

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21299

研究課題名(和文) 視床下部新規領域デルタエリアー辺縁系神経回路による情動調節機構の解明

研究課題名(英文) Functions of the neural pathway between a new hypothalamic area and lateral septum in the mouse brain

研究代表者

堀井 謹子 (Horii, Noriko)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80433332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々がマウスの視床下部に発見した新規領域PeFAH(旧デルタエリア)の機能を明らかにするために、これらニューロンの活動を薬理遺伝学的手法により操作し、行動やストレスホルモンへの影響を調べた。PeFAHニューロンの活性化は、ホームケージの床や床敷きを匂う行動に加え、前足や鼻先で床敷きを動かす行動を誘発した。これらマウスのストレスホルモンレベルや新規環境における不安レベルに差は認められなかったが、新奇物体に対するリスクアセスメントが有意に上昇していた。ホームケージで観察された行動の意義は未だ不明であるが、PeFAHは新奇物体の潜在的危険性をはかる防御行動に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： This study aimed to clarify functions of the perifornical area of the anterior hypothalamus (PeFAH), a new hypothalamic area that we recently identified in the mouse brain. Activation of PeFAH neurons by pharmacogenetic technology induced the behaviors of sniffing a floor and bedding materials and replacing them by treading-like movement in individual home cages. Although anxiety and stress hormone levels in PeFAH-activated mice were comparable to those of control mice, risk assessment of a novel object was significantly increased and time spending for burying the object was longer compared with control mice when bedding materials existed. Although ethological significance of the behaviors observed in home cages has not been fully understood, PeFAH neurons may be involved in regulation of risk assessment of potentially dangerous objects for self-protection.

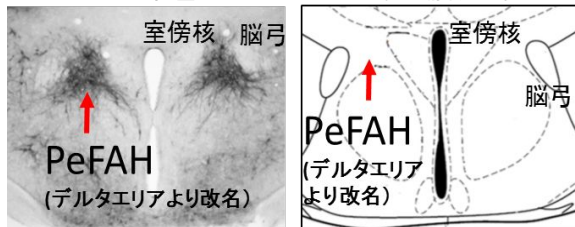
研究分野：神経科学

キーワード：視床下部 防御行動 ウロコルチン エンケファリン 物体 リスクアセスメント burying 外側中隔

1. 研究開始当初の背景

視床下部は、本能行動やストレス応答を制御する脳部位である。申請者は、可塑性制御に關与する特殊な細胞外マトリクス構造であるペリニューロナルネットの局在を、マウスの視床下部を対象として調べていた際、現在のマウス脳アトラスには記載されていない領域に、ペリニューロナルネットに覆われたニューロンの集団が存在することを発見した。その領域は、視床下部室傍核と脳弓の狭間に位置する三角形の領域に相当し、申請者らは、本研究課題申請当初、その領域を仮称「デルタエリア」と呼んでいたが、申請者が2015年に発表した論文により (Horii-Hayashi et al., EJM 2015) 本領域を **Perifornical area of the anterior hypothalamus (PeFAH)** と命名した (下図)。以下、本領域を PeFAH と呼ぶ。

視床下部新規領域PeFAH
(Perifornical area of the anterior hypothalamus)
WFA 染色 マウス脳アトラス



これまでの研究成果により、PeFAH には神経ペプチドである Urocortin 3(Ucn3)と Enkephalin(Enk)を共発現するニューロン群が存在すること、また、これらニューロンは GABA 陰性であることが明らかになっていた。更に、これら Ucn3/Enk ニューロンは、辺縁系に属する外側中隔へ強く投射し、外側中隔からも抑制性の入力を受けることがわかってきた。また、PeFAH ニューロンは、絶食や絶水等のメタボリックストレスには応答しないことも c-Fos 発現を指標とした解析により示されていた。

過去に、Ucn3 神経ペプチドの脳室内投与はストレス性の不安様行動の緩和や摂食抑制に働くこと (Kuperman, et al., 2010, PNAS) また、Enk 遺伝子である *Penk 1* ノックアウトマウスは、強度のストレスに対して脆弱であり PTSD に陥りやすいが (Kung et al., 2010, J Biomed Sci) マイルドストレスには抵抗性を示すこと (Drews et al., 2014, Genes Brain Behav) さらに近年、外側中隔に存在する Ucn3 受容体、CRHR2 をターゲットとした光遺伝学実験により、外側中隔 CRHR2 陽性ニューロンは、ストレス誘発性の不安に關与することが示されている (Anthony et al., Cell 2014)。これらのことから申請者は、「PeFAH-外側中隔神経回路がストレスによる不安情動生成に關与するのではないか?」という仮説を立て、本神経回路の機能を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PeFAH-外側中隔神経回路の機能を、不安情動、ストレス応答、行動制御の観点から解明することである。

3. 研究の方法

(1)動物:野生型マウスとして C57BL6/N、遺伝子改変マウスとして *Ucn3-cre* マウス (Tg(Ucn3-cre)KF43Gsat, MMRRC より購入) を使用した。マウスは 12 時間の明暗サイクル下で、自由給餌・給水で飼育した。解析には 10-22 週齢の雄マウスを使用した。

(2) *Ucn3*, *Penk1* mRNA の real time PCR 解析:30 分間の拘束ストレスを負荷したマウスまたは負荷していないコントロールマウスより脳切片を作成し、20G 注射針を用いて PeFAH を含む組織サンプルをパンチアウトした。組織より RNA を抽出後、cDNA を調整し、TaqMan プローブを用いて、*Ucn3* と *Penk1*, *gapdh* の mRNA 量をリアルタイム PCR によって測定した。ストレス負荷群、非負荷群における mRNA の発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法によって比較した。

(3)薬理遺伝学用 *Ucn3-hM3Dq* マウスの準備:*Ucn3-Cre* マウスの PeFAH に活性型 DREADD ベクターである AAV-hSyn-FLEX-M3Dq-mCherry をインジェクションした。手術から 4 週間後、これらマウスを行動試験に使用した。

(4)行動試験:すべての試験は明期の午前 10 時から 14 時の間に行った。Saline または Clozapine N-Oxide (CNO: 4 mg/kg) は、試験の 15 分前に投与した。Marble burying 試験以外の試験は全て録画し、行動解析ソフト TopScan Lite (CleverSys Inc.) を用いて解析した。

ホームケージ撮影:ホームケージ撮影システム (小原医科産業) を用いて上方、側方から 10 分間ケージを撮影した。総運動量、チップを動かす時間を計測した。

明暗箱試験:明暗箱試験装置 (20 × 20 × 25 cm) と自動解析システム (小原医科産業) を用いた。試験時間は 15 分とし、明箱 600 lux、暗箱 5 lux に設定した。明箱滞在時間、総運動量を測定した。

オープンフィールド試験:マウスをオープンフィールド (40 × 40 × 45 cm) 内に入れ、10 分間、自由に探索させた。フィールドを 9 分割した中央のエリアをセンターとし、センターへの侵入回数、滞在時間と総運動量を測定した。

新奇物体試験:オープンフィールド試験後、アリーナ中央に直径 4 cm、高さ 5 cm の家形のオモチャを置き、そこへマウスを 10 分間入れた。オブジェクトへの sniffing 回数と時間、総運動量を測定した。新奇物体 burying 試験:床敷きを約 4 cm 入れた新しいケージ (テストケージ) にマウス 10 分間入れた。一旦マウスを取り

出し、同ケージの一角に新奇オブジェクト(直径 4cm プラスチックボール)を置き、マウスを 10 分間入れた。オブジェクトへの sniffing 回数と時間、総運動距離、burying time を測定した。

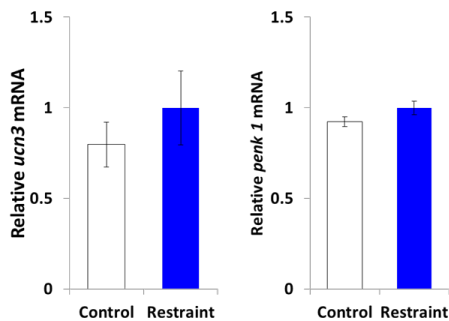
Marble burying 試験：約 4cm の床敷きを入れたケージに 24 個のガラス玉を均等に並べ、そこへマウスを 30 分間入れ、埋めたビー玉の個数を数えた。

コルチコステロン測定：Ucn3-M3Dq マウスに CNO(4mg/kg)を腹腔内投与した 30 分後に、断頭により血液を回収した。血漿を調整し、ELISA キット(矢内原研究所)でコルチコステロン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 拘束ストレスが *Ucn3*, *Penk1* の mRNA 発現に与える影響：30 分間の拘束ストレス負荷後、PeFAH における *Ucn3*, *Penk1* の発現変化を調べたが、コントロール群と拘束ストレス負荷群に有意差は認められなかった。

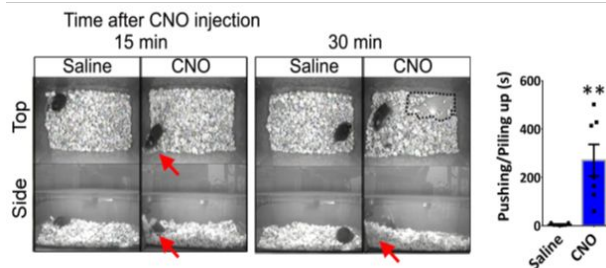
30分間の拘束ストレス後の *Ucn3*, *Penk1* mRNA 変化



(2) 薬理遺伝学による *Ucn3/Enk* ニューロンの活性化がもたらす行動ならびにストレスホルモンへの影響

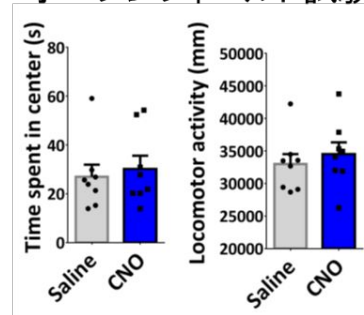
ホームケージ内行動：CNO 投与後約 15 分頃より、ホームケージ内の床や床敷きを sniffing し、激しく掘り返しながらケージのコーナーへ集める行動 (Replacing/piling up) が見られた。

ホームケージ内行動



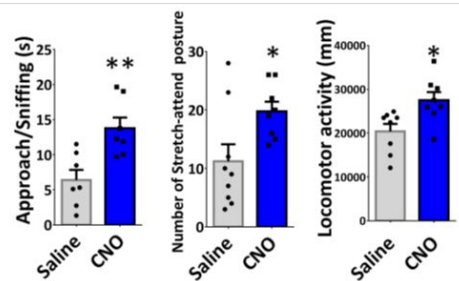
不安様行動：明暗箱試験、オープンフィールド試験を行ったが、両試験共に、saline 群と CNO 投与群に有意差は認められなかった。

オープンフィールド試験



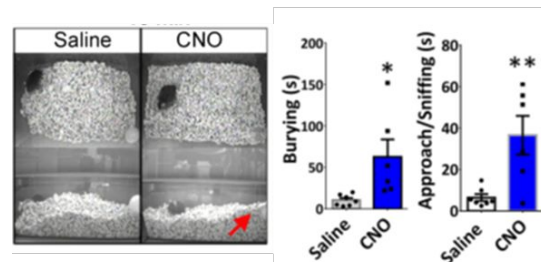
新奇物体試験：CNO 投与により、新奇物体に対する探索時間 (approach/sniffing)、stretch-attend posture の回数 (リスクアセスメント行動の指標)、総運動量が有意に増加した。

新奇物体試験



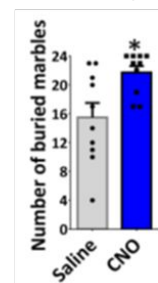
新奇物体 burying 試験：CNO 投与により、新奇物体を埋める (burying) 時間、探索時間 (approach/sniffing) が有意に上昇した。

新奇物体 burying 試験



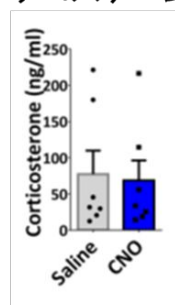
Marble burying 試験：CNO 投与により、埋めたビー玉の数が有意に増加した。

Marble burying 試験



コルチコステロン濃度：CNO 投与による血中コルチコステロン濃度の変化は認められなかった。

コルチコステロンレベル



以上の結果から、PeFAH Ucn3/Enk ニューロンは、研究開始当初の仮説のようにストレス応答や不安の制御に関与するのではなく、新奇物体に対するリスクアセスメント行動や burying 行動を制御する部位であることが示唆された。物体に積極的に近づくリスクアセスメントや burying 行動は、積極的な防御行動の一種と考えられている。防御行動の中でも、攻撃を制御する神経回路については多くの研究がなされており、神経回路学的な理解が進んでいるが、物体に対する防御行動制御メカニズムについてはほとんど報告が無く、本研究で得られた成果は新規性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計7件)

1. Sasagawa T, Horii-Hayashi N, Okuda A, Hashimoto T, Azuma C, Nishi M.
Long-term effects of maternal separation coupled with social isolation on reward seeking and changes in dopamine D1 receptor expression in the nucleus accumbens via DNA methylation in mice. *Neurosci Lett*. 2017, 641:33-39. doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.025. 査読有
2. Nishikawa K, Furube E, Morita S, Horii-Hayashi N, Nishi M, Miyata S.
Structural reconstruction of the perivascular space in the adult mouse neurohypophysis during an osmotic

simulation. *J Neuroendocrinol*. 2017

Feb;29(2). doi: 10.1111/jne.12456. 査読有

3. Okuda A, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Shimizu T, Shigematsu H, Iwata E, Morimoto Y, Masuda K, Koizumi M, Akahane M, Nishi M, Tanaka Y.
Bone marrow stromal cell sheets may promote axonal regeneration and functional recovery with suppression of glial scar formation after spinal cord transection injury in rats. *J Neurosurg Spine*. 2017, 26:388-395. doi: 10.3171/2016.8.SPINE16250. Epub 2016 Nov 25. 査読有
4. Ishiwari F, Hasebe H, Matsumura S, Hajjaj F, Horii-Hayashi N, Nishi M, Someya T, Fukushima T.
Bioinspired design of a polymer gel sensor for the realization of extracellular Ca(2+) imaging. *Sci Rep*. 12;6:24275. doi: 10.1038/srep24275. (2016), 査読有
5. Nishi M, Sasagawa T, Horii-Hayashi N.
Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2017;149:72-75. doi: 10.1254/fpj.149.72. 査読無
6. Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Nishi M.
Insights from extracellular matrix studies in the hypothalamus: structural variations of perineuronal nets and discovering a new perifornical area of the anterior hypothalamus. *Anat. Sci. Int.* (2016). 92:18-24. 査読有
7. 堀井 瞳子, 笹川 誉世、西 真弓
マウス脳に新たに同定した前視床下部脳弓周囲野 PeFAH と情動神経回路の関わり *Bio Clinica* 31 巻 76-81(2016)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Okuda A, **Horii-Hayashi N**, Shigematsu H, Iwata E, Shimizu T, Morimoto Y, masuda K, Akahane M, Nishi M, Tanaka Y. Axonal regeneration and hindlimb-functional recovery by transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cell sheet after completely transected spinal cord injury in rats. Annual meeting of orthopedic research society, in USA (2016)
2. **堀井 謹子**、笹川 誉世、並河 知宏、西 真弓 ペリニューロナルネット研究から見てきた臨界期の時空間パターンと視床下部細胞外マトリクスの多様性 第57回 日本組織細胞化学会総会・学術集会 2016年9月3-4日 杏林大学
3. Mayumi Nishi, Takayo Sasagawa, **No riko Horii-Hayashi**. Effects of early life stress on the brain. 第89回日本薬理学会年会 シンポジウム「幼少期ストレス負荷によるストレス脆弱性の形成と情動・高次機能障害」横浜、2016年3月9-11日
4. **堀井 謹子**、笹川 誉世、西 真弓 視床下部新規領域PeFAHの機能 第122回 日本解剖学会総会・全国学術総会 2017年3月28 - 30日 長崎大学
5. **Noriko Horii** , Takayo Sasagawa , Tomohiro Namikawa , Mayumi Nishi Neural networks between a newly identified perifornical area of the anterior hypothalamus and lateral septum: Pharmacogenetic investigations for physiological roles of urocortin3/enkephalin co-expressing neurons. 第39回日本神経科学大会 2016年7月20-22日 パシフィコ横浜
6. Takayo Sasagawa, **Noriko Horii-Hayashi**, Akinori Okuda, Mayumi Nishi. Effects of early life stress on motivated behavior for palatable foods 第39回日本神経科学大会 2016年7月

20-22日 パシフィコ横浜

7. **堀井 謹子**、笹川 誉世、西 真弓 視床下部の新たな機能 探索行動の外的・内的動因 第31回奈良脳神経ネットワーク 2016年7月1日 奈良
8. **堀井 謹子**、笹川 誉世、橋本 隆、西 真弓 マウス脳に新たに発見同定した視床下部領域について 第121回日本解剖学会総会・全国学術総会 2016年3月28 - 30日 福島
9. 西 真弓、笹川 誉世、**堀井 謹子** Effects of early life stress on the brain 第89回日本薬理学会年回 2016年3月9 - 11日 横浜

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.naramed-u.ac.jp/~1ana/>

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
堀井 謹子 (HORII, Noriko)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80433332

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

笹川 誉世 (SASAGAWA, Takayo)

林 康紀 (HAYASHI, Yasunori)

斎藤 康彦 (SAITO, Yasuhiko)