

令和元年6月12日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05928

研究課題名(和文) 青斑核ノルアドレナリン神経の多様性を生み出す機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the heterogeneous organization of locus coeruleus noradrenaline neurons

研究代表者

植松 朗 (Uematsu, Akira)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：90716242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：青斑核ノルアドレナリン神経は投射部位特異的に分けられる神経群が存在し、それぞれ恐怖学習や消去において異なる機能があることを明らかとした。これら神経群に対して前頭前野や扁桃体中心核などからの入力があることを確認した。入力する神経回路のうち、異なる神経回路から青斑核への入力が消去の過程で関与していることを明らかとした。最後に、遺伝子発現を検討するためリボソームRNAを標識する手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

均一と考えられていた青斑核ノルアドレナリン神経において多様な機能があることを世界に先駆けて発見した。ノルアドレナリン神経が投射する部位により異なる役割があること、さらに入力を受ける脳部位によって異なる作用をしている可能性があることを明らかとした。これまでノルアドレナリンに作用する薬は脳に一樣に作用するものであるため、特定の領域を標的にできればより効果の高い治療法に結び付けられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I found a modular locus coeruleus (LC) organization in rats, endowed with distinct neural projection patterns and coding properties for flexible specification of opposing behavioral learning states. LC projection mapping revealed functionally distinct cell modules with specific efferent connectivity. With optogenetic manipulation, I found that an amygdala-projecting ensemble promoted aversive learning, while an independent medial prefrontal cortex-projecting ensemble extinguished aversive responses to enable flexible behavior. In line with this, activity of prefrontal projecting neuron increases during extinction. As for input, trans-synaptic retrograde tracing study shows these distinct LC populations receive inputs from various areas. Specifically, optogenetic inhibition showed distinct inputs to LC differentially modulate fear extinction. Finally, I developed the method to collect RNAs of LC subpopulations in order to identify distinct molecular markers.

研究分野：神経科学

キーワード：恐怖 ノルアドレナリン 消去 投射部位特異的 光遺伝学 電気生理

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

心の病は現在の日本において大きな問題となっており、簡易診断法や有効な治療法の開発が必要とされている。このうち、心的外傷後ストレス障害（PTSD）は東日本大震災といった自然災害や事故・犯罪・いじめといった恐怖体験により引き起こされる代表的な病気である。PTSD患者の脳内ではノルアドレナリン（NA）レベルが上昇しているとの報告があり、アドレナリン受容体の阻害剤が治療に使用されている。しかし、これらの過程における神経回路機構や分子・細胞レベルでの作用機序は十分に得られていない。そこで、動物モデルを用いて恐怖反応の獲得や消去学習の過程におけるNA神経の役割を解明することで新規治療方法の開発や既存療法の改良に寄与することができると考えられる。

恐怖情動に関連した記憶は、恐怖条件づけという代表的な実験手法を用いて研究され、情動と記憶を結びつけるモデルとなっている。恐怖条件づけでは、まず実験動物に音の手がかりを条件刺激（conditioned stimulus; CS）として、それに続いて嫌悪刺激である足への電気ショックを無条件刺激（unconditioned stimulus; US）として与え、これを数回組み合わせる。その後は条件刺激を提示するだけで、動物は電気ショックが来ることを恐れてすくみ上げる反応を示す。しかし、恐怖記憶を学習したのちにCSのみを繰り返し提示すると動物は徐々に恐怖反応を減らす、恐怖記憶消去という新たな学習をすることが知られており、この手法はPTSD患者治療にも応用されている。

扁桃体におけるNAシグナルが恐怖記憶形成に、一方で前頭前野のNAシグナルが恐怖記憶消去に必要であることがアドレナリン受容体阻害薬を用いた研究で報告されている（Johansen et al. 2015; Mueller et al. 2008）。脳におけるNA神経は主に青斑核に存在するため、代表者が光遺伝学にて青斑核NA神経の恐怖や消去における役割について検討したところ、恐怖・消去どちらにも関与することが明らかとなっていた。また、これまで青斑核NA神経はすべて一様で同じ機能を持ち、様々な脳部位に投射すると言われていたが、代表者は青斑核NA神経は扁桃体と前頭前野に投射する群が異なること、それぞれ恐怖と消去学習で異なる役割を持つことを発見していた。しかしながら、青斑核の多様性はどのように成り立っているのかその詳細な機構は明らかでなかった。

2. 研究の目的

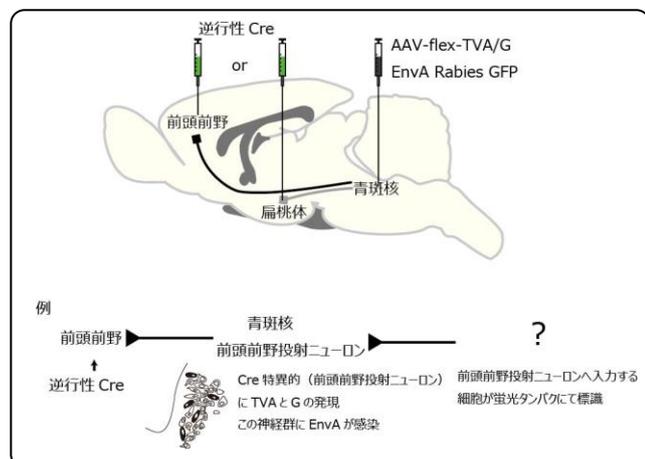
青斑核NA神経の多様性について、より詳細に解明するため1)異なるNA神経群へ入力する神経核の探索とその機能解明、2)恐怖・消去学習中における細胞群間での神経応答の比較検討、3)網羅的遺伝子解析によるNA神経細胞群間での特異的なターゲット分子の発見方法開発、の3点について本研究では実施した。

3. 研究の方法

(1)異なるNA神経群へ入力する神経核の探索とその機能解明

任意の細胞へ入力する細胞を標識できるRabiesウイルスのうちCVS株という長期にわたって神経細胞に発現可能な株を作製した。このRabiesは、鳥由来のTVAというレセプターを発現している細胞のみに感染するもので、さらにその細胞にRabiesを複製するためのGプロテインが発現する場合のみ1シナプス間を移動できるように設計されている。そのため目的細胞にTVAとGプロテインを特異的に発現させることで、特定の神経細胞への入力を明らかにすることができる。TVAとGプロテインの発現をAAV投与によってCre特異的に行う（Cre-loxPを応用したflexカセットを用いる）ことと、逆行性に運ばれるCreリコンビネースを用いることで、前頭前野もしくは扁桃体に投射しているNA神経細胞群へ入力している脳部位を探索した（右図）。

次に、青斑核へ入力する神経回路の機能を解明するため、青斑核へ投射する二か所の脳部位に対して蛍光タンパクのついた光感受性抑制性ポンプであるArchを発現させた。恐怖記憶消去中に軸索にレーザーを照射することでそれぞれの入力の役割について検討を行った。



(2) 恐怖・消去学習中における細胞群間での神経応答の比較検討

扁桃体基底外側核と内側前頭前野に異なる色素の逆行性蛍光標識（神経軸索より取り込まれて細胞体に運ばれる）を投与することで青斑核 NA 神経群を標識した。この動物において、1. 恐怖条件づけを行った群、2. 恐怖条件づけを行った後、恐怖条件づけ翌日に恐怖が高い状態、もしくは3. 消去学習を行った状態で灌流固定を行った。青斑核をスライスした後に神経活動マーカーである c-Fos にて抗体染色し、扁桃体投射群と前頭前野投射群における c-Fos 発現を定量した。

