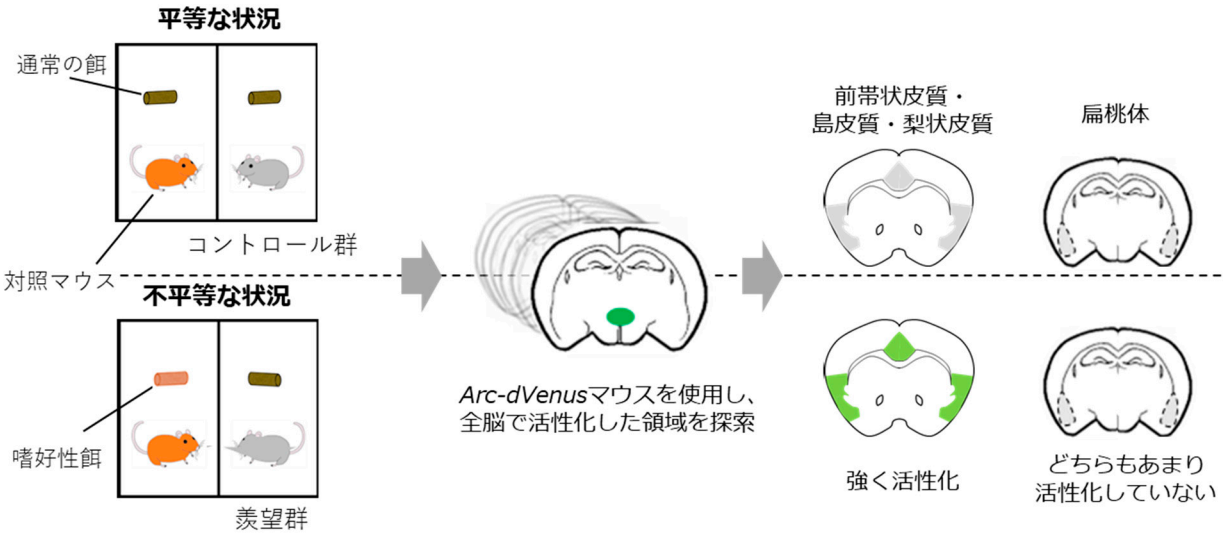
| 143　羨望様・不平等ストレスで活性化する脳領域の解明 | 渡邊　将 |
|---|---|

**【目的】**他者より不利な不平等な状況に曝露されると、羨望が惹起される。この感情はストレスのような個人的な問題であるだけでなく、いじめや自殺のような社会的問題の原因となりうる。そのため、この感情が発生し行動に影響するメカニズムを解明し、対策することは重要であるが、現状ではそのメカニズムは不明であった。その一因は、マウスのような実験動物で羨望を惹起するパラダイムが確立されておらず、詳細な検討ができなかったことにある。ところが最近、不平等な状況に曝露されたマウスがストレス反応を示すことが示唆された。そこで本研究では、活性化した神経細胞が緑色蛍光タンパク質でラベルされる遺伝子改変マウス（*Arc-dVenus* マウス）を用いて、不平等な状況に曝露されることで活性化する脳領域を明らかにすることにした。

**【方法】**本研究では、7〜12 週齢、雄の *Arc-dVenus* マウスを実験に供した。2 匹の *Arc-dVenus* マウスをペアで飼育した。さらに、中央で透明なアクリル板で仕切られ 2 部屋に分かれているアクリル製の箱を用意し、それぞれのマウスを隣接する部屋に入れた。その後、片方には通常の餌を、もう片方のマウスに通常の餌（コントロール群）ないしは嗜好性が高い餌を与えた（羨望群）。また、両方のマウスに通常の餌を与えたものを、コントロール群として用意した。当該の状況（不平等パラダイム）に曝露した 5〜6 時間後にマウスをかん流固定し、脳を摘出した。その後、大脳皮質を含む前脳領域（嗅球、小脳の領域は含まない）から冠状断の組織切片を作製し、そのすべての切片から、共焦点顕微鏡ないしはオールインワン蛍光顕微鏡で Venus 蛍光を観察した。

**【結果】**本研究では前脳のほぼすべての領域から切片を作製し、Venus による蛍光を指標に、羨望群で活性化する領域を探索した。その結果、羨望群ではストレス反応との関連が示唆されている前帯状皮質や島皮質、梨状皮質などの領域で、コントロール群と比べて多くの Venus 陽性細胞が観察され、強く活性化することが見出された。一方で、これらの領域と強い連絡を持ち、拘束ストレスや社会的敗北ストレスのような一般的なストレスパラダイムで活性化することが知られる扁桃体は、今回の不平等群で活性化が見られなかった。あわせて考えると、不平等状況下では、扁桃体以外の領域からの入力が原因で、ストレス反応が誘発されていることが示唆されつつある。今後は、不平等ストレス下で特異的に活性化する領域を明らかにすることで、他のストレス要因と区別して、純粋に不平等な状況に曝されることで活性化する領域を明らかにしたい。

