

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07436

研究課題名(和文) カレ八島による、側座核の直接的間接的制御を介した情動行動への役割の解明

研究課題名(英文) The role of the Island of Calleja in emotional behavior

研究代表者

松股 美穂(酒寄美穂)(Matsumata, Miho)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：50595460

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)：カレ八島(Island of Calleja; ICj)は嗅皮質である嗅結節腹側部に、吻側から尾側、内側部から外側部へ向かって左右に浮島状に並ぶ細胞集団群であるが、マウスでは島の個数や大きさに個体差が大きくまた深さのために物理的介入が難しかった。我々はカレ八島で特異的にCreを発現するマウスを用いて、組織学的解析やICj活性化による行動の変化を確認した。ICjは大部分がGABA作動性の顆粒細胞であるが、その辺縁部にはアセチルコリン作動性神経及び一酸化窒素作動性神経細胞が局在していた。また、光遺伝学的手法を用いたICj顆粒細胞の活性化では、即時型場所嗜好性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICjはげっ歯類では腹側表面に一部が露呈しており目立つこともあって、古くから注目を浴び当時から研究は行われていた。しかし一方で個体差が激しく、また脳底へのアクセスの難しさからなかなか理解が進まず、役割についてもわかっていなかった。今回、ICjが関与すると思われるいくつかの行動の変異がマウス個体を用いた実験から明らかとなり、すでに知られていた神経基盤に加えてICjが新たな寄与神経核であることがわかった。本研究は抑うつ状態の中心症状である意欲や気力の減衰、アンヘドニアの神経基盤の理解を目指して立案しており、治療介入手法の選択肢を増やすという意味でも社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Islands of Calleja (ICj) are a group of neural cells that line the ventral part of the olfactory tubercle in the olfactory cortex, in a floating island-like pattern from rostral to caudal and from medial to lateral. In mice, because the ICj are located deep in the forebrain, and the number and size of islands have the large individual variations, it was difficult to physically manipulate the ICj. Therefore, we used transgenic mice in which Cre expression was specifically localized to the ICj, for histological analyses and behavioral changes induced by ICj activation. The ICj is mostly GABAergic granule cells, but cholinergic neurons and NOergic neurons were scattered around its periphery. Their projections extended toward the nucleus accumbens and the ventral surface of the ICj, a granule cells area. Furthermore, activation of the ICj granule neurons via optogenetic stimulation caused place preference among some of behavior analyses.

研究分野：神経科学

キーワード：カレ八島 嗅結節 側座核 意欲 うつ病 アンヘドニア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) カレハ島(ICj)は嗅球からの投射支配を受ける嗅皮質の一つである嗅結節の3層皮質構造内に、吻側から尾側、内側部から外側部へ向かって左右に対をなして浮島のように並ぶ細胞集団である。齧歯類では前脳の腹側部に位置し、また一部が脳底面表面に露呈しており、その小型の密な細胞群が特徴的なこともあって、古くから注目され論文にも記載されていた。しかし一方で、細胞群の個数や大きさに個体差が激しく、また脳底面に位置していることから動物生体での操作が難しいこともあって、報告は組織学的表記にとどまるものが多く、当時の技術で記載された他の神経核とのコネクションや、ICjを含めた嗅結節を対象とした研究で嗅刺激による嗜好性あるいは嫌悪性の連合学習に関わる、とした報告があるものの、ICj本体の役割やその作用機序についてはほぼわかっていなかった。

(2) 側坐核(NAc)は腹側線条体とも呼ばれ、大脳基底核に属する左右2つの神経核を指し、すでに“感情”や“意欲”の発露に関わることが知られていた。特に腹側被蓋野(VTA)からのNAcへのドーパミン(DA)作動性神経入力がこの回路に特徴的であり、それ以外の主なグルタミン酸(Glu)作動性興奮入力である腹側海馬(vHIP)、扁桃体基底外側部(BLA)、前頭前野(PFC)からの投射、その他様々な神経ペプチド入力、そしてNAc内のアセチルコリン作動性神経細胞及びアミノ酪酸(GABA)作動性抑制神経細胞など、多様で複雑な入力の演算が行われていることがわかっている。古くから、NAc内でのシナプス間隙でのDA濃度や再取り込み阻害が統合失調症陽性症状に関わることが知られていたが、一方で、うつ病患者を対象とした脳画像データではNAcでのシグナルが低下し血流量が減少しているという報告や、意欲や気力の減衰、アンヘドニア(無快楽症)にNAcが関与しそれが抑うつ傾向の主症状の1つであるにもかかわらず、DAの働きでは説明できないことも多かった。

(3) ICjはNAcとは相互に投射があることがわかっており、行動への影響についても、ICjおよびICj同様に小型細胞群からなり前脳腹側部の主に外側部に点在するCap compartmentを含むOT全体について、匂い刺激と報酬を連合学習させた場合には内側のOTおよびICjが、匂い刺激と罰を連合学習させた場合には外側のOTおよびICj、Cap compartmentが活動することがわかっていた。報酬系の中核がNAcであることを鑑みると、行動上の類似点から見ても、DAによる修飾以外の方法によってICjとNAcとの関連性が想定された。さらに、心臓から内頸動脈へ入り脳内へと血液を供給する経路内には血圧の上下変動をモニターしそれを心臓へフィードバックすることで定常的な血圧を保持する圧受容器が存在しているが、圧受容器への刺激で血圧が低下する際に細胞の活動マーカーであるc-fosがICjに発現誘導されること、ICjを薬理的に刺激すると血圧が低下すること、血管拡張剤すなわち降圧剤の投与によりICjにc-fosが発現誘導されること、血管拡張作用をもつNOの合成酵素であるnNOSがICjで認められることなどにより、ICjの神経活動と血圧低下の間の相関関係性が強く示唆された。そこでICjがNAcの活動に対して、神経投射による直接的な制御、前大脳動脈もしくは中大脳動脈による穿通枝がICjからNAc方向に伸びていることを鑑みて、血流を介した間接的な制御、を想定して本計画を質案した。

2. 研究の目的

背景で述べた知見に基づいて、ICjからNAcへの制御の方法としてICjの神経投射による直接的制御、動脈-穿通枝を介した血流システムによる間接的制御、の2つの可能性を想定し、その制御を介して、報酬系の中核であるNAcの関与がわかっている意欲や気力の惹起という情動状態にICjが影響を及ぼしていると仮説を立てた。

(1) ICjの活動の亢進、あるいは抑制によって、意欲に対する影響や快樂に対する行動に変異が起こるかどうかを検出する。

(2) ICjの組織学的プロパティ及びコネクティビティを同定し、またICjの神経活動によるNAcへの直接制御を検出する。

(3) ICjを通りNAcへと至る穿通枝を念頭において、ICjの活動と血流量との相関性を検討する。

(4) (1)~(3)が解明された場合、うつ病モデルマウスを作成し、(1)~(3)で得られた結果をもとにして、症状軽減のための介入を行う。

上記(1)~(4)を通じて、NAcの役割に関与する新規の脳神経核としてICjを介して抑うつ症状に対する神経基盤を解明し、その症状を軽減するための足がかりを得たい。

3. 研究の方法

(1) ICj の活動の亢進及び抑制といった介入実験をマウス生体に対して用いて行うために、ICj 特異的に DNA 組み換え酵素である Cre タンパク質を発現するマウスを手に入れた。このマウスを、Cre を発現している細胞特異的に、光遺伝学的に神経活動を誘導できる ChR2 マウス及び神経活動の抑制を誘導できる Arch マウスと交配し子孫を得て、その次世代マウスの脳内に光刺激を与えるための光ファイバー設置手術を行い、光刺激条件下で行動実験を行う。

(2) (1)で記載した ChR2 及び Arch マウスにおいて、Cre 存在下でその下流に繋いであるレポータータンパク質である蛍光タンパク質 YFP または GFP の発現が誘導される。この YFP 及び GFP を ICj 細胞の目印とすることで、組織学的形態学的プロパティの解明を行う。

(3) 最初に血流を測定する系を確立し、(1)で記載したマウスを用いて ICj の活性化及び抑制が血流量にどう変化を与えるかを確認する。

(4) うつ病モデルマウスとして慢性弱ストレスを用いて、その症状が ICj 活性化もしくは抑制によって改善されるかをみる。

4. 研究成果

(1) ICj の活性化及び抑制を誘導したマウスの行動について

3-(1)で述べたように、ICj で特異的に ChR2 及び Arch を発現するマウスを作成し、このマウスに対して光ファイバーの先端が ICj 近辺になるように設置手術を行った。1週間手術からの回復を待ったのちに、このマウスを用いて行動実験を行った。まず、基本運動量及び不安傾向を検出するためにオープンフィールド試験を行ったが、ChR2 を活性化するための青色光刺激群(ICj 活性化マウス群)、Arch を通じて神経活動を抑制するための橙色光刺激群(IC 抑制マウス群)、対照群との間で有意差は得られなかった。次に、社会性相互作用を検出するために、野生型マウスをフィールドの一角に提示し、ICj 活性化マウス群、ICj 抑制マウス群、対照群を自由探索マウスとして相互作用エリアにどのくらい長く滞在するかを調べた。その結果、ICj 活性化マウス群は相互作用エリアでの滞在時間が短く、また提示マウスへ近づく潜時も短いことがわかった。他のグループでの先行研究で、ICj 活性化マウスを提示マウスとした場合には、野生型マウスが相互作用エリアで滞在する時間が長くなることが報告されたことを踏まえると、ICj を活性化すると他者マウスからは社会的相互作用を正に受け一方で、ICj 活性化マウス自身はむしろ社会的相互作用が負となるというミスマッチが起きていることがわかった。また、ICj 活性化光刺激を報酬とした場合に場所嗜好性が生じるかどうかを確認するテスト(即時型場所嗜好性テスト)を行った結果、光刺激による活性化が嗜好性を誘発することがわかり、ICj の活性化が“心地良い”ことが分かった。しかし、すでに報告されているように VTA-NAc の回路で NAc における DA の放出を報酬とした場所嗜好性テストと比べると滞在時間がそれほど増大しなかったため、VTA-NAc の DA 放出に比べて嗜好性の程度が低めであると想定された。

(2) ICj の組織学的解析について

ICj は NAc の一部として捉えている学説もあるため、まずは ICj の神経細胞のプロパティを NAc を含めた線条体と比較することで検討した。ICj は小型の細胞が密度高く密集しておりそこにまばらに中型、大型の神経細胞が存在していることがすでに報告されていた。小型の細胞群は GABA 細胞からなっており、顆粒細胞エリアとされている。一方、中型、大型の細胞のプロパティは報告されておらず、NAc での知見を元にそれと類似していると想定して解析した。その結果、これらの中型、大型細胞はアセチルコリン作動性細胞や一酸化窒素作動性細胞であることがわかったが、NAc や線条体でのこれらの細胞とは性質が異なっているようであった。たとえば線条体ではアセチルコリン作動性細胞は介在神経として核内投射をし、突起がそれほど長くないが、ICj 顆粒細胞エリア辺縁部に局在しているアセチルコリン作動性細胞は NAc 方面及び ICj の顆粒細胞エリアへ長い突起を伸ばしていた。またこの中型および大型細胞は顆粒細胞エリアの辺縁部に散在しており、ICj 活性化マウスや ICj 抑制マウスの蛍光タンパクをレポーターとして用いた染色結果から、少なくとも ICj 顆粒細胞からの投射を受けているであろうとも推測された。一方、当初は ICj 顆粒細胞の投射先が NAc であり、直接制御していると考えていたが、NAc に逆行性蛍光ラベルタンパクをマイクロインジェクションしその投射元を探したところ、ICj の顆粒細胞はネガティブであったことから、ICj の顆粒細胞は直接は NAc へは投射しておらず、中型、大型細胞を介して NAc の制御を行っているのではないかと現在は考えている。

一方、ICj の顆粒細胞を光刺激により活性化したマウスの脳切片を用いて、細胞の活動マーカーである c-fos で免疫染色を行ったところ、ICj の顆粒細胞を活性化すると辺縁部のアセチルコリン作動性細胞が c-fos ポジティブであった。このことから ICj の顆粒細胞が活性化されるとアセチルコリン細胞の活動も誘導されることがわかったが、顆粒細胞は GABA 作動性で抑制性神経細胞であるためまだ議論の余地があり、さらなる解析が必要である。

(3) NAc の血流測定と ICj の活性化によるその変化の検出について

本研究の前提となっていた、ICj-NAc の神経投射による NAc 活動の制御については、(2)で述

べたように直接的な制御ではないかもしれない、という結果であった。そこで間接的制御として考えていた血流測定と、ICj 活性化/抑制による介入で血流が変化するかどうかについて期待がもたれたが、血流測定の実験があまり進んでおらず、残念ながらこの項目の結果については現在も検討中である。

(4) 慢性弱ストレスによるうつ様モデルマウスを用いた、その症状に対する ICj 活性化もしくは抑制による改善効果について

(3)同様に、この実験についても現在進行中である。

以上から、ICj の活性化によって、負の社会性相互作用と場所嗜好性が示された、ICj は顆粒細胞エリアとその辺縁エリアに分かれており、辺縁エリアには中型および大型のアセチルコリン作動性細胞や一酸化窒素細胞が散在しており、これらが NAc への制御を介している可能性が示唆された。また顆粒細胞の活性化によって少なくともアセチルコリン作動性細胞が活性化されることを検出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 松股 美穂、西村 史絵、Xintong Yao、山内 厚志郎、Wangin TanWangin Tan、田中 光一、相澤 秀紀
2. 発表標題 Astrocytes dysfunction in the lateral habenular can cause depressive-like symptoms in mice.
3. 学会等名 Neuro2023 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松股 美穂、岡本 仁
2. 発表標題 手網核-脚間隔回路による中央縫線核活動の抑制が、社会的闘争における劣位化を決定付ける
3. 学会等名 第8回脳と心の研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新学術領域研究「身体-脳の機能不全を克服する潜在的適応力のシステム論的理解」若手研究者の会にて、技術手法についてのレクチャーを行った。 2021年12月7日「脳領域特異的あるいは細胞特異的に、神経細胞の活性化/抑制を誘導する手法について」松股美穂</p>
--

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