ラットの青斑核に電極を留置することで、NA 神経の活動を電気生理学的に測定した。青斑核に 9 本のテトロード（4 本の電極を束にしたもの）と光ファイバーを留置した。NA 神経を同定するため、Arch を NA 神経特異的に発現させ光刺激により活動が抑制するものを NA 神経として同定した。同様に、投射神経を同定するため前頭前野に投射する NA 神経群のみに Arch を発現させてその同定を試みた。これらの方法で神経を同定したのち、恐怖学習をした動物に CS を提示したときの青斑核の応答を観察した。

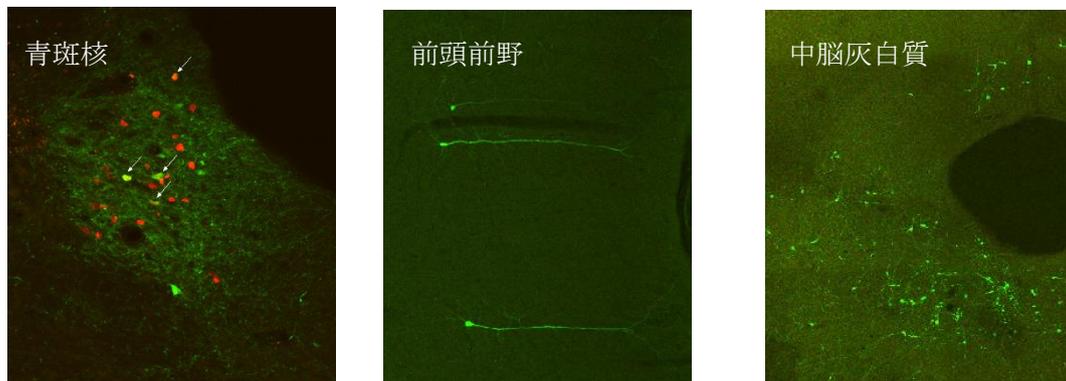
(3) 網羅的遺伝子解析による NA 神経細胞群間での特異的なターゲット分子の発見方法開発

扁桃体投射群と前頭前野投射群に異なる蛍光タンパク質を発現させ、フローサイトメトリーによる選り分けを試みたが、分離後の細胞の状態が悪く RNA の質が低くなってしまった。そのため、リボソーム RNA を回収する系を試みた。これには 110a とよばれるタンパク質に GFP といった蛍光タンパク質がついたものを発現させる方法である。この 110a に GFP もしくは RFP がつくタンパク質を発現させる AAV 配列を作成し、逆行性の AAV を作製した。この AAV によって神経群が標識可能であるか検討を行った。

