

論 文 要 旨

The pivotal role of PACAP/PAC1R signaling from the anterior insular cortex to the locus coeruleus on anxiety-related behaviors of mice

前部島皮質-青斑核回路の PACAP/PAC1 シグナリングは
マウスの不安関連行動に関与する

NGUYEN THI THU

【序論および目的】

ノルアドレナリン (NA) を投射する青斑核 (LC) は不安関連行動に関与することが広く受け入れられている。また、神経ペプチドである下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) とその特異的受容体 (PAC1R) シグナリングもまた不安関連行動に関与していることが示されている。非常に興味深いことに PAC1R は青斑核に高発現しているが、不安関連行動における青斑核での PACAP/PAC1R シグナリングの正確な役割は不明である。そこで本研究では、ウイルスベクターおよび遺伝子改変マウスを用いて、不安関連行動に関与する青斑核 PACAP/PAC1R シグナリングを詳細に解析した。

【材料および方法】

マウス

PACAP プロモータの下流で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (PACAP-Cre)、Cre 依存的に PAC1R が欠損するマウス (PAC1^{flox})、およびワイルドタイプマウスとして C57BL6/J を用いた。これらのマウスは、12 時間の明暗サイクル下において自由に食事と水が与えられる条件で飼育された。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターと遺伝子導入

遺伝子操作には種々のターゲット遺伝子を組み込んだ AAV を用いた。3 種混合麻酔薬 (メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール) で鎮静させたマウスの前部島皮質 (aIC) および LC に、ガラス針を使用して 0.5 μ L の AAV を注入した。

LC の NA 神経細胞における PAC1R ノックダウン

PAC1^{flox} の LC に、ドパミン β ヒドロキシラーゼプロモーターで Cre を発現する AAV を感染させた。

aIC における PACAP ノックダウン

ワイルドタイプマウスの aIC に、PACAP 遺伝子と相補的なショートヘアピン RNA を発現する AAV を感染させた。

行動テスト

不安行動の評価に以下の行動テストを用いた。

オープンフィールドテスト：マウスを 50 cm 四方の塩化ビニル製の箱に入れ最大 10 分間の行動を記録した。壁から 10 cm より内側を内部区画と定義し、内部区画での滞在時間および総移動距離を測定した。不安様症状の高まりに応じて、内部区画への滞在時間が減少する。

高架式十字迷路テスト：床から 50 cm に設置した十字型迷路の壁付き 2 アームをクローズアーム、壁なし 2 アームをオープンアームと定義する。マウスをクローズアーム先端に置き、10 分間の間にクローズアームおよびオープンアームに滞在する時間を計測した。不安様症状の高まりに応じて、オープンアームの滞在時間が減少し、クローズアームの滞在時間が増加する。

組織学的解析

PAC1R 発現神経細胞は、ジゴキシゲニンラベルされた相補的 RNA を用いた in situ hybridization を用いて検出した。NA 神経細胞は、抗チロシン水酸化酵素抗体を用いた免疫染色法を用いて検出した。

LC に投射する PACAP 発現神経細胞は、PACAP-Cre マウスの LC に、Cre 依存的に mCherry (赤色蛍光タンパク質) を発現する AAV2/retro (逆行性輸送される AAV) を感染させて検出した。aIC から LC への神経投射は、PACAP-Cre マウスの aIC に、Cre 依存的にシナプトフィジン EGFP キメラタンパク質 (軸索末端を緑色蛍光標識) を発現する AAV を感染させ検出した。

【結果および考察】

LC の NA 神経細胞における PAC1R の発現

PAC1R mRNA とチロシンヒドロキシラーゼが LC にて共局在していることから、LC の NA 神経細胞が PAC1R を発現することが明らかとなった。

LC の NA 神経細胞特異的な PAC1R ノックダウンによる抗不安効果

LC の NA 神経細胞特異的に PAC1R をノックダウンしたマウスは、オープンフィールドテストにおける総移動距離および内部区画滞在時間の増加が観察された。さらに、高架式十字迷路テストにおけるオープンアーム滞在時間の増加およびクローズアーム滞在時間の減少が観察された。すなわち、LC の NA 神経細胞が発現する PAC1R は不安様症状の増加に関与する可能性が推察された。

aIC の PACAP 発現神経細胞による LC への神経投射

PACAP-Cre マウスの LC に、Cre 依存的に mCherry を発現する AAV2/retro を感染させると、aIC の神経細胞が mCherry で標識された。一方で、PACAP-Cre マウスの aIC に Cre 依存的にシナプトフィジン EGFP を発現する AAV を感染させると、LC に多数の EGFP 陽性ドットが観察された。すなわち、aIC の PACAP 発現神経細胞は LC に投射することが明らかになった。

aIC の PACAP ノックダウンによる抗不安効果

aIC の PACAP をノックダウンしたマウスは、オープンフィールドテストにおける内部区画滞在時間の増加が観察された。さらに、高架式十字迷路テストにおけるオープンアーム滞在時間の増加が観察された。すなわち、aIC の PACAP は不安様症状の増加に関与する可能性が推察された。

【結語】

以上の結果から以下の事柄が明らかとなった。

- (1) LC の NA 神経細胞の PAC1R は不安様行動に関与すること
- (2) aIC の PACAP は不安様行動に関与すること
- (3) aIC の PACAP 発現神経細胞は LC に投射すること

本研究成果は、不安に関連する神経回路の理解を深めるとともに、不安障害の治療法開発に向けた新たな知見を提供した。しかし本研究成果において、aIC の PACAP 発現細胞が LC の NA 神経細胞を直接活性化し、この神経回路が不安様行動に関与するかを証明する知見が不足しているため、今後の研究課題と言える。

