

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03391

研究課題名（和文）全脳細胞解析による不安制御に関わる神経基盤の解明と創薬研究への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the neural basis controlling anxiety through multi-scale analysis

研究代表者

笠井 淳司（Kasai, Atsushi）

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40454649

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）：近年、不安障害の患者数は急増しており、認知症患者数よりも多く、社会負担が甚大ながら、成因・病態機構や治療機序が未解明で新規治療薬の開発も長年失敗している。そこで本研究では、最新の高精細全脳イメージング法および単一細胞トランスクリプトーム解析法を組み合わせ、強い精神的ストレスに暴露された脳を、全脳細胞レベルで解析し、ストレス誘発不安様行動を制御する新たな神経基盤を明らかにした。特に、脳全体の中から重要な細胞集団として同定している微小脳領域「前障」のストレス応答性神経細胞の神経回路構造や細胞特性を明らかにした。この成果を元に、今後新たな不安関連疾患の治療標的の同定に繋がると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不安症やうつ病の新規治療薬の第一選択薬は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬であり、過去数十年間新薬は出ていない。しかし、うつ病患者の約3割は、既存の抗うつ薬では治療効果が得られない難治性であるとされている。そのため、新たな機序の抗うつ薬・不安症等の治療薬開発が求められている。本研究によって同定されたストレス応答性の細胞集団は、これらストレス性精神疾患の新たな標的になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the number of patients with anxiety disorders has increased, imposing a significant social burden. Despite this, the causes, pathological mechanisms, and treatment mechanisms remain unclear. In this study, we combined the latest high-resolution whole-brain imaging technique and single-cell transcriptome analysis methods to analyze the brain exposed to severe mental stress at the single cell level, revealing new neural bases that control stress-induced anxiety-related behaviors. Specifically, we clarified the neural circuit structure and cellular characteristics of stress-responsive neurons in the claustrum. These results suggest that the molecular characteristics in the claustrum could lead to the identification of new therapeutic targets for anxiety-related disorders.

研究分野：神経薬理学

キーワード：不安 イメージング シングル細胞解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不安障害やうつなど精神疾患の患者数は年々増加し、平成 29 年には本邦で約 400 万人である。特に、ストレスが関連する不安障害や気分障害は過去 3 年間で患者数が約 15%も増加しており(アルツハイマー病患者数は 5%増)、その約 3 割が治療抵抗性を示すことから、有効な治療法の確立は緊急の課題である。それにもかかわらず、モノアミン系やベンゾジアゼピン系治療薬の開発以降、新規機序の創薬も 25 年以上成功していないのが現状である。従来の治療標的の探索研究の主な問題点は、仮説に基づいた局所脳領域の解析かつ細胞集団の不均一性を考慮しない遺伝子発現の解析が実施されていたことである。例えば、扁桃体-視床-視床下部経路などの不安に関わる神経経路に基づき、扁桃体における遺伝子発現解析が実施されてきた。しかし、同一脳領域においても個々の神経細胞は、固有の神経結合を有することや、不安障害などの脳機能変調の原因となる神経興奮・抑制の不均衡、エピジェネティクス等は個々の細胞で生じることから、ヘテロな細胞集団を用いた神経核単位のオミクス解析では、重要な分子基盤や創薬標的分子は見逃される可能性が高い。

2. 研究の目的

研究代表者らが開発した方法論を用いて、ストレスが誘発する不安を介在する神経回路における機能的なハブとなる神経細胞と、その神経細胞の分子レベルの特徴を明らかにすることを目的とする。さらに、その細胞特性や重要な遺伝子発現変化に基づいた標的候補分子が、不安障害の新規治療標的になるかを明らかにし、新たなコンセプトの不安障害治療法の開発に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

実験には、7~13 週齢の C57BL/6J を遺伝的背景とする、Arc-dVenus 雄性マウス、または C57BL/6N を遺伝的背景とする Fos2A-iCreER ノックインマウス (TRAP2, JAX stock #030323) を使用した。飼育条件は室温 22 ± 1 、照明 12 時間 (点灯午前 8 時から 20 時) とし、餌と水を自由に摂取させた。なお、動物の飼育、実験等はすべて大阪大学動物実験規定を遵守し、大阪大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(1) 神経細胞標識

前障 (CLA) のストレス応答性神経細胞の回路構造を明らかにするため、逆行性レーザーを用いて、投射元を標識し、空間的な対応を調べた。

具体的には、ストレス応答性神経細胞の集団のみを標識するため、神経活動依存性かつタモキシフェン依存性 Cre リコンビナーゼを発現する TRAP2 マウスの CLA に、逆行性に感染するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を注入した。術後回復ののち、タモキシフェン存在下で社会的敗北ストレスを負荷し、ストレス応答性かつ CLA と回路構造を有する細胞特異的に蛍光標識した。脳を摘出後、FAST を用いて、全脳イメージングを行った。

(2) CLA ストレス応答性神経細胞のトランスクリプトーム解析

CLA には、ストレス応答性と非応答性の興奮性神経細胞が存在し、このうち、スト

レス応答性神経細胞が不安様行動を制御する。そこで本研究では、ストレス応答性神経細胞と非応答性神経細胞の2群、さらに神経回路ごとのストレス応答性神経細胞の分子特性の違いを明らかにするシングル細胞 RNAseq 解析を行った。

シングル細胞 RNA シーケンスの実験では、マウス脳を取り出し、高スクロース人工脳脊髄液中で 150 μm の急性スライスを作製した。シランコーティングされたガラス管を用いて、蛍光顕微鏡下で細胞を吸引分取し、RNase inhibitor を含む溶解緩衝液で回収した。回収した細胞は逆転写反応を行い、cDNA を増幅、精製後、次世代シーケンス用ライブラリーを作成し、Illumina HiSeq 4000 でシーケンスを行った。シーケンスデータは、Cutadapt, Bowtie2, HISAT2 を用いてアダプター除去とアラインメントを行い、featureCounts で遺伝子発現情報を取得した。データ解析には Seurat、ZINB-WaVE、DESeq2 を用いて発現変動解析を行い、q-value < 0.05 で有意な遺伝子を特定した。

4. 研究成果

(1) 2つの急性ストレスモデルにおいて共通して活性化する脳領域の探索

CLA に投射し、社会的敗北ストレスによって活性化する神経細胞を脳全体から同定するために、Cre 依存的な逆行性ウイルスベクターを用いた神経細胞の標識を行った結果、CLA に投射する EGFP を発現するストレス応答性神経細胞は、前辺縁皮質 (PL) / 下辺縁皮質 (ILA)、無顆粒島皮質 (AI)、嗅内皮質 (ENT)、嗅外皮質 (ECT) / 嗅周皮質 (PERI) などの皮質領域と、扁桃体基底外側核 (BLA) などの皮質下領域で観察された。

CLA は主に同側から入力を受けるが、mPFC などの脳領域からは反対側の入力を受けることが明らかになった。CLA への同側からの入力は、AI, BLA, PL/ILA, ECT/PERI, ENT などの脳領域で EGFP 陽性の神経細胞が観察され、反対側からの入力は主に PL と ILA、および BLA からでみられました。同側に対する反対側の入力割合を算出した結果、CLA への入力の多くは同側からであったが、前帯状回皮質 (ACA) と PL/ILA からの入力は反対側が多いことが分かりました。この投射パターンは、CLA の単シナプス性逆行性トレーシングの結果と一致していた。

(2) CLA のストレス応答性神経細胞の分子的特徴

CLA のストレス応答性神経細胞の遺伝子発現の特徴を明らかにするため、シングル細胞 RNA シーケンスを行なった。CLA のストレス応答性神経細胞は興奮性神経細胞であり、mPFC や BLA に投射することが知られている。そこで、次の2つのデータセットを用意した。1つは、Arc-dVenus マウスと AAV-PHP.eB-CaMKII α -tdTomato を用いて、社会的敗北ストレスに応答する興奮性神経細胞と応答しない興奮性神経細胞のデータセットである。2つ目は、mPFC に赤色蛍光蛋白質 mCherry、BLA に緑色蛍光蛋白質 EGFP を発現させる逆行性 AAV ベクターを局所注入し、投射パターン毎の CLA 神経細胞のデータセットである。これら4群の CLA 神経細胞を回収し、次世代シーケンスにより遺伝子発現情報を取得した。

まず、全てのデータを統合し、クラスター解析を行った結果、2つのクラスターが得られた。CLA 神経細胞は遺伝子発現パターンの違いから core と shell に分類されることが示されている。今回の解析でも、core と shell のマーカー遺伝子を抽出し、クラスター間の発現量を比較した結果、2つのクラスターが CLA の core と shell に

相当することが確認できた。また、隣接する大脳皮質第 6 層由来の神経細胞のマーカーが発現するクラスターが得られなかったことから、回収した細胞が CLA 由来であることも示された。

ストレス応答性 CLA 神経細胞および非応答性 CLA 神経細胞の分布を解析したところ、これらの細胞は core と shell のクラスター内に偏りなく存在していた。一方で、mPFC に投射する神経細胞は core に、BLA に投射する神経細胞は shell に有意に多く存在することが明らかになった。これにより、core と shell のクラスターが CLA 神経細胞の投射パターンを反映していることが示された。また、ストレス応答性神経細胞が core と shell 間で均等に分布していることも明らかになった。

次に、ストレス応答性神経細胞で高発現する遺伝子を同定するために、core および shell のクラスター内で遺伝子発現変動解析を実施した結果、両クラスターで共通してストレス応答性神経細胞で有意に高発現する遺伝子としてこれまで知られていない遺伝子 A を同定した。さらに、in situ hybridization 法を用いて、単回ストレス負荷後の CLA における遺伝子 A 発現と最初期遺伝子 Arc の共局在を解析した。その結果、コントロール脳では遺伝子 A 陽性細胞には Arc 陽性細胞が少なかった一方、ストレス負荷脳では遺伝子 A 陽性細胞と Arc 陽性細胞の共局在が多数検出された。また、遺伝子 A は CLA に隣接する皮質領域では発現量が低く、CLA 選択的に発現していることが示されました。

以上の結果から、CLA の core と shell の両方の神経細胞種において、遺伝子 A がストレス応答性神経細胞のマーカー遺伝子として機能する可能性が示された。この成果は、CLA のストレス応答性神経回路の理解に重要な貢献をするものであり、将来的な不安関連疾患の治療標的の探索においても有用な情報となりえる。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Niu M, Kasai A, Tanuma M, Seiriki K, Igarashi H, Kuwaki T, Nagayasu K, Miyaji K, Ueno H, Tanabe W, Seo K, Yokoyama R, Ohkubo J, Ago Y, Hayashida M, Inoue KI, Takada M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Kaneko S, Okuno H, Yamanaka A, Hashimoto H	4. 巻 8
2. 論文標題 Clastrum mediates bidirectional and reversible control of stress-induced anxiety responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabi6375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abi6375	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 Niu Misaki, Kasai Atsushi, Seiriki Kaoru, Hayashida Misuzu, Tanuma Masato, Yokoyama Rei, Hirato Yumi, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Altered Functional Connectivity of the Orbital Cortex and Striatum Associated with Catalepsy Induced by Dopamine D1 and D2 Antagonists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 442 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-01006	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 Tanuma Masato, Niu Misaki, Ohkubo Jin, Ueno Hiroki, Nakai Yuka, Yokoyama Yoshihisa, Seiriki Kaoru, Hashimoto Hitoshi, Kasai Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Acute social defeat stress activated neurons project to the claustrum and basolateral amygdala	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-022-00987-8	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 Endo Fumito, Kasai Atsushi, Soto Joselyn S., Yu Xinzhu, Qu Zhe, Hashimoto Hitoshi, Gradinaru Viviana, Kawaguchi Riki, Khakh Baljit S.	4. 巻 378
2. 論文標題 Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eadc9020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.adc9020	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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsushi Kasai, Misaki Niu, Masato Tanuma, Kaoru Seiriki, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Claustrum mediates stress-induced anxiety responses and stress resistance
3. 学会等名 Cell Symposia (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Kasai
2. 発表標題 The mechanisms of stress-induced anxiety responses revealed by brain-wide neuronal activation mapping
3. 学会等名 Neuro2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠井淳司
2. 発表標題 全脳イメージングシステムFASTの開発と精神・神経疾患研究への応用
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Kasai et al
2. 発表標題 Monitoring neuronal activation at the local and global levels provides a new role of claustral neurons in the neuronal mechanisms of anxiety-related behaviors
3. 学会等名 第64回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------