

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08529

研究課題名(和文) オプトジェネティクスを用いたCO2による覚醒調節機構の解明

研究課題名(英文) Optogenetic analysis of behaviors mediated by chemo-sensitive neurons.

研究代表者

金丸 みつ子 (Kanamaru, Mitsuko)

昭和大学・教養部・教授

研究者番号：40255716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：オプトジェネティクスの手法において、無線式光照射により自由行動下マウスの脳内神経活動を制御し、それによる行動変化を解析した。その結果、正中縫線核のセロトニン神経は、不安様行動を高め、呼吸数の増加から分時換気量を増加させることが明らかになった。延髄大縫線核のセロトニン神経は、下行性疼痛抑制として熱侵害受容閾値を上昇させること、その作用は機械侵害受容への効果とは異なることが明らかになった。背側縫線核のセロトニン神経の睡眠-覚醒への効果も明らかにした。脳内セロトニン神経は、CO2センサーの一つといわれている。本研究は、脳内セロトニン神経のCO2ホメオスタシスを含む生理機能調節を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オプトジェネティクスは、自由行動下哺乳類における、選択的な脳内神経系の制御による行動が解析できるため、ヒトの生理機能の理解において非常に示唆的な情報になる。この方法を用いた本研究の神経生理学的成果は、不安関連呼吸障害や痛みや不眠についてのCO2ホメオスタシスを含む病態生理の解明につながり、不安や不眠の早期発見とそれらに伴う呼吸障害や痛覚異常を含む総合的治療の方法確立に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study of free-moving mice using optogenetics suggested that serotonergic neuron activity in the median raphe nucleus enhances anxiety-like behavior and increases minute ventilation due to respiratory rate. This study also indicated that serotonergic neuron activity in the raphe magnus nucleus of the medulla oblongata increases the thermal-nociceptive threshold as the descending pain inhibitory system and that it is different from the effect on mechanical-nociception. The study also clarified that serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus affect the sleep-wake system. It is proposed that serotonergic neurons in the brain are a CO2 sensor. It is expected that the neurophysiological results from free-moving mice using optogenetics uncover the pathophysiology including CO2 homeostasis of anxiety-related respiratory control, pain, and insomnia and then contribute to establishing methods of early detection and comprehensive treatment of anxiety and insomnia.

研究分野：神経生理学

キーワード：オプトジェネティクス セロトニン 縫線核 不安 呼吸 痛み 睡眠-覚醒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CO₂ の増加は、防御反射の一つとして睡眠からの覚醒を刺激することが知られている。この CO₂ 増加による覚醒には、CO₂ センサーとしての役割が提唱されている脳内のセロトニン神経 (Nat Rev Neurosci. 2004) の関与が示唆されており、睡眠時無呼吸症候群やてんかん突然死や乳幼児突然死症候群においては、この脳内セロトニン神経系の異常が指摘されている。しかしながら、CO₂ 増加による覚醒を調節する脳内セロトニン神経の機構の詳細については不明である。

オプトジェネティクスは、特定の細胞に発現させた光活性化タンパク質を特定の光で活性化し、in vivo の細胞の膜電位をミリ秒単位で操作する技術である。光により Na⁺ を細胞内へ流入させ細胞を興奮させるチャンネルロドプシンや H⁺ を細胞外へ流出させ細胞を抑制するアーチロドプシン等の光活性化タンパク質が活用されている。この技術は、生理機能に関わる in vivo 神経回路解析を可能にし、Nature Methods 誌により 2010 年 Method of the Year に選ばれている (Nat Methods, 2011)。

2. 研究の目的

既に導入準備が先行していた、脳内セロトニン神経に興奮性光活性化タンパク質を発現させたマウスで、光刺激による生理的応答として、睡眠-覚醒、睡眠-覚醒に関連する痛みや不安や呼吸に対する脳内セロトニン神経の役割を、自由行動マウスにおいて明らかにすることを目的とした。

また、脳内セロトニン神経に抑制性光活性化タンパク質を発現させたマウスを作成し、そのマウスを用いて抑制性的効果から脳内セロトニン神経の役割と CO₂ との関連の解析を目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物: 2 系統 (B6:129B6(Cg)-Actb<tm1(tet0-ChR2[C128S]/EYFP)Kftnk>(Cell Rep. 2012) と B6.Cg-Tg(Tph2-tTA)1Ahky のマウスの交配により Tph2-tTA::tet0-ChR2[C128S]EYFP マウスを作成した。マウスの個体及び精子はともに、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研 BRC から提供されたものである。マウスは、三種混合麻酔薬の腹腔内投与による麻酔下に、光照射用無線式 LED カニューーラを脳内セロトニン神経の起始核に向けて留置された。約 1 または 2 週間の回復期間の後、そのマウスの行動解析を行った。

