

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15533

研究課題名（和文）情動を制御する眼窩前頭皮質－扁桃体回路の発達様式とストレスが与える影響の解明

研究課題名（英文）Stress-induced effects on the development of orbitofrontal-amygdala circuit.

研究代表者

國石 洋（Kuniishi, Hiroshi）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・リサーチフェロー

研究者番号：60805034

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）：ストレス関連精神疾患の神経メカニズムを調べるため、情動制御に重要である眼窩前頭皮質(OFC)から扁桃体基底外側核(BLA)に投射する回路に対し、ストレスが与える影響を調べた。マウスにおけるOFC-BLAシナプス伝達を単離し、成熟期または幼少期ストレスが与える影響を検討した結果、ストレス負荷によりAMPA/NMDA電流比の変化などの後シナプス特性変化が見られた。また、行動中のマウスのOFC-BLAシナプス伝達の人工的操作により、この回路はうつ様行動や向社会行動を制御することが明らかとなった。これらの結果より、ストレスはOFC-BLA回路の情報伝達を変化させ、情動変容を引き起こすことが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウスをモデルに、幼少期や成熟期のストレスが眼窩前頭皮質 - 扁桃体回路のシナプス機能に悪影響を与え、情動の変容を招くことを明らかにした。この結果は、ストレス関連精神疾患の病態解明に資するものであり、薬剤やニューロモジュレーションをによる眼窩前頭皮質-扁桃体回路の神経可塑性への介入が、幼少期や成熟期のストレスが原因となる精神疾患症状に対する治療法として有用である可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：The present study explores the effect of stress on the orbitofrontal-basolateral amygdala circuit in mice. First we optogenetically isolated the OFC-BLA excitatory synaptic response in mice and examined effects of stress. We found that the repeated tail-shock stress or adolescent social isolation stress induced changes in postsynaptic properties in the OFC-BLA synapse in mice. Next, we optogenetically manipulated the OFC-BLA synaptic transmission in behaving mice, and found that the OFC-BLA circuit modulated depression-like behavior and social behavior. Our finding suggest that stress disrupts information processing in the OFC-BLA circuit, and it contributes to emotional change in stress-related psychiatric disorders.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス 眼窩前頭皮質 扁桃体 シナプス 光遺伝学 AMPA受容体 幼少期ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過度なストレスに長期間さらされ続けることは、大うつ病、PTSD など種々のストレス関連疾患の発症リスクを増加させる。その背景として、ストレスへの暴露がグルココルチコイドや神経活動依存的なメカニズムを介し、情動を制御する神経回路のシナプス伝達などの情報処理機能に様々な影響を及ぼすことが推測されている^[1, 2]。特に、乳児期から思春期にかけての幼少時期は脳高次機能を担う神経回路の発達が盛んな時期であるため、児童虐待のような過剰なストレス暴露は、その機能発達に重篤な悪影響を与え、様々な精神疾患症状につながると思われる。実際に、児童虐待等の幼少期の過剰なストレスは治療抵抗性うつ病や一部のパーソナリティ障害などの精神疾患のリスクを増加させる^[3, 4]ことに加え、実験動物においても、幼少期のストレス操作により情動行動異常がもたらされることが報告されている^[5]。しかし、幼少期のストレス経験が情動を制御する神経回路の発達にどのような影響を及ぼし、これらの精神疾患症状を招くのか、その詳細な神経メカニズムについては未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、ストレスが影響し、情動制御の異常をもたらしうる神経回路として、前頭葉腹側部の眼窩前頭皮質 (OFC: Orbitofrontal cortex) を中心とした神経回路に注目した。OFC は様々なモダリティの感覚入力を受け、社会性および正と負の情動制御に関与すると推測されている。加えて、OFC は情動発現に重要な機能を持つ扁桃体や視床下部へ密な神経投射を送っている^[6]。さらに、うつ病患者や児童虐待を経験した精神疾患患者において、眼窩前頭皮質 (OFC) と扁桃体間の結合性の異常が報告されている^[7, 8]。前頭葉-扁桃体投射経路は乳児期から思春期にかけての幼少期に発達するため^[9]、幼少期のストレスが OFC-扁桃体回路の発達に悪影響を及ぼすことで、その情動制御機能の異常をもたらし、精神疾患の症状を招く可能性が示唆される。本研究課題では、この可能性を検討するため、マウスに対する成熟期あるいは幼少期のストレス操作が、OFC から扁桃体外側基底核 (BLA) に投射する経路のシナプス伝達に与える影響と、ストレスによる情動行動変化への寄与を調べた。

3. 研究の方法

(1) 光遺伝学とパッチクランプ記録の併用による OFC-BLA シナプス伝達の単離計測

OFC から扁桃体に投射する軸索の走行は複雑であるため、スライス記録でよく用いられてきた電極によるシナプス伝達誘発による単離記録は不可能である。そこで、光遺伝学とパッチクランプ法を利用し、OFC-BLA シナプス伝達を単離した。マウスの OFC (内側部、または外側部) に AAV ベクター (AAV-CaMKII α -ChR2 (H134R)-EYFP) を局所注入し、4 週間以上の生存期間ののちに投射先の扁桃体を含む急性スライス標本を作製した。このスライス上の錐体細胞よりホールセルパッチクランプ記録を行い、青色光 (470 nm) を照射することで、OFC から BLA に投射する興奮性の単一シナプス電流を単離記録した (図 1)。

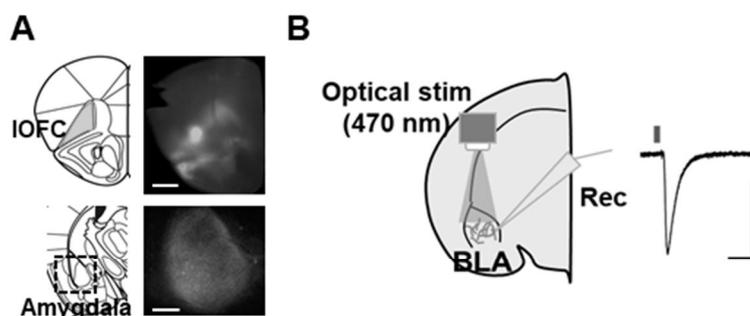


図1、光遺伝学とパッチクランプ記録による OFC-BLA シナプス伝達の計測

(A) AAV インジェクションサイト (上段、外側 OFC) における ChR2-EYFP 発現と、投射先の扁桃体 BLA 核における投射軸索蛍光 (下段)

(B) 青色光照射により誘発された興奮性の OFC-BLA シナプス電流 (スケール: 50 ms、100 pA)

(2) ストレス負荷操作、行動解析試験

成熟期のマウスに対するストレス操作として、3 日間の Repeated tail-shock stress^[10] を付加した。また、幼少期のストレスとして離乳後社会隔離ストレス^[11] (生後 3-8 あるいは 9 週齢の期間) を付加した。これらのストレス負荷動物の成熟後にシナプス伝達の解析およびうつ様行動評価試験 (強制水泳試験、尾懸垂試験) 、社会性評価試験を行った。

(3) 行動下のマウスにおける光遺伝学/化学遺伝学的な OFC-BLA 経路の神経伝達操作

マウスの OFC (内側部、または外側部) に AAV ベクター (AAV-CaMKII α -ChR2 (H134R)-EYFP、AAV-CaMKII α -eNpHR 3.0-EYFP) を局所注入した後、投射先の BLA に LED につながる光ファイバー (Teleopto, バイオリサーチセンター) を留置した。試験中のマウスに対し、光

ファイバーを介して青色光 (470 nm) または黄色光 (590 nm) を照射することで、光遺伝学による OFC-BLA 神経伝達の活性化/抑制を行った。また、マウスの OFC を AAV ベクター (AAV-CaMKIIa-hM4D(Gi)-mCherry) を局所注入した後、投射先の BLA に試薬投与用のガイドカニューレを留置した。行動試験前のマウスに、ガイドカニューレを介して Clozapine N-oxide (CNO) を投与することにより、化学遺伝学による OFC-BLA 神経伝達の抑制を行った。

4. 研究成果

(1) 成熟期のストレスに対する外側 OFC-BLA シナプス特性の変化と情動行動変化への寄与

まず、幼少期ストレス負荷の予備的検討として、成熟後のストレスが OFC-BLA シナプス伝達に与える影響を検討した。成熟後のマウスに対し、Repeated tail-shock stress を与えると、体重の減少、強制水泳試験・尾懸垂試験における無動の増加に加え、OFC 外側領域における c-Fos 陽性細胞数の増加および錐体細胞の発火頻度増加が観察された (第 41 回日本神経科学大会 2018、6th Congress of AsCNP 2019 にて学会発表)。加えて OFC 外側部から BLA へ投射するシナプス伝達の評価を行った結果、ストレス負荷動物では AMPA/NMDA 電流比の増加及び、AMPA 受容体由来電流の内向き整流性の増加 (Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の挿入) などのポストシナプス特性の変化が観察された (図 2)。

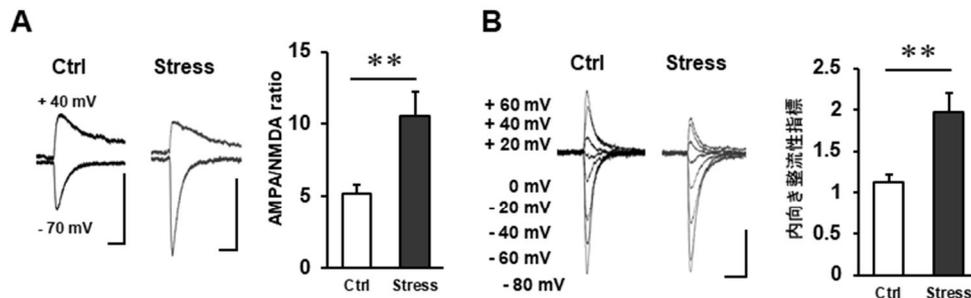


図2、外側OFC-BLA経路におけるストレス応答性のシナプス特性変化

(A) ストレスによる AMPA/NMDA 電流比の増加

(B) ストレスによる AMPA 受容体の電流-電圧特性の変化と内向き整流性の増加

さらに、ストレス負荷の際に Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体のシナプス挿入に重要である PKA の阻害剤をマウスに投与すると、ストレスによる無動の増加及び外側 OFC-BLA シナプス特性の変化が阻害された。次に、外側 OFC-BLA 回路のシナプス伝達とストレスによるうつ様行動増加の因果関係を調べるため、行動試験中のマウスに対し光遺伝学/化学遺伝学を利用した外側 OFC-BLA 経路の神経伝達操作を行った。まず、ストレスを付加していないマウスの外側 OFC-BLA 伝達を光遺伝学的に活性化すると、尾懸垂試験における無動の増加が観察された。逆に、ストレス負荷マウスのこの回路の神経伝達を化学遺伝学的に抑制した結果、無動の減少が観察された (図 3)。

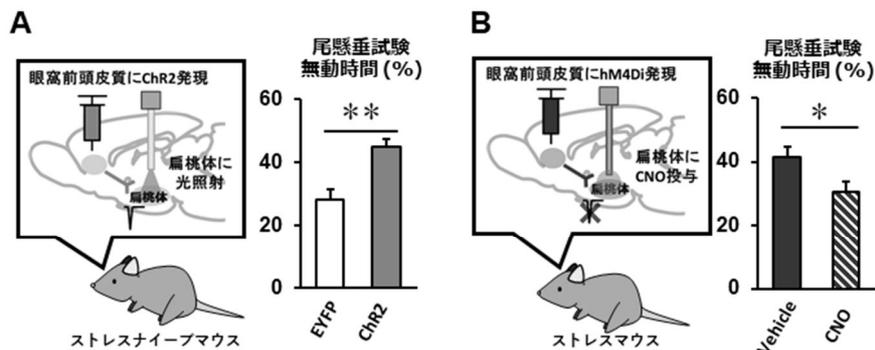


図3、外側OFC-BLA経路の神経活動操作がうつ様行動へ及ぼす影響

(A) 光遺伝学による OFC-BLA 経路の神経伝達活性化により無動が増加

(B) 化学遺伝学による OFC-BLA 経路の神経伝達抑制により無動が減少

これらの結果より、ストレス負荷は外側 OFC-BLA シナプスにおける Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の挿入などのポストシナプス特性の変化を介して、うつ様行動などの情動行動の変容を引き起こす可能性が示された (*Transl Psychiatry* 誌、2020 に掲載)。

(2) 幼少期ストレスによる内側/外側 OFC-BLA 経路シナプス特性の変化と情動変化への寄与

前述の研究により OFC-BLA シナプスのストレスに対する感受性が示された。そこで、次段階として、幼少期の社会隔離ストレスが OFC-BLA シナプスに与える影響を調べた。また、OFC は様々な小領域に分かれており、これらの領域ごとに異なる機能を持つことが近年報告されている。特に、前述の研究で着目した OFC の外側領域は罰や無報酬などのネガティブな感情価に

関与する一方、OFC 内側領域は報酬などのポジティブな感情価に反応することが報告されている⁶⁾。幼少期のストレスはこれら OFC 内側部、外側部を中心とする神経回路にそれぞれ別の影響を与え、情動の変容を引き起こす可能性が推測される。そこで、幼少期の社会隔離ストレスが内側 OFC-BLA/ 外側 OFC-BLA 回路のそれぞれのシナプス特性に与える影響を調べた。

離乳後すぐのマウスに対し、思春期にかけての社会隔離飼育を行った。成熟後の行動解析の結果、隔離飼育マウスは先行研究^[11, 12]と同じく、社会性試験における社会行動の低下と強制水泳試験・尾懸垂試験における無動増加などの行動変化が観察された。また、OFC-BLA シナプス伝達を計測した結果、社会隔離により内側 OFC-BLA シナプスの AMPA/NMDA 電流比の低下が観察された一方、外側 OFC-BLA シナプスの AMPA/NMDA 電流比の増加が観察された。これらの結果は、幼少期社会隔離飼育は内側 OFC-BLA 経路と外側 OFC-BLA 経路において異なるシナプス特性の変化を引き起こし、情動行動の変容をもたらす可能性を示している。

また、これらのシナプス変化と幼少期社会隔離飼育による行動変化の因果関係を調べるため、行動試験中のマウスに対し光遺伝学による内側 OFC-BLA/外側 OFC-BLA 経路の神経伝達操作を行った。まず、通常飼育マウスの内側 OFC-BLA 経路の抑制を行った結果、隔離飼育マウスと同じく社会行動の低下が観察された。そこで、社会隔離マウスにおいて内側 OFC-BLA 経路の活性化すると、隔離飼育による社会性の低下が改善された。次に、通常飼育マウスの外側 OFC-BLA 経路の活性化を行った結果、隔離飼育マウスと同じく尾懸垂試験中の無動の増加が観察された。反対に、社会隔離マウスにおいて外側 OFC-BLA 経路を抑制すると、隔離飼育による無動の増加が改善された。これらの結果は、内側 OFC-BLA シナプスは向社会行動を制御する一方、外側 OFC-BLA シナプスは尾懸垂試験における無動などのうつ様行動を制御することを示している（第 43 回日本神経科学大会 2020, 2018 第 94 回日本薬理学会年会 2021 にて学会発表）。

以上の研究により、幼少期の過剰なストレス経験は内側 OFC-BLA/外側 OFC-BLA シナプス機能の発達にそれぞれ別の影響を与えることで、抑うつや社会的意欲の低下などを引き起こす可能性が示唆される。

<引用文献>

1. Popoli, M., et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **13**(1): p. 22-37.
2. Rothman, S. M. and Mattson, M. P., Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience*, 2012. **3**(293): p. 228-240
3. Williams, L. M., et al., Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression: data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression. *Transl Psychiatry*, 2016. **6**(e799)
4. Ibrahim, J., et al., Childhood maltreatment and its link to borderline personality disorder features in children: A systematic review approach. *Clin Child Psychol Psychiatry*, 2018. **23**(1): p. 57-76
5. Franklin, T. B., et al., Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 2012. **75**(5): p. 747-761
6. Rolls, E.T., et al., The orbitofrontal cortex: reward, emotion and depression. *Brain Commun*, 2020. **2**(2): fcaa196.
7. Versace, A. et al. Abnormal left and right amygdala-orbitofrontal cortical functional connectivity to emotional faces: state versus trait vulnerability markers of depression in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry*, 2010. **67**(5): p. 422-431
8. Hanson, J. L. et al., Lower structural integrity of the uncinate fasciculus is associated with a history of child maltreatment and future psychological vulnerability to stress. *Dev Psychopathol*, 2015. **27**(402): p. 1611-1619
9. Arruda-Carvalho, M. et al., Optogenetic Examination of Prefrontal-Amygdala Synaptic Development. *J Neurosci*, 2017. **37** (11): p. 2976-2985
10. Braga, M., et al., Stress impairs $\alpha 1A$ adrenoceptor-mediated noradrenergic facilitation of GABAergic transmission in the basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacol*, 2004. **29**: p. 45-58
11. Makinodan, M., et al., A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science*, 2012. **337**(6100): p. 1357-1360
12. Haj-Mirzaian, A., et al., Involvement of opioid system in behavioral despair induced by social isolation stress in mice. *Biomed Pharmacother*, 2019. **109**: p. 938-944

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 1件）

1. 著者名 Kuniishi Hiroshi, Yamada Daisuke, Wada Keiji, Yamada Mitsuhiro, Sekiguchi Masayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Stress induces insertion of calcium-permeable AMPA receptors in the OFC-BLA synapse and modulates emotional behaviours in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-020-0837-3	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 國石 洋、関口 正幸、山田 光彦
2. 発表標題 発達期マウスにおける社会隔離飼育は内側・外側OFC-BLA経路のシナプス伝達に異なる影響を与える
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國石 洋、中武 優子、山田 光彦、関口 正幸
2. 発表標題 Adolescent social isolation disrupts synaptic transmission in medial orbitofrontal cortex-basolateral amygdala pathway and social behavior in mice
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Kuniishi, Daisuke Yamada, Keiji Wada, Mitsuhiro Yamada, Masayuki Sekiguchi
2. 発表標題 Stress alters postsynaptic properties in the OFC-BLA pathway and modulates emotional behaviors in mice
3. 学会等名 FENS Forum 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國石 洋、関口 正幸、山田 光彦
2. 発表標題 ストレスによる眼窩面前頭前野-扁桃体回路の可塑的变化：光遺伝学を利用した検討
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國石 洋、中武 優子、関口 正幸、山田 光彦
2. 発表標題 マウスにおける発達期社会的隔離飼育は社会性と扁桃体基底外側核シナプス機能の異常をもたらす
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Kuniishi, Daisuke Yamada, Keiji Wada, Mitsuhiro Yamada, Masayuki Sekiguchi
2. 発表標題 Stress induced postsynaptic plasticity in the orbitofrontal-amygdala pathway in mice
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國石 洋、関口 正幸、山田 光彦
2. 発表標題 眼窩前頭皮質-扁桃体回路におけるストレス応答性のシナプス伝達変化
3. 学会等名 医療心理懇話会第4回集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國石 洋、山田 光彦、関口 正幸
2. 発表標題 異なる2つの前頭前皮質 扁桃体経路における ストレス応答性のシナプス伝達変化
3. 学会等名 令和元年度生理学研究所研究会「情動の生起と変容の多面的理解に向けて」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國石 洋、山田 大輔、和田 圭司、山田 光彦、関口 正幸
2. 発表標題 ストレスによるマウス眼窩前頭皮質 扁桃体シナプス伝達変化とストレス関連行動への寄与
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國石洋、山田大輔、和田圭司、山田光彦、関口正幸
2. 発表標題 光遺伝学的手法による眼窩前頭皮質-扁桃体シナプス伝達の単離とストレスが与える影響の検討
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國石洋、山田大輔、和田圭司、山田光彦、関口正幸
2. 発表標題 ストレスはマウスの眼窩前頭皮質-扁桃体および前部帯状回-扁桃体経路のシナプス伝達に異なる影響を与える
3. 学会等名 第28回臨床精神神経薬理学会・第48回神経精神薬理学会合同年回
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------