

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640009

研究課題名(和文) 情動の臨界期？；幼若期のストレス経験が外側手綱核の構造と機能に及ぼす影響の研究

研究課題名(英文) Stress experiences in immature stage change the lateral habenular nucleus

研究代表者

一條 裕之 (Ichijo, Hiroyuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：40272190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期の経験が影響を及ぼして神経回路の構造と機能が改変されることが感覚系の神経回路で示されており、臨界期として知られている。しかしながら情動の臨界期については神経回路レベルでの研究は行われていなかった。本研究はマウスにおいて幼若期の経験が外側手綱核(LHb)の構造と機能に影響することを示した。反復母子分離ストレスによって成体のLHbにおけるparvalbumin(PV)陽性神経細胞が減少し、ストレス負荷に対する神経細胞活動性が増大した。PV陽性細胞はGABA作働性抑制性神経細胞の中の一部の集団なので、抑制性神経回路の変化がLHbにおける神経活動性の増大に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Structure and function of neuronal circuits are known to be modified under influences of experiences during immature stage, which is well known in mammalian sensory system as "critical period". However, nobody had examined whether there exists a critical period in emotion. Here, we report in mice that stress experiences in immature stage modify structure and function of the lateral habenular nucleus (LHb). Under influences of the repeated maternal separation, neuronal activity of the LHb was hyper-activated, which was correlated with decrease of the parvalbumin(PV)-positive neurons. Since the PV neurons belong to the GABAergic inhibitory neurons, it is thought that modification in the inhibitory neuronal circuits is involved with the experience-dependent activity changes in the LHb.

研究分野：神経科学

キーワード：外側手綱核 臨界期 母子分離ストレス parvalbumin

### 1. 研究開始当初の背景

手綱核は予期した報酬が与えられずに罰が与えられた時やストレスに反応して活動することで「負の報酬や罰」をコードして、情動と行動を結びつける神経核として知られている。私達は神経細胞活動性の履歴を標識する遺伝子導入マウスを作製し、外側手綱核の感受性が幼若期に高く、成体では低いことを発見した。このことは幼若な個体では罰やストレスに関する感受性が高く、成熟にしたがって穏やかになることを示唆している。幼若期の経験の影響で回路の構造と機能が改変されることが「臨界期」として感覚系の神経回路で示されているが、情動の臨界期については神経回路レベルでの研究は行われていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は情動と行動の発達を理解するために、マウスにおける幼若期の経験が外側手綱核の構造と機能に及ぼす影響を検討し、情動の臨界期を検証することを目的として行われた。発達段階に依存した外側手綱核の感受性の変化の研究を通じて、幼若期のストレス負荷が外側手綱核の回路の構造と機能に及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

本研究は富山大学動物実験委員会によって審査され、承認を受けた。

#### ( 1 ) 動物

マウス C57BL/6J を用いた。明暗環境 ( 7 時から 19 時まで明環境 ) を調整した飼育室で、一ケージ当たり 5 匹を、自由にエサと水を摂取する環境でマウスを飼育した。雄のみを実験に用いた。

#### ( 2 ) 生育環境の操作

以下のストレス負荷を利用した。

\* 拘束ストレス ( immobilization [IMO] ): 成体においてストレスに対する LHb の活動性を調べるために、50ml のプラスチック製チューブ ( ファルコン ) に入れ、1 時間拘束した後、ホームケージに戻した。

\* 母子分離ストレス ( maternal separation [MS] ): 幼若個体においてストレスに対する LHb の活動性を調べるために、ホームケージから取り出して、一匹の状態ですべて 1 時間おいた後にホームケージに戻した。

対照群に加えて、幼若期にストレス負荷を与えた群と成熟後にストレス負荷を与えた群を作成し、生育環境を操作した。

\* 対照群 ( Control ): 全ての期間を正常の環境において飼育したマウスを対照群とした。幼若個体には MS を、成体には IMO を負荷し、神経細胞活動性の指標である最初期遺伝子産物 ZIF268/EGR1 の陽性細胞数を測定して、LHb の活動性を調べた。ZIF268/EGR1 はス

レス負荷の終了から 1 時間後に発現のピークとなることをこれまでの実験で明らかにしているため、ストレス負荷の終了から 1 時間後に灌流固定した。

\* 反復母子分離ストレス群 ( repeated maternal separation [RMS] ): P10~P20 までの各日に母子分離ストレスを繰り返し、飼育した。P20、P60 に IMO を行い、1 時間後に灌流固定し、LHb の活動性を調べた。

\* 反復拘束ストレス群 ( repeated immobilization [RIMO] ): P36~P46 までの各日に IMO を繰り返し、飼育した。P60 に IMO を行い、1 時間後に灌流固定し、LHb の活動性を調べた。

