

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03389

研究課題名（和文）分界条床核での神経情報伝達可塑的变化に着目した抑うつ・不安情動生成の分子機構解明

研究課題名（英文）Study on the neuronal mechanisms for the induction of depression and anxiety focusing on plastic changes in neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis

研究代表者

南 雅文（MINAMI, Masabumi）

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20243040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究結果により、慢性痛による不安亢進の神経機構として以下のような機構が示された。1) 慢性痛により分界条床核内の抑制性神経の興奮性が増大、2) これにより外側視床下部に投射する分界条床核神経への抑制性シナプス伝達が増大、3) 外側視床下部に投射する分界条床核神経の出力低下により下流への情報伝達が障害されることで不安が惹起される。さらに、外側腕傍核からの神経投射が分界条床核神経に痛みの情報を伝達している可能性を示した。また、分界条床核から外側視床下部に投射する神経の約半分が腹側被蓋野にも投射し、分界条床核から腹側被蓋野に投射する神経の約半分が外側視床下部にも投射してい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

本研究結果から、慢性痛時に分界条床核から外側視床下部や腹側被蓋野に投射する神経の活動が抑制されることにより、抑うつや不安などの負情動が惹起されることが示された。本研究結果は、慢性痛による不安・抑うつへの惹起に關与する神経基盤の一端を明らかにしたものであり、国際的にも高く評価される学術誌に掲載された。また、これらの知見は、不安障害やうつ病などの精神疾患の神経機構解明や治療薬開発に資することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The results of this study demonstrate the following neural mechanisms by which chronic pain induces anxiety: 1) chronic pain increases the excitability of intrinsic inhibitory neurons in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), 2) activation of intrinsic BNST neurons increases inhibitory synaptic inputs to the BNST neurons projecting to the lateral hypothalamus (LH), and 3) the reduced outputs from the BNST to the LH impairs downstream neurotransmission that in turn induces anxiety. Furthermore, this study shows the possibility that the neurons projecting from the lateral parabrachial nucleus transmit pain information to BNST neurons. We also found that about half of the BNST neurons projecting to the LH also project to the ventral tegmental area (VTA), and about half of the BNST neurons projecting to the VTA also project to the LH.

研究分野：神経薬理学

キーワード：不安 抑うつ 分界条床核 慢性痛 ストレス 情動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含む哺乳類は、危険な時間帯や場所において、また、疾患や傷害を患った際に、自らの行動を抑制し(抑うつ) 周囲に対する警戒を高める(不安) ことで身を守る生体防御システムとして、抑うつ・不安情動生成機構を獲得・進化させてきたと考えられる。したがって、うつ病や不安障害のメカニズムを理解するためには、生体防御システムとしての抑うつ・不安の神経機構・神経回路を明らかにした上で、患者あるいは病態モデル動物においてその神経機構・神経回路がどのように変化しているかを解析することが必要である。

(2) 申請者はこれまでに、分界条床核 (bed nucleus of the stria terminalis, BNST) でのコルチコトロピン放出因子 (CRF) を介した神経情報伝達が、急性的な痛みにより引き起こされる嫌悪反応に関与することを明らかにするとともに、慢性痛モデル動物において、分界条床核での CRF を介した神経情報伝達の可塑的变化が脳内報酬系の持続的抑制を引き起こすことにより、抑うつ状態が惹起されることを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、分界条床核での神経情報伝達可塑的变化の分子機構を明らかにすることにより、慢性痛時の抑うつ・不安の脳内メカニズムを明らかにし、それを足掛かりとして、うつ病や不安障害のメカニズムに迫ることを目的とする。具体的には、分界条床核内の神経情報伝達可塑的变化に焦点を当て、行動薬理学・電気生理学などの従来の解析手法に加え、化学遺伝学・光遺伝学による神経機能解析などの先端的な解析手法を融合的に用い、慢性痛およびうつ病モデル動物における抑うつ・不安情動生成の神経機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 使用動物：実験には雄性の C57BL6JmsSlc マウス (Japan SLC) Tg (Cartpr-cre) 1Aibs/J (CART-Cre マウス, Jackson Laboratory) あるいは CRF-Cre:Rosa26-LSL-tdTomato (Ai9) ヘテロマウスを使用した。実験は、北海道大学あるいは名古屋大学の動物実験委員会の承認のもと行われた。

