

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15925

研究課題名（和文）先天的防御行動を切り替える神経回路の解明

研究課題名（英文）Neural circuits for switching innate defensive behaviors

研究代表者

森川 勝太（MORIKAWA, Shota）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任研究員

研究者番号：00855207

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）：先天的行動は、動物の学習や経験に依存せずに認められることから、遺伝的に保存された特定の神経回路によって駆動されると考えられる。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかとされていない。そこで、本研究では、先天的行動を生じさせるモデルとして、マウスの天敵臭を呈示した際の防御行動を用い、脳深部神経活動記録および神経回路トレーシング解析を行った。その結果、天敵臭を呈示した際の逃避行動の誘導に扁桃体梨状皮質遷移野（AmPir）の活動が必要であることがわかった。さらに、AmPirは、天敵臭を含む特定匂い物質によって誘導される、持続的な不安様行動の亢進にも関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物は生まれ持って有する先天的な防御行動と、学習や経験によって獲得した後天的な防御行動を適切に選択することで、生存確立を高めてきた。これらは日々の生活を円滑を進めるための適応行動の基礎となるメカニズムの1つであり、本機構の破綻は不安障害を始めとした情動障害に繋がる可能性が高い。本研究を更に推し進めることで、恐怖や不安、ストレスといった情動処理機構の理解を深めることができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Innate behaviors manifest independently of the animal's learning and experience background, suggesting their dependence on genetically conserved neural circuits. However, the precise underlying mechanism remains unclear. This study used the defensive response of mice to a predator odor as a paradigm for innate behavior, using deep brain calcium imaging and virus tracing to identify the neural circuit for odor-induced defensive behavior. Our results indicate that the amygdalopiriform transition area (AmPir) plays a central role in eliciting flight behavior upon exposure to predator odors. Furthermore, we discovered the involvement of the AmPir in the enhancement of persistent anxiety-like behavior induced by specific odorants, including those associated with predators.

研究分野：神経科学

キーワード：先天的行動 カルシウムイメージング ウイルストレーシング 扁桃体 防御行動 不安様行動

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

先天的行動は、動物の学習や経験に依存せずに認められることから、遺伝的に保存された特定の神経回路によって駆動されると考えられる。この現象を説明するために、外界からの感覚入力を起因とした特定の神経回路の活性化が生じるとされる Labeled line 仮説が提唱されているが、その詳細なメカニズムは明らかとされていない。

近年の遺伝子工学技術・分子生物学的手法の発展は、脳の機能を領域レベルから、単一細胞レベルで理解することを可能とした。特に、情動の中核である扁桃体における、特定神経細胞の活動の測定及び操作は、神経活動と行動との因果関係について大きな成果を挙げた (Ciocchi et al., Nature, 2012, Tovote et al., Nature, 2016)。しかしながら、情動行動を誘導する外界入力が一連の感覚野で検出された後、どのように脳内で処理され、その結果として行動が生み出されているのかといった包括的な理解はなされていない。この課題の打開策として、嗅覚系における匂いの検出機構は有効な実験モデルである。視覚系における感覚入力は、網膜全体を支配する全ての神経細胞を必要とする。一方で、嗅覚系においては、それぞれの匂いに対応した特定の嗅覚受容体が活性化することで、安定した感覚入力を伝達し、感覚情報を分子として明確に定義できる。その好例として、マウスへ天敵臭を呈示した際、実験動物のマウスでさえ、すくみ行動や回避行動が認められる。つまり、天敵臭は特定の嗅覚受容体を活性化し、特定の下流神経回路の活動を活性化するという Labeled line 仮説が支持されてきたが、その詳細は明らかとされていない。

2. 研究の目的

天敵臭を呈示した際の防御行動の変化を生み出す神経回路を同定し、匂い情報がどのようにして脳内で処理され、情動と結びつくのかを細胞レベルで明らかとする。

3. 研究の方法

天敵臭類似物質を用いた防御行動の誘導

2-メチルチアゾリン (2MT) をはじめとした、各種匂い物質を染み込ませた濾紙をチューブにいった。エアポンプ、シリコンチューブを用いて、マウスに匂い刺激を行った。その際に認められる、すくみ行動・逃避行動・不安様行動を解析した。

組換え狂犬病ウイルストレーシング

アデノ随伴ウイルスを (AAV) 用いて、TVA および oG 遺伝子を扁桃体梨状皮質遷移野 (AmPir) 細胞選択的に発現させた。EnvA+RVΔG-GFP ウイルスを AmPir 細胞に感染させることで、AmPir 細胞に単シナプス接続する上流細胞の可視化を行った。

小型内視鏡を用いて in vivo カルシウムイメージング

AAV を用いて jRCaMP7f を CaMK2 プロモーター下で発現させ、屈折率分布型 (GRIN) レンズを AmPir に埋植した。UCLA-miniscope V4 を、ベースプレートを用いてマウス頭部に固定することで、脳深部に位置する AmPir 細胞の活動記録を行なった。

