

審査の結果の要旨

腹側被蓋野の神経活動による末梢免疫機能への影響

氏名 鹿山 将

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、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)。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)。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パミン神経細胞が存在し、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、この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)。さらに、遺伝薬理学的手法により VTA ド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; *Nat Commun.*, 2018)。

この VTA ドパミン神経細胞の活動パターンは 2 つに大別される。1 つ目は、断続的な高頻度の活動 (Phasic 活動) であり、報酬に関連する刺激に応答して発生する。2 つ目は、持続的な低頻度の発火 (Tonic 活動) であり、ある種の嫌悪的な刺激に反応する。しかし、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は未だ明らかではない。さらに、これまでの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同様の現象が起こり得るかは不明である。

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。具体的には、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、どのような活動が末梢免疫機能に影響を与えるかを検証した。また、自然な生理的条件下で同様の現象が見られるかを検証した。

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。初めに、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ンネルロドプシン 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。

このトランスジェニックマウスの VTA において、チロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞 (ドパミン神経細胞) に ChR2 が発現したことを確認した。さらに、光刺激を行うことで、VTA における ChR2 陽性細胞中の c-fos 陽性細胞数が増加する傾向にあることを確認した。

報酬によって VTA ドパミン神経細胞は 15 Hz 程度の頻度で Phasic 活動する (Cohen et al., *Nature*, 2012)。この知見を踏まえ、報酬獲得時にみられるような高頻度な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 (472 nm, ~30 mW, 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重要であることを検証するために、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 (472 nm, ~30 mW, 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、数種の血清サイトカイン値を測定した。その結果、Phasic 群で、血清 IL-2, IL-4, TNF- α 値が有意に増加した。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- α 値は有意に変動しなかった。これらの結果は、VTA ドパミン神経細胞の Phasic 活動の増

加が末梢免疫機能に影響を与える可能性を示唆している。

自然な生理的条件下での検討を行うために、オスマウスをメスマウスに遭遇させることで、VTA ドパミン神経細胞を活性化させることを試みた。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 におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞 (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。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。一方で、海馬・内側前頭前皮質・側坐核コアでは、c-fos 陽性細胞数は有意に変動しなかった。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。

VTA の神経活動を電気生理学的な視点から評価するために、オスマウスの右 VTA に電極を埋め込むことで、脳波を記録した。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。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。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、同様の検証を内側前頭前皮質と扁桃体でも行ったが、各周波帯域の強度の有意な変動は見られなかった。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、VTA が活性化した可能性を示唆している。

次に、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 時間遭遇させ、直後に採血を行い、血清サイトカイン値を定量した。結果として、メスマウスに遭遇した群は、血清 IL-2 値が有意に増加した。一方で、血清 IL-5, IL-10, TNF- α 値は有意に変動しなかった。

さらに、VTA の神経活動を抑制することで、この現象に VTA が関与するかを検証した。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。そして、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。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。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。これらの結果は、自然な生理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。

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、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。

よって本論文は博士 (薬学) の学位請求論文として合格と認められる。