



Title	暑熱環境下での行動調節における内側前頭前皮質の役割
Author(s)	井門, 愛理
Citation	北海道大学. 博士(臨床薬学) 甲第13619号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13619
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91882
Type	theses (doctoral)
File Information	Airi_Ido.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

暑熱環境下での行動調節における
内側前頭前皮質の役割

井門 愛理

北海道大学大学院生命科学院

平成 31 年 3 月

目次

序論	1
本論	3
第1章 温度選択行動を評価する実験系の構築	3
1. 目的	3
2. 方法	3
1) 実験動物	3
2) 温度選択行動試験	3
3) 深部体温測定	4
4) 統計処理	4
3. 結果	5
4. 考察	10
第2章 温度選択行動における mPFC 神経活動の関与	11
1. 目的	11
2. 方法	12
1) 実験動物	12
2) 室温・暑熱環境曝露	12
3) 脳切片作成	12
4) 蛍光免疫組織染色	12
5) ウイルス・試薬	13
6) DREADD 実験	13
7) 温度選択行動試験	14
8) 統計処理	14
3. 結果	15
4. 考察	18

第3章 温度選択行動中の mPFC 神経活動のリアルタイム計測	19
1. 目的	19
2. 方法	20
1) 実験動物	20
2) ウイルス・試薬	20
3) ファ이버フォトメトリー試験	21
4) 温度選択行動試験	23
5) 統計処理	23
3. 結果	24
4. 考察	28
総括	29
引用文献	31
謝辞	34

序 論

温度は、様々な生理機能に影響を与え、生体の恒常性維持において重要な因子の一つである。恒常性を維持するための体温調節反応は、行動性体温調節反応と自律性体温調節反応の 2 つに分類されている。ヒトや齧歯類などの恒温動物の体温は、環境温度の影響を受けやすい表面（外殻温度；皮膚温、体表面温）に近いほど体温は低くなり、影響を受けにくい体の中心（深部体温）ほど体温は高くなる傾向をもつ。体温調節反応は、この深部体温と末梢温度（主に皮膚温度）の情報が体温調節中枢で統合された後、深部体温が一定の範囲内に維持されるように生じる反応である（図 1）。通常、周囲の環境温度に変化が起こると、まず適切な温度環境への移動やヒトにおける衣服の着脱などの行動性体温調節が行われる。次いで、自律性体温調節反応である皮膚血管の拡張あるいは収縮、ふるえや発汗が起こる。これまで、自律性体温調節反応については、皮膚における温度刺激受容に関わる温度受容体の分子メカニズム³⁻⁵、皮膚から中枢へと感覚情報が伝達・処理されるメカニズム、深部体温を維持するためのフィードバック機構に関して、多くの研究がなされてきた^{6,7}。一方、行動性体温調節反応では、その神経メカニズムの基盤には環境温度に起因する快・不快情動があると考えられるが、環境温度による快・不快情動生成の神経機構の詳細は明らかにされていない。

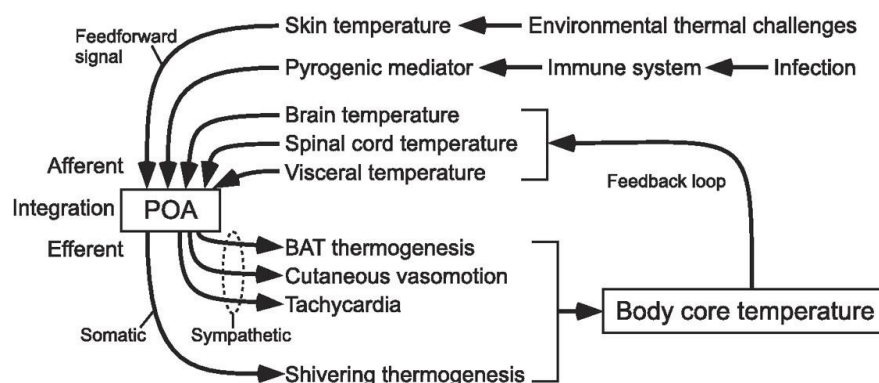


図 1：環境温度変化に伴う体温調節反応の概略図

(Nakamura et al. 2010 一部改変)

これまで齧歯類を用いた先行研究から、周囲の環境温度、つまり気温の変化によって各脳領域において神経活動に変化がみられることが報告されている^{8,9)}。また床面のプレート温度、すなわち、接触温度に対して嗜好性がみられることが報告されており（図 2）、この行動を観察することにより、接触温度に対する温度選択行動の研究が行われてきた¹⁰⁻¹³⁾。しかし、普段我々が日常生活の中で感じているような、気温に関連した温度選択行動のメカニズムはほとんど研究されていない。

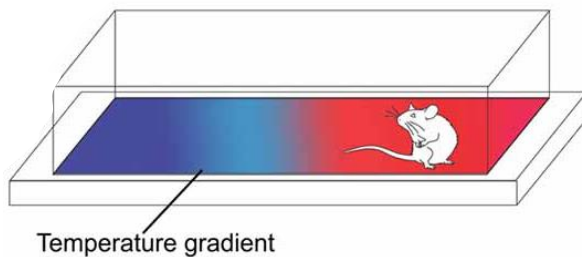


図 2：齧歯類における接触温度嗜好性の検討
(Deuis et al. 2017 一部
改変)

そこで本研究では、気温が上昇した際の動物の行動変化を観察することにより、行動性体温調節反応のメカニズム解明を目指した。第 1 章では、暑熱環境への曝露に伴う動物の温度選択行動の変化から行動性体温調節反応を評価する実験系の構築を行った。第 2 章では、暑熱環境下で神経活動が上昇する脳領域の探索を行った。またこの結果を踏まえ、暑熱環境下で神経活動が上昇していた内側前頭前皮質 (medial prefrontal cortex: mPFC) を、DREADD システム (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug ; DREADD) を用いて人工的に抑制し、温度選択行動への影響を検討した。第 3 章では、行動調節に重要な役割を持つことが知られる中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal gray: PAG) に着目し、PAG に投射する mPFC 神経細胞の温度選択行動中の活動をファイバーフォトメトリー法によって *in vivo* で継時的に計測し検討を行った。

本 論

第 1 章 温度選択行動を評価する実験系の構築

1. 目的

これまで、周囲の環境温度、すなわち気温の変化に伴う行動性体温調節反応を評価する実験系は構築されていない。そこで、気温を上昇させた際の動物の床面温度選択行動をもとに、行動性体温調節反応を評価するための試験方法の確立を行った。気温が 28°C の室温環境、あるいは、40°C の暑熱環境に曝露した際の、25°C および 35°C の床面上での滞在時間を計測することで温度選択行動を評価できると考え検討を行った。

2. 方法

1) 実験動物

実験には雄性 C57BL/6J マウス 8~10 週齢、あるいは 13~17 週齢を使用した。購入したマウスは 1 ケージあたり 3~5 匹で飼育した。飼育条件は室温 22±1°C、12 時間毎の明暗サイクル（明期：7:00~19:00，暗期：19:00~7:00）とし、水および固形飼料を自由に摂取させた。試験当日は、行動試験室において順化のため、行動試験開始時刻より 1 時間以上前に個飼いにした。動物実験はすべて「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定（平成 19 年 4 月 1 日）」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」に準拠し、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

2) 温度選択行動試験

気温を一定に保つことのできる恒温槽（LTE-1000，東京理化機械株式会社，東京）内に、隣接する 2 つの床面の温度を個別に設定することができる Cold / Hot プレート（AHP-1200DCP, Thermoelectric Cooling America Corporation, Chicago, IL, USA）を設置し、この上にアクリル製の囲い（355mm×340mm×325mm）を設置した。気温は室温環境を 28±1°C、暑熱環境を 40±1°C に設定し、庫内の気温のモニタリングは 4CH データログ温度計（TM-947SDJ，株式会社佐藤商事，川崎）を用いた。試験は 30 分間行い、動物を 1 匹ずつ囲いの中に入れ、自由に探索させた。そして、Cold プレートおよび Hot プレートに滞在した時間を継時的に記録

した。行動の録画・解析には Anymaze (Stoelting Co., IL, USA) を用いた。

3) 深部体温測定

動物の体温変化をモニタリングする目的で、nano tag (15×14.2×7.1mm, 2.5 g, キッセイコムテック株式会社, 長野) を用いた。体温は 30~45°C の間で計測を行うように設定した。動物に 40mg/mL に調整した抱水クロラール (和光純薬工業株式会社, 大阪) を 1mg/kg の用量で腹腔内に投与し、70%エタノール (エコノール H, 今津薬品工業株式会社, 東京) および滅菌水で 2% に希釈したポピドンヨード液 (ポピドンヨード消毒用液 10%「NP」, ニプロ株式会社, 大阪) で消毒した nanotag 1 個を腹腔内に埋め込んだのち、開腹部は縫合糸 (黒軟質絹製縫合糸 No.5, 株式会社夏目製作所, 東京) で縫合処置を行った。埋め込み手術から 3 日以上の回復期間を設けたのち行動試験を行った。

4) 統計処理

試験は同個体において室温環境と暑熱環境の計 2 回行い、それぞれの気温条件における各プレートへの滞在時間割合 (%) を算出した。3-1 及び 3-2 の結果は、Two-tailed paired *t* test を用いて比較した。3-3 の結果は Tow-way repeated measures ANOVA を行ったのち、Sidak's multiple comparisons post-hoc test を用いて比較した。すべてのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SEM) として表した。統計ソフトは GraphPad Prism6 (GraphPad Software) を使用し、危険率 5%未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意とした。

3. 結果

3-1

いくつかのプレート温度の組み合わせを検討した結果、Cold プレート を 25°C、Hot プレート を 35°C とした際に気温の上昇に伴う温度選択行動に変化がみられた (図 3)。すなわち、この 2 つのプレート温度の組み合わせを用いた場合、室温環境では Hot プレート により長く滞在し、暑熱環境では Cold プレート により長く滞在した (図 4)。各個体における Cold プレート 滞在時間から Hot プレート 滞在時間を減じた差を「Cold プレート 嗜好性 (秒)」としてスコア化した (図 5)。各個体のスコアの推移はそれぞれ実線で示した。この Cold プレート 嗜好性を比較したところ、室温環境と暑熱環境との間に有意な差が見られ、室温環境よりも暑熱環境において Cold プレート 嗜好性は上昇していることが示された。

