

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21653

研究課題名(和文)食中不飽和脂肪酸バランスによる情動性神経回路制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of underlying mechanism for the modulation of fear circuit by dietary polyunsaturated fatty acids

研究代表者

山田 大輔 (Yamada, Daisuke)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・科研費研究員

研究者番号：10621302

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)：本研究では、食事から摂取する 3系と 6系の多価不飽和脂肪酸(PUFA)の量比(3:6値)が、恐怖記憶の処理に関わる脳内神経回路でのシナプス伝達に与える影響について検討した。その結果、3:6値の高い(3含量が多く、6含量が少ない)餌を食べたマウスでは、聴覚性恐怖記憶が有意に減弱するとともに、聴覚性恐怖神経回路を構成する聴覚野から扁桃体外側核への投射シナプスにおいて、興奮性シナプス伝達の長期増強が減弱していた。また、これらの行動・電気生理学的な変化はいずれもカンナビノイドCB1受容体を介して起こることも明らかとなり、PUFAによる情動調節の神経回路メカニズムが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the effect of a ratio of omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA, 3:6 ratio) in the diet on synaptic transmission in fear circuit. We found that auditory fear memory was significantly reduced in mice fed a high 3:6 ratio diet, when compared with that in mice fed a low 3:6 ratio diet (control diet). In parallel with the behavioral change, long-term potentiation of optogenetically evoked excitatory synaptic transmission in auditory fear circuit (at the terminal of projection from the auditory cortex to lateral nucleus of the amygdala) was significantly reduced in mice fed a high 3:6 ratio diet. Furthermore, both behavioral and electrophysiological changes were blocked by application of an antagonist for cannabinoid CB1 receptors. These results provide new insights into the understanding of neurocircuitry mechanism for the effect of PUFA in emotion regulation.

研究分野：神経生理学

キーワード：多価不飽和脂肪酸 恐怖記憶 カンナビノイド 神経回路 扁桃体 聴覚野 シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

健やかな生活を営むためには、身体的な健康だけでなく、精神的健康すなわち健全な脳の働きを実現・維持することが重要である。そしてそのために日常的にコントロール可能な最も基本的な要素の一つは食事であるといえる。この観点から、研究代表者は「食事から摂取する栄養素が脳機能に与える影響とその作用メカニズムの解明」を目指して研究を行ってきた。

多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid: PUFA)は、細胞膜の脂質二重層のリン脂質を構成する脂肪酸のうち約 35%を占める。そして、細胞膜(脳内の神経細胞膜も含む)の脂肪酸組成は摂取する脂肪酸組成を反映して変動することが知られている。PUFA は主に 3系、6系の二種類に分けられる。ヒトを対象とした臨床研究・疫学研究やげっ歯類を用いた基礎研究において、3 PUFA と情動性の関連を示唆する報告が多くなされているが、その作用メカニズムについてはほとんど不明なまま残されている。特に条件性恐怖記憶への関与については報告がない。

これまでに行われてきた研究は、一般に 3系 PUFA 単独の影響を検討するものが主であったが、我々は先行研究において、6系との関連性にも注目し、食事中および脳内の 3、6二種類の PUFA の量比(以下 3:6値と記す)が恐怖記憶の程度と逆相関することを見出した(たとえ 3を多く摂取しても、6も多く摂取すると恐怖記憶の抑制作用が消失する;図 1A)。そしてそのメカニズムとして、脳内シナプス伝達のフィードバック抑制システムとして機能するカンナビノイド

システムが、情動中枢である扁桃体内で増強していること(CB1 受容体の活性が増強;図 1B)さらに CB1 受容体の活性増強は、PUFA 摂取による細胞膜中のコレステロール量の調節によって実現されるという新規メカニズムを提唱した。

しかし、上記研究においては 3:6 値による恐怖記憶の修飾がどこまで及ぶのか、神経回路レベルでの理解には至っていなかった。恐怖記憶の制御には様々な脳領域間の情報のやり取り(恐怖神経回路と呼ぶ)が必要であることが知られているが、扁桃体は他の様々な脳部位からの投射入力を受けているため、従来から一般的に用いられている電気刺激法を使った場合、記録されるシナプス伝達はそれらの脳部位から入力するシグナルが混在したものになってしまうからである。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、上記の問題点を解決し、摂取する餌の 3:6 値によって影響を受ける神経回路と具体的に生じるシナプス伝達の変化を明らかにすることを目的として、オプトジェネティクスと脳スライスパッチクランプを組み合わせた手法を確立し、検討を行なった。

3. 研究の方法

高 3:6 値餌(3系が多く 6系が少ない:5% krill)と低 3:6 値餌(3系が少なく、6系が多い対照餌: control)を 6週間食べさせてマウスを飼育し、給餌期間後に聴覚性恐怖条件づけ試験(音を条件刺激とする)を行った。

次に、青色光を照射することで活性化して細胞を脱分極させる陽イオンチャネル・チャネルロドプシン 2 (ChR2)と黄色蛍光タンパク(YFP)の遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを聴覚野恐怖神経回路を構成する聴覚野に投与し、聴覚野のニューロンに ChR2-YFP を発現させた。聴覚野は恐怖記憶の処理中枢である扁桃体の外側核へ投射し、音の情報を伝えることが知られている。したがって本方法により、聴覚性恐怖条件づけにおける条件刺激に関連したシナプス伝達を誘発することができ、このシナプス伝達に対する 3:6 値の影響を検討することが可能となる。

上記方法によって聴覚野 扁桃体外側核の興奮性シナプス伝達を誘発し、特に記憶の素過程として知られる長期増強について検討を行った。扁桃体における興奮性シナプス伝達の長期増強は、恐怖記憶の形成や想起に関与することが報告されていることから、こ

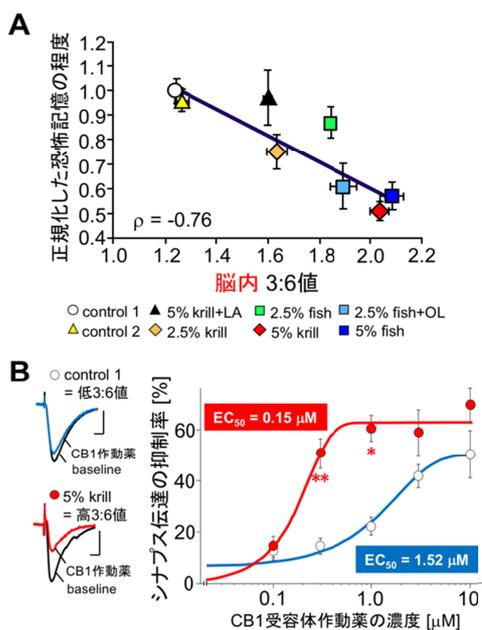


図1. (A) 脳内のω3:ω6量比と恐怖記憶は逆相関する。(B) 高3:6値餌摂取により扁桃体興奮性シナプスにおいてCB1受容体作動薬に対する感受性が増強する。

ここで得られる結果は上記聴覚性恐怖記憶との関連性があると考えられる。また、同シナプス伝達に対するカンナビノイドシステムの関与についても検討した。

4. 研究成果

6週間の給餌期間後、聴覚性恐怖条件づけ試験において、我々の先行研究における文脈性恐怖記憶と同様、高3:6値餌摂取マウスで聴覚性恐怖記憶の有意な低下が認められた。文脈性恐怖記憶と聴覚性恐怖記憶は、それぞれ異なる神経回路により制御されることが知られている。したがって、3:6値の影響は複数の神経回路に及ぶ可能性が示唆された。

また、この聴覚性恐怖記憶の低下は、条件づけ前にカンナビノイド CB1 受容体の遮断薬を投与することによって消失したことから、高3:6値餌摂取によって聴覚性恐怖記憶が減弱するメカニズムには CB1 受容体の活性化が関与する可能性が考えられた(図2)。

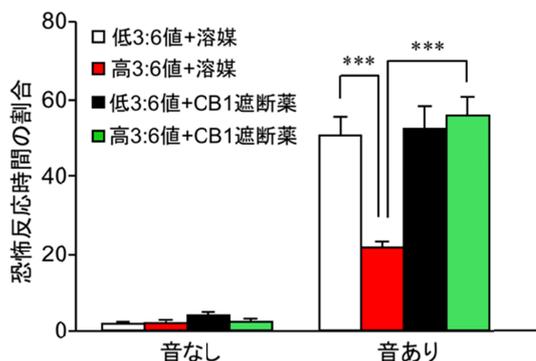


図2. 聴覚性恐怖条件づけ試験. 高3:6値餌摂取により恐怖反応が有意に低下する. この作用は CB1受容体遮断薬投与により消失する.

次に、聴覚野から扁桃体外側核への投射線維を YFP の蛍光を指標に同定し、YFP 陽性線維周囲に位置する扁桃体外側核内錐体細胞からパッチクランプ記録を行った。GABA_A 受容体阻害薬ピクロトキシン存在下で、記録細胞周辺に局所的(直径 50 μ m 程度)に青色光を照射することにより、聴覚野 扁桃体シナプスにおける興奮性シナプス伝達を誘発した。

この興奮性シナプス伝達の長期増強を検討するにあたり、一般に用いられる高頻度刺激ではなく、より生理的条件に近い spike timing-dependent plasticity (STDP)を誘導する条件を用いた。その結果、低3:6値餌摂取マウス(図3の白シンボルで表示)では長期増強誘導後、安定してシナプス伝達の増強が認められたが、高3:6値餌摂取マウス(図3の赤シンボルで表示)では同シナプス伝達の増強程度が有意に小さいことが明らかとなった(図3A)。さらに、上記の長期増強に

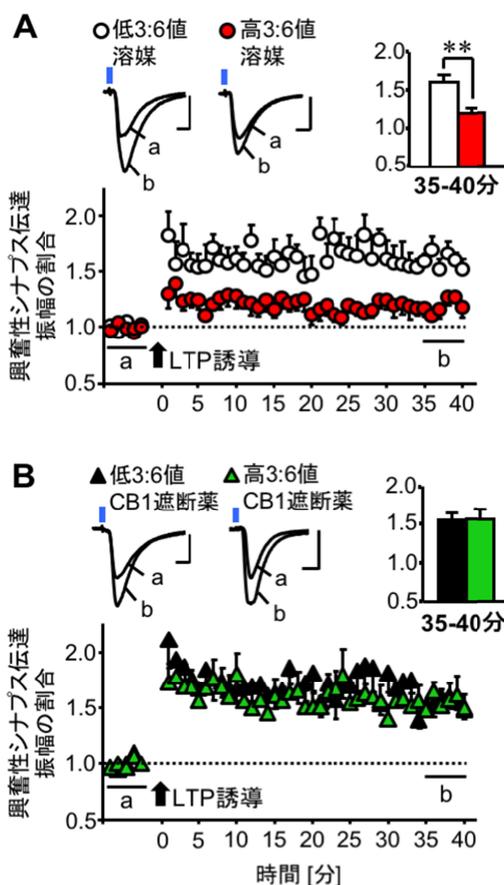


図3. 聴覚野→扁桃体外側核シナプスにおける光誘発性興奮性シナプス伝達の長期増強. (A) 人口脳脊髄液中, (B) CB1遮断薬で処理.

対する 3:6 値の影響は、長期増強誘導前に脳スライスに CB1 受容体遮断薬で処理することにより消失した(図3B)。このことから、長期増強を修飾するメカニズムについても、カンナビノイドシステムが関与する可能性が示唆された。

前述の通り、カンナビノイドシステムは脳内において強いシナプス伝達が起こった際、これを抑えるフィードバック抑制システムとして働くことが知られている。すなわち、CB1 受容体作動薬は扁桃体においても興奮性シナプス伝達の振幅を減少させる。そこで、高3:6値餌摂取マウス脳内の CB1 受容体活性を調べるため、聴覚野 扁桃体外側核シナプス伝達に対する CB1 受容体作動薬の作用を検討した。図4に示すように、CB1 受容体作動薬による興奮性シナプス伝達の抑制の程度は、低3:6値餌摂取マウスに比べ高3:6値餌摂取マウスで有意に強まっていた。CB1 受容体の発現量や扁桃体における CB1 受容体の内因性作動物質の量には顕著な変化は認められないことから、上記結果は CB1 受容体の作動薬に対する CB1 受容体の感受性が増強しているものと考えられた。

以上の結果から、(1)摂取する食事に含まれ

る 3 系と 6 系の PUFA のバランスを反映して脳内（すなわち脳細胞膜の脂質二重層）の PUFA バランスが変化し、(2)これが聴覚野から扁桃体外側核という恐怖神経回路内のカンナビノイドシステムの働きを強めることにより、シナプス伝達の長期可塑性を調節することが示唆された。

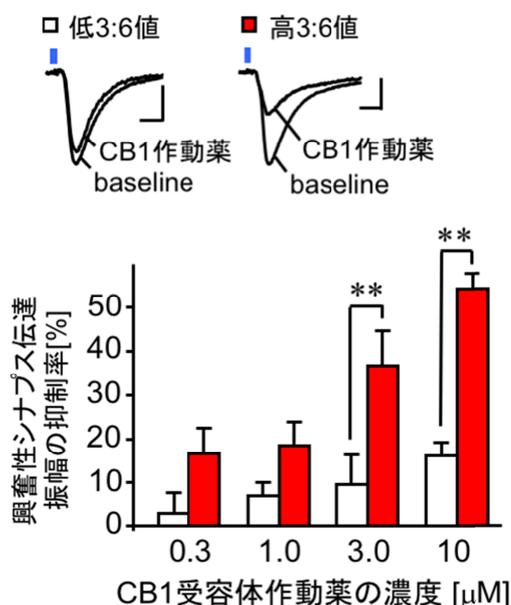


図4. 聴覚野→扁桃体外側核シナプスにおける光誘発性興奮性シナプス伝達の振幅に対する CB1 受容体作動薬の抑制作用。

本研究では、3 系、6 系 PUFA による恐怖記憶の制御メカニズムを特定の神経回路レベルで示し、これまでの PUFA 研究において未解明のまま残されていた課題を世界に先駆けて解決した。ただし、恐怖神経回路における興奮性シナプス伝達の長期可塑性の変化と、聴覚性恐怖記憶の変化との間に直接的な因果関係が存在するかについての明確なデータは得られておらず、今後さらなる研究が必要である。また、本研究で対象とした恐怖神経回路以外にも PUFA バランスによって影響を受ける脳部位・神経回路が存在する可能性が考えられる。たとえば、ヒトにおいて ω3 PUFA サプリメントが症状緩和に有効性を示すとの報告があるうつ病に關与する神経回路について検討することは、今後精神疾患の治療等における PUFA の利用可能性を大いに発展させると期待できることから、この点についてもさらに研究を進める必要があると考える。

本研究で得られた成果は基礎科学的なものではあるが、臨床研究や疫学的研究において、3 PUFA 投与が不安を軽減するなどの有効性が報告されていることから、例えば PUFA を用いた不安症患者への食事介入を行う可能性も考えられる。その際、本研究の成

果はエビデンスに基づく食事介入を行うための基礎的情報を提供するものとして有効利用できる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Daisuke Yamada, Keiji Wada, Masayuki Sekiguchi. Modulation of long-term potentiation of cortico-amygdala synaptic responses by dietary polyunsaturated fatty acid. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2016, Vol 10, Article 164, doi: 10.3389/fnbeh.2016.00164. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

山田 大輔、関口 正幸 「食中脂肪酸バランスによる情動制御とその神経メカニズム」第 134 回日本薬理学会関東部会 シンポジウム(招待あり)2016 年 7 月 9 日 国際医療福祉大学(栃木県大田原市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 3 件)

名称：恐怖記憶の軽減方法
 発明者：関口 正幸、山田 大輔、竹尾 仁良、関 和佳子、和田 圭司
 権利者：日本水産株式会社、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
 種類：特許
 番号：6067558 号
 取得年月日：2017 年 1 月 6 日
 国内外の別：国内

名称：Method for alleviating fear memory
 発明者：Masayuki Sekiguchi, Daisuke Yamada, Jiro Takeo, Wakako Seki, Keiji Wada
 権利者：Nippon Suisan Kaisha, LTD.; National Center of Neurology and Psychiatry
 種類：特許
 番号：US 9107891 B2
 取得年月日：2015 年 8 月 18 日
 国内外の別：国外(米国)

名称：恐怖記憶の軽減方法
 発明者：関口 正幸、山田 大輔、竹尾 仁良、関 和佳子、和田 圭司
 権利者：日本水産株式会社、独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター
 種類：特許

番号：ZL 2012 8 0032795.3
取得年月日：2016年11月30日
国内外の別：国外（中国）

〔その他〕
ホームページ等
<https://researchmap.jp/dericon/>

6．研究組織

(1)研究代表者

山田 大輔（YAMADA, Daisuke）
国立研究開発法人 国立精神・神経医療研
究センター・神経研究所・疾病研究第四
部・科研費研究員
研究者番号：10621302