The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ストレス応答に関わる前障神経細胞のマルチスケール解析
Author(s)	田沼, 将人
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92113
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　田沼　将人　　）	
論文題名	ストレス応答に関わる前障神経細胞のマルチスケール解析

ストレス応答は、外界からの刺激への適応反応であり、様々な脳領域の情報伝達によって制御される生物の生存に必要な機能である。これまでに、副腎皮質ホルモンなどの神経内分泌系がストレス応答の中心を担っているとされてきたが、ストレス刺激により脳局所神経回路が可塑的に変化することが最近相次いで示され、ストレス応答の概念が変わりつつある。例えば、ストレス応答に関連する内側前頭皮質や扁桃体などの脳領域においてはストレス刺激によって神経活動がダイナミックに変化し、神経細胞間の活動相関が変化する。このような局所神経回路の機能的な変化は脳領域間の情報伝達も変調させ、ストレス刺激による情動行動の表出にも関与すると考えられる。そのため、多領野連関により制御されるストレス応答のメカニズム解明には、ストレス応答に重要な脳領域における局所神経回路の機能的変化を明らかにすることが必要である。

これまで我々は、脳全体の活性化マッピングと機械学習による判別分析を用いて、前障（claustrum, CLA）がストレス応答に重要な脳領域であることを見出してきた。また、化学・光遺伝学的手法を用いた人工的な神経活動操作により、CLAに存在するストレス応答性の神経細胞集団が、ストレスによる不安応答の制御やうつ様行動の発現に重要であることを明らかにしてきた。CLAは大脳皮質や皮質下の脳領域と双方向に神経回路を形成することから、CLAはこれらの脳領域から入力を受けて局所神経回路に機能的な変化が生じ、内側前頭皮質の活動や機能を制御するものと考えられる。しかしながら、ストレス刺激によるCLA神経細胞の経時的な活動変化や細胞間の活動の相関といった局所回路における機能的結合性の変化、またCLA神経活動に影響しうる他の脳領域からのストレス応答性神経細胞の入力は明らかにされていない。そこで本研究では、シングル細胞RNAシーケンス、一光子*in vivo*カルシウムイメージングおよび神経回路標識技術を用い、単回ならびに反復ストレス負荷によるCLA神経細胞の機能的変化を詳細に解析した。

CLAは、分子マーカーで分類可能な2つの亜領域（coreとshell）に分かれるが、神経細胞のシングル細胞RNAシーケンスを実施した結果、CLAのストレス応答性神経細胞は2つの亜領野に偏りなく存在していた。そこで、CLAのストレス応答性神経細胞に発現する特徴的な分子マーカーを探索するため、ストレス応答性神経細胞とストレス非応答性神経細胞間で遺伝子発現変動解析を実施した結果、coreとshellのストレス応答性CLA神経細胞に共通して発現が高い分子として*Car12*を同定した。次に、Car12を発現するCLAストレス応答性細胞の神経活動と不安関連行動との関係を明らかにするため、マウス自由行動下*in vivo*カルシウムイメージングを実施した。ストレス負荷前の定常状態では、不安誘発性の環境（高架式十字迷路のオープンアームやオープンフィールドの中央エリア）においてCar12発現神経細胞の神経活動が上昇した。単回社会的敗北ストレス負荷により、不安誘発性の環境におけるCar12発現神経細胞の活動応答は有意に増大した。また、実験間で同一神経細胞を追跡しストレス負荷前後の神経活動を比較した結果、不安誘発性の環境で応答する神経細胞集団はストレス負荷前後で一部異なる集団になっていた。さらに、5日間連続の反復社会的敗北ストレス負荷により生じる社会忌避行動時の*in vivo*カルシウムイメージングを実施した結果、忌避行動を誘発する環境（攻撃性の高いマウスの近傍エリア）で選択的に活動するCar12発現神経細胞の割合がストレス負荷前と比較して増加し、その活動応答も増大した。また、反復社会的敗北ストレス負荷後も忌避行動を誘発する環境に滞在する際に活性化する神経細胞集団がストレス負荷前から一部異なっていた。加えて、単回お

よび反復社会的敗北ストレスにより、Car12発現神経細胞間の神経活動の相関がストレス負荷前と比較して上昇した。これらのことから社会的敗北ストレスにより、Car12を発現するストレス応答性神経細胞集団の神経活動が可塑的に変化し、CLA内の局所神経回路の機能的な結合性に変化が生じることを示した。

最後に、ストレス負荷によるCLA内の機能的結合性の上昇に関与する脳領域を同定するため、CLAと扁桃体基底外側核に神経投射するストレス応答性神経細胞の標識を行った。単回社会的敗北ストレスにより標識された神経細胞の脳領域ごとの分布を解析した結果、CLAは、両側の扁桃体基底外側核および内側前頭皮質からの投射を受けることが明らかになった。

このように本研究では、ストレス刺激によって、CLAストレス応答性神経細胞集団が形成する局所回路に機能的変化が生じることやその神経ネットワークを明らかにした。これらの成果は、局所神経回路の可塑的変化から脳領域の情報伝達の制御を介してストレス応答が惹起されるメカニズムの解明に貢献するものである。また、反復ストレスによって生じるストレス性精神疾患の病態の理解や創薬に貢献することが期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　田沼　将人　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	橋本　均
	副 査	教授	辻川　和丈
	副 査	教授	齊藤　達哉

論文審査の結果の要旨

ストレス応答は、外界からの刺激への適応反応であり、様々な脳領域の情報伝達によって制御される生物の生存に必要な機能である。これまでに、副腎皮質ホルモンなどの神経内分泌系がストレス応答の中心を担っているとされてきたが、ストレス刺激により脳局所神経回路が可塑的に変化することが最近相次いで示され、ストレス応答の概念が変わりつつある。例えば、ストレス応答に関連する内側前頭皮質や扁桃体などの脳領域においては、ストレス刺激によって神経活動がダイナミックに変化し、神経細胞間の活動相関が変化する。このような局所神経回路の機能的な変化は脳領域間の情報伝達も変調させ、ストレス刺激による情動行動の表出にも関与すると考えられる。そのため、多領野連関により制御されるストレス応答のメカニズム解明には、ストレス応答に重要な脳領域における局所神経回路の機能的変化を明らかにすることが必要である。

これまで田沼を含む所属研究室での先行研究において、脳全体の活性化マッピングと機械学習による判別分析を用いて、前障（claustrum, CLA）がストレス応答に重要な脳領域であることが見出されてきた。また、化学・光遺伝学的手法を用いた人工的な神経活動操作により、CLAに存在するストレス応答性の神経細胞集団が、ストレスによる不安応答の制御やうつ様行動の発現に重要であることが明らかにされてきた。CLAは大脳皮質や皮質下の脳領域と双方向に神経回路を形成することから、CLAはこれらの脳領域から入力を受けて局所神経回路に機能的な変化が生じ、内側前頭皮質の活動や機能を制御するものと考えられる。しかしながら、ストレス刺激によるCLA神経細胞の経時的な活動変化や細胞間の活動の相関といった局所回路における機能的結合性の変化、またCLA神経活動に影響しうる他の脳領域からのストレス応答性神経細胞の入力は明らかにされていない。そこで本学位論文において田沼は、シングル細胞RNAシーケンス、一光子*in vivo*カルシウムイメージングおよび神経回路標識技術を用い、単回ならびに反復ストレス負荷によるCLA神経細胞の機能的変化を詳細に解析し、以下の知見を得た。

CLAは、分子マーカーで分類可能な2つの亜領域（coreとshell）に分かれるが、神経細胞のシングル細胞RNAシーケンスを実施した結果、CLAのストレス応答性神経細胞は2つの亜領野に偏りなく存在していた。そこで、CLAのストレス応答性神経細胞に発現する特徴的な分子マーカーを探索するため、ストレス応答性神経細胞とストレス非応答性神経細胞間で遺伝子発現変動解析を実施し、coreとshellのストレス応答性CLA神経細胞に共通して発現が高い分子として*Car12*を同定した。次に、Car12を発現するCLAストレス応答性細胞の神経活動と不安関連行動との関係を明らかにするため、マウス自由行動下*in vivo*カルシウムイメージングを実施した。ストレス負荷前の定常状態では、不安誘発性の環境（高架式十字迷路のオープンアームやオープンフィールドの中央エリア）においてCar12発現神経細胞の神経活動が上昇した。単回社会的敗北ストレス負荷により、不安誘発性の環境におけるCar12発現神経細胞の活動応答は有意に増大した。また、実験間で同一神経細胞を追跡しストレス負荷前後の神経活動を比較した結果、

不安誘発性の環境で応答する神経細胞集団はストレス負荷前後で一部異なる集団になっていることが示された。さらに、5日間連続の反復社会的敗北ストレス負荷により生じる社会忌避行動時の*in vivo*カルシウムイメージングを実施した結果、忌避行動を誘発する環境（攻撃性の高いマウスの近傍エリア）で選択的に活動するCar12発現神経細胞の割合がストレス負荷前と比較して増加し、その活動応答も増大していた。また、反復社会的敗北ストレス負荷後も忌避行動を誘発する環境に滞在する際に、活性化する神経細胞集団がストレス負荷前から一部異なっていることが分かった。加えて、単回および反復社会的敗北ストレスにより、Car12発現神経細胞間の神経活動の相関がストレス負荷前と比較して上昇していた。これらのことから社会的敗北ストレスにより、Car12を発現するストレス応答性神経細胞集団の神経活動が可塑的に変化し、CLA内の局所神経回路の機能的な結合性に変化が生じることが示された。

最後に、ストレス負荷によるCLA内の機能的結合性の上昇に関与する脳領域を同定するため、CLAと扁桃体基底外側核に神経投射するストレス応答性神経細胞の標識を行った。単回社会的敗北ストレスにより標識された神経細胞の脳領域ごとの分布を解析した結果、CLAは、両側の扁桃体基底外側核および内側前頭皮質からの投射を受けることが明らかにされた。

以上、本論文は、ストレス刺激によって、CLAストレス応答性神経細胞集団が形成する局所回路に機能的変化が生じることやその神経ネットワークを明らかにし、局所神経回路の可塑的変化から脳領域の情報伝達の制御を介してストレス応答が惹起されるメカニズムの解明に貢献するものであり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。