

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06421

研究課題名（和文）オキシトシン蛍光イメージングにより迫る脳内幸せシグナル動態

研究課題名（英文）Imaging of happy signal in the brain using a novel fluorescent oxytocin sensor

研究代表者

稲生 大輔（Ino, Daisuke）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師（常勤）

研究者番号：40721981

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）：オキシトシンは、幸せホルモンとも呼ばれる脳内物質であり、私たちの豊かな感情や心身の健康に重要な役割を果たしている。しかしながら、生きた動物の脳内において、オキシトシンを感度よく捉えることは既存手法では困難であり、オキシトシンが脳内でどのように働いているかは、謎にまつまれている。今回、我々は、オキシトシンを高感度に検出可能な蛍光センサーを開発することにより生きたマウスの脳内からオキシトシン動態を高感度に計測することを達成した。刺激や行動パターンの種類に依存して脳内オキシトシン濃度は様々な時定数で変動しているなど、既存の計測法では見えてこなかったような新たな知見が明らかになってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した超高感度蛍光オキシトシンセンサーにより、生きた動物の脳内からオキシトシン濃度変化をリアルタイムで計測することを実現できるようになった。本研究では、限られた実験条件下で脳内オキシトシン動態計測を実施したが、オキシトシンと関連が示唆されている生理機能や病態はまだたくさん残されており、今後幅広い研究への応用が期待される。特にオキシトシンは、自閉スペクトラム症や統合失調症といった難治性疾患を治療するための鍵として注目されており、本ツールの活用により病因解明や治療薬開発が大きく前進することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Oxytocin (OT) is a neuropeptide that is also known as the 'happy hormone' or 'love hormone.' It regulates diverse brain functions, from social cognition to emotion to appetite, and is a potential therapeutic agent for many mental illnesses. A better understanding of how OT acts in the brain during a variety of tasks will advance our knowledge of OT-related physiological and pathological processes, and pave the way for the development of novel therapeutics for refractory mental disorders, such as autism spectrum disorders and schizophrenia. We developed an ultrasensitive fluorescent OT sensor, designated MTRIAOT, which is a chimera protein composed of the OT receptor from medaka and an engineered green fluorescent protein-based module. We introduced MTRIAOT to mouse brain and conducted in vivo recording of brain OT dynamics in living mice. Our analysis revealed that the temporal profiles of OT signals were highly variable and depended on the behavioral context of the mouse.

研究分野：神経科学

キーワード：オキシトシン 蛍光イメージング 脳

1. 研究開始当初の背景

我が国において100万人以上もの人々が、うつ病などの幸せの喪失による精神疾患により苦しんでおり、社会問題となっている。しかしながら、根本的な治療法の開発は未だ達成できていない。その大きな原因の一つとして、“幸せ”という情報が脳内のどこで・どのように創り出されているのか？という本分野における核心と言える問題に踏み込めていないという点が挙げられる。さらに、“不幸”とは“幸せ”と対をなす概念であるが、脳内においては幸せシグナルの減少として表現されているのか？それとも全く独立な情報なのか？という点も不明である。もし、脳内における“幸せ”や“不幸”の実体を捉えることができれば、これらの課題を解決するための突破口を開くことができると考えられる。

では、脳内で“幸せ”という感覚は何に起因するのであろうか？これまでに幸せを感じると脳の中では、オキシトシンと呼ばれる“幸せホルモン”が増加することが示唆されてきている。しかしながら、既存手法を用いて、生きた動物の脳内のオキシトシン動態を精度よく計測することは困難である。最も広く使われてきた既存手法の例として、脳脊髄液の分析が挙げられるが、サンプルの回収に時間がかかる上(数十分オーダー)、脳内のどの領域で変化しているかについて、詳細に知ることはできない。よって、オキシトシンの脳内における機能に迫るには、生きた動物の脳の中で、オキシトシンが“いつ”、“どこで”増えているかを高感度に捉える手法が必須であり、その開発が研究分野において強く求められていた。

2. 研究の目的

上記のような分野内における問題点を鑑み、申請者は、脳内オキシトシンを高感度に感知できる蛍光センサーを新規開発し、生きた動物の脳内からオキシトシン信号をリアルタイム計測することに挑戦することにした。

3. 研究の方法

1) 指向性分子進化による超高感度蛍光オキシトシンセンサーの開発

本研究では、遺伝子コード型のタンパク質型蛍光センサーの開発に取り組んだ。まず、センサーの骨格となるタンパク質の選定を行った。6種類の脊椎動物由来のオキシトシン受容体をクローニングし、培養細胞における細胞膜への局在を評価した。結果に示すようにここではメダカ由来のオキシトシン受容体を選定した。続いて、メダカオキシトシン受容体の細胞内ループに円順列変異型緑色蛍光タンパク質(circularly permuted green fluorescent protein: cpGFP)を挿入した。cpGFP挿入部位の最適部位を見出し、プロトタイプ型オキシトシンセンサーを開発した。続いて、プロトタイプ型オキシトシンセンサーに変異を加え、センサー分子に“進化”を施した。プロトタイプ型オキシトシンセンサーのリンカー部位、膜貫通ヘリックス、cpGFP内部配列にそれぞれランダム変異を加え、作製した変異体センサーのスクリーニングを行った。スクリーニングは、培養細胞(HEK293T細胞)に変異体センサーを発現させ、オキシトシンに対する応答性を顕微鏡下で行うことで達成した。

2) 蛍光オキシトシンセンサーのマウス脳への応用と計測

上記で開発した蛍光センサーをマウス脳に導入し、自由行動化のマウスにおける応答を計測した。センサーの遺伝子導入はアデノ随伴ウイルスを用いて行った。ウイルス注入部位に光ファイバーカニューレを留置し、注入部位における蛍光信号測定を行った(ファイバーフォトメトリー法)。様々な条件下におけるマウス脳内オキシトシン応答の計測を行った。

4. 研究成果

1) 超高感度蛍光オキシトシンセンサーMTRIA_{OT}の開発

細胞外オキシトシンの結合により、明るさが大きく変化する蛍光センサーの開発を行った。センサーのデザインとしては、オキシトシン受容体の細胞内ループに cpGFP が挿入されたキメラタンパク質を採用することにした。高感度なオキシトシン感知を達成するには、センサータンパク質の細胞膜への強い局在が重要となってくる。まず 6 種の脊椎動物（ヒト、マウス、ニワトリ、ヘビ、カエル、メダカ）のオキシトシン受容体の細胞膜への局在を解析した。広く生物実験に用いられる培養細胞である HEK293T 細胞に発現させたところ、メダカのオキシトシン受容体をもっとも強い細胞膜局在を示すことが明らかとなった。そこでメダカのオキシトシン受容体をセンサーの骨格として、蛍光センサーの開発を進めることにした。まず最適な cpGFP 挿入部位の決定を行った。メダカのオキシトシン受容体の K240-I268 の間への cpGFP を挿入時に細胞膜局在を保持しつつオキシトシン応答を示すことがわかった。本タンパク質をプロトタイプセンサーとし、ランダム変異を加えることでセンサー感度の進化を試みた。HEK293T 細胞を用いた顕微鏡下でのスクリーニングにより、本スクリーニングを通じ、オキシトシンに対し、最大約 8 倍もの蛍光強度変化を示す超高感度蛍光オキシトシンセンサーMTRIA_{OT}の開発に成功した。

2) ① 自由行動下のマウスにおける脳内オキシトシン動態測定

アデノ随伴ウイルスを用いてマウス脳内に MTRIA_{OT}を導入し、ファイバーフォトメトリー法により行動下のマウスにおける脳内オキシトシン応答を測定した。成体マウスを給餌・給水条件下でケージ内を自由行動させたところ、オキシトシンの一過性情報が約 2 時間周期で振動様に発生することが判明した。われわれはこの現象を“オキシトシン振動 (oxytocin oscillation)”と名付けた。興味深いことにオキシトシン振動は、マウスが食事を行うタイミングと同期していることが明らかとなった。では、オキシトシン振動の発生に食事は必要なのであろうか？ 本問題を検証するために、絶食時にオキシトシン振動への影響が観察されるか否かを解析した。驚くべきことに、絶食後約半日において、脳内オキシトシン応答は消失せず、振動の振幅が大きく変動した。この乱れたオキシトシン応答をわれわれは“オキシトシン乱流 (oxytocin turbulence)”と名付けた。オキシトシン乱流は、再び給餌を行うことで消失し、再び正常なオキシトシン振動が発生することから、オキシトシン乱流は絶食時特異的な脳内信号であることが確認された。興味深いことにオキシトシン乱流発生中のマウスの行動は、心が乱されたようにケージ内を暴れまわることにも明らかとなった。すなわち、脳内のオキシトシン振動の乱れは、空腹による心の乱れをコードする信号となっている可能性が推測される。

