

平成22年5月14日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20020010
 研究課題名（和文）
 扁桃体機能、情動の制御に関わる新規神経ペプチドの検索とその生理作用の解明
 研究課題名（英文） Studies of Novel Neuropeptides involved in Regulation of Emotional Reaction and Amygdala Function
 研究代表者
 桜井 武 (SAKURAI TAKESHI)
 金沢大学・医学系・教授
 研究者番号：60251055

研究成果の概要（和文）：3種の新規神経ペプチドについて、扁桃体機能と情動の制御におけるそれぞれの役割を解明すべく研究を遂行した。ニューロペプチド B および W に関してはそれらの受容体 NPBWR1 の欠損マウスとヒトにおける多型の解析から、社会行動やストレス応答に関与していることが明らかになり、オレキシンは情動にともなう自律神経系の応答に強く関わっていることが明らかになった。QRFP に関しては、遺伝子欠損マウスを作成した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the physiological roles of three neuropeptide systems in the regulation of emotional reaction and amygdala function. We report here that neuropeptide B/W receptor1 (NPBWR1) plays a critical role in amygdala function mediating stress response and social behavior in both mice and humans. We have established QRFP-deficient mice for studying the role of this peptide in near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,500,000	0	14,500,000
2009年度	9,100,000	0	9,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	23,600,000	0	23,600,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：扁桃体、情動、自律神経、神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

われわれの外界に関する情報は感覚系で感知され、その情報は視床を経て大脳皮質で知覚されるが、この五感からの情報は視床を介して、あるいは大脳皮質経由で大脳辺縁系にも伝えられ、感覚情報に応じた情動に加えて自律神経系、内分泌系の変動などの生理的変化が生じる。たとえば危機的状況においては恐怖や不快という情動とともに、交感神経系の興奮やHPA軸の活性化が引き起こされる。これらは、大脳辺縁系からの出力が視床下部

や脳幹を介して自律神経系や内分泌系に影響をあたえるためである。こうした反応は生物にとって本来、環境に適応するための戦略である。しかし、高度情報化社会において、ヒトは今までとは異なる量や質の情報からくるストレスにさらされている。このことは、さまざまな精神疾患、あるいは内分泌・自律神経系の変調からくる身体疾患の成立とも関わっているはずである。大脳辺縁系の中でも情動の生成において重要な役割を果たしている扁桃体における分子レベル、細胞レベ

ルでの情報伝達機構については、十分に解明されていない。本研究では申請者が自ら見いだした新規神経ペプチドの機能解析を中心とすることにより、他の研究者とはことなる独創的な研究計画を目指した。脳内には現在までに100種ほどの神経伝達物質、あるいは神経調節因子が知られているが、未知の物質もたくさん存在しているはずである。

2. 研究の目的

本研究では、扁桃体の機能に重要な役割を果たす神経伝達物質の役割や、神経回路の役割に着目した。本研究の目的は、「大脳辺縁系・視床下部・脳幹」のシステムとしての機能に着目し、それらの機能に重要な役割を果たす神経伝達物質、とくに未知の神経ペプチドの役割や、それらの神経ペプチドを含む神経回路の生理的な役割を分子レベルで明らかにすることにある。大脳辺縁系では、古典的な神経伝達物質に加え、神経ペプチドが多く局在していることから、とくに申請者が以前から解明に取り組んでいる新規神経ペプチドの機能の解明を中心にそれらのペプチドが扁桃体においてどのような機能を果たしているかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

各遺伝子改変マウスは常法に従って作成し、維持した。すべてC57black/6Jにバッククロスして実験を行った。ヒトによるfMRI実験では、タスクとしてさまざまな情動をしめすヒトの顔を見る際の、扁桃体のBOLDシグナルの変化を観察した。

4. 研究成果

①NPBWR1の生理的役割の解析
申請者らのグループが2003年に同定したニューロペプチドBとニューロペプチドWの受容体であるNPBWR1(GPR7)は扁桃体中心核に多く発現しており、この部分にはニューロペプチドWの免疫陽性線維が観察される(Hondo et al., 2008; Kitamura et al., 2006; Tanaka et al., 2003)。扁桃体中心核は扁桃体の出力系と考えられているが、NPBWR1が発現しているのは中心核のうち、外側部であり、この部分はGABA作動性ニューロンが多く、中心核内側部からの出力を調整する役割をしていると考えられている。この分子が情動や行動にどのような役割を果たしているのかを検討した。そのために、NPBWR1遺伝子欠損マウス (*Npbwr1*^{-/-}マウス) を用いて、行動テストを行った。*Npbwr1*^{-/-}マウスは空間記憶に異常は見られなかったが、文脈による恐怖条件づけに障害が見られることを見いだした。

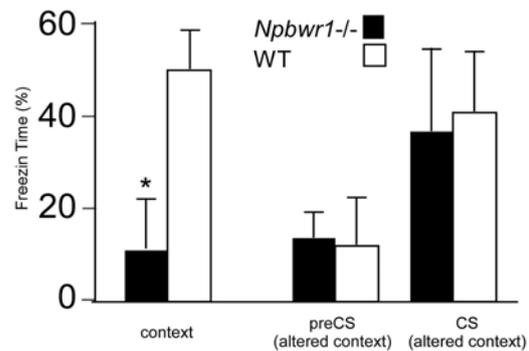


図1 *Npbwr1*^{-/-}マウスはcued and contextual fear conditioningテストにおいて、音を条件刺激としたテストでは野生型マウスと同程度のすくみ行動 (freezing) を示したが、文脈による条件付けではすくみ行動をほとんど示さなかった。図はトレーニング24時間後における文脈 (context) および音 (CS) によるすくみ行動の割合を示す。

また、Resident-intruderテストにおいて、*Npbwr1*^{-/-}マウスが明らかな異常行動を示すことを見いだした。intruderマウスに対する最初の接触までの時間が有意に短く、また接触時間が有意に長かった。このテストの間、執拗に追尾行動をするという特徴が見られた。また、このテストの間、*Npbwr1*^{-/-}マウスにおいて、強くかつ長期に持続する行動量、心拍数、血圧の上昇が観察された。これらのことから社会接触にともなう、扁桃体機能の制御にNPBWR1が関与していることが推測された。その神経科学的機構を解明するために、組織学的、および電気生理学的検討をおこない、NPBWR1は扁桃体中心核外側部のGABA作動性ニューロンに発現しており、NPWやNPBを作用させるとこれらのGABA作動性ニューロンは強力に抑制されることが明らかになった。これらのニューロンは扁桃体出力のゲーティングの役割をしており、NPBWR1はこの機構を制御していることが示唆された。

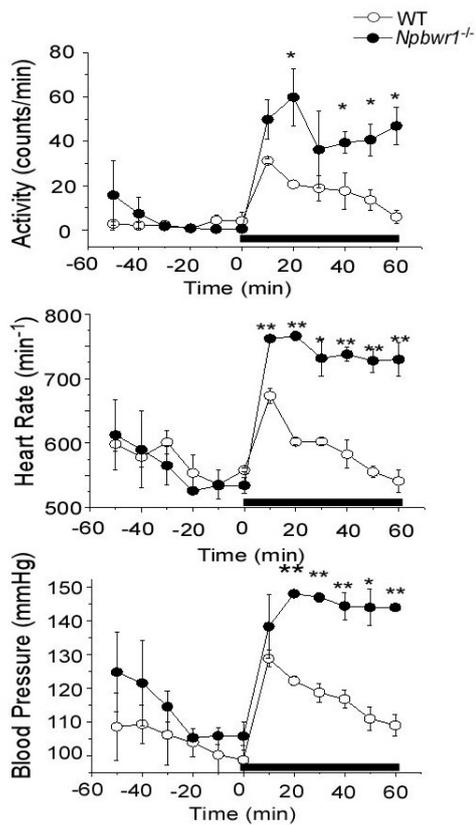


図 2 *Npbwr1*^{-/-}マウスとその野生型コントロールをもちいて、Resident-Intruder テストを行った。その際の、Resident マウスの行動量 (activity)、心拍数 (Heart Rate) および血圧 (Blood Pressure) を照れ目とリースシステムで測定した。Intruder を入れた時点をも 0 時間として示している。Resident マウスが野生型 (WT) および NPBWR1^{-/-}マウスの場合のデータを示した。

一方、ヒトにおけるNPBWR1遺伝子の機能を調べるために多型を検索し、アミノ酸置換を伴う機能低下型のSNPを見いだした。この多型は、NPBWR1のcAMP産生抑制能を低下させることが明らかとなり、ヒトの情動の生成にも影響を与えている可能性が示唆された。そこで、各遺伝子型の被験者をあつめて、表情認知課題をもちいた機能的MRI試験をおこなった。扁桃体の活動をBOLD信号で評価したところ、404T型のSNPをもつヘテロ接合体の被験者は、404A/Aホモの被験者と明らかに違う応答性をしめした。404A/Tヘテロの被験者はどの表情の提示に対しても、404A/A型よりも大きなBOLD信号の増加がみとめられ、恐怖との差が見られた。このことから、NPBWR1はヒ

トの表情認知にともなう扁桃体の活動性にも大きな影響を持っていることが示唆された。

②情動の出力系におけるオレキシンの役割
オレキシンは摂食中枢である視床下部外側野に局在し、摂食行動や覚醒の維持に重要な役割を果たしている新規神経ペプチドである(Sakurai, 2007)。オレキシン神経の電気生理学的解析および、逆行性トレースの結果、オレキシン神経に辺縁系からの入力に豊富にあることが明らかになった(Sakurai et al., 2005)。さらに、オレキシン神経を欠損させたマウスにおいて情動に伴う自律神経系反応の障害があることを見出した(Zhang et al., 2009)。このことにより、オレキシンと情動-自律神経系作用との関係が明らかになった。

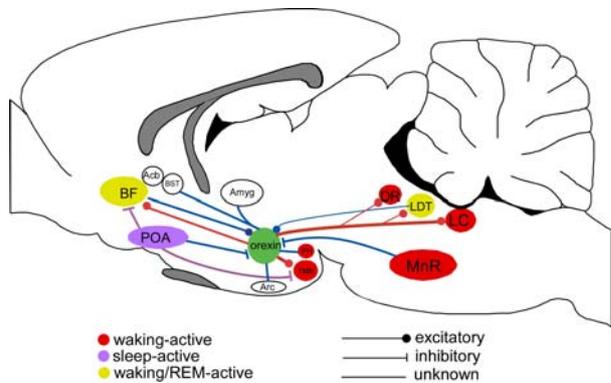


図 3 オレキシン産生ニューロンへの入出力系を模式的に示した。オレキシン産生ニューロンは視床前野や脳幹のモノアミン・コリン作動性ニューロンなどとの相互連絡の他、大脳辺縁系からの入力を豊富に受けている。

③大脳辺縁系に強く発現するオーファン受容体としてGPR103を見だし、その内因性リガンドを同定した(Takayasu et al., 2006)。このリガンドは他のグループから、バイオインフォマティクス的手法をもちいて、先に発表されてしまったが、われわれは、ペプチドレベルで精製し、全構造を決定することに成功した。その結果、予想されていた26アミノ酸型ではなく、43残基のQRFPが主なリガンドであることが明らかになった。薬理学的実験により、このペプチドには摂食行動を促進し、自発運動量を高め、交感神経系を活性化作用があることが明らかになった。また、受容体GPR103には非常に遺伝子配列が似ているが、別の遺伝子にコードされているGPR103AとGPR103Bが存在することを明らかにした。また、GPR103Aは腹側線条体

や尾状核、被殻に強く発現していることも明らかになった。

現在、QRFP の欠損マウスを作製し、その行動を解析することにより、このシステムの生理的役割を探っている。欠損マウスには GFP がノックインされており、QRFP 発現ニューロンが可視化されているが、GFP 発現ニューロンは視床下部外側野に限局して見られ、これは、ISH による検討と一致している。現在、行動テストバッテリーとともに、受容体の分布などを詳細に検討中である。

まとめ：扁桃体機能に密接にかかわる新規神経ペプチド3種の機能を遺伝子改変マウスの解析により遂行した。

ニューロペプチド B と W の受容体である NPBWR1 は扁桃体外側核の GABA 作動性ニューロンに発現しており、ニューロペプチド B または W がこれらを抑制することによって扁桃体の出力を制御していることが示唆された。NPBWR1 欠損マウスは、文脈による恐怖条件付けに異常が見られる他、社会行動の異常、ストレスを与えたときの自律神経系の活性化の亢進が観察された。

また、オレキシンという別の神経ペプチドは、すでに摂食行動や覚醒維持に重要な役割をしていることが明らかになっているが、今回、大脳辺縁系、とくに扁桃体から多くの投射があることが明らかになり、この系路は情動にともなう自律神経の制御に関与していることが示された。オレキシンは、睡眠・覚醒の制御に重要な働きをしていると考えられているが、本研究により、オレキシン系は単に睡眠・覚醒調節機構の一部であるだけでなく、情動やエネルギーバランスに応じ、睡眠・覚醒や報酬系そして摂食行動を適切に制御する統合的な機能を担うことシステムであると考えられる。

このように新規神経ペプチドは大脳辺縁系の機能のさまざまな側面に深く関わっていることがあり、新規神経ペプチドの同定により、いままで明らかになっていなかった生理機能を明らかにできる可能性がある。GPR103 は大脳辺縁系や腹側線条体に発現しており、そのリガンド、QRFP も大脳辺縁系機能に関わっている可能性が高い。今後、QRFP に関しても遺伝子改変マウスの解析により、その生理機能が明らかになっていくこと、ひいては、扁桃体など、大脳辺縁系の神経科学的メカニズムに果たす新規神経ペプチドの役割が明らかになり、創薬のターゲットを提供することになることが期待される。現在も、マイクロアレイ解析によって同定した、扁桃体に比較的高発現する G タンパク質共役型受容体数種に着目し、その欠損マウスの作成、内因性リガ

ンドの同定を試みている。

扁桃体機能に密接にかかわる新規神経ペプチド3種の機能を遺伝子改変マウスの解析により遂行した。

ニューロペプチド B と W の受容体である NPBWR1 は扁桃体外側核の GABA 作動性ニューロンに発現しており、ニューロペプチド B または W がこれらを抑制することによって扁桃体の出力を制御していることが示唆された。NPBWR1 欠損マウスは、文脈による恐怖条件付けに異常が見られる他、社会行動の異常、ストレスを与えたときの自律神経系の活性化の亢進が観察された。

また、オレキシンという別の神経ペプチドは、すでに摂食行動や覚醒維持に重要な役割をしていることが明らかになっているが、今回、大脳辺縁系、とくに扁桃体から多くの投射があることが明らかになり、この系路は情動にともなう自律神経の制御に関与していることが示された。オレキシンは、睡眠・覚醒の制御に重要な働きをしていると考えられているが、本研究により、オレキシン系は単に睡眠・覚醒調節機構の一部であるだけでなく、情動やエネルギーバランスに応じ、睡眠・覚醒や報酬系そして摂食行動を適切に制御する統合的な機能を担うことシステムであると考えられる。

このように新規神経ペプチドは大脳辺縁系の機能のさまざまな側面に深く関わっていることがあり、新規神経ペプチドの同定により、いままで明らかになっていなかった生理機能を明らかにできる可能性がある。GPR103 は大脳辺縁系や腹側線条体に発現しており、そのリガンド、QRFP も大脳辺縁系機能に関わっている可能性が高い。今後、QRFP に関しても遺伝子改変マウスの解析により、その生理機能が明らかになっていくこと、ひいては、扁桃体など、大脳辺縁系の神経科学的メカニズムに果たす新規神経ペプチドの役割が明らかになり、創薬のターゲットを提供することになることが期待される。現在も、マイクロアレイ解析によって同定した、扁桃体に比較的高発現する G タンパク質共役型受容体数種に着目し、その欠損マウスの作成、内因性リガ

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 29 件)

1. Uchio, N, Doi, M, Matsuo, M, Yamazaki, F, Mizoro, Y, Hondo, M, Sakurai, T & Okamura, H. Circadian characteristics of mice depleted with GPR7. *Biomed Res.* **30**, 357-364, 2009. 査読有り
2. Shiuchi, T., Haque, M.S., Okamoto, S., Inoue, T., Kageyama, H., Lee, S, Toda, C., Suzuki, A., Bachman, E.S., Kim, Y-B., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Shioda, S., Imoto, K. & Minokoshi, Y. Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab.* **10**, 466-480, 2009 査読有り
3. Zhang, W., Zhang, N., Sakurai, T., & Kuwaki, T. Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* **1262**, 25-37 (2009). 査読有り
4. Hara, J. Gerashchenko, D, Wisor, J.P., Sakurai, T., Xie, X., & Kilduff, T.S. Thyrotropin-Releasing Hormone Increases Behavioral Arousal through Modulation of Hypocretin/Orexin Neurons. *J. Neurosci.* **29**, 3705-3714, 2009. 査読有り
5. Irukayama-Tomobe, Y, Tanaka, H., Yokomizo, T., Hashidate-Yoshida, T., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor GPR109B. *Proc. Natl. Acad., Sci., USA.*, **106**, 3930-3934, 2009. 査読有り
6. Matsuki, T., Nomiyama, M, Takahira, H., Hirashima, N., Kilduff, T.S., Kunita, S., Takahashi, S., Yagami, K., Bettler, B., Yanagisawa, M., Sakurai, T. Selective loss of GABA_B receptors in orexin/hypocretin-producing neurons results in disrupted sleep/wakefulness architecture. *Proc. Natl. Acad., Sci., USA.*, **106**, 4459-64, 2009. 査読有り
7. Honda, M., Eriksson, K.S., Zhang, S., Tanaka, S., Lin, L., Salehi, A., Hesla, P.E., Maehlen, J., Gaus, S.E., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Taheri, S., Tsuchiya, K., Honda, Y. & Mignot, E. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin). *PLoS ONE.* **4**, e4254, 2009. 査読有り
8. Funato, H., Tsai, A., Willie, J.T., Kisanuki, Y., Williams, S.C., Sakurai, T. & Yanagisawa, M. Enhanced Orexin Signaling Prevents Diet-Induced Obesity and Improves Leptin Sensitivity. *Cell Metab.* **9**, 64-76, 2009. 査読有り
9. Hondo, M., Ishii, M., & Sakurai, T. The NPB/NPW neuropeptide system and its role in regulating energy homeostasis, pain, and emotion. *Results Probl Cell Differ* **46**, 239-256 (2008). 査読有り
10. Aikawa, S., Ishii, M., Yanagisawa, M., Sakakibara, Y. & Sakurai, T. Effect of neuropeptide B on feeding behavior is influenced by endogenous corticotropin-releasing factor activities. *Regul Pept.* **151**, 147-152, 2008. 査読有り
11. Gerashchenko, D., Wisor, J.P., Burns, D., Reh, R.K., Shiromani, P.J., Sakurai, T., de la Iglesia, H.O., & Kilduff, T.S. Identification of a population of sleep-active cerebral cortex neurons. *Proc. Natl. Acad., Sci., USA.*, **105**, 10227-10232, 2008. 査読有り
12. Xie, X, Wisor, JP, Hara, J, Crowder, TL, Lewinter, R, Khroyan, T.V., Yamanaka, A., Diano, S., Horvath, T.L., Sakurai, T., Toll, L. & Kilduff, T.S. Hypocretin/orexin & nociceptin/orphanin FQ coordinately regulate analgesia in a mouse model of stress-induced analgesia. *J Clin Invest.* **118**, 2471-81, 2009. 査読有り
13. Tsunematsu, T, Fu, L.Y., Yamanaka, A., Ichiki, K., Tanoue, A., Sakurai, T. & van den Pol A.N. Vasopressin increases locomotion through a V1a receptor in orexin/hypocretin neurons: implications for water homeostasis. *J Neurosci.* **28**, 228-238, 2008. 査読有り
14. Ohno, K., Hondo, M., & Sakurai, T. Cholinergic Regulation of Orexin/Hypocretin Neurons through M3 Muscarinic Receptor in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **106**, 485-91, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

1. 桜井 武 扁桃体における NPBWR1 の役割 第7回GPCR研究会 東京 5月7日-8日 2010年
2. Sakurai, T. Genetic variation of NPBWR1 alters amygdala function. Neuroendocrine Function of GPCRs (GPCR2010). Official Satellite Symposium of the 14th International Congress on Endocrinology, Kyoto, March 30-31, 2010.
3. Sakurai, T. Orexin as a waking substance. Turkish-Japanese Sleep Forum 2010, Izmir, Turkey, May3-4, 2010.
4. Sakurai, T. Roles of orexins in regulation of energy homeostasis. Symposium of the 14th International Congress on Endocrinology, Kyoto, March 27-30, 2010.
5. 桜井 武 新規神経ペプチドとその生理機能の探求 第1回 Advans 研究会 名古屋 2009年12月26日
6. 桜井 武 睡眠・覚醒と情動における新規神経ペプチドの役割 第7回北海道大学脳科学研究教育センターシンポジウム「脳の個性を科学する：遺伝子と環境がつくる脳の力」 2009年12月8日(金)
7. 桜井 武 新規神経ペプチドと睡眠・覚醒・情動 第56回中部日本生理学会 教育講演 2009年12月4日 金沢
8. 桜井 武 新規神経ペプチドと精神機能「社会性認識」学際脳科学シンポジウム 2009年11月6日、金沢

9. Sakurai, T. Orexin: a neuropeptide at the interface of emotion, metabolism and sleep/wake states. Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptide, Yakushima, Kagoshima, Oct 02-03, 2009.
10. Sakurai, T A decade of research on orexin. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, July 29, 2009.
11. 桜井 武 新規神経ペプチドと覚醒・情動 第 27 回内分泌代謝学サマーセミナー 2009 年 7 月 16-17 日 福井
12. 桜井 武 オレキシン産生神経による睡眠・覚醒の安定化機構 2009 年 5 月 15 日日本実験動物学会総会 シンポジウム 3 大宮
13. 桜井 武 オレキシンによる睡眠・覚醒の安定化機構と行動制御 2009 年 4 月 18 日北陸実験動物研究会 金沢
14. 桜井 武 新規神経ペプチドの探索とその機能解析 フォーラム富山第 27 回研究会 富山 2009 年 2 月 10 日
15. Sakurai, T Speaker in the 3rd annual symposium of Japanese-French Frontiers of Science, Kanagawa, Japan, Jan 24-26, 2009.
16. Sakurai, T Acute and Chronic Regulation of Sleep-Wakefulness States by Orexin/Hypocretin Neurons. SfN meeting, Washington D.C., USA, November 12-16, 2008
17. Sakurai, T The Neural Circuit of Orexin: Mechanisms for Maintaining Sleep and Wakefulness. 2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP Sept 11-13, 2008 Toyama, Japan.
18. Sakurai, T Roles of orexin/hypocretin system in the regulation of sleep-waking cycle. Acta Physiologica International Symposium. August 13-14, 2008 Oulu, Finland
19. Sakurai, T. Acute and Chronic Regulation of Sleep-Wakefulness States by Orexin/Hypocretin Symposium S02 at Sleep2008 (22nd APSS annual meeting), Baltimore, MD, USA, June7-12, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

桜井 武 (SAKURAI TAKESHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60251055

(2)研究分担者

山本 三幸 (YAMAMOTO MIYUKI)

筑波大学・人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：80143147