

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月28日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07024

研究課題名(和文) 摂食に伴う不快情動の発動を担う神経基盤とその冗長性の解明

研究課題名(英文) Neural basis of negative affect in feeding and its redundancy

研究代表者

田中 大介 (Tanaka, Daisuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90456921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：扁桃体中心核および前交連後脚介在核において、神経活動のマーカであるcFos陽性細胞の数と不快反応の程度の間には正の相関が見られたことより、これら脳領域は不快反応と相関のある神経活動を示すと考えられた。また、神経活動依存的に遺伝子組換えを誘導できる遺伝子改変マウスを応用することで、それら脳領域の不快反応と相関のある活動を示す神経細胞で優先的に遺伝子組換えを誘導できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不快情動は我々の感情を構成する主要な要素であり、また、様々な神経疾患において異常を呈していることが知られているが、その神経基盤は未だ明らかになっていない。本研究では、不快情動と相関のある活動を示す神経細胞を同定し、さらにそれら神経細胞で優先的に遺伝子組換えを誘導することができた。今後その遺伝子組換え作用を利用することで、それら神経細胞の活動の不快情動に対する因果関係を調べることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that the numbers of cFos-positive cells in the central nucleus of the amygdala and the interstitial nucleus of posterior limb of the anterior commissure were significantly correlated with the number of behavioral aversive reactions. These findings suggest that the neural activities in these brain regions are correlated with the intensity of aversion. In addition, we could preferentially induce recombination in these cFos-positive cells by using targeted recombination in active population method.

研究分野：情動神経科学

キーワード：不快情動 嫌悪 味覚反応 cFos

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

快情動を生み出す神経機構は明らかになっておらず、これまで関与が示唆されていたが近年それが否定されている中脳ドーパミンシグナルとは別のシグナル伝達経路を検討する必要があった。また、不快情動の発動に関わる神経基盤も未だ明らかになっていなかった。

摂食により引き起こされる快・不快情動を、味覚反応テストを readout として定量的に測定することで、その神経基盤の解明にアプローチできると考えた。

この味覚反応テストを readout として用いることで、主に薬理的なアプローチにより、これまでに摂食に伴う快反応と深い関係にあると考えられる脳領域として、腹側淡蒼球(VP)が同定されていた。しかし、我々が以前に行った実験においては、快反応を示した個体に比べて、不快反応を示した個体の腹側淡蒼球において有意に多くの、神経活動の分子マーカーである cFos を発現している細胞(cFos 細胞)が観察された。このことは、これまで快反応を生み出していると考えられてきた腹側淡蒼球が、実は不快反応をもコードしており、今後、腹側淡蒼球内の神経細胞の快・不快反応の発動における役割を解明するためには、快・不快反応それぞれが生じているときに活動している神経細胞をそれぞれ特異的に操作し、その影響を調べる実験系が必要であると思われた。さらに、腹側淡蒼球のみならず、それに隣接する扁桃体レンズ核下部(SLEA)や前交連後脚介在核(IPAC)においても同様に、不快反応を示した個体において有意に多くの cFos 細胞が観察された。従ってこれら cFos 細胞も不快反応の産生に関わっている可能性があるが、これまでのところその機能は明らかになっていなかった。

また、快・不快体験はうつ病や麻薬中毒など種々の精神疾患において異常を呈していることが知られており、それら疾患では快・不快体験の発動を担う神経基盤に一定の破綻が生じていると考えられているが、その破綻を回復もしくは代替する方法が見つければ新たな治療法の開発につながる可能性があった。しかしこれまでのところ、一旦破綻した快・不快体験の神経基盤にどの程度回復する可能性があるのかは明らかになっていなかった。そこで本研究では不快反応の神経基盤を一旦破綻させた上で、不快反応の回復およびそれに伴う cFos 発現の変化を特定の脳領域において調べることで、不快反応の神経基盤の内在的な冗長性および代替可能性を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究により、味覚反応テストで不快反応を示した個体では、腹側淡蒼球、扁桃体レンズ核下部および前交連後脚介在核における cFos 細胞の数が有意に増加している事が明らかになっている。本研究では、不快反応に伴って cFos 陽性となった腹側淡蒼球、扁桃体レンズ核下部および前交連後脚介在核の細胞の神経活動が、不快反応の発動に必要な十分なのかどうかを明らかにすることを目指した。

さらに、快・不快反応の神経基盤の冗長性や代替可能性の理解に向けて、不快反応の発動に必要な細胞群を細胞死により一旦消失させた後に、不快反応が経時的に回復してくるかどうか、また、それに相関して、消失させた細胞と関連の深い細胞において cFos 発現に変化が現れるかどうかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、摂食に伴う快・不快体験の強度を見積もるために重要であるが、これまで主にラットで用いられていた味覚反応テストの実験系をマウスにおいて確立していた。過去のラットでの知見と同様、口腔内への水の注入の場合と比較して、甘味を生じさせるサッカリン

