

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12738

研究課題名(和文)雌雄マウスの養育行動における脳の性差形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Hypothalamic neural circuit controls parental behavior in female and male mice.

研究代表者

折笠 千登世 (ORIKASA, CHITOSE)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20270671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、マイクロアレイ法を用いて、養育行動に関連し社会的環境因子により変動する遺伝子を網羅解析し、視床下部外側野に発現するメラニン凝集ホルモン(MCH)の変動をみいだした。MCHニューロンにおいてtet-off システムを用い、神経特異的にノックアウトすることで仔の生存率は有意に減少し、養育行動は阻害され、養育行動との関連性を明らかにした。光遺伝学的手法(オプトジェネティクス)によりMCHニューロンを光刺激し、オキシトシン(OXT)の分泌が引き起こされることによって養育行動が誘起され、雌雄マウスの養育行動に関連する神経回路として、MCHからOXTへの神経連絡が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MCHニューロンからOXTニューロンへの神経回路を新たな養育回路として明らかし、MCHニューロンの脱落変性によって、養育行動抑制が引き起こされる事を明らかにした。社会性行動においては、OXTの「信頼ホルモン・絆形成」ホルモンといった側面が提唱されている。MCHとOXTが養育回路を形成することが明らかになり、OXT作用のポジティブな側面を保障している一方で、MCH-OXT神経の相互作用が、養育行動のスイッチングを担っており、攻撃や無視といった雌雄の行動抑制を誘起すると考えられる。これら、神経メカニズムを解明することは、ネグレクトや虐待を含むヒトの社会性行動をひもとくことにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We showed that neurons expressing melanin concentrating hormone (MCH) in the lateral hypothalamic area (LHA) are more active in rodents of both sexes when exhibiting parental nursing behavior. Genetic ablation of the LHA-MCH neurons impaired maternal nursing. The post-birth survival rate was lower in pups born to female mice with congenitally ablated MCH neurons under control of tet-off system, exhibiting reduced crouching behavior. Virgin female and male mice with ablated MCH neurons were less interested in pups and maternal care. Chemogenetic and optogenetic stimulation of LHA-MCH neurons induced parental nursing in virgin female and male mice. LHA-MCH GABAergic neurons project fibers to the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) neurons. Optogenetic stimulation of PVN induces nursing crouching behavior along with increasing plasma oxytocin levels. The hypothalamic MCH neural relays play important functional roles in parental nursing behavior in female and male mice.

研究分野：神経科学行動学

キーワード：養育行動 メラニン凝集ホルモン オキシトシン 養育回路 DREADD オプトジェネティクス アミノ酸

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、性的未経験雄マウスにおいて、養育行動が社会隔離条件下で促進されることを明らかにした。養育行動を示した個体と、養育行動を示さない個体とでマイクロアレイ法により比較し、差のある遺伝子にメラニン凝集ホルモン(MCH)があった。社会的隔離によって促進される養育行動に関連する回路は、脳の性分化の臨界期が終了した後も可塑性を保持し、雌と雄に共通の神経回路発現があるのではないかと考え、その神経科学的メカニズムを解明する。

### 2. 研究の目的

げっ歯類を含む哺乳類の脳の性差形成は、周生期のステロイドホルモンが臨界期に作用することで不可逆的な回路網の変更が起こり、中枢神経系に雄と雌の違いが形成され、成熟した個体の行動・内分泌の両面で性差がみられる。しかし、養育行動の性差に関してはこれら定説が当てはまらないのではないかと考える。すなわち、社会環境を変えることによって、雄での養育行動が容易にひきおこされ、雌でさえも仔に対して無視の行動が現れる。雌雄で現れる無視の行動は、ヒトの育児放棄を意味するネグレクトのモデルになるといえる。この様に雌と雄に共通の回路が環境変化に応じて成熟後も可塑性を有すると考えられる。オキシトシンニューロンを回路に含むMCH投射経路を、養育行動促進の機能的神経回路として明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

