

ホワイトノイズ音曝露によって発現上昇する ラット脳内Fosタンパク質の観察

生理学講座 統合生理学分野 (主任教授: 渡邊達生)

井上 峻, 木場智史, 渡邊達生

c-Fos protein expression in rat brain induced by white noise sound exposure

Ryo INOUE, Satoshi Koba, Tatsuo WATANABE

*Division of Integrative Physiology, Department of Physiology, Tottori University
Faculty of Medicine Nishi-cho 86, Yonago, Tottori, 683-8503, Japan*

ABSTRACT

Evidence has demonstrated that fear results in unique autonomic adjustments: activation of both sympathetic and parasympathetic nervous systems. Here, we attempted to determine rat central cardiovascular regions which would be activated by fear. In conscious rats, fear was induced by 30 min exposure of white noise sound (WNS) at 90 dB, which evoked freezing behavior. Then, Fos protein expression in the brain was examined with the immunohistochemistry method. The WNS exposure significantly ($P < 0.05$) elevated Fos protein expression not only in the amygdala but also in the central cardiovascular regions including the periaqueductal gray, nucleus ambiguus, and rostral ventrolateral medulla. We suggest that these cardiovascular regions may be involved in the autonomic adjustments seen during fear.

(Accepted on April 20, 2015)

Key words : autonomic nervous system, central cardiovascular region, fear

はじめに

恐怖心は交感・副交感神経系の両方を刺激するという特異的な自律神経反応を生成する。例えば覚醒ラットに90 dBのホワイトノイズ音 (WNS) を曝露することですみ行動 (恐怖心の行動指標¹⁾) を誘発させると、腎交感神経活動の増加と心拍数の減少が見られる²⁾。我々は最近、このWNS曝露時のラット徐脈応答がアトロピンを静

注することで消滅することを見出した³⁾。この知見は、恐怖時の徐脈応答は副交感神経の活性化に起因することを示す。ヒトにおいても、恐怖心に伴う情動変化時には副交感神経の活性化に起因した徐脈応答が起こることが報告されている⁴⁾。

我々は現在、恐怖時の自律生理反応を生成する脳内機構の解明を目指した研究を進めている。最近、ラット中脳中心灰白質の外側野・腹外側野 (l/vIPAG) の活性化を薬理的に抑制することで

WNS曝露時の徐脈応答が抑制されることを発見した³⁾。この知見から、l/vIPAGが恐怖心による徐脈応答の誘発に関連する脳領域である可能性が指摘できる。しかし、恐怖時にl/vIPAGが活性化することを示す直接証拠はない。また、恐怖心によって活性化されるl/vIPAG以外の脳領域に関する情報もない。

本研究の目的は、恐怖時に活性化される循環中枢領域を明らかにすることであった。そこで、WNS曝露によって発現上昇するラット脳内Fosタンパク質を観察する免疫染色実験を行った。Fosタンパク質の発現は神経細胞が活性化すると上昇するため、神経細胞活動性の指標として用いられる⁵⁾。観察標的とした脳部位は、上記で言及したPAGに加え、扁桃核、延髄吻側腹外側野 (RVLM) および延髄疑核 (NA) であった。RVLMは交感神経プレモーター神経の細胞体を多く含有する交感神経の遠心性線維の起始部である⁶⁾。NAは副交感神経の遠心性線維の起始部である⁷⁾。扁桃核の中心核は恐怖性行動の制御に役割を果たす⁸⁾。

材料および方法

実験動物

本研究における全ての実験は、鳥取大学動物実験委員会の許可を得 (13-Y-47)、日本生理学会が提示した「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に準拠して行われた。Sprague-Dawleyラット [n=13, オス, 8-10週齢, 体重: 300-370 g] を実験に用いた。恐怖刺激を与える2日前まで室温25℃, 湿度50%, 12h/12hの明暗サイクルの環境下で、飼育した。この間、餌と水を自由に摂取させた。

恐怖刺激を与える2日前に実験室 (室温: 25℃) にラットをケージごと設置することで、36時間以上実験室の環境に慣れさせた。実験日には午前9時から10時の間に、覚醒ラットにWNS (90 dB) を30分間曝露することで、ラットに恐怖刺激を与えた²⁾。WNS曝露終了2時間後に、麻酔したラットの左心からヘパリン混合生理食塩水 (5 U/ml, 200 ml) を灌流して脱血した後直ちに、バラホルムアルデヒド (PFA) 液 (4%, 250 ml) を灌流して固定した。WNSに曝露しないラット (対照群) にも灌流固定を施した。そして直ちに脳組織を取り出してPFA液中に4時間浸漬した後、PFA液をスクロース液 (30%) に置換して、一晚以上放