(2) 慢性痛モデル動物作製と疼痛評価：坐骨神経に由来する総腓骨神経と脛骨神経を結紮・切断 (spared nerve injury, SNI) することにより作製したマウス神経障害性疼痛モデルを慢性痛群 (SNI 群) として用いた。神経の露出のみを行ったマウスを対照群 (Sham 群) とした。手術前と術後 1 週間ごとに 4 週間に渡って von Frey フィラメントを用いて疼痛閾値を計測し (von Frey テスト) 疼痛閾値の低下が 4 週間持続して観察されたマウスを慢性痛群 (SNI 群) として用いた。

(3) 脳局所投与：外側視床下部 (lateral hypothalamus, LH) に投射する BNST ニューロン (LH 投射型 BNST ニューロン) へのシナプス伝達を調べるため、LH に蛍光標識された逆行性神経トレーサーを局所注入した。LH 投射型 BNST ニューロンに hm4Di (抑制性 DREADD) あるいは hm3Dq (興奮性 DREADD) を発現させるため、注入領域へ投射するニューロンに Cre リコンビナーゼを発現させる AAV2-retro/CAG-Cre を LH に、Cre 依存的に hm4Di/ hm3Dq を発現させる AAV5-hSyn-DIO-hm4Di-mCherry/AAV5-hSyn-DIO-hm3Dq-mCherry を BNST に局所注入した。対照群の BNST には、mCherry のみを発現させる AAV5-hSyn-DIO-mCherry を注入した。BNST 内の oval 領域に存在し、神経ペプチドである CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) を発現する BNST ニューロン (ovBNST-CART ニューロン) に、選択的にチャネルロドプシン (ChR2)、hm4Di あるいは mCherry を発現させるため、CART-Cre マウスの BNST に AAV5-DIO-hSyn-ChR2-EYFP、AAV5-hSyn-DIO-hm3Dq-mCherry あるいは AAV5-hSyn-DIO-mCherry を局所注入した。外側腕傍核 (lateral parabrachial nucleus, LPBN) から ovBNST-CART ニューロンへの入力の特異性解析のため、CART-Cre マウスの BNST に AAV9-hSyn-DIO-mCherry を、LPBN に AAV9-hSyn-hChR2-EYFP をそれぞれ局所注入した。

(4) 行動試験：Open arm での滞在時間を不安様行動の指標とする高架式十字迷路テストおよび light side での滞在時間を不安様行動の指標とする明暗箱テストを行った。

(5) 電気生理学的解析：マウス脳より厚さ 250  $\mu\text{m}$  の冠状断スライスを作製し、単一神経細胞の電気的応答を記録できるホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を行った。

(6) 組織学的解析：LH と腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA) に、異なる蛍光波長で蛍光標識した逆行性神経トレーサーを局所注入したのち脳切片を作製し、BNST における蛍光標識細胞を観察・解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 慢性痛による不安様行動の亢進：慢性痛群（SNI 群）では、高架式十字迷路テストにおける open arm 滞在時間および明暗箱テストにおける light side 滞在時間が、対照群（Sham 群）に比べ有意に短く、不安様行動の亢進が認められた。

(2) 慢性痛時の LH 投射型 BNST ニューロンに対する抑制性シナプス伝達増強：BNST を含んだ脳スライスを作製し、蛍光標識された LH 投射型 BNST ニューロンからホールセルパッチクランプ法によりシナプス伝達を記録したところ、LH 投射型 BNST ニューロンにおける自発的抑制性シナプス後電流（spontaneous inhibitory post-synaptic current, sIPSC）の頻度が、対照群（Sham 群）と比較して、慢性痛群（SNI 群）で有意に増加していた。慢性痛により LH 投射型 BNST ニューロンが抑制され出力が低下することが考えられる。

