

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08582

研究課題名(和文) 視床下部バゾプレッシンおよびオキシトシンニューロンの社会性行動への生理的役割解明

研究課題名(英文) Physiological mechanism and social function of vasopressin and oxytocin neuron

研究代表者

丸山 崇 (Maruyama, Takashi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20533194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：バゾプレッシン及びオキシトシンの社会性行動に関する生理的役割を解明するため、視床下部-下垂体-副腎皮質系の賦活により、バゾプレッシン及びオキシトシンニューロンの発現変化を観察する実験を行った。バゾプレッシンに関しては、様々なストレス負荷時のペプチド発現の動態を観察し、特に、腎機能障害時のバゾプレッシン発現や摂食関連の各種神経ペプチドの変化が明らかになった。また、薬理遺伝学的手法(DREADDs)を用いた実験モデル確立を目指し、バゾプレッシンニューロンを薬理的に活性化出来る遺伝子改変ラットを作出し、現在は、オキシトシンニューロンを薬理的に活性化可能とする遺伝子改変ラットの開発も進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部で合成される神経ペプチドであるバゾプレッシン及びオキシトシンの生理的役割を解明するため、様々なストレス負荷を与えた際の神経細胞の反応を確認し、腎機能障害の際の反応など新たな知見が得られた。また、薬理遺伝学的にバゾプレッシン及びオキシトシンニューロンを活性化する遺伝子改変ラットが開発されることにより、バゾプレッシン及びオキシトシンの社会行動における役割解明を行う際の有用な動物実験モデルになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the physiological role of vasopressin (AVP) neuron and oxytocin (OXT) neuron on social behavior and stress responses, we conducted experiments to observe changes in expression of AVP and OXT neurons in hypothalamus. Regarding AVP, the expression after various stresses was observed, in particular, changes in AVP expression and various feeding-related neuropeptides during renal dysfunction were revealed. In addition, with the aim of establishing an experimental model using chemogenetic techniques (DREADDs), we have established a novel transgenic rat line which expresses hM3Dq of which ligand is clozapine-N-oxide (CNO) in AVP neurons. This AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rat was demonstrated to be activated the AVP neuron after CNO injection. Now we are also developing the OXT-hM3Dq-mCherry transgenic rat. These transgenic rats must be useful experimental animal model to elucidate the physiological role of AVP and OXT neuron on social behavior.

研究分野：神経内分泌

キーワード：バゾプレッシン オキシトシン 薬理遺伝学 視床下部 社会行動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視床下部で産生され、下垂体後葉より血中に分泌されるバゾプレッシンは血圧調節や体液調節を行う神経ペプチドとして知られているが、脳脊髄液中への分泌や脳内への神経投射経路もあり生体リズムや精神機能および社会性行動に関係していることが分かっている。バゾプレッシンニューロンと生体リズムの関連では、視交叉上核の背内側部にはバゾプレッシンニューロンが存在し、視交叉上核からの出力系の主要な経路と考えられている。また、バゾプレッシン V1a 受容体または V1b 受容体をノックアウトした実験によりバゾプレッシンニューロンが生体リズムの安定性に関わっていることが報告されて注目を浴びている。また、精神疾患や発達障害との関わりも研究されており、社会的行動をコントロールする機能に関しても多く議論されているが、未知の部分も多い。

オキシトシンに関しては、子宮収縮や射乳に関わる神経ペプチドとして知られているが、近年、人間関係などの社会性行動への関わりも徐々に分かっている。自閉症に対してオキシトシンを使用し効果があったとする報告もあるが、その機序は解明されていない部分も多い。

産業医学の側面からも、「睡眠や生体リズムを整え、精神的ストレスを軽減して活動的に働くための生理学的メカニズム」の解明など、実社会に繋がる基礎研究が求められている。

これまで、当研究室で開発した、バゾプレッシン遺伝子に緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein: GFP) 遺伝子を挿入したトランスジェニックラット (Ueta et al., *Endocrinology* 2005) を用いて、バゾプレッシン遺伝子、GFP 遺伝子、時計遺伝子などの発現パターンの日内変動が野生型ラットと相違なく、このラットが生体リズムにおけるバゾプレッシンの生理的役割を解明するための非常に有用なモデル動物であるということを証明した (Maruyama et al., *Peptides* 2010)。さらに、組織培養や電気生理学的手法も用いながら研究を進めてきたが、未だその解明には至っていない。

当研究室では、様々な遺伝学的手法を用いて研究を進めており、光遺伝学 (Optogenetics) に関しては、光興奮性タンパク (ChR2: チャネルロドプシン 2) をバゾプレッシンニューロンに特異的に発現させたトランスジェニックラットの開発に成功し (Ishii et al., *Neurosci Lett.* 2016) 光照射することによってバゾプレッシンニューロンの電気生理学的な反応が見られることが確認されている。またこれに加え、薬理遺伝学的手法 (DREADDs) を応用し hM3Dq (薬物興奮性レセプター) 遺伝子を挿入したトランスジェニックラットの開発にも着手しているところである。これらの手法を用いてニューロンを特異的に興奮させた際の行動や神経学的な観察をすることによってバゾプレッシンやオキシトシンニューロンの生理学的役割の解明を行うためにこの研究を実施することとした。

2. 研究の目的

(1) 様々なストレス負荷を行った際の、脳内神経ネットワークの変化を観察することで、バゾプレッシンニューロンやオキシトシンニューロンの生理学的役割を解明することを最初の目的とした。

(2) 薬理遺伝学的手法 (DREADDs) を応用し、薬理的な刺激によってバゾプレッシンニューロンやオキシトシンニューロンを活性化させた際の、神経細胞の反応や行動変化を観察することで、バゾプレッシンニューロンやオキシトシンニューロンの生理学的役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) バゾプレッシン遺伝子に緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein: eGFP) 遺伝子を挿入したトランスジェニックラット (AVP-eGFP ラット) やオキシトシンに赤色蛍光タンパク (monomeric red fluorescent protein: mRFP1) 遺伝子を挿入したトランスジェニックラット (OXT-mRFP1 ラット) を用いて、様々なストレス負荷を行った際の、蛍光タンパクの蛍光強度や c-fos タンパクの発現などを観察しバゾプレッシンニューロンやオキシトシンニューロンの反応を調べた。

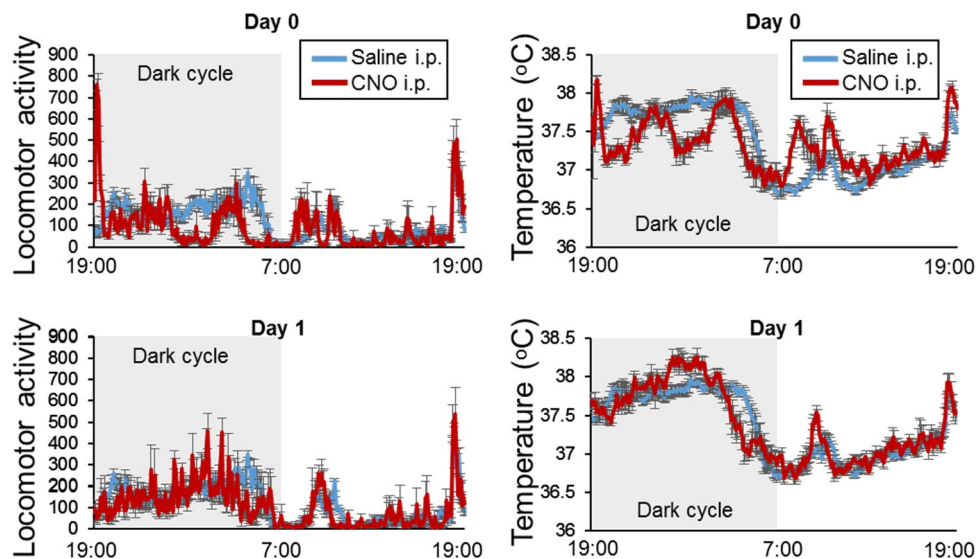
(2) 薬理遺伝学的手法 (DREADDs) を用いて、バゾプレッシンニューロン及びオキシトシンニューロンに GPCR である hM3Dq を発現させた、AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rat ならびに OXT-hM3Dq-mCherry transgenic rat を作出し、特異的なリガンドである CNO (Clozapine-N-oxide) を腹腔内投与により作用させることで、各ニューロンを特異的に興奮させた際の神経細胞や行動の観察を行うことで、バゾプレッシンニューロン及びオキシトシンニューロンの生理学的役割を調べた。

4. 研究成果

バゾプレッシンに関して、様々なストレス負荷時のペプチド発現の動態を観察したが、特に急性腎機能障害のストレスを負荷した際に、AVP-eGFP ラットの視床下部室傍核で、緑色蛍光が強く観察され、バゾプレッシン及び CRH の発現上昇も認められた。また、脳幹での c-Fos の発現も観察された。(Ueno et al, *J Physiol Sci.* 2019) また、腎障害時に AgRP, NPY, MCH, オレキシンが低下していることなど、視床下部の摂食関連神経ペプチドが関わっていることを明らかにした。(Ueno et al, *Neuroscience Letters.* 2019)

薬理遺伝学的手法 (DREADDs) を用いた実験モデルとして、バゾプレッシンニューロンに hM3Dq

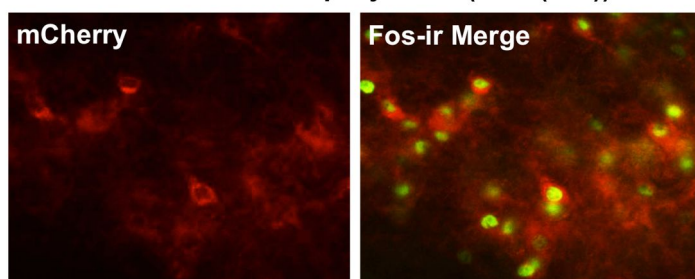
を発現させた、AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rat の作出をおこない、CNO の腹腔内投与によりバゾプレッシンニューロンが活性化されることを、c-Fos タンパクの発現などで確認し、血漿バゾプレッシンが高値になり、尿量が低下することも確認した。(Yoshimura et al, Sci Rep. 2017) この実験モデルを用いて、雌ラットにおけるエストロゲンとバゾプレッシン発現の関係を解明し、論文発表を行った。(Nishimura et al, Sci Rep. 2019) また、この AVP-hM3Dq-mCherry transgenic rat に、CNO を腹腔内投与し、活動量と体温を測定する実験において、リズム位相の変化が観察された。(図1)



(図1) AVP-hM3Dq-mCherry Tg rat に CNO (1 mg/kg) 投与時の活動量と体温の変化

また、オキシトシンニューロンに hM3Dq を発現させた、OXT-hM3Dq-mCherry transgenic rat の作出も行った。CNO の腹腔内投与によりオキシトシンニューロンが活性化されることを、c-Fos タンパクの発現などで確認出来た。(図2) 現在は、さらなる実験に用いるために飼育繁殖中である。これらの薬理遺伝学的実験モデルが確立されれば、今後、バゾプレッシンやオキシトシンニューロンの社会行動における役割解明に繋がる実験が進むことが期待出来る。

90 min after CNO ip injection (PVN (×40))



(図2) OXT-hM3Dq-mCherry Tg rat に CNO 投与後の視床下部室傍核の c-Fos 発現

<引用文献>

Transgenic Expression of Enhanced Green Fluorescent Protein Enables Direct Visualization for Physiological Studies of Vasopressin Neurons and Isolated Nerve Terminals of the Rat Ueta Y, et al. *Endocrinology*. 2005 Jan;146(1):406-13. doi: 10.1210/en.2004-0830.

Diurnal changes of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion transgene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. Maruyama T, Ohbuchi T, Fujihara H, Shibata M, Mori K, Murphy D, Dayanithi G, Ueta Y. *Peptides*. 2010 Nov;31(11):2089-93. doi: 10.1016/j.peptides.2010.08.010.

Transgenic approach to express the channelrhodopsin 2 gene in arginine vasopressin neurons of rats. Ishii M, Hashimoto H, Ohkubo JI, Ohbuchi T, Saito T, Maruyama T, Yoshimura M, Yamamoto Y, Kusuhara K, Ueta Y. *Neurosci Lett*. 2016 Sep 6;630:194-198. doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.001.

Effects of acute kidney dysfunction on hypothalamic arginine vasopressin synthesis in transgenic rats. Ueno H, Serino R, Sanada K, Akiyama Y, Tanaka K, Nishimura H, Nishimura K, Sonoda S, Motojima Y, Saito R, Yoshimura M, Maruyama T, Miyamoto T, Tamura M, Otsuji Y, Ueta Y. *J Physiol Sci*. 2019 May;69(3):531-541. doi: 10.1007/s12576-019-00675-8.

Changes in gene expressions of hypothalamic neuropeptides controlling feeding behaviors in bilateral nephrectomized rats. Ueno H, Miyamoto T, Sanada K, Nakazono K, Tanaka K, Nishimura H, Nishimura K, Sonoda S, Yoshimura M, Maruyama T, Serino R, Otsuji Y, Ueta Y. *Neurosci Lett*. 2019 Oct 15;711:134426. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134426.

Activation of endogenous arginine vasopressin neurons inhibit food intake: by using a novel transgenic rat line with DREADDs system. Yoshimura M, Nishimura K, Nishimura H, Sonoda S, Ueno H, Motojima Y, Saito R, Maruyama T, Nonaka Y, Ueta Y. *Sci Rep*. 2017 Nov 16;7(1):15728. doi: 10.1038/s41598-017-16049-2.

Effect of oestrogen-dependent vasopressin on HPA axis in the median eminence of female rats. Nishimura K, Yoshino K, Sanada K, Beppu H, Akiyama Y, Nishimura H, Tanaka K, Sonoda S, Ueno H, Yoshimura M, Maruyama T, Ozawa H, Ueta Y. *Sci Rep*. 2019 Mar 26;9(1):5153. doi: 10.1038/s41598-019-41714-z.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueno Hiromichi, Serino Ryota, Sanada Kenya, Akiyama Yasuki, Tanaka Kentaro, Nishimura Haruki, Nishimura Kazuaki, Sonoda Satomi, Motojima Yasuhito, Saito Reiko, Yoshimura Mitsuhiro, Maruyama Takashi, Miyamoto Tetsu, Tamura Masahito, Otsuji Yutaka, Ueta Yoichi	4. 巻 69
2. 論文標題 Effects of acute kidney dysfunction on hypothalamic arginine vasopressin synthesis in transgenic rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 531 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00675-8	査読の有無 有
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 Nishimura Kazuaki, Yoshino Kiyoshi, Sanada Kenya, Beppu Hiroki, Akiyama Yasuki, Nishimura Haruki, Tanaka Kentaro, Sonoda Satomi, Ueno Hiromichi, Yoshimura Mitsuhiro, Maruyama Takashi, Ozawa Hitoshi, Ueta Yoichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of oestrogen-dependent vasopressin on HPA axis in the median eminence of female rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 (1)5153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41714-z	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 Yoshimura Mitsuhiro, Nishimura Kazuaki, Nishimura Haruki, Sonoda Satomi, Ueno Hiromichi, Motojima Yasuhito, Saito Reiko, Maruyama Takashi, Nonaka Yuki, Ueta Yoichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Activation of endogenous arginine vasopressin neurons inhibit food intake: by using a novel transgenic rat line with DREADDs system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16049-2	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 Ueno Hiromichi, Miyamoto Tetsu, Sanada Kenya, Nakazono Kazutoshi, Tanaka Kentaro, Nishimura Haruki, Nishimura Kazuaki, Sonoda Satomi, Yoshimura Mitsuhiro, Maruyama Takashi, Serino Ryota, Otsuji Yutaka, Ueta Yoichi	4. 巻 711
2. 論文標題 Changes in gene expressions of hypothalamic neuropeptides controlling feeding behaviors in bilateral nephrectomized rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134426 ~ 134426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.134426	査読の有無 有
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 Takashi Maruyama, Yoichi Ueta	4. 巻 90(3)
2. 論文標題 The fluorescent visualization of oxytocin neurons and pain control study in rat model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 239-245
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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