

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16486

研究課題名(和文) 幼少期経験による不安・うつ発症機序を紐解く：ストレス情報処理回路の解析

研究課題名(英文) Unraveling the mechanism of anxiety and depression by early-life stress: Analysis of stress information processing circuits

研究代表者

中村 友也 (Nakamura, Tomoya)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：70733343

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)：幼少期ストレスを経験したマウスでは、成長後に不安・うつ様行動が生じ、外側手綱核(Lateral Habenula: LHb)のParvalbumin(PV)陽性神経細胞が少なく、ストレスに反応する神経細胞が多かった。幼少期のストレスによるLHbの特定の細胞の変化が、行動の変容に関与すると考えられ、不安とうつが発症する脳内機序のひとつであると示唆されるが、それらの因果関係は明らかでない。LHbのPV陽性神経細胞は、70%が小胞グルタミン酸トランスポーター(vglut2)陽性であり、興奮性のグルタミン酸作動性神経細胞として行動調節に関わっていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、「PV陽性神経細胞はGABA作動性で、局所回路を抑制する介在神経細胞である」という大脳皮質における研究結果に基づく定説があったが、それを覆す結果が得られた。LHbのPV陽性神経細胞は大脳皮質とは異なる機能を有している可能性が高い。

LHbのPV陽性神経細胞とZif268/Egr1陽性神経細胞は、グルタミン酸作動性の興奮性神経細胞として、幼少期ストレスによって生じる成長後の不安とうつに関与していると考えられる。本研究により、幼少期ストレスによって生じる不安とうつのメカニズムの一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In mice, early-life stress led to late effects in adulthood: hyperactivity and fewer parvalbumin positive neurons (PV neurons) in the lateral habenula (LHb), and anxiety/depression. Specific alterations in the LHb induced by early life stress are likely to be involved in behavioral changes and are thought to be one of the brain mechanisms by which anxiety and depression develop, but their causal relationship is unclear. We revealed that 70% of the PV neurons of LHb is the vesicular glutamate transporter 2 positive. PV neurons in the LHb is thought to be related to the behavioral regulation as an excitatory glutamatergic neuron.

研究分野：神経科学

キーワード：外側手綱核 幼少期ストレス パルブアルブミン陽性神経細胞 Zif268/Egr1陽性神経細胞 グルタミン酸作動性 GABA作動性 不安 うつ

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

ヒトではネグレクトや虐待といった幼少期の過度なストレスが、成長後の精神疾患の有病率を高めることが疫学的に知られている。行動の異常は神経回路の改変を伴うと考えられるが、幼少期ストレス経験が情動の神経回路成熟に及ぼす影響や、行動の異常が起きる神経回路機序はわかっていない。

幼少期経験が可塑的に神経回路を変更し(神経可塑性)、生涯の行動に影響を及ぼすことが感覚系(視覚)の神経回路で示されている。げっ歯類では、神経細胞活動性が高い幼少期に受けた経験が抑制性の Parvalbumin (PV) 陽性神経細胞を成熟阻害することが知られている。また、この幼少期の神経細胞活動性の高さは神経可塑性と相関することがわかっている。

外側手綱核(lateral habenular nucleus: LHb)は、間脳背側に位置し、ストレスや嫌悪刺激などの情報を基底核から受け、中脳のモノアミン系神経回路を調節することにより、報酬と嫌悪の情報処理、認知機能と情動制御をしていることが示唆されている。ヒトのうつ患者では、LHbの過活動が報告されている(Morris et al., 1999, Neuroimaging)。さらにげっ歯類の不安・うつ動物モデルにおいてもLHbの過活動がみられ、GABA作動薬を局所投与してLHbを抑制すると同症状が改善する(Winter et al., 2011, Behav Brain Res)。これらの所見はLHbの過活動が「不安とうつ」の発症に関与することを示唆する。

