

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26112010

研究課題名（和文）ストレス対処行動におけるモノアミン制御経路の障害と回復

研究課題名（英文）Role of neural pathway regulating monoaminergic system in disorders and recovery in stress-coping behaviors

研究代表者

相澤 秀紀（Aizawa, Hidenori）

広島大学・医歯薬保健学研究科（医）・教授

研究者番号：80391837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 86,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境の変化に応じて同一個体が示すストレス対処行動の背景にあるドーパミン神経系の役割に注目した。研究成果は以下の3点にまとめられる。1）脳の微小領域である手綱核は中脳ドーパミン神経系を抑制的に制御し、その病的活性化がストレス下におけるマウス行動を受動的対処へとシフトさせた。2）ドーパミン神経伝達を脳局所で阻害する遺伝子改変法を新規に開発し、同方法により腹側線条体でのドーパミン神経伝達がストレス対処行動を制御する事を明らかにした。これらの研究成果はJournal of Neuroscience誌などへ発表した他、プレス発表を通して発信した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス下における動物の行動選択は個体の生存を左右する重大な意思決定であるにも関わらず、その神経機構については未だ不明な点が多く残されている。ストレス対処に関わる神経伝達物質ドーパミンおよびその代謝に関わる分子や脳領域を新たに同定した本研究成果は、ストレスの影響下にある精神疾患の病態解明や災害時におけるストレス関連傷害の予防へ向けた治療戦略を考える上で重要な示唆を与えられ、また、本研究は新学術領域研究「行動適応を担う脳神経回路の機能シフト機構」の計画研究として行われ、ストレス時の脳障害や回復機構を明らかにした点で新たな学術領域の創造に貢献した。

研究成果の概要（英文）：We focused on a role of dopaminergic transmission in modulation of stress-coping behaviors responsive to the environmental challenge. Our achievement is summarized as follows. 1. We identified a small brain area called habenula, which modulated central dopaminergic activity, directed mouse stress-coping behaviors to the passive behaviors. 2. We developed a novel method to knock out the dopaminergic receptors in a specific brain regions. With it, it turned out that dopaminergic transmission in the ventral striatum modulate the coping behaviors under the acute stress.

研究分野：神経生理学

キーワード：ストレス ドーパミン モノアミン 手綱核 線条体 ゲノム編集

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

拘束や恐怖等のストレス環境において動物の取る行動は、1)「すくみ」や回避といった受動的行動もしくは2)「もがき」や攻撃などの能動的行動の2種類に大きく分けられる。環境の変化に応じて同一個体がこれら2種類のストレス対処行動 (Stress coping behaviors) を二者択一的に示すことが知られており、例えば、攻撃を受けて敗北ストレスを受けたマウスは、その後攻撃者マウスに対して回避行動をとるものと果敢に能動的接近行動をとるものに大きく分けられる (Krishnan et al., 2007)。このような能動的/受動的な行動選択は、環境変化に対する適応行動に必須と考えられる。しかし、その重要性にも関わらずストレス対処行動を選択する神経機構については未だ不明な点が多い。異なったストレス対処行動には独立した神経回路が関与すると考えられ、環境変化に応じてこれらの神経回路の優位性をシフトさせている可能性が高い。

近年の研究により脳幹部のドーパミンやセロトニンなどのモノアミン産生細胞の活動がストレス対処行動を修飾する事が明らかとなり、モノアミン神経系のストレス対処行動選択における役割が急激に注目を集めていた (Tye et al., 2013; Chaudhury et al., 2013)。興味深いことにストレス下における脳幹部モノアミン産生細胞の活動変化は15日間以上という長期間持続しており (Krishnan et al., 2007)、このようなモノアミン産生細胞の活動パターンを決定する制御回路の活動が、ストレス対処行動の選択においてスイッチの役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

ドーパミン産生細胞の発火活動を修飾する手綱核や腹側線条体/腹側淡蒼球は、このようなモノアミン神経の制御中枢と考えられていた (Aizawa et al., 2011; Lisman and Grace, 2005)。我々は研究開始までにグルタミン酸作動性投射性神経細胞で構成される外側手綱核が (Aizawa et al., 2012)、尾懸垂ストレスや慢性社会的敗北ストレス負荷にตอบสนองして活性化している事を見出しており、ストレス対処行動の選択において手綱核神経活動の変化が関与する可能性が高いと考えられた (Aizawa et al., 2013)。さらに最近手綱核の活動が広域の神経活動に与える影響を電気生理学的に検討したところ、外側手綱核細胞の 5-8 Hz の律動的同期活動が記憶形成や意思決定に関与する海馬シータ波の維持を行う事を見いだしていた (Aizawa et al., 2013)。これら事実は、手綱核神経活動の変化が広範な神経投射をもつモノアミン神経系の修飾を介してストレス環境下における受動的行動選択へのシフトを引き起こす事を示唆していた。

### 2. 研究の目的

ストレス対処行動では、ドーパミンのようなモノアミンを産生する神経細胞の光遺伝学的活性化により特定の対処行動が惹起される事が示されているものの、能動的行動 (攻撃・接近) を引き起こしたとする報告 (Tye et al., 2013) と受動的行動 (無動・回避) を引き起こしたとする報告 (Chaudhury et al., 2013) が混在しており、ストレス対処行動の神経機構における統一的理解は得られていない。

先行研究の結果は、「モノアミン制御回路を介した適応回路シフトによりストレス対処行動が選択される」という仮説を支持しているものの、能動的及び受動的行動選択を担う各神経回路がどのように相互作用し機能シフトするかは全く不明なままであった。

本研究ではこの問題を解決するため、1) 個々のモノアミン制御回路に対して経路選択的な遺伝子改変技術による機能障害がストレス対処行動に与える影響を明らかにした上で、2) 能動的及び受動的ストレス対処行動におけるモノアミン神経系の挙動を明らかにする事である。

### 3. 研究の方法

#### 1) ストレス対処行動におけるドーパミン制御経路の役割

中脳ドーパミン作動性神経細胞の活動の一部は手綱核による抑制的な制御下にあることが報告されている。このようなドーパミン制御経路のストレス対処行動における役割を明らかにするため、同領域の礒村班と共同で尾懸垂試験や社会回避行動に対する手綱核の活動性変化の影響を調べた。具体的には、外側手綱核における興奮性神経伝達を担う細胞外グルタミン酸の過剰を薬理的・遺伝学的方法により引き起こした。細胞外グルタミン酸濃度の決定因子であるグルタミン輸送体 GLT-1 をジヒドロカイニン酸もしくは GLT-1 欠損により機能抑制した (図1、図2)。これらの実験操作の手綱及びモノアミン神経系における影響を c-Fos タンパク質発現や細胞外ユニット活動を指標として評価した。さらに、手綱における過剰興奮が動物の適応行動に与える影響を調べるため、オープンフィールド試験、尾懸垂試験、Novelty-suppressed feeding 試験、慢

図1

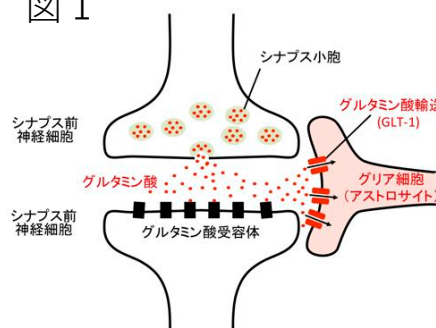
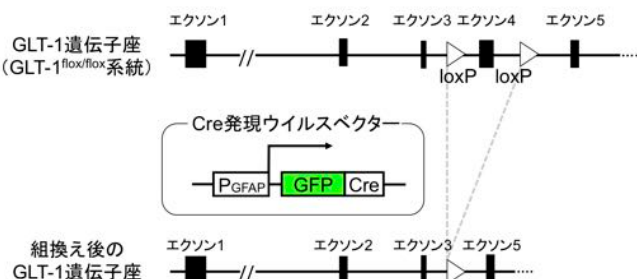


図2



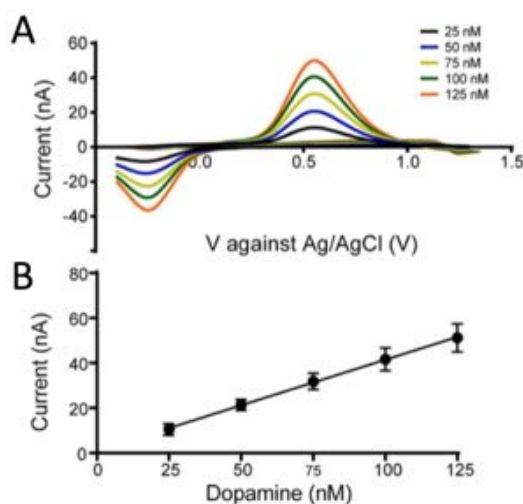
性敗北ストレス下における社会回避行動試験などを行った。

## 2) ドーパミン神経伝達における遺伝子改変技術の開発

ドーパミン投射を豊富に受ける線条体の神経伝達機構を明らかにするため、ドーパミン受容体発現細胞の *in vivo* 遺伝子改変を可能にする技術開発を行った。具体的には同領域の小林班及び伊佐班と共同で Cas9 や guide RNA を発現するアデノ随伴ウイルス及びレンチウイルスベクターを作成した。1型及び2型ドーパミン受容体を標的とした guide RNA の設計はN2A培養細胞へのトランスフェクション実験により検討を行い、SURVEYORアッセイの結果ゲノムの切断効率の高いものを絞り込んだ。これらの guide RNA 及び Cas9 を発現するウイルスベクターをマウス線条体へと投与し、ドーパミン受容体のタンパク質発現および修復後の標的ゲノム配列の次世代シーケンサーにより解析を行った。また、ドーパミン受容細胞の機能操作を可能にするノックインマウスの作成を飛躍的に効率化させるため、従来の CRISPR/Cas9 によるノックインに加えて Exonuclease1 mRNA の共発現の効果を検証した。

## 3) 自由行動下のマウスにおける細胞外ドーパミン放出の高速測定法の開発

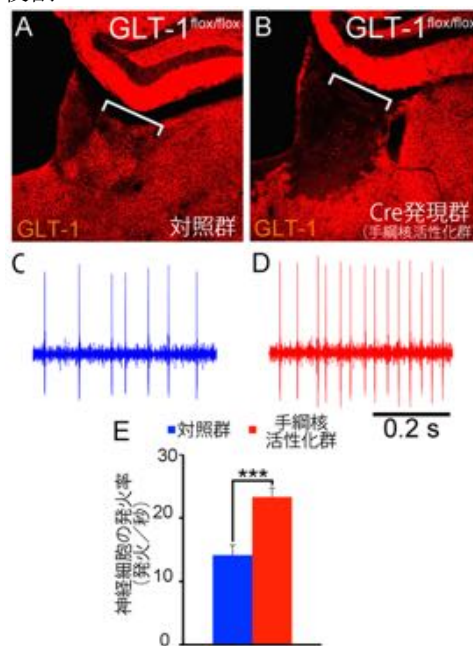
ストレス対処行動におけるドーパミン放出の動態を明らかにするため、慢性的に埋込可能なカーボンファイバ電極を開発し、ボルタンメトリおよび主成分分析法を組み合わせた電気化学的測定技術を開発した(右図)。具体的には細胞外ドーパミンを高感度で検出する炭素電極を作成し、マウス線条体へと設置した。ドーパミン作動性神経線維を含む内側前脳束を電気刺激した際の腹側線条体におけるドーパミン放出をボルタンメトリ及び従来法であるマイクロダイアリシス法で同時に計測し、同期した細胞外ドーパミン濃度の上昇を確認した。これらの動物を急性ストレスである尾懸垂状態に置き、動物の逃避行動や無動の変遷に応じて生じる細胞外ドーパミン動態を動物の行動と共に同時記録した。



## 4. 研究成果

### 1) ストレス対処行動におけるドーパミン制御経路の役割

実験の結果、ジヒドロカイニン酸により手綱核における過剰興奮を引き起こしたマウスでは、黒質・腹側被蓋野及び背側・正中縫線核におけるドーパミン及びセロトニン作動性細胞の活性化が抑制されている事を見出した。また、手綱核特異的に GLT-1 を欠損したマウス(右図)は、麻酔下における手綱核神経細胞の発火率上昇に加え、尾懸垂試験における無動時間の延長、Novelty-suppressed feeding における不安様行動の増強、慢性社会的敗北ストレスに対する感受性の増加を示し、いずれも受動的行動選択へと行動をシフトさせていた。これらの結果は、手綱核がモノアミン神経系の制御領域として機能し、ストレス対処行動のシフトに関与する事を示唆しており、成果をまとめて Journal of Neuroscience 誌へ発表、プレス発表を行った。



### 2) ドーパミン神経伝達における遺伝子改変技術の開発

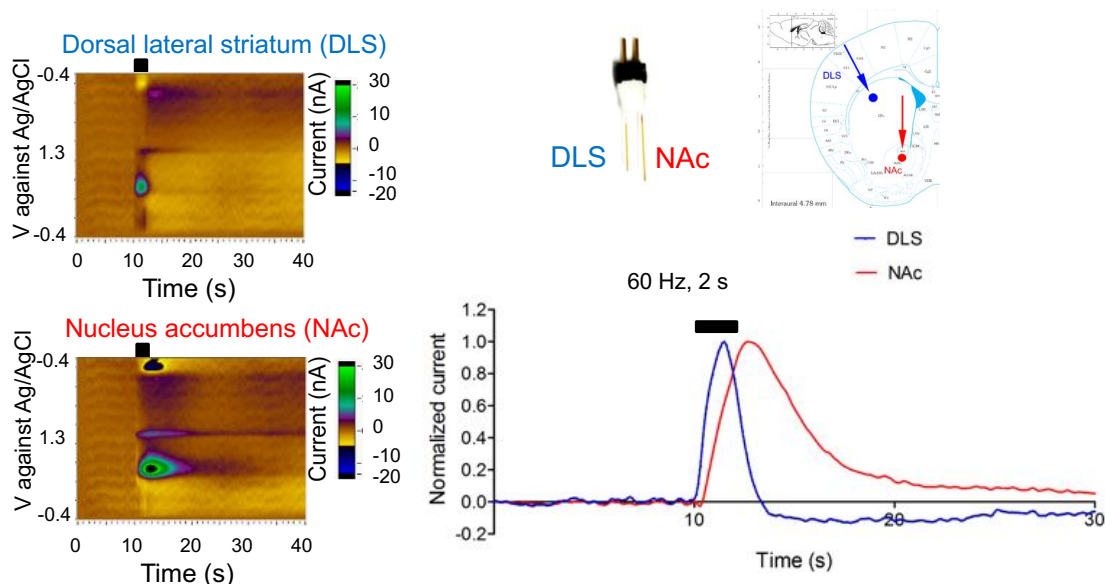
アデノ随伴ウイルスを用いて Cas9 及びドーパミン受容体を標的とする guide RNA を線条体神経細胞へ導入したところ、ドーパミン受容体 D1 蛋白質の持続的な減少を免疫組織化学で確認した。一方、D2 ドーパミン受容体蛋白質の発現は変化を示さず、guide RNA を発現しないベクターでは D1 蛋白質の減少が観察されないことから、本遺伝子改変技術の高い遺伝子特異性が示唆された。D1 受容体の腹側線条体の欠損は尾懸垂試験における絶望状態を減少させ、能動的対処行動の頻度を増加させた。遺伝子改変マウスに対してオープンフィールド試験、尾懸垂試験などを行い、動物の行動を定量的に測定した。実験結果によると D1 受容体の腹側線条体の欠損は尾懸垂試験における絶望状態を減少させ、能動的対処行動の頻度を増加させた。これらの研究成果をまとめて、現在論文投稿中である。

このようなドーパミン受容を行う神経細胞の役割を調べるため、その機能操作を可能にする

ノックインマウスの効率的な作成が不可欠である。従来型の CRISPR/Cas9 法は、ES 細胞を用いた方法と比較して短期間でノックインマウスを作成できる点で有用だが、作成効率が低い点が問題点であった。本研究では、改変効率に寄与する Exonuclease1 を受精卵へ共発現させることで、ノックイン効率を飛躍的に改善する方法を開発する事に成功した。その成果は、BMC Genomics 誌に発表された。

