

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08192

研究課題名(和文) 社会性行動に関与するオキシトシンのCAPS依存的分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) The investigation of CAPS2-dependent secretion of oxytocin

研究代表者

篠田 陽 (SHINODA, YO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80403096

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)：本研究では、CAPSタンパク質がオキシトシン(OXT)の分泌に寄与するかどうかを明らかにすることを目指している。本研究期間において CAPS2 KOマウスの血中OXT濃度が野生型マウスに比べて減少し、脳下垂体中のOXTレベルが増加していること、CAPS2 dex3マウスにおいても同様の傾向が見られたこと、CAPS2 dex3マウスではOXTの発現と軸索終末への輸送には影響がないこと、OXTニューロンはCAPS1とCAPS2の両方を発現しているもの、それぞれ1つしか発現していないもののヘテロな集団であること、CAPS1 OXTcKOマウスの社会性が亢進していること、などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate whether CAPS protein contributes oxytocin (OXT) secretion. In this projects' period, we observed that 1: OXT level was significantly reduced in blood and increased in pituitary in Caps2 KO mice. 2: Similar tendency were observed in Caps2 dex3 mice. 3: The expression and subsequent transportation of OXT into axon terminal in Caps2 dex3 mice were identical to WT. 4: OXT neurons were heterogeneous population, some of them expressed both CAPS1 and 2 but another expressed CAPS1 or 2. 5: OXT neuron specific Caps1 cKO mice showed significant increasing of sociality. Taken together, these result suggest that both CAPS1 and CAPS2 are possibly involved in OXT secretion.

研究分野：神経科学

キーワード：CAPS oxytocin

1. 研究開始当初の背景

オキシトシン (OXT) は視床下部の室傍核および視索上核で合成され、脳内及び脳下垂体後葉で分泌される、9個のアミノ酸からなる分泌性神経ペプチドである (Insel, *Neuron*, 2010)。OXT はホルモンとして子宮筋の収縮や射乳、神経伝達物質として多幸感、信頼感や安心感に影響を与えているとされ、動物の社会性行動や性行動、共感等に関係すると考えられているが、その分泌制御機構はほとんど明らかにされていない。

申請者はこれまで、Calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS) という小胞分泌関連タンパク質を中心として、神経終末における小胞分泌のメカニズム研究を行ってきた。ほ乳類の CAPS には2つのアイソフォーム (CAPS1, CAPS2) が存在しており、ノックアウト (KO) マウスの解析により、これまでに CAPS2 が分泌性栄養因子の一つである脳由来神経栄養因子 BDNF の分泌を促進的に制御していることを明らかにしている (Shinoda *et al.*, *PNAS*, 2011, Sadakata *et al.*, *PNAS*, 2012)。近年、CAPS が OXT の血中分泌部位である脳下垂体 (PIT) 後葉特異的に発現し、OXT と強い共局在性を示すことを見いだした。そこで申請者は、CAPS が OXT 分泌を制御している可能性に注目し、CAPS をターゲットとした OXT の分泌メカニズム解析を行う研究を着想した。

2. 研究の目的

CAPS1 flox, OXT-Cre, CAPS2 KO, CAPS2 exon3 skipped (dex3) マウスを用い、CAPS タンパク質依存的 OXT 分泌機構を明らかにする。

- ・ CAPS の OXT 分泌活性への寄与：マウスの血中及び脳下垂体 OXT 濃度の定量解析
- ・ CAPS の OXT 分泌部位・確率への寄与：OXT 分泌の時空間・速度論的解析
- ・ CAPS 依存的 OXT 分泌と社会性行動：光遺伝学的手法による行動解析

OXT 分泌活性と CAPS の関係を明らかにするために、CAPS1 cKO (CAPS1 flox マウスと OXT-Cre マウスを交配させることで作製。OXT 細胞特異的に CAPS1 を KO する)、CAPS2 KO, CAPS2 dex3 マウスについて、血中及び脳下垂体の OXT 濃度を ELISA 法により測定し、コントロールマウス (CAPS1 flox または WT マウス) と比較する。CAPS が OXT 分泌に関与する場合、KO マウスに

おいて血中 OXT 濃度は低下すると考えられる。また、脳下垂体における OXT 濃度は、合成と下垂体への輸送が正常な場合は分泌されずに蓄積している可能性がある。逆に合成や輸送に異常がある場合は減少していると考えられる。

OXT の時空間・速度論的分泌への CAPS の寄与を評価するため、まず OXT 細胞の培養系を確立し、CAPS と OXT の細胞内分布を免疫組織化学により明らかにする。さらに超解像度顕微鏡 (PALM/dSTORM) を使用し、より詳細な細胞内分布を解析する。OXT の動的分泌過程の解析については、OXT に pH 応答性蛍光タンパク質を融合し、これを OXT-Cre マウスから調製した初代培養 OXT 細胞に遺伝子導入することで、OXT 細胞特異的に OXT-pHluorin を発現させ、蛍光タイムラプスイメージングにより時空間・速度論的 OXT 分泌アッセイを行う。OXT-Cre マウスと CAPS2 KO または CAPS1 flox マウスを予め交配しておくことで、CAPS1, CAPS2 存在・非存在下での OXT 分泌を、軸索・樹状突起それぞれの部位で蛍光強度の時空間的增加により比較する。

CAPS2 依存的 OXT 分泌とそれが寄与する社会性行動を明らかにするために、CAPS1 cKO または CAPS2 KO の OXT-Cre マウスの室傍核 (PVN) または視索上核 (SON) にチャネルロドプシン (ChR2) 発現ベクターを適用し、OXT 細胞特異的に ChR2 を発現させる。ChR2 は光活性型イオンチャネルであり、これを発現した神経細胞を光刺激により活性化することができる。そこで ChR2 を発現した PVN, SON 細胞を光刺激装置により刺激しながら社会性行動を観察することで、CAPS1, CAPS2 存在・非存在下における PVN, SON 各々の部位に由来する OXT 分泌依存的な社会性行動 (母性行動、社会的相互作用、共感行動等) を評価し、CAPS が関与する OXT 分泌とその社会性行動への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

以下の点に焦点を絞り研究を遂行する。

- ① CAPS KO マウスにおける血中・脳下垂体 OXT 濃度の定量解析
CAPS の OXT 分泌への寄与を明らかにするために、CAPS1 cKO (OXT-Cre), CAPS2 KO および CAPS2 dex3 マウスから心臓採血で得た血液を

遠心し、血漿に含まれる OXT の濃度を ELISA kit を用いて定量、コントロールマウスと比較する。また、CAPS 欠損により分泌が抑制されているのであれば、脳下垂体には OXT が蓄積されている可能性がある。そこで脳下垂体のホモジネートでも同様の実験を行い、分泌されずに蓄積された OXT 量を測定する。

② OXT 細胞の高効率分散培養系の確立と免疫組織化学

OXT の細胞内局在、及び OXT 分泌の蛍光タイムラプスイメージングを行うために、OXT 産生細胞を高効率に培養する分散培養系を確立する。これまでラットの視床下部分散培養によって OXT ニューロンを培養できることが報告されているが (Kusano *et al.*, *J Neuroendocrinol.*, 1999)、マウスでの報告はまだない。そこで、ラットの系を参考にして、BDNF、LIF、CNTF といった栄養因子や阻害因子を培地に添加、および浸透圧等を調節する事で、マウス由来 OXT 細胞の分散培養系を確立させる。分散培養系が確立したら、これを用いて CAPS 及び OXT の細胞内分布を免疫組織化学で明らかにする。さらにこれを超解像度顕微鏡において高精細に観察を行う。

③ OXT 分泌の蛍光タイムラプスイメージング用プローブの開発

OXT 分泌の時空間・速度論的解析を行うため、OXT に pH 応答性蛍光タンパク質を融合 (OXT-pHluorin: OXT は短いペプチドであるため、融合タンパク質の正常な発現及び分泌小胞への輸送が困難な場合、OXT のプレプロ体に含まれるニューロフィジン 1(NP1)に pHluorin を融合) したものを作成する。

④ OXT 分泌の蛍光タイムラプスイメージングによる時空間・速度論的解析

CAPS1 cKO、CAPS2 KO および WT マウスより調製した培養 OXT 産生細胞に、上述の pEFBos-DIO-OXT(NP1)-pHluorin を遺伝子導入し、軸索、細胞体、樹状突起部位における OXT(NP1)-pHluorin の分泌を解析する。脱分極刺激としては電気刺激および高 KCl による脱分極刺激を用いる。刺激周波数や KCl の濃度を段階的に変化させた際に観察される OXT の分泌イベントを比較することで、OXT 分泌への CAPS の寄与を時空間・速度論的に解析する。

⑤ 光遺伝学的手法による、OXT 細胞の光活性化下における社会性行動解析

CAPS1 cKO、CAPS2 KO(Cre)、WT(Cre)マウスの PVN または SON に、AAV-EF1a-DIO-hChR2 (Vector Core より入手)を導入し、Cre 陽性 OXT 細胞特異的に ChR2 を発現させる。無線光刺激装置 (バイオリサーチセンター社製テレオプト) をステレオタクシスにより脳に設置・固定し、一定期間順応させた後に社会性行動解析を行い、行動中における光刺激の有無と行動および CAPS 遺伝子の相関を解析する。

4. 研究成果

① CAPS KO マウスにおける血中・脳下垂体 OXT 濃度の定量解析

CAPS タンパク質の OXT 分泌への寄与を明らかにする目的で、CAPS1 cKO、CAPS2 KO、CAPS2 exon3 skipped (dex3) マウスにおける血中および脳下垂体 OXT 濃度の測定を行なった。CAPS1 cKO における OXT 濃度測定は安定して行うことができず、データを得ることができなかったが、CAPS2 KO および CAPS2 dex3 マウスについてはデータが得られたため、それを以下に示す。

CAPS2 KO マウス血漿中の OXT 濃度は WT に比べ有意に低下していた (図 1)。逆に、脳下垂体中の OXT は CAPS2 KO で有意に増加していた (図 2)。

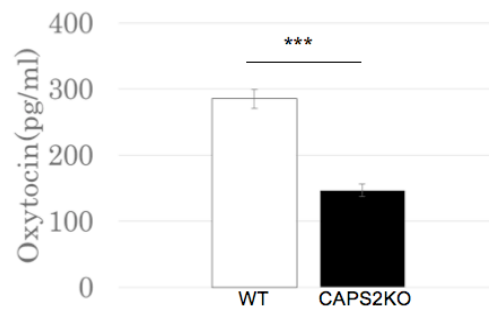


図 1 血漿中 OXT 濃度

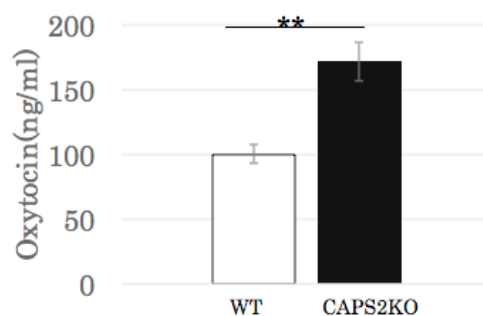


図 2 脳下垂体中の OXT 濃度

次に CAPS2 のドメインの中で軸索輸送に関与

していることが知られている exon3 の領域を欠損した CAPS2 dex3 マウスについて同様の実験を行なったところ、CAPS2 KO マウスの場合と同様に血漿中 OXT 濃度は WT に比べて有意に減少し (図 3)、脳下垂体中の OXT 濃度は増加する結果となった (図 4)。

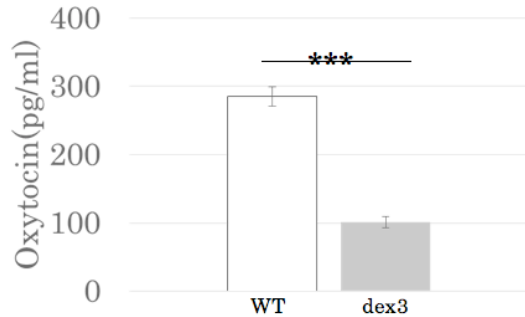


図 3 血漿中の OXT 濃度

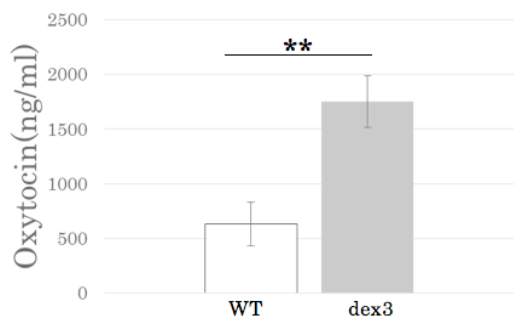


図 4 脳下垂体中の OXT 濃度

CAPS2 dex3 マウスにおいては軸索輸送が障害されると考えられたため、脳下垂体への OXT 分泌小胞の輸送自体が低下し、脳下垂体中の OXT 濃度は WT に比して低下することが予想されたが、CAPS2 KO マウスと同様に OXT 濃度が増加する結果となったため、次に脳下垂体の免疫染色を行うことで、OXT の輸送について検討を行なった (図 5)。

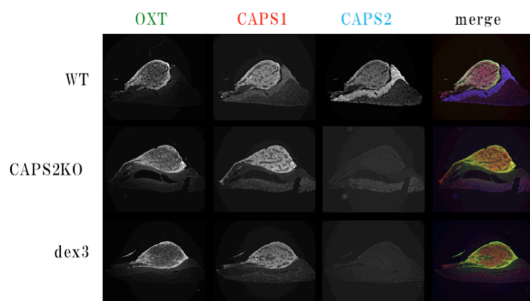


図 5 脳下垂体の免疫組織化学

CAPS2 KO および CAPS2 dex3 マウスの脳下垂体においては CAPS2 の免疫陽性反応は観察されなかったが、OXT の免疫陽性反応は WT と同様に検出された。すなわち、CAPS2 dex3 マウ

スにおいては OXT の軸索輸送はほぼ正常に行われており、CAPS2 dex3 により血中への OXT 分泌が障害されていることが示唆された。

② OXT 細胞の高効率分散培養系の確立と免疫組織化学

OXT 細胞の分散培養はラットで報告されていた (Kusano *et al.*, *J Neuroendocrinol.*, 1999) ため、同手法をマウスに適用し、OXT 細胞の分散培養系の確立を試みた。細胞を摘出する時期、タンパク質消化に用いる酵素の種類、培地及びその添加物など種々の条件検討を行なったが、残念ながらマウスから OXT 細胞の分散培養系を確立することはできなかった。

OXT 細胞が CAPS1 及び CAPS2 を発現しているかどうかを明らかにする目的で、視床下部室傍核切片を作成し、OXT, CAPS1, CAPS2 抗体により 3 重染色を行なったところ、OXT 細胞のうち一部は CAPS1, 2 の両方を発現し、他は CAPS1 のみあるいは CAPS2 のみを発現していることが示唆された (図 6)。

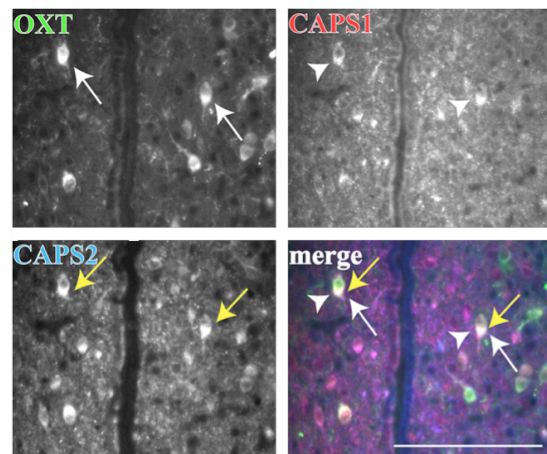


図 6 室傍核の OXT, CAPS1, CAPS2 免疫染色

超解像度顕微鏡による分布観察については、分散培養系の確立が困難であったため断念した。

③ OXT 分泌の蛍光タイムラプスイメージング用プローブの開発

OXT 分泌のタイムラプスイメージングに用いる目的で、pCAGGS-MCS にゲノムライブラリより取り出した OXT およびプレプロ体に含まれる NP1 をクローニングし、pHluorin を結合したものを作成した。C6 細胞に遺伝子導入したところ緑色蛍光が観察されたため、OXT 分泌のタイムラプスイメージング用プローブとして利用可能であると判断した。

④ OXT 分泌の蛍光タイムラプスイメージングによる時空間・速度論的解析

OXT 細胞の分散培養系の確立ができなかったため、タイムラプスイメージングによる OXT 分泌の時空間・速度論的解析に至ることができなかった。

⑤ 光遺伝学的手法による、OXT 細胞の光活性化下における社会性行動解析

光遺伝学的手法により OXT 細胞を光活性化し、CAPS1 発現細胞による OXT 分泌で社会性行動にどのような影響が見られるかを検証する目的で、CAPS1-flox/OXT-Cre マウスの室傍核にステレオタクシスを用いて Cre 依存的に ChR2-mCherry を発現するアデノ随伴ウイルス AAV5-DIO-ChR2-mCherry を導入・発現させることを試みた。まず OXT 発現細胞特異的に Cre リコンビナーゼが発現しているかどうかを明らかにするために、OXT-Cre マウスの室傍核を Cre 及び OXT 抗体で染色を行なった結果、全ての OXT ニューロンが Cre を発現していることが示唆された (図 7)。

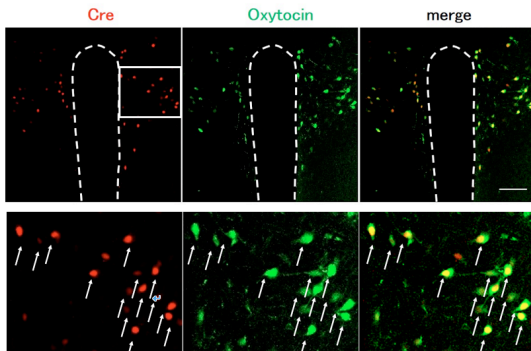


図 7 OXT-Cre マウス室傍核における Cre と OXT の免疫染色

次にステレオタクシスによる AAV 注入と発現が目的通りに行われているかどうかを確認するために、OXT-Cre マウスに AAV5-DIO-ChR2-mCherry を導入し、mCherry の発現を指標にして解析を行なったところ、PVN の領域 Cre 発現と同等の位置に、mCherry の発現が認められた (図 8)。

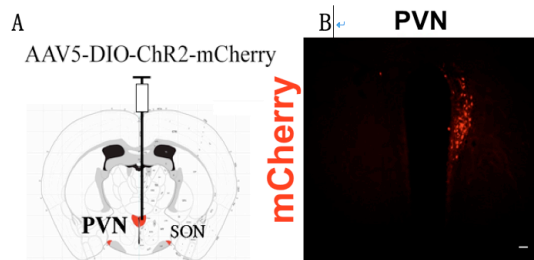


図 8 PVN への AAV 注入模式図(A)と PVN にお

ける mCherry の発現(B)。

これらにより、PVN の Cre 発現 OXT 細胞特異的に AAV による ChR2-mCherry を発現させることが可能となった。

次に OXT 細胞特異的 CAPS1 cKO における社会性行動を評価する目的で、OXT-Cre マウスと CAPS1-flox マウスを交配し、OXT 細胞特異的 CAPS1 cKO (CAPS1 OXTcKO) マウスを作成した。OXT 発現細胞について WT と比較したところ、OXT 発現細胞数は大きな変化が見られなかった (図 9)。

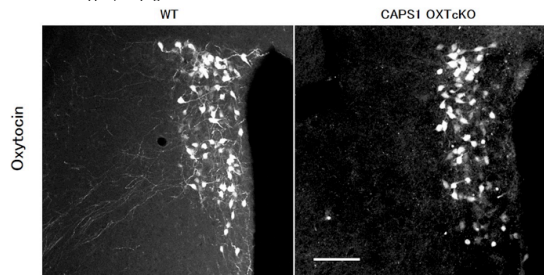


図 9 WT 及び CAPS1 OXTcKO における OXT 陽性細胞

このマウスを用いて社会性行動を 3 チャンバーテストを用いて評価したところ、興味深いことに CAPS1 OXTcKO マウスにおいて WT に比べて社会性行動が亢進していることが示唆される結果が得られた (図 10)。

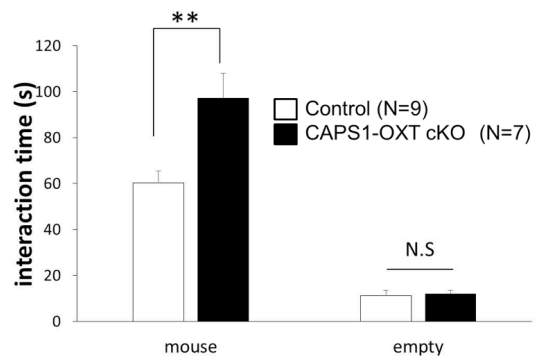


図 10 社会性行動の評価

今後はこれらの手法を合わせ、CAPS1 依存的 (CAPS2 flox マウスを用いることで CAPS2 依存的) な OXT 分泌と社会性行動への寄与について明らかにしていく予定である。

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 2 件)

① Yagishita K, Suzuki R, Mizuno S,

Katoh-Semba R, Sadakata T, Sano Y, Furuichi T and **Shinoda Y**. *Neurosci. Lett.* (2017) 661, 121-125. CAPS2 deficiency affects environmental enrichment-induced adult neurogenesis and differentiation/survival of newborn neurons in the hippocampal dentate gyrus. (査読有) DOI:10.1016/j.neulet.2017.09.047

②Sadakata T, **Shinoda Y**, Ishizaki Y and Furuichi T. *Neurosci. Lett.* (2017) 639, 88-93. Analysis of gene expression in Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 (Cadps2) knockout cerebellum using GeneChip and KEGG pathways. (査読有) DOI: 10.1016/j.neulet.2016.12.068

[学会発表] (計 2 件)

① Haruka Minami, Ryosuke Yamaga, **Yo Shinoda**, Kenji Sakimura, Manabu Abe, and Teiichi Furuichi. Conditional knockout and optogenetic study on the involvement of the secretion-related protein CAPS1 in oxytocin-associated social and maternal behavior. *58th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry*. Poster. (SONIC CITY-HALL, Saitama, Japan) Sep, 11th, 2015 (1P-11)

② Haruka Minami, Ryosuke Yamaga, **Yo Shinoda**, Kenji Sakimura, Manabu Abe, and Teiichi Furuichi. Conditional knockout and optogenetic study on the involvement of the secretion-related protein CAPS1 in oxytocin-associated social and maternal behavior. *Neuroscience 2015*. Poster. (Kobe convention center, Japan) Jul, 30th, 2015 (3P345)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 陽 (Shinoda, Yo)

東京薬科大学・薬学部公衆衛生学教室・講師

研究者番号： 80403096