

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380058

研究課題名 (和文) 母性生殖行動と分娩に於けるオキシトシン受容体機能の分子生物学・分子生理学的解析

研究課題名 (英文) Molecular biological and molecular physiological analysis of the function of OXTR in maternal behavior and parturition.

研究代表者

西森 克彦 (NISHIMORI KATSUHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10164609

研究成果の概要 (和文)：

オキシトシン受容体 KO マウスと Oxt_r-Venus マウスを用い、分娩後母性行動が誘導された際の脳内オキシトシン受容体遺伝子発現の変化を解析した。その結果、母性行動制御領域と知られる視索前野と多くのオキシトシンニューロンが分布する視索上核で、オキシトシン受容体発現ニューロンが増加した。同様のオキシトシン受容体発現ニューロン増加は、未妊娠マウスに母性行動を強制的に誘導した場合にも観察された。一方、OXTR(-/-)、Fp(-/-) ダブル KO 雌マウスで分娩直前に発現上昇する遺伝子を探索し、TGF-β 関連の幾つかの遺伝子が分娩時の子宮体部において、プロゲステロン受容体抑制を介して発現し、分娩を制御している可能性を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Using oxytocin receptor (OXTR) knockout mice and OXTR-Venus knockin mice, we analyzed the alteration in the expression of OXTR, when maternal behavior was induced after parturition. In the result, the number of Venus-positive cells, indicating expression of OXTR, increased significantly in the medial preoptic area (MPOA), known to be an essential region for maternal behavior, and in the supraoptic nucleus (SON), where most of OXT releasing cells are distributed, after parturition and during induction of maternal behavior. The increase of Venus-positive cells in MPOA and the SON in the virgin female mice after artificial (or forced) induction of maternal behavior were also detected. On the other hand, we newly cloned several TGF-beta related gene product as a potent "parturition-regulatory factors", from uterus of OXTR(-/-), Fp(-/-) double knockout female mice, prepared just after induced parturition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：オキシトシン受容体、オキシトシン、母性行動、セロトニン、視索上核、視索前野、Venus

1. 研究開始当初の背景

<分娩に於けるオキシトシン受容体の機能解析> 分娩は哺乳類が正常に誕生し、その後の発育にも影響を与える重要な現象だが、出産の詳しい分子メカニズムは依然明らかにはなっておらず、下垂体後葉から血中へ分泌され子宮筋へ働いて収縮作用をもたらすオキシトシン (OXT) と子宮内膜等で合成されるプロスタグランジン F₂α (PGF₂α) の厳密な役割の分担も、結論はついていない。マウスモデルでの分娩の誘起は我々による分子遺伝学的な実験結果により、OXT 遺伝子欠損マウス (Oxt^{-/-}) では全く障害無く分娩が開始終了する。(Nishimori, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, pp. 11699, 1996)。1997年にはPGF₂α受容体のFp遺伝子欠損マウス (fp^{-/-})の解析により、OXTとPGF₂α/Fp受容体の相互作用の重要性が示唆された (Sugimoto, et al., SCIENCE, 277, pp. 681-683 1997)。OXTは脱落膜や子宮上皮でのPGの合成分泌を促し、一方その受容体OXTRを経由して子宮平滑筋の収縮と脱落膜でのPG合成を導き、妊娠終期にOXTRの発現がこれらの組織で劇的に上昇することなどから、OXTの有無にかかわらず、その受容体(OXTR)が通常の出産開始にとって必須と考えられるに至った。川又、西森らは、野生型マウスの子宮平滑筋が *in vitro* の実験系に於いてOXTのみならず、バソプレッシンによっても収縮すること、OXTR^{-/-}マウスの子宮平滑筋はもはやOXTに全く反応しない、つまりAVPはOXTRにも働きシグナルを与えることを見出し (Kawamata, M., et al., Eur. J. Pharmacol. 472:229, (2003))。OXTは無くとも、OXTRが活性化し、分娩を起こす可能性が示されたのである。一方、我々が作成したOXT受容体遺伝子欠損マウス (OXTR^{-/-}) は、野生型マウスとほぼ変わらない分娩を誘起し、出産を終了する (Takayanagi, Y. et al., PNAS 102: 16096, (2005)) ことから、OXTRの出産に於ける必要性に疑問符が付いた。Fp欠損、OXT欠損 (Fp^{-/-}・OXT^{-/-}) の2重遺伝子欠損マウス、及びFp^{-/-}・OXTR^{-/-} 2重遺伝子欠損マウスも妊娠終期に黄体退縮を誘導するRU486 (プロゲステロン阻害剤) 投与により正常な分娩開始を見せた。しかしこの2重変異マウスは分娩を開始するも継続・終了に至らない異常を見せ、OXT系が分娩の誘起ではなく終了に必要であることを示した

<母性行動とOXTR> OXTは個体識別記憶・生殖行動・ストレス反応・集団形成などの脳高次機能を通じ、社会行動の制御に重要な役割を果たすことが多くの研究で示されている。最近の報告は、脳内に分泌投射するOXT

が神経伝達物質として働き、様々な社会行動を制御していることを記載している。ヒトでも、OXTは信頼を醸成するという研究結果が報告され (Kosfeld, M. et al., Nature, 435: 673, (2005))、他にもヒトの対人関係、母子関係行動などの社会行動；同種の個体同士間に関わる行動へのオキシトシン系 (リガンドのOXTと受容体のOXTRを含む) の働き的重要性を示唆する報告が相次いでいる。

またOXTR遺伝子異常とヒト自閉症発症の間強い相関性についての報告も少なくない (Shao Y, et al., Am J MedGenet. 2002;114:99, Auranen M., et al., Am J Hum Genet. 2002;71:777)。OXTR遺伝子は正常な社会行動を制御する遺伝子としての側面と、その欠損等により、正常な対人関係が損なわれる精神障害 (自閉症、不安神経症など) との密接なつながり、の両側面を持つ。

2. 研究の目的

<分娩とOXTR> 哺乳類の分娩の分子メカニズム解明を最終ゴールとする。その為、妊娠終期のOXTによるプロゲステロン合成の抑制作用のメカニズム解明を目的とする。またFp遺伝子欠損妊娠マウス (そのままでは分娩できない) に、生理的濃度以上のOXTを投与すると分娩が誘導され、しかもその際黄体の退縮と血中プロゲステロン (P4) の低下がみられたが、このメカニズムを明らかにすることを目的とした。またOXTとPGF₂α以外に、PGE₁, E₂, E₃とPG受容体のEP₁, EP₃の何れかの組合せが、分娩誘起機構に関わっている可能性につき、OXT系とPGF₂α系以外の第3の出産機構制御因子を明らかにすることを研究目的とした。

<母性行動とOXTR> 新たに開発したOxt^{-/-}Venu knockin マウスを利用し、Oxt^{-/-}を発現するニューロンの類別 (神経伝達物質等による分類に応じ) 分別、脳内での発現神経核分布などを明らかにする。また、その投射先ニューロンの類別と局在を明らかにし、OXTRに始まる神経ネットワーク下流の詳細を明らかにする事を最終目的とする。また、自治医大の小澤敬也博士らとの共同研究で開発に成功したAAV-Oxt^{-/-}ベクターを用い、Oxt^{-/-}マウスの脳内に三次元的に感染させ、どの領域のニューロンにOXTRを再発現させた場合に母性行動が修復されるのか (レスキュー実験) を示し、またOxt^{-/-}(fx^{-/-})マウスを用いどの脳内領域のOXTR欠損が母性行動を失わせるのか、を示して各社会行動に対するOXTR発現責任領域を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

<分娩と OXTR>G19.0 の otr・fp-/-雌マウスに RU486 を投与し、投与後 0 時間、12 時間の子宮から得られた cDNA をそれぞれ Driver, Tester として subtraction を行い、分娩直前に発現上昇する遺伝子の探索を行った。Subtraction sample を用いて subtraction library を構築後、Driver, Tester のプローブを用いて Differential screening を行った。Tester において発現上昇が示された候補クローンについて sequence を行い、候補遺伝子を約 200 個取得した。各候補遺伝子の機能、転写調節について検索を行った。

<母性行動と OXTR>

新たに開発した OXTR-Venus knockin マウスを利用し、OXTR を発現するニューロンの類別（神経伝達物質等による分類に応じ）分別、脳内での発現神経核分布などを解析した。また、自治医大の小澤敬也博士らとの共同研究により AAV-OXTR ベクター開発を行い、これを OXTR-/-マウスの脳内に三次元的に感染させ、どの領域のニューロンに OXTR を再発現させた場合に母性行動が修復されるのか（レスキュー実験）を解析した。また OXTR (fx-/-) マウスを用いどの脳内領域の OXTR 欠損が母性行動を失わせるのか、を示して各社会行動に対する OXTR 発現責任領域を明らかにする実験を行った。

また、分娩や子育て時期の、雌、又は雄の脳内オキシトシン受容体発現領域でのオキシトシン受容体発現頻度の加減、又神経活性化マーカーの c-fos の発現の増減を解析し、脳内オキシトシン受容体発現神経核と母性行動（父性行動）の相関性を明らかにした。

4. 研究成果

<分娩と OXTR>

上記方法に沿った、分娩制御に関する新たな遺伝子のスクリーニング実験により、TGF- β に制御される遺伝子が 6 個見出された。この結果を受けて、まず TGF- β に制御を受ける候補遺伝子について、wild-type の G17.0 と分娩中の子宮体部、及び G19.0 の otr・fp-/- に RU486 を投与し、投与後 0 時間と 12 時間の子宮体部における発現を Real-time PCR により比較した。その結果、SM22 α 、Growth arrest specific 1 (GAS-1)、Glutathione reductase 1 について有意な発現変化が見られた。次にこれらの遺伝子の転写調節を行っていることが予想される TGF- β 1, 2, 3 及び TGF- β RI, II について、分娩時の子宮体部における発現を解析することとした。その結果、TGF- β 1, 2 及び TGF- β RII において、wild-type の G17.0 から分娩中にかけて有意な発現低下が認められた。特に TGF- β 2 の発現量は約 25 分の 1 に減少していた。更に、fp-/- マウスを用いて、TGF- β 1, 2 及び TGF- β RII の分娩時の子宮体部における発現を解

析した結果、各遺伝子の発現は RU486 の投与により抑制されることが示された。これより、TGF- β 1, 2 及び TGF- β RII は分娩時の子宮体部において progesterone receptor により転写調節を受けることが示唆された。

<母性行動と OXTR>

作製された OXTR 遺伝子導入用の OXTR-venus-AAV ベクターは、OXTR-/-マウスでの OXTR 遺伝子のレスキューを可能とし、同時に IRES (Internal Ribosome Entry Site) により、下流の Venus 遺伝子発現をももたらず事が確認された (Sato, K et al., 2009)。一方、吉田匡秀らが開発した OXTR-Venus マウスの脳の病理解析により、OXTR の発現が見出された様々な領域のうち、母性行動制御に関わる領域について、解析を進めるため、開発した OXTR-venus-AAV ベクターによる母性行動のレスキュー実験を試みた結果、OXTR-/-マウスの LS (外側中隔) 領域に対して OXTR-venus-AAV ベクターを注入・感染し、1 週間以上おいてからマウスを妊娠・出産させ、母性行動を観察した際に、感染マウスで OXTR-/-マウスに見られた母性行動異常の回復が見られ、野生型に近い表現型が観察できた。このことは、少なくとも LS 領域の OXTR は正常な母性行動の誘導に重要な役割を担っていることが示唆している。

脳内、オキシトシン受容体発現領域での神経活性化、オキシトシン受容体発現の増減と母性行動の関連性解析実験では、以下のような結果替が得られた。

分娩中・母性行動中の発現比較により、LS・VMH においてはそれぞれの時期で発現に変化は認められなかった。LS は母性行動の中核であり、Venus の発現量も多かったことから、予想外の結果となった。分娩中には MeA・BNST において Venus の発現が有意に増加していた。BNST は未経産マウスに母性行動を誘導してもその発現に変化が認められなかったことから、分娩時に発現が上昇するのは分娩という生理学的変化による刺激がもたらすものであると考えられ、MeA・BNST の領域では OXTR は母性行動の誘導に必須ではないことが示唆された。

母性行動において最も重要と言われる MPOA では Venus は分娩中・母性行動中において有意な発現増加が認められた。未経産マウスに母性行動を誘導した場合にも Venus は発現増加・活性化していたことから、OXTR は MPOA において母性行動の誘導に重要な機能を果たしていると考えられる。実際に OXTR 遺伝子欠損未経産マウスで母性行動を誘導したときには c-fos の活性は野生型と比較して少なく、Venus/+ と Venus/- マウスにおいて、母性行動中に Venus 陽性細胞と活性をみたところ、Venus/- では MPOA において Venus の発現は少なくその活性も低いことが分かって

いる (data not shown)。このことから、OXTR 遺伝子欠損マウスが母性行動を示さない要因の一つとして、MPOA での OXTR の発現誘導・活性化が起こらないことが考えられる。MPOA ではエストロゲンや Prolactin といった OXT・OXTR 誘導因子が母性行動の誘導に関わっており、これらの因子が OXTR の活性化に関わっている可能性を現在は考えている。

OXT 産生領域である PVN ではそれぞれの時期で発現変化は認められなかった。しかしながら、SON については MPOA と同様分娩中・母性行動中で有意な発現上昇・活性化が認められた。この時期に発現が上昇する要因として単純に分娩・射乳の影響が考えられる。OXT/OXTR が分娩・射乳に関わることは古くから知られており、SON は下垂体後葉に働きかけ OXT を血中に放出する領域である。未経産マウスに母性行動を誘導した場合 SON において Venus の発現が誘導された。これは SON における Venus の発現誘導が母性行動の誘導に伴うことを示すものである。

セロトニン合成酵素である TPH と Venus の発現については分娩中・母性行動中で差は認められなかった。この点についてはセロトニンの投射先におけるセロトニン分泌量や、セロトニンの再取り込みの影響を含めた解析を行い、OXTR とセロトニンとの関連を解析していくことが必要であると考えている。そのために、本研究と同様の異なる時期のマウスを用いて、セロトニントランスポーター (SERT) やセロトニン受容体、セロトニン (5-HT)、またエストロゲンや Prolactin といった母性行動誘導因子の抗体を用いた免疫組織学的染色による解析を行うことが必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 2 件)

1. Sinclair MS, Perea-Martinez I, Dvoryanchikov G, Yoshida M, Nishimori K, Roper SD, Chaudhari N. "Oxytocin Signaling in Mouse Taste Buds" PLoS ONE 5:e11980-11990 (2010)
2. Mohri Y, Umezu T, Hidema S, Tomisawa H, Akamatsu A, Kato S, Nawa A, Nishimori K. "Reduced fertility with impairment of early-stage embryos observed in mice lacking Lgr4 in epithelial tissues." Fertility and Sterility 45:2878-2881 (2010)
3. Schorscher-Petcu A, Sotocinal S, Ciura S, Dupre A, Ritchie J, Sorge RE, Crawley JN, Hu SB, Nishimori K, Young LJ, Tribollet E, Quirion R, Mogil JS. "Oxytocin-induced analgesia and

scratching are mediated by the vasopressin-1A receptor in the mouse" Journal of Neuroscience 30: 8274-8284 (2010)

[学会発表] (計 63 件)

1. 国際会議, International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells Reprogramming of Germ Cells, 福岡市, 20101122-24, "Expression and Suggested Function of Dmrt7 during Meiotic Prophase I in Spermatogenesis" ポスター(一般), 野沢治、西森克彦
2. 国際会議, Neuro Science 2010, サンディエゴ, 20101113-17, "Expression of oxytocin receptor gene in the MPOA and the hypothalamic SON in mice, when they exhibited parental behaviors." ポスター(一般), Sato K, Yamashita A, Yoshida M, Nishimori K.
3. 国際会議, The Parental Brain, エジンバラ, 20100901-04, "Regulatory Mechanism in Parental Behavior of Female and Male Mouse by Oxytocin Receptor." ポスター(一般), Sato K, Osada D, Yamashita A, Yoshida M, Mizukami H, Nishimori K.
4. 国際会議, Neuroscience2009, シカゴ, 20091017-21, "Regulatory Function of Oxytocin Receptor in Maternal Behavior of Mouse." ポスター(一般), Sato K, Yamashita A, Osada D, Yoshida M, Aoyagi Y, Mizukami H, Ozawa K, Nishimori K.
5. 国際会議, The Endocrine Society's 90th Annual Meeting 2008, サンフランシスコ, 20080615-18, "Circumvention of embryonic / neonatal lethality in mice with keratinocyte specific deletion of Lgr4 / Gpr48." ポスター(一般), Kato S, Matsuo T, Akamatsu A, Okuyama R, Nishimori K.

[その他]

ホームページ等

<

<http://www.biochem.tohoku.ac.jp/bunsi/index-j.html> >

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西森 克彦 (NISHIMORI KATSUHIKO)
東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10164609

(2)研究分担者

木村 正 (KIMURA TADASHI)
大阪大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：90240845

(3)連携研究者

杉本 幸彦 (SUGIMOTO YUKIHIKO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：80243038

八尾 寛 (YAWO HIROMU)
東北大学・生命科学研究科・教授
研究者番号：00144353

黒田 公美 (KURODA KUMI)
独立行政法人理化学研究所・黒田研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号：90391945