

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06515

研究課題名(和文) 恐怖刺激による急激な体温・心拍数低下を引き起こす脳内緊急用スイッチの探索・同定

研究課題名(英文) Identification of neural pathway involving innate fear-induced hypothermia and bradycardia

研究代表者

櫻井 勝康 (Sakurai, Katsuyasu)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：70507920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物が環境の変化に適応しその生体恒常性を維持するためには、様々な生理反応の変化が起こる。生死に関わる強烈的な恐怖に直面した場合の生理反応の変化は非常に早いため、脳内には体温や心拍数を急激に変化させることのできる緊急用スイッチとして機能する脳領域および神経細胞群が存在すると考えられる。しかし現在のところ、そのような緊急用スイッチは同定されていない。本研究課題では、げっ歯類(マウス)に対して本能的恐怖行動を引き起こす匂い物質である2MTが尾からの放熱によって体温低下を引き起こすことを明らかにした。さらに、この生理反応が、外側傍小脳脚核-視床下核-孤束核を介して引き起こされることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含めた哺乳類のような恒温動物では、体温が一定の温度に保たれている。しかし、恐怖を含めた情動の変化によって、一定に保たれていた体温が急激に変化する。特に、生死に関わるような強烈的な恐怖下では、体温の低下が引き起こされることがあるが、その脳内メカニズムは明らかにされていなかった。本研究では、マウスの本能的恐怖刺激モデルを用いて、恐怖刺激に対する急激な体温低下に関与する新規の神経回路を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Emotions such as fear can trigger acute changes in body temperature accompanying defensive behaviors to enhance survival in life-threatening conditions. The neural mechanisms of fear-associated thermoregulation remains unknown. In this project, we found that innate fear odor 2-methyl-2-thiazoline (2MT) evokes rapid hypothermia and elevated tail temperature, indicative of vasodilation-mediated heat dissipation, in wild-type mice, but not in mice lacking *Trpa1*, a chemosensor for 2MT. We identified posterior subthalamic nucleus (PSTh) as a novel thermoregulatory hub through comparative c-fos mapping, opto-/chemo-genetics, and neural circuit/cell type specific neural manipulations. We discovered a novel PBel-PSTh-NTS circuit, whereby 2MT-evoked innate fear signal was transmitted from the external lateral parabrachial subnucleus (PBel) to the nucleus of the solitary tract (NTS) through PSTh to induce innate fear-associated hypothermia and tail vasodilation.

研究分野：神経科学

キーワード：体温 恐怖 視床下核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は恐怖刺激に対し、生存戦略として最も適切な行動・生理的反応を無意識に選択・実行する。行動反応は大きく分けて、積極的な反応である逃走、闘争、消極的な反応であるすくみ(フリージング)に分けることができる。生理反応の変化は、それぞれの行動反応によって異なる様態を呈する。例えば、逃走、闘争などの積極的な行動反応では、体温・心拍数の上昇が認められる。

関西医科大学の小早川博士らが同定した齧歯類に恐怖反応を引き起こす匂い物質である 2-methyl-2-thiazoline(2MT)は、キツネの糞便に含まれる 2,3,5-trimethyl-3-thiazoline(TMT)の類似体である(Isosaka et al., 2015, Cell)。我々の研究室では小早川博士らとの共同研究によって、2MT が三叉神経の Trpa1 に受容されることにより、マウスの恐怖行動(すくみ行動)が引き起こされることを明らかにしている(Wang et al., 2018, Nature Communications)。さらに興味深いことに、小早川博士らは、この恐怖刺激(恐怖刺激臭)である 2MT は、マウスの急激な体温低下および心拍数の低下を引き起こすことを見出していた。様々な恐怖刺激に適切に対応して生存確率を高めるためには瞬時の反応が必要であることから、脳内には体温、心拍数を急激に変化させる緊急用スイッチが存在すると考えられる。すなわち、感覚器で受容された恐怖刺激の情報は直ちに脳に伝達され、状況に応じて緊急用スイッチのオン・オフを切り替えるのではないだろうか。現在のところ、恐怖刺激に対して体温・心拍数を急激に調節する緊急用スイッチとして機能する脳領域および神経細胞群は同定されていない。

2. 研究の目的

生物が環境の変化に適応しその生体恒常性を維持するためには、体温や心拍数の変化など、様々な生理反応の変化が起こる。このような生理反応の変化に比べ、生死に関わる強烈な恐怖に直面した場合の生理反応の変化は非常に早いため、脳内には体温および心拍数を急激に変化させることのできる緊急用スイッチとして機能する脳領域および神経細胞群が存在すると考えられる。しかし現在のところ、そのような緊急用スイッチは同定されていない。そこで本研究では、恐怖刺激に対する生理反応の中で急激な体温・心拍数の変化を制御する緊急用スイッチとして機能する脳領域・神経細胞群を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

・マウス：野生型マウス、Trpa1 ノックアウト(Trpa1-KO)、vGlut2-Cre マウス、Fos^{TVA} マウスを用いた。

・体温計測：体表の温度はサーマルカメラで、深部体温はテレメトリーで測定した。

・Fos マッピング：2MT を嗅がせたマウスの脳をサンプリングし、薄切切片を作成、Fos 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、恐怖刺激によって活性化する神経細胞を可視化した。

