

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19006

研究課題名(和文) ストレス情動記憶の想起による体温上昇メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of stress-induced hyperthermic mechanism by recall of stress emotional memory

研究代表者

片岡 直也 (Kataoka, Naoya)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20572423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：強い心理ストレスは情動記憶として扁桃体へ記憶される。負の情動記憶は条件刺激によって想起されると、動悸や体温上昇といったストレス反応を引き起こし、急性ストレス疾患や心的外傷ストレス症候群の原因ともなる。研究代表者は、社会的敗北ストレスを受けたラットが翌日以降もストレスを受けていないにもかかわらず同じ時間に褐色脂肪熱産生が亢進し、体温が上昇する生理反応を見出した。この反応は心理ストレス記憶を想起した結果と考えられ、本研究では、この想起性ストレス熱産生反応を駆動する脳の神経回路を明らかにするために、光遺伝学的手法を取り入れ、ストレス性熱産生を惹起する視床下部背内側部への神経回路の解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心理ストレスによって生じる体温上昇や血圧の変化といった生理反応は、野生動物が天敵に狙われた際に、脳や筋肉を温める事で身体能力を向上させて生存に有利に働かせるといった意義がある。さらに、以前に経験した危険な状況(場所・時間など)では再び同じような危険に遭遇する可能性が高いことから、忌まわしい記憶を呼び起こし、追体験までしてストレス性の体温上昇を惹起させ、速やかに危険を回避出来るようにしているものと考えられる。このような負の想起記憶によって自律生理反応が惹起される現象の中枢神経回路機構は解析されておらず、本研究で得られる知見は、生物の生き残り戦略のメカニズムの新たな解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Strong psychological stress is stored in the amygdala as "emotional memory". In particular, negative emotional memory, when recalled by conditional stimuli such as sounds and places, causes stress reactions such as palpitations and temperature elevations, and also causes acute stress disorder and trauma stress syndrome. I found a physiological response in which rats suffering from social defeat stress are enhanced in brown adipose thermogenesis at the same time despite the fact that they are not stressed from the next day onwards, and their temperature rises. I think that this reaction is caused as a result of recalling psychological stress memory. The research plan will clarify the neural circuits of the brain that drive this recalled stress-induced thermogenesis response. In order to accomplish this purpose, we will use optogenetics techniques to elucidate the neural circuit from the amygdala to the dorsomedial hypothalamus region that causes stress-induced thermogenesis.

研究分野：環境生理学

キーワード：想起ストレス ストレス性交感神経反応 神経回路 褐色脂肪熱産生 光遺伝学

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

### 1. 研究開始当初の背景

現代社会を生きる私たちを取り巻く環境はストレスに溢れており、人間関係などの恒常的な心理ストレスが心因性発熱などのストレス疾患の原因となっている。この心因性発熱やストレス性体温上昇は感染性の発熱とは異なり、解熱剤(NSAIDs)が効かないため治療は難しい

(Oka, *Temperature*, 2, 368-378, 2015)。

研究代表者は、ストレス性体温上昇のしくみが脳の神経回路にあると考え、人間関係のストレスに近い動物モデルある社会的敗北ストレスをラットに与え、それによって起こる体温の上昇を駆動する神経回路の解析を行った。その結果、視床下部の背内側部から延髄縫線核の交感神経プレモーターニューロンへの直接のグルタミン酸作動性の神経伝達が、ストレス性の体温上昇、褐色脂肪組織における代謝性熱産生、頻脈などの交感神経反応を駆動することを明らかにした(Kataoka et al., *Cell Metab*, 20, 346-358, 2014)。研究代表者は、社会的敗北ストレスモデルを用いたストレス性体温上昇の研究を進める中で、ストレスを受けたラットが翌日以降、ストレスを受けていないにも関わらず、同じ時刻になると褐色脂肪組織の温度の有意な上昇と、遅れて腹腔内の温度(深部体温)の上昇を示す現象を観察した。

### 2. 研究の目的

強い心理ストレスは「情動記憶」として扁桃体へ記憶される。特に負の情動記憶は音や場所などの条件刺激によって想起されると、動悸や体温上昇といったストレス反応を引き起こし、急性ストレス疾患や心的外傷ストレス症候群(PTSD)の原因ともなる。研究代表者は、社会的敗北ストレスを受けたラットが翌日以降もストレスを受けていないにもかかわらず同じ時間に褐色脂肪熱産生が亢進し、体温が上昇する生理反応を見出した。この反応は心理ストレス記憶を想起した結果引き起こされているものと考えられ、本研究では、この想起性ストレス熱産生反応を駆動する脳の神経回路を明らかにする。この目的を遂行するために、光遺伝学的手法を取り入れ、扁桃体からストレス性熱産生を惹起する視床下部背内側部への神経回路の解明を行う。心理ストレスの想起に伴う体温上昇反応が起こる仕組みを明らかにすることは中枢の神経回路の理解にとどまらず、PTSDや急性ストレス疾患などの発症基盤の解明に寄与する。

扁桃体に記憶された負の情動記憶は、音や場所などの条件刺激によって想起され、動悸や体温上昇などといったストレス反応を引き起こすことから、PTSDや急性ストレス疾患などの原因ともなっている(Gautam et al., *PLoS ONE*, 10, e0117092, 2015)。したがって、上述した社会的敗北ストレスを経験したラットが翌日に示す体温上昇や頻脈などの反応も扁桃体に記憶された情動記憶と深く関与するものと考えられる。扁桃体と同じく大脳辺縁系を構成する前脳領域も不安や不快、恐怖に関与し、視床下部前域へストレス信号伝達を行っているという報告がなされた(Anthony TE et al., *Cell*, 156, 522-536, 2014)。中隔野は扁桃体の出力核である中心核から入力を受けるが、その殆どがGABA作動性伝達である。

本研究では扁桃体 前脳領域 視床下部背内側部といった一連の神経経路が心理ストレスの想起を引き起こすのではないかと仮説をたてた。

### 3. 研究の方法

本研究計画では人の社会心理ストレスに近い動物モデルである「社会的敗北ストレス」をラットに与え、強い負の情動を脳内に記憶させる。さらに、負の情動記憶の想起によって起こるストレス性体温上昇反応に関わる神経経路を明らかにする解析を行った。

#### 社会的敗北ストレスの実験方法

オスのWistarラットの体内にあらかじめ温度測定用テレメトリー発信器を埋め込み、肩甲骨間の褐色脂肪組織の温度および腹腔の深部体温を同時に計測する。このラットを攻撃的なオスのLong-Evansラットのケージに入れると、Wistarラットは攻撃を受け、強いストレスを受けることになる。この社会的敗北ストレスを受けたラットでは、褐色脂肪組織の温度は即座に上昇し、深部体温も少し遅れて上昇する。

#### (1) 視床下部背内側部へストレス信号を入力する前脳領域の神経核の同定ならびに、扁桃体から前脳領域への神経投射の確認

神経細胞の活性化マーカーであるc-Fosの免疫組織染色と神経投射トレーサー法を組み合わせた組織化学的解析を行った。

#### (2) 前脳領域がストレスによる体温上昇に関与するか薬理的機能抑制実験

ストレス記憶を想起した際の体温上昇を観察するために、体内へ温度測定用のテレメトリー発信器を埋め込み、深部体温と褐色脂肪組織温度を計時的に観察する。さらに、本研究ではまず、前脳領域が心理ストレス反応に関与するか検討を行った。温度測定用テレメトリーを埋め込んだラットの前脳領域へステンレス製のカニューラを挿入しデンタルセメントでカニューラを慢性的に留置した。1週間の回

復期間をおき、予め神経抑制剤であるムシモールを微量注入した動物へ社会的敗北ストレスを与えることで、前脳領域が心理ストレス反応関与するか検討を行った。

(3) 前脳ニューロンが視床下部背内側部へ直接の興奮性入力を行っているか光遺伝学を用いた検証  
光遺伝学的手法を用いて前脳領域から視床下部背内側部へ伸びる神経軸索を光刺激するため、特定波長の光を受けて神経細胞を活性化するカチオンチャンネル ChIEF を発現させるアデノ随伴ウイルスベクター (AAV2/1-CMV-ChIEF-tdTomato) の構築を行った。本 AAV をラットの前脳領域に注入し、感染したニューロン群の軸索終末へ ChIEF が発現していることを組織学的に確認した。こうした ChIEF を含む軸索終末が存在する視床下部背内側部へ、麻酔下で光ファイバーを挿入し、*in vivo* 光照射実験を行った。

(4) 前脳ニューロンが視床下部背内側部へ心理ストレス信号を入力しているか光遺伝学を用いた検討  
本研究計画の申請段階では、逆行性 AAV (AAVrg; AAV retrograde) は報告されたばかりで、多くの研究者は狂犬病ウイルスを改変した CAV-cre ウイルスを海外から導入する必要があり、まだまだ一部の研究者しか逆行性 AAV を扱え得ていない状況であった。しかしながら、近年急速に AAVrg を扱う環境が整い、研究代表者自身でウイルスのパッケージング、精製を行うことが可能となったことで、特定の神経経路選択的に目的タンパク質を発現させる事が可能となった。

そこで、本研究計画は視床下部背内側部へ AAVrg-pgk-cre を感染させ、視床下部背内側部へ入力する神経細胞へ cre を発現させた。続いて、前脳領域へ cre 依存的に Cl<sup>-</sup>チャンネルである iChloC を発現させる AAV2/1-Ef1a-DIO-iChloC-mCherry を導入し、前脳領域ニューロンから視床下部背内側部へ出力する神経細胞選択的に iChloC を発現させ、その軸索終末が存在する視床下部背内側部の直上へファイバカニューラを留置させた動物を用意した。この動物へ社会的敗北ストレスを与え、その直後から視床下部背内側部を青色レーザーで光刺激することでストレス中の神経活動を抑制した。これら一連の解析を行うことで想起ストレスによって惹起されるストレス反応の中樞神経メカニズムを明らかにする。

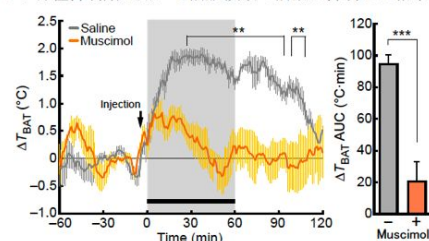
#### 4. 研究成果

本研究ではまず、視床下部背内側部へストレス信号を入力する神経核の同定を行った。視床下部背内側部へ逆行性トレーサーを微量注入することで、視床下部背内側部へ入力する神経細胞を可視化した。このラットへ人の心理ストレスモデルである「社会的敗北ストレス」を与えると、前脳領域から視床下部背内側部へ投射する神経細胞が神経の活性化マーカーである Fos を発現していることが明らかとなった。

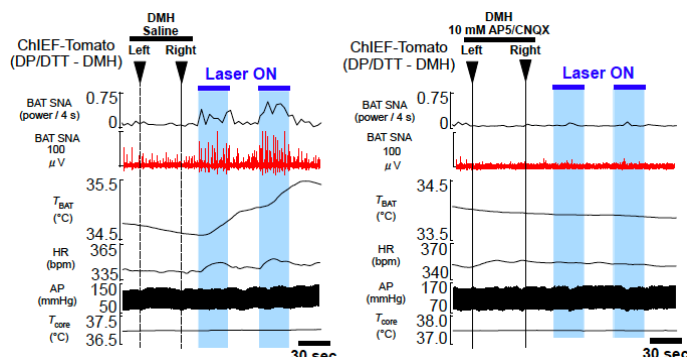
続いて、自由行動下ラットの前脳領域へ神経抑制剤であるムシモールを予め微量注入したラットへ社会的敗北ストレスを与えるとストレスによって惹起される褐色脂肪熱産生、体温、血圧、脈拍の上昇が有意に減弱した (図1)。

さらに、前脳領域から視床下部背内側部への直接の神経投射が褐色脂肪熱産生を駆動するかを *in vivo* 光遺伝学実験によって検証した。光駆動性カチオンチャンネル、ChIEF をウイルスを用いて腹側前頭前皮質ニューロンに発現させると、視床下部背内側部に伸びた軸索終末に ChIEF が局在していた。麻酔下のラットに光ファイバーを挿入して、この軸索終末へ光照射を行うと、褐色脂肪組織交感神経の群放電活動

図1：神経抑制剤を用いて前脳領域の活動を抑制した結果



の活性化を惹起し、それに伴う褐色脂肪組織温度の上昇ならびに脈拍・血圧の上昇などストレス様の生理反応が観察できた。これらの反応はグルタミン酸受容体の拮抗薬である AP5/CNQX を視床下部背内側部に微量注入することで消失した (図2)。



(図2) *in vivo* 生理実験結果

本研究のこれまでの結果から、前脳領域から視床下部背内側部へ直接興奮性のストレス信号を入力する神経経路の存在が明らかとなった。視床下部は広範囲の脳領域から信号を受けているが、前脳領域からストレス信号を受けているという報告は未だなされておらず、現在論文を執筆し海外の英文雑誌へ投稿の準備を進めている。さらに、扁桃体から前脳領域への神経経路の存在は古くから報告されており、特に近年の研究から前脳領域は扁桃体基底外側核 (Basolateral Amygdala) からも恐怖記憶を惹起させる入力を受けていることが報告されている (Gwendolyn G C & Kay M T, Nature Neuroscience,

18(10), 1394-1404, 2015)。本研究においても、前脳領域へCTbを注入しストレスを与えることで、扁桃体基底外側核から前脳領域へ出力するニューロンがストレスによって活性化する結果を得ている。このことから、扁桃体から前脳領域への経路が負の情動記憶の想起を行い、そのストレス信号が前脳領域を介して視床下部背内側部へ入力されていることが強く示唆されている。今後も引き続き負の情動記憶を想起するメカニズムを明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Koba S, Hanai E, Kumada N, Kataoka N, Nakamura K, Watanabe T.

Sympathoexcitation by hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla

Journal of Physiology – LONDON, 596, 4582-4595, 2018 (査読有り) doi: 10.1113/JP276223

2. Yahiro T, Kataoka N, Nakamura Y, Nakamura K.

The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation

Scientific reports, 7, 1-10, 2017 (査読有り) <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05327-8>

3. Shon J, Okamoto S, Kataoka N, Kaneko T, Nakamura K, Hioki H. Differential Inputs to the Perisomatic and Distal-Dendritic Compartments of VIP-Positive Neurons in Layer 2/3 of the Mouse Barrel Cortex.

Front. Neuroanat., 10, 1-18, 2016 (査読有り) doi: [10.3389/fnana.2016.00124](https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00124)

[学会発表] (計 7 件)

1. 心理ストレス性交感神経反応を駆動する神経回路の解析, 片岡直也, 中村和弘, 第36回神経行動薬理若手の集い(岡崎), 2018年6月30日

2. 心理ストレス性交感神経反応を駆動する腹側前頭前皮質-視床下部経路, 片岡直也, 中村和弘, 新学術領域研究「温度生物学」第4回領域会議 若手の会(沖縄), 2018年6月26-27日

3. 心理ストレス性交感神経反応に関与する視床・皮質領域の探索, 片岡直也, 中村和弘, 第13回環境生理プレコングレス(高松), 2018年3月30日

4. 心理ストレス性交感神経反応に関与する視床・皮質領域の探索, 片岡直也, 中島啓介, 加藤領一, 中村和弘, 新学術領域研究「温度生物学」第3回領域会議 若手の会(名古屋), 2018年1月19日

5. 心理ストレス性交感神経反応に関与する視床・皮質領域の探索, 片岡直也, 中村和弘  
第45回 自律神経生理研究会(新宿), 2017年12月2日

6. 心理ストレスによって惹起された交感神経反応を促進させる直接の前頭前皮質-視床下部神経経路, 片岡直也, 中村和弘, 第40回 日本神経科学大会(幕張), 2017年7月20-23日

7. A ventral medial prefrontal cortex–dorsomedial hypothalamus monosynaptic pathway that drives sympathetic stress responses, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Experimental Biology 2017 (Chicago, USA), 2017年4月17-21日

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。