

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700397

研究課題名（和文） 社会的行動を制御する神経回路機構の解明

研究課題名（英文） Identification of neural circuits that control social behavior

研究代表者

水口 留美子 (MIZUGUCHI RUMIKO)

独立行政法人理化学研究所・シナプス分子機構研究チーム・研究員

研究者番号：70450418

研究成果の概要（和文）：

細胞認識分子 BIG-2 は自閉症スペクトラム症候群との関連性が示唆されている。BIG-2 遺伝子欠損マウスは、オープンフィールドテストや高架式十字迷路テストで不安行動の上昇を示すことから、ストレス応答や情動を制御する神経回路に異常が生じているのではないかと考えられた。本研究では、野生型および BIG-2 遺伝子欠損マウスを用いて、オープンフィールドテストに伴って活性化される脳内部位のマッピングを行った。その結果、BIG-2 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ、視床下部室傍核 (PVH) の小細胞領域での神経活動が亢進していることが明らかとなった。PVH はストレス応答に中心的な役割を果たすことから、BIG-2 は PVH を含む神経回路に異常が生じることにより、新奇環境下でのストレスに対して過剰に反応しているのではないかと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

BIG-2 is an axon-associated cell recognition molecule that is involved in neural circuit formation in the brain. Recent studies implicated that BIG-2 is related to autism spectrum disorders (ASD). We previously found that BIG-2 knockout mice show increased anxiety in open field test and elevated plus maze test. To identify brain regions responsible for this abnormality, we mapped brain areas that were activated during the behavioral tests. We found that neuronal activity was elevated in parvocellular population of paraventricular hypothalamic nucleus (PVH) in BIG-2 knockout mice after subjected to open field test. As PVH is known to play central roles in stress response, it is suggested that BIG-2 is involved in formation of neural circuits required for proper stress responses in novel environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：軸索性細胞認識分子、BIG-2、オープンフィールドテスト、不安行動、視床下部、室傍核

## 1. 研究開始当初の背景

細胞認識分子 BIG-2 (contactin-4) は、脳内の特定の領域のニューロンで発現し、これ

らニューロンの軸索投射を制御する (Yoshihara et al., 1995; Kaneko-Goto et al., 2008)。近年、自閉症スペクトラム症候群

(autism spectrum disorders; ASD) の患者において、BIG-2 遺伝子座の欠失や変異が複数例報告され、BIG-2 は ASD の原因遺伝子の一つではないかと考えられている (Cottrell et al., 2011; Guo et al., 2012)。ASD は社会性やコミュニケーション能力に困難が生じる先天性の脳機能障害であることから、BIG-2 は他者の認識や情動の創出などに関わる脳内神経回路の形成や維持に関与しているのではないかと示唆される。

そこで我々は、京都大学 (現・藤田衛生保健大学) 宮川剛教授との共同研究により、BIG-2 遺伝子欠損マウスを用いた網羅的行動テストバッテリーを行った。その結果、BIG-2 遺伝子欠損マウスは、動物の社会的行動を評価するテストである *Crawley's 3-box test* で、特有の行動異常を示すことが明らかとなった。通常野生型マウスは、以前接触したことがある既知マウスよりも、初めて遭遇する未知マウスに対して強い興味を示し、より高頻度・長時間の探索行動を行う。しかし BIG-2 遺伝子欠損マウスは、未知マウスに対してあまり探索行動を行わず、既知マウスに対してより長時間の探索行動を行うことが明らかとなった (図 1 A)。また、BIG-2 遺伝子欠損マウスは、オープンフィールドテストでケージの中央部に滞在する時間が野生型マウスよりも有意に短く、新奇環境下における不安行動が亢進していると考えられた (図 1 B 左)。さらに BIG-2 遺伝子欠損マウスは、高架式十字迷路テストにおいても、open arm に滞在する時間が短い傾向にあり、不安行動が亢進していることが裏付けられた (図 1 B 右)。

そこで本研究では、BIG-2 遺伝子欠損マウスの解析を通じて、動物の社会性や情動に関わる神経回路を同定し、ASD の発症メカニズムの一端を明らかにすることを試みた。

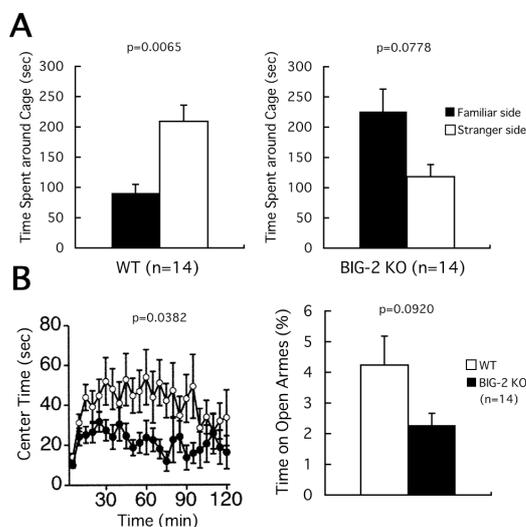


図 1 : BIG-2 遺伝子欠損マウスの行動異常

(A) 社会的行動評価テスト (*Crawley's 3-box test*) での異常。野生型マウスは既知マウスの近傍 (*Familiar side*) よりも未知マウスの近傍 (*Stranger side*) により長時間滞在するが、BIG-2 遺伝子欠損マウスではその傾向が逆転している。

(B) オープンフィールドテスト (左) および高架式十字迷路テスト (右) における BIG-2 遺伝子欠損マウスの不安行動の増加。

## 2. 研究の目的

BIG-2 遺伝子欠損マウスは、社会的行動や不安行動を評価するテストで異常行動を示す。本研究では、これら行動テストに伴って活性化される脳内部位を、野生型マウスと BIG-2 遺伝子欠損マウスの間で比較することにより、BIG-2 遺伝子欠損マウスで異常が生じている神経回路を特定し、社会性や情動を制御する神経回路機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) オープンフィールドテスト

20~40 週令の雄マウス (野生型および BIG-2 遺伝子欠損マウス) をテストに用いた。これらマウスを飼育ケージ内で一週間以上個別飼育した後、明期にテストを行った。マウスを 1 匹ずつ、40cm x 60 cm x 22cm の白いプラスチック製のテストケージの中央に移し 15 分間観察・ビデオ撮影を行った後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い脳を摘出した。摘出した脳は 4%パラホルムアルデヒドで 4℃ 5 時間浸漬固定を行った。コントロールとしては、飼育ケージのまま実験台の上に 15 分間放置したマウスを用いた。

### (2) 免疫組織化学

固定後の脳を 30%スクロースで一晩置換し、ミクロトームで厚さ 50  $\mu$ m の冠状凍結切片を作製した。5%正常ウマ血清で 1 時間ブロッキングを行った後、一次抗体と一晩室温で反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Cy3 ラベルした二次抗体 (Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Jackson ImmunoResearch; 400 倍希釈) と室温で 1 時間反応させ、PBS で 3 回洗浄後、スライドガラスに貼付けて封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った。用いた一次抗体は以下の通りである。

- Rabbit anti-phospho-NF $\kappa$ B antibody (Cell Signaling; #3037; 200 倍希釈)
- Rabbit anti-Corticotropin Releasing Factor (CRF) antibody (Phoenix Pharmaceuticals; H-019-06; 1000 倍希釈)

### (3) PVH における活性化ニューロンの定

量化

野生型および BIG-2 遺伝子欠損マウス各 5 匹を用いてオープンフィールドテストを行い、15 分後に脳を固定・回収した。PVH を含む冠状連続切片 5 枚に対して抗リン酸化 NFκB (pNFκB) 抗体を用いた免疫組織化学を行った。CCD カメラで PVH 近傍の拡大写真 (20 倍) を撮影し、PC の画面上にて PVH 領域内の pNFκB 陽性細胞の数をカウントした。また、ImageJ を用いて PVH 領域内の平均シグナル強度を測定した。この値からそれぞれの切片のバックグラウンドシグナルの値を引いた値を PVH の pNFκB シグナル強度とした。

#### 4. 研究成果

##### I. BIG-2 遺伝子欠損マウスで異常が生じている脳内部位の同定

BIG-2 遺伝子欠損マウスは、Crawley's 3-box test やオープンフィールドテストなどで特有の行動異常を示す。これらの行動異常の原因となる神経回路を同定するために、本研究ではまず、これらの行動テストに伴って活性化される脳内部位を、組織化学的手法を用いてマッピングすることにした。活性化ニューロンを検出するための指標としては、一般的には *c-fos*、*arc* などの最初期遺伝子 (immediate early genes; IEGs) が広く用いられている。しかしこれら IEGs は刺激後の転写誘導を伴うため、検出までに 90 分程度の時間を要し、擬陽性シグナルが多いなどの欠点もあった。そこで本研究では、転写因子 NFκB のリン酸化を指標として用いることにした。NFκB のリン酸化は刺激後 10 分程度で起こるため、ニューロンの活性化を速やかに検出することが可能であり、特異的なシグナルを得やすいと期待できる (Fujikawa et al., 2011; Mizuguchi et al., 2012)。

Crawley's 3-box test は、2つの異なるセッションから構成されており、それに伴って脳内の活性化パターンも変化するため、結果の解釈がやや複雑になることが予想された。そこで本研究ではまず、比較的単純な行動実験系であるオープンフィールドテストに伴って活性化する脳内部位のマッピングを行うことにした。野生型および BIG-2 遺伝子欠損マウスを、飼育ケージからテストケージの中央部に移し、15 分間観察を行った後、脳を固定・摘出して冠状切片を作成し、抗リン酸化 NFκB (pNFκB) 抗体を用いた免疫組織化学を行った。野生型マウスでは、オープンフィールドテストを行うことにより、副嗅球の顆粒細胞、前嗅核、線条体、大脳皮質、扁桃核、

海馬、視床下部など、脳内のいくつかの領域で pNFκB シグナルの上昇が認められた (図 2)。

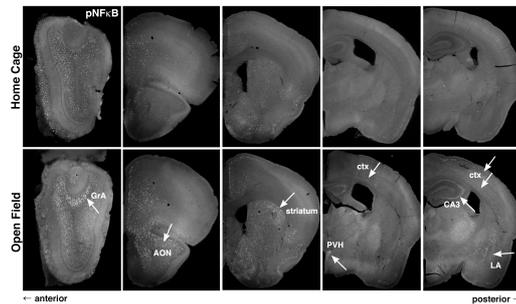


図 2 : オープンフィールドテストに伴う脳部位の活性化

野生型マウスを用いてオープンフィールドテストを行い、15 分後に脳を摘出して抗リン酸化 NFκB 抗体による免疫組織化学を行った (下段)。コントロールマウス (上段) に比べて、副嗅球の顆粒細胞 (GrA)、前嗅核 (AON)、線条体 (striatum)、大脳皮質 (ctx)、視床下部の室傍核 (PVH)、海馬 CA3 領域、扁桃核外側核 (LA) などシグナルの上昇が認められる (矢印)。

このことから、これらの脳領域は新奇環境下での不安行動に関与している可能性が示された。次に、野生型マウスと BIG-2 遺伝子欠損マウスの間で pNFκB シグナルの比較を行ったところ、BIG-2 遺伝子欠損マウスでは、オープンフィールドテストを行った際に、視床下部の室傍核 (paraventricular hypothalamic nucleus; PVH) における pNFκB シグナルの上昇が、野生型マウスに比べて顕著であることが明らかとなった (図 3)。PVH はストレス応答に主要な役割を果たすことが知られている。PVH には異なる

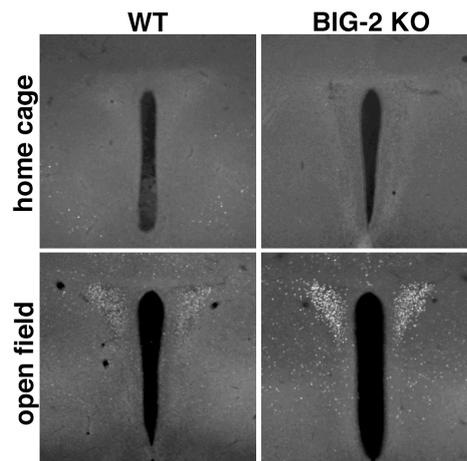


図 3 : BIG-2 遺伝子欠損マウスにおける室傍核ニューロンの過剰な活性化

オープンフィールドテスト後、BIG-2 遺伝子欠損マウス (右) では、野生型マウス (左) に比べて室傍核 (PVH) 小細胞領域での pNFκB シグナルの上昇が顕著であることが分かる。

領域に小細胞と大細胞が存在し、それぞれ異なる経路を介してストレス反応を引き起こすことが知られている。BIG-2 遺伝子欠損マウスで pNFκB シグナルが上昇するのは、PVH の中でも小細胞が存在する領域と一致していた。PVH に存在する小細胞は、情動ストレスを受けると副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (Corticotropin releasing factor; CRF) を分泌し、脳下垂体から副腎皮質刺激ホルモンの分泌を促す。すると副腎皮質からコルチゾールなどのホルモンが分泌され、血圧や血糖値の上昇などのストレス応答を引き起こす。pNFκB マッピングの結果から、BIG-2 遺伝子欠損マウスでは、新奇環境下における PVH を介したストレス応答経路が過剰に活性化している可能性が考えられた。そこで我々は PVH に着目して、BIG-2 遺伝子欠損によりどのような変化が生じているのかを詳細に調べることにした。

## II. PVH の pNFκB 陽性細胞の定量化

我々はまず、BIG-2 遺伝子欠損マウスの PVH で、オープンフィールドテストに伴って活性化するニューロンの数が増加しているかどうかを確かめることにした。野生型および BIG-2 遺伝子欠損マウス 5 匹を用いて、それぞれ PVH 近傍の連続切片 5 枚に含まれる pNFκB 陽性細胞の数を測定した。しかし両者の間に有意な差は見いだせなかった (野生型:  $1136.6 \pm 58.1$ ; BIG-2 遺伝子欠損マウス:  $1260.4 \pm 74.7$ ;  $p=0.2091$ )。そこで次に、BIG-2 遺伝子欠損マウスで PVH ニューロンの活性化の度合いが上昇している可能性について調べることにした。先ほど細胞数を測定した同じ切片を用いて、PVH 領域内の pNFκB シグナル強度を測定し、その平均値を野生型と BIG-2 遺伝子欠損マウスの間で比較した。その結果、BIG-2 遺伝子欠損マウスでは、PVH の pNFκB シグナル強度が約 1.4 倍に上昇していることが明らかとなった (野生型:  $18.10 \pm 1.02$ ; BIG-2 遺伝子欠損マウス:  $25.01 \pm 1.05$ ;  $p=0.0002$ )。以上の結果から、BIG-2 遺伝子欠損マウスでは、情動ストレスによって活性化する PVH ニューロンの数は変化しないものの、その活性化の度合いが上昇していることが示された。

## III. CRF 陽性ニューロンの数や投射パターンの解析

BIG-2 遺伝子は PVH の小細胞領域で発現していることから、BIG-2 遺伝子欠損マウスでは PVH ニューロンの軸索投射に異常が生じ、細胞自律的にニューロンの活性が上昇して

いる可能性が考えられた。そこで、抗 CRF 抗体を用いた免疫組織化学によって PVH の小細胞の軸索を可視化し、野生型と BIG-2 遺伝子欠損マウスの間で比較を行った。CRF 陽性細胞の軸索は、視床および視床下部を通過して扁桃体中心核 (Ce) や内側隆起 (ME)、視交叉上核 (Sch) へ投射していたが、BIG-2 遺伝子欠損マウスでこれらの投射パターンやシグナルの強さに目立った異常は認められなかった (図 4)。このことから、BIG-2 遺伝子は、PVH の CRF 陽性ニューロンの発生や投射には必須ではないことが示された。BIG-2 遺伝子欠損マウスでは、PVH の活性を制御する他の出力ニューロンや介在ニューロンの投射に異常が生じ、その結果として PVH の活性が亢進している可能性が示唆された。

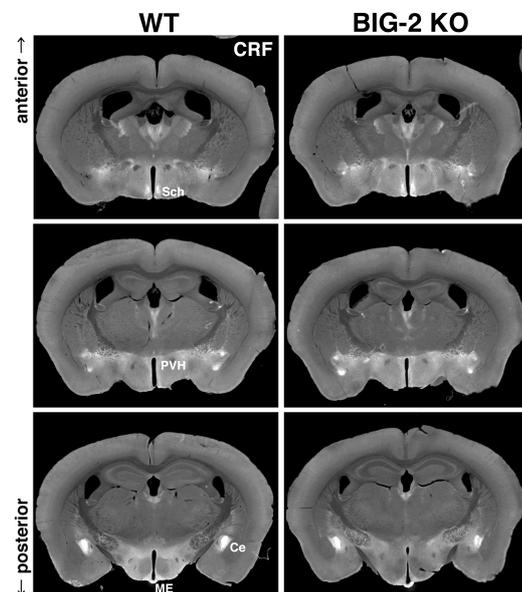


図 4 : CRF 陽性細胞の軸索投射パターンの比較

野生型 (左) および BIG-2 遺伝子欠損マウス (右) に対して抗 CRF 抗体を用いた免疫組織化学を行った。PVH の CRF 陽性細胞の軸索は、扁桃体中心核 (Ce) や内側隆起 (ME)、視交叉上核 (Sch) へ投射している。BIG-2 遺伝子欠損マウスでは、これらの投射パターンに目立った異常は認められない。

本研究で得られた成果は、ストレス応答や情動を制御する神経回路形成の分子機構を解明する上で、有用な手がかりとなることが期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水口 留美子 (MIZUGUCHI RUMIKO)  
独立行政法人理化学研究所・シナプス分子  
機構研究チーム・研究員  
研究者番号：70450418

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

塩崎 桃子 (MOMOKO SHIOZAKI)  
独立行政法人理化学研究所・シナプス分子  
機構研究チーム・パートタイマー職員