(2) 行動解析: 睡眠-覚醒は、上述麻酔下マウスに脳波・頸部筋電図の無線式送信器を装着させて、約 2 週間の回復期間の後、脳波と頸部筋電図波形を導出して解析した。呼吸は、ホールボディプレシスモグラフチャンバーに移したマウスから、呼吸様曲線を導出して計測した。不安様行動は、高架式十字迷路上の行動をビデオカメラで記録して計測した。痛みの閾値は、von Frey test (足底にナイロン製フィラメントを押し当て、足を上げて逃避行動を示すフィラメントの太さを計測) と Hot plate test (温めた金属製プレート上にマウスを置き、足底を舐めるか飛び跳ねる逃避行動が出現するまでの潜時を計測) で評価した。下行性疼痛抑制系の傷害が示唆されている間欠的寒冷ストレス刺激 (ICS) のモデルマウスを作成し (Neurosci Lett. 2010) 合わせて検討した。それぞれの行動に対して、引き続き青色光照射を行い、それによる行動変化を記録し計測した。得られた結果は、脳内セロトニン神経に光活性化タンパク質を発現した群 (光受容群) と、光活性化タンパク質を発現していない群 (対照群) とを統計的に解析して評価した。

(3) 組織学的検討: 深麻酔下に灌流固定したマウスの脳切片を用いた。CUBIC 試薬を用いて透明化し (Nat Protoc. 2015) 発現している光活性化タンパク質 EYFP を蛍光顕微鏡システムで描出した。また、免疫組織化学的手法で、一次抗体に抗 Tph2 抗体と抗 GFP 抗体を用い、それぞれ

に二次抗体として Alexa Fluor 546 と Alexa Fluor 488 を反応させて、脳内セロトニン神経分布と光活性化タンパク質の発現分布を共焦点レーザー顕微鏡システムにより観察した。

(4) C57BL/6-Tg(tet0-ArchT/EGFP)1Ahky マウスと B6.Cg-Tg(Tph2-tTA)1Ahky マウスの交配により得られた、脳内セロトニン神経選択的に抑制性光活性化タンパク質を発現させた、Tph2-tTA::tet0-ArchT/EGFP マウスを作成した。2 系統のマウスの精子はともに、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研 BRC から提供されたものである。本マウスから中脳レベルの冠状断切片標本を作成し、細胞外記録を行いながら緑色光を照射し、その効果を検討した。また、抑制性光活性化タンパク質を発現させたマウスに、前述同様の麻酔下で脳波・頸部筋電図の無線式送信器を装着させ、回復期間の後に行動記録・解析を試行した。また、吸入気ガスに CO₂ ガスを加えて同様に記録・解析を試行した。

4 . 研究成果

(1) 組織学的結果：厚さ 2 mm の冠状断切片を CUBIC 試薬で透明化処理をして、蛍光顕微鏡システムによる EYFP の蛍光分布を観察した結果は、その蛍光が中脳において正中縫線核と背側縫線核に局在していることを示していた。また、GFP 陽性細胞は緑色蛍光で、Tph2 陽性細胞は赤色蛍光で、検出できるように免疫組織化学的に処理をして、共焦点レーザー顕微鏡システムで観察した。中脳において、緑色蛍光と赤色蛍光が同一細胞に共存していることが示された。両系統から改変した遺伝子を受け継いだマウスにおいては、脳内セロトニン神経に光活性化タンパク質が選択的に発現していることが明らかになった。

(2) 呼吸と不安様行動：対照群に比べ光受容群のマウスは、正中縫線核の青色光照射により、呼吸数が有意に増加し、一回換気量の変化なしに分時換気量を有意に増加させていた。また、高架式十字迷路試験においては、対照群に比べ光受容群のマウスは、正中縫線核の青色光照射により、移動距離を変えずにオープンアームの滞在時間を有意に短縮させていた。これらのことから、正中縫線核のセロトニン神経活動は、不安様行動を増大させ、その際に呼吸数とそれによる分時換気量の増大に寄与することを、自由行動下のマウスで初めて明らかにした。これは、ヒトにおける不安関連呼吸応答に類似する結果であったことから、ヒトにおける不安関連呼吸障害の神経機構の解明につながると考えられる。

(3) 痛み：ICS なし群に対して ICS 群のマウスは、von Frey test の疼痛閾値が有意に低下していた。また、ICS の有無にかかわらず、光受容群のマウスの延髄大縫線核の青色光照射は、対照群の光照射の結果同様に、その疼痛閾値に影響しなかった。一方、Hot plate test の疼痛閾値は、ICS なし群に対する ICS 群のマウスにおいて、有意な差はなかった。しかし、ICS の有無にかかわらず、対照群に比べ光受容群のマウスの延髄大縫線核の青色光照射は、Hot plate test の疼痛閾値を有意に上昇させていた。以上のことから、延髄大縫線核のセロトニン神経は、熱刺激性疼痛に鎮痛効果を発揮することが、自由行動下のマウスで明らかになった。また、その下行性疼痛抑制機序は、機械刺激性疼痛への効果とは異なることが明らかとなった。

