

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06866

研究課題名(和文)環境で攻撃性を司る神経回路はどの程度変化するか? : 遺伝と環境の交点を探る

研究課題名(英文) To what extent does the environment alter the neural circuits that control aggression? Exploring the intersection of genetics and environment

研究代表者

前川 文彦 (Maekawa, Fumihiko)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：40382866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：他者との関係性構築が困難な発達障害の急増が社会問題となっており、一部の児童・生徒の表現型として起こる行為障害・暴力といった問題行動増加の原因究明が求められているが環境要因が問題行動増加の原因となるプロセスを理解するための学術基盤が不足している。本研究では遺伝的に異なる攻撃性を示す2系統のウズラを用いて「環境要因に高い感受性を示す攻撃関連神経回路」を同定することで、環境要因による問題行動増加を生物学的に理解する糸口を見出すことを試みた。その結果、系統と性差の相互作用によって発現が変化する遺伝子候補群を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2012年発表の文科省調査で普通学級の小中学生の6.5%が社会的なコミュニケーション等に支障を来す発達障害に罹患している可能性が指摘される等、発達異常が急増していることに不安が高まっている。発達障害には他者との関係性を確立することが困難な例が含まれており、表現型のアウトプットとして攻撃性や暴力といった問題行動が引き起こされる場合もある。原因として環境要因の関与が疑われているが特に有害化学物質が脳の発達に影響を与え、後発的な問題行動の引き金となる神経回路の形成異常を誘導している可能性が指摘されている。本研究は環境要因に影響をうけやすい神経回路を同定するための基礎的な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：The rapid increase in the number of people with developmental disabilities who have difficulty in relationships with others has become a social problem, and there is a need to investigate the causes of the increase in problematic behaviors such as conduct disorder and violence that occur as phenotypes in some children and students. In this study, we attempted to identify "aggression-related neural circuits that are highly sensitive to environmental factors" using two strains of quail that show different aggression genetically, and to find a clue to understand the increase in problematic behavior caused by environmental factors biologically. As a result, we were able to identify a group of candidate genes whose expression is altered by the interaction between strain and sex.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：脳 性ステロイドホルモン 性差 攻撃行動 環境 遺伝

## 1. 研究開始当初の背景

2012 年発表の文科省調査で普通学級の小中学生の 6.5% が社会的なコミュニケーション等に支障を来す発達障害に罹患している可能性が指摘される等、発達異常が急増していることに不安が高まっている。発達障害には他者との関係性を確立することが困難な例が含まれており、表現型のアウトプットとして攻撃性や暴力といった問題行動が引き起こされる場合もある。発達障害急増傾向は世界中で確認されており、原因として環境要因の関与が疑われている。環境要因の中でも、特に薬物、食品成分、ハウスダスト等身近な環境中に含まれる有害化学物質が脳の発達に影響を与え、後発的な問題行動の引き金となる神経回路の形成異常を誘導している可能性が指摘されている (Maekawa et al. *Front. Neurosci.* 2017)。一方で、現在動物モデルの研究を中心に攻撃性や従順性といった性格関連遺伝子の同定が進められており「環境」のみが社会性を司る神経回路構築の決定要因では無く、遺伝的要因が関与するのも明らかである。このような背景の元、遺伝的要因・環境要因は各々攻撃性にどの程度寄与するか、また、各々の要因に影響を受ける神経回路はどの程度独立/重複するか、という問いは重要である。

本研究では、「環境要因に高い感受性を示す攻撃関連神経回路」の仮説を構築することを試み、環境要因による問題行動増加を生物学的に理解する糸口を見出す。

## 2. 研究の目的

本研究ではウズラ、ニワトリ等の鳥類を動物モデルとして攻撃行動を司る神経回路を 遺伝的影響を強く受ける回路、と、環境要因に高感受性を示す回路、に大別するための分子基盤を探り、環境要因により誘導される発達障害発症に関わる神経回路の同定と発症機序の理解を目指す。

本研究で用いた鳥類は本能行動を調べるために行動神経内分泌学分野で古くから利用されてきた有効な動物モデルであり、特に生殖生理・攻撃行動・光周性等の分野で世界的に重要な発見を成し遂げる契機となった。鳥類の研究成果がヒトへの外挿性を持つのかという点に関しては、哺乳類との大脳の形態学的な相違を含め古くから議論が存在するが、最近のゲノム解析・分子生物学的研究の飛躍的進歩とともに、脳投射経路のヒトを含む哺乳類との高い共通性、

発声・聴覚認知等、所謂高次機能回路のヒトとの類似性、ヒト同様の視覚優位性、脳容積当たりの神経細胞量が多く、脳容積が同じ哺乳類より高知能、等の成果が発表された (Clayton et al. *Neuron* 2015, Olkowitz et al. *PNAS* 2016 等)。ヒトの心の解析に直結する様な高次機能の解析には一般的な小型げっ歯類よりも寧ろ優れているとの見方も存在し、げっ歯類モデルとは異なった視点から脳機能障害への解決策を提示できるモデルとして期待が高まっている。国立環境研究所では NIES-L 系統、NIES-Brn 系統と呼ばれるウズラ系統が存在し、2 系統間の行動・生理・内分泌の違いを比較したところ、特に顕著な違いとして雄対雄間の攻撃行動において NIES-Brn 系統が NIES-L 系統より強い攻撃性を示すことが明らかになった (Maekawa et al. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017)。また攻撃性の違いの原因となる分子発現を神経ペプチドに着目して検討したところ、NIES-Brn 系統においてオキシトシンの鳥類ホモログ・メソトシンの上昇を発見した (Maekawa et al. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017)。

しかしながら攻撃性とメソトシンの関係はどのようなものだろう。古典的にはオキシトシンは脳内で働き社会的絆に関係すると考えられてきたが、最近の研究ではストレスがかかった環境下で「引きこもる」か「積極的行動をとる」かの選択が迫られた際、オキシトシンは「積極的行動」を選択させる原動力となるとの仮説も示されている (Rickenbacher et al. *eLife* 2017)。「積極的行動」の中には子どもを守る防衛行動に加えて、威嚇や攻撃行動等様々な様態の行動が含まれ、従来の仮説を包括した広い行動発動全般をオキシトシンが担う可能性がある。また、オキシトシン/メソトシン発現の制御因子として性ステロイドホルモンが知られており、特に環境変化に伴い攻撃性を誘導する既知の代表的因子として精巢から分泌されるテストステロンがあるが、テストステロンが脳内で芳香化酵素によってエストロゲンに変換され、メソトシンの遺伝子発現を制御する可能性がある。このような研究背景を基に、申請者は「テストステロン メソトシン経路」の下流で働く回路の一部が「環境要因に高い感受性を示す攻撃関連神経回路」として働く仮説を立てた。本研究ではそのような神経回路形成に関わる遺伝子発現に関して検討を行った。

## 3. 研究の方法

### サンプリングおよび RNA 抽出

8 週令の雌雄ウズラから脳のサンプリングを行った。ウズラを断頭後、延髄の尾側の先端を切断し、脳を摘出した後、背側から小脳、腹側から橋、延髄を取り除いた。その後、TSM (Tractus septomesencephalicus) を目印に、頭側の大脳を取り除き、最後に左右両側の視蓋を切除し間脳はすべて、-80℃ にて保管した。その後ウズラの間脳から RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, USA) を使用して Total RNA 抽出を行った。得られた Total

RNAのうち、1  $\mu$ lの RNA 溶液を Nanodrop に載せ、RNA の濃度と吸光度 260/280 の比率を測定した。RNA の濃度と吸光度 260/280 の比率を測定した。260/280 の吸光度の比率が 1.8 以上 2.2 以下のサンプルを今後の実験で使用した。

#### DNA マイクロアレイ

間脳から抽出した RNA を使用し、Gene Expression Hybridization キット (Agilent Technologies, Japan) で Gallus (chicken) マイクロアレイ Ver. 2.0 とのハイブリダイゼーションを行った。まず Total RNA のクオリティを Bioanalyzer と Nanodrop で評価した。次に、cRNA の合成を Low Input Quick Amp Labeling キット (Agilent technologies, Japan) を用い行った。各サンプルの Total RNA から 2 本鎖 cDNA を合成し、その cDNA から、in vitro transcription により cRNA を合成した。反応時に、Cyanine 色素で標識された CTP (Cyanine 3-CTP) を取り込ませ、蛍光標識を行った。合成し蛍光標識された cRNA 量を測定し、ハイブリダイゼーションに必要な cRNA 量が得られていることが確認した。標識 cRNA をハイブリダイゼーションバッファーに加え、Gallus (chicken) マイクロアレイ Ver. 2.0 上で 17 時間ハイブリダイズし、洗浄後、Agilent Microarray Scanner で DNA マイクロアレイのイメージを読み取り、Feature Extraction Software (v. 10. 7. 3. 1) にて各スポットの蛍光シグナルを数値化した。ターゲット調整からハイブリダイゼーションまでの作業工程のコントロールとして Agilent RNA Spike-in キットを使用し、ハイブリダイゼーション後にコントロールを Raw 値で確認することにより、Wet 実験が正しく行われていることを確認した。結果は、解析ソフト GeneSpring GX を用いて比較解析した。解析方法は、Normalized 値を群間で比較し、比が 2 ( $\log_2 2 = 1$ ) 以上か、または 0.5 ( $\log_2 0.5 = -1$ ) 以下の Probe を選別し、さらに t 検定を実施して、p-value 0.05 を満たす Probe を選別した。また、必要に応じて別途行った RNA Seq による網羅解析との照合を行った。

#### Realtime PCR による遺伝子発現量測定

NIES-L 系と NIES-Br 系の間脳から抽出した Total RNA を使用し cDNA 合成を行った。最終濃度が 100 ng/ $\mu$ l になるように Total RNA 溶液を調整し、1  $\mu$ l RNA 溶液と 9  $\mu$ l Master Mix (3.8  $\mu$ l RNase Free Water、1  $\mu$ l 10 $\times$  RNA PCR Buffer、2  $\mu$ l 25.0 mM MgCl<sub>2</sub>、1  $\mu$ l 10 mM dNTP、0.5  $\mu$ l Oligo dT-Adaptor Primer、0.2  $\mu$ l、5000 U RNase inhibitor、0.5  $\mu$ l 500 U AMV Reverse Transcriptase XL) を混合し、総量 10  $\mu$ l の溶液を反応系とし、30 10 分間、55 20 分間、99 5 分間加熱し、cDNA を合成した。cDNA の合成は、T100™ Thermal Cycler (BIORAD, Japan) を使用した。

DNA マイクロアレイ解析により検索された遺伝子群の中から遺伝子発現を Realtime PCR 法で確認した。0.9  $\mu$ l PCR grade Water、0.8  $\mu$ l 10  $\mu$ M 各プライマー、7.5  $\mu$ l LightCycler 480 SYBR Green Master (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) cDNA 合成より得た cDNA を 10 倍希釈した 5  $\mu$ l の cDNA を混ぜ、総量を 15  $\mu$ l の溶液を反応系とした。Realtime PCR は、LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics, Germany) を使用して行った。ライトサイクラーの設定は、95 2 分間の初期ステップの後、95 15 秒、60 15 秒、72 15 秒の 3 ステップを 1 サイクルとし、40 サイクル繰り返した。スタンダードサンプルは、Nanodrop の結果より、最も多く RNA を抽出できた 4 つのサンプルを混ぜ合わせ濃度 1013.3 ng/ $\mu$ l のサンプルを、cDNA 合成を行ったものを希釈し使用した。特異的に配列が増幅されているかについては、メルティングカーブを描くことにより確認を行った。遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin に対する比率で示した。

#### 統計解析

データは平均値と標準誤差で示し、統計処理は分散分析および Student's t-test を使用した。

#### 4. 研究成果

DNA マイクロアレイの検索の結果、雌 > 雄の 2 倍以上上昇していた遺伝子は 80 種類、雄 > 雌の 2 倍以上上昇していた遺伝子は 44 種類、存在していた。それらの遺伝子のパスウェイ解析を行った結果、図 1 に示したように、下垂体ホルモン、性ステロイドホルモンとその受容体、オキシトシン (メソトシン) およびその受容体下流のシグナルカスケードにおいて違いが認められるところが明らかになった。また RAD1, PRLR, GRP, SPEF2, UBAP2, KCMF1, PDLIM7, ZFR, SMAD2 等の遺伝子発現に性差が確認され、そのうちの一部は RNA seq のデータにおいても同様のパターンを示していた。これら選抜された遺伝子を Realtime PCR により定量を加えた結果、ボンベシン様ペプチドをコードする GRP に関しては、系統間での違いに加え、雄優位の性差も両系統で確認された。このことは GRP が遺伝的な影響に加え、内因性のホルモンなどの影響を含む環境要因に影響されて発現量を変えやすい遺伝子の代表的なものであると考えられる。GRP に関連しては GRPR と呼ばれる受容体が脳内で鳥類でも存在することが申請者らを含む先行研究から明らかになっており (Maekawa et al. Neuroscience 2004, Ohki-Hamazaki et al. Int J Dev Biol. 2005) 脊髄においては GRP はテストステロンの影響で発現に影響が現れることが報告されているが (Oti et al. Biol Sex Differ., 2016) 鳥類においては視床下部においてもテストステロンの影響が強く現れることが明らかになった。今後

は GRP がどのような神経回路において発現量が変化しているのか特定するとともに、GRP 同様テストステロンと系統差の相互作用により発現に影響をうけるメソトシン神経系との関連性を探っていく予定である。

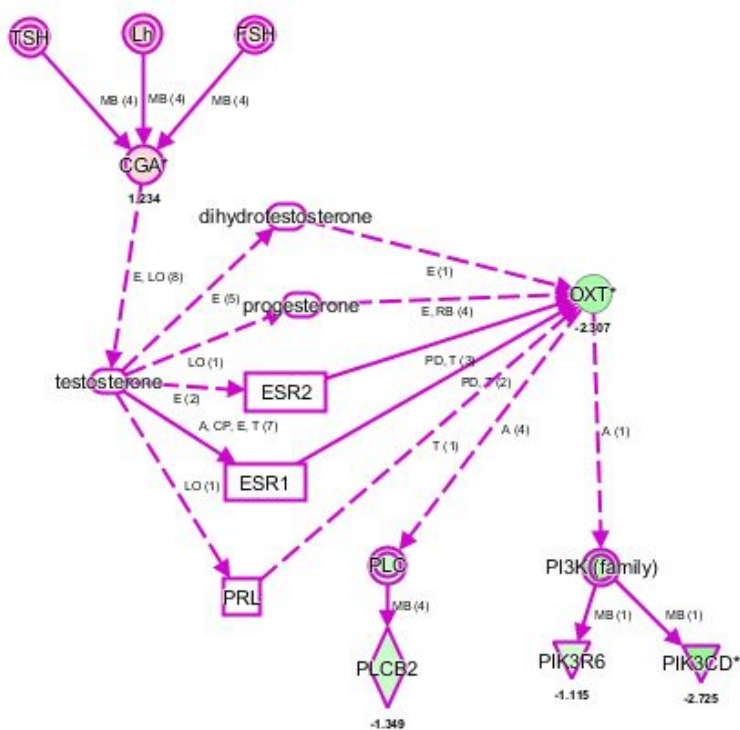


図 1. 性差による発現に違いがある遺伝子のパスウェイ解析結果

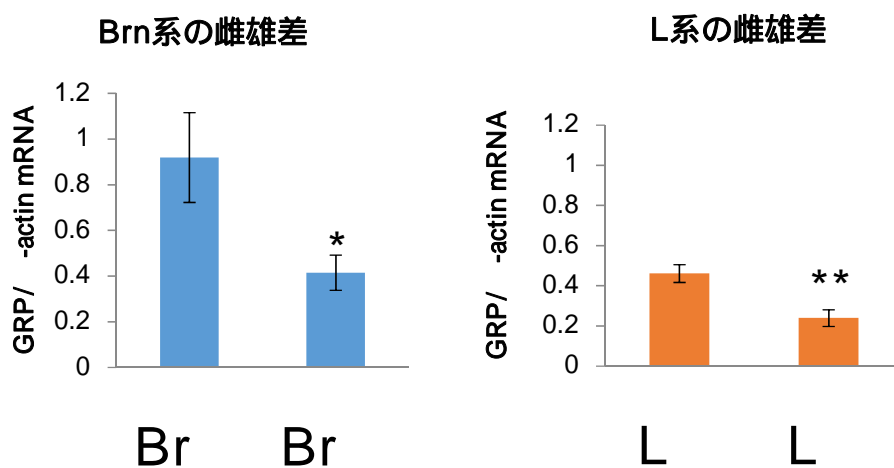


図 2 . GRP の遺伝子発現における系統差および性差 (\* p<0.05, \*\*p<0.01)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前川文彦
2. 発表標題 発達期の環境化学物質曝露と行動の発達
3. 学会等名 第35回 生殖・発生毒性学東京セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤智美, 櫻井美弥乃, 白石純一, 前川文彦, 浜崎浩子
2. 発表標題 性染色体上の神経ペプチド遺伝子のニワトリ脳発現における雌雄差の解析
3. 学会等名 日仏生物学会第193回例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	川嶋 貴治  (Kawashima Takaharu)  (90360362)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員   (82101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------