

博士論文

腹側被蓋野の神経活動による
末梢免疫機能への影響

鹿山 将

目次

【背景】	p 3
【方法】	p 5
【結果】	p 14
【考察】	p 21
【結論】	p 26
【図表】	p 27
【参考文献】	p 39
【謝辞】	p 43

【背景】

脳-末梢免疫連関 近年、情動などの精神状態と末梢免疫機能との関連が着目されている。例えば、臨床知見においては、笑うこと（正の情動発現）により、末梢の Natural Killer 細胞の活性が高まることが知られている (Bennett et al., *Altern Ther Health Med.*, 2003)[1]。逆に、負の情動が長期的に優位になっているうつ病患者は、感染症に罹患するリスクが高いことが知られている (Andersson et al., *Int J Epidemiol.*, 2016)[2]。このような脳-末梢免疫連関を担う脳領域として、腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA) が挙げられる。VTA には、報酬や正の情動発現に関わるドーパミン神経細胞が存在し (Schultz et al., *Science*, 1997)[3]、これらの細胞の活性化が、末梢免疫系を制御している可能性が考えられる。実際に近年では、動物実験において、VTA と末梢免疫機能との関連を示すような現象が報告され始めている。例えば、ラットの VTA を電気刺激することにより、末梢の Natural Killer 細胞の活性が高まることが知られている (Wrona et al., *J Neuroimmunol.*, 2004)[4]。さらに、遺伝薬理学的手法により VTA ドーパミン神経細胞を人工的に活性化させると、一部の免疫機能が亢進し、癌や細菌への抵抗性が高まることが報告されている (Shaanan et al., *Nat Med.*, 2016)[5]; (Shaanan et al., *Nat Commun.*, 2018)[6]。

VTA の活動 VTA ドーパミン神経細胞の活動パターンは 2 つに大別される (Fig.1B) (Schultz et al., *Annu Rev Neurosci.*, 2007)[7]; (Cohen et al., *Nature*, 2012)[8]。1 つ目は、断続的な高頻度の活動 (Phasic 活動) であり、エサや水などの報酬に関連する刺激に応答して発生する。2 つ目は、持続的な低頻度の

活動 (Tonic 活動) であり、通常はこの活動を行っているが、ある種の嫌悪的な刺激に反応して抑制される。他にも、VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動を増加させると、場所嗜好性が増加することが報告されており (Tsai et al., *Science*, 2009)[9]、VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動が正の情動発現に関連することが示唆されている。

先行研究における課題 VTA と末梢免疫機能に関連する先行知見では、末梢免疫系側の検証は詳しく行われているものの、中枢神経系側の検証はあまり詳しく行われていない。現状では、VTA ドパミン神経細胞のどのような活動パターンが末梢免疫機能に影響を与えるかに着目した先行知見は、私が知る限り報告されていない。また、これまでの先行知見の多くは人工的な刺激を行っており、自然な生理学的条件下においても同様の現象が起こり得るかは不明である。

本研究の概要：本研究の目的は、VTA のどのような神経活動が、末梢免疫機能に影響を与えるかを明らかにすることである。これを達成するために、光遺伝学的手法を用いて、高い時間解像度をもって VTA ドパミン神経細胞の活動の頻度や時間を操作した。また、自然な生理学的条件下でも同様の現象が見られるかを検証するために、オスマウスをメスマウスに遭遇させ、VTA ドパミン神経細胞を活性化させた。上記の実験系にて、血清サイトカイン値を測定することで、末梢免疫機能を評価した。結果として、VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動が末梢免疫機能に影響を与える可能性が示唆された。また、自然な生理的条件下でも、VTA の活動を介した末梢免疫機能の変動が起こる可能性が示唆された。

【方法】

■ 動物

すべての実験は東京大学ライフサイエンス研究倫理支援室の承認のもとで行われた（承認番号 P29-14、P29-15）。そして、米国国立衛生研究所（NIH）の定めるガイドラインに従ってマウスを飼育し、実験に使用した。

実験には C57BL/6J マウス（8-14 週齢、体重 17-30 g）を用いた。全ての C57BL/6J マウスは、SLC（Shizuoka, Japan）より購入した。加えて、DAT-IRES-Cre^{+/-} マウス（Jackson Laboratories, B6;SJL-Slc6a3tm1.1(cre) Bkmn/J, stock number 006660）と、Ai:32 (RCL-ChR2(H134R)/EYFP) マウス（Jackson Laboratories, B6;129S-Gt(ROSA)26Sortm32(CAG-COP4*H134R/ EYFP)Hze /J, stock number 012569）を掛け合わせ、DAT-Cre × ChR2-EYFP マウスを作製した。DAT-Cre × ChR2-eYFP マウスは、2-6 月齢で、手術前の体重 25-35 g のオスを実験に用いた。全てのマウスは、12 時間明期（午後 7 時～午前 7 時）、12 時間暗期（午前 7 時～午後 7 時）で飼育した。また、飼育中、マウスが水やエサに自由にアクセスできる状態を保った。

■ 手術

すべての手術において、マウスはイソフルランガス（1-3%）で麻酔し、脳定位固定装置（SMM-200, Narishige, Tokyo, Japan）によって頭部を固定した状態で行われた。目の乾燥を防ぐため、目にワセリンを塗布した。そして、リドカイン（1-2%）を頭部に皮下投与することで局所麻酔を行い、目と目の間から

後頭部まで頭皮を切開した。光ファイバーを埋め込む場合は、VTA の座標 (AP -3.2 mm, ML +0.3 mm, DV -4.5mm) に電動ドリルで穴をあけ、硬膜を除去した後、光ファイバー (コア径 $200 \pm 5 \mu\text{m}$ 、クラッド径 $225 \pm 5 \mu\text{m}$ 、FP200URT, Thorlabs Japan, Tokyo, Japan) を埋め込んだ。VTA の脳波記録のための電極を埋め込む場合は、まず 3D プリンターを用いて作製した 2~5 本の電極をもつ電極セットを作製した。そして、脳梁膨大後部皮質 (AP -3.2 mm、ML +0.3 mm、DV -0.5 mm) および VTA (上記と同一座標) の位置に電動ドリルで穴をあけ、硬膜を除去した。その後、各座標に電極の先端がくるように埋め込んだ。この際、脳梁膨大後部皮質に埋め込んだ電極を標準電極として使用した。また、内側前頭前皮質と扁桃体の脳波記録をする場合には、同様に 3~4 本の電極をもつ電極セットを作製した。そして、内側前頭前皮質 (AP +2.0 mm, ML +0.5 mm, DV -1.4 mm) と扁桃体 (AP -0.8 mm, ML +3.0 mm, DV -4.4 mm) と二次運動野 (AP +2.0 mm, ML +0.5 mm, DV -0.2 mm) の位置に電動ドリルで穴をあけ、硬膜を除去した。その後、各座標に電極の先端がくるように埋め込んだ。この際、二次運動野に埋め込んだ電極を標準電極として使用した。電極は、直径 $17 \mu\text{m}$ ポリイミド被覆白金イリジウム (90/10%) ワイヤ (California Fine Wire Co., Grover Beach, CA) を 4 本紡いで、直径約 $40 \mu\text{m}$ のものを作製し用いた。電極先端は、インピーダンスを $150 \sim 300 \text{ k}\Omega$ に下げるために、白金で被膜した。脳表面に取り付けた頭蓋骨にステンレスビスを小脳に埋め込み、参照電極として用いた。VTA に薬物投与を局所投与する場合は、ガイドカニューレ (長さ 8 mm、内径 0.34 mm、外径 0.5 mm、CXG-8, EICOM, Kyoto,

Japan) を VTA (上記と同一座標) に埋め込んだ。埋め込んだ部位の乾燥を防ぐために、ガイドカニューレにダミーカニューレ (CXD-8, EICOM, Kyoto, Japan) を挿入した。光ファイバー・電極セット・ガイドカニューレは、ステンレスビスと歯科用セメントを使用して頭蓋骨に固定した。手術が完了した後、麻酔を中止し、マウスを自然に覚醒させた。手術後、マウスを 3 日以上、個別に飼育し回復させた後、実験に使用した。

■ 光遺伝学的手法

全ての光刺激実験は、ホームケージにて行った。マウスの光ファイバーのフェルレー部分に、レーザーの光源から伸びるコードを接続した。この接続部分をアルミ箔で覆うことで、マウスから青色光が見えないようにした。青色光は、波長 472 nm で、 ~ 30 mW の強さで光照射した。Phasic 光刺激の場合は、15ms の光刺激を、50 Hz の頻度で 25 回 (合計 500 ms)、10 秒間ごとに行った。Tonic 光刺激の場合は、15ms の光刺激を、2.5 Hz の頻度で継続的に行った (Fig.3B)。

■ 血液採取

血液サンプルは、マウスの尾静脈もしくは右心房より採取した。尾静脈から採取する場合は、マウスを固定した後、尾静脈を剃刀の刃で傷をつけ、血液を採取した (50-200 μ l)。右心房より採取した場合は、マウスをイソフルランガス (1-3%) で麻酔した後、開胸し、20 G の針を用いて血液を採取した (1-2 ml)。

得られた血液サンプルを遠心分離し (1000 g, 20 min, 4 °C)、血清を分取した。

得られた血清は、サイトカイン値を測定するまで -80 °Cに保存した。

■ 血清サイトカイン値測定

血清サイトカイン値測定は、Bio-plex アッセイ (mouse cytokine GI TH1/Th2 8 plex assay, Bio-Rad, USA) または ELISA キット (Proteintech, Tokyo, Japan) によって測定した。Bio-plex アッセイは、Bio-Rad 社に測定を委託した。ELISA キットは、製造元のプロトコールに従って用いた。96 well ELISA プレートの well に標準溶液と、2 倍または 4 倍に希釈した血清サンプル (各 100 µl) を添加し、2 時間インキュベートした (37 °C、遮光)。その後、血清サンプルを除去し、well を洗浄液で 4 回洗浄した。次に、各 well に検出抗体希釈溶液 (1:100) 100 µl を添加し、1 時間インキュベートした後 (37 °C、遮光)、先ほどと同様に 4 回洗浄した。その後、各 well に HRP 標識抗体希釈溶液 (1:100) 100 µl を入れ、40 分間インキュベートした後 (37 °C、遮光)、先ほどと同様に 4 回洗浄した。その後、TMB 基質液を 100 µl 添加し、20 分間インキュベートした (37 °C、遮光)。反応を停止させるために、各 well に 100 µl の反応停止液を添加した。450 nm, 620nm の波長で吸光度を測定し、その差 (450 nm での吸光度 - 620 nm での吸光度) をとることで補正を行った。実験ごとに、標準溶液を用いた希釈列を作成し、血清サイトカイン値を求めた。

