

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34452

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14580

研究課題名(和文)脳部位特異的リバースシナプトロジーによるマウス社会行動の解析

研究課題名(英文)An analysis of social behavior based on the neuregulin1-ErbB4 signaling in synapse

研究代表者

塩坂 貞夫 (SHIOSAKA, SADA0)

大阪行岡医療大学・医療学部・教授

研究者番号：90127233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：KLK8欠損マウス(neuregulin1 (NRG1)-deactivated mouse)の行動パターンを調べ、野生型との社会行動上の違いを認めた。KLK8欠損マウスではSocial recognitionには差がなく、過去の面識の有無を区別するSocial discriminationに有意な差が認められた。KLK8欠損マウスにErbB4(NRG1 receptor)を活性化させるNRG1 177-246を脳室内に注入することによりこの障害が野生型レベルまで回復した。したがって面識の有無の区別のためにKLK8-NRG1-ErbB4シグナル系が関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Social mammals recognize and discriminate their conspecifics to make pair bonding, to maintain species, to create social hierarchy, and to live in the society to which they belong. We investigated whether kallikrein 8 (KLK8)-neuregulin1-ErbB4 signaling is crucial for the social behavior. Using social discrimination paradigm of a three chamber behavioral task, we found neuregulin1-deactivated mouse (klk8-knockout mouse) impaired social discrimination, while this mouse exhibited normal social approach. Intraventricular injection of NRG1 177-246 (active domain of neuregulin1) into the brain of klk8-knockout mouse recovered the impairment into the level of wild type mouse and thus, KLK8 is one of the key regulator through NRG1-ErbB4 signaling, and contributes to social discrimination behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：KLK8 ニューロプシン ニューレグリン1 ErbB4 シナプス形成 シナプトパッチー カリクレインペプチダーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症・双極障害・自閉症・アルツハイマー病は近年、大脳皮質・海馬神経ネットワークのシナプス機能不全(シナプトパチー)が疑われており、すなわち特定の神経ネットワークが遮断されることによって起こる疾患と言われる。一方で、これらの疾患はExcitation-Inhibition(E-I)バランスの崩れによるとも言われ、疾患の主たる原因は上記を総合して抑制性ネットワークのシナプス不全と考えることができる。しかし、実験動物において抑制性シナプス不全を人為的に起こさせ、これらを組織解剖学的、神経科学および行動学的に検討した研究は少ない。

神経機能が局在する脳部位でシナプトパチーが島状に生ずると仮定すると患者の多様で複雑な症状を実験動物においても共通する社会行動障害を再現できるかもしれない。

我々といくつかの研究グループは、統合失調症脆弱因子であるニューレグリン 1 (NRG1)- 受容体 ErbB4 はパルブアルブミン抑制性細胞にのみ栄養効果を及ぼすことから、その不全は抑制性特異的シナプトパチーを起こし、行動異常を示すことを見出している。さらに我々は統合失調症・双極障害のリスク因子、NRG1 の特異的遊離因子として KLK8 (ニューロプシン) を特定し、主にこの欠損動物の解析から上記神経難病に類似の組織的特徴、神経症状を見出してきた (Neuropsychopharm, 33, 3237-3245, 2008; J Chem Neuroanat 42, 24-29, 2011)。しかも KLK8 は可逆的なシナプス形成関わると考えられ、それをリバースすることができれば、神経難病の治療に大きな光明をもたらすに違いない。

### 2. 研究の目的

本研究では統合失調症脆弱因子、ニューレグリン 1 の特異的活性化因子である KLK8 が、大脳皮質、海馬、扁桃体で可逆的なシナプス形成能をもつことを利用して、人為的に起こさせた抑制性シナプトパチーを部位別に回復させ、抑制性シナプスの機能不全と回復が実験動物の行動異常のパターンにどのように関与するか検討する。細胞外神経栄養物質とそのシグナル系がその活性化機構の調節によって実験動物の障害が可逆的なシナプス形成により回復可能であることを証明して、より複雑と考えられる統合失調症・双極障害・アルツハイマー病の神経症状の軽減、あるいは回復が可能かどうかを討ずる。

### 3. 研究の方法

これまでの研究によって KLK8 は神経栄養因子 NRG1 の活性化を行うプロテアーゼ (NRG1 activator) であることが明らかとなっておりそのノックアウトマウスは NRG1-deactivating mouse として有用である

ことから、本研究では NRG1 - ErbB4 シグナリングを研究する手段として本ノックアウトマウスを用いた。

社会行動試験として、ソーシャルインタラクショントテスト、ファミリー侵入者テスト、および3チャンバー社会性試験などを行い、ビデオ録画によって動物の行動を監視した。ビデオ画像からビデオトラッキングシステムによって解析した。

欠損マウスへの NRG1 活性ドメインの脳室内注入を行った。行動解析データよりとくに海馬に絞って行動異常の回復を観察し、行動時の海馬インタニューロンの活動性の変化と KO 動物の社会行動の変化を比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 最初期遺伝子産物 Arc および c-Fos の発現増加

社会性動物であるマウスがどのような神経分子メカニズムで既知と未知の同族を見分けるのか観察した。同一のケージで育てたグループの中に他からの1匹を侵入させ、侵入されたグループのマウス海馬を取り出し最初期遺伝子産物(Arc, c-Fos)の免疫組織化学を行ったところ、既知マウスを侵入させた場合と比較して濃染した海馬神経細胞が大きく増加し、明らかな活動性の上昇が見られた(図1)。

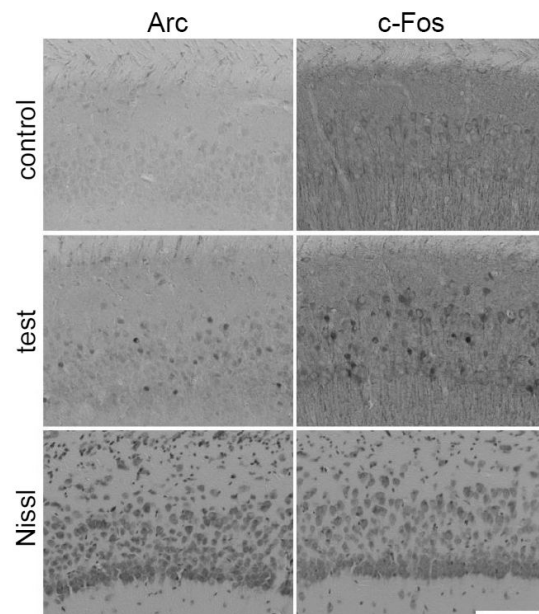


図1 海馬神経細胞の最初期遺伝子産物 Arc および c-Fos の発現、テスト群において発現細胞の増加が認められる。Nissl 染色により、これらの細胞が小型のインターニューロンであることを示している。

#### (2) KLK8 欠損マウスでは社交性行動に差が

みられない

3チャンバー社会性試験により KLK8 欠損マウス(neuregulin1 (NRG1) deactivated mouse)の行動パターンを調べた。

(図2) その結果、野生型との社会行動上で明らかな違いを認めた。すなわち KLK8 欠損マウスでは Social recognition behavior には差がなく、過去の面識の有無を区別する Social discrimination behavior に有意な差が認められた(図3)。

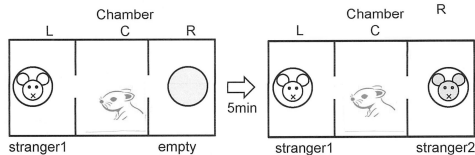


図2 3チャンバー社会性試験、最初Lチェンバーにストレンジャーマウスをいれ、Cのテストマウスが探索するかどうかをテストし、5分後にRチェンバーにいたストレンジャーのどちらを優先して探索するかを調べる。野生型マウスでは常に新たに入れたマウスを優先的に探索する。

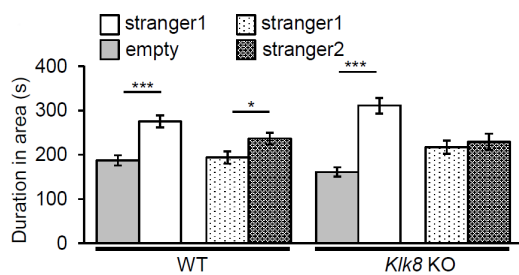


図3 klk8 ノックアウトマウスでは Social discrimination が障害される。

(3) KLK8 欠損マウスでは社会的差別行動に障害がある

KLK8 欠損マウスに ErbB4(NRG1 receptor)を活性化する NRG1<sub>177-246</sub> を脳室内に注入することによりこの障害が野生型レベルまで回復した。したがって面識の有無の区別のために KLK8-NRG1-ErbB4 シグナル系が関与すると考えられた(図4)。

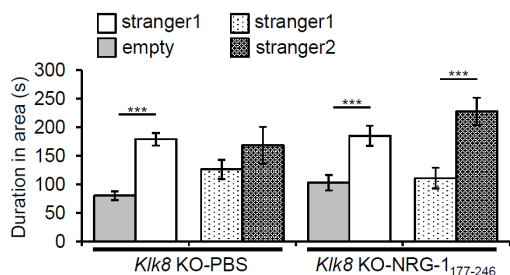


図4 NRG1<sub>177-246</sub> の脳室内注入は社会的差別行動を回復させる

社会的差別行動には短期記憶が関係すると考えられ、海馬における抑制性ネットワークでの KLK8-NRG1-ErbB4 シグナル系の関与が大であると考えられた。

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 3 件)

Kawata, M., Morikawa, S., Shiosaka, S., & Tamura, H. (2017). Ablation of neuropsin-neuregulin 1 signaling imbalances ErbB4 inhibitory networks and disrupts hippocampal gamma oscillation. *Translational Psychiatry*, 7(3).

<https://doi.org/10.1038/tp.2017.20>

Tamura, H., Shiosaka, S., & Morikawa, S. (2017). Trophic modulation of gamma oscillations: The key role of processing protease for Neuregulin-1 and BDNF precursors. *Neurochemistry International*.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.12.002>

塩坂貞夫、学習・認知に関するニューロプシンシグナル 機能、異常および進化、大阪行岡医療大学紀要、4,13-17,2017

[学会発表](計 1 件)

Nakazawa, H., Suzuki, Y., Ishikawa, Y., Shiosaka, S., and Yoshida, S., Neuropsin participate in social memory, 第60回日本神経化学会、9月7-9日、仙台国際センター

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称:ニューレグリン-1 (Neuregulin-1) 部分ペプチド  
発明者:塩坂貞夫、田村英紀  
権利者:国立大学法人奈良先端科学技術大学

院大学  
種類：特許  
番号：特許願 2017-031111 号  
出願年月日：2017 年 2 月 22 日  
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

塩坂 貞夫 (SHIOSAKA Sadao)  
大阪行岡医療大学・医療学部・教授  
研究者番号：90127233

### (2)研究分担者

吉田 成孝 (YOSHIDA Shigetaka)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20230740