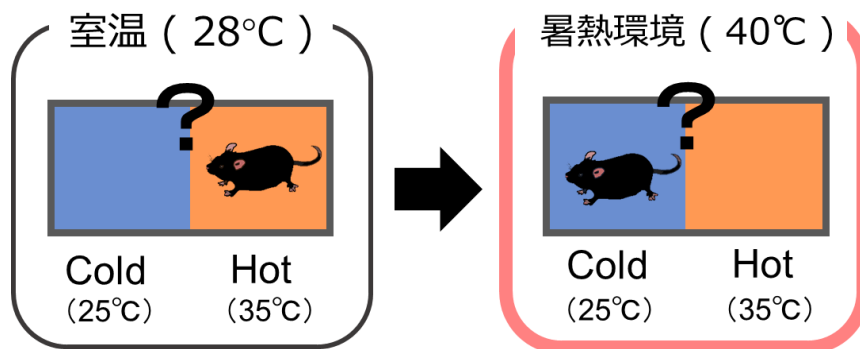


図 3: 室温環境および暑熱環境下における温度選択行動試験の模式図

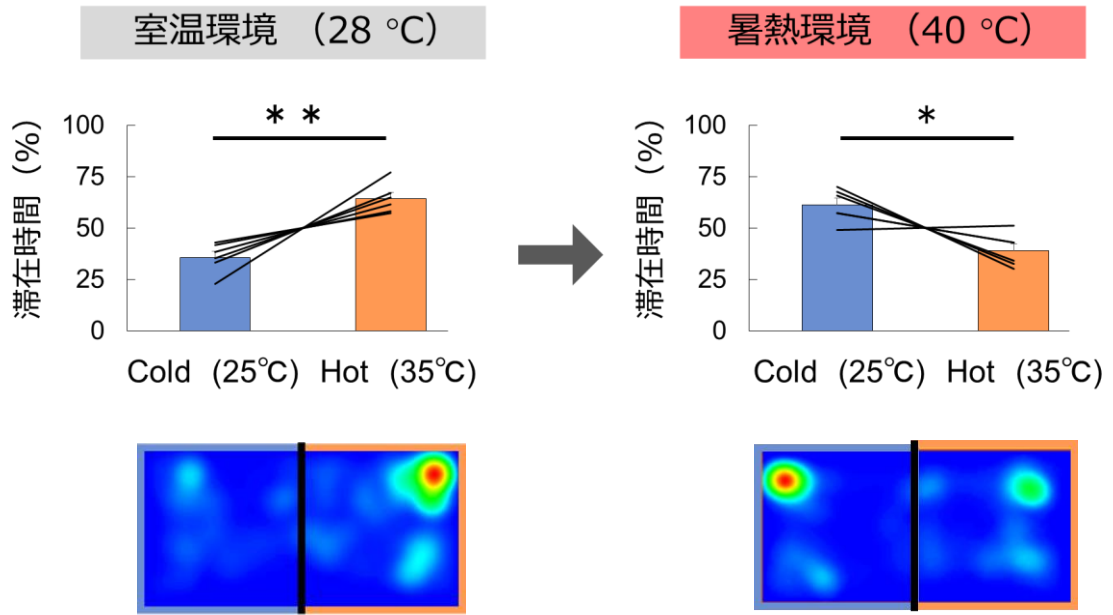


図 4: 室温環境および暑熱環境における温度選択行動の変化
 (上段) 各プレートへの滞在時間割合 (%)。各個体の滞在時間割合 (%) を黒色実線で示した。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (下段) プレート上での滞在時間を示すヒートマップの代表例。

Cold プレート嗜好性
 = Coldプレート滞在時間 - Hotプレート滞在時間

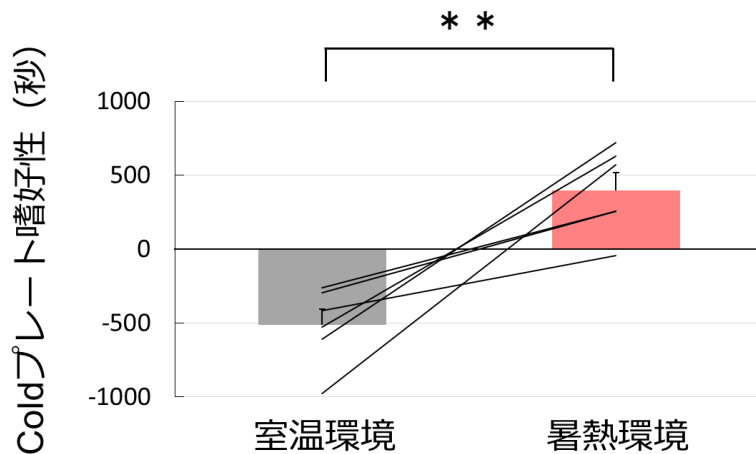


図 5: 室温環境と暑熱環境における Cold プレート嗜好性の比較
 (** $P < 0.01$)

3-2

今後、DREADD を用いた化学遺伝学的手法により温度選択行動に関わる神経回路を解析する際には、ウイルスベクターの脳内投与による DREADD 関連遺伝子の発現に 4~6 週間を要する。そこでより高週齢のマウスを用いた場合においても、同様の温度選択行動を示すか否かを検討するため、3-1 で用いたマウス (8~10 週齢) よりも高週齢のマウス (13~17 週齢) を用いて検討を行った。各個体のスコアの推移はそれぞれ実線で示した。高週齢マウスにおいても、室温環境よりも暑熱環境において Cold プレート嗜好性は有意に上昇していた (図 6)。

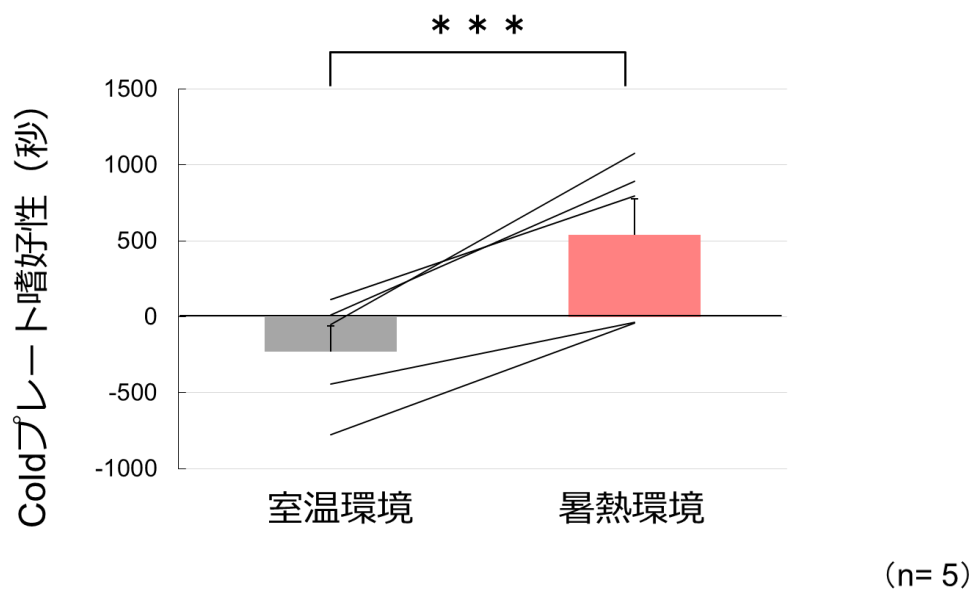
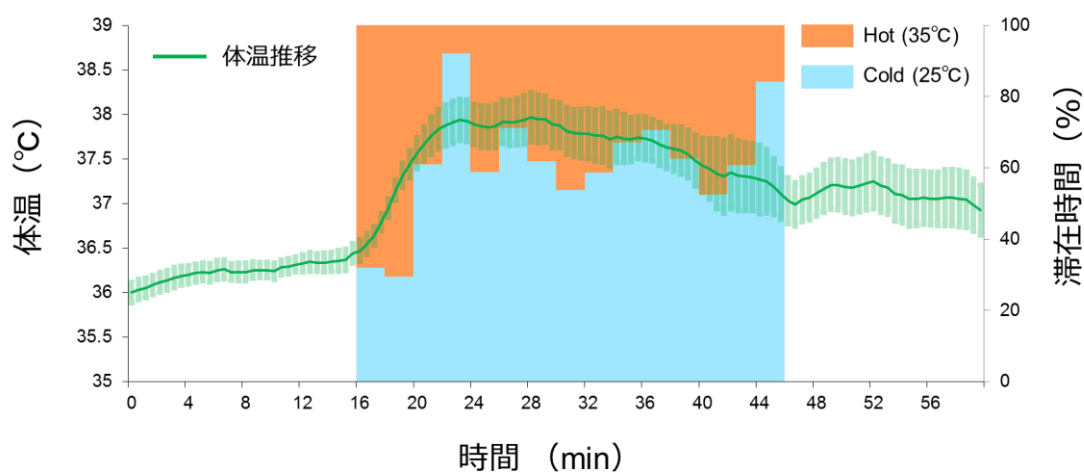


図 6: 高週齢マウスにおける室温環境及び暑熱環境下での Cold プレート嗜好性の比較
($***P < 0.005$)

