

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06274

研究課題名(和文) マウス性指向性を左右するオキシトシン・バソプレシンの神経調節系解析

研究課題名(英文) The central oxytocin and vasopressin system regulating mouse sexual partner preference

研究代表者

近藤 保彦 (Kondo, Yasuhiko)

帝京科学大学・生命環境学部・教授

研究者番号：00192584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：成熟マウスは異性臭に対して選好性を示すが、オキシトシン(OT)欠損マウスはこの選好性を示さない。本研究で、OT受容体(OTR)欠損マウスでテストしたところ正常な選好性を示し、バソプレシン(AVP)受容体(V1b)拮抗薬を追加投与すると選好性が消失した。すなわちOTがOTRとV1bの両受容体に作用することで選好性を調節していることを示す。次に、雌マウスの性行動調節にOT及びAVP受容体がどう関わるかを調べたところ、V1aは雌性行動を抑制するが、V1bがV1aを抑えることによって脱抑制していることが分かった。一方、OTRは拒絶様行動を抑制することで間接的に雌性行動を促進していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでオキシトシン(OT)の生殖行動調節に係る研究は活発に行われてきたが、本研究によって性行動はOTのみならずバソプレシン(AVP)も深く関わることが分かった。OTとAVPは、進化のごく初期に獲得され、構造的にも非常に類似しているため、相互にクロスして受容体に作用することによって生殖行動を調節していることが強く示唆された。本研究では、雄の性行動については時間的に行えなかったが、雄性行動においても同様な相互作用が予想される。このような総合的な観点で行われた性行動研究は、これまで存在しなかったため、本研究は今後の性行動研究に大きな展開を与えるものとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When mature mice were exposed to both sexually active male and estrous female odors simultaneously, they exhibited strong preferences for the opposite-sex odor. These preferences were assessed through the olfactory preference test and the soiled bedding preference test, respectively. Despite previous studies indicating that oxytocin (OT) is not necessary for these preferences, our recent research revealed that male mice lacking the oxytocin receptor gene (OTRKO) can still exhibit them. This suggests the possibility of a crosstalk between OT and vasopressin (AVP) receptors. To investigate further, we administered an antagonist of the v1b receptor (V1bA) to male mice and observed its effects on their preferences. The results demonstrated that V1bA treatment suppressed olfactory preference in OTRKO mice but not in heterozygous (HET) mice. Interestingly, the treatment eliminated soiled bedding preference regardless of the presence of oxytocin receptor genes.

研究分野：行動神経内分泌学

キーワード：性的選好性 異性臭 マウス オキシトシン バソプレシン 性行動

1．研究開始当初の背景

性的に活発な雄は性パートナーに発情雌を選び、一方、発情雌は交尾をすべく性的に活発な雄に接近する。我々は、実験動物に性成熟した雄と発情雌の匂いを同時に提示して探索させると性的に活発な雄は発情雌臭を、発情雌は性的に活発な雄臭を優位に長く探索する異性臭に対する選好性を示すことを報告した(Xiao et al., 2004)。我々は、これを性指向性の動物モデルとして、その生理学的メカニズムの解析を始めた。

これまでの性行動神経回路の研究では、鋤鼻器がフェロモンの受容器であるがゆえに鋤鼻器で感知された社会信号の処理系の重要性が謳われ、副嗅球、扁桃体内側核、そして分界条床核および視索前野という鋤鼻神経系が主たる研究対象として扱われてきた。一方、我々が考案した上述嗅覚選好性テストでは、鋤鼻器信号よりもむしろ嗅上皮から入力される主嗅覚系に依存しており(Dhungel et al., 2011a)、これらの信号は主嗅球や前嗅核といった嗅覚領域を介して最終的には性行動回路である扁桃体内側核や視索前野へと収斂する(Dhungel et al., 2011b)。しかし、これらの性社会行動の信号入力系に神経ペプチドがどのように関与しているかは不明な点が多く、我々はそれらの解析を開始した。

2．研究の目的

近年、オキシトシン(OT)やバソプレシン(AVP)といったノナペプチドが様々な社会行動を制御していることで注目されるようになったが、OT/AVP 産生ニューロンおよび受容体陽性ニューロンは、下垂体後葉からの分泌をつかさどる室傍核や視索上核といった視床下部のみならず、鋤鼻神経系の副嗅球や扁桃体内側核、主嗅覚系の主嗅球、前嗅核、梨状葉皮質といった領域に広く分布している。そこで我々は、OT 遺伝子の欠損(OT-KO)が、雌雄マウスの性行動及び嗅覚選好性にどのような影響を及ぼすかを調べたところ、雄マウスの性行動に OT-KO はほとんど影響がないが、OT-KO は雌マウスの性行動の始動を有意に遅らせること、そして雌雄の嗅覚選好性を完全に消失させることが分かった(Dhungel et al., 2019)。OT はこれまでに社会的認知や母性行動など様々な社会行動の神経制御に介在することが多くの研究で示されてきたが、我々の研究でもマウスが示す他個体の匂いに対する嗅覚選好性に重要な役割を果たすことが分かった。一方、雄マウスの AVP 受容体である v1aR および V1bR をともに欠損した雄マウスの性行動と嗅覚選好性を調べたところ、性行動の活動性は亢進するが嗅覚選好性についてはほとんど影響がないことが分かった(Shimizu et al., 2018)。しかし、刺激として正常雄及び発情雌マウスのホームケージより採取した床敷を使った選好性テストにおいて、AVP の v1b 受容体欠損マウスは選好性が失われていることが報告されており(Wersinger et al., 2004)、OT および AVP の性行動・嗅覚選好性の神経制御に対する関与はまだ十分に解析されたとは言えない。そこで本研究では、OT 受容体(OTR)と AVP 受容体の雌性行動や嗅覚選好性への関わり、また雄マウスの選好性への関わりを実験的に検証することを目的とした。

3．研究の方法

AVP 受容体 v1a、v1b のダブル KO (dKO)が雌マウスの性行動及び嗅覚選好性に及ぼす効果

上述したように雄マウスの AVP 受容体 dKO では、嗅覚選好性にほとんど影響を与えず、雄の性行動活動性の上昇のみが観察されたが(Shimizu et al., 2018)、雌マウスでの AVP 受容体の役割はほとんど分かっていない。そこで雌マウスの dKO を用いて、性行動と嗅覚選好性に対する役割を調べた。性行動は、個飼いの雄マウスのホームケージに被験体雌を導入して 30 分間性行動を観察した。また、選好性テストとして Dhungel et al. (2019)の装置を用いて風流による刺

激動物の匂い提示による嗅覚選好性テストのほか、Wersinger et al. (2004)の用いた床敷刺激をもちいた床敷選好性テストを行った。さらに床敷刺激暴露による脳の活性化を調べるため、cFos免疫組織化学による活性化ニューロン数の比較を行った。

雌マウス性行動における AVP 受容体 v1a、v1b、OT 受容体 OTR 欠損の効果

上記実験において、ホームケージにおける雌マウス性行動テストでは、被験体と刺激雄のケージ内の位置や向きによって正確な行動分類が困難なことが多々あることが分かった。そこで我々は、奥行きが狭い 2 階建ての性行動観察装置を考案し、それを用いて性行動観察を行うことにした(図 1)。この装置では、狭い奥行きのためにマウスの性行動を必ず側面より観察することができ、ロードーシス反射や拒絶様行動が正確に測定できることが示され、今後の雌マウス性行動研究に極めて有用であることが示された。

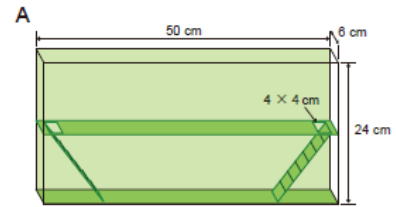


図 1 2 階建て性行動観察装置

われわれはこの装置を用い、野生型雌(WT)、v1a-KO 雌(aKO)、v1b-KO 雌(bKO)、v1a+v1b ダブル KO 雌(dKO)、OTR-KO 雌(OTR-KO)の性行動を観察し、ロードーシスと拒絶様行動に対する影響を比較した。

雄マウス嗅覚選好性に対する OTR 欠損の効果

前述したように我々は、雄マウスの嗅覚選好性は、OT を欠損することによって消失することをすでに報告している(Dhungel et al., 2019)。そこでさらにこれを受容体欠損(OTR-KO)雄マウスにおいて再確認することを試みた。雄マウスに風流による嗅覚選好性テスト、床敷選好性テスト、ならびに社会的認知テストを行った。社会的認知テストは、動物にそれぞれ籠に入れた 2 匹の他個体を 5 分間提示して探索行動を測定する試行を 10 分おきに 3 試行を行った。ただし、1 試行目と 2 試行目は同じ刺激動物を用い、3 試行目では 2 試行目に探索時間が短かった刺激個体を新規の個体に変化させた。これにより取り換えられた個体に対する探索時間が長くなれば、その被験体は個体が変わったことを識別できると判断できる。OT を欠損したマウスではその社会的認知能力が失われていることが報告されており(Ferguson et al., 2000)、本研究では社会的認知能力についても追証を行うこととした。

