

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14964

研究課題名(和文) 精神疾患に関わるストレス脆弱性を左右する神経回路基盤の解明

研究課題名(英文) Whole brain activity mapping and analysis of neuronal innervation in a stress model

研究代表者

笠井 淳司 (Kasai, Atsushi)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：40454649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：(2)精神的ストレスは、脳の器質的および機能的変化を引き起こすことが知られているが、その詳細な変化は不明であった。本研究では、全脳細胞をサブミクロンの高精細でイメージングする装置を開発し、ストレスによる脳内変化を、先入観なしに探索した。その結果、これまでストレスとの関連が未報告であった微小脳領域がストレス性情動行動に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the pathogenic mechanisms of stress-related mental disorders, it is needed to systemically identify brain functional alterations in stress exposure. We recently developed an automated imaging system with high speed at subcellular resolution, named FAST. Here, to reveal spatial patterns of stress-related neuronal activation, we performed whole-brain imaging of stressed Arc-dVenus reporter mice which expressed destabilized Venus in activated neurons, and compared the number and distribution of dVenus-positive cells among control and stressors by FAST system. Mental stress increased the number of dVenus positive-cells in several brain regions. Moreover, we found stress-related neuronal circuitries including these nuclei by anatomical investigation of projections using anterograde and retrograde tracing. These results lead to a better understanding of anatomic-functional neuronal networks related with stress-induced psychiatric disorders.

研究分野：(3) 神経薬理学

キーワード：全脳活動マッピング ストレス 脳計測科学 イメージング

1. 研究開始当初の背景

うつ病などの精神疾患には、複雑な発症機構が存在すると考えられるが、その病態機序は、未解明であり、治療抵抗性症例も多く、アンメットメディカルニーズが最も大きい疾患領域の一つである。その最大の理由に、疾患の生物学的理解が不十分であることが考えられる。

近年の MRI などの脳機能画像解析装置の発達により、機能性精神病と位置付けられてきたうつ病も、神経解剖学的(器質的)異常が見出され、器質性疾患であることが明らかになってきた。高度に機能が局在した脳疾患の理解には、全脳細胞の形態や機能を捉え、症状と相関する変化を定量的に検出し、それを手がかりに病態を究明する必要がある。しかしながら、MRI の画像解像度では、粗大な変化は捉えられるものの、詳細な変化は検出できない。

申請者らは、全脳細胞をサブミクロンの高精細でイメージングする装置を開発し、正常脳と疾患脳を仮説なしに比較する画像解析システムを構築し、FAST(block-FAce Serial microscopy Tomography)と命名した。FASTでは、すべての脳細胞の分布(数、密度や形態)や Arc-dVenus マウスなどの神経活動レポーターマウスを利用することにより活性化したすべての神経細胞 (dVenus 陽性細胞)を定量的に検出できる。

2. 研究の目的

ストレス負荷時の脳内における器質的変化(形態、細胞分布、密度)と機能的変化(活動神経の分布、配向性)を全脳から仮説フリーで定量的に検出することにより、これまでに明らかにされていない脳内変化およびその神経回路構造を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

7~13 週齢の C57BL/6J を遺伝的背景とする、Arc-dVenus 雄性マウスを使用した。飼育条件は室温 22 ± 1 、照明 12 時間(点灯午前 8 時から 20 時)とし、餌と水を自由に摂取させた。なお、動物の飼育、実験等はすべて大阪大学動物実験規定を遵守し、大阪大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(2) ストレス

被験マウスを、通気のための孔を十分にあげた 50 mL 遠心管に入れて、拘束ストレスを 6 時間負荷した。

(3) 全脳マッピング

三種混合麻酔薬(0.3 mg/kg メトミジン (Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima,

Japan)、4 mg/kg ミダゾラム (Sandoz Pharma, Basel, Switzerland)、5 mg/kg プトルファノール(Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan))の腹腔内投与により深麻酔を行い、4% paraformaldehyde を還流した後、さらに脳を 4% paraformaldehyde 溶液中で後固定した。その後、当研究室で開発した高精細な全脳イメージングシステム FAST [業績 1]を用いて全脳領域のトレーシング画像を撮影した。

(4) トレーシング実験

AAV(DJ)-hSyn-hrGFP-WPRE (2×10^{12} copies/mL)または、神経細胞終末の外膜タンパクに結合し、エンドサイトーシスによって細胞質内に取り込まれ、細胞体に速やかに逆行輸送される、Red retrobeads IX (Lumaf luor, FL, USA)を、上述の方法で右半球に 50 nL 注入し、3 週間の回復期間後、当研究室で開発した高精細な全脳イメージングシステム FAST [業績 1]を用いて全脳領域のトレーシング画像を撮影した。

4. 研究成果

(1) ストレス後の全脳活動マッピング

Arc-dVenus マウスにストレスを負荷後、全脳イメージングを行った。その結果、ストレスを負荷していないコントロール脳と比較して、脳内の dVenus 陽性細胞が多く、神経細胞が活性化していることが明らかになった。

脳を 23 の脳領域に分割し、神経核ごとの dVenus 陽性細胞数を計数した結果、恐怖や不安と関連することが明らかにされている扁桃体基底外側核や、外側中隔、内側前頭前皮質などの神経核において、有意に増加することを明らかにした。また、ストレスや不安などとの関連が未報告である微小脳領域も有意に活性化することが明らかになった(図 1)。

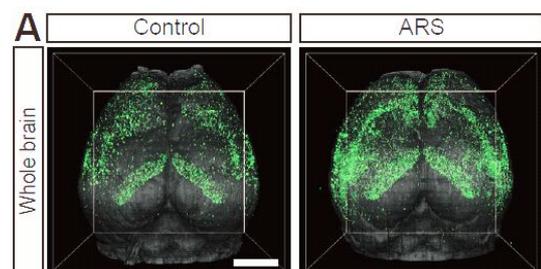


図 1. 拘束ストレス時の全脳活動マッピング。ストレスを負荷しないコントロール脳(左)とストレス負荷脳(右)の代表的な 3 次元画像。緑色のシグナルは、dVenus 陽性細胞を示す。Scale bar, 2 mm.

(2) 微小脳領域の神経回路構造の可視化

ストレスにより活性化される脳領域の神経投射を明らかにするため、順行性神経細

胞標識として AAV(DJ)-hSyn-hrGFP-WPR を、逆行性神経細胞標識として red retrobeads を投与し、3 週間後の全脳イメージングを実施した。その結果、この微小領域は、扁桃体基底外側核、内側前頭前皮質、縫線核、視床下部など恐怖や情動行動、ストレス応答に関わる神経核へ神経投射をしていた (図 2)。さらに、扁桃体基底外側核、内側前頭前皮質、縫線核、腹側海馬 CA1 から神経投射を受けることを明らかにした。

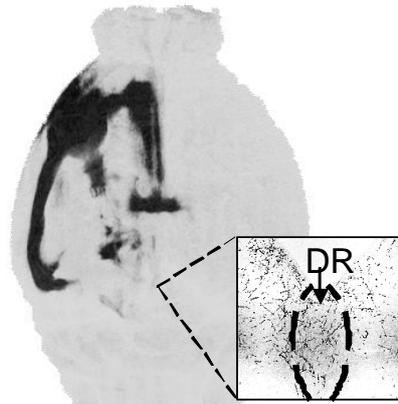


図 2. 神経投射パターンの可視化。微小領域に注入後、FAST を用いて全脳イメージングを実施した。マウス脳を背側側から投影した代表的な画像を示す。黒は、hrGFP シグナル。DR、背側縫線核。

これらの結果は、ストレスによる脳内の機能的な変化を特定の脳領域に絞らずに解析できることが示された。今後、今回見出した微小領域の機能解析を実施し、ストレス応答やストレス性精神疾患の発症機構の解明に繋げたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Kaoru Seiriki, **Atsushi Kasai**, Takeshi Hashimoto, Wiebke Schulze, Misaki Niu, Shun Yamaguchi, Takanobu Nakazawa, Ken-ichi Inoue, Shiori Uezono, Masahiko Takada, Yuichiro Naka, Hisato Igarashi, Masato Tanuma, James A. Waschek, Yukio Ago, Kenji F. Tanaka, Atsuko Hayata-Takano, Kazuki Nagayasu, Norihito Shintani, Ryota Hashimoto, Yasuto Kunii, Mizuki Hino, Junya Matsumoto, Hirooki Yabe, Takeharu Nagai, Katsumasa Fujita, Toshio Matsuda, Kazuhiro Takuma, Akemichi Baba, Hitoshi Hashimoto. "High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates" *Neuron* in press (2017)
2. **Atsushi Kasai**, Sora Kakiyama, Hiroki Miura, Ryo Okada, Keisuke Hazama,

Takanobu Nakazawa, Atsuko Hayata-Takano, Misaki Niu, Norihito Shintani, Hitoshi Hashimoto. "Double in situ hybridization for detecting microRNAs and mRNAs in brain tissues" *Front Mol Neurosci* 9:129 (2016)

3. Kaoru Seiriki, **Atsushi Kasai**, Takahiro Kuwaki, Takanobu Nakazawa, Shun Yamaguchi, Hitoshi Hashimoto. "Critical involvement of the orbitofrontal cortex in hyperlocomotion induced by NMDA receptor blockade in mice" *Biochem Biophys Res Commun* 480:558-563 (2016)

[学会発表](計 11 件)

1. **Atsushi Kasai**, 他 8 名、Practical optimization of in situ hybridization procedure for the detection of microRNAs and mRNA expression in brain tissues. Neuroscience 2015, 2015 年 10 月 17 日、米国シカゴ マコーミック プレイス
2. Kaoru Seiriki, **Atsushi Kasai**, 他 5 名、A new block-face serial microscopy tomography for computational mapping of brain cells, and an unbiased comparative analysis. Neuroscience 2015, 2015 年 10 月 21 日、米国シカゴ マコーミック プレイス
3. 勢力薫, **笠井淳司**, 他 5 名、構造および神経活動の変化を定量的に検出する高精細三次元全脳形態計測システム. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 29 日、神戸国際会議場
4. 丹生光咲, **笠井淳司**, 他 5 名、ストレスにより活性化する神経細胞の全脳マッピングと定量的解析、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015、2015 年 8 月 29 日、東京大学
5. 丹生光咲, **笠井淳司**, 他 5 名、拘束ストレスにより後の活性化する神経活動の全脳活動マッピングと活性化脳領域の神経投射の解析回路構造の同定、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜
6. **笠井淳司**, 橋本均、高速・高解像度の全脳細胞イメージング技術の開発：脳構造・機能変化の探索へ、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 10 日、パシフィコ横浜
7. **笠井淳司**, 他 5 名、高速・高精細全脳イメージング法 FAST によるストレス負荷マウスの脳活動変化の検出、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜
8. 五十嵐久人, **笠井淳司**, 他 7 名、社会的敗北ストレスによる社会的忌避行動時の全脳神経活動マッピング、第 130 回日本薬理学会近畿部会、2016 年 11 月 19 日、

京都大学

9. 勢力薫、**笠井淳司**、他 8 名、全脳活動マッピングを用いた NMDA 受容体拮抗薬誘発行動異常に関わる脳部位の解析、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブルックリンホール
10. **笠井淳司**、橋本均、ストレス性精神疾患の病態解明に向けた全脳細胞解析～FAST システムの開発と応用～、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台国際センター
11. 丹生光咲、**笠井淳司**、他 6 名、精神的ストレスにより活性化する神経核の情動行動における役割、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台国際センター

〔その他〕

ホームページ等

<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 淳司 (KASAI, Atsushi)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：40454649

(2) 連携研究者

橋本 均 (HASHIMOTO, Hitoshi)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30240849

(3) 連携研究者

山中 章弘 (YAMANAKA, Akihiro)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：60323292

(3) 連携研究者

山口 瞬 (YAMAGUCHI, Shun)

岐阜大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70304087

(4) 連携研究者

橋本 岳 (HASHIMOTO, Takeshi)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：60228418