

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18454

研究課題名（和文）前頭前野 扁桃体間の不安神経回路の解明

研究課題名（英文）Identifying the novel mechanism regulating the neural circuits of anxiety

研究代表者

飯田 和泉（渡辺和泉）（Iida, Izumi）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80751031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：扁桃体と前頭前皮質のGluK3陽性抑制性神経への神経接続を可視化できる遺伝子改変マウスGluK3tTAマウスを作製し、繁殖させた。一方で、前頭前皮質の抑制性神経細胞にGluK3は発現しないことがわかった。この結果から、当初の予定の前頭前皮質の不安神経回路だけに絞らず、他の領域に解析の幅を広げるべきだと判断した。GluK3KOマウスの不安行動の減少はドーパミン受容体機能異常により起こり、GluK3KOマウスの線条体においてドーパミン受容体の発現量が減少していることを見出した。これらの結果から、GluK3tTAマウスを用いて、線条体を標的とした不安神経回路を探索する見通しがたつた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不安研究において、GluK3KOマウスは抗不安モデルマウスとして有用である。また現行の不安モデルマウスは薬理的に作製可能だが、抗不安モデルマウスはほとんど存在しない。これまで不安モデルマウスによって同定された不安に関わる神経回路が多数報告されているが、脳領域間の神経回路を同定したものが多く、その神経回路特異的に発現する分子の報告はまだない。本研究では、特定の分子を発現する不安神経回路の同定に加え、その神経回路の活動の操作まで可能であり、これまでの研究から一線を画している。GluK3が制御する不安神経回路が同定されれば、GluK3を標的とした創薬研究への波及的效果が見込める。

研究成果の概要（英文）：We generated GluK3tTA mouse which enable us to visualize neural connection to GluK3 positive inhibitory neurons in the prefrontal cortex from the amygdala. On the other hand, we found that GluK3 was not expressed in the inhibitory neuron in the prefrontal cortex so we should analyze anxiety-related neural circuits not in the prefrontal cortex but also in the other brain regions. Furthermore, we also revealed that the dysfunction of dopamine receptors results in the decrease in anxiety behavior of GluK3KO mice, and the expression level of dopamine receptors in GluK3KO mice striatum was also decreased. These results raise the possibility to target the anxiety-related neural circuit in the striatum.

研究分野：神経科学

キーワード：GluK3 不安 行動解析 カイニン酸型グルタミン酸受容体 ノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「不安」を感じることは、生物が生存するために必要な生体防御能の一つである。一方、過剰な不安は、うつ状態や不安障害の原因となる。新型コロナウイルスパンデミックで日本の自殺者数は増加していることから、人々の不安感を軽減する対策は急務である。しかしながら、不安の制御機構の本質的な理解は未だ深まらず、1940年代以降、抗不安薬がほとんど承認されておらず不安障害患者の大部分は適切な治療を受けていない(Calhoon GG & Tye KM, Nat. Neurosci., 2015)。

興奮入力を神経細胞が受けると、最初にイオン透過性グルタミン酸受容体が活性化する。イオン透過性グルタミン酸受容体には AMPA 型、NMDA 型、カイニン酸型の3種類がある。カイニン酸型受容体は、AMPA 型や NMDA 型受容体に比べてその生理的意義はあまり明らかになっていない。申請者はその解明を目指して、5つある受容体構成サブユニット全ての個別ノックアウト (GluK1-GluK5 KO) マウスを作製し、行動学的な差異があるかについて解析を行ってきた。その過程で GluK3KO マウスだけが強烈な「不安行動の減少」を示すことを見出した。また GluK3 はマウスの前頭前皮質 (ヒトの前頭前野に相当) に強く発現していることがわかってきた。このことは、前頭前皮質に発現する GluK3 が不安行動を調節している可能性を強く示していた。さらに抑制性神経細胞特異的 GluK3KO マウスだけが不安行動の減少、すなわち抗不安行動を示すことが明らかとなった。これらの申請者の先行研究から、「カイニン酸型グルタミン酸受容体の GluK3 サブユニットは前頭前皮質の不安神経回路を活性化させるのではないか」と考えるに至った。

### 2. 研究の目的

感覚情報を感情へと変換する扁桃体は、不安において中枢の働きをしている。近年、神経科学分野における光遺伝学的发展により、扁桃体から前頭前野、海馬、分界条床核、側坐核などへと不安神経回路が形成されていることが明らかとなってきた。なかでも、扁桃体と前頭前野の神経接続は、不安と抗不安の双方の神経応答を担う (Heidbreder CA & Groenewegen HJ, Neurosci. Biobehav. Rev., 2003)。このように扁桃体 - 前頭前野間で不安行動を正と負に調節していることが判明してきたことから、扁桃体と前頭前野の神経接続が特に注目されている。本研究の目的は、GluK3 を抑制性神経細胞で欠損させると抗不安行動を発現することから、「扁桃体から刺激を受けた前頭前皮質の抑制性神経細胞のカイニン酸受容体 GluK3 サブユニットが不安を制御する本体である」という仮説を証明することである。

### 3. 研究の方法

GluK3 の前頭前皮質の抑制性神経細胞における発現については、fluorescence in situ hybridization を用いて検証した。前頭前皮質以外の不安関連脳領域における GluK3 の分布は蛍光免疫染色法を用いて検証した。不安を誘導する報告がある、セロトニン受容体及びドーパミン受容体のアンタゴニストを用いて、GluK3KO マウスの不安回路に異常があるのか薬理行動解析を行い検証した。

### 4. 研究の成果

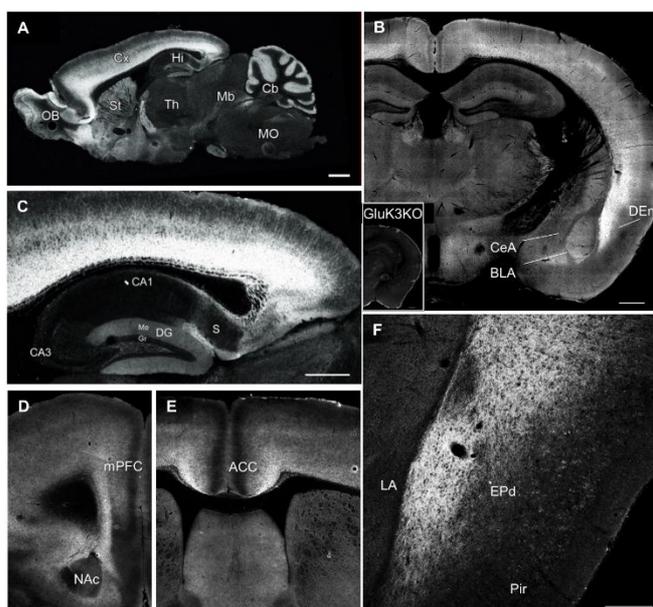
#### (1) 前頭前皮質の抑制性神経細胞に GluK3 の発現がみられないことを明らかにした

前頭前皮質の GluK3 陽性神経細胞が抑制性神経細胞なのか確認した。GluK3 mRNA と VGLUT1 mRNA または GAD67 mRNA の共局在を確認したところ、GluK3 mRNA を発現する神経細胞群のほとんどが VGLUT1 mRNA を発現しており、GAD67 mRNA を発現していないことが分かった。この結果から、前頭前皮質の GluK3 陽性抑制性神経細胞を介した不安神経回路以外に、解析の幅を広げることに研究をシフトさせ、仮説を改めることにした。

#### (2) 不安関連領域における GluK3 の分布を明らかにした

不安神経回路は前頭前皮質以外の多くの脳領域が複雑に絡み合い、不安行動を形成していると想定されている。そこで前頭前皮質以外の脳領域に GluK3 が発現

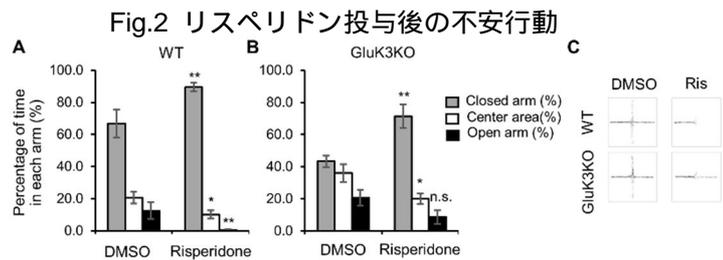
Fig.1 GluK3 免疫染色



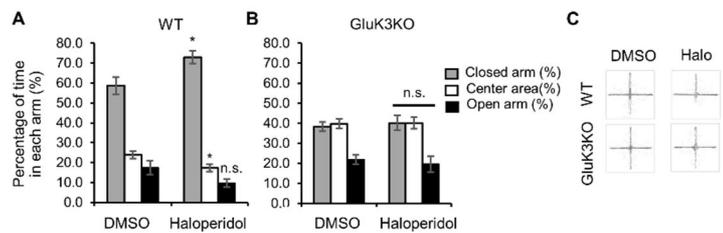
しているのか、蛍光免疫染色法により解析した。その結果、情動系を司る扁桃体基底核や中心核や分界条核や腹側海馬には発現は見られるものの顕著な GluK3 の分布は見られなかった (Fig.1B)。一方、大脳皮質の深層部に GluK3 は強く発現しており (Fig. 1A-C)、中でも不安に関連するとして注目されている、前帯状皮質や梨状皮質に強い発現が認められた (Fig.1D-F)。

### (3) GluK3KO マウスのドーパミン受容体機能異常により不安行動減少が起こることを明らかにした

GluK3 欠損がどのような神経回路に異常をきたし、不安行動の減少を誘導しているのか明らかにするために、WT と GluK3KO マウスに不安誘導を引き起こす薬剤を投与し、不安行動を解析した。セロトニン受容体のアンタゴニストであるリスペリドンは、不安行動を誘導する報告があったため、WT GluK3KO マウスにリスペリドンを投与し、高架式十字迷路テストを行った。その結果、WT と GluK3KO マウス両方共で、不安行動を誘発した (Fig.2)。リスペリドンはセロトニン受容体だけでなく、ドーパミン受容体もアンタゴナイズする薬剤である。そこで、ドーパミン受容体特異的アンタゴニストであるハロペリドールを用いて、さらに不安行動を検証した。その結果ハロペリドール投与で WT マウスは不安行動が亢進したのに対し、GluK3KO マウスの不安行動は減少したままであった (Fig.3)。このことから、ドーパミン受容体を含む神経回路に異常があることで、GluK3KO マウスは不安行動異常を起こすことが明らかとなった。



### Fig.3 ハロペリドール投与後の不安行動



### (4) GluK3KO マウスの線条体のドーパミン受容体が増加していることを明らかにした

GluK3KO マウスのドーパミン受容体機能に異常があることが、薬理実験で明らかとなったため、GluK3KO マウスのドーパミン受容体発現量変化について、ウェスタンブロットにより解析を行った。WT と GluK3KO マウスの前頭前皮質 (PFC)、線条体 (ST)、側坐核 (NAc)、黒質 (SN) を検証したところ、線条体でのみ、ドーパミン D2 受容体の発現量が減少していた (Fig.4)。

### (5) GluK3tTA マウス作製と維持に成功した

GluK3 発現神経細胞が構成する不安神経回路の可視化と神経活動誘発を可能とするために、GluK3 を発現する細胞でのみ転写活性化因子 tTA を発現するマウスを作製した (挿入遺伝子と部位は Fig.5 参照)。tTA を用いたシステムは、ウイルスベクターの感染部位を変えるだけで多くの脳領域を解析でき、また tTA の発現は Cre リコンビナーゼ発現細胞のみで誘導されるため、Cre 発現細胞を変えるだけであらゆる細胞種の解析が可能である。現在、繁殖させ、GluK3 を介した不安神経回路を同定する。

Fig.4 D2 受容体発現

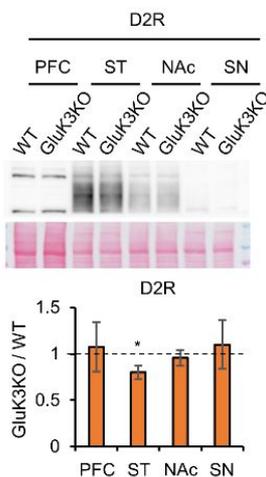
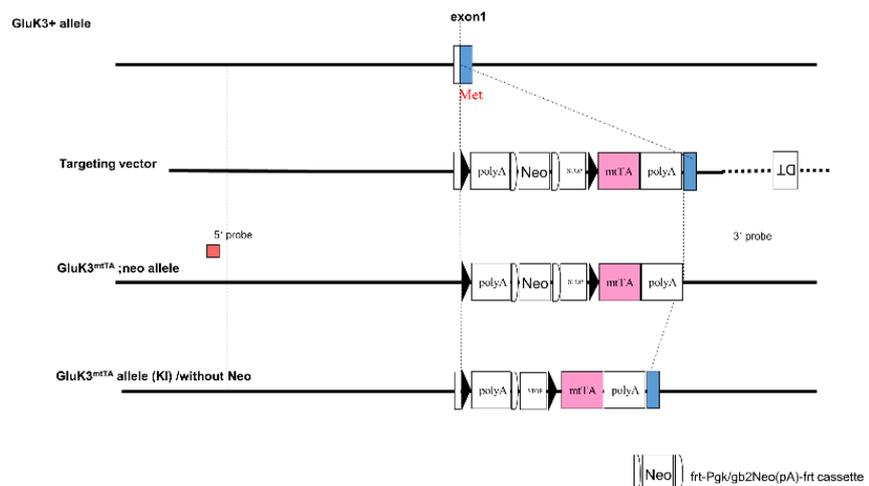


Fig.5 GluK3 mtTA Knock-in マウス作製



## 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 3件）

1. 著者名 Iida Izumi, Konno Kohtarou, Natsume Rie, Abe Manabu, Watanabe Masahiko, Sakimura Kenji, Terunuma Miho	4. 巻 405
2. 論文標題 A comparative analysis of kainate receptor GluK2 and GluK5 knockout mice in a pure genetic background	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113194 ~ 113194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113194	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 Horie Masao, Yoshioka Nozomu, Kusumi Satoshi, Sano Hiromi, Kurose Masayuki, Watanabe Iida Izumi, Hossain Ibrahim, Chiken Satomi, Abe Manabu, Yamamura Kensuke, Sakimura Kenji, Nambu Atsushi, Shibata Masahiro, Takebayashi Hirohide	4. 巻 68
2. 論文標題 Disruption of dystonin in Schwann cells results in late onset neuropathy and sensory ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2330-2344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23843	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 Yamada Yurie, Nihara Jun, Trakanant Supaluk, Kudo Takehisa, Seo Kenji, Iida Izumi, Izumi Kenji, Kurose Masayuki, Shimomura Yutaka, Terunuma Miho, Maeda Takeyasu, Ohazama Atsushi	4. 巻 173
2. 論文標題 Perivascular Hedgehog responsive cells play a critical role in peripheral nerve regeneration via controlling angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 62 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.06.003	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 Komatsu Ayaka, Iida Izumi, Nasu Yusuke, Ito Genki, Harada Fumiko, Kishikawa Sari, Moss Stephen J., Maeda Takeyasu, Terunuma Miho	4. 巻 298
2. 論文標題 Ammonia induces amyloidogenesis in astrocytes by promoting amyloid precursor protein translocation into the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101933 ~ 101933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101933	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯田和泉、阿部学、崎村建司、照沼美穂
2. 発表標題 カイン酸型グルタミン酸受容体サブユニットGluK2及びGluK5サブユニット欠損マウスの行動解析
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会・NPBPPP合同年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 飯田渡辺和泉, 今野幸太郎, 夏目里恵, 阿部 学, 渡辺雅彦, 崎村建司, 照沼美穂
2. 発表標題 Kainate-type glutamate receptor subunit GluK3 KO mice showed anxiolytic behavior and its involvement in expression of dopamine receptors.
3. 学会等名 第11回 生理研-霊長研-新潟脳研 合同シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------