

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月19日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20963

研究課題名(和文) 扁桃体における経路選択的な神経活性化を担う細胞・分子基盤の解析

研究課題名(英文) Neural basis for pathway-selective activation of amygdala

研究代表者

宮道 和成 (Miyamichi, Kazunari)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：30612577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいては異性や天敵に由来する匂い・フェロモン物質が性行動や忌避行動をひき起こすことが知られている。しかし、特定の感覚シグナルが適切な行動をひき起こす神経基盤については不明だった。本研究は、生得的にマウスの性行動に影響をおよぼすフェロモンESP1の責任神経回路を末梢から脳の中核まで特定した。その過程で、内側扁桃体においてESP1は雌雄で異なる神経回路を活性化させること、視床下部においてESP1と天敵のシグナルは同じ脳領域内の異なるニューロンによって処理されることが分かった。すなわち、生得的な行動を制御する感覚シグナルに専用の神経回路が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In mice, chemosensory signals derived from mates or predators evoke stereotyped behavioral responses such as sexual or defensive behaviors. How a specific sensory input is converted to a stereotyped behavioral output remained elusive. In this study, we mapped responsible neural circuit for enhanced sexual behaviors of adult female mice induced by a male-specific sex pheromone called ESP1. In the medial amygdala, ESP1 activated distinct projection neurons depending on the sex of recipient mice. In hypothalamus, ESP1 and a predator's signal (snake skin) were mediated by mostly non-overlapping neurons that were intermingled in the same brain region. Together, these data revealed the presence of labeled-line organization for processing the sensory signals that evokes innate behavioral outputs.

研究分野：神経科学

キーワード：性的二形 神経回路 フェロモン 性行動 視床下部 扁桃体

1. 研究開始当初の背景

脳内では膨大な数の神経細胞が自らの特異性を踏まえて連結し、神経回路を構成している。外界の情報を適切に処理し適応的な行動に結びつけるためには、異なる情報が混線することなく適切な経路において伝達され、それぞれ特異的な高次脳領域に到達する必要がある。この情報伝達経路の特異性はどのような仕組みによって担保されているのだろうか？ マウスの嗅覚系は、入力（匂い分子やフェロモン分子）と出力（情動や行動の変化）を明瞭に規定でき、比較的少数の脳領域で入力から出力までを結ぶことができる。脳における情報伝達機構を研究するための優れたモデルである。本研究で着目するのは、主に鋤鼻器官で受容され、マウスの行動や情動に強く影響するような化学情報シグナルである。

へビなど天敵の因子は鋤鼻器官で受容され^{1,2}、副嗅球→内側扁桃体を経て視床下部腹内側核を活性化させる^{3,4}。その結果、マウスは逃走したり物陰に隠れるなどの防衛行動を取ると考えられる^{5,6}。一方、他個体の仔は雄マウスにとって自らの遺伝子を残す妨害となるので、一般的に攻撃行動を引き起こす。仔シグナルも鋤鼻器官に受容され、内側扁桃体を活性化させるが、面白いことに視床下部に至ると敵のシグナルとは異なり視索前野を活性化させることが初期応答遺伝子の発現解析から判明している⁷。また、ライバルとなる同種の雄マウスからも化学シグナルが発せられており、このうちの一つは雄フェロモンの ESP1 と呼ばれるタンパク質で、視索前野を活性化させることが分かっている⁸。以上をまとめると、同じ内側扁桃体を経る情報が、視床下部の腹内側核を活性化させる場合と、視索前野を活性化させる場合とがあり、それぞれ行動アウトプットが異なることがわかる。この情報伝達経路の特異性はどのように担保されるのだろうか？

申請者は、内側扁桃体を介して情報が適切な下流領域に伝達されるのは、内側扁桃体に経路経路選択的なニューロンが存在し、情報を振り分けるためではないかと考えた。一般に領域 X に含まれる投射ニューロンがすべての下流領域を均等に担当している系を分散的な投射系、領域 X の中に特定の下流領域 Y₁, Y₂, … を専門に担当するニューロンが存在する分業体制を経路選択的な投射系と言う (図 1)。申請者が開発した経路選択的の標識法⁹を用いると、脳内の任意のニューロンの投射経路特異性を簡便かつ網羅的に調査できる。この手法は、軸索末端から効率よく感染し細胞体に Cre を発現させるイヌ科アデノウイルス (CAV2) を用い、標的領域に存在するニューロンをアデノ随伴ウイルス (AAV) によって経路選択的に標識する。予備実験において、視床下部腹内側核と視索前野に投射する内側扁桃体のニューロンを標識したところ、腹内側核に主に投射するニューロンは

全体として視索前野よりも約 8 倍の密度で腹内側核に投射しており、逆に視索前野に主に投射するニューロンは腹内側核に比べて 3-4 倍の密度で視索前野と分界条床核に投射していた。従って、内側扁桃体に視床下部の異なる領域を担当する投射経路特異的なニューロンが存在することが示された。そこで本研究では、この内側扁桃体の投射経路選択的なニューロンが実際のフェロモン等鋤鼻感覚を処理する上でどのような役割を果たしているのかを検討した。

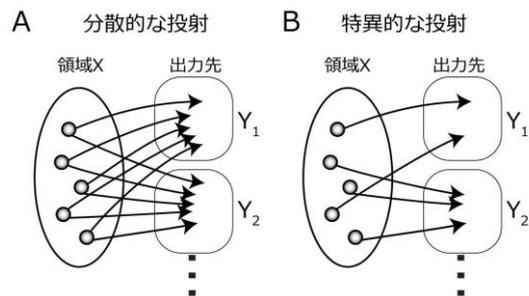


図 1: 神経回路における投射経路選択性

引用文献:

- (1) Isogai Y et al. *Nature* **478**, 241, 2011.
- (2) Papes F et al. *Cell* **141**, 692, 2010.
- (3) Carvalho VM et al. *Front Neurosci* **9**, 283, 2015.
- (4) Perez-Gomez A et al. *Curr Biol* **25**, 1340, 2015.
- (5) Kunwar PS et al. *eLife* **06633**, 2015.
- (6) Wang L et al. *Neuron* **85**, 1344, 2015.
- (7) Tachikawa KS et al. *J Neurosci* **33**, 5120, 2013.
- (8) Haga S et al. *Nature* **466**, 118, 2010.
- (9) Schwarz LA & Miyamichi K et al. *Nature* **524**, 88, 2015.

2. 研究の目的

内側扁桃体の投射経路選択的なニューロンの構造と機能を解明する。この目的のために、さまざまな鋤鼻活性化因子をスクリーニングし、投射経路選択的なニューロンの活性化パターンを比較解析する。また、投射経路選択的なニューロン（または、これらニューロンを含む神経核全体）の神経活動を操作した場合に、下流の視床下部領域の活動や動物の行動に与える影響を薬理遺伝学的な介入実験により調査する。最後に、投射経路選択的なニューロンを起点するトランスシナプス標識法によって、これらニューロンの受け取る入力の定量的な相違について検討する。

3. 研究の方法

3-1. 投射経路選択的なニューロンの活性化パターンの解析

内側扁桃体の投射経路選択的なニューロンを逆行性標識剤の Retrobeads を用いて赤色に標識する。マウスを注入手術から回復させ

十分な期間をあけたのち、鋤鼻器官を刺激するさまざまな因子を暴露し、内側扁桃体において初期応答遺伝子 *cFos* の発現を指標に活性化されたニューロンを検出する。Beads と *cFos* の二重陽性細胞を数えることによって、どの経路が活性化されていたかを評価する。

3-2. 内側扁桃体の活動を操作することによる下流領域および行動への影響評価

フェロモン等鋤鼻活性化因子の処理における内側扁桃体あるいはその投射経路選択的ニューロンの機能を調べる目的で、これらのニューロンに薬剤 CNO によって神経活動を抑制することによってできる hM4Di をアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いて導入する。行動実験に先立って CNO あるいは対照として生理食塩水を腹腔注入し、その後フェロモンに暴露した個体の性行動をアッセイする。

3-3. 内側扁桃体の投射経路選択的ニューロンを起点とするトランスシナプス標識系の構築

内側扁桃体の後腹部の投射ニューロンは *vGluT2* を発現する興奮性ニューロンであることが分かっている。そこで *vGluT2-Cre* マウスを用いてトランスシナプス標識¹⁰を行う。また、内側扁桃体の投射経路選択的ニューロンの主要なターゲット領域に逆行的に感染する *CAV2-Cre* を導入し、内側扁桃体においてトランスシナプス標識を行うことで、投射経路選択的ニューロンの受けるインプットを可視化する。

4. 研究成果

4-1. ESP1 は雌雄で異なる投射経路を活性化

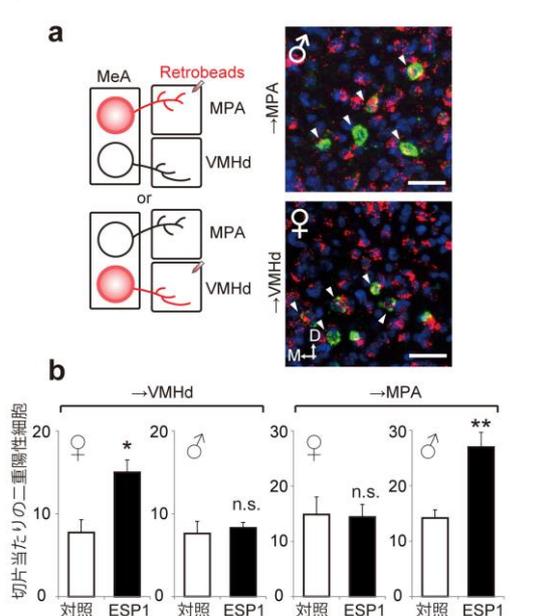


図2 ESP1による経路選択的ニューロンの活性化。(a)左側は実験の模式図、右側は代表的な内側扁桃体の切片におけるBeads(赤)と*cFos*(緑)の二重染色像。二重陽性細胞を

矢じりで示した。D, dorsal. M, medial. スケールバーは100 μ m.

(b)内側扁桃体の20 μ m厚切片あたりの二重陽性細胞の数。*, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$.

さまざまな鋤鼻活性化因子あるいは尿や体液などの混合物を雌雄のマウスに暴露し、活性化される経路を検討した結果、多くの場合に明瞭な結果が得られなかったが、雄マウスの涙腺から分泌するタンパク質性のフェロモンESP1を与えた場合に明瞭な結果が得られた。すなわち、内側扁桃体における投射経路選択的ニューロンとして、腹内側核(VMH)あるいは視索前野(MPA)を標的に調べたところ、ESP1は雌マウスではVMH経路を活性化させるのに対し、MPA経路を活性化させず、逆に雄マウスではVMH経路が活性化されずにMPA経路が選択的に活性化されることが明らかになった(図2, 発表論文のFigure 3を元に作成)。この結果は、哺乳類において同一の感覚入力に対して異なる経路が活性化されることを初めて示したもので、また、構造的には雌雄で同型の神経回路の「使われ方」に雌雄差があるという性的二形性の新しい様式を提示するものである。

4-2. 内側扁桃体後腹部の興奮性ニューロンの活動はESP1によるVMHの活性化とフェロモン効果に必要である

予備実験において、*CAV2-Cre*を用いて内側扁桃体の投射経路選択的ニューロンに特異的にhM4Diを発現させ、CNO依存的に神経活動の抑制を試みたが、個体ごとに導入効率が大きくばらつき明瞭な結論が得られなかった。そこで、内側扁桃体の投射経路選択的ニューロンがいずれも後腹部の*vGluT2*陽性興奮性ニューロンであることを示したうえで、このニューロン集団の活動を薬理遺伝学によって抑制することにした。