3-3

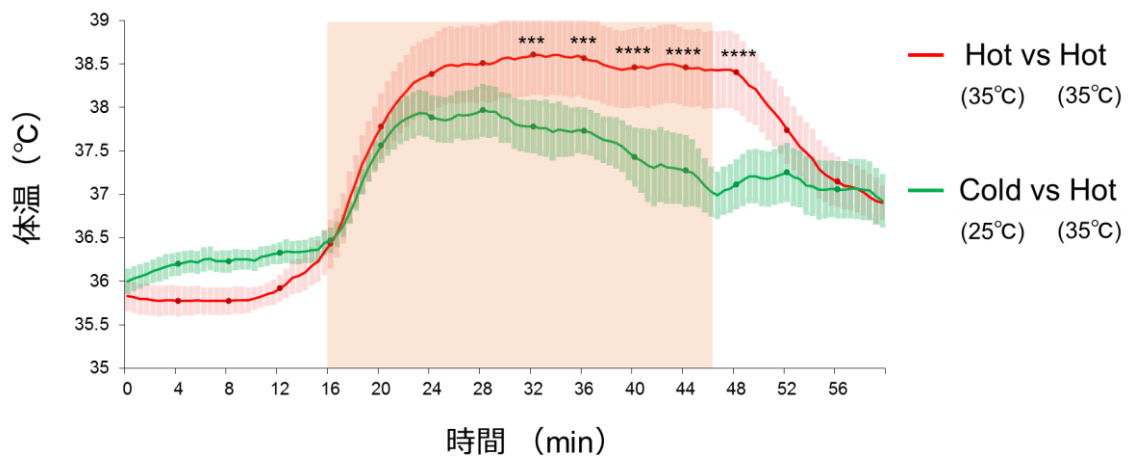
3-1 で観察された温度選択行動が、実際にマウスの体温調節に寄与しているかを調べるために、暑熱環境において温度選択行動中のマウスの体温を測定した。試験前後 10 分間と、試験中の体温の推移を示した (図 7)。実線で示しているのが体温の推移であり、棒グラフで示しているのは 2 分毎の各プレートへの滞在時間割合 (%) である。30 分間の暑熱環境曝露期間において、初めは Hot プレートにより長く滞在しているが、徐々に Cold プレートにより長く滞在するという傾向がみられた。体温については、暑熱環境曝露開始とともに体温は急激に上昇しているが、Cold プレートへの滞在時間が長くなるにつれて体温は徐々に低下していく傾向がみられた。



(n=6)

図 7: 暑熱環境下における温度選択行動中の体温推移

同じ個体を用いて暑熱環境においてプレートの温度を両方とも 35°C に設定した場合の体温変化についても検討した (図 8)。一方のプレートを 25°C、もう一方のプレートを 35°C に設定した場合 (緑線) と比較して、両方のプレートを 35°C に設定した場合 (赤線) では、暑熱環境曝露開始とともに上昇した体温は低下せず、体温は有意に高くなっていることがわかった。



(n=6)

図 8: 暑熱環境における温度選択行動中の体温推移
網掛け部分は暑熱環境に曝露した期間を示す。
(***P<0.005, ****P<0.001)

4. 考察

本研究では、室温環境に比較し暑熱環境では 2 種類の温度の床面のうち、より低温の 25°C のプレート (Cold プレート) でのマウスの滞在時間が増えることが明らかとなった。そこで、Cold プレート滞在時間から Hot プレート滞在時間を減じた差を「Cold プレート嗜好性 (秒)」としてスコア化したところ、室温環境と暑熱環境の間でスコアに有意な差がみられることが分かった。次に、暑熱環境における温度選択行動中の動物の体温を計測したところ、暑熱環境曝露開始と同時に体温は上昇し、Cold プレート滞在時間が増加するにつれて体温が徐々に下降する傾向がみられた。さらに、両方のプレートを 35°C (Hot プレート) に設定した場合、暑熱環境曝露開始とともに上昇した体温は低下せず、体温はより高くなる傾向が見られた。以上の結果より、動物が Cold プレート上に滞在することで体温調節をしている可能性が示され、本実験系を用いることにより暑熱環境に対する行動性体温調節反応を検討できるものと考えられる。先行研究では、床面の温度、すなわち、接触温度に対する嗜好性から行動性体温調節反応のメカニズムを解析することが試みられてきた¹⁰⁻¹³⁾。しかし、接触温度に対する温度選択行動を解析するだけでは、我々が普段感じているような「暑さ」、「寒さ」に対する反応、すなわち、気温に対する行動性体温調節反応を評価するには不十分であると考えられる。本研究で構築された実験系は、気温に対する行動性体温調節反応を解析できる点で意義があるものと考えられる。

第2章 温度選択行動における mPFC 神経活動の関与

1. 目的

第1章では、気温の上昇に伴う温度選択行動が、体温調節に関与している可能性が示された。そこで、第2章では暑熱環境に曝露した動物の脳内諸部位における神経活動を調べることで、温度選択行動に関わる脳領域を検討した。神経活動の指標として、c-Fos タンパク質の発現を検討した。c-Fos はシナプス活動や活動電位に伴うカルシウムイオン流入などによって発現が誘導されることから、個々の神経細胞における c-Fos の発現が活性化のマーカーとして使用可能であると考えられ、多くの神経科学研究で用いられている。本章では、室温環境および暑熱環境に曝露した際の動物脳における c-Fos タンパク質発現を検討した。

c-Fos タンパク質発現の検討結果から、暑熱環境下で mPFC における神経活動が亢進している可能性が示されたことから、mPFC 内神経細胞活動の抑制が温度選択行動に与える影響を検討した。神経活動を人工的に抑制するために、DREADD システムを用いた。DREADD システムとは、デザイナー薬剤により特異的に活性化されるデザイナー受容体を用いたシステムである。DREADD は、内在性のリガンドには応答せず、デザイナー薬剤にのみ特異的に応答する。Gi 共役型である変異型ムスカリン受容体 hM4Di を発現した神経細胞では、デザイナー薬剤である Clozapine N-oxide (CNO) によって神経活動が抑制される (図9)。DREADD により神経活動を抑制した際に、温度選択行動にどのような変化が生じるのかを検討した。

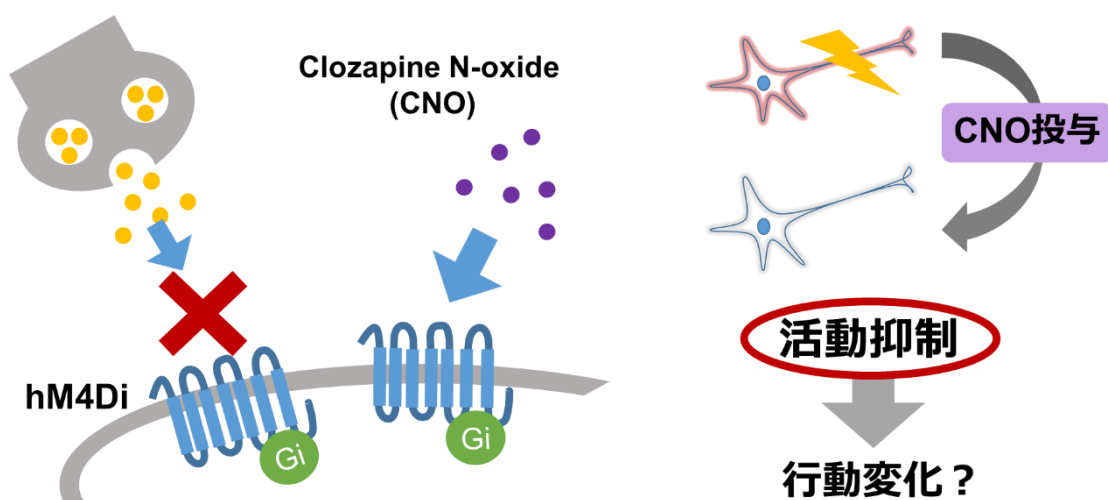


図9: DREADD システム (hM4Di) による神経活動抑制

2. 方法

1) 実験動物

c-Fos 発現の検討には雄性 Sprague-Dawley 系ラット (7~8 週齢) を使用した。購入したラットは個飼いで飼育した。DREADD 実験には雄性 C57BL/6J マウス (手術時: 7~9 週齢、行動試験時: 13~17 週齢) を使用した。購入したマウスは 1 ケージあたり 3~5 匹で飼育した。飼育条件は室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 時間毎の明暗サイクル (明期: 7:00~19:00, 暗期: 19:00~7:00) とし、水及び固形飼料を自由に摂取させた。実験はすべて動物実験委員会の承認を受けて「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (平成 19 年 4 月 1 日)」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」に準拠して実施した。

2) 室温・暑熱環境曝露による c-Fos 発現の検討

恒温槽 (KCL-2000, EYELA) に動物をケージに入れた状態で設置し、室温環境 (気温 28°C , 湿度 50%) あるいは暑熱環境 (気温 38°C , 湿度 50%) に 150 分間曝露した。各環境への曝露は、摂食・飲水が自由に行える状況下で行った。

3) 脳切片作成

各環境への曝露終了後に、ペントバルビタール深麻酔下で、0.9%塩化ナトリウム/0.01M リン酸緩衝液 (PBS) で経心灌流し、続いて、4%パラホルムアルデヒド (PFA) /0.1M リン酸緩衝液 (PB) で経心灌流固定を行った。その後、脳を取り出し、4%PFA/0.1M PB 溶液中で一晩静置することで後固定を行い、15%スクロース/0.1M PB、30%スクロース/0.1M PB によるクライオプロテクションを行い、脳を凍結した。クライオスタット (CM3050s, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて脳冠状切片 ($40\ \mu\text{m}$ 厚) を作製し、蛍光免疫組織染色に用いた。

4) 蛍光免疫組織染色

c-Fos タンパク質の蛍光免疫染色を行った。切片を 0.1% Triton X-100 (ナカライテスク, 京都) /0.01M PBS (PBS-T) で洗浄後、2%ブロックエース (雪印メグミルク株式会社, 東京) /0.1% PBS-T により 1 時間のブロッキングを行った。その後、一次抗体 (ヤギ抗 c-Fos 抗体, sc-52-G, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, TX,

USA) 中 4°Cで一晩振とうした。続いて 0.1%PBS-T により洗浄し、二次抗体溶液 (Alexa Fluor-568 標識ロバ抗ヤギ抗体, A11057, 1:1000, Invitrogen, MA, USA) 中室温で 2 時間振とうした。0.1% PBS-T、0.01M PBS により洗浄を行った後に、切片をスライドガラスに張り付け、Vectashield Hard Set mounting medium (Vector Laboratories, CA, USA) により封入した。切片の蛍光観察には fluorescence microscope BZ-X700 (株式会社キーエンス, 大阪) を用い、対物レンズは CFI Plan Apo λ 40× (株式会社ニコン, 東京) を使用した。解析にあたり、200 μm 間隔の切片において、各脳領域に 0.25 mm×0.25 mm の格子を設定し、格子内の c-Fos 陽性細胞数を計測し密度を算出した。

5) ウイルス・試薬

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用い、AAV8-hsyn-hm4D(Gi)-mCherry (Addgene, MA, USA; titer $\geq 3 \times 10^{12}$ vg/mL) を mPFC に局所注入することで、デザイナー受容体である hm4Di を mPFC の神経細胞に発現させた。このウイルスは、ヒトシナプシンプロモーターが組み込まれているため、感染することで神経細胞特異的に hm4Di を発現させることができる。デザイナー薬剤である CNO (Enzo Life Sciences, Inc., NY, USA) は、DMSO (ジメチルスルホキシド, 和光純薬工業株式会社, 大阪) で溶解したのち saline で希釈し、1mg/kg の用量で腹腔内に投与した。

6) DREADD 実験

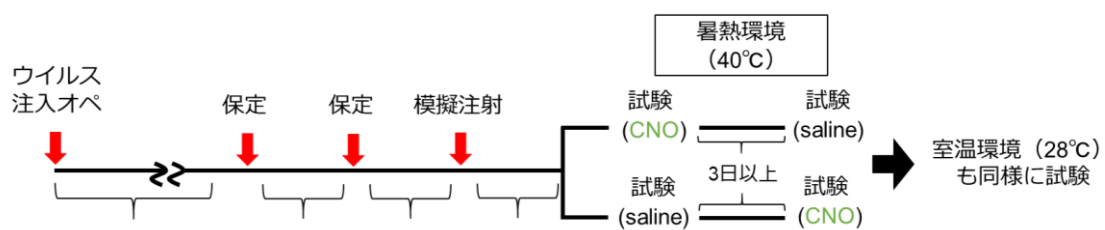


図 10: DREADD 実験タイムコース

イソフルラン吸入麻酔下、マウスを脳定位固定装置に固定して頭蓋表面を露出させ、インジェクションカニューレ挿入のため電動ドリルで頭蓋に穴をあけ

た。一方にポリエチレンチューブがつながったインジェクションカニューレに滅菌水を充填し、さらに、先端部に規定用量の AAV ベクターを充填して脳定位固定装置のマイクロマニピュレーターに固定した。インジェクションポンプに 5 μ L ハミルトンシリンジを装着し、インジェクションカニューレとつながったポリエチレンチューブにつないだ。mPFC の三カ所 (bregma より AP: 0, ML: \pm 1.02, DV: 1.8, AP: 1, ML: \pm 1.02, DV: 2.0, AP: 2, ML: \pm 1.02, DV: 2.0) にインジェクションカニューレを刺入した。各座標において、AAV 溶液を流速 0.2 μ L/min で片側あたり 0.5 μ L ずつ両側に注入し、溶液逆流防止のため、注入後さらに 10 分以上経過したのちにインジェクションカニューレを抜き取った。ウイルスの脳内局所注入を行ってから 6 週間以上群飼いで飼育したのち、行動試験開始 3 日前から順化を行った。1 日目、2 日目はマウスの保定のみを、3 日目は保定および模擬注射 (注射針を刺すのみ) を行った。その後、暑熱環境および室温環境で各 2 回温度選択行動試験を行った (図 10)。次の行動試験までは 3 日以上空けた。CNO および saline は試験開始 30 分前に腹腔内に投与した。行動試験の前後には直腸温度計測器 (BAT-12 Microprobe Thermometer, Physitemp Instruments, LLC, NJ, USA) を用いて直腸温の測定を行った。また、一部のマウスは nano tag を埋め込んで試験を行った。nano tag の埋め込みは順化開始より 4 日以上前に行った (方法は第 1 章, 2. 方法 3) を参照)。一部のマウスは、恒温器内で暑熱環境に曝露された記憶を消去するため、暑熱環境における 2 回の試験ののちに、室温環境においてプレート温度をどちらも 30°C に設定した条件で 60 分間放置した。

7) 温度選択行動試験

第 1 章 2. 方法 2) に準じた。

8) 統計処理

DREADD 実験は同個体において室温環境と暑熱環境で各 2 回ずつ計 4 回行い、それぞれの条件における各プレートへの滞在時間割合 (%) を算出し、Two-tailed paired t test を用いて比較した。すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) として表した。危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意とした。

3. 結果

3-1

c-Fos の発現は、側坐核、分界条床核、視索前野、扁桃体中心核など多くの脳領域で観察された（データ未掲載）。本研究では、mPFC 内（bregma より AP: 2.28 ~ -1.56 mm）の c-Fos タンパク質発現に着目した（図 11）。mPFC 内の c-Fos タンパク質発現は、室温環境に曝露した際よりも暑熱環境に曝露した際に、より多くなる傾向がみられた（図 12 A, B）。

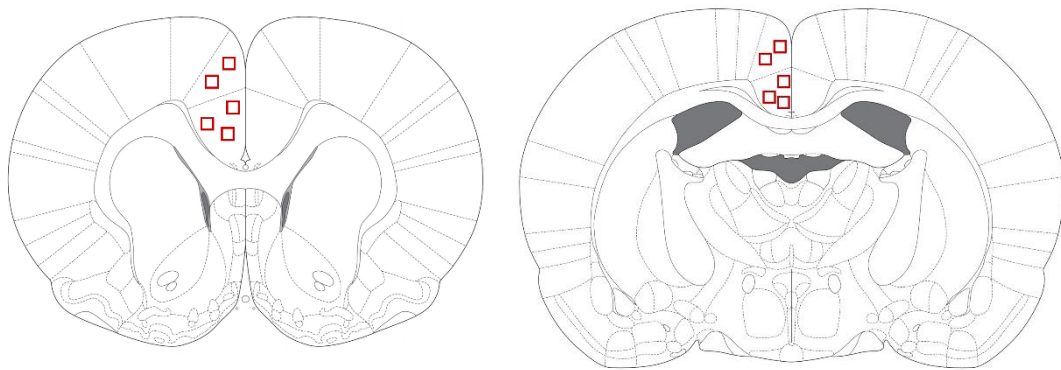
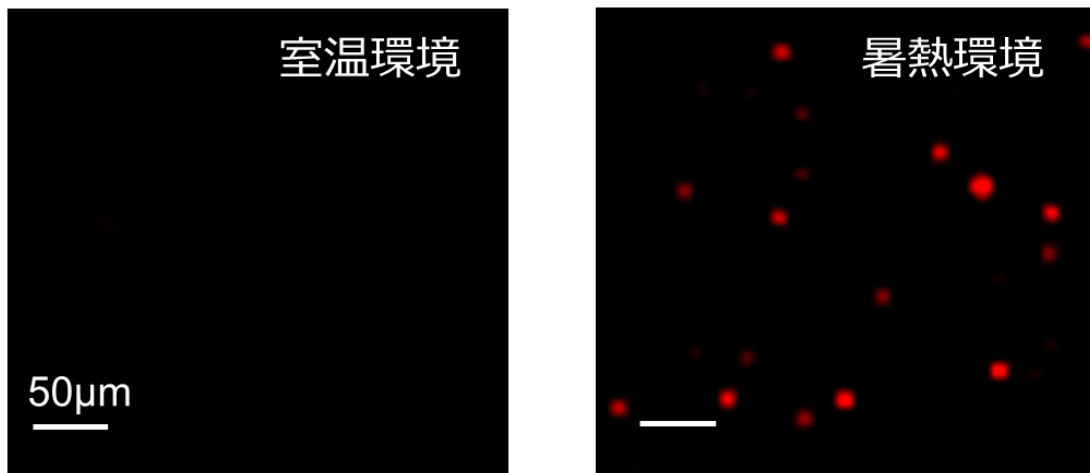
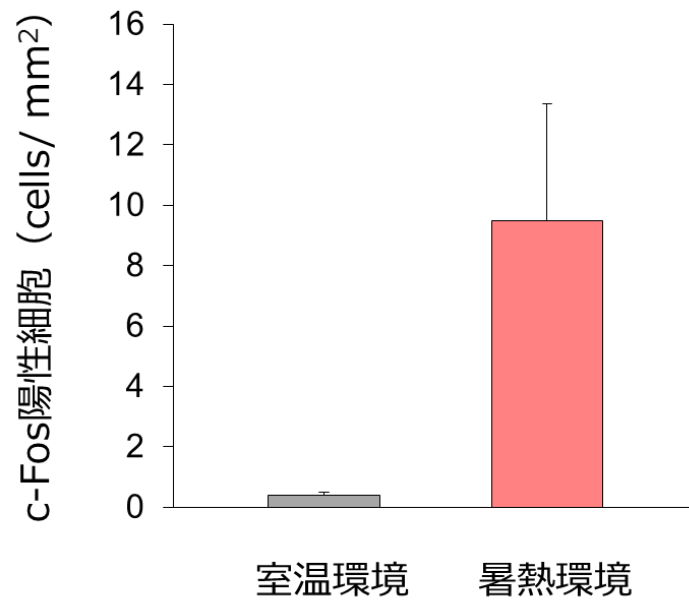


図 11: mPFC 内の c-Fos 発現細胞計測部位を赤枠で示す。
(左) AP: 2.28 , (右) AP: -1.56 mm

A



B



(n=3)

図 12 : 室温環境および暑熱環境における c-Fos タンパク質発現

A : 各気温環境における c-Fos タンパク質発現の代表写真

B : c-Fos 陽性細胞密度 (cell/mm²)

