

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19879

研究課題名(和文) シナプス長期増強に着目した不安を形成する新たな神経分子機構

研究課題名(英文) The neural mechanism of anxiety related long-term potentiation

研究代表者

古賀 浩平 (KOGA, KOHEI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50768455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：前帯状回は情動的な側面、中でも不安に関わる。我々は、前帯状回のシナプス前長期増強(pre-LTP)が不安様行動のシナプス可塑性であることに着目し、この神経機構を調べた。pre-LTPは、タンパク質の分解に関わるユビキチンプロテアソームシステム(UPS)の阻害薬で抑制され、ユビキチンリガーゼE3のSCRAPPERの遺伝子改変マウスはpre-LTPを減弱した。また、不安に関わるノルアドレナリンが興奮性シナプス伝達で可塑的变化を形成した。以上から、不安のシナプス可塑性である前帯状回のpre-LTPは、UPSを介した分子機構であること、ノルアドレナリンがシナプス可塑性を形成す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

前帯状回は、情動の形成に重要な役割を果たす大脳皮質であり、不安に関与することがヒトイメージングで明らかになっている。我々が明らかにしたシナプスレベルの解析では、前帯状回のpre-LTPは興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を促進することから、この神経伝達物質の放出が不安様行動の形成に関わる可能性が考えられる。本研究でpre-LTPやシナプス可塑性を制御する機構の詳細が明らかになると、不安障害や慢性疼痛による不安の増悪に対する創薬や治療法の開発につながっていく。

研究成果の概要(英文)：The anterior cingulate cortex (ACC) is a critical cortical area for various emotions, especially anxiety like behaviors. We focused on the presynaptic long-term potentiation (pre-LTP) that occurs to glutamatergic transmission in the ACC, and studied the detailed molecular mechanisms related to anxiety-like behaviors. Since an ubiquitin proteasome system (UPS) plays the role for the degradation of protein, we considered the UPS necessary for the cortical pre-LTP. Bath application of a proteasome inhibitor MG-132 inhibited the cortical pre-LTP. However, MG-132 did not affect basal synaptic transmission. An ubiquitin ligase E3, SCRAPER knockout mice reduced pre-LTP. Furthermore, noradrenaline produced synaptic plasticity on glutamatergic transmission. These results suggest that the pre-LTP in the ACC which is related to anxiety like behaviors requires the UPS, especially through SCRAPER.

研究分野：疼痛学

キーワード：シナプス長期増強

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不安障害を患う患者は 55 万人以上に上り年々増え続けており、Quality of Life の低下を引き起こす神経症として臨床で問題となっている (2013 年、厚生労働省発表)。これまでの不安の解明は、ヒトのイメージング法を用いた脳関連部位の同定もしくは不安様行動テストを用いた動物実験が主であった。しかしながら、これらの研究方法では時間分解能や空間分解能が不十分なため、不安を発症する神経基盤はいまだに解明されていない。

我々は、不安は脳内でシナプスの長期記憶 およびシナプス可塑性を形成するのではないかと仮説を立て、実験動物を用いてこれまで研究を行ってきた。不安に重要な役割を果たす前帯状回に着目し、シナプス前終末の長期増強 presynaptic long-term potentiation: pre-LTP の機序を同定した (Koga et al., J Neurosci 2015)。さらに、この前帯状回の pre-LTP が不安様行動のシナプス可塑性であることを発見した (Koga et al., Neuron 2015; Koga et al., Current Neuropharmacol 2016)。

本研究では、不安のシナプス可塑性であるこの前帯状回の pre-LTP に着目し、これまで未解明である ユビキチンプロテアソームシステム (Ubiquitin Proteasome System; UPS) を介した神経分子機構や慢性疼痛による不安のシナプス可塑性の発達を調べた (Yao et al., Cell 2007)。また、不安に関わる神経伝達物質であるノルアドレナリンに着目して、前帯状回に投射するノルアドレナリンがシナプス可塑性を形成するかを検討した。

2. 研究の目的

(1) ユビキチンプロテアソームシステムを介する前帯状回 pre-LTP の神経分子機構; 前帯状回の pre-LTP は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を持続的に促進することが明らかとなっている。従って、この神経伝達物質の放出を制御する機構が、pre-LTP における分子機構の解明につながると考えた。特に、神経伝達物質の放出機構に関わるタンパク質を分解する役割を持つユビキチンプロテアソームシステムに着目して pre-LTP の分子機構を調べた。

(2) 慢性疼痛の発達に伴うシナプス可塑性の解析; 痛みの感覚入力と不安を含む負の情動は、相互にかつ複雑に影響し合っていることが考えられる。その過程にはシナプス可塑性の形成が推測されるが、痛みが急性期から慢性期に進行して維持される時期と不安様行動が増大していく時間的な関係をシナプスレベルで調べた研究は少ない。従って、前帯状回の pre-LTP の形成を慢性炎症モデル作製後の初期と中期および神経損傷モデルの中期と後期のそれぞれの時期で調べた。

(3) 前帯状回に投射するノルアドレナリン神経によるシナプス可塑性の解明; ノルアドレナリン神経は、青斑核から脊髄へ投射して痛みを和らげる下行性抑制系としての機能のほか、青斑核から脳全体に投射する上行性の役割がある存在する。そして、ノルアドレナリンの分泌異常が意欲の低下や不安感につながることを示されている。従って、この青斑核から前帯状回に投射するノルアドレナリン神経が前帯状回のシナプス伝達にどのような可塑的变化を形成するか、そして前帯状回のノルアドレナリン神経を活性化した時の行動表現を調べた。

3. 研究の方法

(1) ユビキチンプロテアソームシステムを介する前帯状回 pre-LTP の神経分子機構; オスの成熟マウス (8-12 週齢、C57/BL6) を用いて、冠状断脳スライス標本作製した。前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、保持電位を -60 mV に固定して興奮性シナプス後電流を記録した。刺激電極を記録細胞近傍に留置して誘発性の興奮性シナプス後電流を記録した。そして、プロテアソームの阻害薬である MG-132 を灌流投与した時に、前帯状回の pre-LTP の導入は抑制されるのか、また正常のシナプス伝達に影響するかを調べた。さらに、ユビキチンリガーゼ E3 の 1 つである SCRAPPER の遺伝子改変マウスを用いて、SCRAPPER の野生型、ヘテロ型、ノックアウトマウスの前帯状回で pre-LTP は形成されるかについて調べた。

(2) 慢性疼痛の発達に伴うシナプス可塑性の解析; 完全フロインドアジュバンドをオスの成熟マウス (8-12 週齢、C57/BL6) の左後肢に投与し、モデル作成後の初期と中期を実験に用いた。また、総腓骨神経を結紮した神経損傷モデルを作製して、中期と後期をそれぞれ電気生理学的解析に用いた。それぞれの慢性疼痛モデルの各時期において前帯状回 pre-LTP の形成を調べるために、冠状断脳スライス標本作製して前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、記録細胞の近傍に留置した刺激電極を用いて 2 Hz の低頻度刺激を 2 分間与えた。Pre-LTP の解析と併せて paired pulse ratio も同時に記録した。

(3) 前帯状回に投射するノルアドレナリン神経によるシナプス可塑性の解明; 成熟マウス (オス、8-12 週齢、C57/BL6) を用いて冠状断脳スライス標本作成し、第 II/III 層の錐体細胞から

ホールセルパッチクランプ記録を行った。保持電位を-60 mV に固定して興奮性シナプス後電流を記録し、低濃度 (10 μ M) および高濃度 (50 μ M) のノルアドレナリンを灌流投与した時の、自発性興奮性シナプス後電流を解析した。特に、自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度と振幅、基線の変化を解析した。また、保持電位を 0 mV に固定して抑制性シナプス伝達を記録し、低濃度 (10 μ M) のノルアドレナリンを灌流投与した時に自発性抑制性シナプス後電流は変化するかについても解析した。次に、ノルアドレナリン受容体の阻害薬を用いて、興奮性シナプス伝達に關与するノルアドレナリン受容体をそれぞれ同定した。さらに、カルシウムイオンによって活性化するアデニル酸シクラーゼのタイプ 1 とタイプ 8 のノックアウトマウスを用いて、同定したノルアドレナリン受容体の下流シグナル伝達を調べた。最後に、光遺伝学を用いて、青斑核にチャネルロドプシン 2 を組み込んだアデノ随伴ウイルスを局所投与し 4 週間後に、前帯状回に青色光 (5 Hz もしくは 20 Hz) を与えた時に示す行動表現を解析した。

4. 研究成果

(1) ユビキチンプロテアソームシステムを介する前帯状回 pre-LTP の神経分子機構; 前帯状回を含む脳スライス標本を作製し、第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。そして記録細胞の近傍に留置した刺激電極を用いて誘発性の興奮性シナプス後電流を解析した。プロテアソームの阻害薬である MG-132 の灌流投与は、前帯状回の pre-LTP の導入を抑制した。一方、MG-132 は正常のシナプス伝達には影響しなかった。これらの結果から、プロテアソームが pre-LTP を制御している可能性が示された。さらに、ユビキチンリガーゼ E3 の 1 つである *SCRAPPER* の遺伝子改変マウスを用いて、*SCRAPPER* がこの長期増強に関わっているかを調べた。その結果、*SCRAPPER* 欠損マウスは、pre-LTP を抑制した。これらの結果から、不安のシナプス可塑性である前帯状回の pre-LTP は、ユビキチンプロテアソームシステムによって制御され、特に *SCRAPPER* を介したシナプス可塑性であることが明らかとなった。

(2) 慢性疼痛の発達に伴うシナプス可塑性の解析; 完全フロイドアジュバンドをマウスの左後肢に投与した炎症性モデルの初期と中期、そして、総腓骨神経を結紮した神経損傷モデルの中期と後期を作製した。それぞれの慢性疼痛モデルの初期、中期、後期の各時期において前帯状回 pre-LTP の形成を調べるために、脳スライス標本を作製して前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、記録細胞の近傍に留置した刺激電極を用いて 2 Hz の低頻度刺激を 2 分間与え、各モデルの各時期で pre-LTP を形成するかを調べた。その結果、慢性炎症性モデルの初期では、pre-LTP が、観察されなかった。この結果は、慢性炎症性モデルの初期では pre-LTP がすでに形成されているためもうこれ以上 pre-LTP が形成できない状態であると推測される。一方、慢性炎症の中期では、pre-LTP が形成された。この pre-LTP の形成に伴い、paired pulse ratio も変化した。この結果は、炎症の中期では前帯状回の興奮性シナプス伝達が正常に戻りつつあることを示唆している。次に、神経損傷モデルの中期は、pre-LTP が認められなかったが、後期は pre-LTP が形成された。一方、神経損傷モデルの後期における pre-LTP の形成時は、paired pulse ratio に変化がなかった。以上の結果は、種類の異なる疼痛モデルは時期に応じて異なるシナプス可塑性を前帯状回において形成する可能性を示しており、このシナプス可塑性の違いが、慢性疼痛による不安様行動の増悪と関係があると推測される。

(3) 前帯状回に投射するノルアドレナリン神経によるシナプス可塑性の解明; 成熟マウスを用いて脳スライス標本を作成し、第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。そして、低濃度 (10 μ M) のノルアドレナリンを灌流投与すると、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を促進した。一方、低濃度のノルアドレナリンの灌流投与は、抑制性シナプス伝達には影響しなかった。興奮性シナプス後電流を記録して高濃度 (50 μ M) のノルアドレナリンを投与すると、inward currents を引き起こした。さらに、これらの反応に関わるノルアドレナリンが作用する受容体と下流のシグナル伝達を調べると、グルタミンの放出促進はシナプス前終末に発現する β 受容体-アデニル酸シクラーゼ VIII 型、inward currents はシナプス硬膜に発現する $\alpha 1$ 受容体-アデニル酸シクラーゼ I 型を介することが明らかとなった。さらに、光遺伝学を用いて、青斑核から前帯状回に投射するノルアドレナリン神経を選択的に頻回刺激によって活性化すると、機械刺激に対する過敏行動および引っ掻き行動を誘発した (Koga et al., Mol Brain 2020)。

< 引用文献 >

- Koga et al., J Neurosci 2015, 35(5):2033-43.
- Koga et al., Neuron 2015, 85(2):377-89.
- Koga et al., Current Neuropharmacol 2016, 14(5):427-34.
- Yao et al., Cell 2007, 130(5):943-57.
- Koga et al., Mol Brain 2020, 13(1):49:1-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Uta D, Yoshimura M, Koga K. | 4. 巻 160 |
| 2. 論文標題 Chronic pain models amplify transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor responses in adult rat spinal dorsal horn. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neuropharmacology. | 6. 最初と最後の頁 1~10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2019.107753. | 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 - |
| 1. 著者名 Uta D, Kato G, Doi A, Andoh T, Kume T, Yoshimura M, Koga K. | 4. 巻 512(2) |
| 2. 論文標題 Animal models of chronic pain increase spontaneous glutamatergic transmission in adult rat spinal dorsal horn in vitro and in vivo. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 352~359 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.051. | 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 - |
| 1. 著者名 Koga K, Yamada A, Song Q, Li XH, Chen QY, Liu RH, Ge J, Zhan C, Furue H, Zhuo M, Chen T. | 4. 巻 13(1) |
| 2. 論文標題 Ascending noradrenergic excitation from the locus coeruleus to the anterior cingulate cortex. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Mol Brain. | 6. 最初と最後の頁 1~14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00586-5. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Koga K, Matsuzaki Y, Migita K, Shimoyama S, Eto F, Nakagawa T, Matsumoto T, Terada K, Mishima K, Furue H, Honda K | 4. 巻 1704 |
| 2. 論文標題 Stimulating muscarinic M1 receptors in the anterior cingulate cortex reduces mechanical hypersensitivity via GABAergic transmission in nerve injury rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Brain Research | 6. 最初と最後の頁 187~195 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.10.013 | 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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Koga K, Shimoyama S, Yamada A, Furukawa T, Nikaido Y, Furue H, Nakamura K, Ueno S | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Chronic inflammatory pain induced GABAergic synaptic plasticity in the adult mouse anterior cingulate cortex | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Pain | 6. 最初と最後の頁 1~14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806918783478 | 査読の有無 無 |
| 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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koga K, Shimoyama S, Yamada A, Furue H, Nakamura K, Ueno S. |
| 2. 発表標題 Chronic pain model alters GABAergic synaptic transmission in the mice anterior cingulate cortex. |
| 3. 学会等名 The 9th FAOPS (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Koga K |
| 2. 発表標題 Functional roles of presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex for pain and anxiety. |
| 3. 学会等名 第40回 日本疼痛学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 古賀浩平 |
| 2. 発表標題 前帯状回のシナプス前終末における長期増強の形成と不安様行動 |
| 3. 学会等名 第27回 神経行動薬理若手研究者の集い (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Koga K, Yao I, Setou M, Furue H, Zhuo M |
| 2. 発表標題 The ubiquitin proteasome system regulates presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex |
| 3. 学会等名 第95回 日本生理学会大会 (高松) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koga K, Yao I, Setou M, Furue H, Zhuo M |
| 2. 発表標題 SCRAPPER regulates spontaneous release and presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex |
| 3. 学会等名 第40回 日本神経科学会年会 (千葉) |
| 4. 発表年 2017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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |