

2024年2月14日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

説明のつかない不安感の正体 手綱核アストロサイトによる神経活動制御の解明

【発表のポイント】

- 手綱核^(注1)という脳内の神経核は、ほとんどすべての脊椎動物に見られる古い脳構造で、意欲や認知機能において重要な役割を担っています。
- ガラス玉が敷き詰められた不安な環境にマウスを置くと、手綱核のアストロサイト^(注2)内の脳内環境が変動することを光計測^(注3)を使って示しました。
- この手綱核アストロサイトの活動を光を使って操作^(注4)すると、不安レベルが調整されることを示しました。
- 本研究により、手綱核アストロサイトの活動が、不安の程度を左右することが示され、不安障害^(注5)の新たな治療戦略が示唆されました。

【概要】

私たちは、えも言われぬ不安感に襲われることがあります。これは潜在的な危険を無意識に察した結果と言えます。したがって、適度な不安は生存に有利ですが、不安が過剰になると適応障害にもつながります。

東北大学大学院生命科学研究科の譚婉琴^{たんえんきん}大学院生(学際高等研究教育院博士教育院生)、松井広^{こう}教授らのグループは、実験動物のマウスを用いて、脳の手綱核^{たづな}のアストロサイトが不安の程度を左右することを発見しました。ガラス玉(マール)を床一面に敷き詰めた環境に置かれたマウスは不安(ブルー)になります。このような不安環境^(注6)のもとでは、手綱核でシータ波^(注7)の神経活動が生じ、アストロサイトの細胞内 pH は酸性化することが分かりました。そこで、手綱核アストロサイトの pH を人為的にアルカリ化に光操作すると、シータ波の神経活動が弱まり、マウスの不安レベルも緩和されました。手綱核アストロサイトの活動制御が不安障害の新たな治療戦略となることが期待されます。

本研究成果は 2024 年 2 月 10 日付で著者校正版が神経科学の専門誌 Neuroscience Research 誌に掲載されました。

【詳細な説明】

研究の背景

ヒトや動物は、常に、周囲の環境を見まわして、潜在的な危険があるかないかを無意識に評価しています。その結果として、時には、意識的には説明のつかない不安感に襲われ、この感情により、自然と危険を回避する行動が引き起こされることがあります。マウスのようなげっ歯類は、開放的な場所、明るい場所、高所を避けるといった行動をとることが知られています。捕食者から狙われる危険性を回避するためだと考えられますが、実験環境には実際の捕食者はいません。したがって、この時、マウスに生まれる感情は「恐怖」ではなく、「不安」だと考えられます。この感情の結果として、危険が予め回避されるようであれば、不安は、動物の生存にとって有益であると言えるでしょう。しかし、私たちを取り巻く環境は刻々と移ろうため、過剰な不安感、変化への望ましい適応さえも抑え込んでしまう可能性があります。逆に、危険性への適度なアセスメントを欠いた向こう見ずな行動も、また、生存を脅かします。本研究では、不安のレベルを適切にコントロールしているのは、手綱核という脳の領域でのアストロサイトと神経細胞の相互作用なのではないかと考えました。

手綱核とは、上丘の背側にあり、海馬の下で両側に位置する一対の小さな神経核で、ほとんどすべての脊椎動物に見られる古い脳構造です。ドーパミン^(注8)作動性の神経系とセロトニン^(注9)作動性の神経系の両方を制御する数少ない脳領域のひとつであり、意欲や認知機能において重要な役割を担っています。手綱核の神経回路の動作異常は、不安障害や大うつ病性障害に関わることが示されています。一方、グリア細胞^(注10)の一種であるアストロサイトは、局所脳内環境を維持し、伝達物質濃度を調節し、シナプス可塑性に影響を与える等の役割を担います。したがって、アストロサイトと神経細胞の相互作用次第で、神経回路の動作の仕方が定まり、この相互作用に不具合が生まれれば、様々な精神疾患につながる可能性があります。そこで、手綱核のアストロサイトによる作用が、周囲の神経細胞の活動に影響し、マウスの不安の程度が決まる可能性を検討することにしました。

今回の取り組み

東北大学 大学院生命科学研究科 超回路脳機能分野の譚婉琴(たん えんきん)大学院生、生駒葉子(いこま ようこ)助教、高橋佑輔(たかはし ゆうすけ)大学院生、松井広(まつい こう)教授らのグループは、群馬大学とコペンハーゲン大学(デンマーク)

との国際共同研究を実施し、マウスを用いた実験によって、不安を司る脳内機構に注目し、特に、手綱核のアストロサイトが局所脳内環境を制御し、動物の不安の程度を左右する可能性を検証することに取り組みました。

マウスの不安様行動の評価に、ガラス玉(マール)覆い隠しテスト^(注11)が使われることがあります。マウスにとって、マールは脅威とはなっていませんが、マールの存在は、マウスを不安にするようです。したがって、マウスは、この不安から逃れるために、マールを床敷きの中に埋めることで、嫌悪刺激となっているマールを視界から取り除き、不安を和らげる反応を示します。マウスに抗不安薬を投与すると、マールを隠す数が減ります。したがって、一定の時間で何個マールを隠したかで、不安のレベルを評価することができると考えられています。そこで、マールがマウスにとって嫌悪刺激となっていることを利用して、ケージの床一面をマールで敷き詰めた、オールマールケージ^(注12)を新たな不安誘発環境として用意しました(図 1)。この場合、マウスは、床敷きによってマールを覆い隠すことはできないので、逃れられない強い不安感(マール・ブルー)に襲われることになると考えられます(図 2)。

オールマールケージにマウスを入れて、手綱核の神経活動を局所フィールド電位^(注13)として記録したところ、シータバンド(5 - 10 Hz)での活動が増強することが示されました(図 3)。それでは、逆に、手綱核をシータバンドで電気刺激すれば、マウスに不安様行動を誘発することができるのでしょうか。これを検証するため、2方明暗箱装置を考案しました。この装置は、オールマールケージの明室と、快適な床敷のある暗室で構成されています。まず、マウスを明室に入れて試験を開始したところ、予想通り、マウスは、より快適な暗室に移動し、実験時間の残りはほとんどそこに留まることが示されました。続いて、マウスが明室から暗室に入るたびに、手綱核に 8 Hz のシータバンドの電気刺激を与えてみました。すると、マウスは明室に留まる傾向が強まり、明室での総滞在時間は、コントロールと比較して有意に長くなりました。このことから、手綱核への 8 Hz シータバンドでの電気刺激により、暗室への嫌悪が生じ、不安様行動が人為的に誘発されることが示唆されました(図 3)。

続いて、不安にともなう局所的な脳内環境の変動を測定するため、アストロサイト特異的に蛍光 Ca^{2+} センサー、蛍光 pH センサー、あるいは、血液内にアルブミン-mScarlet^(注14)を発現させたマウスを用いることにしました。これらのマウスを用いて、手綱核に光ファイバーを留置し、励起光を送り込んで返ってくる蛍光を測定する方法(ファイバーフォトメトリー法)を実施しました。まず、血液内のアルブミン-mScarlet の

蛍光を観察したところ、マウスが不安誘発環境に置かれると、手綱核の局所脳血流量が増大することが示されました。また、それぞれの蛍光センサー発現マウスを用いて、アストロサイト内 Ca^{2+} や pH の変動を可視化したところ、不安誘発環境において、手綱核アストロサイト内 Ca^{2+} は減少し、pH は酸性化することが明らかになりました(図 4)。

これまでの当研究室での研究成果と組み合わせて考えると、アストロサイトの酸性化反応は、アストロサイトからのグルタミン酸等の伝達物質放出を促し、このグルタミン酸が神経細胞に働きかけることで、シータバンド活動が増強されるという経路が働くことが推測されました。もし、このようなメカニズムが働くのであれば、アストロサイトの細胞内を人為的にアルカリ化することで、不安にともなう酸性化を拮抗させれば、抗不安作用が生まれる可能性が考えられました。そこで、アストロサイト特異的に外向きの光感受性水素イオンポンプ ArchT を遺伝子発現させたマウスを用意しました。このマウスのアストロサイトに光を当てると、アストロサイトの細胞内はアルカリ化します。まず、マウスをオールマーブルケージに置くと、シータバンドの局所フィールド電位の増加が観察されました。ここで、両側の手綱核アストロサイトの ArchT を光活性化すると、シータバンドの神経活動は減弱することが示されました(図 5)。続いて、2 方明暗箱装置を用いた研究を行いました。マウスを暗室に入れると、マウスは暗室にとどまる傾向が強いことが確認されました。一方、実験群のマウスにおいて、手綱核アストロサイトの ArchT を光刺激すると、マウスは暗室から明室に移動して、統制群のマウスより、より長い距離を明室において探索する傾向にあることが明らかになりました。

