

令和 4 年 2 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04030

研究課題名(和文) ストレス感受性・抵抗性におけるモノアミン神経相互作用とその機能的意義

研究課題名(英文) Mutual interactions of monoaminergic neurons in stress resilience and sensitivity

研究代表者

那波 宏之 (Nawa, Hiroyuki)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：50183083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニン再吸収阻害剤SSRIの薬理学研究は「セロトニン=抗ストレス」概念を生んだがその真偽は明らかでない。本計画の目的はストレス感受性における3種モノアミン神経活動の相互作用とドパミンの真の役割を明らかにすることである。慢性社会敗北ストレス負荷後に、3種モノアミン神経活動と社会行動量を計測した結果、ドパミン神経発火活動にのみ社会行動量に負の相関がみられた。薬理遺伝学法を用いてセロトニン神経活動とドパミン神経活動を介入操作した結果、3種モノアミン神経活動のなかで、セロトニン神経活動の下流でドパミン神経活動がより直接的にストレス感受性や抵抗性に関与していると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、ラットの慢性的社会敗北ストレス下における3種モノアミン神経発火の相互作用と腹側被蓋野ドパミン神経活動の重要性が示唆された。さらに青斑核ノルアドレナリン神経活動や背側縫線核セロトニン神経活動は、社会行動制御システムにおいてドパミン神経の上流に位置している可能性が仮説された。これらの知見はドパミン神経の新たな神経生理学的役割を明らかにするだけでなく、うつ病の作用機序の解明やより効果的な抗うつ薬の開発に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pharmacological studies of the serotonin reuptake inhibitor SSRI have given rise to the concept of "serotonin = anti-stress", but the truth is unknown. The purpose of this project is to clarify the role of dopamine and the interaction of three monoamine neural activities in stress sensitivity. After exposure to chronic social defeat stress, the firing activity of three monoaminergic neurons and the amount of social activity were measured. As a result, a negative correlation with social interaction was found only in the dopaminergic activity. The interventional manipulation of serotonergic activity and dopaminergic activity with the DREADD method, dopaminergic activity is more directly involved in the regulation of stress sensitivity and resilience in a downstream of serotonin. Our results suggest that dopamine neuron firing play a direct role in regulating stress sensitivity and resilience.

研究分野：神経科学

キーワード：ドパミン ストレス セロトニン ノルアドレナリン SSRI

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内にある主要な3つのモノアミン神経回路は、ノルアドレナリン神経 (A1-A7)、アドレナリン神経 (C1-C3)、ドパミン神経 (A8-A15)、セロトニン神経 (B1-B9) より構成され、時々刻々と変化する知覚刺激、環境ストレスに応じて、その自律発火頻度を巧妙に制御して、脳機能 (認知、注意、意欲、運動、情動など) を調節している。各モノアミン神経は脳、脊髄等、各領域への投射に加え、相互間に神経繊維連絡路を有し、その密度は全出力繊維の十数パーセントに及ぶ。各モノアミン神経はその相互伝達を介して、独自の特徴的な自律発火パターン、感受性、同期性、可塑性を呈する。従ってストレス負荷時、とくに社会的敗北ストレスのような慢性的なストレス負荷時には、3者モノアミン神経活動は相互に強い干渉が起きていると推定されるが、その実態は明らかにされていない。

2. 研究の目的

動物個体の精神ストレス感受性や抵抗性 (レジリエンス) には、3種モノアミン神経伝達が包括的な影響を及ぼす。精神ストレスが負荷されるとドパミン神経、セロトニン神経、ノルアドレナリン神経はその自律発火頻度を一斉に上昇させ、扁桃体や前頭前野、視床下部等を介して、下垂体や交感神経系などを興奮させることで、覚醒・思考レベルを高め、不安感を励起し、注意力を亢進させるとともに、血圧上昇や心拍数をあげることで、全生体防御システムを駆動させる。このように脳内モノアミン神経系はストレス感受性や抵抗性の調節司令塔の役割を担う。一見合理的な生体防御システムに思えるが、過度の精神ストレスや長期にわたるストレス刺激は、逆に覚醒レベルを下げ、注意力とやる気を低下させ、漫然と恐怖・不安をまきおき、血圧上昇や心拍数の調節を不安定化させ、いわゆる「うつ症状」を惹起する。それでは過度のストレスが急性、もしくは慢性的に負荷されたとき、3つのモノアミン神経細胞はどのような相互作用とバランス変化をするのだろうか？ また、逆にドパミン神経細胞の変調は、モノアミン神経相互作用をどう変換し、どのように精神ストレス感受性に影響をあたえているのだろうか？ 従来の抗うつ剤の薬理学から、セロトニンやノルアドレナリン神経伝達がストレス抵抗性において重要視されているが、最近の研究結果との矛盾も多い。そこで本計画では、ドパミン神経細胞の発火頻度と放出強度に着目して、各モノアミン神経細胞の自律発火がどのように相互に影響・干渉し合うことで、ストレス感受性・反応性が調節されているかを探求する計画を立てた。

3. 研究の方法

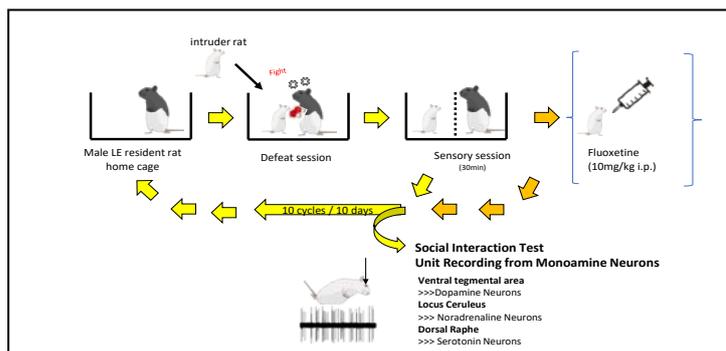
ストレス感受性・耐性におけるモノアミン神経活動相互作用に関する疑問を、ドパミン神経活動に着目し、下記の3手順で①生理学的測定、②神経化学的測定、③行動科学的測定により明らかにした。

1) 慢性・急性ストレス負荷時の3種モノアミン神経発火活動の測定

2) セロトニン再吸収阻害剤 (SSRI) の3種モノアミン神経発火活動に対する影響評価

3) ドパミン神経の発火操作による他モノアミン神経とストレス耐性への影響の解析

コントロールラットの麻酔下での神経活動記録を基盤データとして取得した。介入操作は、慢性



効果影響に注目するため薬理遺伝学法を用いた。加えてセロトニン神経活動への介入操作も実施した。得られたデータを総合して脳内のモノアミン神経発火の相互作用を解明し、3種モノアミン活動によるストレス感受性・反応性の制御メカニズムを明らかにする計画であった。

【図1】社会的敗北ストレスの負荷方法、抗うつ剤の投与手順とその後の行動テストと活動記録

ストレスの負荷方法については、個体間のばらつきが少なく、当該領域での認知度の高い社会的敗北ストレス負荷法を採用した。ストレス状態を、新規動物に対する臭い嗅ぎ行動 (社会行動量) により評価し、各モノアミン神経核よりドパミン神経、セロトニン神経、ノルアドレナリン神経の発火レベルを麻酔下で測定した。急性パラダイムは、ウイルスベクターの購入やセロトニン神経活動への介入操作のためのドライバーラットの購入費が嵩んだため実施を見送った。

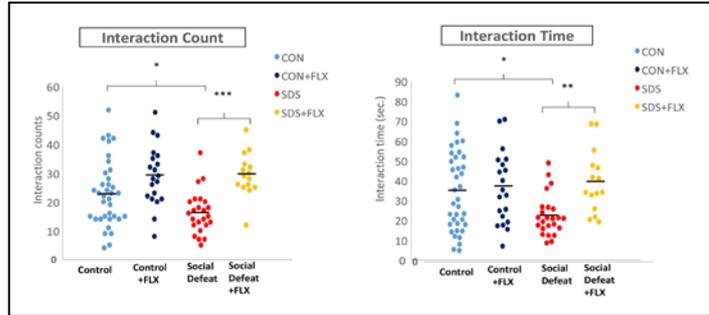
実験3におけるドパミン神経介入実験のためのドライバーラットは、Deisseroth博士が作成したCRE組み換え酵素をチロシン水酸化酵素プロモーターで発現するTH-CreラットをアメリカのラットバンクRRRCから輸入した。セロトニン神経細胞にCRE組み換え酵素を発現するTPH2-CREラットはSAGE社よりライセンス購入した。薬理遺伝学法のためのFLOX作動性READD発現

ベクターは、AAV5 のパッケージの hSyn-DIO-hmDi-mCherry, hSyn-DIO-hm3Dq-mCherry を ADDGENE 社より購入して脳内注入を実施した。なお、注入サイトへは 10^{+9} pfu 以上のタイターを投与した。

4. 研究成果

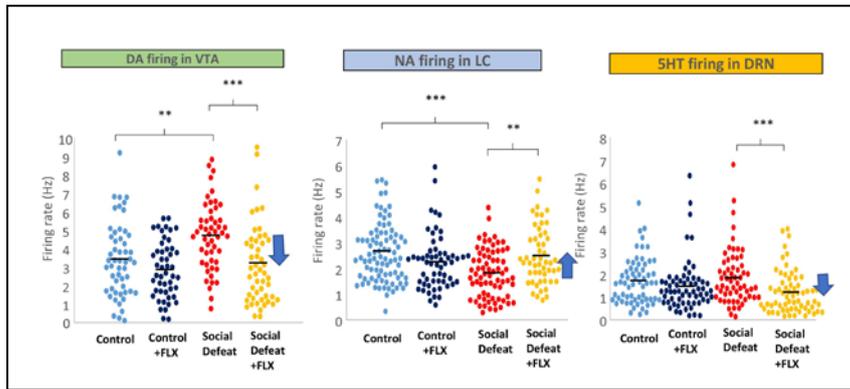
(1) 課題 1 & 2 : 慢性ストレス負荷とセロトニン再吸収阻害剤 (SSRI) による 3 種モノアミン神経発火活動変化

慢性的社会敗北ストレスパラダイムによって社会活動性の低下がみられるかを検証するため、ターゲットラットを 10 日間連続で攻撃的なロングエバンス雄ラットに攻撃させた (図 1)。11 日目に同週令程度の新奇雄ラットに 10 分間暴露したときのスニッフィング時間と回数を社会行動量として計測した。慢性的社会敗北ストレスを与えた群では、スニッフィング時間、回数ともに減少した (図 2)。このことから慢性的社会敗北ストレスによって社会活動性が低下することが確認された。次に、慢性的社会敗北ストレスパラダイムと並行して SSRI の一種のフルオキセチン (FLX) を 10 日間慢性投与した。投薬群では、スニッフィング時間、回数ともに正常化していた (図 2)。フルオキセチンは慢性的社会敗北ストレスによる社会的相互作用の低下を阻止できると考えられる。



【図 2】慢性的社会敗北ストレス負荷と SSRI 同時投与による社会行動変化

慢性的社会敗北ストレスによってドパミン神経 (DA)、ノルアドレナリン神経 (NA)、セロトニン神経 (5HT)、3 種モノアミン神経の発火がどのように変化するかを測定した (図 3)。慢性的社会敗北ストレスパラダイムの翌日に、3 種モノアミン神経の発火活動を麻酔下で細胞外単一ユニット記録を用いて測定した。

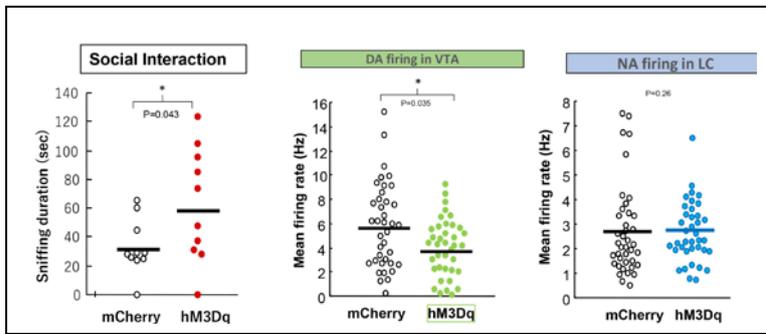


【図 3】慢性的社会敗北ストレス負荷と SSRI 同時投与による 3 種モノアミン神経細胞発火への影響

腹側被蓋野 (VTA) のドパミン神経発火は慢性的社会敗北ストレス群で有意に増加し、フルオキセチン慢性投与群で低下した。青斑核 (LA) のノルアドレナリン神経発火はストレス群で低下し、フルオキセチン慢性投与群で増加した。興味深いことに背側縫線核 (DRN) のセロトニン神経発火は慢性的社会敗北ストレス群で変化がみられなかったが、フルオキセチン慢性投与群において有意に低下した。これらの結果から、慢性的社会敗北ストレスによって腹側被蓋野ドパミン神経発火が上昇し、青斑核ノルアドレナリン神経発火が低下することがわかった。さらに、フルオキセチン慢性投与によりドパミン、ノルアドレナリンの神経発火は正常化され、セロトニン神経発火のみがむしろコントロールより低下することが確認された。

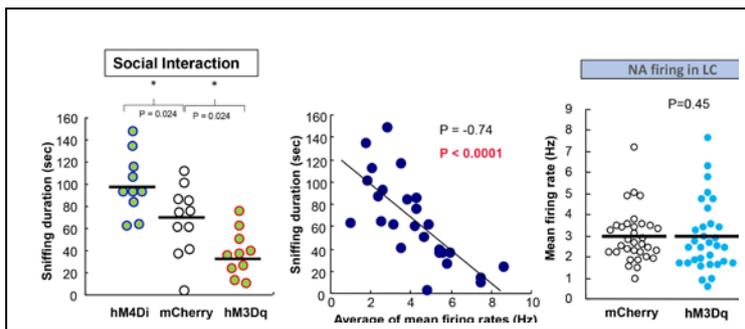
(2) 課題 3 : ドパミン・セロトニン神経の発火操作による他モノアミン神経とストレス耐性への影響の解明

セロトニン再吸収阻害剤 SSRI は、シナプス間隙のセロトニン濃度を上昇させることが知られている。それでは、その代わりにセロトニン神経細胞の発火活動を亢進させるとおなじような、抗うつ効果が得られるのであろうか。この疑問に答えるために、背側縫線核にダブルフロックス hM3Dq 遺伝子を含む AAV vector を感染させ、人工リガンド CNO の慢性皮下投与により、セロトニン神経活動を活性化させた。そのコントロールには、hM3Dq 遺伝子のない mCherry だけの AAV vector を感染させた。これらのラットの社会行動量ならびに、ドパミン神経発火頻度、ノルアドレナリン神経発火頻度を分析した (図 4)。臭い嗅ぎ行動時間は、セロトニン神経活動の強制的亢進により倍増していた。一方、セロトニン神経活動亢進にともない、腹側被蓋野のドパミン神経発火は減少していたものの、青斑核ノルアドレナリン神経活動には影響を及ぼしていなかった。



【図4】薬理遺伝学による背側縫線核セロトニン神経の活動亢進

つまり、セロトニン神経活動の方向性と、社会行動変化の間には乖離がみられる。同様に、青斑核ノルアドレナリン活動性とも、社会行動時間は、これらの実験での相関性は低かった。そこで残るドパミン神経活動の役割を実証するべく、ドパミン神経発火頻度によって実際に社会行動量が調節されるかどうかを検証するため、腹側被蓋野ドパミン神経の活動に介入した。ドパミン神経の慢性的活性化は、チロシン水酸化酵素 TH の遺伝子プロモーター下で cre 組み換え酵素を発現しているドライバーラットを用いて実施した。興奮性の DREADD (hM3Dq)、および抑制性の DREADD (hM4Di) を Flox 中に含む AAV vector を、ドライバーラットの腹側被蓋野 (VTA) に感染させた。これらの手順により、人工リガンド CNO 投与に依存して腹側被蓋野ドパミン神経の発火活動を増加、もしくは減少させることができた。結果、ドパミン神経発火を低下させると社会活動は、上昇、逆にドパミン神経発火を増加させると社会活動は、低下した (図5)。



【図5】腹側被蓋野ドパミン神経の発火操作による臭い嗅ぎ時間とノルアドレナリン神経への影響

図3にある社会敗北ストレスの負荷では、SSRI 投与でセロトニン神経活動は低下とともに社会活動が上昇したのに対し、薬理遺伝学を用いたセロトニン神経活動の上昇操作では、セロトニン神経活動の増加が、むしろ社会行動の亢進に結びついていた。