申請者らはLHbにおける神経可塑性と幼少期ストレス経験による成長後の行動異常を明らかにした。幼少期ストレスの動物モデルとして、生後10-20日(postnatal day: P10-20)に仔マウスを母親から毎日3時間分離(Repeated Maternal Deprivation: RMD)し、成長後の神経回路と行動を検討したところ、RMDを行った群では、成長後(P60)にLHbのPV陽性細胞が少なく、ストレス負荷による神経細胞活動性が高く、明暗箱における不安様行動と強制水泳試験におけるうつ様行動が出現した。幼少期(P10-20)のマウスLHbは神経細胞活動性が高く(Ichijo et al. Neuroscience research 2015)、PV陽性細胞が未熟だったため、神経可塑性が高いことが想起された。

幼少期のストレスによるLHbの特定の細胞の変化が、行動の変容に関与すると考えられ、不安とうつが発症する脳内機序のひとつであると示唆されるが、それらの因果関係は明らかでない。

## 2. 研究の目的

in-situ hybridization chain reaction (in-situ HCR)と免疫染色により、LHbのPV陽性神経細胞とストレス刺激後に活動する神経細胞の作動性(グルタミン酸・GABA・セロトニン・ドパミン)を同定する。また、光遺伝学的操作によってストレス情報処理における役割を明らかにすることで、不安とうつの発症する機序を紐解き、新しい治療法の開発に貢献する。

## 3. 研究の方法

免疫染色と in-situ HCR の多重染色により，神経伝達物質作動性マーカーを染色した．各マーカーを以下に記す．

#### in-situ HCR

- ・グルタミン酸作動性神経細胞：グルタミン酸小胞トランスポーターの *vglut 1, 2, 3*
- ・GABA 作動神経細胞：GABA とグリシンの小胞トランスポーターの *vgat* と GABA 合成酵素の *gad 1, 2*，GABA トランスポーターの *gat*
- ・セロトニン作動性神経細胞：セロトニントランスポーターの *slc6a4*

#### 免疫染色

- ・セロトニン作動性神経細胞：抗 Tryptophan hydroxylase (TPH)抗体
- ・ドパミン作動性神経細胞：抗 Tyrosine hydroxylase (TH)抗体
- ・抗 PV 抗体，抗 Zif268/Egr1 抗体，抗 GABA 抗体

#### (1) PV 陽性神経細胞の神経伝達物質作動性の解明

PV と上記の各マーカーを染色し，LHb の PV 陽性神経細胞の作動性を明らかにした．また，他脳部位の一般的な GABA 作動性 PV 陽性神経細胞と比較し解析した．LHb の PV 陽性神経細胞の特異性を明らかにした．

#### (2) Zif268/Egr1 陽性神経細胞の神経伝達物質作動性の解明

PV 陽性神経細胞の検討と同様の手法で，ストレス負荷時に活動する Zif268/Egr1 陽性神経細胞の神経伝達物質作動性を明らかにした．

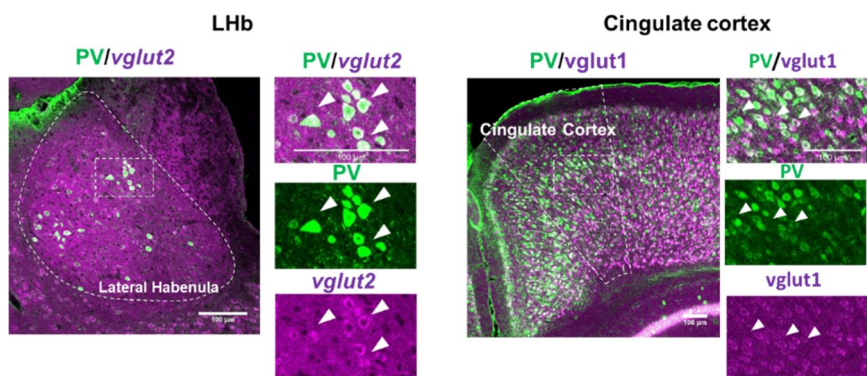
#### (3) 光遺伝学的操作による PV 陽性細胞の機能の解明

光遺伝学的に PV 神経細胞を操作した条件下での，光遺伝学的操作下の LHb 下流にあたるモノアミン系神経核の活動性と行動を検討する．

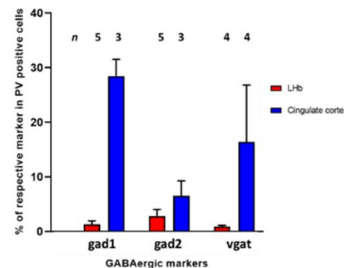
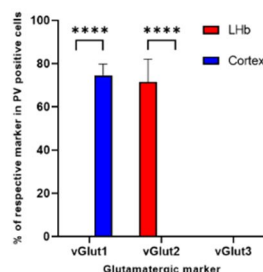
## 4 . 研究成果