今後の展開

本研究では、不安誘発環境下で、手綱核のアストロサイト内の pH が変化し、手綱核のシータバンド神経活動が調整され、マウスの不安レベルが左右されることが解明されました。また、手綱核アストロサイトの活動を操作することで、不安レベルを調整できることも示されました。したがって、不安障害の新たな治療戦略として、手綱核アストロサイトの機能に影響を与える薬が開発される可能性があります。私たちが、健康で豊かな生活を営んでいく上で、「不安」という感情の持つメリットとデメリットを理解する必要があります。今後の研究を通して、不安のレベルをコントロールする脳内メカニズムが解明されれば、私たちが、上手に「不安」と付き合っていく道が拓けることが期待されます。

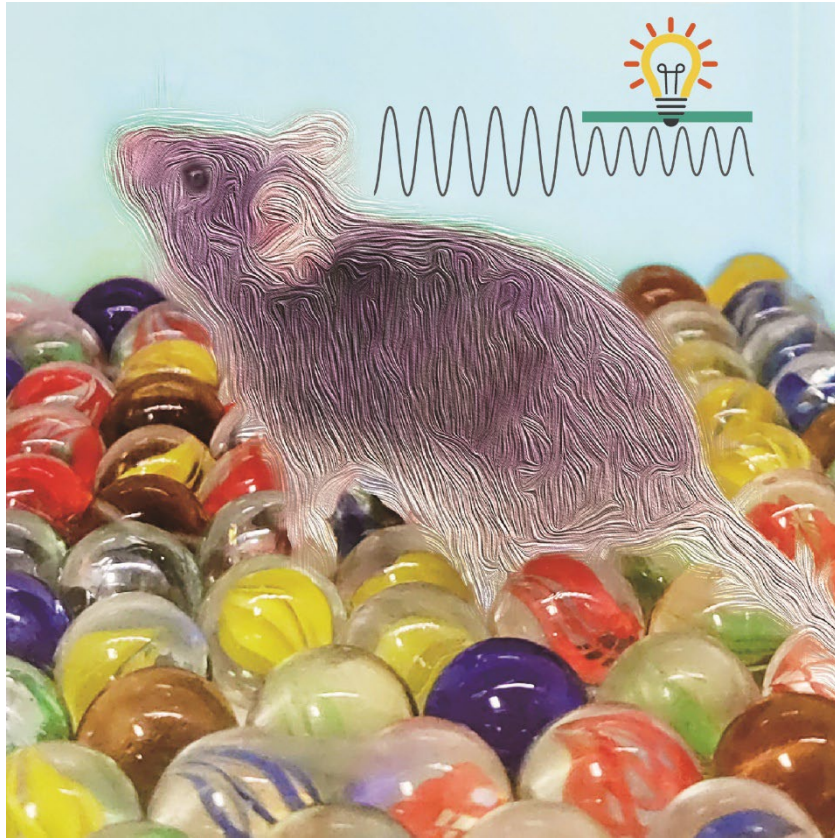
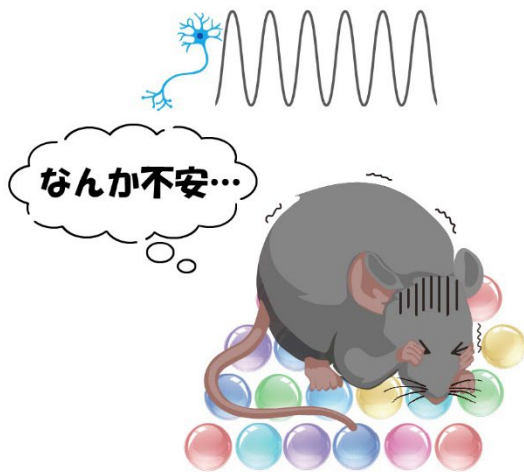