(3) LH 投射型 BNST ニューロンの出力低下による不安惹起：慢性痛による不安惹起と、LH 投射型 BNST ニューロン出力低下との因果関係を調べた。健常マウスの LH に AAV2-retro/CAG-Cre を、BNST に AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を投与することで、LH 投射型 BNST ニューロン特異的に hM4Di を発現させた。hM4Di は、人工リガンドである Clozapine-n-oxide (CNO) と特異的に結合して神経細胞を過分極させる。LH 投射型 BNST ニューロンで hM4Di を発現するマウスに CNO を投与すると、高架式十字迷路テストにおける open arm 滞在時間および明暗箱テストにおける light side 滞在時間が、hM4Di を発現しない対照群に比べ有意に減少した。一方で、von Frey テストにおいて疼痛閾値の低下は認められなかった。これらの結果は、LH 投射型 BNST ニューロンの抑制が、痛みの感覚的側面に影響を及ぼさず不安を惹起させることを示している。

(4) 慢性痛時の不安亢進に対する LH 投射型 BNST ニューロン活性化の効果：LH 投射型 BNST ニューロンに、CNO が結合すると神経細胞を脱分極させる受容体である hM3Dq を発現させた。高架式十字迷路テストにおいて、Sham 群では LH 投射型 BNST ニューロン活性化による open arm 滞在時間の変化は認められなかったが、慢性痛モデルマウスでは open arm 滞在時間の減少が LH 投射型 BNST ニューロン活性化により消失した。また、von Frey テストにおいて疼痛閾値の回復傾向も見られた。これら結果は、LH 投射型 BNST ニューロンの活性化が慢性痛による不安惹起を軽減することを示している。

(5) ovBNST-CART ニューロンによる LH 投射型 BNST ニューロンの抑制性調節：慢性痛により LH 投射型 BNST ニューロンへの抑制性シナプス伝達が増強するメカニズムを明らかにするため、LH 投射型 BNST ニューロンに抑制性入力を行う神経について検討した。ovBNST-CART ニューロンに光感受性イオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 (Chr2) を Cre 依存的に発現させ、逆行性神経トレーサーにより LH 投射型 BNST ニューロン蛍光標識したマウス脳より冠状断スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を行った。青色光照射により Chr2 を発現した ovBNST-CART ニューロンを選択的に活性化すると、83.3%（18 細胞中 15 細胞）の LH 投射型 BNST ニューロンで抑制性シナプス伝達が増強されたことから、ovBNST-CART ニューロンが LH 投射型 BNST ニューロンに抑制性シナプスを形成していることが示された。

(6) 慢性痛による ovBNST-CART ニューロンの興奮性増大：慢性痛により ovBNST-CART ニューロンの興奮性が増大するかを検討した。ovBNST-CART ニューロンに Cre 依存的に蛍光タンパク質を発現させることで蛍光標識し、ホールセルパッチクランプ記録を行うことで、電気生理学的特性を解析した。その結果、慢性痛モデルマウスでは発火閾値および基電流が小さいことが明らかとなった。慢性痛により ovBNST-CART ニューロンの興奮性が増大し、発火確率が上昇していることが示された。