4. 研究成果

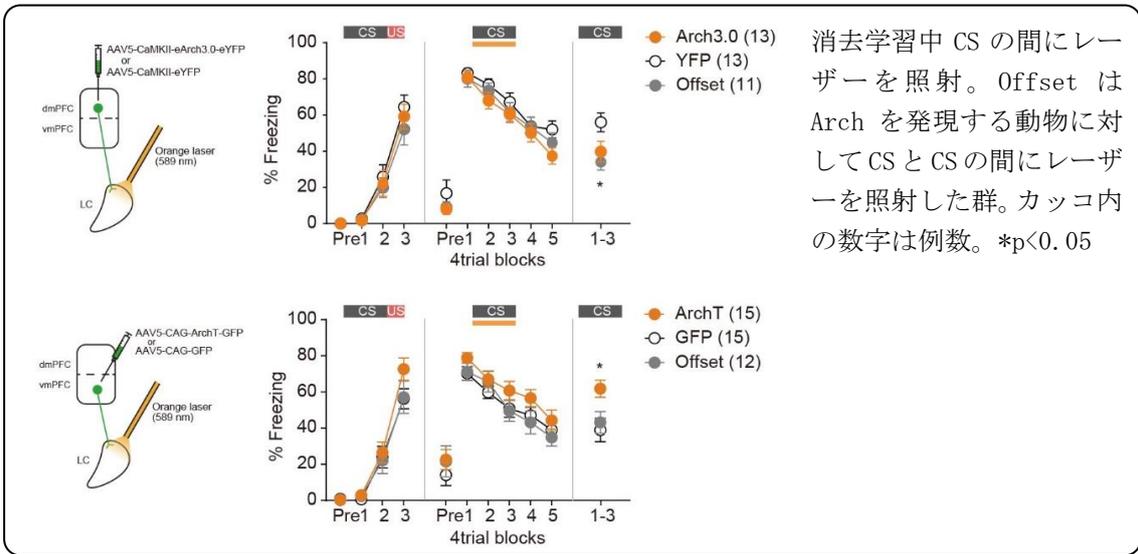
(1) 異なる NA 神経群へ入力する神経核の探索とその機能解明

CVS 株による標識を行ったところ、青斑核 NA 神経において TVA・G を発現する細胞（スターターセル）に Rabies を発現することを確認した。また青斑核へ入力する脳部位へについて観察したところ、中脳灰白質、扁桃体中心核、分界常床核、前頭前野といった部分において標識されることが明らかとなった。前頭前野についてはこれまでの SAD19 株ではほとんど標識が見られておらず株ごとによる領域特異性があることが示唆された。

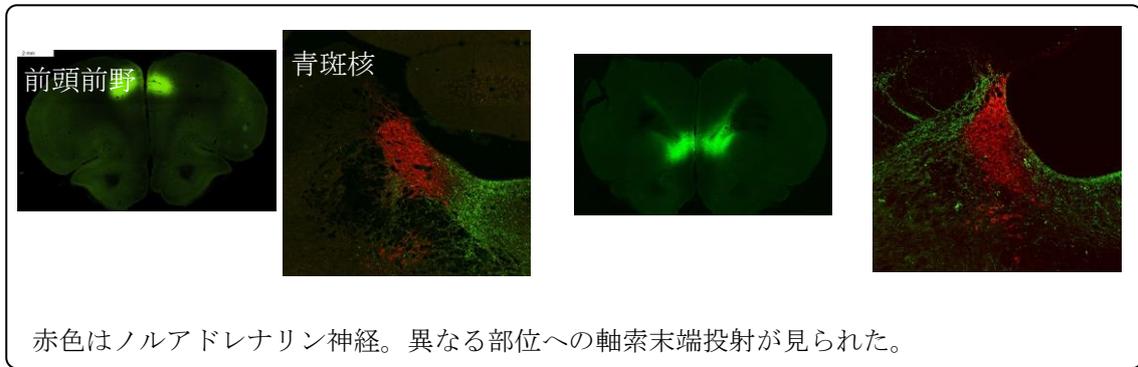


TVA を発現する細胞は赤、Rabies で標識された細胞は緑。白い矢印が赤・緑どちらも発現するためスターター細胞と定義。

これらの入力部位のうち、前頭前野の背側と腹側により恐怖行動と消去にそれぞれ異なる役割を担っていることが明らかとなっている。しかしながら、これらの青斑核への投射がどのような機能があるかについては未解明であった。そのため、光遺伝学を用いて背側前頭前野もしくは腹側前頭前野の青斑核への入力が消去学習に与える影響について検討した。この結果、背側前頭前野の入力を抑制すると消去の長期記憶を促進すること、一方で、腹側前頭前野の入力を抑制すると消去の登記記憶を阻害することが明らかとなった。

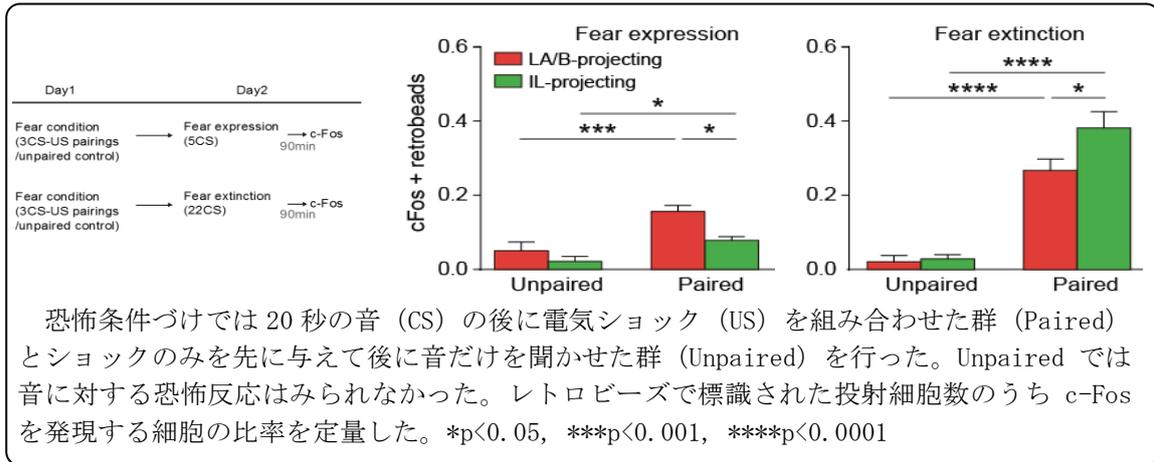


また、これらの投射は青斑核とその周辺においてそれぞれ異なる領域にあることが明らかとなり、NA 神経の異なる細胞群もしくは特異的な樹状突起に入力している可能性が示唆された。

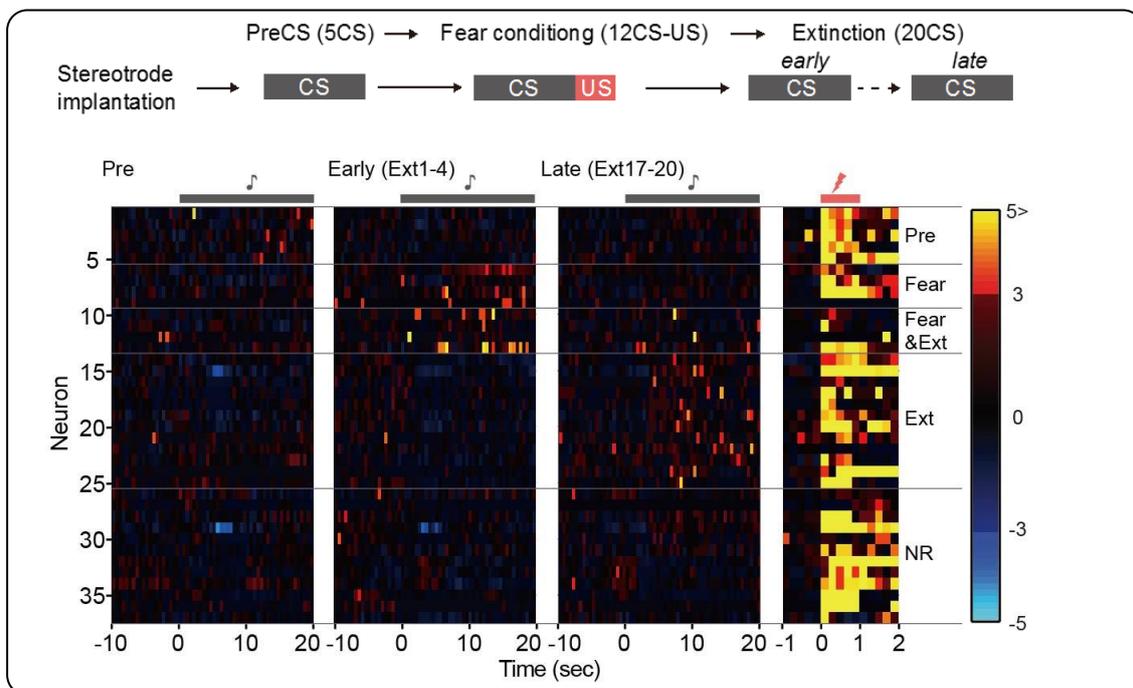


(2) 恐怖・消去学習中における細胞群間での神経応答の比較検討

恐怖条件づけ後では扁桃体投射群・前頭前野投射群どちらの群も同等の c-Fos 陽性細胞が発現していた。恐怖想起させた動物においては扁桃体投射神経群内で c-Fos 陽性細胞が内側前頭前野投射群に比べて有意に多くなった。一方で、消去をさせた動物においては内側前頭前野投射群での c-Fos 陽性細胞が有意に多くなることが明らかとなった。



In-vivo 電気生理により青斑核 NA 神経の活動を観察したところ、恐怖反応が高いとき (Fear 細胞) と消去が進んだとき (Ext 細胞) で異なる神経群が CS に対して応答を示すことが明らかとなった。また、投射神経群特異的な記録では前頭前野神経群において消去が進んだときに応答を示す細胞があることが明らかとなった。



(3) 網羅的遺伝子解析による NA 神経細胞群間での特異的なターゲット分子の発見方法開発
 逆行性の AAV により異なる NA 神経群で 110a タグのついた GFP と RFP を発現させることに成功した。今後、免疫沈降を行うことで、これら細胞群を特異的にとり RNA を抽出、次世代シーケンシングを行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(† equally contributed, * corresponding author)

① Luo R†, Uematsu A†, Weitemier A, Aquili L, Koivumaa J, McHugh TJ, Johansen JP*.

A dopaminergic switch for fear to safety transitions. *Nature Communications* 9, Article number: 2483 (2018) 査読有

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04784-7>

② Uematsu A†*, Tan BZ†, Ycu EA, Sulkes J, Koivumaa J, Junyent F, Kremer EJ, Witten IB, Deisseroth K, Johansen JP*.

Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nature Neuroscience* 20 pp.1602-11 (2017) 査読有

DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.4642>

③ 植松 朗, Tan BaoZhen, Johansen Joshua. 恐怖記憶の形成および消去には異なるタイプの青斑核のノルアドレナリンニューロンが関与する。 *ライフサイエンス新着論文レビュー* article number: 17284 (2017) 査読なし DOI: [10.7875/first.author.2017.114](https://doi.org/10.7875/first.author.2017.114)

[学会発表] (計 10 件)

① 植松 朗、「神経科学が解き明かす動物の行動：機能の変容と疾患」 富山大学生命融合科学 教育部シンポジウム 2019 年 シンポジウム発表

② Akira Uematsu, Distinct noradrenaline neurons coordinate opposing learning states. 日本神経科学学会 2018 年 シンポジウム発表

③ 植松 朗、恐怖記憶とその抑制を制御するモノアミン神経系の役割、日本獣医学会獣医学奨励賞講演 2018 年

④ 植松 朗、「精神疾患研究と創薬」 名古屋大学環境医学研究所シンポジウム 2017 年 シンポジウム発表

⑤ 植松 朗、学習における青斑核ノルアドレナリン神経の多様性、日本獣医学会 2017 年 口頭発表

⑥ Akira Uematsu, Modular organization of the brainstem noradrenaline system

- coordinates opposing learning states. 日本神経科学学会 2017年 ポスター発表
- ⑦ Mayumi Watanabe, Akira Uematsu, Prefrontal cortex regulation of the locus coeruleus noradrenergic system for fear extinction learning. 日本神経科学学会 2017年 ポスター発表
- ⑧ Akira Uematsu, Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. Gordon Research Conference 2017年 ポスター発表
- ⑨ Akira Uematsu, Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. 日本神経科学学会 2016年 ポスター発表
- ⑩ Akira Uematsu, Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. FENS Forum of Neuroscience 2017年 ポスター発表

[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：
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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170919_1/

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180627_2/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 真弓

ローマ字氏名：Watanabe Mayumi