

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23683021

研究課題名(和文) マウスの過剰な攻撃行動を発動するセロトニン神経活動の解析

研究課題名(英文) Neural activity of serotonergic neurons that regulates escalated aggressive behavior in male mice

研究代表者

高橋 阿貴 (TAKAHASHI, Aki)

筑波大学・人間系・助教

研究者番号：30581764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：攻撃行動に関わる神経伝達物質として、セロトニンは他のどの神経伝達物質よりも着目されている。一方で、実際に攻撃行動を示している最中に、セロトニン神経系がどのような制御を受けているかは明らかになっていない。本研究では光遺伝学的手法を用いて、背側縫線核セロトニン神経系の興奮、抑制が攻撃行動をどのように変化させるかを直接的に検証することを目指した。また、薬理学的手法を用いて背側縫線核がどのような入力を受けたときに攻撃行動が過剰になるかを解析し、グルタミン酸入力が攻撃行動の程度を決定することが明らかとなった。加えて、順遺伝学的手法を用いて、過剰な攻撃行動に関わる遺伝子座の1つを15番染色体上に同定した。

研究成果の概要(英文)：Serotonin in the brain has been strongly implicated in the neural mechanism of escalated aggression. However, how the activity of serotonergic system is regulated or what kind of neural input modulate serotonergic system during aggressive behavior is still not clear. In this study, we aimed to manipulate the activity of serotonergic system in the dorsal raphe nucleus (DRN) during the aggressive encounter of male mice by using optogenetics, and examined its role on aggressive behavior. Also, we aimed to identify neural input into the DRN during aggressive behavior, and we found that the glutamatergic input into the DRN determines the level of aggression in male mice. We also conducted forward genetics analysis to map genetic loci involved in escalated aggression of male mice by using consomic mouse strain of MSM/Ms and C57BL/6J.

研究分野：行動薬理学、行動遺伝学、光遺伝学

キーワード：過剰な攻撃行動 セロトニン 背側縫線核 光遺伝学 遺伝マッピング コンソミックマウス系統

1. 研究開始当初の背景

脳内セロトニン神経は主に縫線核に局在し、前頭葉をはじめとした前脳領域へと軸索を投射している。研究代表者らはこれまで、縫線核セロトニン神経の GABA による調節が攻撃行動に及ぼす影響を調べることで、過剰な攻撃行動を示す最中のセロトニン神経の活動変化について明らかにしようと試みてきた。雄マウスの背側縫線核に GABA 受容体の作動薬を投与したのちに攻撃行動を観察したところ、GABA-B 受容体作動薬である baclofen は攻撃行動を 2 倍以上に増加させた。背側縫線核の GABA-B 受容体がセロトニン神経活動をどのように調節して、過剰な攻撃行動を誘発するかを明らかにするために、In vivo マイクロダイアリシス解析を用いて投射先の 1 つである前頭葉でのセロトニン放出量を測定したところ、背側縫線核への baclofen の局所投与により、前頭葉でのセロトニン放出の増加が認められた。このことから、過剰な攻撃行動を示す最中に背側縫線核セロトニン神経が活性化する可能性が示唆された (Takahashi et al. *J Neuroscience*, 2010)。

日本産野生由来系統 MSM のオスは、極めて高い攻撃性を示し、性成熟後のオス同士を同じケージに飼育していると、ときに他のオスを負傷させ殺してしまうことがある。一方で、実験用マウス系統である C57BL/6J ではこのような行動が見られることは全くない。この攻撃性が異なる 2 系統から作出されたコンソミックマウス系統の解析から、4、13、15、17 番染色体を MSM 系統に置き換えた各系統は、MSM と同様に攻撃行動を示すことが明らかとなったことから、これらの染色体上に攻撃行動の個体差に関わる遺伝要因が存在することを示した (Takahashi et al. *Behav Genet*, 2010)。

2. 研究の目的

脳内セロトニンの低下が攻撃行動をもたらすという説が支持される一方で、実際に過剰な攻撃行動を示している最中に、セロトニン神経がどのような挙動を示すかは不明だった。本研究では光遺伝学的手法を用いて、背側縫線核セロトニン神経特異的な神経活動の調節を行い、セロトニン神経系の興奮、抑制どちらが過剰な攻撃行動を誘発するかを直接的に検証することを目指した。さらに、過剰な攻撃行動を示し且つセロトニン神経活動に差がある系統を用い、過剰な攻撃行動とセロトニン神経活動に関わる遺伝要因の同定を試みた。本研究により、過剰な攻撃行動の生物学的基盤としてのセロトニンの役割を明らかにし、それを抑制するためのメカニズムを探索することを目指している。

3. 研究の方法

(1) 光遺伝学的手法を用いて、背側縫線核セロトニン神経系の興奮・抑制どちらが過剰な

攻撃行動を誘発するかを検証する。また、光刺激によって神経活動をミリ秒単位で調節することが可能であり、どのような神経発火パターン (tonic か phasic か) が攻撃行動に関与するかを検討した。

(2) 背側縫線核がどのような入力を受けた際に攻撃行動が過剰になるかを明らかにするために、薬理学的手法や in vivo マイクロダイアリシス法を用いて、重要な神経伝達物質入力を同定した。

(3) 攻撃行動が異なるコンソミックマウス系統を用い、セロトニンのレベルやセロトニン関連遺伝子発現と、攻撃行動の系統差に関連があるかを検討した。更なる順遺伝学的解析により、過剰な攻撃行動に影響を与える遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 計画初年度はレンチウイルスによるセロトニンニューロン特異的な光受容体発現系を立ち上げることを試みたが、質のいいウイルスの作成に苦労したことから、代替案として Tet 発現系を用いた Tph2 発現領域 (セロトニン神経) に特異的に ChR2 (活性化) もしくは Arch (抑制化) を発現させる KENGE-tet トランスジェニックマウスを用いて解析を行っている (名古屋大学山中章弘博士と慶応義塾大学田中謙二博士との共同研究)。ICR 系統との交雑により攻撃行動を高めた個体で ArchT の光操作実験を行ったところ、背側縫線核セロトニンニューロンの活性が攻撃行動の発現に必須ではなく、むしろ過剰な興奮を抑える働きをもつ可能性が示唆され、現在更なる解析を進めている。

(2) これまでの研究から、抑制性神経伝達物質 GABA-B 受容体の作動薬 (baclofen) を背側縫線核に投与すると、雄マウスの攻撃行動が過剰になることが分かっていたことから、この GABA-B 受容体の作動薬が背側縫線核の中のどのニューロンに作用して攻撃行動を増加させるのかを調べることを目指した。セロトニンニューロン特異的な GABA-B 受容体ノックアウトマウスを使った解析から、baclofen はセロトニンニューロンに直接作用するわけではなく、セロトニンニューロン以外の神経細胞に作用することで攻撃行動を増加させることが分かった。更に、背側縫線核に baclofen を投与すると、興奮性の伝達物質であるグルタミン酸の放出が増加した。そこでグルタミン酸を背側縫線核に局所投与してみると、グルタミン酸の濃度に応じて、雄マウスの攻撃行動が増加した。

また、攻撃行動を示している最中のグルタミンの放出量をマイクロダイアリシス法で測定してみると、雄マウスの背側縫線核内でグルタミン酸の放出が増加していることも明らかになった。このグルタミン酸放出の増加は、マウスがさらに高い攻撃行動を示すような状況に置くと、なおいっそう高くなった。

背側縫線核と、その投射領域の1つである内側前頭前野でセロトニンを測定したところ、通常の攻撃行動ではセロトニンの放出に変化がなかったのに対し、マウスが高い攻撃行動を示すような場面では、セロトニンの放出が増加することが明らかとなった。このことから、脳内セロトニンの攻撃行動への関与が、攻撃行動の程度もしくは質によって異なることが示唆された (Takahashi et al, *J Neurosci*, 2015)。

(3) 過剰な攻撃行動に関わる遺伝要因の同定のために、野生由来系統 MSM の過剰な攻撃行動とセロトニン神経活動の詳細な解析を行った。MSM のどの染色体上に攻撃行動に関わる遺伝子座が存在するかを検討するために、コンソミック系統群を用いて解析を行い、染色体4番と15番を持つ系統において、質の異なる攻撃性の昂進が認められた。これらの系統について、セロトニン受容体や合成酵素の mRNA 発現、そして脳内セロトニン量の違いを検討したところ、セロトニン合成酵素の発現量の違いと、セロトニン量の変化が認められた (Takahashi et al, *Frontiers in Neuroscience*, 2014)。

15番染色体について、更に解析を進めており、サブコンソミック系統を複数作成して解析をしたところ、1つの染色体上にも攻撃行動を増加させる複数の遺伝子座が存在することが明らかとなった。この遺伝子座の特徴は、侵入者としてこの個体が用いられたときに顕著に攻撃行動に変化が生ずるということであり、それに関わる1つの遺伝子座領域は約4Mbの範囲まで狭めることに成功した(論文準備中)。本研究から、野生由来マウス系統の過剰な攻撃行動に関わる複雑な遺伝的基盤の一旦が見えてきた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

Takahashi A, Lee RX, Iwasato T, Itoharu S, Arima H, Bettler B, Miczek KA, Koide T (2015) Glutamate input in the dorsal raphe nucleus as a determinant of escalated aggression in male mice. *Journal of Neuroscience*. 35(16), pp. 6452-6463. 査読有

Miczek KA, **Takahashi A**, Gobrogge KL, Hwa LS, de Almeida RMM (2015) Escalated Aggression in Animal Models: Shedding New Light on Mesocorticolimbic Circuits. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 3, pp. 90-95. 査読無

Takahashi A, Shiroishi T, Koide T (2014) Genetic mapping of escalated aggression in wild-derived mouse strain MSM/MS: association with serotonin-related genes.

Frontiers in Neuroscience. 8, pp. 156. 査読有

Takahashi A, Nagayasu K, Nishitani N, Kaneko S, Koide T (2014) Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. *PLOS ONE*. 9(4), pp. e94657. 査読有

Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, **Takahashi A**, Tabuchi S, Doya K (2014) Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Current Biology*. 24(17), pp. 2033-2040. 査読有

Kanno K, Kokubo H, **Takahashi A**, Koide T, Ishiura S (2014) Enhanced prepulse inhibition and low sensitivity to a dopamine agonist in HESR1 knockout mice. *Journal of Neuroscience Research* 92(3), pp. 287-297. 査読有

Arakawa T, Tanave A, Ikeuchi S, **Takahashi A**, Kakihara S, Kimura S, Sugimoto H, Asada N, Shiroishi T, Tomihara K, Tsuchiya T, Koide T (2014) A male-specific QTL for social interaction behavior in mice mapped with automated pattern detection by a hidden Markov model incorporated into newly developed freeware. *Journal of Neuroscience Methods*. 234, pp. 127-134. 査読有

Takahashi A, Miczek KA (2014) Neurogenetics of aggressive behavior: Studies in rodents. In, Klaus Miczek and Andreas Meyer-Lindenberg (Eds), *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 17, pp. 3-44. Heidelberg: Springer. 査読無

Takahashi A, Schilit AN, Kim J, DeBold JF, Koide T, Miczek KA (2012) Behavioral characterization of escalated aggression induced by GABAB receptor activation in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)*. 224(1), pp. 155-166. 査読有

高橋阿貴 (2012) 光遺伝学 (オプトジェネティクス): 行動を制御する神経回路をあきらかにする試み 動物心理学研究. 総説. 62(2), pp. 147-162. 査読有

Takahashi A, Quadros IM, de Almeida RM, Miczek KA. (2012) Behavioral and pharmacogenetics of aggressive behavior. In, John Cryan (Ed), *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 12, pp 73-138. Heidelberg: Springer. 査読無

Faccidomo S, Quadros IM, **Takahashi A**,

Fish EW, Miczek KA (2012) Infralimbic and dorsal raphe microinjection of the 5-HT(1B) receptor agonist CP-93,129: attenuation of aggressive behavior in CFW male mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 222(1), pp. 117-128. 査読有

Newman EL, Chu A, Bahamón B, **Takahashi A**, DeBold JF, Miczek KA (2012) NMDA receptor antagonism: escalation of aggressive behavior in alcohol-drinking mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 224(1), pp. 167-177. 査読有

Takahashi A, Quadros IM, de Almeida RM, Miczek KA. (2011) Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology (Berl)*. 213(2-3), pp. 183-212. 査読有

Miczek KA, Nikulina EM, **Takahashi A**, Covington HE 3rd, Yap JJ, Boyson CO, Shimamoto A, de Almeida RM (2011) Gene expression in aminergic and peptidergic cells during aggression and defeat: Relevance to violence, depression and drug abuse. *Behavior Genetics*. 41(6), pp. 787-802. 査読有

Ishii A, Koide T, **Takahashi A**, Shiroishi T, Hettinger TP, Frank ME, Savoy LD, Formaker BK, Yertutanol S, Lionikas A, Blizard DA (2011) B6-MSM consomic mouse strains reveal multiple loci for genetic variation in sucrose octaacetate aversion. *Behavior Genetics*. 41(5), pp. 716-723. 査読有

Koide T, Ikeda K, Ogasawara M, Shiroishi T, Moriwaki K, **Takahashi A** (2011) A new twist on behavioral genetics by incorporating wild-derived mouse strains. *Experimental Animals*. 60(4), pp. 347-354. 査読有

[学会発表](計 16 件)

Aki Takahashi, Kenji F. Tanaka, Akihiro Yamanaka, Tsuyoshi Koide (2015) Optogenetic silencing of serotonin neurons on escalated aggression in male mice 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回 日本生理学会大会合同大会 2015 年 3 月 21 日~23 日神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

Aki Takahashi, Kenji F. Tanaka, Akihiro Yamanaka, Tsuyoshi Koide The role of 5-HT neurons in escalated aggression

induced by social instigation 第 74 回日本動物心理学会大会、2014 年 7 月 19 日~21 日、犬山国際観光センターフロイデ(犬山市・愛知県)

高橋阿貴、小出剛 (2014) 背側縫線核の興奮性入力が雄マウスの攻撃行動の強度を決定する 第 37 回日本神経科学大会 2014 年 9 月 11~13 日 パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)

Aki Takahashi, Ray X. Lee, Takuji Iwasato, Shigeyoshi Itoharu, Hiroshi Arima, Bernhard Bettler, Klaus A. Miczek, Tsuyoshi Koide (2014) Glutamatergic input in the dorsal raphe nucleus as the determinant of the level of aggression in male mice. *Neuroscience 2014*, Nov 15-19, 2014. Washington, DC (米国)

Aki Takahashi, Kazuki Nagayasu, Shuzi Kaneko, Tsuyoshi Koide (2014) Optogenetic activation of the mPFC and escalated aggression. 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19-21 日 仙台国際センター(仙台市・宮城県)

高橋阿貴、小出剛 (2013) 過剰な攻撃行動を制御する神経メカニズム: 背側縫線核と内側前頭前野. 第 16 回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム 2013 年 12 月 20 日 ウィンクあいち(名古屋市・愛知県)

Aki Takahashi, Tsuyoshi Koide (2013) Escalated aggression by the activation of 5-HT system via glutamate in the dorsal raphe nucleus. *Neuro2013* 2013 年 6 月 20-23 日 国立京都国際会館(京都市・京都府)

Aki Takahashi, Klaus A. Miczek, Tsuyoshi Koide (2013) Escalated aggression and the dorsal raphe nucleus: Role of Glutamate and GABA. *SfN 2013*. Nov 9-13, 2013 San Diego, CA. (米国)

高橋阿貴・永安一樹・金子周司・小出剛 (2013) マウスの雄間攻撃行動を制御する神経回路: 内側前頭前野の役割. 日本動物心理学会第 73 回大会 2013 年 9 月 14~16 日 筑波大学(つくば市・茨城県)

Takahashi, A., Miczek, K.A. Hwa, L.S., Quadros, I., Shimamoto, A., Newman, E.J., DeBold, J.F. (2012) Alcohol and aggression in preclinical models: Critical modulation of cortical serotonin via GABAA and NMDA receptors. 16th Congress of the International Society for Biomedical Research on Alcoholism. Sep 9-12, 2012 札幌コンベンションセンター(札幌)

幌市・北海道)

Aki Takahashi, Tsuyoshi Koide (2012) Escalated aggression by GABA(B) receptor activation in the dorsal raphe nucleus: Role of Glutamate and GABA. 第35回日本神経科学大会 2012年9月18日~21日 名古屋国際会議場 (名古屋市・愛知県)

高橋阿貴・小出剛 (2012) 野生マウス系統 MSM の過剰な攻撃行動に関わる遺伝的基盤 日本動物心理学会第72回大会 2012年5月12日~13日 関西学院大学(西宮市・兵庫県)

高橋阿貴・Klaus A. Miczek・小出剛(2011) 背側縫線核 GABA_B 受容体の活性化による過剰な攻撃行動の詳細な行動学的・神経学的解析 第34回日本神経科学大会 2011年9月14日~17日 パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)

高橋阿貴・田邊彰・小出剛 (2011) マウスの社会行動に関わる遺伝子座の探索 日本動物心理学会第71回大会 (Animal2011) 2011年9月8日~11日 慶應義塾大学(港区・東京都)

高橋阿貴・城石俊彦・小出剛 (2011) 日本産野生由来マウス系統 MSM の過剰な攻撃行動とセロトニン受容体 mRNA の系統差 第58回日本実験動物学会 2011年5月25日~27日 タワーホール船堀(江戸川区・東京都)

高橋阿貴・城石俊彦・小出剛 (2011) 過剰な攻撃行動の遺伝的基盤とセロトニン神経系: 日本産野生由来マウス系統 MSM を用いて 日本遺伝学会第84回大会 2011年9月24~26日 九州大学(福岡市・福岡県)

〔図書〕(計 2 件)

Sluyter F, **Takahashi A**, Maxson SC (2014) Pathological aggression. In, Susanna Pietropaolo, Frans Sluyter and Wim E. Crusio (Eds), Behavioral Genetics of the Mouse Vol. 2: Genetic Mouse Model of Neurobehavioral Disorders (Chapter 10). Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 86-96.

高橋阿貴、小出剛 (2013) 系統について知ろう(第2章) マウスの行動を解析しよう(第10章) 小出剛(編)「マウス実験の基礎知識 第2版」オーム社 pp.23-39, 133-146.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201504220600.html>

<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1468/1518.html>

<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1468/1492.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 阿貴 (TAKAHASHI, Aki)

筑波大学・人間系・助教

研究者番号: 30581764