

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号： 32202

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2010～2011

課題番号： 22659050

研究課題名（和文） 社会行動を担う神経基盤の形成：幼若期オキシトシンの働き

研究課題名（英文） Effects of oxytocin during the neonatal period on the development of the neural basis of social behavior.

研究代表者

高柳 友紀（TAKAYANAGI YUKI）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号： 10418890

研究成果の概要（和文）：

オキシトシンシステムを時期あるいは部位特異的に抑制し、その行動に与える影響を検討するため、オキシトシン産生ニューロン特異的にヒトジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックラットを作製した。トランスジーンの子孫細胞系への伝達のみられ、オキシトシン産生ニューロン特異的にヒトジフテリア毒素を発現する 6 ラインを樹立した。

一方で、幼若期のオキシトシン受容体活性化の影響を見るため、仔マウスに生後 5 日間オキシトシンを投与し、成熟後の社会行動、情動行動、うつ関連行動について網羅的に検討を行ったが、予想に反して差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

To examine effects of time- or site-specific inhibition of oxytocin system upon social behaviors, we generated transgenic rats expressing human diphtheria toxin receptor under the control of the oxytocin promoter. We screened for germ-line transmission of the transgene and established six lines of transgenic rats expressing human diphtheria toxin receptor in oxytocin-synthesizing neurons.

On the other hand, to examine effects of the activation of oxytocin receptor during the neonatal period upon social behaviors in adulthood, we injected mice with oxytocin over the first five postnatal days. Contrary to our expectations, social, emotional and depression-related behaviors in adulthood of oxytocin-injected mice were not significantly different from control mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

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：オキシトシン、社会行動、情動行動、母子愛着、幼若期、ジフテリア毒素受容体、トランスジェニックラット

1. 研究開始当初の背景

幼若期の経験によって、成熟後の情動性と社会行動が大きく修飾されることが知られている。しかし、このメカニズムは明らかではない。

我々はこれまでに、オキシトシン受容体遺伝子欠損マウスの母性行動が低下していることを明らかにした。しかし、母性行動を既に示している動物にオキシトシン受容体アンタゴニストを投与しても母性行動は阻害されない。これらのデータは、仔を出産して母性行動が発現するより以前にオキシトシン受容体が活性化されることが、正常な母性行動の表出に必要であることを示唆している。一方で、母性行動は、幼若期に母親から受けた愛着行動に強く影響を受けることが知られている。

我々は、ヒトの母乳にオキシトシンが多く含まれていることを見出している。新生児期は消化機能が未発達で、血液脳関門が未熟であるため、母乳中のオキシトシンが仔の脳に移行してオキシトシン受容体を活性化する可能性が考えられる。また、皮膚表面のマッサージにより視床下部のオキシトシン産生ニューロンが活性化されることが報告されており、母親が仔の体をなめることにより仔のオキシトシン産生ニューロンが活性化されオキシトシンが放出される可能性がある。さらに、我々は、仔を母親と隔離して仔に求愛行動を誘発させたときに、仔の視索上核のオキシトシン産生ニューロンの神経活動が亢進する傾向を確認している。また、仔にオキシトシン受容体アンタゴニストを投与すると、成熟後の社会行動と情動行動が修飾される傾向を認めている。これらのデータは、幼若期の母仔愛着行動時に仔のオキシトシン受容体が活性化され、これが成熟後の行動に影響を与えている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では幼若期に母から愛着行動を受けることにより仔のオキシトシン産生ニューロンが活性化され、その結果、仔の将来の社会行動が規定されるという仮説の検証を行うことを目的とした。

そのため、オキシトシン産生ニューロンを

特異的に破壊できるラットを用い、時期あるいは部位特異的にオキシトシン／オキシトシン受容体システムの抑制を行い、その効果を検討することを目指した。

一方で、幼若期にオキシトシンを投与し、幼若期のオキシトシン受容体活性化の成熟後の行動における影響を検討することを目指した。

3. 研究の方法

(1)ヒトはジフテリア毒素感受性であるが、マウス、ラットでは受容体と毒素の結合力がヒトの1,000分の1と低く、ジフテリア毒素に対する感受性が極めて低い。本研究ではこのシステムを利用して、時期・部位特異的にオキシトシン産生細胞を破壊することを可能にするため、ラットのオキシトシン産生細胞特異的にヒトジフテリア毒素受容体を発現させたトランスジェニックラットを作製した。

トランスジーンのコストラクトには、ラットオキシトシン遺伝子を含むバクテリア人工染色体 (BAC) クローンを用い、近傍に存在するバゾプレッシン遺伝子については体内で過剰発現になることを防ぐために取り除いた。この様に改変したBACクローンのオキシトシン遺伝子座に、ヒトジフテリア毒素受容体と、その下流に自己開裂ペプチドである2Aペプチドでつないだ蛍光タンパク質

(YFP)を導入し、トランスジーンコストラクトとした。

このコストラクトをマイクロインジェクション法により導入したラットの受精卵から産仔を得て、サザンブロット解析による遺伝子型決定を行い、コストラクトがゲノムに組み込まれたファウンダーを同定した。ファウンダーを同系統(Wistar)の野生型ラットと交配し、得られた産仔の遺伝子型を決定し、トランスジーン生殖細胞系列への伝達を確認した。

ここで得たトランスジェニックラットに対して、オキシトシンとYFPの二重免疫組織化学法を行い、オキシトシン産生ニューロン特異的なヒトジフテリア毒素受容体の発現を確認した。これらによって、トランスジェニックラット系統を樹立した。

(2)幼若期のオキシトシン投与が成熟後の社会行動に与える影響を検討するため、生後5日間オキシトシンを連続投与したマウスについて、成熟後に社会行動(社会的相互作用テスト、社会認識テスト、チューブテスト)、情動行動(オープンフィールドテスト、高架十字迷路テスト、明暗箱テスト)、うつ関連行動(強制水泳テスト、尾懸垂テスト)のテストを網羅的に行った。

4. 研究成果

(1)オキシトシン産生ニューロン特異的ヒトジフテリア毒素受容体トランスジェニックラットの作製を行った。トランスジーンの生殖細胞系列への伝達が見られる7ラインを得て、それぞれに対してオキシトシンとYFPの二重免疫組織化学染色を行い、6ラインにおいて分界条床核、視床下部室傍核、視索上核のオキシトシン産生ニューロンにYFPが共局在していることを確認した。よって、これらのラットではヒトジフテリア毒素受容体がオキシトシン産生ニューロンに限局して発現している可能性が強く示唆された。

(2)仔マウスに生後5日間オキシトシンを投与し、成熟後の行動について網羅的な検討を行った。社会行動、情動行動、うつ関連行動について、予想に反して、幼若期にオキシトシンを投与することによる差は雌雄共に認められなかった。以前行った結果では、仔に対してオキシトシン受容体アンタゴニストを投与すると成熟後の社会行動と情動行動が修飾されたが、それとは矛盾する結果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M: Roles of oxytocin neurones in the control of stress, energy metabolism, and social behaviour. *J Neuroendocrinol* **24**: 587-598, 2012. 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2826.2012.02300.x.
- ② Takayanagi Y, Onaka T: Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control

of stress and food intake. *FEBS J* **277**: 4998-5005, 2010. 査読有
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07932.x.

- ③ Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T: Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* **396**: 703-708, 2010. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.165

[学会発表] (計11件)

- ① 尾仲達史: 摂食とストレスと社会記憶におけるオキシトシンの働き. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012年3月28日, 山梨大学甲府キャンパス(山梨県)
- ② Wang Y: Roles of the medial amygdala in the control of social behaviour in mice. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ③ Onaka T: Roles of oxytocin in the control of social recognition. 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Protein, 2011年8月3日, Beijing International Convention Center (Beijing, China)
- ④ Ludwig M: Recognising 'Significant Others' by Smell; the Role of Vasopressin in the Olfactory System. 9th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH2011), 2011年7月30日, Northeastern University (Boston, USA)
- ⑤ Takayanagi Y: Roles of Oxytocin in the Control of Social Recognition Following Secretin Administration. 9th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH 2011), 2011年7月30日, Northeastern University (Boston, USA)
- ⑥ 尾仲達史: ストレス、摂食、そして社会行動: オキシトシン、バゾプレシンの働き. 第15回日本行動神経内分泌研究会・第15回鋤鼻研究会合同集会, 2011年7月1日,

八王子セミナーハウス（東京都）

- ⑦ 高柳友紀：PrRPによる摂食とストレスの調節. 第88回日本生理学会大会, 2011年3月29日, Journal of Physiological Sciences (61: Suppl. 1, 2011) 誌上開催
- ⑧ 尾仲達史：下垂体後葉ホルモンと情動、社会行動. 第88回日本生理学会大会, 2011年3月30日, Journal of Physiological Sciences (61: Suppl. 1, 2011) 誌上開催
- ⑨ 高柳友紀：セクレチンはオキシトシン受容体の活性化を介して社会行動を促進する. 第33回日本神経科学大会, 2010年9月4日, 神戸コンベンションセンター（兵庫）
- ⑩ 高島明秀：マウスの社会認識行動におけるセクレチンとオキシトシンの役割. 第87回日本生理学会大会, 2010年5月20日, 盛岡市民文化ホール・いわて県民情報交流センター（岩手）
- ⑪ 高柳友紀：下垂体後葉ホルモンとストレス・社会行動：バゾプレシン発現ニューロン選択的破壊法による解析. 第87回日本生理学会大会, 2010年5月20日, 盛岡市民文化ホール・いわて県民情報交流センター（岩手）

6. 研究組織

(1)研究代表者

高柳 友紀 (TAKAYANAGI YUKI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：10418890

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし