

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430031

研究課題名(和文) 神経回路改変マウスを用いた扁桃体回路の機能解析

研究課題名(英文) Generation of the network modified mouse with disruption of amygdala-BNST connections

研究代表者

須藤 文和 (Suto, Fumikazu)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・室長

研究者番号：40345848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：情動・摂食・生殖行動に中心的な役割を果たす扁桃体神経回路について、この回路を限定的に改変するためのマウス作出のため、条件付き遺伝子破壊マウスの作製を行った。既存の遺伝子破壊マウスにおいて扁桃体神経回路に異常を持つplexin-A4とSema6A, Sema6Bに対して標的遺伝子組換えベクターの作製を完了させ、plexin-A4については、相同組換えES細胞を2株単離した。また既存のplexin-A4遺伝子破壊マウスについて、生後発達期における成長不良を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The amygdaloid network is a principal component of the limbic system with roles in emotion, feeding and sexual behavior. Axons of distinct amygdaloid nuclei connect to the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in a topographic manner. However, it remains largely unknown the roles or contributions of this topographic connections for animal behavior. We have tried to generate the network modification animal restricted in amygdala-BNST connections. We generated the conditional targeting vectors for three axon guidance genes (plexin-A4, Sema6A, Sema6B), regulating the formation of the topographic connection, and established two ES cell lines with targeted recombination for plexin-A4.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経科学 分子 発生・再生 神経回路形成 扁桃体 軸索誘導分子 プレキシシン セマフォリン

1. 研究開始当初の背景

動物の学習や記憶、および、行動発現は神経回路網を基盤とする。この神経回路網の特徴の一つとして、神経接続が規則性と特異性をもって形成されることが挙げられる。この特異性の乱れと行動発現の変化との関連については、運動制御系を中心に解析が進行してきているが(Kullander et al., 2001,2003)、情動・摂食・生殖行動を制御する神経回路については未着手であった。情動・摂食・生殖行動の制御には、感覚情報を適切に処理する機能を担う扁桃体神経核を中心とした神経回路が重要な役割を持っていることが示唆されている。扁桃体は、複数の神経核より構成される神経核複合体であり、個体の生存にとって重要な感覚情報を扁桃体内部の神経核間で処理するとともに、処理した情報を他の基底核や視床下部、脳幹部に出力することで行動発現を担うことが知られている。主たる出力の一つは、分界条床核と特異性をもった神経連絡を形成することが明らかにされている(Dong et al., 2003)。例えば、扁桃体神経核のうち、中心核と一部の主嗅覚系神経核からの出力線維は、分界条床核の前部(内側、外側部)と接続し、一方、副嗅覚系神経核とその他の主嗅覚神経核からの出力線維は分界条床核の後部と前内側部と接続する。さらに、分界条床核は亜領域ごとに行動発現を制御する視床下部や脳幹部と特異的な接続をしていることから、扁桃体と分界条床核間の特異的な接続様式は、外界の感覚情報を適切に行動に結びつけるための重要な神経接続であると考えられる。一方、感覚情報は他の脳領域からも視床下部や脳幹部に伝達されており、行動発現において、扁桃体と分界条床核間の特異的な接続が担う役割や貢献度は解明されていない。

また近年、神経接続の規則性と特異性を担う分子が発見され、遺伝学的解析からこれらの特性を制御する分子機構が明らかになりつつある(Sanes & Yamagata, 2009)。我々は軸索誘導分子セマフォリンとその受容体プレキシンに着目して解析を進め、個体レベルでの遺伝学的解析より末梢神経系(体性感覚系/自律神経系: Suto et al., 2005)や中枢神経

系(海馬: Suto et al., 2007)の神経回路の規則性と特異性を制御する分子機構であることを明らかにしてきた。また、これらの分子(plexin-A4 とそのリガンド分子)が扁桃体-分界条床核の特異的な接続を制御していることを見出している。これらの知見を基に、扁桃体神経回路においてsemaphorin/plexin シグナルを個体レベルで制御して神経回路を改変させることで、情動行動などの行動発現における扁桃体と分界条床核間の接続様式の役割と貢献度を明らかにできる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 扁桃体出力回路の回路改変マウスの作出: 扁桃体の出力系のうち、分界条(stria terminals)を形成する神経線維の走行を改変し、分界条床核との接続に変化をもたらしたマウスを作出することを目的とする。回路変化を誘導するためには、これまでの知見を基に、扁桃体を構成する神経細胞でSemaphorin/plexin シグナルを変化させた遺伝子改変マウスを作成する。これらのマウスについて、組織化学的解析を行い、扁桃体の出力系が改変されていることを確認し、扁桃体出力系回路改変マウスとする。

(2) 扁桃体回路改変マウスの行動様式の変化: 回路改変マウスを用いた行動解析を行い、特定の行動様式制御における扁桃体と分界条床核の特異的な接続の役割を明らかにすることを目的とする。plexin-A4 遺伝子欠損マウスでは、扁桃体から分界条床核前方部への大部分の接続が失われていることから、分界条床核前部が接続する行動様式制御系に異常が生じている可能性が高い。また、扁桃体と分界条床核の接続は摂食行動や内分泌系に関与することが知られていることから、個体の発育を制御する可能性がある。そこで、生後発育状況を解析するとともに、摂食行動の解析を優先に、各種行動解析を行い、扁桃体回路改変マウスでの行動様式の変化を明らかにする。

(3) 行動発現時における分界条床核の神経細胞発火頻度の変化 扁桃体から分界条床核への出力線維は大部分が GABA 作動性神経であることから、分界条床核の神経細胞は

扁桃体からの入力でその活動が抑制されていると考えられている。そのため、回路改変マウスでは神経細胞の活動状態が亢進していることが推察される。このことを検証するために、分界条床核内の神経細胞について、扁桃体からの GABA 作動性入力の役割を明らかにすることを目的とし、回路改変マウスの行動発現時における神経細胞活動様式を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 標的遺伝子組換え操作に用いる遺伝子ターゲティングベクターの作製は、対象遺伝子を有する BAC clone をもとに、pRed/ET システムを用いた大腸菌内組換え法を用いた。また、相同組換え ES 細胞の作製は、C57BL/6N 由来の ES 細胞に対して、ターゲティングベクターをエレクトロポレーションにて導入し、Neomycin 薬剤耐性コロニーを単離、PCR ならびにサザンブロット法を用いて選別を行った。また、扁桃体出力線維可視化用の抗体を作製するために、抗原を培養細胞で産生させた後、タグによる精製にて調整した。この抗原をウザギに免疫してポリクローナル抗体を作製した。

(2) 生後個体の発育状況の解析は、生後 0 日、1 週齢、1 ヶ月齢での体重を計測した。また、行動様式解析のため恐怖情動行動関連の解析のシステムを導入した。

(3) 活動神経細胞を可視化するために、神経活動依存的に発現する *c-fos* 遺伝子を指標とした *in situ* hybridization 法を導入した。

4. 研究成果

(1) 扁桃体出力回路の回路改変マウスの作出について、まず、*plexin-A4*、*Sema6A*、*Sema6B* 遺伝子について条件付き遺伝子破壊マウスの作製を試みた。遺伝子破壊標的領域として、それぞれの遺伝子の翻訳開始部位をコードする exon を選択し、この exon を flox するとともに、下流の intron に薬剤耐性遺伝子を導入した。相同組換えのために 5' 上流と 3' 下流に相同領域を付加してターゲティングベクターとした。*plexin-A4* については作製したターゲティングベクターをもとに、C57BL/6N 由来の ES 細胞について標的

組換え ES 細胞の作製を行い、2 株単離することに成功した。現在、これら組換え ES 細胞より個体再生を進めている。一方、扁桃体回路の異常を調べるためのツールとして、一部の扁桃体神経細胞で発現している *plexin-D1* について、ポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いた免疫染色により、扁桃体からの一部の出力線維を可視化できることを確認した。*plexin-A4* 遺伝子破壊マウスでは、*plexin-D1* 陽性線維に異常が認められたことから、扁桃体回路改変マウスでの線維走行の解析に有用であるとも確認した。

(2) 扁桃体神経回路特異的に回路を改変したマウスの作製に至らなかったために、既存の *plexin-A4* 遺伝子破壊マウスについて生後発育状況を解析した。生後一週齢から 1 ヶ月、さらに成体にかけて *plexin-A4* 遺伝子破壊マウスは野生型マウスより低体重であり、成体では野生型より 25% 程度低体重であることを明らかにした。また、生後直後（生後 0 日目）では、両者の体重に差は認められなかったことより、生後発達期において *plexin-A4* が関わる神経回路の異常に起因し、成育不良が生じていることが推察された。*plexin-A4* は扁桃体から分界条床核の線維接続形成に必要であること、また、これらの分界条床核のうち、摂食や内分泌系制御と関連する神経細胞領域との接続に関与することから、*plexin-A4* 遺伝子破壊マウスで認められる成育異常は扁桃体出力線維の異常のために生じた可能性が高いと考えられる。

(3) 神経細胞の活動を可視化するための解析系を導入した。神経細胞活動後に発現する *c-fos* 遺伝子について、発現解析用プローブを作製するとともに、*in situ* hybridization 法により活動神経細胞の可視化を行った。解析系の評価は、既に報告されている行動（生殖行動や攻撃行動）と関連する神経細胞の活動について調べ、これらの神経細胞での発現を確認した（評価系導入の完了）。

本研究では、扁桃体神経回路を限定的に改変したマウスを作出することにより、扁桃体と分界条床核の接続の意義を個体レベルで明らかにする事が主たる目的であったが、研究期間内にその目的を達成することができな

かった。一方で、回路改変マウスの解析系については確かな系が構築できていることより、今後、現在進めている回路改変マウスの作製を進めることで、当初の目的を達成したいと考えている。

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 4件)

- 1) Yamashita, N., Yamane, M., Suto, F., Goshima, Y: TrkA mediates retrograde semaphorin 3A signaling through plexin A4 to regulate dendritic branching. *J Cell Sci.* 129:1802-1814, 2016. 査読有り
doi: 10.1242/jcs.184580
<http://jcs.biologists.org/content/129/9/1802.long>
- 2) Uchida, Y., James, JM., Suto, F. and Mukoyama YS: Class 3 semaphorins negatively regulate dermal lymphatic network formation. *Biol Open.* 28:1194-205, 2015. 査読有り
doi: 10.1242/bio.012302
<http://bio.biologists.org/content/4/9/1194.long>
- 3) Yamashita, N., Usui, H., Nakamura, F., Chen, S., Sasaki, Y., Hida, T., Suto, F., Taniguchi, M., Takei, K., Goshima, Y: Plexin-A4-dependent retrograde semaphorin 3A signaling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. *Nat Commun*, 5:3424 2014. 査読有り
doi: 10.1038/ncomms4424
<http://www.nature.com/ncomms/2014/140306/ncomms4424/full/ncomms4424.html>
- 4) Katayama K, Imai F, Suto F, Yoshida Y: Deletion of Sema3a or plexinA1/plexin3 causes defects in sensory afferent projections of statoacoustic ganglion neurons. *PLoS ONE*, 8, e72512, 2013. 査読有り
doi: 10.1371/journal.pone.0072512
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072512>

[学会発表](計 3件)

- ・ 須藤文和、川口将史、大隅典子、一戸紀孝: Semaphorin/plexin signaling regulates the development of the amygdala-BNST network、第 47 回日本発生生物学会年会、2014 年 5 月 27 日、28 日、ウインクあいち、名古屋市、愛知県
- ・ Son A, Suto F, Morozov Y, Ishii S, Rakic P, Levitt P, Hashimoto-Torii K,

Torii M: Plexin-A4 Mediates the Maintenance of Postnatal Callosal Axons .*Neuroscience* 2014. 2014 年 11 月 18 日 . Washington DC (米国)

- ・ Alexander Son , 須藤 文和 , 鳥居(橋本) 和枝 , Pasko Rakic , Pat Levitt , 鳥居 正昭: 大脳皮質間神経回路形成における軸索数の制御機構、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド、神戸、兵庫県

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

須藤 文和 (SUTO FUMIKAZU)

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・微細構造研究部・室長
研究者番号：40345848

(2)研究分担者

()

研究者番号：