

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07938

研究課題名(和文) 観察恐怖による情動行動変容とその神経回路基盤の解明

研究課題名(英文) Neural circuits of emotional behavior and their alterations by observational fear

研究代表者

吉田 隆行 (Yoshida, Takayuki)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：60374229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期における心身の過剰なストレスによって生じる情動機能障害モデルマウス(幼若期ストレスマウス)を用いて観察恐怖学習(負の共感様行動)とその変容に関わる中枢神経系の神経回路ネットワークとその基盤となる神経細胞の活動について研究した。5-HT2CK0マウスは共感性が欠如し、幼若期ストレスマウスは観察恐怖学習が亢進している可能性が示唆された。幼若期ストレスマウスの内側前頭前皮質の錐体細胞の神経活動をスライスパッチクランプ法にて解析した結果、ストレス負荷群の雌マウスでは活動電位の頻度上昇が認められたが、雄マウスでは変化していなかった。これは女性のうつ病発症リスクが高いことの一因となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共感性の変容には先天性と後天性がある。例えば、自閉症スペクトラムや統合失調症などは先天性の共感性欠如が認められる場合がある。観察マウスのすみ行動およびにおい嗅ぎ行動を共感様行動と解釈すれば、セロトニン2C受容体欠損マウスでは共感性が欠如しており、前述の精神疾患と同受容体との関連性が示唆される。幼若期ストレスマウスの内側前頭前皮質の錐体細胞の神経活動は雌マウスで亢進しており、雄マウスでは変化していなかった。これは女性のうつ病発症リスクが高いことの一因となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I investigated the central nervous system network and underlying neuronal activity involved in observed fear learning (negative empathy-like behavior) and its modification using a mouse model of emotional dysfunction caused by excessive physical and mental stress during childhood (juvenile stress mice). 5-HT2CK0 mice lacked empathy, and juvenile stress mice may have enhanced observational fear learning. Neuronal activity of pyramidal cells in the medial prefrontal cortex of juvenile stress mice was analyzed by the slice patch clamp method. The results showed that the frequency of action potentials increased in female mice in the stress group, but remained unchanged in male mice. This may contribute to the higher risk of developing depression in females.

研究分野：神経科学

キーワード：観察恐怖学習 幼若期ストレス 内側前頭前皮質 セロトニン

### 1. 研究開始当初の背景

共感性は他者の情動状態を知覚することによって生じる代理的な情動反応である (佐藤, 2012)。自他の中で情動が共有される現象は“情動伝染”と呼ばれ、共感性の基盤であると考えられている。従来の研究から共感性は向社会的行動の実行、思いやり、社会的相互作用に影響を及ぼすことが明らかになってきた (Hoffman, 1982; Davis, 1994)。つまり共感性は他者への理解を深め、円滑な対人関係の形成の基礎となることが考えられる。一方で、他者の反応を自分の様子として考える自己思考的反応が、ネガティブ関係コーピングを誘発することや、対人援助の場面で共感性の能力の高さから対人援助者自身が疲弊してしまうことが指摘されてきた (下田ら, 2011; 正木・野村, 2006)。二次的外傷性ストレス (二次受傷) とは、「代理受傷」「共感性疲弊」「外傷性逆転移」と呼ばれている現象の総称であり、「外傷体験を負った人の話に耳を傾けることで生じる被害者と同様の外傷性ストレス反応」を指す (大澤, 2002)。二次受傷としては、いわゆる PTSD (再体験、回避、覚醒亢進)、燃え尽き、世界観の変容などの症状が挙げられている。

以上のことから、共感性はポジティブな側面だけでなくネガティブな情動表出にも関連すると考えられている (和氣ら, 2013) もの、そのメカニズムには不明な点が多い。これらのことから、生後発達期の育成環境に基づいた負の共感性変容とその機序について神経回路の機能役割を検討することで情動ストレスに対する生体防御機構の調節に重要な情動機能の理解ならびに治療への可能性を追究する必要がある。

### 2. 研究の目的

共感性とは「他者の感情を自己に置き換えて共有体験すること」であり、他者への理解を深め、円滑な対人関係の形成に重要な情動機能である。一方、負情動に対する過剰な共感の高まりによって、二次的な外傷性ストレスを誘発し得る側面も有する。