実験で得た動物ごとの平均ドパミン神経発火頻度と臭い嗅ぎ時間をプロットしてみると、きれいな逆相関性が存在することが明らかとなった (図5)。しかし、セロトニン神経発火操作の実験結果と同様、このドパミン神経発火操作においても、ノルアドレナリン神経発火にはその影響がみられなかった。

(3) 考察

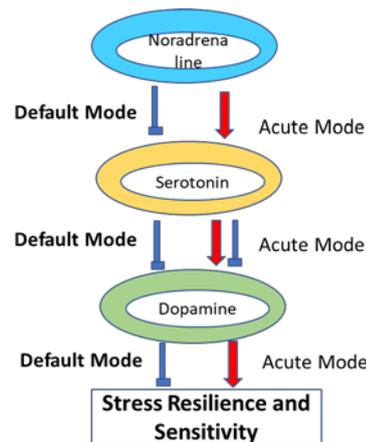
①従来のモノアミン仮説とモノアミン神経同士の相互作用の重要性

これまでうつ病の病態にモノアミン神経が関わっているという仮説が多く提唱されてきた。1つはドパミン仮説で2つ目はノルアドレナリン仮説である。しかし、最も有力視されてきたのがセロトニン仮説である。レセルピン、イミプラミン、イプロニアジドなどの抗うつ薬がセロトニンに影響を与えることや、セロトニン前駆物質のトリプトファン投与をモノアミン酸化酵素阻害薬に併用すると抗うつ作用が増強することから、うつ病患者の脳ではセロトニン神経の機能異常が起きていると考えられた。さらに、セロトニントランスポーターを阻害し再取り込みを抑制することでシナプス間隙のセロトニン濃度を上昇させる SSRI が現在のうつ病治療の第一選択肢となったことで、3種モノアミン神経の中で、セロトニンがストレスの感受性や抵抗性に最も主要な役割を果たしているものと推定されてきた。しかし、ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなどモノアミン神経は脳や脊髄等、それぞれ別領域への投射に加え、相互間に神経繊維連絡路を有し、その密度は全出力繊維の十数%に及ぶという報告がある。また背側縫線核が腹側被蓋野ドパミン神経から入力を受けていることも指摘されている。このことから、モノアミン神経同士がそれぞれのモノアミン神経の活動に相互に影響を与え合っている可能性が示唆されていた。実際、薬理遺伝学によりモノアミン神経活動に介入すると、ドパミン神経とセロトニン神経活動は相互に干渉しあっていることが判明した。

②本研究における慢性的社会敗北ストレスにおける3種モノアミン神経の変化

本研究では、慢性的社会敗北ストレスによって社会活動が低下したラットのモノアミン神経発火を麻酔下において単一細胞ユニット記録で測定し、それを模倣させる形で3種モノアミン神

経活動の相互関係を明らかにしようと試みた。慢性的社会敗北ストレスは、腹側被蓋野ドパミン神経発火が上昇させ、青斑核ノルアドレナリン神経発火を低下させた。さらにストレス負荷と並行してフルオキシセチンを慢性投与すると、腹側被蓋野ドパミン神経と青斑核ノルアドレナリン神経の発火異常は改善された。一方で、背側縫線核セロトニン神経の発火は慢性的社会敗北ストレス負荷で変化しなかったが、フルオキシセチン投与により低下した。DREADD を用いて、薬理遺伝的に背側縫線核セロトニン神経や腹側被蓋野ドパミン神経を慢性的に活性化させた時、社会行動量の変化が引き起こされたが、青斑核ノルアドレナリン神経の発火は影響されなかった。この社会活動量変化は、ドパミン神経活動が主役であると仮定すると、一義的に説明されるものであった。総合すると、この3者モノアミン神経間の活動干渉は、通常の基底状態では、図6にあるような負の上下関係、制御関係にあるものと推察される。本実験が慢性刺激かつ麻酔下で実施されたこともあり、相互の神経核間に存在する局所回路に依存するものと推定している。なお、シナプス前の自己受容体の関与も否定するものではない。



【図6】 腹側被蓋野ドパミン神経の発火操作による臭い嗅ぎ時間とノルアドレナリン神経への影響

③相互作用による3種モノアミン神経発火活動の変化

慢性的社会敗北ストレス負荷時には、ストレス感受性マウスの腹側被蓋野ドパミン神経の側坐核への投射による phasic 発火が増加することが報告されている。また腹側被蓋野から側坐核に投射するドパミン神経の発火を光遺伝学的に亢進させると、社会性の喪失が引き起こされることが分かっている。これらの先行研究から、本研究におけるストレス制御に関与した腹側被蓋野ドパミン神経は、側坐核に投射する群だと推定される。この慢性現象は、ドパミン発火亢進によりストレス耐性が形成されるという急性ストレス反応とは対照的である（図6）。慢性的なストレスでは、相次ぐドパミン発火と放出によりドパミン神経回路の感作が起きていて、ドパミンが効力を失っていると推定される。ただし、ストレスの差により腹側被蓋野ドパミンの発火変化は異なるという報告もあり、その解説は単純ではない。SSRI はセロトニントランスポーターを阻害し、シナプス間隙のセロトニン濃度を上昇させるが、セロトニン濃度が上昇すると、5-HT1A 自己受容体が活性化しネガティブフィードバックによりセロトニン神経細胞発火が減少する。その後抗うつ効果を発揮する5-HT1A 自己受容体が脱感作するまで4週間かかると言われている。今回、セロトニン神経の発火はフルオキシセチン投与により発火低下を示した為、5-HT1A 受容体の脱感作は引き起こされていないと考えられるが、その状態でもドパミン神経発火がすでに低下していたことは注目に値する。

④今後の課題点

本研究にはいくつかの課題が残っている。本研究ではラットのモノアミン神経の発火活動を麻酔下で測定した為、ノルアドレナリン神経を強く支配する大脳の活動が抑制されており、ノルアドレナリン神経活動との関係を正確に把握するにはフリームービングでの生理測定が必要だと考えられる。また、本研究では慢性的社会敗北ストレス負荷が非可逆的脳変化を与えるとの指摘もあり、SSRI の投与をストレス負荷と同時並行で実施したが、本来のうつ病の治療薬理学を考慮すると、うつ状態が完成した後にSSRI を投与してその効果を見るべきである。

本研究から、慢性的社会敗北ストレス下において、ラットの3種モノアミン神経の麻酔下での発火の相互作用と腹側被蓋野ドパミン神経活動の重要性が示唆された。さらに青斑核ノルアドレナリン神経活動や背側縫線核セロトニン神経活動は、社会行動制御システムにおいてドパミン神経の上流に位置している可能性が浮かび上がった。今後、ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン神経のヒエラルキーを更に精密に調査し、それぞれの関係性を明らかにすることで、うつ病の作用機序の解明やより効果的な抗うつ薬の開発に寄与できるものと考えられる。

(4) 謝辞

本研究を行うにあたって共同研究を分担してくれた難波寿明博士、外山英和博士、ならびに動物飼育補助をして頂きました北山栄子助手を含め、本研究に協力していただいた全ての方々へ深く感謝を申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Namba H, Nawa H	4. 巻 未定
2. 論文標題 Post-pubertal difference in nigral dopaminergic cells firing in the schizophrenia model prepared by perinatal challenges of a cytokine, EGF	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 那波宏之
2. 発表標題 ネズミも精神病にかかる？；統合失調症と動物モデル
3. 学会等名 第10回脳科学クラスター・ミニリトリート（徳島大学）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Nawa
2. 発表標題 Neuropathologic implication of pallidal hyperactivity in the auditory abnormality of schizophrenia animal models
3. 学会等名 The 13th World Congress of Biological Psychiatry（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 外山英和、那波宏之
2. 発表標題 Persistent hyper-active VTA dopamine neurons lead to social deficits
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼川真季、外山英和、難波寿明、那波宏之
2. 発表標題 Interaction of three monoaminergic neurons in social stress responses
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	難波 寿明 (Namba Hisaaki) (90332650)	新潟大学・脳研究所・助教 (13101)	
研究 分担者	外山 英和 (Sotoyama Hidekazu) (40377198)	新潟大学・脳研究所・特任助教 (13101)	削除：2018年10月2日

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	鬼川 真季 (Kikawa Kikawa)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------