

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590229

研究課題名(和文) 視床下部神経ペプチドによるげっ歯類性社会行動の調節機構

研究課題名(英文) Neuropeptidergic regulation of sociosexual behavior in rodents

研究代表者

近藤 保彦 (Kondo, Yasuhiko)

帝京科学大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：00192584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：動物は、なわばりの維持、パートナーの選択と、さまざまな他個体との相互交渉を行いながら個の保存、主の保存を実現している。これらの社会行動は、嗅覚を中心とした社会信号が視床下部に送られ制御されているが、最近の研究でとくに神経ペプチドであるオキシトシンが重要な役割を果たしていることが分かってきた。我々は、この研究でオキシトシン欠損マウスが異性の匂いに対する選好性を失っていること、また、特に雌マウスでは初めての交尾時に雄をなかなか受け入れられないことを発見した。さらにラットを使った実験では、母親が仔ラットの匂いに惹きつけられるのにもオキシトシンが重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The social behavior in rodents is regulated by the hypothalamus through sensory signals from chemosensory organs. In the hypothalamus, a neuropeptide, oxytocin, has been shown to mediate the regulation of social behavior. In this study, we examine sociosexual behavior in mice deficient for oxytocin gene (OTKO mice). Alternative choice test for conspecific odors revealed that OTKO mice showed a lack of preference for opposite-sex odor. In addition, OTKO deteriorated accept of male mouse in sexually naive females, while OTKO did not affect male sexual behavior. We also tested for olfactory preference in female rats for pup odors. The experiment demonstrated that lower responsiveness to pup in virgin females than that of multiparous females was due to lower responsiveness of oxytocin neurons. Administration of oxytocin modified olfactory preference for pup in virgin females.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：視床下部室傍核 視索前野 扁桃体内側核 母性行動 嗅覚選好性 性行動 オキシトシン げっ歯類

1. 研究開始当初の背景

「引きこもり」や「キレる若者」など、思春期における対人関係の不応は、日本においても重要な社会問題と化している。現在のところ、これらの成因について確定的なことは不明であるが、最も高い可能性として生育環境が挙げられるだろう。発達初期の生育環境が脳の不可逆的な変化を引き起こすことは、最近の分子生物学的研究、とくにエピジェネティクスの研究などによって明らかにされてきた。我々の研究でも、思春期前の豊かな環境や社会的な刺激に乏しい環境が、その後の情動性や社会行動に強く影響することを示唆する結果が得られつつある。そのような環境要因は、それと同時に脳内の神経伝達物質や受容体の発現動態にも恒久的な変化を及ぼすことが分かってきた。しかし、社会行動を調節する神経メカニズムは、近年、ようやく始まったばかりであり、いまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

今回、我々が焦点を当てた視床下部神経ペプチドは、動物の社会行動、性行動、情動行動を調節する重要な因子として近年、特に注目されるようになった。特にオキシトシンとバソプレッシンは、嗅覚系に密な投射を持ち、社会的信号の処理を制御していると考えられている。また、視床下部外側野にあるオレキシンは、動物の覚醒水準を調節することによって行動の始動を制御すると考えられる。本研究では、これらの仮説を検証し、さらに社会行動神経制御におけるオキシトシン・バソプレッシン神経とオレキシン神経の相互作用について実験的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 性行動におけるオレキシンニューロンの役割

オレキシンニューロンは、視床下部外側野に局在するが、その軸索は脳内に後半に投射を持つ。我々は、特に性行動と関連が深い分界条床核 (BnST) および内側視索前野 (mPOA) へのオレキシン投射が性行動にどのような影響を及ぼしているのかを調べるため、これらの領域にオレキシン-サポリン結合体 (Orex-Sap) を投与して、オレキシン受容体陽性細胞を特異的に破壊した。

実験群は、注射部位 (BnST または mPOA) と投与薬 (生理食塩水 saline または Orex-Sap) の 2 x 2 の 4 群とした。Long-Evans 系ラットにあらかじめ十分に性行動経験を与え、性行動レベルが等しくなるようこれら 4 群に振り分けた。注射は、動物を麻酔した後、脳定位固定装置に据え付け、ハミルトンシリンジとマイクロインジェクターによって行った。性行動終了後、すべての動物は灌流固定によって屠殺し、脳の薄切切片を作成し、NeuN 免疫組織化学によって破壊部位を同定した。

(2) オキシトシン KO マウスの性社会行動

オキシトシンは、上述したようにさまざまな社会行動神経制御に重要な役割を果たしていることが示唆されてきたが、オキシトシン遺伝子を欠損させた (OTKO) マウスは、正常に繁殖ができることが知られている (交尾・出産ができるが、子育て・授乳ができない)。そこで本研究では、交尾に先立ち、嗅覚刺激によって相手に引き寄せられる原因となる嗅覚選好性を調べることにした。嗅覚選好性では、異性および同性の個体の匂いを同時提示し、どちらの匂いを多く探索するかを測定した。

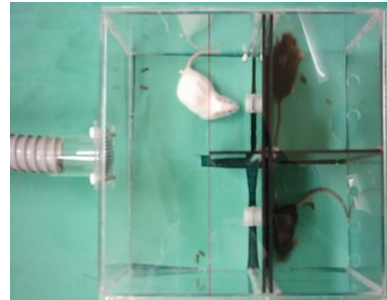


図1 嗅覚選好性テスト

また、交尾テストでは、より複雑な行動が発現しうるように広いケージにさまざまなオブジェクトを配置した準自然環境を設定し、その中で異性と一緒にした際の行動を観察した。被験体は、雌雄の OTKO マウスおよび野生型マウスを使用、刺激動物としては C57BL/6J を用いた。

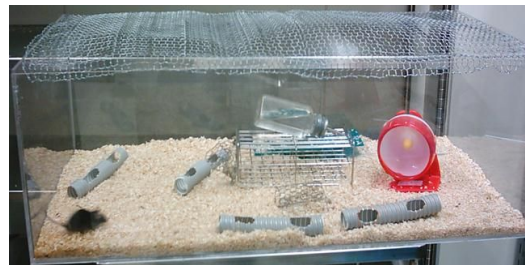


図2 実験に用いた準自然環境交尾テスト

(3) 雌ラットの仔ラットに対する嗅覚選好性

授乳中母ラットは、仔ラットの匂いに惹かれ、その結果、熱心な子育て行動を示す。我々は、出産子育て経験を持たない雌ラットや経験持つが子育て中ではない雌ラットが仔ラットの匂いに対して選好性を持つかを検討した。観察ケージに仔ラットを入れた容器を置き、未経験ラット、経験ラット、そして授乳中ラットがその容器に対して示す探索時間を測定した。また、嗅覚テスト後、実際に仔ラットを直にケージに入れ、仔集め行動など母性行動の発現を観察し、その後、仔ラットと1晩同居させた。この手続きを8日間繰り返し、最後に仔ラットの匂い提示後に灌流屠殺し、オキシトシンおよびバソプレッシンニューロンの活性化を cFos 免疫組織化学によって調べた。



図3 仔ラットに対する探索行動

(4) 未経験ラットのオキシトシン脳室内投与が仔ラットの匂いに対する選好性に及ぼす影響

出産子育て経験を持たない雌ラットの側脳室内に留置カニューレを設置し、浸透圧身にポンプによってオキシトシンまたはsalineを慢性投与した。その間、実験(3)と同様に仔ラットの嗅覚選好性テストと母性行動テストを8日間繰り返した。

4. 研究成果

(1) 性行動におけるオレキシンニューロンの役割

まず、BnST破壊から報告する。saline群ではマウント回数、イントロミッション回数とも術前と術後でほとんど変わらなかったのに対し、Orex-Sap群は術前より術後の方が増加した。しかしながら、いずれの間にも統計的な有意差は得られなかった(繰り返しありの2元配置ANOVA)。これに対し、射精潜時については、saline群でやはり術前、術後でほとんど変化しなかったのに対し、Orex-Sap群の術後では射精がほとんど見られず、潜時は最大値である3600秒となり、BnSTのOrex-Sap破壊によって有意に増加することが分かった。

一方、mPOA破壊では、saline群に比べマウントにはほとんど影響が見られなかったが、イントロミッション潜時、射精潜時は有意に増加することが分かった。

これらのことから、視床下部外側野オレキシンニューロンは、BnSTおよびmPOAに投射し、勃起や射精を調節していることが示唆された。

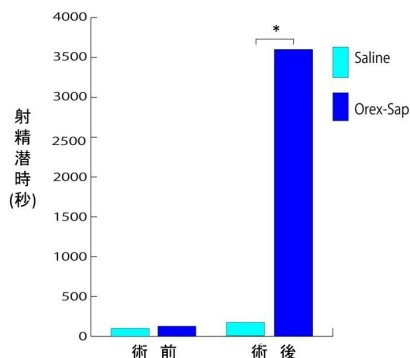


図4 Orex-SapによるBnST破壊の効果

(2) オキシトシンKOマウスの性社会行動

正常な(野生型)マウスの嗅覚選好性は、同性よりも異性の匂いに対して有意に長い探索行動を示した。それに対し、OTKOマウスでは、雌雄とも異性と同性の匂いに同等の興味を示し、嗅覚選好性を全く示さないことが分かった。

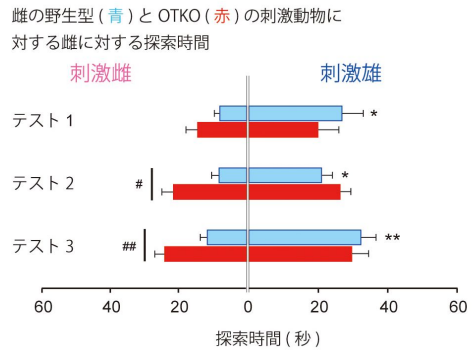
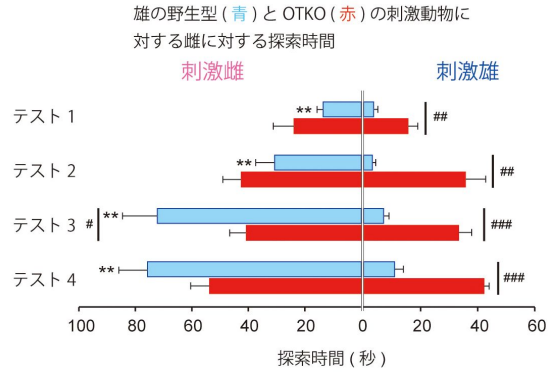


図5 OTKOマウスの嗅覚選好性テスト結果

一方、OTKO雄マウスの性行動は、野生型と比べてまったく遜色なく、活発な性行動を示したのに対し、OTKO雌マウスは初めて性的に成熟した雄マウスに出会った時、なかなか性行動を開始せず、野生型雌マウスに比べて有意に長く時間がかかることが分かった。

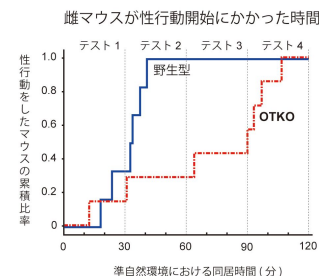
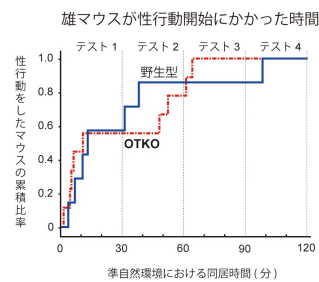


図6 OTKOマウスが性行動開始に要した時間

(3) 雌ラットの仔ラットに対する嗅覚選好性

授乳中雌ラットは、初日から仔ラットの匂いに対して強い関心を示し、長い探索時間を示した。仔の探索時間は、8日間のテスト期間の間、ずっと維持された。また、出産子育て経験を持つ雌ラットも同様で、8日間、仔ラットの匂いに対する選好性を維持し続けた。それに対し、子育て経験を持たないラットでは、最初の数日間は仔ラットの匂いに興味を持つものの、その後、仔ラットの匂いにはほとんど興味を失ってしまった。これらの期間中、母性行動の観察も行ったが、授乳中の雌ラットは仔ラットの存在にすぐに反応して子育てを開始したのに対し、経験ラットは子育て行動を開始するまで数日間を要し、さらに未経験ラットでは1週間を要した(未経験ラットでは、8日目嗅覚選好性を示していなかったにもかかわらず、母性行動は行った)。

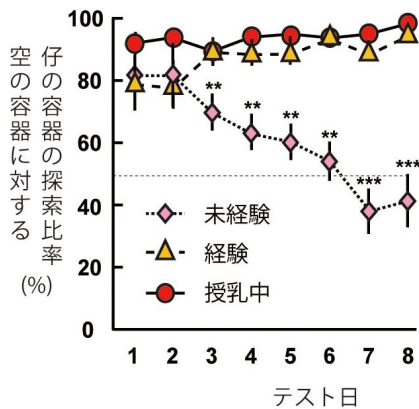


図7 雌ラットの仔ラットに対する探索時間

これらのラットに仔ラットの匂いを提示し、視床下部ニューロンの活性化を調べたところ、パソプレッシンニューロンの活性化には全く差がなかった。また、オキシトシンニューロンでは、視索上核では差が見られなかったものの、室傍核では経験ラットと授乳中ラットのオキシトシンニューロンが有意に活性化したのに対し、未経験ラットでは何も提示しなかった条件に比べまったく活性化の増加は観察されなかった。これは嗅覚選好性の行動パターンとぴったりと一致することが分かった。

(4) 未経験ラットのオキシトシン脳室内投与が仔ラットの匂いに対する選好性に及ぼす影響

Saline 投与された雌は、実験(3)と同様に数日以内に仔ラット臭に対する嗅覚選好性を失いつつも8日後には母性行動を示すようになった。一方、オキシトシンを脳室内投与された未経験雌ラットは、8日間、仔ラットの匂いに対して嗅覚選好性を維持し続け、さらに母性行動も経験ラットのように速やかに示すようになった。

これらのことから、授乳中ラットや出産・

子育て経験雌ラットが仔ラット刺激に対して強い反応性を示すのは、視床下部室傍核のオキシトシンニューロンが反応性を獲得するためであると結論することができた。

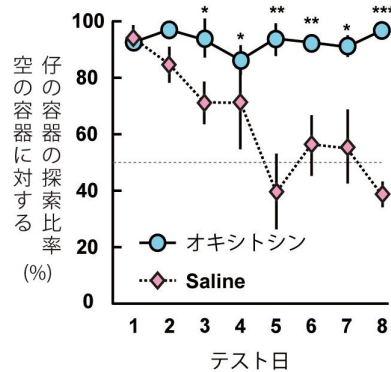


図8 未経験雌へのオキシトシン投与の効果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Orikasa, C., Kondo, Y., Usui, S. and Sakuma, Y. Similar numbers of neurons are generated in the male and female rat preoptic area in utero. *Neuroscience Research* 68: 9-14, 2010.

Dhungel, S., Urakawa, S., Kondo, Y. and Sakuma, Y. Olfactory preference in the male rat depends on multiple chemosensory inputs converging on the preoptic area. *Hormones and Behavior* 59: 193-199, 2011.

Dhungel, S., Masaoka, M., Rai, D., Kondo, Y. and Sakuma, Y. Both olfactory epithelial and vomeronasal inputs are essential for activation of the medial amygdala and preoptic neurons of male rats. *Neuroscience* 199: 225-234, 2011.

Urakawa, S., Mitsushima, D., Shimozuru, M., Sakuma, Y. and Kondo, Y. An enriched rearing environment calms adult male rat sexual activity: implication for distinct serotonergic and hormonal responses to females. *PLoS One* 9: e87911, 2014.

[学会発表](計20件)

ドゥンゲル スニル・近藤保彦・佐久間康夫. Cross-talking between olfactory epithelium and vomeronasal inputs in the rat nervous system. 第87回日本生理学会大会発表(盛岡), 2010.

ライ ディリップ・加藤百合子・近藤保彦・佐久間康夫. Destruction of orexin-innervating neurons in the preoptic area impairs copulatory behavior but not sexual preference in the male rat. 第87回日本生理学会大会発表(盛岡), 2010.

加藤百合子・上原直樹・ライ ディリップ・近藤保彦・佐久間康夫. 雄ラット性行動に

おける分界条床核オレキシン受容体陽性細胞破壊の効果. 第 87 回日本生理学会大会発表 (盛岡), 2010.

二神弘子・岡田翔真・近藤保彦・佐久間康夫. 雄ラットの性行動後に見られる痛覚閾値の上昇と脳内オキシトシン. 第 87 回日本生理学会大会発表 (盛岡), 2010.

棟朝亜理紗・近藤保彦・宮本武典・佐久間康夫. 出産経験は仔ラットの匂いに対する室傍核オキシトシンニューロンの反応性を変化させる. 第 37 回日本神経内分泌学会大会発表(京都), 2010.

Dhungel, S., Kondo, Y. and Sakuma, Y. Convergence of olfactory signals regulating sexual preference on the preoptic area of male rats. The 7th International Congress of Neuroendocrinology (Rouen, France), 2010.

Munetomo, A., Kondo, Y., Miyamoto, T. and Sakuma, Y. Differential responses of oxytocin and vasopressin neurons to pup odors in virgin and multiparous rats. The 7th International Congress of Neuroendocrinology (Rouen, France), 2010.

棟朝亜理紗・近藤保彦・宮本武典・佐久間康夫. 出産・育児経験によるオキシトシン・ニューロンの反応性と行動の変化. 第 15 回日本行動神経内分泌研究会・第 15 回鋤鼻研究会合同大会(八王子), 2011.

ライ ディリップ・ドゥンゲル スニル・西森克彦・近藤保彦・佐久間康夫. Oxytocin regulates social interaction antecedent to sexual behavior of male and female mice. 第 34 回日本神経科学学会大会発表 (横浜), 2011.

棟朝亜理紗・近藤保彦・宮本武典・佐久間康夫. 出産育児経験により獲得される仔ラットの匂いに対するオキシトシンニューロンの反応性. 第 38 回日本神経内分泌学会大会発表(東京), 2011.

Munetomo, A., Kondo, Y., Miyamoto, T. and Sakuma, Y. Oxytocin is required for acquisition of odor preference in the female rat toward pups. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience (Florence, Italy), 2011.

Munetomo, A., Kondo, Y., Miyamoto, T. and Sakuma, Y. Pup exposure in virgin females is insufficient to be maternal: Parturition and parenting experience forms oxytocin responsiveness to pups. The first Asia-Pacific Conference on Integrative Behavioral Science (APCIB) with Sino-Japan Integrative Symposium on Behavior and its Neuro-Mechanisms (Xi ' an, China), 2011.

折笠千登世・碓井澄子・近藤保彦・佐久間康夫. ラット脳内視索前野性的二型核および

分界条床核 2 領域の神経核発生時期の検討. 第 89 回日本生理学会大会発表 (松本), 2012.

ライ ディリップ・ドゥンゲル スニル・西森克彦・佐久間康夫・近藤保彦. Oxytocin is essential for odor preference but differentially influences the sexual interaction in male and female mice. 第 89 回日本生理学会大会発表 (松本), 2012.

近藤保彦. げっ歯類における嗅覚選好性とその神経調節機序. 伊香保 BS の会・第 2 回多分野交流会 (群馬大学), 2012.

徳丸祐一・南愛梨・近藤保彦. ラットの性行動および嗅覚選好性神経調節における分界条の役割. 第 17 回日本行動神経内分泌研究会(関西セミナーハウス), 2012

遠藤知子・渡辺亜香沙・近藤保彦. ラット脳の性分化におけるアンドロゲン受容体の機能再評価. 第 17 回日本行動神経内分泌研究会(関西セミナーハウス), 2012

棟朝亜理紗・石井寛高・宮本武典・佐久間康夫・近藤保彦. 出産・育児経験による仔に対する嗅覚選好性と脳内オキシトシン系の反応性の変化. 第 17 回日本行動神経内分泌研究会(関西セミナーハウス), 2012.

棟朝亜理紗・石井寛高・佐久間康夫・近藤保彦. 出産・育児経験により獲得される仔に対する嗅覚選好性と脳内オキシトシン系の反応性. 第 39 回日本神経内分泌学会学術集会(北九州国際会議場), 2012.

折笠千登世・永岡謙太郎・近藤保彦・佐久間康夫. 性的未経験雄マウスにおける養育行動. 日本動物心理学会第 73 回大会(筑波大学), 2013.

[図書] (計 1 件)

近藤保彦. オスの性を科学する. 性をめぐる生物学 ネズミから学ぶ(斎藤徹編著) アドスリー, 37-82, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤保彦 (Kondo, Yasuhiko)

研究者番号 : 00192584

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :