

令和 3 年 6 月 7 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：17K08574

研究課題名(和文)レジリエンスの神経回路基盤：プロラクチン放出ペプチド神経回路の役割

研究課題名(英文)Neural basis of resilience: a role of prolactin-releasing peptide

研究代表者

吉田 匡秀 (Masahide, Yoshida)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30533955

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)：CRISPR/Cas9法を用いて、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子欠損マウス、時間・部位特異的にプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子を欠損できるマウス、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Venus knock-inマウスを作製した。また、胚性幹細胞に対する相同性組換え法を用いて、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Flippase knock-inマウスを作製した。プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Venus knock-inマウスの解析から、うつ様行動に関連する脳領域を含む、新奇のプロラクチン放出ペプチド受容体発現脳領域を複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

復元力を意味する「レジリエンス」が不十分なヒトは、うつ病といったストレス関連精神神経障害を発症し易いという概念がある。しかし、その分子基盤はよく判っていない。申請者が行ってきたこれまでの研究から、レジリエンスを担う候補因子としてプロラクチン放出ペプチドを見出した。本研究を通じて、プロラクチン放出ペプチド受容体が発現する脳領域を同定する方法、時間・部位特異的にプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子を欠損させる方法、プロラクチン放出ペプチド受容体発現細胞を人為的に活動操作する方法を独自に開発した。本研究はストレス関連精神神経障害の治療に繋がる可能性が有る。

研究成果の概要(英文)：By Using of the CRISPR/Cas9 system, we generated prolactin-releasing peptide receptor gene-deficient mice, conditional prolactin-releasing peptide receptor gene-deficient mice, and prolactin-releasing peptide receptor-Venus knock-in mice. We also generated prolactin-releasing peptide receptor-Flippase knock-in mice using homologous recombination applied to mouse embryonic stem cells. From the analysis of the prolactin-releasing peptide receptor-Venus knock-in mice, We found several novel prolactin-releasing peptide receptor-expressing brain areas, including brain areas associated with depression-like behavior.

研究分野：生理学、神経科学

キーワード：ストレス プロラクチン放出ペプチド レジリエンス うつ病 心的外傷後ストレス障害

## 1. 研究開始当初の背景

慢性的に続くストレスや深刻なストレスを受けたことで、うつ病や心的外傷後ストレス障害を発症するヒトがいる。一方で、同様なストレスを受けても発症せずに回復するヒトもいる。この違いは個人が持つ「レジリエンス」に差があることが一因と考えられる。レジリエンスとは、ストレス負荷状態から、正常な状態に戻ろうとする「復元力」、「回復力」を意味する。このレジリエンスが不十分なヒトは、うつ病や心的外傷後ストレス障害といったストレス関連精神神経障害を発症し易いという概念がある。この概念の妥当性は臨床的に認知されている。しかし、その分子基盤は明らかになっていない。申請者が行ってきたこれまでの研究から、レジリエンスを担う候補因子としてプロラクチン放出ペプチドを見出した。

プロラクチン放出ペプチドは、脳において延髄孤束核、延髄腹外側部、視床下部背内側核の3カ所に限局して存在している。さらに、延髄孤束核、延髄腹外側部では、プロラクチン放出ペプチドはTyrosine hydroxylaseニューロンに発現しており、プロラクチン放出ペプチド陽性細胞は全てカテコラミンニューロンである。

プロラクチン放出ペプチドは、下垂体前葉に発現するGタンパク質共役型受容体であるGPR10に対するリガンドとして1998年に報告された。当初プロラクチン放出ペプチドは、*in vitro*においてプロラクチン放出を促進する神経ペプチドとして報告された。しかし、プロラクチン放出ペプチドは下垂体前葉を制御する他の視床下部ホルモンとは異なり、正中隆起に投射するニューロンには発現しておらず、門脈血中には放出されないことが判ってきた。そのため、プロラクチン放出ペプチドの生理機能に関しては不明な点が多かった。

これまでの申請者の研究から、(1)齧歯類にうつ様行動を惹起させる事が知られている社会的敗北ストレスを、マウスに負荷すると延髄孤束核、延髄腹外側部、視床下部背内側核の3カ所のプロラクチン放出ペプチド産生ニューロンが活性化されること(未発表データ)、(2)慢性的な社会的敗北ストレスを、プロラクチン放出ペプチド遺伝子欠損マウスに対して負荷すると、うつ様行動である同種マウスへの社会的探索意欲の減弱が起こること(未発表データ)、(3)心的外傷後ストレス障害のモデルの1つである条件恐怖学習試験を、プロラクチン放出ペプチド遺伝子欠損マウスに対して負荷すると、恐怖記憶が増強すること(Yoshidaら *Endocrinol.* 2014)、(4)プロラクチン放出ペプチドを脳室内投与、または視床下部背内側核に局所微量投与すると不安行動が減弱すること(未発表データ)を見出してきた。これらの結果から、プロラクチン放出ペプチドがストレス状態からの回復を促進するレジリエンス亢進因子である可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、レジリエンスを担うプロラクチン放出ペプチド産生ニューロン経路を同定することであった。

(2) さらに、プロラクチン放出ペプチドがレジリエンスを亢進させる脳内作用部位を同定することであった。

## 3. 研究の方法

(1) プロラクチン放出ペプチド産生ニューロンの軸索投射を明らかにする実験系の開発を行った。アデノ随伴ウイルスを用いて、緑色蛍光タンパク質発現細胞においてDNA組換え酵素であるCreの活性が誘導されるCre-DOGシステムを用いた。

(2) プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子欠損マウスを作製する目的で、CRISPR/Cas9法を用いた。

(3) 内在性のプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子プロモーター制御下で蛍光タンパク質Venusが発現するマウスを作製する目的で、CRISPR/Cas9法を用いた。

(4) 時間・部位特異的にプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子を欠損できるマウスを作製する目的で、CRISPR/Cas9法を用いた。

(5) 内在性のプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子プロモーター制御下で、DNA 組換え酵素である Flippase を発現するマウスを作製する目的で、胚性幹細胞に対する相同性組換え法を用いた。

これらの実験から以下の成果を得た。

#### 4. 研究成果

(1) プロラクチン放出ペプチド遺伝子プロモーター制御下で緑色蛍光タンパク質を発現する BAC トランスジェニックラットにおいて、プロラクチン放出ペプチド発現細胞特異的に緑色蛍光タンパク質が発現することを確認した。

アデノ随伴ウイルスを用いて、緑色蛍光タンパク質発現細胞において DNA 組換え酵素である Cre の活性が誘導される Cre-DOG システムが培養細胞だけでなく、生体内においても機能することを確認した。

GAD43 遺伝子のパルミトリル化シグナルを付加することにより、神経軸索へ局在する赤色蛍光タンパク質 (pal mCherry) を作製した。Cre 依存的に軸索局在化赤色蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルスを作製した。

(2) CRISPR/Cas9 法を用いて、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子欠損マウスを独自に作製した。ゲノムシーケンシングにより、フレームシフト変異が起こる 2 種類の遺伝子欠損マウスラインを確立した。

(3) CRISPR/Cas9 法を用いて、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Venus knock-in マウスを独自に作製した。ゲノム PCR により Venus 遺伝子が挿入されている候補ラインを 2 種見出した。デジタル PCR を用いて、2 ラインのうち、1 ラインが 1 コピー体であることが判った。ゲノムシーケンシングにより、この 1 コピー体において、Venus 遺伝子がプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子座に正しく挿入されていることを確認した。このマウスを用いて新奇のプロラクチン放出ペプチド受容体発現領域を複数見出した。

(4) CRISPR/Cas9 法を用いて、独自に時間・部位特異的にプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子を欠損できるマウスを作製した。ゲノム PCR により loxP 配列が挿入された候補マウスラインを取得した。ゲノムシーケンシングにより、正しく遺伝子改変されたラインを得た。

(5) 胚性幹細胞に対する相同性組換え法を用いて、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Flippase knock-in マウスを独自に作製した。サザンブロット法を用いて、正しく相同組み換えを起こした胚性幹細胞をセレクトした。この胚性幹細胞に対し DNA 組換え酵素である Dre をトランスフェクションし、rox 配列で挟まれた薬剤マーカーを除去した。この薬剤マーカーを除去した胚性幹細胞を受精卵にインジェクションし、胚性幹細胞の寄与率が約 100%と判断されたキメラマウスを 2 匹得た。このキメラマウスから F1 マウスを得て、ラインを確立した。

レジリエンスを担うプロラクチン放出ペプチド産生ニューロン経路を同定する目的で (1) の実験を行った。今後、プロラクチン放出ペプチド遺伝子プロモーター制御下で緑色蛍光タンパク質を発現する BAC トランスジェニックラットに対し、Cre-DOG システムと Cre 依存的に軸索局在化赤色蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルスを投与し、経路の同定を行っていく。

プロラクチン放出ペプチドがレジリエンスを亢進させる脳内作用部位を同定するためにはプロラクチン放出ペプチド受容体発現細胞を特定し、刺激、抑制を行う必要があるが、その方法がなかった。本研究で、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Venus knock-in マウス、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子欠損マウス、時間・部位特異的にプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子欠損マウス、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Flippase knock-in マウスを独自に確立した。

プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Venus knock-in マウスの解析から、うつ様行動に関連したいくつかの脳部位で、プロラクチン放出ペプチド受容体が発現していることを見出した。このマウスを用いて、社会的敗北ストレスによって活性化されるプロラクチン放出ペプチド受容体発現細胞が存在する脳部位を同定していく。時間・部位特異的にプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子欠損マウスを用いて、同定した脳部位特異的にプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子を欠損させ、慢性ストレスにより、うつ様行動が亢進するかを解析していく。また、プロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子-Flippase knock-in マウスとアデノ随伴ウイルスを組み合わせた実験を行う。同定した脳部位のプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子発現細胞に人工受容体 DREADDs を発現させ、人為的に神経細胞を興奮、抑制する実験を行っていく。これにより、

慢性ストレスにより、うつ様行動が変化するかを解析していく。これらの実験を通じて、プロラクチン放出ペプチドがレジリエンスを亢進させる因子であるか、およびその脳内メカニズムを明らかにしていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4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 Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, Inutsuka A, Nishimori K, Yamanaka A, Onaka T	4. 巻 159
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 該当する

1. 著者名 吉田匡秀、犬束歩、高柳友紀、尾仲達史	4. 巻 35
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
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
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
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14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshida M, Nasanbuyan N, Onaka T
2. 発表標題 Facilitation of social defeat posture by oxytocin/oxytocin receptor systems
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inutsuka A, Yoshida M, Takayanagi Y, Onaka T
2. 発表標題 The role of oxytocin in behavioral changes induced by social defeat stress
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 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 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 3th 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 3th 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, Yuki 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 3th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高柳 友紀, Naranbat Nasanbuyan, 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 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 Neuroscience2018
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 ICN2018
4. 発表年 2018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.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Onaka T
2. 発表標題 Toward the elucidation of the mechanism of affiliative relationship among interspecific species.
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 Matsumoto Makiya, Yoshida Masahide, Inutuka Ayumu, Takayanagi Yuki, Onaka Tatsushi
2. 発表標題 Allo-grooming behavior to distressed cagemate mice: activation of oxytocin receptor expressing cells.
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 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HP <a href="http://www.jichi.ac.jp/usr/pys1/admpys1/">http://www.jichi.ac.jp/usr/pys1/admpys1/</a>  Researchmap吉田匡秀 <a href="https://researchmap.jp/y-masa">https://researchmap.jp/y-masa</a>
---

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
---------	---------