

平成 30 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05569

研究課題名(和文) ストレス応答を司る神経回路の動態と破綻機構の解明

研究課題名(英文) Neuronal network dynamics in response to mental stress

研究代表者

佐々木 拓哉 (Sasaki, Takuya)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：70741031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ストレス応答時の多数の脳活動パターンと末梢活動がどのように関連するかを解明することを目的とした。ラットに社会的敗北ストレスを負荷し、心電図の変動を基に、動物群をストレス感受性群と非感受性群に分けて、大脳新皮質の複数領域および海馬から記録された脳波を解析した。解析の結果、ストレス感受性群ではストレス応答後に、ガンマ帯を除くほぼすべての周波数帯において、脳波パワーの変動が見られ、セロトニンの濃度の変動が大きく、こうした濃度変化が脳波パワーの変動につながる可能性を示唆した。ストレス応答による生体変化を病態生理学的観点から解明した新たな知見である。

研究成果の概要(英文)：Chronic social defeat is a widely used animal model with high etiological and discriminative validity that evokes profound behavioral phenotypes. In this study, we examined how social defeat stress alters physiological activity in freely moving rats. Our recording system integrates local field potential signals from the cortex, heartbeat signals, and skeletal muscle signals into an electrical interface board that is mounted on an animal's head. After receiving a physical attack from the resident rat, the heart rate of the intruder animals was transiently increased and then decreased when they started to show freezing behavior. During the freezing period, brain local field potential power was prominently reduced. The evidence will advance the understanding of the neurophysiological correlate of mind-body associations during mental stress exposure.

研究分野：神経生理学

キーワード：中枢末梢連関 ストレス応答 大脳皮質 局所場電位 心電図

1. 研究開始当初の背景

動物は、日常生活の中で精神的・物理的な多様なストレスに曝されて生存している。ストレス応答に関係する自律神経系は、中枢脳領域の一部である視床下部や扁桃体による支配を受けている。つまり、ストレスによる末梢器官の機能不調は、脳における活動変化に起因している。これまでの先行研究においては、ストレスが脳に与える影響に関する知見では、ストレスを与えた動物モデルを用いて生化学・分子生物学レベルで小実変化あるいは病理組織学・解剖学レベルの変化を捉えたものがほとんどであった。一方で、生理的な生体電気信号がどのように変動するか、その詳細は不明な点が多かった。病態生理学的な研究が必要とされる。

2. 研究の目的

本研究では、動物が精神的ストレス応答を生じたときに、中枢神経と末梢臓器がどのような情報伝達を行い、また、それらがどのように変化するかを解明することを目的とした。まずは、方法論を確立するために、1匹の齧歯類動物において、ストレス応答を司る複数脳領域の神経活動、および心電図や呼吸リズムの両方を1カ月程度慢性的に計測できる技術「神経網羅解析法」の構築を試みた。これは従来の脳波計測法を拡張したものである。この方法の確立後は、ラットの社会的敗北ストレスモデルを用いて、ストレス応答が引き起こされた際に、脳ではどのような応答が生じるか、また、それがどのように身体反応と関連するかを理解することを目的とした。

こうしたシステムの観点をもった病態生理学研究は希少である。各脳領域と末梢臓器の機能の相対関係を多臓器レベルから解釈することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

全ての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物実験委員会の承認を得た上で(承認番号:P29-5)実験動物への苦痛を最小限に抑えるための最大限の努力のもとに行った。全ての実験には、10-12週齢および20週齢以上のLong Evans 雄性・雌性ラットをそれぞれ、Intruder およびResident ラットとして使用した。

(2) 電気生理記録

ラットに記録電極を埋め込むために、イソフルラン吸入麻酔のもと、心電図記録用の導線を胸部の筋肉に縛りつけた。また、右側背側海馬CA1あるいはその直上の大脳新皮質に電極を刺入するため、bregma からAP方向に-3.8 mm、ML方向に2.6 mmの位置を中心に直径1.4 mm程度の穴をドリルで頭蓋骨にあけた。硬膜を取り除き、独立に可動の8本の電極(150-300 k Ω)を格納したマイクロドライブを刺入した。

(3) 組織染色

脳に刺入した電極跡の確認は、実験後に灌流固定して脳を取り出したのち、薄層切片にしてCresyl Violet 染色を行った。

4. 研究成果

(1) 中枢と末梢の生体電気信号を同時計測するための方法構築

これまでの研究にて、ラットを実験動物として、40本以上の電極を用いて脳領域の1つである海馬神経活動を計測する生理計測法を扱ってきた。本研究では、まずはこの計測技術を拡張し、海馬のみならず大脳新皮質など2つ以上の脳領域に電極を埋め込む方法の確立を目指した。ここでは、3Dプリンターを用いてラットの頭部に設置する電極装置(マイクロドライブ)自作し、試行錯誤を重ねて最適な方法を模索した。この装置では、各電極に微小ネジが取り付けられており、1つ1つの電極を独立に電極の深さ調節できる。電極埋め込み後には脳波(細胞外電位)のパターンを参照しながら、一日数十マイクロメートルずつ電極を降下させていき、目的の脳領域に到達する。本法は2016年の初頭に完成した。本研究ではさらに、心電図計測用の電極を腹部皮下に、筋電図計測用の電極を頸背部皮下に埋入し、末梢活動を同時計測する方法の確立を目指した。また、呼吸リズムを同時計測するために、鼻上の嗅覚神経内にも電極を埋入する方法を検討した。検討を繰り返し重ねた結果、これら末梢側に埋め込んだ金属電極を、先述の脳波測定用の装置にハンダ付けすることで、脳波、心電図、筋電図、呼吸リズムといった全身の生体電気信号を1つの記録装置に集約させて効率的に計測する方法を確立した。この新しい方法論を学術論文としてまとめ発表した(Sasaki et al., Biol Pharm Bull, 2017)。以上にて、ストレス応答に関与する中枢神経活動パターンと、末梢臓器活性を網羅的に計測するという実験系が構築された(図1)。

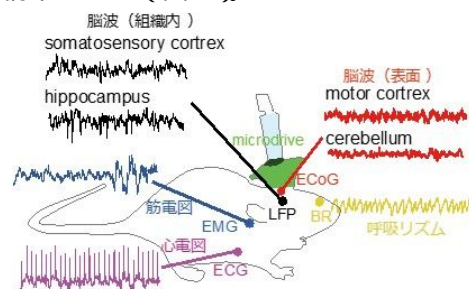


図1 中枢と末梢の生理電気信号の同時計測

(2) 社会的敗北ストレス負荷後の生体電気信号の解析

ストレス応答による機能破綻を誘発するため、ラットに社会的敗北(social defeat)ストレスを負荷した。このストレス応答モデルは、一方の身体が小さいラットが、もう一方の身体大きいラットから攻撃を受けるというものである。攻撃されたラットには、10分間のストレス環境を経験するだけでも、

全身に様々な反応が生じることがわかっている。こうした中枢・末梢の応答を神経網羅解析法により記録した。被攻撃ラットからの計測には、物理的な衝撃が伴うが、3Dプリンターでカバーを作成し、安定して記録できる実験系を構築した。

ラットへの社会的ストレス負荷は、たった10分の攻撃だけでも、身体不調が顕著に現れることが知られている。またストレス負荷を受けても、強い生体反応を生じる個体とそうでない個体が見られる。これは心拍数の変化として顕著に発現する。本研究では、この指標に基づいてストレス抵抗性と感受性の動物を分類した。

ストレス負荷により心拍数が顕著に変化したラット(ストレス感受性群)において、社会的敗北ストレスを負荷した直後から、大脳新皮質と海馬の神経活動が著しく減弱することを見出した。末梢の心電図や呼吸リズムは、ストレス負荷前と比較して、大きな差は見られなかった。この神経活動の減弱は、ストレス負荷後およそ10分間程度継続し、徐々に回復する傾向がみられた。

(3) 社会的敗北ストレス負荷後の神経調節物質の定量

上記で観察された皮質領域全体における神経活動の変化の原因として、広範な脳活動を制御する神経伝達調節物質の関与が考えられる。そこで、マイクロダイアリシス法を用いることによって、2種類の主要なモノアミン系神経伝達調節物質(ドパミン、セロトニン)の細胞外領域における定量を試みた。ここでは、従来のマイクロダイアリシス法に、本研究の生理計測法を組み合わせるため、3Dプリンターで最適な電極形状と手術条件の検討を行った。方法の確立後、ストレス前後の休息時から、15分ごとにサンプルを回収し、高速液体クロマトグラフィーによってそれぞれの回収量を定量した。その結果、ストレス経験により脳局所場電位の減弱が見られた群(ストレス感受性群に対応)において、細胞外セロトニン量の顕著な上昇が認められた。さらに、セロトニンを直接、大脳皮質に投与し、投与直下の脳波パワーを解析したところ、顕著な減弱が認められた。これらの結果から、ストレス経験によりセロトニン分泌が促進され、大脳皮質領域の神経活動の減弱を引き起こしていることが示唆された。

(4) 研究の意義

本研究では、ストレス経験が大脳皮質領域の神経活動に与える影響を見出した。また、その影響はセロトニンの分泌によって媒介されている可能性が示唆された。こうしたストレス経験による心拍数の変化に個体間で差異があることから、ストレス経験に対する応答の個体差を脳の活動変化の違いによって説明できる可能性がある。時間と空間方向の要素は多様であるが、さらに検証を進めて

いけば、ストレス経験後の不安や心的外傷など、心因性由来の身体不調の発症機序と治療標的をさらに直接的に検証していけると期待される。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計15件)

S. Yagi, H. Igata, Y. Shikano, Y. Aoki, T. Sasaki*, Y. Ikegaya. Time-varying synchronous cell ensembles during consummatory periods correlate with variable numbers of place cell spikes. Hippocampus, in press.

T. Okonogi, R. Nakayama, T. Sasaki*, Y. Ikegaya. Characterization of peripheral activity states and cortical local field potentials of mice in an elevated plus maze test. Frontiers in Behavioral Neuroscience, in press.

Y. Shikano, Y. Ikegaya, T. Sasaki*. Monitoring brain neuronal activity with manipulation of cardiac events in a freely moving rat. Neuroscience Research, in press.

H. Norimoto, K. Makino, M. Gao, Y. Shikano, K. Okamoto, T. Ishikawa, T. Sasaki, H. Hioki, S. Fujisawa*, Y. Ikegaya*. Hippocampal ripples down-regulate synapses. Science, in press.

Y. Shikano, T. Sasaki*, Y. Ikegaya. Simultaneous recordings of cortical local field potentials, electrocardiogram, electromyogram, and breathing rhythm from a freely moving rat. Journal of Visualized Experiments, in press.

T. Sasaki+, VC. Piatti+, E. Hwaun, S. Ahmadi, JE. Lisman, S. Leutgeb, JK. Leutgeb*. Dentate network activity is necessary for spatial working memory by supporting CA3 sharp-wave ripple generation and prospective firing of CA3 neurons. Nature Neuroscience, 21: 258-269, 2018.

T. Kayama, I. Suzuki*, A. Odawara, T. Sasaki*, Y. Ikegaya. Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 495: 1028-1033, 2018.

S. Okada, H. Igata, T. Sasaki*, Y. Ikegaya. Spatial representation of hippocampal place cells in a T-maze with an aversive stimulation. *Frontiers in Neural Circuits*, 11: 101, 2017

T. Sasaki*, Y. Nishimura, Y. Ikegaya. Simultaneous recordings of central and peripheral bioelectrical signals in a freely moving rodent. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40: 711-715, 2017.

Y. Aoki, Y. Nishimura, T. Hondrich, R. Nakayama, H. Igata, T. Sasaki*, Y. Ikegaya*. Selective attenuation of electrophysiological activity of the dentate gyrus in a social defeat mouse model. *Journal of Physiological Sciences*, 67: 507-513, 2017.

S. Ujita, T. Sasaki, A. Asada, K. Funayama, M. Gao, K. Mikoshiba, N. Matsuki, Y. Ikegaya*. cAMP-dependent Calcium Oscillations of Astrocytes: An Implication for Pathology. *Cerebral Cortex*, 27: 1602-1614, 2017.

S. Okada, H. Igata, T. Sakaguchi, T. Sasaki*, Y. Ikegaya. A new device for the simultaneous recording of cerebral, cardiac, and muscular electrical activity in freely moving rodents. *Journal of Pharmacological Sciences*, 132: 105-108, 2016.

Y. Nishimura, R. Abe, T. Sasaki*, Y. Ikegaya*. Homeostatic changes in neuronal network oscillations in response to continuous hypoperfusion in the mouse forebrain. *Neuroscience Research*, 109:28-34, 2016.

R. Nakayama, T. Sasaki*, K.F. Tanaka, Y. Ikegaya*. Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes. *European Journal of Neuroscience*, 43: 923-932, 2016.

H. Igata, T. Sasaki*, Y. Ikegaya*. Early failures benefit subsequent task performance. *Scientific Reports*, 6: 21293, 2016.

[学会発表](計16件)

第50回神経解剖懇話会、2018年3月

27日

次世代薬理学セミナー2018、2018年3月10日

The 4th CiNet Conference "Neural oscillation and functional connectivity: from anatomy to perception"、2018年2月28日

公開シンポジウム「ヒトiPS分化細胞を用いた医薬品の評価法開発と国際協調」、2018年2月8日

Nepal-Japan symposium on Neuroscience and Medicine、3 May 2017

平成29年度記憶研究会、2017年10月11日

動物心理学会、動物行動学会合同学会若手シンポジウム、2017年9月1日

第4回包括的緩和医療科学学術研究会/第5回Tokyo疼痛緩和次世代研究会合同研究会、2017年8月26日

第1回感覚免疫研究会、2017年7月4日

日本薬学会第137年会、2017年3月25日

第90回日本薬理学会年會、2017年3月16日

7th International neural microcircuit conference、9 Dec 2016

2nd UK-Japan FoS symposium、7 Nov 2016

Modeling Neural Activity (MONA)2 conference、23 Jun 2016

次世代脳冬のシンポジウム3領域合同若手シンポジウム、2016年12月16日

第39回日本神経科学大会、2016年7月20日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://sasaki-brain.net>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 拓哉 (SASAKI, Takuya)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 70741031

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし