

令和元年5月24日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01842

研究課題名(和文) 不安・恐怖に関与する神経ペプチドの作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of neuropeptides involved in fear memory

研究代表者

岩瀬 克郎 (Iwase, Katsuro)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80322030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経ペプチド前駆体・セクレトグラニン 遺伝子(Scg2)の欠損マウス(Scg2 KO)を用いて、電気刺激と音刺激を組み合わせた恐怖条件付け学習を行った。海馬依存のとされる文脈的想起において、Scg2 KOマウスはすくみ反応の抑制傾向を示した。電気刺激に対する感受性には遺伝子型による差異は認められず、すくみ反応の抑制は刺激への感受性の鈍化によるものではないと考えられた。また鶏胚漿尿膜法において、Scg2由来神経ペプチド・セクレトニューリンは血管新生亢進作用を示し、血管内皮増殖因子(VEGF)との生理活性の類似性がさらに確かめられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不安・恐怖は、危険を察知し安全を確保する上で重要なものであり、その制御機構の解明は、社会的要請も強い重要な研究課題である。Scg2遺伝子の欠損が恐怖記憶によるすくみ反応の抑制を引き起こすことから、Scg2由来ペプチドの作用の抑制は、不安障害の症状改善につながることを期待される。またScg2由来ペプチド・セクレトニューリンとVEGFの間でみられる多様な生理活性の類似性は、セクレトニューリンの作用を理解する上で重要な特徴である。

研究成果の概要(英文)：Using the secretogranin II gene (Scg2) deficient mice (Scg2 KO), we performed fear conditioning combining footshock (unconditional stimulus) and tone (conditional stimulus), and examined the freezing response. It was found that the Scg2 KO mice tended to suppress the freezing response during the hippocampus-dependent context test. On the other hand, there was no difference between genotypes in sensitivity to electrical stimulation, it was considered that suppression of freezing response was not due to a decrease in sensitivity to stimulation. Moreover, in the chicken embryo chorioallantoic membrane assay, the Scg2-derived neuropeptide secretoneurin exhibited an angiogenesis promoting activity, and the physiological analogy with vascular endothelial growth factor (VEGF) was further confirmed.

研究分野：神経生物学

キーワード：記憶・学習 恐怖条件付け 神経ペプチド 光環境 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不安・恐怖という感情や、それを伴う記憶は、危険を察知し安全を確保する上で重要なものである。しかしながら適正な制御ができなくなると、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 等の不安障害を発症し、正常な社会生活を営むことが困難となる場合も多い。不安・恐怖の制御機構の解明は、社会的要請も強い重要な研究課題となっている。

神経ペプチド前駆体タンパク質のセクレトグラニン 遺伝子 (Scg2) は、グルタミン酸とドーパミンによって協調的に誘導され、同時期的な入力をよく反映している[1]。このような異なった神経伝達物質の同期的な入力は、恐怖記憶をはじめとする連合記憶の形成において基礎的事象であると考えられることから、同遺伝子が恐怖記憶に関与しており、その遺伝子欠損 (Scg2 KO) マウスは、不安・恐怖の制御機構の解明、並びに不安障害治療法の研究・開発を行なう上で良いモデルマウスとなることが期待された。加えて、Scg2 の発現は概日リズム形成の中核である視交叉上核で非常に高く、光応答性やリズム制御にも関与していることが予想されている。光環境異常や概日リズムの変調によって引き起こされる気分障害や不安障害において、Scg2 が果たしている役割にも関心が持たれた。

2. 研究の目的

Scg2 は脳や神経内分泌系組織でよく発現しており、これまでにセクレトニューリン、EM-66、マンセリンの3種類のペプチドが Scg2 由来生理活性ペプチドとして報告されている。ホルモン分泌の制御や神経突起伸張、神経伝達物質の分泌制御、神経細胞保護、血管新生など多様な役割が報告されているが[2]、記憶等の高次神経機能への関与についてはほとんど明らかになっていない。Scg2 遺伝子欠損マウスを用いて、遺伝子欠損が恐怖記憶や恐怖反応に与える影響について検証し、Scg2 由来神経ペプチドによる不安・恐怖制御機構を解明することが、本研究の目的である。また、その作用機序について明らかにすることで、同ペプチドの作用を標的とした、新たな不安障害治療法の確立を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 恐怖条件付け学習試験

