

令和 6 年 5 月 30 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：20H03556

研究課題名(和文) 情動適応・変容における大規模神経機能ネットワーク動態の解明

研究課題名(英文) Brain-wide analysis of neuronal network dynamics underlying adaptive and maladaptive emotional responses

研究代表者

勢力 薫 (Seiriki, Kaoru)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90802918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳の機能や行動にほとんど影響を残さない生理的なレベルのストレス反応と、社会回避行動など情動の変調を引き起こす過度のストレスによる脳内反応およびその神経基盤には不明な点が多く残されている。本研究では、マウス脳全体を対象としてストレスによるFos発現を指標とした神経活動の三次元イメージング解析や、その擬似時間解析を通して、ストレス状態に依存して情動変容を引き起こす細胞集団およびこれらの神経回路構造を明らかにした。また、本研究を通して確立した神経投射の解析技術により、マウスにおいて抗精神病薬によって神経活動が亢進する神経細胞の回路構造を解析することに成功し、その成果の一部を学術論文に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスによる情動変容の神経基盤を、脳全体の時間・空間的な神経活動変化に基づいて明らかにした本研究は、将来的にヒト疾患との関連性などを検証していくことによって、ストレス関連疾患の病態理解や、治療戦略の確立に貢献できる可能性が考えられる。また、本研究を通して確立してきた神経活動変化や神経回路構造の解析方法は、他の病態モデル動物や薬物の治療効果における神経回路レベルのメカニズムを理解するための研究への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Neuronal mechanisms underlying different stress responses caused by physiological and pathological stress remain unclear. Using three-dimensional imaging analysis of stress-induced neuronal activity across the entire brain, we identified the neuronal populations and their circuit structures responsible for stress-induced emotional alterations depending on the stress states. Moreover, using our brain-wide analysis of axonal projection, we revealed the circuit structure of neuronal populations responsive to an antipsychotic drug.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス 神経科学 イメージング 情動

## 1. 研究開始当初の背景

環境への適応や、生命の脅威に対する適切な行動選択のために、精神的ストレスは心拍・血圧の上昇や脳の覚醒、一過性の不安など様々な生体反応を引き起こす。しかし、過度のストレスは情動や認知などの脳機能を変調させ、精神疾患の発症につながる場合がある。このようなストレスの“強度”に応じた脳内反応や行動変化の相違点および神経機構に関する学術的知見は限定的であるのが現状である。そこで申請者は、情動行動にほとんど影響を及ぼさない程度のストレスと、社会回避行動などの情動変容を引き起こす過度のストレスによる脳内応答の相違点を明らかにすることにより、情動の適応と変容の制御を担う脳領域や細胞集団を特定し、過度のストレスに起因する行動変容の神経メカニズムの解明を目指して研究を進めてきた。

これまでに申請者は、脳全体を対象として、ストレスによる活動制御を捉えるために、最初期遺伝子 c-Fos のレポーター遺伝子改変マウスと、独自に開発してきた顕微鏡イメージングシステム FAST (Seiriki et al., *Neuron*, 2017; Seiriki et al., *Nat Protoc*, 2019)を用いて、細胞レベルの神経活動変化を全脳レベルで解析してきた。しかし、研究開始当初の段階では、ある一時点の活動解析に限定され、ストレスによる機能変調が生じる前・後や、ストレスの強度等が増大する過程において、経時的に変化する神経活動の変化を全脳レベルで解析することは不可能であった。ストレスに適応する過程における脳内反応と、ストレスの強度が増大することによって情動に変調が生じる際の神経メカニズムの相違点を明らかにするためには、ストレス強度の増大過程における動的な神経活動の変化を捉える解析方法を確立し、時間・空間的な活動変化を定量的に捉えた上で、顕著な変化を示す脳領域・細胞集団の役割を理解する必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ストレス経験による情動機能の適応・変容を担う多脳領域間・細胞間ネットワークの動態制御機構を明らかにするために、神経活動のレポーターマウスと FAST を用いた全脳イメージング解析の応用を通して、神経活動の時間・空間的な動態を細胞レベルで解析する方法の確立を行う。また、これらの解析によって見出した細胞集団の解剖学的・機能的な特徴を明らかにすることにより、神経回路構造に基づいた情動の変容メカニズムを明らかにする。具体的には、社会的敗北ストレスによる社会回避行動を指標として、社会情動の適応と変容の分岐過程に関わる細胞集団と神経回路メカニズムを捉える。

## 3. 研究の方法

神経活動の時間・空間的な変化の解析方法の確立では、(1)独自に作製した Fos-2A-Venus-2A-CreERT2-2A-rtTA マウス (Fos-VCT マウス; 未発表) および CAG-STOP-tdTomato/TRE-TagBFP マウス (未発表) を用いた同一個体内における神経活動変化の多重標識方法の確立と、(2) 最初期遺伝子 c-Fos のプロモーター制御下に蛍光タンパク質を発現する B6.Cg-Tg(FOS-tTA, FOS-EGFP\*)1Mmay/J mice (Fos-EGFP マウス, JAX. #018306) を用いて、個体ごとに異なる回数のストレス刺激を暴露し、各個体の脳全体における神経活動パターンを擬似時間解析する方法の確立という二つの異なる方法を検証した。

Fos-EGFP マウスの解析では、7~10 週齢の間に単回もしくは連続繰り返しの社会的敗北ストレスを暴露することで、ストレスによって活動亢進した細胞を蛍光標識し、その脳内分布の解析および複数個体の定量データから活動変化の擬似時間解析を実施した。また、活動亢進した神経細胞の軸索標識およびその脳内分布解析では、STOCK Fostm2.1(icre/ERT2)Luo/J (Fos-2A-CreERT<sup>2</sup> マウス, JAX. #030323) および Cre 依存的に細胞膜局在型の蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた。

飼育条件は室温 22 ± 1°C、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。

## 4. 研究成果

### (1) 脳全体を対象として Fos 発現を指標とした神経活動の時間変化を解析する方法の確立

独自に作製した Fos-VCT マウスでは、蛍光タンパク質 Venus の緑色波長帯と、CreERT<sup>2</sup> を介した標識(赤色位蛍光タンパク質を予定)、rtTA を介した標識(青色蛍光タンパク質を予定)の 3 つ

の時間窓において活動更新した神経細胞を区別して標識する方法を計画していた。しかし、Fos-VCT マウスと交配して用いる予定であった Cre 依存的 RFP (tdTomato)-rtTA 依存的 BFP (tagBFP2) マウス(CRTB マウス)では、Cre を介した標識は可能であるものの、tTA では脳領域に応じて BFP の非特異的発現や、サイレンシングによる発現抑制が認められ、本研究課題の研究期間中に方法を改善することが難しいことが予測された。そこで、代替的な神経活動の時間変化解析として、これまでに全脳の神経解析に用いてきた Fos-EGFP マウスを利用して、各ストレス刺激に対する Fos 発現変化を利用して時間情報を推定する擬似時間解析を試みた。ホームケージ(ストレス刺激なし)と、新奇環境刺激、1 回の社会的敗北ストレス刺激、5 回の社会的敗北ストレス刺激、これらのストレスとは異なる拘束ストレス刺激を行なった各 Fos-EGFP マウス脳における EGFP 発現細胞を定量化し、250 脳領域の細胞密度を次元削減した結果、拘束ストレス以外の刺激では、ホームケージ→新規環境刺激→1 回社会的敗北ストレス刺激→5 回社会的敗北ストレス刺激に沿って状態遷移(擬似時間)を反映すると考えられる主曲線を得ることができた。また、低次元空間の成分に対する各脳領域の因子負荷量を参照することにより、複数の視床下部の垂核や脳幹の微小脳領域が状態遷移に寄与する可能性を見出した。

当初予定していた、神経活動の履歴を多色標識する遺伝子改変マウスを用いた解析には、時間を要するものの、代替的に確立した全脳の Fos 発現パターンのストレス状態依存的な変化に基づく擬似時間解析を確立することに成功し、目的の一部を達成することができたと考えられる。

## (2) 細胞種選択的に遺伝子導入を可能にする AAV の構築と化学遺伝学的実験への応用

神経活動に顕著な変化が認められた脳領域、細胞種を対象として、化学遺伝学的な神経活動の操作・介入実験を実施した。共同研究を通じて TH-Cre マウス等の細胞種選択的な Cre 発現マウスを用いた検証を実施した。また、独自に青斑核ノルアドレナリン神経に対して細胞種選択的な遺伝子発現を可能にする AAV を構築することに成功した。これらの Cre マウスや、AAV を用いた検証を進める過程において、青斑核ノルアドレナリン神経では人工受容体である Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD)のうち hM4Di (Gi 共役型抑制性 DRADD)の発現効率が低く、TH-Cre マウスに AAV を用いて発現させる場合には少なくとも  $1 \times 10^{13}$  genome copies/ml (gc/ml)以上の高いタイターで局所注入する必要があることが明らかになった。また、Tet-Off システムを介した hM4Di の発現効率の改善について検証した結果、少なくとも脳幹の青斑核周辺においては AAV9-TRE-hM4Di-mCherry ( $5 \times 10^{12}$  gc/ml)を局所注入すると、tTA 非存在下でも mCherry の発現が認められることが明らかになった。これらの問題が生じたため、予定していた化学遺伝学的な実験の一部を実施することが困難であった。しかし、本研究とは目的・内容の異なる別の研究プロジェクトにおいて、青斑核ノルアドレナリン神経における hM4Di の発現効率を向上させる AAV の構築と、さらに逆行性感染性の AAVretro (Terve DGR et al., Neuron, 2016)と組み合わせることで神経回路選択的かつ細胞種選択的に hM4Di を発現させることに成功した。これらの技術は、本研究に限らず細胞種選択的に投射経路の役割を解析する研究に貢献できると考えられる。

## (3) ストレス等の環境刺激により活動亢進する細胞集団の投射先脳領域の解析

ストレス等の環境刺激によって神経活動が亢進する細胞集団が、どの脳領域に軸索を投射するのか明らかにするため、Fos-2A-CreER<sup>T2</sup> マウスと Cre 依存的に細胞膜・軸索局在型の蛍光タンパク質を発現する AAV を用いて、神経活動依存的に Fos を発現した細胞の軸索標識する方法の確立を試みた。当初、環境刺激による神経活動依存的に CreER<sup>T2</sup> を発現し、かつ 4-ヒドロキシタモキシフェン(タモキシフェン活性代謝産物)投与に依存して、細胞が蛍光タンパク質で標識されると考えられたが、実際には環境刺激を行わない条件下においてもいくつかの細胞体の蛍光標識が認められた。しかし、軸索線維を標識できるレベルの蛍光タンパク質の発現量には至らず、社会的敗北ストレス等の環境刺激を提示した場合のみ蛍光標識された軸索線維が多数検出された。これらの結果から、本実験系では、活動亢進した細胞の数を正確に定量することは困難であるものの、当該細胞集団の軸索投射先については解析可能であると考えられた。そこで本実験系と、(2)に記述した細胞種選択的 AAV を用いて、ストレスによって神経活動が亢進する青斑核の細胞の軸索投射先を検証した。その結果、広範な脳領域に蛍光標識された軸索が検出されたものの、一部の脳領域において顕著な蛍光標識の増加が認められた。これらの脳領域間の回路を対象として、細胞種選択的 AAV と、逆行性感染性の AAVretro-Cre を組み合わせた遺伝薬理的な行動解析の結果、これまでに機能が報告されている細胞集団とは異なる細胞集団の活動抑制が、ストレスによる行動変化を抑制する可能性を見出した。また、神経活動依存的な標識とその神経投射を全脳レベルで解析する解析方法の応用として、薬物によって活動変化する内側

