

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05128

研究課題名(和文) オキシトシン神経活動操作技術を用いたストレス神経回路機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of stress neural circuits using oxytocin neuron-selective activity manipulation

研究代表者

中村 和弘 (Nakamura, Kazuhiro)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00548521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「愛情ホルモン」とも呼ばれる神経ペプチドであるオキシトシンが、脳の中でどのように作用し、体温調節やストレス反応などの自律生理機能に対してどのように影響を与えるのかについて解析を行った。視床下部のオキシトシン発現神経細胞群を選択的に光刺激する技術を用いるなどして実験を行った結果、視床下部の中でオキシトシンを発現する神経細胞群が交感神経調節ニューロンに作用し、褐色脂肪組織の熱産生を活性化するとともに脈拍を上昇させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「愛情ホルモン」とも呼ばれる神経ペプチドであるオキシトシンが、体温調節やストレス反応などを担う自律神経系に対してどのように作用するのかが不明な点が多い。本研究の結果は、視床下部のオキシトシン発現神経細胞群が交感神経を活性化し、ストレス反応を増強する可能性を提示した。つまり本研究は、オキシトシンに環境の様々なストレスに対処するための身体の準備を促す役割がある可能性を示し、その脳の仕組みの一端を明らかにした。医療応用されつつあるオキシトシンの生理作用を理解する上で有用な知見である。

研究成果の概要(英文)：I studied how oxytocin, a neuropeptide often called the “love hormone”, acts in the brain to affect autonomic physiological functions, such as body temperature regulation and stress-coping responses. By employing in vivo optogenetic techniques to selectively stimulate a group of oxytocin neurons in the hypothalamus together with other anatomical and physiological techniques, I identified an oxytocinergic neuronal pathway that stimulates brown adipose tissue thermogenesis and tachycardia.

研究分野：生理学

キーワード：ストレス オキシトシン 光遺伝学 神経回路 心因性発熱 情動 血圧 交感神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心理ストレスは生体の恒常性維持システムに強い影響を与え、体温、血圧、脈拍などを上昇させる。そして、強度のストレスを受けると、自律神経系を含めた恒常性維持システムが崩れ、心因性発熱や高血圧、肥満などの様々なストレス疾患につながる。心理や情動信号を処理する脳領域としては大脳皮質や辺縁系が知られ、ここからのストレス信号が、自律生理機能を司る視床下部へ伝達されることで情動性の自律生理反応が生じる。

研究代表者はこれまで、科研費(若手研究(A))(平成22、26-27年度)や最先端・次世代研究開発支援プログラム(平成22-25年度)などの助成を受け、心理ストレスが褐色脂肪組織における交感神経性熱産生を惹起して体温を上昇させる際に働く中枢神経回路メカニズムの研究を行ってきた。その結果、視床下部から延髄へ直接、ストレス信号が神経伝達されることによって褐色脂肪熱産生、体温上昇、頻脈が駆動されることを見出した。

一方、こうしたストレス神経回路の活動を修飾するシステムも存在すると考えられる。中でも神経ペプチドであるオキシトシンは視床下部室傍核や視索上核の神経細胞群によって産生され、脳内の様々な部位に伸びる軸索終末から情動刺激などに応じて放出される。特に、心理ストレスや情動刺激によって、視床下部室傍核のオキシトシンニューロン群が活性化されるが、このオキシトシンニューロン群がストレス神経回路に作用する仕組みは知られていない。研究代表者は、オキシトシンニューロン特異的に任意のリポーター遺伝子を高発現させるウイルスの開発に成功した。この研究ツールを用いることによって、心理ストレスの自律生理反応を駆動する中枢神経回路をオキシトシン神経システムがどのように修飾し、生理作用を発揮するのかを解明することが可能となった。この解析によって得られる知見は、オキシトシンの主要な中枢神経作用機構を提示するだけでなく、中枢のストレス神経回路の作動メカニズムの深い理解にも貢献し、さらに、オキシトシンの幅広い臨床応用に必要な基礎的知見をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者の保有するウイルスや *in vivo* 生理学の技術を駆使することによって、ストレス神経回路に対するオキシトシン神経投射の役割を直接明らかにすることである。この目的を達成するために、

- (1) 視床下部から自律神経調節やストレス反応に関わる脳領域へのオキシトシン神経投射の同定
- (2) 特定の脳領域へのオキシトシン神経投射の活性化によって生じる自律生理反応の解析
- (3) オキシトシン神経投射領域へのオキシトシン受容体拮抗薬注入によるストレス反応への影響の解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) 視床下部から自律神経調節やストレス反応に関わる脳領域へのオキシトシン神経投射の同定

オスの Wistar ラット(6~9週齢)に深麻酔をかけ、脳定位装置に装着した状態で頭頂部の皮膚を切開し、視床下部室傍核へオキシトシンニューロン特異的に palGFP(細胞膜移行型の緑色蛍光タンパク質)を発現させるウイルスを注入した。注入後、皮膚切開部を縫合・消毒し、感染予防のために抗生物質を投与して麻酔より回復させた後、1週間以上飼育した。このラットに再度深麻酔をかけ、右心室より4%ホルマリン水溶液を灌流する方法により、全身組織を固定した。脳を摘出し、30%ショ糖水溶液中にて一晩以上振とうした後、凍結ミクロトーム上にて30 μ m厚の組織切片を作製した。一部の脳組織切片は、既報の方法により、抗オキシトシン抗体や抗GFP抗体などを用いた免疫組織染色を行った。脳組織切片はスライドガラスに貼り、乾燥後、封入して、蛍光顕微鏡観察および共焦点レーザー顕微鏡観察に供した。

- (2) 特定の脳領域へのオキシトシン神経投射の活性化によって生じる自律生理反応の解析

オスの Wistar ラット(6~9週齢)に深麻酔をかけ、脳定位装置に装着した状態で頭頂部の皮膚を切開し、視床下部室傍核へオキシトシンニューロン特異的に palGFP あるいは ChIEF-mCherry(光感受性カチオンチャンネルと赤色蛍光タンパク質の融合タンパク質)を発現させるウイルスを注入した。注入後、皮膚切開部を縫合・消毒し、感染予防のために抗生物質を投与した後、麻酔から回復させた。それから1週間以上経過後、このラットにウレタン・クロラロース麻酔をかけ、既報の方法により、褐色脂肪組織の交感神経活動、褐色脂肪組織温度、呼吸CO₂濃度、血圧、脈拍を同時計測した状態で、脳内に光ファイバーを刺入し、特定の脳部位に445nmのパルス光を照射した。そして、この光照射によって生じた生理学的パラメーターの変化を計測した。一部のラットでは、脳内にガラスキャピラリーを刺入してオキシトシン受容体拮抗薬の微量注入(50~100nl)を行った。

計測終了後、オキシトシン受容体拮抗薬を注入したラットには注入部位に蛍光マイクロビーズを微量注入した。すべてのラットに対して、右心室より4%ホルマリン水溶液を灌流して全身組織を固定し、摘出した脳を30%ショ糖水溶液中にて一晩以上振とうした後、凍結ミクロトーム上にて30 μ m厚の組織切片を作製した。脳組織切片はスライドガラスに貼り、乾燥後、封

入して、蛍光顕微鏡観察を行うことにより、palGFP あるいは ChIEF-mCherry の発現と局在を確認した。また、蛍光マイクロビーズを検出することにより、オキシトシン受容体拮抗薬の注入部位を同定した。

(3) オキシトシン神経投射領域へのオキシトシン受容体拮抗薬注入によるストレス反応への影響の解析

オスの Wistar ラット (6~9 週齢) に深麻酔をかけ、脳定位装置に装着した状態で頭頂部の皮膚を切開し、薬物注入の標的とする脳領域にマイクロインジェクション用ガイドカニューレを刺入して、歯科用セメントを用いて頭蓋骨に固定した。また、褐色脂肪組織温度と腹腔内温度を計測するためのテレメトリー発信器を体内に埋め込んだ。皮膚切開部を縫合・消毒し、感染予防のために抗生物質を投与して麻酔より回復させた後、1 週間以上飼育した。埋め込んだカニューレを通じて、50~100 ml の生理食塩水あるいはオキシトシン受容体拮抗薬を注入し、既報の方法により、このラットに 60 分間の社会的敗北ストレスを与えた。褐色脂肪組織温度と腹腔内温度はテレメトリーシステムを用いて経時的に計測した。

計測後、注入部位に蛍光マイクロビーズを微量注入し、右心室より 4% ホルマリン水溶液を灌流して全身組織を固定した。摘出した脳を 30% ショ糖水溶液中にて一晩以上振とうした後、凍結ミクロトーム上にて 30 μm 厚の組織切片を作製し、スライドガラスに貼った。乾燥後、封入して、蛍光顕微鏡下で蛍光マイクロビーズを観察することによって、微量注入の部位を確認した。

4. 研究成果

(1) 視床下部から自律神経調節やストレス反応に関わる脳領域へのオキシトシン神経投射の同定

オキシトシンニューロン特異的に palGFP を発現させるウイルスを視床下部室傍核へ感染させたところ、多数の神経細胞において palGFP の発現が観察された。オキシトシンの免疫組織染色を行ったところ、palGFP 発現神経細胞の大多数でオキシトシンの存在が検出でき、palGFP 発現のオキシトシン神経細胞選択性が確認できた。視床下部室傍核のこれらの palGFP 発現神経細胞に由来する軸索が終末まで palGFP によって標識されていることが確認できたことから、軸索終末の分布を詳細に解析したところ、多数の脳領域にわたって分布していた。その投射先の中で、ストレス性の体温上昇に関わる脳領域では、palGFP で標識された軸索が褐色脂肪組織の熱産生を駆動するニューロンに接触してシナプス様の構造を形成している観察像を得た。その他、前脳のストレス関連領域への軸索投射も確認された。

(2) 特定の脳領域へのオキシトシン神経投射の活性化によって生じる自律生理反応の解析

ウイルスを用いて視床下部室傍核のオキシトシン神経細胞選択的に ChIEF-mCherry を発現させた。オキシトシン神経投射先に ChIEF-mCherry を含有する軸索が多数観察されたことから、麻酔下で光ファイバーをその投射先神経核直上に刺入し、光照射を行ったところ、褐色脂肪組織の交感神経活動、褐色脂肪組織温度、呼気 CO_2 濃度、脈拍が上昇した。一方、palGFP を発現させた対照群では、オキシトシン神経投射先への光照射による自律生理反応は生じなかった。

光照射前に予め、オキシトシン神経投射先へオキシトシン受容体拮抗薬を注入しておく、ChIEF-mCherry 含有軸索への光照射による自律生理反応は起こらなかった。したがって、視床下部室傍核からのオキシトシン神経軸索はオキシトシン受容体を介して交感神経を活性化し、褐色脂肪熱産生や頻脈の自律生理反応を引き起こすことが明らかとなった。視床下部室傍核から当該神経核へのオキシトシン神経伝達が、ストレス性の褐色脂肪熱産生や体温上昇の増強に寄与するか否かについては今後の研究課題である。

(3) オキシトシン神経投射領域へのオキシトシン受容体拮抗薬注入によるストレス反応への影響の解析

(1)の実験で明らかとなった、視床下部室傍核から前脳のストレス関連領域へのオキシトシン神経投射がストレス反応に寄与するかどうかを検討するために、予め当該前脳領域に挿入したマイクロインジェクション用ガイドカニューレを通じてオキシトシン受容体拮抗薬を微量注入した後、ラットに社会的敗北ストレスを与えた。現在までに数例の実験を行ったが、ストレスによって惹起される褐色脂肪熱産生や深部体温上昇に大きな影響は見られなかった。今後も、いくつかのストレス関連領域へのオキシトシン受容体拮抗薬投与の効果を調べていく予定である。

以上、本研究では、(1)~(3)の実験を通じて、視床下部室傍核からのオキシトシン神経軸索がオキシトシン受容体を介して交感神経ニューロンを活性化し、褐色脂肪熱産生や頻脈の自律生理反応を引き起こすことが明らかとなった。このオキシトシン作動性の自律生理反応は、オキシトシンが単独で作用することによって起こるのではなく、熱産生を指令する上位からのグルタミン酸作動性の興奮性入力からのシナプス伝達を増強することによって生じるものと推測される。一方で、前脳のストレス関連領域へのオキシトシン神経伝達の作用はまだ未解明であり、今後解析を続け、解明を目指す。

< 引用文献 >

- Kataoka N, Hioki H, Kaneko T, Nakamura K. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus–medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell Metabolism* 20:346–358, 2014.
- Dayas CV, Xu Y, Buller KM, Day TA. Effects of chronic oestrogen replacement on stress-induced activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis control pathways. *Journal of Neuroendocrinology* 12:784–794, 2000.
- Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T. In vivo transduction of central neurons using recombinant Sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49:1497–1508, 2001.
- Nakamura K, Matsumura K, Hübschle T, Nakamura Y, Hioki H, Fujiyama F, Boldogkői Z, König M, Thiel HJ, Gerstberger R, Kobayashi S, Kaneko T. Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *Journal of Neuroscience* 24:5370–5380, 2004.
- Lin JY, Lin MZ, Steinbach P, Tsien RY. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophysical Journal* 96:1803–1814, 2009.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- Morrison SF, Nakamura K, Central mechanisms for thermoregulation, *Annual Review of Physiology*, 査読有、Vol. 81, 2019, pp. 285–308
DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114546
- Nakamura K, Afferent pathways for autonomic and shivering thermoeffectors, *Handbook of Clinical Neurology*, 査読有、Vol. 156, 2018, pp. 263–279
DOI: 10.1016/B978-0-444-63912-7.00016-3
- Nakamura K, Nakamura Y, Hunger and satiety signaling: modeling two hypothalamomedullary pathways for energy homeostasis, *BioEssays*, 査読有、Vol. 40, 2018, pp. 1700252
DOI: 10.1002/bies.201700252
- Nakamura Y, Nakamura K, Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 査読有、Vol. 470, 2018, pp. 823–837
DOI: 10.1007/s00424-017-2090-z
- Yahiro T, Kataoka N, Nakamura Y, Nakamura K, The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation, *Scientific Reports*, 査読有、Vol. 7, 2017, pp. 5031
DOI: 10.1038/s41598-017-05327-8
- Nakamura Y, Yanagawa Y, Morrison SF, Nakamura K, Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication, *Cell Metabolism*, 査読有、Vol. 25, 2017, pp. 322–334
DOI: 10.1016/j.cmet.2016.12.002

[学会発表] (計 47 件)

- Fukushima A, Nakamura K, Oxytocinergic hypothalamic neurons stimulate brown adipose tissue thermogenesis, *The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress / The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan*, 2019
- 福島章紘, 中村和弘, 視床下部オキシトシン神経系による褐色脂肪熱産生の誘導、第46回自律神経生理研究会、2018
- 福島章紘, 中村和弘, 視床下部室傍核オキシトシンニューロンは褐色脂肪熱産生を誘導する、第65回中部日本生理学会、2018
- Nakamura K, Difference in central circuit mechanisms of infection-induced and psychogenic fever, *International Society for Autonomic Neuroscience* 2017, 2017
- Kataoka N, Nakamura K, A corticohypothalamic monosynaptic pathway that drives psychological stress-induced sympathetic responses, *第40回日本神経科学大会*, 2017
- Kataoka N, Nakamura K, A ventral medial prefrontal cortex-dorsomedial hypothalamus monosynaptic pathway that drives sympathetic stress responses, *Experimental Biology* 2017, 2017
- Kataoka N, Nakamura K, Sociopsychological stress activates ventral medial prefrontal cortex-dorsomedial hypothalamus pathway that drives sympathetic stress responses, *第94回日本生理学会大会*, 2017
- Nakamura K, Kataoka N, Higher brain stress signalling that drives the hypothalamo-medullary pathway for stress-induced hyperthermia, *6th International Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation*, 2016

Nakamura K, Central pathways for cold-induced thermogenesis, The Wenner-Gren Foundations International Symposium "Brown adipose tissue and eutheria", 2016

Kataoka N, Nakamura K, Direct pathway from ventral medial prefrontal cortex to dorsomedial hypothalamus drives psychological stress-induced hyperthermia, Experimental Biology 2016, 2016

〔図書〕(計 3件)

廣川信隆 編(中村和弘:心理ストレスによる自律生理反応を駆動する中枢神経回路機構) クバプロ、ブレインサイエンス・レビュー 2017、2017、総ページ数 308 (135-149)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2/>

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2/english.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中村 佳子

ローマ字氏名：(NAKAMURA, Yoshiiko)

研究協力者氏名：片岡 直也

ローマ字氏名：(KATAOKA, Naoya)

研究協力者氏名：福島 章紘

ローマ字氏名：(FUKUSHIMA, Akihiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。