

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07080

研究課題名(和文) 視床下部新規領域が司るburying行動と自閉症における常同行動との関係性

研究課題名(英文) Mouse burying behavior regulated by hypothalamic neurons and its involvement in repetitive-stereotypic behavior in autism model mice

研究代表者

堀井 謹子(Noriko, Horii)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物は、新奇物体に遭遇した際、その危険性や情報を、リスクアセスメントと呼ばれる行動を介して得ようとする。今回、マウスを用いた実験により、視床下部のPeFAと呼ばれる領域の神経細胞が、新奇物体に対するリスクアセスメントや、新奇物体に対する積極的防御行動とされる埋める行動(burying)の制御に関与することが明らかになった。burying行動の亢進が認められる自閉症モデルマウスBTBRを用いて、新奇物体試験を行った結果、物体近傍の滞在時間におけるリスクアセスメント行動の割合が低下していることが明らかになった。また、PeFA神経細胞の投射先である中隔の構造もコントロールマウスと異なっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、これまで機能が不明であった視床下部の領域PeFAの働きが明らかになった。また、本研究は、新奇物体に対する防御行動の一種であるリスクアセスメントや、積極的な対処行動であるburyingが、視床下部ニューロンの調節を受けているということを明らかにした最初の発見であることも学術的意義がある。また、自閉症モデルマウスにおいても、新奇物体に対するリスクアセスメント行動や、PeFA神経細胞の投射先の脳構造に異常が認められることも明らかになり、今後更なる検証が必要であるが、自閉症にみられるモノへの拘りや執着等にも、PeFA-中隔神経回路が関係する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：When animals encounter a novel object, they carefully approach and assess the risk of the object, which is called risk assessment behavior. The present study using mice revealed that the perifornical area of the anterior hypothalamus (PeFA) is involved in the regulation of risk assessment and burying behaviors toward a novel object. BTBR mice are an inbred mouse strain with autism-like behaviors including increased burying activity as a rodent behavioral marker for repetitive-stereotypic behavior. BTBR mice showed decreased ratio of risk assessment (sniffing) to duration of stay near the object. Furthermore, the brain structure of the projection target of PeFA neurons was different from that of control animals.

研究分野：神経解剖学

キーワード：hypothalamus enkephalin urocortin 3 burying DREADD BTBR autism

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視床下部は動物の本能を司る脳部位であり、食欲、性欲、睡眠、防御行動などに関与している。視床下部は更に、神経核や野(エリア)と呼ばれる領域に細分化されるが、現在では、どの領域のニューロンが、どのような本能行動に関与しているか、その関係性がおおよそ明らかになっている。しかし、未だその機能が明らかになっていない領域も存在し、その1つが、脳弓周囲野(PeFA: Perifornical area)である。筆者は、マウス脳のPeFAに、2種類の神経ペプチド、urocortin 3(Ucn3)とenkephalin(Enk)を共発現するニューロン集団が存在し、それらが外側中隔へ投射することを明らかにした(Horii-Hayashi et al., Eur. J. Neurosci., 2015)。更に最近、これらニューロンの特異的な活性化により、新奇物体に対する探索行動の1つであるリスクアセスメント行動が促進されることを発見した(論文作成中)。リスクアセスメント行動は、新奇物体に対する体の進退と退縮または後退を繰り返す行動である。そこで筆者は、PeFAのUcn3/Enkニューロンの活性化ならびに選択的欠損は、げっ歯類の常同姓繰り返し行動の指標の1つとされるburying(埋める)行動にも影響を与えるのではないかと考えた。また、社会性やコミュニケーション能力の障害に加えて、特定の物への拘りや頻繁な常同行動など特徴とする自閉症に、本神経回路が関係するのではないかと考えた。そこで本研究では、PeFA Ucn3/Enkニューロンが、情動性繰り返し行動に関与する可能性、また、自閉症のモデルマウス的一种として知られ、burying行動の亢進が認められているBTBRマウスを用いて、burying行動や新奇物体への応答性、ならびに本神経回路にまつわる脳部位の異常について調べる。

2. 研究の目的

- (1) PeFAのUcn3/Enkニューロンの欠損ならびに活性化が、burying行動と新奇物体への探索行動に影響する可能性について明らかにする。
- (2) BTBRマウス脳を用いて、PeFA Ucn3/Enkニューロンの投射先である外側中隔の構造と投射について調べる。
- (3) BTBRマウスのMBT時における運動量や行動の特徴について明らかにする。
- (4) BTBRマウスの新奇飼育ケージやオープンフィールドにおける運動量を調べる。
- (5) BTBRマウスの新奇物体探索における行動特性について明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) PeFAのUcn3/Enkニューロンの活性化と選択的欠損

Ucn3プロモータ制御下でCreリコンビナーゼを発現するTGマウスはMMRRCより購入した。Creリコンビナーゼ依存的に、hM3Dq-mCherryまたはmCherry-ジフテリア毒素(DTA)を発現するAAVベクター(名古屋大、山中教授より譲渡)をマウス脳のPeFAにインジェクションした。術後は少なくとも1か月間の回復期を設け、行動試験を行った。行動試験に使用した動物は全て、インジェクションの正確性を組織学的に調べた。Ucn3/Enkニューロンの活性化は、Clozapine N-oxide(CNO: 0.7 mg/kg または 5 mg/kg mouse)の腹腔内投与により行った。

- (2) BTBRマウス脳の組織学的解析

マウスを4% PFAにより灌流固定し、取り出した脳を後固定した。ピプラトームで切片を作成後、Nissl染色ならびに免疫染色(抗Ucn3, Enk, c-Fos抗体)を行った。

- (3) 行動試験と解析

Marble burying test (MBT) : 床敷きを敷いたケージに 24 個のビー玉を等間隔に並べた。そのケージにマウスを 30 分間入れ、埋められたビー玉の数を数えた。BTBR マウスの MBT 中の行動は録画した。

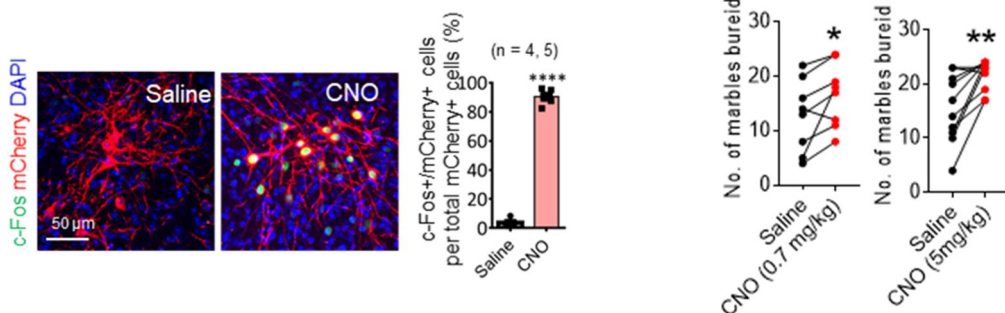
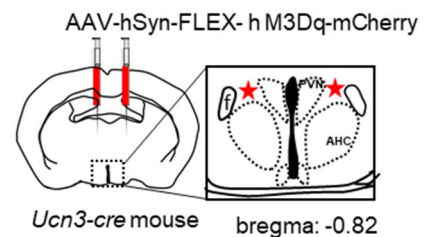
オープンフィールド 新奇物体試験 : オープンフィールド (40 cm × 40 cm) に、マウスを 10 分間 (BTBR マウス実験の場合は 15 分間) 入れ、行動を撮影した。続いて同フィールド内に新奇物体を置いた後、マウスを入れ、行動を撮影した。

解析方法 : 試験動画は行動解析ソフト TopScan により、特定箇所の滞在時間と運動量、総運動量、sniffing を測定した。

4 . 研究成果

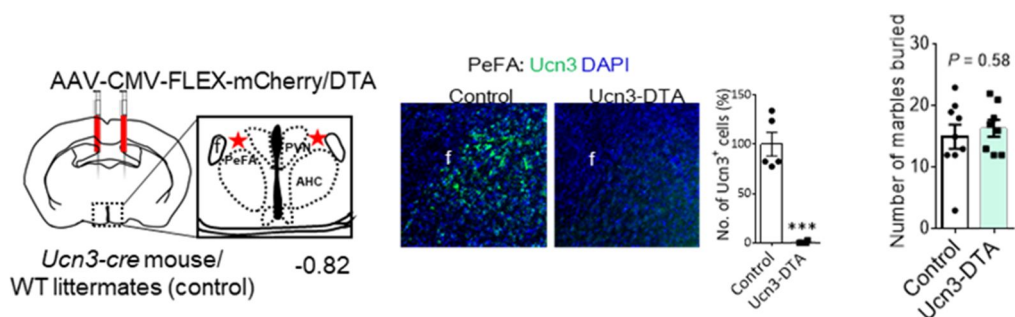
(1) 視床下部 PeFA Ucn3/Enk ニューロンの活性化は burying 行動を促進する