■ Enriched environment 実験

Enriched environment 実験では、プラスチック製のケージ (37.0 cm × 21.5 cm × 20.0 cm) に滑車、シーソー、毬、はしごを置き、オスマウスを 1 匹で飼育した。この環境下で 14-17 日間飼育し、採血を行った。全てのマウスで、採血の 1 日前に高架式十字迷路試験を行った。

■ メスマウス遭遇実験

メスマウス遭遇実験では、オスマウスのホームケージにメスマウス (8-14 週齢) を入れ、2 時間、4 日間、10 日間後に採血を行った。脳波記録を行った場合については、「電気生理記録」の項目に詳しく記載した。

■ 社会的敗北ストレス実験

社会的敗北ストレス実験は、先行知見を参考に行った (Golden et al., Nat Protoc., 2011)[10]。初めに、プラスチック製のケージ (42.5 cm × 26.6 cm × 15.5 cm) を直径 10mm の穴の開いた透明なプラスチック製の仕切り (0.5cm × 41.8cm × 16.5cm) で分割した。CD-1 マウス (13 週齢以上、オス) をこのケージ片側に 1 匹入れた。この CD-1 マウスを入れたスペースに C57/BL6J マウス (オス) を入れることで、7-10 分間、社会的敗北ストレスに曝露した。ただし、攻撃による傷や出血があった場合には、直ちに曝露を終了させた。その後、C57/BL6J マウスを、仕切りの反対側のスペースに移動させ、24 時間飼育した。この操作を 10 日間連続で行った。この際、毎日違う CD-1 マウスに曝露

させた。全ての社会的敗北ストレスが終わった 2 日後に、採血を行った。

■ 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路は ABS 樹脂製で、中央の領域 (7.6 cm × 7.6 cm) と 4 本のアーム (長さ 28 cm × 幅 7.6 cm、2 本のオープンアームと高さ 15 cm の横壁で囲まれた 2 本のクローズドアーム) をもつものを使用した。迷路は床から 30 cm の高さに設置し、20 W の蛍光灯 2 つを照明として用いた。初めに、30 分間、マウスを記録スペースに静置した。その後、記録を行うために、マウスをオープンアームに向けた状態で中央の領域に置き、5 分間探索させた。終了後、マウスを迷路から取り出した。迷路内でのマウスの行動は、ビデオカメラを用いて、30 Hz のフレームレートで撮影した。

■ 免疫染色

初めに、ウレタン (1 g/kg) を腹腔内注射し麻酔をかけた。その後、氷冷した 1×PBS (-) を 10 ml 灌流させた後、4-8% PFA 液を 10 ml 灌流させて固定を行った。4-8% PFA 液に浸漬して 1 日以上静置した (4°C、遮光)。その後、脳を 30%スクロース水に浸漬し 2 日以上静置した (4°C、遮光)。そして、-80 °C に冷却した 100% アセトン中で脳を凍結させ、ミクロトーム (Sliding Microtome, SM2010 R, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を用いて 50 μm 厚で冠状断脳切片を作製した。この冠状断脳切片を 1×PBS (-) で洗浄し、室温でブロッキング液 (0.3 % Triton X-100, 5 w/v % 血清ウシアルブミン

(nacalai tesque, Kyoto, Japan) in 1×PBS (-)) 中で 60 分間インキュベートした (室温、遮光)。その後、マウス抗チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体 (1:1000, EMD Millipore, USA)、ニワトリ抗 GFP 抗体 (1:1000, abcam, Tokyo, Japan)、ウサギ抗 c-fos 抗体 (VTA は 1:500、その他の脳領域は 1:1000、Synaptic Systems, Goettingen, Germany) をブロッキング液にて各濃度に希釈し、一晩インキュベートした (4℃、遮光)。その後、1×PBS (-) で 3 回洗浄した。そして、抗ウサギ IgG 抗体 Alexa 405, 488 (1:500, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)、抗ニワトリ IgG 抗体 Alexa 488 (1:500, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)、抗マウス IgG 抗体 Alexa 647 (1:500, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) をブロッキング液にて各濃度で希釈し、90-120 分間インキュベートした (室温、遮光)。1×PBS (-) で 3 回洗浄した後、DAPI 含有封入剤 (12745-74, nacalai tesque, Tokyo, Japan) または DAPI を含有していない封入剤 (TA-030-FM, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を用いてスライドガラス (Micro Slide Glass, FRC-02, Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan) に封入した。画像は、対物レンズ (×10, 0.4 NA; ×20, 0.75 NA; ×40, 0.95 NA) を備えた共焦点レーザー顕微鏡 (BX51-FL; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

■ 電気生理記録

脳波記録: 全ての記録は自由行動下で行った。オスマウスの電極セットにある Electric interface board にヘッドステージ (Celeplex M, Blackrock

microsystems, Salt Lake City, UT) を接続し、記録装置 Cereplex Direct (Celeplex Direct, Blackrock microsystems, Salt Lake City, UT) にデータを送った。サンプリングレートを 2 kHz とし、0.1 Hz から 500 Hz の間でフィルタリングした。まず、オスマウスを 1 匹で飼育していたケージを記録スペースに持ち込み、30 分間以上静置した。その後、ホームケージでオスマウス 1 匹の状態を 1 時間脳波記録を行った。そして、メスマウス (8-14 週齢) を 1 匹入れ、2 時間脳波記録を行った。解析には、メスマウスを入れる前後の 30 分間を使用した。

電極痕跡の確認 (ニッスル染色) : 初めに、ウレタンを腹腔内注射し麻酔をかけた (1 g/kg)。その後、氷冷した 1×PBS (-) を 10 ml 灌流させた後、4-8 % PFA 液を 10 ml 灌流させて固定を行った。その後、電極跡を確実につけるために、電極が埋め込まれた状態の頭部のみを取り出し、4-8 % PFA 液に浸漬して 1 日以上静置した (4°C、遮光)。そして、頭部から脳を取り出し、4-8 % PFA 液に 1 日浸漬した (4°C、遮光)。その後、30% スクロース水溶液に 1 日以上浸漬してスクロース置換した (4°C、遮光)。-80 °C に冷却した 100% アセトン中で脳を凍結させ、ミクロトーム (Sliding Microtome, SM2010 R, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を用いて 50 µm 厚で冠状断脳切片を作製した。切片はスライドガラス (Micro Slide Glass, FRC-02, Matsunami Glass Ind.,Ltd., Osaka, Japan) に貼り付け、1 晩以上静置し、乾燥させた。貼り付けた冠状断脳切片をニッスル染色し、疎水性封入剤 (PARAmount-D, Falma, Tokyo, Japan) で封入した。光学顕微鏡 (All-in-One Fluorescence Microscope

BZ-X710, Keyence Corporation, Osaka, Japan) で 2 倍レンズを用いて切片を可視光で撮影した。そして、撮影された画像から各電極で記録した箇所を特定した。

■ VTA への局所薬物投与

薬物投与の際は、ダミーカニューレをガイドチューブから外し、インジェクションカニューレ (CXMI, EICOM, Kyoto, Japan) に交換した。インジェクションカニューレの反対側は、インジェクションポンプ (KDS LEGATO101, Muromashi, Tokyo, Japan) に取り付けられた 5 μ l のシリンジにポリエチレンチューブで接続した。インジェクションカニューレを介して、生理食塩水またはムシモル・バクロフェン混合液 (1 mM ムシモルと 50 μ M バクロフェンを生理食塩水に溶解した混合液) を、0.1 μ l/min の速度で、全量 0.2 μ l 投与した。投与終了後、インジェクションカニューレを 5 分間静置した後、再びダミーカニューレをガイドチューブに挿入した。

■ データ解析

全てのデータ解析は MATLAB、Excel、R を用いて行った。また、本文中の値の表記は「平均値 \pm 標準誤差」とした。

【結果】

本研究では、VTA の神経活動と末梢免疫機能との関連を検証した (Fig.1A)。今回の実験では、末梢免疫機能の指標として、血清サイトカイン値の変動のみを測定した。本研究では、主に末梢免疫系において情報伝達物質として用いられるサイトカインの血清中濃度の変動を、末梢免疫機能の変動ととらえている。しかし、免疫細胞による細菌や癌への抵抗性など、末梢免疫機能をより直接的に評価できる実験は行っておらず、上記のような間接的な評価に留まっている。これは、本研究の **limitation** である。

■ VTA ドパミン神経細胞への光刺激

初めに、VTA ドパミン神経細胞の活動を詳細に操作するために、光遺伝学的手法を用いた (Fig.2A)。DAT-Cre マウスと RCL-ChR2 マウスを掛け合わせ、VTA ドパミン神経細胞にチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現したトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの VTA において、TH 陽性細胞 (ドパミン神経細胞) に ChR2 が発現したことを免疫染色法にて確認した (Fig.2B)。そして、このマウスの右 VTA に、光ファイバーを埋め込み、光刺激を行うことで、VTA ドパミン神経細胞の活動を詳細に操作した。光刺激を行うことで、ChR2 陽性細胞が活性化するかを確認するために、神経活動マーカーである **c-fos** の免疫染色を行った。この実験では、2 時間、断続的かつ高頻度に光刺激し (15 ms の刺激を 50 Hz の頻度で 25 回、10 秒間ずつ)、その 1 時間後に灌流固定し、免疫染色を行った。光刺激を行ったマ

ウスは、光刺激を行っていないマウスと比べて、VTA における ChR2 陽性細胞中の c-fos 陽性細胞数が多い傾向にあった (Fig.2C)。この結果から、光刺激による ChR2 陽性細胞の活性化に成功した可能性が示唆された。

このトランスジェニックマウスに対する VTA への光照射の頻度を操作することで、VTA ドパミン神経細胞のどのような神経活動が末梢免疫機能に影響を与えるかを検証した。前述のとおり、VTA ドパミン神経細胞は、断続的な高頻度の活動 (Phasic 活動) と持続的な低頻度の発火 (Tonic 活動) の 2 つのパターンを示す (Fig.1B) (Schultz et al., *Annu Rev Neurosci.*, 2007) [7]; (Cohen et al., *Nature*, 2012)[8]。本研究では、正の情動発現が末梢免疫機能を活性化させるという臨床的な知見から (Bennett et al., *Altern Ther Health Med.*, 2003)[1]、Phasic 活動の増加が末梢免疫機能を変動させる可能性があると考えた。報酬獲得時にみられるような Phasic 活動を再現するため、Phasic 群を作製した。この群では、VTA を 12 時間、断続的かつ高頻度に光刺激した (15 ms の刺激を 50 Hz の頻度で 25 回、10 秒間ずつ)。活動が高頻度であることが末梢免疫機能に影響を与えることに対して重要であるかを検証するために、Tonic 群を作製した。この群では、VTA を 12 時間、持続的に光刺激した (15 ms の刺激を 2.5 Hz の頻度)。Tonic 群は、光刺激を行った回数が Phasic 群と同じであり、頻度のみを変えている。さらに、光刺激を行っていない、光刺激なし群も作製した。各群、光刺激を終了してから 3 時間後に採血を行い、血清サイトカイン値を測定した (Fig.3 AB)。結果として、Phasic 群で、血清 IL-2, IL-4, TNF- α 値が有意に増加した (Fig.3 C、IL-2 : * $P < 0.05$, Tukey test after two-way

ANOVA, $n = 5$ mice、IL-4 : * $P < 0.05$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 5$ mice、TNF- α : ** $P < 0.01$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 5$ mice)。一方で、Tonic 群では、血清サイトカイン値の有意な変動は見られなかった。また、血清 IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ 値は有意に変動しなかった。これらの結果から、VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動の増加は末梢免疫機能に影響を与える可能性を示唆している。さらに、12 時間の光刺激を行った 9 時間後、24 時間後に採血を行い、血清 IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α 値を測定したが、有意な変動は見られなかった (SFig.1)。これらの結果から、VTA ドパミン神経細胞の活性化による末梢免疫機能の変動は、時間が経つにつれて減少する可能性が示唆された。

■ 自然な生理的条件下での検討

前項目では、光遺伝学的手法を用いることで、VTA ドパミン神経細胞を直接活性化した。では、自然な生理的条件下においても、同様の現象がみられるのだろうか。そこで、自然な生理的条件下において VTA ドパミン神経細胞の活動を変化させて、末梢免疫機能を評価した。神経科学の分野では、多くの場合、マウスの VTA を活性化するために、マウスの摂水・摂食制限をした上で、水やエサを与える方法が用いられる (Cohen et al., *Nature*, 2012)[8]。しかし、この方法ではマウスの栄養状態を変えてしまうため、末梢免疫機能を評価する本研究には不適切であると考えた。そこで、マウスにとって報酬となり得るような実験系として、オスマウスをメスマウスに遭遇させる「メスマウス遭遇群」、

遊具と共に飼育する「Enriched environment 群」を作製した。さらに、負の情動発現が長期的に発生する「社会的敗北ストレス群」を作製した。先行知見にて、Enriched environment 群では、VTA ドパミン神経細胞が活性化することが示唆されている (Li et al., *NeuroImage*, 2020)[11]。今回の実験では、オスマウスを 14-17 日間、遊具 (滑車、シーソー、毬、はしご) のある環境下で飼育した後、採血を行い、血清 IL-2, IL-5, IL-10, TNF- α 値を測定した (Fig 4A)。採血の 1 日前に、高架式十字迷路試験を行ったが、不安様行動に有意な変動は見られなかった (SFig.2)。また、測定した血清サイトカイン値に有意な変動は見られなかった (Fig.4B)。社会的敗北ストレス群では、10 日間連続で社会的敗北ストレスを与えた後、2 日後に採血を行い、血清 IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α 値を測定したが、これらの血清サイトカイン値に有意な変動は見られなかった (SFig.3)。そこで、メスマウス遭遇群にて、VTA の神経活動と末梢免疫機能との関連を詳しく検証することを試みた。

初めに、オスマウスがメスマウスに遭遇することで、VTA の神経活動が増加するかを検証するために、神経活動マーカーである c-fos の発現を免疫染色法にて定量した (Fig.5A)。オスマウスをメスマウスに 2 時間遭遇させた後、オスマウスの VTA の c-fos 陽性細胞数を免疫染色法にて測定した。メスマウスに遭遇したオスマウスは、VTA における TH 陽性細胞 (ドパミン神経細胞) 中の c-fos 陽性細胞の割合が有意に増加した (Fig.5B、* $P < 0.05$, $t_7 = 2.52$, Student's t -test, $n = 4$ mice)。さらに、その主な投射先である側坐核シェルにおける c-fos 陽性細胞数が有意に増加した (Fig.5C、* $P < 0.05$, $t_{11} = 2.26$,

Student's *t*-test, $n = 6$ mice)。一方で、海馬・内側前頭前皮質・側坐核コアでは、*c-fos* 陽性細胞数の有意な変動は見られなかった (Fig.5C)。これらの結果から、オスマウスがメスマウスに遭遇することで、VTA ドパミン神経細胞が活性化し、その主な投射領域である側坐核シェルが活性化した可能性が示唆される。

次に、VTA が活性化したことを電気生理学的な視点から確認するために、オスマウスの右 VTA に電極を埋め込むことで、VTA における脳波を記録した (Fig.6A)。そして、ホームケージにオスマウス 1 匹の状態 (遭遇前) と、メスマウスに遭遇している状態 (メスマウス遭遇時) で、それぞれ 30 分間記録を行った。各周波帯域の強度を定量したところ、メスマウス遭遇時に、Slow ガンマ強度 (20-50 Hz) と Fast ガンマ強度 (50-80 Hz) が有意に増大した (Fig.6 BC、Slow ガンマ強度 : $*P < 0.05$, $t_3 = 3.43$, paired *t*-test, $n = 4$ electrodes from 4 mice、Fast ガンマ強度 : $**P < 0.01$, $t_3 = 12.71$, paired *t*-test, $n = 4$ electrodes from 4 mice)。一方で、デルタ強度 (2-4 Hz) や シータ強度 (4-8 Hz) の有意な変動は見られなかった (Fig.6 BC)。さらに、このような Slow ガンマ強度と Fast ガンマ強度の変動が脳全体で起きているわけではないことを確認するために、同様の検証を前頭前皮質と扁桃体でも行った。結果として、各周波帯域の強度の有意な変動は見られなかった (Fig.7)。これらの結果は、電気生理学的な視点からも、オスマウスがメスマウスに遭遇することで、オスマウスの VTA が活性化した可能性を示唆している。

■ メスマウスとの遭遇による血清サイトカイン値の増加

オスマウスをメスマウスと共に飼育することで、オスマウスの VTA が活性化することが示唆されたため、この実験系を用いて末梢免疫機能を評価した。まず、オスマウスをメスマウスに 2 時間、4 日間遭遇させ、直後に採血を行い、血清 IL-2, IL-5, IL-10, TNF- α 値を定量した (Fig.8A)。メスマウスに 2 時間遭遇させた群は、血清 IL-2 値が有意に増加した (Fig.8B、* $P < 0.05$, $t_{19} = 2.11$, Student's t -test, $n = 10$ mice)。一方で、血清 IL-5, IL-10, TNF- α 値は有意に変動しなかった。4 日間遭遇させた群では、血清 IL-2, IL-5, IL-10, TNF- α 値は有意に変動しなかった (Fig.8C)。さらに、10 日間メスマウスに遭遇させた群も作製し、血清 IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α 値を測定した。結果として、メスマウス遭遇群にて、血清 IL-5 値が有意に増加した (SFig.3、* $P < 0.05$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 3-4$ mice)。

次に、この現象に VTA が関与するかを明らかにするために、VTA の神経活動を抑制することを試みた。右 VTA に薬物投与用のカニューレを埋め込み、神経活動を抑制するためにムシモル・バクロフェン混合液 (ムシモル 1 mM, バクロフェン 50 μ M, 全量 0.2 μ L, 投与速度 0.1 μ L/min) を投与した (Fig.9A)。コントロールをとるために、生理食塩水を投与した群も作成した。その後、このオスマウスをメスマウスに 2 時間遭遇させた。生理食塩水を投与した群では、メスマウスに遭遇した群で血清 IL-2 値が有意に増加した (Fig.9B、* $P < 0.05$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 6-7$ mice)。一方で、ムシモル・バクロフェン混合液を投与した群では、メスマウスに遭遇した群で血清 IL-2 値

の有意な増加は見られなかった (Fig.9B)。メスマウスに遭遇した群同士で比較すると、ムシモル・バクロフェン混合液を投与した群では、生理食塩水を投与した群に比べて、血清 IL-2 値が有意に減少した (Fig.9B、* $P < 0.05$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 6-7$ mice)。これらの結果は、自然な生理学的条件下であっても、VTA の神経活動を介して、末梢免疫機能が変動する可能性を示唆している。

【考察】

■ VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動による末梢免疫機能への影響

本研究は、VTA ドパミン神経細胞への Phasic 光刺激が末梢免疫機能に影響を与えることが示唆された。この研究と同じように、15ms の光刺激を、50 Hz の頻度で 25 回（合計 500 ms）行った研究では、光刺激による発火成功率は約 30 % であることが報告されている (Tsai et al., *Science*, 2009)[9]。そのため、今回の実験でも約 15 Hz 程度には発火している可能性が示唆される。報酬を与えられた際に、VTA ドパミン神経細胞は平均で 15 Hz 程度の発火をすることを踏まえると (Cohen et al., *Nature*, 2012)[8]、自然な生理的条件下に近い発火頻度のある程度再現できたと考えられる。

今回の実験では、Phasic 光刺激 (50 Hz) することで、血清 IL-2, IL-4, TNF- α 値が有意に増加した。同じ回数、比較的低い頻度で光刺激した Tonic 光刺激 (2.5 Hz) の場合には、血清サイトカイン値の有意な変動は見られてない (Fig.3)。すなわち、高頻度に活動することが、末梢免疫機能に影響を与えるために重要である可能性が考えられる。

通常、VTA ドパミン神経細胞は Tonic 活動をしており、投射脳領域に軸索から低濃度なドパミンを放出する。一方で、報酬を獲得した際などに VTA ドパミン神経細胞が Phasic 活動すると、軸索から比較的高濃度なドパミンが放出されることが知られている (Tsai et al., *Science*, 2009)[9]; (Bass et al., *Front Behav Neurosci.*, 2013)[12]。VTA ドパミン神経細胞が主に投射する側坐核には、ドパミン D1 受容体をもつ神経細胞とドパミン D2 受容体をもつ神経細胞

がそれぞれ分かれて存在している (Del'guidice et al., *Front Neuroanat.*, 2011)[13]。また、ドパミン D1 受容体は、ドパミン D2 受容体よりも 20-70 倍高濃度のドパミンに反応することが知られている (Marcellino et al., *Synapse*, 2012)[14]。そして、報酬によって引き起こされる場所嗜好性や学習促進はドパミン D1 受容体を介していることが示唆されている (Shippenberg et al., *Brain Res.*, 1987)[15]; (Smith-Roe et al., *J Neurosci.*, 2000)[16]。これらの知見と、先ほどの結果を踏まえると、VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動が投射先のドパミン D1 受容体を活性化し、末梢免疫機能に影響を与えている可能性が考えられる。VTA ドパミン神経細胞は、直接末梢臓器に投射していないので、いくつかの脳領域の活動を経て末梢免疫系に影響を及ぼしていることが予想されるが (Morales et al., *Nat Rev Neurosci.*, 2017)[17]、どの脳領域へのドパミン放出が最も重要なのかは不明である。VTA ドパミン神経細胞の投射先である様々な脳領域にドパミン D1 受容体の拮抗薬を投与した上で、VTA を Phasic 光刺激する実験を行えば、どのような脳領域を経て末梢免疫系にまで影響を及ぼすのかを明らかにすることができるかもしれない。

末梢の免疫組織は、主に交感神経支配であり、副交感神経はほとんど投射していない (Nance et al., *Brain Behav Immun.*, 2007)[18]。また、交感神経を除去することで、VTA ドパミン神経細胞の活性化による末梢免疫機能への影響が起こらなくなることが報告されている (Shaanan et al., *Nat Med.*, 2016)[5]; (Shaanan et al., *Nat Commun.*, 2018)[6]。加えて、前述の Shaanan らの知見では血漿中コルチコステロン値を測定しているが、VTA ドパミン神経細胞の活

性化による有意な変動は見られなかった。そして、ある種の免疫細胞はアドレナリン β 2受容体を発現しており (Dantzer et al., *Physiol Rev.*, 2018)[19]、アドレナリン β 2受容体がサイトカインの放出を制御していることが報告されている (Sanders et al., *J Immunol.*, 1997)[20]。これらの知見から、VTA ドパミン神経細胞の活性化による末梢免疫機能への影響は、交感神経を介して起こることが示唆されている。本研究での VTA への Phasic 光刺激でも、同様に交感神経を介して末梢免疫機能に影響を与えた可能性が考えられるが、この仮説を明らかにするためには、交感神経の除去や、アドレナリン β 2受容体拮抗薬を投与した上で VTA を Phasic 光刺激する実験を行う必要があると考えている。

■ 自然な生理条件下での末梢免疫機能への影響

Enriched environment 先行知見にて、Enriched environment での飼育により、VTA ドパミン神経細胞が活性化すること (Li et al., *NeuroImage*, 2020)[11]、投射先である側坐核にてドパミン放出量が増大すること (Segovia et al., *J Neural Transm.*, 2010)[21] が示唆されている。この知見から、Enriched environment での飼育で VTA が活性化する可能性があると考え、検証を行った。今回の実験では、Enriched environment で 14-17 日間飼育したことによる、血清 IL-2, IL-5, IL-10, TNF- α 値の有意な増加は見られなかった (Fig.6)。一方で、先行知見にて、Enriched environment で飼育すると、末梢の Natural Killer 細胞の活性が高まることや (Milshtein et al., *Eur J Neurosci.*, 2004)[22]、癌を改善すること (Li et al., *Sci Rep.*, 2015) [23] が報

告されている。この先行知見は 3-8 週間 **Enriched environment** で飼育していることを踏まえると、より長く飼育することで、末梢免疫機能への影響が表れる可能性が考えられる。先行知見では **Enriched environment** での飼育によって不安様行動が減少することが報告されているが (Li et al., *Sci Rep.*, 2015)[23]、今回の実験では不安様行動の減少は見られていない (SFig.2) 点から考察しても、実験条件によって情動に与える影響は異なる可能性がある。すなわち、VTA の活動も異なる可能性が考えられる。今回は、メスマウス遭遇実験を主に進めたため、**Enriched environment** での検証は充分ではなかったが、どの時点で VTA が活性化するかを調べることで、この実験系でも VTA と末梢免疫機能との関連を調べられる可能性があると考えている。

メスマウス遭遇 先行知見にて、オスマウスとメスマウスを遭遇させることで、VTA ドパミン神経細胞中の c-fos 陽性細胞の割合が増加すること (Beloate et al., *J Neurosci.*, 2016)[24] が報告されている。また、オスマウスがメスマウスと遭遇することで、VTA ドパミン神経細胞の投射先である側坐核において、c-fos 陽性細胞数の増加や (Ago et al., *Int J Neuropsychopharmacol.*, 2015)[25]、発火率の増加 (Matsumoto et al., *J Neurosci.*, 2012)[26] が報告されている。これらの知見から、オスマウスとメスマウスを遭遇させることで VTA を活性化させ、末梢免疫機能に影響するかを検証した。本研究では、メスマウス遭遇群にて、VTA の TH 陽性細胞 (ドパミン神経細胞) 中の c-fos 陽性細胞の割合の増加を確認した (Fig.5B)。さらに、側坐核シェルにおいて c-fos 陽性細胞数が有意に増加したことを確認した (Fig.5C)。これらの結果は、先行知見と一致して

いる。さらに、電気生理学的な検証として、オスマウスの VTA の脳波を記録したところ、メスマウスと遭遇することで、Slow ガンマ強度と Fast ガンマ強度が有意に増加した (Fig.6C)。これらの結果から、VTA が活性化した可能性が示唆される。オスマウスとメスマウスが遭遇する際の、オスマウスの VTA の脳波を記録したのは、私が知る限り本研究が初めてである。

次に、オスマウスがメスマウスと遭遇することで、末梢免疫機能に影響するかを検証した。結果として、オスマウスとメスマウスを 2 時間遭遇させることで、血清 IL-2 値が増加した (Fig.8B)。また、10 日間の遭遇では、血清 IL-5 値が有意に増加した (SFig.3)。さらに、VTA の神経活動をムシモル・バクロフェン混合液で抑制することで、2 時間のメスマウスとの遭遇による血清 IL-2 値の増加が抑制された (Fig.9)。これらの結果から、オスマウスがメスマウスと遭遇することで、オスマウスの VTA の神経活動を介して、末梢免疫機能に影響を与える可能性が示唆された。

今回、変動が見られた IL-2 は、主に 1 型ヘルパー T 細胞が放出するが、この 1 型ヘルパー T 細胞は $\beta 2$ 受容体を発現している (Dantzer et al., *Physiol Rev.*, 2018)[19]。光刺激実験の章で述べたように、交感神経を介した経路によってこの現象が起こった可能性が考えられるが、この仮説を明らかにするには、交感神経の除去や、アドレナリン $\beta 2$ 受容体拮抗薬を投与した上で、メスマウス遭遇実験を行う必要があると考えている。

【結論】

本研究では、光遺伝学的手法を用いることで、VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動が末梢免疫機能に影響を与える可能性が示唆された。VTA と末梢免疫系との関連を調べた研究において、ドパミン神経細胞の活動の頻度による違いに迫った知見は、私が知る限り本研究が初めてである。さらに、オスマウスをメスマウスに遭遇させることで、VTA が活性化することが示唆された。また、このような自然な生理的条件下でも、VTA の神経活動を介して、末梢免疫機能が変動する可能性が示唆された。自然な生理的条件下において、特定の脳領域と末梢免疫系との関連に迫った知見は少なく、意義深いものであると考える。本研究の成果は、末梢免疫機能に影響を与えうる、脳内の神経活動の一端を明らかにした点で有意義である。

【図表】

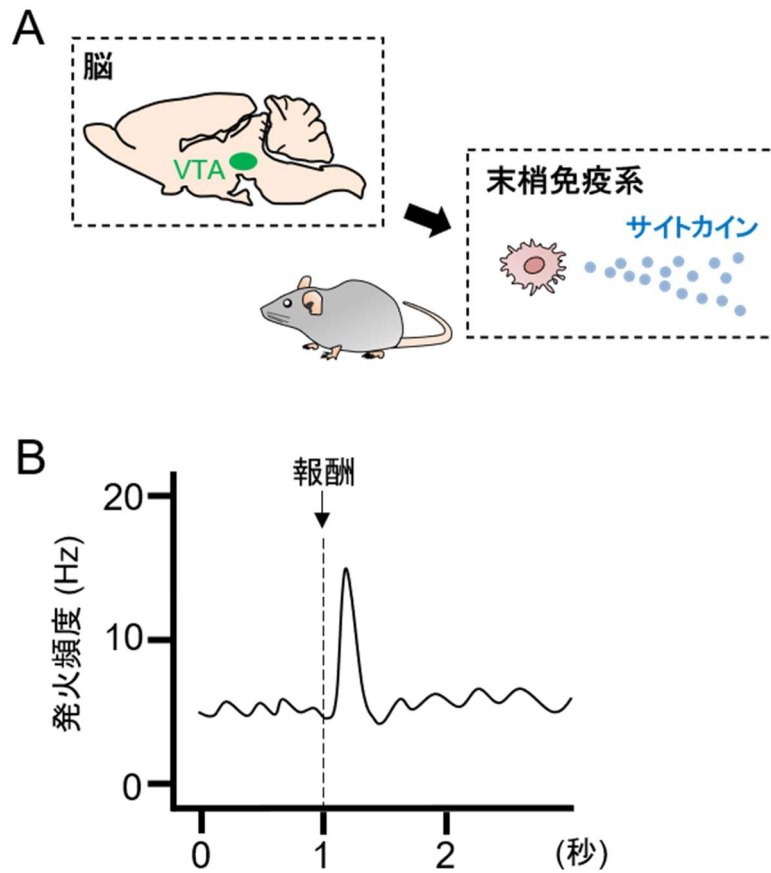


Figure 1. (A) 本研究の概略図。光遺伝学的手法や自然な生理的条件下で VTA を活性化し、血清サイトカイン値を測定した。(B) VTA ドパミン神経細胞の発火活動を模式的に示した。通常、数 Hz 程度の持続的活動 (Tonic 活動) が見られるが、報酬獲得時には高頻度な活動 (Phasic 活動) が見られる。

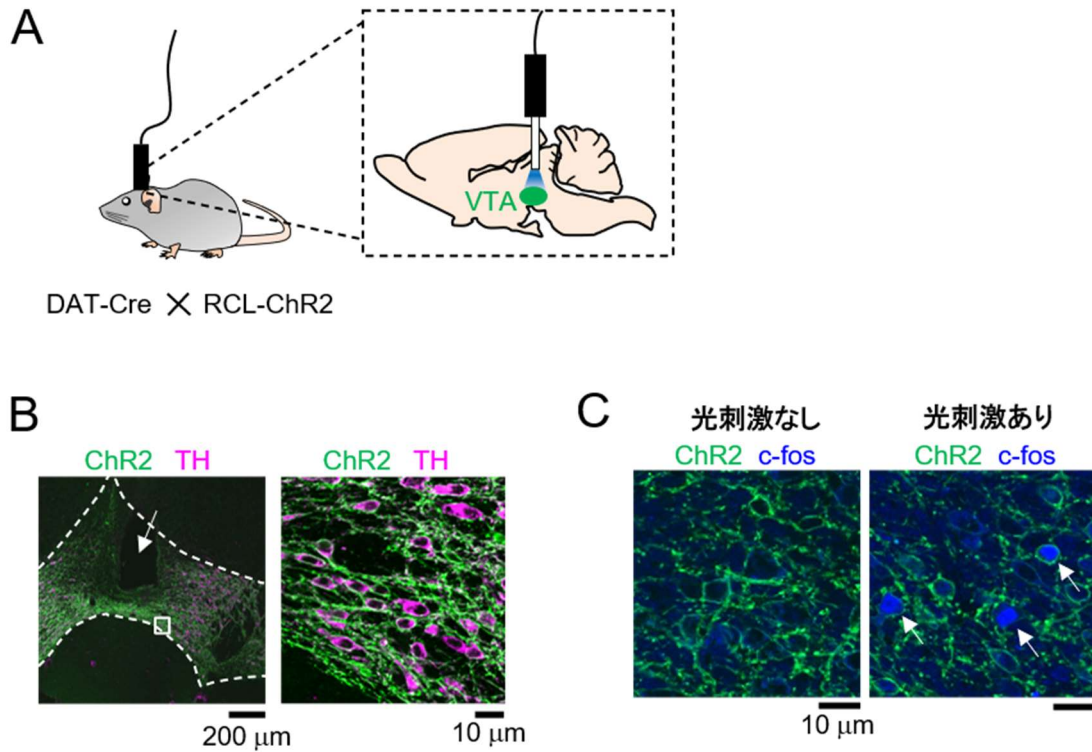


Figure 2. (A) 実験模式図。右 VTA に光ファイバーを埋め込み、光刺激を行った。(B) VTA の免疫染色 (緑 : ChR2、マゼンタ : TH)。(左) VTA を白い点線で囲った。白い矢印は光ファイバー跡を示した。(右) 左図の白枠内の拡大図。(C) VTA の免疫染色 (緑 : ChR2、青 : c-fos)。(左) 光刺激を行っていないマウスの結果。(右) 光刺激を行ったマウスの結果 (波長 472nm、強度 ~ 30 mW、照射時間 15 ms、頻度 50 Hz、25 回を 500 ms の間に光刺激した。これを 10 秒間ごとに 2 時間行い、その 1 時間後に灌流固定した)。白い矢印は ChR2 陽性細胞中の c-fos 陽性細胞を示した。

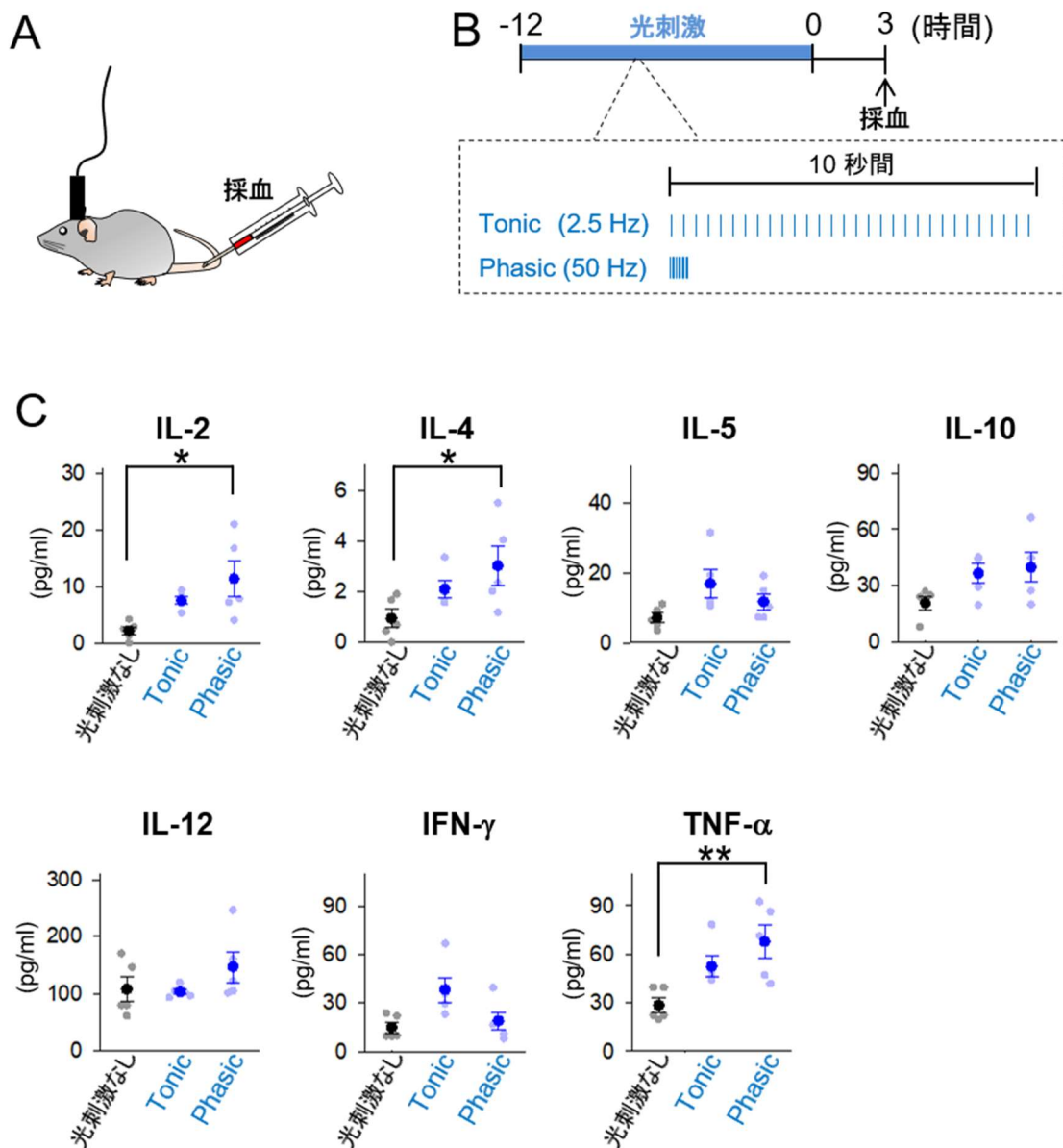


Figure 3. (A) 実験模式図。光刺激を行った後、採血を行い、血清サイトカイン値を測定した。(B) 実験タイムコース。光刺激なし群、Tonic 光刺激群、Phasic 光刺激群の 3 群を作製した。(C) 血清サイトカイン値の結果 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 5$ mice)。

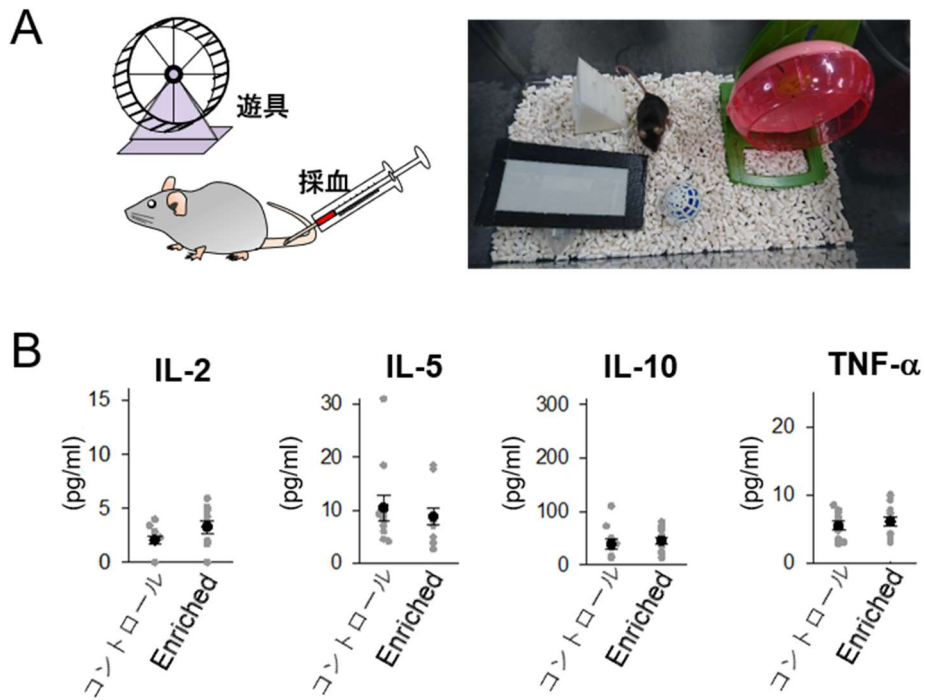


Figure 4. (A) (左) 実験模式図。14-17 日間、遊具（滑車、シーソー、毬、はしご）のある環境で飼育した。（右）実際の画像。（B）血清サイトカイン値の結果（ $P > 0.05$, Student's t -test, $n = 11$ mice）。