図1. マーブル・ブルーの不安感。これまで見たことのないガラス玉(マーブル)は、マウスを不安(ブルー)にさせます。マーブル覆い隠しテストでは、いくつかのマーブルを床敷きの中に隠すかを調べますが、抗不安薬を投与すると隠す数が減ることが知られています。ところが、床一面にマーブルを敷き詰めると、マーブルを隠しようもなくなるので、マウスは強い不安感に襲われると考えられます。この時の手綱核を調べると、シータ帯域の神経活動が誘発されていました。そこで、光刺激によって手綱核のアストロサイトをアルカリ化してみると、シータ帯域神経活動が減弱しました。手綱核アストロサイトの活動は、不安の程度を左右する役割があることが示唆されました。

※図示のマウスは写真ではなく絵であり、研究状況のイメージになります。

手綱核神経の不安応答



アストロサイト光刺激



図 2. 手綱核アストロサイトによる不安の程度の調節機構。床一面にマーブルを敷き詰めたオールマーブルケージにマウスを入れると、マーブル自体はマウスにとって脅威とはなっていないものの、マウスは、強い不安感に襲われると考えられます。この時のマウスの手綱核の神経活動を調べたところ、不安環境下において、特徴的なシータ帯域(～8 Hz)の神経活動が記録されました。続いて、脳の中のアストロサイトに光感受性の ArchT を遺伝子発現させたマウスを用いました。このマウスの脳内手綱核に光ファイバーを介して光刺激を送り込むと、アストロサイトはアルカリ化します。アストロサイトを光刺激すると、オールマーブルケージの不安環境下でのシータ帯域神経活動が減弱することが示され、マウスの不安様行動は抑制されました。これらの実験により、手綱核アストロサイトには、不安の程度を調節する機能があることが示唆されました。

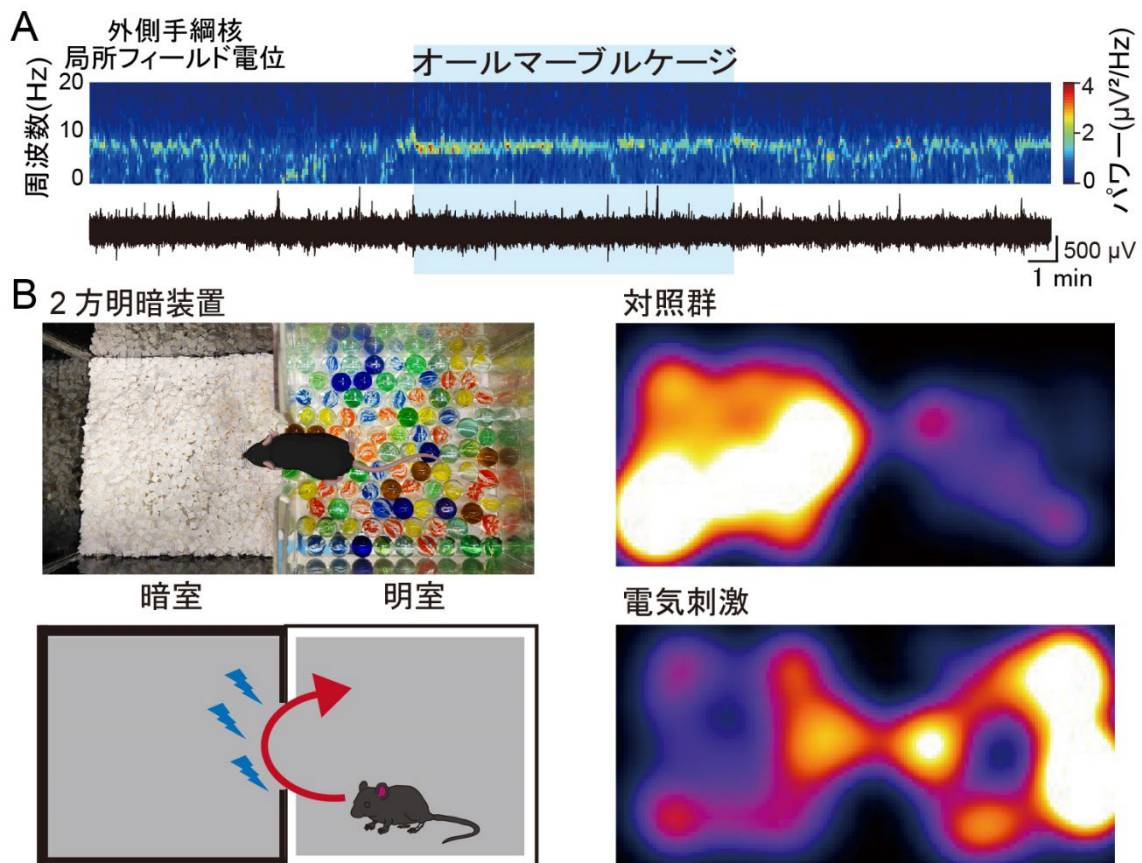


図 3. 手綱核のシータ帯域神経活動と不安。不安を誘発するオールマーブルケージにマウスを入れたときの手綱核での神経活動を調べました。(A) 手綱核に留置した2本の電極間の局所フィールド電位を解析したところ、不安環境下において、特徴的なシータ帯域(～8 Hz)の神経活動が記録されました。(B) 続いて、暗室と明室のふたつの区画を自由に行き来できる装置にマウスを入れました。マウスは、一般的に暗いところを好むことが知られており、さらに、今回、明室としては、オールマーブルケージを用いたので、マウスは、居心地の良い暗室に留まることが多いことが観察されました。しかし、明室に入れたマウスが暗室に移動しようとするたびに、シータ帯域の電気刺激を、人為的に手綱核に送り込むと、マウスは暗室を避け、明室に留まることが多くなることが示されました。したがって、手綱核でのシータ帯域での神経活動は、マウスに不安を誘発させることが示唆されました。

※図示のマウスは写真ではなく絵であり、研究状況のイメージになります。

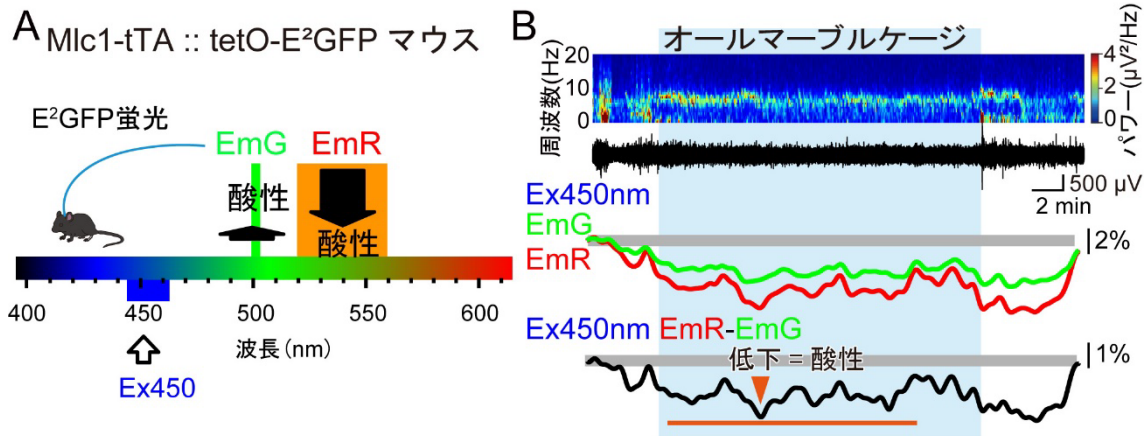


図4. 不安誘発環境下での手綱核アストロサイトの酸性化。(A) 脳内のアストロサイト細胞に、細胞内の pH に応じて蛍光が変化するセンサータンパク質 (E^2GFP) を遺伝子発現させたマウスを用いました。 E^2GFP は、紫色の励起光に対して、緑色～オレンジ色の蛍光を発生しますが、 E^2GFP を取り巻く pH が変化しても、緑色蛍光はほとんど変化せず、オレンジ色蛍光は、pH の酸性化とともに蛍光が減弱することが知られています。(B) このマウスを、不安誘発環境オールマーブルケージに入れたところ、手綱核でシータ帯域の神経活動が起きました。一方、手綱核に留置した光ファイバーからは、アストロサイトの E^2GFP 蛍光が変化するのが観察されました。まず、pH が変化しても蛍光量が変化しないはずの緑色蛍光が減弱したので、手綱核での局所血流量が増大し、直径が拡張した血管に E^2GFP 蛍光が遮蔽^{しゃへい}されて、計測される蛍光量が減ったことが示唆されました。続いて、 E^2GFP のオレンジ色蛍光を調べたところ、オレンジ色蛍光のほうが緑色蛍光より大きく減弱することが示されました。したがって、不安環境下では、手綱核アストロサイトの細胞内は酸性化すること、ならびに、手綱核での局所血流量が増大することが分かりました。

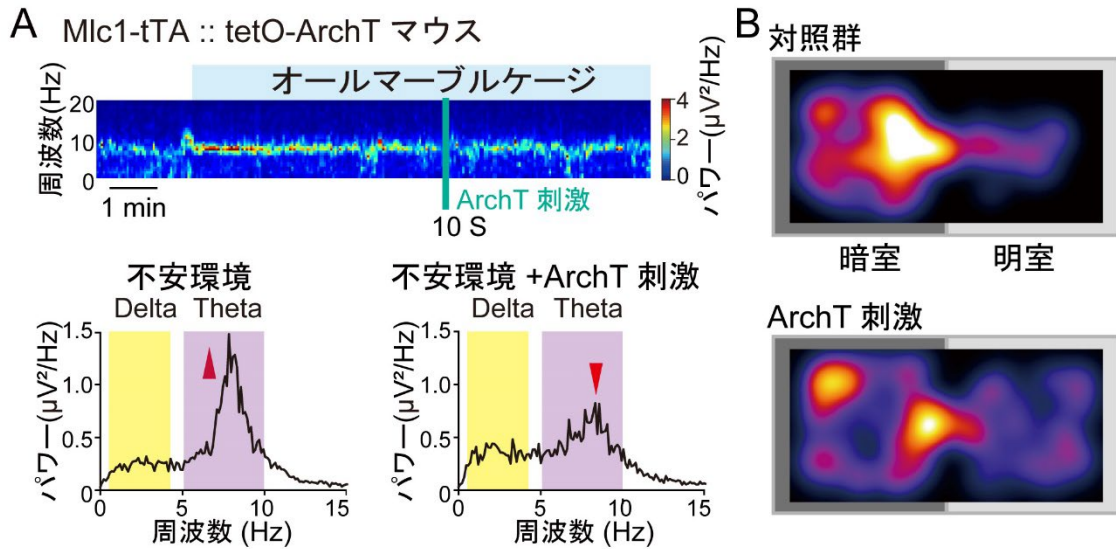


図5. 手綱核アストロサイトの ArchT を光刺激すると不安が緩和されることが示されました。(A) 光感受性の外向きプロトンポンプ ArchT を発現する細胞に光を照射すると、細胞の内から外に向けて、水素イオン(プロトン)が排出されます。したがって、細胞内はアルカリ化します。この ArchT をアストロサイトに遺伝子発現するマウスを用いました。マウスを、不安誘発環境オールマーブルケージに入れると、手綱核においてシータ帯域の神経活動が記録されますが、この時、光ファイバーを介して、手綱核アストロサイトの ArchT を光刺激しところ、シータ帯域の神経活動が減弱することが示されました。(B) 続いて、暗室と明室のふたつの区画を自由に行き来できる装置にマウスを入れたところ、マウスは、居心地の良い暗室に留まることが多いことが観察されました。ところが、アストロサイトに ArchT を遺伝子発現するマウスの手綱核を光刺激したところ、マウスは、暗室から明室に移動して、明室で多くの距離を歩き回って探索するようになることが示されました。したがって、不安環境下で生まれる手綱核アストロサイトの酸性化を拮抗させるアルカリ化作用を引き起こせば、マウスの不安は低減することが示唆されました。

【謝辞】

本研究は、文部科学省研究費補助金 JSPS KAKENHI (JP22K15218、JP22K06454、JP19H03338、JP22H02713)、AMED (JP21dm0207111)、学術変革領域 (A)「グリアデコーディング」(JP20H05896)、学術変革領域 (A)「行動変容生物学」(JP23H04659)、新学術領域研究「脳情報動態」(JP18H05110、JP20H05046)、光科学技術研究振興財団、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団の支援を受けて行われました。