(4) 睡眠-覚醒：背側縫線核のセロトニン神経の睡眠-覚醒への寄与を明らかにし、現在論文を準備中である。

(5) 抑制性光活性化タンパク質を発現させたマウスから作成した、中脳の冠状断切片標本において、背側縫線核付近から細胞外記録をしながら緑色光照射をすると、その光照射の間だけ細胞外記録が抑制されていた。よって、EGFP 陽性細胞は、抑制性の光活性化タンパク質 ArchT を発現していることが示唆された。ただし、睡眠-覚醒の記録において、マウスの睡眠を継続したまま吸入気の CO₂ 濃度を上げることについては、さらなる検討が必要である。脳内セロトニン神

経の役割を興奮性と抑制性の両面から解明を進めてきた。抑制性光活性化タンパク質を発現させたマウスの行動解析については、今後更なる研究が必要である。

以上のように、本研究により脳内セロトニン神経は、延髄レベルで熱刺激性疼痛に鎮痛効果を発揮し、中脳レベルで呼吸の亢進を伴う不安の増大や、睡眠-覚醒の調節に寄与することが明らかになった。痛みなどの感覚受容器からの応答や呼吸などの自律性の応答が、不安や不眠などの高次脳機能の変化と連動していること、その機構にCO₂センサーの役割を提唱されている脳内セロトニン神経系が大きな役割を果たしていることは、これらの病態に伴う酸塩基平衡障害の解析の必要性を想起させる。よって、本研究成果は、不安や不眠の早期発見とそれらに伴う呼吸障害や痛覚異常の総合的治療の方法確立に寄与することが期待される。

<引用文献>

Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis, *Nat Rev Neurosci.* 5, 2004, 449-461.

Method of the Year 2010, *Nature Methods* 8, 2011, 1.

Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T. et al. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep.* 2, 2012, 397-406.

Nishiyori M, Nagai J, Nakazawa T, et al. Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neurosci Lett.* 472, 2010, 184-187.

Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, et al. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc.* 10, 2015, 1709-1727.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 OKUMA Naoki, KANAMARU Mitsuko, MORIYA Rika, TANAKA Kenji, ARATA Satoru, WATANABE Jun, YOSHIKAWA Akira, IZUMIZAKI Masahiko	4. 巻 31
2. 論文標題 Optogenetic Stimulation of 5-HT Neurons in the Median Raphe Nucleus Affects Anxiety and Respiration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Showa University Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 263 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.15369/sujms.31.263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 三橋学、金丸みつ子、田中謙二、吉川輝、稲垣克記、久光正、砂川正隆、泉崎雅彦	4. 巻 79
2. 論文標題 大縫線核セロトニン神経による疼痛抑制の光遺伝学的解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 483-491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.14930/jshowaunivsoc.79.483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 金丸 みつ子	4. 巻 150
2. 論文標題 閉塞性睡眠時無呼吸症候群の神経化学的視点：延髄セロトニン神経について（特集 難治性疾患の治療に向けた基礎研究）	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 177-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1254/fpj.150.177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mitsuko Kanamaru, Mana Tsukada, Akira Yoshikawa, Hiroshi Onimaru, Ayako Mochizuki, Masataka Sunagawa, Tomio Inoue, Masahiko Izumizaki
2. 発表標題 Effects of optogenetic inhibition of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus on respiratory control
3. 学会等名 9th FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rika Moriya, Mitsuko Kanamaru, Naoki Okuma, Hiroshi Onimaru, Akira Yoshikawa, Kenji Tanaka, Satoshi Hokari, Yasuyoshi Ohshima, Masahiko Izumizaki
2. 発表標題 The effect of activating serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus on control of vigilance state
3. 学会等名 European Respiratory Society International Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三橋学, 金丸みつ子, 田中謙二, 吉川輝, 久光正, 砂川正隆, 泉崎雅彦
2. 発表標題 大縫線核の 5-HT 神経を介した侵害受容機構の光遺伝学的解析
3. 学会等名 第 9 5 回 日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大熊 公樹, 金丸 みつ子, 森谷 梨加, 鬼丸 洋, 田中 謙二, 荒田 悟, 渡邊 潤, 遠藤 利行, 吉川 輝, 飯塚 眞喜人, 泉崎 雅彦
2. 発表標題 光遺伝学による不安と呼吸の関連性
3. 学会等名 第 9 4 回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森谷 梨加, 金丸 みつ子, 大熊 公樹, 吉川 輝, 田中 謙二, 穂苅 諭, 大嶋 康義, 鬼丸 洋, 泉崎 雅彦
2. 発表標題 背側縫線核セロトニン神経の睡眠・覚醒における役割
3. 学会等名 第 9 4 回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	泉崎 雅彦 (Izumizaki Masahiko) (20398697)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	
研究 分担者	吉川 輝 (Yoshikawa Akira) (90737355)	昭和大学・医学部・助教 (32622)	
研究 協力者	森谷 梨加 (Moriya Rika)	昭和大学・医学部	
研究 協力者	大熊 公樹 (Okuma Naoki)	昭和大学・医学部	