

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06414

研究課題名(和文)行動の性差を生み出す性的二型細胞群の機能解析

研究課題名(英文)Function of sexually dimorphic cell groups for sexually dimorphic behavior

研究代表者

恒岡 洋右 (Tsuneoka, Yousuke)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：50549011

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)：視床下部内側視索前野を始めとした性的二型細胞群の機能を明らかにするため、それらの細胞の解剖学的解析を行うとともに、遺伝子改変マウスとアデノ随伴ウイルスを用いて神経活性操作を行い、その機能を解析した。性的二型を示す細胞群であっても、細胞の種類によって性ステロイド感受性は異なっていた。これらの細胞がどのようなタイミングで活動しているのかを組織学的に明らかにするため、多重ISH法を開発した。それらの情報を元に操作実験を行い、性行動のモチベーション調節に関わる神経細胞群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、性的二型核はその存在は知られていたものの、どのような種類の細胞なのかは明らかになっていなかった。また、どれだけの種類の細胞があるのかについても不明であった。本研究では内側視索前野の性的二型核に存在する細胞群として3種類の細胞を同定するとともに、その機能の一端を明らかにした。また、その過程で新規のイメージング技術の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：To verify the function of sexually dimorphic cell groups in the medial preoptic area of hypothalamus, we analyzed the anatomy of those cells, as well as their function by manipulating neural activity using genetically engineered mice and adeno-associated virus. Even within the sexually dimorphic group of cells, sex steroid hormones' sensitivity differed among cell types. We developed a multiple ISH method to histologically clarify the timing of activity of these cells. Based on this information, we performed manipulation experiments and identified a group of neurons involved in the motivational regulation of sexual behavior.

研究分野：神経解剖学

キーワード：性的二型 内側視索前野 性行動

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中樞神経系に広くみられる性的二型は性特異的もしくは性差のある行動の制御に関わっていると考えられているが、一部の例を除いて、脳の構造的性差が行動に与える影響は不明であった。多くの行動を制御する神経回路は雌雄で共通であるにも関わらず、同じ刺激に対して雌雄で異なる行動をするのはなぜかという問いへの解答は、様々な環境からの刺激に対してどのように最適な振る舞いを選択するかという神経機構の本質を知る上で良いモデルとなる (de Vries and Södersten, *Horm Behav* 2009; Yang and Shah, *Neuron* 2014)。

行動の雌雄差の一つとして性ホルモンの関与が挙げられる。性ホルモンは多くの遺伝子発現を制御することがわかっているが、その作用はあくまで修飾的なものに過ぎず、行動における「雄型の行動をとるか雌型の行動をとるか」という選択を説明するものではない。このため、性ホルモンよりも脳の構造的な性差(性的二型)が行動の性差を実現していると考えられているが (de Vries and Södersten, *Horm Behav* 2009)、実際にそれが実証された研究は極めて少ない (Scott et al. *Nature* 2014; Yang et al. *Cell* 2013)。研究代表者らは内側視索前野・分界条床核・扁桃体における3か所に性的二型核が存在し、2種の細胞が3領域で共通して分布することを発見した。

2. 研究の目的

研究代表者らが発見した性的二型細胞集団が行動の性差の責任領域の一つなのかについて検討するため、遺伝子発現解析を用いてその領域における細胞プロファイルの解明や、細胞の性ステロイドホルモン感受性などを調べることで解剖学的特徴づけを行うと共に、神経活性操作実験等を用いてその機能解明に取り組むことを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 内側視索前野の性的二型マーカーである、*Moxd1*, *Penk*, *Neurotensin* について、その発現を ISH 法を用いて確認した。これらの遺伝子の発現量が性ステロイド依存的に変化する可能性について検討するために、雌雄それぞれのマウスの性腺を除去したもの、さらにその後ステロイドホルモン注射を行ったマウスについても検討した。比較対象として、内側視索前野近傍にある性ステロイド受容体の発現していない領域での発現変動も検討した。
- 2) 通常の ISH 法では複数の遺伝子、特に4つ以上の遺伝子を同一切片から簡便に検出することは難しい。そこで研究代表者らが開発した蛍光多重 ISH 法をさらに改良することで同一切片から10前後の分子を検出できる手法の開発に取り組んだ。この手法を用いて性行動を行ったマウスで神経活性化マーカーも含めた多重染色を行い、細胞のプロファイルを明らかにするとともに性行動の特にモチベーション調節に関わる神経細胞群の同定を試みた。また、それらの技術に付随して既存の蛍光 ISH 法の感度をさらに大きく上昇させる手法の開発も試みた。
- 3) それらの遺伝子の Cre ドライバーマウスにアデノ随伴ウイルス (AAV) による部位特異的・細胞種特異的遺伝子導入を行うことで、細胞の形態について確認するとともに、光遺伝学的な細胞活性の操作を併用することで行動に与える影響を検討した。AAV による遺伝子導入としては、青色光照射により脱分極が誘導できる ChR2 を Cre 依存的に発現可能なベクターを用いた。青色光は細胞体の分布する内側視索前野と、その主要な投射領域の一つである腹側被蓋野に照射した。それぞれのマウス系統について、上記の c-Fos 染色から示唆される行動について、細胞の神経活動操作をした際に、行動に変化が起こるかについて検討した。

4. 研究成果

- 1) 内側視索前野の性的二型マーカーである、*Moxd1*, *Penk*, *Neurotensin* の発現に性差があることはこれまでの研究から明らかであったが、本研究でも同様の傾向が確認され、*Moxd1* と *Neurotensin* ではオス優位な細胞数であり、*Penk* はメス優位な細胞数であった。加えて、性腺除去によって *Neurotensin* では雌雄ともに細胞当たりの発現量が減ったものの細胞数の性的二型は維持されていた。また、この発現量の減少はテストステロンの補充によって回復した。*Moxd1* では基本的に性腺の除去やその後のホルモン処理の影響を受けず、常に発現量

と発現細胞数は一定のレベルを維持していた。一方で、Penk ではオスの場合、性腺除去によって大きく発現量が上昇し、テストステロン補充によって発現量が減少した。メスの場合、性腺除去による影響は検出できなかったがテストステロン補充によって発現量が減少した。これらの遺伝子の周辺領域における発現量は基本的に性腺除去やテストステロン補充によって変化しなかった。以上のことから、これら 3 遺伝子はそれぞれ異なった発現量調節制御を受けており、Neurotensin はエストロゲン依存的に増加し、Penk はテストステロン依存的に減少することが示唆された。また、これらの細胞は同所的に分布するが異なるものであることが示唆された。

- 2) 内側視索前野には Moxd1, Penk, Neurotensin を発現する細胞だけでなく、その他にも多くの細胞種がいるということがわかっている (Tsuneoka et al 2017 Sci Rep)。これらをそれぞれ区別し、なおかつ同一の標本からデータを得るために Multiplex 蛍光多重 ISH 法の開発を行った。レポーターであるヘアピン DNA を 6~12 種類用意し、それぞれに対応したプローブをハイブリダイズさせ、3 種類ずつ発色して撮影した後に強力な LED イルミネーターで消光することでシグナルを消し、その後残りを順次発色、撮影、消光を繰り返すことで Multiplex 蛍光多重 ISH をすることに成功した。この手法を用い、性行動を行ったマウスと性行動を部分的に行ったマウス、無処理のマウスで神経活動を組織学的に比較した上でその細胞種の同定に取り組んだ。その結果、性行動のモチベーションに応じた神経活動の上昇は Penk, Neurotensin, Vglut2 陽性細胞で観察され、メスマウスに対する曝露に応じた神経活動の上昇は Moxd1 陽性細胞で観察された。