本研究の目的は、幼若期における心身の過剰なストレスによって生じる情動機能障害モデルマウス (幼若期ストレスマウス) を用いて観察恐怖学習 (負の共感様行動) とその変容に関わる中枢神経系の神経回路ネットワークとその基盤となる神経細胞の活動について解明することである。

共感性の変容には先天的な疾患と後天的な疾患とに分けられる。例えば、自閉症スペクトラムや統合失調症などは先天的な共感性欠如が認められる。一方、パーソナリティ障害と診断される患者の乏共感性には後天的な素因も指摘されている。本研究のように後天的変容である幼若期ストレスモデルと先天的変容である 5ht2c 受容体遺伝子欠損マウスの共感性について調べる研究はほかになく極めて独創的であると言える。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の点について取り組む。

- (1) 幼若期 (生後 3 週齢) にストレスを受けたマウス (幼若期ストレスマウス) ならびに 5ht2c 受容体遺伝子欠損マウスにおける観察恐怖学習 (共感様行動) を評価する。

幼若期ストレスモデルの作製には生後 3 週齢のマウス (C57BL/6 系統) に 5 日間連続して電気ショックを負荷する (図 1)。

7 週間後 (生後 10 週齢時) に行動解析を行い、情動機能を評価する (図 2)。ケージメイトの 2 匹 (観察マウスと電気ショック前マウス) を同じ箱

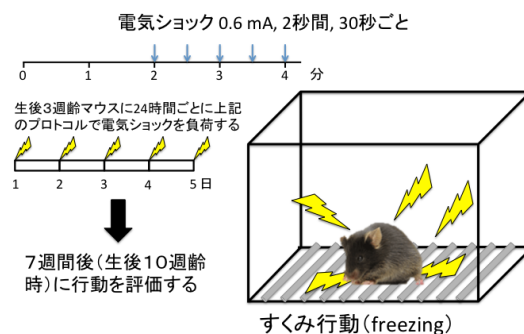


図1 幼若期ストレスモデルマウスの作製

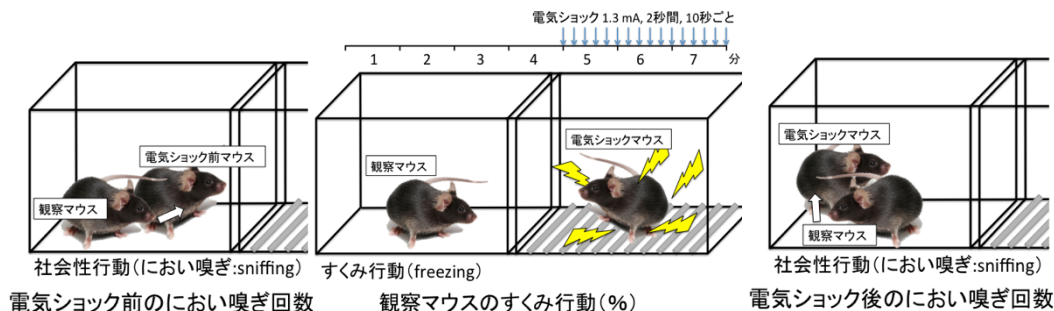


図2 観察恐怖学習と共感様行動の評価

に入れ、観察マウスが電気ショック前マウスに対して行う社会性行動の1つであるにおい嗅ぎの回数を計測する (図 2 左)。続いて電気ショック前マウスを電気ショックボックスに入れ、4 分間馴化した後、3 分間 10 秒ごとの電気ショックを負荷する。7 分間の観察マウスのすくみ行動を評価する。その後、電気ショックマウスを観察マウスのいる元のボックスに戻し、観察マウスが

電気ショックマウスに対して行うにおい嗅ぎ行動の回数を計測する(図 2 右)。この評価系を用いて、対照群マウス、幼若期ストレスマウスならびにセロトニン 2C 受容体遺伝子欠損マウス(5-HT<sub>2c</sub>KO マウス)において解析を行う。

- (2) 関連脳部位に逆行性トレーサーおよびアデノ随伴ウイルスベクターによる神経標識を行い、観察恐怖学習に関与する神経回路ネットワークについて解析する。
- (3) 神経活動に依存的な遺伝子プロモーターにより観察恐怖に応答する神経細胞を機能的に標識し、その特徴と特性を形態解剖学的および電気生理学的に解析する。

#### 4. 研究成果

2020 年度は上記(1)の内容について取り組み、成果を得た。

所属機関を異動したため、マウスの共感様情動行動の評価系としての観察恐怖学習を解析するための機器と実験ツールの新規構築を行なった。生後 3 週齢のマウス(C57BL/6 系統)に 5 日間連続して電気ショックを負荷することで、マウスの幼若期ストレスモデルを確立した。7 週間後(生後 10 週齢時)に行動解析として、観察恐怖学習試験と社会性行動試験(におい嗅ぎ行動)を行い、情動機能評価系実験を立ち上げた。

幼若期にストレスを負荷されていないマウス(対照群)は、電気ショックマウスがショックを受けている間、すくみ行動が増加し、ショック後のにおい嗅ぎ行動も増加した。一方、5-HT<sub>2c</sub>KO マウスではすくみ行動を全く行わず、におい嗅ぎ行動回数も変化しなかった。幼若期ストレスマウスのすくみ行動はショック前から増大し、ショック時の最初の 1 分間で最大になった。しかしながら、におい嗅ぎ行動はショック前後において低回数のままであった。観察マウスのすくみ行動およびにおい嗅ぎ行動を共感様行動と解釈すれば、5-HT<sub>2c</sub>KO マウスは共感性が欠如し、幼若期ストレスマウスは観察恐怖学習が亢進している可能性が示唆された。

2021 年度は(3)の内容について取り組み、成果を得た。

神経活動依存的な遺伝子プロモーターのアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)による神経細胞への遺伝子導入を行い、観察恐怖学習をおこなった。このマウスを用いてスライスパッチクランプ記録を行う方法を確認した(図 3)。

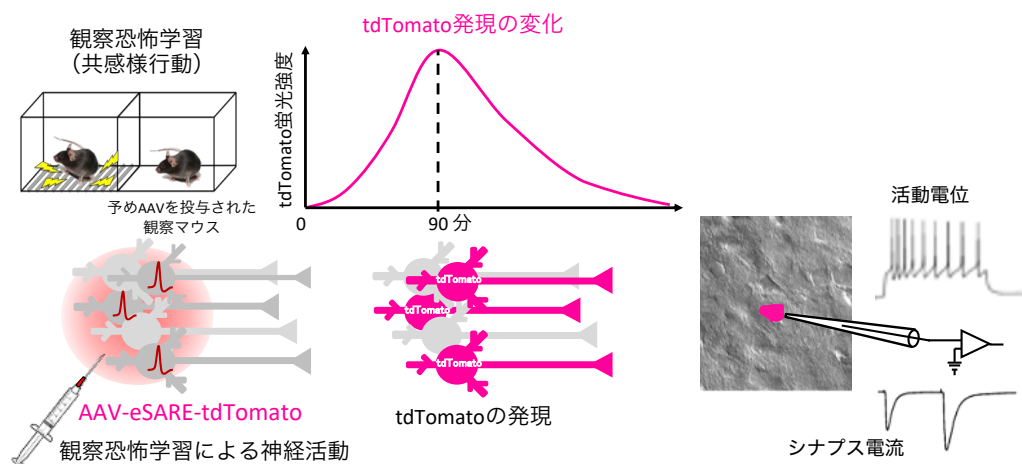


図 3 神経活動依存的遺伝子プロモーター(eSARE)による共感様行動活性化神経細胞の蛍光標識と脳スライスパッチクランプ法による電気生理学的解析

2022 年度は上記(2)と下記の内容について取り組み、成果を得た。

観察恐怖学習に関与する脳領域として内側前頭前皮質(medial prefrontal cortex; mPFC)が報告されている。また、不安や恐怖などの情動調節およびすくみ行動の中核として扁桃体基底外側核(basolateral amygdala; BLA)および中脳水道周囲灰白質(periaqueductal gray; PAG)がそれぞれ知られている。mPFCの錐体細胞がBLAまたはPAGを制御調節する可能性を検討するために、BLAまたはPAGに逆行性トレーサーである蛍光標識コレラ毒素を注入し、観察恐怖学習後の神経活動で誘導される最初期遺伝子である c-fos の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、mPFC 領域において、BLA に投射する細胞は 2, 3 層に、PAG に投射する神経細胞は 5 層にそれぞれ多く分布していた。BLA 投射細胞および PAG 投射細胞の内、c-fos を発現する細胞はいずれも 2 割程度であった。この結果は 2 つの可能性を示唆する。(I) 観察恐怖学習によって活性化される BLA や PAG に投射する mPFC 錐体細胞の関与は小さい。(II) 活性化するのは抑制性ニューロンであり、錐体細胞は抑制されることで観察恐怖学習に寄与する。これらの可能性については今後更なる検討が必要である。また、この逆行性トレーサー標識されたニューロンから脳スライスパッチクランプ法による電気生理学的解析が可能であることを確認した(図 4)。

観察恐怖学習試験の結果、幼若期ストレスマウスは非ストレスマウスに比較して、負の共感様行動であるすくみ行動の比率が高かった。幼若期ストレスマウスの内側前頭前皮質の錐体細胞の神経活動をスライスパッチクランプ法に

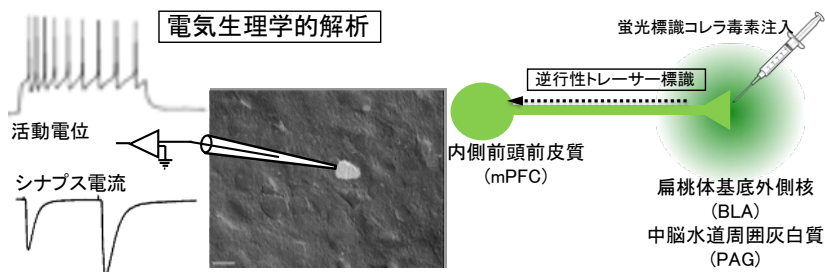


図 4 BLAまたはPAGに神経投射するmPFCの神経細胞の局在解析とスライスパッチクランプ法

て解析した結果、ストレス負荷群の雌マウスでは活動電位の頻度上昇が認められたが、雄マウスでは変化していなかった。これは女性のうつ病発症リスクが高いことの一因となる可能性がある。

うつ病の病態仮説として、脳内のセロトニン遊離量の減少が挙げられている。このため、幼若期ストレスマウスにおける背側縫線核セロトニン神経細胞の神経細胞の活動特性をスライスパッチクランプ法により電気生理学的に解析した。その結果、雌雄マウスともに神経活動の発火特性ならびに膜電位特性に変化は認められなかった。これらのことから、うつ様症状を呈するマウスのセロトニン神経細胞の出力特性は変化しておらず、背側縫線核に入力する神経線維の回路内調節が変容している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aikawa Katsuhiko, Yoshida Takayuki, Ohmura Yu, Lyttle Kerise, Yoshioka Mitsuhiro, Morimoto Yuji	4. 巻 1746
2. 論文標題 Subanesthetic ketamine exerts antidepressant-like effects in adult rats exposed to juvenile stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146980 ~ 146980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.146980	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 Glover Lucas R, McFadden Kerry M, Bjorni Max, Smith Sawyer R, Rovero Natalie G, Oreizi-Esfahani Sarvar, Yoshida Takayuki, Postle Abigail F, Nonaka Mio, Halladay Lindsay R, Holmes Andrew	4. 巻 9
2. 論文標題 A prefrontal-bed nucleus of the stria terminalis circuit limits fear to uncertain threat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e60812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.60812	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 該当する

〔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 Takayuki Yoshida, Katsuhiko Aikawa, Yu Ohmura, Yuji Morimoto, Mitsuhiro Yoshioka
2. 発表標題 Subanesthetic ketamine rapidly reverses depressive-like alterations induced by juvenile stress in adult rats
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 (Neuro2020)
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		
米国	国立衛生研究所 (NIH) / アルコール乱用・依存研究所 (NIAAA)		