(7) 慢性痛時の不安亢進に対する ovBNST-CART ニューロン抑制の効果：慢性痛による ovBNST-CART ニューロンの興奮性増大が、慢性痛時の LH 投射型 BNST ニューロンへの抑制性入力増大や不安亢進に関与しているかを検討した。慢性痛モデルマウスの ovBNST-CART ニューロンに Cre 依存的に hM4Di を発現させるとともに、逆行性神経トレーサーを LH へ投与することで LH 投射型 BNST ニューロンを蛍光標識した。LH 投射型 BNST ニューロンにおける抑制性シナプス伝達を測定したところ、CNO 処置による ovBNST-CART ニューロンの抑制に伴って抑制性シナプス伝達が減少することを明らかにした。次に、ovBNST-CART ニューロンに Cre 依存的に hM4Di を発現させ、不安様行動を解析した。CNO 処置による ovBNST-CART ニューロンの抑制は、慢性痛により減少していた open arm 滞在時間を増加させた。慢性痛による ovBNST-CART ニューロンの興奮性増加が、LH 投射型 BNST ニューロンへの抑制性シナプス伝達を増大させることで不安亢進に関与している可能性が示された。

(8) LPBN ovBNST 神経路の特性解析：ovBNST-CART ニューロンに痛み情報を伝達する神経経路について、痛覚情報伝達の中継核であると考えられている LPBN から BNST への経路に着目し解析を行った。CART-Cre マウスの BNST に AAV9-hSyn-DIO-mCherry を注入することで ovBNST-CART ニューロンを蛍光標識し、LPBN から BNST に投射する神経終末を選択的に刺激するために LPBN

に AAV9-hSyn-hChR2-EYFP を局所注入した後、冠状断スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。青色光照射により、LPBN から投射する神経終末を活性化したところ、記録した ovBNST-CART ニューロンのうち、100% (10 細胞中 10 細胞) で光刺激誘発興奮性シナプス後電流 (optically evoked excitatory postsynaptic currents, oEPSC) が、90% (10 細胞中 9 細胞) で光刺激誘発抑制性シナプス後電流 (optically evoked inhibitory postsynaptic currents, oIPSC) が観察された。oIPSC がピークに到達するまでの時間は、oEPSC がピークに到達するまでの時間よりも有意に長かった。また、AMPA・カイニン酸受容体アンタゴニスト CNQX (20  $\mu$ M) の処置により、oEPSC と oIPSC の両方が消失することが確認された。以上より、ovBNST-CART ニューロンは、LPBN からの興奮性入力を受けていること、抑制性入力に関しては LPBN からの抑制性神経の直接的な投射によるものではなく、分界条床核内の抑制性介在神経を介したものであることが示唆された。

(9) BNST 内の oval 領域に存在し、神経ペプチドである CRF (Corticotropin-Releasing Factor) を発現する BNST ニューロン (ovBNST-CRF ニューロン) に、選択的に tdTomato を発現させ蛍光標識した。神経障害性疼痛モデルによる慢性痛群 (SNI 群) と、神経の露出のみを行った対照群 (Sham 群) を作製し、4-5 週間後に脳スライスを作製して、ovBNST-CRF ニューロンの電気生理学的特性を比較検討したところ、ovBNST-CART ニューロン同様、ovBNST-CRF ニューロンについても、慢性痛時に興奮性が増大していることが明らかとなった。

(10) 申請者らは、慢性痛モデルラットを用いた研究により、慢性痛時に BNST から VTA に投射する神経細胞への抑制性入力が増大し、慢性痛時に見られる抑うつやアンヘドニア (快の喪失) に関与している可能性を報告している。そこで、BNST から LH に投射する神経細胞と VTA に投射する神経細胞の関連性を組織学的手法により解析したところ、BNST から LH に投射する神経細胞の約半分が VTA にも投射し、BNST から VTA に投射する神経細胞の約半分が LH にも投射していることが明らかとなった。この結果は、BNST からのアウトプットが慢性痛時に抑制されることにより、抑うつや不安などの負情動生成に関与する神経路を統合的に調節していることを示唆している。