4 . 研究成果

AVP 受容体 v1a、v1b のダブル KO (dKO)が雌マウスの性行動及び嗅覚選好性に及ぼす効果

雌マウスの AVP 受容体 dKO は、初めての性行動テストにおいてペニスの挿入を受けるまでの時間を有意に短くしたが、それ以外の点ではほとんど影響を示さなかった。また、風流による嗅覚選好性テストでも、Shimizu et al. (2018)で報告したのと同様に dKO の影響は全く観察されなかった。ところが床敷選好性テストでは、dKO 雌は雄に対する選好性を示さなくなるどころか、逆に発情雌に対して選好性を示すようになった(図 2)。

そこで、これら床敷刺激の脳内性行動関連領域に対する活性化が WT と dKO 雌で異なるのではないかと考

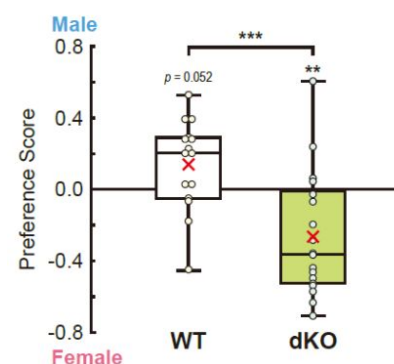


図 2 dKO 雌の床敷選好性テスト結果

え、cFos 免疫組織化学により領域の活性化を測定した。すると WT 雌では扁桃体内側核前野(MeAa)、扁桃体内側核後背側部(MeApd)、扁桃体内側核後腹側部(MeApv)、内側視索前野(mPOA)、分界条床核(BnST)いずれの領域においても雄床敷刺激によって有意な活性化が観察されたのに対して、dKO 雌ではすべての領域において雄床敷刺激に対しても発情雌床敷刺激に対しても有意な活性化が観察されなかった(図 3)。このことから、dKO 雌マウスは、雄刺激よりも発情雌刺激に対して選好性を示すものの、発情雌刺激は脳の性行動関連領域を活性化しないことから、AVP 受容体欠損によって雄の性的誘因性が失われ、性的な信号とは異なる本来雌が持つ同性に対する社会的親和性が顕在化した結果として選好性が変化したものではないかと考えた。

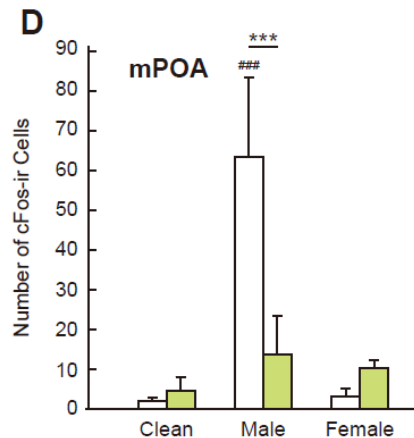


図 3 雌雄床敷刺激に対する WT および dKO 雌の mPOA 活性化の違い

雌マウス性行動における AVP 受容体 v1a、v1b、OT 受容体 OTR 欠損の効果

本研究においては 2 階建て性行動観察装置により正確にロードーシス反射が測定できたため、それをもとにロードーシス商(LQ = #lordoses / #mount received)を計算し、拒絶様行動とともに分析を行った。その結果、aKO 雌は WT 雌と変わらない LQ を示したのに対し、bKO はロードーシスが強く抑制されていることが分かった(図 4)。一方、OTR-KO はロードーシスに対してはまったく影響を示さなかった。興味深いことに、dKO は bKO を含んでいるにもかかわらず、aKO と同様に WT と同じレベルのロードーシスを示すことが分かった。

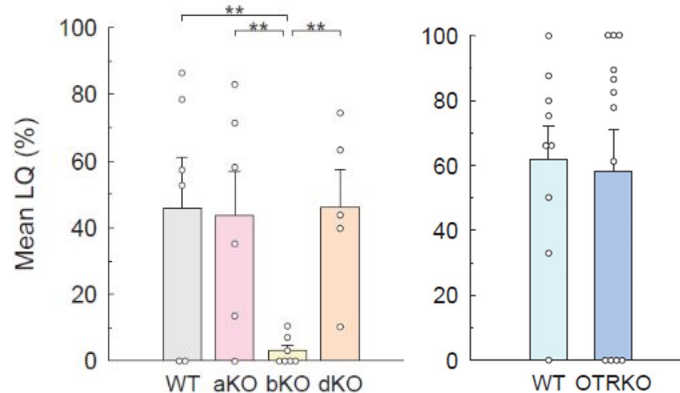


図 4 雌マウスロードーシスに対する aKO、bKO、dKO、OTR-KO の効果

これは今後の検証が必要であるが、現在のところ、v1a 陽性細胞は性行動を抑制するが v1b 陽性細胞によって v1a の抑制系がさらに抑制されているのではないかと考えた。これによれば v1a の欠損はもともと v1b に抑制されていたためにほとんど影響が出ず、v1b の欠損によって v1a の抑制効果が表れたのではないかと、そして dKO では v1a の抑制解除によって WT 並みのロードーシスを示したのではないかと考えている。

一方、雌マウスの雄に対する拒絶様行動に関しては、aKO による性行動の抑制解除が表れて有意に減少し、これは v1b の抑制を受けていないようである(図 5)。したがって、dKO

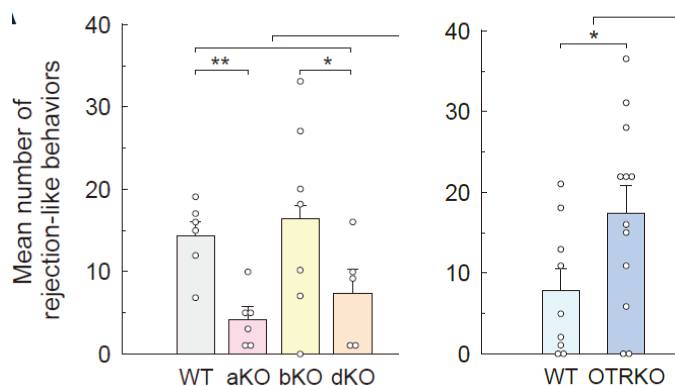


図 5 雌マウス拒絶様行動に対する aKO、bKO、dKO、OTR-KO の効果

雌においても aKO と同様に拒絶様行動の有意な減少が観察された。一方、OTR-KO により拒絶様行動は有意に増加することが分かった。我々の OT-KO による雌の性行動の初動の遅さは、拒絶様行動の増加によるものであり(Dhungel et al., 2019)、一旦、性行動が開始されれば OT-KO であっても正常なロードーシスの受容性を示した結果であると解釈できることが分かった。

雄マウス嗅覚選好性に対する OTR 欠損の効果

この実験は、OT-KO は嗅覚選好性を消失させるという我々の先行研究を OTR-KO 雄マウスによって追証するために行った(Dhungel et al., 2019)。ところが、風流による匂い提示の嗅覚選好性テストでは、OTR-KO 雄は WT 雄と同様に発情雌臭に対して有意に長い探索時間を示し(図 6 左)、嗅覚選好性は正常であることが分かった。また、床敷刺激を使った選好性テストでも OTR-KO の効果を調べたが、同様に選好性は正常であった(図 7 左)。一方、社会的認知にたいしては、OTR-KO も OT-KO と同様に傷害効果を持つことが分かった。

前述したように v1b の欠損は、雄マウスの床敷選好性を消失させることが報告されているため(Wersinger et al., 2004)、これらのマウスに v1b の拮抗薬を投与してテストを行った。その結果、嗅覚選好性は OTR-KO でも、v1b 拮抗薬投与単独でも効果は表れず、OTR-KO と v1b 拮抗薬投与を組み合わせた場合のみ、選好性が失われることが分かった(図 6 右)。一方、床敷選好性に関しては、上記の結果と同様に OTR-KO ではまったく効果がないが、OTR-KO の如何にかかわらず v1b 拮抗薬の投与によって選好性が消失することが分かった(図 7 右)。これらのことから風流による嗅覚選好性はリガンドである OT 欠損で消失するが、受容体としては OTR と v1b 両法が欠損しない限り選好性は正常であり、OT がこれら両受容体に作用することで調節されていることが示唆される。一方、床敷提示による選好性では、OT 及び OTR は基本的に関わっておらず、恐らく AVP が v1b に作用することによって調節されている可能性が高いことが分かった。

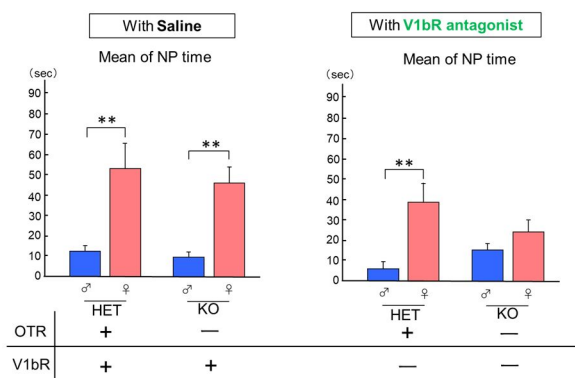


図 6 嗅覚選好性にたいする OTR-KO と v1b 拮抗薬の組み合わせ効果

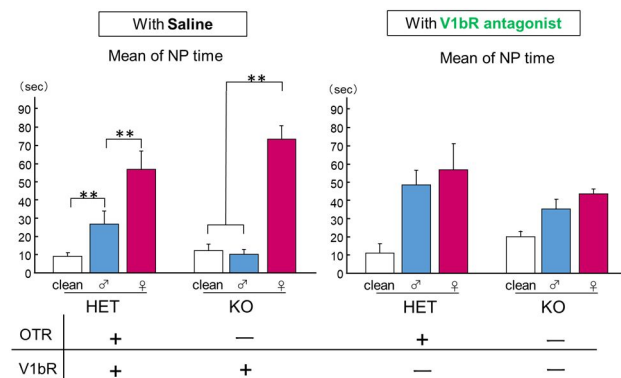


図 7 床敷選好性にたいする OTR-KO と v1b 拮抗薬の組み合わせ効果

引用文献

- Dhungel, S. *et al.*, 2011a. *Neuroscience* 199, 225-234.
 Dhungel, S. *et al.*, 2011b. *Horm Behav* 59, 193-199.
 Dhungel, S. *et al.*, 2019. *Neurosci Res* 148, 34-41.
 Ferguson, J.N. *et al.*, 2000. *Nat Genet* 25, 284-288.
 Shimizu, K. *et al.*, 2018. *Physiol Behav* 197, 37-41.
 Wersinger, S.R. *et al.*, 2004. *Horm Behav* 46, 638-645.
 Xiao, K. *et al.*, 2004. *Horm Behav* 46, 356-361.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hayashi, H., Shimizu, K., Nakamura, K., and Kondo, Y.
2. 発表標題 Vasopressin and oxytocin receptors differentially regulate sexual receptivity and proceptivity in female mice.
3. 学会等名 International Congress of Neuroendocrinology (ICN2022, Glasgow, Scotland) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林姫花・清水稀恵・中村和昭・坂本浩隆・近藤保彦
2. 発表標題 下垂体神経様ホルモン受容体によって調節される雌マウスの性的同意と拒絶様行動.
3. 学会等名 日本動物学会中国史国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林姫花・清水稀恵・中村和昭・近藤保彦
2. 発表標題 Differential regulatory roles of vasopressin and oxytocin in female sexual behavior of the mouse.
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会 合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林姫花・清水稀恵・中村和昭・坂本浩隆・近藤保彦
2. 発表標題 雌マウス性行動における受容および拒絶様行動を制御する下垂体神経葉ホルモン受容体.
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林姫花・西森克彦・近藤保彦
2. 発表標題 雄マウスの発情雌臭選好性を調節するオキシトシンおよびバソプレシン受容体の役割.
3. 学会等名 第35回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中怜奈・林姫花・西森克彦・近藤保彦
2. 発表標題 雄マウスの異性臭に対する選好性及び社会認知に対するオキシトシン受容体欠損の影響
3. 学会等名 第34回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林姫花・清水稀恵・中村和昭・近藤保彦
2. 発表標題 バソプレシン1b受容体欠損による雌マウス性行動の抑制
3. 学会等名 第34回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林姫花・清水稀恵・中村和昭・近藤保彦
2. 発表標題 バソプレシン1a, 1b受容体両欠損雌マウスにおける雄尿に対する行動及び神経活性
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林姫花・田中怜奈・西森克彦・近藤保彦
2. 発表標題 Neural regulation of sex-odor preference and social recognition by oxytocin - Is the action of oxytocin solely resulted via oxytocin receptor?
3. 学会等名 日本動物心理学会第81回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林姫花・清水稀恵・中村和昭・近藤保彦
2. 発表標題 雌マウスの性行動発現におけるバソプレシン1b受容体の重要性
3. 学会等名 第31回バソプレシン研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 近藤保彦・小川園子・菊水健史・山田一夫・富原一哉・塚原伸治編著	4. 発行年 2023年
2. 出版社 西村書店	5. 総ページ数 364
3. 書名 脳とホルモンの行動学 分かりやすい行動神経内分泌学 第2版	

〔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