

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14345

研究課題名(和文) 分界条床核特定神経回路を介した不安生起機構

研究課題名(英文) Occurrence of anxiety through a specific neuronal group in the bed nucleus of stria terminalis

研究代表者

竹本 さやか(木村さやか)(Takemoto, Sayaka)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：70372365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：不安状態は環境によって大きく変化する。不安制御に関与すると注目される皮質下の神経核の一つが、扁桃体延長部(extended amygdala)の分界条床核(BNST)および扁桃体中心核(CeA)である。これらの領域の活動や、その変化を支える分子機構を解明することは、病的不安の病態理解において必須である。本研究では、独自に見出した分子マーカーを用いて、これらの領域の解剖学的検討を進めると共に、特定神経細胞活動を操作、計測する技術を開発し、不安行動との関係を検討した。

研究成果の概要(英文)：The occurrence of anxiety is modified by environment. One of the subcortical nucleus related to anxiety regulation is the bed nucleus of stria terminalis and the central nucleus of amygdala, which are included in the extended amygdala. In this study we focused on specific groups of neurons in these regions. We performed anatomical study to reveal connections between two regions. Furthermore, we established methods measuring and manipulating the neuronal groups in this area to understand the pathophysiology of anxiety disorders.

研究分野：分子神経科学

キーワード：分界条床核 カルシウム依存的リン酸化酵素 扁桃体中心核

1. 研究開始当初の背景

不安状態は外界の環境や内的な要因によって大きく変化する。不安制御に関与すると注目される皮質下の神経核の一つが、扁桃体延長部 (extended amygdala) の分界条床核 (BNST) である。本領域は皮質下情動ループの制御を介し、適応的、病的な不安状態の制御に深く関与するとされる。一方、extended amygdala は複雑な細胞種で構成され、その分子マーカーの知見が乏しく、亜核レベル、亜核内局所回路レベルの知見は限られ、個々の亜核の分子マーカーを見出し、分子マーカーを活用して、局所回路レベルにおける不安制御の動作原理を解明することが喫緊の課題である。本研究は、このような状況を打破するため、申請者が発見し機能解明を進める CaMKI γ 分子 (JBC 2003, Neuron 2007, 第13回日本神経化学会奨励賞) が、extended amygdala 特定抑制性神経細胞の分子マーカーであるという発見に基づき、不安生起の動作原理を亜核回路レベルで明らかにする研究である。

2. 研究の目的

CaMKI γ 分子が extended amygdala の亜核、特定抑制性神経細胞の分子マーカーであるという知見を活用して、不安生起の動作原理を亜核局所回路レベルで明らかにすることを目的とする。特に、extended amygdala に属する扁桃体中心核と分界条床核は、非常に類似した機能を有するとされる。両領域において共通の分子マーカーを活用し、多面的な解析を行いその差異について解明する。

3. 研究の方法

(1) CaMKI γ 陽性細胞の遺伝学的標識方法の確立

CaMKI γ 陽性細胞において cre リコンビナーゼを発現する、遺伝子改変動物 (Camk1g-cre 系統) の作出・評価を推進した。また、他の分子マーカーの探索、cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変動物の評価を推進する。これらの遺伝子改変動物と、アデノ随伴ウイルスを用いて cre 依存的に蛋白質を発現するカセットを導入し、extended amygdala の特定亜核において、様々な分子ツールを発現する方法を確立する。分子ツールとして、Ca²⁺センサー、回路標識のための蛍光蛋白質、回路活動操作を可能とする毒素などを発現させ、下記の研究項目にて用いる。

(2) Extended amygdala 神経活動イメージング手法の開発

実際の神経細胞活動を in vivo で可視化する方法の開発を行う。近年開発された革新的なエンドスコープ型小型合蛍光顕微鏡技術を用いて、脳深部の extended amygdala 特定神経細胞における Ca²⁺変動を、自由行動下に計測する。Extended amygdala の各亜核は非常に小さな領域であるが、分子マーカー

知見を用いて(1)の方法で標識することで、特定の細胞群のみの神経活動計測が可能である。

(3) Extended amygdala 神経回路ネットワークの解明

扁桃体中心核および分界条床核において特定の分子マーカーを発現する細胞群が、どの領域に投射するかを、蛍光蛋白質をもちいて軸索を可視化し検討する。この際、扁桃体中心核と分界条床核の投射先を同一個体で標識し、両領域からの投射パターンの差異を明らかとする。

(4) Extended amygdala を介した不安および恐怖記憶制御

分子マーカーによって標識される細胞群の活動をテタヌストキシンや Kir2.1 などを発現させ抑制した際の不安状態の変化を、Open field test や Elevated plus maze を用いて検討することで、分界条床核および扁桃体中心核特定細胞群を介した不安制御について明らかとする。また、恐怖条件付け記憶をテストすることで、本領域の特定細胞群を介した恐怖記憶の制御について明らかとする。

4. 研究成果

(1) CaMKI γ 陽性細胞の遺伝学的標識方法の確立

作製した Camk1g-cre 系統および、CaMKI γ 陽性細胞において発現する他のマーカー分子プロモーターを活用した cre ドライバー系統について評価を推進した。レポーター系統との交配、cre 依存的に蛍光蛋白質を発現するカセットをアデノ随伴ウイルスにより導入し検討を実施したところ、後者の cre ドライバー系統において、目的の細胞群の標識が可能であることが判明し、(2)以降の検討に用いた。

(2) CaMKI γ 陽性細胞神経活動イメージング手法の開発

脳深部の extended amygdala 特定神経細胞における Ca²⁺変動を、自由行動下に計測する方法の開発を推進した。Extended amygdala の各亜核は非常に小さな領域であるが、これらの領域において効率的にアデノ随伴ウイルスを用いて遺伝子導入を行う技術を確認し、分子マーカー知見を用いて(1)の方法で標識することで、特定の細胞群のみの神経活動計測が可能である。細胞群の選択的な標識は、cre リコンビナーゼ依存的に緑色の蛋白質カルシウムセンサー (GCaMP) を発現するアデノ随伴ウイルスを用いることで可能となる。GCaMP 蛋白質を用いて本領域において Ca²⁺変動を計測することが可能であることを確認した。

(3) Extended amygdala 間を結ぶ神経回

路ネットワークの解明

分界条床核と扁桃体中心核は、両方向性の神経回路結合が存在するといわれている。本研究において標識が可能となった細胞群における双方向性の結合について、組織学的な検討を行った。

その結果、扁桃体中心核から分界条床核への投射領域には、分界条床核内亜核からも投射があり、逆に分界条床核から扁桃体中心核への投射領域には扁桃体中心核亜核からも投射することが判明した。これらの結果は両領域の機能的な共通性の回路機構として、投射先の類似性が存在することを示唆する。

(4) Extended amygdala を介した不安および恐怖記憶制御

上記に記載の分子マーカーを用いて、分界条床核および扁桃体中心核の特定神経細胞を標識し、不安および生起との因果関係を、回路機能操作によって推進する。Open field test や Elevated plus maze を不安行動指標として用い、各神経細胞集団を、テタヌストキシンや Kir2.1 などを発現させ抑制した際の、不安状態の変化を検討した。

また、不安と同様に分界条床核および扁桃体中心核が関与するとされる、恐怖記憶について、恐怖条件付け記憶テストを実施して検討した。その結果、分界条床核、扁桃体中心核いずれにおいても、本研究によって同定された細胞群が重要な役割を果たすことが示唆された。

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)

[雑誌論文](計2件)

Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane S, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, Fujii H, Bito H.

Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. J Neurochem, 査読有, 2017, 印刷中 doi:10.1111/jnc.14020

Horigane S, Ageta-Ishihara N, Kamijo S, Fujii H, Okamura M, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H.

Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI pathway during neuronal polarization. Molecular Brain, 査読有, 2016, 9:8, doi: 10.1186/s13041-016-0189-3.

[学会発表](計8件)

Yagishita-Kyo N, Okuno H, Kamijo S, Kawashima T, Uemura Y, Takemoto-Kimura S, Bito H.

Mapping emerging neocortical active ensembles during retrieval of remote

memory via functional bioluminescence imaging of Arc promoter activity. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2016.11.15-11.16, San Diego, USA

Kamijo S, Suzuki K, Horigane S, Takemoto-Kimura S, Bito H.

Excitation-morphogenesis coupling during corticogenesis: a critical role for L-type voltage-gated calcium channel-driven spontaneous calcium elevations in neurite extension and radial migration.

The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2016.11.15-11.16, San Diego, USA

Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Endo T, Kim R, Koyama H, Horigane S, Fujii H, Bito H.

Calcium-dependent phosphorylation signaling in emotional and social limbic circuit.

Horigane S, Ageta-Ishihara N, Kamijo S, Fujii H, Okamura M, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H.

Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKIa pathway.

第39回日本神経科学大会, 2016.7.21, 横浜.(招待講演)

竹本さやか, 遠藤俊裕, 金亮, 鈴木敢三, 藤井哉, 尾藤晴彦.

扁桃体神経回路におけるカルシウム依存的リン酸化経路と情動行動.

第46回日本神経精神薬理学会, 2016.7.2, ソウル.(招待講演)

竹本(木村)さやか, 堀金慎一郎, 鈴木敢三, 児山博亮, 金亮, 上條諭志, 藤井哉, 尾藤晴彦.

神経細胞形態制御を担うカルシウム依存性リン酸化経路の神経機能解明.

第121回日本解剖学会総会, 2016.3.28-3.30, ビックサイト福島.(招待講演)

井上昌俊, 竹内敦也, 堀金慎一郎, 大倉正道, 安藤恵子, 藤井哉, 上條諭志, 竹本-木村 さやか, 狩野方伸, 中井淳一, 喜多村和郎, 尾藤晴彦.

高感度、超高速赤色カルシウムインディケータの合理的設計による開発.

第38回日本神経科学大会, 2015.7.28-7.31, 神戸国際会議場・神戸国際展示場.(招待講演)

竹本-木村 さやか, 鈴木敢三, 上條諭

志, 金 亮, 堀金慎一郎, 尾藤晴彦.
樹状突起形成および情動行動における
カルシウム依存的リン酸化経路の新規
機能解明.
第 38 回日本神経科学大会, 2015.07.28-
07.31, 神戸国際会議場・神戸国際展示
場。(招待講演)

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 さやか(木村 さやか)(Takemoto, Sayaka)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号: 70372365