

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06736

研究課題名(和文) 恐怖反応を制御する神経回路形成の分子機構の解明

研究課題名(英文) Developmental mechanism of the posterior septum associated with fear and anxiety

研究代表者

渡辺 啓介 (Watanabe, Keisuke)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：20446264

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)：本能行動を制御する神経回路の形成メカニズムについては明らかにされていないことが多い。本研究において、生来の恐怖行動が減弱しているDpy19L1ノックアウト(KO)マウスの神経回路構築異常の解析を行った。その結果、Dpy19L1 KOマウスにおいて、恐怖・不安行動に関わる後方中隔核の形成異常を見出した。さらに、後方中隔核ニューロンは終脳外、間脳前方端のthalamic eminenceと呼ばれる領域で産生され、前方移動を経て、中隔核に加わることがわかった。Dpy19L1は細胞移動、軸索突起伸展を制御することから、後方中隔核ニューロンの移動を制御することで後方中隔核の形成に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously observed abnormal innate fear responses in Dpy19L1 knockout (KO) mice. In this study, we found that the posterior septum, which is associated with fear and anxiety, is severely disorganized in adult Dpy19L1 KO mice. Furthermore, the defect in the posterior septum was also observed in embryonic Dpy19L1 KO mice. However, the development of the posterior septum remains unclear. Using in vivo and in vitro studies, we found a novel caudal origin and rostral migratory stream of posterior septal neurons arising from the thalamic eminence (TE), a transient developmental structure at the rostral end of the rodent diencephalon. Finally, we revealed that Dpy19L1 is localized to the ER membrane and regulates neurite extension during development. Our results suggest that Dpy19L1 is involved in development of the posterior septum, possibly by regulating rostral migration of TE-derived posterior septal neurons.

研究分野：神経解剖学

キーワード：中隔核 恐怖行動 Dpy19L1 thalamic eminence

1. 研究開始当初の背景

動物は、危険な状況、不快な刺激、または漠然とした恐れに対して恐怖や不安を感じ、それらを除去・解消するための行動をとる。野生動物においては、天敵等の脅威から逃れることは生存にとって必須となるが、逃避などの行動は恐怖や不安に起因するものである。これらの本能行動は、経験・学習に基づかないことから、一連の行動を制御する神経回路形成は、発生期に遺伝子レベルで制御されていることが予想される。しかしながら、「神経回路形成の分子メカニズムと情動行動の統合的理解」については、未だに解明されていないことが多い。我々は、新たに作製した Dpy19L1 ノックアウト(KO)マウスにおいて、ヒトを怖がらない・キツネの匂いから逃げないなど、生来の恐怖行動が著しく減弱していることを見出した(図. 1)。この結果は、Dpy19L1 が恐怖情動の遺伝的な発生プログラムに関わっていることを強く示唆するものである。そこで本研究課題においては、Dpy19L1 の機能解析を通して、動物が生まれつき持つ(恐怖)情動行動の神経回路形成を遺伝子レベル明らかにすることを目的とした。

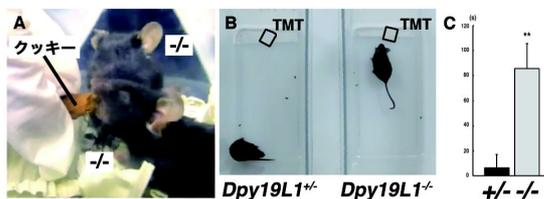


図 1: A. Dpy19L1 KO マウスは飼育者を怖がらず、手から直接クッキーをとり食べる異常な行動を示す。B, C. キツネの分泌成分 TMT を用いた忌避反応実験。C. ケージの TMT 側半分にとどまる時間(5分間のテスト)。ヘテロマウスは TMT から遠ざかる傾向があるが、KO マウスは気にせず動き回る。

2. 研究の目的

本研究課題では、「動物が示す恐怖行動」と「発生期の神経回路メカニズム」の関連を遺伝子レベルで明らかにすることを目的とする。この目的の達成のため、Dpy19L1 に焦点を当て、Dpy19L1 KO マウスの恐怖行動異常と神経回路形成異常について解析することで、先天的な恐怖行動の神経回路の発生メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Dpy19L1 タンパク質の細胞内局在と機能解析

細胞内における Dpy19L1 の機能を明らかにするため、培養神経細胞を用いた Dpy19L1 の細胞内局在解析および機能解析阻害実験を行った。

Dpy19L1 の細胞内局在解析

胎生 14 日目のマウス大脳皮質から神経細胞の分散培養を行い、数日間培養後、Dpy19L1 および細胞小器官マーカーに対する免疫染色により、Dpy19L1 の細胞内局在を検討した。

神経細胞における Dpy19L1 の機能解析

上記の初代培養神経細胞に Dpy19L1 siRNA を導入することで、神経細胞の形態形成における Dpy19L1 の機能解析を試みた。さらに小胞体の細胞内分布の変化について観察した。

(2) Dpy19L1 KO マウスにおける神経回路構築異常の解析

Dpy19L1 KO マウスにみられた恐怖行動異常の責任領域を明らかにするため、組織化学的手法を用いて脳構築異常について検討した。

成体 Dpy19L1 KO マウスにおける組織

生後 2 ヶ月の Dpy19L1 KO マウス脳を 4%PFA で固定後、凍結切片を作製し、ニッスル染色および神経細胞マーカーの抗体を用いた免疫染色を行うことで、KO マウスの脳構築異常の観察を行った。

発生期における神経回路形成異常の解析

胎生(E)12日目から生後1週間のマウス脳について、上述(2)-と同様の解析を行った。

(3) 恐怖・不安行動に関与する後方中隔核の発起源の解析

実験(2)により、Dpy19L1 KO マウスにおける後方中隔核の形成異常が明らかとなったため、その発起源を同定するため、以下の実験を行った。

-1 マーカー遺伝子の発現パターン解析

in situ hybridization 法 (ISH) を用いて、後方中隔核ニューロンのマーカーである calretinin の分布様式を様々な発生段階で観察した。

-2 後方中隔核ニューロンの細胞系譜解析

子宮内エレクトロポレーション法により、マウス E12.5 の間脳 thalamic eminence (TE) に GFP プラスミドを導入し、2 日-2 週間後に組織切片を作製、GFP に対する免疫染色を行い、GFP 陽性細胞の分布を調べた。

-3 後方中隔核ニューロン移動のタイムラプス観察

発生期の後方中隔核ニューロンの移動を直接観察するため、E12.5 TE に GFP を導入後、E17.5 に脳スライスを作製した。その後、共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察、撮影を行った。

TE 由来細胞の前方移動時における netrin 関連分子の発現

ガイダンス分子 netrin 1 と netrin レセプター unc5c の発現パターンを ISH 法により検討した。

4. 研究成果

(1) Dpy19L1 タンパク質の細胞内局在と機能解析

Dpy19L1 の細胞内局在解析

本研究遂行時において、細胞内における Dpy19L1 の局在と機能については全く明らかとなっていなかった。そこで、胎生(E)14 日目のマウス大脳皮質の神経細胞の分散培養を行い、Dpy19L1 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、Dpy19L1 は核周囲に強く局在し、さらに細胞体、軸索および樹状突起において点状に局在することがわかった(図.2A)。また、微小管、小胞体などの二重染色の結果、Dpy19L1 は微小管ネットワークに沿って分布する小胞体と同局在することが明らかとなった(図.2B; Watanabe et al., Plos One, 2016)。Dpy19L1 は 12 回程度の膜貫通領域を持つことから、小胞体膜上に局在することが予想された。我々の論文報告と同時期に、マウス Dpy19L1, Dpy19L3 が C 型マンノース転移酵素であることが報告された(Niwa et al., Mol. Biol. Cell, 2016; Shcherbakova et al., PNAS, 2017)。

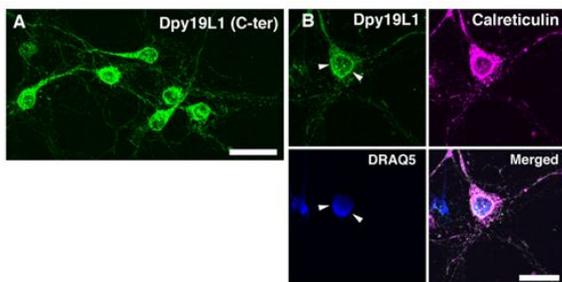


図 2: E14.5 の大脳皮質神経細胞を 2 日間培養し、Dpy19L1 抗体を用いた免疫染色を行った。(A) Dpy19L1 シグナルは核周囲に強く観察された。(B) 小胞体マーカー Calreticulin との二重染色像。Dpy19L1 の小胞体への局在が観察された。

神経細胞における Dpy19L1 の機能解析

申請者は、これまで子宮内エレクトロポレーション法を用いて、Dpy19L1 が大脳皮質の神経細胞の移動に関わることを明らかにした(Watanabe et al., Development, 2011)。しかしながら、移動制御以外の Dpy19L1 の機能については全く明らかとなっていなかった。そこで、上記の培養神経細胞に Dpy19L1 siRNA (または control siRNA) と GFP プラスミドを共導入し、72 時間の培養後、GFP の免疫染色により神経細胞の形態を比較検討した。その結果、siRNA による Dpy19L1 の機能阻害により、軸索の伸長が著しく阻害されることがわかった(図.3)。また、神経細胞死への影響は認められなかった。この結果から、Dpy19L1 が神経細胞の軸索伸長を制御することが示唆された。実験(1)から、Dpy19L1 が小胞体膜に局在することが考えられたため、軸索内の小胞体分布を観察したが、明らかな変化は認められなかった(図.4)。

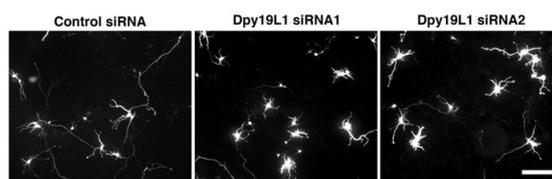


図 3: 培養神経細胞における siRNA を用いた Dpy19L1 の機能阻害実験。大脳皮質神経細胞に control または Dpy19L1 siRNA を導入後、72 時間後に神経細胞の形態を観察した。Dpy19L1 siRNA を導入した神経細胞では、軸索の伸長阻害が観察された。

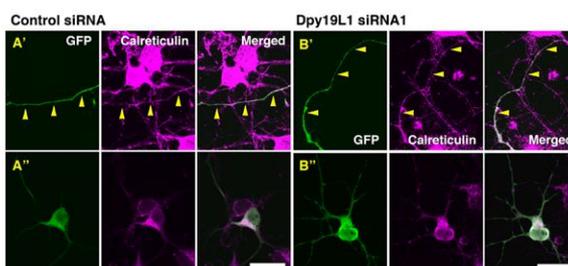


図 4: Dpy19L1 siRNA を導入後、72 時間後に Calreticulin の免疫染色を行い、小胞体の分布について検討した。Control, Dpy19L1 siRNA 導入神経細胞ともに、軸索および樹状突起において小胞体の分布が観察でき、Dpy19L1 の機能阻害により、小胞体の局在変化は起こらないと考えられた。

(2) Dpy19L1 K0 マウスにおける神経回路構築異常の解析

成体 Dpy19L1 K0 マウスにおける組織学的解析

辺縁系は海馬や扁桃体など多くの領域からなり、原始的な行動に深く関わる領域である。Dpy19L1 K0 マウスは、生来の恐怖行動に異常を示したことから、辺縁系の神経回路構築異常の可能性を考えた。多くの Dpy19L1 K0 マウスが生後すぐ致死となってしまうが、一部は生存する。そこで、生存した 2 ヶ月齢マウスから組織切片を作製、ニッスル染色を行い、辺縁系領域を観察した結果、終脳腹側正中部の中隔核周辺に異所性の細胞集団が存在することを見出した。そこで ISH 法を用いて、種々のマーカータンパク質の分布を検討した結果、恐怖・不安行動に深く関わる後方中隔核(三角中隔核(Triangular septal nucleus; TS)と前交連床核(bed nuclei of the anterior commissure; BAC))に顕著な細胞構築異常がみられることが明らかとなった(図.5)。Dpy19L1 ヘテロマウスにおいては、脳梁の腹側正中部に TS、前交連の背側部に両側性に BAC が観察されるのに対し(図.5 上段) K0 マウスでは TS は正常な位置には認められず(図.5 青矢印) BAC についても顕著な構築異常が観察された(図.5 赤矢印)。さらに、K0 マウスの前方には大きな異所性の細胞集団が認められた(図.5 矢頭)。また、Calretinin と Neurofilament との二重染色を行った結果、K0 マウスにみられる異所性の細胞集団は、軸索上に沿って分布していること

がわかった。これらの結果から、Dpy19L1 は、恐怖・不安行動に関わる TS および BAC の構築に関わることが示唆された。

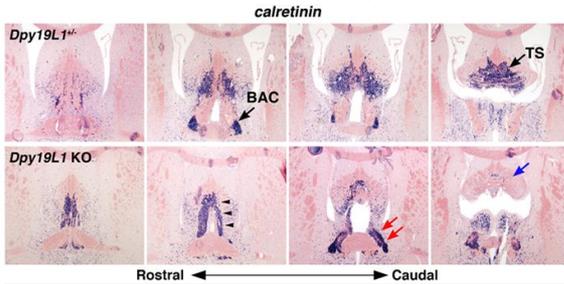


図 5: Dpy19L1 KO マウスにおける後方中隔核の構築異常。2ヶ月齢マウス脳の calretinin の ISH 像。上段: Dpy19L1 ヘテロマウス、下段: Dpy19L1 KO マウス。KO マウスにおいて、calretinin でラベルされる TS, BAC の顕著な細胞構築異常が認められる。

発生期における神経回路形成異常の解析

Dpy19L1 KO マウスにみられる TS、BAC の異常がいつ、どのように生じるのかを明らかにするために、胎生期 Dpy19L1 KO マウスの脳形成について解析した。胎生(E)14-18 日目について、TS、BAC ニューロンのマーカーである calretinin の発現を検討した結果、E17.5 の中隔核において、野生型と Dpy19L1 KO マウスで calretinin 陽性細胞の分布に大きな違いがみられた。野生型の将来 TS が形成される領域には calretinin 陽性細胞集団が観察されるのに対し、KO マウスでは陽性細胞集団が認められなかった(図. 6 矢印)。また、将来の BAC 領域については、KO マウスでは野生型に比べて、大きな calretinin 陽性集団が存在することがわかった(図. 6 矢頭)。これらの結果から、Dpy19L1 は発生期における TS, BAC 形成に関わっていることが示唆された。また、この異常は、発生期の神経細胞の移動異常により引き起こされている可能性が考えられた。

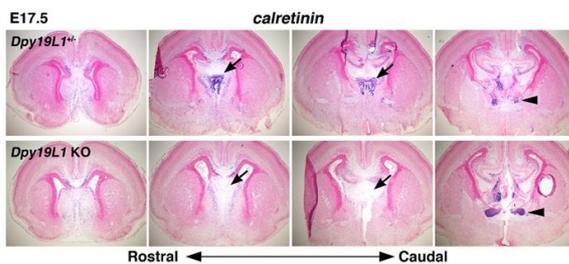


図 6: 胎生期 Dpy19L1 KO マウスにおける後方中隔核の形成異常。胎生(E)17 日目の calretinin の ISH 像。上段: Dpy19L1 ヘテロマウス、下段: Dpy19L1 KO マウス。KO マウスにおいて、予定 TS 領域に calretinin 陽性細胞が観察されず(矢印)、また後方レベルにおいては、陽性細胞の異常な蓄積がみられた(矢頭)。

しかしながら、TS、BAC ニューロンの発生起源および発生パターンについては、これまで明らかになっていなかったため、分布異常がみられた calretinin 陽性細胞、さらには TS、BAC ニューロンの細胞系譜を明らかにするために、下記(3)の実験を行った。

(3) 恐怖・不安行動に関与する後方中隔核の発生様式の解析

後方中隔核の発生起源の解析

TS、BAC ニューロンの発生起源を調べるため、calretinin 陽性細胞の分布を様々な発生段階で観察した結果、E17.5 において間脳前方端の Thalamic eminence (TE) とよばれる領域から将来の TS、BAC 領域に向けて大きな細胞集団の stream が存在することがわかった(図. 7)。そこで、子宮内 electroporation 法により、E12.5 の TE に GFP プラスミドを導入し、2-14 日目に組織切片を作製し、GFP 陽性細胞の分布を観察した。その結果、多くの GFP 陽性細胞が生後 7 日目の TS および BAC に分布することが明らかになった(図. 8, 9)。さらに、TE から第 3 脳室の腹側部を前方に移動し、終脳領域に進入した後、背側方向に後方中隔核まで移動する経路が示唆された(図. 8)。次に、GFP を導入した E17.5 のマウス脳からスライス切片を作製し、GFP 陽性細胞の挙動をタイムラプス観察した結果、中隔核領域で背側方向に移動している細胞が観察された。これらの結果から、後方中隔核の TS、BAC ニューロンは thalamic eminence (TE) で誕生し、前方に長い距離を移動し、終脳の中隔核に加わることを見出した(図. 10)。一方、外側・内側中隔核など他の中隔核ニューロンは終脳内で産生されることが明らかにされている(Wei et al., Neuroscience, 2012)。これらの結果から、中隔核が終脳、間脳両方の前駆細胞から形成されることを明らかにしたものであり、このことがより複雑な神経回路網の構築に関わっている可能性が考えられる。

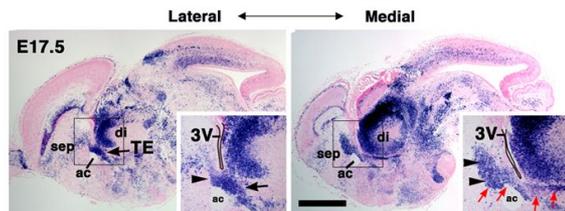


図 7: 胎生(E)17 日目矢状断における calretinin の ISH 像。間脳前方端 thalamic eminence (矢印) から第 3 脳室の腹側をくぐり(赤矢印)終脳の中隔核領域(矢頭)にまで伸びる calretinin 陽性細胞の集団が観察された。

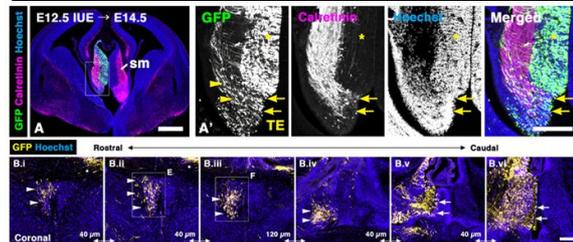


図 8: 子宮内エレクトロポレーション法による TE 由来細胞の系譜解析。(A) 胎生(E)12 日目の TE に GFP プラスミドを導入し、48 時間後に GFP の免疫染色を行った。Calretinin でラベルされる TE に GFP が導入されていることがわかる(矢印)。(B) GFP 導入後、6 日後の GFP 陽性細胞の分布。間脳 TE (矢印) から前方へ移動し、終脳に進入している GFP 陽性細胞(矢頭)が観察された。

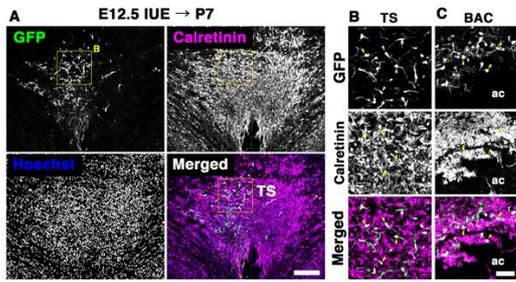


図 11:胎生(E)17 日目の netrin シグナル分子の発現パターン。(A)冠状断。calretinin 陽性細胞における netrin レセプター-unc5c の発現。(B)矢状断における netrin 1 の発現パターン。netrin 1 は前方に移動する calretinin 陽性細胞の周囲に発現する。

図 9: 子宮内エレクトロポレーション法による TE 由来細胞の系譜解析。胎生(E)12 日目の TE に GFP プラスミドを導入し、2 週間後に後方中隔核における GFP 陽性細胞の分布を検討した。TS、BAC 共に TE 由来の GFP 陽性細胞が分布することがわかった。

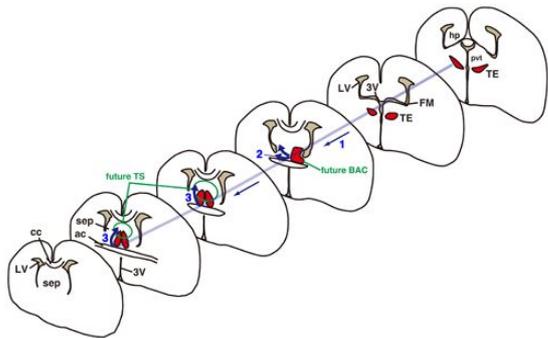
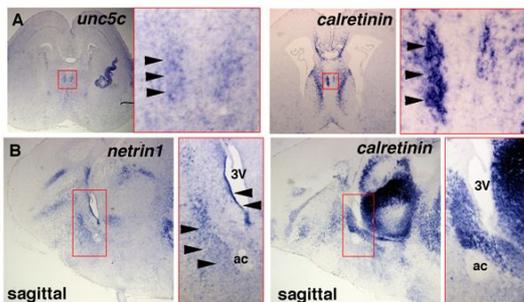


図 10: TE 由来細胞の移動経路。間脳 TE で産生された神経細胞は前方へ移動し (1)、終脳-間脳境界領域を越え、終脳領域へ進入する。その後前交連に接する位置で BAC を形成し(2)、さらに背側へ移動し TS ニューロンへと分化する(3)。

TS、BAC ニューロンの移動制御の解析

近年、Dpy19L1 がガイダンス分子 netrin 1 のレセプターの一つである unc5a へ糖鎖修飾することで、netrin シグナルに関わることが報告された (Shcherbakova et al., PNAS, 2017)。そこで、TS、BAC ニューロンの移動が netrin 1 に制御されている可能性について検討した。ISH により、netrin シグナル分子の発現パターンを観察した結果、E14.5 の TE で unc5c レセプターが発現し、さらに E17.5 の移動する calretinin 陽性細胞においても発現がみられた (図. 11A 矢頭)。また netrin 1 が TS、BAC ニューロンの calretinin 陽性細胞の前方移動の経路を取り囲むように発現していることがわかった (図. 11B 矢頭)。これらの結果から、netrin 1 が TS、BAC ニューロンに関わる可能性が示唆された。



これまで Dpy19L1 が生来の恐怖行動に関わることを明らかにしてきたが、本研究により、Dpy19L1 が恐怖・不安行動に関わる TS、BAC 領域の発生に関わることが示された (実験 (2))。また、TS、BAC ニューロンの発生起源が終脳ではなく、間脳 TE にあり、前方への長距離移動を経て、中隔核に到達することを明らかにした (実験(3))。以上の結果から、Dpy19L1 は TE からの TS、BAC ニューロンの移動を制御することで、中隔核の形成に関わっていることが示唆された。また、この移動にガイダンス分子 netrin シグナルが関わる可能性が示された (実験(4))。さらに、invitro 実験で Dpy19L1 が軸索伸展を制御していることを明らかにしたため、Dpy19L1 は細胞移動、軸索伸展時の形態形成に関わることが示唆された (実験(1))。

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)

Watanabe K*, Bizen N, Sato N, Takebayashi H. Endoplasmic reticulum-localized transmembrane protein Dpy19L1 is required for neurite outgrowth. PLOS ONE 11, e0167985, 2016. (査読あり)*責任著者

Nagashima H*, Sugahara F, Watanabe K, Shibata M, Chiba A, Sato N. Developmental origin of the clavicle, and its implications for the evolution of the neck and the paired appendages in vertebrates. J. Anat. 229, 536-482, 2016.

Nakashima M, Saito H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N*. Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Ann. Neurol. 78, 375-386, 2015.

[学会発表] (計 5 件)

渡辺 啓介, 佐藤 航士, 竹林 浩秀, 佐藤 昇. 「恐怖・不安行動に関わる後方中隔核の新たな産生領域。」第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、日本医科大学 (東

京都武蔵野市) 2018年3月28~30日.

渡辺 啓介、備前 典久、佐藤 昇、竹林 浩秀 . 「 Endoplasmic reticulum-localized transmembrane protein Dpy19L1 is required for neurite outgrowth.」 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎大学(長崎県長崎市) 2017年3月28~30日.

Keisuke Watanabe, Li Zhou, Norihisa Bizen, Rie Natsume, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Noboru Sato, Hirohide Takebayashi. 「 Transmembrane protein Dpy19L1 is required for development of the septal nucleus.」 第39回日本神経科学会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016年7月20~22日.

渡辺 啓介. 「Dpy19L1による中隔核形成と恐怖行動への関与.」 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市) 2016年3月28~30日.

渡辺 啓介、周 麗、備前 典久、夏目 里恵、阿部 学、崎村 建司、竹林 浩秀、佐藤 昇. 「哺乳類大脳形成における膜タンパク質 Dpy19L1 の役割とその分子機能の解明.」 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、一ツ橋大学学術総合センター(東京都千代田区一ツ橋) 2015年12月17~19日.

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 啓介 (WATANABE, Keisuke)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：20446264