

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08573

研究課題名(和文) 思春期社会的ストレスが成熟後の社会行動に与える影響とその機序の解明

研究課題名(英文) Effects of adolescent social stress on adult social behavior

研究代表者

高柳 友紀 (Takayanagi, Yuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10418890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでにラットを用いて思春期の社会的遊びを阻害されると成体で社会行動の障害が起こることを示してきた。この現象にオキシトシン神経回路の可塑的な機能低下が関連するという仮説を検証することが本研究の目的であった。本研究では社会的遊び行動によって活性化されるオキシトシン神経回路を同定し、活動操作するための遺伝子組換えラットを作製した。オキシトシン受容体遺伝子欠損ラットでは、思春期の社会的遊び行動と成熟後の社会行動には異常が認められなかったため、オキシトシン産生ニューロンを破壊して、社会的遊び行動によって活性化されるオキシトシン産生ニューロンの役割の検証を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼少期の経験により成熟後の社会行動が制御される神経機序についてはこれまでほとんど明らかになっていない。本研究では、この現象に関連する可能性が高いオキシトシン神経回路を同定・阻害・活動操作する手法を確立した。この神経機序の同定は、社会行動の障害を成熟後に改善する手法の開発につながる。また、本研究で作製した遺伝子改変動物は他のオキシトシン関連研究においても利用出来るため学術的に有用である。

研究成果の概要(英文)：We have shown that deprivation of social play behavior in adolescent rats leads to impaired social behavior in adult rats. The purpose of this study was to test the hypothesis that this phenomenon is related to plastic dysfunction of oxytocin neural circuits. In this study, we generated genetically modified rats to identify the oxytocin neural circuits activated by social play behavior and manipulate their activities. Since oxytocin receptor-deficient rats showed no abnormalities in social play behavior during adolescence and social behavior after maturation, we are verifying the roles of oxytocin-synthesizing neurons by selective ablation of these neurons.

研究分野：生理学、神経科学

キーワード：オキシトシン 社会行動 ストレス 思春期 遊び

1. 研究開始当初の背景

思春期の社会的遊びは社会性の発達に重要と考えられている。しかし、この神経基盤はほとんど明らかになっていない。

我々はマウスやラットを用いて、オキシトシン-オキシトシン受容体系が社会行動制御に重要であることを示してきた。また、幼少期にオキシトシン受容体が活性化されることが正常な社会行動の発達に必須であることを見出した。さらに、思春期に虐待やネグレクトの様な社会的ストレスを経験したヒトで、血中オキシトシン濃度が低下すると報告されている。これらのことから、思春期に社会的ストレスを受けるとオキシトシン系の活動が可塑的に低下し、成体になってからの社会行動が障害されることが考えられる。

ラットは離乳から性成熟までの思春期に当たる期間、社会的遊び行動を多く示す。我々はラットが遊び行動を示す時にオキシトシン産生ニューロンが活性化されること、遊びを阻害すると成体になってからの社会的相互作用が阻害されることを見出した。これらのことから、思春期に社会的遊びが阻害されるとオキシトシン系の活動が可塑的に低下し、成体になってからの社会行動が障害されることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では「思春期に遊ぶことでオキシトシン神経回路が賦活化されて成熟後の社会行動が促進されるが、思春期に遊びが阻害されると、オキシトシン神経回路が可塑的に機能低下して成体で社会行動の障害が起こる」という仮説を検証することを目的とした。

そのため、遊び行動時に活性化されるオキシトシン神経回路の同定、遊び行動時に活性化されるオキシトシン産生ニューロンの役割の解析、遊び行動の阻害による成熟後の社会行動障害の解析、遊び行動の阻害によりオキシトシン神経回路が可塑的に機能低下するかの検証、オキシトシン神経回路特異的な賦活化による回復するかの検証により、オキシトシン神経回路の役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 遊び行動時に活性化されるオキシトシン神経回路の同定：遊び行動によって活性化されるオキシトシン産生ニューロンを同定するため、神経活動マーカーである c-Fos とオキシトシンの二重免疫組織化学法を行った。

(2) 思春期の社会的遊びを阻害した時の成熟後の社会行動への影響の解析：離乳後から成体になるまでの間、社会的隔離によって遊び行動を阻害した群（隔離群）隣で同居ラットが遊ぶところを観察できるが一緒に遊ぶことを阻害した群（遊び行動観察群）遊び行動群を設定した。これらに対して、成熟後に社会的遊びに伴う快情動の指標である 50kHz 帯域の超音波発声を聞かせ、接近行動を観察した。

(3) 社会的遊びによって活性化されるオキシトシン神経回路を同定・活動操作するための遺伝子改変ラットの開発：同定したオキシトシン産生ニューロンの投射先を解析するため、オキシトシン遺伝子プロモーター制御下で蛍光タンパク質 tdTomato と DNA 組換え酵素 Flippase を発現するトランスジェニック (OXT-tdTomato-2A-Flippase Tg) ラットを作製した。この動物に対して、

Flippase 依存的に緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを局所投与し、Flippase が機能することを確認した。さらに、オキシトシン受容体プロモーター制御下で蛍光タンパク質 Venus と Flippase を発現するノックインラットを作製した。

(4) オキシトシン受容体遺伝子欠損ラットにおける思春期の社会的遊び行動と成熟後の情動行動・社会行動の解析：遊び行動におけるオキシトシン-オキシトシン受容体システムの機能を明らかにする目的で、CRISPR-Cas9 系を用いてオキシトシン受容体遺伝子欠損ラットを作製した。この動物を用いて、思春期に同じ遺伝子型同士で遊ばせた時の 50 kHz 超音波発声、成熟後の情動行動（オープンフィールドテスト、高架十字迷路テスト、明暗箱テスト）と社会行動（ホームケージにおける社会的行動の 48 時間測定）の評価を行った。

(5) オキシトシン産生ニューロンを新生児期に破壊する系の確立：オキシトシン産生ニューロンを特異的に破壊するために、7 日齢のオキシトシン-ヒトジフテリア毒素受容体-2A-YFP トランスジェニックラットに対してジフテリア毒素を脳室内投与あるいは視床下部室傍核に局所投与し、免疫組織化学法によってオキシトシン陽性細胞数を検討した。

4. 研究成果

(1)神経活動マーカーである c-Fos の発現を詳細に検討することで、遊び行動時のラットでは視床下部室傍核尾側部のオキシトシン産生ニューロンが特異的に活性化されることを見出した。我々は、これまでに、撫でる親和的接触刺激によってもこの部位のオキシトシン産生ニューロンが特異的に活性化されることを見出している（ ）。どちらの刺激においても快情動の指標である 50 kHz 帯の超音波発声を示すため、快情動に伴って視床下部室傍核尾側部のオキシトシン産生ニューロンが特異的に活性化される可能性が考えられる。

(2)遊び行動を阻害したラットの成熟後の社会行動について、社会的相互作用が阻害されるだけでなく、快情動に伴う 50 kHz 帯域の超音波発声に対する接近行動が減少し、50 kHz 帯発声への嗜好性が抑制されることを見出した。

(3)オキシトシン遺伝子プロモーター制御下で蛍光タンパク質 tdTomato と DNA 組換え酵素 Flippase を発現するトランスジェニックラットを作製し、ラインの選定を行った。オキシトシン産生ニューロンの存在する分界条床核、視床下部室傍核、視索上核の全てにおいて、オキシトシン産生ニューロンの 90%程度で tdTomato の発現が観察され、トランスジーンの特異的な発現が確認できた。この動物に、Flippase 依存的に緑色蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを投与し、Flippase が機能することを確認した。また、オキシトシン受容体プロモーター制御下で蛍光タンパク質 Venus と Flippase を発現するノックインラットを作製し、1 コピー正しく挿入されているラインを得た。今後はこれらのラットを用いて、社会的遊び行動によって活性化されるオキシトシン神経回路の同定とその活動操作を行う。

(4)遊び行動におけるオキシトシン-オキシトシン受容体システムの機能を明らかにする目的で、CRISPR-Cas9 系を用いてオキシトシン受容体遺伝子欠損ラットを作製し、ゲノム配列の確認を行ってラインの選定をした。また、この遺伝子欠損ラットの脳における受容体オートラジオグラフィマッピングによって、オキシトシン受容体が欠損しているラインを得たことを確認した。このオキシトシン受容体遺伝子欠損雄ラットを用いて、思春期の遊び行動時の快情動を示す超音波発声と、成熟後の情動・社会行動について評価を行った。思春期のオキシトシン受容体遺伝子欠損ラットにおいて、遊び行動中の超音波発声数は野生型と差は無かった。また、成熟したオキシトシン受容体遺伝子欠損ラットにおいて、オープンフィールドテスト、高架十字迷路テスト、明

暗箱テストを用いて情動行動の評価を行ったが、野生型と差はなかった。さらに、社会行動の一つである寄り添い行動についても、野生型と差が無かった。

(5)遊び行動時に活性化されるオキシトシン産生ニューロンの役割解析のために、オキシトシンプロモーター制御下でヒト改変ジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックラットを用いることを計画した。この動物に対して乳児期にジフテリア毒素を脳室内に投与して、オキシトシン産生ニューロンが破壊される条件を決定した。さらに、視床下部室傍核に局所投与し、オキシトシン産生ニューロンが破壊される条件を検討した。現在、室傍核のオキシトシン産生ニューロンが破壊される最適な条件について、さらなる検討を進めている。

引用文献

Okabe, S., Takayanagi, Y., Yoshida, M., and Onaka, T. (2021). Post-weaning stroking stimuli induce affiliative behavior toward humans and influence brain activity in female rats. *Sci Rep* 11, 3805.

Okabe, S., Takayanagi, Y., Yoshida, M., and Onaka, T. (2020). Gentle stroking stimuli induce affiliative responsiveness to humans in male rats. *Sci Rep* 10, 9135.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Onaka T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Post-weaning stroking stimuli induce affiliative behavior toward humans and influence brain activity in female rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83314-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Onaka T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Gentle stroking stimuli induce affiliative responsiveness to humans in male rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66078-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida M, Takayanagi Y, Ichino-Yamashita A, Sato K, Sugimoto Y, Kimura T, Nishimori K.	4. 巻 160
2. 論文標題 Functional Hierarchy of Uterotonics Required for Successful Parturition in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2800 ~ 2810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2019-00499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Onaka T, Takayanagi Y	4. 巻 31
2. 論文標題 Role of oxytocin in the control of stress and food intake.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jne.12700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, Inutsuka A, Nishimori K, Yamanaka A, Onaka T	4. 巻 159 (2)
2. 論文標題 Oxytocin-Oxytocin Receptor Systems Facilitate Social Defeat Posture in Male Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 763-775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2017-00606.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 吉田匡秀、犬束歩、高柳友紀、尾仲達史	4. 巻 35 (7)
2. 論文標題 分子から迫る神経薬理学 バゾプレシン・オキシトシン受容体に関する臨床応用 精神・神経疾患への応用の試み	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 769-771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高柳友紀、吉田匡秀、犬束歩、尾仲達史	4. 巻 35 (6)
2. 論文標題 分子から迫る神経薬理学 バゾプレシン受容体の機能 中枢作用を中心に	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 640-642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 犬束歩、高柳友紀、吉田匡秀、尾仲達史	4. 巻 35 (5)
2. 論文標題 分子から迫る神経薬理学 オキシトシン受容体の機能	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 508-509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 尾仲達史、犬束歩、高柳友紀、吉田匡秀	4. 巻 35 (4)
2. 論文標題 分子から迫る神経薬理学 バゾプレシン受容体とオキシトシン受容体の種類	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 376-377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 犬束歩、吉田匡秀、高柳友紀、尾仲達史
2. 発表標題 社会性敗北ストレスによる行動変容におけるオキシトシンの機能
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, Inutsuka A, Onaka T
2. 発表標題 Role of the oxytocin receptor in social defeat stress.
3. 学会等名 第30回バゾプレシン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田匡秀、高柳友紀、木村正、西森克彦
2. 発表標題 分娩に必要な子宮収縮因子の機能的なヒエラルキー
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本まきや、吉田匡秀、岡部祥太、犬束歩、高柳友紀、尾仲達史
2. 発表標題 他個体に対する毛繕い行動中のオキシトシン受容体発現細胞の活性化
3. 学会等名 第31 回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高柳友紀、Nasanbuyan Naranbat、吉田匡秀、犬束歩、尾仲達史
2. 発表標題 社会的敗北ストレスにおけるオキシトシンの役割
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inutsuka A, Yoshida M, Takayanagi Y, Onaka T
2. 発表標題 Genetic manipulation of oxytocin receptor-expressing neurons using GFPdependent Cre recombinase and Oxtr-Venus knock-in mice
3. 学会等名 13th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida M, Matsumoto M, Okabe S, Inutsuka A, Takayanagi Y, Onaka T
2. 発表標題 Indispensable role of the oxytocin receptor for allogrooming behavior toward socially distressed cage mates in female mice.
3. 学会等名 13th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida M, Takayanagi Y, Kimura T, Nishimori K
2. 発表標題 Genetic evidence that oxytocin/oxytocin receptor system is crucial to induce enough labor force for appropriate expulsion of the fetus in mice.
3. 学会等名 13th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Onaka T, Yoshida M, Matsumoto M, Nasanbuyan N, Takayanagi Y, Inutsuka A
2. 発表標題 The oxytocin-oxytocin receptor system in stress-related pathways.
3. 学会等名 The Third Sino-Japan Symposium on the Frontier of Behavioral Neuroendocrinology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 犬束歩、吉田匡秀、高柳友紀、尾仲達史
2. 発表標題 前頭前皮質に局在するオキシトシン受容体発現ニューロンのストレス応答における機能解析
3. 学会等名 第46回自律神経生理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, Inutsuka A, Nishimori K, Yamanaka A, Onaka T
2. 発表標題 Oxytocin-Oxytocin receptor systems facilitate social defeat posture in male mice.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M, Nasanbuyan N, Okabe S, Inutsuka A
2. 発表標題 Roles of oxytocin in the control of stress and social behavior.
3. 学会等名 The 9th International Congress of Neuroendocrinology (ICN2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡部 祥太, 高柳 友紀, 吉田 匡秀, 尾仲 達史
2. 発表標題 異種間における親和的關係性構築のメカニズム解明に向けて—ラットを用いた研究—
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本まきや、吉田匡秀、犬束歩、高柳友紀、尾仲達史
2. 発表標題 他個体に対する毛繕い行動中のオキシトシン受容体発現細胞の活性
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田匡秀、Naranbat Nasanbuyan、高柳友紀、犬束歩、尾仲達史
2. 発表標題 中枢神経系におけるオキシトシン投射線維とオキシトシン受容体の分布：新規の社会行動関連神経回路とその機能
3. 学会等名 第28回バゾプレシン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Onaka T
2. 発表標題 Stroking stimuli form an affiliative relationship between humans and rats
3. 学会等名 行動2017 (Koudou2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Onaka, T, Takayanagi, Y, Nasanbuyan, N, Yoshida, M, Inutsuka, A
2. 発表標題 Activation of oxytocin neurons in response to secretin administration and social defeat stress
3. 学会等名 The 12th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH 2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾仲達史、Naranbat Nasanbuyan、吉田匡秀、高柳友紀、犬束歩
2. 発表標題 社会的敗北とオキシトシン
3. 学会等名 第27回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 医学部 生理学講座 神経脳生理学部門 ホームページ
<http://www.jichi.ac.jp/usr/pys1/admpys1/>
 自治医科大学 教員業績データベース
<http://kyouingyousekidb.jichi.ac.jp/profile/ja.202854f017a443ce.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------