

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06471

研究課題名(和文) 雌マウスにおける雄型性行動発現に対する抑制神経回路の解明

研究課題名(英文) Identification of inhibitory neural circuitry underlying male ejaculatory behavior in the female brain

研究代表者

松本 高広 (MATSUMOTO, Takahiro)

徳島大学・先端研究推進センター・教授

研究者番号：70447374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、雌マウスの外側傍巨大細胞網様核(LPGi)の亜核群の神経破壊実験を実施し、LPGiの中間亜核のセロトニン神経が雌脳において射精パターンを含む雄型性行動発現に抑制的に働いていることが明らかとなった。次に、ウイルスレーザー法を用いて中間亜核のセロトニン神経細胞を起点とした神経回路網の可視化を行い、上行性神経投射として前頭野、視索前野、視床下部外側野、室傍核、下行性神経投射として下位脳幹網様体、腰仙髄の運動ニューロン及び自律神経節前細胞への神経回路が雌脳に発達していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

元来は、脳の雌性化は受動的プロセスで、周生期にアンドロゲンが作用しないと、基本型である雌脳としてそのまま発達すると考えられていた。本研究により、1)雌の脳内にも射精に至るまでの全ての雄型性行動パターンを発現させる神経機構が潜在的には存在していること、2)LPGi中間亜核を起点としたセロトニン作動性の抑制型神経回路が発達していることが、雌性が異性行動を示さない要因であることを明らかにした。即ち、雌脳への性分化の過程は、雄型性行動に対する抑制型神経回路を積極的に発達させる能動的プロセスであることを提唱し、脳の性差研究に新たな知見をもたらすものであると考える。

研究成果の概要(英文)：The behavioral sex differences clearly exist in many animals including rodents. Adult female mouse shows lower levels of male-typical sexual behavior even after treatment with large doses of androgen. Here we report that the lateral nucleus paragigantocellularis (LPGi) serves a vital function in inhibiting motivational and consummatory aspects of male sexual motor patterns in female mice. Discrete excitotoxic or serotonergic lesions placed in the middle subregion of the LPGi accelerated the expression of mount and intromissive pattern in female mice and some of these animals had ability to achieve ejaculatory pattern. We next aimed to identify the neural circuits of serotonergic neurons in the middle subregion of the LPGi. Anterograde tracing using Cre-dependent herpes simplex virus revealed projections of serotonergic neurons to various brain regions including the frontal cortex, the preoptic area, the paraventricular nucleus and the motor neurons in the lumbosacral spinal cord.

研究分野：実験動物学

キーワード：外側傍巨大細胞網様核 アンドロゲン 性差

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌雄間には種々の差異が存在し、その性差は特に生殖に関わる行動パターンに顕著に現れる。雄の性行動は能動的であり、齧歯類の雄は発情雌に対し馬乗りとなるマウント行動、挿入行動を繰り返し、やがて射精行動に至る。一連の雄型性行動は、各々に特徴的な行動パターンとして現れるため、容易に区別することができる。一方、発情雌は雄のマウントに反応し、反射的に脊柱を湾曲させるロードシス行動を示し、雄を受け入れる。このように明確に異なる性行動パターンは、それぞれ雌雄の性に厳格に固定されている。そのため、性成熟した雌に、たとえ多量のアンドロゲン投与してある程度マウント、挿入パターンの発現は観察されるが雄のレベルに比べ極めて低い。また、射精行動パターンに至っては決して観察されることはない。これは、中枢神経系に発達した性中枢の神経回路に構造的・機能的な雌雄差が形成されていることを反映している。一方、性ステロイドホルモンの長期間投与や皮膚への電気ショックや痛覚刺激を与えることにより、雌ラットにおいて挿入パターンが出現し、射精パターンに至る個体もあることが報告されている。これら知見は、雌の中枢神経系にも全ての雄型性行動パターンを発現させる神経回路が潜在していることを示している。しかし、こうした1970年代の研究以降、その後の研究報告は続かず、雌脳における異性行動を司る神経回路の詳細については長らくの間不明である。