2) ② 社会的相互作用刺激時や急性ストレス負荷時の脳内オキシトシン動態測定

上記と同様にマウス脳内に MTRIA_{OT}を導入し、社会的相互作用刺激や急性ストレス負荷時の脳内オキシトシン動態測定を行った。生きたマウスを提示し社会的相互作用刺激を行ったところ分単位でピークに達するようなオキシトシンの増加が観察された。続いて、しっぽをつまんで持ち上げることにより、急性ストレスを負荷した。するとこのような刺激を負荷した場合には、数秒以内にピークに達するような非常に速いオキシトシンの増加が観察された。これらの結果と上記の 2 時間のオキシトシン振動も併せて考えると、脳内においてオキシトシンは刺激の種類や行動パターン依存して様々な時定数で変動しているということになる。このような脳内オキシトシンの信号パターンと生理機能との関連の解明は今後の課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yudai Tanaka, Takuto Nakata, Hiroshi Hibino, Masaaki Nishiyama, Daisuke Ino	4. 巻 18
2. 論文標題 Classification of multiple emotional states from facial expressions in head-fixed mice using a deep learning-based image analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0288930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0288930	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 Daisuke Ino, Yudai Tanaka, Hiroshi Hibino, and Masaaki Nishiyama	4. 巻 19
2. 論文標題 A fluorescent sensor for real-time measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 1286-1294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41592-022-01597-x	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 Qi Zhang, Takeru Ota, Takamasa Yoshida, Daisuke Ino, Mitsuo P Sato, Katsumi Doi, Arata Horii, Fumiaki Nin, Hiroshi Hibino	4. 巻 599
2. 論文標題 Electrochemical properties of the non-excitabile tissue stria vascularis of the mammalian cochlea are sensitive to sounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4497-4516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP281981.	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 Seishiro Sawamura, Genki Ogata, Kai Asai, Olga Razvina, Takeru Ota, Qi Zhang, Sasya Madhurantakam, Koei Akiyama, Daisuke Ino, Sho Kanzaki, Takuro Saiki, Yoshifumi Matsumoto, Masato Moriyama, Yasuo Saijo, Arata Horii, Yasuaki Einaga, Hiroshi Hibino	4. 巻 599
2. 論文標題 Analysis of Pharmacokinetics in the Cochlea of the Inner Ear	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 633505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.633505.	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 Atsuki Kawamura, Yuta Katayama, Wataru Kakegawa, Daisuke Ino, Masaaki Nishiyama, Michisuke Yuzaki, Keiichi I Nakayama	4. 巻 35
2. 論文標題 The autism-associated protein CHD8 is required for cerebellar development and motor function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108932.	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 稲生 大輔
2. 発表標題 可視化により探る 多様な細胞外シグナル動態
3. 学会等名 生理研研究会, シナプス研究会2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔
2. 発表標題 オキシトシンと様々な脳内神経修飾物質のリアルタイム解析を実現する蛍光センサーの開発
3. 学会等名 JPW2022 (第96回 日本薬理学会年会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔
2. 発表標題 A fluorescent sensor for real-time measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回 日本神経科学大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔
2. 発表標題 可視化により見えてきた複雑な脳内オキシトシン動態
3. 学会等名 生理研研究会, 細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔, 日比野 浩, 西山 正章
2. 発表標題 脳内細胞外シグナルのリアルタイム測定を実現する蛍光センサーの開発と応用
3. 学会等名 細胞の局所コミュニティ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔, 日比野 浩
2. 発表標題 Development of Fluorescent Sensors for Real-Time Measurement of Extracellular Oxytocin Dynamics in the Brain
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲生 大輔
2. 発表標題 細胞外シグナル動態をとらえる 蛍光センサーの開発
3. 学会等名 第5回形態解析ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲生 大輔
2. 発表標題 細胞外シグナル動態をとらえる 蛍光センサーの開発
3. 学会等名 第90回Blood Vessel Club (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 雄大, 中田 卓人, 日比野 浩, 西山 正章, 稲生 大輔
2. 発表標題 深層学習によるマウスの表情解析ツールの開発
3. 学会等名 生理研研究会 細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲生大輔
2. 発表標題 細胞外シグナル動態をライブ解析するための新規蛍光センサー開発
3. 学会等名 第101回 日本生理学大会
4. 発表年 2024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
---------	---------