

令和元年6月11日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14936

研究課題名(和文) 情動ストレス負荷に対する自律神経応答の脳神経回路メカニズム解明

研究課題名(英文) Analysis of neuronal mechanism of autonomic response to emotional stress

研究代表者

山下 哲 (Yamashita, Akira)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：40740197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ストレス負荷時のオレキシン神経活動と自律応答の関係を解析した。光ファイバーを用いて自由行動マウスにおいてオレキシン神経特異的に発現させたG-CaMP6およびmCherry由来蛍光の同時検出が可能な実験系を作製した。同時に循環応答の指標として心拍を測定した。ストレス負荷としては、侵入者同居ストレス、天敵由来のにおい刺激、超音波刺激の3種を用いた。結果、マウスが嫌悪感を感じるストレス負荷を与えた際に、いずれのストレス負荷時にも即座にオレキシン神経活動の上昇が観察された。またこの変化は、ストレス負荷による心拍上昇と相関し、さらには心拍上昇の直前に生じていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス防衛反応は過剰となると様々な疾患に関与する。本来はストレスが過剰であればそれを避けて生活することが望ましいが、現代社会においては多くの場合難しい。このような場合はあらかじめストレスをマネジメントすることで、のちの疾患発症予防につながると考えられる。本研究によりストレスに暴露された“その場”でオレキシン神経活動が上がり、心拍上昇に影響を与えることが明らかとなった。この結果は、ストレス時のオレキシン神経活動上昇をあらかじめ抑えることが、自律神経過剰応答を防ぎ、のちの疾患発症を予防することができる可能性を示している。これは新たなストレスケア戦略の構築に役立つのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether orexin neuron activity would be changed in association with stress-induced autonomic responses. To record two parameters of heart rate and the orexin neural activity from the freely-moving-mouse at the same time in real time, we established the fiber photometry system. Three acute aversive stresses were applied; intruder stress, aversive sound stress, aversive smell stress. The experiment showed that orexin neural activity immediately increased after three aversive stress stimulations. Additionally, they preceded the increases in heart rate. We conclude that an increase in orexin neural activity may be one of the causes but not a result from autonomic changes associated with fight-or-flight response.

研究分野：神経科学、生理学

キーワード：ストレス オレキシン 自律神経 光遺伝学 ファイバーフォトメトリー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物がストレスを認知すると交感神経系が賦活化され、「ストレス防衛反応」と呼ばれる循環・呼吸・体温などの自律機能変化が引き起こされる。動物がストレスを認知してからストレス防衛反応が起こるまでには、様々な神経回路・神経系が関与していることが明らかとなっている。しかしながら、これらの神経系がストレス刺激に暴露された際に、どのようなタイムコースで応答し最終的に自律神経系へ影響を与えているかは、ほとんど明らかとなっていない。この神経回路動作メカニズムが明らかとなれば、過剰なストレスに対して神経科学的にどう対処すべきか、方向性を示す手がかりになると考えられる。

急性的なストレスによる防衛反応には、オレキシン神経が非常に重要であることが知られている。オレキシンペプチドをノックアウトしたマウスを用いた過去の研究などにより、急性ストレス負荷時のストレス防衛反応にはオレキシン神経が必須であることが明らかとなっている (Zhang et. al., Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2006)。現在ではオレキシン神経は動物がストレスを感受してから防衛反応が起こるまでのマスタースイッチとして機能している可能性が提唱されている (Kuwaki. Autonomic Neurosci., 2011)。しかしながら、ストレス誘発自律応答に重要であるオレキシン神経について、急性ストレスに暴露された際に即時的な応答をするか否か、応答は一過性なのか持続するのか、そしてその神経応答には自律応答との関連性はあるのか、不明のままである。

以上のような理由から、急性的なストレスに暴露された「瞬間」の神経系の応答とその自律神経への関わりを明らかとすれば、日々の過剰な自律応答を防ぐ手立てを構築し、予測されるストレスへあらかじめ「マネジメントする」といったことが可能になるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

