

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700350

研究課題名(和文) 脳内モノアミン制御を担う手綱核神経回路の遺伝学的同定

研究課題名(英文) Genetic identification of the habenular pathway regulating the monoamines metabolism in the brain

研究代表者

相澤 秀紀 (Aizawa, Hidenori)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：80391837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：齧歯類手綱核を構成する細胞はグルタミン酸、アセチルコリンやP物質などの神経伝達物質関連遺伝子及びモノアミン受容体などの発現に多様性がみられ、それぞれ手綱核亜核特異的な発現パターンを示していた。Dbx1CreERT2/+を用いて誕生時期特異的な遺伝学的標識を行ったところ胎生期12日目～16日目におけるTamoxifen投与は成体の広い脳領域の細胞を標識したが、生後0日目～生後3日目のTamoxifen投与は成体手綱核に限局するアストロサイトを標識した。また、電気生理学的実験により手綱核はセロトニン神経系を介して海馬など広い脳領域の神経活動を修飾することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Habenular subnuclei in the rodents were characterized by the heterogeneity of the neurons in expression of marker genes for glutamatergic, cholinergic and substance P-ergic transmission and monoaminergic receptors. Tamoxifen injection to Dbx1CreERT2/+ knock-in mouse line before (embryonic days 12-16) and after birth (postnatal days 0-3) resulted in the ubiquitous labeling of the cells in the adult forebrain and specific labeling of the astrocytes in the adult habenula, respectively. Electrophysiological study revealed that the habenula lesion elicited the impairment of the hippocampal theta oscillation, which was dependent upon the intact serotonergic raphe in the brain stem. These results suggested that the habenula affected the diverse brain activity via modulation of neuronal activity in the monoaminergic neurons.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：手綱核 モノアミン

1. 研究開始当初の背景

手綱核は、精神疾患の病態に密接に関与するセロトニンやドーパミン (モノアミン) 神経系の制御中枢として知られ、うつ病患者における過剰活性化が観察されることから同病態の責任病巣として近年注目を集めている。しかし、手綱核は形態学的観察に基づく 15 以上の亜核に分類されているがその機能分化は不明なままである。また、手綱核からの出力線維はドーパミン作動性神経細胞の豊富な黒質・腹側被蓋野やセロトニン作動性神経細胞の豊富な縫線核のみならず、中脳・後脳の様々な神経核に投射している。このように手綱核神経回路は複数の異質な神経回路群による構成されているため、分子レベルでの機能解析は手つかずのままである。このような背景のもと手綱核に存在する細胞種の分子的特性やその機能を解析することは、精神神経疾患の病態理解に必須と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス及びラットを用いて手綱核を構成する神経細胞やグリア細胞の分子的特性を組織学的に明らかにした上で、これらの細胞種の発現遺伝子や発生に関与する遺伝子発現機構に注目し、遺伝学的操作による新たな細胞種特異的標識法の開発を行うことである。また、このような手綱核の興奮性の変化が脳内モノアミン代謝や広範囲神経活動に与える影響について明らかにする。このような遺伝子操作法の開発を通して、脳内モノアミン代謝を制御する神経回路の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 齧歯類手綱核神経細胞における分子特性の解明

成体オス Long-Evans ラットにおける神経伝達物質関連遺伝子の発現パターンを組織学的に調べ、手綱核神経細胞の分子特性を明らかにした。具体的には、グルタミン酸作動性 (Vglut1, Vglut2)、GABA 作動性 (Gad67)、神経ペプチド作動性 (Substance P 前駆物質 Tachykinin 1) マーカー遺伝子に対して特異的プローブを作製し、*in situ* hybridization 法を用いて mRNA 発現を可視化した。本研究では、*in situ* hybridization 法と汎神経細胞マーカーである HuC/D の免疫組織化学的検出をくみ合わせることで、手綱核神経細胞の分布と mRNA の発現パターンを比較することを可能にした。

(2) 手綱核細胞の遺伝学的標識とその光遺伝学的活性化

手綱核原器に特異的に発現する Dbx1 遺伝子に注目し、Dbx1^{CreERT2/+} 系統と Rosa-CAG:loxP-STOP-loxP-tdTomato 系統もしくは Rosa-CAG-loxP-STOP-loxP-ChR2-EYFP 系統を交配した。誕生時期特異的に細胞標識

