

平成30年6月19日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13112

研究課題名(和文)快情動を司る脳内神経回路

研究課題名(英文)Brain circuit for happy emotion

研究代表者

桑木 共之(KUWAKI, Tomoyuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80205260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：快情動は疾病予防や健康増進に有益であることが経験的に知られている。その脳内神経回路を明らかにすることによって、経験則に生物学的エビデンスを付与することが本研究の目的であった。快情動によってカタプレキシーを引き起こすことが知られているオレキシン欠損マウスを用い、カタプレキシー発作直前または同時に活性化される脳部位を網羅的に探索したところ、側坐核の活性化が顕著であることが明らかになった。今まで不明であった快情動を研究する際のターゲットとなる脳部位を絞り込むことができたが、健康増進との関連解明にまでは至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Happy emotion is believed to be beneficial for protection of disease and promotion of health. The aim of this study was to get biological evidence for the empirical knowledge by revealing neural circuit supporting for the phenomenon. We supposed that cataplexy attack in narcolepsy animal might be an objective measure of the subjective happy emotion because cataplexy is triggered by happy emotion at least in humans. Using narcolepsy model mice, we systematically searched for the brain region that was activated during or just after the cataplexy attack. We found that the accumbens nucleus was the most activated brain site. Next step will be the examination of possible relationship between activity of the accumbens nucleus and health promotion.

研究分野：脳科学

キーワード：感性・情動・感情 オレキシン 情動脱力発作 快情動 神経科学

1. 研究開始当初の背景

快情動を作り出す原因となる脳内神経回路の研究は不快情動を伴うストレス応答の回路研究に比べて遅れている。快情動に伴う行動変化は不快情動に伴うものに比べて定義・観察しづらいことがその一因である。一方、睡眠障害の1つであるナルコレプシーの原因は視床下部に存在するオレキシン含有ニューロンの脱落であり、その副症状であるカタプレキシーは快情動が原因になっており、しかも客観的観察が可能である。そこで、オレキシン含有ニューロン脱落モデルマウスを材料としてカタプレキシー発作の最中または直後に活性化される脳内神経回路を調べれば、快情動を司る神経回路を解明できると考えた。

2. 研究の目的

快情動は疾病予防や健康増進に有益であることが経験的に知られている。その脳内神経回路を明らかにすることによって、経験的に生物学的エビデンスを付与することが本研究の目的であった。快情動はヒトと異なり言語報告のできない実験動物での研究は困難とされていたが、ナルコレプシーの副症状であるカタプレキシー（情動脱力発作）は快情動によって引き起こされるので、この発作を指標として研究可能になると考えた。これらの発症原因は視床下部に存在するオレキシン含有ニューロンの脱落であることが既に明らかになっているので、このニューロンの脱落モデルマウスを材料としてカタプレキシー発作の直前に活性化される脳内神経回路を調べれば、快情動を司る神経回路を解明できる。

3. 研究の方法

連携研究者の山中らが開発したオレキシン含有ニューロンを時期特異的に脱落させることのできる ORX-tTA; tetO-DTA マウス (J Neurosci 34: 6495-6509, 2014, Sci Rep 8: 2717, 2018) を用いた。ドキシサイクリンを混ぜた餌を与えている間はオレキシンプロモーター支配下で発現する tTA が tetO 配列に結合できないので何も起こらないが、普通食に替えると tetO 下流のジフテリア毒 A サブユニットが産生されて、その細胞を 2 週間程度で完全に破壊するモデルである。

カタプレキシーの好発時刻は活動期でありマウスの場合は夜間である。実験者の都合に合わせてマウスを昼夜逆転照明環境で予め 2 週間以上飼育し、昼間（暗期）にカタプレキシーを起こす条件を設定した。カタプレキシーの頻度をより増加させるために実験時にはチョコレートを与えた。

赤外線暗視カメラでマウスの行動を観察し、カタプレキシー発作（行動中に突然脱力してその場に静止して呼吸以外の運動を起こさなくなることで判定。通常 60 秒程度持続して再度突然動き始める）の終了を確認し

たらマウスを直ちに暗箱から取りだしてウレタンを腹腔内投与（1.6 g/kg）して麻醉した。対照にはチョコレートをかじった後 1 分以上カタプレキシーを起こさなかったマウスを用いた。更に、カタプレキシー発作そのものの影響を極力排除するために、カタプレキシー発作開始 5 秒後に麻醉を投与する群も作成した。

麻醉後のマウスは直ちにリン酸緩衝生理食塩液 (PSB) と 4% パラホルムアルデヒドを加えた PBS で経心臓的に灌流した。脳を摘出し、一晩後固定した後に薄切切片（40 μm）を作成した。最初期遺伝子の 1 つであるリン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ (p-ERK) に対する抗体を 1 次抗体として用い、アビジンビオチン複合体法を用いて免疫染色してジアミノベンチジンで発色させた。最後に neutral red を用いて対比染色して神経核を同定した。

