

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19709

研究課題名（和文）「意欲」の神経による自律神経制御メカニズムの解明：独自作出遺伝子改変ラットの活用

研究課題名（英文）Role of "motivation" neurons in regulating autonomic nervous system function

研究代表者

木場 智史（Koba, Satoshi）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：40565743

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）：本研究では、研究グループが新しく作出した遺伝子改変ラットを用いて確立したラットFosTRAP法（短時間中に興奮した神経細胞選択的に、遺伝子工学的介入を可能とする手段）を用い、運動意欲の亢進に伴って興奮する視床下部神経による交感神経活性を調査した。運動意欲興奮DH神経に青光感受陽イオンチャンネルChR2を発現させて光遺伝学刺激したところ交感神経抑制が生じた一方、延髄吻側腹外側野投射性の運動意欲興奮DH神経を光遺伝学刺激は交感神経活性を生じさせた。運動意欲興奮DH神経には交感神経抑制と交感神経活性の両方の機能を持つ細胞が混在していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抑うつ状態などの精神病態下で認められる自律神経機能不全は意欲低下の原因かつ結果である。しかし意欲と自律神経機能との関連メカニズムは研究自体がなかった。本研究では私たちが独自作出したラットFosTRAP法や光遺伝学などの遺伝子工学的技術を活用して、運動意欲の亢進に伴って興奮する視床下部神経による交感神経制御能を調査し、それらの役割を初めて明らかにした。本研究の知見は意欲と自律神経機能との因果性を担う脳実体に迫ったものであり、現代社会の病とも言える意欲の低下と関連した精神病態の新しい理解にもつながり、また未来医療の方策開発の基盤となる可能性も秘める。

研究成果の概要（英文）：We used newly generated FosTRAP rats via CRISPR/Cas9 system to investigate the distribution of excited hypothalamic neurons due to the motivation for running exercise as well as their roles in eliciting sympathetic outflow. Dorsal hypothalamus (DH) of rats that performed 2-h voluntary treadmill running with tamoxifen displayed a greater number of "FosTRAPed" neurons than that of control rats in which tamoxifen was administered during the resting period on the treadmill. Under urethane anesthesia, optogenetic stimulation of cell bodies of the running-exercise-FosTRAPed DH neurons decreased renal sympathetic nerve activity. Optogenetic stimulation of axons extending from the running-exercise-FosTRAPed DH neurons in the ventral medulla produced a pressor effect. These observations suggest both sympathoinhibitory and sympathoexcitatory DH neurons play roles in determining appropriate levels of sympathetic nerve activity during motivation-driven running exercise.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：FosTRAP 視床下部背側野 交感神経抑制 運動意欲

1. 研究開始当初の背景

意欲は生存・社会行動の活力であり、意欲が低下すると生存能力が低下する。現代ストレス社会における健康課題の解決には、意欲の変化が生体機能に与える影響とそのメカニズムの解明が必要である。

抑うつ状態などの精神病態下で認められる自律神経機能不全は、意欲低下の原因かつ結果である。しかし意欲と自律神経機能との関連メカニズムは研究自体がない。例えば、意欲を産み出す脳回路による自律神経制御能は不明である。

申請者は最近、新しい遺伝子組換え Fos-CreERT2 ラット (内因性 Fos (興奮神経での発現タンパク質) の翻訳開始点にタモキシフェン誘導性の DNA 組換え酵素 Cre 遺伝子を挿入) を作出し、独自にラット FosTRAP 法 (Fos-CreERT2 ラットに四水酸化タモキシフェン (4OHT) を投与すると、その作用中 (約 2 時間) の Fos 発現神経の核内に Cre が移行するため、その神経への Cre/LoxP 系を介した遺伝子工学的介入が可能となる (= FosTRAP 法)) を確立した。この方法を活用した in vivo 生理実験 (20K21759) や、研究代表者の他の科研プロジェクト (21H03321) から、「視床下部背側野 (DH) にある、運動意欲の亢進に伴って興奮する特定の神経集団 (以下“意欲亢進 DH 神経”) は、交感神経制御能を持つ」ことを示唆するデータを得た。これらの知見から、「(I) 意欲亢進 DH 神経が意欲と自律神経系との因果性を担う脳実体である」との仮説が考えられ、さらに「(II) 意欲にあふれた動物個体では恒常的に、意欲亢進 DH 神経が交感神経活動を適正に抑制制御している」との仮説も考えられた。

2. 研究の目的

本研究は独自確立したラット FosTRAP 法を活用し、上記仮説 (I) (II) の検証を目指した。

3. 研究の方法

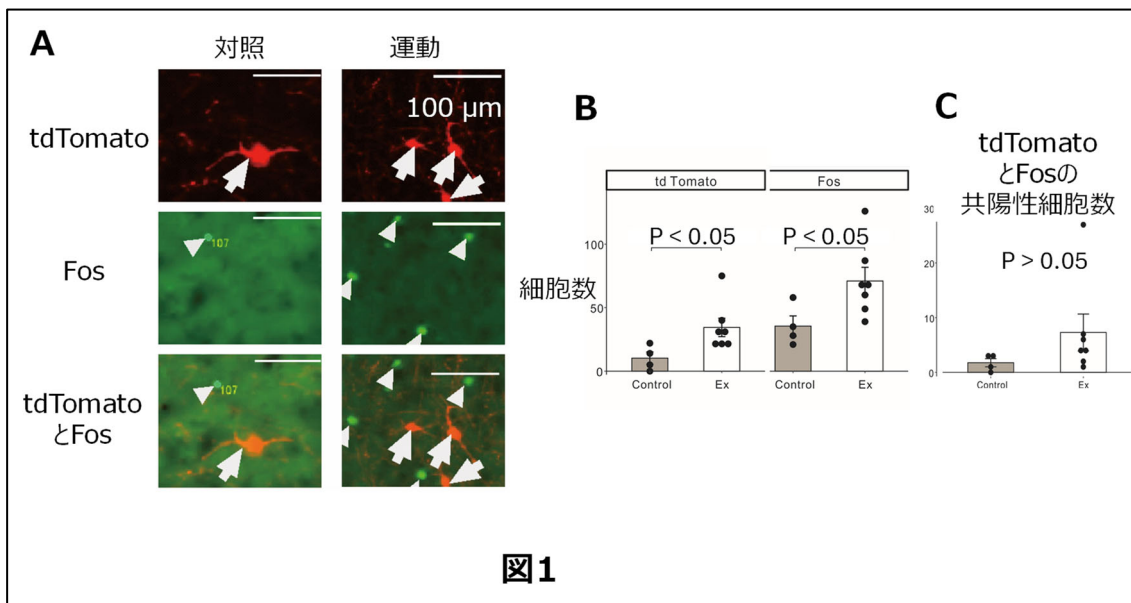
実験生物学的な研究手法 (ラット FosTRAP 法, in vivo 生理学実験, 組織学解析, 光遺伝学などの遺伝子工学技術) を活用した。具体的な研究方法は、「4. 研究成果」内に結果とともに記載した。

4. 研究成果

(1) 実験 A

まず、上記仮説 (I) の検証のために、「運動意欲の亢進によって興奮する DH 神経に対する FosTRAP 法の確立」を目指した。Fos-CreERT2 ラットと「Cre 依存性に tdTomato を発現するレポーターラット (ナショナルバイオリソース Rat No: 0734) (Igarashi *et al.*, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0155687.)」とを交配させ、タモキシフェン作用中に興奮する神経細胞に tdTomato が発現する遺伝子改変ラット (F1 ラット) を作出し、繁殖させた。

離乳後の F1 ラットに 3 週間弱のトレーニングを行い、自発的にトレッドミル走行を行う (トレッドミルレーンの前方で走行し続ける) ラットを選抜した。これらのラットを、「運動意欲をもって走行運動を行う」と評価した。これらのラットに対し、2 日程度のトレーニング中断期間を経て、2 時間のトレッドミル走行 (分速 16 メートル, 0 度傾斜) を行わせ、運動開始 1 時間の時点で 4OHT (12.5 mg) を腹腔内投与した [実験日①]。運動終了後にはケージに戻し、1 週間トレーニングを中断した。その後 3 週間弱のトレーニング, 2 日程度のトレーニング中断期間を経て、再び 2 時間のトレッドミル走行 (分速 16 メートル, 0 度傾斜) を行わせた [実験日②]。



その後ただちに抜脳し、tdTomatoとFosの発現を免疫組織化学染色によって検証した(図1A)。

DHにおけるtdTomato陽性細胞数(=実験日①)においてFosTRAP法によって標識した、興奮神経細胞数は、運動を行っていない対照群(トレッドミル上で2時間静置)と比較して運動群において、有意に多かった。またFos陽性細胞数(=実験日②)

において興奮した神経細胞数)も対象群よりも運動群で有意に多かった。すなわちFosTRAP法によって運動意欲興奮DH神経を検出した結果は、Fos発現の染色によって検出した結果と相同であったことから、運動意欲興奮DH神経に対するFosTRAP法手技の確立に成功したと結論した(図1B)。ただし興味深いことに、tdTomato陽性細胞のうちFosにも共陽性であったものは約二割程度であった(図1C)。この結果は、実験日②の運動で興奮した神経のうち実験日①の運動でも興奮したものはわずかであることを示す。すなわち、運動するたびに同じDH神経集団が興奮するのではなく、異なったDH内神経回路が稼働する可能性が考えられる。

(2) 実験B

実験Aで確立したFosTRAP法を用い、運動意欲興奮DH神経による交感神経制御能を調査した。実験Aと同様に、離乳後のFos-CreERT2ラットに2週間弱のトレーニングを行い、自発的にトレッドミル走行を行うラットを選抜した。Fos-CreERT2ラットのDHに、Cre依存に青光感受性陽イオンチャネルの発現を誘導するアデノ随伴ウイルスベクター液を微量注入した。注入後に再度3週間弱のトレーニング、2日程度のトレーニング中断期間を経た。そして2時間のトレッドミル走行(分速16メートル、0度傾斜)を行わせ、運動開始1時間の時点で40HT(12.5mg)を腹腔内投与した(FosTRAPによる興奮DH神経でのChR2の発現誘導)。そして3週間以上経過したのち、運動意欲興奮DH神経による交感神経制御能を調査するin vivo生理実験を行った(図2A)。すなわち、ウレタン麻酔下で両側DHに青光を照射した際の腎交感神経活動を記録することで、運動意欲興奮DH神経の光遺伝学刺激に対する交感神経活動変化を調査した。運動意欲興奮DH神経を刺激すると腎交感神経活動が直ちに(0.5秒以内に)低下したことから、運動意欲興奮DH神経には交感神経抑制能があることが分かった(図2B)。

(3) 実験C

運動意欲興奮DH神経の投射先を全脳調査したところ、中脳歩行誘発野や延髄吻側腹外側野(RVLM)などの随意運動時の自律神経制御を司ることが示唆されている脳領域へと運動意欲興奮DH神経が軸索を伸ばすことが分かった。そこで、RVLM投射性運動意欲興奮DH神経の交感神経制御能を調査した。実験Bで用いたラットのRVLMに青光を照射することでRVLM投射性運動意欲興奮DH神経を選択刺激したところ、腎交感神経活動の変化は検出されなかったが、有意な昇圧応答が生じた(図3)。この結果から、RVLM投射性運動意欲興奮DH神経には交感神経活性能があることが分かった。運動意欲によって興奮するDH神経にはその投射先によって交感神経活動を促進するものと抑制するものがあり、それらが運動中の適切な交感神経活動レベルの生成に貢献する可能性が示唆された。

(4) まとめ

本研究は、意欲で活動亢進するDH神経に対するFosTRAP法を確立し、その方法を用いることで運動意欲興奮DH神経の交感神経制御能を明らかにした。しかし、FosTRAP法で“捕まえた”運動意欲興奮DH神経の薬理遺伝学操作が不首尾であったために、上記仮説(II)の検証には至らず、今後の課題として残された。

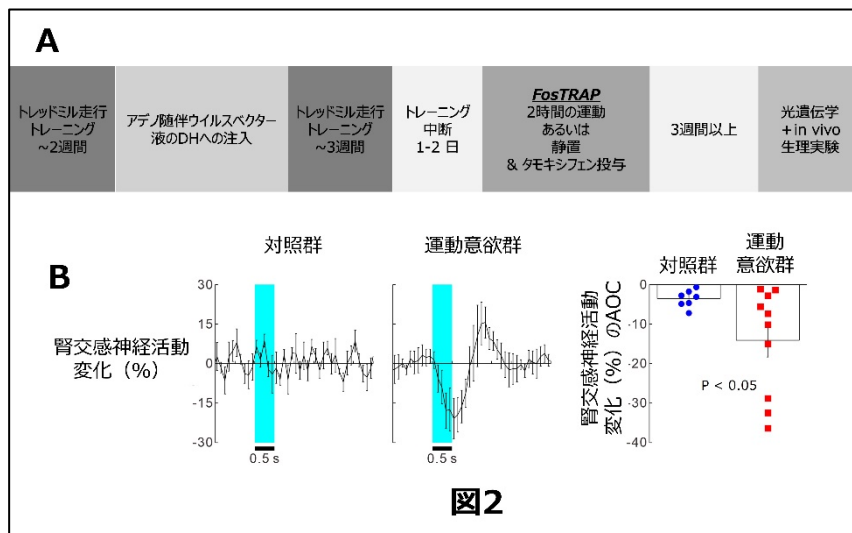


図2

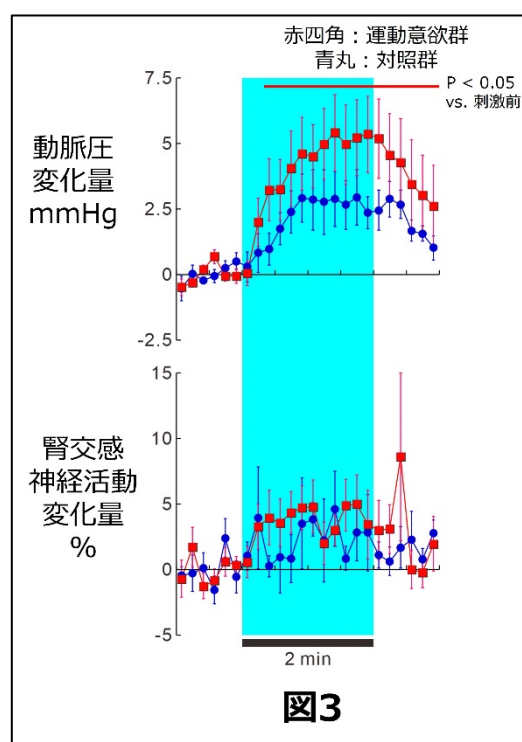


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yoshimura Yuki, Nakamura Kazuomi, Seno Misako, Mochizuki Misa, Kawai Kenji, Koba Satoshi, Watanabe Tatsuo	4. 巻 72
2. 論文標題 Generation of c-Fos knockout rats, and observation of their phenotype	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 95 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.22-0077	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 Koba Satoshi, Kumada Nao, Narai Emi, Kataoka Naoya, Nakamura Kazuhiro, Watanabe Tatsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 A brainstem monosynaptic excitatory pathway that drives locomotor activities and sympathetic cardiovascular responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32823-x	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 木場 智史, 奈良井 絵美	4. 巻 59
2. 論文標題 運動とストレス：急性自律生理反応の生成メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 354 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32272/ans.59.4_354	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 Narai Emi, Yoshimura Yuki, Honaga Takaho, Mizoguchi Hiroyuki, Yamanaka Akihiro, Hiyama Takeshi Y., Watanabe Tatsuo, Koba Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Orexinergic neurons contribute to autonomic cardiovascular regulation for locomotor exercise	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	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) 10.1113/JP285791	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8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Emi Narai、Yuki Yoshimura、Akihiro Yamanaka、Naoya Kataoka、Kazuhiro Nakamura、Tatsuo Watanabe、Satoshi Koba
2. 発表標題 Locomotion and sympathetic cardiovascular responses by orexinergic neurons in rats.
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Koba、Yuki Yoshimura、Kazuomi Nakamura、Misako Senoo、Karen Shibayama、Emi Narai、Takeshi Hiyama、Tatsuo Watanabe
2. 発表標題 Sympathoinhibitory and sympathoexcitatory roles of running exercise-excited lateral hypothalamic neurons assessed by rat FosTRAP
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奈良井絵美、熊田奈桜、吉村裕貴、渡邊達生、木場智史
2. 発表標題 セントラルコマンドを伝達する視床下部 - 中脳 - 延髄経路
3. 学会等名 第17回環境生理学プレコンgres
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奈良井 絵美、木場 智史
2. 発表標題 セントラルコマンドの脳回路メカニズム：オレキシン神経系の役割
3. 学会等名 第49回自律神経生理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 心疾患と運動時交感神経制御の中樞メカニズム
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 運動時交感神経活性の中樞回路メカニズム
3. 学会等名 第75回日本自律神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 心不全や運動時の交感神経活性を司る中樞回路
3. 学会等名 第19回九州脳・高血圧・循環制御研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場智史
2. 発表標題 学会賞受賞講演
3. 学会等名 第76回日本自律神経学会総会（招待講演）
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
研究 分担 者	吉村 祐貴 (Yoshimura Yuki) (50771242)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	

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