本研究の概略



# 143. 羨望様・不平等ストレスで活性化する脳領域の解明

渡邊　将

岐阜大学 大学院医学系研究科 高次神経形態学分野

Key words：羨望，不平等，ストレス，神経回路

## 緒　言

「出る杭は打たれる」という諺がある。打たれる側は不幸であるが、打つ側にも抑えがたい感情がある。それは羨望である。この感情は厄介で、他者より不利な状況に曝露されると、本人は望んでいないのに他者の幸福に対して負の感情を抱いてしまう。これは大きなストレスである。ストレスは鬱病をはじめとする様々な疾患のリスク因子であり、人生の質を損なう。また、この感情は、社会的にはいじめや自殺のような問題の原因となりうる。これを解決するためには、社会的アプローチだけでなく、「羨望の原因となる神経回路を特定し、操作する」といった神経解剖学的なアプローチが有効である。

ところが羨望についての研究は非常に少なく、羨望のメカニズムやそれを制御する神経回路さえ、現状では不明である。これまでには、ヒトで核磁気共鳴法（fMRI）を用いた研究で、前帯状回が活性化することが報告されている［1］。しかし、fMRI は非侵襲的でヒトに用いることができる反面、空間的分解能が悪い。詳細に解析するためには、マウスやラットのような実験動物を用いた解析が必要と考えられたが、これまで、これらの実験動物が不平等な状況でどのような行動や反応を示すのかは十分な検討がなされず、検討に適した実験パラダイムにすら確立されてこなかった。ところが近年、マウスが自分よりも優遇されているマウスを見ることで、ストレスを感じることが示唆されつつあった［2］。

そこで本研究では、不平等な状況に曝露されることで活性化する神経回路を明らかにすることで、羨望のメカニズムの一端を明らかにしたいと考えた。渡辺のパラダイム［2］を参考にし（不平等パラダイム）、不平等な状況に曝露されることで活性化する神経回路を探索することにした。具体的に、活性化した神経細胞が蛍光タンパク質 Venus でラベルされるトランスジェニックマウス（*Arc-dVenus* マウス［3］）を不平等パラダイムに曝露し、組織学的手法で活性化部位を探索することにした。

## 方　法

### 1. *Arc-dVenus* マウス

本研究では、*Arc-dVenus* マウスを 8 時～20 時の明暗サイクルで飼育した。マウスの遺伝子型は PCR 法で決定し、雄のヘテロマウスを使用した。マウスは不平等パラダイムに曝露する 1 週間以上前から 2 匹ずつのケージに分けて飼育し、7～12 週齢で実験に供した。なお本研究は、岐阜大学動物実験委員会、組換え DNA 実験安全委員会の承認を得たうえで実施した（承認番号：2021-278、3 岐大研企第 3 号-3）。

### 2. 実験装置とスケジュール

本実験で用いた装置は、渡辺の研究［2］を参考にした。実験装置として、透明なアクリル製の 10×20×20 cm の箱を作製した。装置は真ん中で厚さ 5 mm のアクリル板で 2 つの部屋に仕切られていた。仕切りには 3 mm 間隔で直径 5 mm の穴が開いており、においや音が部屋間で伝わるようにした。不平等パラダイムへの曝露をするためのスケジュールは、4 日間のサイクルで行った。1～3 日目にはマウスを午後 1 時からそれぞれの実験装置

に 1 匹ずつ入れ、30 分間ずつ馴化させた。その 3 時間後に、ホームケージで嗜好性餌を与え、その味を覚えさせた。4 日目にはマウスを不平等パラダイムに曝露した。

### 3. 不平等パラダイム

渡辺が用いたパラダイム（大きな嗜好性餌、小さな嗜好性餌をそれぞれ与え、この 2 群を比較する）[2] をそのまま用いると、嗜好性餌を食べたことで報酬系が活性化してしまい、不平等と関係がない神経回路の活性化をモニターしてしまう可能性があった。そこで本研究ではこのパラダイムを改変した。具体的に、1〜3 日目で装置に馴化させた 2 匹のマウスをそれぞれ、装置の向かい合う部屋に入れた。コントロール群では、両方のマウスに通常の餌 （2.0〜3.0 g）を与えた（図 1a）。一方で、片方のマウスにより高脂質で嗜好性が高い餌（嗜好性餌：2.0〜3.0 g 、もう一方のマウスに通常の餌（2.0〜3.0 g）を与えた群も用意した（図 1b）。この条件で、嗜好性餌を得られなかった群を不平等群とした。これらの条件に 5〜6 時間曝露したのちにかん流固定し、組織学的実験に供した。