(11) 本研究から、慢性痛による不安亢進の神経機構として以下のような機構が考えられる。1) 慢性痛により ovBNST-CART ニューロンの興奮性が増大する。2) これにより LH 投射型 BNST ニューロンへの抑制性シナプス伝達が増大する。3) LH 投射型 BNST ニューロンの出力が低下し下流への情報伝達が障害されることで不安が惹起される。さらに、LPBN ovBNST 神経路が ovBNST-CART ニューロンに痛みの情報を伝達している可能性を示すとともに、BNST 内の oval 領域に存在する ovBNST-CRF ニューロンについても、慢性痛時に興奮性が増大していることを明らかとした。また、BNST から LH に投射する神経細胞の約半分が VTA にも投射し、BNST から VTA に投射する神経細胞の約半分が LH にも投射していることから、BNST からのアウトプットが慢性痛時に抑制されることにより、抑うつや不安などの負情動生成に関与する神経路を統合的に調節している可能性が考えられた。以上の知見は、慢性痛による不安・抑うつに関与する神経基盤の一端を明らかにしたものであり、その成果の一部は、国際的にも高く評価される学術誌に掲載された。また、これらの知見は、不安障害やうつ病などの精神疾患の神経機構解明と治療薬開発に資することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamauchi, N., Sato, K., Sato, K., Murakawa, S., Hamasaki, Y., Nomura, H., Amano, T., Minami, M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Chronic pain-induced neuronal plasticity in the bed nucleus of the stria terminalis causes maladaptive anxiety.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabj5586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abj5586	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 Arakaki, S., Minami, M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Role of noradrenergic transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis in nicotine withdrawal-induced aversive behavior.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Report	6. 最初と最後の頁 233-237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12252	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 Kaneko, T., Hara, R., Amano, T., Minami, M.	4. 巻 147
2. 論文標題 Diverse intracellular signaling pathways mediate the effects of neurotensin on the excitability of type II neurons in the rat dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 86-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.05.013	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 Hara, R., Takahashi, D., Takehara, T., Amano, T., Minami, M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibitory synaptic transmissions to the bed nucleus of the stria terminalis neurons projecting to the ventral tegmental area are enhanced in rats exposed to chronic mild stress.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00684-4	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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南雅文
2. 発表標題 慢性痛による負情動生成の神経機構
3. 学会等名 第52回日本神経精神薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南雅文
2. 発表標題 慢性痛による脳報酬系機能低下
3. 学会等名 第44回日本疼痛学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田涼子、向井康敬、天野大樹、山中章弘、南雅文
2. 発表標題 慢性痛によるoval BNST内CRF陽性神経細胞の電気生理学的細胞特性変化
3. 学会等名 第44回日本疼痛学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南雅文、濱崎友美、野村洋、天野大樹、山内直紀
2. 発表標題 慢性痛による不安情動惹起に関わる分界条床核内神経情報伝達変化
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内直紀、野村洋、天野大樹、南雅文
2. 発表標題 慢性痛による拡張扁桃体の可塑性は不安を惹起する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内直紀、野村洋、天野大樹、南雅文
2. 発表標題 慢性痛による不安惹起への分界条床核CART陽性神経の関与
3. 学会等名 第50回 日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 大学院薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野 薬理学研究室 <a href="https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html">https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html</a>
--

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
研究協力者	天野 大樹  (AMANO Taiju)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	野村 洋  (NOMURA Hiroshi)		
研究協力者	山内 直紀  (YAMAUCHI Naoki)		
研究協力者	佐藤 圭一郎  (SATO Keiichiro)		
研究協力者	佐藤 健太  (SATO Kenta)		
研究協力者	村川 俊作  (MURAKAWA Shunsaku)		
研究協力者	濱崎 友美  (HAMASAKI Yumi)		
研究協力者	新垣 紗也  (ARAKAKI Saya)		
研究協力者	石津 周  (ISHIZU Amane)		



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	内田 涼子  (UCHIDA Ryoko)		
研究協力者	向井 康敬  (MUKAI Yasutaka)		
研究協力者	山中 章弘  (YAMANAKA Akihiro)		

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