を行うため、Cre recombinase を核内移行させ活性化させる Tamoxifen を胎仔期 12 日目～生後 3 日目のマウスへ投与し、蛍光標識される細胞群の分布を組織学的に解析した。Tamoxifen は 100 mg/kg で投与し、胎仔期では妊娠メスマウス、生後は各個体へ直接腹腔内投与を行った。生後 0-3 日目のマウスでは、10 μ l 程度と投与液容量が少ないため、ハミルトンシリンジを用いた微量投与が有効であった。Tamoxifen を投与された妊娠マウスは出産時に分娩困難であったり、出産仔の食殺行動が頻繁に観察されたため、本研究では帝王切開及び里親による保育を行い、生後における脳内蛍光蛋白観察を可能にした。

また、標識された細胞の光遺伝学的操作法を確立するため、成体まで飼育したこれらの遺伝子改変マウスの手綱核に対して 200 μ m 径の光ファイバを脳定位的に配置し、光刺激を行った。光刺激による細胞の活性化は、最初期遺伝子 c-Fos 蛋白の発現により確認した。

3) 手綱核興奮性の変化による広範囲神経活動の修飾及びそのモノアミン依存性の検討

手綱核神経回路による広範囲神経活動の修飾及びそのモノアミン神経系依存性を検討するため、ラットにおける電気生理学的測定を行った。具体的には手綱核を電気凝固破壊したラットにテトロード電極を設置し、大脳皮質や海馬神経活動に与える影響を調べた。

また、手綱核破壊の効果がモノアミン、特にセロトニン神経系を介して現れるか否かを検討するため、セロトニン作動性神経細胞の特異的神経毒である 5,7-dihydroxy-tryptamine (5,7-DHT) を正中縫線核へ投与した。セロトニン作動性神経細胞への 5,7-DHT の効果は、抗セロトニン抗体による免疫組織化学により正中縫線におけるセロトニン産生神経細胞数の減少を確認した。

4. 研究成果

(1) 齧歯類手綱核神経細胞における分子特性の解明

ラット手綱核における神経伝達物質関連遺伝子の mRNA 発現解析の結果、ラット手綱核のほとんどは Vglut1 もしくは Vglut2 を発現するグルタミン酸作動性神経細胞より構成されていた。Gad67 を発現する抑制性神経細胞は外側手綱核の外側区画 oval part に限局して散在しているのみであった。このようにほぼ一様にグルタミン酸作動性である手綱核神経細胞の亜核特異的遺伝子発現特性を明らかにするため、アセチルコリン作動性マーカー (VAChT 及び ChAT) や神経ペプチド作動性マーカー (Tachykinin1, Enkephalin など) の発現分布と神経細胞マーカー HuC/D の分布を比較したところ、手綱核の各亜核はグルタミン酸に加えてアセチルコリン (内側手綱の腹側部) や P 物質 (内側手綱の上部)、2 型セロトニン受容体 (外側手綱の一部)、2

型ドーパミン受容体（外側手綱の一部）などの発現に多様性がみられ、それぞれ手綱核亜核特異的な発現パターンを示していた（下表）。これらの結果は、分子特性の異なった手綱核亜核がそれぞれ異なった神経機能に参与していることを示唆している。

これらの内容をまとめて *Journal of Comparative Neurology* 誌及び *Anatomical Science International* 誌に発表した。

	<i>Vglut1</i>	<i>Vglut2</i>	DBH fibers	IL-18	<i>Tact/SP</i>	ChAT	<i>Gpr151</i>	<i>Oprm</i>
MHbS	++	+++	++	++	-	-	-	-
MHbI	++	++	-	-	-	++	-	-
MHbCd	-	+	-	+	++	-	-	-
MHbCv	++	++	-	-	-	++	++	-
MHbL	-	++	-	-	-	++	++	++

Summary of the gene expression patterns assessed in the lateral habenula

	<i>Vglut1</i>	<i>Vglut2</i>	<i>Drd2</i>	TH	<i>Htr2c</i>	<i>Pcdh10</i>	<i>Gpr151</i>
<i>Medial division</i>							
LHbMS	-	++	-	+	++	++	++
LHbMPc	-	++	-	++	+	++	+
LHbMC	-	++	-	+	++	++	+
LHbMMg	-	++	++	-	-	-	+
<i>Lateral division</i>							
LHbLPc	-	++	-	+	++	++	+
LHbLMc	-	++	++	-	++	+	+
LHbLO	-	++	++	-	++	-	+

Abbreviation, MHbS, superior part of the medial habenula; MHbI, inferior part of the medial habenula; MHbCd, central part of the medial habenula, dorsal region; MHbCv, central part of the medial habenula, ventral region; MHbL, lateral part of the medial habenula; LHbMS, superior part of the medial division of the lateral habenula; LHbMPc, parvocellular part of the lateral division of the lateral habenula; LHbMC, central part of the medial division of the lateral habenula; LHbMMg, marginal part of the medial division of the lateral habenula; LHbLPc, parvocellular part of the lateral division of the lateral habenula; LHbLMc, magnocellular part of the lateral division of the lateral habenula; LHbLO, oval part of the lateral division of the lateral habenula.

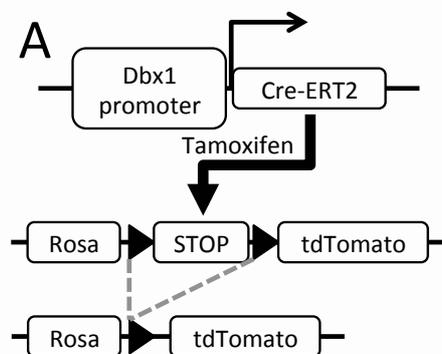
(2) 手綱核細胞の遺伝学的標識とその光遺伝学的活性化

Dbx1^{CreERT2/+};Rosa-CAG:loxP-STOP-loxP-tdTomato 系統（下図 A）へ胎生期 12 日目～16 日目に Tamoxifen を投与した成体マウスでは、*Dbx1* 遺伝子がこの時期背側視床や大脳皮質など広範囲に発現しているため、tdTomato の蛍光が手綱核を含むこれらの広い脳領域に観察された。一方、生後 0 日目～生後 3 日目に Tamoxifen を投与した成体マウスでは、手綱核に分布する標識細胞が観察された。興味深い事に、標識細胞は手綱核全域に観察されるものの、外側手綱核外縁を境界として背側視床などの外側隣接領域では観察されず、標識細胞が手綱核に局限していた。このことは、脳室面から発生するこれらの細胞群の移動範囲が何らかのメカニズムにより制御され

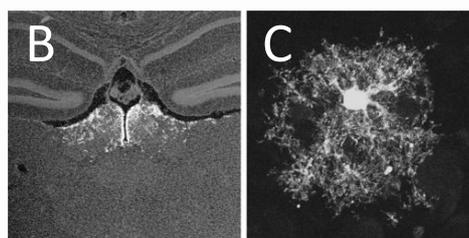
ている事を示唆している。

さらに、これらの細胞種を特定するため、分子マーカーとの共局在を検討したところ、NeuN を発現する神経細胞は全く標識されず、その多く [79.6% (内側手綱核) 及び 57.0% (外側手綱核、N=266 細胞)] は *S100β* を発現する原形質アストロサイトであった（下図 B、C）。この結果により本研究で開発した時期特異的遺伝子改変法が手綱核グリア細胞の遺伝子改変に有効である事が明らかとなった。

このようにして開発された時期特異的遺伝子改変法を神経活動操作に応用するため、*Dbx1^{CreERT2/+};Rosa-CAG:loxP-STOP-loxP-ChR2-EYFP* 系統へ生後 0-3 日目に Tamoxifen を投与し、光ファイバーを用いて刺激したところ、照射領域（片側手綱核）の神経細胞に神経興奮性のマーカーである c-Fos 蛋白の発現上昇を確認した。現在これらの神経活動操作法によるモノアミン神経活動への影響を検討中である。



Dbx1陽性領域から発生する手綱核細胞の遺伝学的操作



手綱核に局限したアストロサイトの遺伝学的標識

以上の結果をまとめて、2012 年及び 2013 年の神経科学会で発表した。

(3) 手綱核興奮性の変化による広範囲神経活動の修飾及びそのモノアミン依存性の検討

手綱核の電気刺激は脳幹部のドーパミンやセロトニン産生細胞の発火を一時的に抑制する事から、手綱核は脳内モノアミン代謝の制御中枢として知られてきた。しかし、手綱核がモノアミン制御を介してどのような脳活動に影響を与えるのかは不明なままである。

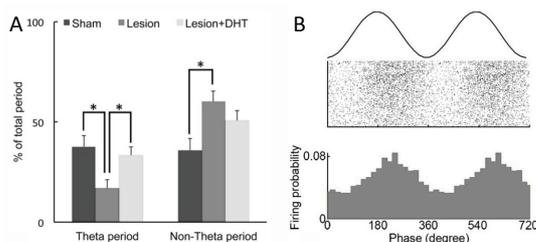
このような問題に取り組むため、手綱核の破壊が海馬や大脳皮質神経活動に与える影響について調べた。大脳皮質、海馬のフィールド電位は探索行動、摂食行動、覚醒、レム睡眠、ノンレム睡眠などの脳状態特異的な活動パターンをする事が知られている。特に海馬フィールド電位は、探索行動やレム睡眠時に特徴的な 5-8 Hz 律動活動 (シータリズム) や摂食行動やノンレム睡眠に特徴的な Sharp wave / ripple complex などが観察され、動物の筋電活動と組み合わせると脳活動の状態遷移を観察する事が出来る。

実験の結果、手綱核破壊ラットではウレタン麻酔下及び睡眠中の海馬シータ波の活動が減弱しており、実際これらの動物はレム睡眠時間の短縮が観察された。この事は、手綱核がレム睡眠制御に重要な役割を果たす事を示唆している。

興味深い事に、手綱核破壊による海馬シータ波抑制効果は、セロトニン作動性縫線核を破壊すると観察されなかった。このことは、手綱核がセロトニン作動性縫線核の活動を介して海馬シータ波の安定性維持に重要である事を示している (下図 A)。

さらに、手綱核及び海馬神経活動における協調活動について検討するため、睡眠中の頭部固定ラットからテトロドを用いた多点同時記録を行ったところ、手綱核神経細胞は海馬シータリズムと位相同期して協調活動していた (下図 B)。これらの結果は、手綱核神経活動がセロトニンなどのモノアミン作動性神経系の活動修飾を介して、広範な脳活動に影響を与えていることを示している。

これらの結果をまとめて、*Journal of Neuroscience* 誌及び *Frontiers in Human Neuroscience* 誌へ発表した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Aizawa H, Cui W, Tanaka K, Okamoto H. Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front Hum Neurosci*. 2013 7:826. 査読有 DOI: 10.3389/fnhum.2013.00826
- ② Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R,

McHugh TJ, Fukai T, Isomura Y, Okamoto H. The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. *J Neurosci*. 2013 33(20):8909-21. 査読有 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4369-12.2013

- ③ Aizawa H. Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. *Anat Sci Int*. 2013 88(1):1-9 査読有 DOI: 10.1007/s12565-012-0158-6
- ④ Aizawa H, Kobayashi M, Tanaka S, Fukai T, Okamoto H. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J Comp Neurol*. 2012, 520:4051-4066. 査読有 DOI: 10.1002/cne.23167

[学会発表] (計 5 件)

- ① 崔 万鹏, 田中 光一, 相澤 秀紀 Activation of the lateral habenula under the acute and chronic stress 第 36 回日本神経科学大会、京都、2013 年 6 月 21 日 (ポスター発表)
- ② 相澤 秀紀 Role of the lateral habenula in pathophysiology of major depression 第 36 回日本神経科学大会、京都、2013 年 6 月 20 日 (シンポジウム講演)
- ③ 崔 万鹏, 孫 偉楠, 田中 光一, 相澤 秀紀 うつ病様行動における手綱核の役割 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、香川、2013 年 3 月 30 日 (ポスター発表)
- ④ 崔 万鹏, 田中 光一, 相澤 秀紀 Activation of habenula neurons in the social avoidance behavior after chronic social stress 第 35 回日本神経科学大会、名古屋、2012 年 9 月 21 日 (ポスター発表)
- ⑤ 相澤 秀紀, 崔 万鹏, 田中 光一 Temporally-regulated neurogenesis and gliogenesis in the mouse habenula 第 35 回日本神経科学大会、名古屋、2012 年 9 月 19 日 (ポスター発表)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/mri/aud/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 秀紀 (AIZAWA, Hidenori)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号：80391837

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし