

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07263

研究課題名(和文) 恐怖・不安を制御する神経回路の発生プログラムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neural circuit development 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生来の恐怖行動を制御する神経回路の発生メカニズムは明らかにされていないことが多い。本研究では、恐怖行動の減弱と恐怖・不安制御に関わる後方中隔核の構築異常を示すDpy19L1 KOマウスの神経回路形成異常について解析を行った。その結果、中枢神経系特異的Dpy19L1 KOマウスにおいて恐怖行動異常、後方中隔核構築異常および脳弓走行異常が観察された。さらに、後方中隔核ニューロン移動には脳弓の適切な走行が必須であること、大脳皮質特異的Dpy19L1 KOマウスの後方中隔核形成異常がわかった。以上の結果から、発生期大脳皮質に発現するDpy19L1が間接的に後方中隔核形成に関わることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物にとって恐怖や不安は極めて重要な情動の一つである。野生動物においては、天敵に対する恐怖は生存にとって必須であるし、ヒトにおいても過度な恐怖・不安は不安症などの障害に繋がり、社会的にも重要視されている。しかしながら、恐怖や不安の神経回路がどのような発生メカニズムで形成されるかはほとんどわかっていない。私達はDpy19L1 KOマウスが人を怖がらないという異常な行動を示すことに注目し、その発生異常の解析を進めてきた。本研究により、Dpy19L1がどのようなメカニズムで恐怖の神経回路発生を制御しているかがわかってきた。

研究成果の概要(英文)：We previously observed abnormal innate fear responses and disorganization of the posterior septum (PS), which is related to fear and anxiety, in Dpy19L1 knockout (KO) mice. In this study, we found that central nervous system-specific Dpy19L1 conditional knockout mice showed abnormal innate fear responses, severe disorganization of the PS, and abnormal projections of the postcommissural fornix. Furthermore, we found that PS neurons utilize the postcommissural fornix as a scaffold for their migration during development. The cytoarchitecture of the PS was disorganized in cortex-specific Dpy19L1 knockout mice. Our results suggest that Dpy19L1 derived from the cerebral cortex regulate development of the PS in an indirect manner during embryonic stages.

研究分野：解剖学

キーワード：中隔核 恐怖行動 Dpy19L1 細胞移動

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、それを解消するための行動をとる。野生動物においては、天敵の脅威から逃れることは生存にとって必須であり、逃避やフリーズなどの行動は恐怖や不安に起因している。ヒトにおいても、過度な恐怖・不安が、恐怖症、または社会不安障害や心的外傷後ストレス障害(PTSD)を含む不安症などの障害に繋がり、社会的にも重要視されている。恐怖情動には動物が生まれつき持つ(生来の、先天的な)恐怖反応が存在し、実験的にはマウスが出会ったこともない捕食者のキツネの匂いを恐れる行動などがあげられる。このことから、生来の恐怖・不安情動の神経回路は、環境によらず、発生期に遺伝子レベルで設計されていると考えられる。近年、光遺伝学などの実験技術の駆使により、恐怖・不安を制御する辺縁系領域、神経回路網について、解明が進んでいきている。しかしながら、恐怖・不安行動を制御する神経回路形成の分子メカニズムについては、ほとんど明らかになっていない。私達は、新規糖転移酵素 **Dpy19L1** ノックアウト (KO) マウスが天敵のキツネの臭いに対して忌避行動を示さないなどの実験結果により、生来の恐怖行動が著しく減弱していることを見出した。さらに KO マウスにおいて、辺縁系の一領域であり恐怖・不安行動に関わる後方中隔核(**posterior septum; PS**) の形成異常がみられることを新たに発見した。これらの結果は、**Dpy19L1** が PS の形成を制御し、さらに成体での先天的な恐怖情動の発現に重要な働きを持っていること、つまり **Dpy19L1** が恐怖情動の回路形成における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。**Dpy19L1** の研究を進めることが、「動物の本能行動が、どのような遺伝的プログラムにより発生制御されているか？」を解き明かすための大きな手掛かりとなると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、「動物個体が示す恐怖行動」と「発生期の神経回路形成メカニズム」両者の関連を遺伝子レベルで理解することを目的とする。その一端として、**Dpy19L1** による中隔核形成と **Dpy19L1** KO マウスが示す恐怖行動異常解析に焦点を絞り、先天的な恐怖行動の神経回路形成の分子メカニズムを明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳領域特異的 **Dpy19L1** cKO マウスの作製。

発生期中枢神経系特異的に、または大脳皮質特異的に **Cre** リコンビナーゼを発現するマウスとしてそれぞれ **Nestin-Cre** マウス、**Neurod6-Cre** マウスを利用した。これらのマウスと **Dpy19L1^{lox/lox}** マウスと交配することで、中枢神経系または大脳皮質特異的 **Dpy19L1** cKO マウスを作製した。

(2) 後方中隔核(PS)と脳弓形成異常の組織化学的解析

マウスを 4%PFA 固定後、凍結切片を作製した。**Calretinin (CalR)**、**L1cam (L1)**抗体を用いた免疫染色、または **CalR** の *in situ hybridization (ISH)* などにより、**Dpy19L1** KO マウスが示す脳構築異常を検討した。

(3) 脳弓形成阻害による PS ニューロンの移動異常についての検討

軸索誘導分子 **Semaphorin3A (Sema3A)** の異所性発現により、脳弓形成阻害実験を試みた。脳弓の走行領域となる胎生 12 日目(E12)海馬に **Sema3A** プラスミドを子宮内エレクトロポレーション法により導入した。その後、E17 に組織切片を作製、PS と脳弓発生について検討した。

(4) **Dpy19L1** cKO マウスの恐怖行動異常の解析

天敵であるキツネの排泄物の臭い成分の一つであるトリメチルチアゾリン (TMT) を用いた忌避反応試験を行った。マウスケージの端に TMT をしみ込ませた濾紙をおき、5 分間のマウスの行動を観察・記録し、TMT に対して忌避反応を示すかを調べた。

(5) 胎生期における R-spondins とそのレセプター LGRs の発現・機能解析

Dpy19L1 シグナル関連分子の候補として **R-spondin** と **LGR4-6** について発現解析を行った。また子宮内エレクトロポレーション法により **LGR6 siRNA** 導入し、機能損失実験を行った。

4. 研究成果

これまでの研究により、以下の点について明らかにしてきた。

1. **Dpy19L1** KO マウスは生来の恐怖行動が著しく減弱している。
 2. **Dpy19L1** KO マウスは恐怖・不安を制御する後方中隔核 (PS) 形成に異常をきたす。
 3. **Dpy19L1** は大脳皮質に強く発現し、軸索伸展を制御する (Watanabe et al., *Development*, 2011; *Plos One*, 2016)。
 4. PS ニューロンは間脳 thalamic eminence (TE) で誕生し、間脳-終脳境界を超えて長距離を移動し、中隔核に加わる(図 1; Watanabe et al., *Sci. Rep.*, 2018)。
- 以上の結果から、大脳皮質に発現する **Dpy19L1** は間接的に PS ニューロンの移動、形成を制御する可能性が示唆された。そこで、PS ニューロンの移動に必須となる大脳皮質由来の構造、および PS 構築における **Dpy19L1** の役割について検討した。

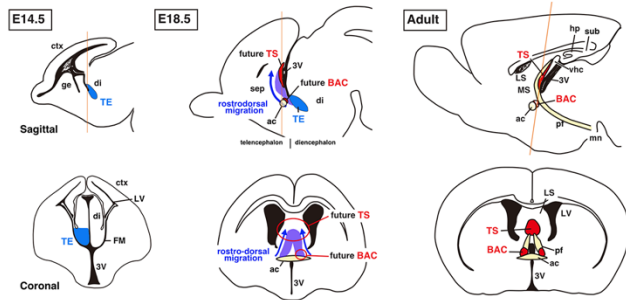


図1
後方中隔核(PS)の発生経路。上段、矢状断; 下段、冠状断。PS (TS, BAC)ニューロンは thalamic eminence (TE)で誕生し、前方に長距離を移動し(青矢印)、中隔核領域へと達する。
TS, 三角中隔核; BAC, 前交連床核; pf, 交連後脳弓; sep, 中隔核; sub; 海馬台; hp, 海馬。

(1) 後方中隔核(PS)ニューロンの移動ガイド機構の解析

胎生期における PS ニューロンの長距離移動をガイドする構造についての解析を行った。

① PS ニューロンの移動経路の組織学的解析

これまでの組織学的解析から、PS ニューロンは海馬台から間脳の乳頭体に投射する交連後脳弓上を移動する可能性が考えられた。そこで Calretinin 陽性 PS ニューロンの局在と脳弓線維(L1 陽性)の走行を比較検討した。その結果、胎生 17 日目 (E17) において、脳弓線維の走行と PS ニューロンの移動経路はほぼ一致することがわかった (図 2)。さらに、子宮内エレクトロポレーション法を用いて、E12 の間脳 TE に GFP plasmid を導入し、E17 に GFP 陽性細胞の分布を検討した。GFP 陽性 PS ニューロンの先端突起は脳弓線維に並行していることが観察された。次に両者について発生段階を追って観察したところ、まず脳弓が形成された後、脳弓線維の伸長方向の反対方向に PS ニューロンが移動を開始することが示された。これらから、**PS ニューロンは先に形成された脳弓に沿って前方に移動し、中隔核領域に達することが示唆された。**

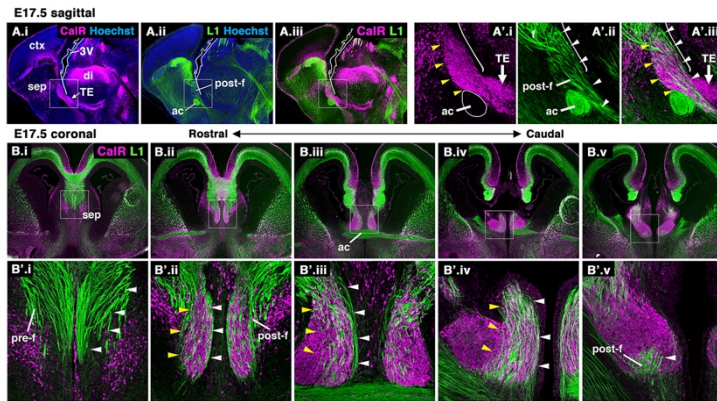


図2
E17.5 における PS ニューロンの移動経路と脳弓の走行パターン。A. 矢状断。B. 冠状断。間脳 TE を起源とする PS ニューロン (CalR 陽性) は、脳弓 (L1 陽性) 上を前方へ移動する (矢頭)。

② 脳弓形成阻害による PS ニューロンの移動異常についての検討

次に PS ニューロンの移動に脳弓線維が必須であるかを明らかにするため、脳弓を欠失させることを試みた。子宮内エレクトロポレーション法により、E12 の海馬領域に反発性ガイダンス分子 Semaphorin3A (Sema3A) を異所性発現し、E17 で組織学的解析を行った。その結果、Sema3A 導入側で L1 陽性の脳弓線維が消失し、脳弓形成が阻害されることがわかった。さらに脳弓欠損側で PS ニューロンの前方移動が著しく阻害され、発生起源の TE 周辺に蓄積することが見出された (図 3)。以上の結果から、**PS ニューロンの領域を超えた長距離移動には先に形成される脳弓線維が足場として必須であることが示唆された (図 4; Watanabe et al., Sci. Rep., 2020)。**

