

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06954

研究課題名（和文）網羅的光観察技術を応用した心理ストレス反応の発現に関わる高次中枢神経回路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of higher central nervous circuits involved in inducing of psychological stress responses using by real-time multiple fiber-photometry

研究代表者

片岡 直也（Kataoka, Naoya）

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：20572423

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）：研究代表者は、前頭前皮質の上位に位置する多数の神経核が複雑な神経ネットワークを形成し、相互に神経活動のバランスを制御することで心理ストレス反応の強弱を決定していると仮説をたてた。本研究は、ストレス反応を惹起する腹側部と、ストレス反応を抑制する背側部のそれぞれに入力する上位の神経ネットワークの全容を明らかにすることを目的とし、神経回路ネットワーク全体のバランスを捉えるために、マルチファイバーフォトメトリー法を確立し、6カ所の脳領域の神経活動をin vivo同時計測することに成功した。さらに、神経活動計測と同時に末梢のストレス反応の同時計測も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の情報処理メカニズムを解明するためには、多数のニューロン群の活動をin vivoで同時計測し、その活動変化を解析する必要がある。従来の神経活動の測定には、パッチクランプ法などが用いられてきたが、この方法では多数の神経細胞の活動をin vivoで同時計測するのは困難であった。また、生体反応は1-2カ所の神経活動だけで駆動されておらず、様々な脳領域同士が協調して生体恒常性を維持している。本研究を通じて、心の高次中枢ネットワークの一端と末梢生理反応の同時計測に成功したことから、将来的に我々が「ストレス」と呼ぶものの神経科学的実態を明らかにする技術的基盤ができた。

研究成果の概要（英文）：We predicted that a number of brain sites located upstream of the prefrontal cortex form a complex neural network. We hypothesized that this neural network determines the intensity of psychological stress responses by regulating the balance of neural activities among the upstream sites. The mPFC is divided into the ventral part (vmPFC) that triggers stress responses and the dorsal part (dmPFC) that suppresses the stress responses. In this study, multi-fiber photometry was established to capture the activity balance of the neural networks involving the vmPFC and dmPFC. Using this technique, we succeeded in simultaneously measuring neural activities in six brain regions in vivo. In addition, simultaneous measurement of neural activity and peripheral stress responses was also conducted.

研究分野：神経生理学

キーワード：網羅的神経ネットワーク 心理ストレス イメージング 交感神経反応

1. 研究開始当初の背景

心理ストレスによって起こる生理反応や病態のメカニズムとなる神経回路基盤には不明な点が多い。ストレス関連疾患の病態機序の解明が進まない原因として、複雑な脳内ネットワークの解析が困難であることや、心理ストレスの種類や強度によってストレス疾患の表現型が様々に変化することが挙げられ、その解析の難しさに拍車をかけている。

代表者はこれまでに心理ストレス関連疾患の一つである「心因性発熱」の脳内メカニズムを明らかにするため、人間関係のストレスに近い動物の心理ストレスモデルで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上昇や頻脈を引き起こす神経経路の解析を行ってきた。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、解熱剤が効かないため治療が難しい⁽¹⁾。代表者は、社会的敗北ストレスを与えられたラットの脳内では、視床下部背内側部(DMH)から延髄縫線核(rMR)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神経伝達が強まり、褐色脂肪熱産生や頻脈を駆動することを、光遺伝学や行動薬理学、免疫組織化学実験などを駆使して証明した⁽²⁾。さらに DMH へストレス信号を入力する脳領域の探索を行った結果、前頭前皮質(mPFC)の中でも腹側部(ventral medial prefrontal cortex: vmPFC)のグルタミン酸作動性神経細胞群が DMH へ興奮性信号を直接入力することでストレス反応を惹起することが明らかとなった⁽³⁾。一方、前頭前皮質の中でも背側部(dorsal medial prefrontal cortex: dmPFC)に分布する神経細胞群は、血圧・脈拍の低下などストレス反応や恐怖反応を抑制することが報告されている^(4, 5)。このことから、前頭前皮質は背側部と腹側部で心理ストレス反応に対する機能が正反対であり、これら2つの脳領域の活動は、さらに上位の脳領域からの入力によって活動バランスが制御されることが示唆される。代表者の予備実験から、vmPFC や dmPFC の上位では複数の神経核が複雑な神経ネットワークを形成していることが示唆されており、そのネットワークの構成要素の一つ一つが協調して脳領域間の神経活動バランスを制御することによって、多様な心理ストレス反応の出力トーンを決定しているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、前頭前皮質へストレス信号を入力する複数の脳領域を対象に、ファイバーフォトメトリーを応用した神経活動の *in vivo* 多点光計測技術(マルチファイバーフォトメトリー)を用いて、神経細胞の活動を同時観察する Ca^{2+} イメージング解析を *in vivo* で行う。そして、vmPFC と dmPFC のそれぞれにストレス信号を入力する神経細胞群同士の活動の違いと、熱産生や血中ストレスホルモン濃度の変化といったストレス反応発現との連関を網羅的に捉えることで、心理ストレス反応の発現に関わる高次中枢神経ネットワーク機構を明らかにすることを目的とする。この高次中枢神経ネットワークを明らかにすることにより、私たちが「ストレス」と呼ぶものの神経科学実態の理解につなげる。