水溶液の注入により舌の突出等の快反応が、その逆に苦味を生じさせるキニーネ水溶液により口を大きく開ける等の不快反応が有意に増加することが確かめられた。さらに味覚反応テストの後に脳を固定し、fluorescent *in situ* hybridization 法により神経活動の分子マーカーのひとつである *cFos* mRNA の発現を、快反応に重要な役割を担っていると考えられてきた腹側淡蒼球、およびその周辺領域で調べた。その結果、快反応を示した個体や何の反応も示さなかった個体に比べ、不快反応を示した個体の腹側淡蒼球(VP)、扁桃体レンズ核下部(SLEA)および前交連後脚介在核(IPAC)において、有意に多くの *cFos* 細胞が観察された。従ってこれら *cFos* 細胞は不快反応の発動に関わっている可能性があるが、これまでのところその機能は明らかになっていなかった。

我々がこれまでに同定した、不快反応と高い相関を示す腹側淡蒼球、扁桃体レンズ核下部および前交連後脚介在核における *cFos* 細胞の活動が、それぞれ不快反応に「必要十分」であるかどうかを明らかにするために、化学遺伝学的手法を用いてこれら細胞の活動を特異的に操作した場合に、不快反応がどのように変化するかを調べようと考えた。

[*cFos* 細胞の活動が不快反応の「必要」条件である可能性の検証]

一般に、ある行動に特定の神経活動が「必要」かどうかを調べることは、神経回路機能の重複性および操作効率等の問題により、「十分」であるかどうかを調べるよりも難しいため、一方がうまくいかない可能性を考慮して、以下2つの異なる方法を平行して試す予定であった。

方法 1. *cFos* 細胞の活動を抑制した時に、不快反応が減弱されるかどうかを調べる。*cFos* 細胞を含む腹側淡蒼球、扁桃体レンズ核下部および前交連後脚介在核の神経細胞の活動を抑制するために、生体には薬理学的に不活性である Clozapine N-oxide (CNO) の存在下でのみ神経活動を抑制する、人工受容体である hM4Di をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) を上記脳領域のいずれかに注入し、hM4Di が十分に発現する2週間後に CNO を腹腔投与し、その50分後にキニーネ水溶液を口腔内に注入し、不快反応の減弱を確かめる。その後、脳を固定し、hM4Di 発現細胞で有意に *cFos* の発現が抑制されていた事を確かめる。尚、これまでの予備実験で、AAV-hM4Di-mCherry もしくはコントロールの AAV-GFP を注入した上記脳領域において、hM4Di-mCherry を発現する細胞では GFP を発現する細胞に比べて、CNO 存在下において *cFos* の発現が抑えられる傾向があり、この方法で期待通り神経活動が抑制されることが示唆されている。

方法 2. *cFos* 細胞を特異的に死滅させた時に、不快反応が減弱されるかどうかを調べる。*cFos* 細胞を特異的に死滅させるために、*cFos* の遺伝子座に CreERT2 を knock-in した *cFos*-CreERT2 マウスを用いる。細胞死を誘導する taCasp3-TEVp を Cre 依存的に発現する AAV を *cFos*-CreERT2 マウスの上記脳領域それぞれに注入し、キニーネ水溶液を口腔内に注入してから 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) を腹腔投与することで CreERT2 を活性化し、AAV が感染した脳領域の *cFos* 細胞で特異的に taCasp3-TEVp を発現させ、それら細胞を死滅させる。尚、*cFos*-CreERT2 マウスでは注目している行動の完了後に 4-OHT を投与することで、当該行動に伴って *cFos* が発現した細胞で効率的に組み換えが起こる事が先行研究において確認されている。細胞死が完了する4週間後にキニーネ水溶液を口腔内へ注入し、不快反応の減弱を確かめる。

[*cFos* 細胞の活動が不快反応の「十分」条件である可能性の検証]

cFos 細胞の活動を特異的に活性化すると不快反応が増強されるかどうかを調べる。*cFos* 細胞の活動を特異的に活性化するために、CNO の存在下でのみ神経活動を活性化する hM3Dq を Cre 依存的に発現する AAV を *cFos*-CreERT2 マウスの上記脳領域それぞれに注入し、キニーネ水溶液を

口腔内へ注入してから 4-OHT を腹腔投与することで、AAV が感染した脳領域の *cFos* 細胞で特異的に hM3Dq を発現させる。hM3Dq が十分に発現する 2 週間後に CNO を腹腔投与し、その 50 分後に水を口腔内へ注入し、不快反応の誘導(増強)を確かめる。味覚反応テスト後に脳を固定し、hM3Dq 発現細胞で有意に *cFos* の発現が増強されていたことを確かめる。

尚、本研究に必要な *cFos*-CreERT2 マウスは既に手元にあり実験に使える段階まで殖えており、必要な AAV は全て公的機関より購入することが可能である。

[快・不快反応の神経基盤の冗長性や代替可能性の検証]

味覚反応の神経基盤の冗長性や代替可能性が高ければ、その反応に必要な十分な細胞群を除去しても時間の経過とともに他の細胞の活動が変化して反応が回復すると考えられる。ここまでの実験で不快反応の発動に必要な十分であると判断された細胞群を、上記と同様の方法で消失させて不快反応が減弱していることを確かめた後、2 週間ごとに最大 12 週間後程度まで、キニーネ水溶液を口腔内へ注入した際の味覚反応を調べる。尚、味覚反応を調べる間隔や期間については結果を元に随時修正していく。さらに一部個体の脳を固定し、消失させた細胞が分布していた脳領域において、周囲の細胞が時間の経過に伴い *cFos* を発現するようになるかどうかを調べ、不快反応回復の程度と *cFos* 細胞の数の変化の相関を調べる。この時、*cFos* 細胞の変化が確認されない場合は、必ずしも消失させた細胞の周囲の細胞がその機能を代替しているとは限らないため、消失させた細胞の投射元、および投射先に解析領域を広げる予定である。

4 . 研究成果

本研究計画においては、元々、不快反応と高い相関を示す腹側淡蒼球、扁桃体レンズ核下部および前交連後脚介在核における *cFos* 細胞に注目していたが、その後の解析で腹側淡蒼球や扁桃体レンズ核下部よりも、扁桃体中心核においてより不快反応と高い相関を示す *cFos* 細胞が見つかったため、特にこの扁桃体中心核および前交連後脚介在核における *cFos* 細胞に注目していくことにした。そして予定通り、これら *cFos* 細胞の活動が、不快反応に「必要十分」であるかどうかを明らかにすることを目指した。

まず「必要」条件については、昨年度、CNO そのものによって摂水行動が抑制される影響が見られたため、CNO 量の最適化を行った結果、1mg/kg の投与量では、GFP を導入したネガティブコントロールでは摂水量が変わらなかった一方、hM4Di を導入した場合は摂水量が抑制されることが明らかになった。この結果は、想定していた効果と真逆の効果であり、この方法では我々が注目している細胞以外の活動も抑制してしまっているために、想定外の影響が見えてしまっている可能性が考えられた。従って「必要」条件の検討においても、「十分」条件と同様に、*cFos* 細胞特異的な操作が必要であると考えた。また、「必要」条件の検討のためにも「十分」条件検討のためにもまずはキニーネ刺激依存的な組換えを誘導できる条件検討を優先的に行うことにした。その結果、前交連後脚介在核において、水刺激に比べてキニーネ刺激により有意に多くの組換わり細胞(YFP で標識される)を検出することが出来た。さらに、これら YFP 細胞が、本当にキニーネ刺激依存的に活動するのかを確かめるために、組換えを誘導した個体で、その組換え誘導時に与えたのと同様のキニーネ刺激を与えた後に脳を固定し、固定直後の神経活動のマーカーとなる IEG である *cFos* および Arc mRNA の発現を確かめた。結果、IEG/GFP およびその逆は 30%程度の overlap になった。ネガティブコントロールとして水刺激で組換えを誘導した個体では、overlap は 10%程度であった。従ってキニーネ刺激による遺伝子組み換えは、キニーネ刺激により活動する細胞を優先的に標識出来ていると考えられた。この成果は、味覚刺激依存的に活動した神経細胞で優先的に遺伝子組み換えを誘導した、これまでに報告のない

初めての成果となる。そこで次にそれらキニーネ刺激依存的に組換えが誘導される神経細胞で特異的に hM3Dq を発現させ、CNO を投与することでそれら細胞の活動を活性化した場合の行動レベルでの機能評価に進んだ。結果、最初のスクリーニングとして予定していた味覚反応テストおよび摂水行動テストでは、CNO 投与により明確な行動変化は見られなかった。そこでキニーネ刺激依存的に hM3Dq が発現していることを確認したところ、水刺激に比べキニーネ刺激をした個体でより多くの細胞が hM3Dq を発現している傾向が確かめられた。

尚、予定していた冗長性や代替可能性を調べる実験は時間が足りず行うことができなかったが、本研究でそれら実験に繋がる成果が得られたので、近い将来に是非行いたいと考えている。

研究期間全体を通じて、不快反応と相関のある神経活動を示す脳領域として扁桃体中心核および前交連後脚介在核を同定した。さらにそれら神経核で、不快反応と相関のある活動を示す神経細胞で優先的に遺伝子組み換えを誘導できることを実証した。今後この遺伝子組換え作用を利用することで、それら神経細胞の活動の不快情動に対する因果関係を調べることができると期待される。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

田中大介, “ 味覚嫌悪の生得的反応と獲得反応の両方をコードする拡張扁桃体神経細胞への遺伝学的アクセスの確立に向けて ”, 第 3 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会 (生理学研究所研究会), 2018 年

Tanaka DH, Li S and Tanabe T. Expression of gustatory “disgust” reactions recruit specific amygdaloid nuclei in mice, The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2017

6 . 研究組織

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。