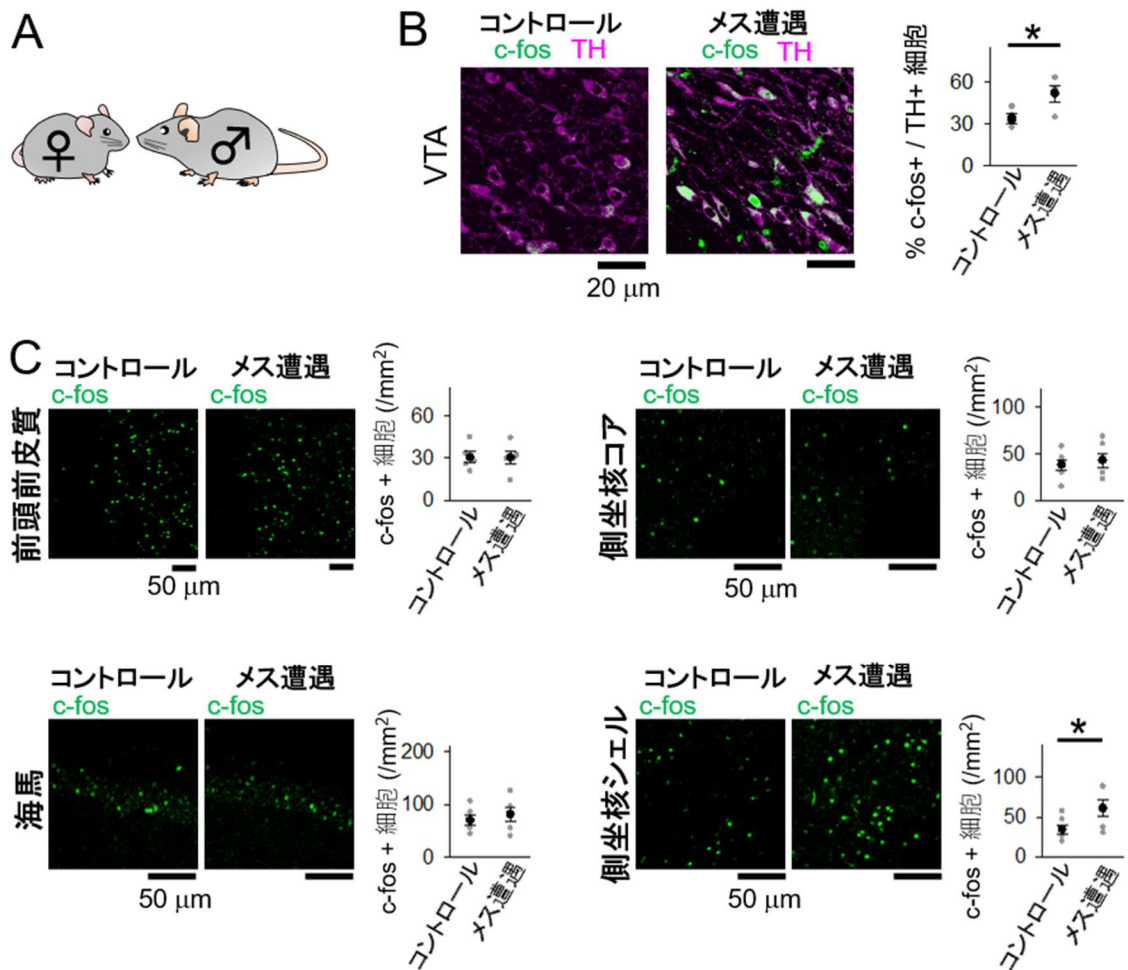
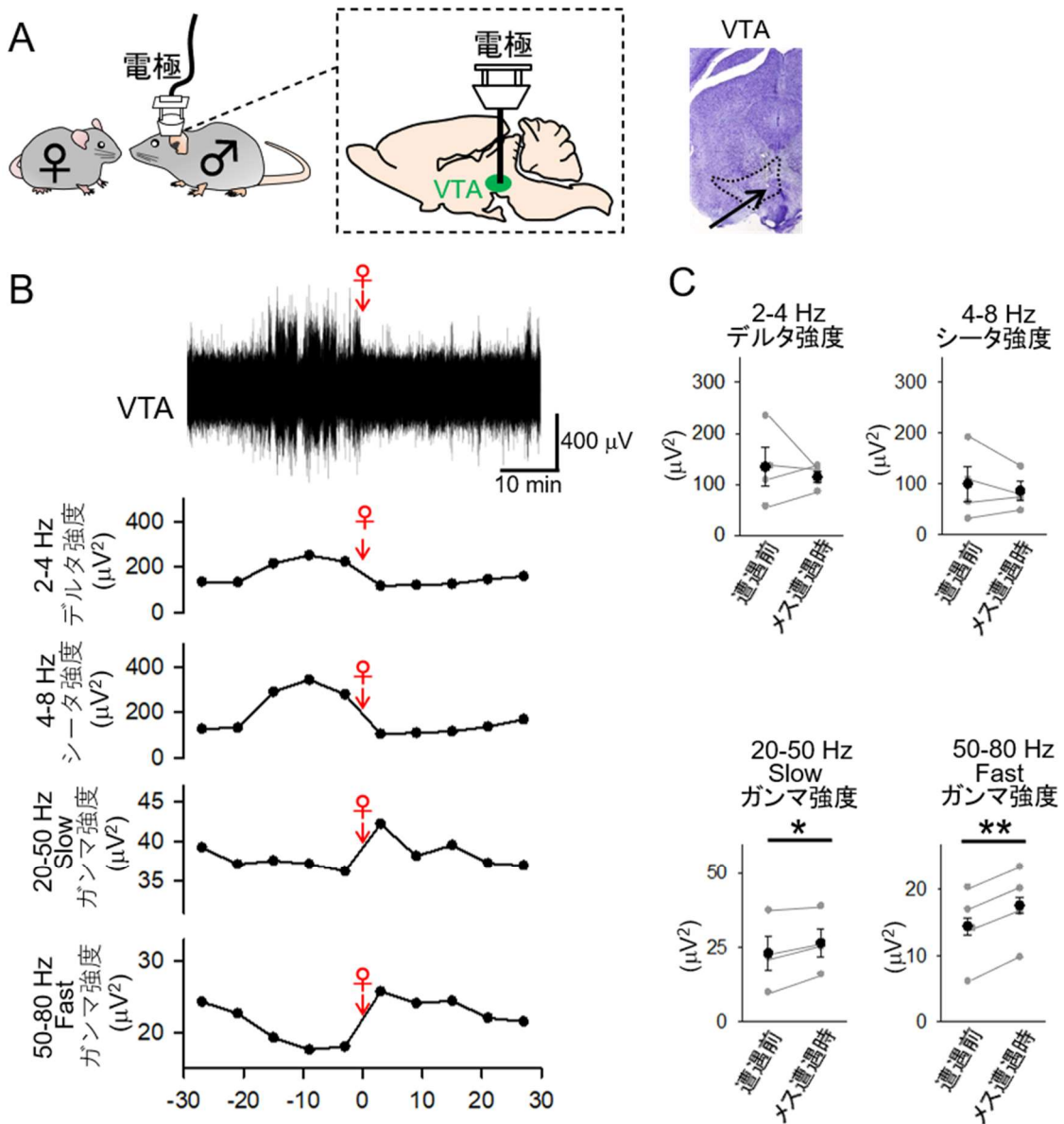


Figure 5. (A) 実験模式図。2 時間、オスマウスをメスマウスと共に飼育した。(B) (左) VTA の免疫染色 (緑 : c-fos、マゼンタ : TH)。(右) 定量結果 (* $P < 0.05$, Student's t -test, $n = 4$ mice)。(C) (左) 内側前頭前皮質、海馬、側坐核コア、側坐核シェルの免疫染色 (緑 : c-fos)。(右) 定量結果 (* $P < 0.05$, Student's t -test, $n = 5-6$ mice)。



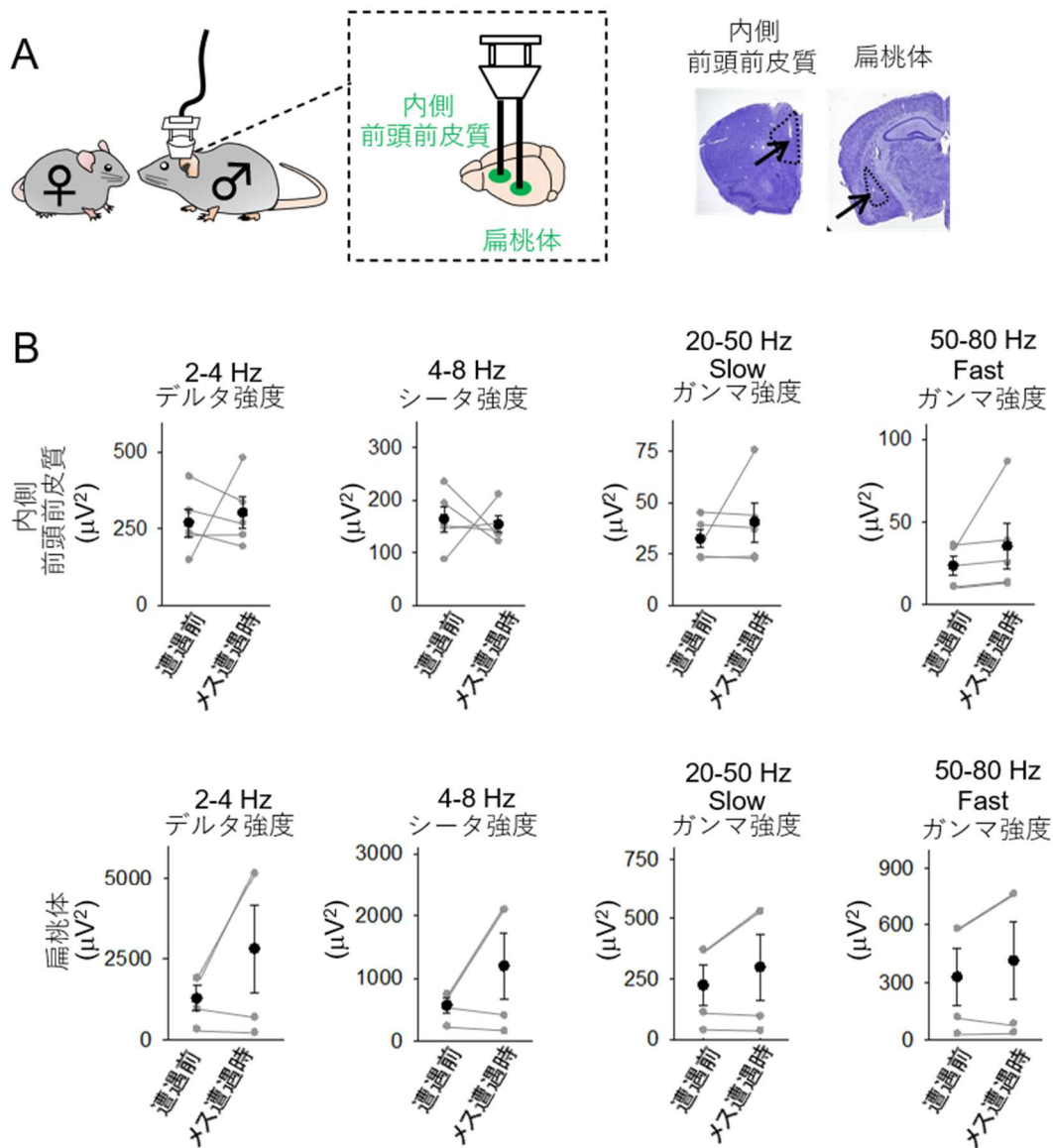


Figure 7. (A) (左) 実験模式図。右の内側前頭前皮質、扁桃体に電極を埋め込み、オスマウスをメスマウスと遭遇させた。(右) ニッスル染色による電極跡確認。黒い点線がそれぞれの脳領域を示しており、黒い矢印は電極の先端を示している。(B) 遭遇前、遭遇時の各 30 分間における各周波帯域の脳波の強度を定量した ($P > 0.05$, paired t -test, $n = 4-5$ electrodes from 2-3 mice)。

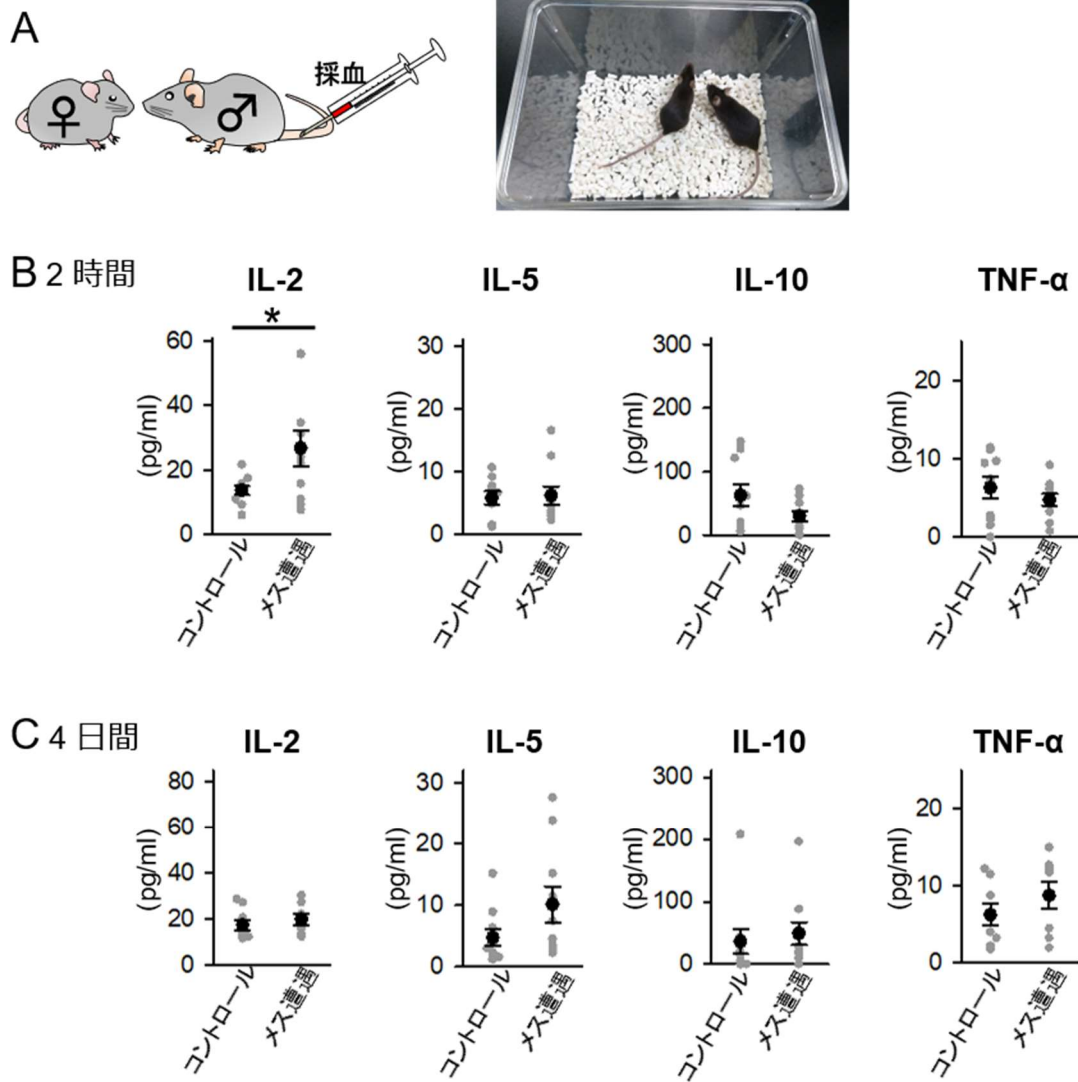


Figure 8. (A) (左) 実験模式図。(右) 実際の写真。(B,C) オスマウスをメスマウスに 2 時間 (B) 及び 4 日間 (C) 遭遇させた場合の、各血清サイトカイン値 (* $P < 0.05$, Student's t -test, $n = 10$ mice)。

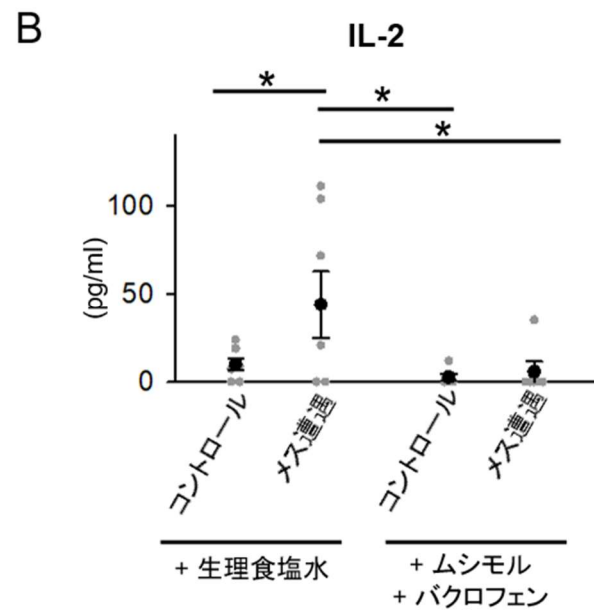
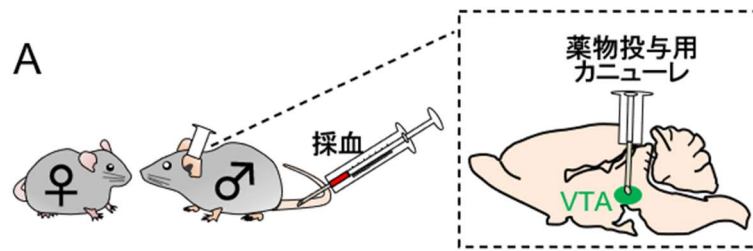
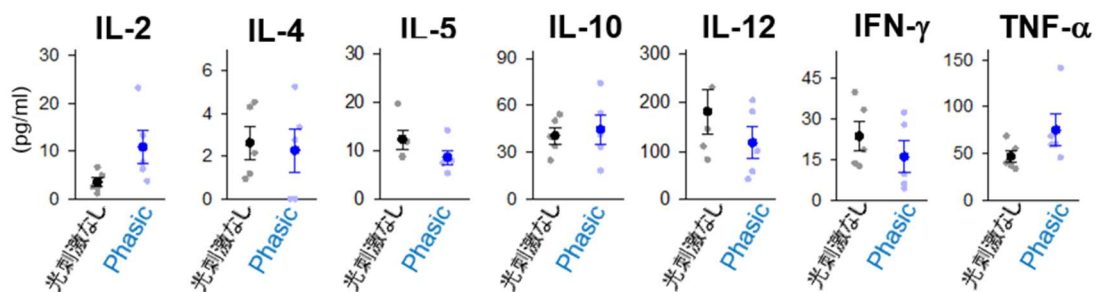
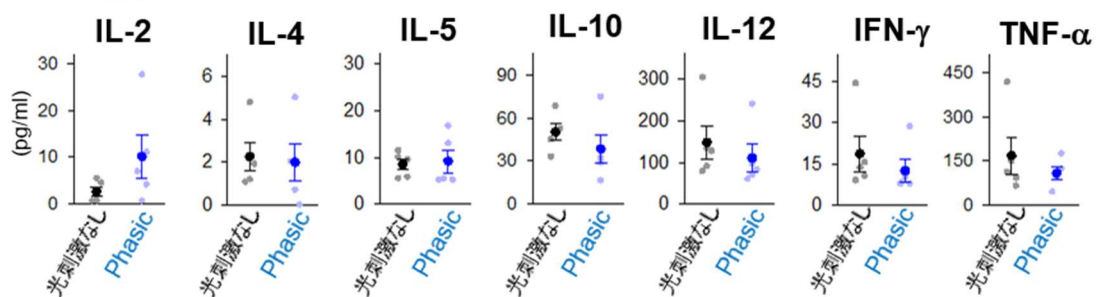


Figure 9. (A) 実験模式図。オスマウスの右 VTA に薬物投与用カニューレを埋め込んだ。そして、VTA の神経活動を抑制するために、ムシモル・バクロフェン混合液を投与した。コントロールをとるために、生理食塩水を投与した群も作製した。その後、メスマウスに 2 時間遭遇させることで、血清 IL-2 値が変動するか検証した。(B) 各群における血清 IL-2 値 (* $P < 0.05$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 6-7$ mice)。

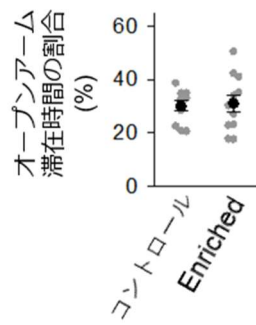
A 9 時間



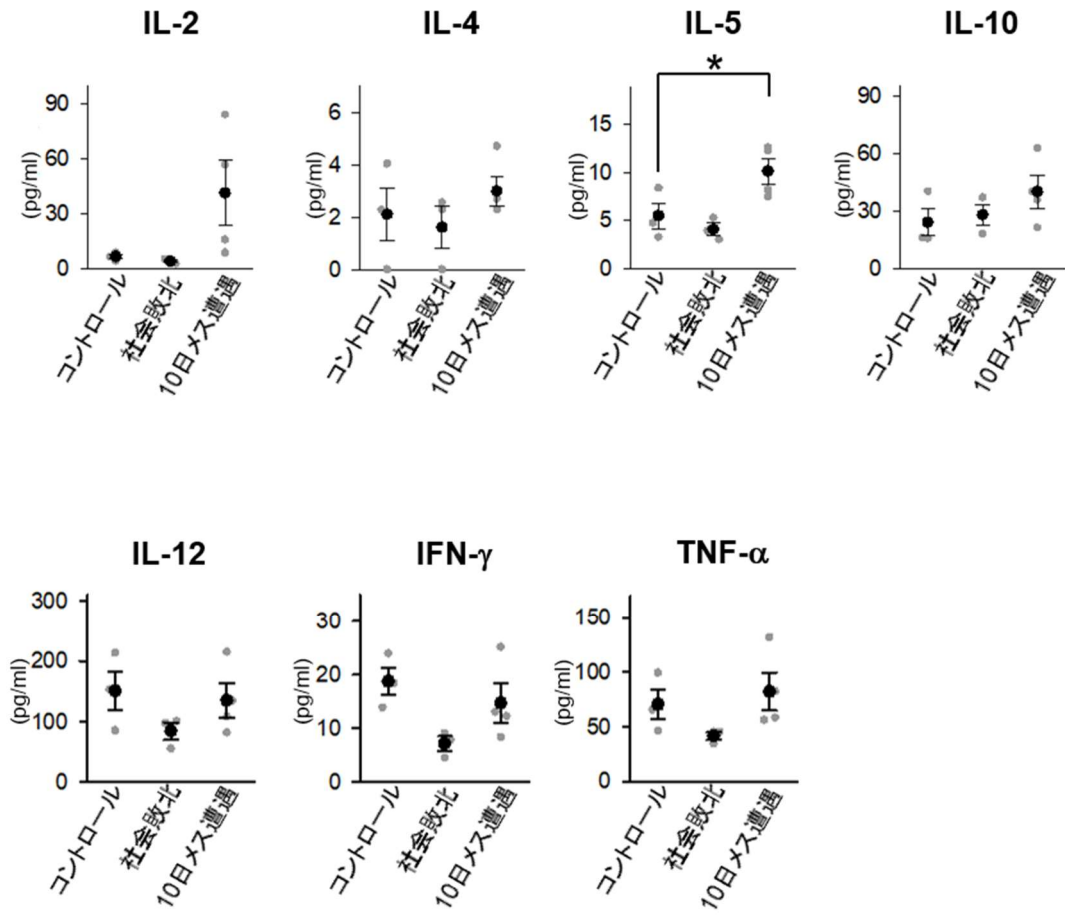
B 24 時間



Supplemental Figure 1. (A, B) 光刺激してから 9 時間後 (A) または 24 時間後 (B) に血液を採取した場合の、各血清サイトカイン値 ($P > 0.05$, Student's t -test, $n = 5$ mice)。



Supplemental Figure 2. Enrich environment で飼育したマウスの高架式十字迷路試験の結果 ($P > 0.05$, Student's t -test, $n = 11$ mice)。Figure 6 で採血したマウスと同じ個体を用いており、採血の前日に行った。



Supplemental Figure 3. 社会的敗北ストレス群、及び10日間のメスマウス遭遇群における各血清サイトカイン値 (* $P < 0.05$, Tukey test after two-way ANOVA, $n = 3-4$ mice)。

【参考文献】

- [1] Bennett MP, Zeller JM, Rosenberg L and McCann J (2003). "The effect of mirthful laughter on stress and natural killer cell activity." Altern Ther Health Med. **9**(2): 38-45.
- [2] Andersson NW, Goodwin RD, Okkels N, Gustafsson LN, Taha F, Cole SW and Munk-Jørgensen P (2016). "Depression and the risk of severe infections: prospective analyses on a nationwide representative sample." Int J Epidemiol. **45**(1):131-9.
- [3] Schultz W, Dayan P and Montague PR (1997). "A neural substrate of prediction and reward." Science. **275**(5306):1593-9.
- [4] Wrona D, Klejbor I and Trojnar W (2004). "Chronic electric stimulation of the midbrain ventral tegmental area increases spleen but not blood natural killer cell cytotoxicity in rats." J Neuroimmunol. **155**(1-2):85-93.
- [5] Ben-Shaanan TL, Azulay-Debby H, Dubovik T, Starosvetsky E, Korin B, Schiller M, Green NL, Admon Y, Hakim F, Shen-Orr SS and Rolls A (2016). "Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity." Nat Med. **22**(8):940-4.
- [6] Ben-Shaanan TL, Schiller M, Azulay-Debby H, Korin B, Boshnak N, Koren T, Krot M, Shakya J, Rahat MA, Hakim F and Rolls A (2018). "Modulation of anti-tumor immunity by the brain's reward system." Nat Commun. **9**(1):2723.
- [7] Schultz W (2007). "Multiple dopamine functions at different time courses."

Annu Rev Neurosci. **30**:259-88.

[8] Cohen JY, Haesler S, Vong L, Lowell BB and Uchida N (2012). “Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area.” Nature. **482**(7383):85-8.

[9] Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L and Deisseroth K (2009). “Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning.” Science. **324**(5930):1080-4.

[10] Golden SA, Covington HE 3rd, Berton O and Russo SJ (2011). “A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice.” Nat Protoc. **6**(8):1183-91.

[11] Li R, Wang X, Lin F, Song T, Zhu X and Lei H (2020). “Mapping accumulative whole-brain activities during environmental enrichment with manganese-enhanced magnetic resonance imaging.” Neuroimage. **210**:116588.

[12] Bass CE, Grinevich VP, Gioia D, Day-Brown JD, Bonin KD, Stuber GD, Weiner JL and Budygin EA (2013). “Optogenetic stimulation of VTA dopamine neurons reveals that tonic but not phasic patterns of dopamine transmission reduce ethanol self-administration.” Front Behav Neurosci. **7**:173.

[13] Del'guidice T, Lemasson M and Beaulieu JM (2011). “Role of Beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the Basal Ganglia.” Front Neuroanat. **5**:58.

- [14] Marcellino D, Kehr J, Agnati LF and Fuxe K (2012). "Increased affinity of dopamine for D(2) -like versus D(1) -like receptors. Relevance for volume transmission in interpreting PET findings." Synapse. **66**(3):196-203.
- [15] Shippenberg TS and Herz A (1987). "Place preference conditioning reveals the involvement of D1-dopamine receptors in the motivational properties of mu- and kappa-opioid agonists." Brain Res. **436**(1):169-72.
- [16] Smith-Roe SL and Kelley AE (2000). "Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning." J Neurosci. **20**(20):7737-42.
- [17] Morales M and Margolis EB (2017). "Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour." Nat Rev Neurosci. **18**(2):73-85.
- [18] Nance DM and Sanders VM (2007). "Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007)." Brain Behav Immun. **21**(6):736-45.
- [19] Dantzer R (2018). "Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa." Physiol Rev. **98**(1):477-504.
- [20] Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS, Kasprovicz DJ, Fuchs BA and Street NE (1997). "Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help." J Immunol. **158**(9):4200-10.
- [21] Segovia G, Del Arco A, De Blas M, Garrido P and Mora F (2010). "Environmental enrichment increases the in vivo extracellular concentration

of dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study” J Neural Transm (Vienna). **117**(10):1123-30.

[22] N Benaroya-Milshtein, N Hollander, A Apter, T Kukulansky, N Raz, A Wilf, I Yaniv and C G Pick (2004). “Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity” Eur J Neurosci. **20**(5):1341-7.

[23] Li G, Gan Y, Fan Y, Wu Y, Lin H, Song Y, Cai X, Yu X, Pan W, Yao M, Gu J and Tu H (2015). “Enriched environment inhibits mouse pancreatic cancer growth and down-regulates the expression of mitochondria-related genes in cancer cells.” Sci Rep. **5**:7856.

[24] Beloate LN, Omrani A, Adan RA, Webb IC and Coolen LM (2016). “Ventral Tegmental Area Dopamine Cell Activation during Male Rat Sexual Behavior Regulates Neuroplasticity and d-Amphetamine Cross-Sensitization following Sex Abstinence.” J Neurosci. **36**(38):9949-61.

[25] Ago Y, Hasebe S, Nishiyama S, Oka S, Onaka Y, Hashimoto H, Takuma K and Matsuda T (2015). “The Female Encounter Test: A Novel Method for Evaluating Reward-Seeking Behavior or Motivation in Mice.” Int J Neuropsychopharmacol. **18**(11):pyv062.

[26] Matsumoto J, Urakawa S, Hori E, de Araujo MF, Sakuma Y, Ono T and Nishijo H (2012). “Neuronal responses in the nucleus accumbens shell during sexual behavior in male rats.” J Neurosci. **32**(5):1672-86.

【謝辞】

博士課程 4 年間にわたってご指導頂きました池谷裕二先生、小山隆太先生、佐々木拓哉先生、中嶋藍先生、竹内春樹先生、松本信圭先生に厚く御礼申し上げます。私が薬学博士課程から薬品作用学教室に所属して、博士論文をまとめるまでの長い間、本研究に関して多くのご指導をいただきました。

私は、外部の大学で、かつ異分野の研究室から、東京大学の薬品作用学教室に所属しました。以前の研究室は、分析化学や生化学を専門としており、統合失調症患者の血液から、バイオマーカー候補になり得る分子の探索を行っていました。その過程で、脳で起きたどのような活動が末梢にまで影響を与えているのかに興味を持ち、薬品作用学教室で研究をしたいと考えました。初めの頃は、神経科学分野の専門的な背景や考え方が理解できず、困惑したのをよく覚えています。しかし、先生方や先輩方、同じ研究室の仲間をサポートしてもらうことで、1 つ 1 つ課題を乗り越えることができました。また、研究テーマに関しても、私が興味をもっていた「脳-末梢連関」に即したものを与えてくださいました。このような大変な幸運に恵まれたことで、非常に苦しい時期にも研究に対するモチベーションを失うことなく、この博士論文をまとめる段階まで、研究を続けることができました。

改めて、本研究に関わり、サポートして下さった全ての皆様に深く御礼申し上げます。

2020/01/08