

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18364

研究課題名(和文)多様な生得的行動を制御する神経領域：内側視索前野の機能解剖学的解析

研究課題名(英文)Functional anatomy of the medial preoptic area

研究代表者

恒岡 洋右 (TSUNEOKA, Yousuke)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：50549011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内側視索前野は視床下部吻側に位置し、多様な生得的行動の中核的役割を担うことが知られている。しかし、その解剖学的な複雑性が障壁となり、亜領域レベルでの機能や解剖において不明な点が多かった。マウスを用いた解剖学的・機能的な解析により、我々はMPOA亜領域の解剖学的再検討を行い、分子マーカーに基づいた脳地図を作成した。また、性ホルモン受容体の発現と、分子マーカーの発現について報告した。それらのマップを基盤に、MPOAで養育行動・性行動・攻撃行動の際に活性化する神経細胞群の同定を行った。加えて、MPOAで養育行動・性行動・攻撃行動を制御する神経細胞群について検討した。

研究成果の概要(英文)：The medial preoptic area (MPOA) is located at the anterior portion of the hypothalamus. This area has been known to be the brain center for the widely diverse behaviors. However, little is known for their function and anatomy because of the heterogeneity and complexity of the MPOA anatomy. We reviewed the anatomy of the MPOA subregions by using molecular markers, and developed the atlas of the MPOA. We also reported the gonadal steroid hormone receptor expressions in the MPOA with the molecular marker expression. Based on these results, we assessed the neural activity during various instinctive behaviors by means of histological analyses of c-Fos expression. In addition, using cre-loxp mediated manipulation of the neural activity, the responsible cell groups for regulating various behavior were determined.

研究分野：神経解剖学

キーワード：MPOA 養育行動 性行動 攻撃行動 性ホルモン受容体 c-Fos

1. 研究開始当初の背景

性行動や養育行動、攻撃行動、摂食などの生得的な動機づけは生存や繁殖に必須であり、その破綻は性依存症や情動障害、虐待、過食症などとして顕在化する(Stolzenberg & Numan 2011 *Nuerosci Biobehav Rev*)。この生得的動機づけの神経回路の一部として最も重要だと考えられているのが内側視索前野-腹側被蓋野系である(Becker et al. *Sex Differences in the Brain*, 2008, 図1)。その中でも内側視索前野は視床下部の最も吻側に位置する領域であり、内分泌情報や環境情報、他個体の情報などの社会的情報を統合し、下流の複数の情動に関わる神経領域を制御すること、性行動や養育行動、攻撃行動などの生得的な社会行動を制御する中枢であることが古典的な破壊実験や投射解析から示唆されてきた。また、社会行動に限らず、睡眠や摂食、体温調節などの多岐に渡る生命活動の根源的機能を担う領域としても知られている。

しかし、その生体機能における多くの示唆がある一方で、機能解剖における課題は多い。まず、内側視索前野に分布する亜核及び内側視索前野と隣接領域との境界が研究者間でも一致していない。研究代表者が実際の遺伝子発現や投射パターンを詳細に調べたところ、最も汎用される2つの脳地図と乖離があった(Tsuneoka et al. *J. Comp. Neurol.* 2013)。さらに、様々な種類の神経細胞が同所的に混在しており、神経毒注入などの古典的な破壊実験では妥当性を備えた結果が得られない。内側視索前野は動機づけの神経機構研究においてその重要性が認識されてきた一方で、形態的・機能的複雑性が研究の障害となり、ブラックボックスとして扱われることも少なくなかった。

このような背景を鑑みて、研究代表者らは内側視索前野にどのような種類の神経細胞が分布するかを調べ、その解剖について再検討し、細分化した領域がどのような行動に関連するかについて研究を進めてきた(Tsuneoka et al. 2013 *J Comp Neurol*)。その結果、同所的に分布するが行動によって異なる種類の神経細胞が活性化していることが明らかになった(Tsuneoka et al. 2015 *EMBO J*)。以上から、研究代表者は内側視索前野-腹側被蓋野系が複数の行動の動機づけを調節するメカニズムの作業仮説として、各行動に対応する特異的神経ネットワークの存在を想定した。

2. 研究の目的

各行動に対応する特異的神経ネットワークの存在を実証するため、数段階の目的を設定した。まずは内側視索前野内部の亜領域レベルでどのような種類の神経細胞が分布しているのについて解明することを目的とし

た。次に、そのデータに基づき、どのような行動時に、どの部位のどの種類の神経細胞が活動しているのかについて、神経活性化マーカーである c-Fos を用いて検討した。最終的に、それらの細胞が実際に行動制御に貢献しているのかについて検討するため、領域・神経細胞種特異的な操作を DREADD システム(Armbruster et al. 2007 *PNAS*)を用いて行うことで、内側視索前野の細胞が性行動・養育行動・攻撃行動・摂食行動に果たす役割を検討した。

3. 研究の方法

(1)(2) MPOA 亜領域の解剖学的再検討と性ホルモン受容体を発現する細胞群

内側視索前野の分子細胞構築を調べるための組織学的解析として、成体の C57BL6J 系統の雄マウスにおいて *in situ* hybridization (ISH) 法と免疫染色法を用いて、網羅的に解析を行った。内側視索前野の分子マーカーは *allen brain atlas* (<http://www.brain-map.org/>)により、内側視索前野の亜領域レベルで特異性が高く、発現強度の強いものを選択した。内側視索前野が制御する生得的な行動の多くは性ホルモン受容体細胞が主要な役割を持つことが良く知られていることから、上記の分子マーカーを ISH 法により検出し、性ホルモン受容体については免疫染色により検出することで、内側視索前野の解剖学的再検討を行い、亜領域マップを作製すると同時に、生得的行動に重要と思われる細胞群の絞り込みを行った。

(3) MPOA で養育行動・性行動・攻撃行動時に活性化する神経細胞群

上記(2)の実験で分布及び性ホルモン受容体を発現することが確認できた細胞種において、養育行動・性行動・攻撃行動時に神経活動マーカーである c-Fos を発現する細胞との対応付けを行った。各行動を行ったマウスを、その2時間後に灌流固定し、c-Fos の発現を誘導した。マウス脳は薄切し、ISH 法および抗 c-Fos 抗体による免疫染色を組み合わせることで細胞レベルの同定を行った。

(4) MPOA で養育行動・性行動・攻撃行動を制御する神経細胞群

(3)により絞り込みを行った細胞群をそれぞれ特異的に操作を行うため、それぞれの細胞に対応する Cre ドライバーマウスを Jackson 研究所より入手もしくは筑波大学動物資源センターに依頼して作製した。各マウス系統は C57BL/6J 系統に合計10回以上戻し交配を行った上で以降の実験に用いた。マウスの内側視索前野にセロタイプ II 型の遺伝子改変アデノ随伴ウイルス(AAV)を注入し、

Cre 発現依存的に任意の遺伝子を発現させることにより、特定の細胞群を操作した。具体的には、6 系統の Cre ドライバースマウスを用い、AAV はヒトジフテリア毒素受容体、変異型ムスカリン受容体である hM3Dq もしくは hM4Di、GFP を発現するものを用意した。Cre ドライバースマウスに AAV を感染させた 4 週間後から、養育行動、性行動、攻撃行動の変化について検討を行った。実験終了後にマウスは解剖し、AAV の感染部位について確認した。

(5) 性的二型核の新規マーカーの同定

上記の一連の実験の過程で、内側視索前野の性的二型核に特異性が非常に高い分子マーカー Moxd1 を新たに発見した。そこで、上記実験とは別に、この分子マーカーについて、その発現分布と性ホルモン感受性、雌雄差について調べるとともに、他の脳領域での発現分布についても検討した。このマーカーは既存の性的二型核マーカーである Calbindin D 28K との分布が全脳的に類似していたため、二重染色を行い、細胞レベルでの共局在についても検討した。

4 . 研究成果

(1) MPOA 亜領域の解剖学的再検討

従来脳のマッピングに用いられていた Nissl 染色と合わせて行った MPOA 亜領域の検討により、MPOA で機能的にも重要と考えられ、領域分けにも利用可能と思われる分子マーカーとして、Calbindin, Vglut2, Neurotensin, Penk, Oxytocin を見出した。これまで、MPOA 内で認識されていた MPN, PDPN, VLPO などの神経核以外の領域は特に区別されることなくその他の領域として扱われていたが、これらのマーカーを活用することで、新たに dmMPOA, cMPOA, vMPOA, vIMPOA として区別することが可能になった。さらに、MPOA 最大の亜核である MPN に関しても、より細かく分類することが可能になった。

(2) MPOA で性ホルモン受容体を発現する細胞種

MPOA において、エストロゲン受容体とアンドロゲン受容体の分布及び細胞レベルの共局在を検討し、MPOA の多くの領域において同一細胞で両受容体が発現していることを確認した。加えて、MPNma や BNSTpr などの一部の領域では両受容体の発現細胞数に違いがあることも見出している。

次に MPOA において、10 種の神経伝達物質及び神経ペプチドを発現する細胞種についてエストロゲン受容体とアンドロゲン受容体の発現について検討した。その結果、Neurotenin, Galanin, Penk, Tac2 において

は約 70% の細胞で性ホルモン受容体を発現していることが明らかとなった。一方で、Cart, Vglut2, Pdyn, Tac1 などでは亜領域レベルで性ホルモン受容体の発現が異なっており、概して 20-50% が性ホルモン受容体を発現していた。ほとんどの Trh 陽性細胞において性ホルモン受容体の発現が確認できなかった。Pdyn, Tac1 については 2 つの性ホルモン受容体において発現が異なっており、エストロゲン受容体よりもアンドロゲン受容体が多く発現していた。

(3) MPOA で養育行動・性行動・攻撃行動の際に活性化する神経細胞群

養育行動・性行動・攻撃行動を行ったマウスの MPOA において神経活動マーカーである c-Fos の発現分布を調べたところ、cMPOA を中心に発現が見られたが、その分布パターンは明らかに異なっていた。このことは亜領域レベルで同所的に分布する神経細胞が異なる状況で活動していることを示唆している。詳しくそれらの神経細胞の性質を調べたところ、各行動においてそれぞれ複数種類の神経細胞が活動していること、その比率が異なることが明らかとなった。

(4) MPOA の養育行動・性行動・攻撃行動を制御する細胞群

導入した Cre ドライバースマウス 6 系統のうち、戻し交配を終えている 3 系統について神経活動操作実験を行った。

その結果、1 系統では神経活動抑制時に養育行動が消失し、神経活動促進時に養育行動の開始が見られた。特に神経活動を促進した場合には、通常養育行動の開始時に見られる巢作り行動が極端に促進した。この行動促進は既に養育モチベーションの高まっている母マウスでは観察されなかった。例数は少ないものの、この系統では神経活動操作時に他の行動にも変化がみられる傾向もあった。

別の 1 系統では神経活動抑制時に養育モチベーションの高い個体で、仔マウスに対する行動が減少した。しかし、神経活動促進時には養育モチベーションが上がる表現型は観察されなかった。

調べた別の 1 系統では神経活動促進時に性行動の亢進が見られ、特に性的対象とならない相手に対してもマウントやイントロミッションなどの行動が見られ、発情雌の認識に関与している可能性が示唆された。

(5) 性的二型核新規マーカー

Moxd1 は性的二型核である SDN-POA に特異的に発現し、MPOA のその他の領域では発現が見られなかった。これは既存のマーカーである

Calbindin よりもはるかに SDN-POA に対する特異性が高く、マーカーとして有用であることを示唆している。Moxd1 の発現はオスで高く雌で低いことに加え、成体マウスの去勢やホルモン処理では発現強度は変化しなかった。一方、脳の雄性化を決定する出産前後のテストステロンを除くために出産当日に去勢した実験では、このような雄バイアスの Moxd1 発現は消失した。さらに、既に性的二型が報告されている MPOA 以外の部位である BNSTpr, MeA においても Moxd1 は強く発現しており、SDN-POA と同様に雄バイアスの発現を示し、出産当日の去勢により性的二型性は消失した。以上から、Moxd1 は SDN-POA だけでなく、脳の様々な領域において雄バイアスの性的二型核のマーカーであることが強く示唆された。

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)

Oda Satoko, Tsuneoka Yousuke, Yoshida Sachine, Adachi-Akahane Satomi, Ito Masanori, Kuroda Masaru, Funato Hiromasa Immunolocalization of muscarinic M1 receptor in the rat medial prefrontal cortex Journal of Comparative Neurology 526 2018 1329-1350

DOI: 10.1002/cne.24409

査読あり

Tsuneoka Yousuke, Yoshida Sachine, Takase Kenkichi, Oda Satoko, Kuroda Masaru, Funato Hiromasa Neurotransmitters and neuropeptides in gonadal steroid receptor-expressing cells in medial preoptic area subregions of the male mouse Scientific Reports 7 2017 1-13

DOI: 10.1038/s41598-017-10213-4

査読あり

Okabe S, Tsuneoka Y, Takahashi A, Ooyama R, watarai A, Maeda S, Honda Y, Nagasawa M, Mogi K, Nishimori K, Kuroda M, Koide T, Kikusui T Pup exposure facilitates retrieving behavior via the oxytocin neural system in female mice Psychoneuroendocrinology 79 2017 20-30

DOI: 10.1016/j.psyneuen.2017.01.036

査読あり

Tsuneoka Y, Tsukahara S, Yoshida S, Takase K, Oda S, Kuroda M, Funato H Moxd1 is a marker for sexual dimorphism in the medial preoptic area,

bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdala. Frontiers in Neuroanatomy 11 2017 1-13

DOI: 10.3389/fnana.2017.00026

査読あり

恒岡洋右, マウス内側視索前野の養育行動における役割 東邦医学会雑誌 62 2015 117-119

<http://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-1026592227-00>

査読なし

[学会発表](計 5 件)

恒岡洋右, 吉田さちね, 小田哲子, 黒田優, 船戸弘正, マウス内側視索前野における神経ペプチドmRNA 発現と性的二型 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018年

恒岡洋右, 塚原伸治, 吉田さちね, 小田哲子, 黒田優, 船戸弘正, 性的二型核マーカーMoxd1の内側視索前野における発現 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年

恒岡洋右, 吉田さちね, 小田哲子, 黒田優, 船戸弘正, マウス内側視索前野の性ホルモン受容体発現細胞における分子組成 第25回日本行動神経内分泌研究会 2016年

恒岡洋右, 吉田さちね, 小田哲子, 黒田優, 船戸弘正, 生得的社会行動を制御する内側視索前野の機能解剖学的解析 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016年

Tsuneoka Y, Yoshida S, Oda S, Kuroda M, Funato H, Functional neuroanatomy of the medial preoptic area: a study on its functional and anatomical heterogeneity The 38th annual meeting of the Japan Neuroscience Society 2015年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://toho-funatolab.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
恒岡 洋右 (TSUNEOKA, Yousuke)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号： 50549011

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし