

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15225

研究課題名(和文) プロスタグランジンE2による神経活動持続的抑制の生理機能解明

研究課題名(英文) Physiological role of sustained suppression of neural activity by prostaglandin E2

研究代表者

向井 康敬 (Mukai, Yasutaka)

北海道大学・医学研究院・特別研究員 (PD)

研究者番号：30908124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：一時的なストレスを受けると、我々は数時間～数日間の持続的な「調子の悪さ」を経験する。この持続的な調子の悪さの原因は、数時間～数日間にだけ生じる「持続的な神経活動の変化」ではないだろうか？本研究では、これまでスライス実験で確認していたLC-NA神経活動のPGE2による持続的な抑制が、心理的ストレス負荷後の実際の生体内でも生じていることを見出した。この結果から、PGE2によるLC-NA神経活動の持続的な抑制が、心理的ストレス負荷後の行動への影響を緩和する機能を持つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、PGE2によるLC-NA神経活動の持続的な抑制が、心理的ストレス負荷後の行動への影響を緩和する機能を持つ可能性を示した。今後、PGE2の由来やストレスによるPGE2合成の機序、LC-NA神経活動のストレス負荷前後での長期的な変化機序などの研究を進めることができれば、LC-NA神経活動の持続的な抑制を介したPGE2の生理機能のより深い解明に繋がると考えられる。そして心理的ストレス後のうつ様症状の軽減などの新たなアプローチ開発にも知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：When we receive temporal stressors, we often feel in a state of "malaise" lasting from hours to days. This prolonged feeling of malaise could be caused by "sustained changes in the activity of neurons". This study has shown that a sustained suppression of the activity in noradrenergic neurons in the locus coeruleus (LC-NA neurons), induced via the prostaglandin EP3 receptor, can be observed not only in lab-prepared brain slices, but also in living organisms after experiencing psychological stressors. The findings suggest that this sustained suppression of the activity in LC-NA neurons, induced by prostaglandin E2, could moderate behaviors after experiencing psychological stressors.

研究分野：神経生理学

キーワード：プロスタグランジンE2 青斑核 ノルアドレナリン ストレス うつ様行動 ファイバーフォトメトリ
ー カルシウムイメージング 生理活性物質

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は研究開始までに、特定の神経細胞の活動を調節する因子のスクリーニング法を独自に確立して報告した(Mukai et al., 2020, *Sci Rep*)。本手法を用い、青斑核ノルアドレナリン(LC-NA)神経について57種の生理活性因子をスクリーニングしたところ、2分間のプロスタグランジン E₂(PGE₂)投与によって、60分以上にわたり細胞内カルシウムイオン濃度([Ca²⁺]_i)が持続的に低下することを発見した。さらに電気生理学的記録でも、[Ca²⁺]_i低下に伴いLC-NA神経の発火頻度が持続的に低下することを見出した。そして抑制性PGE₂受容体である3型EP受容体(EP3R)をLC-NA神経特異的にノックアウトすると、[Ca²⁺]_i低下が完全に消失した。以上により、PGE₂はEP3Rを介してLC-NA神経活動を持続的に抑制することを明らかにした。

PGE₂は、ストレス受容時の調子の悪さ、すなわち疾病応答に関与する。一方LC-NA神経は、活性化時には覚醒レベルや鎮痛作用の上昇などを引き起こし、環境に適應した行動を惹起するのに重要である。これらを踏まえ、申請者は「ストレスにより産生・分泌が促進されるPGE₂が、LC-NA神経活動を持続的に抑制することで、傾眠や痛覚過敏などの疾病応答を引き起こすのではないか」との着想を得た。そこで、持続的な抑制に関与するEP3RをLC-NA神経でノックアウトした際の行動への影響と、ストレス負荷後の実際のLC-NA神経活動を調べることとした。

2. 研究の目的

本研究は、PGE₂による神経活動調節の「持続性」に着目し、神経活動の持続的な抑制がどのような生理機能に重要であるか解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) cK0 マウスにおけるストレス負荷の行動への影響解析

ノルアドレナリン輸送体(NAT)プロモーター下流でノルアドレナリン(NA)神経特異的に組み換え酵素Creを発現するNAT-Creマウス系統と、抑制性のプロスタグランジンE₂受容体であるEP3受容体(EP3R)をCre依存的にノックアウト可能なEP3R-floxマウス系統を交配し、NA神経特異的なEP3Rノックアウトマウス(cK0マウス)を作出した。その上で、ストレス負荷および負荷後の行動への影響を、cK0マウスおよび同腹の野生型(WTマウス、ただしfloxヘテロ接合体を含む)を比較して調べた。

研究代表者はこれまでの研究で、社会的孤立ストレスまたは社会的敗北ストレスを与えた後の社会性行動試験、拘束ストレスを与えた後の尾懸垂試験を実施した。本研究では新たに、半日以上持続的に睡眠覚醒行動を変化させる炎症性ストレスとして働くリポ多糖(LPS)を腹腔投与し、cK0マウスとWTマウスの睡眠覚醒行動への影響を調べた。

(2) LC-NA 神経活動を持続的に抑制可能なマウスの開発

青色光照射によって開口する陰イオンチャネルのACR2を、組み換え酵素Cre依存的に発現する遺伝子改変マウス(LSL-ACR2マウス)を共同研究により作出し、NAT-Creマウスとの交配によりLC-NA神経でACR2を発現するマウス(NAT-ACR2マウス)を得た。NAT-ACR2マウスを用いて、脳スライスおよび生体における発現および機能の評価を行った。

発現の評価 ACR2の融合タンパク質ドメインである黄色蛍光タンパク質(EYFP)と、LC-NA神経細胞のマーカータンパク質であるチロシン水酸化酵素(TH)の共免疫染色を行い、重なり合う割合を調べた。

脳スライスにおける機能評価 LC-NA神経細胞を含む脳スライス標本を作製し、パッチクランプ法による電気生理学的記録を行った。複数の強度の青色光刺激を行い、光駆動電流の光強度依存性を調べた。

生体における機能評価 リアルタイム場所嗜好性試験(RT-PPT)を行った。LSL-ACR2マウスの対照群として、Cre依存的に赤色蛍光タンパク質tdTomatoを発現するマウス(LSL-tdTomatoマウス)をNAT-Creマウスと交配させて得たマウス(NAT-tdTomatoマウス)を用いた。それぞれのマウスの片側のLC上方に光ファイバーカニューラを留置した。試験の1時間以上前に光ファイバーケーブルを取り付けた後、自由に往来できる2部屋を備えたチャンバーに個体を入れた。前半の10分間では光照射を行わず、2部屋の滞在時間を測定した。その後一旦ホームケージに戻した後、後半の10分間では片方の部屋に滞在している間のみ青色光照射を行った。青色光照射は、前半の10分間で滞在時間の短かった方の部屋で行った。実験後、光照射と関連付けた部屋への滞在時間を、前半と後半で比較した。

(3) ストレス負荷後のLC-NA 神経活動の記録

生体内でカルシウム濃度変化として神経活動を記録可能なファイバーフォトメトリー法により、cK0マウスとWTマウスの間で、ストレス負荷後のLC-NA神経活動に差異が存在するかを調

べた。各マウスの LC-NA 神経に、アデノ随伴ウイルスベクターによってカルシウム指示タンパク質である G-CaMP6 を発現させ、さらに青斑核の上方に光ファイバーカニューラを留置した。個体が十分に回復した後、光ファイバーケーブルに接続した状態で、行動試験を行った。拘束ストレス負荷を与えるため、50 mL チューブに 30 分間個体を閉じ込めた後、6 分間尾懸垂試験を行い、尾懸垂試験中のカルシウム濃度変化を測定した。

4 . 研究成果

(1) cKO マウスにおけるストレス負荷の行動への影響解析

cKO マウスと WT マウスのいずれにおいても、LPS 投与によって睡眠時間の増大が観察されたが、具体的なパラメータについて明確な違いは認められなかった。この結果から、NA 神経で発現する EP3R は、LPS 投与誘導型の炎症性ストレスにより生じる睡眠覚醒行動において、今回測定した指標には大きくは関与していない可能性が示唆された。

(2) LC-NA 神経活動を持続的に抑制可能なマウスの開発

発現の評価 NAT-ACR2 マウスにおいて、ACR2 は TH 陽性細胞の $86.6 \pm 0.8\%$ で発現しており、また ACR2 発現細胞の $93.4 \pm 1.8\%$ が TH 陽性だった。この結果から、NAT-ACR2 マウスの LC-NA 神経細胞における ACR2 発現は、カバー率と特異性の双方が高いことが示された。

脳スライスにおける機能評価 -60 mV で膜電位固定記録した LC 神経細胞では、光強度依存的な外向き電流が観察された。また膜電位固定記録した LC 神経細胞では、すべての光強度で神経細胞の自発発火が完全に抑制された。さらに、ルーズセルアタッチ記録で 10 分間連続光照射したところ、光照射中は自発発火が完全に抑制された一方、光照射の前後では自発発火頻度に有意な差が見られなかった。この結果から、NAT-ACR2 マウスでは青色光照射によって効率よく、かつアーチファクトは少なく、神経活動を抑制可能であることが示唆された。

生体における機能評価 NAT-ACR2 マウスでは、青色光照射によって、光照射側の部屋への滞在時間が増大した。一方、NAT-tdTomato マウスでは、青色光照射によって、部屋の滞在時間は変化しなかった。この結果から、NAT-ACR2 マウスでは青色光照射によって、LC-NA 神経活動が抑制されていた可能性が示唆された。また、LC-NA 神経活動の抑制が、マウスにおいては正の感情価として機能することが示唆された。

(3) ストレス負荷後の LC-NA 神経活動の記録

拘束ストレス負荷後の尾懸垂試験中、cKO マウスのカルシウム信号強度は、WT マウスの信号強度よりも大きかった。この結果から、NA 神経細胞の EP3R は生体内においても、LC-NA 神経活動を抑制している可能性が示唆された。

以上により本研究は、PGE2 による LC-NA 神経活動の持続的な抑制が、心理的ストレス負荷後の行動への影響を緩和する機能を持つ可能性を示した。今後、PGE2 の由来やストレスによる PGE2 合成の機序、LC-NA 神経活動のストレス負荷前後での長期的な変化機序などの研究を進めることができれば、LC-NA 神経活動の持続的な抑制を介した PGE2 の生理機能のより深い解明に繋がると考えられる。そして心理的ストレス後のうつ様症状の軽減などの新たなアプローチ開発にも知見を与えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mukai Yasutaka, Li Yan, Nakamura Akiyo, Fukatsu Noriaki, Iijima Daisuke, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Itoi Keiichi, Yamanaka Akihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Cre-dependent ACR2-expressing reporter mouse strain for efficient long-lasting inhibition of neuronal activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-023-30907-2	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 Mukai Yasutaka, Yamanaka Akihiro	4. 巻 189
2. 論文標題 Functional roles of REM sleep	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 44～53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.12.009	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 Li Wanru, Nakano Takashi, Mizutani Kohta, Kawatani Masahiro, Matsubara Takanori, Danjo Teruko, Mukai Yasutaka, Yamanaka Akihiro, Ito Hikaru, Aizawa Hidenori, Petersen Carl C. H., Yoshimoto Junichiro, Yamashita Takayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Primary motor cortex drives expressive facial movements related to reward processing in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2022.10.28.514159	査読の有無 無
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 Rahaman Sheikh Mizanur, Chowdhury Srikanta, Mukai Yasutaka, Ono Daisuke, Yamaguchi Hiroshi, Yamanaka Akihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Functional Interaction Between GABAergic Neurons in the Ventral Tegmental Area and Serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	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） 10.3389/fnins.2022.877054	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 Mukai Yasutaka, Okubo Tatsuo S., Lazarus Michael, Ono Daisuke, Tanaka Kenji F., Yamanaka Akihiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Prostaglandin E2 Induces Long-Lasting Inhibition of Noradrenergic Neurons in the Locus Coeruleus and Moderates the Behavioral Response to Stressors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7982 ~ 7999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/jneurosci.0353-23.2023	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 該当する

1. 著者名 Ito Hiroto, Fukatsu Noriaki, Rahaman Sheikh Mizanur, Mukai Yasutaka, Izawa Shuntaro, Ono Daisuke, Kilduff Thomas S., Yamanaka Akihiro	4. 巻 120
2. 論文標題 Deficiency of orexin signaling during sleep is involved in abnormal REM sleep architecture in narcolepsy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2301951120	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 該当する

1. 著者名 Li Wan-Ru, Nakano Takashi, Mizutani Kohta, Matsubara Takanori, Kawatani Masahiro, Mukai Yasutaka, Danjo Teruko, Ito Hikaru, Aizawa Hidenori, Yamanaka Akihiro, Petersen Carl C.H., Yoshimoto Junichiro, Yamashita Takayuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Neural mechanisms underlying uninstructed orofacial movements during reward-based learning behaviors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3436 ~ 3451.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2023.07.013	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 向井康敬、ラザルス・ミハエル、永井健治、田中謙二、山中章弘
2. 発表標題 青斑核ノルアドレナリン神経活動を持続的に抑制するプロスタグランジンE2の生理機能
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯嶋大右、向井康敬、山中章弘
2. 発表標題 光遺伝学を用いてドーパミン神経を活性化させた時のオレキシン神経の長時間in vivoカルシウムイメージング
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤洋人、深津紀暁、ラハマン・セイク・ミザン、伊澤俊太郎、向井康敬、小野大輔、Kilduff Thomas、山中章弘
2. 発表標題 オレキシン神経の活動記録と睡眠中の活動の役割
3. 学会等名 Neuro2022
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 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯嶋大右、向井康敬、山中章弘
2. 発表標題 Long-term in vivo calcium imaging in orexin neurons with optogenetic activation of dopamine neurons
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村明代、向井康敬、李妍、深津紀暁、飯嶋大右、阿部学、崎村健司、井樋慶一、山中章弘
2. 発表標題 Generation and in vivo functional evaluation of novel ACR2 reporter mice
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 向井康敬、Michael Lazarus、永井健治、田中謙二、山中章弘
2. 発表標題 Identification of substances that modulate the activity of noradrenergic neurons in the locus coeruleus
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 向井康敬、大久保達夫、Michael Lazarus、小野大輔、田中謙二、山中章弘
2. 発表標題 Prostaglandin E2 induces sustained suppression of noradrenergic neurons in the locus coeruleus to moderate stress response
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024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
---------	---------