現代のストレス社会では、過剰なストレスにより自律神経活動が乱れることで、生活の質が低下してしまう。しかし、ストレスを感知してから自律機能応答へ至る神経経路について、未だ詳細は明らかとなっていない。そこで、ストレス誘発自律機能変化の「マスタースイッチ」としての可能性が提唱されているオレキシン神経の活動とストレス誘発自律神経応答について、新たに開発した無麻酔無拘束マウスからの活動記録法を用いて高い時間分解能で因果関係を解析することが、本研究課題の目的である。ストレス防衛反応の指標となる心拍数変化、体温変化といった自律応答は、全ての神経ネットワーク及び末梢組織が保存された個体でのみ生じる生理現象である。また、「ストレス負荷」に対する反応を研究するにあたり、実験動物には極力ストレスがかからない状態で生体反応を記録する必要がある。これらのことから、本研究課題においては「無麻酔下かつ無拘束下での動物個体」を用いた実験が望ましいと考えた。そこで申請者らは自由に行動する無麻酔無拘束マウスにおいてオレキシン神経の活動を記録する実験系の確立を進めてきた。近年、高感度カルシウムプローブ開発によるイメージング技術の目覚ましい発展によって、高い時間分解能で特定神経の活動の記録が可能となってきた。その結果、光ファイバー・高感度カルシウムプローブとして知られる G-CaMP6 を用いることで、無麻酔無拘束マウスからの特定神経活動記録システムの開発に成功し、末梢への侵害刺激に対するオレキシン神経の神経活動をリアルタイム記録し成果を発表することができた。

### 3. 研究の方法

まず初めに G-CaMP6 を用いた無麻酔無拘束マウスからの活動記録法を用いて調べた。オレキシン神経特異的に遺伝子発現させるために、オレキシンの前駆体であるプレプロオレキシンプロモータを用いてオレキシン神経細胞に tTA (テトラサイクリントランスアクチベータ) を発現するマウス (ORX-tTA マウス) を用いた。このマウスの視床下部領域に tTA 依存的に G-CaMP6 および mCherry を発現可能な AAV (AAV-TetO G-CaMP6, AAV-TetO mCherry) を局所感染させ、視床下部オレキシン神経細胞特異的に G-CaMP6, mCherry が発現したマウスを作出した (図 1 A C)。この動物の視床下部領域直上へ刺入した光ファイバーから励起光を照射し、同じファイバーから蛍光を検出することで、*in vivo* 活動記録を行った (図 1)。自律応答は、無麻酔無拘束マウスから心拍数・体温を測定できる無線タイプのテレメトリーシステムを、マウスの腹腔内へ埋め込むことにより記録した。同時に行動量測定するための赤外線センサーとビデオカメラを設置して、オレキシン神経応答と自律応答 (体温上昇、心拍数変動)、動物の

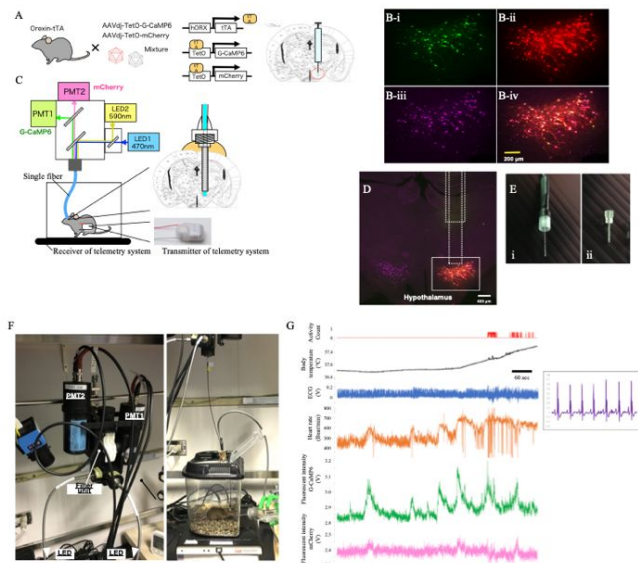


図1 自由行動マウスからオレキシン神経活動を記録するための2chファイバーフォトメトリーシステムの確立

行動変化をリアルタイムモニタリングした。これにより得られたデータを解析することでそれぞれの生体反応パラメータと神経活動との相関関係を評価した。

#### 4. 研究成果

<1> Orexin-tTA;TetO G-CaMP6 マウスを用いた *in vivo* 視床下部オレキシン神経の活動記録

過去の研究において我々はファイバフォトメトリー法を独自に立ち上げることに成功した (Inutsuka et al., Sci. Rep, 2016)。本研究では、精神的な嫌悪ストレスを負荷した際の自律応答およびオレキシン神経がどのような活動を示しているか、その活動様式の手同定を試みるために、上記フォトメトリーシステムの改良を行なった。G-CaMP6 のみの蛍光検出では判断の難しかったノイズ対策として、G-CaMP6 と同時に mCherry 蛍光タンパク質を発現させ、その蛍光も同時計測するシステムに改良した (図 1)。自律応答の指標として心拍数変化・体温変化を測定するために、無線タイプのテレメータをマウス腹腔内に埋め込み、その信号を、蛍光変化を検出するのと同じ A/D コンバータで取り込み、ソフトウェアで解析することにした。これにより高い時間分解能でオレキシン神経活動変化と自律応答変化を比較することができるようになった (図 1G)。

<2> 嫌悪ストレス負荷による自律応答変化に対するオレキシン神経活動の役割

自由に行動するマウスにおいて、心拍数変動とオレキシン神経活動変化を同時記録しながら、嫌悪ストレス負荷を与えた際の各指標の変化について調べた。嫌悪ストレス負荷としては、記録中の被験マウスのケージに他個体を同居させる「侵入者同居ストレス負荷」、マウスが嫌いとなる周波数領域の音を聞かせる「嫌悪音負荷」、マウスが本能的に忌避行動を示すことが知られている、天敵の糞に多く含まれている物質の一つである TMT の臭いを嗅がせる「嫌悪臭い負荷」の3種類のストレス負荷を行なった。結果、3種いずれのストレス負荷時において、ストレス負荷後、即座に心拍数上昇および G-CaMP6 蛍光強度の上昇が見られた (図 2)。また、ストレス負荷後の心拍数上昇と G-CaMP6 蛍光強度上昇の時間関係についても解析を行なったところ、心拍変動に先駆けてオレキシン神経活動上昇が起きていることも明らかとなった (図 3)。これらのことから、嫌悪ストレスにより生じる自律応答変化は、オレキシン神経活動に影響されている可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Moriya S, Yamashita A, Nishi R, Ikoma Y, Yamanaka A, Kuwaki T. Acute nociceptive stimuli rapidly induce the activity of serotonin and noradrenalin neurons in the brain stem of awake mice. IBRO reports. 査読あり, 2019, in press

Moriya S, Yamashita A, Kawashima S, Nishi R, Yamanaka A, Kuwaki T. Acute aversive stimuli rapidly increase the activity of ventral tegmental area dopamine neurons in awake mice. Neuroscience. 査読あり, 2018, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.06.027. Epub 2018 Jun 27.

Futatsuki T, Yamashita A, Ikbarm KN, Yamanaka A, Arita K, Kakihana Y, Kuwaki T. Involvement of orexin neurons in fasting- and central adenosine-induced hypothermia. Scientific Reports. 査読あり, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21252-w.

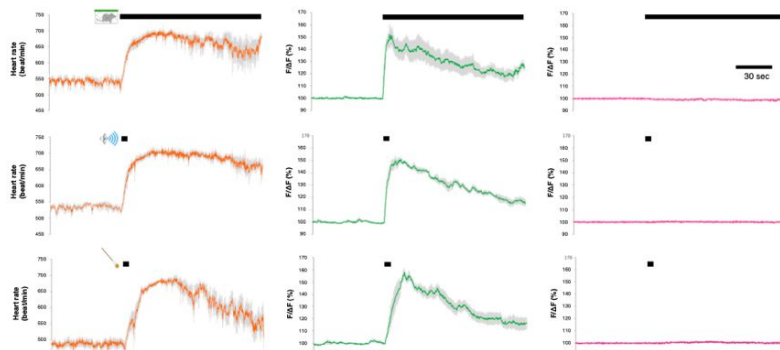


図2 嫌悪ストレス負荷による心拍数変動とオレキシン神経活動変化  
 上段：侵入者同居ストレス負荷 中段：嫌悪音負荷 下段：嫌悪臭い負荷  
 左列：心拍変動 中列：GCaMP6蛍光変動 右列：mCherry蛍光変動

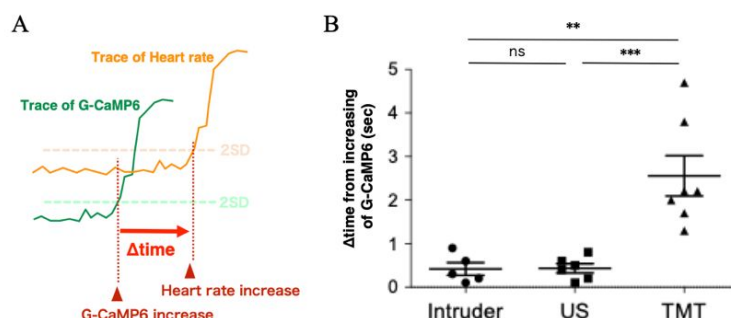


図3 ストレス後の心拍上昇とGCaMP6蛍光上昇の時間関係解析  
 ストレス負荷後に心拍変動が2SDを超えた時点に基づいてGCaMP6蛍光強度が2SDを超えた時点の時間差をΔtimeとして解析した。全ての試行においてΔtime値は正の値、すなわちGCaMP6蛍光強度変化の方が心拍変動よりも早く生じていることがわかった。

Watanabe M, Narita M, Hamada Y, Yamashita A, Tamura H, Ikegami D, Kondo T, Shinzato T, Shimizu T, Fukuchi Y, Muto A, Okano H, Yamanaka A, Tawfik VL, Kuzumaki N, Navratilova E, Porreca F, Narita M. Activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve injury or bone cancer. *Molecular Pain*. 査読あり, 2018, doi: 10.1177/1744806918756406. Epub 2018 Jan 22.

〔学会発表〕(計9件)

Yamashita A, Moriya S, Nishi R, Ikoma Y, Yamanaka A, Kuwaki T. Acute nociceptive stimuli induce the activity of serotonin and noradrenalin neurons in awake mice. FAOPS 2019, 2019年

山下哲、守谷俊平、川島茂隆、西龍星、山中章弘、桑木共之「急性の有害刺激は覚醒マウスのVTAドーパミン神経活動を即座に増加させる」第41回日本神経科学大会、2018年

山下哲、守谷俊平、西龍星、上之蘭知邑、山中章弘、桑木共之「ストレス防衛反応に対する視床下部オレキシン神経の機能解明のための2chファイバーフォトメトリーシステムの開発」第11回鹿児島神経科学研究会、2018年

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の関係」第95回日本生理学会、2018年

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年

山下哲、守谷俊平、上之蘭知邑、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研究会、2017年

Yamashita A, Moriya S, Kaminosono J, Kajiya K, Yamanaka A, Kuwaki T. Association between the orexin neural activity and the autonomic response to an acute aversive stimulation. *Optogenetics RSJ* 2017, 2017年

Yamashita A, Moriya S, Nishi R, Yamanaka A, Kuwaki T. Measurement of neuronal activity in conscious animal by in vivo photometry system. ISAN 2017, 2017年(シンポジウム発表)

山下哲、山中章弘、桑木共之「オレキシンを基軸としたストレス誘発自律応答神経回路の解明」第40回日本神経科学大会、2017年

〔図書〕(計0件)

〔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  
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：桑木 共之  
ローマ字氏名：Kuwaki Tomoyuki

研究協力者氏名：山中 章弘  
ローマ字氏名：Yamanaka Akihiro

※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。