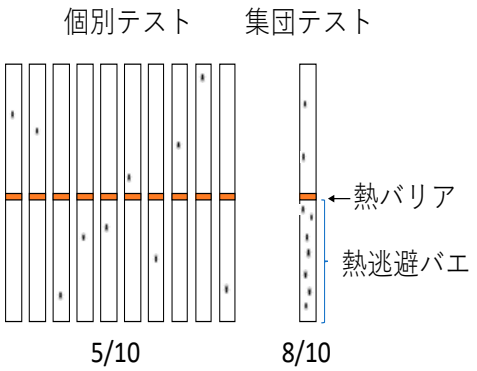
33　情動伝染を担うショウジョウバエ神経回路	齊藤　実

【目的】他者の痛みや悲しみなどの情動状態の共感は人間が社会性を形成する心理学的基盤である。しかし進化の過程で共感性がいつ現れたのか？どのような神経機構の働きによるのか？なぜ孤立化やストレスで低下し、自閉症や発達障害などで欠如するのか？多くのことが不明である。我々は共感性の原初的形態である情動伝染が、単純な神経回路を持つショウジョウバエでも起こることを見出した。本研究ではショウジョウバエを新たなモデル動物として、情動伝染を担う神経回路を同定し、集団飼育により回路が形成される仕組み、その形成機構と動作原理を一細胞レベルで明らかにする。社会性を持たないショウジョウバエの簡便な脳神経回路の働きから、社会性の基盤となる情動伝染を理解することで、情動伝染から共感性・社会性への進化を、神経科学から解き明かす糸口を与える。また情動伝染が生まれる仕組みを遺伝学的に解析することで、各種精神神経疾患や発達障害で顕在化する共感性の消失を分子レベルで理解する。

【方法】ハエの反走地性を利用して熱回避行動を調べた。ハエがバイアルを登っていく途中にある熱バリアを越えて、さらに登っていくか、熱バリアを回避して登るのを止めるかを定量観察した。個別テストでは一つのバイアルにハエを 1 匹入れて、集団テストでは一つのバイアルに 10 匹のハエを入れて熱回避行動を観察した（下図）。行動薬理学的実験では 5-HT2A 受容体、5-HT1A 受容体、D2 受容体、AMPA 受容体、NMDA 受容体、GABAA 受容体、ニコチン受容体、ヒスタミン Hi1 受容体阻害剤、セロトニン合成酵素阻害剤、セロトニン取り込み阻害剤を用いた。熱逃避行動の亢進を担う感覚は各種感覚受容変異体と、熱遺伝学的手法による各種感覚神経細胞の人為的な活動制御により調べた。同定された神経細胞の形態や神経活動の痕跡は共焦点レーザー顕微鏡により調べた。

【結果】ショウジョウバエ熱回避行動が個別と比べて集団で亢進すること、この熱回避行動の亢進が熱回避行動を取る他者からの、恐らく翅を対象とした、視覚情報によって誘導されることが分かった。哺乳類集団内での侵害刺激に対する応答の増強は、感情の伝染（情動伝染）によって引き起こされると考えられている。熱回避行動の集団性亢進は、哺乳類の情動伝染と同様に、拘束ストレスによって抑制され、幼少期の集団飼育が必要であった。また熱回避行動の集団性亢進はセロトニン受容体阻害剤で抑制された。セロトニン作動性神経細胞は幾つかのクラスターを形成しているが、脳両側の PMPD クラスターにある一組のセロトニン神経細胞（R23E12-Tph 神経細胞）の出力を熱遺伝学的手法で阻害すると熱回避行動の集団性亢進が消失し、活性化すると拘束ストレスで消失した熱回避行動の集団性亢進が回復するだけでなく、個別の熱回避行動も亢進した。さらに R23E12-Tph 神経細胞は他人の熱回避行動を観察したときだけでなく、自身が熱刺激を受けることでも活性化した。これらの結果から、熱回避行動の集団性亢進は情動伝染によるものであり、R23E12-Tph 神経細胞はショウジョウバエで情動伝染を担うミラーニューロン様の細胞であることが示唆された。

集団による熱回避行動の亢進



33. 情動伝染を担うショウジョウバエ神経回路

齊藤　実

東京都医学総合研究所 学習記憶プロジェクト

Key words：情動伝染，ショウジョウバエ，セロトニン作動性神経，ミラーニューロン

緒　言

他者の痛みや悲しみといった情動状態の共感は人間が社会性を形成する心理学的基盤である。Preston と de Waal は情動伝染が共感性へと進化して社会性を獲得する行動心理学的背景を論じている［1］。哺乳類では社会性・共感性に関与する脳領域（縫線核、扁桃体、腹側運動前野、内側前頭前野など）やオキシトシン、バソプレッシンなどの神経内分泌系が見つかっている。しかし各脳領域間でどのような回路を構築しているのか？社会性・共感性が成長過程でどのように発達し、ストレス下でなぜ表出が抑制されるのか？に対する分子・回路レベルでの解明には至っていない。Malenka らのグループはマウスの社会性発現に、縫線核から側坐核に投射する 5-HT 神経細胞の活動が必要なことを最近報告しているが［2］、複雑な脳構造を持ち、多種多様な遺伝学的操作を組み合わせた解析が容易でない哺乳類モデルでは依然として多くの点と点が結ばれていない現状がある。

我々は社会性を持たないショウジョウバエでも、集団の中で他者の熱回避行動を見ると自身の熱回避行動が亢進すること、即ち情動的共感性の原初的形態といわれる情動伝染の端緒を、熱回避行動の集団性亢進で初めて見出した。本研究は簡便な脳と高度に発達した遺伝学的手法、膨大な脳の連続電子顕微鏡画像データを用いたコネクトーム解析による神経結合の網羅的同定など、ショウジョウバエのモデル動物としての特長や研究資源を生かして、情動伝染回路の実体を一細胞単位で同定して分子・シナプスの機能から動作原理を調べた。

方　法

1. 熱回避行動

バイアルを登上する途中にある熱バリアを回避して戻るか、越えて登っていくかを一匹ずつもしくは 10 匹の集団で観察した。熱バリアは温水を流すチューブをバイアルの外周に巡らせた（図 1）。熱バリアを回避して登上しなかったハエの比率から熱回避インデックスを算出した。

2. 行動薬理実験

5-HT2A 受容体阻害剤（ketanserin）、5-HT1A 受容体阻害剤（Way 100635）、セロトニン合成酵素阻害剤（PCPA）、セロトニン取り込み阻害剤（fluoxetine）に加えて、D2 受容体阻害剤（pimozide）、AMPA 受容体阻害剤（CNQX）、NMDA 受容体阻害剤（MK801）、GABAA 受容体阻害剤（picrotoxin、bicuculline）、ニコチン受容体阻害剤（mecamylamine）、ヒスタミン Hi1 受容体阻害剤（hydroxyzine）を用いた。

3. 使用した変異体と遺伝子組換え体

視覚変異体 norpA、嗅覚変異体 or[83]に加えて、GAL4/UAS 法を用いて細胞種特異的なシナプス伝達の阻害、神経活動の誘導を行った。Ato-GAL4 により聴覚神経細胞、Gr63a-GAL4 と Gr21a-GAL4 により CO2 受容神経細胞、RB55 により機械刺激受容神経細胞、R23R12-Tph-GAL4 により PMPD クラスター中一組のセロトニン作動性神経細胞で UAS-TNT（テタヌストキシン）を発現して不可逆的にシナプス伝達を、UAS- shi^{ts}（熱感受性変異ダイナミン）を発現して可逆的にシナプス伝達を阻害した。逆に UAS-dTRP（熱感受性チャンネル）により上記細胞で熱依存的に神経活動を上昇させた。

4. 形態学的解析

神経活動の痕跡は抗リン酸化 ERK 抗体により調べた［3］。特定の神経細胞の局在、形態は細胞種特異的な GAL4 系統と UAS-nls::GFP（核局在 GFP）、UAS-mCD8::GFP（膜移行型 GFP）を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で調べた。

結果と考察

1. 集団での熱回避行動の亢進は視覚情報による

ショウジョウバエがバイアルを登上するとき途中にある熱バリアを越えて登り続けるか、中止して戻るか（熱回避行動をとるか）、バイアル毎に一匹ずつ入れて調べる個別テストと、10 匹入れて調べる集団テストで調べた。その結果、図 1a に示すように集団テストの群が個別テストの群より 38～42℃の熱バリアに対して高い熱回避行動（HA）をとった。この集団効果がどのような感覚情報に依存しているか、視覚情報変異体（norpA）、嗅覚変異体 or[83]で調べた。さらにテタヌストキシンによりシナプス出力を聴覚神経細胞で抑止した Ato＞TNT、忌避シグナル二酸化炭素の受容神経細胞で抑止した Gra63a＞TNT、Gr21a＞TNT、器械受容神経細胞で抑止した RB55＞TNT で調べた。視覚障害をもつ norpA では集団での回避行動の亢進がみられなかったが（図 1b）、他の感覚変異系統や TNT 発現系統では野生型同様の集団効果がみられた。さらに暗闇で育てられたことで視覚障害をもつハエにも集団効果が見られなかった。通常の飼育を行ったハエでも翅を切ったとき集団効果が起こらなかった。また直接他者との接触がなくとも、熱回避行動をとる他のハエをガラス越しに見るだけで集団効果が観察された。

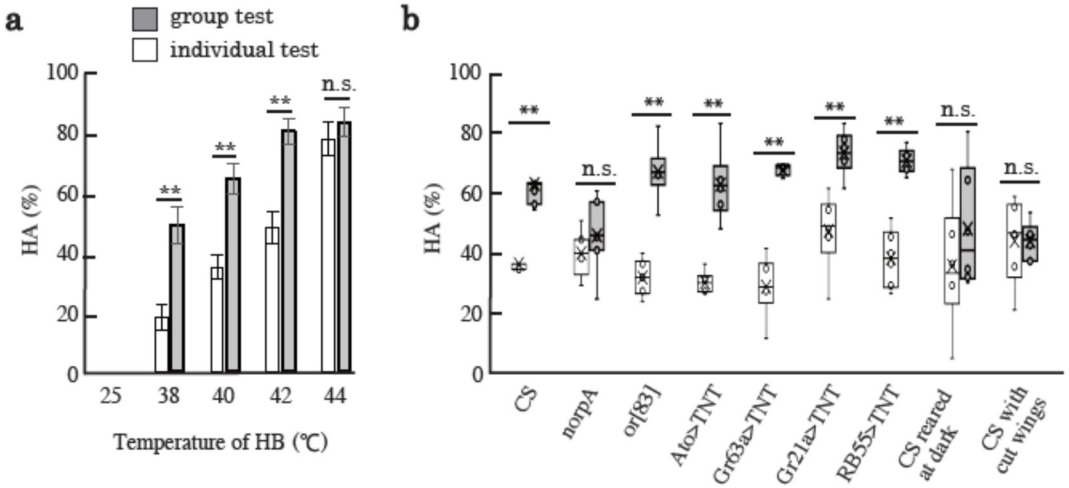


図 1. 視覚情報に依存した熱回避行動の集団での亢進

a) 熱バリアを越えずに戻る比率を Heat Avoidance %で表した。熱バリアが 25℃のときは個別も集団も熱バリアを越えてバイアルを登上し、44℃ではいずれも約 80%が登上を止めて戻る。一方 25～44℃熱バリアは個別より集団の方が引き返す率が高い。**p＜0.01 by Bonferroni post-hoc comparison after two-way ANOVA.

b) 熱回避行動の集団での亢進は視覚情報による。集団での 40℃の熱バリアに対する回避率の上昇が視覚変異体と暗闇で育てた群、翅を切った群では障害された。一方、嗅覚変異体および CO2 受容神経細胞、機械刺激受容神経細胞からのシナプス出力を阻止した系統では野生型同様の集団性亢進が見られた。**p＜0.01 by t-test.

興味深いことに集団効果は個飼いされたハエでは発達せず、拘束ストレスで消失した。更に記憶中枢キノコ体の神経細胞からの出力を阻害しても集団効果は消失した。こうした結果から集団効果が視覚情報にもとづいた情動伝染によること、発達期の他者との相互作用が記憶としてキノコ体に蓄積され、これが他者の翅を必要とする行動の観察から読み出されることで集団効果を表出していることが示唆された［4］。

2. 集団での熱回避行動の亢進はセロトニン作動性神経系による

集団効果に関与する神経系を明らかにするため、各種受容体阻害剤の効果を調べた（表 1）。その結果、5HT2A 受容体の阻害剤は集団効果を消失させるが個体での熱回避行動には影響は与えないことが分かった。さらにセロトニン合成酵素（TPH）の阻害剤も集団効果を抑制した一方、セロトニン取り込み阻害剤は個体の熱回避行動に影響を与えないが、集団効果を強化し、拘束ストレスを受けた個体でも集団効果を回復させた。以上の結果から熱回避行動の集団効果にはセロトニン作動性神経系による 5HT2A 受容体の活性化が必要なことが示唆された。

表 1. 集団での熱回避行動の亢進の各種受容体阻害剤による影響

阻害剤	受容体	熱回避行動	集団での回避亢進
ketanserine	5HT2A	影響なし	なし
Way 100635	5HT1	影響なし	あり
pimozide	D2	影響なし	あり
CNQX	AMPA	影響なし	あり
MK801	NMDA	影響なし	あり
picrotoxin	GABAA	影響なし	あり
bicuculline	GABAA	影響なし	あり
mecamylamine	nicotinic	影響なし	あり
hydroxzine	Hi1R	影響なし	あり

調べた全ての阻害剤は個体の熱回避行動には影響を与えなかった。しかし 5HT2A 受容体の阻害剤は集団での熱回避行動の亢進を顕著に抑制した。

3. 集団による熱回避行動の亢進は一組のセロトニン作動性神経細胞により制御されている

セロトニン作動性神経細胞は複数のクラスターとして脳内に分布している［5］。各クラスターで GAL4 を発現する GAL4 系統と UAS-TNT 系統を掛け合わせて、どのクラスターからの出力が熱回避行動の集団効果に必要か検討した。その結果、PMPD というクラスターからの出力を停止すると集団効果が消失することが分かった。さらに PMPD クラスターの中で集団効果に関与するセロトニン作動性神経細胞のより詳細な解剖遺伝学的解析を行った。その結果、R23E12-Tph-GAL4 で標識される一組のセロトニン作動性神経細胞［5］のシナプス出力を停止すると集団効果が消失し（図 2a）、逆に神経活動を上昇させると個別テストにおいても集団テスト同様、熱回避行動が亢進し、拘束ストレスで消失した集団効果も回復することが分かった（図 2b）。

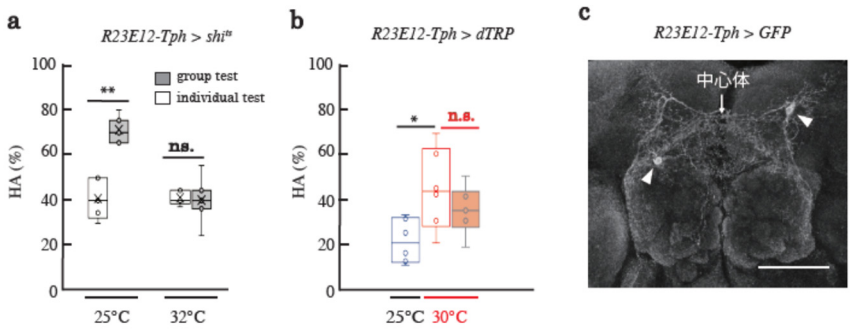


図 2. 情動伝染を制御する一組のセロトニン作動性 R23E12-Tph 神経細胞

a） 熱感受性 shibire 変異遺伝子を発現し 32℃でシナプス出力を抑制すると集団での熱回避行動亢進が消失する。**p＜0.01 by Bonferroni post-hoc comparison after two-way ANOVA.

b） 熱感受性 dTRP 遺伝子を発現し 30℃で神経活動を上昇させると個別テストでも熱回避行動が亢進した。*p＜0.05 by Bonferroni post-hoc comparison after one-way ANOVA.

c） R23E12-Tph 神経細胞の細胞体（矢頭）と軸索投射パターン。スケールバー：100 μm。

実際に熱回避行動や集団効果で R23E12-Tph が活性化されるか、リン酸化 ERK を指標に調べたところ、ハエ自身に熱刺激が与えられたときだけでなく、熱刺激を与えられている他者をみたときも活性化されること、しかし翅を切られた他者に熱刺激が与えられているところをみても活性化されないことが分かった。23E12-Tph 神経細胞に GFP を発現してその形態を調べたところ、視覚情報処理と逃避行動の制御に関わる中心体にその軸索を投射していた（図 2c）。

集団の中で他者の回避行動を観察したことによる自身の回避行動の亢進（集団効果）は、個飼いされたハエでは起こらないこと、拘束ストレスにより消失するといった特徴から情動伝染の発達によるものと思われる。情動伝染は共感性や社会性の基盤と考えられており［1］、共感性に障害をもつ自閉スペクトラム症の治療薬として使用されているセロトニン再取り込み阻害剤が拘束ストレス後に低下する集団効果を回復させることも、集団効果が情動伝染によることを示唆している。集団で飼育されることが集団効果の発現に必要であることを考慮すると、発達期の他者との相互作用が、後の集団効果の発現に必要な視覚経験として記憶中枢のキノコ体に蓄積されることが考えられる。

本研究により情動伝染が、同定された僅か一対のセロトニン作動性 R23E12-Tph 神経細胞により制御されていることが示唆された。これら神経細胞は自身が熱刺激を受けたときだけでなく、他者が熱刺激される様子を観察することでも活性化されたことから、この神経細胞が情動伝染ミラーニューロンとして機能することが推測された。さらに当該神経細胞からのシナプス活動を抑制することで集団効果が抑制され、逆に向上させることで拘束ストレスによる集団効果の抑制が解除された結果もミラーニューロンとしての役割を示唆している。R23E12-Tph 神経細胞の軸索は視覚情報を処理し、逃避行動を制御する中心体に投射していた。他者の回避行動を見ると、どのような経路を介して R23E12-Tph 神経細胞が活性化されるのか？R23E12-Tph 神経細胞の活性化が中心体の神経活動にどのような影響を与えるのか？を明らかにすることが今後の研究課題である。哺乳類の社会性に関与するオキシトシン、バソプレッシンと類似のペプチドと受容体はショウジョウバエにも発現しているが［6］、ショウジョウバエで社会性の行動は確認されていない。これらペプチド神経系とセロトニン神経系との相関が、情動伝染から社会性への進化の鍵を握っているのかもしれない。

謝　辞

本研究の遂行にあたり東京都医学総合研究所学習記憶プロジェクトの方々からの支援、助言に感謝します。

文　献

1） Preston SD, de Waal FB. Empathy: Its ultimate and proximate bases. Behav Brain Sci. 2002;25(1):1-20; discussion -71. Epub 2003/03/11. doi: 10.1017/s0140525x02000018. PubMed PMID: 12625087.

2） Walsh JJ, Christoffel DJ, Heifets BD, Ben-Dor GA, Selimbeyoglu A, Hung LW, et al. 5-HT release in nucleus accumbens rescues social deficits in mouse autism model. Nature. 2018;560(7720):589-94. Epub 2018/08/10. doi: 10.1038/s41586-018-0416-4. PubMed PMID: 30089910.

3） Miyashita T, Kikuchi E, Horiuchi J, Saitoe M. Long-Term Memory Engram Cells Are Established by c-Fos/CREB Transcriptional Cycling. Cell Rep. 2018;25(10):2716-28 e3. Epub 2018/12/06. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.022. PubMed PMID: 30517860.

4） de Waal FBM, Preston SD. Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. Nat Rev Neurosci. 2017;18(8):498-509. Epub 2017/06/29. doi: 10.1038/nrn.2017.72. PubMed PMID: 28655877.

5） Pooryasin A, Fiala A. Identified Serotonin-Releasing Neurons Induce Behavioral Quiescence and Suppress Mating in Drosophila. J Neurosci. 2015;35(37):12792-812. Epub 2015/09/18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1638-15.2015. PubMed PMID: 26377467; PubMed Central PMCID: PMCPMC6795202.

6) Stafflinger E, Hansen KK, Hauser F, Schneider M, Cazzamali G, Williamson M, et al. Cloning and identification of an oxytocin/vasopressin-like receptor and its ligand from insects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(9):3262-7. Epub 2008/03/05. doi: 10.1073/pnas.0710897105. PubMed PMID: 18316733; PubMed Central PMCID: PMCPMC2265169.