

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290020

研究課題名(和文) 分界条床核に着目した負情動生成機構と病態モデルにおける変容メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of neural mechanisms for negative emotion and its alteration under the pathological conditions: Study with focusing on the bed nucleus of the stria terminalis

研究代表者

南 雅文(MINAMI, Masabumi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20243040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含む哺乳類は、身を守るための生体防御システムとして、抑うつや不安などの負情動生成機構を獲得・進化させてきたと考えられる。したがって、うつ病や不安障害のメカニズムを理解するためには、生体防御システムとしての負情動生成機構を明らかにした上で、患者や病態モデル動物における変化を解析することが必要である。我々は、分界条床核と呼ばれる脳部位に着目して研究を進め、CRFによる分界条床核神経活性化が腹側被蓋野ドーパミン神経を抑制することで痛みによる負情動を生成すること、さらに、慢性痛では分界条床核における神経情報伝達に可塑的变化が起き、腹側被蓋野ドーパミン神経が恒常的に抑制されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mammals including humans are thought to have acquired and evolved neuronal mechanisms for negative emotion, such as depression and anxiety, as a biological defense system that protects themselves by suppressing their activities and raising vigilance against the surroundings, when they are in dangerous condition. Therefore, in order to understand the neuronal mechanisms of depressive disorders and anxiety disorders, it is necessary to clarify the neuronal mechanisms for negative emotion from the viewpoint as a biological defense system and to analyze the changes of such mechanisms in patients and disease model animals. We have been studying with focusing on the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), and demonstrated that activation of BNST neurons by CRF suppresses the dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) to produce pain-induced negative emotion, and that neuroplastic alteration in the BNST induces sustained suppression of VTA dopaminergic neurons.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳・神経 薬理学 情動 不安 抑うつ 分界条床核 扁桃体 腹側被蓋野

1. 研究開始当初の背景

申請者は、痛みによる負情動生成に関わる神経機構を研究し、痛み刺激が、分界条床核におけるノルアドレナリン神経 (J Neurosci, 28, 7728-7736 (2008) および CRF 神経 (J Neurosci, 33, 5881-5894 (2013)) の神経情報伝達亢進を介して、負情動を生成することを明らかにしてきた。特に、嫌悪反応については、分界条床核内 type 神経細胞の活動亢進が、3本の GABA 神経を介した神経回路により腹側被蓋野ドパミン神経を抑制することで嫌悪反応を惹起する可能性を示唆する組織学的研究成果を報告している (J Neurosci, 32, 18035-18046 (2012))。このうち、分界条床核から腹側被蓋野に投射する GABA 神経活動を光遺伝学的に制御することで場所嫌悪反応や場所嗜好反応を惹起できることが、米国の Stuber のグループにより報告されている (Nature, 496, 224-228, (2013))。また、米国の Deisseroth のグループは、分界条床核から外側視床下部への投射が高架式十字迷路で観察される不安様行動の制御に関係していることを光遺伝学的手法により明らかにしている (Nature, 496, 219-223, (2013))。分界条床核は、内側前頭前野、海馬台、扁桃核、腕傍核などから入力を受け、様々な情報を統合し、情動や摂食、内分泌などの機能調節に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。これら機能調節に関わる分界条床核からの出力経路については、上述のように光遺伝学的手法を駆使した研究によりかなり明らかにされてきた。一方、様々な脳部位からの情報が分界条床核内の神経回路にどのように入力され、どのようにして情報統合が行われているかは未だ明らかでない。また、気分障害モデルや慢性痛モデル動物での抑うつや不安などの情動変容における分界条床核を中心とした神経回路・神経機構の機能的変化の役割についても不明のままである。

2. 研究の目的

分界条床核を中心とした神経経路、特に、分界条床核への入力経路に焦点を当て、受容体作動薬・拮抗薬を用いた従来の薬理学的手法と、光遺伝学による神経経路特異的な解析手法を融合的に用いることにより、負情動生成の神経回路・神経機構を明らかにするとともに、病態モデル動物における当該神経機構変容のメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

実験には雄性 Sprague-Dawley ラット (4週齢) (日本 SLC, 浜松) を使用した。動物は、室温 22 ± 1 、明暗周期が 12 時間 (明期; 7:00-19:00, 暗期; 19:00-7:00)、さらに摂食・飲水が自由に行える室内環境の下で飼育した。なお、実験はすべて「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (平成 19

年 4 月 1 日)」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守し、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の審査・承認を得て行った。

(2) ウイルス注入

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下、ラットを脳定位固定装置に固定して頭蓋表面を露出させた後、インジェクションポンプに接続したニューロシリンジ (Model 7002 KH, 30G, 外径; 0.31 mm, 内径; 0.20 mm, HAMILTON, NV, USA) に、チャンネルロドプシン (ChR2) を神経細胞に導入できるように設計されたアデノ随伴ウイルス溶液 (AAV5-hSyn-ChR2 (H134R)-eYFP; UNC vector core, NC, USA) を充填し、背側方向から扁桃核中心核内へと定位的に挿入した。ニードル挿入位置は、先端が扁桃核中心核の中心部となるようにした。ウイルスは、注入速度 $0.075 \mu\text{l}/\text{min}$ で注入量 $0.2-0.3 \mu\text{l}$ になるように扁桃核中心核に注入した。なお、ウイルス溶液逆流防止のため、注入後さらに 5 分以上経過した後シリンジのニードルを脳内から抜き取った。その後、少なくとも 4 週間以上のウイルス発現待機時間において、各種実験に用いた。また、対照群には ChR2 を発現しない AAV5-hSyn-eYFP を注入した。

(3) 光ファイバー埋め込み手術

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下、ラットを脳定位固定装置に固定して頭蓋表面を露出させた後、光ファイバーカニューレ (光ファイバー直径 $400 \mu\text{m}$, Thorlabs, NJ, USA) を両側に挿入し、歯科用セメント (UNIFAST, GG, 東京) により固定した。カニューレの挿入位置は、先端が分界条床核の背側部となるようにした。カニューレ挿入後、少なくとも 1 週間の回復期間とハンドリング期間において、高架式十字迷路試験を行った。

(4) 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験 (elevated plus maze; EPM test) には、壁のない open arm ($10 \times 50 \text{ cm}$) と壁に囲まれた closed arm ($10 \times 50 \text{ cm}$, 壁の高さ 45 cm) が中央の center area ($10 \times 10 \text{ cm}$) を挟んで十字型に交差して、地面から 50 cm の高さに設置されている装置を用いた。照明は、center area において $7-8 \text{ lux}$ になるように調節した。ラットに光ファイバーを接続後、open arm に頭を向けて center area にラットを置き、12 分間装置の上を自由に探索させた。12 分間の試験時間のうち、3 分毎に光刺激 (50 ms interval , 5 ms duration , 473 nm) の OFF・ON を切り替え、扁桃核中心核から分界条床核に投射する神経の選択的活性化が不安様行動に与える影響を検討した。不安が高まると open arm の滞在時間が少なくなると考えられるため、open arm の滞在時間を指標として不安レベル

の評価を行った。動物の行動はカメラによって撮影し、コンピューターによって自動解析した (EthoVision XT, Noldus, Wageningen, Nederland)。統計学的有意差は two-way ANOVA を用いて評価し、 $P < 0.05$ の場合に有意であると示した。

(5) 薬物の脳局所投与

薬液投与用ガイドカニューレは 10° 傾け先端が分界条床核上部に位置するように埋め込んだ。手術後、ガイドカニューレ内にダミカニューレを挿入した。EPM test 開始前に薬液投与を行った。分界条床核両側のガイドカニューレにインジェクションカニューレを挿入し、インジェクションカニューレがガイドカニューレの先端から 1 mm 突き出すことで分界条床核に届くように設計した。シリンジポンプを用いて、saline もしくは CRF 受容体拮抗薬である α -helical CRF (0.26 nmol/0.5 μ L) を 0.5 μ l/min の流速で 1 分間注入した後、薬物の逆流を防ぐため 1 分間インジェクションカニューレを静置した。薬液投与から 5 分後、ガイドカニューレに光ファイバーを装着し、行動試験を行った。

(6) 組織学的解析

EPM test 終了から 1 日以上経過したラットを用いて実験を行った。薬物の脳局所投与を再び行い、薬物投与から 5 分後にガイドカニューレに光ファイバーを装着し、3 分間の光刺激 (50 ms interval, 5 ms duration, 473 nm) を行った。光刺激終了から 120 分後、0.1 M PBS 及び 4% PFA / 0.1 M PB を経心灌流し、素早く脳を取り出した。取り出した脳は、4% PFA / 0.1 M PB 溶液中で一晩静置することで後固定を行った。30%スクロース溶液に脳を移しスクロース置換を行った後、脳を粉末状のドライアイスにより凍結し、分界条床核あるいは扁桃体中心核を含む厚さ 30 μ m の冠状切片をクリオスタットにより作製した。作製した切片を 10 分間 PBS-T により洗浄する操作を 3 回行い、その後 3% 通常口バ血清により 1 時間のブロッキングを行った。1 次抗体溶液中 (ウサギ抗 cFos 抗体、1:1000, Santa Cruz Biotechnology) 4 で一晩振とうした後、10 分間 PBS-T により洗浄する操作を 3 回行い、2 次抗体溶液中 (AlexaFluor-594 標識口バ抗ウサギ抗体、1:100, Invitrogen) で 1 時間振とうした (室温)。PBS による 10 分間の洗浄を 3 回行い、脳切片をスライドガラスに張り Vectashield mounting medium with DAPI (Vector laboratories) により封入した。蛍光観察には Bio-zero BZ-9000 microscope (Keyence) を用いた。cFos 陽性細胞の計測は、分界条床核内に 0.4 mm \times 0.3 mm の格子を設け、神経核マーカーである DAPI 陽性細胞の総数と、DAPI と cFos が marge しているものの数をカウントし、cFos 陽性細胞の割合を算出した。脳スライス 3 枚分をカウントし 1 例として解析した。解析には imageJ

software (National Institutes of Health) を用いた。統計学的有意差は two-way ANOVA を用いて評価し、 $P < 0.05$ の場合に有意であると示した。

(7) 慢性痛による神経可塑的变化の電気生理学的解析

慢性痛モデルとしてラット神経障害性疼痛モデルを作製した。腹側被蓋野および外側視床下部に逆行性トレーサーを注入し、分界条床核から腹側被蓋野あるいは外側視床下部に投射する神経細胞を蛍光標識した。その後、ラットを断頭して分界条床核を含む脳スライスを作製し、パッチクランプ法により、分界条床核から腹側被蓋野あるいは外側視床下部に投射している神経細胞において自発的な抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を記録した。

4. 研究成果

(1) 扁桃体中心核 分界条床核神経路の活性化が不安情動に及ぼす影響

EPM test において、control 群と比べ、Chr2 群では光照射により、open arm 滞在時間が有意に減少した。一方、光刺激による総移動距離には 2 群間で有意な差は見られなかった。以上の結果より、扁桃体中心核 分界条床核神経路の活性化は不安情動を増強することが示された。本研究過程において、分界条床核 扁桃体中心核神経路の活性化も不安情動を増強することを見いだしている。

(2) 扁桃体中心核 分界条床核神経路活性化による不安情動増強における CRF の関与

扁桃体中心核 分界条床核神経路活性化による不安情動増強に分界条床核内 CRF 神経情報伝達が関与するか否かを検討した。EPM test を行う前に CRF 受容体拮抗薬を分界条床核内に局所投与した。対照群には saline を投与した。saline 投与群では光照射により open arm 滞在時間が有意に減少し不安情動が増強されたが、拮抗薬投与群では open arm 滞在時間に有意な変化は見られなかった。以上の結果より、扁桃体中心核 分界条床核神経路の活性化による不安情動増強には分界条床核内 CRF 神経情報伝達が関与することが示唆された。

(3) 扁桃体中心核 分界条床核神経路活性化による分界条床核内 cFOS 発現誘導

光照射による扁桃体中心核 分界条床核神経路の活性化に伴い、分界条床核神経細胞の活動が亢進しているか否かを調べるため、神経活動マーカーである cFos の免疫染色を行った。扁桃体中心核 分界条床核神経路の活性化により、分界条床核内 cFos 陽性細胞が増加していた。この結果より本神経路の活性化は分界条床核神経細胞の活動を亢進させることが示唆された。また、この効果は、CRF 受容体拮抗薬の前処置により抑制されたこ

とから扁桃体中心核 分界条床核神経路の活性化による分界条床核神経細胞の活動上昇は、CRF 神経情報伝達を介していることが示唆された。分界条床核において、CRF は2型神経細胞の活動を選択的に上昇させることをすでに報告しているが (J Neurosci, 33, 5881-5894 (2013)) 本研究課程において、CRF による2型神経細胞活動上昇には2型神経細胞におけるアデニル酸シクラーゼ-cAMP-PKA 系の活性化が重要であること、さらに、2型神経細胞の活性化は腹側被蓋野や外側視床下部に投射する3型神経細胞への抑制性入力を増加させることを見いだしている。また、分界条床核2型神経細胞の活性化におけるグルタミン酸-NO 系の関与を示すデータも得ている。

(4) 慢性痛モデル動物分界条床核における神経活動の可塑的变化

対照群に比較し、慢性痛モデル動物では、腹側被蓋野や外側視床下部に投射する分界条床核3型神経細胞への抑制性入力が増加していた。さらに、この抑制性入力の増大に分界条床核内 CRF 神経情報伝達の亢進が関与していることを示唆するデータを得ている。慢性痛による抑うつや不安の亢進に分界条床核内 CRF 神経情報伝達の可塑的变化が関与している可能性が考えられる。

<引用文献>

Deyama S, Katayama T, Ohno A, Nakagawa T, Kaneko S, Yamaguchi T, Yoshioka M, Minami M, Activation of the beta-adrenoceptor- protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. J. Neurosci., 28, 2008, 7728-7736

Ide S, Hara T, Ohno A, Tamano R, Koseki K, Naka T, Maruyama C, Kaneda K, Yoshioka M, Minami M, Opposing roles of corticotropin- releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats. J. Neurosci., 33, 2013, 5881-5894

Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M, Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. J. Neurosci., 32, 2012, 18035-18046

Jennings JH, Sparta DR, Stamatakis AM, Ung RL, Pleil KE, Kash TL, Stuber GD,

Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. Nature, 496, 2013, 224-228

Kim SY, Adhikari A, Lee SY, Marshel JH, Kim CK, Mallory CS, Lo M, Pak S, Mattis J, Lim BK, Malenka RC, Warden MR, Neve R, Tye KM, Deisseroth K, Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. Nature, 496, 2013, 219-223

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Deyama S, Sugano Y, Mori S, Amano T, Yoshioka M, Kaneda K, Minami M, Activation of the NMDA receptor-neuronal nitric oxide synthase pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain. Neuropharmacology, 査読有, 118, 2017, 59-68
DOI:10.1016/j.neuropharm.2017.03.008

Kaneko T, Kaneda K, Ohno A, Takahashi D, Hara T, Amano T, Ide S, Yoshioka M, Minami M, Activation of adenylate cyclase- cyclic AMP-protein kinase A signaling by corticotropin-releasing factor within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis is involved in pain-induced aversion. Eur. J. Neurosci., 査読有, 44, 2016, 2914-2924
DOI: 10.1111/ejn.13419

Nagano Y, Kaneda K, Maruyama C, Ide S, Kato F, Minami M, Corticotropin-releasing factor enhances inhibitory synaptic transmission to type III neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. Neurosci. Lett., 査読有, 600, 2015, 56-61
DOI: 10.1016/j.neulet.2015.05.059

[学会発表](計20件)

山内 直紀、高橋 大樹、長野 雄介、天野 大樹、南 雅文、Activation of the bed nucleus of the stria terminalis neurons projecting to the central amygdala induces anxiety-like behaviors、第90回薬理学会年会、2017年3月15日~2017年3月17日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

木村 佳祐、長野 雄介、山内 直紀、南 雅文、Activation of neuronal projection from the central amygdala

to the bed nucleus of the stria terminalis induces anxiety-like behaviors、第 90 回薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日～2017 年 3 月 17 日、長崎ブリックホール（長崎県・長崎市）

Naoki Yamauchi, Yusuke Nagano, Daiki Takahashi, Taiju Amano, Masabumi Minami、The neurons in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis are sorted by neuronal firing types and projection pattern、30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology、2016 年 7 月 3 日～2016 年 7 月 5 日、ソウル（韓国）

Daiki Takahashi, Taiju Amano, Masabumi Minami、Alteration of the effects of corticotropin-releasing factor on synaptic transmission in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis of chronic pain model rats、30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology、2016 年 7 月 3 日～2016 年 7 月 5 日、ソウル（韓国）

高橋 大樹、天野 大樹、南 雅文、慢性疼痛モデルラットにおける背外側分界条床核での CRF による興奮性シナプス伝達修飾の変化、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日～2016 年 3 月 11 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

南 雅文、痛みによる負情動生成の神経機構：慢性疼痛とうつ病の接点、第 25 回日本臨床精神神経薬理学会、2015 年 10 月 29 日～2015 年 10 月 30 日、京王プラザホテル（東京都・新宿区）

兼子 智之、原 大樹、井手 聡一郎、金田 勝幸、南 雅文、CRF による背外側分界条床核 型神経細胞の興奮性亢進に關与する細胞内情報伝達、第 58 回日本神経化学会大会、2015 年 9 月 11 日～2015 年 9 月 13 日、大宮ソニックシティホール（埼玉県・さいたま市）

菅野 矢耶、出山 諭司、森 さくら、井手 聡一郎、吉岡 充弘、金田 勝幸、南 雅文、Role of nitric oxide within the ventral bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversion、2015 年 7 月 28 日～2015 年 7 月 31 日、神戸コンベンションセンター（兵庫県・神戸市）

南 雅文、痛みによる負情動生成の神経機構、第 37 回日本疼痛学会、2015 年 7 月 3 日～2015 年 7 月 4 日、熊本市市民会館（熊本県・熊本市）

長野 雄介、金田 勝幸、圓山 智嘉史、井手 聡一郎、加藤 総夫、南 雅文、CRF は分界条床核 型神経細胞における抑制性シナプス伝達を促進する、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18 日～2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 雅文（MINAMI, Masabumi）
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号： 20243040

(3) 連携研究者

金田 勝幸（KANEDA, Katsuyuki）
金沢大学・医薬保健研究域・教授
研究者番号： 30421366

井手 聡一郎（IDE, Soichiro）
公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員
研究者番号： 30389118

山中 章弘（YAMANAKA, Akihiro）
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号： 60323292