

令和元年6月6日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19408

研究課題名(和文) 複雑な社会の形成に関わる神経機能の同定

研究課題名(英文) Identification of neural function for establishing a complex social in mouse

研究代表者

菊水 健史(Kikusui, Takefumi)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：90302596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物における社会(群れ)とは、2個体間の関係にとどまらず、複数の個体が複雑な関係性を構築し、一定の範囲内で共存するものをいう。本課題では、半野生のマウス集団における集団の形成を変化させる因子の同定と、新たな自動解析システムの構築を行った。餌場をめぐる競争では、特にオスで対峙が激化し、場合によっては損傷も生じた。社会性に関与するオキシトシン神経系を遮断すると、集団の崩壊が認められた。また2018年にパスツール研究所の開発した新たなlive Mouse Trackingシステムをいち早く導入し、集団の解析、特にAIを用いた40種の社会行動の分類に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで動物の社会性に関わる神経機能研究は、その殆どが2個体間の関係にとどまり、複数の個体が複雑に関係性を維持する機構を明らかにしたものはない。しかし、ヒト社会でも動物の社会においても、群れは2個体にとどまらず複数個体によって維持されている。このような複数個体が共存する環境下において適切な行動を発現するための中枢機能の研究は、複雑な社会性を司るメカニズムの解明にとどまらず、社会構造を成り立たせることの進化的意義の分子レベルでの理解や、社会性に障害を有する疾患の原因究明や治療法確立につながるものであり、本成果もそこに大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：The social group in animals is not limited to the relationship between two individuals, but refers to one in which a plurality of individuals builds complex relationships and coexist within a certain range. In this process, each person gains a role in the flock, and the flock functions as one collective. In this study, we identified a factor that changes the formation of a group in a semi-wild mouse population and constructed a new automatic analysis system using a 3D sensor. In the competition for food resources, competition with males intensified, and in some cases physical damage occurred. When the oxytocin nervous system involved in sociality was inhibited, collapse of the group was observed. In addition, a new live Mouse Tracking system, developed by the Pasteur Institute in 2018, was quickly introduced, and group analysis, in particular, classification of 40 types of social behavior using AI was succeeded.

研究分野：動物行動学

キーワード：集団行動 自動解析システム 半野生化 オキシトシン 戦略

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

動物における社会(群れ)とは、2 個体間の関係にとどまらず、複数の個体が複雑な関係性を構築し、一定の範囲内で共存するものをいう。この過程で個々が群れの中での役割を獲得し、群れが一つの集合体として機能するようになる。これまで動物の社会性に関わる神経機能研究は、その殆どが 2 個体間の関係にとどまり、複数の個体が複雑に関係性を維持する機構を明らかにしたものはない。しかし、ヒト社会でも動物の社会においても、群れは 2 個体にとどまらず複数個体によって維持されている。このような複数個体が共存する環境下において適切な行動を発現するための中枢機能の研究は、複雑な社会性を司るメカニズムの解明にとどまらず、社会構造を成り立たせることの進化的意義の分子レベルでの理解や、社会性に障害を有する疾患の原因究明や治療法確立につながる、価値の高い研究である。

申請者らはこれまで動物の 2 個体間の関係性がどのように形成維持されるのか、さらにはその神経回路の解明に取り組んできた。例えば、母子間ではオキシトシンを介した親和的行動が絆形成にかかわること (Front Neurosci 2015)、このオキシトシンと親和行動のポジティブループは異種間であるヒトとイヌの絆形成にも寄与し、ヒトとイヌの共生社会の基礎をなすことを明らかにしてきた (Science 2015)。さらに、オスメスの関係性はフェロモンや音声などのシグナルを介してやり取りされ (Front Neurosci 2015, PLoS One, 2014)、特に匂いを介した情動神経回路がその適切な行動発現に重要であることを見出している (Nature 2007, Nature, 2010, PNAS 2015, Curr Biol 2016)。これまでの情報と経験を発展させ、集団という新しい切り口で、動物の社会性を明らかにし、その中枢制御機構や社会性を決定する環境因子の同定、さらにはその計測技術の新たな確立が必要となった。

