

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15350

研究課題名（和文）ナトリウム利尿ペプチドの臨界期制御における役割の解明

研究課題名（英文）Analysis of the role of natriuretic peptides in neuronal mechanism of critical period

研究代表者

中森 智啓（Nakamori, Tomoharu）

北里大学・一般教育部・助教

研究者番号：50725348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ナトリウム利尿ペプチドファミリーが、幼少期学習のモデルである鳥類の視覚を使った刷込み行動の臨界期の制御機構にどのように関与しているのかを調べた。CNP3と呼ばれるペプチドは受容体のNPR1を介して神経細胞の可塑性を上昇させることで、臨界期の開始機構に関与している事が示唆された。またペプチドA（名称未公開）は受容体のNPR3を介して神経細胞の可塑性を低下させることで、臨界期の終了や刷込み記憶の保持機構に深く関与していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、幼若期における高い神経可塑性の分子メカニズムの一端が明らかになった。神経疾患や脳障害で失った高次機能の回復は、外科的・薬理的な治療と並んで神経回路の再構築が重要なプロセスの1つである。しかしながら、個体成熟後における神経回路の再構築は困難である。その原因として成熟後の脳神経細胞では可塑性が低下していることが挙げられる。幼少時に見られる神経系の可塑的变化が起こり易い状態を再現させることは、高次機能回復法の発見にとって必要不可欠である。そのため、臨界期制御のメカニズムの研究は基礎研究だけでなく臨床応用に向けても重要な意味を持つ。

研究成果の概要（英文）：We investigated how the natriuretic peptide family is involved in the neuronal mechanism of critical period of avian visual imprinting behavior, which is a model for early childhood learning. It was suggested that a peptide called CNP3 has a role in the initiation mechanism of the critical period by increasing the plasticity of nerve cells via activation of the receptor NPR1. It was also found that peptide A (unpublished) is deeply involved in the end of the critical period and the retention mechanism of imprinted memory by reducing the plasticity of nerve cells via activation of the receptor NPR3.

研究分野：神経科学

キーワード：刷込み行動 神経可塑性 臨界期 幼若期学習

1. 研究開始当初の背景

生物の発達過程において、様々な機能を司る神経細胞の構造・機能の変化しやすさ(可塑性)が高まる時期「感受性期又は臨界期」が存在する。臨界期制御の神経基盤は、よい実験モデルが少なく十分には理解が進んでいない。鳥類の「刷込み行動」は、成立可能な臨界期を持ち(ニワトリ雛では孵化後1~4日目)、短時間の刺激により学習が成立する点等から、脳神経系に大きな可塑的变化を引き起こすと考えられており、臨界期における神経可塑性の発現の制御メカニズムを調べる上で重要な学習モデルである(Horn, Nat. Rev. Neurosci., 2004)。

鳥類の視覚的刷込みの際に活動する終脳内神経経路において、NR2Bを持つNMDA受容体は臨界期終了後に比べ臨界期中で高い発現が見られ、その活動が刷込み学習時における長期増強現象の誘導に必須であった。また、神経ペプチドのコレシストキニンや神経栄養因子のBDNFの発現や、神経経路内の抑制性細胞の活動が、臨界期可塑性に重要な働きを持つことが分かっていた。しかしながら、臨界期の制御メカニズムの全容を解明するためには、臨界期制御に関わる遺伝子の網羅的な探索が必要不可欠であった。

そこで、ニワトリ雛の脳における遺伝子の発現部位や、発育に伴う発現量の変動などを網羅的に調べ、臨界期の制御に関わる有力な候補遺伝子として、ナトリウム利尿ペプチドファミリー(NPs)に注目した。NPsは血管拡張作用やナトリウム利尿作用があることが知られる数種類のペプチドで構成されており(鳥類ではRNP, BNP, CNP1, CNP3, CNPPなど)、受容体は3種類知られていた。NPsの心臓や腎臓における生理作用に関しては研究が進んでいるものの、脳神経細胞における作用は未解明な点が多く、特に臨界期の制御における役割については全く分かっていなかった。そこで、NPsや受容体の脳内における発現解析を行ったところ、刷込みに重要な脳神経経路においてペプチドや受容体の遺伝子の発現が確認できた。また、C型のナトリウム利尿ペプチド3(CNP3)は刷込みの臨界期中の方が臨界期終了以降よりも、脳における遺伝子の発現量が高いことが分かった。このことから、NPsは刷込みの臨界期に制御機構に関わる重要な因子であることが見込まれ、しかも従来知られている生理作用とは異なるメカニズムによって、臨界期を制御している可能性があった。そのため、脳神経細胞におけるNPsの未だ知られていない機能を解明し、臨界期の制御機構におけるNPsの役割を理解することは、幼若期における神経の可塑性発現の全く新しい分子メカニズムの発見に繋がる可能性が非常に高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、成立可能な時期(臨界期)が限定されている鳥類の刷込み行動を学習モデルとして用い、ナトリウム利尿ペプチドファミリー(NPs)の臨界期制御における役割を調べ、幼若期における神経可塑性の新たな神経基盤の発見を目指す。具体的には下記の解析を行った。

- 1) NPs及びその受容体の、ニワトリ雛の脳における詳細な発現解析を行った。
- 2) NPsや受容体の発現を変異させた個体の作製、あるいは薬理的な手法を用い、刷込みの臨界期制御におけるNPsの役割を検証した。
- 3) NPsが関わる神経の可塑的变化の分子メカニズムを調べた。

3. 研究の方法

臨界期の制御機構におけるNPsの役割を解明するため、研究期間内には、まずNPsや受容体の、脳内における詳細な発現部位や細胞の種類を特定を行い、また、刷込み成立に伴うNPs及び受容体の遺伝子発現量の変動を調べた。次に、発現解析で得られた結果をもとに、刷込み行動の成立過程や記憶の固定におけるNPsの働きを薬理的あるいは行動学的に調べた。さらに、NPsの脳神経細胞の形態変化における役割を脳スライス培養を用いて調べた。具体的な研究方法は以下の通りである。

・NPs及びその受容体の、ニワトリ雛の脳における詳細な発現解析

NPs及び受容体の終脳における発現分布をin situ hybridization法によって詳細に調べた。また、NPs及び受容体を発現している細胞が、興奮性あるいは抑制性の神経細胞に発現しているかどうかを、それぞれの特異的な遺伝子マーカーとの共染色によって調べた。また、ミラー切片(厚さ6µm)を作成し、各ペプチドを受容体と同じ細胞に発現しているかを調べた。

・刷込み行動の成立過程や記憶の固定におけるNPsの働き

CNP3及びペプチドAを、刷込み学習前にVW領域へ注入し、刷込み成立の効率が変化するかを行動学的に調べた。また、刷込み成立後に各ペプチドを注入した場合、刷込み記憶の維持期間にどのような影響が出るのかを調べた。

・NPsの脳神経細胞の形態変化における役割

ペプチドAはニワトリ胚時期には脳内での発現が観察されなかった。一方で受容体NPR3は胚時

期においても脳内で発現していた。そのため、8日胚の脳スライスを用い、ペプチドAの神経細胞の形態変化に与える影響を調べた。神経細胞の標識にはGFP発現ベクターを用い、共焦点顕微鏡で神経細胞形態を観察し、樹状突起及び軸索の数や長さにペプチドA付与群と非付与群で違いがあるかを調べた。また、受容体NPR3のRNAiベクターを導入したスライスにおいて同様の検証を行い、ペプチドAで引き起こされた神経細胞の形態変化がNPR3を介して起こったものであるかを調べた。

4. 研究成果

本研究課題は、ニワトリ雛の視覚的刷込み行動をモデルとして使用し、幼少期学習における神経細胞の可塑的な変化の分子メカニズムにおける、ナトリウム利尿ペプチドファミリー(NPs)の役割を解明することを目的として行われた。特に、鳥類の刷込み学習にとって重要な脳部位である、終脳にあるvisual Wulst(VW;哺乳類の視覚野に相当)におけるNPs及びその受容体(NPR)の働きについて調べた。

・NPs及び受容体の発現解析

NPsの中でもCNP3と、NPsと類似の配列を持つペプチドA(名称非公表)と呼ばれる遺伝子は、発現細胞が刷込み成立に重要である終脳のvisual Wulst(VW)に集中しており、CNP3は刷込み成立が可能な臨界期(孵化1~4日後)における遺伝子発現量は臨界期後(孵化5日後以降)よりも高く、一方でペプチドAの発現量は臨界期中よりも臨界期後の方が高いことが分かった。また、受容体NPR1,2,3は全て終脳全域に広く分布しており、発達による発現量の変化はなかった。CNP3を発現している細胞とNPRを発現している細胞の詳細な局在解析を行ったところ、CNP3細胞はNPR1及びNPR2は発現しておらず、CNP3細胞の近傍にNPR1、NPR2を持つ細胞が存在することが分かった。また、CNP3発現細胞はGAD65遺伝子を持つ抑制性の神経細胞であることが示唆された。

・刷込み行動の成立過程や記憶の固定におけるNPsの働き

CNP3は主にNPR1、ペプチドAはNPR3を介して受容され細胞内シグナルが伝わる。孵化後1日齢のヒヨコ脳のVW領域あるいは脳室内にCNP3を注入した場合、刷込み学習がより短時間で成立することが分かった。刷込み学習前にVW領域にペプチドAを注入した場合、刷込み成立の効率が低下すること、刷込み学習後にペプチドAを注入した場合は、刷込み記憶の保持を長期化させることが分かった。さらに、刷込み成立からのNPsの発現量の経時変化を調べたところ、CNP3は刷込み成立後すぐに発現量が一過性に上昇し、その後低下した。ペプチドAは刷込み後6時間以降で発現量が増加し、それ以降は発現量が高い状態が1週間以上持続した。

・NPsの脳神経細胞の形態変化における役割

胚時期のヒヨコ脳のスライス培養系を用いて、ペプチドAの付加に対する神経細胞の形態変化への影響を調べたところ、ペプチドAは樹状突起の伸長を抑制する働きがあることが分かった。また、ペプチドAの受容体の発現をRNAiを用いて抑制した場合、ペプチドAによる樹状突起伸長の抑制が起こらないことが分かった。さらに、RNA-seqを行い脳スライスへペプチドAを付加した際に、どのような遺伝子群の発現量変動が起こっているかを解析した。

これらのことから、刷込み行動の臨界期中に高い発現量を持つCNP3は近傍の受容体を持つ細胞に作用し刷込みを促進することが示唆された。また、孵化後に発現量が増加するペプチドAは、刷込みの成立に重要な神経細胞の樹状突起の伸長を抑制することで、神経の可塑性を低下させ、刷込み記憶の固定に関わると共に臨界期を終了へと導いていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Nakamori T, Chiba Y, Fujitani K, Makita A, Okubo T, Hirai K, Takamatsu N, Ohki-Hamazaki H.	4. 巻 1708
2. 論文標題 Characteristic expressions of the natriuretic peptide family in the telencephalon of juvenile chick.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 116-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoharu Nakamori, Yurino Chiba, Haruka Ueno, Ami Makita, Tsugumi Okubo, Kasumi Hirai, Hiroko Ohki-Hamazaki
2. 発表標題 A C-type natriuretic peptide and its receptors in chick brain are involved in the process of visual imprinting
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中森智啓、藤谷和子、千葉ゆりの、上野晴香、牧田愛美、浜崎浩子
2. 発表標題 鳥類の刷込み行動におけるナトリウム利尿ペプチドの役割
3. 学会等名 日仏生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中森智啓、藤谷和子、千葉ゆりの、上野晴香、牧田愛美、浜崎浩子
2. 発表標題 刷込み行動におけるナトリウム利尿ペプチドの働きの解明を目指して
3. 学会等名 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松澤和泉、中森智啓、浜崎浩子
2. 発表標題 ヒヨコの神経の可塑的变化における遺伝子Xの役割について
3. 学会等名 鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamori T, Chiba Y, Ueno H, Makita A, Okubo T, Hirai K, Ohki-Hamazaki H.
2. 発表標題 Analysis of the functional roles of natriuretic peptide family on regulating the critical period of chick visual imprinting.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学 一般教育部生物学 大学院医療系研究科 浜崎浩子グループ
<https://www.clas.kitasato-u.ac.jp/bio/personal/hamazaki/index19a.html>

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------