

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15190

研究課題名(和文)恐怖心による副交感神経活性の中枢経路の解明

研究課題名(英文)Central pathways mediating autonomic cardiovascular adjustments to fear

研究代表者

木場 智史(Koba, Satoshi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40565743

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究は副交感神経活性に由来した恐怖性徐脈反応を担う中枢回路の解明を目的とした。中枢回路標識実験から、恐怖時に興奮し、徐脈反応に関連し得る視床下部・中脳・延髄の領域を含む脳内ネットワークを明らかにした。次に、覚醒ラットの生体信号記録と光遺伝学/DREADDsを組み合わせた実験から、そのうちの経路を生成する神経細胞集団の選択的活動抑制が恐怖性徐脈反応に与える影響を検討した。しかし、その経路が恐怖性徐脈を担う実験的証拠を得なかった。

研究成果の概要(英文):This project aimed to identify central circuitries underlying fear bradycardia. The neural tracing experiments combined with immunofluorescence found several central cardiovascular multisynaptic pathways throughout the rat whole brain. In vivo observations of cardiovascular parameters during fear in rats combined with optogenetics or DREADDs were further conducted to determine functional roles a cardiovascular pathway identified by neural tracing experiments plays in fear bradycardia. Selective inhibition of neuronal excitation by the cardiovascular pathway did not affect fear bradycardia in conscious rats.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：恐怖 徐脈 自律神経

1. 研究開始当初の背景

恐怖心が惹起すると、交感・副交感神経両方の活性化という特異な自律神経反応が生成される(Hermans *et al.* *Neuroimage* 2013). 恐怖心による副交感神経活性の徐脈反応を担う脳メカニズムについては研究自体がない. 本研究代表者はこの課題への取り組みを開始していた. まず、恐怖性自律・循環反応のラット実験モデルを先行研究(Yoshimoto *et al.* *AJP-Reg*, 2010)に倣って追試したところ、先行研究と同様に、覚醒・自由行動ラットにホワイトノイズ音を曝露することですくみ行動(恐怖心の行動指標)を誘発させた際、腎支配の交感神経活動の増加と同時に、副交感神経活動の増加に起因した徐脈が起こることを観察した.

この実験モデルを用い、恐怖心により「尾側中脳中心灰白質の外側・腹外側野(1/v1PAG)から延髄疑核およびその周辺(NA)への同側性の投射」(1/v1PAG-NA神経)が刺激され、そして副交感神経が刺激されて徐脈が起こることを突き止め、その成果を誌上発表した(Koba *et al.* *Physiol Rep*, 2016). つまり、この神経投射は“恐怖心”と“副交感神経”をつなぐ中枢経路の一部である. しかし、恐怖心がどのような下降路を経て1/v1PAG-NA神経を刺激するかは不明であった.

2. 研究の目的

本研究の目的は、恐怖性徐脈反応を担う1/v1PAG-NA神経の上位脳領域Xの探索であった. また、領域Xから1/v1PAGへの投射神経と1/v1PAG-NA神経とが直接にシナプスを形成するかを確認することを目的とした、狂犬病ウイルス・アデノウイルスベクターを使用するTRIO法による神経トレース実験(Schwarz *et al.* *Nature* 2015)を行う予定であった. しかし当初申請額からの配分額減により、その実験系の立ち上げを断念した. ただし、当初目的には含めなかったが、研究の過程においてその重要性を確信したことから、恐怖性交感神経活性を担う中枢経路の探索も行った.

3. 研究の方法

(1) 神経回路標識実験

1/v1PAGに投射する上位脳領域を探索するために、コレラ毒素サブユニットb(CTb, 逆行性神経トレーサ)を用いてラット神経回路を標識した. 麻酔ラットの1/v1PAG(片側)にCTbを微量注入(96.0 nl)した. 9~11日後、覚醒ラットに対する30分間のホワイトノイズ音曝露(90 dB, Koba *et al.* *Physiol Rep* 2016)によって、すくみ行動を伴う恐怖心を惹起させた. ホワイトノイズ音曝露終了から60分後、深麻酔下のラットを脱血・かん流固定したのち、抜脳した. 冠状脳切片(30 μ m厚)を作成し、CTbおよび神経活性マーカーとなるFosタンパク質に対する免疫染色を行った.

全脳的に、CTb陽性細胞体の局在領域を探索した.

また本プロジェクトとは異なる研究(本研究代表者が研究代表を務める他の科研・15H05367)において、交感神経活性を担うとされる延髄吻側腹外側野(RVLM)に投射する上位脳領域の探索も行っていった. RVLMはNAの腹側に位置する. レポータタンパク質GFPを発現させる逆行性のアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)をRVLMとして標的として注入したところ、その拡散領域がRVLMより背側、すなわちNA周辺にあった場合があった. その場合には、NA周辺に投射する1/v1PAG以外の上位脳領域の同定を研究目的とし、投射神経細胞体の局在領域を探索した.

(2) 覚醒ラット恐怖心惹起時における自律性循環反応に対するオプトジェネティクス・DREADDsによる中枢神経活動操作の影響

神経回路標識実験で明らかとなった投射神経の興奮性を選択的に操作するためにオプトジェネティクスあるいはDREADDsを用いた. 麻酔ラットの脳内にAAVを注入し、チャネルロドプシン、アーキロドプシン、ジョーズなどの光感受性タンパク質やhM3DあるいはhM4Dといったクロザピンに対する人工受容体を発現させた. また組み換え酵素Creを組み込んだ逆行性AAVを脳内に注入されたラットも作成した. 光受容体タンパク質を発現させるラット脳内には、光照射のための光ファイバーも留置した. AAV注入後から4週以上後、動脈圧・心拍数を計測するテレメトリー送信機(ミラー社, TRM54P)を麻酔ラットの腹部動脈内に、および薬物投与のためのカテーテルを頸静脈内に留置した. テレメトリー送信機の留置から3日以上後に、恐怖性循環反応に対する特定中枢神経活動操作の影響を検討した. 覚醒ラットに対する5分間のホワイトノイズ音曝露によって、すくみ行動を伴う恐怖心を惹起させた. 光受容体タンパク質を活性化させる波長のレーザー光を照射することで、あるいはクロザピン(CNO)を静脈内投与することで、特定中枢神経活動の操作を試みた.

4. 研究成果

(1) 神経回路標識実験

1/v1PAGへのCTb注入ラット脳に対する免疫染色実験から、CTb陽性細胞体は特に視床下部外側野、視床下部腹内側野、視床下部背内側野、視床下部後部、皮質聴覚野に分布していた. さらに、Fosとの共陽性細胞を探索したところ、視床下部外側野に顕著に存在した(図1a). 恐怖中枢として知られている扁桃体では、その出力核として知られる中心核にCTb陽性細胞が少量分布したのみであり、Fosとの共陽性細胞はほとんど存在しなかった(図1b).

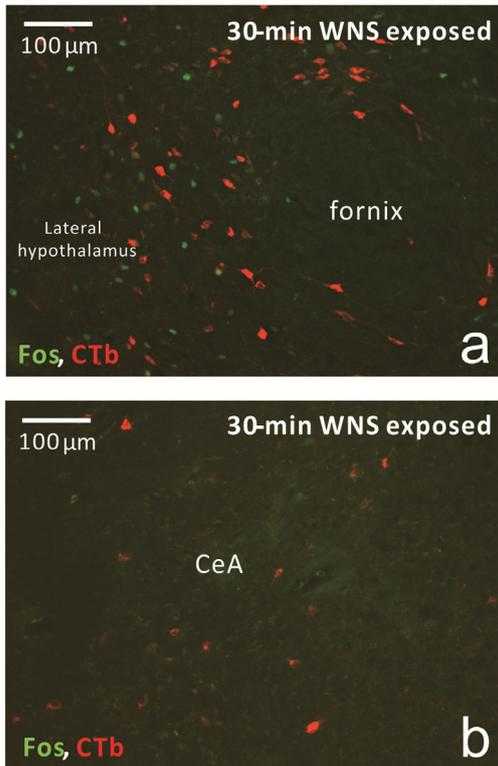


図 1. 1/v1PAG への CTb 注入ラット(ホワイトノイズ音曝露)脳冠状切片(a: ブレグマより 3.00 ミリメートル尾側, b: ブレグマより -2.04 ミリメートル尾側)の CTb および Fos タンパク質に対する免疫染色実験。CeA: central amygdala.

延髄疑核周辺への逆行性 AAV 注入ラット脳に対する免疫染色実験から、GFP 陽性細胞体は扁桃体中心核において相当数が分布していた。延髄疑核周辺領域の興奮は徐脈反応を起こすことから(Koba *et al. Physiol Rep*, 2016), 恐怖中枢である扁桃体の中心核から延髄疑核への投射神経は恐怖性徐脈の生成に関与する可能性が指摘できる。

(2) 覚醒ラット恐怖心惹起時における自律性循環反応に対するオプトジェネティクス・DREADDs による中枢神経活動操作の影響

本研究代表者が研究代表を務める他の科研・15H05367 におけるプロジェクトにおいて、視床下部室傍核(PVN)から RVLM への投射神経(PVN-RVLM 神経)の興奮は交感神経活性を担うことを明らかにした(未発表データ)。恐怖時には交感神経活性も伴う。そこで、恐怖性交感神経活性を担う中枢経路の特定を目的とし、「PVN-RVLM 神経の活動抑制はすくみ行動時の昇圧応答を抑制する」との仮説を検証した。まず、オプトジェネティクスによる PVN-RVLM 神経の活動抑制を試みた。ラット PVN の両側にアーキロドプシンを発現させるための AAV の注入および RVLM を照射標的とした光ファイバーの留置を行い 4 週以上の回復期間をとった。そしてテレメトリを体内留

置した。術後 3 日以上して実験を行った。ラットにホワイトノイズ音を 5 分間曝露して恐怖刺激を与えた際の動脈圧・心拍数応答を記録した。5 分間の恐怖刺激中に 5 回、5 秒間の 532 nm 波長レーザー光(continuous mode で 10 mW)を RVLM 両側にランダムなタイミングで照射した。恐怖刺激時の昇圧・徐脈反応にレーザー光照射の影響は認められなかった(N=3)。PVN-RVLM 神経は恐怖性の自律循環反応に関わらないかもしれない。しかし、安静時の覚醒ラット RVLM にレーザー光を照射しても動脈圧・心拍数に影響しなかったことから、PVN-RVLM 神経活動の操作がうまくいかなかった可能性も否定できない。

そこで PVN-RVLM 神経活動の抑制操作を DREADDs 法でも試みた。Cre を発現させる逆行性 AAV を RVLM に、Cre 依存に hM4D を発現させる AAV を PVN に注入した。AAV 注入から 4 週以上後、テレメトリを留置した覚醒ラットにおいて実験を行った。生食あるいは CNO(1 あるいは 2 mg/kg)を静脈内投与して 30 分後に、ホワイトノイズを曝露に対する動脈圧・心拍数反応を観察した。恐怖刺激時の昇圧・徐脈反応に CNO 投与の影響はなかった(N=2)。ただし、CNO 投与によって PVN-RVLM 神経活動が適切に操作できたかは本実験では不明である。この課題を解決するには、CNO 投与群と生食投与群とでホワイトノイズ音曝露時の PVN-RVLM 神経細胞における Fos タンパク質発現や PVN-RVLM 神経細胞電気活動の選択的記録を行う必要がある。これらの実験は今後の課題である。

(3) まとめ

本研究で行った神経回路標識実験から、恐怖心と循環中枢(交感神経活性あるいは副交感神経活性を担う)とを結ぶ脳内ネットワークの解析が進んだ。一方で、その回路網を構成する一因子：特定の投射神経集団による恐怖性自律反応における役割を立証するには至らなかった。その理由として、1)覚醒ラットにおける特定神経細胞集団の活動操作の適正さに、まだ改善の余地があり、これは今後の研究課題である。また、2)覚醒下における恐怖性自律反応は特定神経細胞集団の活動操作によって変化できるのか?といった疑問点も挙げられる。動脈圧を一定にする働きは、生体ホメオスタシス維持の最重要課題である。特定中枢神経の活動を人為的に抑制できたとしても、他の神経細胞が動員され、生体は瞬時に循環系パラメータを一定にするメカニズムを有していてもおかしくはない。その場合、本研究で用いたオプトジェネティクス・DREADDs による神経活動操作による実験アプローチは不適切かもしれない。また、3) PVN-RVLM 神経以外の神経細胞集団が恐怖性自律反応に主要な役割を果たす可能性もある。今後、1)、2)、および 3)の視座から、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Satoshi Koba (corr. author). Angiotensin II, oxidative stress, and sympathetic nervous system hyperactivity in heart failure. *Yonago Acta Medica*, in press. 【招待総説, 査読有】
2. Nao Kumada, Satoshi Koba (corr. author), Eri Hanai, Tatsuo Watanabe. Distribution of Fos-immunoreactive cells in the ventral part of the medulla following voluntary treadmill exercise. *Autonomic Neuroscience Basic & Clinical* 208: 80-87, 2017. doi: 10.1016/j.autneu.2017.09.014. 【原著論文, 査読有】
3. Satoshi Koba (corr. author). Central command: brain control of the circulation during exercise. The Autonomic Nervous system (日本自律神経学会誌) 53: 118-121, 2016. 【解説記事, 査読有】
4. Satoshi Koba (corr. author), Ryo Inoue, Tatsuo Watanabe. Role played by periaqueductal gray neurons in parasympathetically mediated fear bradycardia in conscious rats. *Physiological Reports* 4(12): e12831, 2016. doi/10.14814/phy2.12831. 【原著論文, 査読有】

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Satoshi Koba. Central neural circuits underlying sympathetic adjustments to exercise. 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年 3 月. 【シンポジスト, 招待】
2. Satoshi Koba. Central neural mechanism underlying sympathetic hyperactivity in heart failure. 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年 3 月. 【シンポジスト, 招待】
3. Eri Hanai, Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe. Are PVN-RVLM neurons involved in sympathetic dysfunction in heart failure? 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年 3 月. 【ポスター発表】
4. Nao Kumada, Satoshi Koba, Eri Hanai, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Blood pressure regulation by neurons projecting from the mesencephalic locomotor region to the rostral ventrolateral medulla in rats. 第 95 回日本生理学会大会, 高松市, 2018 年 3 月. 【ポスター発表】
5. 熊田奈桜, 木場智史, 花井映里, 渡邊達生. 中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野への投射神経刺激による昇圧反応. 第

69 回日本生理学会中国四国地方会, 徳島市, 2017 年 10 月. 【口頭発表】

6. Satoshi Koba, Eri Hanai, Nao Kumada, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Effect of glutamate receptor blockade in RVLM on PVN stimulation-elicited sympathoexcitation in anesthetized rats. International Society for Autonomic Neuroscience 2017, 名古屋市, 2017 年 8-9 月. 【ポスター発表】
7. Eri Hanai, Satoshi Koba, Nao Kumada, Tatsuo Watanabe. Effect of optogenetic inhibition of PVN-RVLM neurons on sympathetic nerve activity in anesthetized rats with heart failure. International Society for Autonomic Neuroscience 2017, 名古屋市, 2017 年 8-9 月. 【ポスター発表】
8. Satoshi Koba, Eri Hanai, Nao Kumada, Naoya Kataoka, Kazuhiro Nakamura, Tatsuo Watanabe. Optogenetic stimulation of PVN-RVLM neurons increases sympathetic nerve activity in anesthetized rats. Experimental Biology 2017, 米国シカゴ, 2017 年 4 月. 【ポスター発表】
9. Eri Hanai, Satoshi Koba, Tatsuo Watanabe. Posterior hypothalamic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus are activated by exercise in rats. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松市, 2017 年 3 月. 【ポスター発表】
10. Nao Kumada, Satoshi Koba, Tatsuo Watanabe. Distribution of activated catecholaminergic neurons by exercise in the rat ventral medulla. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松市, 2017 年 3 月. 【ポスター発表】
11. 花井映里, 木場智史, 熊田奈桜, 渡邊達生. 運動時交感神経活性の中中枢路の探索. 第 12 回環境生理学プレコンgres, 浜松市, 2017 年 3 月. 【口頭発表】
12. 花井映里, 木場智史, 渡邊達生. 視床下部後部から視床下部室傍核への中枢経路は運動によって活性化する. 第 68 回日本生理学会中国四国地方会, 岡山市, 2016 年 11 月. 【口頭発表】
13. 木場智史, 花井映里, 熊田奈桜. 運動トレーニングと循環中枢回路. 計測自動制御学会ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2016, 大阪市, 2016 年 11 月. 【シンポジスト, 企画, 招待】
14. Satoshi Koba, Momone Kato, Eri Hanai, Ryo Inoue, Tatsuo Watanabe. Central efferent projections to medulla for autonomic adjustments to exercise in rats. Experimental Biology 2016, 米国サンディエゴ, 2016 年 4 月. 【ポスタ

一発表】

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

1. https://researchmap.jp/satoshi_koba/
2. http://researchers.adm.tottori-u.ac.jp/html/100000153_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木場 智史 (KOBASATOSHI)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40565743