3. 研究の方法

A. 前頭前皮質へストレス信号を入力する脳領域の組織化学的同定

当初の予定では、これまで研究代表者が研究対象としていたラットを実験に用いる計画であったが、ラットの社会的敗北ストレス実験は雄同士が激しく攻撃し合うため、頭部に接続する光ファイバーが破損することが懸念された。そこで、本研究では実験動物をマウスに変更した。マウスでも mPFC へ入力する神経核がラットと同様であるか確認するため、マウス vmPFC へ逆行性神経トレーサー(CTb: コレラ毒素 b-サブユニット)を注入してこれらの領域に投射する神経細胞群を標識した上で、マウスに社会的敗北ストレスを与え、活性化神経細胞のマーカーである c-Fos の発現を調べ、ストレス信号を入力する上位脳領域を同定した。

B. マルチファイバーフォトメトリーを用いた心理ストレス神経回路の解析

① 逆行性にウイルス感染するアデノ随伴ウイルス(AAVrg)を vmPFC に注入し、蛍光 Ca²⁺ブローブ(GCaMP6)が上記 A で同定した上位脳領域の神経細胞に発現するか確認した。

② ①とは異なり、神経路選択的に GCaMP を発現させるため、vmPFC へ AAVrg-pgk-Cre を感染させ、vmPFC へ入力する脳領域へ Cre を発現させた。A. で明らかにした脳領域へ Cre 依存的に GCaMP を発現させる順行性感染アデノ随伴ウイルス(AAV-CAG-Flex-GCaMP6)を注入し、vmPFC へ入力する脳領域選択的に GCaMP を発現させた。

③ ①②で AAV を注入したマウスの目的脳領域の直上にファイバーカニューラを留置した。近接する光ファイバーから漏れ出した光を検出することを防ぐため、デンタルセメントに活性炭を混ぜ込み光を透過させない「黒いデンタルセメント」を用いて、ファイバーカニューラをマウス頭蓋骨に固定した。

④ マルチファイバーフォトメトリーセットアップを Kim らの報告⁽⁶⁾を基に Thorlabs 社の光学系を用いて立ち上げた。光の検出には sCMOS カメラを用いた(図1)。

⑤ ファイバーカニューラを留置したマウスに、脈拍・血圧・体温測定用のテレメトリー送信機を埋め込み、ストレス反応の経時的観察を行った。このマウスに社会的敗北ストレスを与え、マルチファイバーフォトメトリー解析と末梢生理反応変化の同時記録を行った。475 nm の励起光を照射して Ca²⁺イオン濃度依存的な蛍光を観察した後、410 nm の励起光を照射することで得られる Ca²⁺イオン濃度非依存的な蛍光に対する比を算出した。同時記録した複数の脳領域の活動変化や熱産生・脈拍などの生理反応変化の時系列データから、各神経細胞群の機能的寄与を算出した。

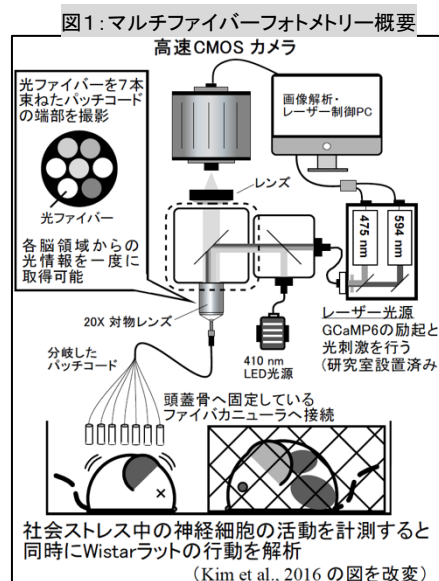
4. 研究成果

本研究ではまず、マウス vmPFC へ入力する脳領域の同定を行った。vmPFC へ逆行性トレーサー、CTb を微量注入することで、vmPFC へ入力する神経細胞を可視化した。このマウス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、視床室傍核(PVT)などの脳領域から vmPFC へ投射する神経細胞の中で、活性化神経のマーカーである c-Fos を発現するものが増加していた。つまり、これらの脳領域から vmPFC へ心理ストレス信号が入力されることが示唆された。