## 2. 研究の目的

本研究課題の最終到達目標は、マウスを用いて社会構造を司る神経機構を明らかにすることである。この達成のために、以下3つの目的を立てた。

複数マウス個体の半野生環境下における長期的な時空間モニタリング手法の確立: これまで複数個体にRFIDを装着、短時間RED Module上にて自由行動させ、その位置情報の取得に成功している。今後、半野生下での飼育期間が数ヶ月に及ぶことから、その期間、問題なく記録を続けるよう改良が必要である。長期的な個体間距離の測定なども必要となることから、それに耐えうる完璧なシステム構築を行う。

幼少期経験の操作による社会構造の変化の解析: 幼少期の母子間の関係性は成長後の社会行動に大きく影響を与える。例えばヒトでは幼少期のトラウマ経験や虐待経験がうつ病や社会性障害のリスクを増大させ、またストレス応答性の上昇による心血管疾患や脳卒中の危険因子にもなることが疫学的に明らかになっている。申請者らが確立してきた早期に母子分離するモデルでは、うつ病様症状を呈するのみならず、不安行動の増加、恐怖記憶の消去抵抗性、さらには共感性をも低下することを見出してきた。本モデルでは、前頭葉から扁桃体外側基底核に至る回路に障害があることも見出している。このモデルを用い、幼少期の母子間関係性の障害が、成長後の社会構造にどのような影響を与えるかを明らかにする。

オキシトシン神経系の人為的操作による社会構造のスクラップビルド: オキシトシン神経系は、個体間の親和的関係性の構築を支える最も重要な分子であることを見出し

てきた。特にマウス母子間では、仔からのアタッチメント行動により親のオキシトシン分泌が促進され、これが視床下部の視索前野領域に作用することで、母性行動の適切な誘起につながることを見出している。またヒトとイヌの絆形成にもオキシトシンが関わることを見出してきた。これらの実績から、オキシトシンが社会構造の形成において最も重要な分子であると仮説を立てた。さらに申請者らはオキシトシン神経系の人為的操作にも成功している。具体的にはオキシトシン受容体にCreを発現する遺伝子改変マウスと、DREADDsを含むアデノ随伴ウイルス(AAV)を組み合わせ、時期場所特異的なオキシトシン神経系の操作が可能となった。この手法を用い、一度形成されたマウスの社会において、飲水中にDREADDsのリガンドであるCNOを入れ、オキシトシン神経系を人為的に操作し、構築された社会構造がどのように変異、再構築されるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

複数マウス個体の半野生環境下における長期的な時空間モニタリング手法の確立：現在の短時間計測システムを改良し、長期的時空間モニタリングが可能なシステムとする。改善点は、マウスに装着させたRFIDが他のマウスによって剥離され、落下することである。これを改善するため、マウス特性のジャケットを作製、ジャケットと身体の上にRFIDチップを装着させることで達成する。目標の長期的モニタリングはマウスの繁殖日数が21日であることを考慮し、形成に2ヶ月、再構築にも2ヶ月を想定し、4ヶ月とする。また現在のRED Moduleは熱発生によって、センサ感度が低下することが懸念されることから、半野生下のアリーナを低温で維持するシステムを作成する。

幼少期経験の操作による社会構造の変化の解析：申請者らはすでに早期に母子分離されたマウスの社会構造変化の解析を実施している。この予備実験では、時空間モニタリングを行っていないものの、タイムサンプリング解析を実施し、個体間の親和行動や攻撃行動をモニタしている。その結果、興味深いことに、飽食の条件下では通常通り離乳されたマウスが上位個体となり群れを支配するものの、制限給餌の条件下では、早期に母子分離された個体が群れを支配した。それと呼応するよう、飽食時に比べて、制限給餌時には早期離乳個体の産子数が増加することがマイクロサテライト領域解析を用いた子マウスの遺伝子型から明らかとなった(右図)。この結果から、早期の母子分離は過酷な環境下における生き残り戦略である可能性を見出し、幼少期の母子間の在り方を改めて問い直す成果を得た。平成29年度においては、この実験を継続させ、幼少期環境と社会構造の変化を明らかにし、さらにその社会構造の変化がどのように繁殖戦略に活かされるのかを明らかにする。

オキシトシン神経系の人為的操作による社会構造のスクラップビルド：すでにオキシトシン受容体遺伝子の下流にCreを導入したマウスを保有し、脳内局所にLoxp配列で挟まれたDREADDs遺伝子を含むAAVを感染させ、Cre依存的なDREADDsの発現を確認している。このシステムを用い、飲水中にCNOを含ませ、実際に神経細胞の活性の操作が可能かどうかを明らかにする。具体的には飲水後に社会的対峙実験を行い、オキシトシン受容体を含む細胞の活性化が抑制型のhM4Diの発現によって低下した場合の社会集団の変化を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

複数マウス個体の半野生化環境下における長期的な時空間モニタリング手法の確立：自作システムを改良中にフランスパスツール研究所から画期的なモニタリングシステムとして Live Mouse Tracker (LMT) が公表された。すでに共同研究を開始していたラボであったことから、急遽連絡をとり、LMT を導入した。LMT は、3D depth sensor の Kinect によるマウストラッキングと、RFID (radio frequency identifier) による個体識別を連動させた装置である。複数個体のトラッキングを持続可能にするのが、Kinect 機械学習である。機械学習は、Kinect で得た高さ方向のデータと強度分布データの組合せで作られた 3 次元情報から、マウスと背景、物体の分類を AI 用いてリアルタイムで行う。Kinect で見失った ID を RFID で再同定させる。得られた 3D データをもとに 40 種以上の社会行動の分類が可能である。現在、数週間の複数個体のトラッキングが既に可能となった。本システムの導入を皮切りに下記 の実験を実施した。

幼少期経験の操作による社会構造の変化の解析：幼少期環境の操作により、これまで繁殖戦略に大きな差が生じていることを見出していた。そこで、まずはオスメスの繁殖戦略、さらには資源共有（餌場）がどれだけ社会構造やその形成に影響を与えるかを調べた。メスマウスは見知らぬ個体でも短時間で個体が融合し、1 つの集団となった。一方、オスでは見知らぬ個体との距離が低下するのに 12 時間以上を要し、また覚醒時に激しい対峙行動が認められた。最終的に 1 つの集団となることなく、ヒエラルキーが形成され、最も強い個体が 1 個体だけ離れた集団となった。餌場を複数にすると、集団内での対峙行動が減少した。これらのことから、集団形成には性差が存在すること、オスではヒエラルキーがより明確に観察され、それによる集団形成に影響が出ること、さらには資源共有が最も大きな集団形成の律速因子であることが示された。

オキシトシン神経系の人為的操作による社会構造のスクラップビルド：すでにオキシトシン遺伝子に Cre を導入したマウスの視床下部室傍核に AAV8.syn.D10.hM4Di.mcherry を感染させ、Dreadds のリガンドである CNO を投与することでオキシトシン神経系を低下させた。このオキシトシン神経系低下マウスと、対照マウスで集団形成の様子を観察した。オキシトシン受容体欠損マウスでは、4 個体が 1 つの集団として Huddling することがなく、常に別行動する個体が現れた。また新奇環境に対する馴化が遅れ、集団の安定化に時間を要することが明らかとなった。

これまで動物の社会性に関わる神経機能研究は、その殆どが 2 個体間の関係にとどまり、複数の個体が複雑に関係性を維持する機構を明らかにしたものはない。しかし、ヒト社会でも動物の社会においても、群れは 2 個体にとどまらず複数個体によって維持されている。このような複数個体が共存する環境下において適切な行動を発現するための中枢機能の研究は、複雑な社会性を司るメカニズムの解明にとどまらず、社会構造を成り立たせることの進化的意義の分子レベルでの理解や、社会性に障害を有する疾患の原因究明や治療法確立につながる、価値の高い研究である。今回得られた社会構造に影響を与える体内因子や環境因子、さらには AI を用いた自動解析システムは、今後の社会性研究に一石を投じるものとなった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Kikusui, Takefumi; Kajita, Mayu; Otsuka, Natsumi; Hattori, Tatsuya; Kumazawa, Kanako; Watarai, Akiyuki; Nagasawa, Miho; Inutsuka, Ayumu; Yamanaka, Akihiro; Matsuo, Naoki; Sex differences in olfactory-induced neural activation of the amygdala Behavioural brain research 346 96-104 2018
2. Kikusui, Takefumi; Neuroendocrinology of social buffering in group living animals Japanese Journal of Animal Psychology 68.1. 5 2018
3. Kanno, Kouta; Kikusui, Takefumi; Effect of Sociosexual Experience and Aging on Number of Courtship Ultrasonic Vocalizations in Male Mice Zoological science 35 3 208-215 2018
4. Kikusui, Takefumi; Early weaning increased emotional behavior in mice JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL SCIENCES 130 3 S63-S63 2016
5. Nomoto, Kensaku; Ikumi, Mayu; Otsuka, Monami; Asaba, Akari; Kato, Masahiro; Koshida, Nobuyoshi; Mogi, Kazutaka; Kikusui, Takefumi; Female mice exhibit both sexual and social partner preferences for vocalizing males Integrative zoology 13 6 735-744 2018
6. Watarai, Akiyuki; Arai, Natsuki; Miyawaki, Shingo; Okano, Hideyuki; Miura, Kyoko; Mogi, Kazutaka; Kikusui, Takefumi; Responses to pup vocalizations in subordinate naked mole-rats are induced by estradiol ingested through coprophagy of queen ' s feces Proceedings of the National Academy of Sciences 115 37 9264-9269 2018
7. Kamimura, Itsuka; Watarai, Akiyuki; Takamura, Takuma; Takeo, Atsushi; Miura, Kyoko; Morita, Hidetoshi; Mogi, Kazutaka; Kikusui, Takefumi; Gonadal steroid hormone secretion during the juvenile period depends on host specific microbiota and contributes to the development of odor preference Developmental psychobiology 2019
8. Kikusui, Takefumi; Kanbara, Natsumi; Ozaki, Mariya; Hirayama, Nozomi; Ida, Kumiko; Tokita, Mika; Tanabe, Naho; Mitsuyama, Kuriko; Abe, Hatsuki; Yoshida, Miki; Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex Scientific reports 9 1 3991 2019

〔学会発表〕(計 24 件)

1. マウス長期個体追跡による集団行動解析 \*野元謙作・田嶋実・茂木一孝・菊水健史 第 29 回日本行動神経内分泌研究会 (JSBN) 20180907 相模原市 他 23 報

〔図書〕(計 3 件)

1. オオカミと野生のイヌ 近藤雄生, 澤井聖一 エクスナレッジ 20180731 207
2. 犬のココロをよむ 伴侶動物学からわかること【岩波科学ライブラリー199】 (岩波オンデマンドボックス) 菊水 健史, 永澤 美保 岩波書店 20180508 138
3. 愛と分子 惹かれあう二人のケミストリー 菊水 健史 東京化学同人 20180331 128

〔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 <https://sites.google.com/carazabu.com/lab-kaizai/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：茂木一孝

ローマ字氏名：Mogi, Kazutaka

所属研究機関名：麻布大学

部局名：獣医学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁): 50347308

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：池田和司

ローマ字氏名：Ikeda, kazushi

所属研究機関名：奈良先端科学技術大

部局名：先端科学技術研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁): 10262552

### (3)研究協力者

研究協力者氏名：久保孝富

ローマ字氏名：Kubo, Takatomi

所属研究機関名：奈良先端科学技術大

部局名：先端科学技術研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁): 20631550

### (4)研究協力者

研究協力者氏名：山川俊貴

ローマ字氏名：Yamakawa, Toshitaka

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院先導機構

職名：助教

研究者番号 (8桁): 60510419