

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22477

研究課題名(和文) 神経路特異的薬理学とインビボ神経活動イメージングを駆使した脳身連関の神経機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of neuronal mechanisms of brain-body interaction using neuronal pathway-specific pharmacology and in vivo neuroimaging

研究代表者

南 雅文(MINAMI, Masabumi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20243040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：分界条床核から外側視床下部に投射する神経の活動抑制により不安様行動が惹起されること、分界条床核内在性の神経回路により分界条床核から外側視床下部に投射する神経が抑制性の調節を受けていることを明らかにした。分界条床核内在性神経回路の活動亢進により、外側視床下部に投射する神経への抑制性入力が増大し、不安様行動が惹起される神経機構が考えられる。今後は、病態モデルにおける不安様行動への本神経機構の関与を検討する必要がある。また、不安により引き起こされる心拍数上昇や消化管機能障害の病態メカニズムを明らかにするため、外側視床下部から橋・延髄に投射し自律神経機能を調節する神経回路を同定することが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不安などのネガティブな情動が循環器や消化管の機能異常を引き起こすことはよく知られているが、その神経機構は未だ明らかではない。本研究では、先端的な神経路特異的薬理学研究法を駆使することにより、分界条床核から外側視床下部に投射する神経細胞の活動低下が不安情動を惹起することを明らかにした。今後、外側視床下部から橋・延髄に投射し自律神経機能を調節する神経回路を同定することにより、不安などのネガティブな情動に起因する循環器や消化管の機能障害の病態メカニズム解明や治療薬創製に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that inhibition of neurons projecting from the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) to the lateral hypothalamus (LH) induced anxiety-like behaviors, and that neuronal circuits within the BNST are involved in the inhibitory regulation of LH-projecting BNST neurons. Increased neuronal activity in the BNST may suppress LH-projecting BNST neurons, thereby inducing anxiety-like behaviors. Further studies are needed to examine whether this neuronal pathway is involved in anxiety-like behaviors observed in various pathological conditions. In addition, in order to clarify the pathological mechanisms of anxiety-induced heart rate elevation and gastrointestinal dysfunction, it is necessary to elucidate the neural circuits that project from the LH to the pons and medulla oblongata, the brain regions regulating autonomic functions.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳身連関 情動 循環器系 消化器系 分界条床核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの研究により、分界条床核が不安や抑うつなどの負情動生成に關与していることが明らかになっている。不安や抑うつなどの負情動生成に關与する神経路として分界条床核から腹側被蓋野や外側視床下部に投射する神経路の役割が報告されている。

(2) これまでの研究により、分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達亢進により胃排出能低下や下部消化管活動亢進が惹起されることが明らかとなっている。また、分界条床核内神経活動亢進が心拍数上昇などを引き起こすことも報告されている。

2. 研究の目的

(1) 分界条床核を起点とした神経回路に焦点を絞り、自律神経機能調節に重要な視床下部への神経情報伝達機構を明らかにし、当該神経回路が不安惹起に關与するか否かを光遺伝学や化学遺伝学などの先端的手法を活用した研究により明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 使用動物：実験には8-10週齢、雄性 C57BL6J マウス (Japan SLC) を使用した。飼育環境は、室温 22 ± 1 、明暗周期12時間 (明期：7:00-19:00; 暗期：19:00-7:00) とした。動物は2-4匹ごとにケージで飼育し、摂食および飲水が自由に行える環境に置いた。動物は、無作為に実験グループへと振り分けた。行動解析は明期に行った。すべての動物実験は、北海道大学動物実験委員会の承認のもと行われた。

(2) ウイルスベクターによる遺伝子導入：脳内神経細胞への遺伝子導入は、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV) ベクターを用いて行った。逆行性に Cre を発現させる AAV2-retro/CAG-Cre は University of North Carolina Viral Core より購入した。Cre 依存的に改変型受容体 hM4Di を発現する AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry と、そのコントロールベクターである AAV5-hSyn-DIO-mCherry は Addgene 社より購入した。ウイルスベクターの脳内微量注入を行うため、マウスをイソフルラン (導入 3.0%、維持 1.0-1.5%; Pfizer) 麻酔下、脳定位固定装置 (SR-6M-HR, Narishige) に固定した。頭皮の切開前に鎮痛のためリドカインを塗布した。30G インジェクションカニューラを目的の脳部位に挿入し、シリンジポンプを用いて 250 nl/side のウイルス溶液を注入した。分界条床核に AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を、外側視床下部に AAV2-retro/CAG-Cre を注入することにより、分界条床核から外側視床下部に投射する神経に特異的に改変型受容体 hM4Di を発現させた。分界条床核と外側視床下部の座標は、それぞれ、bregma から AP: + 0.6 mm, ML: 1.1 mm, DV: 3.9 mm、および、AP: - 1.1 mm, ML: 1.2 mm, DV: 5.6 mm とした。ウイルス溶液の注入完了後、頭蓋に開けた穴は歯科用セメントで埋め、シルク縫合糸により頭皮を縫合した。手術後、鎮痛のためメロキシカム (1 mg/kg) を皮下投与した。AAV2-retro-CAG/Cre 注入部位確認のため、1000 倍に希釈した蛍光ビーズ (Lumifluor) をウイルス溶液に混合した。分界条床核から外側視床下部に投射する神経細胞の活動調節機構を明らかにするため、トランスジェニックマウス (Cart-cre マウス, Jackson Laboratory) の分界条床核に AAV5-DIO-hSyn-ChR2-EYFP を注入し CART 神経細胞選択的にチャネルロドプシン 2 を発現させた。CART 陽性神経細胞の局在を調べるため、Cre 依存的に mCherry を発現させる AAV5-hSyn-DIO-mCherry を、Cart-cre マウスの分界条床核に注入した。

(3) 化学遺伝学的手法を用いた行動解析：不安情動を評価するため、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、明暗箱試験の順に連続した3日間で行動試験を行った。化学遺伝学的手法を用いて神経活動を操作する場合は、試験開始の40分前に Clozapine-N-Oxide (CNO; 1 mg/kg; abcam) を腹腔内投与した。vehicle には生理食塩水を用いた。行動解析には Noldus Ethovision 11.5XT を用いた。はじめに、試験を行う環境への馴化を目的にマウスを30分程度、試験を行う部屋に馴化させた。オープンフィールド試験は、D46 × W46 × H23 cm の白色オープンフィールドを用いた。照度は 50-60 lux に設定し、防音箱の中で記録を行った。中央 23 × 23 cm を Center zone とし、その周囲を Periphery zone とした。試験開始時にマウスを Periphery zone に静置し、その後の行動を上部に設置したカメラによって5分間記録した。高架式十字迷路試験は、長さ 30 cm の Closed arms と、長さ 30 cm の Open arms、および 7 × 7 cm の Center area を持つ装置を用いた。高さは床から 40 cm、照度は Open arms および Center area で 6 ± 1 lux、Closed arms で 3 ± 1 lux に設定した。試験開始時にマウスを Center area に静置し、その後の行動を上部に設置したカメラによって5分間記録した。明暗箱試験は、上部が開放された D32 × W25 × H25 cm の白色の明箱と上部が覆われた D16 × W25 × H25 cm の黒色の暗箱を用いた。これら二つの箱は 7 × 7 cm のトンネルでつながれており、マウスは自由に行き来できる。照度は白色の明箱で 400-500 lux に設定した。防音箱の中で記録を行った。試験開始時にマウスを黒色の暗箱に静置し、その後の行動を上部に設置したカメラによって5分間記録した。

(4) 光遺伝学的手法および遺伝子改変動物を用いた電気生理学的解析：分界条床核内の CART 神経細胞選択的にチャンネルロドプシン 2 を発現させたマウスの外側視床下部に蛍光標識ビーズを注入し外側視床下部に投射する神経を標識した。このマウス脳から分界条床核を含む切片を製作し、青色光 (= 465 nm, 5 ms duration; LEX2-LZ4-B; Brainvison Inc.) を照射した際の外側視床下部投射神経細胞におけるシナプス後電流を測定した。記録には、内液 (65 mM K-gluconate, 70 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 12 mM Na-phosphocreatine, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.2% biocytin, pH 7.2-7.3 adjusted with KOH) で満たされた先端が 3-7 M のガラスピペットを使用した。電位固定モードにて、電位を -70 mV に保持した。CNQX (10 μM) および AP5 (50 μM) を加えることでグルタミン酸神経伝達を阻害した。青色光照射に応じて、振幅が 10 pA より大きく、かつ、10 回刺激したうち 6 回以上の抑制性シナプス後電流が確認できた場合に抑制性シナプス接続が形成されていると判断した。

(4) 統計解析：統計解析は Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) を用いて行った。二群間の比較には Two-tailed Student's t-test もしくは Two-tailed Mann-Whitney test を用いた。三群以上の比較には One-way ANOVA と Bonferroni's post hoc test、もしくは Two-way ANOVA と Bonferroni's もしくは Sidak's post hoc test を用いた。結果は $p < 0.05$ であるとき有意であると判断した。

4. 研究成果

(1) 化学遺伝学的手法による神経路特異的神経活動操作を用いた行動薬理的解析：外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制が不安様行動に及ぼす影響について改変型受容体 hm4Di を用いて検討した。逆行性に Cre レコンビナーゼを発現させる AAV2 を外側視床下部に注入するとともに、Cre 依存的に hm4Di-mCherry を発現させる AAV5 を健常マウスの分界条床核へ注入した。同じ AAV2 を外側視床下部に注入し、Cre 依存的に mCherry のみを発現させる AAV5 を分界条床核に注入した群を対照群とした。外側視床下部に投射する分界条床核の神経細胞は、過去の報告と一致して anterodorsal 領域に局在しており、Oval 領域にはほとんど見られなかった。脳スライスを用いた電気生理学的解析により、hm4Di のリガンドである CNO (10 μM) 処置によって hm4Di-mCherry を発現する分界条床核の神経細胞が過分極することを確認した。外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制が、不安様行動にどのような影響を及ぼすのか調べるため、ウイルスベクター注入 5 週間後に行動解析を行った。行動試験の 40 分前に、CNO (1 mg/kg) を腹腔内に投与した。hm4Di-mCherry を発現するマウスでは不安様行動がオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、および明暗箱試験のいずれにおいても亢進した。分界条床核から外側視床下部への神経路の機能低下が、不安様行動を惹起させることが示唆された。

(2) 光遺伝学的手法および遺伝子改変動物を用いた電気生理学的解析：Cre 依存的に mCherry を発現させる AAV5 と Cart-cre マウスを用い、CART 陽性神経細胞の局在を調べたところ、CART 陽性神経細胞は、分界条床核内の oval 領域に密に局在することが観察された。さらに、蛍光標識された CART 陽性神経細胞の軸索が、分界条床核内に確認された。以上より、CART 陽性神経細胞は分界条床核内にシナプス接続を形成していることが示唆された。機能的なシナプス接続を調べるため、AAV 投与により Cre 依存的に CART 陽性神経細胞にチャンネルロドプシン 2 を発現させるとともに、外側視床下部への蛍光標識逆行性神経トレーサー注入により、外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞を可視化した。チャンネルロドプシン 2 は青色光が照射されると発現している神経を脱分極させる。外側視床下部へ投射する分界条床核神経からホールセルパッチクランプ記録により膜電流を測定しつつ、青色光の照射により CART 陽性神経細胞を活性化したところ、記録した神経細胞中の 83.3% (18 細胞中 15 細胞) で青色光応答性の抑制性シナプス後電流が確認された。このことから、分界条床核内在性の CART 陽性神経細胞が外側視床下部へ投射する分界条床核神経細胞に抑制性シナプスを形成し、抑制性の機能調節を行っていることが明らかとなった。

(3) 分界条床核-外側視床下部神経路による不安情動制御：本研究により、分界条床核から外側視床下部に投射する神経細胞の抑制により不安様行動が惹起されること、分界条床核内在性の神経回路により分界条床核から外側視床下部に投射する神経細胞が抑制性の調節を受けていることが明らかとなった。これらの結果より、分界条床核内在性の神経回路の活動亢進により、外側視床下部に投射する神経細胞への抑制性入力が増加し、不安様行動が惹起される可能性が考えられる。今後は、病態モデルにおける不安様行動に本神経回路が関与しているか否かを検討する必要がある。また、不安により引き起こされる、心拍数上昇や消化管機能障害の病態メカニズムを明らかにするため、外側視床下部から橋・延髄に投射し自律神経活動を調節する神経回路を同定することが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山内直紀、野村洋、天野大樹、南雅文
2. 発表標題 Neuronal plasticity in an extended amygdala circuit induced by chronic pain causes maladaptive anxiety
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内直紀、野村洋、天野大樹、南雅文
2. 発表標題 慢性痛による拡張扁桃体神経回路の可塑的变化は不安を惹起する
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原隆人、高橋大樹、南沙希、竹原達裕、天野大樹、南雅文
2. 発表標題 慢性ストレスによる背外側分界条床核神経伝達の可塑的变化
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Yamauchi, Hiroshi Nomura, Taiju Amano, Masabumi Minami
2. 発表標題 Chronic pain-induced plastic change in the extended amygdala neural circuit causes maladaptive anxiety
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryouto Hara, Tatsuhiro Takehara, Daiki Takahashi, Saki Minami, Taiju Amano, Masabumi Minami
2. 発表標題 Chronic stress-induced alteration of synaptic transmission in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内直紀、野村洋、天野大樹、南雅文
2. 発表標題 Chronic pain-induced plastic change in the extended amygdala neural circuit causes maladaptive anxiety
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 大学院薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野 薬理学研究室
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html>

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
研究協力者	天野 大樹 (AMANO Taiju)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	野村 洋 (NOMURA Hiroshi)		
研究協力者	山内 直紀 (YAMAUCHI Naoki)		
研究協力者	原 隆人 (HARA Ryuto)		
研究協力者	竹原 達裕 (TAKEHARA Tatsuhiro)		

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