さらに、vmPFC へ入力する神経細胞に GCaMP6 を発現させる実験(B. ①)を行い、免疫組織染色の結果、PVT をはじめとする複数箇所に GCaMP6 が発現していることが明らかとなった。この AAVrg を用いた実験結果は、CTb トレーサーを用いて vmPFC へ入力する神経細胞の分布と一致していた。しかしながら、AAVrg を用いて神経細胞に GCaMP6 を発現させる方法では GCaMP6 のシグナルが非常に弱い事があきらかとなり、ファイバーフォトメトリーでは蛍光観察が難しいと予想された。

続いて、B.②の実験を行った結果、B.①と同様の脳領域に多くの GCaMP6 が発現していることが明らかとなった。このことから、本研究における神経活動観察には B.②の方法を用いることとした。

当初の計画では、励起光照射や蛍光観察のためのカメラ制御などを MATLAB 上でおこなう予定であったが、MATLAB スクリプトが作動しなかった。このことから、イメージングソフトウェアを導入し、それに連動する LED 光源を制御しながら画像解析を行った結果、脳領域6カ

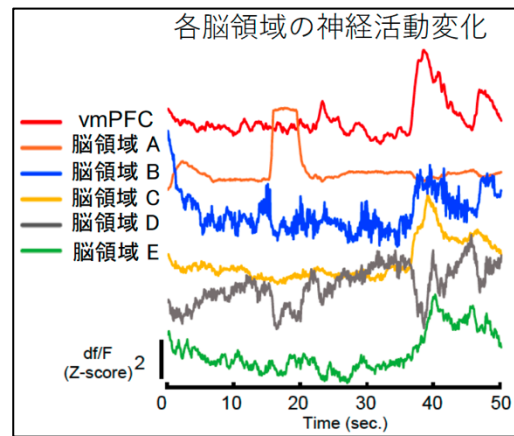


所への励起光の照射と蛍光観察を行う事に成功した(図2)。

上記の動物を攻撃的な ICR オスマウスがいるケージに移し、実験対象マウスが ICR に攻撃された後、両者をアクリル板で遮り、実験対象マウスに強い心理ストレスを与えた。アクリル板で遮った直後を0分とし、マルチファイバフォトメトリ観察を行い、その後5分後、10分後、30分後に1分間ずつの神経活動変化と末梢生理反応の同時記録を行った。

本研究期間内では、MATLAB 制御に多大な時間を要してしまい **dmPFC** へ入力する脳領域のマルチファイバフォトメトリを開始するまでに時間を要してしまった。今後は、**vmPFC** 同様にウイルスの注入を行い、社会的敗北ストレスを与えることで **dmPFC** へ入力する脳領域間での神経活動変化と末梢ストレス反応の同時記録を行う予定である。これらのデータから **vmPFC**、**dmPFC** のそれぞれに入力する脳領域間での神経活動の違いと、頻脈や体温変化といった末梢ストレス反応との相関関係を明らかにしたい。

図2: 異なる6カ所の脳領域の神経活動変化



<引用文献リスト>

1. Oka T., Psychogenic fever: how psychological stress affects body temperature in the clinical population. *Temperature*, 2, 368-378, 2015
2. Kataoka N. et al., Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell Metab.*, 20, 346-358, 2014
3. Kataoka N. et al., A central master driver of psychosocial stress responses in the rat. *Science*, 367, 1105-1112, 2020
4. McDougall SJ. et al., Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur J Neurosci.*, 20, 2430-2440, 2004
5. Do-Monte FH. et al., Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *J Neurosci.*, 35, 3607-3615, 2015
6. Kim CK. et al., Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat. Methods.*, 13, 325-328, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kazuhiro Nakamura, Yoshiko Nakamura and Naoya Kataoka	4. 巻 23
2. 論文標題 A hypothalamomedullary network for physiological responses to environmental stresses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	6. 最初と最後の頁 35-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41583-021-00532-x	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 Yoneshiro Takeshi, Kataoka Naoya, Walejko Jacquelyn M, Ikeda Kenji, Brown Zachary, Yoneshiro Momoko, Crown Scott B, Osawa Tsuyoshi, Sakai Juro, McGarrah Robert W, White Phillip J, Nakamura Kazuhiro, Kajimura Shingo	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolic flexibility via mitochondrial BCAA carrier SLC25A44 is required for optimal fever	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.66865	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
1. 著者名 片岡直也、中村和弘	4. 巻 58
2. 論文標題 心理ストレスに対する交感神経反応と行動反応の中樞神経メカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 133-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kataoka N, Takeuchi T, Kusudo T, Li Y, Endo Y, Yamashita H	4. 巻 1866
2. 論文標題 Lack of UCP1 stimulates fatty liver but mediates UCP1-independent action of beige fat to improve hyperlipidemia in Apoe knockout mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.	6. 最初と最後の頁 165762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2020.165762	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 Kataoka N, Shima Y, Nakajima K, Nakamura K	4. 巻 367
2. 論文標題 A central master driver of psychosocial stress responses in the rat.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1105-1112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaz4639	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 Hashimoto M, Kusudo T, Takeuchi T, Kataoka N, Mukai T, Yamashita H	4. 巻 33
2. 論文標題 CREG1 stimulates brown adipocyte formation and ameliorates diet-induced obesity in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 8069-8082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802147RR	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 Nakamura Yoshiko, Yahiro Takaki, Fukushima Akihiro, Kataoka Naoya, Hioki Hiroyuki, Nakamura Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons bidirectionally control body temperature via tonic GABAergic signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadd5463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.add5463	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 Koba Satoshi, Kumada Nao, Narai Emi, Kataoka Naoya, Nakamura Kazuhiro, Watanabe Tatsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 A brainstem monosynaptic excitatory pathway that drives locomotor activities and sympathetic cardiovascular responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32823-x	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 Fukushima Akihiro, Kataoka Naoya, Nakamura Kazuhiro	4. 巻 40
2. 論文標題 An oxytocinergic neural pathway that stimulates thermogenic and cardiac sympathetic outflow	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111380 ~ 111380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111380	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13件(うち招待講演 8件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 片岡直也、嶋裕太、中村和弘
2. 発表標題 Central circuit mechanisms of sympathetic and behavioral responses to psychological stress
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 第1回CJK国際会議(神戸、Web)(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片岡直也、中村和弘
2. 発表標題 Perspectives on psychosomatic research
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会(仙台、Web)(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片岡直也、伊藤綾香、中島啓輔、菅波孝祥、中村和弘
2. 発表標題 心と身体をつなぐ脳の神経路メカニズム
3. 学会等名 温熱生理研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片岡直也、嶋裕太、中村和弘
2. 発表標題 A psychosomatic pathway from the prefrontal cortex to the hypothalamus that drives physiological responses to psychological stress
3. 学会等名 第98回日本生理学会（名古屋、Web）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片岡直也
2. 発表標題 心と身体をむすぶ心身相関メカニズム
3. 学会等名 若手新分野創成ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片岡直也
2. 発表標題 心理と生理をつなぐ脳の神経回路メカニズム
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡直也、嶋裕太、中村和弘
2. 発表標題 心理ストレス性交感神経反応を駆動する脳神経回路
3. 学会等名 2020年度温熱生理研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡直也、嶋裕太、中村和弘
2. 発表標題 心理ストレスに対する交感神経および逃避行動反応の中枢回路メカニズム
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（別府）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡直也、嶋裕太、中島啓輔、中村和弘
2. 発表標題 心理ストレス性交感神経反応を制御する脳神経経路の同定
3. 学会等名 第72回日本自律神経学会総会（北九州）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoya Kataoka, Yuta Shima, Kazuhiro Nakamura
2. 発表標題 A cortico-hypothalamic pathway that mediates sympathetic and behavioral responses to psychosocial stress
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (Chicago)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡直也、中村和弘
2. 発表標題 腹側前頭前皮質 視床下部経路は心理ストレス性交感神経反応を駆動する
3. 学会等名 新学術領域 温度生物学若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡直也
2. 発表標題 心理ストレス性交感神経反応を引き起こす心身相関メカニズム
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（名古屋）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片岡直也、中村和弘
2. 発表標題 Psychosomatic correlation mechanism driving psychological stress responses
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会（京都）（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 片岡直也、中村和弘	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 147
3. 書名 実験医学2020年9月号	

1. 著者名 片岡直也、中村和弘	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 139
3. 書名 実験医学2022年12月号	

〔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
---------	---------