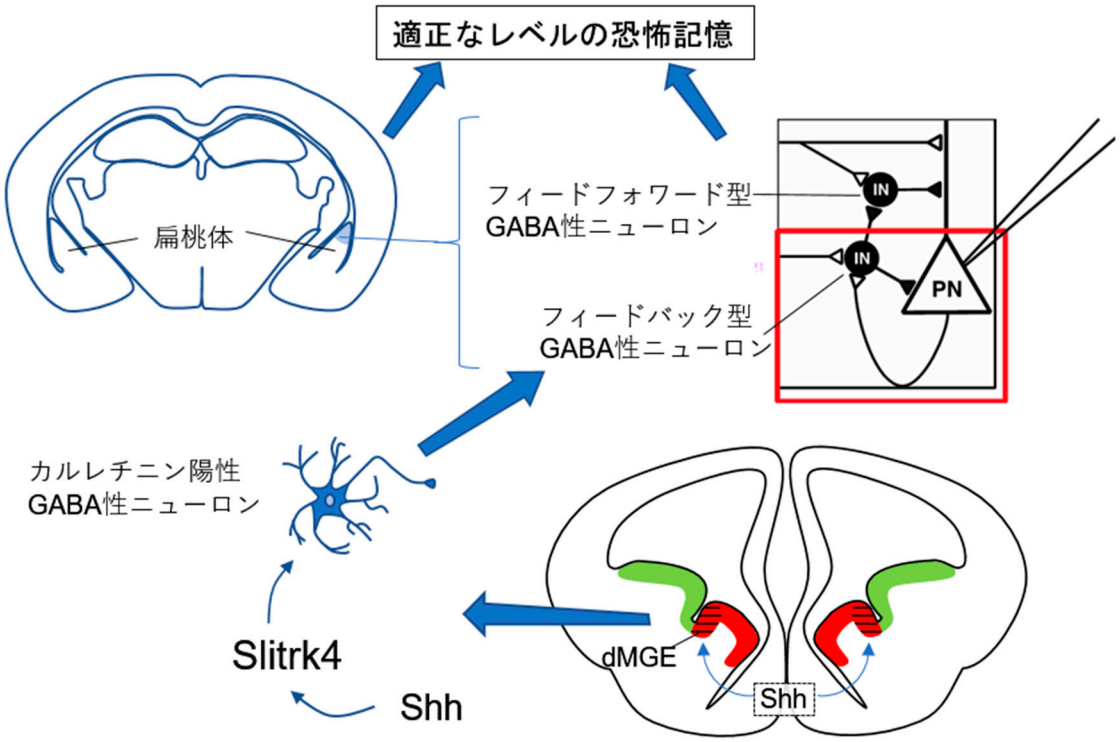
16　Slitrkによるモノアミン神経系制御の病態生理学的意義	有賀　純

【目的】6 種類の LRR（Leucine-Rich Repeat）膜貫通タンパク質よりなる Slitrk ファミリーは中枢神経系の神経突起の伸展制御、シナプス形成およびシナプス機能維持において重要な役割を持つことが知られている。最近、我々は Slitrk ファミリータンパク質がモノアミン性ニューロンを含む神経系の発達制御を行う可能性を見出した。今回は Slitrk ファミリーの 1 つである Slitrk4 を欠損するマウスについて、神経発達の異常という観点から解析を行うことにした。

【方法】独自に作製した *Slitrk4* 欠損マウスに対して、恐怖条件付け実験を含む系統的行動解析、扁桃体スライスを用いた電気生理学的解析、免疫染色解析、定量的 PCR や *in situ* ハイブリダイゼーションによる分子マーカー解析などを行った。野生型および *Slitrk4* 欠損型の ES 細胞から GABA 性ニューロンを誘導して、カルレチニンやソマトスタチンなどの GABA 性ニューロンサブタイプマーカータンパク質のウェスタンブロットによる定量解析を行った。

【結果】*Slitrk4* 欠損マウスでは恐怖記憶の獲得能、扁桃体のシナプス可塑性が増強していることが明らかになった。扁桃体のフィードバック制御を行う GABA 性ニューロンのサブタイプの発生不全が生じており、このことが恐怖記憶の関連した行動異常の背景にあるものと考えられた。ES 細胞から *in vitro* で神経分化を起こさせる実験系で、ソニックヘッジホッグシグナルを強める試薬を作用させたところ、Slitrk4 を持つ細胞と持たない細胞の間では産み出された GABA 性ニューロンの種類が異なっていた。以上の結果から、*Slitrk4* 欠損マウスではフィードバックニューロンの発生不全のため、扁桃体のシナプスの可塑性が変化し、恐怖記憶が強く形成されるようになるものと考えられた。近年、心的外傷後ストレス障害（PTSD）患者で SLITRK4 の発現に変化があるという報告があり、本研究の研究成果は PTSD の病態の理解や治療法の改善に貢献するものと期待された。

Slitrk4 はフィードバックニューロンの発生制御を通じて適正なレベルの恐怖記憶の成り立ちに寄与する



16. Slitrk によるモノアミン神経系制御の病態生理学的意義

有賀　純

長崎大学 医歯薬学総合研究科 医科薬理学

Key words：膜貫通タンパク質，モノアミン性神経系，強迫スペクトラム症，双極性障害，疾患モデル動物

緒　言

脳神経系に発現するロイシンリッチリピート（Leucine-Rich Repeat）を 含む膜貫通タンパク質（以下、LRR 膜タンパク質）は中枢神経系の神経突起の伸展制御、シナプス形成およびシナプス機能維持において重要な役割を持つことが知られている［1〜4］。我々は 2003 年に 6 種類の LRR 膜タンパク質よりなる Slitrk ファミリータンパク質を同定・命名し、発現・機能解析を行った［1］。その結果、3 系統（*Slitrk1* 欠損、*Slitrk2* 欠損、*Slitrk5* 欠損）においてモノアミン代謝の異常が起きていることを見いだした［5〜7］。これら 3 系統ではいずれもうつ様症状の指標と考えられている行動テストで異常が認められており、ノルアドレナリン性神経系、セロトニン性神経系の一方もしくは両方の発生・分化の異常が認められた。更に *Slitrk1* 欠損マウスでは強迫スペクトラム症の治療薬の 1 つであるクロニジン投与により［5］、*Slitrk2* 欠損マウスでは気分障害（双極性障害）治療薬であるリチウムを投与すると［7］行動異常が部分的に回復することがわかった。そこで、ノルアドレナリン性神経系およびセロトニン性神経系の発生発達過程を *Slitrk1* 欠損および *Slitrk2* 欠損マウスにおいて、詳細に検討したところ、*Slitrk1* 欠損マウスにおいては出生 1 週間後から、ノルアドレナリン性神経系およびセロトニン神経系の形態異常と前頭前野のノルアドレナリン過剰が起きること［6］、*Slitrk2* 欠損マウスでは幼獣で縫線核のセロトニン性ニューロンの数が 20%ほど減少していた［7］。

一方、ヒト SLITRK1、SLITRK2、SLITRK5 はそれぞれ強迫スペクトラム症（トゥレット障害、抜毛症、強迫性障害を含む)、双極性障害、強迫神経症と遺伝学的に関連することが知られている。以上から、SLITRK1、SLITRK2、SLITRK5 は「モノアミン性神経系の発達において重要な役割を果たし、これらの機能変化が不安、うつなどの状態と関係するのではないか」という仮説を得て、これらを含む LRR 膜タンパク質欠損動物のモノアミン神経系の発達・機能異常に関する解析を行った。

本稿では上原財団からの助成期間中に成果発表に至った「*Slitrk4* 遺伝子欠損マウスに観察された、扁桃体のフィードバック抑制回路の機能不全によるトラウマ記憶の増強」［8］について紹介する。怖かった体験を記憶しておくことは、動物が危険を避け、身を守るために重要な脳の機能である。一方で、極めて辛い体験をした後に、長い時間が経過しても悪夢をみたり、その辛い体験を再び体験しているかのような反応が心や体にでてしまったりすることがあり、症状が重大な苦痛を引き起こしているか、日常生活に大きな支障をきたしている場合は心的外傷後ストレス障害（post-traumatic stress disorder : PTSD）と呼ばれる。近年の研究により、怖い体験の記憶（恐怖記憶）の獲得には、扁桃体（amygdala）という脳の領域が重要な働きを持つことが分かってきた。この研究では、扁桃体の中の恐怖記憶を司る神経回路の成り立ちに Slitrk4 が必要であることを明らかにした［8］。SLITRK4 は PTSD 患者で発現が高くなっているという報告もあり、この研究成果は PTSD の病態の理解や治療法の改善に貢献するものと期待される。

方　法

Slitrk4 の脳における役割を知るために *Slitrk4* 欠損マウスを作製した［8］。恐怖条件付け、社会性行動、嗅覚

関連行動の評価を含む系統的な行動解析、スライス標本を用いた扁桃体外側核を対象とする電気生理学的解析、扁桃体や脳全体を対象とする免疫染色、ウェスタンブロット、*in situ* ハイブリダイゼーション、定量的 PCR などによる分子マーカー解析を行うことにより、*Slitrk4* 欠損マウスの表現型を解析した[8]。野生型および *Slitrk4* 欠損型の ES 細胞から GABA 性ニューロンを誘導して、カルレチニンやソマトスタチンなどの GABA 性ニューロンサブタイプマーカータンパク質のウェスタンブロットによる定量解析を行った［8]。

結　果

1. *Slitrk4* 欠損マウスにおける行動異常

まず始めに Slitrk4 がどのような脳の機能に関わるかを知るために、*Slitrk4* 欠損マウスを作製し、その行動異常 21 種類の行動試験により調べた。その結果、社会行動、嗅覚に関連した行動、恐怖記憶に関連した行動の 3 種類の行動に異常が認められた。

恐怖記憶を調べる行動実験は音刺激と不快刺激（電気ショック）を組み合わせることにより、音刺激だけを与えたときにどれだけおびえている動物に特徴的な行動（すくみ行動、じっと動かない状態）がどれくらい表れるかで恐怖記憶の強さを評価した。*Slitrk4* 欠損マウスでは音刺激後のすくみ行動が増加していた（図 1a)。マウスの脳領域のウェスタンブロットでは、嗅球や扁桃体で Slitrk4 タンパク質が検出された（図 1b）ため、扁桃体における Slitrk4 タンパク質の役割について研究を進めた。

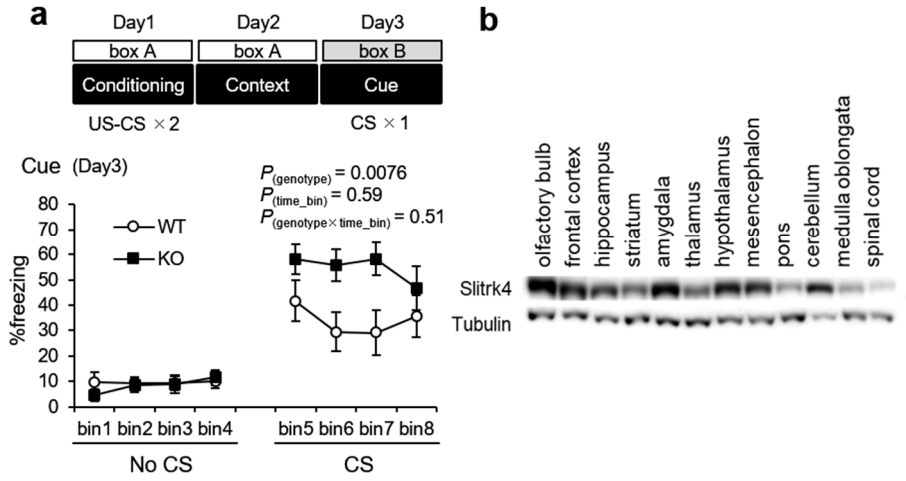


図 1. *Slitrk4* 欠損マウスの恐怖記憶異常と Slitrk4 タンパク質の脳内分布

a）マウスは、ボックス A で 2 回の CS（30 秒のノイズ）と US（脚への電気ショック）同時刺激を受け、48 時間後（Day3）に新しい環境（ボックス B）で CS（30 秒のノイズ）を受けた。すくみ（freezing）行動を定量化した。1 時間区分（bin）は 30 秒。野生型（WT）、n＝10 マウス；*Slitrk4* 欠損（KO）、n＝10 マウス。エラーバー、SEM。*P* 値は、反復測定（遺伝子型×時間区分）の 2 元配置分散分析における値を示す。

b）Slitrk4 またはチュブリンに対する抗体を使用した、野生型マウスの各脳領域由来タンパク質に対するウェスタンブロット。

2. *Slitrk4* 欠損マウスの扁桃体に見られたシナプス可塑性の異常

扁桃体を含む脳のスライスを作製して、音情報の入力神経線維を特定の条件で刺激することにより、長期間続くシナプスにおける情報伝達の効率の変化を調べた。その結果、*Slitrk4* 欠損マウスの扁桃体では長期間続くシナ

プス伝達効率の上昇（long-term potentiation：LTP）が強くなっていることがわかった（図 2a）。しかし、GABA A 受容体非競合拮抗薬 100 μM ピクロトキシン存在下では 野生型と同程度であったため、GABA を介するシナプス伝達が *Slitrk4* 欠損マウスで減弱していることが示唆された（図 2a）。その中でもフィードバック型と呼ばれるタイプの GABA 性ニューロンの働きが低下していたことがその後の解析で明らかになった（図 2b）。

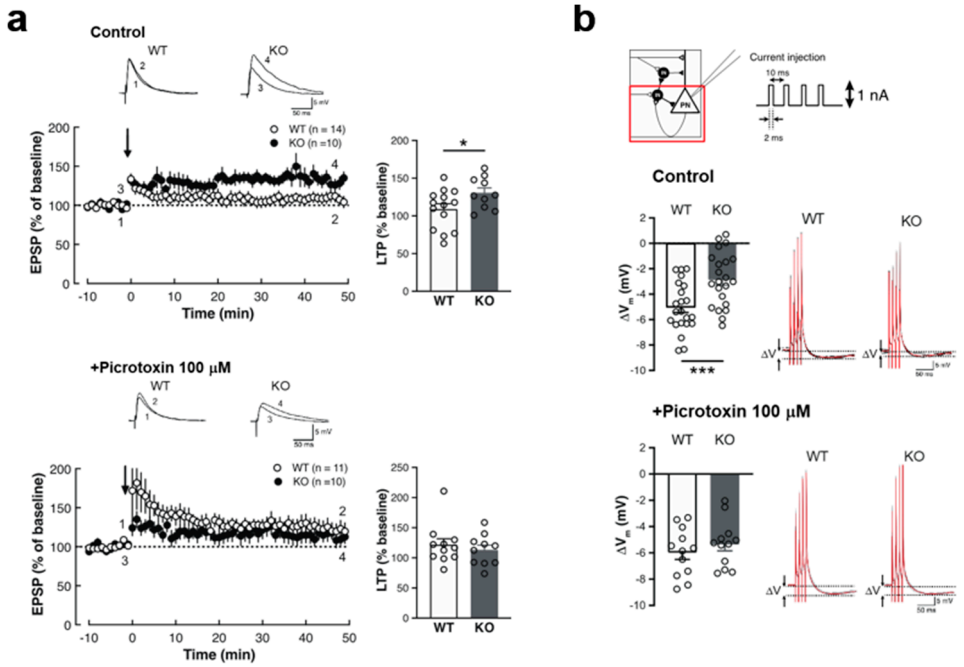


図 2. *Slitrk4* 欠損マウスの扁桃体におけるシナプス可塑性の変化

a）上段：通常条件（リンゲル液）での視床-扁桃体求心性神経の LTP。*Slitrk4* 欠損（KO）マウスの LTP は野生型マウス（WT）よりも有意に高くなっている。WT：n＝14 スライス、10 匹のマウスから；KO：n＝19 スライス、8 匹のマウスから。* Student t 検定で *P*＝0.044。エラーバー：SEM。
下段：100 μM ピクロトキシン（GABA A 拮抗薬）の存在下では、遺伝子型間で LTP に差は無い。WT：n＝11 スライス、8 匹のマウスから；KO：n＝10 スライス、10 匹のマウスから。Student t 検定で *P*＝0.52。エラーバー：SEM。

b）扁桃体錐体ニューロンへのフィードバック抑制の測定。
上段：外側核における LTP 誘導を制御する抑制回路の模式図（左上）。
中段：錐体ニューロンの興奮によって引き起こされる電圧低下（ΔV）は、*Slitrk4* KO マウスで減少していた。各遺伝子型あたり n＝22 スライス、5 匹のマウスから。****P*＝0.00090（スチューデント t 検定）。
下段：この減少はピクロトキシンによって阻止された。各遺伝子型あたり n＝12 スライス、5 匹のマウスから。*P*＝0.41（スチューデント t 検定）。

3. *Slitrk4* 欠損マウスにおけるカルレチニン陽性 GABA 性ニューロンの減少

どの種類の GABA 性ニューロンが変化しているのかを調べたところ、カルレチニン陽性の GABA 性ニューロンが *Slitrk4* 欠損マウスの扁桃体を含む脳のいくつかので減少していることがわかった［8］。扁桃体にあるカルレチニン型 GABA 性ニューロンの一部は、脳の発生の過程で内側隆起（medial ganglionic eminence）というところにある若い細胞がソニックヘッジホッグというタンパク質の影響を受けてできることが知られている。そこで、Slitrk4 を持つ ES 細胞と持たない ES 細胞から培養皿の中で幼若なニューロンを人工的に作製した。この過

程でソニックヘッジホッグシグナルを強める試薬を作用させたところ、Slitrk4 を持つ細胞と持たない細胞の間では産み出された GABA 性ニューロンの種類が異なることが明らかになった［8］。これらの結果は、Slitrk4 が、ソニックヘッジホッグシグナルの影響下に GABA 性ニューロンのサブタイプが産生される過程に関わることを示唆する。

考　察

本研究により Slitrk4 の生理学的な役割の一端が明らかになった。Slitrk4 は、カルレチニン陽性 GABA 性ニューロンが産生される過程に必要な因子の 1 つである可能性が高い。扁桃体のフィードバック型 GABA 性ニューロンがカルレチニン陽性細胞を含むことは、近年のシングルセル RNA-seq 解析の結果と矛盾しない［8］。フィードバックニューロンの発達障害のため、*Slitrk4* 欠損マウスでは扁桃体のシナプスの可塑性が変化し、恐怖記憶が強く形成されるようになるものと考える。

最近、PTSD の患者群を対象にした mRNA レベルの遺伝子発現状態の変化の調査（トランスクリプトーム解析）で PTSD の患者では SLITRK4 の発現が高くなっていることが 2 つの研究グループから報告されている［9, 10］。今回の研究結果は SLITRK4 が PTSD の病態と関わる可能性を実験動物レベルで示したものと言える。

これまで、神経系の細胞の発生・分化・発達における Slitrk ファミリーの役割については、Slitrk6 が内耳のらせん神経節の神経線維の形成に役割を持つこと［2］、Slitrk1 がノルアドレナリン性神経線維の生後発達に役割を持つこと［6］、Slitrk2 がセロトニン性神経の発生に役割を持つこと［7］が知られていたが、本研究は新たな役割を書き加えたと言える。また、Slitrk ファミリーと細胞分化に関わるシグナルとの関連でいえば、ニューロトロフィンシグナルとの関連［2］、セマフォリンシグナルとの関連［6］がこれまでに示されていたが、ソニックヘッジホッグシグナルとの関連を示した点で新しい。最近、Slitrk5 が骨組織の発生過程でソニックヘッジホッグシグナルと接点を持つことが報告されており［8］、他にもこのシグナル系と Slitrk ファミリーの機能との接点がないか注目される。本研究で得られた知見はモノアミン性神経系の発達と Slitrk ファミリーの機能的なつながりを探索する研究においても役立つものと推測する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所の三輪秀樹、福岡大学薬学部の中川慎介を含む文献［8］の共著者である。本研究を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Aruga J, Mikoshiba K. Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. Mol Cell Neurosci. 2003;24(1):117-29. PMID: 14550773. doi: 10.1016/s1044-7431(03)00129-5.

2） Katayama K, Zine A, Ota M, Matsumoto Y, Inoue T, Fritzsch B, Aruga J. Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of Slitrk6-deficient mice. PLoS One. 2009;4(11):e7786. Epub 20091111. PMID: 19936227. doi: 10.1371/journal.pone.0007786.

3) Takahashi H, Katayama K, Sohya K, Miyamoto H, Prasad T, Matsumoto Y, Ota M, Yasuda H, Tsumoto T, Aruga J, Craig AM. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPdelta trans-synaptic interaction. Nat Neurosci. 2012;15(3):389-98, S1-2. Epub 20120129. PMID: 22286174. doi: 10.1038/nn.3040.
4) Tekin M, Chioza BA, Matsumoto Y, Diaz-Horta O, Cross HE, Duman D, Kokotas H, Moore-Barton HL, Sakoori K, Ota M, Odaka YS, Foster J, 2nd, Cengiz FB, Tokgoz-Yilmaz S, Tekeli O, Grigoriadou M, Petersen MB, Sreekantan-Nair A, Gurtz K, Xia XJ, Pandya A, Patton MA, Young JI, Aruga J, Crosby AH. SLITRK6 mutations cause myopia and deafness in humans and mice. J Clin Invest. 2013;123(5):2094-102. Epub 20130401. PMID: 23543054. doi: 10.1172/JCI65853.
5) Katayama K, Yamada K, Ornthanalai VG, Inoue T, Ota M, Murphy NP, Aruga J. Slitrk1-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. Mol Psychiatry. 2010;15(2):177-84. Epub 20080916. PMID: 18794888. doi: 10.1038/mp.2008.97.
6) Hatayama M, Katayama KI, Kawahara Y, Matsunaga H, Takashima N, Iwayama Y, Matsumoto Y, Nishi A, Yoshikawa T, Aruga J. SLITRK1-mediated noradrenergic projection suppression in the neonatal prefrontal cortex. Commun Biol. 2022;5(1):935. Epub 20220909. PMID: 36085162. doi: 10.1038/s42003-022-03891-y.
7) Katayama KI, Morimura N, Kobayashi K, Corbett D, Okamoto T, Ornthanalai VG, Matsunaga H, Fujita W, Matsumoto Y, Akagi T, Hashikawa T, Yamada K, Murphy NP, Nagao S, Aruga J. Slitrk2 deficiency causes hyperactivity with altered vestibular function and serotonergic dysregulation. iScience. 2022;25(7):104604. Epub 20220614. PMID: 35789858. doi: 10.1016/j.isci.2022.104604.
8) Matsumoto Y, Miwa H, Katayama KI, Watanabe A, Yamada K, Ito T, Nakagawa S, Aruga J. Slitrk4 is required for the development of inhibitory neurons in the fear memory circuit of the lateral amygdala. Front Mol Neurosci. 2024;17:1386924. Epub 20240426. PMID: 38736483. doi: 10.3389/fnmol.2024.1386924.
9) Guardado P, Olivera A, Rusch HL, Roy M, Martin C, Lejbman N, Lee H, Gill JM. Altered gene expression of the innate immune, neuroendocrine, and nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) systems is associated with posttraumatic stress disorder in military personnel. J Anxiety Disord. 2016;38:9-20. Epub 20151210. PMID: 26751122. doi: 10.1016/j.janxdis.2015.12.004.
10) Girgenti MJ, Wang J, Ji D, Cruz DA, Traumatic Stress Brain Research G, Stein MB, Gelernter J, Young KA, Huber BR, Williamson DE, Friedman MJ, Krystal JH, Zhao H, Duman RS. Transcriptomic organization of the human brain in post-traumatic stress disorder. Nat Neurosci. 2021;24(1):24-33. Epub 20201221. PMID: 33349712. doi: 10.1038/s41593-020-00748-7.