4. 研究成果

上述の方法で脳内の 42 箇所神経核における pERK の発現を網羅的に解析したところ、発作終了直後に最も pERK 陽性細胞数が増加していた部位は側坐核吻側部であった (表 1)。

表 1 細胞活性化マーカーである細胞外シグナル調節キナーゼのリン酸化型 (p-ERK) を発現した細胞数 (抜粋)

脳部位	カタプレキシーなし	発作終了直後
側坐核吻側部	102 ± 19	217 ± 13 *p<0.05
前帯状皮質	23 ± 2	25 ± 3
扁桃体基底外側部	23 ± 3	18 ± 5
外側視床下部	33 ± 6	39 ± 3

側坐核吻側部ではカタプレキシーなしの対照マウスでも pERK 陽性細胞が多数観察されたが、発作終了直後では対照と比較して有意な増加が観察された。発作開始 5 秒後に麻醉をかけた群でも発作終了直後群よりは少なかったものの、対照と比較して有意な増加を認めた。

以上の結果から、側坐核吻側部における神経細胞の活性化はカタプレキシーの結果と言うよりはカタプレキシーの原因となる快情動との関連が強いことが示唆された。

側坐核吻側部が快情動の原因であることを示唆する本研究結果は、顔表情を指標として脳の一部を刺激する方法で得られた Berridge らの研究報告 (Neuron 86:646, 2015) と酷似しており、我々の仮説の妥当性を示していた。

なお、当初予定していた快情動責任部位の破壊 / 刺激実験は現在も進行中であり、計画年度内に全ての目標を達成することはできなかった。しかしながら、本研究結果によって研究対象とすべき脳部位を絞り込むこと

ができたので、今後は加速度的に研究を進めることができると考えている。

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 5 件)

Takahiro Futatsuki, Akira Yamashita, Khairunnisa Novita Ikbar, Akihiro Yamanaka, Kazunori Arita, Yasuyuki Kakihana, Tomoyuki Kuwaki: Involvement of orexin neurons in fasting- and central adenosine-induced hypothermia. *Sci Rep* **8**: 2717 (2018) doi: 10.1038/s41598-018-21252-w, PMID: 29426934 査読有, open access, 国際共同研究

Hideki Kashiwadani, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki: Application of calibrated forceps for assessing mechanical nociception with high time resolution in mice. *Plos One* **12(2)**: e0172461 (2017) doi: 10.1371/journal.pone.0172461, PMID:28212389 査読有, open access

Kohei Miyata, Tomoyuki Kuwaki, Youichirou Ootsuka: The integrated ultradian organization of behavior and physiology in mice and the contribution of orexin to the ultradian patterning. *Neurosci* **334**: 119-133 (2016) doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.07.041, PMID:27491480, 査読有

Shogo Tashiro, Ran Yamaguchi, Sodemi Ishikawa, Takeshi Sakurai, Katsuko Kajiya, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki, Hideki Kashiwadani: Odour-induced analgesia mediated by hypothalamic orexin neurons in mice. *Sci Rep* **6**: 37129 (2016) doi:10.1038/srep37129, PMID: 27845440. 査読有, open access

桑木共之: オレキシンと睡眠障害 *The Lung Perspectives* **24(1)**: 82-87 (2016) 査読有

〔学会発表〕(計 24 件)

山下哲、守谷俊平、上之蘭知邑、加治屋勝子、山中章弘、桑木共之: 嫌悪ストレス刺激に対する自律神経応答とオレキシン神経活動との関係、第 95 回日本生理学会大会 3/28-30/2018

岩川昌平、上村裕一、桑木共之: 睡眠薬(オレキシン受容体拮抗薬、トリアゾラム)で誘導された睡眠中マウスへの嫌悪刺激による覚醒の比較、第 95 回日本生理学会大会 3/28-30/2018

桑木共之: ストレス防衛反応を担う脳内神経回路、生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017/12/6-9

二木貴弘、山下哲、Khairunnisa Novita Ikbar、山中章弘、有田和徳、垣花泰之、桑木共之: オレキシン神経は飢餓誘発低体温に抵抗する、第 45 回自律神経生理研究会 2017/12/02
山下哲、山中章弘、桑木共之: 視床下部オ

レキシン神経のストレス誘発自律応答における役割、第 45 回自律神経生理研究会 2017/12/02

山下哲、桑木共之: ファイバーフォトメトリー法を用いた循環応答に關与する神経回路網の in vivo 解析、第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 2017/11/24,25

Tomoyuki Kuwaki: Orexin neurons serve as a pivotal link between fight-or-flight behavior and autonomic functions. Invited Lecture at Xiamen University, 2017/11/10

山下哲、守谷俊平、上之蘭知邑、加治屋勝子、山中章弘、桑木共之: 嫌悪ストレス刺激に應答するオレキシン神経活動と自律神経応答の関係、第 9 回光操作研究会 2017/10/21,22

岩川昌平、上村裕一、桑木共之: オレキシン受容体拮抗薬による睡眠時に、危険刺激で覚醒できるのか? 第 10 回鹿児島神経科学研究会 2017/9/9

Zhi Li, Akira Yamashita, Tomoyuki Kuwaki: A quest for the brain center of happy emotion. 第 10 回鹿児島神経科学研究会 2017/9/9

Akira Yamashita, Shunpei Moriya, Ryusei Nishi, Akihiro Yamanaka, Tomoyuki Kuwaki: Analysis of the role of orexin neural circuit under autonomic responses using in vivo fiber photometry system, ISAN2017, 8/30-9/2/2017

Ran Yamaguchi, Tomoyuki Kuwaki, Ikuo Kusumoto-Yoshida: A candidate neural circuit contributing to orexin-induced food intake. 第 40 回日本神経科学学会 7/20-23/2017

Akira Yamashita, Akihiro Yamanaka, Tomoyuki Kuwaki: Research for orexin based neural circuit of stress-induced autonomy response. 第 40 回日本神経科学学会 7/20-23/2017

桑木共之、岩川昌平、上村祐一: オレキシン受容体阻害薬による睡眠時でも危険刺激による覚醒が起こるか? 第 42 回日本睡眠学会 6/29,30/2017

山下哲、山中章弘、桑木共之: ストレス誘発自律神経応答に対するオレキシン神経活動の役割、第 94 回日本生理学会大会 3/28-30/2017

山口蘭、桑木共之、楠本(吉田)郁恵: マウスの摂食行動に対するオレキシン神経光刺激の効果、第 94 回日本生理学会大会 3/28-30/2017

二木貴弘、Khairunnisa Novita Ikbar、垣花泰之、有田和徳、桑木共之: 飢餓およびアデノシン誘発低体温へのオレキシン神経の關与、第 12 回環境生理プレコングレス 3/27/2017

山口蘭、楠本郁恵、桑木共之: マウス摂食行動への光刺激の効果、第 9 回鹿児島神経科学研究会 2017/2/18

山口蘭、楠本郁恵、桑木共之: マウスの摂食行動に対するオレキシン神経光刺激の効果、第 10 回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会

2017/2/2 最優秀発表賞

山下哲、山中章弘、桑木共之：ストレス負荷による自律応答とオレキシン神経活動の相関解析、第44回自律神経生理研究会 2016/12/3

21) Eri Inoue, Tomoyuki Kuwaki, Hideki Kashiwadani: Application of calibrated forceps for evaluating antinociceptive effect induced by shortacting analgesic in mice. SfN Annual Meeting 2016/11/12-16

22) 山下哲、山中章弘、桑木共之：ファイバーフォトメトリー法を用いた急性ストレス負荷による循環応答時におけるオレキシン神経活動の測定【奨励賞受賞】第67回西日本生理学会 2016/10/7,8

23) 山口蘭、桑木共之、楠本郁恵：マウス摂食行動に対するオレキシン神経光刺激の効果、第67回西日本生理学会 2016/10/7,8

24) 山下哲、中井淳一、大倉正道、山中章弘、桑木共之：ストレス負荷による循環応答時におけるオレキシン神経活動の自由行動マウスからの計測、第15回九州脳・高血圧・循環制御研究会 最優秀賞 2016/07/23

〔図書〕(計 2件)

Pascal Carrive & Tomoyuki Kuwaki: Orexin and Central Modulation of Cardiovascular and Respiratory Function. *In Current Topics in Behavioral Neuroscience* pp1-40, 2016 Dec 02. Springer. doi:10.1007/7854_2016_46, PMID: 27909989, Series Editors: Geyer, M.A., Ellenbroek, B.A., Marsden, C.A., Barnes, Th.R.E. ISSN: 1866-3370

桑木共之：自律神経と情動 In 情動学シリーズ(全10巻)小野武年監修 6.情動と呼吸—自律系と呼吸法—本間生夫、帯津良一編、pp46-68 全159p、朝倉書店、2016
<http://www.asakura.co.jp/books/isbn/978-4-254-10696-1/>

〔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

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 統合分子生理学分野ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

桑木 共之 (KUWAKI, Tomoyuki)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80205260

(2)研究分担者

該当なし

(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

(4)研究協力者

李 智 (LI, Zhi)

磯道 拓人 (ISOMICHI, Takuto)

山下 哲 (YAMASHITA, Akira)

大塚 曜一郎 (OOTSUKA, Youichirou)

柏谷 英樹 (KASHIWADANI, Hideki)

宮田 紘平 (MIYATA, Kohei)

田代 章悟 (TASHIRO, Shogo)

山口 蘭 (YAMAGUCHI, Ran)

石川 そでみ (ISHIKAWA, Sodemi)

桜井 武 (SAKURAI, Takeshi)

加治屋 勝子 (KAJIYA, Katsuko)

上村 裕一 (KANMURA, Yuichi)

二木 貴弘 (FUTATSUKI, Takahiro)

Khairunnisa Novita Ikbar

有田 和徳 (ARITA, Kazunori)

垣花 泰之 (KAKIHANA, Yasuyuki)