

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18336

研究課題名(和文) 青斑核ノルアドレナリン神経機能の全解明

研究課題名(英文) Analysis of the locus coeruleus noradrenaline neurological function

研究代表者

山下 哲 (YAMASHITA, Akira)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：40740197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、様々な生理機能発現時におけるノルアドレナリン神経活動変化、その活動操作による行動発現変化を、自由行動する動物個体を用いて解析した。においては、ファイバーフォトメトリーシステムの独自システムによる開発を達成した。このシステムにより、末梢への侵害刺激に青斑核ノルアドレナリン神経が応答することを明らかとした。においては、光操作により青斑核ノルアドレナリン神経活動を特異的に制御しながら、心拍数、体温変化をリアルタイム測定する実験系を立ち上げた。これにより、青斑核ノルアドレナリン神経活動が、心拍制御に一部関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated two topics : 1)whether activity of noradrenergic neurons would change in association with animal behavior, and 2)whether manipulation of noradrenergic neuron activity induce animal behavior.

1)By using the fiber photometry system, I succeeded in recording the activity of noradrenergic neurons from the free-moving-mouse in real time. The neural activity immediately increased after acute nociceptive stimuli.

2)By using optogenetics systems and telemeter systems, I succeeded in recording body temperature and heart rate during manipulating the activity of noradrenergic neurons. My data suggested correlation between activity of noradrenergic neurons and heart rate.

研究分野：神経科学

キーワード：青斑核 ノルアドレナリン神経 ファイバーフォトメトリー 光遺伝学 自律応答

1. 研究開始当初の背景

青斑核は中枢神経系の中で最も多数のノルアドレナリン神経 (NA 神経) が集合している神経核である。青斑核 NA 神経は、大脳皮質、視床、視床下部、小脳、脊髄など、主要なほとんどの脳領域に軸索を投射し、これらの部位の活動に影響を与えている。これまでの研究により NA 神経が睡眠覚醒の制御、特に覚醒の維持において重要な役割を担っていることが分かってきた。また、下行性疼痛抑制系として中枢における疼痛の制御にも重要であることが示されている。さらに、NA 再取り込み阻害薬は、抗うつ薬として用いられていることから、うつや気分障害などにも関与していると考えられている。

しかしながら、睡眠覚醒や疼痛制御、情動行動などは、全ての神経ネットワークが保存された丸ごとの個体でのみ生じる生理現象であるため、その役割、活動パターンを詳細に調べるには「無麻酔下かつ無拘束下での動物個体」を用いた研究が必須である。近年の光遺伝学などの特定神経活動の操作技術の開発や、高感度プローブ開発によるイメージング技術の目覚ましい発展によって、高い時間分解能で特定神経の活動の記録または活動制御が可能となってきた。申請者はこれまでに、光遺伝学を用いて他の神経活動を調節することで、個体マウスにおいて睡眠覚醒を制御することに成功している (Ito et al., Mol. Brain, 2014, Yamashita et al., Synapse, 2014)。

そこで、強力かつ可逆的な遺伝子発現制御を可能にする tTA (テトラサイクリントランスアクトベータ) /TetO システムを用いて、自由行動下において青斑核 NA 神経の神経活動を記録する系および、同神経活動を光によって人為的に操作する系の確立を試みた。

2. 研究の目的

ノルアドレナリン神経は青斑核を起始核として脳全体に投射し、睡眠覚醒、情動、痛みの知覚、自律応答など、多くの生理機能に関与するとされている。しかし、それらの生理機能はいずれも動物個体でのみ生じるために、従来の *in vitro* の実験系だけでは、NA 神経のその機能的役割の解明には不十分であった。そこで申請者は、これらの生理機能発現時における NA 神経の活動パターンと機能的役割について、自由行動する動物個体を用いて詳細に解析することを試みた。そのために、カルシウムイメージング法を応用し NA 神経の活動を自由行動下で記録可能な動物の作出、および装置の開発を行った。また、光遺伝学を用いて NA 神経を同時に操作する実験系も立ち上げた。本研究は、これら独自の実験系を用いて、青斑核 NA 神経の生理機能について、神経活動の操作と記録の両方向からのアプローチによって詳細に解明することを目的としている。

3. 研究の方法

NA 神経特異的に遺伝子発現させるために、新規に作成したドパミン-β-水酸化酵素 (DBH: dopamine beta-hydroxylase) プロモータを用いて NA 神経細胞に tTA (テトラサイクリントランスアクトベータ) を発現するマウス (DBH-tTA マウス) を用いた。このマウスと tTA 依存的に超高感度カルシウム蛍光プローブ (GCaMP6) を発現可能な AAV (AAV-TetO GCaMP6) を感染させ、NA 神経細胞特異的に GCaMP6 が発現したマウスを作成した。GCaMP6 は、カルシウム濃度が上昇すると蛍光強度も上昇する蛍光プローブであり、その蛍光強度を解析することで神経活動を記録することができる (図 1 右)。この動物を用いて青斑核領域直上へ刺入した光ファイバーから励起光を照射し、同じファイバーから蛍光を検出することで、*in vivo* 活動記録を行った (図 2)。

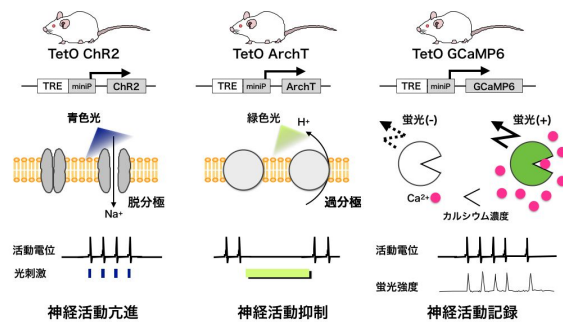


図 1 青斑核 NA 神経の活動操作と活動記録

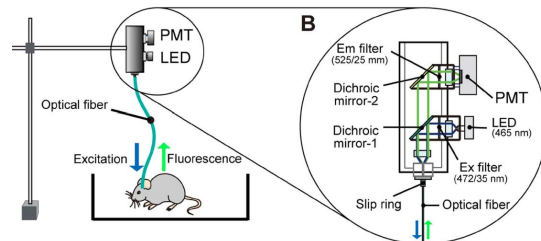


図 2 ファイバーフォトメトリー法による特定神経活動記録 (引用文献 3 より)

一方、青斑核 NA 神経に光遺伝学的手法を適用するために、DBH-tTA マウスを、tTA 依存的にチャネルロドプシン 2 (ChR2) やアーキロドプシン (ArchT) を発現可能なマウス (TetO ChR2 マウス、TetO ArchT マウス) と交配させて NA 神経細胞特異的に ChR2 もしくは ArchT を発現させた。ChR2 は青色光で開口する陽イオン非選択的のイオンチャネルであり、青色光照射で神経活動を活性化することができる (図 1 左)。ArchT は緑色光によって活性化されるプロトンポンプであり、緑色光照射で神経活動を抑制する (図 1 中)。これらの遺伝子改変動物を用いて、*in vivo* における活動記録と活動操作の両方向から評価を行うことを試みた。

4. 研究成果

<1> DBH-tTA;TetO GCaMP6 を用いた *in vivo* における青斑核 NA 神経の活動記録

現在はファイバーフォトメトリーと呼ばれる *in vivo* カルシウムイメージング法を独自に立ち上げることに成功した(Inutsuka et al., Sci. Rep, 2016)。種々の行動発現の際に青斑核 NA 神経がどのような活動を示しているか、その活動様式の同定を試みた。そのために、DBH-tTA マウスと、AAV-TetO GCaMP6 を用いて、青斑核 NA 神経特異的に GCaMP6 を発現したマウスを作成した。組織化学的解析を行い、GCaMP6 が青斑核の NA 神経細胞に発現していることを確認した。この青斑核 DBH-GCaMP6 マウスの青斑核直上に蛍光イメージング用の光ファイバー (直径 0.5mm) を刺入し、*in vivo* において光ファイバーを通じて GCaMP6 からの蛍光変化を検出できるかどうか条件検討を行った。その結果、青斑核 NA 神経活動に伴う GCaMP6 蛍光変化を検出することに成功した。

<2> 疼痛行動発現時における青斑核 NA 神経活動の役割の解明

青斑核は、中枢での疼痛制御系として知られる下行性疼痛抑制系に含まれる核であり、疼痛刺激があると興奮することが免疫組織化学的染色や functional MRI の研究などから知られている。本研究計画で開発された *in vivo* カルシウムイメージングを用いて同部位の神経細胞から活動を記録しながら後足に痛み刺激を与えることで、痛み刺激に対する青斑核の応答を無麻酔下で記録することができた。痛み刺激としては、機械刺激、熱刺激の 2 種類の刺激を行った。機械刺激は pinch システム、熱刺激はペルチエ素子を用いて行った。それぞれ刺激を与え、刺激を与えてから疼痛様行動を起こすまでの神経活動を計測した。その結果、両刺激時において、疼痛行動に伴う神経活動変化が検出された(図 3)。

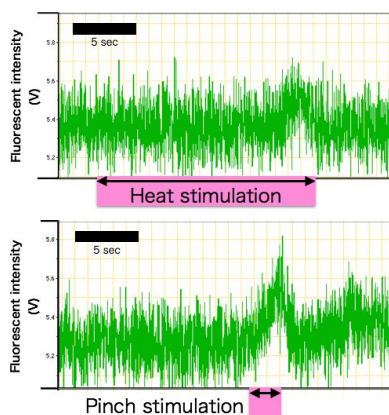


図 3 末梢侵害刺激に応答する青斑核 NA 神経

<3> DBH-tTA ; TetO ChR2 もしくは DBH-tTA ; TetO ArchT マウスを用いて青斑核 NA 神経を光操作した際の行動変化

種々の行動発現の際に青斑核 NA 神経がどのような活様式を示しているか同定することを試みていたが、青斑核の機能を調べるには逆に、青斑核 NA 神経を光操作した際に行動がどのように誘発されるか検討を行う必要がある。そのために、DBH-tTA マウスと TetO ChR2 マウスまたは TetO ArchT マウスを交配させ、バイジェニックマウス DBH-tTA; TetO ChR2 / DBH-tTA; TetO ArchT マウスを作成する。まず、これらのマウスを用いて免疫組織化学的解析を行い、青斑核の DBH 陽性神経 (NA 神経細胞) に ChR2 または ArchT が発現していることを確認した。なお、スライスパッチクランプを用いた検討により、DBH-tTA; TetO ChR2 マウスの NA 神経細胞から膜電位を記録しながら青色光照射することで、発火を誘導できること、DBH-tTA; TetO ArchT マウスの NA 神経細胞から膜電位を記録しながら緑色光照射することで、その発火を抑制できることは確認済みであった。

<4> 青斑核 NA 神経の活動が自律応答へ与える影響

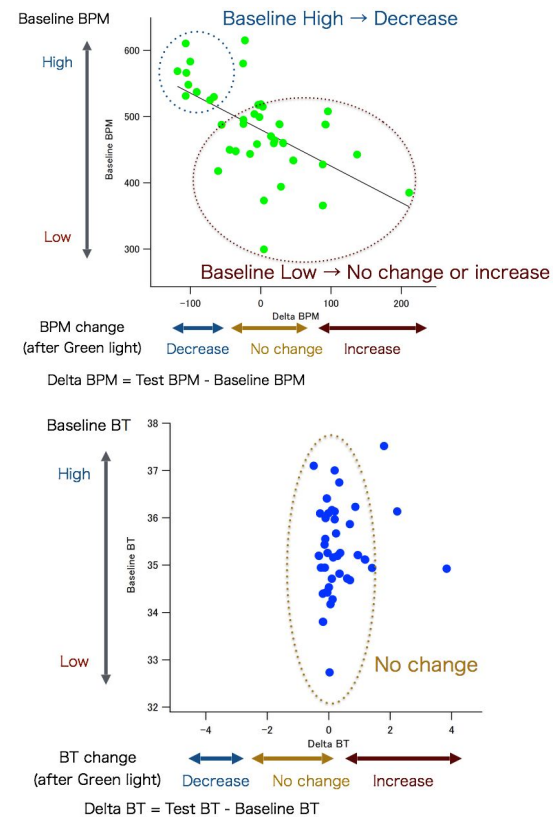


図 4 青斑核 NA 神経活動操作による心拍数・体温の変化

DBH-tTA; TetO ChR2 マウスまたは DBH-tTA; TetO ArchT マウスの青斑核直上へ光ファイバーを留置しながら、心拍、深部体温を測定可能なテレメーター (無線式) をマウスの腹腔内へ埋め込んだ。青斑核 NA 神経活動を光操作により ON/OFF 制御しながら、心拍数ならびに体温変化を同時にリアルタ

イム測定することで、同神経の自律応答に対する役割について解析を試みた。その結果、DBH-ArchT マウスを用いて青斑核 NA 神経活動を抑制したところ、心拍が定常状態（1分間あたりの心拍数が500以下と低い状態）において光抑制を行うと、光照射後1分間あたりの心拍数は変化なしもしくは増加した（図4上）。これに対し、心拍が定常状態より高い状態（1分間あたり500以上）において光抑制を行うと、光照射後1分間あたりの心拍数は減少した（図4上）。一方体温変化においては変化が認められなかった（図4下）。これらの結果より、青斑核 NA 神経活動は、心拍制御に一部関与している可能性が示唆された。

<引用文献>

1, Ito H, Yanase M, Yamashita A, Kitabatake C, Hamada A, Suhara Y, Narita M, Ikegami D, Sakai H, Yamazaki M, Narita M., Analysis of sleep disorders under pain using an optogenetic tool: possible involvement of the activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neurons. Mol. Brain, 2014.

2, Yamashita A, Hamada A, Suhara Y, Kawabe R, Yanase M, Kuzumaki N, Narita M, Matsui R, Okano H, Narita M., Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain. Synapse, 2014.

3, Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, Yamanaka A., The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. Sci. Rep. 2016.

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, Yamanaka A. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. Scientific Reports. 査読あり 2016. DOI:10.1038/srep29480.

〔学会発表〕(計 4 件)

山下哲、山中章弘、桑木共之. ストレス誘発自律神経応答に対するオレキシン神経活動の役割. 第94回日本生理学会. 2017年3月28日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

山下哲、山中章弘、桑木共之. ストレス負荷による自律応答とオレキシン神経活動の相関解析. 第44回自律神経生理研究会. 2016

年12月3日、日本光電工業フェニックスアカデミー（東京都新宿区）

山下哲、山中章弘、桑木共之. ファイバーフォトメトリー法を用いた急性ストレス負荷による循環応答時におけるオレキシン神経活動の測定. 第67回西日本生理学会. 2016年10月7日、レインボー桜島（鹿児島県鹿児島市）

山下哲、中井淳一、大倉正道、山中章弘、桑木共之. ストレス負荷による循環応答時におけるオレキシン神経活動の自由行動マウスからの計測. 第19回九州脳・高血圧・循環制御研究会. 2016年7月23日、ホテル日航福岡（福岡県福岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
山下 哲 (YAMASHITA Akira)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：40740197

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし