

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05054

研究課題名（和文）ストレスによる情動障害に関わる神経基盤の解明と創薬研究への応用

研究課題名（英文）A novel mechanism for the development of stress-related psychiatric disorders

研究代表者

笠井 淳司（Kasai, Atsushi）

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40454649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,000,000円

研究成果の概要（和文）：精神的なストレスは、うつ病などの精神疾患が発症の原因になりうるものの、その発症メカニズムはいまだ不明な点が多い。本研究では、全脳細胞の活性化マッピングと機械学習等のデータ駆動型解析を組み合わせ、ストレス応答やその後のうつ様行動発症に関わる新たな神経細胞集団を同定した。この細胞集団の神経回路の入力と出力先を、全脳レベルで明らかにし、この細胞集団を特異的に神経活動操作することによりストレス後の不安行動や反復ストレスによるうつ様行動発症を制御できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不安症やうつ病の新規治療薬の第一選択薬は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬であり、過去数十年間新薬は出ていない。しかし、うつ病患者の約3割は、既存の抗うつ薬では治療効果が得られない難治性であるとされている。そのため、新たな機序の抗うつ薬・不安症等の治療薬開発が求められている。本研究によって同定されたストレス応答性の細胞集団は、これらストレス性精神疾患の新たな標的になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Although mental stress can cause the onset of psychiatric disorders such as depression, the pathogenesis of these disorders remains unclear. Here, we combined whole-brain activation mapping and data-driven analysis by support vector machine to identify a new population of neurons involved in the stress response and subsequent development of depression-like behavior. We have clarified the neuronal connectivity of the cell population to stress circuits at the whole brain level, and showed that specific neural manipulation of the cell population can mediate bidirectional and reversible control of stress-induced anxiety-related behavior and the onset of depressive-like behaviors. These results suggest that the cell population can be a therapeutic target for stress-related psychiatric disorders.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ストレス 全脳 不安 うつ

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病は繰り返されるストレスが原因で発症すると考えられるものの、その神経基盤は未解明である。うつなどの気分障害は、治療抵抗性症例も多く、アンメットメディカルニーズがきい疾患領域の一つである。実際、モノアミン仮説に基づいた抗うつ薬の開発以降、20年来、有用な新薬開発に成功していない。

一過性の精神的ストレス応答は、本来生存を促すための適切な行動選択を可能にする適応反応であるが、ストレスが過度になったり慢性的になったりすると、不安障害やうつ病などの精神疾患の発症につながる。ストレス応答は、カテコラミンの遊離とその後の不安関連行動などの情動行動の発現などの複数のプロセスからなり、大脳皮質からの感覚情報ならびに海馬からの記憶情報を受け取る扁桃体を中心とする神経ネットワークにより制御されていると考えられている。しかし、ストレスの受容と処理、そして、うつ病発症に繋がる神経メカニズムは未だ完全に解明されていない。

我々は、仮説に基づかずに、脳機能やその機能障害による精神疾患発症に関わる神経メカニズムを明らかにするため、脳全体を高速かつ高精細にイメージングする装置 FAST を構築してきた。さらに活性化した神経細胞を標識する Arc-dVenus レポーターマウスを組み合わせたデータ駆動型解析による新たな脳研究の方法論を構築してきた。本研究では、以下の目的のもとに、この方法論を駆使して研究を遂行し、ストレス性精神疾患発症に関わる神経メカニズムの解明と創薬応用を目指した。

## 2. 研究の目的

Arc-dVenus レポーターマウスを用いて、急性の精神的ストレス後の全脳イメージングを実施したところ、様々な脳領域において dVenus 陽性細胞を検出することに成功している。そこで本研究では、下記の3つの目的を立て、脳全体からストレス性精神疾患発症に関わる特に重要な脳領域や細胞集団を同定することを目的にした。

- (1) 2つの急性ストレスモデルにおいて共通して活性化する脳領域の探索
- (2) 特徴となる細胞集団特異的な活動操作が行動に与える影響
- (3) 反復ストレス時の神経活動操作がうつ様行動発現に与える影響

## 3. 研究の方法

7~13週齢の C57BL/6J を遺伝的背景とする、Arc-dVenus 雄性マウスを使用した。飼育条件は室温  $22 \pm 1$ 、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。

- (1) 2つの急性ストレスモデルにおいて共通して活性化する脳領域の探索

精神的なストレスモデルとして、30分間の拘束ストレス、および10分間の体格の大きい攻撃的なマウスに暴露させる社会的敗北ストレスを用いた。Arc-dVenus マウスにこれらのストレスを負荷後、5時間後に脳をイメージングした。その後、FAST を用いて全脳活動マッピングを実施し、機械学習による判別分析を実施した。

- (2) 特徴となる細胞集団特異的な活動操作が行動に与える影響

ストレスにより活性化する神経細胞の特異的な活動制御には、タモキシフェン誘導型 Cre と、Cre 依存的に発現する人工受容体 hM3Dq または hM4Di を発現するシステムを用いた。ストレス応答性の細胞集団を標識するため、タモキシフェン存在下において 10 分間の社会的敗北ストレスを負荷した。行動試験には、高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験を用いた。

### (3) 反復ストレス時の神経活動操作がうつ様行動発現に与える影響

ストレスにより活性化する神経細胞特異的に抑制性人工受容体 hM4Di を発現させ、特異的リガンド CNO を投与 30 分後に社会的敗北ストレスを負荷した。この操作を連続 10 日間実施し、11 日目に social preference-avoidance 試験を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 2つの急性ストレスモデルにおいて共通して活性化する脳領域の探索

拘束ストレスおよび社会的敗北ストレスを負荷した Arc-dVenus レポーターマウスの脳と、ホームケージ内で飼育したコントロールマウスの脳の全脳イメージングと dVenus 陽性細胞数を計数した。その後、ストレス負荷マウス脳とホームケージ飼育マウス脳の活動マッピングデータを用いて、サポートベクターマシンのによる判別分析を実施した結果、ホームケージ群と拘束ストレス群、およびホームケージ群と社会的敗北ストレス群の 2 つの判別に重要な脳領域として、前障および扁桃体基底外側核、視覚野を見出した。その中でも、前障が判別に最も大きく寄与する領域であった。

### (2) 特徴となる細胞集団特異的な活動操作が行動に与える影響

前障に、最初期遺伝子 Fos プロモーター制御下に  $ERT2Cre^{ERT2}$  を、CaMKIIa プロモーター制御下に DIO-hM3Dq-mCherry または DIO-mCherry を発現させるアデノ随伴ウイルスを注入後、タモキシフェン存在下で社会的敗北ストレスを負荷し、ストレスにより活性化した前障神経細胞特異的に hM3Dq-mCherry または mCherry を発現させた。その後、CNO 投与後にオープンフィールド試験および高架式十字迷路試験を行い、自発運動量および不安関連行動を測定した。その結果、hM3Dq-mCherry 発現マウスは、mCherry 発現マウスと比較して、総運動量に変化はなかったが、中央滞在時間が有意に減少した。また、高架式十字迷路試験においては、hM3Dq-mCherry 発現マウスは、mCherry 発現マウスと比較して、不安関連行動の指標となるオープンアーム滞在時間が有意に減少した。ストレス誘発不安関連行動には、ドパミンおよびノルアドレナリンが関与することが知られている。そこで次に、hM3Dq-mCherry 発現マウスの不安関連行動にドパミンおよびノルアドレナリンシグナルが関与するかを行動薬理的に解析した。その結果、hM3Dq-mCherry 発現マウスの前障神経細胞の再活性化により惹起される不安関連行動は、D2 受容体遮断薬 raclopride および 受容体遮断薬 propranolol により有意に抑制された。

同様の方法を用いて、ストレス応答性前障神経細胞に hM4Di-mCherry を発現させた、社会的敗北ストレス後の不安関連行動を計測した。その結果、hM4Di-mCherry 発現マウスは、mCherry 発現マウスと比較して、総運動量に変化はなかったが、中央滞在時間が有意に増加した。また、高架式十字迷路試験においては、hM4Di-mCherry 発現マウスは、mCherry 発現マウスと比較して、オープンアーム滞在時間が有意に増加した。

### (3) 反復ストレス時の神経活動操作がうつ様行動発現に与える影響

社会的敗北ストレスを 10 日間繰り返すことによりうつ様行動が誘導される。そこで、hM4Di-

mCherry 発現マウスを用いて、社会的敗北ストレス時にストレス応答性前障神経細胞の活動抑制がうつ様行動の発現に与える影響を解析した。その結果、mCherry 発現マウスと比較して、hM4Di-mCherry 発現マウスは、社会的な忌避行動が低下することを見出した。さらに、うつ症状の一つである無快感状態をシヨ糖嗜好性試験により測定したところ、hM4Di-mCherry 発現マウスのシヨ糖飲水率が mCherry 発現マウスに比べて有意に増加した。

以上より、全脳活動マッピングと仮説フリーな解析を通じて、ストレス応答に重要な脳領域として新たに前障を見出し、ストレスにより活性化する前障の細胞集団の化学遺伝学的な操作により、ストレス誘発性の不安関連行動が制御されることを示した。さらに、繰り返されるストレスにより惹起されるうつ様行動の発現にも重要な役割を担っていること示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Seiriki K, Kasai A, et al,	4. 巻 94
2. 論文標題 High-Speed and Scalable Whole-Brain Imaging in Rodents and Primates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1100.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2017.05.017	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 該当する

1. 著者名 Seiriki Kaoru, Kasai Atsushi, Nakazawa Takanobu, Niu Misaki, Naka Yuichiro, Tanuma Masato, Igarashi Hisato, Yamaura Kosei, Hayata-Takano Atsuko, Ago Yukio, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Whole-brain block-face serial microscopy tomography at subcellular resolution using FAST	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1509 ~ 1529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-019-0148-4	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9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Atsushi Kasai et al
2. 発表標題 Clastrum is involved in stress-induced anxiety-like behaviors
3. 学会等名 Cold Spring Harbor meeting: Molecular Mechanisms of neuronal connectivity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Kasai et al
2. 発表標題 Activation of claustral glutamatergic neurons induces anxiety-like behaviors through catecholamine release
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kasai A et al,
2. 発表標題 FAST, High-speed serial-sectioning imaging for whole brain analysis with high scalability
3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Kasai
2. 発表標題 FAST, high-speed serial-sectioning imaging for whole-brain analysis with high-scalability
3. 学会等名 次世代薬理学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笠井淳司
2. 発表標題 脳研究を加速する全脳イメージングシステムFAST
3. 学会等名 日本薬学会東海支部特別講演 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笠井淳司
2. 発表標題 高速・高精細全脳イメージング法FASTの開発 新たな中間表現型の探索へ
3. 学会等名 第49回藤田学園医学会 研究最前線セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Kasai et al
2. 発表標題 Claustal stress ensembles decode anxiety-related behaviors through multi-area interconnectivity
3. 学会等名 The 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences ( 国際学会 )
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masato Tanuma et al
2. 発表標題 In vivo imaging of alkynylated S-Citalopram using surface-enhanced Raman scattering
3. 学会等名 Neuroscience 2019 ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Kasai et al
2. 発表標題 Monitoring neuronal activation at the local and global levels provides a new role of claustral neurons in the neuronal mechanisms of anxiety-related behaviors
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科 神経薬理学分野ホームページ  
<http://molpharm.umin.jp/>  
 大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野  
<http://molpharm.umin.jp/>

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