### (1) PV 陽性神経細胞の神経伝達物質作動性の解明

LHb の PV 陽性神経細胞は 70%以上がグルタミン酸トランスポーター *vglut2* 陽性であった．また 56.4%が GABA 陽性で



※PVは免疫染色，*vglut1, 2*はin-situ HCR



あった。gad1 は 1% , gad2 は 3% のみが陽性で、神経細胞が GABA を伝達物質として使用するために必要な GABA 小胞トランスポーターの vgat は観察されなかった。GABA を細胞外から細胞内に取り込むためのトランスポーターである gat は 5% だけが陽性であった。さらに、セロトニン作動性神経細胞マーカーのセロトニントランスポーターおよび tryptophan hydroxylase , ドパミン作動性神経細胞マーカーの tyrosine hydroxylase 陽性細胞は LHb には観察されなかった。

逆行性トレーサーを用いた実験で、LHb の PV 陽性神経細胞のうち 18% が下流の背側縫線核、18% が腹側被蓋野に投射していることがわかった。これらの結果から、LHb の PV 陽性神経細胞は、多くが興奮性のグルタミン酸作動性で、一部は背側縫線核と腹側被蓋野に投射する神経細胞として、下流の神経核を制御する細胞であると考えられる。 先行研究から LHb の PV 陽性神経細胞の半数程度は神経伝達物質の GABA を保持していることがわかっているが、vgat 陰性であることから、非 GABA 作動性神経細胞であることが示唆される。従来から知られている GABA の産生方法、取り込み経路に当てはまるものがなく、この PV 陽性神経細胞がどのように GABA を保持したのかは不明である。

帯状回皮質 (cingulate cortex) の PV 陽性神経細胞は、28% が gad1 , 8% が gad2 , 20% が vgat , 46% が gat 陽性であった。vglut2 は観察されなかったが、78% が vglut1 陽性であった。LHb の PV 陽性神経細胞は、帯状回皮質のものとは、GABA 作動性神経細胞マーカーの割合とグルタミン酸作動性神経細胞マーカーの種類が異なっており、性質が異なると考えられる。

今後は、これら実験の例数追加と共に、他の脳部位(扁桃体、海馬)での追加解析を行い、LHb の PV 陽性神経細胞の性質との違いを検討する。

## (2) Zif268/Egr1 陽性神経細胞の神経伝達物質作動性の解明

LHb の Zif268/Egr1 陽性神経細胞の 50% は興奮性のグルタミン酸作動性神経細胞で、その他のマーカーは観察されなかった。LHb の Zif268/Egr1 陽性神経細胞は、背側縫線核に 38%、腹側被蓋野に 53% が投射していた。LHb の Zif268/Egr1 陽性神経細胞の多くは、興奮性グルタミン酸作動性の投射神経細胞として、下流の神経核を制御していると考えられる。

## (3) 光遺伝学的操作による PV 陽性細胞の機能の解明

PV-cre マウスと R26-H2B-EGFP あるいは R26-H2B-mCherry をかけ合わせ、蛍光タンパク質を核周辺に局在させた動物を作成し、PV 免疫染色を行い、PV-cre マウスの遺伝子導入率を検討している。

これまで、「PV 陽性神経細胞は GABA 作動性で、局所回路を抑制する介在神経細胞である」という大脳皮質における研究結果に基づく定説があったが、以上結果は、それを覆した。LHb の PV 陽性神経細胞と Zif268/Egr1 陽性神経細胞は、グルタミン酸作動性の興奮性神経

細胞として、幼少期ストレスによって生じる成長後の不安とうつという情緒に対応する能力に関与していると考えられ、幼少期ストレスによって生じる不安とうつのメカニズムの一端が明らかになった。今後はこれらの細胞がどのようなメカニズムで行動を調節するのかを検討する。

この実験系で予定している高架式十字迷路の行動を解析するための準備を終えた。行動はビデオカメラで撮影し、トラッキングには MATLAB ベースの mouse tracker (Motr; Ohayon et al., 2013) を使用し、行動解析のための MATLAB スクリプトを開発した。

#### (4) 論文による成果の公開

マウスの LHb の成熟過程を神経細胞活動性マーカー（最初期遺伝子 Zif268/Egr1）と、神経細胞可塑性マーカー（PV と perineuronal nets: PNNs）を用いて記載し、成熟が 4 段階を経ることを示した。さらに、ストレスに対する脆弱性が成熟段階によって異なり、第 2 段階（生後 10-20 日）に母子分離ストレスを毎日繰り返して与えた個体では、成長後（生後 60～80 日）に LHb の PV 陽性神経細胞が少なく、ストレスによって誘発される LHb の神経細胞活動性が高く、不安とうつ様行動を呈する事を示した( Nakamura, T., Kurosaki, K., Kanemoto, M., Sasahara, M., & Ichijo, H. (2021). Early-life experiences altered the maturation of the lateral habenula in mouse models, resulting in behavioural disorders in adulthood. *Journal of psychiatry & neuroscience* : JPN, 46(4), E480–E489. <https://doi.org/10.1503/jpn.200226> ( 査読有り ) ) 。

マウスにおいてストレス刺激に反応する神経細胞を、最初期遺伝子の発現によって探索し、大脳基底部のレンズ核下拡大扁桃体（sublenticular extended amygdala, SLEA）に、GABA 作動性神経細胞と、その他の細胞から構成される最初期遺伝子 Zif268/Egr1 陽性の神経細胞クラスターを新しく発見し、「SLEA-zNC (sublenticular extended amygdalar Zif268/Egr1-expressing neuronal cluster)」と名付けた。SLEA-zNC は、ストレス刺激に応じて細胞の活動性が増大し、その反応が抗不安薬のジアゼパムによって抑制されたことから、ストレス情報処理に重要な役割を果たしていることが明らかになった。SLEA-zNC は全てのマウス個体で観察されが、個体ごとに異なる位置に存在し、ストレス情報処理の神経回路の個体差について初めて明らかにした（Kanemoto, M., Nakamura, T., Sasahara, M., Ichijo, H. (2020). Stress-Related Neuronal Clusters in Sublenticular Extended Amygdala of Basal Forebrain Show Individual Differences of Positions. *Front Neural Circuits*. 14:29. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00029>. ( 査読有り ) ) 。

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 0件）

1. 著者名 Nakamura Tomoya, Kurosaki Kohei, Kanemoto Munenori, Sasahara Masakiyo, Ichijo Hiroyuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Early-life experiences altered the maturation of the lateral habenula in mouse models, resulting in behavioural disorders in adulthood	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Psychiatry and Neuroscience	6. 最初と最後の頁 E480 ~ E489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1503/jpn.200226	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中村 友也, 黒崎 恒平, 兼本 宗則, 一條 裕之
2. 発表標題 幼少期ストレスは外側手綱核のパルプアルブミン陽性細胞の成熟を阻害し、成長後の不安やうつ症状を伴った神経細胞ストレス過剰反応を惹起する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 兼本 宗則, 中村 友也, 一條 裕之
2. 発表標題 前脳基底部の拡張扁桃核レンズ核下部領域におけるストレス関連神経細胞集団
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 一條 裕之, 兼本 宗則, 笹原 正清, 中村 友也
2. 発表標題 Stress-Related Neuronal Clusters in Sublenticular Extended Amygdala of Basal Forebrain Show Individual Differences of Positions ストレスに反応する神経回路の個体差；レンズ核下拡大扁桃核のZif268/Egr1陽性神経細胞クラスター
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回 日本生理学会大会 合同大会（国際学会）
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
研究協力者	一條 裕之 (Ichijo Hiroyuki)  (40272190)	富山大学・学術研究部医学系・教授  (13201)	

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