*vGluT2-Cre*雌マウスの内側扁桃体後腹部を標的にCre依存型のAAVを用いてhM4Diを導入し、二週間後にCNOあるいは対照として生理食塩水を与え、一時間後にESP1あるいは対照緩衝液を与えて性行動アッセイを行った。その後さらに十分な期間を開けたのち個体を再びCNOあるいは生理食塩水による処理ののちにESP1で刺激して*cFos*の発現解析に供した(図3, 発表論文のFigure 5を元に作成)。CNO群において、VMHの*cFos*発現数は有意に減少しており、内側扁桃体の投射経路選択的ニューロンを含む集団の活動抑制により、実際にシグナルの伝達が阻害されることが分かった。更に行動実験において、ESP1による性受け入れ率の上昇がみられなくなることが明らかになった。この結果は、内側扁桃体後腹部の活動がESP1によるVMHの活性化と性受け入れ促進作用に必要であることを明らかにした。これら結果は、*Neuron*誌に発表した論文中でも重要な

役割を果たした。

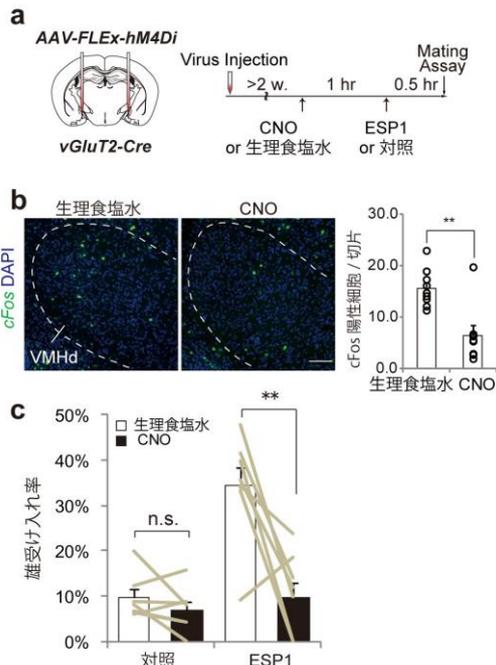


図 3 内側扁桃体の薬理遺伝学的な機能欠損実験 (a) ウイルスベクター導入箇所 の模式図と実験のスケジュール. (b) 生理食塩水あるいは CNO を注入した ESP1 刺激雌個体の VMH における cFos 発現. 代表的な切片写真と定量結果を示した. (c) 生理食塩水あるいは CNO 注入個体における性受け入れ率の定量結果. n.s., 有意差なし. **, $p < 0.01$.

4-3. 内側扁桃体後腹部の投射経路選択的ニューロンに対するインプットの可視化

内側扁桃体の投射経路選択的ニューロンを *CAV2-Cre* を用いて標識し, 次に AAV を用いて狂犬病ウイルスの感染と増殖に必要な遺伝子を導入することによって特異的なトランスシナプス標識を行った (TRIO 法). その結果, 内側扁桃体の後腹部を中心に標識の起点となる starter cell を作製でき, そのシナプス前ニューロンとして多くの脳領域に標識が見られた. 特に, 腹側の海馬領域や扁桃体-線条体移行領域といった従来着目されていなかったシナプス前ニューロンを多数同定した. 各三個体の雌マウスにおいて, *CAV2-Cre* を VMH と MPA に導入した群をそれぞれ比べてみると, シナプス前ニューロンの定性的な分布に大きな差はなかったが, 定量的には, MPA 投射ニューロンの方が嗅覚関連領域からの入力が多く, 視床下部からの入力が少ないといった差異が見出された (図 4). しかし, 当初の仮説と異なり, 副嗅球からの入力細胞数が非常に少数 (全体の 1%以下) であったことから, 副嗅球における標識細胞の分布や数の違いについて議論に耐えうるデータは得られなかった. 今後は, 解析を興奮性ニューロンに限定する cTRIO の利用や, サンプル数を増やして透明化脳の全脳イメージングなど高いスループットの

解析法に供するなどの工夫が必要と考えられる.

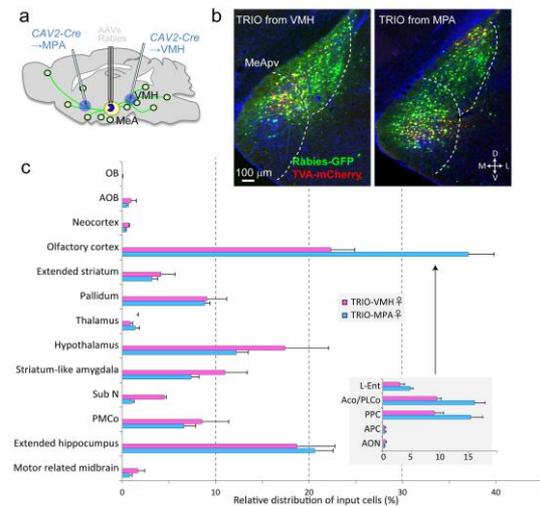


図 4 内側扁桃体の投射経路選択的ニューロンを起点とするトランスシナプス標識 (a) 各ウイルス導入領域の模式図. (b) 代表的な starter cell (黄色) を含む内側扁桃体の切片像. (c) シナプス前細胞群の位置を 12 の脳領域に分類しその相対頻度を各個体で測定した. それぞれ三匹の雌マウスを用いた. エラーバーは s.e.m. 図中の略号は以下の通り. OB, olfactory bulb; AOB, accessory olfactory bulb, N, nucleus, PMCO, postero-medial cortical amygdala, L-Ent, lateral entorhinal cortex; ACo, anterior cortical amygdala; PLCo, posterolateral cortical amygdala; PPC, posterior piriform cortex; APC, anterior piriform cortex; AON, anterior olfactory nucleus.

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 1 件)

- Ishii KK*, Osakada T*, Mori H, Miyasaka N, Yoshihara Y, Miyamichi K*, Touhara K#. A Labeled-Line Neural Circuit for Pheromone-Mediated Sexual Behaviors in Mice. *Neuron*. **95**, 123-137 (2017)
doi: 10.1016/j.neuron.2017.05.038.
PMID: 28648498

査読あり *は共筆頭著者、#は共責任著者を表す

[学会発表] (計 7 件)

- 宮道和成, 神経回路マッピングは神経疾患の理解に役立つか? 第二回 CDB こども病院ジョイントシンポジウム 口頭発表 2017 年
- 宮道和成, マウスにおける性フェロモンの神経作用メカニズム, 第 1 回 性と生

- 殖の懇談会 口頭発表 2017年
- ③ 宮道和成、フェロモンによる生殖抑制の神経基盤、第4回 Chemosensation and Behavior 研究会 口頭発表 2017年
 - ④ Miyamichi Kazunari、Functional Dissection of Hypothalamus by Sex Pheromones in Mice. 第40回日本神経科学大会 口頭発表 2017年
 - ⑤ 宮道和成、ウイルス遺伝子工学を用いた神経回路構造の研究、第40回日本神経科学大会 教育講演 2017年
 - ⑥ 宮道和成、マウスにおける経路選択的なウイルス遺伝子工学を用いた高次嗅覚神経回路の解析、第39回日本神経科学大会 口頭発表 2016年
 - ⑦ Miyamichi Kazunari、Dissecting neural circuits processing a sex pheromone in mice. 第17回国際味匂いシンポジウム (ISOT) 口頭発表 2016年

[図書] (計 1 件)

- ① Miyamichi K and Schwarz LA. 著、Connectivity and Circuit Architecture Using Transsynaptic Tracing in Vertebrates、Springer 2017. Decoding Neural Circuit Structure and Function の第4章

[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

研究室 HP: <http://www.cdb.riken.jp/ccol/>

研究成果に関する新着論文レビュー :

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/16645>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮道 和成 (Miyamichi Kazunari)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号 : 30612577

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

石井健太郎 (Ishii Kentaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・大学院生