TRAP 法を用いた遺伝子発現解析

Rpl10a 遺伝子に GFP 遺伝子を融合させた人工遺伝子を、human synapsin プロモーター下に挿入したプラスミドを作成した。本プラスミドを、神経細胞の軸索終末から取り込まれるように retroAAV2 カプシドでパッケージングすることで、AmPir 細胞の投射経路選択的に Rpl10a-GFP を発現させ、GFP 抗体を用いて AmPir 細胞で選択的に発現する遺伝子を単離・精製した。その後、RNA-seq によって GFP 陽性の AmPir 細胞で高い発現を示す遺伝子を調べた。

4. 研究成果

天敵臭類似物質を用いた防御行動誘導モデルの確立

2メチルチアゾリン (2MT) を染み込ませた濾紙をチューブの中に入れ、ポンプによってマウスに匂いを3分間提示した。その結果、先行研究と一致して2MTはマウスに対してフリージング行動を誘導することがわかった。しかし、予想に反して、2MTの提示はフリージングだけでなく、ボックスから逃避するFlight行動をフリージングと交互に繰り返す行動をとることが観察された。そして、Flight行動の減少に伴って、Freezing割合が最大に達し、匂い提示終了後にもマウスは持続的なフリージング行動を示すことがわかった。つまり、2MTはフリージングだけでなく、Flight行動を同時に誘導し、この行動変化が繰り返し生じることがわかった。そして、その後、持続的な強いフリージング状態へと推移していくことが観察された。また、2MTは呈示中のみならず、呈示後にも持続的な警戒行動(不安様行動の亢進)を誘導することがわかった。また、これらの現象は2MTだけでなく複数の匂い物質で確認することができた。以上より、2MTを始めたとした各種天敵臭類似物質を用いることで、多様な防御行動を誘導できることを明らかにした。

・天敵臭類似物質を用いた多様な防御行動を制御する神経回路の同定

上記で得られた防御行動を誘導するための責任領域を明らかにすることを旨とした。まず我々は Freezing と Flight 行動の出力に重要だとされている扁桃体中心核 CeA に着目し、狂犬病ウイルスを用いた CeA を制御する上流細胞のマッピング実験を行った。具体的な方法としては、フリージングの誘導を担うと考えられているソマトスタチン陽性 (SOM) 細胞に組換え酵素 Cre を発現させた SOM-Cre マウスを用いて、SOM 細胞選択的に TVA 受容体と G をアデノ随伴ウイルス (AAV) によって発現させた。そして、TVA を介して感染する EnvA に組み換えた狂犬病ウイルスを AAV 投与の 2 週間後に局所インジェクションし、その 1 週間後にサンプリングすることで、CeA-SOM 細胞の 1 つ上流の細胞を標識した。全脳にわたって標識細胞を観察し、CeA の上流領域として扁桃体梨状皮質遷移野 (AmPir)、扁桃体外側基底核、島皮質、視床室傍核などに標識細胞が認められた。その中でも最も多数の入力細胞が認められ、天敵臭による活性化が誘導されることが知られている AmPir に着目した。

・In vivo カルシウムイメージングを用いた AmPir の活動記録

1. 各種の防御行動を示すマウスの AmPir の神経活動を記録するために、屈折率分布型 (GRIN) レンズを用いた脳深部からのカルシウムイメージングを実施し、自由行動下における脳深部のカルシウム変動を捉えた。その結果、APir の一部の細胞が 2MT に対して選択的な応答を示すことがわかった。まず、Flight 行動時に AmPir の活動がどう変化するかを調べた。その結果、APir の細胞の活動は Flight 開始タイミングの前後において、増加または低下するといった多様なパターンを示すことがわかり、活動パターンに基づいて AmPir 記録細胞を 3 つのグループに分類した。Type1 は Flight 前後に活動を増加、Type2 は変化なし、Type3 は低下させた細胞グループとなり、Type1 グループは、Flight 行動と同期したタイミングで活動を上昇させることがわかった。その一方で、嗅覚皮質の 1 つである嗅内皮質 (LEC) においては、AmPir と比較して有意な活動変化を示す細胞は少なく、2MT 応答は AmPir に特徴的なものであることがわかった。また、さらに広い時間枠で解析を行うと、Type1 細胞は Flight 前に活動が低下し、リバウンド反応のように活動が増加していることがわかった。また、この Type1 細胞の約半数が 2MT 応答細胞であり、これらの細胞の活動が Flight の誘導に関与していることが示唆された。

2. 各種天敵臭類似物質を暴露した後に見られる、持続的な防御行動に対する AmPir の関与を検証した。上記と同じく、In vivo カルシウムイメージングを実施し、匂い暴露中・暴露後の長い時間スケールでの活動記録を行った。その結果、コントロール臭と比較して、2MT は匂い暴露後においても、持続した活動亢進を示すことがわかった。つまり、天敵臭類似物質による持続的な警戒行動の亢進は、AmPir の活動によって誘導されることが示唆された。

・Apir 細胞の活動抑制による防御行動制御の解析

先に示した、APir の活動が Flight 行動の誘導に重要であることを調べるために、AmPir の活動抑制実験を行った。具体的な方法としては、CeA に retroAAV2-Cre を局所投与し、CeA に注射する AmPir 細胞選択的に Kir2.1 を発現させ神経活動を低下させた。その結果、活動抑制群は Flight 数が減少し、そして、Flight に至るまでの潜時が増加した。一方で、Freezing 行動自体には変化がなかったことから、AmPir の活動は Flight 行動の誘導に必要であることがわかった。上記の実験方法では、時間選択的な活動抑制実験ができない。そこで、光遺伝学的手法を導入することで、警戒行動を示すタイミングでのみ AmPir の活動を抑制する実験系を構築した。具体的には、AmPir 細胞選択的に Cre 酵素を発現する遺伝子改変マウスを用いて、青色光でクロライドイオンを流入させる stGtaCR2 を AAV によって Cre 依存的に発現させた。その結果、AmPir 非抑制群の対照群と比較して、AmPir 抑制群は匂い暴露後の不安様行動を示す割合が有意に低下した。つまり、2MT を含む天敵臭類似物質による、持続的な活動亢進は、持続的な防御行動の誘導に必要であることがわかった。

・AmPir 細胞選択的マーカー遺伝子の同定

Retro-AAV2-hsyn-GFP-Rpl10a を CeA に局所投与し、AmPir 細胞で発現する mRNA を TRAP 法によって取得した。そして、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq によって、AmPir 細胞で高発現する遺伝子を複数ピックアップした。その結果、in situ hybridization 法による検証を重ね、AmPir 細胞選択的な活動記録・操作を可能とする遺伝子改変マウスの選定に成功し、上記で述べた活動操作実験に活用した。

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 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuga Nahoko, Nakayama Ryota, Morikawa Shota, Yagishita Haruya, Konno Daichi, Shiozaki Hiromi, Honjyo Natsumi, Ikegaya Yuji, Sasaki Takuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Hippocampal sharp wave ripples underlie stress susceptibility in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-023-37736-x	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 Yawata Yosuke, Shikano Yu, Ogasawara Jun, Makino Kenichi, Kashima Tetsuhiko, Ihara Keiko, Yoshimoto Airi, Morikawa Shota, Yagishita Sho, Tanaka Kenji F., Ikegaya Yuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Mesolimbic dopamine release precedes actively sought aversive stimuli in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-023-38130-3	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 -
1. 著者名 Nakashima Miki, Ikegaya Yuji, Morikawa Shota	4. 巻 178
2. 論文標題 Genetic labeling of axo-axonic cells in the basolateral amygdala	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 33～40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.02.002	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 Noguchi Asako, Huszar Roman, Morikawa Shota, Buzsaki Gyorgy, Ikegaya Yuji	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition allocates spikes during hippocampal ripples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-022-28890-9	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 森川 勝太、池谷 裕二、竹内 春樹	4. 巻 28
2. 論文標題 技術ノート 逆行性ウイルスを用いた嗅球僧帽細胞の形態可視化法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 97～100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18965/tasteandsmell.28.2_97	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 香取和生、森川勝太、奥山輝大、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二
2. 発表標題 天敵臭に対する持続的な防御行動を担う神経基盤の解明
3. 学会等名 第8回ケモビ研究会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 森川勝太、香取和生、竹内春樹、池谷裕二
2. 発表標題 先天的防御行動を制御する神経回路の解
3. 学会等名 第8回ケモビ研究会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 中嶋美紀、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 Axo-axonic 細胞は恐怖連合学習を制御する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 森川勝太、香取和生、日置寛之、竹内春樹、田村英紀、池谷裕二
2. 発表標題 神経ペプチドVIPによる学習・記憶の制御機構の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 中嶋美紀、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 扁桃体Axo-axonic cell特異的標識と情動記憶学習における役割の解明
3. 学会等名 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 森川勝太
2. 発表標題 神経ペプチドVIPによる連合学習の制御機構の解析
3. 学会等名 生理学研究所 情動研究会2022(招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 森川勝太、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二
2. 発表標題 Neural circuits for switching innate defensive behaviors
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中嶋美紀、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 先天的な防御行動を切替えるための神経回路の解析
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中嶋美紀、香取和生、中嶋藍、竹内春樹、池谷裕二、森川勝太
2. 発表標題 先天的な防御行動を切替えるための神経回路の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Nakashima Miki, Katori Kazuki, Nakashima Ai, Takeuchi Haruki, Ikegaya Yuji, Morikawa Shota
2. 発表標題 Neural circuits for switching innate defensive behaviors
3. 学会等名 AFMC International Medicinal Chemistry Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022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
---------	---------