・ウイルスおよび色素注入：マウスを脳定位固定装置に固定。イソフルランによる麻酔下で標的脳部位に目的のウイルスもしくは色素(逆行性に輸送される蛍光色素である CTB)を注入した。ウイルスもしくは色素を注入したマウスは、目的遺伝子の発現や色素の輸送を十分に待った後に、神経活動の刺激、抑制実験や神経回路の可視化の実験に用いた。

・神経活動操作：神経活動はオプトジェネティクス、ケモジェネティクス、テタヌス毒素によって操作した。

4. 研究成果

2MT による体温低下の確認

野生型マウスにおける 2MT による体温の低下を確認するために、体表および体内の体温変化を測定した。その結果、体表、体内の温度共に、2MT によって急激に低下することを確認した。その際、尾の周辺の体表の温度は一時的に上昇することを見出した。したがって、2MT による体温の低下は、血管拡張に伴う放熱反応によって引き起こされている可能性が示唆された。また、同様の 2MT による体温変化の測定を、2MT に対して恐怖反応を示さない Trpa1-KO を用いて行った。その結果、Trpa1-KO では体温の変化は観察されなかった。

2MT によって活動する脳領域の同定

2MT によって活動した脳領域は、体温低下に関与していると考えられる。そこで、2MT によって活動する脳領域の同定を、全脳 Fos マッピングにより行った。その際、2MT による体温低下が

認められる野生型マウスと、体温低下が認められない *Trpa1-KO* マウスにおける Fos 発現パターンを比較した。興味深いことに、体温低下に関与すると考えられている視床下部の神経核である内側視索前野 (MnPO) と視索前野腹内側部 (VMP0) では、2MT による Fos 陽性細胞は、野生型マウスに比べて *Trpa1-KO* のほうが多く認められた。したがって、これらの脳領域は 2MT によって抑制され、体温低下の誘発に直接的には関わっていないことが示唆された。野生型のマウスにおいて多くの Fos 陽性細胞が観察された脳領域は、外側傍小脳脚核 (PBeI)、視床下核 (PSTh) および孤束核 (NTS) であり、これらの脳領域が 2MT による尾からの放熱に伴う体温低下に関与することが示唆された。

2MT による体温低下に関与する神経経路の同定

NTS は体温調節を含む様々な生理反応に関わっている脳領域のひとつである。NTS に逆行性トレーサーの一種である蛍光標識されたコレラ毒素サブユニット (CTB488) を注入し、その入力先を可視化した。その際、Fos 染色も行うことにより、NTS に入力する脳領域の中で、2MT によって活動する領域の網羅的探索を行った。その結果、PSTh において多くの CTB/Fos 共標識細胞が観察された。このことから、PSTh-NTS 経路が 2MT による体温低下に関与していることが示唆された。この可能性を検証するために、逆行性感染するアデノ随伴ウイルス (テタヌス毒素軽鎖を発現) を用いた PSTh-NTS 経路の特異的抑制、もしくはケモジェネティクスによる PSTh の神経細胞の特異的抑制 (*vGlut2-Cre* マウス) を行った。その結果、これらのマウスでは、2MT による尾からの放熱と体温低下が部分的に抑制された。次に、オプトジェネティクスを用いて PSTh-NTS 経路を光照射によって活性化した。その際、NTS は前後に長いため、光ファイバーの留置位置を前部、後部に分けた。その結果、NTS の前部での刺激において、非常に顕著な体温低下、さらには尾の周辺からの温度上昇が認められた。これらの結果から、PSTh-NTS の経路が 2MT による尾からの放熱に伴う体温低下に関与していることが強く示唆された。我々はこれまでに、2MT は三叉神経によって受容され、その情報が脳内に伝達されることを明らかにしていた。三叉神経を介した 2MT の刺激情報がどのような神経経路によって PSTh に伝達されるのかを明らかにするために、逆行性トレーサーと Fos 発現の可視化を行うことにより、PSTh の上流脳領域の探索を行った。その結果、PBeI において多くの CTB/Fos 共標識細胞が観察された。PBeI-PSTh の神経経路が 2MT による体温低下に関与するのかが検証するために、オプトジェネティクス、ケモジェネティクスによる神経経路、もしくは細胞種特異的な操作、さらには神経活動依存的に活性化した神経細胞のみを標識、操作することのできる CANE システム (Sakurai et al., 2016, Neuron) を用いて、2MT によって活性化する神経細胞の標識、操作を行い、Fos 発現細胞と、体温低下の因果関係を検討した。その結果、PBeI-PSTh 経路が活性化することにより、体温低下が引き起こされることを明らかにした。以上の結果から、2MT による尾からの放熱および体温低下は、PBeI-PSTh-NTS という新規の神経経路が活動することによって引き起こされることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu Can, Lee Chia-Ying, Asher Greg, Cao Liqin, Terakoshi Yuka, Cao Peng, Kobayakawa Reiko, Kobayakawa Ko, Sakurai Katsuyasu, Liu Qinghua	4. 巻 12
2. 論文標題 Posterior subthalamic nucleus (PSTh) mediates innate fear-associated hypothermia in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22914-6	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------