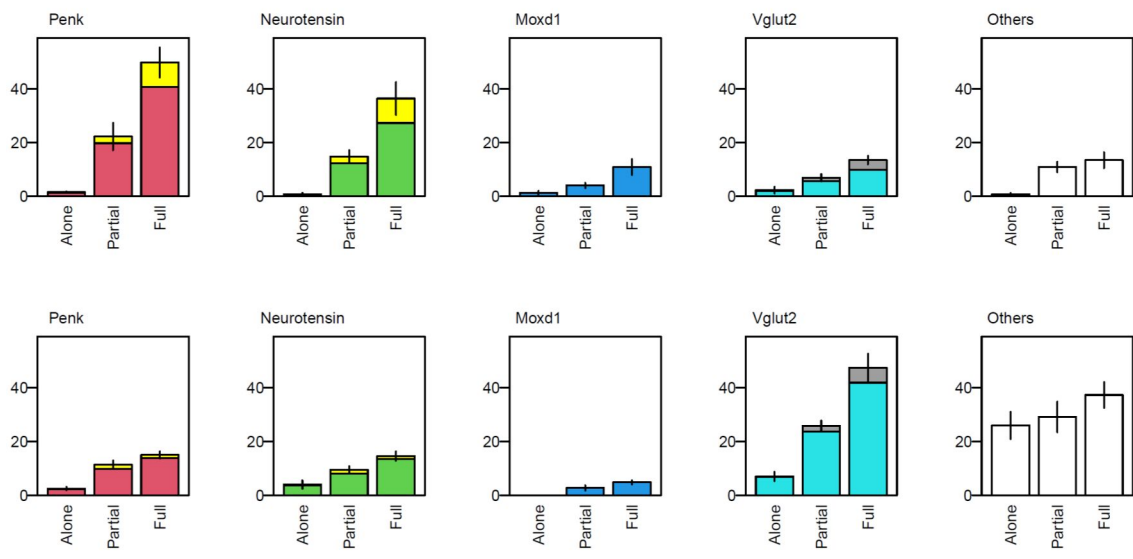


図. c-Fos 陽性細胞数の比較。上段が Esr1 陽性細胞、下段が Esr1 陰性細胞。

- 3) オレキシン受容体は G タンパク共役型膜タンパクであり、多くの行動や性差にも関わっていると考えられる。内側視索前野においても顕著な発現がみられるものの、その性差を検討するには既存の ISH 法では難しかった。そこで我々は分岐型 HCR 法を開発し、その脳内分布を明らかにすることに成功した。1 型と 2 型受容体がオレキシンには知られているが、その発現分布はほとんどの脳領域で重なっておらず、ごく一部の細胞でしか共発現を確認できなかった。興味深いことに、1 型受容体は特に視床下部のエストロゲン受容体発現領域として知られる領域に多く発現していた。

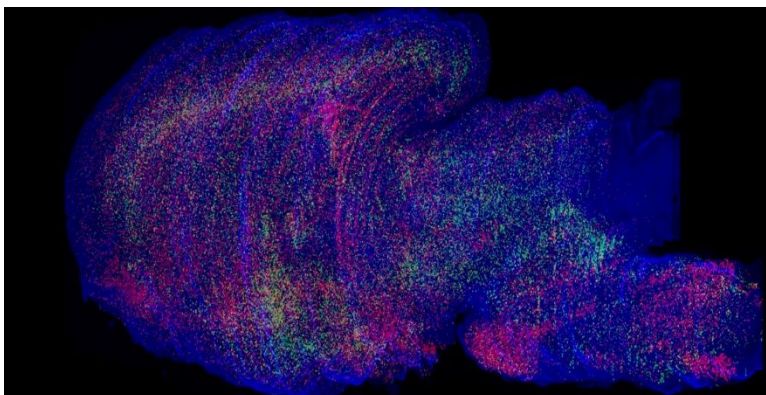


図. オレキシン受容体の脳内 3 次元分布

- 4) 上述 1) 2) の研究成果から、性行動のモチベーションに強く関わるのは内側視索前野の Penk 陽性細胞であることが強く示唆された。そこで、これまでに行っていた薬理遺伝学的な検討に加えて、光遺伝学的検討を加えた。その結果、内側視索前野の Penk 陽性細胞の活性化は性行動を促進させ、マウントおよびイントロミッションの潜時が短縮された。しかしながら、この効果は光刺激のタイミングとは完全に合致せず、刺激から 10 分以上後でも行動の促進効果が確認できた。このことは Penk 陽性細胞が任意の行動の動作を制御しているというよりも性行動のモチベーションを上げているという観察に合致し、一度上昇したモチベーションはある程度の時間継続するということが示唆された。加えて、内側視索前野の Penk 陽性細胞の神経終末が集まる領域の一つである腹側被蓋野を光遺伝学的に刺激した場合にも同様に光刺激のタイミングとは独立してマウント行動の促進が見られたが、イントロミッション行動には変化が観察されなかった。このことは、他の脳領域も性行動に関与している可能性を示唆するとともに、腹側被蓋野の性行動における重要性が示唆される結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tsuneoka Yousuke, Yoshihara Chihiro, Ohnishi Ryuko, Yoshida Sachine, Miyazawa Eri, Yamada Masanobu, Horiguchi Kazuhiko, Young W. Scott, Nishimori Katsuhiko, Kato Tadafumi, Kuroda Kumi O. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Oxytocin Facilitates Allomaternal Behavior under Stress in Laboratory Mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 eneuro | 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） 10.1523/ENEURO.0405-21.2022 | 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 Katayama Yukitoshi, Saito Ami, Ogoshi Maho, Tsuneoka Yousuke, Mukuda Takao, Azuma Morio, Kusakabe Makoto, Takei Yoshio, Tsukada Takehiro | 4. 巻 388 |
| 2. 論文標題 Gene duplication of C-type natriuretic peptide-4 (CNP4) in teleost lineage elicits subfunctionalization of ancestral CNP | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell and Tissue Research | 6. 最初と最後の頁 225 ~ 238 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-022-03596-y | 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 - |
| 1. 著者名 Yamazaki Soh, Inohara Naohiro, Ohmuraya Masaki, Tsuneoka Yousuke, Yagita Hideo, Katagiri Takaharu, Nishina Takashi, Mikami Tetuo, Funato Hiromasa, Araki Kimi, Nakano Hiroyasu | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 I B controls IL-17-triggered gene expression program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents Th17-associated pathologies | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Mucosal Immunology | 6. 最初と最後の頁 1321 ~ 1337 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41385-022-00554-3 | 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 Tsuneoka Yousuke, Atsumi Yusuke, Makanae Aki, Yashiro Mitsuru, Funato Hiromasa | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Fluorescence quenching by high-power LEDs for highly sensitive fluorescence in situ hybridization | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience | 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） 10.3389/fnmo1.2022.976349 | 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 Yoshihara Chihiro, Tokita Kenichi, Maruyama Teppo, Kaneko Misato, Tsuneoka Yousuke, Fukumitsu Kansai, Miyazawa Eri, Shinozuka Kazutaka, Huang Arthur J., Nishimori Katsuhiko, McHugh Thomas J., Tanaka Minoru, Itohara Shigeyoshi, Touhara Kazushige, Miyamichi Kazunari, Kuroda Kumi O. | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Calcitonin receptor signaling in the medial preoptic area enables risk-taking maternal care | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 109204 ~ 109204 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109204 | 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 Tsuneoka Yousuke, Yoshihara Chihiro, Ohnishi Ryuko, Yoshida Sachine, Miyazawa Eri, Yamada Masanobu, Horiguchi Kazuhiko, Young W. Scott, Nishimori Katsuhiko, Kato Tadafumi, Kuroda Kumi O. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Oxytocin Facilitates Allomaternal Behavior under Stress in Laboratory Mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 eneuro | 6. 最初と最後の頁 21.2022 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0405-21.2022 | 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 Katayama Yukitoshi, Saito Ami, Ogoshi Maho, Tsuneoka Yousuke, Mukuda Takao, Azuma Morio, Kusakabe Makoto, Takei Yoshio, Tsukada Takehiro | 4. 巻 388 |
| 2. 論文標題 Gene duplication of C-type natriuretic peptide-4 (CNP4) in teleost lineage elicits subfunctionalization of ancestral CNP | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cell and Tissue Research | 6. 最初と最後の頁 225 ~ 238 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-022-03596-y | 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 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 恒岡洋右, 船戸弘正 |
| 2. 発表標題 Branched HCR法によって明らかになったマウス脳内オレキシン受容体mRNAの分布 |
| 3. 学会等名 日本解剖学会128回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 恒岡洋右, 船戸弘正 |
| 2. 発表標題 高感度超多重ISH法から観る内側視索前野のオス性行動における機能 |
| 3. 学会等名 第48回神経内分泌学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 恒岡洋右 |
| 2. 発表標題 性と経験によって変化するマウス養育行動 |
| 3. 学会等名 第93回日本動物学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|-------------------|------------------------------|
| 産業財産権の名称 自家蛍光消光装置 | 発明者 恒岡洋右, 船戸弘正 | 権利者 恒岡洋右, 船戸弘正, (株)ネッパジーン |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2021-008882 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|-------|--|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 船戸 弘正 (Funato Hiromasa) (90363118) | 東邦大学・医学部・教授 (32661) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|