【用語説明】

- 注1. **手綱核**: 手綱核とは、脳の中心部に位置し、前脳からの入力を受けて脳幹に情報を伝達する中継核です。外側手綱核(LHb)からは、吻側内側被蓋核(RMTg)に神経投射があることが知られています。RMTgには、抑制性GABA作動性の神経細胞が多くあり、ドーパミン神経細胞のある腹側被蓋野(VTA)とセロトニン神経細胞のある縫線核(RN)を抑制します。したがって、外側手綱核の神経活動が上がると、VTAとRNの神経活動が抑制され、ドーパミン神経系とセロトニン神経系の両方の活動が下がり、不安様行動につながる可能性が考えられています。手綱核は、逃避不能な足や尻尾へのショック、母性剥奪、社会的敗北ストレスなど、様々な負の情動刺激によって活性化されます。近年は、うつ病の責任病巣としても注目を浴びており、抗うつ薬の作用機序としても、手綱核での作用が重要な役割を果たしていることが示唆されています。
- 注2. **アストロサイト**: 脳を構成する細胞の種類で、神経細胞とは異なるものは総じてグリア細胞と呼ばれます。従来、グリア細胞は、脳の隙間を埋めるノリのような存在と考えられてきましたが、グリア細胞には脳内のエネルギー代謝やイオン環境を制御する機能があることが示されてきました。特に、アストロサイトは、グリア細胞の中で一番多く存在し、脳内の血管と神経細胞の両方に突起を伸ばしていることが知られています。アストロサイトは、神経細胞とは異なる方法で、脳内情報処理に関わることも明らかにされてきており、脳と心の機能におけるアストロサイトの役割に大きな注目が集まっています。
- 注3. **光計測**: 脳深部に光ファイバーを刺し入れて、蛍光信号を計測する方法をフ

イバーフォトメトリー法と呼びます。本研究では、細胞内の Ca^{2+} や pH に応じて、蛍光特性が変化する蛍光センサータンパク質を、脳内アストロサイトに人工的に遺伝子発現させたマウスを用いました。なお、当研究室では、細胞内 Ca^{2+} をセンス(検出)するように設計された蛍光センサータンパク質でも pH の影響を受け、局所血流量の変動はあらゆる蛍光に影響を与えることを示してきました。本研究では、これらの影響を選り分ける工夫が施された新手法が用いられています。また、今回、新たに、アルブミンと mScarlet 蛍光タンパク質を融合させた分子を肝臓で発現させ、これを血液中に循環させる仕組みを使い、局所血流量を直接計測する方法も用いました。複数の指標を組み合わせ、最大4波長の蛍光を計測する方法を開発しました。

- 注4. **光操作**: 光に応じて細胞の状態や機能を変化させるタンパク質を、特定の細胞に遺伝子発現させることにより、光照射で細胞の活動を制御する技術のことを光操作法と呼びます。また、この技術は、光遺伝学またはオプトジェネティクスとも呼ばれます。本研究では、古細菌に発現する光感受性のアーキロドプシンタンパク質(ArchT)を、アストロサイトに特異的に発現させた遺伝子改変マウスを用いました。ArchT は、光により活性化すると、細胞内から細胞外に H^+ イオンを排出するため、細胞内は、過分極するとともにアルカリ化します。
- 注5. **不安障害**: さまざまな原因により、強い不安や緊張感によって生活に支障が出てしまう状態の総称です。主な不安障害には、全般性不安障害、社会不安障害、強迫性障害とパニック障害があります。
- 注6. **不安環境**: ヒトやマウスなどの動物が、潜在的な危険を感じる環境のことを不安環境と呼びます。例えば、ヒトにとっては、暗い屋外や高い場所などが不安環境に相当します。なお、足への電気刺激(フットショック)などが与えられる環境は、実際の脅威となるので、フットショックが与えられたことのある環境に対して生まれる感情は、「恐怖」と定義されます。一方、高所などは、それ自体では脅威とはなっておらず、潜在的な危険に過ぎないので、潜在的な危険に対して生まれる感情は「不安」と考えられており、「恐怖」とは区別されています。
- 注7. **シータ波**: 多くの脳神経細胞の電氣的な活動が電極まで伝わって記録されるものを脳波、もしくは、局所フィールド電位と呼びます。脳波の周波数を解析することで、睡眠や覚醒、てんかん等の脳病態等に相関するいくつかの脳状態を高精度に測定し、診断をすることができていることが知られています。今回、手

網核に挿入した電極から記録される局所フィールド電位の波形に含まれる 5 - 10 Hz の周波数成分に注目しました。この周波数成分はシータ波(一般的には、4 - 8 Hz 程度と定義されています)と呼ばれます。この他、デルタ波(0.5 - 4 Hz)など、いくつかの周波数帯域での振動活動が観察され、それぞれ異なった生理学的な意義を有すると考えられています。

- 注8. **ドーパミン**: 中枢神経系に存在する神経伝達物質の一種で、快く感じる原因となる脳内報酬系の活性化において、中心的な役割を果たしていることが知られています。また、運動調節、学習や情動に関しても、重要な役割を果たしていることが明らかにされています。
- 注9. **セロトニン**: 神経伝達物質の一つで、情動や認識機能に深く関連することが知られています。
- 注10. **グリア細胞**: グリア細胞は、大きく分けて、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに分類されています。本研究では、特に、アストロサイトの役割に注目しました。
- 注11. **ガラス玉覆い隠しテスト**: 敷き詰めた床敷の上にガラス玉(マーブル)を配置し、その後、マウスがマーブルを床敷内に埋めてしまう行動を観察する試験をマーブル覆い隠しテストと呼びます。マーブルは、マウスにとって嫌悪刺激となるため、一定の時間で、何個のマーブルを隠したかが、マウスの不安の程度の指標となります。また、マーブル覆い隠しテストでは、マウスの不安ではなく、マウスの強迫行為に関連した行動が測定されているとも考えられています。
- 注12. **オールマーブルケージ**: All marble cage (AMC)。ガラス玉(マーブル)のように、マウスにとって新規性のあるものを、マウスは、嫌悪刺激として捉えることが知られています。そこで、マーブルをケージの床一面に敷き詰めることで、逃れようのない不安環境を、新たに考案しました。とはいえ、マウスにとっても、マーブル自体は、健康や生命を脅かすような脅威とはなっておらず、実験の都合上も、オールマーブルケージでの連続滞在時間は、最大でも 20 分程度と限っていたため、マウスにとっての苦痛度は高くないと判断されました。
- 注13. **局所フィールド電位**: 本研究では、近接する2本の電極を手網核に挿入し、このふたつの電極間の電位差を増幅することで、手網核での局所フィールド電位を記録しました。局所フィールド電位では、手網核の電極近傍の多くの脳神経細胞の電氣的な活動による影響が合わさったものが記録されているため、

個々の神経細胞の活動は計測されません。電極近傍での神経の集合的な活動状態を知るひとつの指標として用いられています。

- 注14. **アルブミン-mScarlet**: アルブミンと mScarlet の融合タンパク質を肝臓で発現させると、血中にアルブミン-mScarlet が放出され、全身の血管内を循環します。mScarlet は赤色の蛍光タンパク質なので、黄色の励起光を照射すると、血管内から赤色の蛍光が観察されるようになります。本研究では、ファイバーフォトメトリー法で mScarlet 蛍光を計測したので、血管径が太くなって、光ファイバー先端近傍の局所血流量が増えれば、mScarlet 蛍光がより強く計測されることとなります。このようにして、局所血流量の変化を光計測しました。なお、アルブミン-mScarlet を用いた血管造影技術は、コペンハーゲン大学(デンマーク)の平瀬肇教授との国際共同研究により導入し、群馬大学の平井宏和教授、今野歩講師の協力により、アルブミン-mScarlet の発現を可能にするアデノ随伴ウイルスの設計・作出が得られました。

【論文情報】

タイトル : Anxiety control by astrocytes in the lateral habenula
著者 : Wanqin Tan, Yoko Ikoma, Yusuke Takahashi, Ayumu Konno,
Hirokazu Hirai, Hajime Hirase, Ko Matsui*

筆頭著者 : 東北大学 大学院生命科学研究科 超回路脳機能分野
譚 婉琴 (博士課程大学院生)

* 責任著者 : 東北大学 大学院生命科学研究科 超回路脳機能分野
松井 広 (教授)

研究者 : <https://researchmap.jp/komatsui/>

研究室 : <http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/>

掲載誌 : Neuroscience Research

DOI : doi.org/10.1016/j.neures.2024.01.006

URL: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2024.01.006>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院生命科学研究科

教授 松井 広 (まつい こう)

TEL: 022-217-6209

Email: matsui@med.tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院生命科学研究科広報室

高橋 さやか (たかはし さやか)

TEL: 022-217-6193

Email: lifsci-pr@grp.tohoku.ac.jp