Ucn3 プロモータ制御下で Cre リコンビナーゼを発現する TG マウスの PeFA に、Cre 依存的に hM3Dq-mCherry を発現する AAV ベクターをインジェクションし、Ucn3 ニューロンにレポーター遺伝子である mCherry が発現していることを確認した。これらマウスに、CNO(0.7 mg/kg または 5 mg/kg mouse)を腹腔内投与し、15 分後に MBT を行った。その結果、PeFA Ucn3/Enk ニューロンの活性化により、burying スコアが優位に上昇した。つたが、そのスコアはコントロール群と差がなかった。

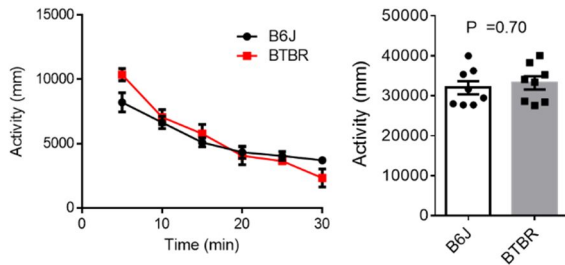


(2) 視床下部 PeFA Ucn3/Enk ニューロンの欠損は burying 行動と新奇物体探索に影響を与えない

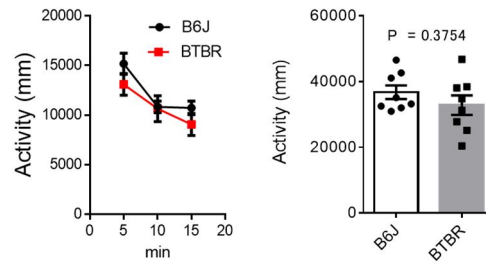
Ucn3 プロモータ制御下で Cre リコンビナーゼを発現する TG マウスの PeFA に、Cre 依存的にジフテリア毒素 (DTA) を発現する AAV ベクターをインジェクションしたところ、ほぼ全ての PeFA Ucn3/Enk ニューロンの欠損が確認できた。これらマウスを用いて、MBT を行ったが、その burying スコアはコントロール群と差がなかった。また、同様のマウスを用いて新奇物体探索試験も行ったが、コントロール群との間に差は認められなかった。



新しい飼育ケージにおける活動量 (30 min)



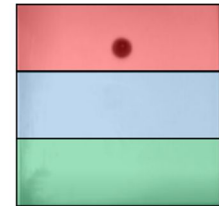
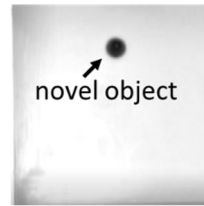
オープンフィールド (15 min)



(5) BTBR マウスは新奇物体近傍に長く滞在するが探索行動は B6J マウスと同等である

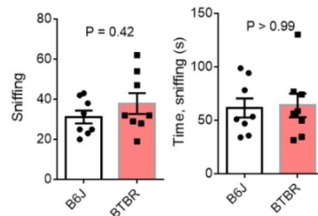
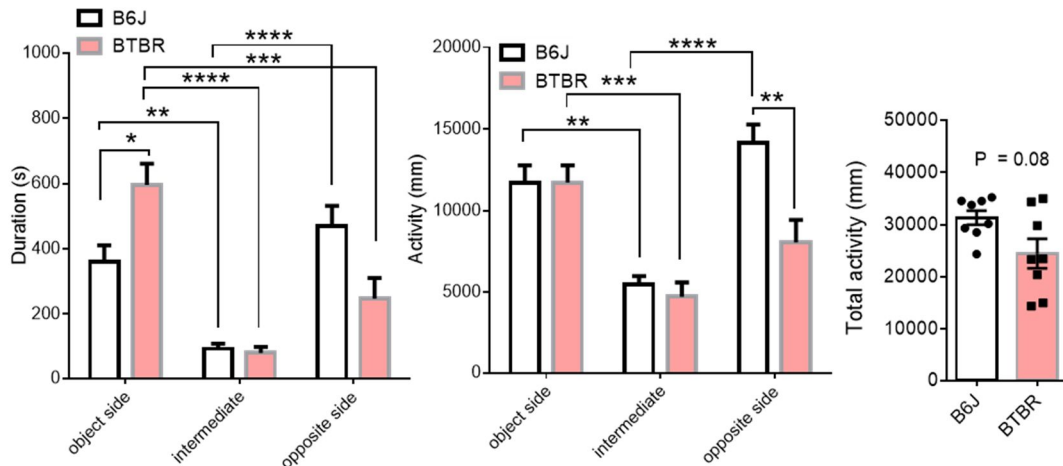
BTBR マウスを用いて新奇物体試験を行った。