置した (4℃)。NAを含有する冠状断の凍結切片 (プレグマ-14.04 mmおよび-13.56 mm), RVLMを含有する切片 (プレグマ-12.36 mmおよび-12.0 mm), PAGを含有する切片 (プレグマ-8.4 mm, -7.8 mm, -7.2 mmおよび-6.6 mm) および扁桃核を含有する切片 (プレグマ-3.12 mmおよび-2.52 mm) をそれぞれ4枚ずつ作製した (厚さ: 35 μm)。

免疫染色

冠状切片を過酸化水素水に浸漬することで内在性ペルオキシダーゼを不活性化した後、Triton X-100 (2 μl/ml, Sigma Aldrich) および正常ヤギ血清 (20 μl/ml) を混和したリン酸緩衝生理食塩水に浸漬することで非特異反応をブロックした。そしてウサギ抗c-Fos抗体 (2 μl/ml, #2250, CST) を24時間~48時間 (4℃) 作用させた。再びブロッキングした後に、ヤギ抗ウサギIgG抗体 (5 μl/ml, BA-1000, VECTASTAIN®) を1時間 (4℃) 作用させた。ペルオキシダーゼ染色キット (PK-6101, VECTASTAIN®) を用いて抗体シグナルを増感した後、DAB法を用いてFosタンパク質を染色した。脳切片をスライドガラスにマウントして乾燥 (室温)、脱水およびキシレン処理を施した後、封入した。

データ収集と解析

デジタルカメラを接続した光学顕微鏡 (BZ-9000, キーエンス) を用いて脳切片のデジタル画像を収集し、顕微鏡付属のソフトウェアを用いて脳切片の全体像を構成した。取得した画像とラット脳地図 (冠状断面)⁹⁾ とを、画像処理ソフト (Corel DRAW X6, Corel) を用いて重ね合わせることで脳領域を判別した。画像処理ソフト (Image J 1.48v, NIH) を用いて、Fos陽性細胞数および脳領域の表面積を算出した。

各脳部位の位置間および群間の差異を検討するために二元配置分散分析を用いた。有意なF値が得られた場合には、Tukey's法を用いて事後検定を行った。有意水準を危険率5%未満とした。平均値±標準誤差で値を示した。

結 果

WNSを曝露したラットとWNSに曝露しなかった対照ラットのvIPAG (プレグマ-7.8 mm) に

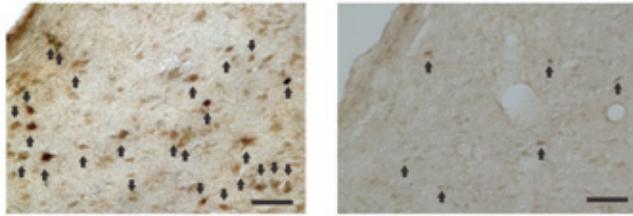


図1 ホワイトノイズ音を曝露したラット (左) と対照ラット (右) のvIPAG (プレグマ-7.8 mm) におけるFos陽性細胞 (矢印で示す) の例. スケールバー: 50 μ m.

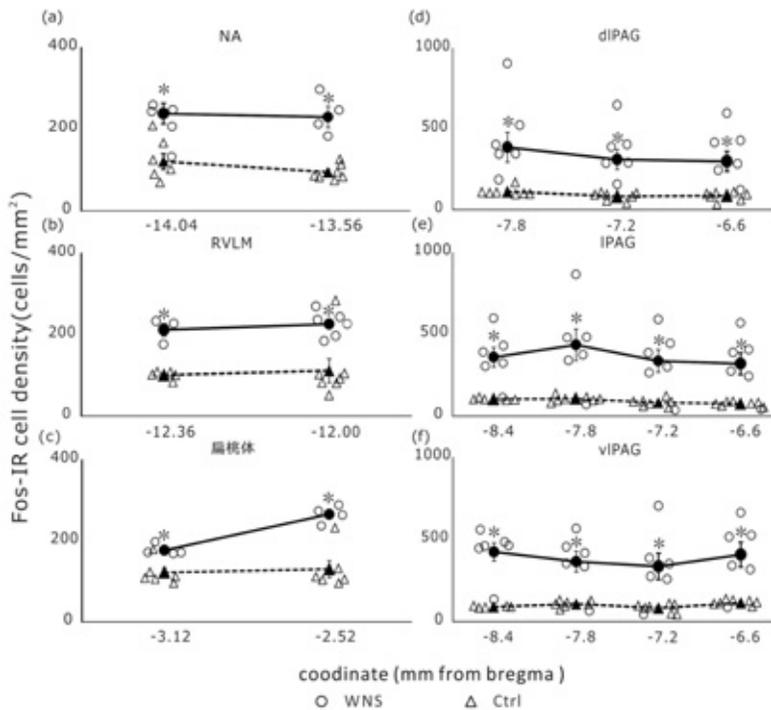


図2 各個体の延髄疑核 (NA, a), 延髄吻側腹外側野 (RVLM, b), 扁桃体 (c) および中脳中心灰白質の背外側野・外側野・腹外側野 (dl/l/vIPAG, d~f) におけるFos陽性細胞の密度 (cells/mm²). WNS: ホワイトノイズ音暴露群 (n=6, ただしRVLM プレグマ-12.36 mmはn=3, 扁桃体はn=4, ○). Ctrl: ホワイトノイズ音を曝露しない対照群 (n=7, ただしRVLM プレグマ-12.36 mmはn=5, 扁桃体はn=6, l/vIPAG プレグマ-8.4 mmはn=5, △). ●および▲: 平均値±標準誤差. *: 危険率が5%未満であったことを示す.

におけるFos陽性細胞の例を, 図1に示した. WNS群 (n=6) と対照群 (n=7) の各脳領域 (NA, RVLM, PAGおよび扁桃体) におけるFos陽性細胞の密度を, 図2に示した. NA (プレグマ-14.04 mmおよび-13.56 mm) におけるFos陽性細胞の密度は対照群よりもWNS群で約2-3倍高かった

($p < 0.05$) (図2a). RVLM (プレグマ-12.36 mmおよび-12.0 mm) においては対照群 (プレグマ-12.36 mmはn=5) よりもWNS群 (プレグマ-12.36 mmではn=3) で約1.5-2倍高かった ($p < 0.05$) (図2b).

扁桃体 (プレグマ-3.12 mmおよび-2.52 mm) に

におけるFos陽性細胞の密度は対照群 (n=6) よりもWNS群 (n=4) で約1.5-2.5倍高かった (p < 0.05) (図2c).

PAG腹外側野 (dlPAG) (ブレグマ-7.8 mm, -7.2 mmおよび-6.6 mm) におけるFos陽性細胞の密度はWNS群で約3-4倍高かった (p < 0.05) (図2d). lPAG (ブレグマ-8.4 mm, -7.8 mm, -7.2 mmおよび-6.6 mm) におけるFos陽性細胞の密度は対照群 (ブレグマ-8.4 mmではn=6) よりもWNS群で約3-4倍高かった (p < 0.05) (図2e). vlPAG (ブレグマ-8.4 mm, -7.8 mm, -7.2 mmおよび-6.6 mm) におけるFos陽性細胞の密度は対照群 (ブレグマ-8.4 mmではn=6) よりもWNS群で約3-4倍高かった (p < 0.05) (図2f).

考 察

循環中枢部位であるPAGの各領域, RVLM, およびNAにおいて, WNSを曝露することによってFosタンパク質の発現が有意に上昇した. これらの脳部位は, 恐怖刺激時の特異的な自律神経反応 (交感神経・副交感神経の賦活) の生成において, 何らかの役割を担っている可能性が考えられる.

PAGは解剖学的に, 内側, 背外側, 外側, 腹外側領域に分けられ, 各領域が高度な機能的特性を有する長軸方向に添った柱状構造を形成する¹⁰⁾. Bellchambersら¹¹⁾ は, ラットに強制的に水泳を行わせた後, Fosタンパク質がPAGにおいて発現上昇することを見出している. ただし, 強制水泳によってlPAG吻側部およびvlPAG尾側部においてFosタンパク質発現が有意に上昇した一方で, dlPAGにおいては発現上昇が見られなかった¹¹⁾. 一方で本研究では, WNS曝露によってPAG全領域においてFosタンパク質の発現が上昇した. すなわちWNS曝露と強制水泳とでは, PAGの各領域は異なって活性化した. ストレス時に活性化するPAG領域は, ストレスの種類によって異なると思われる.

副交感神経の遠心性線維の起始部であるNA⁷⁾ がWNS曝露によって活性化したという本研究結果は, WNS刺激時の副交感神経性の徐脈応答³⁾ にはNAの活性化が関与した可能性を示唆する. l/vlPAGからNAには神経投射がある¹²⁾ ことから, 恐怖心はl/vlPAGの活性化を介してNAを刺激することで, 副交感神経性の徐脈応答を引き起こし

たのかもしれない.

交感神経の遠心性線維の起始部であるRVLM⁶⁾ がWNS曝露によって活性化したという本研究結果は, WNS曝露時の交感神経活動の増加³⁾ にはRVLMの活性化が関与した可能性を示唆する. PAGからRVLMに神経投射がある¹³⁾ ことに加え, dlPAGが交感神経の活性化に重要である¹⁴⁾ ことも踏まえると, 恐怖心はdlPAGの活性化を介してRVLMを刺激することで, 交感神経活動を増加させた可能性が考えられる.

恐怖心の中枢部位である扁桃体においてもFosタンパク質の発現が上昇することも見出した. 恐怖刺激で活性化する扁桃体外側核¹⁵⁾ からは, 直接または間接に, 恐怖性行動の表出を制御する扁桃体中心核⁸⁾ への入力がある¹⁶⁾. この扁桃体中心核からPAGへの直接の投射¹⁷⁾ が, 恐怖時に活性化して徐脈応答を引き起こす役割を持つかもしれない. ただし本研究は, 「扁桃体外側核→扁桃体中心核→PAGという中枢経路が恐怖時の自律神経反応の生成に関連する」との仮説を検証するものではない. 恐怖時に作動して自律神経系に影響する扁桃体からPAGへの中枢経路の同定は, 今後の課題である.

大村菜美博士 (鳥取大学大学院) の実験助言に感謝する. 本研究は科学研究費挑戦的萌芽研究 (26670112) (木場) およびかなえ医薬業振興財団研究助成金 (木場) によって行われた.

文 献

- 1) Schenberg LC, Póvoa RM, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; **29**: 1279-1298.
- 2) Yoshimoto M, Nagata K, Miki K. Differential control of renal and lumbar sympathetic nerve activity during freezing behavior in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; **299**: R1114-R1120.
- 3) Koba S, Hisatome I, Watanabe T. Fear-induced bradycardia is abnormal in rats with heart failure. *The FASEB Journal* 2014; **28**: 1132.3.
- 4) Hermans EJ, Henckens MJ, Roelofs K,

- Fernández G. Fear bradycardia and activation of the human periaqueductal grey. *Neuroimage* 2013; **66**: 278-287.
- 5) Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988; **240**: 1328-1131.
 - 6) Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **287**: R824-R832.
 - 7) Chitravanshi VC, Sapru HN. Microinjections of urocortin1 into the nucleus ambiguus of the rat elicit bradycardia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **300**: H223-H229.
 - 8) Hitchcock JM, Davis M. Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. *Behav Neurosci* 1991; **105**: 826-842.
 - 9) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*, compact sixth edition. San Diego: Academic Press; 2009.
 - 10) Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 1994; **17**: 379-389.
 - 11) Bellchambers CE, Chieng B, Keay KA, Christie MJ. Swim-stress but not opioid withdrawal increases expression of c-fos immunoreactivity in rat periaqueductal gray neurons which project to the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 1998; **83**: 517-524.
 - 12) Ennis M, Xu SJ, Rizvi TA. Discrete subregions of the rat midbrain periaqueductal gray project to nucleus ambiguus and the periambigal region. *Neuroscience* 1997; **80**: 829-845.
 - 13) Van Bockstaele EJ, Aston-Jones G, Pieribone VA, Ennis M, Shipley MT. Subregions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat. *J Comp Neurol* 1991; **309**: 305-327.
 - 14) Dampney RA, Furlong TM, Horiuchi J, Iigaya K. Role of dorsolateral periaqueductal grey in the coordinated regulation of cardiovascular and respiratory function. *Auton Neurosci* 2013; **175**: 17-25.
 - 15) Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 2001; **8**: 229-242.
 - 16) Wilensky AE, Schafe GE, Kristensen MP, LeDoux JE. Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 2006; **26**: 12387-12396.
 - 17) LeDoux J. Rethinking the emotional brain. *Neuron* 2012; **73**: 653-676.