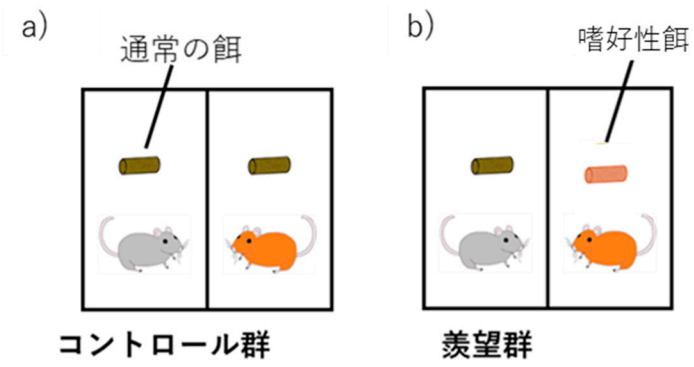



図 1. 不平等パラダイムの模式図
パラダイム中に、両方のマウスに通常の餌を与えたものをコントロール群 a）、片方のマウスにのみ嗜好性餌を与え、嗜好性餌を得られなかったマウスを羨望群 b）とした。

### 4. 組織サンプルの用意

不平等パラダイムに曝露されたマウスを麻酔下でかん流固定した。リン酸緩衝食塩水（PBS）で脱血したのちに、4%パラホルムアルデヒド溶液（4% PFA : PBS で希釈、pH 7.2）でかん流した。その後全脳を摘出し、4% PFA で翌日まで後固定し、翌日に外液を PBS に置換した。これらの全脳サンプルを、ブレインマトリックスを用いて冠状断方向に嗅球と小脳を切りおとしたのち、ビブラトーム（VT-1000、Leica 社）で薄切し、100 μ m 厚の冠状断の組織切片を作製した。これらのすべての切片を、封入材（Aqua-Poly/Mount、Polysciences 社）で封入し、観察した。

### 5. 組織サンプルの観察と解析

これらのサンプルは、封入から 2〜30 日の間にオールインワン顕微鏡（BZ-X800、キーエンス社）ないしは共焦点顕微鏡（LSM700、Leica 社）を用いて蛍光画像を得た。Venus 蛍光は、488 nm 波長のフィルターで検出した。切片全体の観察には 4 倍の対物レンズを用いてスクリーニングをしたのち、10 倍の対物レンズを使用して候補となる領域で詳細な観察を行った。前帯状皮質、島皮質、梨状皮質の蛍光画像は、ブレグマより 0.97 mm 吻側の領域を含む切片で撮影したもの、扁桃体外側基底核は、ブレグマより 1.31 mm 尾側の領域を含む切片で撮影したものを表示した。また、本稿で表示した蛍光画像は、100 μ m 厚の切片のうち、Z 軸方向に 30 μ m 分の画像を 3 μ m 幅でスタックして取得した。

## 結　果

### 1. 不平等群で梨状皮質、前帯状回、島皮質が強く活性化する傾向が見られた

本研究で用いた *Arc-dVenus* マウスは、最初期遺伝子である *Arc* のプロモーターの下流に、蛍光タンパク質 Venus をコードする遺伝子と分解促進配列を組み込んだトランスジェニックマウスである［3］。そのため、このマウスの Venus タンパク質の発現は *Arc* の性質に依存し、主に大脳皮質や辺縁系、基底核でみられる。そのため本研究でも、まずは前脳側の領域に注目して、不平等パラダイムで活性化する領域を探索することにした。不平等群では、梨状皮質、前頭前野、島皮質のような領域で、非常に多くの Venus 陽性細胞がみられた（図 2a～d）。コントロール群でも Venus 陽性細胞はみられたが、細胞数が少ない傾向がある。梨状皮質は主に匂い情報を処理するといわれており［4］、おそらくは嗜好性餌の匂いを嗅ぐことで活性化したものと考えられた。一方で、前頭前野や島皮質はストレスに関連する領域といわれており、実際に拘束ストレスや社会的敗北ストレスのようなストレスパラダイムでも活性化する［5，6］。そのため、不平等群が受けたストレスに対する反応を神経解剖学的なレベルで検出したものと考えられた。

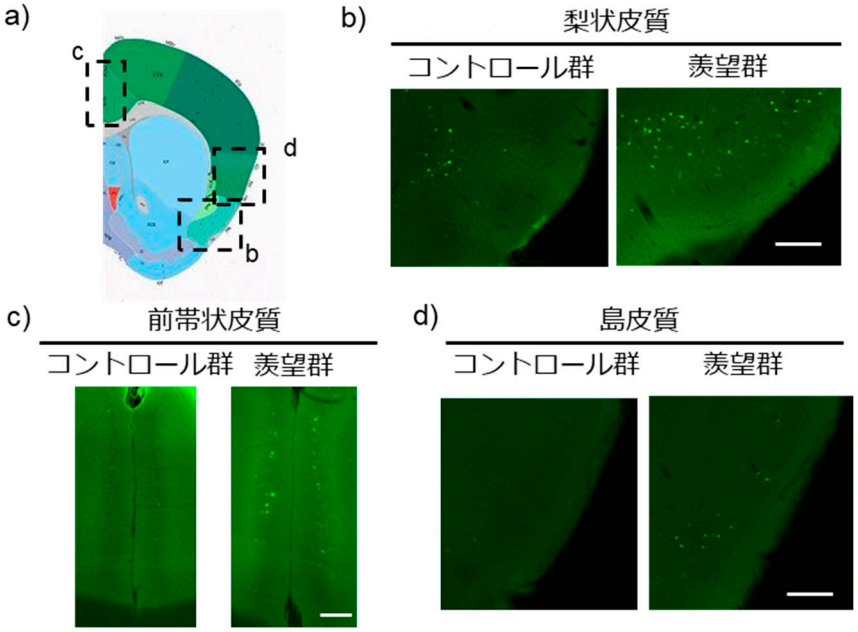



図 2. 不平等群で梨状皮質、前帯状皮質、島皮質が強く活性化する傾向があった

a） ブレグマから 0.97 mm 吻側の冠状断切片の模式図（右脳のみ）。Allen Brain Atlas より引用したものを改変した。

b～d） a）の黒破線で囲った領域での代表的な蛍光像である。b）梨状皮質、c）前帯状皮質、d）島皮質にあたる。スケールバーはいずれも、200 μm である。

### 2. 不平等群でも、扁桃体外側基底核は活性化していなかった

一方で、拘束ストレスや社会的敗北ストレスでは、扁桃体が活性化し、不安様行動や抑うつ症状を誘導する［7］。扁桃体はアーモンド状の形状をした、大脳皮質に覆われた領域であり、不安・恐怖のような情動を通じてストレス反応を引き起こす。そこで我々は、扁桃体が不平等な状況で活性化することで、ストレス反応を制御している可能性があるのではないかと考えた。扁桃体の亜核の中でも外側基底核は扁桃体からの出力を担っており、島皮質や前頭前野へ出力する。そこで外側基底核で Venus 陽性な細胞を観察した。すると、コントロール群と不平等群のいずれでも、外側基底核でほとんど Venus 陽性細胞はみられなかった（外側基底核の領域を分かりやすくするために、隣接する外側核も示してある）（図 3）。

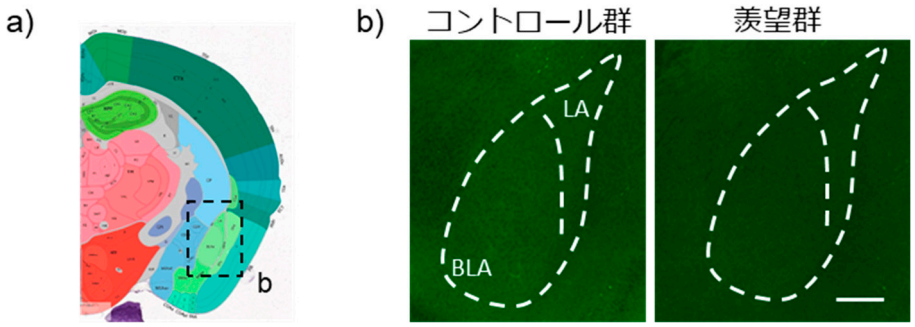



図 3. 不平等群でも、扁桃体外側核・外側基底核は活性化していなかった

a) ブレグマから 1.31 mm 尾側の冠状断切片の模式図（Allen Brain Atlas）。

b) 黒破線で囲った領域の代表的な蛍光イメージ像。外側基底核（BLA）と外側核（LA）を白破線で囲った。スケールバーは 200 μm である。

## 考　察

本研究では、不平等な状況に曝露されることで前帯状皮質や島皮質が活性化することを見出した。これらの領域は拘束ストレスや社会的敗北ストレスで活性化することが知られている［4］。そして渡辺の研究で不平等な状況に曝露されたマウスがストレス反応の一種である体温上昇を示した［2］こともあわせて考えると、不平等に曝露されたマウスがストレスを感じており、今回の研究ではそれを神経細胞レベルで観察できた可能性が高い。これまで、マウスにとって不平等な状況がストレスであるというエビデンスは、体温上昇でしか観察されていなかった。本研究の結果は、これを神経解剖学的な面からサポートしうる点で、一定の意義を持つ。一方で、本期間の殆どを探索的な研究に費やしてしまったため、定量的な解析は現在進行中である。今後、活性化した神経細胞数を定量化・比較し、より正確に不平等パラダイムで活性化した領域を明らかにしていく。

また、前帯状皮質や島皮質が、どの領域からの入力を受けることで活性化したのかは、現状では明らかにできていない。扁桃体の活性化は多くのストレスパラダイムで活性化が見られており、前帯状皮質や島皮質は扁桃体からの強い入力を受ける。しかし、不平等群では扁桃体外側基底核の活性化は見られておらず、他の領域からの入力で島皮質のようなストレス関連領域が活性化していることが示唆された。主観的な意見で恐縮だが、たしかに横で別のマウスが嗜好性餌を食べているという状況が恐怖や不安を誘発するとは考えにくい。では、どの領域からの入力が原因で、ストレスに関連した領域が活性化しているのだろうか？これを明らかにすることは、その他のストレスと区別して、不平等がストレスを誘導するメカニズムを解明するうえで極めて重要である。今後は、ニューロトレーサーやウイルスを用いて、あらためて詳細に神経回路のつながりを検討する必要がある。さらに、これらの領域は、ストレス反応の中枢である視床下部など、多くの領域と連絡している。残念ながら、*Arc-dVenus* マウスでは間脳を含む脳幹の多くの領域で、神経細胞がラベルされづらい。そのため、*c-Fos* のような、*Arc* 以外の最初期遺伝子の活性化を指標にした組織学的解析も行い、多角的に検討する予定である。

## 共同研究者・謝辞

本研究は岐阜大学大学院医学系研究科高次神経形態学分野にて行いました。*Arc-dVenus* マウスをご提供いただいた山口瞬先生と、BZ-X810 を貸与いただいたキーエンス社に、この場をお借りして御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団様より助成賜りましたことを、改めて感謝申し上げます。

## 文　献


1) Takahashi H, Kato M, Matsuura M, Mobbs D, Suhara T, Okubo Y. When your gain is my pain and your pain is my gain: neural correlates of envy and schadenfreude. Science. 2009;323(5916):937-939. PMID: 19213918 DOI: 10.1126/science.1165604

2) Watanabe S. Infrared thermography for non-invasive measurement of social inequality aversion in rodents and potential usefulness for future animal-friendly studies. Front Behav Neurosci. 2023 Mar 6;17:1131427. Front Behav Neurosci. 2023 Mar 31;17:1192617. PMID: 36950066 DOI: 10.3389/fnbeh.2023.1131427.

3) Eguchi M, Yamaguchi S. In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain. Neuroimage. 2009;44(4):1274-1283. PMID: 19059347 DOI: 10.1016/j.neuroimage.2008.10.046

4) Blazing RM, Franks KM. Odor coding in piriform cortex: mechanistic insights into distributed coding. Curr Opin Neurobiol. 2020 Oct;64:96-102. PMID: 32422571. DOI: 10.1016/j.conb.2020.03.001. Epub 2020 May 15.

5) Park S, Cho J, Huh Y. Role of the anterior insular cortex in restraint-stress induced fear behaviors. Sci Rep. 2022 Apr 20;12(1):6504. PMID: 35444205. DOI: 10.1038/s41598-022-10345-2.

6) Becker LJ, Fillinger C, Waegaert R, Journée SH, Hener P, Ayazgok B, Humo M, Karatas M, Thouaye M, Gaikwad M, Degiorgis L, Santin MDN, Mondino M, Barrot M, Ibrahim EC, Turecki G, Belzeaux R, Veinante P, Harsan LA, Hugel S, Lutz PE, Yalcin I. The basolateral amygdala-anterior cingulate pathway contributes to depression-like behaviors and comorbidity with chronic pain behaviors in male mice. Nat Commun. 2023 Apr 17;14(1):2198. PMID: 37069164. DOI: 10.1038/s41467-023-37878-y.

7) Zhang WH, Zhang JY, Holmes A, Pan BX. Amygdala Circuit Substrates for Stress Adaptation and Adversity. Biol Psychiatry. 2021 May 1;89(9):847-856.. PMID: 33691931. DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.12.026