する治療薬の効果は、不十分である。より効果的かつ安全な治療薬を開発するためには、不安と恐怖記憶に関わる神経基盤の解明が重要である。不安障害や心的外傷後ストレス障害に今日用いられている治療薬の作用機序を踏まえると、セロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)神経系は、不安や恐怖記憶に関与していると思われる。5-HT 受容体は 14 のサブタイプがあり、そのうち薬理学的研究から、5-HT_{2c} 受容体は自発運動活性、不安、恐怖記憶に関与していることが示唆されている。薬理学的研究では、受容体の選択性に限界があることから、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスを用いた研究が行われてきた。しかし、1) 自発運動活性と不安に関しては、結果が一貫せず、2) 恐怖記憶に関しては十分な検討がされていない。そこで本研究では、①より詳細な行動解析を行うことで、(A) 自発運動活性と (B) 不安に関するこれまでの一貫しない結果を説明可能とすること、② 5-HT_{2c} 受容体が恐怖記憶の制御に果たす役割について明らかにすること、を目的とした。なお、自発運動活性の変化は不安や恐怖記憶の評価に必然的に影響するため、同時に調べる必要がある。さらに、③ 光遺伝学的手法と薬理学的手法を組み合わせることで、不安に関する責任脳部位を同定することを目的とした。

【対象と方法】

目的①、②については、雄性 5-HT_{2c} 受容体欠損マウスとその野生型同腹仔(野生型群)を用いて比較した。①-(A)のため、オープンフィールド試験を用いて試験中の運動量の経時変化を解析した。①-(B)のため、高架式十字迷路試験のオープンアーム 滞在時間、zero maze 試験のオープン 区画滞在時間を不安の指標として解析した。更に、これまでの 5-HT_{2c} 受容体欠損マウスを用いた先行研究では解析されていなかった高架式十字迷路試験の中央区画滞在時間も解析対象に加えた。また、目的②のため、文脈的恐怖条件付け試験を実施した。マウスに電撃ショックを与えた 24 時間後、電撃ショックを与えずに前日と同じ環境にマウスを 30 分間再曝露した。マウスは前日の電撃ショックの恐怖を想起してすくみ行動(freezing)をとることから、時間経過に伴う freezing の減少を恐怖記憶の消去学習と解釈した。

目的③には、雌雄の 5-HT 神経選択的光感受性チャネル発現マウスを用いた。まず、5-HT 神経終末の活性化を光照射によって実現できていることを確認するために、脳内微小透析法を用いて 5-HT 遊離量の増加を確認した。不安の測定には、高架式十字迷路試験を用いた。先行研究から腹側海馬の関与が推定

されたため、両側腹側海馬に向けて光ファイバーを留置し、試験中に 5-HT 神経終末の活動を上昇させ、不安様行動の増加が見られるかどうかを検証した。また、腹側海馬に密に 5-HT 神経投射を送る神経核である正中縫線核の活動を上げることで不安様行動が増加することが先行研究で示されていることから、その不安惹起効果が 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬の腹側海馬局所投与によって消失するかどうかを調べた。

【結果と考察】

①-(A)：経時変化を分析したところ、野生型群と比べて 5-HT_{2c} 受容体欠損群では、時間経過による運動活性の減少が鈍く、新奇環境への馴化が遅かった。①-(B)：高架式十字迷路試験のオープンアーム滞在時間には、群間で有意な差は見られなかった。一方、5-HT_{2c} 受容体欠損群では中央区画滞在時間が有意に長かった。更に、zero maze 試験ではオープン区画滞在時間が 5-HT_{2c} 受容体欠損群で有意に長かったことから、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスでは不安水準が低下しているものと考えられる。Hill らは高架式十字迷路試験を用いていたため、中央区画滞在時間の延長によって差が検出できなかったものと推測される。

②：文脈的恐怖条件付け試験において、24 時間後に実施した再曝露中の freezing の減少は、5-HT_{2c} 受容体欠損群で有意に速かった。5-HT_{2c} 受容体欠損マウスは、恐怖記憶の消去学習が促進されていることが示唆される。しかし、①-(A)の運動量と②の freezing には負の相関傾向が見られた。よって、再曝露中の freezing の減少には、①-(A)で見られた運動量の経時変化の違いを含有している可能性がある。

③：5-HT 神経選択的光感受性チャネル発現マウスの腹側海馬を青色光照射することで、5-HT 細胞外濃度が上昇することを確認した。そして、5-HT 神経選択的光感受性チャネル発現マウスを用いて、腹側海馬の 5-HT 神経終末を活性化した結果、不安様行動は増加した。更に、正中縫線核 5-HT 神経の活性化による不安惹起作用は、腹側海馬への 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬投与で消失した。これらの結果を総合すると、正中縫線核から腹側海馬に投射する 5-HT 神経の終末から遊離された 5-HT が腹側海馬に発現する 5-HT_{2c} 受容体を刺激することで不安が惹起されるものと考えられる。

【結論】5-HT_{2c} 受容体は不安惹起に関与すると言えるが、恐怖記憶への関与については保留とする。正中縫線核から腹側海馬に投射する 5-HT 神経がこの不安惹起作用に関与しているだろう。

略語表

アルファベット順に全て

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

aCSF artificial cerebrospinal fluid

ChR2 Channelrhodopsin-2

PTSD Post-Traumatic Stress Disorder

SSRI selective serotonin reuptake inhibitor

5-HT 5-hydroxytryptamine

緒言

不安障害と心的外傷後ストレス障害 (Post-Traumatic Stress Disorder, PTSD) は現代における重要な社会問題であり、そして現代医学にとっても未解決の課題である。不安障害とは、過剰な恐怖および不安を主症状とする疾患群の総称であり、日本における何らかの不安障害の生涯有病率は 4.2% と推定されている (川上, 2016)。また、近年の大地震・津波のような天災、戦争、児童虐待などの恐怖の記憶はヒトの脳に深く刻み込まれ、人々を長く苦しめる。特に 2011 年の東日本大震災以降、東北地方での PTSD 患者の割合は 14.7% にまで達した (Onose et al., 2015)。PTSD の発症リスクを増大させる児童虐待も増加の一途を辿っており、平成 27 年度の児童虐待相談件数はいよいよ 10 万件の大台を超えた (厚生労働省, 2016)。しかし、不安障害と PTSD に対する治療薬の効果は後述するように不十分であり、深刻な副作用を有するものもあるのが現状である。このように、より効果的かつ安全な治療薬を開発することが喫緊の課題であるが、不安と恐怖記憶に関わる神経基盤と現存する治療薬の作用機序はいまだに対応がとれておらず、このことが上記問題の解決を妨げていると私は考えた。以上を踏まえて、私は不安と恐怖記憶に関わる神経基盤の解明に取り組むこととした。

不安障害の治療には、ベンゾジアゼピン系抗不安薬、5-HT_{1A} 受容体部分作動薬、および選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) が主に用いられている。ベンゾジアゼピン系抗不安薬は GABA_A 受容体へのアロステリック調節により抗不安効果を発揮する。即効性があるものの、依存性があり、筋弛緩作用、認知機能低下などの深刻な副作用をもたらすことが問題視されている。つまり、一時的な不安緩和効果はあるものの、社会復帰を困難にしてしまう。5-HT_{1A} 受容体部分作動薬であるタンドスピロンは、縫線核の 5-HT_{1A} 自己受容体に作用することで、5-HT_{1A} 受容体の脱感作を導く。その結果、自己受容体刺激による抑制が弱まり、5-HT 遊離が持続するようになるために抗不安効果をもたらすものと推定されているが (Garcia-Garcia et al., 2014)、この仮説に反する証拠もあり (Turcotte-Cardin et al., 2018)、作用機序についての結論は出ていない。タンドスピロンはベンゾジアゼピン系抗不安薬と比較すると依存性が少なく、また筋弛緩の副作用がみられない抗不安薬なので、臨床的には使いやすい。しかし一方で即効性に欠けることが問題である (村崎光邦, 1997)。SSRI は抗うつ薬の一種であり、フルボキサミン、パロキセチン、セルトラリン、エシタロプラムの 4 種類が日本で臨床利用されている。うつ病・うつ状態の他、フルボキサミンは強迫性障害、社会不安障害、パロキセチンはパニック障害、

強迫性障害、社会不安障害、PTSD、セルトラリンはパニック障害、PTSD、エスシタロムは社会不安障害にも適応を持つ。SSRI の投薬により、シナプス間隙の 5-HT 濃度が上昇し、5-HT 受容体が刺激されることで不安緩和効果をもたらすと推定されるが、後述するようにその作用機序についての結論は出ていない。さらに、即効性に欠けるという問題がある上に (Pollack et al., 2001)、投薬初期には逆に不安症状を悪化させてしまうこともある (樋口ら 2005; Harada et al. 2008)。

上記で一部触れたように、PTSD 患者に対しても SSRI が処方されているが、投薬治療に反応するのは半数程度に過ぎず、十分な効果を得られていない (Alexander 2012)。さらに、PTSD 治療においてはベンゾジアゼピン系抗不安薬の処方逆効果である可能性が動物実験では指摘されている (Sugiyama et al., 2015)。このように、不安障害と PTSD に対する現存の治療薬は患者の社会復帰を十分にサポート出来ていない。

現存の不安障害、PTSD 治療薬の大部分が 5-HT 神経系に作用することを踏まえると、5-HT 神経系は何らかの形で不安に関与しているものと考えられる。しかし、5-HT が刺激する 5-HT 受容体は 5-HT₁ から 5-HT₇ までの 7 種類のサブファミリーからなり、14 個のサブタイプが存在するため、どの 5-HT 受容体サブタイプが不安に関与しているのかを明らかにする必要がある。また、先述のように SSRI 投薬初期には逆に不安症状を悪化させてしまうこともあることを踏まえると、一部の 5-HT 受容体刺激はむしろ不安を悪化させる可能性が考えられる。もしこの考えが正しければ、その受容体の拮抗薬を併用することで SSRI の副作用を回避し、治療効果も高めることが出来るだろう。これら 14 個のサブタイプのうち、本研究では 5-HT_{2c} 受容体に着目した。これまでの研究に限れば、刺激することによって不安を増加させることが最も多く報告されているのは 5-HT 受容体の中で 5-HT_{2c} 受容体である。例えば、5-HT_{2c} 受容体作動薬はげっ歯類において不安を亢進させることが数多く報告されている (Kennet et al., 1989; Bagdy et al., 2001; Campbell et al., 2003)。

本研究で着目した 5-HT_{2c} 受容体は、かつては 5-HT_{1c} 受容体として誤って 5-HT₁ ファミリーに分類されていたが、後に 5-HT_{2c} 受容体に改名された。5-HT_{2c} 受容体は 7 回膜貫通型 Gq 蛋白質共役型受容体であり、末梢神経系にはほとんど発現がなく、中枢神経系には広く発現している。5-HT_{2c} 受容体は、5-HT_{2A} 受容体、5-HT_{2B} 受容体と 46-50% の相同性があり、同じファミリーを形成している (Hoyer et al., 2002)。5-HT_{2c} 受容体は、哺乳類では発現部位がほぼ共通しており、脈絡叢上皮、前頭皮質、前嗅覚核、外側手綱核、海馬、扁桃体、大脳基底核 (尾状核、黒質)、帯状回、側坐核、腹側被蓋野、視床下

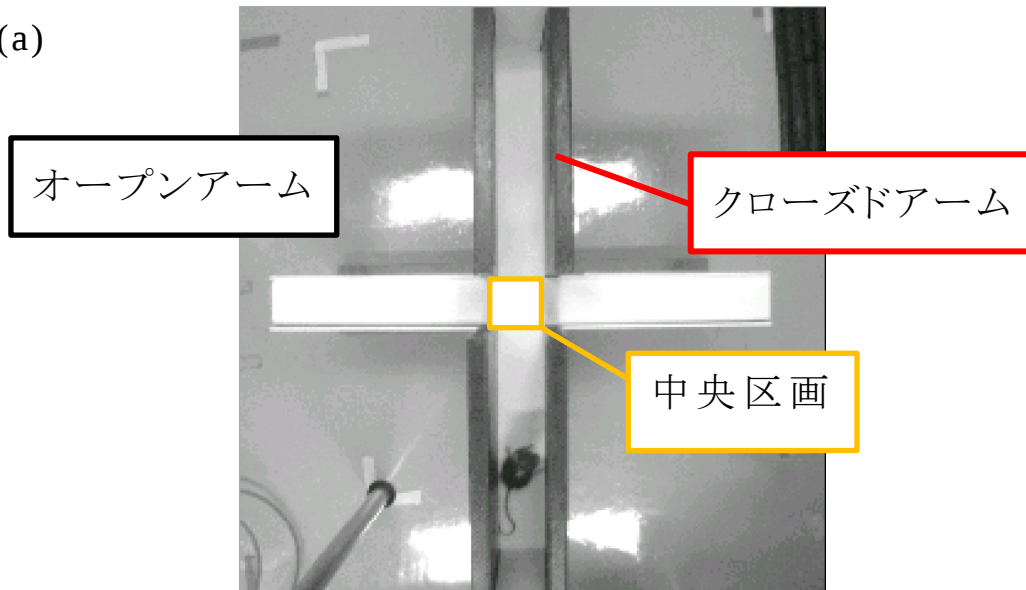
部などに主に発現している (for a review, Werry TD et al., 2008)。本研究では、まず 5-HT_{2c} 受容体欠損マウスを用いて 5-HT_{2c} 受容体の機能欠損が不安緩和をもたらすことを確かめ (第 1 章)、その上で光遺伝学的手法と薬理学的手法を組み合わせることで責任脳部位を同定する (第 2 章)。

第 1 章 5-HT_{2c} 受容体欠損マウスにおける不安と恐怖記憶関連行動の特徴

これまで、不安と恐怖記憶における 5-HT_{2c} 受容体の役割を明らかにするためには、薬理学的研究が進められてきた (Ohyama et al., 2016; Martin et al., 2002; Mosher et al., 2005)。薬理学的研究では、研究者らは比較的、5-HT_{2c} 受容体選択的な拮抗薬を用いて研究を行っていたが (例: SB242084, Kennett et al., 1997; Bagdy G et al., 2001)、その選択性はあくまで相対的なものであり、off-target 効果は完全には否定できない。そのため、これまでも薬理学的研究だけではなく、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスを用いて、自発運動活性および情動機能における 5-HT_{2c} 受容体の役割を明らかにしようとする試みが行われてきた。新奇環境における自発運動活性の低下は不安を部分的に反映していると考えられること、そして自発運動活性は不安や恐怖記憶の評価に影響を与えうるため、しばしば運動活性も同時に測定される。しかし、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスにおける運動活性と不安の結果は、一貫していない。Hill らは、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスは野生型マウスと比較して高い運動活性を示すが、不安は大きく変化しないと報告した。一方、Heisler らは、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスは運動活性は野生型マウスと違いがないと主張する一方で、不安水準は低いと報告した。私は、それぞれの先行研究で、少しずつ異なる行動実験を用いていたことに注目した。Hill らは、連続 5 日間の 1 時間ごとの運動活性の平均を用いている。一方、Heisler らは、1 度だけ評価し、30 分間の運動活性を用いている。また不安に関しては、Hill らは高架式十字迷路試験を用いている一方、Heisler らは、zero maze 試験を用いていた。本研究の主な目的の一つ目は、詳細に行動を解析することによって、これらの一貫しない結果を解釈可能にすることである。

より詳細に行動解析を行うために、以下の点に着目した。新奇環境におけるげっ歯類の自発運動活性は、時間の経過と共に減少することが知られている。また、いずれの先行研究でも時間経過による自発運動活性の変化については示されていなかった。そのため、私たちは、自発運動活性の時間経過による変化を解析した。更に、私たちは、高架式十字迷路試験の中央区画におけるマウスの行動を解析した。高架式十字迷路試験も zero maze 試験も、オープンアームと壁に囲まれたクローズドアームが存在し、アームにおけるマウスの行動は、不安を測定するために用いられる。しかし、Hill らは高架式十字迷路試験を用いているが、中央区画での行動は解析しておらず、zero maze 試験には中央区画が存在していない。(図 1-1)

(a)



(b)

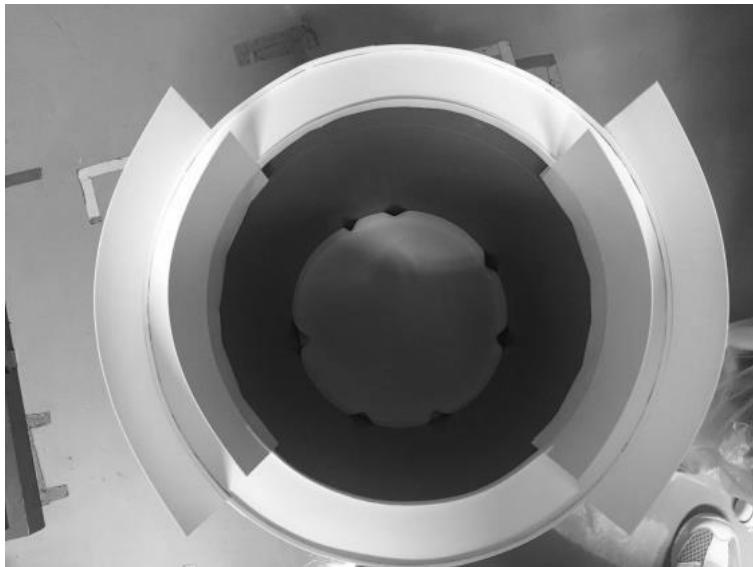


図 1-1 (a)高架式十字迷路試験, (b)zero maze 試験

(a)の高架式十字迷路試験は、木製の壁のない2本のオープンアームと壁で覆われている2本のクローズドアーム、およびそれらが交差する中央区画から成り立つ。(b)の zero maze 試験は、一連のドーナツ型の走行路から成り立つ不安を測定するための試験。高架式十字迷路試験と異なり、中央区画が存在しない。

恐怖記憶に関しては薬理学的研究の結果が一貫しておらず、5-HT_{2c}受容体拮抗薬投与により、文脈的恐怖条件付け試験における恐怖記憶の指標であるすくみ行動(freezing)を減少させることを示した研究と(Ohyama et al., 2016)、同様の効果を観察できなかった研究がある(Masuda et al., 2013)。その上、5-HT_{2c}受容体を薬理的に阻害することにより、学習過程に影響を与えることを示唆する先行研究もある(Alsio et al., 2015; Foilb and Christianson, 2016)。これらの薬理学的研究による結果を補完するため、本研究では5-HT_{2c}受容体欠損マウスを用いて文脈的恐怖記憶の獲得、想起、消去過程を調べることにした。

また、文脈的恐怖条件付け試験では恐怖記憶の指標としてすくみ行動(freezing)が用いられるが、「動いていない」ことを指標とするために、運動活性や不安に変化がある場合、正しく恐怖記憶を評価できない可能性がある。実際、文脈的恐怖条件付け試験で測定されるすくみ行動発現率と、高架式十字迷路試験で測定される不安様行動には、相関関係があることがわかっている(Botta et al., 2015)。もし、5-HT_{2c}受容体欠損マウスが高い運動活性と低い不安を示すのであれば、文脈的恐怖条件付け試験の結果を解釈する上でそれらの要素を考慮する必要があるだろう。そこで、文脈的恐怖条件付け試験におけるすくみ行動発現率と運動活性又は不安水準の相関関係も調べた。

1.1. 方法

1.1.1 使用動物・飼育環境

実験には、雄性成熟5-HT_{2c}受容体欠損マウス(RRID:IMSR_JAX:015821)又はその同腹仔(12から16週齢)を用いた。5-HT_{2c}受容体欠損マウスには、エクソン3と4の間にLoxP配列に挟まれた転写阻害配列(transcriptional blocking cassette)が挿入されている。これらのマウスは、少なくとも6回以上C57BL/6Nと交配させてから使用した。交配に用いるC57BL/6Nは、Nippon SLC Co. Ltd (Hamamatsu, Japan)から購入した(C57BL/6NCrSlc)。マウスの遺伝子型は、PCRの後、アガロースゲル電気泳動にかけて解析した(図1-2)。プライマーは以下の3つを用いた(SEQUENCE 5' → 3'):

AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA

AGGCTTTAGTGACCTCCCATGA

CGGAAGAGAAGGACCTGGATAG

マウスは集団で飼育され、行動実験中を除いて常に自由飲水、自由摂餌であった。飼育室の環境は、室温25 ± 2° C、湿度40-50%、午前7時から午後7時までは暗期、午後7時から翌日午前7時までは明期に設定されていた。

全ての行動実験は、マウスにとっての暗期に実施した。全ての実験は、「北海道大学動物実験に関する規程」,「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」に従って実施した。承認題目は、遺伝子改変マウスの電気生理学的および行動薬理的解析(番号 2019-031)および中枢神経系における情動機能調節とその薬理的効果に関する研究(番号 18-0070)である。マウスはそれぞれ一つ又は幾つかの行動実験に用いた(表 1-1)。複数の実験をマウスが経験する場合、ストレスが少ないと思われる行動実験から順に実施した。

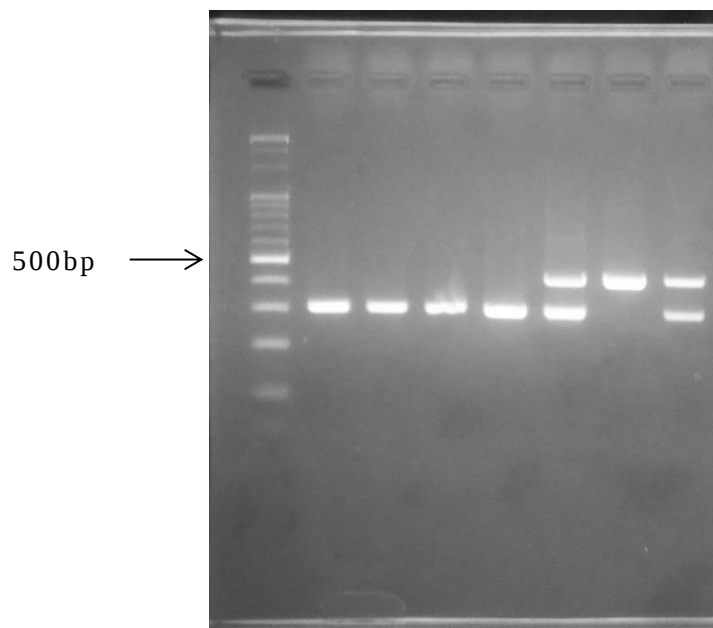


図 1-2 5-HT_{2c} 受容体欠損マウス電気泳動例

一番左はラダーであり、500bp から以下 400, 300, 200, 100 bp を示す。5-HT_{2c} 受容体欠損マウスは 310bp、野生型同腹仔は 437bp にそれぞれバンドが現れる。

表 1-1 それぞれのマウスが経験した行動実験について

	野生型群	5-HT _{2C} 受容体欠損群
運動活性 - 高架式十字迷路試験 - 文脈的恐怖条件付け試験	15 (2) ^{*1}	22 (4) ^{*1, 2}
運動活性 - zero maze 試験 - 文脈的恐怖条件付け試験	13	7 (1) ^{*3}
zero maze 試験 - 文脈的恐怖条件付け試験	7	11 (3) ^{*4}
文脈的恐怖条件付け試験	13	11
合計	48	51

表内の運動活性は、新奇環境における自発運動活性を示す。

それぞれの実験を経験したマウスの匹数を示す。カッコ内は、文脈的恐怖条件付け試験の結果を除外又は結果が存在しない匹数を示す。理由はそれぞれ下記の通りである。

^{*1} 野生型群 15 匹中 2 匹と 5-HT_{2C} 受容体欠損マウスの 22 匹中 1 匹は、文脈的恐怖条件付け試験実施中に同ケージ内の 5-HT_{2C} 受容体欠損マウスが死亡したため、文脈的恐怖条件付け試験の結果から除外。

^{*2} 5-HT_{2C} 受容体欠損マウス 22 匹中 3 匹は、高架式十字迷路試験実施後、文脈的恐怖条件付け試験実施前に死亡したため、文脈的恐怖条件付け試験の結果が存在しない。

^{*3} 5-HT_{2C} 受容体欠損マウス 7 匹中 1 匹は、zero maze 試験実施後、文脈的恐怖条件付け試験実施前に死亡したため、文脈的恐怖条件付け試験の結果が存在しない。

^{*4} Zero maze 試験 - 文脈的恐怖条件付け試験の 5-HT_{2C} 受容体欠損マウス 11 匹中 3 匹は、zero maze test 実施後、文脈的恐怖条件付け試験実施前に死亡したため、文脈的恐怖条件付け試験の結果が存在しない。

1.1.2. 新奇環境における自発運動活性

アクリルボックス ($30 \times 30 \times 30 \text{ cm}^3$) を用いてマウスの自発運動活性を調べた (図 1-3)。部屋の明るさは、アクリルボックスの中央底が約 400 lux になるよう設定した。実験開始時、マウスはアクリルボックスの四隅のいずれかに置かれた。ソフトウェア上で描いた $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ の格子をマウスが 2 回跨いだら、実験開始とした。30 分間の試験中、マウスの行動を CCD camera で撮影した。実験終了後、ソフトウェア (LimeLight, Actimetrics, USA) を用いて解析を行った。 $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ の格子をマウスが跨いだ回数を総 crossing 回数とした。総移動距離と総 Crossing 回数を、自発運動活性の指標として用いた。

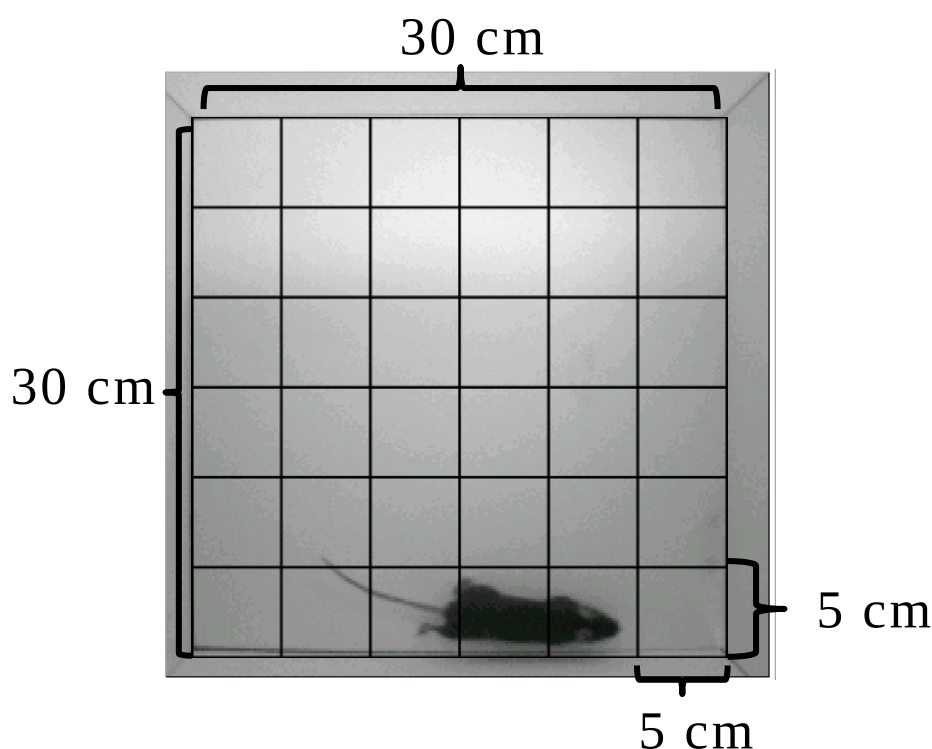


図 1-3 新奇環境運動活性試験

新奇環境運動活性試験に用いたアクリルボックス。赤外線カメラによりマウスの移動を捕捉し、解析を行った。

1.1.3. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は、不安関連行動を評価できる試験系である。木製の壁のない 2 本のオープンアーム ($25 \times 5 \text{ cm}$) と高さ 20 cm の壁で覆われている 2 本のクローズドアーム ($25 \times 5 \text{ cm}$)、およびそれらが交差する中央区画 ($5 \times 5 \text{ cm}$) から成り立つ迷路が床からの高さ 40 cm に存在する装置を用いて

実施した(図 1-4)。装置の床は全て白色のポリプロピレンのシートで覆われている。部屋の明るさは、約 400 lux に設定した。マウスが中央区画からクローズドアームに侵入するよう誘導し、マウスがクローズドアームにいる状態で中央区画の方向に振り返ったら、実験開始とした。5 分間の試験中、CCD カメラを用いて各マウスの行動を撮影した。マウスの総移動距離と、各アーム及び中央区画への進入回数の合計である総 crossing 回数を自発運動活性の指標として用いた。マウスは生得的に壁の無いオープンアームを避ける性質があり、抗不安薬の投与によりマウスはオープンアーム滞在時間が延長する。これらのことから、オープンアーム滞在時間割合とオープンアーム進入回数割合を不安の指標として用いた (Lister et al., 1987)。また、マウスは、新奇環境に対する探索欲求もあるので、マウスがオープン区画に出るかどうかを悩んでいる指標として、中央区画滞在時間と、リスクアセスメント行動の回数も解析した。リスクアセスメント行動は、マウスが中央区画から身体を伸長させて、前肢のみをオープンアームへと侵入させた後、後肢を動かさずに元の位置へと戻る行動を 1 回と定義した (図 1-5)。

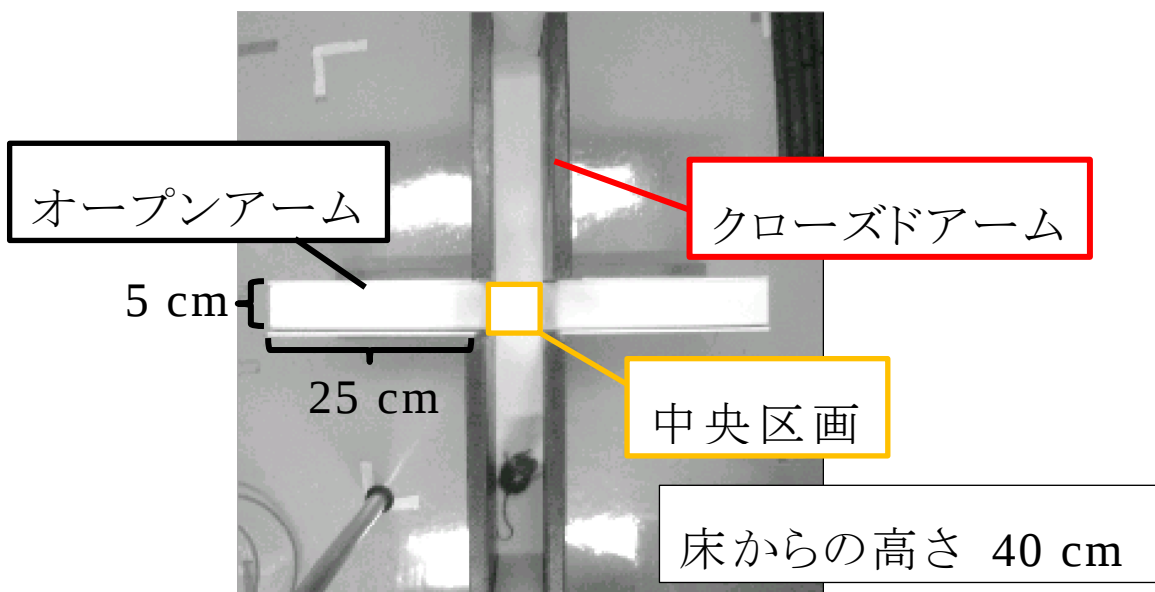


図 1-4 高架式十字迷路試験

木製の壁のない 2 本のオープンアーム (25 × 5 cm) と高さ 20 cm の壁で覆われている 2 本のクローズドアーム (25 × 5 cm)、およびそれらが交差する中央区画 (5 × 5 cm) から成り立つ。

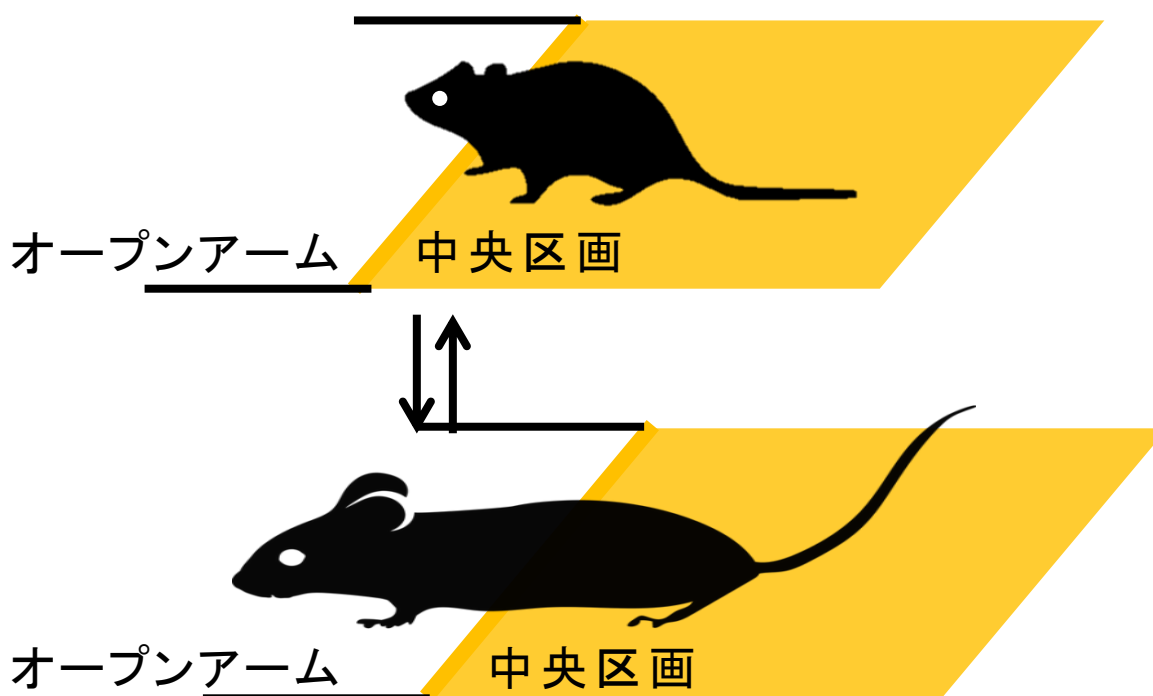


図 1-5 リスクアセスメント行動

リスクアセスメント行動は、マウスが中央区画にいる状態から、身体を伸長させて、前肢のみをオープンアームへと侵入させた後、元の位置へと戻る行動と定義した。この一連の行動を 1 回として、高架式十字迷路試験中の回数を数えた。

1.1.4. Zero maze 試験

Zero maze 試験は、高架式十字迷路試験同様、不安関連行動を評価できる試験系である。装置は、実験室の床から 40 cm の高さに存在する外径 46 cm、床幅 5 cm のドーナツ型の走行路であり、走行路のうち向かい合う 2 区画が壁のないオープン区画、残りの向かい合う 2 区画が高さ 20 cm の壁のあるクローズド区画で成り立つ(図 1-6)。床は全て高架式十字迷路試験同様に白色のポリプロピレンシートで覆われている。部屋の明るさは約 400 lux に設定した。マウスをクローズド区画に置いて実験を開始し、5 分間の実験中は CCD カメラを用いて撮影した。高架式十字迷路試験と同様に、総移動距離と進入回数、open 区画滞在時間割、リスクアセスメントを測定した。

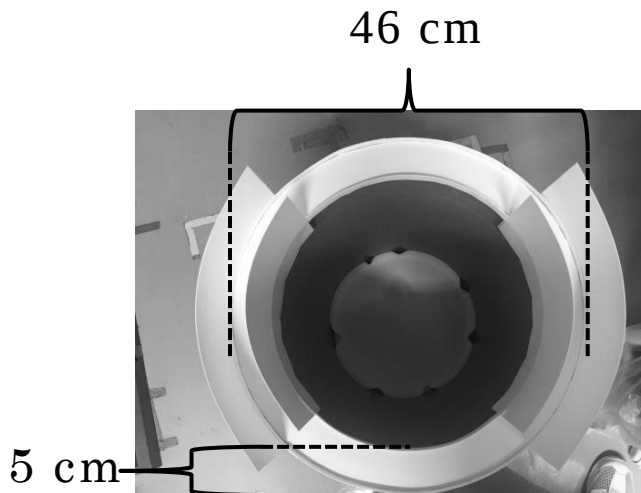


図 1-6 Zero maze 試験

一連のドーナツ型の走行路から成り立つ不安を測定するための試験。高架式十字迷路試験と異なり、中央区画が存在しない。

1.1.5. 文脈的恐怖条件付け試験

文脈的恐怖条件付け試験には、電撃ショックボックス ($16.0 \times 16.0 \times 12.5 \text{ cm}^3$) を用いた (図 1-7)。電撃ショックボックスは床のグリッドからマウスに電撃ショックを与える。実験は Session 1 から Session 3 まで 3 日間に渡って実施された。Session 1 では、マウスを電撃ショックボックスに入れ、5 分間馴化させたのち、 0.6 mA 、2 秒間の電撃ショックを、30 秒間隔で 10 回、マウスに与えた。最後の電撃ショックから 30 秒後にマウスを電撃ショックボックスから取り出し、ホームケージへと戻した。マウスが呼吸以外での体動が欠損している状態をすくみ行動 (Freezing) と見なし、ソフトウェア (FreezeFrame, Actimetrics) を用いて自動解析した。Session 1 でのすくみ行動 (Freezing) は、電撃ショックボックスという特定の環境と関連付けられた恐怖記憶の獲得を反映しているとみなした。Session 1 の 24 時間後、Session 2 を実施した。Session 2 では、マウスは電撃ショックを与えられず、電撃ショックボックスに 30 分間曝露された。Session 2 の最初の 10 分のフリージングは、Session 1 で獲得した特定の環境に関連付けられた恐怖記憶の想起を反映している。Session 2 では電撃ショックが与えられないので、マウスは徐々に Freezing が減少する。この時間経過における Freezing の減少は、within-session extinction として測定される。Session 2 の終了後、マウスは再度ホームケージへと戻される。Session 2 の 24 時間後に、Session 3 として電撃ショックボックスへと 10 分間マウスを曝露させる。Session 3

の Freezing は、Session 2 で得られた恐怖記憶の消去学習の想起又は固定を反映している。更に、Session 2 の最初の 0 から 10 分までの 10 分間と Session 3 の Freezing については、between-session extinction として測定される。

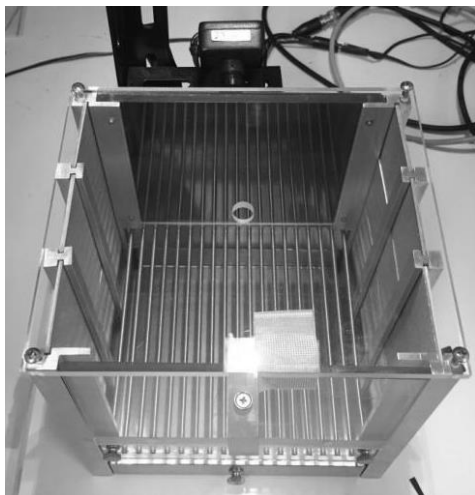


図 1-7 文脈的恐怖条件付け試験

文脈的恐怖条件付け試験にもちいた電撃ショックボックス。床がグリッドになっているので、そこからマウスに電撃ショックを与える。

1.1.6. 統計解析

新奇環境、高架式十字迷路試験、zero maze 試験、文脈的恐怖条件付け試験における遺伝子型の効果は、対応の無い両側 t 検定 (Two-tailed unpaired t tests) を用いた。ルビーン検定 (Levene' s test) が有意であった場合には分散の均質性が仮定できないと考え、スチューデントの t 検定 (Student' s t -test) の代わりにウェルチの t 検定 (Welch' s t -test) を用いた。シャピロ・ウィルク検定 (Shapiro-Wilk normality test) が有意であった場合には正規分布が仮定できないと考え、マン・ホイットニーの U 検定 (Mann-Whitney' s U test) を用いた。

新奇環境における自発運動活性、文脈的恐怖条件付け試験における freezing の経時変化には、時間を被験者内要因、遺伝子型を被験者間要因とした、二要因の混合計画分散分析を用いた (two-factor mixed ANOVA)。二要因の分散分析において、交互作用が有意であった場合には、それぞれの水準について一要因の分散分析 (one-factor ANOVA) を実施した。

ピアソンの相関係数 (Pearson product-moment correlation coefficients) を用いて、文脈的恐怖条件付け試験における freezing と新奇環境における自

発運動活性、又は文脈的恐怖条件付け試験における freezing と zero maze 試験における open 区画滞在時間の相関を解析した。

全ての結果は平均値±標準誤差として示した。有意水準 $\alpha < 0.05$ であるとき、統計学的に有意であるとした。全ての統計解析には SPSS (version 23.0) を用いた。

1.2 結果

1.2.1. 新奇環境における自発運動活性

30 分間における総移動距離は、5-HT_{2C} 受容体欠損マウスでは、野生型群と比較して、有意に長かった ($t_{55} = 3.23$, $p = 0.002$, 図 1-8-a)。更に、総 crossing 回数も野生型群と比較して 5-HT_{2C} 受容体欠損マウスで有意に多かった ($t_{55} = 3.63$, $p = 0.0019$, 図 1-8-b)。5-HT_{2C} 受容体欠損マウスにおける高い運動活性の原因を探るため、10 分ごとの総移動距離の経時変化を解析した。2 要因の分散分析において、時間と遺伝子型について有意な交互作用が見られた ($F_{2,110} = 7.27$, $p = 0.001$)。有意な交互作用が見られたので、各時間帯に対して 1 要因の分散分析を行った結果、0 から 10 分には遺伝子型における有意差は無く、10 から 20 分、20 から 30 分において、5-HT_{2C} 受容体欠損マウスは野生型群と比較して有意に移動距離が長かった ($F_{1,55} = 2.00$, $p = 0.16$, in 0 - 10 min; $F_{1,55} = 15.59$, $p = 0.001$, in 10 - 20 min; $F_{1,55} = 12.60$, $p = 0.001$, in 20 - 30 min, 図 1-8-c)。総 crossing 回数は、2 要因の分散分析を実施したところ、時間と遺伝子型について有意な交互作用が見られた ($F_{2,110} = 14.41$, $p < 0.001$)。有意な交互作用が見られたので、各時間帯に対して 1 要因の分散分析を行った結果、0 から 10 分には遺伝子型における有意差は無く、10 から 20 分、20 から 30 分において、5-HT_{2C} 受容体欠損マウスは野生型群と比較して有意に crossing 回数が多かった ($F_{1,55} = 1.17$, $p = 0.28$, in 0 - 10 min; $F_{1,55} = 19.17$, $p < 0.001$, in 10-20 min; $F_{1,55} = 17.54$, $p < 0.001$, in 20-30 min, 図 1-8-d)。

Figure 2

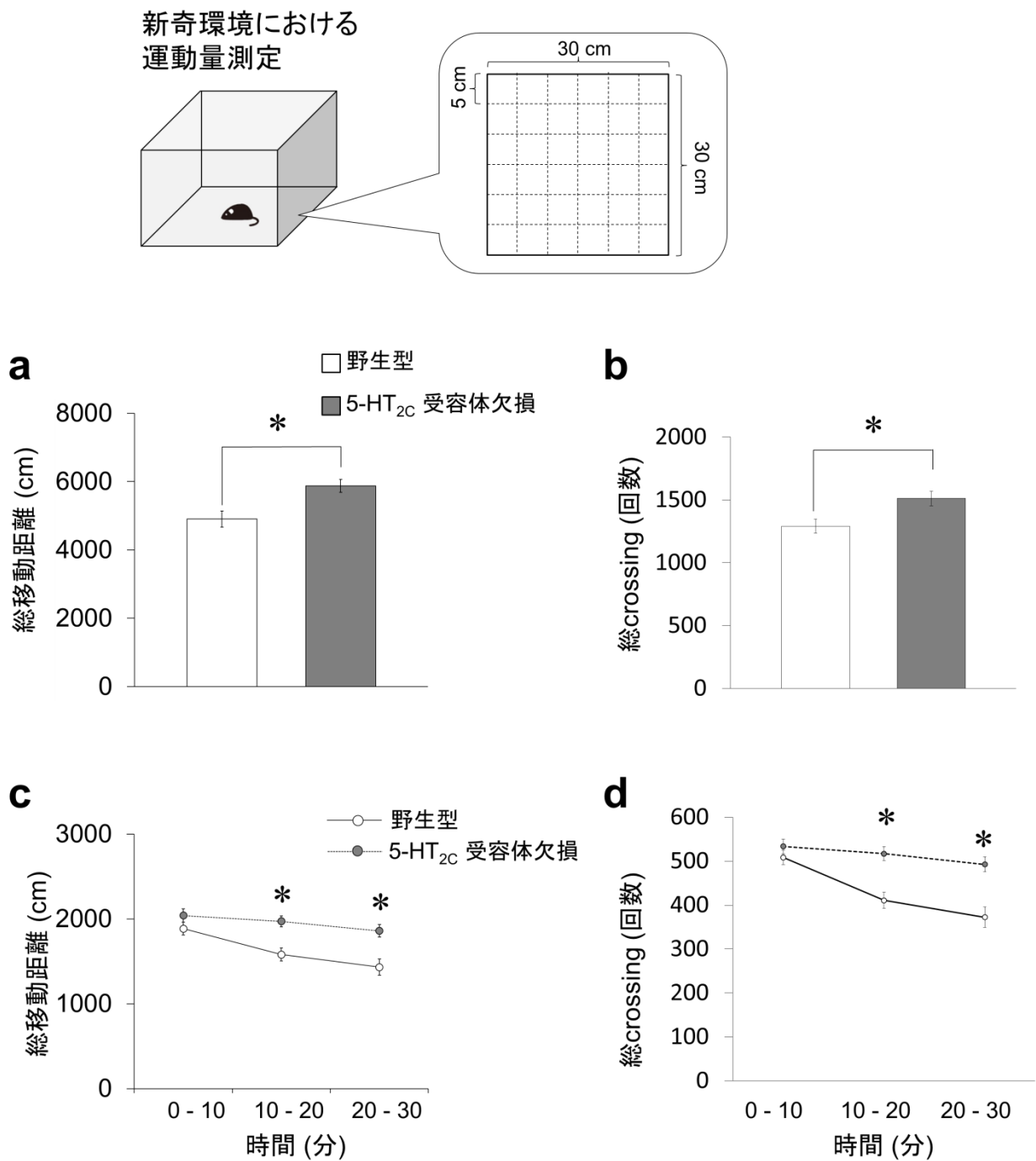


図 1-8 新奇環境における自発運動活性

新奇環境における (a) 30 分間の総移動距離 (cm) (b) 総 crossing 回数 (回) (c) 10 分毎の移動距離 (cm) (d) 10 分毎の crossing 回数 (回) * < 0.05

1.2.2. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験において、不安の指標であるオープンアーム滞在時間割合には、遺伝子型による差は無かった ($t_{35} = 1.86$, $p = 0.07$, 図 1-9-a)。運動活性の指標である総移動距離 ($t_{35} = 1.06$, $p = 0.30$, 図 1-9-b) 及び総 crossing 回数には有意差は無かった ($t_{35}=1.10$, $p = 0.28$, 図 1-9-c)。中央区画滞在時間は、野生型群と比較して、5-HT_{2C} 受容体欠損マウスで有意に多いことが示された ($U = 98.00$, $p = 0.039$, 図 1-9-d)。リスクアセスメントの回数は、5-HT_{2C} 受容体欠損マウスにおいて、野生型と比較して有意に多かった ($t_{35} = 2.96$, $p = 0.006$, 図 1-9-e)。

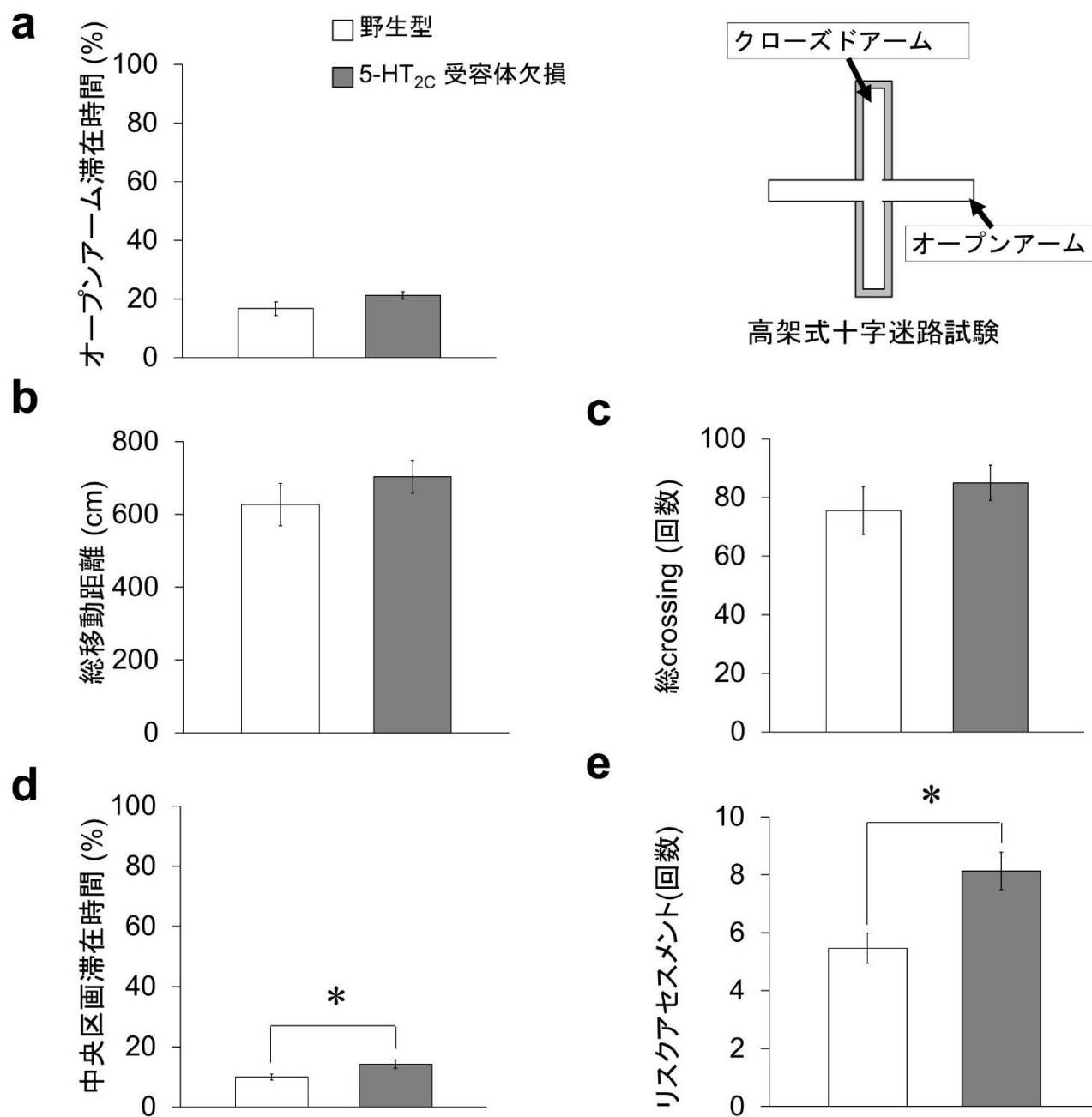


図 1-9 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験における (a) オープンアーム滞在時間割合 (%) (b) 総移動距離 (cm) (c) 総 crossing 回数 (回) (d) 中央区画滞在時間割合 (%) (e) リスクアセスメント回数 (回) * < 0.05

1.2.3. Zero maze 試験

Zero maze 試験では、5-HT_{2C} 受容体欠損マウスは、不安の指標であるオープン区画滞在時間が、野生型群と比較して有意に長かった ($U = 79.00$, $p = 0.007$, 図 1-10-a)。また、総移動距離も 5-HT_{2C} 受容体欠損マウスは、野生型群と比較して有意に長かった ($t_{26.75} = 2.76$, $p = 0.01$, ウェルチの t 検定, 図 1-10-b)。リスクアセスメントの回数は遺伝子型において有意な差が無かった ($t_{36} = 1.70$, $p = 0.098$)。平均速度に関しては、二要因の分散分析において、遺伝子型と区画の交互作用 ($F_{1,34} = 6.53$, $p = 0.015$) と区画の主効果 ($F_{1,34} = 14.55$, $p = 0.001$) が有意であった。野生型群における平均移動速度は、クローズド区画において、5-HT_{2C} 受容体欠損群と比較して有意に遅かった ($F_{1,34} = 18.24$, $p = 0.0001$)。

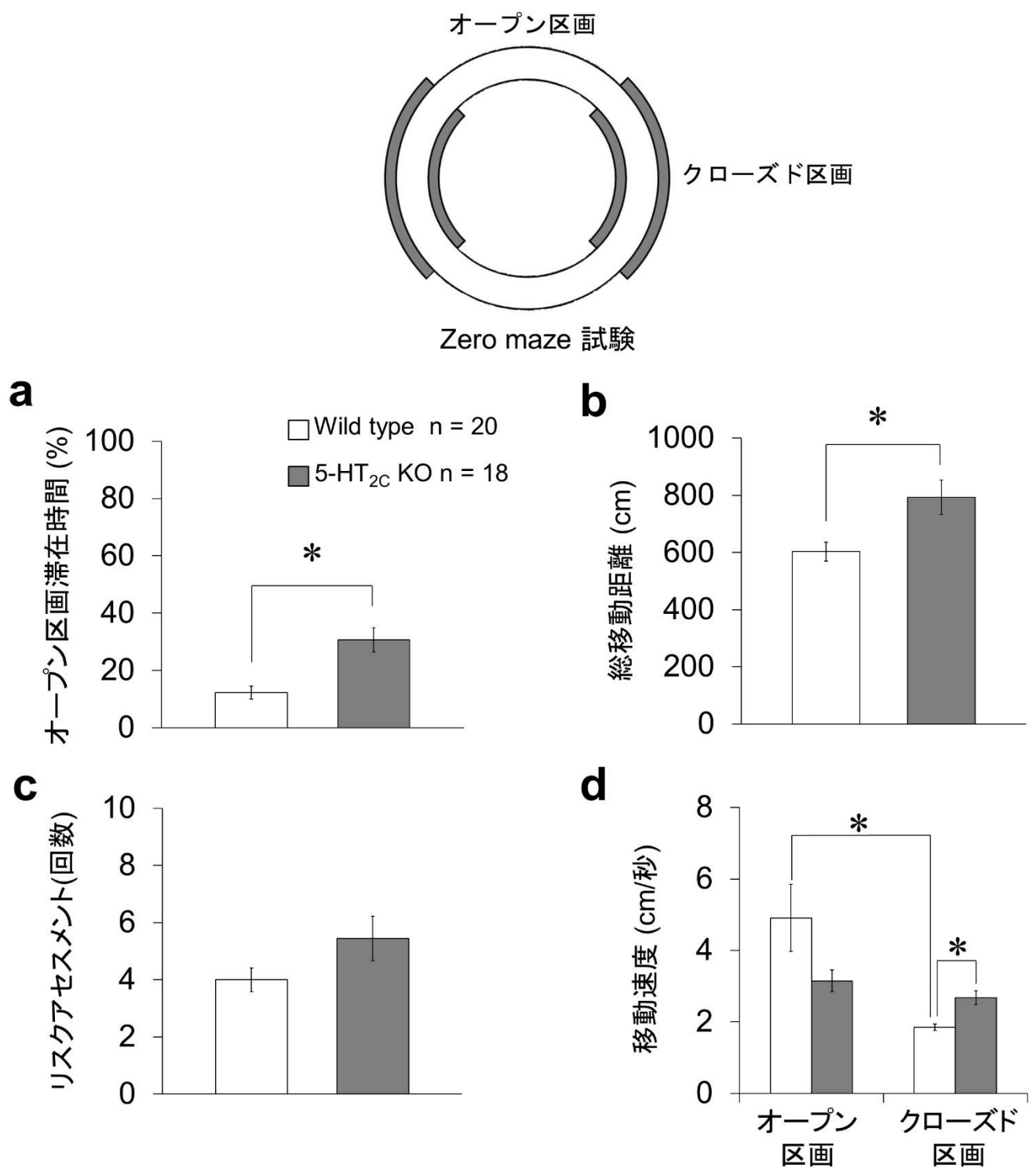


図 1-10 Zero maze 試験

Zero maze 試験における (a) オープン区画滞在時間割合 (%), (b) 総移動距離 (cm), (c) リスクアセスメント (回), (d) 各アームにおける平均速度 (cm/sec)

* < 0.05

1.2.4. 文脈的恐怖条件付け試験

二要因の分散分析において、Session 1 では、時間 ($F_{19,1653} = 418.33$, $p < 0.001$)、遺伝子型 ($F_{1,87} = 7.46$, $p = 0.008$) の主効果と、時間と遺伝子型の交互作用 ($F_{19,1653} = 3.52$, $p = 0.001$) が有意であった (図 1-11-a)。交互作用が有意であったので、各時間帯に対して一要因の分散分析を実施すると、session 1 の 240 から 270 秒 ($F_{1,87} = 5.03$, $p = 0.027$)、330 秒から 360 秒 ($F_{1,87} = 8.40$, $p = 0.005$)、360 秒から 390 秒 ($F_{1,87} = 10.15$, $p = 0.002$)、390 秒から 420 秒 ($F_{1,87} = 8.38$, $p = 0.005$)、420 秒から 450 秒 ($F_{1,87} = 4.94$, $p = 0.029$) において遺伝子型の効果が有意であった。二要因の分散分析において、Session2 では、時間 ($F_{2,174} = 309.20$, $p < 0.001$)、遺伝子型 ($F_{1,87} = 5.42$, $p = 0.02$) の主効果と交互作用 ($F_{1,87} = 3.08$, $p = 0.049$) が有意であった (図 1-11-b)。交互作用が有意であったので、各時間帯において一要因の分散分析を実施すると、session 2 の 10 から 20 分、20 から 30 分において、5-HT_{2C} 受容体欠損群で有意に Freezing が低かった。Session 3 では、5-HT_{2C} 受容体欠損群において、有意に Freezing が低かった。 ($U = 745.00$, $p = 0.045$, 図 1-11-c)

Session 2 の最初の 0 から 10 分と、Session 3 での Freezing では、Session の主効果 ($F_{1,87} = 490.17$, $p < 0.001$) は検出されたが、genotype の主効果 ($F_{1,87} = 2.26$, $p = 0.14$)、および交互作用 ($F_{1,87} = 0.86$, $p = 0.36$) は、いずれも検出されなかった。(図 1-11-d)

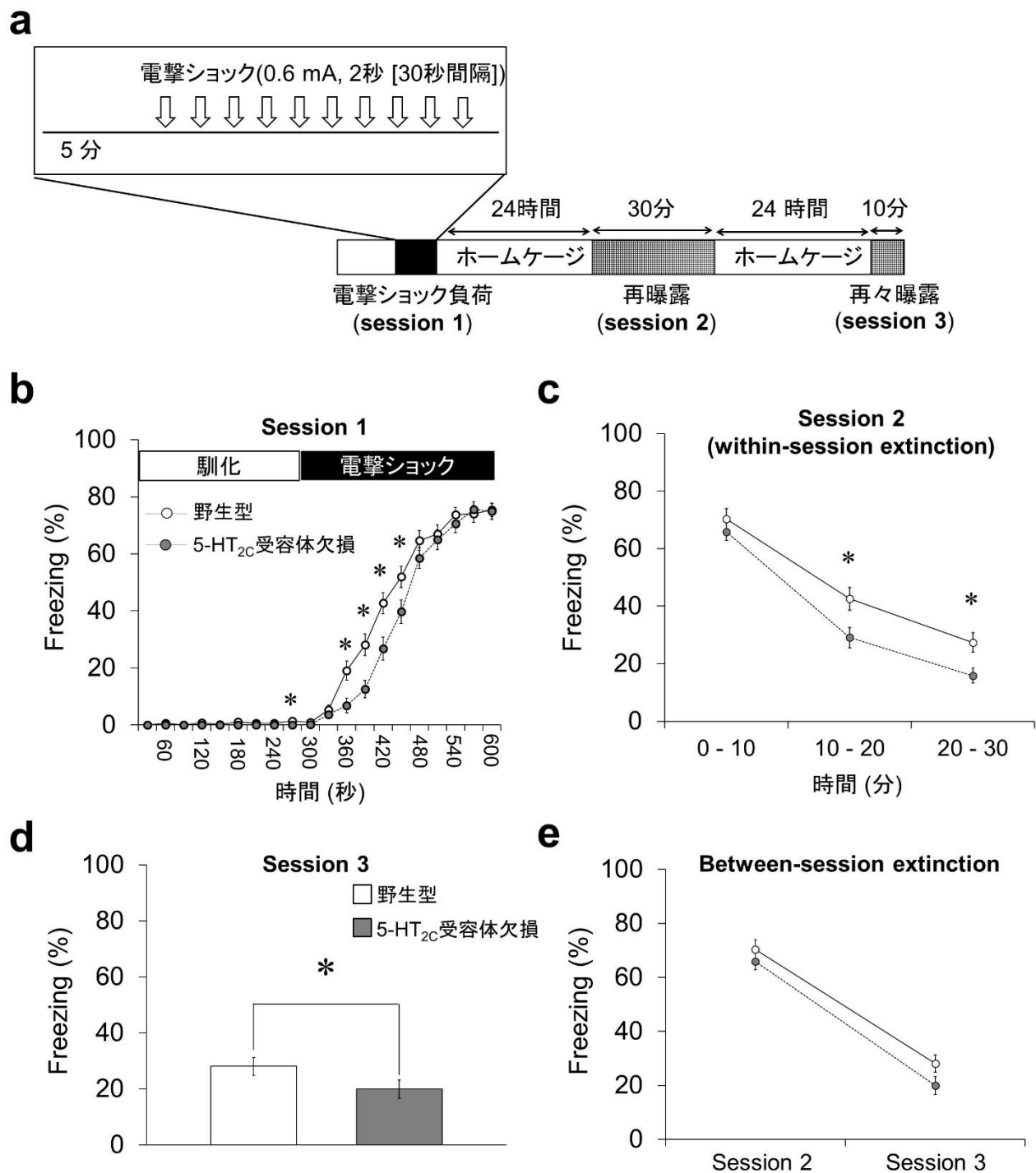


図 1-11 文脈的恐怖条件付け試験

(a) 文脈的恐怖条件付け試験での、(b) Session 1 の Freezing(%), (c) Session 2 の 10 分毎の Freezing(%), (d) Session 3 の Freezing(%), (e) between-session extinction の結果 * < 0.05

1.3 考察

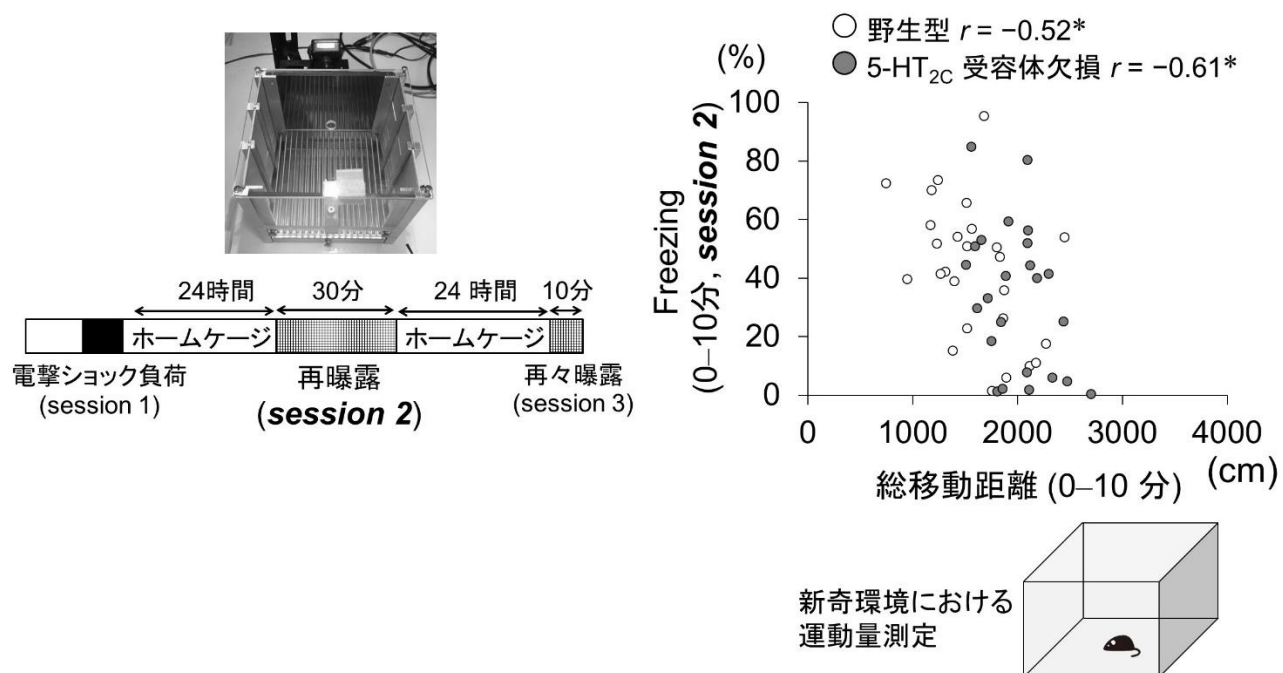
5-HT_{2c} 受容体欠損マウスでは、野生型同腹仔と比較して時間経過による自発運動の低下が鈍いことが示された。これは、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスが新しい環境への馴化が遅いことを示唆している。馴化が遅いという今回の結果は、これまでの一貫性のない先行研究の結果を説明可能とするだろう。先行研究では、5 日間の平均の自発運動活性または 30 分間の総移動距離を用いていた。このような分析は、統計的な検出力を低下させることが推測される。なぜなら、自発運動活性の違いは、今回の研究で示されたように実験の後半だけで生じるため、実験条件のわずかな違いによって統計学的な結果が異なっただけと思われる。Hill らは、実験を繰り返し、遺伝子間における自発運動活性に差があることを検出し、一方 Heisler らは、実験を一度だけ実施し、遺伝子間における自発運動活性の差を検出できなかった。同一の環境下で行動実験を繰り返すことにより、馴化の違いが強調されるため、違いが検出されたと推測される。したがって、5-HT_{2c} 受容体の薬理的遮断または 5-HT_{2c} 受容体の遺伝学的欠損は、自発運動活性をある程度増加させる、と結論付けられるだろう。しかしながら、薬理学的手法を用いた先行研究の 1 つでは、5-HT_{2c} 受容体の薬理的遮断により、実験の前半から自発運動が増加することが示されている (Browne et al., 2017)。ただし、この研究では新奇環境ではなく、慣らした後に運動活性が評価されていた。そのため、5-HT_{2c} 受容体の薬理的遮断が 5-HT_{2c} 受容体遺伝子欠損と同様に新規環境への馴化を遅くするかどうかについては、さらなる研究が必要である。

さらに、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスは、高架式十字迷路試験では、中央区画に留まり、リスクアセスメント行動を行い、決断をためらう様子を示した。この表現型は、これまでの先行研究での一貫しない結果を説明可能とする。先行研究においても、高架式十字迷路試験ではオープンアーム滞在時間の有意な増加は示されなかったが、zero maze 試験では、オープン区画滞在時間が有意に増加していた。Zero maze 試験には中央区画が存在しないため、単に進むか戻るかの決断だけが必要とされる。なお、高架式十字迷路試験の中央区画では 4 方向のどの方向に移動するか判断が必要とされる。中央区画滞在時間が増加することで、オープン区画滞在時間が減少し、結果として不安レベルの違いを検出する感度が低下する (Kulkarni et al., 2007)。実際、zero maze 試験を用いたときに、オープンアーム滞在時間は 5-HT_{2c} 受容体欠損マウスでは野生型同腹仔よりも長く、リスクアセスメント行動は遺伝子型間で差がなかった。

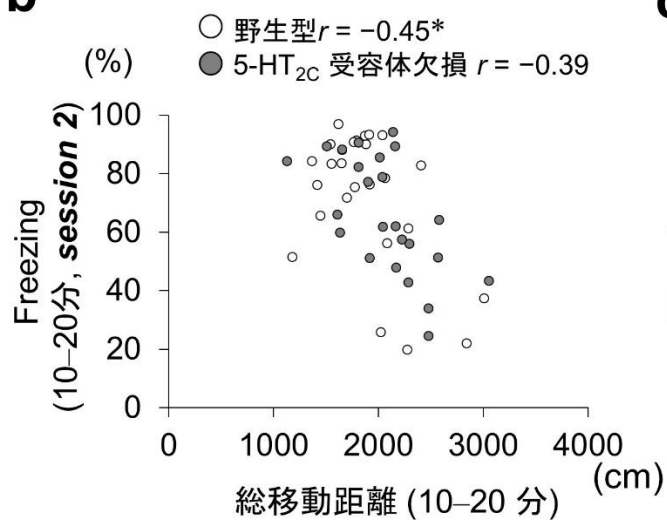
Zero maze 試験での自発運動は、野生型同腹仔よりも 5-HT_{2c} 受容体欠損マウスで高かったが、より高い自発運動活性が、不安レベルの尺度であるオープン区画滞在時間に影響を与える可能性は低いと思われる。その理由は 2 つある。まず、オープン区画滞在時間のパラメータは、パーセンテージとして計算されているため、運動量変化の直接の影響を受けない（つまり、オープン区画滞在時間 / [オープン区画滞在時間 + クローズド区画滞在時間] × 100）。二つ目に、オープン区画とクローズド区画との間の移動速度差は遺伝子型間で異なり、移動距離の違いは全体的な活動の違いだけでなく行動パターンの違いも意味することを示す。つまり、野生型マウスは、できるだけ早くクローズド区画に逃げたいためにオープン区画で加速しているが、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスは、特にオープン区画から逃げたいと思っていないためにオープン区画またはクローズド区画のどちらに存在しているかに関係なく一定の速度で移動しているものと考えられる。したがって、5-HT_{2c} 受容体機能の抑制は、少なくとも特定の条件下では、抗不安作用を発揮するだろうと結論付けられる。

文脈的恐怖条件付け試験では、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスは、恐怖条件付けの獲得が遅く、within-session 内での急速な恐怖記憶の消去を示した。しかし、文脈恐怖条件付け試験での Freezing 発現率は、新奇環境における自発運動活性と負の相関がある（図 1-12）。そのため、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスの文脈的恐怖記憶に関するこれらの特徴は、運動活性を含有している可能性がある。実際、文脈的恐怖条件付け試験における Freezing の減少曲線は、運動活動の減少曲線と鏡像のようである（図 1-8-c, 1-11-b）。以上を踏まえて、文脈的恐怖における 5-HT_{2c} 受容体の役割に関する結論は保留とする。

a



b



c

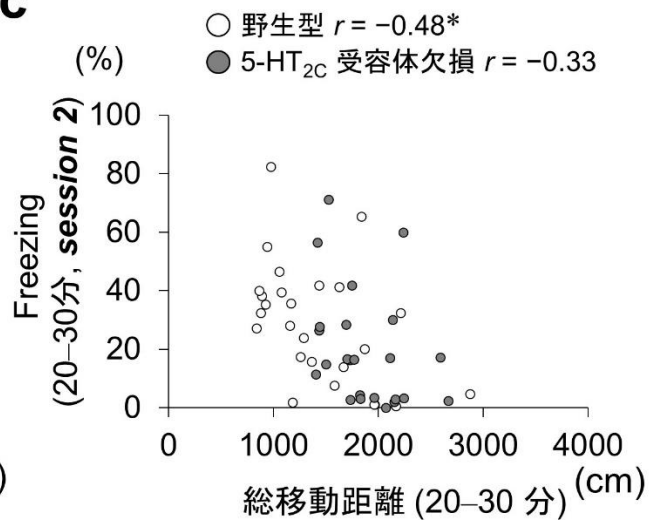


図 1-12 自発運動活性と文脈的恐怖条件付け試験の相関関係

新規環境における自発運動活性と文脈的恐怖条件付け試験の Session 2 の
(a) 0- 10 分、(b) 10- 20 分、(c) 20- 30 分における相関関係

今回の研究の欠点の1つとしては、4つの行動試験系のみを使用したことが挙げられる。5-HT_{2c}受容体が不安を調節すると結論付けるためには、より多くの試験による評価が必要になるかもしれない。しかし、5-HT_{2c}受容体欠損マウスの死亡率が高いため(Tecott et al., 1995; Xu et al., 2008)、行動試験の数を制限し、自発運動活性、不安、恐怖条件付け試験の全ての試験を行うマウスを増やすことを今回は選択した。結果として、比較的信頼できるサンプルサイズで相関分析を行うことができたため、少なくとも今回の目的に対しては合理的であったと考えている。

総じて、今回の結果は先行研究における一貫性のない結果に対する合理的な説明を可能とした。また、薬理学的手法を用いた先行研究と遺伝学的研究を用いた先行研究の間にあるいくつかのギャップを埋めることができた。今回の結果の解釈としては、5-HT_{2c}受容体機能を抑制することによる抗不安効果は、高架式十字迷路試験では抗不安効果が観察されなかったため、弱いまたは中程度であるという解釈が考えられる。しかし、また別の解釈として、5-HT_{2c}受容体の機能を抑制することで、リスクをとる危険な行動を誘発せずに、不安を抑制する効果を発揮できる、とも言えるだろう。さらに、5-HT_{2c}受容体機能の抑制は、within-session extinctionを抑制したが、between-session extinctionを促進しなかったため、持続的に記憶依存性の恐怖を減少させることはないと思われる。最近の研究では、メマンチン(Ishikawa et al., 2016)やリルゾール(Sugiyama et al., 2015)などの一部の薬がbetween-session extinctionを促進できることが示唆されているため、これらの薬の方が心的外傷後ストレス障害の治療には適しているかもしれない。したがって、5-HT_{2c}受容体は依然として、標的疾患によっては、抗不安薬を開発するための有望な標的となりえると思われる。

第2章 正中縫線核 5-HT 神経活動誘発性不安様行動における 5-HT_{2c} 受容体阻害薬の効果

第2章では、光遺伝学的手法を用いて、マウスの 5-HT 神経活動を亢進させ、不安様行動に影響を与える神経回路の同定及び、その神経回路における 5-HT_{2c} 受容体の役割を検証することを目的とした。本研究では、チャネルロドプシン 2 (Channelrhodopsin-2: ChR2) の C128S 変異体 (ChR2 (C128S)) という光感受性チャネルを用いた。このチャネルは、約 470 nm の青色光に反応して開き、陽イオン（主にナトリウムイオン）が細胞内に流入することで膜電位を脱分極させる。そして、この変異体の特徴として、光照射を止めた後も約 100 秒間陽イオンの流入が継続される。また、黄色光 (590 nm 前後) 照射によって青色光照射によるイオン流入が停止し、細胞の活動が平常状態に戻る。本研究では、ChR2 (C128S) を脳内 5-HT 神経細胞に選択的に発現させた遺伝子導入マウスを用いた。

第一章では、5-HT_{2c} 受容体欠損マウスが、弱いまたは中程度の抗不安効果を持つことが示された。そこで、第二章では、どこの脳部位に存在する 5-HT_{2c} 受容体が抗不安効果に重要であることを明らかにすることを試みた。先行研究において、正中縫線核の 5-HT 神経活動を光遺伝学的に活性化することで不安様行動が増加することが既に示されている (Ohmura et al., 2014)。正中縫線核から密な神経投射を受ける部位の 1 つとして腹側海馬が挙げられ (Azmitia and Segal, 1978)、この脳部位は不安制御に重要な役割を果たすことが知られている (Adhikari et al., 2011)。以上を踏まえて、正中縫線核から腹側海馬に投射する 5-HT 神経の活性化が腹側海馬の 5-HT_{2c} 受容体を刺激することで不安が惹起されるという仮説を立て、その検証を試みた。まず初めに脳内微小透析法を用いて腹側海馬の 5-HT 神経終末に対する青色光照射によって細胞外 5-HT 遊離量が増加することを確認した。その上で腹側海馬への青色光照射が不安様行動を増加させるかどうかを調べ、さらに正中縫線核 5-HT 神経活動増加による不安様行動増加効果が腹側海馬への 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬投与によって消失するかどうかを調べた。なお、先行研究に倣い (Ohmura et al., 2014)、不安様行動の評価には高架式十字迷路試験を用いた。

2.1. 方法

2.1.1. 使用動物・飼育環境

実験には、慶應義塾大学の田中謙二、名古屋大学の山中章弘によって作成された Tph2-tTA:tetO-ChR2 (C128S)-EYFP マウスを用いた。これらのマウスは、少なくとも 10 回以上 C57BL/6N と交配させてから使用した。実験は、生後 70

日齢以降の雌雄成熟マウスで行い、雌雄をほぼ同数各条件に割り当てた。その他のマウスの飼育条件、実験条件、倫理基準は第 1 章 1.1.1 と同じである。

遺伝子導入マウスは、tet システムを応用させた KENGE-tet システムを用いて作成された (Tanaka et al., 2012)。5-HT ニューロン特異的な ChR2 (C128S) の発現、および機能獲得の仕組みについて次に記載する。Tet システムは tetO と tTA の二遺伝子導入を用いている。tetO に tTA が結合することで、tetO 下流のプロモーターが活性化し、目的遺伝子が発現可能となる仕組みである。ユビキタスに発現している β -actin 遺伝子下流に tetO-ChR2 (C128S)-EYFP 配列を組み込んだ遺伝子導入マウス (tetO-ChR2 (C128S)-EYFP knock-in mice (RRID:IMSR_RBRC05454)) と、Tph2 遺伝子下流に tTA 配列を組み込んだ遺伝子導入マウス (Tph2-tTA BAC transgenic mice (RRID:IMSR_RBRC05846)) を交配させることで二遺伝子導入マウスを作製した。この交配により、二遺伝子を持っている 5-HT 神経細胞でのみ、ChR2 (C128S) の発現が可能となる。

先行研究において、Tph2-tTA:tetO-ChR2 (C128S)-EYFP 二遺伝子組換えマウスについては、背側縫線核と正中縫線核のほとんどすべての 5-HT 神経細胞において選択的に ChR2 を発現していること、各縫線核への青色光照射により 5-HT 神経の発火率は増加し、黄色光照射により基礎値へと戻ることも確認されている (Ohmura et al., 2014)。

2.1.2. 外科的措置

片側腹側海馬への脳内微小透析用ガイド埋め込み術に関しては以下のように行った。イソフルラン吸入麻酔下 (4% 導入、1% 維持) で、マウスを脳定位固定装置 (Narishige Scientific Instrument Lab., Japan) に固定し、頭皮を切開し、The mouse brain の脳地図 (Franklin and Paxinos, 2008) に準拠し、bregma から後方に 3.3 mm、正中線より側方に 3.1 mm の位置に歯科用ドリルで頭蓋骨に小孔を開けた。マイクロダイアリス用ガイドカニューレ (CXG-4, Eicom, Japan) の先端を脳表面から深さ 2.0 mm の位置に留まるように歯科用即時重合レジン (UNIIFAST II, GC Corporation, Japan) とアンカービスを用いて固定し、ダミーカニューレをガイドカニューレ内に挿入した。なお、ガイドカニューレに光ファイバーを接着剤で貼り付けた状態で埋め込んでいる (図 2-1)。

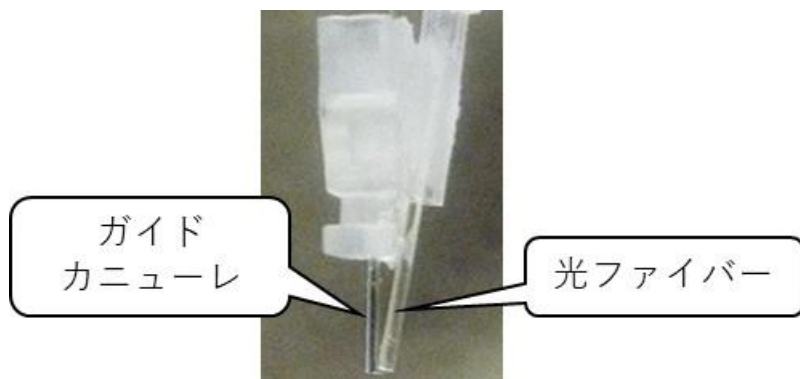


図 2-1：ガイドカニューレと光ファイバーの接着方法

ガイドカニューレの一部を削り、その溝に光ファイバーを沿わせた上で、アロンアルファで接着している。

両側腹側海馬への光ファイバー脳内埋め込み術は上述の脳内微小透析用ガイド埋め込み術と同様に行い、ガイドの代わりに光ファイバー (FLT; Doric Lenses) を左右の腹側海馬それぞれに埋めた。

正中縫線核への光ファイバー脳内埋め込み術も座標以外は上記と同様に行われた。先端に鏡のついた特殊光ファイバー (MA45, Doric, Canada) を bregma から後方に 4.5 mm、正中線より側方に 1.0 mm、脳表面から深さ 3.7 mm の位置に埋めた。この光ファイバーでは光を側方から出すことが出来る。さらに、この手術と同時に腹側海馬に薬物局所注入用のガイドカニューレを埋め込む手術を実施した。座標は深さ以外は脳内微小透析用ガイド埋め込み術と同様である。脳表より 1.2mm の深さに 24G のステンレス管を埋めて固定し、ダミーカニューレをガイド内に留置した。

手術終了後、抗生物質 (Dolmycin, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) とステロイド (Kenalog, Bristol-Myers Squibb, NewYork, NY, USA) の軟膏を創傷部位に塗布した。手術後マウスは個飼いにされ、ホームケージ内では carprofen を含むゼリー (MediGel, Clear H2O, Portland, ME, USA) を一かけら与えられた。行動実験を行うまでは少なくとも 7 日は回復を待った。

2.1.3. 脳内微小透析法

イソフルラン吸入麻酔 (4%) によって数分導入した後、覚醒前に速やかにダミーカニューレを外し、マイクロダイアリシス用透析プローブ (outer diameter, 0.22 mm; A-I-4-02, Eicom, Kyoto, Japan) を挿入した。透析プローブは組織内に 2.0 mm 露出される。プローブはチューブでマイクロシリンジポンプと接続し、人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid, aCSF;

2.7mM KCl, 140mM NaCl, 1.2mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂, 0.3mM NaH₂PO₄, and 1.7mM Na₂HPO₄, pH 7.2) を 2.0 μ L/min の流速で灌流した。腹側海馬の 5-HT レベルを測定するためには、aCSF にシタロプラム (1 μ M) を入れて灌流した。

プローブ挿入後、マウスは床敷、エサ、水を十分に置いたプラスチック製の観察ケージ (30 cm $\times$ 30 cm $\times$ 35 cm) 内に置かれた。マウスが覚醒した後 3 時間以上経過し、さらに測定値のベースラインが安定した後、実験を開始した。

5-HT は、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography with elector-chemical detector: HPLC-ECD) を用いて測定した。HPLC の装置は、Eicom 社の Eicompak PP-ODS 4.6 mm i.d. $\times$ 30 mm、電気化学検出器は、ECD-300 を用いた。移動相の組成は 2.1 mM sodium 1-decansulfonate, 0.1 mM EDTA-2Na/0.1 M phosphate buffer (pH 6.0), and 1% (v/v) methanol であり、1 μ L/min の速度で流した。5-HT 濃度の推移は、ベースラインに対する百分率の値 (実験開始前 3 サンプルの平均値を 100% とする) として表した。

2.1.4. 薬物投与方法

5-HT_{2c} 受容体拮抗薬 SB242084 (Tocris Bioscience, UK) は、5% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む 0.9% NaCl において溶解された。行動実験開始の 10 分前に、SB242084 (500 ng) 又は生理食塩水を片側の腹側海馬に投与した。ポリエチレンチューブへ接続された 30 ゲージのステンレスインジェクターを Hamilton microsyringe につなぎ、溶液 (0.5 μ L) は、マイクロインジェクションポンプ (CMA100, Carnegie Medicine, Stockholm, Sweden) を用いて一定の速度 (0.25 μ L/min) で 2 分かけて投与された。投与終了後 1 分間はそのまま静置した。

2.1.5. *In vivo* 光照射

光源には、LED 光源 (Lumencor, Beaverton, OR, USA) およびレーザー光源 (COME2-LB473/589/100; Lucir, Tsukuba, Japan) を用いた。腹側海馬の照射にはレーザー光源を使用し、青色光 (475 nm) 又は黄色光 (589 nm) を照射した。光ファイバー先端での光強度は約 10 mW/mm² に合わせた。正中縫線核への光照射には LED 光源を使用し、青色光 (475nm) または黄色光 (575nm) を照射した。光ファイバー先端での光強度は約 1 mW/mm² であった。ロータリージョイント (Doric Lenses, Quebec, Canada) は、*in vivo* illumination を無拘束で行うために用いられた。光照射のタイミングなどは、電気刺激装置 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) によって TTL を介して制御された。

2.1.6. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験に用いた装置は、第1章1.2.2と同様である。マウスの不安水準のベースラインを低くするため、試験中の部屋の明るさは5 lux以下とした。総移動距離と各アーム又は中央区画へと侵入した回数である総crossing回数をを用いて自発運動活性を定量化した。自発運動活性が減少した場合、オープンアームとクローズドアームにおける平均速度(オープンアーム又はクローズドアームにおける移動距離/オープンアーム又はクローズドアーム滞在時間)を算出した。自発運動活性の減少が不安レベルの増加によるものであれば、平均速度の減少がクローズドアームではなく、オープンアームで観察されると考えた。マウスはオープンアームを向いた状態で中央区画に置かれて、マウスがアームを1度クロスしたら測定開始とした。もし、1分以上経過してもcrossしない場合には、解析のデータからそのマウスは除外とした。腹側海馬への光照射は10秒に1回500m秒の光を1分毎に黄色と青色を交互に照射した。正中縫線核への光照射は1分に1回500m秒の光を黄色と青色交互に照射した。それぞれのマウスの行動は、実験中の4分間CCDカメラで撮影され、ソフトウェア(LimeLight, Actimetrics, Wilmette, IL, USA)を用いて自動解析された。

2.1.7. 統計解析

脳内微小透析法のデータについては時間(光照射直前、照射中、照射直後、の3点)を被験者内要因とした一要因の反復測定分散分析(repeated ANOVA)を行い、多重比較にはボンフェローニ法(Bonferroni's correction)を用いた。行動試験については主に黄色光照射時と青色光照射時の比較を行い、対応のある両側 t 検定(Two-tailed paired t tests)を用いた。投薬を行った場合には、光の種類と投薬量それぞれを被験者内要因とし、二要因の反復測定分散分析を用いた(two-factor repeated ANOVA)。二要因の分散分析において、交互作用が有意であった場合には、それぞれの水準について一要因の反復測定分散分析を実施した。

2.2. 結果

2.2.1. 腹側海馬 5-HT 神経終末の光遺伝学的活性化による細胞外 5-HT 濃度変化

自由行動下のマウスにおいて脳内微小透析法を用いて、細胞外 5-HT 濃度を測定した。腹側海馬に対して青色光照射をした後、有意に 5-HT 濃度は上昇した。一要因の反復測定分散分析を実施したところ、5-HT 濃度における時間の

主効果が見られた (5-HT, $F_{2,10} = 5.71$, $P = 0.022$, 図 2-2; basal levels, 462.92 ± 93.83 fg/ fraction, with citalopram ($1 \mu\text{M}$)). Bonferroni の補正を行った多重比較 (A multiple comparison with Bonferroni's correction) では、光照射中は、光照射前と比較して 5-HT 濃度が有意に高かった。

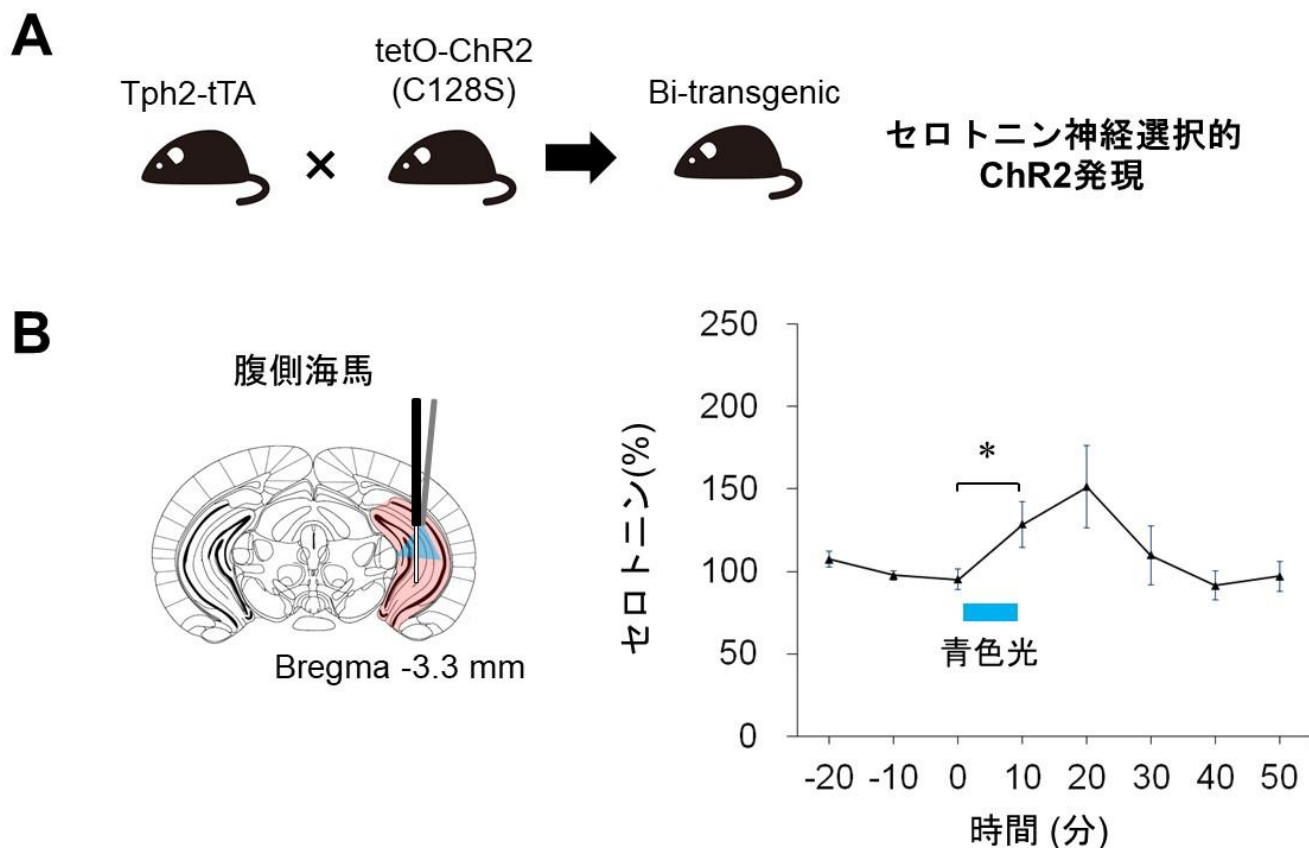


図2-2. 腹側海馬5-HT神経終末の光遺伝学的活性化による細胞外5-HT濃度変化. (A) β -actin遺伝子下流にtetO-ChR2(C128S)-EYFP 配列を組み込んだ遺伝子導入マウス (tetO-ChR2(C128S)-EYFP knock-in mice) と、中枢における5-HT合成酵素Tph2の遺伝子下流にtTA配列を組み込んだ遺伝子導入マウス (Tph2-tTA BAC transgenic mice) を交配させることで中枢5-HT神経選択的にChR2を発現する二遺伝子導入マウス (bi-transgenic mice) を作製した。(B) 左に示されるように、光ファイバー (灰色) と透析用ガイド (黒色) を腹側海馬 (赤色) に埋め込み、還流プローブ (白色) を刺入した。右の図は腹側海馬の細胞外5-HT濃度の時間変化を示している ($n=6$)。二遺伝子導入マウスは青色光を0.5秒間、1分に一回照射した。ドパミン濃度は検出限界以下であった。なお、腹側海馬の5-HT神経終末におけるChR2 発現は既に免疫組織学的に確認されている (Ohmura et al., 2014)。

2.2.2. 腹側海馬 5-HT 神経終末の光遺伝学的活性化による不安様行動の変化

腹側海馬 5-HT 神経終末の光遺伝学的活性化は高架式十字迷路試験におけるオープンアーム滞在時間を有意に減少させた ($t_8=3.43$, $p=0.009$, 図 2-3)。これは以前に正中縫線核の 5-HT 神経細胞を活性化した時の結果と一致する (Ohmura et al., 2014)。また、腹側海馬の 5-HT 神経終末刺激によって総移動距離は有意に減少したが ($t_8=3.62$, $p=0.007$)、総クロッシング回数は影響を受けなかった ($t_8=0.16$, $p=0.88$)。また、総移動距離の減少は単純な鎮静によるものではないと考えられる。なぜならオープンアームでの移動速度が減少する一方で ($t_8=2.66$, $p=0.029$)、クローズドアームでの移動速度は影響を受けなかったからである ($t_8=1.87$, $p=0.10$)。

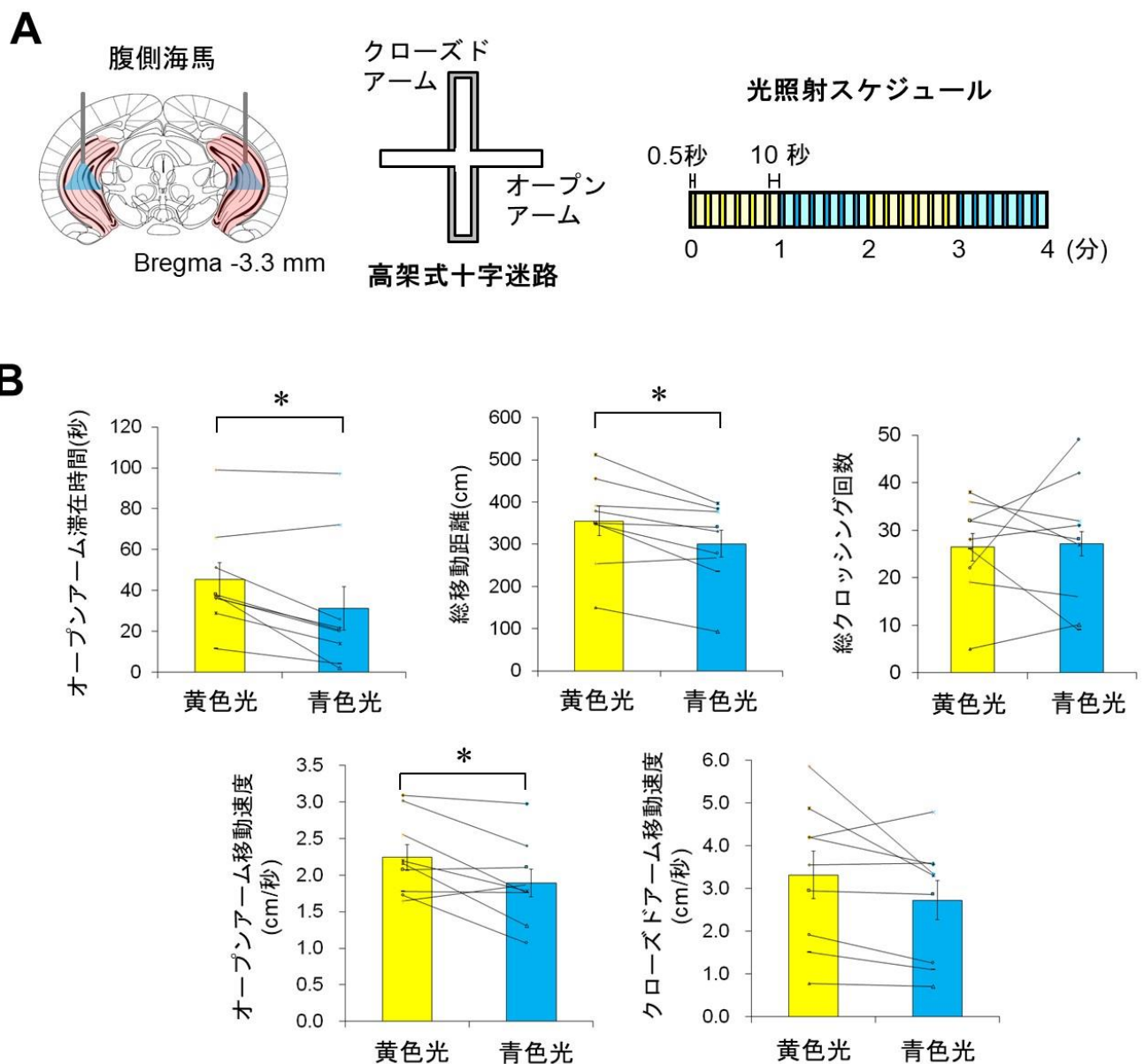


図2-3. 腹側海馬5-HT神経終末の光遺伝学的活性化による不安様行動の変化。

(A)左に示されるように、腹側海馬両側(赤色部分)を高架式十字迷路試験実施中に照射した。右に示されるように、4分間の試験中に、0.5秒の光を10秒に1回照射し、黄色か青色かは1分ごとに変更した。(B) 二遺伝子導入マウスの高架式十字迷路試験における主な行動指標を示した(n=9)。

2.2.3. 正中縫線核5-HT神経細胞の光遺伝学的活性化による不安様行動増加作用に対する腹側海馬への5-HT_{2c}受容体拮抗薬投与の効果

5-HT_{2c}受容体拮抗薬SB242084(500 ng)を腹側海馬に投与することで、正中縫線核5-HT神経細胞の光遺伝学的活性化による不安様行動増加作用は消失した(図2-4)。高架式十字迷路試験において、溶媒投与群ではオープンアーム滞在時間が青色光照射によって減少したが、SB242084投与群では減少しなかった(薬×光の種類の交互作用, $F_{1,5}=12.45$, $p=0.017$; 各群内での光の効果: 溶媒群, $F_{1,5}=19.88$, $p=0.007$; SB242084投与群, $F_{1,5}=2.97$, $p=0.145$)。総移動距離については交互作用がなく($F_{1,5}=3.41$, $p=0.12$)、光照射による主効果のみであった($F_{1,5}=12.47$, $p=0.017$)。総クロッシング回数についても交互作用がなく($F_{1,5}=2.46$, $p=0.18$)、光照射による主効果のみであった($F_{1,5}=12.00$, $p=0.018$)。

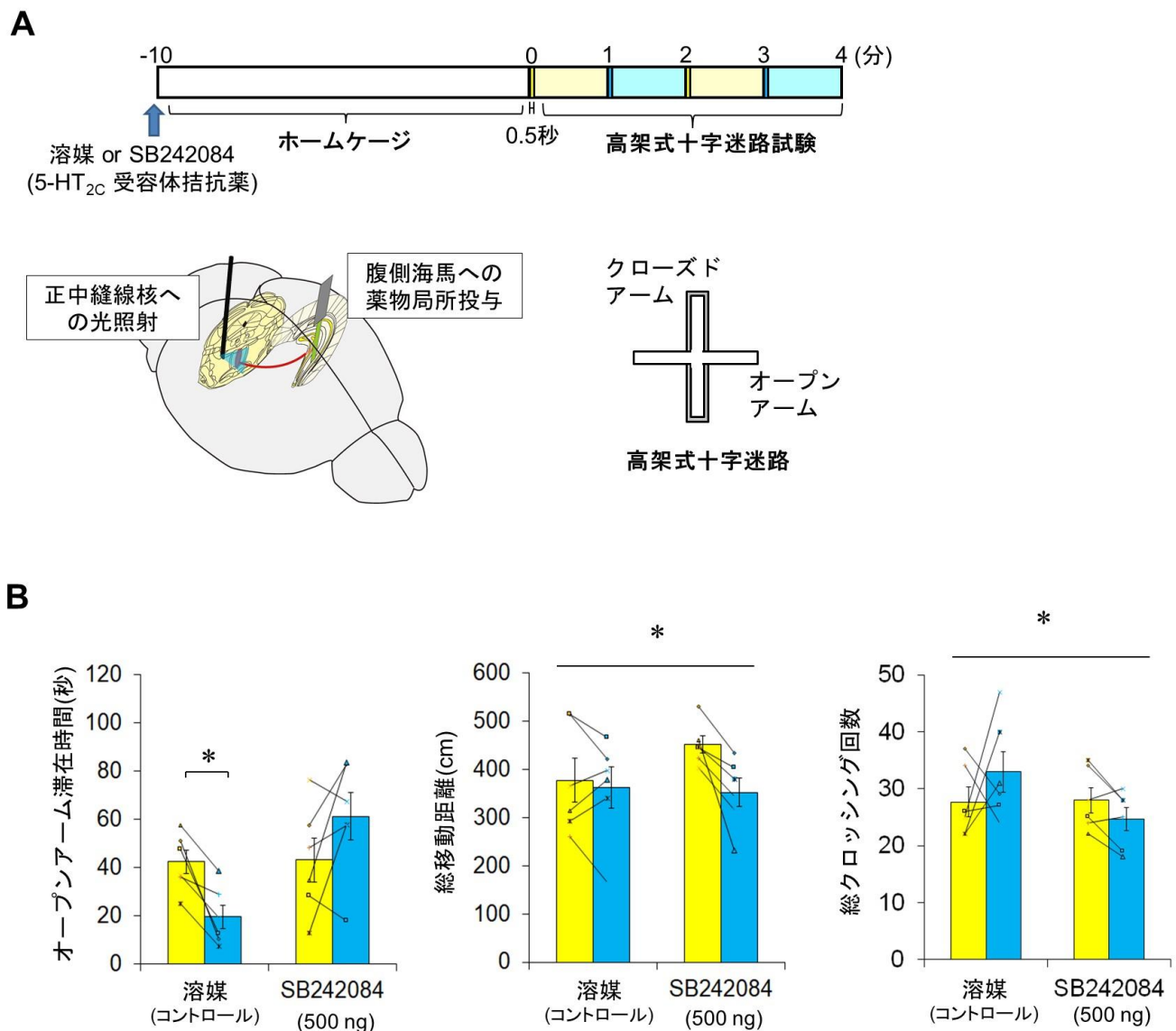


図2-4. 正中縫線核5-HT神経細胞の光遺伝学的活性化による不安様行動増加作用に対する腹側海馬への5-HT_{2C}受容体拮抗薬投与の効果. (A)高架式十字迷路試験開始の10分前に、腹側海馬に溶媒もしくは5-HT_{2C}受容体拮抗薬を投与した。高架式十字迷路試験実施中に正中縫線核に光照射した。4分間の試験中に、0.5秒の光を60秒に1回照射し、黄色か青色かは1分ごとに変更した。(B) 二遺伝子導入マウスの高架式十字迷路試験における主な行動指標を示した (n=6)。溶媒投与と5-HT_{2C}受容体拮抗薬の間は2週間以上空けて実施した。

2.3. 考察

腹側海馬の5-HT神経終末を光遺伝学的に活性化した結果、不安様行動が増加したことから、腹側海馬の5-HT遊離が不安惹起に重要な役割を果たしていると考えられる。腹側海馬は正中縫線核、背側縫線核の両方から5-HT神経投

射を受けているが (Azmitia and Segal, 1978; McQuade and Sharp, 1997)、背側縫線核の 5-HT 神経細胞を光遺伝学的に活性化しても不安様行動は増加しないことが報告されている (Ohmura et al., 2014)。また、今回の研究で正中縫線核の活性化による不安惹起作用が腹側海馬への 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬投与で消失したことも含めて考えると、正中縫線核から腹側海馬に投射する 5-HT 神経の活性化が腹側海馬の 5-HT_{2c} 受容体を刺激することで不安が惹起されるものと推測できる。一方で、正中縫線核から背側海馬への 5-HT 神経投射が不安の制御に重要だと主張する研究もあり (Andrade et al., 2013)、今回の結果は他の経路の存在を否定するものではない。

腹側海馬の 5-HT 神経終末を光遺伝学的に活性化した結果、脱分極が逆行して正中縫線核の 5-HT 神経細胞体を活性化してしまったのではないか、という懸念もある。しかし、他の正中縫線核からの主要な投射部位（腹側被蓋野など）を同様の方法で刺激した場合には不安惹起作用が見られないことを踏まえると (Ohmura et al., 2019)、その影響は大きなものではないと推測される。さらに、今回示したように正中縫線核の活性化による不安惹起作用が腹側海馬への 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬投与で消失したことから、仮に多少そのような現象が生じていたとしても、腹側海馬の 5-HT 遊離が不安惹起に重要であるという結論自体は変わらないであろう。

今回の研究結果を解釈する上での注意点としては、今回の研究はあくまでも正常な動物を使用したものであって、不安障害のモデル動物を使用したわけではないという点が挙げられる。適切な不安障害モデル動物というものが存在するかどうかは議論が分かれるところではあるが (e.g. Steimer 2011)、そういったモデルにおいて今回見出した神経回路がどのように変化しているのかを調べる価値はあるだろう。

結論

①本研究全体から得られた新知見は以下の通りである。

- 5-HT_{2c}受容体欠損マウスは新しい環境への馴化が遅い
- 5-HT_{2c}受容体機能の抑制は、少なくとも特定の条件下では、抗不安作用を発揮する
- 文脈的恐怖条件付け試験では、5-HT_{2c}受容体欠損マウスは、恐怖条件付けの獲得が遅く、within-session内での急速な恐怖記憶の消去を示す。
- 文脈恐怖条件付け試験での Freezing 発現率は、新奇環境における自発運動活性と負の相関がある
- 腹側海馬の 5-HT 遊離が不安惹起に重要な役割を果たしている
- 正中縫線核の活性化による不安惹起作用は、腹側海馬の 5-HT_{2c} 受容体刺激を介している

②新知見の意義

本研究の知見は、先行研究における 5-HT_{2c}受容体欠損マウスの一貫性のない結果に対する合理的な説明を可能とした。つまり、自発運動活性の「経時変化」という観点を取り入れることで、これまでの全時間帯の平均をとる分析方法では結果が一貫しないであろうことを示した。抗不安作用については、広く用いられている高架式十字迷路試験の「中央区画」という観点を取り入れることで、5-HT_{2c}受容体欠損マウスのおそらく不安とはまた別の特徴（意思決定におけるためらい）が不安評価を難しくしていたことを示し、その要素を排除すれば 5-HT_{2c}受容体欠損マウスの低不安様行動を検出できることを示した。そしてこれらの結果として、薬理学的手法を用いた先行研究と遺伝学的研究を用いた先行研究の間にあるいくつかのギャップを埋めることができ、薬理学的研究の結果も遺伝学的研究の結果もほぼ一貫した効果を有する、と結論付けられる。5-HT_{2c}受容体の機能抑制は自発運動活性を高め、不安を緩和する、と言えるだろう。

さらに本研究の知見は、不安を制御する 5-HT 神経回路の一端を明らかにした。この知見が、SSRI の投薬が不安緩和効果をもたらすのに時間がかかり、投与開始初期には逆に不安を悪化させる理由を説明できるかもしれない(樋口ら 2005; Harada et al., 2008)。つまり、SSRI の投与開始初期には 5-HT_{2c}受容体も刺激してしまうために、別の 5-HT 受容体刺激による不安緩和効果が相殺されてしまうかもしれない。そして長期間投与することで 5-HT_{2c}受容体は脱感作し(Yamauchi et al., 2004)、不安緩和効果が明確に表れてくるのかもしれない。

③本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

本研究の知見を臨床応用に活かしていくためには、5-HT_{2C}受容体拮抗薬単体、もしくはSSRIとの共投与による抗不安作用効果の検証をサルやヒトで行うことが必要である。単剤投与の観点からは、5-HT_{2C}受容体逆作動薬の効果(Wood et al., 2001)を追試していくのが望ましいかもしれない。

④今後の課題

文脈的恐怖条件付け試験では、5-HT_{2C}受容体欠損マウスは、恐怖条件付けの獲得が遅く、within-session内での急速な恐怖記憶の消去を示した。しかし、文脈恐怖条件付け試験でのFreezing発現率は、新奇環境における自発運動活性と負の相関がある。そのため、5-HT_{2C}受容体欠損マウスの文脈的恐怖記憶に関するこれらの特徴は、運動活性を含有している可能性がある。以上から、5-HT_{2C}受容体が恐怖記憶の消去学習に関与しているかを明らかにするためには、自発運動活性の影響を受けない指標により恐怖記憶の消去を調べる必要がある。

PTSDにおいては、恐怖記憶の体験から時間が経過しても、人々を長く苦しめることが問題の一つである。本研究では、連続した3日間で文脈的恐怖条件付け試験を行い、within-session extinctionが速いことを示した。恐怖体験から長期に時間が経過した場合の消去学習に5-HT_{2C}受容体が関与するかは不明なままである。そのため長期恐怖記憶に対する5-HT_{2C}受容体の役割を明らかにする必要がある。

本研究で用いた5-HT_{2C}受容体欠損マウスは、全身5-HT_{2C}受容体欠損マウスであるため、代償効果が生じている可能性がある。今後、脳部位選択的・時間選択的な手法を用いる必要がある。

最終的には、本研究で得られた知見をもとに、不安障害もしくはPTSDのモデル動物を用いて研究することが求められる。

謝 辞

本研究の機会を与えてくださり、ご指導、ご鞭撻を賜りました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 吉岡充弘 教授に心より感謝を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導を頂きました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 大村優 講師に深謝いたします。

終始有益なご指導、ご助言を頂きました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 吉田隆行 助教、西谷直也 助教、Youcef Bouchekioua 助教、北海道医療大学薬学部薬理学講座臨床薬理毒理学 泉剛教授に厚くお礼申し上げます。学生生活を共に過ごし、様々なご助言や技術指導等をいただきました、隈元晴子さん、王冊さん、相川勝洋さん、小冷碧さん、笹森瞳さん、工藤愛さん、三浦和仁さん、杉浦千瑛さん、ならびに多くのご支援を頂きました武山美香さん、菊池康子さん、古川友子さん、谷守亜紀さんに心からの感謝の意を表します。

最後に学生生活を通じて励まし続けてくれた家族と友人に心から感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Adhikari, A., Topiwala, M.A., and Gordon, J.A. (2011). Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron* 71, 898-910.
- Alsiö, J., Nilsson, S.R., Gastambide, F., Wang, R.A., Dam, S.A., Mar, A.C., Tricklebank, M., and Robbins, T.W. (2015). The role of 5-HT_{2C} receptors in touchscreen visual reversal learning in the rat: a cross-site study. *Psychopharmacology (Berl)* 232, 4017-4031.
- Andrade, T.G., Zangrossi, H., and Graeff, F.G. (2013). The median raphe nucleus in anxiety revisited. *J Psychopharmacol* 27, 1107-1115.
- Azmitia, E.C., and Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179, 641-667.
- Bagdy, G., Graf, M., Anheuer, Z.E., Modos, E.A., and Kantor, S. (2001). Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol* 4, 399-408.
- Bonhaus, D.W., Weinhardt, K.K., Taylor, M., DeSouza, A., McNeeley, P.M., Szczepanski, K., Fontana, D.J., Trinh, J., Rocha, C.L., Dawson, M.W., et al. (1997). RS-102221: a novel high affinity and selective, 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36, 621-629.
- Botta, P., Demmou, L., Kasugai, Y., Markovic, M., Xu, C., Fadok, J.P., Lu, T., Poe, M.M., Xu, L., Cook, J.M., et al. (2015). Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 18, 1493-1500.
- Browne, C.J., Ji, X., Higgins, G.A., Fletcher, P.J., and Harvey-Lewis, C. (2017). Pharmacological Modulation of 5-HT_{2C} Receptor Activity Produces Bidirectional Changes in Locomotor Activity, Responding for a Conditioned Reinforcer, and Mesolimbic DA Release in C57BL/6 Mice. *Neuropsychopharmacology* 42, 2178-2187.

- Campbell, B.M., and Merchant, K.M. (2003). Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. *Brain Res* 993, 1-9.
- Clemett, D.A., Punhani, T., Duxon, M.S., Blackburn, T.P., and Fone, K.C. (2000). Immunohistochemical localisation of the 5-HT_{2C} receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology* 39, 123-132.
- Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Elsevier/Academic Press, Amsterdam; New York).
- Garcia-Garcia, A.L., Newman-Tancredi, A., and Leonardo, E.D. (2014). 5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 623-636.
- Harada, T., Sakamoto, K., and Ishigooka, J. (2008). Incidence and predictors of activation syndrome induced by antidepressants. *Depress Anxiety* 25, 1014-1019.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., and Martin, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 533-554.
- Ishikawa, R., Fukushima, H., Frankland, P.W., and Kida, S. (2016). Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval. *Elife* 5.
- Kennett, G.A., Whitton, P., Shah, K., and Curzon, G. (1989). Anxiogenic-like effects of mCPP and TFMPP in animal models are opposed by 5-HT_{1C} receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 164, 445-454.
- Kennett, G.A., Wood, M.D., Bright, F., Trail, B., Riley, G., Holland, V., Avenell, K.Y., Stean, T., Upton, N., Bromidge, S., et al. (1997). SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36, 609-620.

Kulkarni, S.K., Singh, K., and Bishnoi, M. (2007). Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29, 343-348.

Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92, 180-185.

Masuda, T., Nishikawa, H., Inoue, T., Toda, H., Nakagawa, S., Boku, S., and Koyama, T. (2013). 5-HT depletion, but not 5-HT1A antagonist, prevents the anxiolytic-like effect of citalopram in rat contextual conditioned fear stress model. *Acta Neuropsychiatr* 25, 77-84.

Mosher, T., Hayes, D., and Greenshaw, A. (2005). Differential effects of 5-HT_{2C} receptor ligands on place conditioning and locomotor activity in rats. *Eur J Pharmacol* 515, 107-116.

Ohmura, Y., Tanaka, K.F., Tsunematsu, T., Yamanaka, A., and Yoshioka, M. (2014). Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behaviour in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 17, 1777-1783.

Ohmura, Y., Tsutsui-Kimura, I., Sasamori, H., Nebuka, M., Nishitani, N., Tanaka, K.F., Yamanaka, A., and Yoshioka, M. (2019). Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*, 107703.

Ohyama, M., Kondo, M., Yamauchi, M., Imanishi, T., and Koyama, T. (2016a). Asenapine reduces anxiety-related behaviours in rat conditioned fear stress model. *Acta Neuropsychiatr* 28, 327-336.

Onose, T., Nochioka, K., Sakata, Y., Miura, M., Tadaki, S., Ushigome, R., Yamauchi, T., Sato, K., Tsuji, K., Abe, R., et al. (2015). Predictors and prognostic impact of post-traumatic stress disorder after the great East Japan earthquake in patients with cardiovascular disease. *Circ J* 79, 664-667.

Pollack, M.H., Zaninelli, R., Goddard, A., McCafferty, J.P., Bellew, K.M., Burnham, D.B., and Iyengar, M.K. (2001). Paroxetine in the

treatment of generalized anxiety disorder: results of a placebo-controlled, flexible-dosage trial. *J Clin Psychiatry* 62, 350-357.

Steimer, T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci* 13, 495-506.

Sugiyama, A., Saitoh, A., Inagaki, M., Oka, J., and Yamada, M. (2015). Systemic administration of riluzole enhances recognition memory and facilitates extinction of fear memory in rats. *Neuropharmacology* 97, 322-328.

Tanaka, K.F., Matsui, K., Sasaki, T., Sano, H., Sugio, S., Fan, K., Hen, R., Nakai, J., Yanagawa, Y., Hasuwa, H., et al. (2012). Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep* 2, 397-406.

Tecott, L.H., Sun, L.M., Akana, S.F., Strack, A.M., Lowenstein, D.H., Dallman, M.F., and Julius, D. (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature* 374, 542-546.

Turcotte-Cardin, V., Vahid-Ansari, F., Luckhart, C., Daigle, M., Geddes, S.D., Tanaka, K.F., Hen, R., James, J., Merali, Z., Beique, J.C., et al. (2019). Loss of Adult 5-HT_{1A} Autoreceptors Results in a Paradoxical Anxiogenic Response to Antidepressant Treatment. *J Neurosci* 39, 1334-1346.

Werry, T.D., Loiacono, R., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2008). RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. *Pharmacol Ther* 119, 7-23.

Wood, M.D., Reavill, C., Trail, B., Wilson, A., Stean, T., Kennett, G.A., Lightowler, S., Blackburn, T.P., Thomas, D., Gager, T.L., et al. (2001). SB-243213; a selective 5-HT_{2C} receptor inverse agonist with improved anxiolytic profile: lack of tolerance and withdrawal anxiety. *Neuropharmacology* 41, 186-199.

Xu, Y., Jones, J.E., Kohno, D., Williams, K.W., Lee, C.E., Choi, M.J., Anderson, J.G., Heisler, L.K., Zigman, J.M., Lowell, B.B., et al. (2008).

5-HT₂CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron* 60, 582-589.

Yamauchi, M., Tatebayashi, T., Nagase, K., Kojima, M., and Imanishi, T. (2004). Chronic treatment with fluvoxamine desensitizes 5-HT₂C receptor-mediated hypolocomotion in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78, 683-689.

川上, 憲. (2014). 厚生労働省厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業精神疾患の有病率等に関する大規模疫学調査研究:世界精神保健日本調査セカンド研究報告書 (東京大学大学院医学系研究科).

村崎光邦, (1997). セロトニン作動性抗不安薬の作用機序 (日病薬誌), pp. 299-306.

樋口輝彦, 田島博, 張賢徳ら (2005). うつ病治療の問題点を探る 抗うつ薬の投与初期および終了期の適切なマネジメントー離陸と着陸の重要性ー (JAMA(日本語版)), 110-123.