

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06919

研究課題名(和文) 1細胞病態解析から迫る双極性障害モデル動物を用いた気分調節機構の解析

研究課題名(英文) The study of the mood system by single cellular analysis of bipolar model animal

研究代表者

島 康之 (Shima, Yasuyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60815885

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)：本研究では、脳室傍核(PVT)のセルタイプ分類と機能解析を行なった。PVTの各細胞の遺伝子発現解析を行なったところ、PVTの神経細胞は前後軸に沿って段階的に遺伝子発現を変化させていることがわかった。PVTの前部と後部を特異的に標識したところ、PVT前部と後部で全く異なった脳部位に連絡しており、食欲調節における機能も拮抗していることがわかった。本研究により、PVTが部位特異的に気分に関わる脳部位を制御していること、そしてPVT内での機能が拮抗していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

双極性障害は遺伝性の高い精神疾患であり、原因遺伝子の探索が多数行われているが、その生物学的メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。本研究では、双極性障害マウスモデルにおいてその重要性が指摘されたPVTを1細胞レベルで解析し、遺伝子発現、生理活性、軸索投射などの多様な解析を行なった。その結果、前後PVTが全く異なった脳領域の投射しており、生理機能も拮抗していることを示した。本研究により、気分調節を担う神経回路メカニズムの一部を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed cell type classification and functional analysis of the paraventricular nucleus (PVT). Gene expression analysis of each PVT cell showed that PVT neurons changed gene expression stepwise along the anterior-posterior axis. Specific labeling of the anterior and posterior PVT revealed that the anterior and posterior PVT communicated with distinct brain regions and had antagonistic functions in appetite regulation. This study suggests that PVT regulates mood-related brain regions in a site-specific manner, and that the functions within PVT are antagonistic.

研究分野：神経科学

キーワード：双極性障害 scRNAseq セルタイプ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

双極性障害は病態メカニズムが未だ不明であり、病因となる神経回路や生理現象・遺伝子発現など生物学的理解が進んでいない。ミトコンドリア DNA(mtDNA)の複製酵素である Polg 遺伝子は、双極性障害の発症率が高いミトコンドリア病の関連遺伝子のひとつである。PolgD181A トランスジェニックマウス(以下 Polg マウス)は変異 Polg を脳で発現する双極性障害モデル動物として樹立された。Polg マウスで脳部位ごとの mtDNA の欠失頻度を測定したところ、視床室傍核(Paraventricular nucleus of thalamus: PVT)で欠失が最も蓄積していた。PVTは前後軸にわたり背側視床に位置する神経核である。腹側線条体/側坐核(Nucleus of accumbens, NAc)が主要な投射先であり、分界条床核、扁桃核、視床下部や内側前頭前皮質など、行動、情動や報酬系に關与する神経核に広く投射している。また、覚醒、睡眠、恐怖学習など幅広い行動に關与することが示されている。

### 2. 研究の目的

双極性障害に關わる PVT の神経回路を解析するために、単一細胞 RNA シーケンス(scRNAseq)を用いて PVT のセルタイプを網羅的に同定する。遺伝子発現解析を行い、セルタイプに特異的な遺伝子発現を解析する。さらに、セルタイプ特異的な Cre 発現マウスを同定し、セルタイプ特異的な軸索投射を解析する。また、電気生理的解析、セルタイプ特異的な神経活動の調節により PVT が關わる情動・報酬系回路への寄与を解析する。

### 3. 研究の方法

(1) scRNAseq の手法として、Quartz-seq2 を用いる。Quartz-seq2 は scRNAseq 手法を多数比較した論文で、遺伝子同定効率、クラスター同定効率で最も高い評価を受けた手法である。PVT は小さい神経核であるため、成体から効率的に生細胞を取得する方法として、高齢マウス脳からのスライス電気生理用の手法を応用した手法を用いる。

(2) セルタイプの確認として、蛍光多色 in situ ハイブリダイゼーション法である RNAscope を用い、1細胞レベルでのマーカー遺伝子発現を解析する。

(3) スライスセクションング 2光子顕微鏡システム Tissuecyte を用いて、PVT の軸索投射を全脳レベルで解析する。

(4) アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて Cre マウスでセルタイプ特異的にレポーター遺伝子を発現させる。

### 4. 研究成果

#### (1) PVT のセルタイプ分類

14個体(オスメス7匹づつ)より PVT の scRNAseq を行い、計 9240 細胞の scRNAseq データを得た。神経細胞を単離し、PVT 以外の神経細胞を除いた結果、2,741 個の PVT の神経細胞を得た。遺伝子発現によるセルタイプ分類で、PVT の神経細胞は5つのクラスター(AM, AL, Tr, PM, PL)に分類された。遺伝子発現の主成分解析では、PVT のセルタイプは PC2/PC3 図上でクラスターが分かれて展開された。PC2 に貢獻する遺伝子は PVT の前後(aPVT, pPVT)で異なった発現を示した。また、PC3 に關与する遺伝子は aPVT の2つのセルタイプで特徴的な発現パターンを示した。

#### (2) 多色蛍光 in situ によるマーカー遺伝子発現解析

5つのセルタイプに特異的に発現するマーカー遺伝子を選定し、RNAscope による多色蛍光 in situ でセルタイプの分布を推定した(図2A)。コンフォーカル顕微鏡で撮像した画像中の各細胞を同定し、細胞一つ一つでの in situ シグナルを定量した。遺伝子発現データを UMAP で次元圧縮し、各マーカー遺伝子の発現レベルを比較したところ、各マーカー陽性細胞はそれぞれのクラスターを形成し、クラスター間でマーカー遺伝子の発現にグラディエントがあることがわかった(図2B)。マーカー遺伝子を3

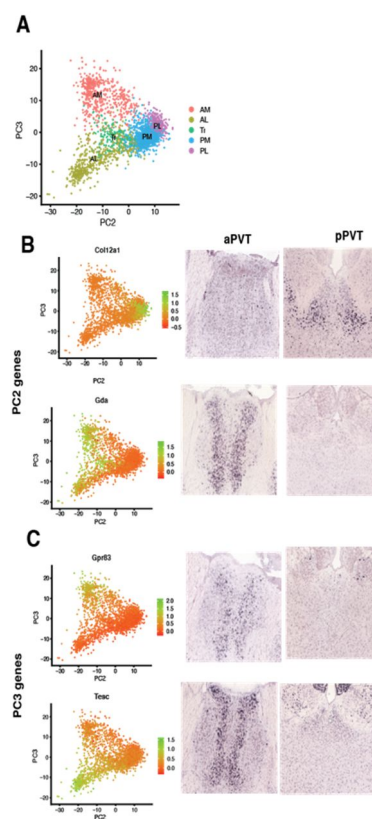


図1:PVTのセルタイプ分類と主成分解析。A: 5つのPVTのセルタイプはPC2・3で展開される。B: PC2は前後軸、PC3はAMとALの分離に關与する

つ以上発現する細胞はほとんどなく、セルタイプ間で性質が連続的に変化していることを示唆した。遺伝子発現レベルによるマーカー発現細胞のラベリング(図2C)を行い、そのカラーコードを用いて in situ データでの細胞の遺伝子発現をカラー図示した(図2D)。

(3) セルタイプ特異的な軸索投射解析  
セルタイプ特異的なCreマウスをAllen brain institute の発現データベースより探索し、Ntrk1-Cre と Drd2-Cre をそれぞれ aPVT, pPVT に特異的に Cre を発現するマウスとして同定した。AAV-CAG-FLEX-EGFP を aPVT と pPVT に導入し、TissueCyte で全脳蛍光イメージングした(図3)。aPVT と pPVT からの軸索は、側座核、扁桃体などの主要な PV T の投射先で全く異なった軸索投射を行っていた。各脳部位への投射を定量したところ、ほとんどの投射脳領域で aPVT と pPVT からの軸索投射に大きな差があった。

(4) セルタイプ特異的な摂食制御  
遺伝子発現解析より、aPVT と pPVT で摂食行動に関するペプチドホルモンの受容体の発現に差があることがわかった。スライス電気生理により、aPVT は Orexin A(OrxA)に、pPVT は メラノサイト刺激ホルモン(-MSH)に特異的に反応することがわかった(図4A)。摂食におけるセルタイプ別の影響を見るために、AAV-FLEX-M3q を Ntrk1-Cre, Drd2-Cre の aPVT と pPVT に導入した。セルタイプ特異的に神経を活性化させるために、CNO を導入前後で摂食量を比較したところ、aPVT の活性化で摂食量は減少した一方、pPVT の活性化で摂食量は増加した。

まとめ  
本研究により、PVT のセルタイプには連続性がある一方、前後の PVT では軸索投射と生理機能に大きな差があることがわかった。PVT の機能の差とセルタイプを結びつけた研究はなく、本研究により PVT の多機能性を担う神経回路メカニズムを同定できた。また、PVT 内での相反する機能を同定した。情動、報酬系で相反する症状が見られる双極性障害の原因としての神経回路解析の基盤を作ることができた。

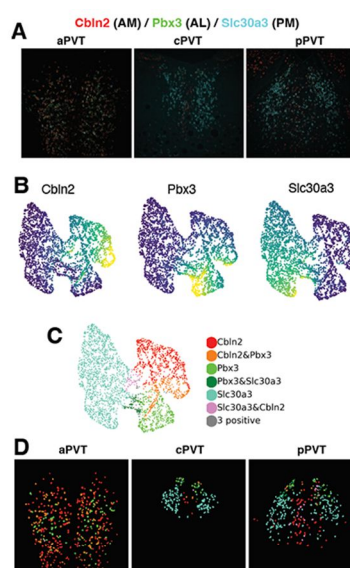


図2:多色蛍光 in situ による PVT のセルタイプ分布の解析。A: 蛍光 in situ データ、B: U MAP による発現データの2次元展開。C: マーカー発現レベルによるラベリング、D: C のコードによる A のカラーラベリング

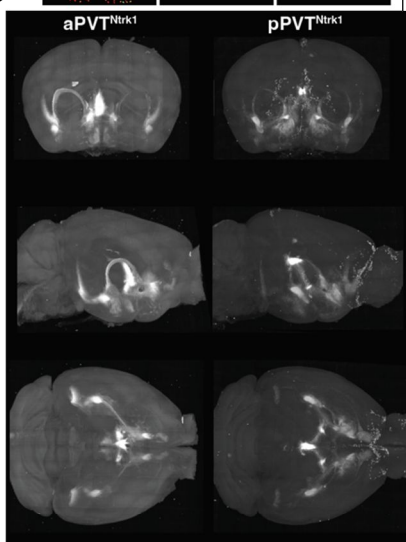


図3: Tissuecyte による PVT の軸索の全脳イメージング。aPVT-Ntrk1(左)と pPVT-Drd2(右)では軸索投射パターンがほとんど重ならず、相補的である。

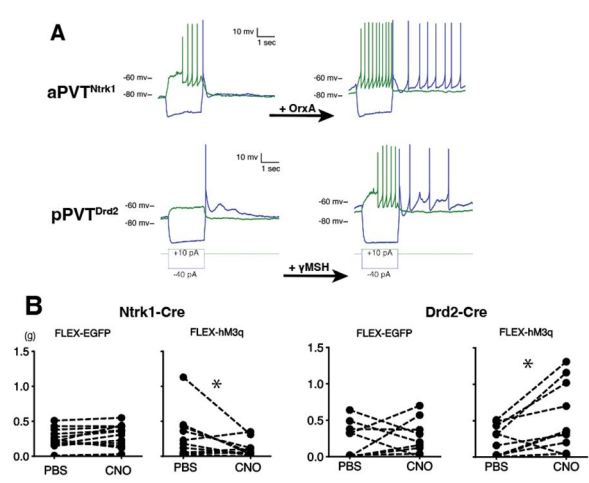


図4: aPVT と pPVT の摂食における機能差  
A: aPVT は OrxA に、pPVT は MSH に特異的に反応する。  
B: DREADD によるセルタイプ特異的な活動調整と接触量(g)の変化。CNO による神経活性で、aPVT は接触を阻害する一方、pPVT は活性化させることがわかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 1. Yasuyuki Shima, Henrik Skibbe, Yohei Sasagawa, Noriko Fujimori, Itoshi Nikaido, Nobutaka Hattori, Tadafumi Kato.	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinctiveness and continuity in transcriptome and connectivity in the anterior-posterior axis of the paraventricular nucleus of thalamus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.02.13.480207	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥 康之、加藤 忠史
2. 発表標題 1 細胞解析による視床室傍核の網羅的セルタイプ同定とセルタイプ特異的な報酬系回路の制御
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020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
---------	---------