前頭前皮質の細胞集団の神経投射解析に応用し、その成果を学術論文に発表した(Hirato et al., Biol Pharm Bull, 2024)。

これらの研究を通して、Fos 発現を指標とした全脳における時間・空間的な活動変化を捉える擬似時間解析を確立し、顕著な変化を示す脳領域・細胞集団を特定することができた。その成果については、現在学術誌への投稿準備を進めている。これらの全脳レベルの活動変化に関する新たな解析方法の構築や、ウイルスベクターを用いた回路構造・機能の解析により、ストレスによる行動変化に関する新たな神経回路メカニズムの一端を明らかにできたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takemoto T, Baba M, Yokoyama K, Kitagawa K, Nagayasu K, Ago Y, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Mori D, Ozaki N, Takuma K, Hashimoto R, Hashimoto H, Nakazawa T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Oxytocin ameliorates impaired social behavior in a mouse model of 3q29 deletion syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-022-00915-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
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 Claustrium 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 Yamamoto K, Kuriu T, Matsumura K, Nagayasu K, Tsurusaki Y, Miyake N, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Fujiwara M, Baba M, Kitagawa K, Takemoto T, Gotoda-Nishimura N, Takada T, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Ago Y, Kida S, Takuma K, Ono F, Matsumoto N, Hashimoto R, Hashimoto H, Nakazawa T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Multiple alterations in glutamatergic transmission and dopamine D2 receptor splicing in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with familial schizophrenia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-021-01676-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitagawa K, Matsumura K, Baba M, Kondo M, Takemoto T, Nagayasu K, Ago Y, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Takuma K, Hashimoto R, Hashimoto H, Nakazawa T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Intranasal oxytocin administration ameliorates social behavioral deficits in a POGZWT/Q1038R mouse model of autism spectrum disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00769-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirato Yumi, Seiriki Kaoru, Kojima Leo, Yamada Shohei, Rokujo Hiroki, Takemoto Tomoya, Nakazawa Takanobu, Kasai Atsushi, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Clozapine Induces Neuronal Activation in the Medial Prefrontal Cortex in a Projection Target-Biased Manner	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 478 ~ 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Whole-brain mapping of locus coeruleus noradrenergic projections in mice
3. 学会等名 第66回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Shunsuke Maeda, Leo Kojima, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Development of an AAV vector for noradrenergic neuron-specific gene expression and application to mesoscale analysis of noradrenergic wiring diagrams in mice.
3. 学会等名 Neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Whole-brain mapping of locus coeruleus noradrenergic projections in mice
3. 学会等名 第66回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Shunsuke Maeda, Leo Kojima, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Development of an AAV vector for noradrenergic neuron-specific gene expression and application to mesoscale analysis of noradrenergic wiring diagrams in mice.
3. 学会等名 Neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yumi Hirato, Kaoru Seiriki, Shohei Yamada, Leo Kojima, Atsushi Kasai, Takanobu Nakazawa, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Identification of the medial prefrontal circuit responsive to the atypical antipsychotic drug clozapine
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Shunsuke Maeda, Yuzuka Fujimoto, Shohei Yamada, Yumi Hirato, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Development of a noradrenergic neuron-selective AAV vector and brain-wide axonal mapping of social stress-responsive noradrenergic neurons
3. 学会等名 Neuro2022(第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuzuka Fujimoto, Kaoru Seiriki, Shunsuke Maeda, Taiyou Baba, Atsuko Hayata-Takano, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Social defeat stress induces activation of PACAP-expressing neurons in thermoregulatory systems
3. 学会等名 The 15th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides The 1st International Society for BioactivePeptides Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Shohei Yamada, Shunsuke Maeda, Yuzuka Fujimoto, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Development of a noradrenergic neuron-selective AAV vector and its application to the brain-wide axonal mapping
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田駿介、藤本柚香、勢力薫、山田翔平、平戸祐充、馬場太陽、児島励央、疋田貴俊、笠井淳司、橋本均
2. 発表標題 ストレスの強度に応じた社会性の低下に關与する神経基盤のイメージング解析
3. 学会等名 第140回薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Hirato, Kaoru Seiriki, Shohei Yamada, Leo Kojima, Atsushi Kasai, Takanobu Nakazawa, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Identification of the medial prefrontal circuit responsive to the atypical antipsychotic drug clozapine
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------