

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16303

研究課題名（和文）オキシトシンによる攻撃性緩和の神経回路機構

研究課題名（英文）Circuit mechanisms of oxytocin-mediated suppression of aggression

研究代表者

稲田 健吾（Inada, Kengo）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：20823363

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）：本研究は父親マウスの養育行動を生み出す神経回路基盤の解明を目的とした。本研究により雄マウスの養育行動発現におけるオキシトシン細胞の関与およびその重要性が明らかとなった。また雄マウスが父親になる過程でオキシトシン細胞が活性化しやすくなるような、神経回路変化が起きていることも解明できた。さらにこれまで養育行動の文脈ではあまり注目されてこなかった視床下部の外側視床下部興奮性細胞が、雄マウスの仔への攻撃性抑制に関与していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では雄マウスが父親マウスになる過程で、脳領域レベルでの神経回路変化が生じていることを示した。これは人間社会で父親の育児参加が進む中で、父親の親性がどのように獲得されているのかを解明するための足掛かりとなる知見となる。本研究が完成してもなお養育行動発現には様々な疑問が残されているが、本研究で使った一連の実験手法やロジック構成は、オキシトシン細胞群以外の細胞群にも適用可能であり、ライフステージの変化に伴う神経回路変化に関する後発研究へ着想を与えるものとなる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to understand the neural circuits that give a rise to parental behaviors in male mice. This study revealed the importance of oxytocin in the expression of parental behaviors. We also described the changes in the neural connection to oxytocin neurons, which led to the oxytocin neurons being more excitable. We further identified that excitatory neurons in the lateral hypothalamus, which had not been studied in the context of parental behaviors, suppressed pup-directed aggression.

研究分野：神経科学

キーワード：オキシトシン 養育行動 トランスシナプス標識法 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の子供(仔)は、独立するまで親の庇護下で養育される。親にとって子育て行動(養育行動)は、親自身の生存を脅かす側面も持つが、自分自身の子孫を確実に残すには必要不可欠であるため、ヒトを含め多くの哺乳類種の親は積極的に養育行動を行う。養育行動は親となった個体に特徴的な行動で、交尾未経験の雄や雌では見られない。それどころか交尾未経験の雄や雌は、概して(他者の)仔に対して攻撃的である。こうした行動学的な知見から、哺乳類の脳内では親になるまでの間、すなわち交尾から出産までの間に、仔への攻撃性を和らげつつ、親和性を上げるような神経回路の変化が起きていると考えられているが、詳しいことは分かっていない。特に妊娠や出産といった生理的な変化を経験する雌と比べ、雄が父親になる過程で脳にどのような変化が生じるのかは、十分に理解されていない。

2. 研究の目的

交尾未経験の雄マウスは、仔マウスに対して極めて攻撃的である。ところが、雌マウスとの交尾やパートナーとの同居を経て父親になる時期が近づくと、攻撃性がなくなり、他のマウスの仔であっても保温したり、巣から離れた仔を連れ戻したりといった養育行動を示すようになる。脳の視床下部と呼ばれる領域には、養育行動の発現に重要とされる神経核が多数存在する。このうち室傍核という神経核に存在するオキシトシン神経細胞は、マウスを含むげっ歯類の雌において出産や射乳、そして養育行動を促進させる働きを持つ。そこで本研究では、雄マウスの攻撃性がオキシトシンによって緩和されることで養育行動が発現し、また父親になる過程でオキシトシン神経細胞の興奮性を上げるような神経回路の変化が起きているのではないかと考え、実験を行った。

3. 研究の方法

(1) オキシトシンのコンディショナルノックアウト実験系の確立

本研究ではまず父親マウスの養育行動発現におけるオキシトシン分泌の重要性を示すため、オキシトシンのコンディショナルノックアウトマウスを新規に作成した。具体的な手法としてはCRISPR-Cas9をベースとするPITCh法を用いた。このマウス系統では、DNA組み換え酵素Cre依存的にオキシトシン遺伝子の $exon1$ が欠損するように設計した。オキシトシン遺伝子の $exon1$ はオキシトシン合成に必要な配列を含むため、Creを発現させた細胞だけでオキシトシンの合成能を欠損させることができる。我々は本マウス系統作成後、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて室傍核特異的にCreを発現させた上で、*in situ*ハイブリダイゼーション法でオキシトシンのmRNAを可視化した。すると設計通り、有意にオキシトシンmRNAの発現レベルが下がっていることを確認した。

(2) Cre発現に依らないオキシトシン神経細胞の操作系の確立

オキシトシン神経細胞は、活性化するとオキシトシンを分泌する。ただオキシトシン神経細胞はグルタミン酸など、オキシトシン以外の神経伝達物質や神経修飾物質も放出する。本研究では、従来切り分けられてこなかった、オキシトシン神経細胞の活動と、オキシトシン分泌、それぞれの養育行動発現における重要性についての検証にも取り組んだ。具体的にはオキシトシンをノックアウトすることでオキシトシンの合成能を欠損したマウスにおいて、薬理遺伝学の手法でオキシトシン神経細胞を特異的に活性化させる。この場合、オキシトシン神経細胞は活性化されてもオキシトシンを分泌できない。本実験においては、オキシトシン遺伝子が欠損しているため、従来型のオキシトシンCreマウスを使うことができない。そこでオキシトシンのミニプロモーターを用いて薬理遺伝学のプロンプを発現させるコンストラクトを作成し、AAVを用いて脳内で発現させた。このAAVを用いると、Creマウスを使わなくとも、オキシトシン神経細胞にプロンプを発現させることができることが分かった。

4. 研究成果

(1) オキシトシン分泌は雄マウスの養育行動を促進する

まず父親マウスの養育行動におけるオキシトシン分泌の必要性を示すため、AAVを用いて室傍核のオキシトシン神経細胞でオキシトシンコンディショナルノックアウトを行った。この雄マウスを正常な雌マウスと交尾させ、その後妊娠中から出産5日後まで同居させることで「父親マウス」とした。これまでの研究から、父親マウスは自分の仔でなくとも養育行動を示すことが知られており、Creを発現していない父親マウスは養育行動を示した。これに対し、オキシトシン合成能を失わせた父親マウスは、養育行動を示す割合が低下し、仔を無視するようになった。

交尾未経験の雄マウスは、仔に対して攻撃的である。もしオキシトシンが養育行動を促進するならば、交尾未経験の雄マウスであっても、オキシトシン神経細胞を人為的に活性化させてオキシトシンの分泌を促せば、養育行動を示す可能性がある。そこで次に、薬理遺伝学の手法を使って交尾未経験の雄マウスのオキシトシン神経細胞を活性化させた。するとこれらの雄マウスは

仔を攻撃せず、代わりに父親マウスの様に養育行動を見せた。さらに、オキシトシンノックアウトマウスで同様にオキシトシン神経細胞を活性化させた。このマウスも養育行動を見せたが、そのパフォーマンスはオキシトシン分泌ができる場合よりも顕著に悪かった。

これらの結果は、オキシトシン神経細胞の活性化、そしてオキシトシンの分泌が雄マウスの養育行動を引き起こすために重要であることを示している。

(2) 養育行動を生み出す脳内回路変化の解析

オキシトシン神経細胞の活性化が養育行動を引き起こすのであれば、交尾からパートナーの出産に至るまでの過程において、雄マウスの脳内で、オキシトシン神経細胞が活性化しやすくなるような神経回路の変化が起きているのではないかと考えた。本研究ではこの仮説を2種類の異なる実験手法で検証した。

第一として、オキシトシン神経細胞に直接入力を送る神経細胞群を同定した。この実験では、狂犬病ウイルスがシナプス後細胞からシナプス前細胞へ広がる性質を持つことを利用したトランスシナプス標識法を用いた。そして交尾未経験の雄マウスと父親マウスについて、オキシトシン神経細胞のシナプス前細胞を網羅的に可視化し、精緻に比較解析した。その結果、外側視床下部と呼ばれる領域からの入力、父親マウスで著しく増えていることが分かった。さらにこのシナプス前細胞が興奮性が抑制性が調べたところ、興奮性の入力が増えていることも分かった。

第二に、オキシトシン神経細胞が受ける神経伝達強度を解析した。この実験では、光遺伝学と電気生理学的手法を用いた。光遺伝学は光に反応するタンパク質を標的とする神経細胞群に発現させ、光を当てることでその細胞から神経伝達物質の放出を誘起する手法である。本実験では外側視床下部の興奮性細胞群を標的とした。一方オキシトシン神経細胞からは、全細胞記録法という手法を用いて、神経細胞の電気活動を高い精度で記録した。その結果、外側視床下部からの興奮性入力、父親マウスにおいて交尾未経験の雄マウスよりも強化されていることが分かった。

これら2つの独立した実験により、外側視床下部興奮性細胞からオキシトシン神経細胞への入力強度が、父親マウスにおいて増強されていることが分かった。

(3) 外側視床下部の興奮性神経細胞は仔への攻撃性を抑制する

外側視床下部の興奮性神経細胞からオキシトシン神経細胞への入力強度が、父親マウスで増えていることには、どのような意味があるのか。外側視床下部はこれまで養育行動の研究ではあまり注目されてこなかったため、本研究ではまず、神経活動の指標となる最初期遺伝子 *c-fos* の発現を解析した。すると、父親マウスの外側視床下部の興奮性神経細胞は仔との触れ合いで活性化されることが分かった。次に、交尾未経験の雄マウスにおいて、外側視床下部の興奮性神経細胞を人為的に活性化させた際の、仔マウスへの行動を調べた。すると養育行動こそ出ないものの、仔への攻撃行動が抑制された。この攻撃行動の抑制は、オキシトシン遺伝子のノックアウトマウスでは起きなかったことから、外側視床下部は下流のオキシトシン神経細胞の活性化を介して攻撃性の抑制を行っていることが示された。一方で外側視床下部の活性化だけでは養育行動を生み出せないことから、他の脳領域からオキシトシン神経細胞への様々な入力、協調的に働くことで、父親の養育行動が発現されている可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Inada Kengo, Hagihara Mitsue, Tsujimoto Kazuko, Abe Takaya, Konno Ayumu, Hirai Hirokazu, Kiyonari Hiroshi, Miyamichi Kazunari | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Plasticity of neural connections underlying oxytocin-mediated parental behaviors of male mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Neuron | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2022.03.033 | 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 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 稲田健吾 |
| 2. 発表標題 Oxytocin neurons facilitate parental behavior in males |
| 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 稲田健吾 |
| 2. 発表標題 Rearrangement of neural circuits of oxytocin neurons regulates parental behavior in male mice |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 稲田健吾 |
| 2. 発表標題 A vasotocin-to-oxytocin receptor signaling underlies paternal caregiving behaviors |
| 3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|