### 2. 研究の目的

研究代表者のこれまでの研究により、視床下部腹内側核や中脳正中縫線核の高周波破壊により、雌ラットにおいてマウント発現が促進することから雌脳において雄型性行動に対する抑制神経機構が存在することが示されている。さらに、薬理的に雌ラットの脳内セロトニンを枯渇させると、雄型性行動の発現が亢進し、射精パターンを示す個体も出現することが報告されている。この知見は、雌脳においてセロトニン神経系は雄型性行動を強く抑制していることを示している。したがって、雌ではこのようなセロトニン神経による抑制神経回路が強く発達していることが、雄型性行動発現能力の雌雄差を規定する重要な要因となっていると考えられる。脳内のセロトニン産生細胞は下位脳幹に存在する縫線核群とその近傍の神経核に集中している。これまでの研究により、前脳に対し上行性の神経投射をする最大のセロトニン含有神経核である中脳の背側縫線核および正中縫線核以外のセロトニン神経に抑制力が存在していることが示されているが、その神経領域については未だに特定されていない。

一方、延髄の大縫線核、不確縫線核、淡青縫線核、外側傍巨大細胞網様核のセロトニン神経は主に脊髄に神経繊維を送っている。雄ラットを用いた実験では、不確縫線核は雄型性行動を促進する領域であることが報告されている。一方、雄ラットにおいて外側傍巨大細胞網様核 (Lateral nucleus paragigantocellularis ; LPGi) の破壊は射精行動と反射性勃起を増強させることから、雄脳では延髄レベルにおいてLPGiは雄型性行動に抑制的に機能していることが報告されている。しかし、雌脳における異性行動発現に対するLPGiの役割は不明であるのが現状である。LPGiは延髄の腹外側領域に位置し、吻側から尾側方向に細長い神経核であるが、その細胞構築および遠心性神経結合パターンにより、吻側亜核、中間亜核、尾側亜核に区分される。そこで本研究では、LPGiを構成する亜核群の雌脳における異性行動発現に対する役割を明らかとし、LPGiのセロトニン神経細胞を起点とした神経回路の同定を目指す。

### 3. 研究の方法

雌性における雄型性行動発現に対するLPGiの亜核群のセロトニン産生細胞の機能を明らかとするため、成体の雌マウスに脳定位固定装置下にて吻側亜核、中間亜核、尾側亜核に神経細胞体の選択的破壊を誘導するイボテン酸、またはセロトニン神経を選択的に破壊する5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT)の微量注入手術を施した。手術2週間後、テストステロンを含む長さ5cmのSilastic tubeを2本、背側皮下に挿入した。チューブ挿入後、1週間毎に計3回の雄型性行動テストを行った。テストステロン投与後に1週間毎に計3回の雄型性行動テストを行なった。観察は赤色光下にて行い、被験マウスを観察用ケージに入れ、4-5分適応させた後、発情した雌マウスを入れてから30分間観察を行った。発情雌マウスは卵巣除去後、行動観察の48時間前に30 $\mu$ g、24時間前に15 $\mu$ gのエストラジオールを皮下投与し、さらに行動観察の4時間前に500 $\mu$ gのプロゲステロンを皮下投与した。雄型性行動測定はマウント、挿入パターン、射精パターンのそれぞれの行動回数、雌を入れてからそれぞれ最初の行動が起こるまでの潜時を記録した。観察後、各マウスを4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定した後、30 $\mu$ mの凍結切片を作成し、チオニンで染色した後、神経細胞の破壊部位を同定した。また、セロトニン神経破壊領域はトリプトファン水酸化酵素に対する抗体を用いた免疫染色法により同定した。

LPGiのセロトニン神経細胞を起点とした神経回路の同定は、セロトニン神経に選択性を示す

SERT-Cre 系統の成体雌マウスに脳定位固定装置下にて、LPGi の中間亜核に、経シナプス性の順行性ウイルストレーサーを注入し、セロトニン神経細胞に特異的にウイルス感染させた。神経トレーサーである改変型単純ヘルペスウイルス (H129 TK-TT) は Cre が発現している神経細胞において増殖が可能であり、その後は経シナプス性かつ順行性に感染する。感染後、4 日目に解剖し、感染細胞で発現する蛍光タンパク質 tdTomato を指標として、神経投射パターンを解析した。

#### 4. 研究成果

LPGi の亜核群のセロトニン神経機能を調べるため、成体の雌マウスに脳定位固定装置下にて吻側亜核、中間亜核、尾側亜核に神経細胞体の選択的破壊を誘導するイボテン酸の微量注入手術を施し、テストステロン投与後に 1 週間毎に計 3 回の雄型性行動テストを行なった。その結果、吻側亜核および尾側亜核の神経破壊による雄型性行動への影響は確認されなかったものの、中間亜核の神経破壊を施された雌マウスでは、マウント、挿入および射精パターンの増加が観察された。雌マウスのマウント発現は LPGi の中間亜核の破壊により対照雄と同じレベルまで増加した。雄性では LPGi は射精や反射勃起の脊髄制御機構に対して抑制的に働いており、LPGi を破壊してもマウント増加は起こらない。したがって、LPGi の中間亜核は雌脳においてのみマウントを強く抑制しており、この機能的な雌雄差が雌性のマウント発現能の低さに寄与している可能性が考えられる。一方、LPGi の中間亜核の破壊は雌マウスの挿入パターンの増加を促し、33% の個体で射精パターンの発現が観察された。この結果は、雌の脳内にも射精に至るまでの全ての雄型性行動発現プログラムが潜在しているという過去の報告を支持し、さらにその機能発現は LPGi の中間亜核により抑制を受けることを示している。次に、LPGi がどのような神経伝達物質を介して抑制型神経回路を形成しているかを調べるため、LPGi に豊富に存在するセロトニン神経を選択的に破壊する 5,7-DHT を中間亜核に微量注入し、雌マウスにおける雄型性行動の発現を観察した。その結果、選択的セロトニン神経破壊により雌マウスのマウント及び挿入パターンの発現が増加し、10 匹中 2 匹の個体で射精パターンが観察された。さらに、セロトニン神経破壊により雄型性行動パターンが亢進した雌マウスにおいて、どの神経領域の細胞が活性化されるかを、神経細胞の活性化マーカーである c-fos 発現を指標に検討した。その結果、視索前野、分界条床核、扁桃核、弓状核、室傍核、腰仙椎の運動ニューロンにおける c-fos 陽性細胞の局在が確認された。以上の結果から、雌マウスが射精パターンに至る雄型性行動を示さない要因として、LPGi の中間亜核を起点としたセロトニン作動性の抑制型神経回路が発達していることが示された。

そこで次に、LPGi 中間亜核のセロトニン神経細胞から始まる神経回路網の可視化を行うため、セロトニン神経に選択性を示す SERT-Cre 系統の成体雌マウスの LPGi の中間亜核に、経シナプス性の順行性ウイルストレーサーを注入し、セロトニン神経特異的にウイルスを感染させた。その結果、LPGi の中間亜核のセロトニン神経細胞から下行性神経投射として下位脳幹網様体、腰仙髄の運動ニューロン、自律神経節前細胞に神経終末があることが明らかとなった。腰仙髄には射精や勃起に不可欠な球海綿体脊髄核および背外側核が存在している。これら運動ニューロンは性的二型を示し、雌性ではあまり発達していないものの、中間亜核のセロトニン神経細胞は最終効果系として脊髄制御機構に投射し、雄型性行動の発現を抑えている可能性がある。一方、上行性神経投射先として前頭野、視索前野、視床下部外側野、室傍核が確認された。これら領域はいずれも雄型性行動に重要であることから、中間亜核のセロトニン神経細胞は上行性投射により、前脳に発達した雄型性行動の促進部位の機能を抑制している可能性も十分に考えられる。

出生前後にアンドロゲンを投与された雌マウスは、成熟後に雄型性行動を強く示すようになる。一方、出生直後に精巣除去された雄マウスは、成熟後の雄型性行動の低下がみられることから、周生期のアンドロゲンの欠如が雄型性行動発現能力を低下させるものと考えられる。今後は、雌脳の LPGi 中間亜核のセロトニン神経細胞を起点とした神経回路網が周生期アンドロゲンによりどのような影響を受けるか調べていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------