3-2

室温環境および暑熱環境において動物に saline を投与した場合と CNO を投与した場合の、温度選択行動試験における Cold プレート嗜好性を比較した(図 13)。線で示しているのが各個体の Cold プレート嗜好性の推移である。Saline 投与を行った際には、室温環境よりも暑熱環境において Cold プレート嗜好性が有意に上昇していた。一方で、CNO 投与を行った際には嗜好性が逆転する個体も見られ、ばらつきが大きくなり、室温環境と暑熱環境の間での Cold プレート嗜好性に有意な差はなかった。

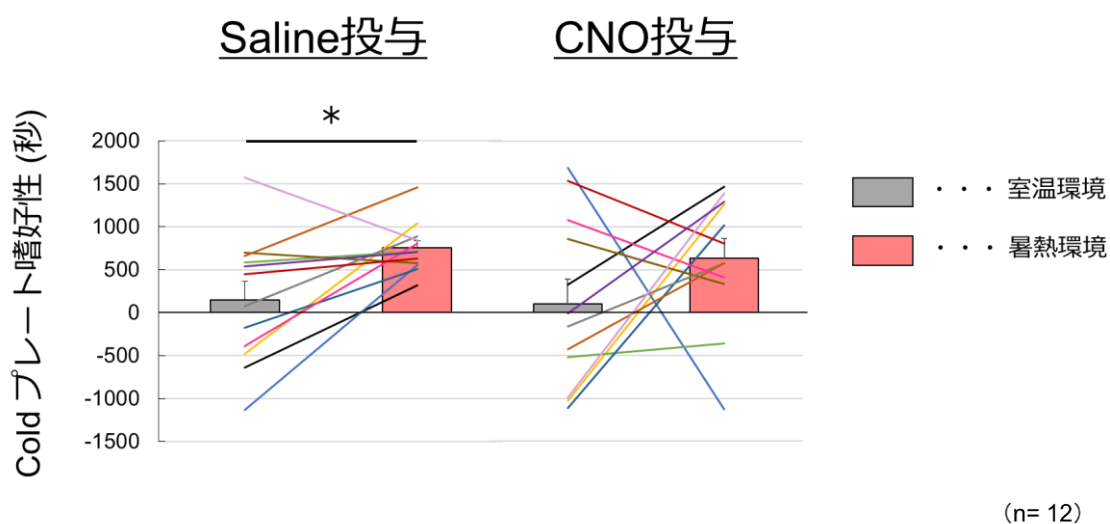


図 13: mPFC 神経活動抑制が温度選択行動に与える影響 (*P<0.05)

4. 考察

mPFCは行動調節に重要な役割をもつ脳領域として、ヒトや齧歯類において多くの報告がされている。これまでに、mPFCが報酬やリスクの大きさの判断に関わる意思決定に重要な役割をもつこと^{14,15)}、また、痛みにより惹起される場所嫌悪性に関与していることなどが報告されている¹⁶⁾。本研究結果において、室温環境に曝露した群ではmPFC内におけるc-Fosタンパク質発現はほとんど見られなかった。一方で、暑熱環境に曝露した群ではmPFC内におけるc-Fosタンパク質発現は多くみられた。これは、以前の研究報告と一致する結果である⁶⁾。これまでのmPFCに関する報告から、暑熱環境曝露により増加したc-Fosタンパク質発現は暑熱環境による不快情動の惹起、あるいは、不快情動を回避するための行動選択に関連している可能性が推測された。

DREADD実験において、salineを投与した動物において見られた暑熱環境でのColdプレート嗜好性上昇が、CNO投与を行った動物においてはばらつきが大きくなり、室温環境と暑熱環境の間でColdプレート嗜好性に有意な差がみられなくなったことから、mPFC内における神経活動の抑制により温度選択行動が障害された可能性が考えられる。先行研究において、接触温度に対する温度嗜好性に関与する脳領域として、視索前野、視床下部室傍核、視床下部背内側核、腕傍核などがこれまでに報告されてきた¹¹⁻¹³⁾。しかし、これらの脳領域は情動に関する機能だけではなく、体温調節中枢としての役割や^{17,18)}、皮膚からの温度感覚の情報処理に関する役割も大きいことが知られている¹⁹⁾。これまでに、mPFCに着目して接触温度に対する温度嗜好性への役割を検討した研究はない。一方で、上述のように、mPFCは痛みの情動的側面に関与することが報告されていることから¹⁶⁾、mPFC内神経活動抑制による温度選択行動の障害は、暑熱環境によって惹起される不快情動が抑制されることによる可能性が考えられる。しかしながら、mPFCが不快情動を回避するための行動選択に関連している可能性など、他の可能性も残されており、温度選択行動におけるmPFCの役割を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

第3章 温度選択行動中の mPFC 神経活動のリアルタイム計測

1. 目的

第2章では、mPFC 神経が暑熱環境下において活動上昇することを明らかにし、さらに、mPFC における神経活動を人工的に抑制することで、温度選択行動が障害される可能性を示した。そこで第3章では、mPFC 神経細胞の温度選択行動中の活動変化について検討した。本研究では、PAG に投射する mPFC 神経に着目した。PAG は行動調節に重要な役割をもつ脳領域として知られている²⁰⁾。当研究室では、これまでに mPFC から PAG への投射神経を人工的に活性化することにより、探索行動（新しい環境におかれた動物が、その環境を探索する行動）が増加することを明らかにしている。また、PAG は熱や痛みなどの嫌悪刺激に対して活性化することがこれまでに報告されている^{21,22)}。第2章では c-Fos の発現を指標として神経細胞の活性化を評価したが、より高い時間分解能で、かつ、経路特異的な神経活動を観察するためにファイバーフォトメトリー法を用いた。ファイバーフォトメトリー法では、脳内に埋め込んだ光ファイバーを介して脳局所で励起光を照射し、同じ光ファイバーを介して蛍光計測を行うことで、自由行動下の動物脳内における蛍光計測が可能となる（図14）。カルシウム感受性蛍光プローブである GCaMP6 を、ウイルスベクターを用いて PAG に投射する mPFC 神経に特異的に発現させ、温度選択行動中の神経活動を経時的に計測した。

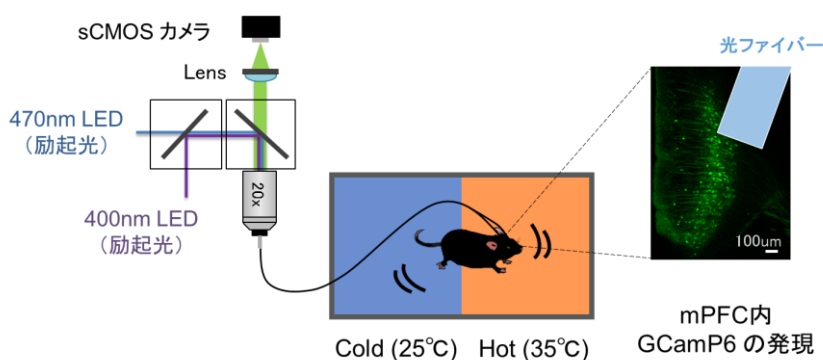


図 14: ファイバーフォトメトリー法による温度選択行動中の神経活動計測
mPFC-PAG 経路選択的に GCaMP6 を発現させ、光ファイバーを介して励起光 (470nm) を照射し、神経活動を反映した蛍光強度変化を sCMOS カメラで記録した。400nm の励起光による蛍光を神経活動に依存しない対照として用いた。

2. 方法

1) 実験動物

実験には雄性 C57BL/6J マウス（ウイルス注入時：11 週齢、ファイバー埋め込み時：16 週齢、行動試験時：19 週齢）を使用した。購入したマウスは 1 ケージあたり 3～5 匹で飼育した。飼育条件は室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 時間毎の明暗サイクル（明期：7:00～19:00、暗期：19:00～7:00）とし、水および固形飼料を自由に摂取させた。試験当日は、順化のため、行動試験開始時刻より 1 時間以上前に行動試験室において個飼いにした。実験はすべて動物実験委員会の承認を受けて「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定（平成 19 年 4 月 1 日）」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」に準拠して実施した。

2) ウイルス・試薬

本研究では、AAV ベクターを用い、AAV_{dj}-EF1 α -DIO-GCaMP6m（UNC vector core, NC, USA; titer $\geq 1.5\times 10^{13}$ vg/mL）を mPFC に、AAV2-retro-syn-EBFP-Cre（Addgene, MA, USA; titer $\geq 6\times 10^{12}$ vg/mL）を PAG に局所注入することで、Cre/loxP システムにより mPFC-PAG 経路特異的に GCaMP6m を発現させた。AAV2-retro-syn-EBFP-Cre を PAG に注入することで、PAG に投射する神経細胞の細胞体に逆行性に Cre タンパク質を発現させることができる。mPFC に注入された AAV_{dj}-EF1 α -DIO-GCaMP6m には、逆方向の GCaMP6m 遺伝子配列が loxP 配列に挟まれた状態で組み込まれており、Cre 存在下で GCaMP6m 遺伝子配列が順方向に組み換わる。これにより、mPFC-PAG 経路特異的に GCaMP6 を発現させることが可能となる（図 15）。GCaMP は、改良型 GFP に Ca²⁺結合タンパクであるカルモジュリン（CaM）と M13 ペプチドがつながった構造をしている。神経活動上昇により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇すると、CaM に Ca²⁺が結合し Ca²⁺/CaM 複合体が M13 と相互作用することで GCaMP6 に立体的な構造変化が起きる。その結果、GCaMP6 が活性状態となり蛍光タンパクとして機能する。この際の励起光の照射によって生じる蛍光強度を検出することで神経活動の可視化が可能になる（図 16）。

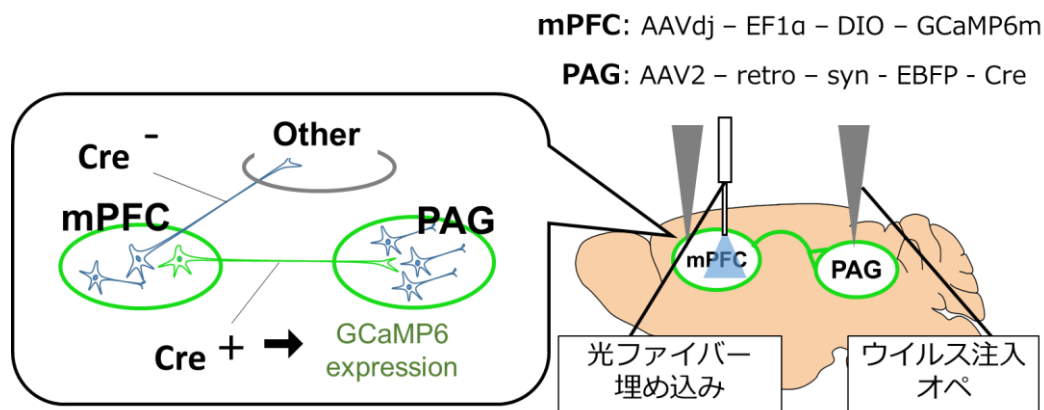


図 15: mPFC-PAG 経路特異的な GCaMP6 の発現

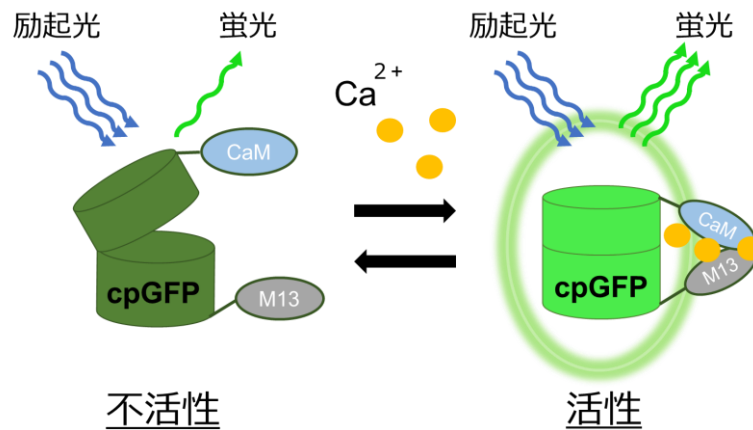


図 16: GCaMP6 を用いた Ca²⁺濃度計測

3) ファイバーフォトメトリー

イソフルラン吸入麻酔下、マウスを脳定位固定装置に固定して頭蓋表面を露出させ、インジェクションカニューレ挿入のため電動ドリルで頭蓋に穴をあけた。一方にポリエチレンチューブがつながったインジェクションカニューレに滅菌水を充填し、さらに、先端部に規定用量の AAV ベクターを充填して脳定位固定装置のマイクロマニピュレーターに固定した。インジェクションポンプに 5 μ L ハミルトンシリンジを装着し、インジェクションカニューレとつながったポリエチレンチューブにつないだ。mPFC の 2 カ所 (bregma より AP: 1.0, ML: \pm 0.97, DV: 1.58; AP: 2.2, ML: \pm 1.07, DV: 1.78) と、PAG (bregma より AP: -4.16 ML: \pm 1.0 DV: 2.66) にインジェクションカニューレを刺入した。mPFC への刺

入は 20 度、PAG への刺入は 10 度の傾きをつけて行った。各座標において、AAV 溶液を流速 0.2 μ L/min で片側あたり 0.5 μ L ずつ両側に注入し、溶液逆流防止のため、注入後さらに 10 分以上経過したのちにインジェクションカニューレを抜き取った。ファイバーフォトメトリー用のメタルフェルルファイバー（内径：400 μ m, 外径：425 μ m, NA：0.50, FP400URT, Thorlabs, Inc., NJ, USA）をウイルス注入オペと同じに mPFC（AP: 1.0, ML: \pm 0.97, DV: 1.28; AP: 2.2, ML: \pm 1.07, DV: 1.48）に埋め込んだ。黒色セメントでメタルフェルルを固定し、セメントが完全に固化したのち手術を終了した。

AAV ベクター投与から 8 週間以上待機したのち、室温環境あるいは暑熱環境において 20 分間、蛍光強度の測定を行った。20 分間の蛍光強度データから Z スコアを算出した。Z スコアは以下の式により算出した。X は各時点の蛍光強度、 α および β は 20 分間の蛍光強度の平均値とその標準偏差。

$$Z \text{ score} = (x - \alpha) / \beta$$

試験は計 4 回行い、Day1 および Day2 を室温環境、Day3 および Day4 を暑熱環境で行った。Day2 および Day4 では Cold (25 $^{\circ}$ C) および Hot (35 $^{\circ}$ C) プレートを選択行動中の神経活動を計測した。Day1 および Day3 では両プレートの温度を中間温度である 30 $^{\circ}$ C に設定し、温度差がない 2 つのプレート上の行動中の神経活動の計測をコントロール実験として行った（図 17）。

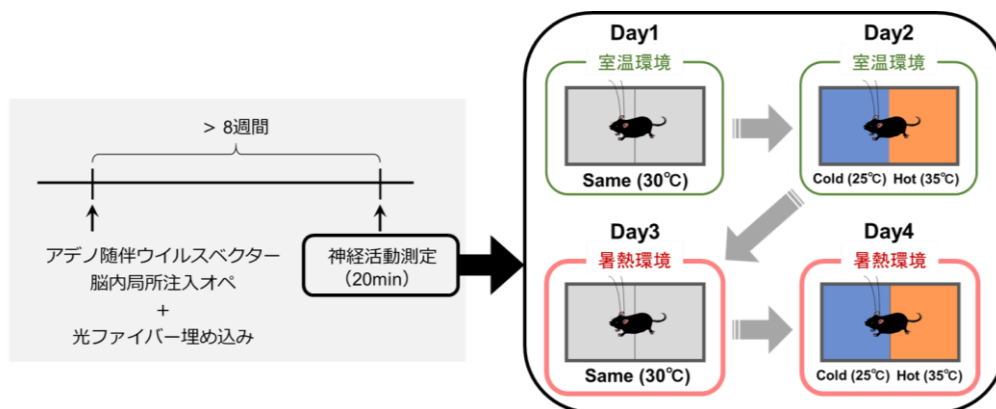


図 17: ファイバーフォトメトリーによる神経活動計測実験のプロトコール

4) 温度選択行動試験

気温を一定に保つことが出来る恒温槽内に、2つの床面の温度を個別に設定することができる Cold (25°C) / Hot (35°C) プレートを設置し、この上にアクリル製の囲いを設置した。気温は室温環境を 28±1°C、暑熱環境を 40±1°C に設定し、庫内の気温は温度センサーを用いてモニタリングを行った。試験は 20 分間行い、動物を 1 匹ずつ囲いの中に入れ、自由に探索させた。動物の行動を録画し、EthoVision XT 14 (Noldus Information Technology, Wageningen, NL) を用いて行動解析を行った。

5) 統計処理

同個体において、2種類の環境温度設定および2通りのプレート温度設定の計4つの条件下において計測した蛍光強度の時間経過データを用い、各環境温度条件下における各プレート滞在時の平均蛍光強度を比較した。また、プレート間を移動した際の蛍光強度変化について解析を行った。プレートを移動した時点を基準点 (0 秒) とし、同じプレートに 5 秒以上滞在している (前回のプレート間移動から 5 秒以上経過している) 場合のみを抽出した。移動前後 20 秒間 (±20 秒) の活動について、ヒートマップおよび平均トレースを作成するとともに、プレート間移動の前後 5 秒における蛍光強度-時間曲線の曲線下面積 (Area Under the Curve ; AUC)、プレート間移動の前後 5 秒における蛍光強度の Peak 値を求め、統計解析に用いた。統計解析は、Two-way repeated measures ANOVA を行ったのち、Tukey-Kramer post-hoc test を用いて比較した。すべてのデータは平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) として表した。統計ソフトは GraphPad Prism6 (GraphPad Software) を使用し、危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意とした。

3. 結果

各環境温度において Cold プレートと Hot プレート間の温度選択行動を行っている際の、各プレート滞在時の平均蛍光強度を比較した。線で示しているのが各個体の平均蛍光強度の推移である。暑熱環境下では、Hot プレート滞在時に Cold プレート滞在時よりも有意に神経活動が上昇していた。一方、室温環境下においては Hot プレート滞在時と Cold プレート滞在時の間で平均蛍光強度に有意な差は見られなかった (図 18)。

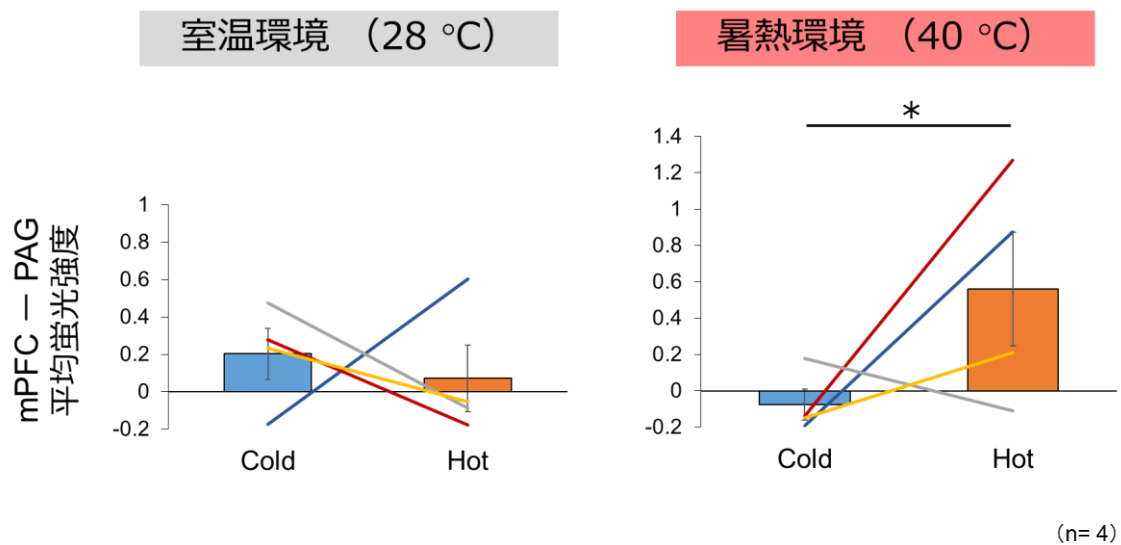


図 18: 温度選択行動試験中における各プレート滞在中の平均蛍光強度 (*P<0.05)

次に、プレート間を移動した際の蛍光強度変化について解析を行った。プレートを移動した瞬間を基準点 (0 秒) とし、前後 20 秒間の蛍光強度変化を算出した (図 19 から図 21)。

室温環境におけるプレート間移動時の蛍光強度変化を図 19 に示す。2つのプレートを同じ温度に設定した場合に比較して、Hot プレートと Cold プレートの2つの温度設定にした場合では、プレート間移動の際に神経活動が上昇する傾向がみられた。そこで、プレート間移動の前後 5 秒における蛍光強度-時間曲線の AUC と蛍光強度の Peak 値を比較したところ、AUC と Peak 値のいずれの場合においても、同温度のプレート間を移動した場合に比較し、Hot プレート

から Cold プレートに移動した場合で有意な神経活動の上昇が見られた (図 20)。

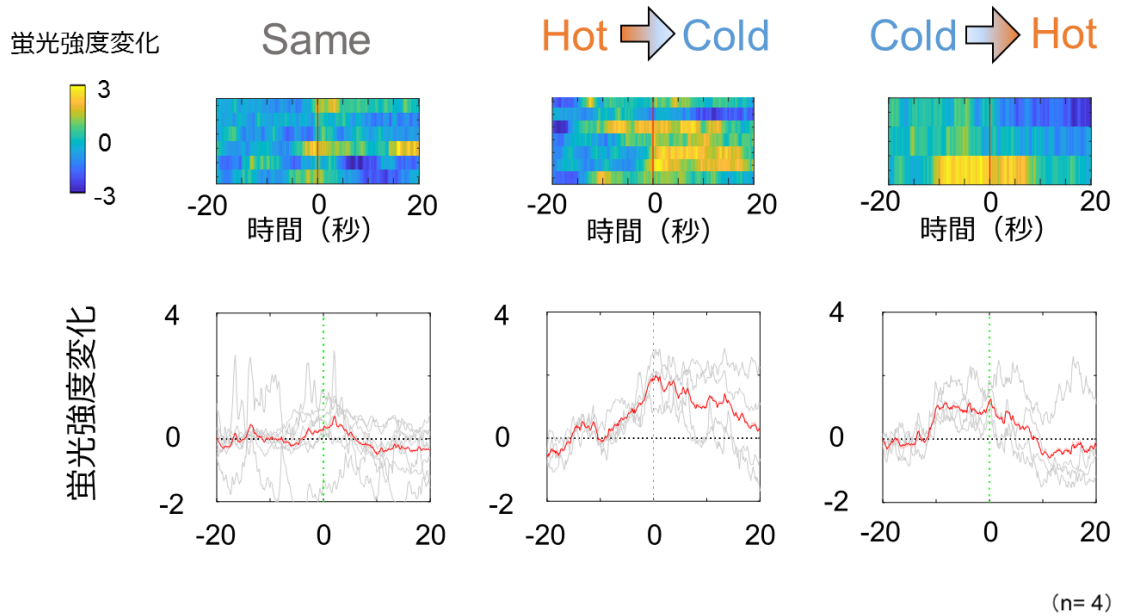


図 19: 室温環境におけるプレート間移動時の蛍光強度変化

左から、Same (同じ温度の) プレート間の移動、Hot プレートから Cold プレートへの移動、Cold プレートから Hot プレートへの移動。

(上段) 蛍光強度変化のヒートマップの代表例。(下段) 蛍光強度変化の平均波形 (赤色) と個体ごとの波形 (灰色)。

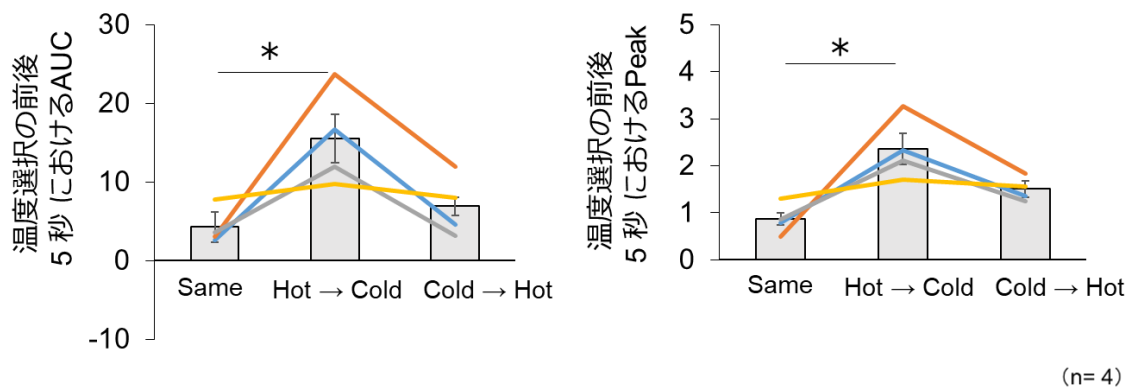


図 20: 室温環境におけるプレート間移動前後 5 秒の AUC および Peak 値
 (左) プレート間移動前後 5 秒の AUC、(右) プレート間移動前後 5 秒における Peak 値。各グラフにおいて、左から、Same プレート間の移動、Hot プレートから Cold プレートへの移動、Cold プレートから Hot プレートへの移動。(* $P < 0.05$)

次に、暑熱環境下における結果を示す (図 21)。先ほどと同様、上段はプレート間移動の際の蛍光強度変化をヒートマップで示した代表例である。下段において、灰色で示しているのが各個体の蛍光強度の平均値、赤色で示しているのが灰色で示した各個体の平均値を平均したものである。いずれの条件においてもプレート間移動の際に神経活動が上昇する傾向が見られた。そこで、温度選択行動の前後 5 秒における蛍光強度-時間曲線の AUC と蛍光強度の Peak 値を比較したところ、Same プレート間の移動、Hot プレートから Cold プレートへの移動、Cold プレートから Hot プレートへの移動の 3 つの間には有意な差は認められなかった (図 22)。

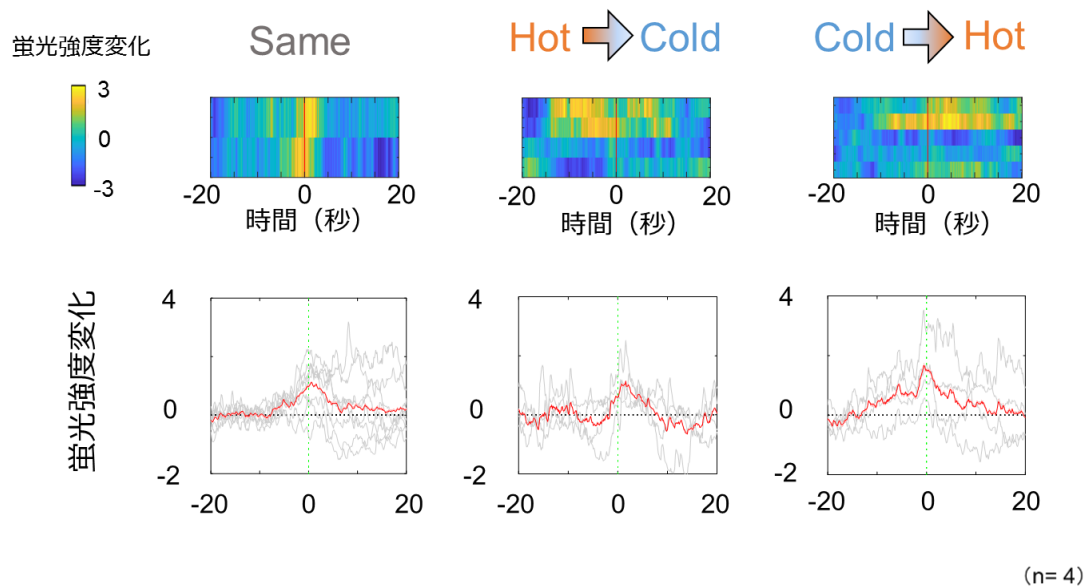


図 21: 暑熱環境におけるプレート間移動時の蛍光強度変化
 左から、Same（同じ温度の）プレート間の移動、Hot プレートから Cold プレートへの移動、Cold プレートから Hot プレートへの移動。
 （上段）蛍光強度変化のヒートマップの代表例。（下段）蛍光強度変化の平均波形（赤色）と個体ごとの波形（灰色）。

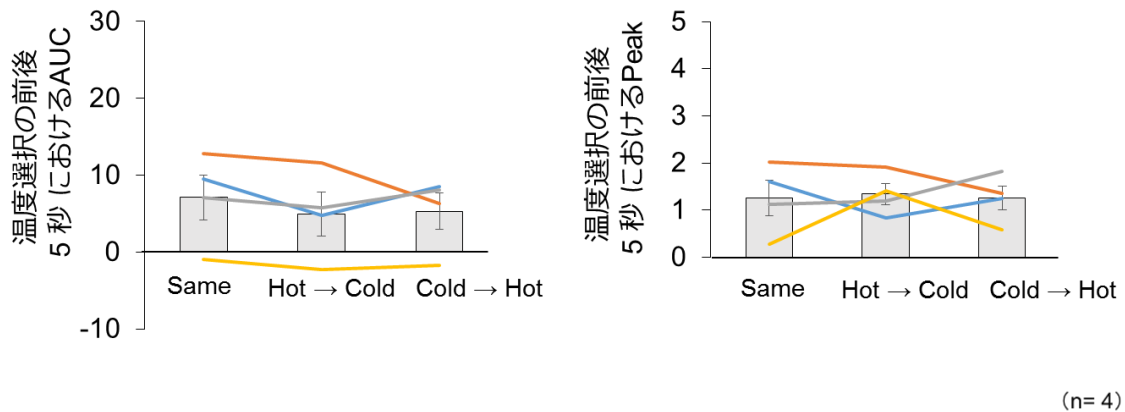


図 22: 暑熱環境におけるプレート間移動前後 5 秒の AUC および Peak 値
 （左）プレート間移動前後 5 秒の AUC、（右）プレート間移動前後 5 秒における Peak 値。各グラフにおいて、左から、Same プレート間の移動、Hot プレートから Cold プレートへの移動、Cold プレートから Hot プレートへの移動。

4. 考察

本章では、mPFC-PAG 経路に着目し、ファイバーフォトメトリー法を用いて温度選択行動中の動物における mPFC 神経細胞の活動を *in vivo* で経時的に検討した。Hot プレートおよび Cold プレート上に滞在している際の神経活動を比較すると、室温環境においては両プレート間で有意な差はみられなかったが、暑熱環境において、Cold プレート滞在時よりも Hot プレート滞在時に神経活動が有意に上昇していた。暑熱環境においては Hot プレート上の方がより不快な環境であると考えられることから、mPFC 神経細胞活動上昇は不快情動の惹起あるいは亢進による可能性が考えられる。あるいは、当研究室のこれまでの研究から、mPFC-PAG 経路の活性化により探索行動が増加することから、より良い温度環境を得るための探索行動を亢進させるために mPFC 神経細胞活動が上昇している可能性も考えられる。これらの可能性を検討するためにはさらなる実験が必要である。

プレート間を移動する際の神経活動について検討したところ、室温環境においては、AUC および Peak 値のいずれの解析からも、同じ温度のプレート間を移動した場合に比較し、Hot プレートから Cold プレートに移動した場合に神経活動が有意に上昇したが、Cold プレートから Hot プレートに移動した場合にはそのような神経活動上昇は見られなかった。第 1 章の結果から、室温環境においては Cold プレートよりも Hot プレートを好むと考えられ、本結果は、嗜好性が高いプレートから嗜好性が低いプレートに移動する際に mPFC-PAG 経路がより活性化することを示している。この結果の生理的意義について明らかにするためにはさらなる検討が必要である。暑熱環境においては、同じ温度のプレート間を移動した場合に比較し、Hot プレートから Cold プレートに移動した場合も、Cold プレートから Hot プレートに移動した場合も神経活動変化は見られなかった。暑熱環境では神経細胞活動のベースラインが高いため、プレート間移動時の神経活動変化が検出されにくい可能性が考えられる。

総 括

第1章では、暑熱環境曝露に伴う動物の温度選択行動の変化から行動性体温調節反応を評価する実験系の構築を行った。すなわち、気温が28°Cの室温環境あるいは40°Cの暑熱環境において、25°Cの床面（Coldプレート）および35°Cの床面（Hotプレート）上での滞在時間を計測することで温度選択行動を評価できると考え検討を行った。1）室温環境に比較し暑熱環境では、Coldプレートでの滞在時間が増えること、2）暑熱環境における温度選択行動中の動物の体温を計測したところ、暑熱環境曝露開始と同時に体温は上昇し、その後、Coldプレート滞在時間が増加するにつれて体温が徐々に下降すること、3）両方のプレートを35°C（Hotプレート）に設定した場合、暑熱環境曝露開始とともに上昇した体温は低下せず、体温はより高くなる傾向が見られることが明らかとなり、動物がColdプレート上に滞在することで体温調節をしている可能性が示され、本実験系を用いることにより暑熱環境に対する行動性体温調節反応を検討できるものと考えられた。

第2章では、まず、c-Fos タンパク質発現を指標として暑熱環境下で神経活動が上昇する脳領域の探索を行った。その結果、暑熱環境下でmPFCにおいて神経活動が上昇していることを示唆する結果が得られた。そこで、DREADDシステムを用いてmPFCにおける神経活動を人工的に抑制し、第1章で構築した温度選択行動試験を行ったところ、対照群に比べてmPFC神経活動を抑制した群では、Coldプレート嗜好性のばらつきが大きくなり、室温環境下と暑熱環境下におけるColdプレート嗜好性の有意な差が見られなくなったことから、mPFC神経活動抑制によって温度選択行動が障害される可能性が考えられた。

第3章では、行動調節に重要な役割を持つことが知られるPAGに着目し、PAGに投射するmPFC神経細胞の温度選択行動中の活動をファイバーフォトメトリー法によってin vivoで継時的に計測した。その結果、PAGに投射するmPFC神経細胞は、暑熱環境において、Coldプレート滞在時に比較しHotプレート滞在時に活動が上昇することが明らかとなった。暑熱環境下においては

Hot プレート上の方がより不快な環境であると考えられることから、mPFC 神経細胞活動上昇は不快情動の惹起あるいは亢進による可能性が考えられた。あるいは、当研究室のこれまでの研究から、mPFC-PAG 経路の活性化により探索行動が増加することから、より良い温度環境を得るための探索行動を亢進させるために mPFC 神経細胞活動が上昇している可能性も考えられた。また、室温環境において Hot プレートから Cold プレートに移動した場合に神経活動が有意に上昇していた。これは、嗜好性が高いプレートから嗜好性が低いプレートに移動する際に mPFC-PAG 経路がより活性化することを示している。この結果の生理的意義について明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

以上、本研究では、気温に関連した温度選択行動の神経機構を解析するための実験系を新たに構築し、その実験系を用いて、mPFC 神経細胞が温度選択行動に関与する可能性を示した。本研究により構築した実験系および本研究結果は、生体の恒常性維持に重要である行動性体温調節の神経機構の解明に役立つことが期待される。

引用文献

- 1) Nakamura K (2011) Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301(5):R1207-28.
- 2) Deuis J, Dvorakova L, Vetter I (2017) Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front. Mol. Neurosci.* 10:284
- 3) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389(6653):816-24.
- 4) Tominaga M, Caterina MJ (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol.* 61(1):3-12.
- 5) Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A (2006) Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci.* 29:135-61.
- 6) Craig AD, Bushnell MC, Zhang ET, Blomqvist A (1994) A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature.* 22-29;372(6508):770-3.
- 7) Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K (2000) Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci.* 20;85(1-3):18-25.
- 8) Tsay HJ, Li HY, Lin CH, Yang YL, Yeh JY, Lin MT (1999) Heatstroke induces c-fos expression in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 26;262(1):41-4.
- 9) Bratincsák A, Palkovits M (2004) Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. *Neuroscience.* 127(2):385-97.
- 10) Lee H, Iida T, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ (2005) Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci.* 25(5):1304-10.

- 11) Tan CL, Cooke EK, Leib DE, Lin YC, Daly GE, Zimmerman CA, Knight ZA (2016) Warm-sensitive neurons that control body temperature. *Cell*. 167(1):47-59.e15.
- 12) Yahiro T, Kataoka N, Nakamura Y, Nakamura K (2017) The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation. *Scientific Reports*. 7: 5031
- 13) Almeida MC, Steiner AA, Branco LG, Romanovsky AA (2006) Neural Substrate of Cold-Seeking Behavior in Endotoxin Shock. *PLoS One*. 1(1): e1.
- 14) Rogers RD, Ramnani N, Mackay C, Wilson JL, Jezard P, Carter CS, Smith SM (2004) Distinct portions of anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex are activated by reward processing in separable phases of decision-making cognition. *Biol Psychiatry*. 55(6):594-602.
- 15) St Onge JR, Abhari H, Floresco SB (2011) Dissociable Contributions by Prefrontal D1 and D2 Receptors to Risk-Based Decision Making. *J Neurosci*. 31 (23) 8625-33.
- 16) Johansen JP, Fields HL, Manning BH (2011) The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3;98(14):8077-82.
- 17) Nakamura K, Morrison SF (2008) A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci*. 11(1):62-71.
- 18) Romanovsky AA (2007) Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292(1):R37-46.
- 19) Cechetto DF, Standaert DG, Saper CB (1985) Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 240(2):153-60.
- 20) Isosaka T, Matsuo T, Yamaguchi T, Funabiki K, Nakanishi S, Kobayakawa R, Ko Kobayakawa (2015) Htr2a-Expressing Cells in the Central Amygdala Control the Hierarchy between Innate and Learned Fear. *Cell*. 163, 1153-1164

- 21) Tovote P, Esposito M, Botta M, Chaudun F, Fadok J, Markovic M, Wolff S, Ramakrishnan C, Fenno L, Deisseroth K, Herry C, Arber S, Lüthi A (2016) Midbrain circuits for defensive behavior. *Nature*. volume 534, pages 206–2
- 22) Yoshida K, Konishi M, Nagashima K, Saper CB, Kanosue K (2005) Fos activation in hypothalamic neurons during cold or warm exposure: projections to periaqueductal gray matter. *Neuroscience*. 133(4):1039-46.

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し、ご指導を賜りました北海道大学 大学院薬学研究院 薬理学研究室 教授・南 雅文 先生、同研究室 講師・天野 大樹 先生、同研究室 講師・野村 洋 先生、同研究室 助教・人羅 菜津子 先生に謹んで感謝の意を表します。

さらに、本論文を審査していただき、有益なるご助言、ご討論を賜りました北海道大学 大学院薬学研究院 薬物動態解析学研究室 教授・菅原 満 先生に深く感謝申し上げます。

最後に、折に触れ、幾多のご助言、ご討論を頂きました薬理学研究室の卒業生の皆様、温度グループの立ち上げにご協力頂いた皆様、後輩たち、そして大学院進学を奨めてくれ、研究生活を支えてくれた両親、応援してくれた友人たちに心から感謝いたします。

2019年 3月
井門 愛理