

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06910

研究課題名(和文) オキシトシン産生ニューロンの前頭前皮質への投射に関する機能解析

研究課題名(英文) Physiological roles of oxytocin receptor-expressing neurons in the medial prefrontal cortex

研究代表者

犬束 歩 (Inutsuka, Ayumu)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30584776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：前頭前皮質のオキシトシン受容体発現細胞がストレス応答において果たす役割について解析した。まず、Oxtr-floxedマウスの前頭前皮質にCre発現AAVベクターを局所投与し、オキシトシン受容体を前頭前皮質特異的に欠損させたときの行動変化を解析した。オートラジオグラフィでは、前頭前皮質の深い領域に分布するオキシトシン受容体のシグナルがCre発現AAVベクターを投与したマウスでは大幅に低下していた。次に、前頭前皮質のオキシトシン受容体発現ニューロン特異的な投射経路の可視化を達成し、扁桃体基底外側核など脳内の複数領域に投射領域を見出した。さらに、オキシトシンを直接検出する蛍光センサーを導入した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、社会性に関わるホルモンとして知られるオキシトシンが脳の前頭前皮質という領域でどのように作用しているのか調べたものです。前頭前皮質にはオキシトシンを受け取るオキシトシン受容体が豊富に存在していますが、これを無くしてしまうとストレスによる影響を受けやすくなることが分かりました。また、前頭前皮質にあるオキシトシン受容体を発現している神経の接続を調べたところ、これまで知られていなかった脳他の領域との接続が分かりました。今後は、ストレスを受けた時に前頭前皮質までオキシトシンがどのように届いているのか、特別な蛍光センサー分子を導入することで明らかにしたいと考えています。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of oxytocin receptor-expressing cells in the prefrontal cortex in the stress response. First, Cre-expressing AAV vectors were injected locally to the prefrontal cortex of Oxtr-floxed mice to analyze behavioral changes when oxytocin receptors were specifically deleted in the prefrontal cortex. Autoradiography showed that oxytocin receptor signals distributed in deep prefrontal cortex were greatly reduced in the mice treated with Cre-expressing AAV vectors. Next, we visualized the projections from the oxytocin receptor-expressing neurons in the prefrontal cortex and found multiple brain regions including the basolateral amygdala. Furthermore, they introduced a GPCR-based fluorescent sensor that directly detects oxytocin.

研究分野：神経科学

キーワード：オキシトシン受容体 前頭前皮質 ウイルスベクター ナノボディ Split-Cre 投射経路 ストレス応答 社会行動

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

動物が環境変化に応じて最適な行動を選択するためには、多様な情報を処理して、いくつかの生理応答を統合的に変化させる必要がある。神経ペプチドの一つ、オキシトシンは出産時の子宮収縮と授乳に関与することが古くから知られている。その後、つがい関係の構築(Ross, 2005-J Neurosci)や子育て行動 (Takayanagi, 2005-PNAS)、ヒトにおける他者信頼性(Kosfeld, 2005-Nature)、といった社会性への関わりが明らかとなった。また、点鼻投与することで自閉症において損なわれている社会性を改善させることも報告された(Guastella, 2010-Biol Psychiatry)。しかし、最近日本で行われた大規模な臨床試験ではあまり効果がなかった(Yamasue, 2018-Mol Psychiatry)という報告もあり、オキシトシンの機能については混乱もみられる。オキシトシン産生ニューロンに関わる入出力(投射経路)の複雑さがオキシトシンの機能実態の理解を困難にしている理由の一つと考えられる。

視床下部のオキシトシン産生ニューロンは前頭前皮質にもその軸索を投射しており、前頭前皮質にはオキシトシン受容体が豊富に発現している。前頭前皮質のオキシトシン受容体発現細胞はストレスによる社会性の変化による役割が提起され、BAC トランスジェニックマウスを用いた解析においてはソマトスタチン陽性の介在ニューロンであると報告されている(Li, 2016-Cell)。しかし、我々は蛍光分子 Venus をオキシトシン受容体発現細胞に特異的に発現するノックインマウス(Oxtr-Venus knock-in mouse)と軸索末端から細胞体へと逆行性に輸送される蛍光ビーズ(Retrobeads)を用いた解析を行い、前頭前皮質の第 2/3 層から扁桃体へ投射するオキシトシン受容体発現細胞を新たに見出している。しかし、この投射ニューロンの働きは不明である。

## 2. 研究の目的

我々は複雑な入出力を持つオキシトシンニューロンの個別の投射経路を選択的に活動操作し、その機能分担/機能連関を明らかにすることを長期的な目的としている。本課題ではこの長期目標に沿って研究期間内における短期目標を設定した。具体的には、前皮質のオキシトシン受容体発現細胞が社会行動において果たす役割、特に社会的敗北ストレスによって引き起こされる社会的忌避行動における役割について明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### [ウイルスベクターの局所投与]

各種トランスジェニックマウスの前頭前皮質に AAV ベクターを局所投与した。投与部位は Stereotaxic を用いてブレグマから前後方向に+1.8 mm、左右方向に±0.3 mm、深さ 2.3 mm の位置とした。回復と導入遺伝子の発現のため行動実験までの間に 4 週間待った。

### [社会的敗北ストレス]

AAV ベクターを投与したマウスを攻撃性の高いオス ICR マウスのホームケージに入れることで、社会的敗北ストレスを与えた。テストマウスへの攻撃暴露は 1 回 10 分間、10 日間連続で行った。攻撃に偏りが生じないように毎日 ICR マウスを変えて実験を行った。攻撃を受けたマウスが後ろ足で立ち上がり、前足を突き出すような敗北姿勢を見せることを確認した。

### [行動実験]

高架式十字迷路、社会的忌避行動テスト、自由行動下における二個体近接記録、尾懸垂試験、強制水泳試験からなる一連の行動実験群を、社会的敗北ストレスを与える前と後に行った。

### [オートラジオグラフィ]

行動試験後のマウスから速やかに脳を摘出し、ドライアイス上で凍結した。クライオスタートを用いて凍結した脳を厚さ 20 μm で切片作成し、スライドガラス上に貼り付けた。サンプルを室温に戻し、0.1%パラホルムアルデヒドで二分間固定した。固定したサンプルは 50 mM の Tris buffer (-MgCl<sub>2</sub>)を用いて 10 分間で 2 回洗浄したのち、50 pM の <sup>125</sup>I で標識された OVTA で 1 時間結合させた。その後、4 の条件下で 50 mM Tris buffer (+MgCl<sub>2</sub>)を用いて 5 分間、4 回洗浄した。次に、室温で 50 mM Tris buffer (+MgCl<sub>2</sub>)を用いて 30 分間洗浄したのち、Milli-Q 水に漬けた。スライドをドラフトで乾かしてからカセットに入れ、暗室で感光フィルムをセットした。感光開始 6 日後、フィルムを現像して画像を観察した。

### [前頭前皮質のオキシトシン受容体発現ニューロンを対象とした投射経路のトレーシング]

オキシトシン受容体発現細胞特異的に組み換え酵素 Cre を発現する Oxtr-Cre マウスの前頭前皮質に、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato とシナプス小胞上の膜タンパク質である Synaptophysin と EGFP の融合タンパク質を発現させる AAV-hSyn-FLEX-tdTomato-2A-SypEGFP を局所投与した。ウイルス投与後 4 週間発現を待ってから灌流固定を行い、脳切片を観察した。

### [DREADDs を用いた前頭前皮質オキシトシン受容体発現ニューロンの選択的活性化]

AAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-mCherry の Oxtr-Cre マウス前頭前皮質への局所投与を行い、前頭前皮質のオキシトシン受容体発現ニューロンに対して薬理遺伝学的な活動操作を行った。社会的敗北ストレスを与える前に CNO の腹腔内投与を行い、その後の行動変容に与える影響を解析した。

#### [脳切片を用いたカルシウムイメージング]

蛍光カルシウムインジケーターである YC-nano を発現する AAV ベクターを *Oxtr-Cre* マウスの前頭前皮質に注入し、その後の個体から急性脳スライスの作成を行い、前頭前皮質領域を含む脳切片のカルシウムイメージングを実施した。実験は名古屋大学の山中章弘教授の協力を受けた。

#### [RFP-dependent Cre の作成]

GFP-dependent Cre (Tang, 2015-Nat Neurosci) の作動原理は Split-Cre に連結するナノボディを選択することで、GFP 以外の標的分子にも応用できる可能性がある。GFP とともに遺伝子改変動物で幅広く細胞同定に使用されている蛍光分子としては赤色蛍光タンパク質 (RFP) がある。そこで、GFP と同程度のサイズであり複数の特異的なナノボディが作成されてきた RFP を標的とし、RFP-dependent Cre を作成することを試みた。

#### 4. 研究成果

研究期間内において、大別して以下の 5 つの研究成果を得た。

##### (1) 前頭前皮質におけるオキシトシン受容体のコンディショナルノックアウトの効果確認

*Oxtr-floxed* マウスの前頭前皮質に Cre 発現 AAV ベクターを局所投与することでオキシトシン受容体を前頭前皮質特異的に欠損させてその機能を調べる実験を行い、前頭前皮質におけるオキシトシン受容体の欠損が社会的敗北ストレスによる社会的忌避行動を増悪させることを見出した。オキシトシン受容体は抗体を用いて免疫染色で検出することが未だ困難なタンパク質である。そのため、我々は脳内におけるオキシトシン受容体の分布を見るため、放射性同位体を用いたオートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフィでは、対照群マウスの脳切片において前頭前皮質の深い領域にオキシトシン受容体の分布が確認された。このシグナルは Cre を発現する AAV ベクターを投与したマウスでは大幅に低下していた。こうした結果は、AAV ベクターを利用した Cre の発現により、前頭前皮質におけるオキシトシン受容体を選択的にノックアウトできたことを示している。

##### (2) 前頭前皮質のオキシトシン受容体発現ニューロン特異的な投射経路の可視化

オキシトシン受容体発現細胞特異的に組み換え酵素 Cre を発現する *Oxtr-Cre* マウスの前頭前皮質に、Cre 依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato とシナプス小胞上の膜タンパク質である Synaptophysin と EGFP の融合タンパク質を発現させる AAV-hSyn-FLEX-tdTomato-2A-SypEGFP を局所投与した。研究期間前に行った、オキシトシン受容体発現細胞特異的に緑色蛍光タンパク質 Venus を発現する *Oxtr-Venus* マウスの扁桃体に逆行性トレーサーである Red Retrobeads を局所投与する実験では、前頭前皮質のオキシトシン受容体発現細胞の一部に Red Retrobeads が確認され、オキシトシン受容体発現細胞が扁桃体に軸索投射していることが示唆されていた。ウイルスを用いたトレーシングでは前頭前皮質のオキシトシン受容体発現細胞に発現した Synaptophysin-EGFP が扁桃体基底外側核に強く局在しており、投射関係が確認された。同時に扁桃体基底外側核以外にも脳内の複数領域に軸索投射領域を見出した。

##### (3) 前頭前皮質のオキシトシン受容体発現ニューロンにおけるオキシトシン結合の効果確認

脳切片を用いたカルシウムイメージングにより、オキシトシン投与に対するカルシウム濃度の一過性の上昇が、前頭前皮質においてオキシトシン受容体を発現する細胞で観察された。

##### (4) オキシトシンを直接検出する蛍光センサーの導入

オキシトシンを含む神経ペプチドを生体内で検出する方法としては、従来から使われてきたマイクロダイアリシスやポルタンメトリーが持つ欠点を補う手法として、GPCR ベースの蛍光センサーが台頭しつつある(これらの手法の特徴や展望については Inutsuka, 2021-Peptides に発表した)。研究代表者は大阪大学の稲生大輔特任講師の協力を受けてオキシトシンの結合によって蛍光強度が増強するオキシトシンの蛍光センサーを導入した。ウイルスベクターの作成を完了し、前頭前皮質における発現確認を行った。

##### (5) 赤色蛍光タンパク質で標識された細胞を特異的に遺伝子発現制御する手法の応用確認

Split-Cre の N 末端側と C 末端側に連結させる RFP 特異的なナノボディもしくは DARPin (designed ankyrin repeat protein) と呼ばれる人工タンパク質をスクリーニングし、RFP の存在下のみで Cre リコンビナーゼの組換え活性が発揮される組み合わせを複数見出した(ここまで研究期間前の成果)。研究期間内において我々は、この Cre-DOR の機能評価を RFP 発現動物において行った。岡山大学の坂本浩隆准教授の協力のもと、*Esr2-mRFP1* マウスおよび *Grpr-mRFP1* ラットにおいて、Cre-DOR を搭載したウイルスベクターを Cre 依存的に paEGFP を発現するウイルスベクターと併せて局所投与し、mRFP1 発現ニューロンの投射経路を可視化することに成功した。これまでの研究成果と併せて、論文を作成し preprint として公表した (doi: 10.21203/rs.3.rs-1234462/v1)。現在リバイズ中である。

以上の研究成果の他に AAV ベクターを用いた共同研究などで挙げた成果については成果欄参照。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 4件）

1. 著者名 Kato Yoko, Katsumata Harumi, Inutsuka Ayumu, Yamanaka Akihiro, Onaka Tatsushi, Minami Shiro, Orikasa Chitose	4. 巻 11
2. 論文標題 Involvement of MCH-oxytocin neural relay within the hypothalamus in murine nursing behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82773-5	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 Inutsuka Ayumu, Ino Daisuke, Onaka Tatsushi	4. 巻 136
2. 論文標題 Detection of neuropeptides in vivo and open questions for current and upcoming fluorescent sensors for neuropeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170456 ~ 170456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2020.170456	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 Inutsuka Ayumu, Kimizuka Norihiro, Takanohashi Natsuki, Yakabu Hisashi, Onaka Tatsushi	4. 巻 522
2. 論文標題 Visualization of a blue light transmission area in living animals using light-induced nuclear translocation of fluorescent proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 138 ~ 143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.023	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 Chowdhury Srikanta, Hung Chi Jung, Izawa Shuntaro, Inutsuka Ayumu, Kawamura Meiko, Kawashima Takashi, Bito Haruhiko, Imayoshi Itaru, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Yamanaka Akihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Dissociating orexin-dependent and -independent functions of orexin neurons using novel Orexin-Flp knock-in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1 ~ 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.44927	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1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
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 犬束歩、君塚悟洋、高野橋菜月、屋嘉部久志、尾仲達史
2. 発表標題 タンパク質核内移行の脳内における光操作
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君塚悟洋、犬束歩、屋嘉部久志、高野橋菜月、尾仲達史
2. 発表標題 LiNuSiによる蛍光タンパク質の核内移行を利用した脳内における青色光の伝達マッピング
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayumu Inutsuka, Masahide Yoshida, Yuki Takayanagi, Tatsushi Onaka
2. 発表標題 Genetic manipulation of oxytocin receptor-expressing neurons using GFP-dependent Cre recombinase and Oxt <sup>r</sup> -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

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
ドイツ	Heidelberg University			