12 時間明・12 時間暗の周期で飼育したマウスを用い、恐怖条件付け学習試験を行った(図1)。恐怖条件付けは、マウスを刺激用チャンバーに入れて3分間おいた後、条件刺激として30秒間の音刺激 (1,000~2,000 Hz, 80~90 dB) を与え、その最後の2秒間に、非条件刺激として電気刺激 (0.75mA) を組み合わせた。最初の刺激を CS1 とし、同様の刺激を 60 秒後 (CS2)、さらに 120 秒後 (CS3) と、異なった間隔を開けて計3回与えた。

恐怖条件付けの約 24 時間後に、文脈的想起試験として、刺激用チャンバーに入れて5分間おき、その間のすくみ反応を計測した。次いで、音刺激をきっかけとした想起試験として、別環境チャンバーにマウスを入れて3分間おいた後、音刺激を3分間与え、それぞれの間のすくみ反応を計測した。

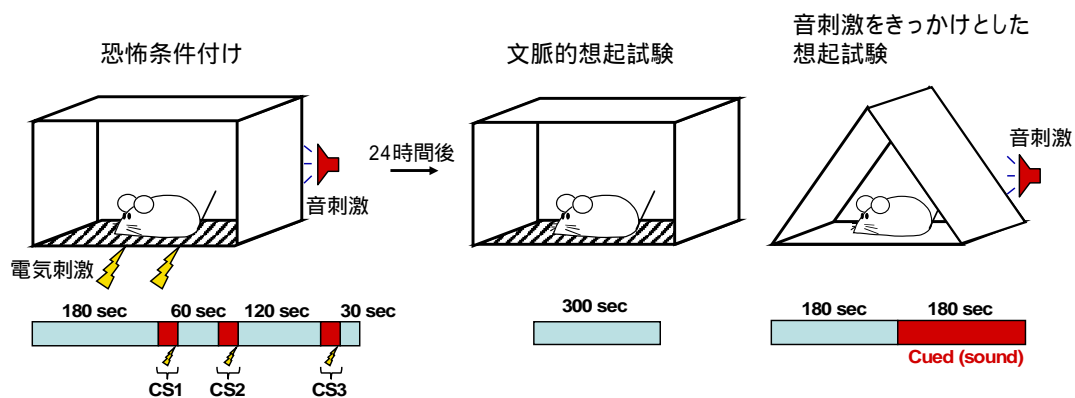


図1 恐怖条件付け学習試験

(2) 電気刺激に対する感受性の確認

電気刺激に対する感受性を確かめるため、マウスを刺激用チャンバーに入れて1秒間の電気刺激を与え、move、run、jump、vocalizeの各反応が誘発される様子を観察した。電気刺激は、0.1mAから、0.1mA刻みで最大で0.6mAまで上げていき、move、run、jump、vocalizeの各反応が誘発された最小の電気刺激の強さを比較した。

(3) 鶏胚漿尿膜法による血管新生活性の解析

鶏有精卵を転卵機で保温し、3日目の受精卵の気室側の殻を直径1cmほど開け、ステンレスキャップを被せ、38.0の孵卵器に入れた。11日目に、コラーゲンスポンジに50ng血管内皮増殖因子 (VEGF) もしくは10µgセクレトニューリンに相当するペプチド溶液を染み込ませ、胚漿尿膜に設置した。42~46時間後、20%脂肪乳濁輸液を漿尿膜内に注入して血管網を明視化

し、スポンジ設置場所付近の血管形成の様子を実体顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) Scg2 遺伝子欠損が恐怖条件付け学習試験に及ぼす影響

通常条件による恐怖条件付け学習試験

まず一般的な明期（休眠期）のマウスを用いての恐怖条件付け学習試験を行い、遺伝子型による身体のすくみ反応の差異について検証した。個体ごとのバラつきが大きく、明確な差は認められなかったが、Scg2 KO において、すくみ反応は全体的に抑えられ気味にあるように思われた（図2）。特に海馬依存のとされる文脈的想起において、Scg2 KO マウスですくみ反応の抑制傾向が認められた（ $p=0.07$, student's t-test）。一方で音刺激を手掛かりとした想起においては、抑制傾向があるとは言えず（ $p=0.17$, student's t-test）Scg2 由来ペプチドは、恐怖記憶の形成あるいは想起において、海馬依存の反応に関与している可能性が示された。

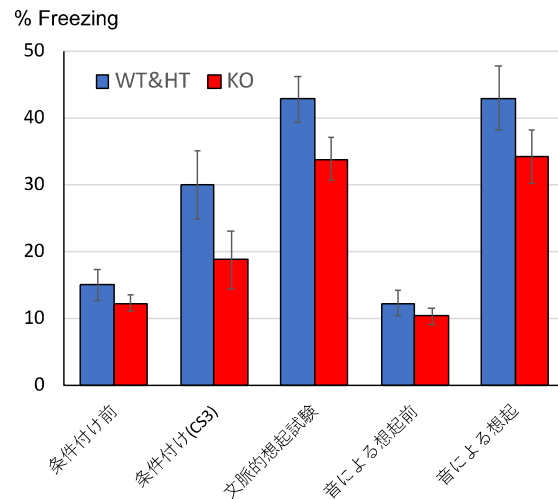


図2 恐怖条件付け学習によるすくみ反応

電気刺激への反応性の検証

Scg2 KO マウスにおけるすくみ反応の抑制傾向に、電気刺激に対する感受性の変化が影響している可能性について検証するため、move、run、vocalize、jumpの各反応を誘発する電気刺激の強さを比較検討した。どの反応も、遺伝子型による差異は認められなかった（図3）。したがってすくみ反応の抑制傾向の原因は、感受性の鈍化によるものではないと考えられた。

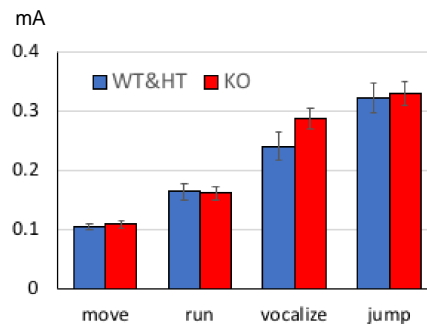


図3 電気刺激に対する感受性

暗期マウスによる恐怖条件付け学習試験

Scg2 は、概日リズム制御の中核である視交叉上核で特に発現が高く、光環境への応答や概日リズム制御への関与も示唆されている。Scg2 によるリズム制御と、記憶・学習への影響の関連を明らかにするため、暗期（活動期）のマウスを用い、恐怖条件付け学習試験を行った。光環境の条件を飼育のリズム条件に合わせるため、条件付けや想起試験は暗所条件下で行ったが、この条件下では遺伝子型による差異は認められなかった。Scg2 由来ペプチドによる恐怖記憶の制御にはリズム性があり、明期で作用が強い可能性がある。しかしながら、暗所条件下での恐怖条件付け学習試験は通常に比べてすくみ反応が弱く出る傾向があり、抑制方向の差異は現れ難いことが考えられる。実際、明期（休眠期）のマウスを用いて暗所条件下での恐怖条件付け学習試験を行った場合でも、すくみ反応は弱く出る傾向があり、遺伝子型による差異は認められなかった。日周活動リズムと記憶・学習との関連や、光環境異常によって引き起こされる気分障害や不安障害に Scg2 が関与している可能性については、さらなる検討が必要である。

(2) 受容体の検索

Scg2 は前駆体タンパク質であり、切断されて神経ペプチドとして作用する。Scg2 の作用機序を明らかにする上で、Scg2 由来神経ペプチド受容体の性状の解析は不可欠であるが、受容体遺伝子は未だ同定されていない。脳組織から抽出した mRNA より cDNA 発現ライブラリーを作製し、COS7 細胞等に導入してタンパク質を発現させ、ペプチドの結合を指標として受容体候補遺伝子の検索を試みたが、有力な候補は得られなかった。また別のアプローチ法として、Scg2 由来ペプチドの1つであるセクレトニューリンは GPCR であると推察されていることから [3]、Allen Brain Atlas 等の遺伝子発現データベースを活用して受容体候補となりうる GPCR 遺伝子を選別し、受容体として機能しうるか検討したが、こちらも有力な候補は得られなかった。

セクレトニューリンは HUVEC などの血管内皮系細胞にも作用するので、血管内皮系細胞由来の cDNA 発現ライブラリーを作製して検索をやり直す等を、計画している。

(3) 鶏胚漿尿膜法によるセクレトニューリンの血管新生亢進作用の確認

VEGF は血管内皮細胞に作用し、血管新生を強く亢進する増殖因子であるが、神経栄養因子として海馬等の神経細胞に作用し、神経可塑性や神経細胞の保護に関わることが知られている [4]。一方で Scg2 由来神経ペプチド・セクレトニューリンも、神経細胞への作用の他、血管新生の亢

進作用を示すことが明らかになっており[5]、両者が示す多様な生理活性の類似性は、セクレトニューリンの作用を理解する上で重要な特徴である。鶏胚漿尿膜法は、in vivo に近い環境の血管新生を比較的簡便に観察できる優れた手法であり、VEGF による鶏胚漿尿膜上の血管新生促進作用が知られている。今回、セクレトニューリンの血管新生促進効果も同様に認められるか検証したところ、鶏胚漿尿膜法においても、VEGF と類似した血管新生促進作用が確かめられた(図4)。



図4 セクレトニューリンによる鶏胚漿尿膜の血管新生促進

<引用文献>

- [1] Iwase, K. et al., J. Neurochem., 128 (2014) 233-245
- [2] Troger, J. et al., Prog. Neurobiol., 154 (2017) 37-61
- [3] Gasser, M. C. et al., J. Neurochem., 85 (2003) 662-669
- [4] Nowacka, M. M. and Obuchowicz, E., Neuropeptides, 46 (2012) 1-10
- [5] Egger, M. et al., Circulation, 109 (2004) 777-783

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Akiko Taira, Emiko Arita, Eriko Matsumoto, Ayano Oohira, Katsuro Iwase, Takaki Hiwasa, Koutaro Yokote, Shigenobu Shibata & Masaki Takiguchi. Systemic oscillator-driven and nutrient-responsive hormonal regulation of daily expression rhythms for gluconeogenic enzyme genes in the mouse liver. Chronobiology International, 査読有, Vol 36, No.5, (2019) pp.591-615

〔学会発表〕(計4件)

- 芦野 洋美、岩瀬 克郎、瀧口 正樹「血管新生においてCK2によりもたらされるMMP13の調節」第91回日本生化学会大会、2018
- 芦野 洋美、岩瀬 克郎、小野 富男、瀧口 正樹「カゼインキナーゼ2の阻害がもたらす血管新生抑制の解析」2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017
- 芦野 洋美、岩瀬 克郎、小野 富男、瀧口 正樹「CK2阻害物質による血管新生促進ケモカインCXCL1作用の抑制」第89回日本生化学会大会、2016
- 芦野 洋美、岩瀬 克郎、瀧口 正樹「血管新生およびNF- κ B活性化を抑制するCK2阻害剤の血管内皮細胞透過性への作用」第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会、2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/seika1/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：芦野 洋美

ローマ字氏名：(ASHINO hiromi)

研究協力者氏名：有田 恵美子

ローマ字氏名：(ARITA emiko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。