### 3) 自由行動下のマウスにおける細胞外ドーパミン放出の高速測定法の開発

尾懸垂試験におけるドーパミン放出の動態。上記のように新たに開発された技術を応用し、尾懸垂試験において 受動的対処行動（無動）及び能動的対処行動（もがき）を示すマウスの腹側線条体におけるドーパミン放出を測定した。対処行動のシフト時にドーパミン放出の減少が頻繁に観察され、急性ストレス下におけるドーパミン神経伝達が対処行動の制御に関与する可能性が示唆された。モノアミン制御経路の機能障害が神経回路機能に与える影響を明らかにするため、脳の複数領域における神経伝達物質放出の定量的測定方法を開発した。具体的には、ボルタンメトリ測定用のカーボンファイバー電極を背側及び腹側線条体へ慢性的に埋込み、独自に開発した多チャンネル電流—電圧変換回路を用いて測定した。実験の結果、マウス内側前脳束の電気刺激により放出されたドーパミンは腹側線条体に対して背側線条体においてより早く除去されており、脳部位で異なる細胞外ドーパミンの動態を検出することに成功した（下図）。これらの成果をまとめて現在論文投稿中である。



また、ドーパミン放出に応用されてきたボルタンメトリ法を脳各部位のセロトニン測定に応用するため、国際活動支援のもと、サウスカロライナ大学と共同研究を行った。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. [Aizawa H](#) and Zhu M. Toward understanding of the various different symptoms of depression by the habenula. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *in press*
2. Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, Shirawachi S, Asano S, [Aizawa H](#), Yamawaki S, Kanemastu T, Akagi H. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res.* 1680:13-38, 2018, doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.004
3. Sugimoto J, Tanaka M, Sugiyama K, Ito Y, [Aizawa H](#), Soma M, Shimizu T, Mitani A, Tanaka K. Region-specific deletions of the glutamate transporter GLT1 differentially affect seizure activity and neurodegeneration in mice. *Glia.* 66(4):777-788, 2018, doi: 10.1002/glia.23281
4. Aikawa T, Watanabe T, Miyazaki T, Mikuni T, Wakamori M, Sakurai M, [Aizawa H](#), Ishizu N, Watanabe M, Kano M, Mizusawa H, Watase K. Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice. *Hum Mol Genet.* 26(16):3094-3104, 2017, doi: 10.1093/hmg/ddx193.
5. [Aida T](#), Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, [Aizawa H](#), Yamamoto T, Tanaka K. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics.* 17(1):979, 2016
6. Ishizu N, Yui D, Hebisawa A, [Aizawa H](#), Cui W, Fujita Y, Hashimoto K, Ajioka I, Mizusawa H, Yokota T, Watase K. Impaired striatal dopamine release in homozygous Vps35 D620N knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 2016, 25 (20): 4507-4517
7. Ishii K, Kubo K, Endo T, Yoshida K, Benner S, Ito Y, [Aizawa H](#), Aramaki M, Yamanaka A, Tanaka

- K, Takata N, Tanaka KF, Mimura M, Tohyama C, Kakeyama M, Nakajima K. Neuronal Heterotopias Affect the Activities of Distant Brain Areas and Lead to Behavioral Deficits. *J Neurosci*. 35(36):12432-45. 2015 査読有
8. Aida T, Yoshida J, Nomura M, Tanimura A, Iino Y, Soma M, Bai N, Ito Y, Cui W, Aizawa H, Yanagisawa M, Nagai T, Takata N, Tanaka KF, Takayanagi R, Kano M, Götz M, Hirase H, Tanaka K. Astroglial Glutamate Transporter Deficiency Increases Synaptic Excitability and Leads to Pathological Repetitive Behaviors in Mice. *Neuropsychopharmacology*. 40(7):1569-79. 2015 査読有
  9. Cui W, Mizukami H, Yanagisawa M, Aida T, Nomura M, Isomura Y, Takayanagi R, Ozawa K, Tanaka K, Aizawa H. Glial Dysfunction in the Mouse Habenula Causes Depressive-Like Behaviors and Sleep Disturbance. *J Neurosci* 34:16273–16285. 2014 査読有
  10. Amo R, Fredes F, Kinoshita M, Aoki R, Aizawa H, Agetsuma M, Aoki T, Shiraki T, Kakinuma H, Matsuda M, Yamazaki M, Takahoko M, Tsuboi T, Higashijima SI, Miyasaka N, Koide T, Yabuki Y, Yoshihara Y, Fukai T, Okamoto H. The Habenulo-Raphe Serotonergic Circuit Encodes an Aversive Expectation Value Essential for Adaptive Active Avoidance of Danger. *Neuron*. 84(5):1034-1048. 2014 査読有
  11. 相澤秀紀：手綱核 分子精神医学 Vol.19 No.1, p45-47. 2019年 査読有
  12. 吉野敦雄、相澤秀紀、高村真広、市川奈穂、柴崎千代、山脇洋輔、笹岡貴史、岡本泰昌、山脇 成人：うつ病における手綱核の役割—これまでのヒト脳に関する知見を中心に. *神経研究の進歩* 70(9): 1017-1023. 2018年 査読有
  13. 相澤秀紀：うつ病様行動障害と脳の局所興奮性 分子精神医学 Vol.17 No.1, p56-57. 2017年 査読有
  14. 相澤秀紀、崔万鵬、田中光一：恐怖と不安一脅威に対する動物の適応行動選択とその克服. *生体の科学* 66(1) 29-32 2015年 査読無

〔学会発表〕（計 13 件）

1. 野崎 香菜子、伊藤 日加瑠、扇谷 昌宏、加藤 隆弘、北島 貴司、勝又 清至、山脇 洋輔、山脇 成人、相澤 秀紀 Effect of TSPO-targeting compound ONO-2952 on the mouse behaviors under the chronic social defeat stress、第 41 回日本神経科学大会、2018 年
2. Kanako Nozaki, Hikaru Ito, Masahiro Ohgidani, Yosuke Yamawaki, Takashi Kitajima, Seishi Katsumata, Shigeto Yamawaki, Takahiro Kato, Hidenori Aizawa TSPO-targeting compound ameliorates the abnormal behaviors of mice received social defeat stress, 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)、2018 年
3. 相澤秀紀、崔万鵬、相田知海、伊藤日加瑠、小林憲太、加藤成樹、和田悠作、中野高志、田中光一、伊佐正、小林和人 ゲノム編集技術を用いた成体脳におけるドーパミン受容体の機能解析、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年
4. 相澤秀紀 Dopaminergic and serotonergic transmission and stress-coping behavior, Behavioral adaptation and functional recovery from pathological states, 2017
5. 相澤秀紀 脳内モノアミン代謝における手綱核神経回路の役割と気分障害の病態生理、日本睡眠学会第 42 回定期学術集会シンポジウム、2017 年
6. H. Aizawa, W. Cui, T. Aida, S. Kato, H. Ito, K. Tanaka, K. Kobayashi, Role of dopamine signaling in the murine stress-coping behaviors, Dissecting and Understanding Mechanisms for Functional Shift of Brain Network、2016 年
7. 相澤秀紀 ストレス対処行動の神経基盤としてのモノアミン制御経路、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年
8. 相澤秀紀 ゲノム編集によるマウス成体脳の遺伝子改変、第 39 回日本神経科学大会、2016 年
9. 相澤秀紀 ストレス感受性におけるモノアミン制御経路の役割、第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会、2016 年
10. 相澤秀紀 うつ病様行動障害における手綱核グリア細胞の役割、日本解剖学会第 70 回中国・四国支部学術集会、2015 年
11. 相澤秀紀 うつ病様行動異常と睡眠障害における手綱核活動異常の役割 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会合同年 会(招待講演) 2014 年
12. 相澤 秀紀、崔万鵬、水上浩明、柳澤美智子、相田知海、野村政壽、磯村宜和、高柳涼一、小澤敬也、田中光一 グルタミン酸トランスポータのうつ病様行動における役割 第 37 回日本神経科学大会(招待講演)、2014 年
13. 相澤秀紀 Ontogeny and phylogeny of the habenula regulating animal behaviors. 日本動物学会第 85 回仙台大会(招待講演)、2014 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://home.hiroshima-u.ac.jp/neurobio/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：相田 知海

ローマ字氏名：(AIDA, Tomomi)

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：難治疾患研究所

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：50540481

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：田中 光一

ローマ字氏名：(TANAKA, kohichi)

研究協力者氏名：崔 万鹏

ローマ字氏名：(CUI, wanpeng)

研究協力者氏名：伊藤 日加瑠

ローマ字氏名：(ITO, hikaru)

研究協力者氏名：Deepa Kamath Kasaragod

ローマ字氏名：(KASARAGOD, deepa)

研究協力者氏名：野崎 香菜子

ローマ字氏名：(NOZAKI, kanako)

研究協力者氏名：中野 高志

ローマ字氏名：(NAKANO, takashi)

研究協力者氏名：齊木愛希子

ローマ字氏名：(SAIKI, akiko)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。