

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430037

研究課題名(和文) 平衡覚伝導路形成における細胞接着分子プロトカドヘリン9の役割の解明

研究課題名(英文) Role of protocadherin 9 in formation of the oculomotor system

研究代表者

平野 伸二 (HIRANO, Shinji)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：80222248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞接着分子プロトカドヘリン9は、平衡覚伝導路に特異的に分布しているが、その生理的な機能はわかっていない。本研究では、ノックアウトマウスを用いて、この分子が実際に平衡覚伝導路の形成や平衡感覚に関わっているかを形態学および行動学的に検証をした。まず、発生期の神経回路形成などを組織化学的に調べたが、特に異常が見いだせなかった。一方、行動解析においては、平衡感覚や学習などの行動には異常は見られなかったが、視機性動眼反射で異常が見られるとともに、情動性が高まっていることがわかった。以上の結果から、プロトカドヘリン9が前庭動眼神経系や情動系の神経回路で機能していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Protocadherin 9 is expressed in the vestibular and oculomotor systems, but its physiological role is not known. In this study, we examined if this molecule is involved in formation of these systems and in sense of balance in the protocadherin 9-knock-out mice. We could not detect any abnormalities in formation of the neural circuits during development in histochemical analyses. On the other hand, we found abnormal behaviors in optokinetic response (OKR) and higher emotional response. These results showed that protocadherin 9 plays some roles in neural functions in the vestibular and oculomotor systems and the emotional system.

研究分野：神経発生学

キーワード：プロトカドヘリン カドヘリン 神経回路 動眼反射 平衡覚 細胞接着分子 精神神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

プロトカドヘリンは細胞接着分子カドヘリン超分子群の中で最も種類の多いグループである。近年神経系での機能に関する研究が徐々に報告され始めたが、まだ多くのプロトカドヘリンについては生体内での機能や役割はわかっていない。一方、本研究以前に我々の研究グループは、プロトカドヘリン9が平衡覚伝導路に特異的に分布していることを明らかにした(Asahina et al. 2012)。その結果はこの分子が平衡覚伝導路の形成やその機能に関わっていることを示唆していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、プロトカドヘリン9のノックアウトマウスを用いて、この分子が実際に平衡覚伝導路の形成や平衡感覚に関わっているかを形態学的および行動学的に検証をする。特に平衡感覚などについてヒトのめまいに結びつくような関連性がないかも注意して調べる。これによりプロトカドヘリン9の生体内での機能と役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

プロトカドヘリン9欠損のヘテロマウスを交配し、形態学的な解析では同腹の中で、行動解析では同じ時期に交配をした複数のマウスの子孫からホモ個体と野生型個体を用意し、表現型の解析を行った。ノックアウトマウスの形態学的な解析には、スライスおよび切片による免疫組織化学法を用いた。また、生理機能については、ビームテスト、フットプリント、前庭動眼反射、オープンフィールドテスト、恐怖条件付けテスト、プレパルス抑制テストなどの行動解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 形態学的な解析

神経系形成での役割を知るために、胎仔期において脳の大きさや形態などを調べたが、異常は見られなかった。さらに、ニューロフィラメントで前庭動眼反射系の神経回路を調べた限りでは大きな回路の異常はなかった。また、内耳の平衡斑や膨大部の形態や神経投射にも異常は見られなかった。なお培養系によるシナプスの形成については結論に十分なデータが得られなかった。以上の結果から、ノックアウトマウスの脳の形成過程においては大きな形態異常はないことが分かった。ただし、成体になった時点でホモ個体では若干体重が軽い傾向にあることがわかった。

### (2) 行動解析

発生期の神経系において形態的な異常が見られなかったため、以下のような行動解析によって成体での神経機能に異常がないかを調べた。

### 平衡感覚のテスト

フットプリント、ビームテスト、ロータロッド、正向反射、接触正向反射などの検査では、ノックアウトマウスにおいて平衡感覚の異常は見いだせなかった。なお、この実験の一部については理化学研究所若菜茂晴チームリーダーの主宰するマウスクリニックの協力を得た。

### 前庭動眼反射

理化学研究所永雄総一チームリーダーの協力を得て、前庭動眼反射の解析を行ったところ、ノックアウトマウスでは前庭動眼反射(VOR)は正常と差がなかったが、視機性動眼反射(OKR)に異常が見られた(下図)。

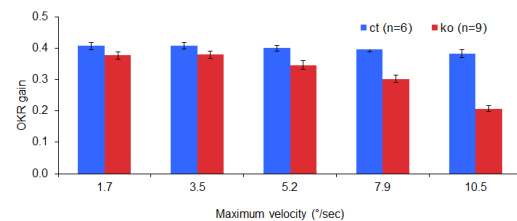


図 OKRの結果

しかし、上記の平衡感覚テストで異常が見られないことから、OKRはVORとともに姿勢保持に重要であるが、OKRの異常がOKRなどの他の反射等によって補償されている可能性があることがわかった。なお、期間中に異動があり、neo 遺伝子を含まない個体での解析は時間の関係で実施することができなかった。

### 高次脳機能検査

理化学研究所若菜茂晴チームリーダーの主宰するマウスクリニックの協力を得て、一連の行動解析を用いて高次脳機能検査を行った。それには、情動性・探索行動、社会行動、活動性、記憶・学習、感覚情報処理の項目に分けてオープンフィールドテスト、Crawleyの社会性テスト、ホームケージ活動、Y迷路テスト、恐怖条件付けテスト、プレパルス抑制テストなどが含まれている。その結果、ホモではオープンフィールドテストで中心滞在率が低く、外周部での移動距離が長いこと、Crawleyの社会性テストでは新奇物体を避ける傾向などがみられた(下図)。これらの結果から、ノックアウトマウスでは情動性が高くなっていることが分かった。

なお、明暗移行テストなど、不安に関する指標に異常は見られなかった。また、ノックアウトマウスでも学習は成立していた。

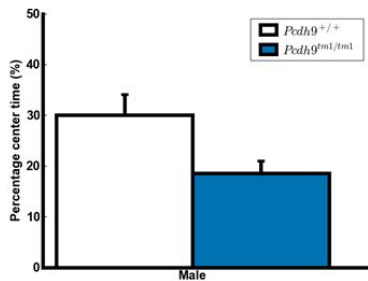


図 オープンフィールドテストの結果

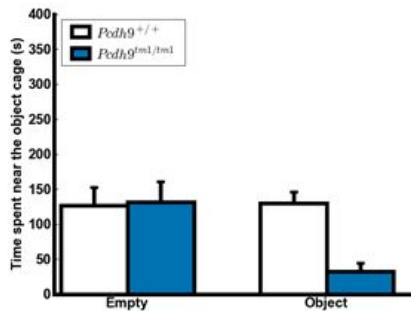


図 Crawley の社会行動テストの結果

以上本研究によりプロトカドヘリン 9 がめまいに直接関係している証拠は得られなかったが、視機性動眼反射に異常が見られたことは、この分子が前庭動眼神経系のいずれかのポイントで機能していることが強く示唆された。また、情動性が高くなっていることからプロトカドヘリン 9 が自閉症などの発達障害と関係している可能性も示唆された。なお、近年この遺伝子が自閉症の感受性遺伝子の候補であることが報告されたことは注目に値する (Tsang et al. *PLOS ONE* 2013)。本研究でプロトカドヘリン 9 の視機性動眼反射や情動性との関係について有意なデータが得られたことから、これらについては今後も研究を継続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 5 件)

Hannah Schoch, Arati S. Kreibich, Sarah L. Ferri, Rachel S. White, Dominique Bohorquez, Anamika Banerjee, Russell G. Port, Holly C. Dow, Lucero Cordero, Ashley Pallathra, Hyong Kim, Hongzhe Li, Warren Bilker, Shinji Hirano, Robert T. Schultz, Karin Borgmann-Winter, Chang-Gyu Hahn, Dirk Feldmeyer, Gregory C. Carlson, Ted Abel and Edward S. Brodtkin, Sociability deficits and altered amygdala circuits

in mice lacking Pcdh 10, an autism associated gene. *Biological Psychiatry, in press* (受理印刷中) 査読あり。

Oishi K, Nakagawa N, Tachikawa K, Sasaki S, Aramaki M, Hirano S, Yamamoto N, Yoshimura Y, Nakajima K. Identity of neocortical layer 4 neurons is specified through correct positioning into the cortex. *Elife*. 2016 Feb 12;5. pii: e10907. doi: 10.7554/eLife.10907. 査読あり。

Lu KM, Evans SM, Hirano S, Liu FC. Dual role for Islet-1 in promoting striatonigral and repressing striatopallidal genetic programs to specify striatonigral cell identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(1):E168-77. 2014. 査読あり。

PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells.

Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T. *Biochem Biophys Res Commun*. 444(1):13-18. 2014. 査読あり。

Hoshina N, Tanimura A, Yamasaki M, Inoue T, Fukabori R, Kuroda T, Yokoyama K, Tezuka T, Sagara H, Hirano S, Kiyonari H, Takada M, Kobayashi K, Watanabe M, Kano M, Nakazawa T, Yamamoto T. Protocadherin 17 regulates presynaptic assembly in topographic corticobasal Ganglia circuits. *Neuron*. 78(5):839-54. 2013. 査読あり。

〔学会発表〕(計 7 件)

Suteera Vibulyaseck, Gideon Sarpong, Hirofumi Fujita, Shinji Hirano, Izumi Sugihara Early development of the longitudinal striped compartments in the prenatal mouse cerebellum studied with three-dimensional mapping of protocadherin 10 expression. 日本神経科学大会 2016 年 7 月 20-22 日、パシフィコ横浜、横浜

Gideon Anokye Sarpong, Hirofumi Fujita, Suteera Vibulyaseck, Teiichi Furuichi, Shinji

Hirano, Izumi Sugihara, Comparison of expression patterns of different marker molecules of the cerebellar longitudinal striped compartments in the mouse. 日本神経科学大会 2016年7月20-22日、パシフィコ横浜、横浜

H. Schoch, A. Banerjee, S. Ferri, A. Kreibich, H. Dow, S. Hirano, R.T. Schultz, C.G. Hahn, T. Abel, E. Brodtkin, D. Feldmeyer, Male-specific dendritic spine abnormalities in amygdala of mice haploinsufficient for Protocadherin 10, an autism-associated gene, Neuroscience 2015 (Annual meeting of Society for Neuroscience) Oct 18, 2015. Chicago USA.

Suteera Vibulyaseck, Shinji Hirano, Izumi Sugihara, Development of functional compartmentalization of the cerebellum. IBRO Workshop (Hongkong, 2014 July)

Suteera Vibulyaseck, Shinji Hirano, Izumi Sugihara, Striped Protocadherin 10 expression pattern in the adult and developing mouse cerebellar cortex, 日本神経科学大会 2014年9月11-13日、パシフィコ横浜、横浜

H. Schoch, S. Ferri, A. Kreibich, H. Dow, S. Hirano, R.T. Schultz, E. Brodtkin, E. Abel Haploinsufficiency of the autism-linked gene Protocadherin 10 causes male-specific behavioral deficits Program#/Poster: 603.05/G8, Annual meetings of Society for Neuroscience, November 18, 2014, Washington DC

平野伸二 非定型カドヘリンの多様性と機能、日本生化学会 2013年9月13日、パシフィコ横浜、横浜。

〔図書〕(計3件) 部分執筆

Shintaro T.Suzuki & Shinji Hirano, Chapter 1, Introduction (Suzuki & Hirano eds, Book title, "The Cadherin Superfamily" p3-11, June 8, 2016)

Keiko Imai-Okano & Shinji Hirano, Chapter 11, Various atypical cadherins: T-cadherin, RET, Calsynenin, and 7D-cadherin. (Suzuki & Hirano eds, Book title, "The Cadherin Superfamily" p277-311, June 8, 2016)

Shinji Hirano & Keiko Imai-Okano, Chapter 15, Cadherin-related diseases. (Suzuki & Hirano eds,

Book title, "The Cadherin Superfamily" p399-421, June 8, 2016)

〔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

平野 伸二 (HIRANO, Shinji)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80222248

##### (2) 研究分担者

由利 和也 (YURI, Kazunari)  
高知大学・医学部・教授  
研究者番号：10220534

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：