MCHニューロンによる養育行動への関与を調べるため、神経薬理学的手法 (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs; DREADD) によって行動解析を行う。さらに光遺伝学を適用し、チャンネルロドプシン2 (ChR2) によるオプトジェネティクス行動解析を行い、ニューロン特異的な行動変化がおこるのかについて検討する。これらの手法は、ニューロン活動を直接操作することで、分子の機能性を直接解析できる利点がある。MCHニューロン特異的にかつ、Creリコンビナーゼ依存的に遺伝子発現を制御するMCH-Creトランスジェニック (Tg) マウスに、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV)-ChR2を感染させ、MCHニューロン特異的にChR2を発現させる。光感受性ChR2タンパクを連結タンパクとし、視床下部外側野でのMCHニューロンの活動を光によって操作し、養育行動の解析を行う。意識下で自由行動する雌雄マウスの養育行動が誘起されるか否かの検討を行う。また、神経特異的ノックアウト動物を、tTA-MCHトランスジェニックマウスとDTAトランスジェニックマウスを掛け合わせたダブルトランスジェニック

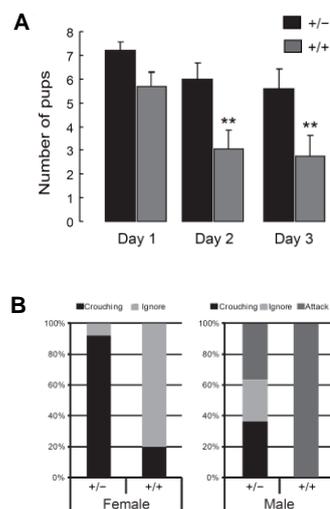


図1 MCHニューロン脱落変性による効果 (A) MCH-tTA; TetO-DTAダブルトランスジェニック(Tg)から生まれた仔の生存数は減少する (B) 性的未経験MCH-tTA; TetO-DTA TG雌マウスは無視行動が、雄は攻撃行動が増加する

### A AAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-mCherry

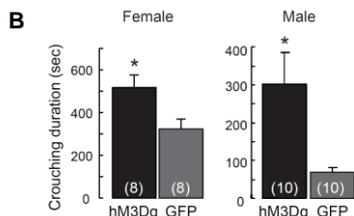


図2 DREADDによるMCHニューロン活性化による効果 (A) 視床下部外側野(LHA)のMCHニューロンにAAVを用いてhM3Dqを導入した。 (B) 全身性にクロザピン-N-オキシドに投与しMCHニューロンを活性化し、養育行動は有意に増加する。

マウスを作成し、tet-off システムを用い、神経特異的にノックアウトすることで、養育行動に対する影響を検討する。

#### 4. 研究成果

MCH ニューロが養育行動に関連する機能を持つことが明らかになった。MCH ニューロンを tet-off システムを用い、神経特異的に KO することで、養育行動抑制があることを明らかにした。すなわち、MCH ニューロンノックアウトの母親マウスでは、妊娠出産を経た後、仔マウスの生存数が対照群と比較して優位に減少していた (図 1A)。性的未経験の雌雄マウスにおいても、MCH ニューロンノックアウトの影響によって、雌では無視行動が、雄では攻撃行動が有意に増加していた (図 1B)。

DREADD による解析によって、MCH ニューロンを直接活性化し、養育行動の促進が認められた (図 2A, B)。さらに、光遺伝学的手法を用いて、ChR2 を Cre リコンビナーゼ依存的に MCH ニューロンに発現させ、光刺激をすることによって養育行動促進が認められた (図 3A, B, C)。MCH ニューロンに発現させた ChR2 には EYFP が付加されており、投射先の脳領域を特定できる。ChR2 発現の MCH の神経線維が、室傍核にある OXT ニューロンに投射することが明らかになった (図 3D)。MCH ニューロンから ChR2 が発現している神経線維は、オキシトシンニューロンへ投射し、光刺激することによって養育行動の促進が認められた (図 3E, F)。

養育行動促進に伴って、雌のオキシトシン分泌は優位に高まり、雄でもオキシトシン量が増加傾向にあることが明らかとなった (図 3G)。MCH ニューロンは神経伝達物質として GABA を介している可能性が示唆された (図 4)。MCH ニューロンから OXT ニューロンへの投射があり、これらの神経回路が雌雄共通の新たな養育回路であることが示唆された。

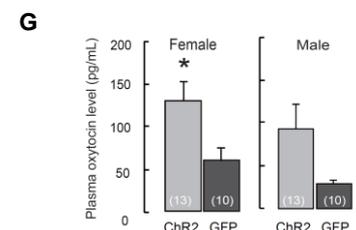
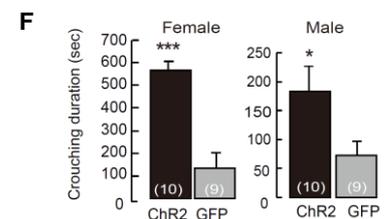
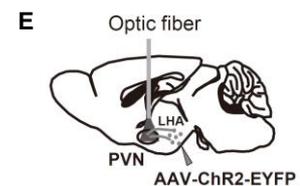
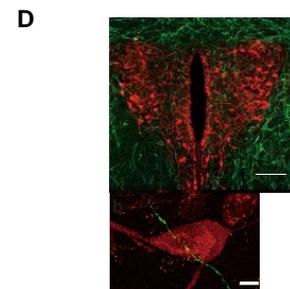
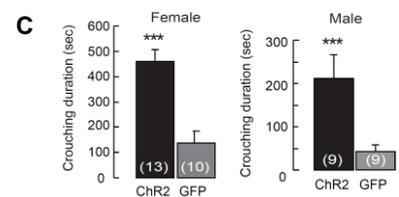
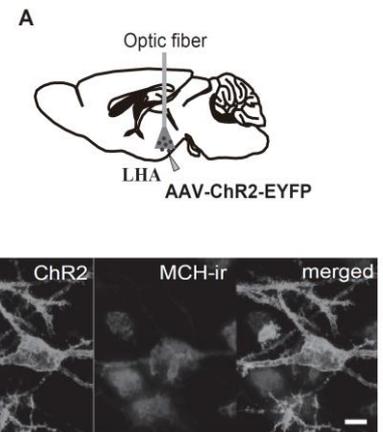


図3 オプトジェネティクスによるニューロン活性化による効果 (A, B) LHAのMCHニューロンにChR2-EYFPを導入した。(C) 光刺激によりChR2を発現するMCHニューロンを活性化し養育行動促進が認められた。(D) ChR2-EYFPは室傍核へ投射し、オキシトシンニューロンへ投射線維が及んでいた。

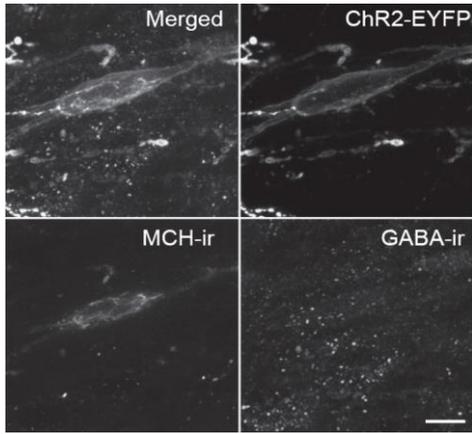


図4  $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA) 陽性MCHニューロン  
ChR2を導入したMCHニューロンはGABA陽性である。

## 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 Orikasa Chitose	4. 巻 11
2. 論文標題 Regulation of Morphological and Functional Aspects of Sexual Dimorphism in the Brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phycoendocrinology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.97470	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 Orikasa Chitose	4. 巻 22
2. 論文標題 Neural Contributions of the Hypothalamus to Parental Behaviour	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6998 ~ 6998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22136998	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 Yoko Kato, Harumi Katsumata, Ayumu Inutsuka, Akihiro Yamanaka, Tatsushi Onaka, Shiro Minami, Chitose Orikasa	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 3348
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 Orikasa Chitose	4. 巻 16
2. 論文標題 Social network plasticity of mice parental behavior	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience, section Neuroendocrine Science	6. 最初と最後の頁 882850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.882850.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kato Y, Katsumata H, Minami S, Orikasa C., Katsumata H, Minami S, Orikasa C.
2. 発表標題 Effects of cell-sepecific ablation of MCH neurons on parental behavior in mice.
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会大会
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
---------	---------