

令和元年6月9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：17K16387

研究課題名(和文) 中枢神経におけるセロトニン神経のリアルタイムにおける測定解析

研究課題名(英文) Measurement analysis of serotonin neurons in central nervous system under real time condition

研究代表者

守谷 俊平(MORIYA, SHUNPEI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60647139

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)：中枢神経系内の主要な神経であるドーパミン神経は腹側被蓋野に多く存在する。我々は、急性の嫌悪ストレス刺激を負荷した際の腹側被蓋野におけるドーパミン神経活動の変動を測定した。測定には、高い時間分解能を有するカルシウムイメージングによるファイバーフォトメトリーシステムを用いた。Cre-loxPシステムによるDAT-Creマウスを採用して、ドーパミン神経特異的に測定した。測定指標を緑色蛍光蛋白であるG-CaMP6の蛍光強度として解析した。種々の負荷時に非常に短い潜時でドーパミン神経活動が上昇した。所見については、学術論文及び学会にて発表を施行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、急性の嫌悪刺激が急速に意識清明のマウスの腹側被蓋野におけるドーパミン神経活動を上昇させることを測定結果から明らかにした。測定に非常に高い時間分解能を有しているファイバーフォトメトリーを使用しており、腹側被蓋野のドーパミン神経活動と疼痛や精神疾患への治療方法を関連させて検討する所見として有用である。明確に瞬間的な神経活動を評価できる点でもファイバーフォトメトリーが非常に有用なツールであることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Dopamine neuron is main neuron in central nervous system and mainly located in ventral tegmental area. The fluctuation of ventral tegmental area dopamine neuronal activity was measured when acute noxious stimuli were given. We utilized a fiber photometry system which has high time resolution by calcium imaging system. We measured specific dopamine neuronal activity using DAT-Cre mice by Cre-loxP system. Fluorescence intensity of G-CaMP6, green fluorescence protein, was analyzed as measurement index. Various stimuli resulted in a rapid increase in the activity of VTA dopamine neuron. We published the paper and presented these findings at a conference.

研究分野：精神神経科学

キーワード：神経活動 ドーパミン神経 カルシウムイメージング ファイバーフォトメトリー

### 1. 研究開始当初の背景

セロトニン(5-HT)は気分、不安などの生理機能の調節に必須の役割を持つ神経伝達物質である。中枢神経系において最も多数のセロトニン神経が集合している神経核が縫線核であり、同部位から、海馬、扁桃体、歯状回、大脳皮質、視床、視床下部などの多くの主要な脳部位に上行性に軸索を投射しており、それぞれの部位での5HT神経活動が生理機能に影響を与えることが知られている。臨床においては、5-HT神経シナプス領域の受容体を標的とするSSRI(selective serotonin reuptake inhibitor)、NaSSA(Noradrenergic and Serotonergic Antidepressant)、5-HT<sub>1A</sub>受容体作動薬などが気分障害や不安障害の治療において中心的役割を担っている。このように5-HT神経活動が中枢神経系の生理機能において重要であることが示唆されてきているが、その詳細な役割や活動パターンについては不明な点が多い。この点についてより詳細に調べるためには、実験動物個体の神経ネットワークが保存され、意識清明下のストレスフリーな状態において、リアルタイムに神経活動が測定されることが最善である。そこで、申請者らは2016年5月より無麻酔による意識清明下の自由に行動する動物個体において、5-HT神経活動を記録する実験系の確立をした。ある一時点での特定の条件設定のもとで、その瞬間や直後の5-HT神経活動が明らかとなることで、5-HT神経が病態の中心を担っているとされている気分障害や不安障害の病態の理解が進み、さらに上述した薬物のより適切な選択への一助となるのではないかと考え本研究の計画へと至った。

### 2. 研究の目的

生理機能や精神機能は中枢神経系の様々な神経伝達物質の状態に依存し、ドーパミン(DA)はモノアミン神経伝達物質の一つとして重要な機能を担っている。脳幹においてVTAはDA神経の主要な起始核として重要な箇所であり、種々の精神疾患や症候に関与していると言われている。神経科学領域の研究手法において最近ではカルシウムイメージングが用いられるようになり、高い時間分解能を保持し、特異的な神経活動をリアルタイムに測定可能なファイバーフォトメトリー法が開発された。そこで、本研究では我々は立ち上げたファイバーフォトメトリーシステムを用いて、意識清明なマウスのVTADA神経活動を、急性の嫌悪刺激を負荷した際にどのように変動するかを測定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

*in vivo*カルシウムイメージング法を5-HT神経及びDA神経特異的に適用して、尾部把持刺激、侵入者ストレスマウス刺激、音刺激、嫌悪嗅覚刺激を与えた際のDR、延髄縫線核での5HT神経活動、及び、腹側被蓋野(VTA)でのDA神経活動をリアルタイムに高度な時間分解能で測定可能なファイバーフォトメトリー法において解析する(図1)。無麻酔による意識清明下に自由に行動する動物においてリアルタイムに測定できる点で従来の方法とは異なっており、この方法により中枢神経系における5-HT神経活動、及び、DA神経活動と生理機能の役割や発現パターンの生理学的連結が明らかになると考えられる。測定指標として用いる蛍光蛋白であるG-CaMP6をマウスの測定箇所に発現させる方法として、5-HT神経系においてはTph-tTAマウスを用いたTeto、システム、DA神経系においてはDAT-Creマウスを用いたFLEXシステムを用いて、アデノ随伴ウイルスの投与を介してG-CaMP6を特異的に測定箇所にあらかじめ発現させた(図2)。

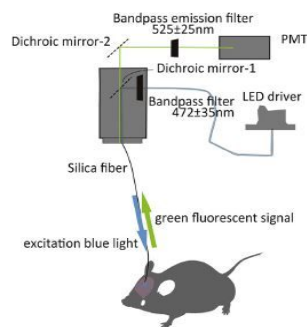


図1:ファイバーフォトメトリー

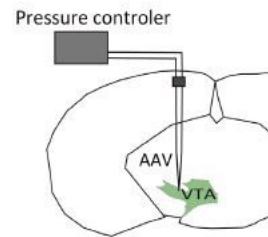


図2:アデノ随伴ウイルス投与

### 4. 研究成果

中枢神経系内の主要な神経であるDA神経は腹側被蓋野に多く存在する。我々は、急性の嫌悪ストレス刺激を負荷した際の腹側被蓋野におけるドーパミン神経活動の変動を測定した。測定には、高い時間分解能を有するカルシウムイメージングによるファイバーフォトメトリーシステムを用いた。Cre-loxPシステムによるDAT-Creマウスを採用して、ドーパミン神経特異的に測定した(図3)。測定指標を緑色蛍光蛋白であるG-CaMP6の蛍光強度として解析した。種々の負荷時に非常に短い潜時でドーパミン神経活動が上昇した(図4)。所見については、学術論文及び学会にて発表を施行した。

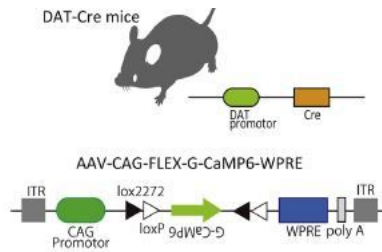


図 3: DAT-Cre マウスと FLEX システム

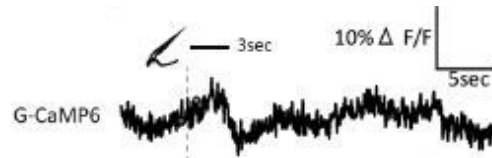


図 4: 急性尾部把持刺激の G-CaMP6 シグナル上昇

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Moriya Shunpei, Yamashita Akira, Kawashima Shigetaka, Nishi Ryusei, Yamanaka Akihiro, Kuwaki Tomoyuki, Acute Aversive Stimuli Rapidly Increase the Activity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Awake Mice, *Neuroscience*, 査読有、386 巻、2018、16-23  
DOI:10.1016/j.neuroscience.2018.06.027
- Miyagawa Taku, Khor Seik-Soon, Toyoda Hiromi, Kanbayashi Takashi, Imanishi Aya, Sagawa Yohei, Kotorii Nozomu, Kotorii Tatayu, Moriya Shunpei, Tokunaga Katsushi et al., A variant at 9q34.11 is associated with HLA-DQB1\*06:02 negative essential hypersomnia, *Journal of Human Genetics*, 査読有、63巻、2018、1259-1267  
DOI:10.1038/s10038-018-0518-8

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① Yamashita Akira, Moriya Shunpei, Kawashima Shigetaka, Nishi Ryusei, Yamanaka Akihiro, Kuwaki Tomoyuki, Acute Aversive Stimuli Rapidly Increase the Activity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons in Awake Mice, 第 41 回日本神経科学大会、2018
- Yamashita Akira, Moriya Shunpei, Nishi Ryusei, Ikoma Yoko, Yamanaka Akihiro, Kuwaki Tomoyuk, Acute nociceptive stimuli rapidly the activity of serotonin and noradrenalin neurons in the brain stem of awake mice, 第 96 回日本生理学会大会、2019

〔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

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

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：守谷 俊平

ローマ字氏名：MORIYA SHUNPEI

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：客員研究員

研究者番号 (8 桁)：60647139

(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：山下 哲

ローマ字氏名：YAMASHITA AKIRA

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。