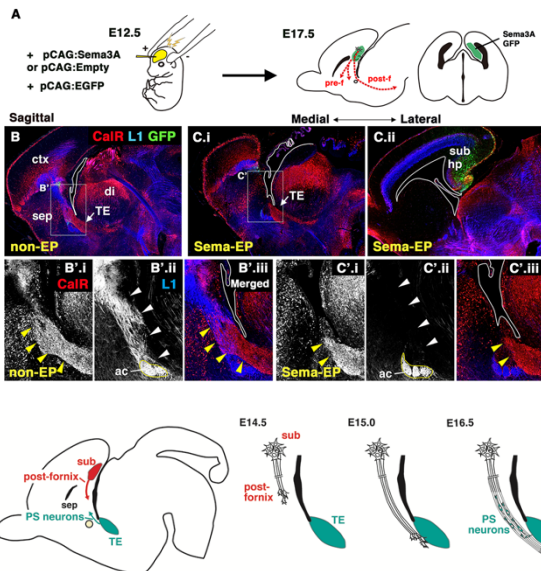


図3
Sema3A 異所性発現による脳弓形成阻害実験。A. E12.5 海馬領域に Sema3A を異所性発現させ、E17.5 に組織学的な解析をした。B. control 側、C. Sema3A 発現側。Control 側では脳弓が正常に形成されているのに対し (B'.ii 白矢頭)、Sema3A 発現側では脳弓の形成が阻害された (C'.ii 白矢頭)。さらに Sema3A 側では PS ニューロンの移動が著しく阻害された (B'.i, C'.i 黄矢頭)。

図4
胎生期において、交連後脳弓は海馬台から間脳乳頭体へ向けて伸張し、PS ニューロンは間脳 TE から中隔核へ前方移動する。脳弓は E15.0 に TE へ達し、PS ニューロンは E15.5 から先に形成された脳弓を足場として移動する。

(2) Dpy19L1 KO マウスにおける脳弓形成異常の解析

これまでの結果から、Dpy19L1 KO マウスに見られる PS 形成異常は、脳弓形成異常が引き金となり、その後起こる PS ニューロンの移動に異常が生じている可能性が考えられた。そこで、胎生期 Dpy19L1 KO マウスにおける脳弓形成を観察した。E15-18 の Dpy19L1 KO において、野生型と比較して脳弓線維の走行に異常が見られた (図 5)。特に野生型では脳弓が PS 発生起源 TE に近接して走行するのに対して、Dpy19L1 KO マウスでは TE と離れて投射していた。また、KO マウスでは脳弓が走行していない位置に PS ニューロンが異所性に蓄積していた。これらの結果から、Dpy19L1 KO マウスでは PS ニューロンの移動に必須となる脳弓の形成に異常が生じていることが明らかになった。

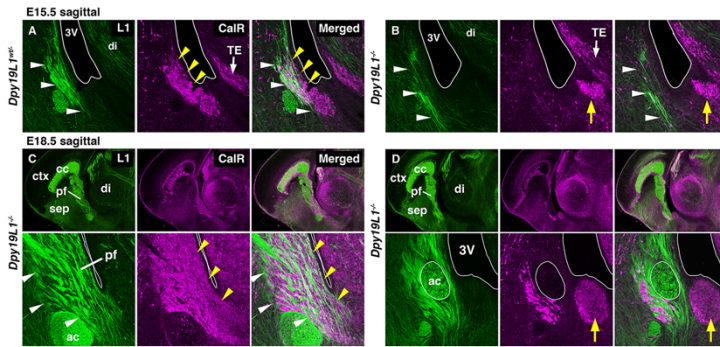


図 5

Dpy19L1 KO マウスにおける脳弓形成異常。A, B. E15.5; C, D. E18.5 矢状断。A, B. control マウス; C, D. Dpy19L1 KO マウス。KO マウスでは交連後脳弓が前交連の物側を走行するなどの形成異常が観察された。また、PS ニューロンが異所性に蓄積されていることも観察された (黄矢頭)。

(3) 中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスの作製と解析

Dpy19L1 は発生期大脳皮質で強く発現するが、胎生期 肺や腎臓など末梢組織にも発現する (Watanabe et al., Plos One, 2016)。また、全身性の Dpy19L1 KO マウスのほとんどが生後一日以内に致死になってしまうため、成体マウスの解析は難しかった。そこで、Dpy19L1 KO マウスで見られた恐怖行動異常および PS 構築異常が中枢神経系に発現する Dpy19L1 に起因するかを調べるため、中枢神経系特異的 Dpy19L1 conditional KO (cKO) マウスを作製、解析した。まず発生期中枢神経系特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Nestin-Cre マウスと Dpy19L1 flox マウスを交配させることで、中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスを作製した。

① 中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスの組織学的解析

中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスはやや低体重を示すが、多くのマウスが 3 ヶ月齢まで生存することがわかった。そこで、in situ hybridization 法を用いて後方中隔核 (PS) の構築を検討した (図 6)。PS は三角中隔核 (Triangular septal nucleus; TS) と前交連床核 (bed nuclei of the anterior commissure; BAC) の 2 つの神経核から構成される。コントロールマウスにおいては、中隔領域尾側部、脳梁の腹側背側部に TS が、前交連の背側部に両側性に BAC がみとめられる。一方、中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスでは、TS はほぼ消失し、前方または腹側の正中部に細胞が異所性に分布するのが観察された。BAC についても明らかな細胞構築異常が見られた。さらに成体 cKO マウスにおいて片側性ではあるが、脳弓の形成異常も観察された。この結果から、中枢神経系に発現する Dpy19L1 が正常な PS および脳弓形成に関わることが明らかとなった。

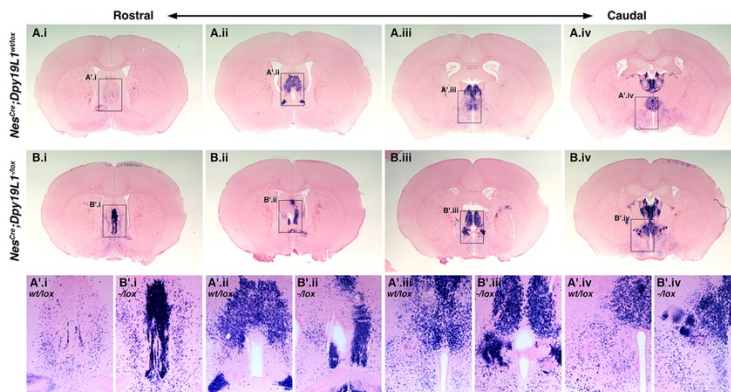


図 6

中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスにおける PS 構築異常。2 ヶ月齢マウス脳 calretinin の ISH 像。A. control マウス; B. Nestin-Cre; Dpy19L1 cKO マウス。cKO マウスにおいて calretinin でラベルされる PS (TS と BAC) に顕著な細胞構築異常が認められた。

② Dpy19L1 cKO マウスの恐怖行動異常解析

中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスにおける生来の恐怖行動異常を調べるため、天敵であるキツネの排泄物の臭い成分の一つであるトリメチルチアゾリン (TMT) を用いた忌避反応試験を行った結果、野生型マウスは TMT に対して強い忌避反応を示すのに対して、Dpy19L1 cKO マウスは忌避反応が著しく低下していることが示された (図 7)。この結果から全身性 KO マウスと同様に、Dpy19L1 cKO マウスも生来の恐怖行動が減弱していることがわかった。

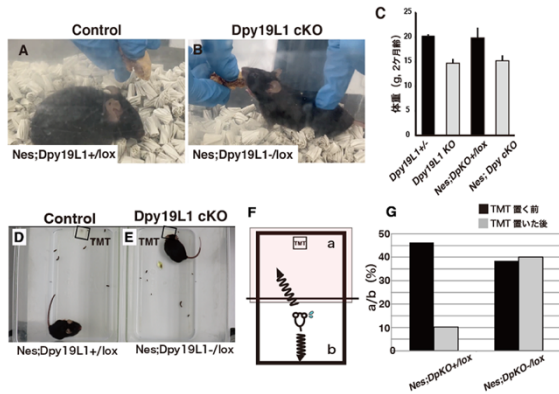


図7
中枢神経系特異的 Dpy19L1 cKO マウスが示す恐怖行動異常。A,B. Dpy19L1 cKO マウスは飼育者を怖がらず直接クッキーを食べる異常な行動を示す。C. cKO マウスは全身 KO マウスと同様低体重を示す。E-H. キツネの匂い成分 TMT を用いた忌避反応実験。グラフは5分間にケージ a 側にいた時間の割合。Control マウスは TMT を避ける傾向があるが、cKO マウスは気にせず動き回る。

(4) 発生期大脳皮質特異的 Dpy19L1 cKO マウスの作製と解析

Dpy19L1 KO マウスにおける PS 形成異常が、脳弓形成異常を引き金に二次的に生じたものかを調べるため、大脳皮質特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Neurod6-Cre マウスと Dpy19L1 flox マウスを交配させることで、大脳皮質特異的 Dpy19L1 cKO マウスを作製した。2ヶ月齢の大脳皮質特異的 Dpy19L1 cKO マウスにおいて、中枢神経系特異的 cKO マウスと似た PS の構築異常が観察された。

(5) 発生期終脳における R-spondins とそのレセプターLGRs の発現・機能解析

① in situ hybridization による mRNA 発現解析

シグナル関連分子の候補として R-spondin1-4 とそのレセプターLGR4-6 の発現について検討した。R-spondin1-3 は脳弓に近接する cortical hem に、LGR6 は胎生期の大脳皮質全体に強く発現することがわかった (図8)。

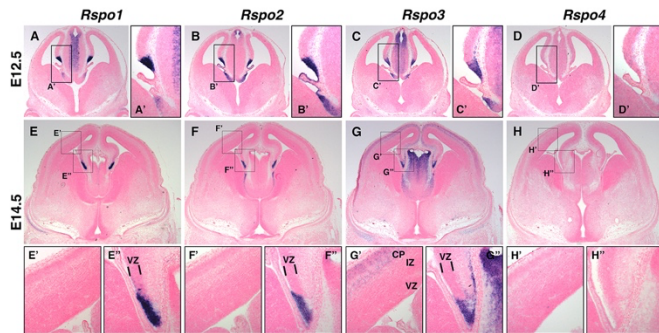


図8
発生期終脳における R-spondin1-4 の発現パターン。E12.5, 14.5 終脳の R-spondin1-4 の ISH 像。脳弓走行経路周囲に位置する cortical hem に R-spondin1-3 の強い発現が観察された。

② LGR6 の機能損失実験

子宮内エレクトロポレーション法により、E12 の大脳背内側部に LGR6 siRNA を導入し、E17 に脳弓の形成を検討した。L1 の免疫染色により脳弓の走行を調べたが、LGR6 の機能損失により異常はみとめられなかった。

本研究により、以下の点が明らかとなった。

1. PS ニューロンは先に形成された交連後脳弓を足場として前方へ移動する。
2. 中枢神経系に発現する Dpy19L1 が PS の構築、さらに脳弓形成に必須となる。
3. 中枢神経系に発現する Dpy19L1 は生来の恐怖行動の発現に重要となる。
4. 大脳皮質に発現する Dpy19L1 が PS の構築を制御する。
5. Dpy19L1 シグナル関連分子の候補として R-spondin1-3 と LGR6 の発現が確認された。

以上から、大脳皮質の Dpy19L1 が間接的に PS ニューロンの移動、形成に関わることが示唆された。Dpy19L1 は大脳皮質に強く発現すること、PS ニューロンの移動には大脳皮質から伸びる脳弓形成が必須であることを考えると、Dpy19L1 は脳弓形成を制御することで、PS ニューロンの移動・構築、さらに成体での恐怖行動の発現に関わっている可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Watanabe K, Takebayashi H, Sato N.	4. 巻 10
2. 論文標題 The fornix acts as a permissive corridor for septal neuron migration beyond the diencephalic-telencephalic boundary.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65284-7.	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 -

1. 著者名 Chiba A, Soma K, Watanabe K, Nagashima H, Sato N	4. 巻 81
2. 論文標題 Development of fin-innervating motor neurons after peripheral target removal in medaka fish.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Neurobiology	6. 最初と最後の頁 110-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dneu.22799	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 啓介、竹林 浩秀、佐藤 昇
2. 発表標題 The fornix acts as a permissive corridor for septal neuron migration beyond the diencephalic-telencephalic boundary.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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