

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07264

研究課題名（和文）レジリエンスの神経基盤：プロラクチン放出ペプチド受容体系の作用機序

研究課題名（英文）Neurological mechanisms of resilience: actions of the prolactin-releasing peptide receptor system

研究代表者

吉田 匡秀 (Yoshida, Masahide)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30533955

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）：独自に開発したプロラクチン放出ペプチド受容体（PrLhr）-Venusマウスを用いてPrLhrの発現を高感度で検出し、全脳領域を検索して新奇PrLhr発現脳部位を同定した。PrLhr-Flippaseマウスを独自に開発し、DNA組換え活性と発現を確認した。レジリエンスを担うPrLhr発現細胞を特定する目的で、このFlippaseマウスを利用した2重DNA組換え酵素応答性蛍光蛋白質発現法を用いてストレス応答に重要な神経ペプチド産生細胞におけるPrLhrの発現を明らかにした。また、2重DNA組換え酵素を利用したPrLhr発現細胞の亜集団の神経回路の特定法、人為的活動調節法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス関連精神障害は現代社会が解決すべき喫緊の課題である。本研究は、ストレスを負荷された状態から、正常な状態に戻ろうとする復元力・回復力（レジリエンス）を亢進する神経回路とそれに関わる神経ペプチド/受容体系を明らかにすることを目指している。本研究の成果は、ストレス関連精神神経障害の予防法の確立に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Prolactin-releasing peptide receptor (PrLhr) expression was detected with high sensitivity using originally developed PrLhr-Venus mice, and whole brain regions were searched to identify novel PrLhr-expressing brain regions. PrLhr-Flippase mice were originally developed, and their DNA recombination activity and expression were confirmed. To identify PrLhr-expressing cells responsible for resilience, the mouse line was used to determine PrLhr expression in neuropeptide-synthesizing neurons that are crucial for stress responses using a dual DNA recombinase-responsive fluorescent protein expression method. Methods for identifying the neural circuits of a subpopulation of PrLhr-expressing cells and artificially regulating their activity was also established using a double DNA recombinase.

研究分野：生理学、神経科学、神経内分泌学

キーワード：ストレス プロラクチン放出ペプチド レジリエンス うつ病 心的外傷後ストレス障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストレスを負荷された状態から、正常な状態に戻ろうとする復元力・回復力(レジリエンス)が不十分だとうつ病や心的外傷後ストレス障害(PTSD)といったストレス関連精神神経障害を発症するとされている。臨床的にはこの妥当性は認められているが、その分子基盤は判っていない。最近、研究代表者は、プロラクチン放出ペプチド(PrRP)がレジリエンスを亢進させる可能性を見出した。

PrRPは、下垂体前葉に発現するGタンパク質共役型受容体であるPrRP受容体(Pr1hr)のリガンドとして1998年に発見された。PrRP受容体はGタンパク質共役型受容体である。

PrRP/Pr1hr系は、in vitroにおいてプロラクチン放出を促進することが報告された。しかし、PrRPは下垂体前葉を制御する他の視床下部ホルモンとは異なり、正中隆起に投射するニューロンには発現しておらず、門脈血中には放出されないことが判ってきた。そのため、PrRP/Pr1hr系の生理機能に関しては不明な点が多かった。

脳においてPrRPは、延髄孤束核、延髄腹外側部、視床下部背内側核の3カ所にのみ発現していることが判っている。一方、Pr1hrの発現脳部位に関しては、検出の特異性や感度の問題から、一貫性のある見解は得られていなかった。

研究代表者はこれまで、①社会的ストレス負荷および条件恐怖ストレスにより延髄PrRP産生ニューロンが活性化されること(未発表データ、YoshidaらEndocrinology 2014)、②PrRP遺伝子欠損マウスに慢性の社会的ストレスを負荷するとうつ様行動の一つである同種マウスに対する社会的探索意欲の減弱が起こること(未発表データ)、PrRP遺伝子欠損マウスは条件恐怖学習における恐怖記憶が増強していること(YoshidaらEndocrinology 2014)、PrRPを視床下部背内側核に局所投与すると不安行動が減弱すること(未発表データ)、を含む結果を得てきた。

2. 研究の目的

研究代表者によるこれまでの研究は、PrRPがストレス負荷状態からの回復を促進するレジリエンス亢進因子であること、延髄PrRP産生ニューロン-視床下部Pr1hr回路がレジリエンス亢進を担うことを示唆していた。

そこで「PrRPのレジリエンス亢進作用はいかなる機序で発揮されるのか」を明らかにすることを目的とした研究を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) PrRP受容体(Pr1hr)の発現を、全脳領域を対象に解析する目的で、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集法により独自に作成した内在性Pr1hrプロモーター制御下でレポーター遺伝子である蛍光タンパク質Venusを発現するknock-inマウス(Pr1hr-Venusマウス)を用いた。

(2) 内在性Pr1hrプロモーター制御下でDNA組換え酵素であるFlippaseを発現するknock-inマウス(Pr1hr-Flippaseマウス)を作成する目的で、胚性幹細胞を用いたDNA相同組換え法を用いた。

(3) Pr1hr-FlippaseマウスのFlippase活性と発現特異性を解析する目的で、Flippase依存的に蛍光タンパク質Tdtomatoを発現するマウスを用いた。

(4) オキシトシン、バゾプレシン、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)産生ニューロンにおけるプロラクチン放出ペプチド受容体の発現とその投射部位を解析する目的で、DNA組換え酵素CreとFlippaseの両者が存在する細胞において蛍光タンパク質EGFPが発現するマウス(FLTGMマウス)を用いた。

4. 研究成果

(1) Prlhr-Venus マウスを用いた解析を行い、新奇の Prlhr 発現脳部位を多数見出した。成体の雄の脳を用いた解析では、Prlhr 発現細胞は大脳辺縁系、視床下部、視床に多く観察されたが、大脳皮質には少なかった。また研究代表者の過去の研究から PrRP はオキシトシン、ACTH 分泌を促進することが判っていた。Prlhr 発現細胞は、オキシトシン、バゾプレシン、CRH が発現する視床下部室傍核において豊富に存在していることが判った。

考察1: 独自に開発した Prlhr-Venus マウスを用いて Prlhr の発現を高感度かつ細胞レベルの解像度で検出することができた。現在、Prlhr-Venus マウスを用いて社会的ストレス負荷および条件恐怖ストレスによって活性化する Prlhr 発現細胞の特定を進めている。この実験によりレジリエンスに関わる Prlhr 発現脳領域を探索できるものと考えられる。

(2) Prlhr-Flippase マウス作成のために、ターゲティングベクターが正しく相同組換えされた胚性幹細胞を取得した。更に、この胚性幹細胞から DNA 組換え酵素 Dre を用いて、薬剤耐性マーカーを除去した。この胚性幹細胞をマウス受精卵にマイクロインジェクションし、キメラ率が100%に近いキメラマウスを2匹取得した。このキメラマウスを野生型マウスと交配し、後代を得た。

(3) Prlhr-Flippase マウスの解析を行った。Prlhr-Flippase マウス・Flippase 依存的に蛍光タンパク質 Tdtomato を発現するマウスとの2重遺伝子改変マウスを作成し、解析を行った。この結果、Tdtomato の発現が確認された。また脳内での Tdtomato 発現パターンは、Prlhr-Venus マウスと酷似していた。

考察2、3: PrRP/Prlhr 系に関わるレジリエンス亢進作用部位を同定するためには、特定の脳部位の Prlhr 発現細胞を刺激、抑制する必要があるが、その方法が無かった。本研究で、Prlhr-Flippase マウスを独自に樹立した。現在、Prlhr-Flippase マウスとアデノ随伴ウイルスを組み合わせて、神経回路の特定、人為的活性化・抑制実験を遂行している。更に、独自に樹立した時間・部位特異的 Prlhr 欠損マウスを利用することで、レジリエンスにおける Prlhr 発現細胞および Prlhr 遺伝子の役割を特定できると考えられる。

(4) オキシトシン、バゾプレシン、CRH 産生ニューロンにおける Prlhr の発現解析を行った。DNA 組換え酵素 Cre と Flippase の両者が存在する細胞において蛍光タンパク質 EGFP が発現するマウス (FLTG マウス) を用いた。(1) FLTG・Prlhr-Flippase・オキシトシン-Cre マウス、(2) FLTG・Prlhr-Flippase・バゾプレシン-Cre マウス、(3) FLTG・Prlhr-Flippase・CRH-Cre マウス、の3種類の3重遺伝子改変マウスを作成し、EGFP 陽性細胞を全脳から探索した。その結果、3種類全ての3重遺伝子改変マウスにおいて EGFP 陽性細胞が観察され、Prlhr を発現している各ペプチド産生ニューロンが特定できた。

FLTG・Prlhr-Flippase・オキシトシン-Cre マウスの結果: EGFP 陽性細胞は、視床下部室傍核で観察されたものの、予想に反し陽性細胞数は僅かであった。

FLTG・Prlhr-Flippase・バゾプレシン-Cre マウスの結果: EGFP 陽性細胞は、視床下部室傍核ではほとんど観察されなかった。視交叉上核においては、陽性細胞が存在していた。

FLTG・Prlhr-Flippase・CRH-Cre マウスの結果: EGFP 陽性細胞は、視床下部室傍核、分界条床核、中心扁桃核で多数観察された。

以上の観察から、Prlhr の発現は、3種類の視床下部に存在するペプチド産生ニューロンの中では、CRH 産生ニューロンにおける発現割合が高いことが判った。

考察4: FLTG・Prlhr-Flippase・オキシトシン-Cre マウスを用いた解析から、オキシトシン産生ニューロンにおける Prlhr 発現の割合は非常に低かった。この結果から、PrRP によるオキシトシン分泌作用は、オキシトシン産生ニューロンへの直接の作用ではない可能性がある。

FLTG・Prlhr-Flippase・バゾプレシン-Cre マウスを用いた解析から、視交叉上核バゾプレシン産生ニューロンにおいて Prlhr が発現している予想外の結果が得られた。視交叉上核バゾプレシン産生ニューロンは、概日リズムの形成に重要であることが知られている。今回得られた結果は PrRP/Prlhr 系が、バゾプレシン系を介した概日リズムの調整に関わる新たな可能性を示している。

FLTG・Prlhr-Flippase・CRH-Cre マウスを用いた解析から、視床下部室傍核、分界条床核、中心扁桃核 CRH 産生ニューロンにおける Prlhr の発現が観察された。視床下部室傍核、分界条床核、中心扁桃核はストレス関連脳部位である。また、CRH 産生ニューロンも視床下部一下垂体一副腎系を始めとしたストレス応答に重要な役割を担う。本研究の結果から、(a) Prlhr を発現する視床下部室傍核 CRH 産生ニューロンが、PrRP/Prlhr 系の刺激により ACTH 分泌を促進している可能性がある。(b) Prlhr を発現する分界条床核、中心扁桃核 CRH 産生ニューロンが、ストレス時における行動反応を調節し、レジリエンス作用を発揮している可能性がある。

現在、CRH 産生ニューロン特異的 Prlhr 欠損マウスを作成し、行動反応、神経内分泌反応を指標

とした解析を行っている。また、Pr1hr-Flippase・CRH-Cre 2 重遺伝子改変マウスとアデノ随伴ウイルスを組み合わせ、Pr1hr 陽性 CRH 陽性ニューロンおよび Pr1hr 陽性 CRH 陰性ニューロンの神経回路の特定、人為的活性化・抑制実験を行っている。

本研究から、

- ・ PrRP/Pr1hr 系の生理機能を証明するための、新奇の遺伝子改変マウスと実験系を独自に開発した。

- ・ 全脳における Pr1hr 発現細胞を同定した。

- ・ 本研究の解析結果から「PrRP/Pr1hr 系によるレジリエンス作用が、CRH 産生ニューロンを直接調整することで引き起こされる」という新たな研究仮説を着想した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shota Okabe , Yuki Takayanagi , Masahide Yoshida , Tatsushi Onaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Novel 31-kHz calls emitted by female Lewis rats during social isolation and social inequality conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106243	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 -
1. 著者名 Masahide Yoshida , Tomoko Saito , Yuki Takayanagi , Yoshikazu Totsuka , Tatsushi Onaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Necessity of integrated genomic analysis to establish a designed knock-in mouse from CRISPR-Cas9-induced mutants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24810-5	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 -
1. 著者名 Kengo Inada , Kazuko Tsujimoto , Masahide Yoshida , Katsuhiko Nishimori , Kazunari Miyamichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Oxytocin signaling in the posterior hypothalamus prevents hyperphagic obesity in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e75718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.75718	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 -
1. 著者名 Makiya Matsumoto , Masahide Yoshida , Buddhini Wimarsha Jayathilake , Ayumu Inutsuka , Katsuhiko Nishimori , Yuki Takayanagi , Tatsushi Onaka	4. 巻 33
2. 論文標題 Indispensable role of the oxytocin receptor for allogrooming toward socially distressed cage mates in female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12980	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 -

1. 著者名 Naoki Usui , Masahide Yoshida , Yuki Takayanagi , Naranbat Nasanbuyan , Ayumu Inutsuka , Hiroshi Kurosu , Hiroaki Mizukami , Yoshiyuki Mori , Makoto Kuro-O , Tatsushi Onaka	4. 巻 33
2. 論文標題 Roles of fibroblast growth factor 21 in the control of depression-like behaviours after social defeat stress in male rodents.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e13026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.13026	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 -

1. 著者名 Jun Watanabe , Yuki Takayanagi , Masahide Yoshida , Tatsuya Hattori , Michiko Saito , Kenji Kohno , Eiji Kobayashi , Tatsushi Onaka	4. 巻 33
2. 論文標題 Conditional ablation of vasopressin-synthesizing neurons in transgenic rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e13057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.13057	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 -

1. 著者名 Shota Okabe , Yuki Takayanagi , Masahide Yoshida , Tatsushi Onaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Post-weaning stroking stimuli induce affiliative behavior toward humans and influence brain activity in female rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83314-w	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8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田匡秀, Anir Khurelbaatar, 尾仲達史
2. 発表標題 延髄チロシン水酸化酵素発現ニューロン亜集団のストレス反応における役割
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田匡秀, 渡辺純, 高柳友紀, 尾仲達史
2. 発表標題 下垂体後葉性ホルモン産生ニューロンの時期・部位特異的な破壊法の開発
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 犬束 歩, 向井 康敬, 吉田 匡秀, 高柳 友紀, 山中 章弘, 尾仲 達史
2. 発表標題 社会的敗北ストレスによって誘導される行動変容における前頭前皮質オキシトシン受容体発現ニューロンの生理機能
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田貴博, 武藤重明, 吉田 匡秀, 渡邊南, 福田恵子, 舘野朋子, 尾仲達史, 長田太助
2. 発表標題 SGLT2阻害薬の体液保持機能としてのバソプレシン分泌は食餌量に依存する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田匡秀, 薄井直, 高柳友紀, Naranbat Nasanbuyan, 犬束歩, 尾仲達史
2. 発表標題 FGF21は社会的敗北ストレスによる抑うつ行動を減弱させる
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 犬束 歩, 吉田 匡秀, 高柳 友紀, 尾仲 達史
2. 発表標題 社会的敗北ストレスによる行動変容における前頭前皮質オキシトシン受容体の役割
3. 学会等名 第31回バゾプレシン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naranbat Nasanbuyan , Masahide Yoshida , Yuki Takayanagi , Ayumu Inutsuka , Tatsushi Onaka
2. 発表標題 Role of the ventromedial hypothalamus oxytocin receptor in social defeat stress
3. 学会等名 第31回バゾプレシン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahide Yoshida , Naranbat Nasanbuyan , Tatsushi Onaka
2. 発表標題 Facilitation of social defeat posture by oxytocin/oxytocin receptor systems
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ResearchMap 吉田匡秀 https://researchmap.jp/y-masa</p> <p>ResearchGate Masahide Yoshida https://www.researchgate.net/profile/Masahide-Yoshida</p> <p>自治医科大学医学部生理学講座神経脳生理学部門HP https://www.jichi.ac.jp/medicine/department/neurology/</p>

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