

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06380

研究課題名（和文）脳内自己回復機構に基づく新規ストレス性不安障害治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment for stress-induced anxiety disorder based on self-recovering mechanisms

研究代表者

田村 英紀（Tamura, Hideki）

星薬科大学・先端生命科学研究所・准教授

研究者番号：80437516

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトを含め動物は、健常であれば、軽度の気分の落胆や高揚は自己回復できるが、ストレス状態では、変化した気分は回復せず、不安障害発症の一因となる。多数の研究は、ストレス誘発性不安機構を解明してきたが、ストレス回復の仕組みについてはほとんど明らかではない。今回、中脳水道灰白質に局在する抑制性ソマトスタチン（Sst）細胞が、青斑核ノルアドレナリン作動性（LC-NA）神経細胞にシナプス結合し、その神経活動を強力に抑制することを発見した。また、LC-NA細胞特異的に Sst 受容体サブタイプ 2（Sstr2）を発現抑制したマウスでは、拘束ストレス負荷後の不安行動が増大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

本研究成果は、新規に同定した中脳水道灰白質-青斑核経路を起点としたストレス回復機構の一端を解明するものである。この機構のキーとなる候補分子が Sst2 であることを見出している点で独創的で、具体的な分子を起点とした研究展開が可能であり、他の研究とは一線を画す。がん治療が、「免疫」という我々が本来備える治癒力を活用することで革命的転換を迎えたように、本研究成果はストレス性不安障害に対して、「ストレス回復機構シグナル」という生得的な回復力を活用するという全く新しい視点での治療戦略を創造する可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Humans and other animals are capable of self-recovering from low mood in healthy condition, but in stressful conditions, altered mood is not recoverable and may contribute to the development of anxiety disorders. Numerous studies have elucidated stress-induced anxiety mechanisms, but little is known about stress recovery mechanisms. In this study, we found that inhibitory somatostatin (Sst)-expressing neurons, which are localized in the periaqueductal gray, synaptically connected to and potently inhibit the neuronal activity of the locus coeruleus noradrenergic (LC-NA) neurons. After restraint stress, Sst receptor subtype 2 (Sstr2) knockdown in the LC-NA neurons produced greater anxiety-like behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：ストレス回復 ソマトスタチン 不安 青斑核 中脳水道灰白質 レジリエンス

1. 研究開始当初の背景

我々の身体は、有害な出来事に直面するとストレス応答が誘導され、身体および精神状態を変化させ、外界環境に適応する。急性ストレス性不安は、タスクの遂行や、危機的状況の回避に必要な覚醒と警戒を維持する上で重要なストレス反応の一種である。一方で、ストレス応答が過剰に活性化すると、強い不安に襲われ、行動および精神に異常をきたす (Lupien et al., 2009)。しかし、人口の大多数は、一生の間に何度もストレスを伴う出来事を経験するが、これらの人々のうち、ストレスが引き金となって神経精神疾患を発症するのはごく一部であることが報告されている (Russo et al., 2012)。例えば、米国の調査では、サンプル人口の約 90% が少なくとも 1 回はトラウマとなる出来事に遭遇しているにもかかわらず、心的外傷後ストレス障害の有病率はわずか 8.3% であることが明らかとなっている (Kilpatrick et al., 2013)。このように、ストレスを受けた人々の大半は、心的外傷後ストレス障害やうつ病などの精神病理を示さない (Yehuda, 2004)。このことは、複雑なストレス神経回路内に、ストレス応答を制御する機構が存在することを示唆している。これまで、いくつかの神経修飾分子 (neuropeptide Y, endocannabinoid, urocortin, and endogenous opioid) が、抗ストレス機能を発揮することが報告されている。しかし、ストレス応答時における作用部位やその制御機構は明らかではない (Heilig and Thorsell, 2002; Reul and Holsboer, 2002; Kozicz, 2007; Bowers et al., 2012; Gunduz-Cinar et al., 2013)。ストレス対抗・回復メカニズムの同定は、ストレス応答の個人差やストレスに対する脆弱性およびレジリエンスを決定する要因の理解に役立つ。特に、神経調節ネットワークが、どのように陰性感情に影響を及ぼすのか、その神経回路基盤を理解することは、ストレスによって誘発される神経精神疾患の予防や治療に対するストラテジーを組むための重要な一歩である (Arnsten et al., 2015; McCall et al., 2015; Reyes et al., 2015; McCall et al., 2017)。

橋背側部に位置する青斑核 (Locus coeruleus: LC) には、ノルアドレナリン作動性神経 (LC-NA) 細胞が密に存在し、これらは脊髄を含め脳全体へ広範囲に投射している。LC は、大脳で検出された外界刺激に応じて行動様式を決定する脳領域であり、主に覚醒、注意、情動、記憶、自律神経活動、ストレス応答などに関与する (Berridge and Waterhouse, 2003; Valentino and Van Bockstaele, 2008; Carter et al., 2010; Hickey et al., 2014)。例えば、動物が危機的な状況に直面すると、LC-NA 細胞が活性化し、NA 受容体シグナルを介して闘争・逃走反応を引き起こされる (Valentino et al., 1991; Reyes et al., 2008; Valentino and Van Bockstaele, 2008; Bingham et al., 2011)。一方で、過度のストレスによる NA の過剰放出は、前頭前野の活動を低下させ、ストレス性不安障害や心的外傷後ストレス障害発症の一因となると考えられている (Olson et al., 2011; Raskind et al., 2013)。LC-NA 細胞は、通常時では 1-2 Hz の自発活動を示し (Aston-Jones and Bloom, 1981)、活動期には、phasic (短期的高頻度発火) あるいは tonic (持続性発火) の二つの活動様式を示す (Foote et al., 1980; Valentino and Foote, 1988)。また、ストレス負荷時には、high tonic 活動が誘発される (McCall et al., 2015)。こうした LC の発火活動は、主に内因性の膜特性と発達環境によって決定されるが、機能的に異なる様々な脳領域からの求心性線維から分泌される神経伝達物質や神経修飾因子によっても修飾される (McCall et al., 2015)。特に、LC-NA 細胞への抑制性入力、high tonic 活動を抑制し、ストレス回復に関わることが示唆されている (Valentino and Van Bockstaele, 2015)。しかしながら、ストレス応答時に LC-NA 細胞活動を制御する求心性抑制性神経回路の実体には未だ多くの不明点が残されている。

2. 研究の目的

神経ペプチドの一種であるソマトスタチン (Sst) は、前駆体タンパク質から切り出され特徴的なアミノ酸配列をもつ 14 アミノ酸と 28 アミノ酸の 2 種類の活性型として存在している。Sst 受容体は 5 種類のサブタイプ (Sstr1 - Sstr5) が知られており、いずれも Gi/o タンパク質共役受容体であり、強力な神経抑制効果を発揮する (Olias et al., 2004)。これら受容体は、様々な脳領域に発現しているが、それぞれのサブタイプの局在は異なっている (Breder et al., 1992; Perez et al., 1994)。Sst は脳全体に広範囲に発現しているので (Finley et al., 1981)、各受容体サブタイプのシグナルに依存して、Sst は様々な脳機能に関わる (Brown and Tache, 1981)。特に、ストレスなどの強い情動喚起は、Sst の遊離を促すことが明らかとなっている (Arancibia et al., 1984; Arancibia et al., 2000)。遊離された Sst は、内分泌反応や自律神経反応、内臓反応、行動反応など様々なストレス反応を抑制する (Brown and Tache, 1981)。一方で、うつ病や不安障害などのストレス性神経疾患では Sst 量が低下していることが報告されている (Agren and Lundqvist, 1984; Martel et al., 2012; Lin and Sibille, 2013)。こうした Sst の欠乏と病態との因果関係は明らかではないが、Sst 遺伝子欠損動物では、コルチコステロンの増大および明暗往来試験における不安様行動の増加などが認められる (Zeyda et al., 2001)。また、Sst の脳室内投与は、NA 量の低下や不安様行動の減弱などが認められるが (Yeung et al., 2011; Yeung and Treit, 2012)、その遊離 Sst の標的脳領域および情動制御を司る Sst 受容体サブタイプは明らかではない。

私は、これまでの研究から Sst が Sstr2 を介して抗てんかん作用を示すなど、細胞興奮を著しく抑制することを明らかにした (Iwasawa et al., 2019)。この強力な神経抑制効果を示す Sstr2 は LC-NA 細胞に高発現している (図 1, 白)、Sst が LC-NA 細胞の活動抑制を担うと考えた。そこで本研究では、LC-NA 細胞へ入力する多様な興奮性および抑制性入力の最適な統合機構を理解するために、LC-NA 細胞へシナプス結合する Sst 神経起始核を同定すると共に、LC-NA 細胞における Sst-Sstr2 シグナルが、急性ストレス性不安に関与するかどうかを検討した。

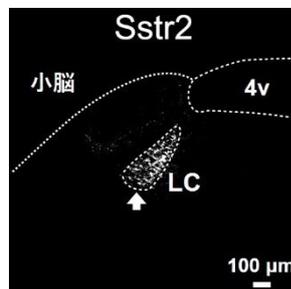


図 1. LC に高局在する Sstr2 の免疫組織染色像 (矢印)。

3. 研究の方法

PAG-LC 回路の神経標識および光遺伝学・電気生理学的解析

イソフルラン吸引麻酔を施した Sst-EGFP (Sst 細胞に EGFP が発現している) マウスの LC (caudal 5.2 mm, lateral 0.9 mm from the bregma, and ventral 3.2 mm from the surface of the brain) に、逆行性トレーサーである Alexa Fluor 555-conjugated Cholera toxin B subunit (CTB555) を 75 nL 投与することで、LC-NA 細胞へ投射している中脳水道灰白質 (periaqueductal gray: PAG) に局在する抑制性 Sst 神経細胞を標識した。

PAG の Sst 細胞特異的にチャンネルロドプシン (ChR2) を発現させるために、*ChR2* 遺伝子をコードしたアデノ随伴ウイルス (AAV) を、イソフルラン吸引麻酔を施した Sst-cre (Sst 細胞に cre 酵素が発現している) マウスの PAG に 200 nL 投与した。二週間後、LC を含む冠状切片 (250 μm) を vibratome (VT-1200S) を用いて作製し、倒立蛍光顕微鏡 (ECLIPSE FN1) 下の記録チャンパーに置き、人工脳脊髄液を灌流した。ChR2 を発現した PAG-Sst 細胞の軸索終末を光照射 (450-495 nm; XLED1) し、その際の LC-NA 細胞のシナプス電位および活動電位の変化を、ホールセルパッチクランプ法 (current clamp / voltage clamp) によって記録した。

Cre/loxP shRNA システムによる LC-NA 細胞特異的 Sstr2 遺伝子ノックダウン

Sstr2 遺伝子に対する shRNA (Sstr2-shRNA: 5'-CGT GGT ACA CAG GTT TCA TTA CTC GAG TAA TGAAAC CTG TGT ACC ACG TTT TT -3') を作製し、Cre/loxP で駆動する pAAV-(flox stop)-shRNA-EF1α-EGFP ベクターに導入しウイルス化した。コントロールには、Scramble shRNA (5'-GCA TAC GGT CAA TCC TCA ACA CTC GAG TGT TGA GGA TTG ACC GTA TGC TTT TT -3') を用いた。これら AAV と LC-NA 細胞特異的に Cre 遺伝子を発現する pAAV-PRSX8-Cre ベクターを組み込んだ AAV を、マウスの両側 LC に 200 nL 投与した。三週間後に、高架式十字迷路試験を実施した。実験終了後、LC-NA 細胞における Sstr2 の発現抑制を免疫組織化学染色によって確認した。

高架式十字迷路試験

高架式十字迷路は、壁のあるアーム (クローズドアーム; 250 × 50 × 150 mm / 1 セット) と壁のないアーム (オープンアーム; 250 × 50 mm / 1 セット) のそれぞれ 2 セットが中央で十字に交差する迷路で、それぞれ床から 50 cm の高さに設置されている。CCD カメラで撮影しながらマウスを 10 分間自由に探索させ、画像解析プログラムでオープンアームへの進入回数を算出した。

4. 研究成果

LC-NA 細胞へ投射している抑制性 Sst 神経細胞を同定するために、逆行性トレーサーである CTB555 を Sst-EGFP マウスの LC に投与した。その結果、中脳水道灰白質 (periaqueductal gray: PAG) 外側核 (IPAG) と腹外側核 (viPAG) の境界部の神経細胞上に CTB555 の陽性反応が検出され、これら陽性シグナルの多くは、EGFP が発現した Sst 細胞上に認められた。次に、抑制性 GABA 作動性神経細胞および興奮性グルタミン酸神経細胞の各マーカー遺伝子 (*vgat* / *vglut2*) を用いた二重蛍光 *in situ* hybridization を用いて、逆行標識された Sst 細胞種を調べた。その結果、CTB 陽性の Sst 細胞のほぼ全てで *vgat* の発現が認められた (92.5 %) 一方で、*vglut2* との共発現率は、5.0 % であった。以上のことから、LC へ投射している PAG Sst 細胞は、抑制性 GABA 細胞であることが明らかとなった。

PAG の Sst 細胞が、LC-NA 細胞にシナプス結合しているかどうかを検討するために、Sst-cre マウスの PAG に、プレシナプスに局在するマーカータンパク質であるシナプトフィジン (mRuby 融合 synaptophysin) を発現する AAV::flex-EGFP-2A-Synaptophysin-mRuby を投与した。その結果、PAG-LC 経路で EGFP 陽性反応が認められ、また LC-NA 細胞周囲に点状の synaptophysin-mRuby 陽性反応が認められた。以上のことから、PAG の Sst 細胞は、LC-NA

細胞にシナプス結合していることが明らかとなった。次に、このシナプス結合の電気生理学的な機能を明らかにするために、Sst-cre マウスと AAV ベクターを用いて、PAG Sst 細胞特異的に ChR2 を発現させた。PAG Sst 細胞の軸索終末を光照射によって活性化した結果、LC-NA 細胞で抑制性シナプス後電流 (IPSC) が発生した。また、電流固定法によって測定される LC-NA 細胞の活動電位は、光照射によって完全に阻害された (図 2)。こうした LC-NA 細胞の発火抑制は、Sst アナログの投与でも同様に認められた。以上のことから、PAG Sst 細胞は、LC-NA 細胞の活動を負に制御していることが明らかとなった。

LC へ投射している PAG Sst 細胞が、拘束ストレスによって活性化するか否かを明らかにするために、Sst 細胞を逆行性トレーサーである CTB488 で標識した後、神経活動マーカーである *c-Fos* mRNA に対して二重蛍光 *in situ* hybridization を行った。30 分間の拘束ストレス負荷マウスでは、IPAG と viPAG の境界部で多数の *c-Fos* 陽性反応が認められた。また、CTB488 で標識された Sst 細胞において、*c-Fos* の陽性反応が認められた。CTB488+Sst⁺ 細胞における *c-Fos* 発現割合を定量した結果、拘束ストレス負荷群では、コントロール群と比較して、有意な *c-Fos* の発現上昇が認められた (Stress: $26.13 \pm 0.84\%$, $n = 4$, Mann-Whitney test, $p = 0.0286$ vs. control: 0%)。これらの結果より、急性拘束ストレス負荷によって、LC へ投射している PAG Sst 細胞が活性化することが明らかとなった。

次に、LC-NA 細胞の *Sstr2* の発現抑制が、マウスのストレス性不安様行動にどのような影響を与えるか検討した。*Sstr2* mRNA に対する shRNA を Cre/loxP システム制御下で発現する組換えウイルス (AAV::(flox stop)-shRNA-EF1 α -EGFP) を作製し、これと LC-NA 細胞で特異的に Cre 酵素を発現する AAV::PRSX8-Cre を LC に投与した。三週間後、マウスに拘束ストレスを負荷した後、高架式十字迷路を用いて、不安レベルを測定した。その結果、LC-NA 細胞特異的に *Sstr2* を発現抑制したマウスでは、対照群 (Scramble shRNA) と比べて、オープンアームへの進入割合が有意に低下した。以上の結果より、LC-NA 細胞における *Sstr2* の発現抑制は、ストレス性不安が増大することが明らかとなった。

本研究により、PAG Sst 細胞の軸索終末が、LC-NA 細胞に抑制性のシナプスを形成していることが示され、ストレス性 LC 活動の抑制制御機構として投射性 Sst シグナルの存在が見出された。重要なこととして、本研究の組織学的および電気生理学的解析のみでは、LC の神経活動が、PAG 入力線維終末部からの Sst の放出によって実際に抑制されるか否かを決定することはできない。しかしながら、Cre/loxP システムで制御される shRNA ノックダウンによって、LC-NA 細胞特異的に *Sstr2* シグナルを阻害した結果、ストレス性不安が増大していることが認められた。これらの結果は、ストレス応答の対抗制御機構に際して、LC における情動喚起依存的な Sst シグナルの影響を理解するための重要な知見を提供する。

LC-NA 細胞は、行動によって phasic と tonic 発火様式間をスイッチする (Aston-Jones and Cohen, 2005)。この発火シフトは、動的に変化する外界環境への適応を促進させる (Bouret and Sara, 2005)。特に、ストレス環境では、LC-NA 細胞は、high tonic 活動を示すことで、急速に脅威に対抗する状態を形成する一方で、phasic モードへのシフトがストレス終結に重要な役割を果たしている (Valentino and Van Bockstaele, 2015)。現段階では、PAG からの Sst シグナルが、LC-NA 細胞の発火様式に与える影響を論じることはできないが、LC における抑制シグナルが phasic 発火の誘導に関わることが明らかとなっている (Kuo et al., 2020)。一般に、LC-NA 細胞の phasic 活動は、感覚処理と意思決定を担う皮質ネットワークから運動ネットワークへの情報伝達のゲインを適切に調節することによって、行動反応を促進させる可能性が想定されている。本研究で、LC-NA 細胞への抑制性 Sst シグナルを阻害することで、高架式十字迷路におけるオープンアームへの進入低下が認められたことを考慮すると、PAG-LC 抑制回路は、LC phasic 誘導の制御に寄与していることが示唆される (Usher et al., 1999; Aston-Jones and Cohen, 2005)。

以上、本研究の結果によって、PAG-LC 経路における Sst-Sstr2 抑制性シグナルは、ストレス性不安行動の制御に関与していることが明らかとなった。しかしながら、この機構が、ストレスへの対抗あるいは回復のどちらに寄与しているのかは未解明のままである。今後は、PAG^{Sst}-LC 細胞がストレス負荷中のどのタイミングで活性化しているのかをリアルタイムイメージングによって明らかにする必要がある。

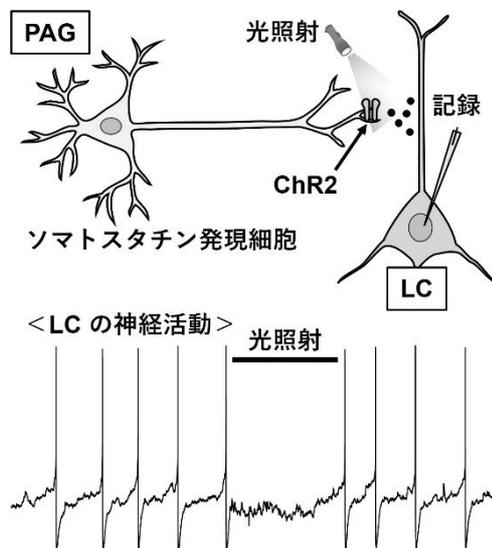


図 2. チャネルロドプシン (ChR2) による Sst 細胞の軸索の活性化は (光照射)、LC の神経活動を抑制する。

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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tamura Hideki, Miyazaki Akiko, Kawamura Takashi, Gotoh Hikaru, Yamamoto Naoki, Narita Minoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Chronic ingestion of soy peptide supplementation reduces aggressive behavior and abnormal fear memory caused by juvenile social isolation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-62534-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 -

1. 著者名 Yoshida Sara, Hamada Yusuke, Narita Michiko, Sato Daisuke, Tanaka Kenichi, Mori Tomohisa, Tezuka Hiroyuki, Suda Yukari, Tamura Hideki, Aoki Kazunori, Kuzumaki Naoko, Narita Minoru	4. 巻 16
2. 論文標題 Elucidation of the mechanisms underlying tumor aggravation by the activation of stress-related neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-023-01006-0	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0件

〔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
---------	---------