

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2021～2022
 課題番号：21K20688
 研究課題名(和文) プロスタグランジンE2による青斑核ノルアドレナリン神経活動長期抑制の生理機能解明

研究課題名(英文) Physiological role of long-lasting suppression of noradrenergic neurons in the locus coeruleus induced by prostaglandin E2

研究代表者
 向井 康敬 (Mukai, Yasutaka)

名古屋大学・環境医学研究所・特任助教

研究者番号：30908124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスを受けた時、数時間-数日間「調子の悪さ」を経験することがある。この原因の一つは、数時間-数日間にだけ生じる「長期的な神経活動の変化」ではないだろうか？ 研究代表者は急性脳スライス標本において、注意覚醒の惹起に重要な青斑核ノルアドレナリン神経の活動が、ストレス関連物質であるプロスタグランジンE2(PGE2)によって長期的に抑制される現象を、独自に発見した。本研究は、その現象の生体における機能解明を目指した。そして、ノルアドレナリン神経活動のPGE2による抑制が、心理的ストレス負荷後の鬱様行動や覚醒時間の抑制に関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 生理活性因子による神経活動調節は、ミリ秒-分スケールの変化がよく着目されてきた。このため、因子の短時間の作用により引き起こされ得る、神経活動への長期的な影響は見過ごされてきた。本研究は、生理活性因子による神経活動の分-時間スケールの長期的な変化が、行動発現に影響する可能性を示した。今後さらに検証を進め、また他の因子や神経細胞において同様の現象が見出せれば、これまで見過ごされてきた長期的な神経活動変化と行動発現の新たな理解に資すると考えられる。また、因子による神経活動への長期的な影響の理解が進めば、それを活用した薬品開発や副作用防止、治療や健康増進方法の開発にも繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：When experiencing stress, one may feel “malaise” for several hours to several days. Could one of the causes be the “long-lasting neural activity changes” that occur only during this time period? Noradrenergic neurons in the locus coeruleus (LC-NA neurons) are involved in the regulation of attention and sleep/wakefulness. Prostaglandin E2 (PGE2) is involved in the stress responses induced by both physical and psychological stressors. Previously, it was found that PGE2 induces long-lasting suppression of the activity of LC-NA neurons via EP3 receptor in acute brain slices. In this study, functional roles of the long-lasting suppression was examined in vivo, using conditional knockout mice of EP3 receptor in NA neurons. The results suggested that EP3-mediated suppression of the activity of noradrenergic neurons would be involved in the suppression of depression-like behavior and inhibition of wakefulness after psychological stress exposure.

研究分野：神経科学

キーワード：青斑核ノルアドレナリン神経 イメージング 神経活動調節
 プロスタグランジンE2 ストレス うつ様行動 睡眠覚醒 カルシウム EP3受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は研究開始までに、特定の神経細胞の活動を調節する因子のスクリーニング法を独自に確立した(Mukai et al., 2020, *Sci Rep*)。本手法を用い、青班核ノルアドレナリン(LC-NA)神経の活動調節作用について53種の生理活性因子をスクリーニングしたところ、2分間のPGE2投与により細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)が60分以上にわたって低下することを発見した。さらに電気生理学的記録でも、 $[Ca^{2+}]_i$ 低下に伴ってLC-NA神経の発火頻度が長時間低下することを見出した。そして抑制性PGE2受容体である3型PGE2受容体(EP3R)をNA神経特異的にノックアウト(cKO)すると、LC-NA神経において $[Ca^{2+}]_i$ 低下が完全に消失することを確認した。以上により研究代表者は、PGE2がEP3Rを介してLC-NA神経活動を長期的に抑制することを独自に発見していた。しかし、その生体内における生理機能については全く分かっていなかった。

PGE2は、身体的ストレスや心理的ストレスを受けた時に産生・分泌が促進され、発熱などの疾病応答に関与することが知られている。一方LC-NA神経は、活性化時には覚醒レベルの上昇などを引き起こし、環境に適応した行動を惹起するのに重要とされている。これらを踏まえ、研究代表者は「ストレスにより産生・分泌が促進されるPGE2が、LC-NA神経活動を長期的に抑制することで、傾眠などの疾病応答を引き起こすのではないか」との着想を得た。そこで研究代表者は、長期的な抑制に関与するEP3RをLC-NA神経でノックアウトした際の行動への影響を、野生型と比較して調べることとした。

2. 研究の目的

本研究は、PGE2によるLC-NA神経活動の長期的な抑制が、どのような行動惹起に重要であるか解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) cKOマウスにおけるストレス負荷の行動への影響解析

ノルアドレナリン輸送体(NAT)プロモーター下流でノルアドレナリン(NA)神経特異的に組み換え酵素Creを発現するNAT-Creマウス系統と、抑制性のプロスタグランジンE2受容体であるEP3受容体(EP3R)をCre依存的にノックアウト可能なEP3R-floxマウス系統を交配し、NA神経特異的なEP3Rノックアウトマウス(cKOマウス)を作出した。その上で、ストレス負荷および負荷後の行動への影響を、cKOマウスおよび同腹の野生型(WTマウス、ただしfloxヘテロ接合体を含む)を比較して調べた。

社会的孤立ストレスおよび社会的敗北ストレス：社会性行動試験

まず社会的孤立ストレスを与えた。群飼育していた雄のcKOマウスおよびWTマウスを個別のケージに1週間隔離した(社会的孤立ストレス)。その後、初対面の雄のICRマウスが入った檻を短辺中央に置いた長方形の広場において、ICRマウスの檻に近づく時間(交流時間)を測定した(社会性行動試験)。続いて同じ被験マウス(cKOマウスおよびWTマウス)に社会的敗北ストレスを与えた。身体が大きく攻撃性の高いICRマウスの飼育ケージへ、被験マウスを各個体1日あたり5~10分間導入してから、元の飼育ケージに戻した(社会的敗北ストレス)。社会的敗北ストレス負荷開始から1, 4, 10日後に社会性行動試験を行い、交流時間を測定した。

拘束ストレス：尾懸垂試験

まず平常状態におけるWTとcKOの差異の有無を調べるため、ストレスをかけずに尾懸垂試験のみを行った。長さ15cmのテープ片端を個体の尻尾先端に接着し、テープの反対の端を天井に接着させて6分間吊り下げて個体の動きを動画撮影した(尾懸垂試験)。その後、動画から、鬱様行動の指標である不動時間を測定した。次に、その7日後にストレス負荷を与えた。底部および側面に通気用・蓋に尻尾用の穴を開けた50mL遠沈管の中で、30分間個体を拘束した(拘束ストレス負荷)。その後、尾懸垂試験を行い、不動時間を測定した。

(2) LC-NA神経活動抑制の模倣による鬱様行動への影響解析

人工リガンドであるclozapine-N-oxide(CNO)によりGi共役型シグナル伝達を駆動可能な人工受容体hm4Diを、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)により、NAT-CreマウスのLC-NA神経に発現させた。そしてCNO腹腔内投与によって、LC-NA神経活動を抑制するEP3Rの作用を人為的に模倣した。その上で尾懸垂試験を行い、不動時間を測定した。また、同じくCNOによりGq共役型シグナル伝達を駆動可能な人工受容体hm3Dqを、AAVによりNAT-CreマウスのLC-NA神経に発現させ、同様の実験を行った。対照群として生理食塩水投与、および蛍光タンパク質mCherryを発現させた個体を用いた。

(3) cK0 マウスにおけるストレス負荷の睡眠覚醒への影響解析

LC-NA 神経活動が重要な役割を果たす睡眠覚醒行動への影響を調べるため、cK0 マウスおよび WT マウスにおいて、拘束ストレス負荷前後の睡眠覚醒時間を測定した。

4. 研究成果

(1) cK0 マウスにおけるストレス負荷の行動への影響解析

社会的孤立ストレスおよび社会的敗北ストレス：社会性行動試験

社会的孤立ストレス後および社会的敗北ストレス後の社会性行動試験について、cK0 マウスと WT マウスの間で明確な差は認められなかった。この結果から、NA 神経で発現する EP3R は、これらのストレスにより生じる社会性行動において、今回測定した指標には大きくは関与していない可能性が示唆された。

拘束ストレス：尾懸垂試験

拘束ストレス負荷のない状態では、cK0 マウスと WT マウスの間で不動時間に明確な差異は認められなかった。一方、拘束ストレス負荷後に、cK0 マウスの不動時間が WT マウスよりも増大した。この結果から、NA 神経で発現する EP3R は、拘束ストレスによる鬱様行動の惹起を抑制する機能がある可能性が示唆された。

(2) LC-NA 神経活動抑制の模倣による鬱様行動への影響解析

hM4Di および hM3Dq のいずれの結果も、実験群と対照群の不動時間に明確な差異は認められなかった。本研究では、実際の生体内における PGE2 による LC-NA 神経活動抑制の有無は解明できておらず、また抑制が生じている場合そのタイミングも解明できていなかった。今後の研究で生体内における LC-NA 神経活動の測定を行い、EP3R を介した神経活動抑制が生じていれば、より近い条件を模倣して再度検討する必要があると考えられた。

(3) cK0 マウスにおけるストレス負荷の睡眠覚醒への影響解析

拘束ストレス負荷のない状態では、cK0 マウスと WT マウスの間で覚醒時間に明確な差異は認められなかった。一方、拘束ストレス負荷後の暗期において、覚醒時間が cK0 マウスで増大した。この結果から、NA 神経で発現する EP3R は、拘束ストレス後の暗期覚醒時間減少の誘導に関与する可能性が考えられた。

以上により本研究は、プロスタグランジン E2 による LC-NA 神経活動の長期的な抑制が、拘束ストレスのような心理的ストレスの後、鬱様行動惹起の抑制および覚醒時間の減少に寄与する可能性を示した。今後、実際の生体内において PGE2 による LC-NA 神経活動抑制があること、および今回観察された cK0 の行動が青班核に限定した NA 神経における EP3R ノックアウトで再現することを示すことができれば、LC-NA 神経活動の長期的な抑制を介した PGE2 の新たな生理機能解明に繋がると考えられる。そして心理的ストレス後の鬱様症状や睡眠覚醒行動変化の機構解明にも新たな知見を与えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura Shigeru, Imada Toshihiro, Jin Kai, Shibuya Michiko, Sakaguchi Hisayo, Izumiseki Fumiya, Tanaka Kenji F, Mimura Masaru, Nishimori Kastuhiro, Kambara Natsumi, Hirayama Nozomi, Kamimura Itsuka, Nomoto Kensaku, Mogi Kazutaka, Kikusui Takefumi, Mukai Yasutaka, Yamanaka Akihiro, Tsubota Kazuo	4. 巻 -
2. 論文標題 The oxytocin system regulates tearing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.03.08.483433	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Mukai Yasutaka, Li Yan, Nakamura Akiyo, Fukatsu Noriaki, Iijima Daisuke, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Itoi Keiichi, Yamanaka Akihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Cre-dependent ACR2-expressing reporter mouse strain for efficient long-lasting inhibition of neuronal activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-30907-2	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 -
1. 著者名 Mukai Yasutaka, Yamanaka Akihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional roles of REM sleep	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Wanru, Nakano Takashi, Mizutani Kohta, Kawatani Masahiro, Matsubara Takanori, Danjo Teruko, Mukai Yasutaka, Yamanaka Akihiro, Ito Hikaru, Aizawa Hidenori, Petersen Carl C. H., Yoshimoto Junichiro, Yamashita Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Primary motor cortex drives expressive facial movements related to reward processing in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.10.28.514159	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Rahaman Sheikh Mizanur, Chowdhury Srikanta, Mukai Yasutaka, Ono Daisuke, Yamaguchi Hiroshi, Yamanaka Akihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Functional Interaction Between GABAergic Neurons in the Ventral Tegmental Area and Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.877054	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10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 向井康敬, ラザルス・ミハエル, 永井健治, 田中謙二, 山中章弘
2. 発表標題 青斑核ノルアドレナリン神経を持続的に抑制するプロスタグランジンE2の生理的役割について
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井康敬, 永山綾子, 井樋慶一, 山中章弘
2. 発表標題 特定神経の活動を調節する物質のスクリーニングと、それを用いた生理機能の解明
3. 学会等名 日本睡眠学会 第46回定期学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井康敬, ラザルス・ミハエル, 永井健治, 田中謙二, 山中章弘
2. 発表標題 青斑核ノルアドレナリン神経におけるプロスタグランジンE2の生理機能の探索
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井康敬
2. 発表標題 プロスタグランジンE2による、青斑核ノルアドレナリン神経活動の長期的な調節機構
3. 学会等名 第4回名古屋リズム研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井康敬、ラザルス・ミハエル、永井健治、田中謙二、山中章弘
2. 発表標題 青斑核ノルアドレナリン神経活動を持続的に抑制するプロスタグランジンE2の生理機能
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯嶋大右、向井康敬、山中章弘
2. 発表標題 光遺伝学を用いてドーパミン神経を活性化させた時のオレキシン神経の長時間in vivoカルシウムイメージング
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤洋人、深津紀暁、ラハマン・セイク・ミザン、伊澤俊太郎、向井康敬、小野大輔、Kilduff Thomas、山中章弘
2. 発表標題 オレキシン神経の活動記録と睡眠中の活動の役割
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 犬束歩、向井康敬、吉田匡秀、高柳友紀、山中章弘、尾仲達史
2. 発表標題 社会的敗北ストレスによって誘導される行動変容における前頭前皮質オキシトシン受容体発現ニューロンの生理機能
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯嶋大右、向井康敬、山中章弘
2. 発表標題 Long-term in vivo calcium imaging in orexin neurons with optogenetic activation of dopamine neurons
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村明代、向井康敬、李妍、深津紀暁、飯嶋大右、阿部学、崎村健司、井樋慶一、山中章弘
2. 発表標題 Generation and in vivo functional evaluation of novel ACR2 reporter mice
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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