

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01846

研究課題名(和文) 闘争における優劣決定の神経回路機構

研究課題名(英文) The social conflict behaviors are defined by the activity of the ventral medial habenula - interpeduncular nucleus - median raphe pathway

研究代表者

松股 美穂 (Matsumata, Miho)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：50595460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：手綱核内側部腹側領域(vMHb)は脚間核(IPN)にアセチルコリン(ACh)とグルタミン酸を放出している。今回、マウスvMHb-IPN回路を抑制(ACh合成阻害)または活性化(光刺激活性化、ニコチン投与による活性化)し、社会的優劣関係の検出テストを行った。その結果、回路を抑制すると勝者に、活性化すると敗者になる傾向が見られた。IPNは中央縫線核(MnR)に抑制性の神経投射をしているが、それを模倣しMnRのセロトニン神経を抑制すると、vMHb-IPN回路の活性化同様に社会的敗者になる傾向を確認した。以上より、vMHb-IPN-MnR回路が闘争行動を終了させるように働くことがわかった。

研究成果の概要(英文)：It was reported that the ventral part of medial habenula (vMHb) projects to the interpeduncular nucleus (IPN) and that the neurons in the vMHb release both glutamate and acetylcholine (ACh). We examined the effects of inhibition or activation on the vMHb-IPN pathway in social conflicts. The mice with selective impairment in ACh synthesis (cCKO mice) in the vMHb-IPN pathway showed tendency to win in the tube test, a standard assay of a dominant-subordinate relationship. In contrast, when channel-rhodopsin 2 was selectively photo-activated in that pathway by micro-LED, the mice behaved submissively. Next, we examined the involvement of the median raphe (MnR), which was projected from the IPN. When the 5HT neurons in the MnR were inhibited selectively by specific expression of chemogenetic receptor and its ligand, those mice behaved timidly. Taken together, the activity of the vMHb-IPN-MnR pathway plays the major role for inducing the submissive behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：社会的闘争 手綱核 脚間核 中央縫線核

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的相互関係は2匹以上の同種の動物に見られる関係性のことを指し、資源の限られた自然界において個体、群れ及び種の維持に重要な意味を持つ。特に雄性では、食餌と交配パートナーを得るためのテリトリーを持つことが多いが、比較的資源が豊富な場合はテリトリーを棲み分けることで同種間での争いは回避される。一方資源が十分でない場合はテリトリーをめぐる闘争が起きるが、急性期の闘争行動で社会的順位付けが行われ優劣関係が決まると、その後はそれぞれの地位に見合った振る舞いをする事で、同種間での無駄な争いによるエネルギーの浪費を回避する、すなわち種の維持を主眼とした社会行動を取るようになる[ローレンツ, 攻撃—悪の自然誌]。上記のような社会的相互関係について、行動学的観点からの報告はなされていたが、それがどのような神経基盤によって行動決定されるのかについては未知であった。

(2) 手綱核 (Habenula; Ha) はヒト脳最深中心部にある間脳由来の神経核である。哺乳類では構造的に内側部 (MHb) 及び外側部 (LHb) に分かれるが、MHb はさらに背側部 (dMHb) と腹側部 (vMHb) とに分けられる。我々のグループではこの手綱核が脊椎動物で進化的に広く保存されていることを、魚類であるゼブラフィッシュで確認し、既に報告していた[Amo R, 2010]。

(3) 上記ゼブラフィッシュを用いて、哺乳類の dMHb 及び vMHb に相当する背側手綱核外側部及び内側部から脚間核 (Interpeduncular nucleus; IPN) への神経投射をそれぞれ特異的に抑制したゼブラフィッシュを作成し、社会的相互関係、特に闘争行動を確認したところ、社会的闘争の際、外側部を抑制すると敗北者に、内側部を抑制すると勝利者になりやすいことがわかった[岡本仁 2014 年第 37 回神経科学大会; Chou MY, 2013 年北米神経科学大会]。

2. 研究の目的

背景で述べた知見に基づき、哺乳類でも同様に MHb-IPN の回路が社会的相互作用の急性期における闘争行動、及びその後の慢性期における寛容関係時における行動を決定付けると仮説を立てた。

(1) MHb-IPN 回路のアクティビティが、身体的差異とは別のファクターとして社会的闘争時の勝敗に関与することを示す。

(2) 闘争行動の勝敗結果に基づいて、MHb-IPN 回路に変化が起きること、さらにその後の慢性期寛容関係時の行動や精神状態への影響を確かめる。

(3) 社会的劣位ストレスによって鬱傾向行動が誘発されることがわかっているため、介入実験による MHb-IPN 回路へのアクティビティ制御とその後の行動を確認することで、抑鬱効果及びその予防・治療効果についても検討する。

3. 研究の方法

(1) vMHb の神経投射を人為的に操作することで、vMHb-IPN 回路をそれぞれ特異的に活性化 / 抑制し、社会的相互関係の各ステップ (社会的闘争 / その後の個体の行動・精神状態 / 社会的順位付け) における行動の変化を検出する。

(2) MHb-IPN 回路の下流神経核を同定し、詳細な解剖学的知見を得る。

4. 研究成果

(1) vMHb-IPN 回路の神経投射抑制マウスにおける闘争行動

vMHb-IPN 回路の神経投射は、グルタミン酸 (Glu) とアセチルコリン (ACh) の共放出によって行われている。さらに vMHb-IPN 回路では、ACh と Glu がどちらも興奮性神経伝達物質であることがわかっている。この投射を遮断する目的で、Hb 特異的に Cre を発現する Tg マウスライン (PGR7-Cre (+) マウス) と ACh 合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の flox マウスラインを交配させ、vMHb-IPN 回路でのみ ACh の放出が抑制されたダブル Tg マウスを作成した (PGR7-Cre(+)/Chat(f/f) マウス; conditional ChAT knockout マウス; cCKO)。同腹仔の Cre ネガティブマウスを対照群として (PGR7-Cre(-)/Chat(f/f) マウス; Cont) 以下の行動実験を行った。

社会的闘争行動実験

vMHb-IPN 回路の遮断による社会的闘争行動への影響については、先行していたゼブラフィッシュの相同回路を遮断した実験から勝利しやすいと推測された。そこで、対戦相手として、cCKO を作成したマウスラインである B6 ラインのマウスよりも大きくて攻撃性が高いと報告のある CD1 マウスを用いて、社会的闘争行動を確認した。闘争行動のテストとしては、社会的順位付けによる優劣を検

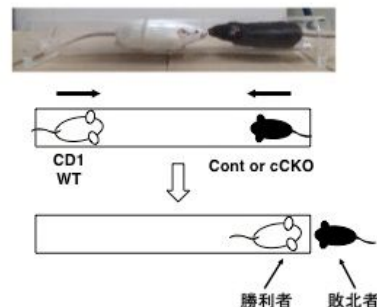


図1 チューブテスト

出す方法として使われるチューブテストを用いた(図1チューブテスト)。透明なチューブの両端から2匹のマウスを互いに向かい合わせで挿入し、どちらのマウスがもう片方を押し出すのかを確認した。このテストでは、押し出した方が優位(勝利者)、押し出された方が劣位(敗北者)として検出される。その結果、Cont マウスは、対戦相手である大きな CD1 マウスに負けやすい傾向にあったが、cCKO マウスは身体的には不利にもかかわらず CD1 マウスに勝利しやすい傾向が見られた(図2 ACh 投射の抑制はマウスを強気にさせる)。

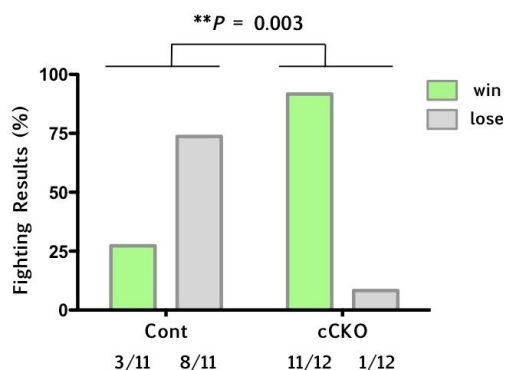


図2 ACh 投射の抑制はマウスを強気にさせる

#### cCKO マウスの他の特性

cCKO マウスがなぜ勝利しやすいか、Cont と cCKO との群間差について考える可能性を検討した。

- ・身体上の違い(体重及び押し力)を想定し群間差を調べた; 違いなし
  - ・不安度が高すぎても低すぎても攻撃性が上昇するとの報告があることから、不安度の違いを群間差で比較した; 違いなし
  - ・痛み受容が低下していれば勝利者になりやすいと考えられることから、痛覚受容の群間差を調べた; 高温刺激及び物理的刺激に対する受容度に差なし
  - ・対戦相手にとって不快と感じられるなんらかの刺激を放出していれば相手が自発的に退避するため、相対的に勝利者になりやすいと考えられることから、他者に対する嫌悪的特性の有無を調べた; 違いなし
  - ・チューブテストを模擬し、チューブ内に障壁を設置して、その障壁を押し頻度と押し始めるまでの潜時を群間で比較した; Cont に比べて、cCKO では障壁を押し回数が多くまた押し始めるまでの潜時も短いことがわかった。
- 以上のことから、cCKO マウスでは障壁提示に対する反発心が高く、そのため相手を退けやすいことが示唆された。

#### (2)vMHb-IPN 回路の活性化マウスにおける闘争行動

(1)- で述べた通り vMHb-IPN 回路の ACh を遮断すると、そのマウスは身体的に不利にもかかわらず大きなマウスにも勝利しやす

いことがわかったため、逆にこの回路を活性化するとそのマウスが敗北者になりやすいと仮説を立て検証した。

#### vMHb-IPN 回路の光遺伝学的活性化マウスにおける社会的闘争行動

vMHb-IPN 回路を活性化する目的で、Chat-Cre(+)マウスの vMHb に Cre 依存的に ChR2 を発現させる AAV ベクターを感染させ発現誘導した。このマウスに対して、ChR2 を光刺激するための光源となる LED の設置手術を行い(vMHb は第3脳室に面しているため、第3脳室に挿入) 光刺激下での闘争行動を調べた。この回路の活性化は(1)- で確認された表現系と逆向き、すなわち敗北しやすいと予想されるため、対戦相手としては B6 バックグラウンドマウスよりもおだやかと報告のある C3H マウスを用いた。対照群として、ChR2 の代わりに YFP を発現するもの(Control1)及び ChR2 を発現しているが光刺激を行わないもの(Control2)を用意したが、これらのマウスは予測どおり対戦相手である穏やかな C3H マウスに勝利しやすい傾向が見られた。一方、ChR2 を光刺激したマウス(Test)では C3H マウスにも敗北しやすい傾向がみられた(図3 vMHb-IPN 回路の活性化はマウスを弱気にさせる)。

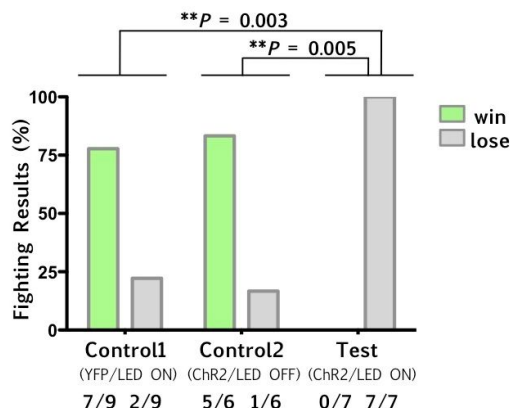


図3 vMHb-IPN回路の活性化はマウスを弱気にさせる

#### ニコチン投与による IPN ニューロン活性化マウスにおける社会的闘争行動

(1)- 及び(2)- の結果を踏まえて、vMHb-IPN 回路を切断のちに IPN ニューロンを活性化したマウスが、vMHb-IPN 回路活性化マウスと同じ表現系を示すかどうかを確認した。IPN の活性化の方法には薬理学的手法を選択し、cCKO マウスに対してニコチンの 1.5mg/kg 投与を行った(vMHb では影響がなく、IPN ニューロンを活性化することが報告されている)。また、対戦相手は(2)- 同様に、より穏やかな C3H バックグラウンドマウスを選んだ。

対照群である生理的食塩水を投与したマウス(cCKO+saline)は、対戦相手である穏やかな C3H マウスに勝利しやすい傾向が見られた。一方、ニコチンを投与した cCKO マウ



スは敗北しやすい傾向が見られた(図4 ニコチン投与による IPN の活性化は cCKO マウスを弱気にさせる)。

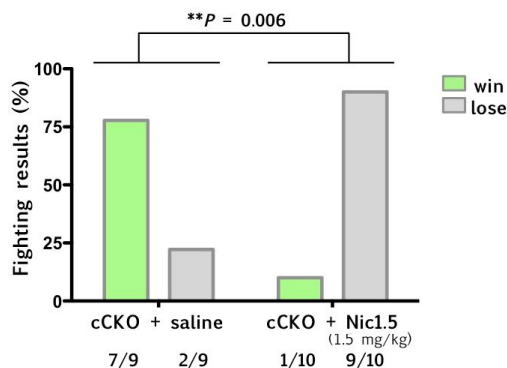


図4 ニコチン投与によるIPNの活性化はcCKOマウスを弱気にさせる

### (3) 中央縫線核ニューロンの化学遺伝学的抑制マウスにおける闘争行動

vMHb-IPN 回路の下流神経核の一つとして中央縫線核(median raphe; MnR)が同定され、また IPN からの投射ニューロンが抑制性ニューロンであることも報告されていた。(2)で述べたように IPN ニューロンを活性化するとそのマウスは敗北しやすくなることから、MnR ニューロンを抑制すると同様の表現系が見られるのではないかと考え、これを検証した。

MnR のセロトニンニューロンを抑制する目的で、縫線核特異的に Cre を発現する 5HTT-Cre(+)マウスを用意し、このマウスの MnR に Cre 依存的に抑制型デザイナー受容体である hM4Di 発現 AAV ベクターを感染させ発現誘導した。発現誘導ののち、神経活動を抑制するためにリガンドとなる CNO を投与し実験に用いた。対照群としては、hM4Di の代わりに mCherry を発現するマウス (Cont) を用意し同様に CNO を投与した。対戦相手は(2)同様に、B6 バックグラウンドマウスより穏やかな C3H バックグラウンドマウスを使用した。

対照群である Cont マウスでは、対戦相手での C3H マウスに勝利しやすい傾向が見られた。一方、MnR のセロトニンニューロンを抑制したマウスでは、C3H マウスにも敗北しやすい傾向が見られた(図5 MnR セロトニンニューロンの抑制はマウスを弱気にさせる)。

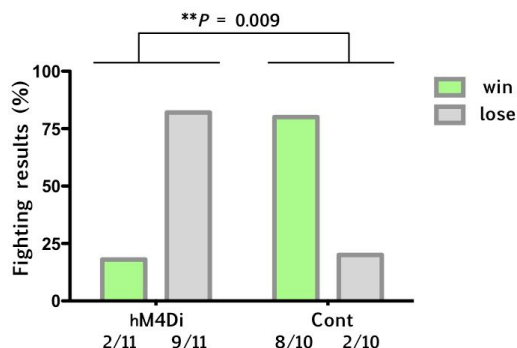


図5 MnRセロトニンニューロンの抑制はマウスを弱気にさせる

(4)以上(1)~(3)の結果より、vMHb-IPN-MnR 回路は、社会的闘争において闘争行動を終了させるように働いていることがわかった(図6 戦いを停止させる vMHb-IPN-MnR 回路)。

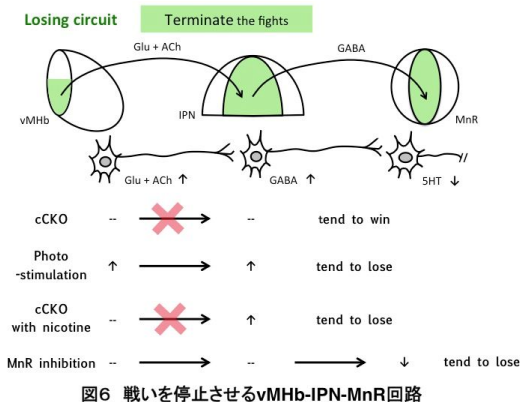


図6 戦いを停止させるvMHb-IPN-MnR回路

## 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)

〔学会発表〕(計3件)

Miho Matsumata, Kenzo Hirao, Takuma Kobayashi, Yuki Kobayashi, Authur J Huang, Thomas J McHugh, Shigeyoshi Itohara and Hitoshi Okamoto. "Nicotine reduces resilience in social conflict by activation of the interpeduncular nucleus." 第40回日本神経科学大会 ポスター発表 2017年7月21日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

松股美穂、小林琢磨、平尾頭三、Islam Tanvir、小林祐樹、Arthur Huang、Thomas J McHugh、糸原重美、岡本仁「社会的闘争の勝敗は手綱核によって決定される」第39回日本分子生物学会年会 シンポジウム「環境適応戦略の神経基盤」2016年12月1日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Miho Matsumata, Takuma Kobayashi, Kenzo Hirao, Authur J Huang, Thomas J McHugh and Hitoshi Okamoto. "The optogenetic activation of the ventral medial habenula to interpeduncular nucleus pathway makes mice timid in social conflicts." 第39回日本神経科学大会 一般口演 2016年7月20日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称: 撮像装置、及び、生体情報取得装置

発明者: 小林琢磨、松股美穂、岡本仁

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2017-49069

取得年月日：平成27年3月9日

国内外の別：国内

〔その他〕

Miho Matsumata, Kenzo Hirao, Takuma Kobayashi, Yuki Kobayashi, Authur J Huang, Thomas J McHugh, Shigeyoshi Itoharu and Hitoshi Okamoto. “Optogenetic stimulation in Habenulo-Interpeduncular pathway makes mice timid” 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム 2015年12月18日 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

松股 美穂 (MATSUMATA, Miho)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：50595460