右図のように、試験フィールドを object side, intermediate, opposite side の 3 領域に分け、滞在時間と活動量の解析を行った。その結果、BTBR マウスは object side における滞在時間が



B6 マウスより優位に長かったが、同領域における活動量は B6J マウスと同等であった。また、opposite side の滞在時間に優位差はなかったが、同領域における活動量は BTBR マウスの方が優位に低かった。フィールド全体における活動量に差異は認められなかった。

次に、物体とマウスの鼻先の距離が 1cm 未満の場合を sniffing と定義し、その回数と時間を測定したが、いずれの場合も B6J と BTBR マウスの間に差異は認められなかった。以上のことから、BTBR マウスは新奇物体近傍の滞在時間は長いですが、近傍での activity や探索行動である sniffing が増加しているわけではなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horii-Hayashi Noriko, Nishi Mayumi	4. 巻 51
2. 論文標題 A Newly Defined Area of the Mouse Anterior Hypothalamus Involved in Septohypothalamic Circuit: Perifornical Area of the Anterior Hypothalamus, PeFAH	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.17030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasagawa Takayo, Horii-Hayashi Noriko, Okuda Akinori, Hashimoto Takashi, Azuma Cho, Nishi Mayumi	4. 巻 641
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 33~39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.neulet.2017.01.025	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horii-Hayashi Noriko, Sasagawa Takayo, Nishi Mayumi	4. 巻 92
2. 論文標題 Insights from extracellular matrix studies in the hypothalamus: structural variations of perineuronal nets and discovering a new perifornical area of the anterior hypothalamus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 18~24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-016-0375-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishi Mayumi, Sasagawa Takayo, Horii-Hayashi Noriko	4. 巻 149
2. 論文標題 Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 72~75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.149.72	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa K., Furube E., Morita S., Horii-Hayashi N., Nishi M., Miyata S.	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural Reconstruction of the Perivascular Space in the Adult Mouse Neurohypophysis During an Osmotic Stimulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12456	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Akinori, Horii-Hayashi Noriko, Sasagawa Takayo, Shimizu Takamasa, Shigematsu Hideki, Iwata Eiichiro, Morimoto Yasuhiko, Masuda Keisuke, Koizumi Munehisa, Akahane Manabu, Nishi Mayumi, Tanaka Yasuhito	4. 巻 26
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Spine	6. 最初と最後の頁 388 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2016.8.SPINE16250	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀井 謹子、野元 謙作、菊水 健史、西 真弓
2. 発表標題 不安を介してリスクアセスメント行動を制御する視床下部ニューロン
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀井 謹子、野元 謙作、菊水 健史、西 真弓
2. 発表標題 Perifornical hypothalamic neurons promote risk assessment behavior to a novel object.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤のぞみ、牧之段学、堀井謹子、杣山奈実、小森崇史、岸本年史、西真弓
2. 発表標題 集団飼育環境における自閉症モデルマウスの行動解析
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀井 謹子、西 真弓
2. 発表標題 視床下部新規領域PeFAHのUrocortin3/Enkephalin共発現ニューロンの機能
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀井 謹子、西 真弓
2. 発表標題 マウス視床下部新規領域PeFAHの機能
3. 学会等名 第44回 日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀井 謹子、笹川 誉世、西 真弓
2. 発表標題 Neural circuit controlling defensive active coping with inanimate threats
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----