#### ( 3 ) 標本の作製と解析

50 µg/g body weight のペントバルビタールを腹腔内に投与して深麻酔した後、開胸した。左心室からカニューレを挿入し、PBS を灌流した後、4%PFA-PBS または 3.7% formalin-PBS による灌流固定を行った。脳を剖出した後に同じ固定液で一晩の追固定の後に、PBS で洗浄し、ゼラチン包埋した。

ゼラチン包埋した標本を vibatome ( VT-1000S, Leica ) を用いて薄切片し、厚さ 70 µm の連続切片を作製した。切片を 0.1% Triton X-100 - PBS ( PBT ) で処理し、3% BSA-PBT によるブロッキングの後、一次抗体を反応させた。一次抗体には抗 ZIF268/EGR1 抗体 ( Santa Cruz )、抗 parvalbumin ( PV ) 抗体 ( Sigma )、抗 aggrecan 抗体 ( Millipore ) を用いた。

適切な組み合わせの二次抗体 ( 抗マウス IgG 抗体または抗ラビット IgG 抗体、Life technologies ) を用いて、蛍光染色、または蛍光二重染色を行い、共焦点顕微鏡 ( ZeissLSM780 ) で観察し、記録した。

切片を PBT で処理し、WFA-biotin ( Vector ) を反応させた。PBT で洗浄の後、Avidin-biotin-HRP ( Vector ) を反応させ、Metal enhanced DAB substrate kit ( Thermo scientific ) で発色させ、perineuronal net ( PNN ) を染色した。標本を顕微鏡 ( LeicaDMRE ) で観察し、デジタルカメラ ( Nikon DsRi1 ) で記録した。

#### ( 4 ) 解析

記録した画像に基づいて、陽性細胞数 ( ZIF268/EGR1, PV, aggrecan ) と PNN 陽性領域の拡がり ( WFA 陽性領域 ) を測定した。

#### \* 経験の操作が LHb の構造に及ぼす影響

PV 陽性細胞は GABA 作働性抑制性神経細胞の中の一部で、視覚系における臨界期形成に役割を果たすことが知られているため、LHb における細胞構築の指標として用いて、神経回路構造を評価した。前方から後方にかけての LHb 全体を撮影し、PV 陽性細胞数を目視で測定した。

神経回路の安定性に影響を与え、視覚系の

臨界期の閉鎖に関わることが知られている PNN はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) を構成成分とすることが知られている。CSPG のコアタンパクである aggrecan を持つ aggrecan 陽性細胞数と CSPG の糖鎖に結合する WFA レクチンによって認識される細胞外基質の拡がりを PNN の指標として用いて LHb の構造を評価した。LHb の全体を撮影し、aggrecan 陽性細胞数を目視で測定した。ImageJ を用いて WFA 陽性細胞領域の拡がりを測定した。

\* 経験の操作が LHb の機能に及ぼす影響

ZIF268/EGR1 陽性細胞数を神経細胞活動性の指標として用いて、LHb の機能を測った。LHb の全体を撮影し、ImageJ を用いて ZIF268/EGR1 陽性細胞数を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 発達段階依存的な LHb の機能

P9~P60 までのそれぞれの段階にストレス負荷を行い、ZIF268/EGR1 陽性細胞数を指標に LHb の活動性を評価した。

MS に対する LHb の活動性は P9 にはほとんどみられなかったが、P11 から P20 にかけては大きかった。P20 における IMO に対する LHb の活動性は著しく大きかったが、P35 と P60 での活動性の増大は P20 に比して小さかった。

P10~P20 にかけてのストレス負荷は LHb に大きな活動を引き起こすが、成体 (P35, P60) では中程度の活動性の増加を引き起こした。

##### (2) 発達段階依存的な LHb の構造

P10 では PV 陽性神経細胞は観察されなかった。P20 でわずかに観察され、陽性細胞数は P35 にかけて増加し、P60 以降も維持されていた。

P10 において PNN は観察されなかった。CSPG のコアタンパク質の aggrecan は P20 ですでに発現し、P35, P60 にわたって維持されていた。aggrecan は PV 陽性細胞の細胞体の表面を覆っていた。

他方、WFA で認識される PNN (CSPG の糖鎖部分) は P20 で観察され、P35~P80 にかけて領域は単調増加し、PNN が拡大する様子が観察された。

以上のことから LHb の活動性の平穏化にもなって、PV 陽性細胞数と aggrecan 陽性細胞数が増加し、PNN 領域が拡大することが明らかになった。

##### (3) 経験の操作が LHb の構造と機能に及ぼす影響

経験の操作が LHb の構造に及ぼす影響を測るために、RMS 群を作成し、P20 と P60 に灌流固定し、対照群および RIMO 群と比較した。P20 においては PV 陽性細胞数、aggrecan 陽性細胞、WFA 陽性領域のいずれにおいても三群間に違いは認められなかった。

しかしながら、P60 における RMS 群では PV

陽性細胞数が対照群と RIMO 群に比して有意に少なかった (\*\*  $p < 0.01$ ) (one-way ANOVA, Turkey HSD test, RMS vs Control;  $p = 0.0009$ , RMS vs RIMO; \*\*  $p = 0.0008$ ) (図 1)。

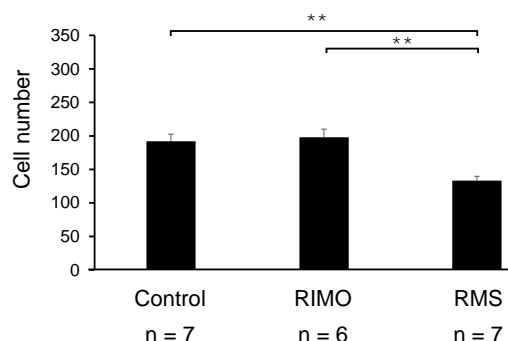


図 1 LHb における PV 陽性細胞数

他方、RMS 群における aggrecan 陽性細胞数および WFA 陽性 PNN は P20 および P60 のいずれにおいても他の二群と違いは認められなかった。P10~P20 の幼若期の RMS によって成体の LHb の構造に影響が現れるが、その影響は PV 陽性細胞に特異的で、PNN の構造には影響しなかった。

経験の操作が LHb の機能に及ぼす影響を検討し、構造の改変と機能の変化の関係を調べるために、成体 (P60) におけるストレス負荷によって引き起こされる LHb の活動性を ZIF268/EGR1 陽性細胞数を指標として、RMS 群と対照群および RIMO 群を比較した。RMS 群では他の二群に比して著しく多い ZIF268/EGR1 陽性細胞数が観察され、その違いは有意であった (\*\*  $p < 0.01$ ) (one-way ANOVA, Turkey HSD test, RMS vs Control;  $p = 0.009$ , RMS vs RIMO;  $p = 0.0051$ ) (図 2)。

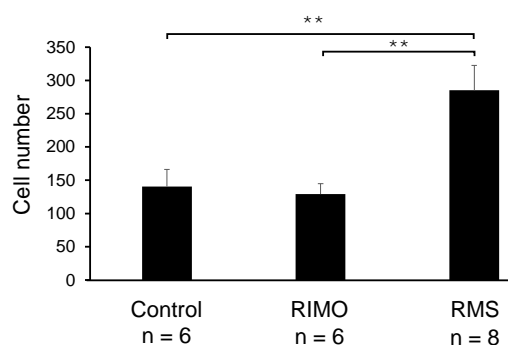


図 2 LHb における ZIF268/EGR1 陽性細胞数

この結果は RMS によって LHb の機能が影響を受けることを示し、幼若期に繰り返すストレス負荷によって、成熟後の LHb のストレス感受性が増大することを示している。経験の操作に伴うストレス感受性の増大は LHb の PV 陽性細胞数の減少を伴っていた。PV 陽性細胞は GABA 作働性抑制性神経細胞と考えられるので、LHb における抑制性神経回路の変化が

ストレス感受性の増大に關与していると示唆される。PV 陽性細胞は視覚系における臨界期形成に役割を果たすことが知られているが、LHb においても同様の神経回路機序が示唆され、情動の臨界期の解明の一步となると期待される。

#### 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 3件)

An Evolutionary Hypothesis of Binary Opposition in Functional Incompatibility about Habenular Asymmetry in Vertebrates. Ichijo H, Nakamura T, Kawaguchi M, Takeuchi Y.

Front Neurosci. 2017 Jan 4;10:595. doi: 10.3389/fnins.2016.00595. eCollection 2016.

Axons from the medial habenular nucleus are topographically sorted in the fasciculus retroflexus.

Ichijo H, Toyama T. Anat Sci Int. 2015 Sep;90(4):229-34. doi: 10.1007/s12565-014-0252-z.

Lateralization, maturation, and anteroposterior topography in the lateral habenula revealed by ZIF268/EGR1 immunoreactivity and labeling history of neuronal activity.

Ichijo H, Hamada M, Takahashi S, Kobayashi M, Nagai T, Toyama T, Kawaguchi M. Neurosci Res. 2015 Jun;95:27-37. doi: 10.1016/j.neures.2015.01.005.

[学会発表](計 1件)

Ichijo H, Kawaguchi M. Lateralization, maturation, and anteroposterior topography in the lateral habenula revealed by ZIF268/EGR1 immunoreactivity and labeling history of neuronal activity. 第38回日本神経科学大会, 2015年07月30日, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市.

[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.med.u-toyama.ac.jp/anat/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

一條 裕之 (ICHIJO, Hiroyuki)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)教授

研究者番号: 40272190

##### (2) 研究分担者

川口 将史 (KAWAGUCHI, Masafumi)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)助教

研究者番号: 30513056

##### (3) 連携研究者

無し

##### (4) 研究協力者

無し