

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01848

研究課題名(和文) 活動神経のプロファイリングを通じた扁桃体機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of Amygdaloid Nucleus by Profiling Activated Neurons

研究代表者

城山 優治 (Kiyama, Yuji)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：90456195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 扁桃体はストレスの影響を受けつつ情動的な行動を調節する。GRP (Gastrin-Releasing Pentide)は、ストレスにより活性化される神経伝達物質である。GRP遺伝子の欠損マウスは、急性ストレスを受けたときのみ過剰に情動表出する。この情動表出に関わる神経回路を同定するために、我々はArc-Venusレポーター遺伝子挿入マウスを用いて扁桃体内のマッピングを行った。その結果、神経活動の有意な差が、外側核に隣接する核の一つで見つかった。この結果は、その核内においてGRPにより活性化される神経細胞が、下流の神経回路を通じて過剰な情動表出を抑制することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日常生活において、適度な心理的ストレスは覚醒レベルを高め、問題や障害の克服に向けた原動力となる。しかし、ストレス耐性が低いと、同じストレスレベルであっても過度な情動反応を引き起こす。そして、それは適応障害等を見たとおり生活する上でむしろマイナスに作用することが多い。このような、ストレス下で恐怖・不安等の情動機能を制御して心を平穏に保つための脳神経回路に関しては不明な点が多い。本研究結果は、ストレス下でも過度な恐怖に苛まれず、適切な行動を選択するための神経回路の一端を明らかにした。今後、部位特異的な神経活動操作を行い、神経回路の詳細な機能解析を進めていく。

研究成果の概要(英文)： The amygdala is crucially involved in regulation of effects of stress on emotional behavior. GRP(Gastrin-Releasing Pentide) is known stress-activated transmitter. GRP knockout mice exhibited excessive emotional expression only when they were subject to acute stress. To identify the critical neural circuits associated with the emotion, we carried out Arc-reporter mapping by using an Arc-Venus reporter transgenic mouse line. A significant difference was found only in one sub-region of the amygdala, adjacent to the lateral nucleus. These results indicate that the GRP-activated neurons in the nucleus are likely to suppress excessive emotional expression through regulation of downstream circuits.

研究分野：神経科学

キーワード：扁桃体 情動 活動神経 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

神経系に発現する種々の遺伝子は、それら個々の分子・生理的な機能を通じて最終的に個体レベルにおける行動的な制御に関連すると予想される。従って、それら遺伝子機能を解明したい場合、動物を用いた行動的な解析が必須となる。しかし、行動解析で表現型が出てもその原因となる神経回路の特定は困難であり、必ずしも解析対象遺伝子の分子・生理的な機能解明に繋がるとは限らなかった。

扁桃体は、興奮性・抑制性神経が協調しつつ、情動関連の記憶を司る。その中の、Lateral Nucleus(LA)と Basolateral Nucleus(BL)を含む Basolateral Complex(BLA)は、各種の感覚刺激(CS)と嫌悪刺激(UCS)が合流する部位であり、ここで誘導されるシナプス可塑性が恐怖学習の中心的役割を担う。研究代表者は、数種の遺伝子改変マウスにおいて情動や恐怖学習に異常を示す表現型を報告している。それらの多くは、可塑性など扁桃体機能に原因があると推測される。しかし、行動実験データのみからでは想定可能な機能異常は多岐にわたり、分子・生理レベルにおける特定の仮説を立てるにあたって多くの困難を経験した。

Arc, c-fos 等の初期発現遺伝子(IEG)は、シナプスへの強い刺激に応答して速やかに発現が誘導され、シナプス可塑性・長期記憶の維持に必須である。特に Arc は転写の潜時が短く、行動刺激等に起因する神経活動のマーカーとして in-situ hybridization(ISH)や免疫組織化学(IHC)等による発現解析が行われてきた。そしてこの Arc 遺伝子プロモーター領域の下流に蛍光タンパク Venus を組み込んだ Transgenic マウス(Arc-Venus)を譲受し、領域における活動神経細胞(Venus 陽性細胞)を確認した。この Arc-Venus を用いた神経活動解析は、従来の組織学的方法と比較して以下の様な特性がある。

前処理や染色過程が必要ないため、迅速なサンプリング、安定した強度のシグナルが取得可能。

Venus に PEST 配列が付加され、ノイズが低く時間特異性が高いシグナルが得られる。

低倍率撮影でも個々の細胞を明確に特定可能(図2)。故に BLA 全体をカバーしつつ(図1)、コンピュータによる細胞のカウントや、計測(輝度・位置・大きさ等)も容易。

遺伝子発現産物自体がシグナルであるため、発現量(プロモーター活性)が直接的に蛍光輝度として反映される。

2. 研究の目的

我々は、情動や恐怖学習に異常を示す遺伝子改変マウスを用い、情動刺激に応答して活動する神経細胞のプロファイリングを通じ、BLA における活動神経の諸情報を包括的に解析する。プロファイリングの際は、活動神経における以下の情報を取得する。

位置情報・・・Cued Fear Conditioning は主に LA、Contextual Fear Conditioning 時は BL の可塑性に依存する等、扁桃体は亜核ごとに機能分化が存在する。我々は、その背景を念頭に置きつつ、BLA 内の座標情報を基にした位置情報の取得を行う。

活動マーカー(Venus)の発現量・・・Arc 発現は神経活動や可塑性誘導の指標とされているが、分子機能としての Arc は「逆シナプスタグ」として機能する事が知られている。図2で見られる通り、活動細胞における Venus 発現量(蛍光輝度)は強弱差が大きく、その差がシナプス可塑性における機能的な差を反映している可能性がある。

神経細胞種・・・Venus 陽性細胞の大きさ・形状は多様であり、複数種の神経細胞を含むと

予想される。恐怖学習では抑制性神経も積極的に関与する事が知られており、また脳領域によっては抑制性神経でも Arc が発現する事が知られている（扁桃体においては不明）。従って、Venus 陽性細胞の中には抑制性神経を含む数種類の神経細胞種が含まれる可能性がある。扁桃体内 Venus 陽性細胞の種別分類により、同エリアにおける可塑性の全容が明らかにできる。

この細胞のプロファイリングを通じた扁桃体活動解析により、扁桃体に関連すると予想されるのであれば、特定の仮説設定を必要とせず、細胞レベルでの中間表現型探索が可能となる。我々は、この解析系を、遺伝子改変マウスの機能解析に応用することを目指している。行動テストバッテリーを用いた遺伝子改変マウスの網羅的な表現型解析は研究代表者が進めている研究の一つであるが、情動行動で表現型が見出された場合、それに続く二次解析として進める。これを通じて、行動レベルで得られた表現型を端緒として、情動制御の分子・生理メカニズムに効率よく迫ることが可能となる。

3．研究の方法

撮影された BLA 画像を基に、ImageJ や Cell Profiler 等の細胞画像解析ソフトウェアを用い、Venus 陽性細胞の座標・輝度データを得る。得られたデータの表示にあたって、BLA における独自の標準化とバブルプロット化を行う。標準化より、形状が微妙に異なるスライス・個体の画像であっても共通の座標情報で分析することが可能となる。またバブルプロットは、現状でも Venus 陽性細胞の位置・輝度（発現量）を直感的に把握できる有用な手段となっており、Fear Conditioning による行動刺激で LA や BL 領域における Venus 陽性細胞数が増加するなど、従来の報告と矛盾ない特性をもつことが確かめられている。

4．研究成果

研究成果の一つとして、GRP(Gastrin-Releasing Peptide)遺伝子の欠損マウス解析があげられる。は、ストレスにより活性化される神経伝達物質である。GRP 遺伝子の欠損マウスは、急性ストレスを受けたときのみ過剰に情動表出する。この情動表出に関わる神経回路を同定するために、我々は Arc-Venus マウスを用いて扁桃体内のマッピングを行った。その結果、神経活動の有意な差が、外側核に隣接する核の一つで見つかった。この結果は、その核内において GRP により活性化される神経細胞が、下流の神経回路を通じて過剰な情動表出を抑制することを示唆する。

5．主な発表論文等

[雑誌論文] （計 3 件）

Wakabayashi C., Numakawa T., Odaka H., Ooshima Y., Kiyama Y., Manabe T., Kunugi H. & Iwakura Y. IL-1 receptor-antagonist (IL-1Ra) knockout mice show anxiety-like behavior by aging. *Neuroscience Letters*, 599: 20-25, (2015)

Nakazawa T., Hashimoto R., Sakoori K., Sugaya Y., Tanimura A., Hashimotodani Y., Ohi K., Yamamori H., Yasuda Y., Umeda-Yano S., Kiyama Y., Konno K., Inoue T., Yokoyama K., Inoue T., Numata S., Ohnuma T., Iwata N., Ozaki N., Hashimoto H., Watanabe M., Manabe T., Yamamoto T., Takeda M. & Kano M.: Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nature Communications, 7: 10594, (2016)

Kiyama Y., Kikkawa Y.S., Kinoshita M., Matsumoto Y., Kondo K., Fujimoto C., Iwasaki S., Yamasoba T., Manabe T.: The adhesion molecule cadherin 11 is essential for acquisition of normal hearing ability through middle ear development in the mouse. Laboratory Investigation, doi: 10.1038/s41374-018-0083-y. (2018)

[学会発表] (計 1 件)

後藤史子、城山優治、小川糸音、奥野浩行、吉田進昭、尾藤晴彦、真鍋俊也

GRP はストレス負荷時の恐怖学習を調節する、/GRP regulates fear learning under stress conditions、日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜、2016-07-21

[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

研究代表者は平成 31 年 3 月に鹿児島大学に異動した。そのため、ホームページは未整備であるため、まだ無い。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

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。