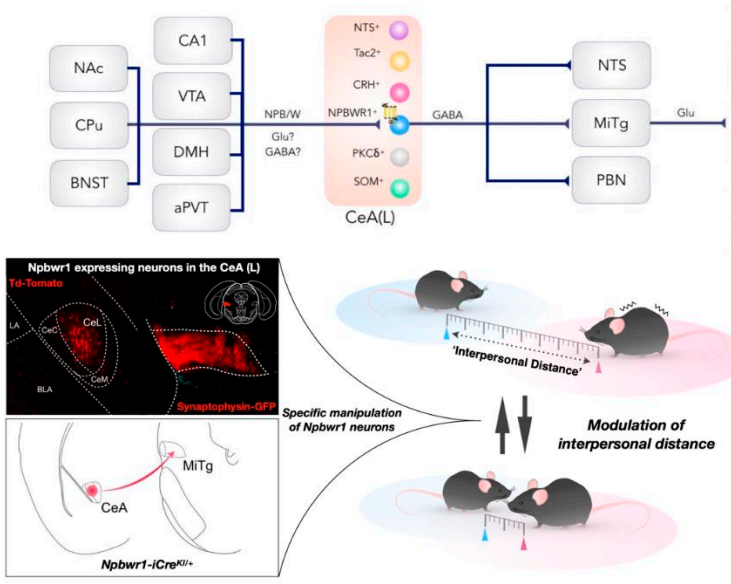
142　個体間の距離を制御する生体メカニズムの解明	征矢　晋吾

【目的】他者とコミュニケーションを取る上で個体間の距離を縮めていくことは社会性を構築する上で必須である。しかし、社会行動に関わる神経メカニズムについてはこれまでに報告されているが、社会行動に至るまでの個体間距離の調節機序については全く明らかになっていない。他者の情報を得るためには個体間距離を縮める必要があるが、他者との社会的接触は恐怖や不安などの情動応答を引き起こす。したがって、個体間距離の調節メカニズムは情動制御のメカニズムが関与している可能性が示唆されるが、その分子・神経基盤については未だ明らかではない。本研究では、新規のニューロペプチドである NPB／NPW の受容体である Npbwr1 に焦点を当て、情動応答や社会行動への関与が示唆される Npbwr1 を豊富に発現する扁桃体中心核（CeA）のニューロンを解析することで Npbwr1 が個体間距離の制御に果たす役割について検討する。

【方法】Npbwr1 が発現するニューロン（Npbwr1 ニューロン）に Cre 組み換え酵素が特異的に発現する Npbwr1-iCre マウスを用いて、Cre 依存的にシナプトフィジンを発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）や狂犬病ウイルス（SADΔG）等を用いて、Npbwr1 ニューロンの投射領域および Npbwr1 ニューロンに入力するニューロン群を解析した。また、Npbwr1-iCre マウスの CeA に Cre 依存的に発現する人工受容体である hM3Dq（興奮性）または hM4Di（抑制性）を組み込んだ AAV を投与し、腹腔に人工リガンドである Clozapine-N-Oxide（CNO）を投与することで Npbwr1 ニューロンの薬理遺伝学的操作を行った。さらに、光遺伝学を用いて CeA から MiTg に投射する Npbwr1 ニューロン特異的にチャネルロドプシン 2 を発現させ、473 nm のレーザー照射により軸索末端を人為的に興奮させ、社会行動における影響を観察した。

【結果】本研究によって、CeA に局在する Npbwr1 ニューロンを中心とした入出力機構を同定した。具体的には、CeA の Npbwr1 ニューロンは NAc、CPu、BNST、CA1、VTA、DMH、aPVT 等の領域から直接入力を受けており、同定した出力先（NTS、MiTg、PBN）の中でも主に MiTg に顕著な投射線維が観察された。さらに、薬理遺伝学および光遺伝学を用いることで、CeA の Npbwr1 ニューロンが社会行動を調節することが明らかになり、CeA から脳幹の MiTg への Npbwr1 ニューロンの投射がその神経メカニズムの一つであることが示唆された。

本研究で明らかにした個体間の距離を制御する神経回路



142. 個体間の距離を制御する生体メカニズムの解明

征矢　晋吾

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構

Key words：Npbwr1，ニューロペプチド，個体間距離，扁桃体，情動応答

緒　言

我々は言葉や身振りそして他者を記憶することでコミュニケーションを取る以上、見知らぬ他者との距離（ソーシャルディスタンス）やパーソナルスペースの調節は社会性を構築する上で不可欠である。パーソナルスペースとは他人に近付かれると不快と感じる空間または距離を表す概念であり、一般的に親密な相手とのパーソナルスペースは狭く、逆に敵視している相手や初めて会う人に対しては広くなる。他者によるパーソナルスペースの侵害は自律神経応答やストレス応答などを引き起こし、逆に親密な相手との接触は幸福感をもたらす。パーソナルスペースおよび適切な社会行動の制御不全は、コミュニケーション障害から対人恐怖症まで、社会性に関わる様々な問題を引き起こす原因と考えられる。しかし、パーソナルスペースやソーシャルディスタンスを統合的に制御する分子および神経基盤については全く明らかになっていない。社会行動自体に関わる脳部位は過去に多数報告されているが（Okuyama et al, 2016, Baran et al, 2017）[1, 2]、社会行動に至るまでの他者との物理的距離を調節する生体機構については報告されていない。したがって、パーソナルスペースやソーシャルディスタンスの調節時に生理的応答を統合する神経基盤を探索することで、中枢と末梢がどのように相互作用することでこれらが調節され、社会的接触につながるのか明らかにできる可能性がある。

我々の研究室では、社会的接触を制御する神経基盤を探索するためニューロペプチド B/W に注目した。ニューロペプチド B/W はこれまでに痛みの制御、自律神経系の調節などに関わることが知られているが［3］、その生理的役割は不明な点が多い。我々は、これらの受容体であるニューロペプチド B/W1 受容体（Npbwr1）は情動応答に重要な役割を果たす扁桃体中心核（CeA）の GABA 作動性ニューロンにおいて顕著な発現を示すことを確認した。さらに、*Npbwr1* 欠損マウスを独自に作製し、様々な行動テストを行った結果、このマウスは初めて対峙する相手に対して社会的接触時間が非常に長く、執拗な追尾行動を示すことが明らかになった。この時の心拍数、血圧を測定したところ、対照群に比べ顕著かつ持続的な上昇が見られた。また、恐怖記憶の形成に障害が観察された［4］。これらの知見から、Npbwr1 を手がかりとして Npbwr1 が発現するニューロンの生理的役割を神経回路レベルで探索することで個体間距離を制御する分子・神経基盤の描出を試みる。

方　法

1.　遺伝子組み換えウイルスを用いた入出力解析

Npbwr1 ニューロンに Cre が特異的に発現する *Npbwr1-iCre* マウスを用いて、Cre 依存的に改変型狂犬病ウイルスの受容体である TVA およびその構成タンパク質である RG を発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）を Npbwr1 ニューロンが局在する CeA に投与する。二週間後、改変型狂犬病ウイルスである *SAD⊿G-EGFP* を再度 CeA に投与する。投与から六日後に脳を固定し、免疫抗体染色を行う。EGFP の蛍光シグナルを脳全体で観察することで、Npbwr1 ニューロンにシナプス接続している上流のニューロンを可視化する（逆行性トレーシング）。さらに、シナプトフィジンを発現する AAV を *Npbwr1-iCre* マウスの CeA に投与することで Npbwr1 ニューロンの投射領域を同定する（順行性トレーシング）。

2. 3 コンパートメント社会行動試験

社会行動を解析するため、3 コンパートメント社会行動試験を用いた。40 cm×52 cm のアクリルチャンバーは開閉可能なゲートによって三つのコンパートメントに分けることが可能である。左右のコンパートメントの隅には、グリッド状のシリンダーケージを一つずつ置き、片方には新規個体である 4～5 週齢の雄マウスを入れておく。まず、実験マウスを真ん中のコンパートメントに入れ、3 分間順化させた。その後、左右のゲートを開くことでマウスが左右どちらのコンパートメントに多く滞在したか計算することによって、社会行動の定量を行った。テストは 20 分間行った。マウスの行動はビデオカメラで録画し、実験終了後 Smart3.0 ソフトウェア（Pan lab）を用いて各コンパートメント内における滞在時時間を計算した。

3. 薬理遺伝学（DREADD）による神経操作

Npbwr1-iCre マウスの CeA に Cre 依存的に発現する人工受容体である hM3Dq（興奮性）または hM4Di（抑制性）を組み込んだ AAV を投与し、腹腔に人工リガンドである Clozapine-N-Oxide（CNO）を投与することで、Npbwr1 ニューロンを特異的に操作し、行動変化を観察した。1 日目は Saline を投与し、2 日目に CNO を投与した。投与から 40 分後に 3 コンパートメント社会行動試験を行った。

4. 光遺伝学による神経操作

Npbwr1-iCre マウスの CeA に Cre 依存的に発現するチャネルロドプシン 2（ChR2）を組み込んだ AAV を投与し、光ファイバーを主な投射先である MiTg（順行性トレーシングにより同定）の真上に留置した。コントロール群として EYFP を組み込んだ AAV を投与した。473 nm のレーザーをパルス状に 2 秒照射し（10 Hz）28 秒のインターバルを挟む試行を 20 分間繰り返した。MiTg に投射する Npbwr1 ニューロンの投射線維を人為的に興奮させることで 3 コンパートメント社会行動試験におけるマウスの行動変化を観察した。

5. 免疫組織科学染色

免疫組織科学染色に用いるマウス脳は 4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて固定し、脱水後は−80℃で急速凍結した。クライオスタットを用いて 40 μm の冠状脳切片を作製し、PBS で洗浄後一次抗体を用いて抗原抗体反応を行った（24 時間）。PBS で洗浄後二次抗体を用いて抗原抗体反応を行った（2.5 時間）。染色には一次抗体（抗 GFP、抗 mCherry）、二次抗体（Alexa488、Alexa594）および粗面小胞体染色試薬（Nissl：細胞体を可視化する）を用いた。

結　果

1. CeA に局在する Npbwr1 ニューロンの入出力解析

狂犬病ウイルスを用いて逆行性トレーシングを行った結果、CeA の Npbwr1 ニューロンは様々な脳領域から入力を受けていることが明らかになった。特に側坐核（Nucleus accumbens：NAc）、線条体（Caudate putamen：CPu）、分界条床核（Bed nucleus of stria terminalis：BNST）、視床室傍核（Paraventricular thalamus：PVT）、腹側被蓋野（Ventral tegmental area：VTA）、海馬背側 CA1（Dorsal hippocampal CA1：dCA1）から多くの入力を受けていることが明らかになった（図 1a～c）。次に、Npbwr1 ニューロンの直接の投射領域を同定するため、軸索末端に発現するシナプトフィジンを発現する AAV を用いて順行性トレーシングを行った。その結果、腕傍核（Parabrachial nucleus：PBN）や微小細胞被蓋核（Microcellular tegmentum：MiTg）、孤束核（Nucleus solitary tract）にシナプトフィジンの集積が顕著に観察された。特に MiTg における集積は他の領域と比べてもより顕著なものであった。

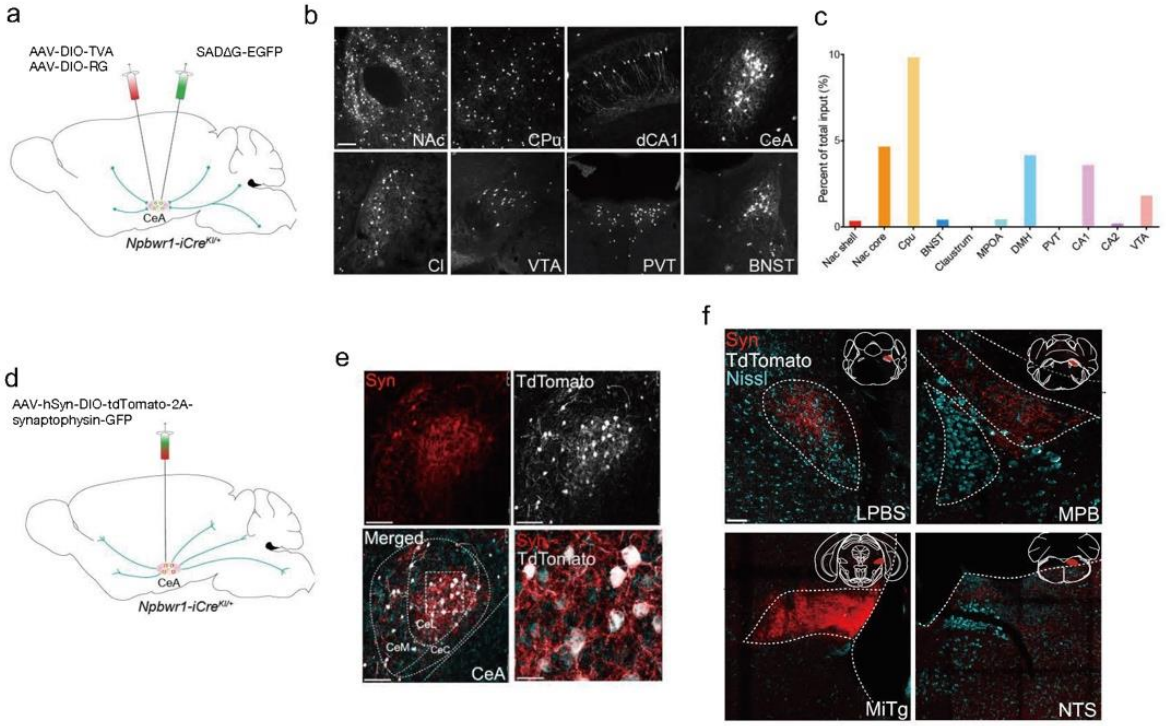


図 1. CeA の Npbwr1 ニューロンの入出力解析

a) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV- DIO-EF1a-TVA-mCherry および AAV-EF1a-DIO-TVA-mCherry を投与した。二週間後、SADΔG-EGFP を同一箇所に投与した。

b) 免疫抗体染色により EGFP 陽性細胞を全脳領域で可視化した（スケールバー：100μm）。

c) EGFP 陽性細胞数を領域別にカウントし全 EGFP 陽性細胞数における割合を可視化した。

d) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV-hSyn-DIO-tdTomato-2A-synaptophysin-GFP を投与した。

e) 免疫抗体染色により CeA の Npbwr1 ニューロンの細胞体に発現する TdTomato（白）および軸索末端に発現する Synaptophysin（赤）を可視化した（スケールバー：100μm）。

f) 免疫抗体染色により CeA の Npbwr1 ニューロンの軸索末端に発現する Synaptophysin（赤）を様々な脳領域で可視化した（スケールバー：100μm）。Nissl（水色）により細胞体を染色した。

2. Npbwr1 ニューロンの薬理遺伝学的操作

CeA に局在する Npbwr1 ニューロンの生理的意義を明らかにするため、DREADD による薬理遺伝学的な操作を試みた。興奮性の hM3Dq を用いて Npbwr1 ニューロンを興奮させた結果、3 コンパートメント社会行動試験において、コントロール (Saline 投与群) に比べ CNO 投与群の社会行動時間が著しく増加した (図 2c)。一方で、抑制性の hM4Di を用いて Npbwr1 ニューロンを抑制する実験を行った結果、3 コンパートメント社会行動試験において新規個体のマウスが置かれたコンパートメントに滞在する時間は著しく減少した (図 2f)。

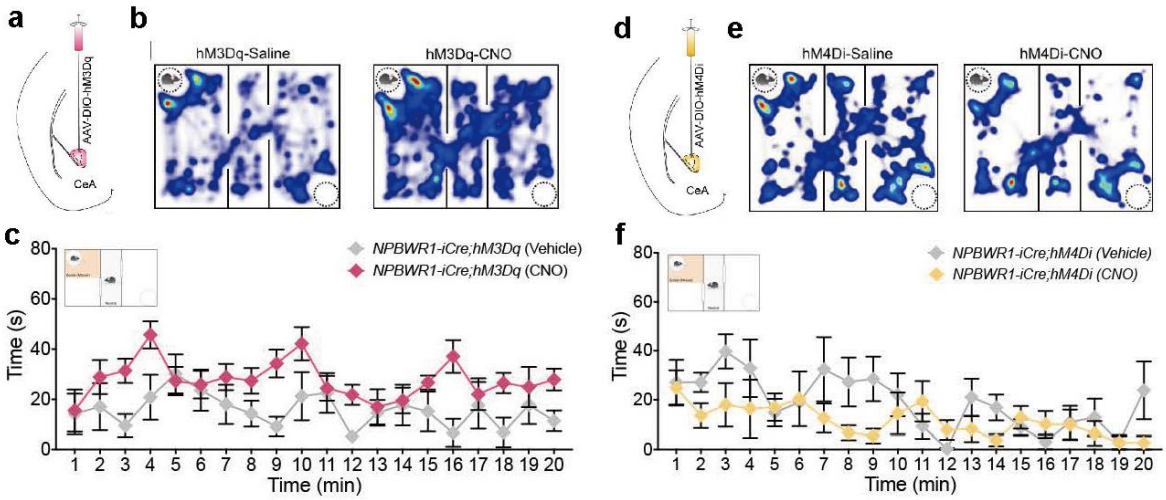


図 2. CeA の Npbwr1 ニューロンの薬理遺伝学的操作

a) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV- EF1a-DIO-hM3Dq-mCherry を投与した。

b) hM3Dq を用いた 3 コンパートメント社会行動試験における滞在時間を示したヒートマップ。

c) hM3Dq を用いた 3 コンパートメント社会行動試験において新規マウスが入ったケージ周辺の滞在時間。

d) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV- EF1a-DIO-hM4Di-mCherry を投与した。

e) hM4Di を用いた 3 コンパートメント社会行動試験における滞在時間を示したヒートマップ。

f) hM4Di を用いた 3 コンパートメント社会行動試験において新規マウスが入ったケージ周辺の滞在時間。

3. MiTg に投射する Npbwr1 ニューロンの光遺伝学的操作

順行性トレーシングの結果、Npbwr1 ニューロンの投射線維が最も多く観察された MiTg 焦点を当て、MiTg に投射する CeA の Npbwr1 ニューロンの生理的意義を明らかにするために光遺伝学的な操作を試みた。3 コンパートメント社会行動試験において、10 Hz のパルス状レーザーを用いて MiTg に投射する CeA の Npbwr1 ニューロンを人為的に興奮させた結果、コントロール（EYFP 投与群）に比べ ChR2 投与群の社会行動時間が著しく増加した（図 3c）。

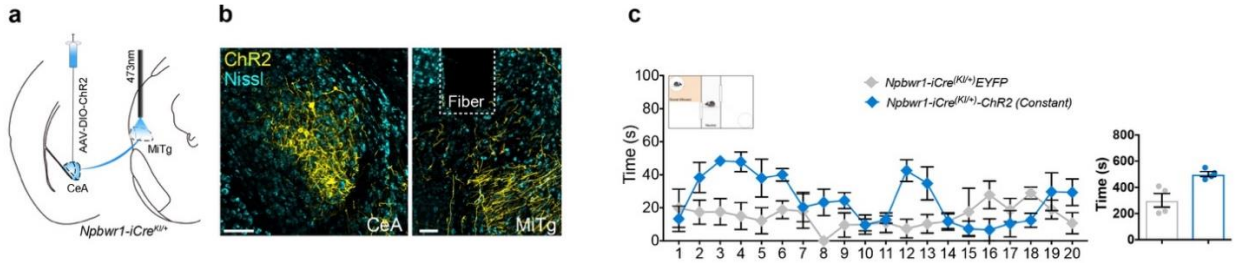


図 3. MiTg に投射する CeA の Npbwr1 ニューロンの光遺伝学的操作

a) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV- EF1a-DIO-ChR2-EYFP または AAV- EF1a-DIO-EYFP を投与した。

b) ChR2（黄）および Nissl（水色）により細胞体を染色した（左）。MiTg の真上に光ファイバーを留置した（右）（スケールバー：100 μm）。

c) 光刺激を用いた社会行動試験において新規マウスが入ったケージ周辺の滞在時間（左グラフ）およびその平均（右グラフ）を示した。

考　察

本研究では、CeA の Npbwr1 ニューロンに着目し、その入出力機構を描出するとともに社会行動における役割について検討した。CeA の Npbwr1 ニューロンは様々な脳領域から直接の入力を受けていることが明らかになったが（図 2a～c）、Npbwr1 のリガンドである NPB/NPW の発現パターン［3］を考慮すると、VTA や dCA1 が主な入力先であると推察される。主な投射先である MiTg については、グルタミン酸作動性ニューロンが局在していることを除いてほとんど分かっていない。近傍の PBGN に局在するグルタミン酸作動性ニューロンは恐怖および逃避行動に関わることから［5］、同様の機能を有している可能性が考えられる。MiTg に投射する Npbwr1 ニューロンを操作することで社会行動が調節されることが本実験より明らかになったが、社会的接触や社会行動時に Npbwr1 ニューロンの活動が実際どのような動態を示すかについては不明である。現在進行中であるカルシウムインディケーター（GCaMP7）を用いて Npbwr1 ニューロンの活動をモニターする実験の結果から Npbwr1 ニューロンのより詳細な生理的役割を明らかにできる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構の櫻井武教授および櫻井勝康助教である。本研究は、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団、千里ライフサイエンス振興財団、科研費（新学術領域、基盤研究）の助成を基に遂行された。

文　献

1） Okuyama et al. Ventral CA1 neurons store social memory. Science. 2016 Sep 30; 353(6307):1536-1541. PMID: 27708103 DOI: 10.1126/science.aaf7003

2） Baran et al. Applying gene regulatory network logic to the evolution of social behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jun 6; 114(23):5886-5893. PMID: 28584121 DOI: 10.1073/pnas. 1610621114

3） Sakurai Takeshi. NPBWR1 and NPBWR2: Implications in Energy Homeostasis, Pain, and Emotion. Frontiers in Endocrinology. 2013 Mar 18; 4:23. eCollection. PMID: 23515889 DOI: 10.3389/fendo.2013.00023

4） Nagata-Kuroiwa Ruby et al. Critical role of neuropeptides B/W receptor 1 signaling in social behavior and fear memory. PLoS One. 2011 Feb 24; 6(2):e16972. PMID: 21390312 DOI: 10.1371/journal.pone.0016972

5） Shang C et al. Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. Nature Communications. 2018 Mar 26; 9(1):1232. PMID: 29581428 DOI: 10.1038/s41467-018-03580-7