

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240057

研究課題名(和文) エストロゲンによる社会行動制御の神経機構

研究課題名(英文) Neural Mechanism of the Regulation of Social Behavior by Estrogen

## 研究代表者

小川 園子 (OGAWA, Sonoko)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号：50396610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,600,000円

研究成果の概要(和文)：社会行動の制御に中心的役割を果たすエストロゲンの脳内作用機構について、1)性特異性(行動の性差の基盤)と類似性、2)時期特異性(発達の各段階に特徴的な行動発現の基盤)と連続性、3)脳領域特異性(機能・表現型の異なる行動の表出を司る神経回路基盤)に着目し、遺伝子改変マウスや脳部位特異的に遺伝子発現をノックダウンしたマウスでの行動解析と神経組織・分子生物学解析を行うことにより、社会行動の神経基盤の解明を目指した。その結果、内側扁桃体、内側視索前野、視床下部腹内側核、背側縫線核に局在するエストロゲン受容体アルファ、ベータが、雌雄のマウスの性、攻撃、社会的不安行動の制御に果たす役割が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Estrogen plays a central role in the regulation of social behavior. We aimed to elucidate neurobiological basis of social behavior by focusing on neural mechanisms of 1) sex-specific, 2) time-dependent, and 3) brain site-specific action of estrogen. For this purpose, we performed behavioral, neuroanatomical and molecular biological analyses in global knockout and brain site-specific knockdown mice of two types of estrogen receptors. We have found that estrogen receptor alpha and beta in the medial amygdala, medial preoptic area, hypothalamic ventromedial nucleus, and dorsal raphe nucleus might have differential roles in the regulation of sexual, aggressive behavior and social anxiety levels in male and female mice.

研究分野：神経科学・行動神経内分泌学

キーワード：エストロゲン受容体 性差 社会認知 情動性 攻撃行動 扁桃体 視床下部

## 1. 研究開始当初の背景

高度情報化、多様化が進む現代社会では、人間同士のコミュニケーションが希薄化し、周囲の人々との行動的、情動的関係を正常に保つことができないことに起因すると考えられる多くの問題が顕在化してきている。個体(人)間の関係性は、ヒトを含め種を越えて認められる根幹的な生物現象であり、それを支える個体間行動である「社会行動」の神経生物学的基盤を理解することは極めて重要である。社会行動の神経基盤については、様々な観点からの研究が行われているが、我々はこれまで、ホルモンによる社会行動の発現の制御・調節について、実験室マウスを用いた行動解析を中心とした解析を進めてきた。なかでも、アンドロゲン、エストロゲンといった性ステロイドホルモンは、転写制御因子として働く核内受容体への結合を介して、様々な遺伝子の発現を制御し(genomic action)、最終的な行動表出をコントロールしていることが知られている。さらに、雄性ステロイドホルモンのアンドロゲンの一種であるテストステロンは、脳内で酵素アロマターゼによりエストラジオールに代謝変換されることから、雌雄の社会行動の制御において、エストロゲン受容体が重要な役割を果たしていると言える。以上のことから、エストロゲンの脳内作用機構について、1)性特異性(行動の性差の基盤)と類似性、2)時期特異性(発達の各段階に特徴的な行動発現の基盤)と連続性、3)脳領域特異性(機能・表現型の異なる行動の表出を司る神経回路基盤)に着目して解析することにより、社会行動の神経基盤の理解に貢献することが望まれた。

## 2. 研究の目的

個体の一生においては、各発達段階に応じてホルモンレベル変動とそれに呼応する脳内ホルモン受容体の発現が見られ、受容体に結合したホルモン作用は、脳構造の構築(organizational action)や脳の生理学的、生化学的機能の調節(activational action)に関わるこ

とにより、様々な機能・表現型を持つ社会行動の性特異的、時期特異的な表出を制御していると考えられる。本研究の主要目的はこの様な脳内ホルモン(ホルモン、受容体、及び転写制御産物を含む)機構と社会行動との関係を、以下に述べる具体的な研究課題の推進を通して明らかにすることであった。

### (1) 社会行動の新規測定法の確立と社会性テストバッテリーの構築

マウスの本来持つ特性を考慮し、社会行動の表出・変容の様相をより定量的、継続的に測定することのできる新たな行動測定パラダイム(社会的嗜好性テスト、社会的探索・記憶・認知行動テスト)を開発し、従来から用いられている各種行動テストを合わせて社会性テストバッテリーを確立する。

### (2) 思春期におけるステロイドホルモン作用による後の社会行動の制御の脳内機序

発達初期から思春期に至る時期での性ステロイドホルモンの organizational action は、その後の社会行動のレベルや質の決定に極めて重要である。ウイルスを用いた脳部位特異的遺伝子発現操作法を用いて、その神経組織基盤及び脳内分子機構を明らかにする。

### (3) 思春期や成体期における社会行動の発動や維持を支える情動・認知機構

発達初期に構築される組織構造を基盤とした、社会行動の発動(onset)や、その維持(maintenance)には、個体の情動、不安、ストレス耐性、嗜好性や、認知、記憶が深く関わっている。これらの制御には、脳内での局在の異なる2種のエストロゲン受容体、ER- $\alpha$ とER- $\beta$ の役割分担があると考えられることから、各々が脳領域特異的に担う転写制御による行動調節について明らかにする。

### (4) 生育環境が後の社会行動の表出に及ぼす影響とその神経組織基盤

社会行動の発現は、発達初期の生育環境や経験により変容することが予測されるため、社会行動を修飾するこれらの要因と脳内ホルモン機

構との関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 社会行動を主軸とした行動解析の方法

本研究では、すでに標準化・汎用化されている情動、不安関連行動(既存のオープンフィールド、明暗箱往来、ゼロ迷路テスト装置を使用)、攻撃・性行動(テスト中に観察される行動を本研究室で開発したデジタルイベントレコーダープログラム(Recordial1.0b)を用いてヒューマンカウントにより記録、分析)に加えて、あらたに本研究推進を通して確立した3種の社会行動テスト(長期社会的選好性測定、社会的探索・記憶・認知行動測定、ホームケージ内活動性・ソーシャルインターアクション測定)を用いた。

#### (2) 社会行動制御の神経基盤の解析に用いた動物モデル

本研究では、既存のエストロゲン受容体(ER)関連、およびオキシトシン(OT)関連の遺伝子改変マウスを用いた。前者としては、ER- $\alpha$ とER- $\beta$ 、アロマテース遺伝子欠損マウスに加え、ER- $\alpha$ を標識したトランスジェニック(Tg)マウス等を、後者としては、OT および OT 受容体欠損と OT 受容体を標識した Tg マウスを使用した。

#### (3) 脳部位特異的なエストロゲン受容体遺伝子発現の操作

本研究室においてすでに確立しているアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた RNA 干渉法(Musatov, et al., PNAS, 2006; 2007)を使って、脳部位特異的な ER- $\alpha$ と ER- $\beta$ の遺伝子発現のノックダウン(投与の1週間後からほぼ永久的に遺伝子発現の抑制を引き起こすことが可能)を行ない、社会行動やその基盤となる下流遺伝子発現の変化を解析した。

#### (4) 神経組織学、分子生物学的解析

研究分担者の塚原との共同研究により、免疫組織染色法、in situ hybridization 法、PCR 法を用いて、ステロイドホルモンによる脳内物質の制御の様相を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 社会行動の表出・変化の様相の包括的な測

定を可能にする社会行動テストバッテリーを確立し、ER- $\alpha$ 、ER- $\beta$ 、OT、OTR 遺伝子欠損マウスおよび新生仔期や思春期に親仔関係あるいは社会的経験を剥奪したマウスに適用した。その結果、ER- $\beta$ 、OT、OTR 遺伝子欠損により、社会的場面での不安傾向が高まり、他者との関係性形成の障害に繋がる可能性が示唆された。

(2) 成体雄マウスの性行動、攻撃行動の表出において、思春期に上昇するテストステロンが重要な役割を果たしていることが知られているが、我々はその脳内メカニズムの一端を明らかにすることができた。すなわち、思春期前に内側扁桃体においてのみ、ER- $\alpha$ の遺伝子発現を RNA 干渉法により抑制すると、成体になってからの性行動と攻撃行動のレベルが大きく低下した。さらに、その神経基盤の解明に向けて解析を進めたところ、雄マウスの内側扁桃体の神経細胞数が減少していることが明らかとなった。従って、情動性や社会認知に中心的な役割を果たしている扁桃体が思春期にテストステロンの作用により正常に発達することが、後の社会行動の表出に不可欠であり、その基盤には、テストステロンがエストラジオールに変換され(芳香化)、ER- $\alpha$ を介して働くことが重要であると結論された。一方、性成熟後に、内側扁桃体でER- $\alpha$ を欠損させた場合には、性・攻撃行動には影響が見られなかったが、内側視索前野での ER- $\alpha$ 欠損は性行動の低下、視床下部腹内側核での欠損は、性・攻撃行動の低下を引き起こしたことから、雄の社会行動制御における ER- $\alpha$ の時期特異的、脳部位特異的な役割が明らかとなった。

(3) エストロゲンによる社会行動制御に果たす ER- $\beta$ の役割について、様々な視点からの解析を行った。第1に、内側扁桃体の ER- $\beta$ の遺伝子発現の抑制により、通常の雄マウスが非発情メスよりも発情メスに対して示す選好性が消失することが明らかとなった。従って、発情雌に関する嗅覚情報処理や、適切な相手への効率的な性行動の表出には、内側扁桃体の ER- $\beta$ が関与していることが示唆された。第2に、雌マウスで

の解析では、発情期でない時期での性的受容性の抑制に背側縫線核の ER- $\beta$  の発現が不可欠であることが明らかとなった。第3に、攻撃行動の制御に果たす内側視索前野の ER- $\beta$  について雌雄のマウスで解析したところ、ER- $\beta$  遺伝子発現抑制により雄マウスの攻撃行動には低下が見られたのに対して、授乳期雌マウスの攻撃行動には亢進が見られることが明らかとなり、この部位の ER- $\beta$  の働きには性差があることが示唆された。

(4) エストロゲンが結合した ER は転写制御因子として働くことが知られているが、社会行動調節に関与する可能性のある転写制御産物の同定を試みた。内側視索前野で ER- $\alpha$  の遺伝子発現を抑制すると雄の性行動の低下が見られるが、その基盤には神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の低下がある可能性を見出した。さらに、ER- $\beta$  を介した遺伝子発現調節の解析のために、ER- $\beta$  を発現する細胞を赤色蛍光タンパク質にて標識する Tg マウスを作製し、実用化にむけての解析を行い、いくつかの脳領域で明らかな陽性細胞を確認することができた。

#### 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 59 件)

1. Kanaya M, Tsuda CM, Sagoshi S, Nagata K, Morimoto C, Chaw Kyi Tha Thu, Toda K, Kato S, Ogawa S, Tsukahara S: Regional difference in sex steroid action on formation of morphological sex differences in the anteroventral periventricular nucleus and principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One*, 9, e112616, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0112616. (査読有)
2. Anchan D, Gafur A, Sano K, Ogawa S, Vasudevan N: Activation of the GPR30 receptor promotes lordosis in female mice. *Neuroendocrinology*, 100, 71-80, 2014. (査読有)
3. Tsuda MC, Yamaguchi N, Nakata M, Ogawa S: Modification of female and male

social behaviors in estrogen receptor beta knockout mice by neonatal maternal separation. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 274, 2014. doi: 10.3389/fnins.2014.00274. (査読有)

4. Tsukahara S, Kanaya M, Yamanouchi K: Neuroanatomy and sex differences of the lordosis-inhibiting system in the lateral septum. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 299, 2014. doi: 10.3389/fnins.2014.00299 (査読有)
5. Sano K, Tsuda MC, Musatov S, Sakamoto T, Ogawa S: Differential effects of site-specific knockdown of estrogen receptor  $\alpha$  in the medial amygdala, medial preoptic area, and ventromedial nucleus of the hypothalamus on the sexual and aggressive behavior of male mice. *European Journal of Neuroscience*, 37, 1308-1319, 2013. (査読有)
6. Iwakura T, Sakoh N, Tsutiya A, Yamashita N, Ohtani A, Tsuda MC, Ogawa S, Tsukahara S, Nishihara M, Shiga T, Goshima Y, Kato T, Ohtani-Kaneko R.: Collapsin response mediator protein 4 affects the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the sexually dimorphic nucleus in female mice. *Developmental Neurobiology*, 237, 502-517, 2013. (査読有)
7. Matsuda K, Yanagisawa M, Sano K, Ochiai I, Musatov S, Okoshi K, Tsukahara S, Ogawa S, Kawata M: Visualization of oestrogen receptor $\alpha$ -positive neurons in transgenic mice expressing GFP under the control of the oestrogen receptor  $\alpha$  promoter. *European Journal of Neuroscience*, 38, 2242-2249, 2013. (査読有)
8. Vasudevan N, Morgan M, Pfaff D, Ogawa S: Distinct behavioral phenotypes in male mice lacking the thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  or  $\beta$  isoforms. *Hormones and Behavior*, 63, 742-751, 2013. (査読有)
9. Sano K, Vasudevan N, Nagata K, Nakata M, Uchimura T, Xiao K, Tsuda MC, Ogawa S: Loss of neuronal ER $\alpha$  abolishes sexual and aggressive behaviors in male mice. *Tsukuba*

- Psychological Research*, 45, 1-9, 2013. (査読有)
10. 小川園子: 社会行動の調節を司るホルモンの働き. *動物心理学研究*, 63, 31-46, 2013. (査読有)
  11. Spencer-Segal JL, Tsuda MC, Mattei L, Waters EM, Romeo RD, Milner TA, McEwen BS, Ogawa S: Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience*, 202, 131-146, 2012. (査読有)
  12. Handa RJ, Ogawa S, Wang JM, Herbison AE: Roles for estrogen receptor beta in adult brain function. *Journal of Neuroendocrinology*, 24, 160-173, 2012. (査読有)
  13. Spiteri T, Ogawa S, Musatov S, Pfaff DW, Agmo A: The role of the estrogen receptor  $\alpha$  in the medial preoptic area in sexual incentive motivation, proceptivity and receptivity, anxiety, and wheel running in female rats. *Behavioural Brain Research*, 230, 11-20, 2012. (査読有)
  14. Tsuda MC, Ogawa S: Long-lasting consequences of neonatal maternal separation on social behaviors in ovariectomized female mice. *PLoS One*, 7, e33028, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0033028 (査読有)
  15. Ribeiro AC, Musatov S, Shteyler A, Simanduyev S, Arrieta-Cruz I, Ogawa S, Pfaff DW: siRNA silencing of estrogen receptor- $\alpha$  expression specifically in medial preoptic area neurons abolishes maternal care in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 109, 16324-16329, 2012. (査読有)
  16. Kato Y, Nakashima S, Maekawa F, Tsukahara S: Involvement of postnatal apoptosis on sex difference in number of cells generated during late fetal period in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in rats. *Neuroscience Letters*, 516, 290-295, 2012. (査読有)
  17. Sakamoto H: Brain-spinal cord neural circuits controlling male sexual function and behavior. *Neuroscience Research*, 72, 103-116, 2012. (査読有)
  18. Sakamoto H, Takahashi H, Matsuda KI, Nishi M, Takanami K, Ogoshi M, Sakamoto T, Kawata M: Rapid signaling of steroid hormones in the vertebrate nervous system. *Frontiers in Bioscience*, 17, 996-1019, 2012. (査読有)
  19. Tsuda MC, Yamaguchi N, Ogawa S: Early life stress disrupts peri-pubertal development of aggression in male mice. *Neuroreport*, 22, 259-263, 2011. (査読有)
  20. Tsukahara S, Tsuda MC, ..... Ogawa S (10人中10番目): Effects of aromatase or estrogen receptor gene deletion on masculinization of the principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis of mice. *Neuroendocrinology*, 94, 137-147, 2011. (査読有)
- [学会発表] (計 118 件)
1. 小川園子: 動物を用いた行動実験の理論と実際: 行動神経内分泌学の立場から 第41回日本神経内分泌学会学術集会 神経内分泌入門、2014年11月2日 都道府県会館、東京都千代田区。
  2. 小川園子: 社会行動の性差発現を支えるホルモンの働き 第67回日本自律神経学会総会シンポジウム「内分泌機能から見た自律神経調節」、2014年10月30日 ラフレ埼玉、埼玉県さいたま市。
  3. Ogawa S, Sano K, Nakata M, Musatov S, Tsukahara S: Activation of estrogen receptor  $\alpha$  in the medial amygdala during pubertal period is essential for the full expression of male-type social behavior in mice. The International Congress of Neuroendocrinology/Society for Behavioral Neuroendocrinology, August 19, 2014, Hilton Hotel, Sydney, Australia.
  4. Ogawa S: Role of two types of estrogen receptors in life-long action of gonadal steroids in the regulation of social behavior. Satellite Meeting of ICN 2014 “Recent and Future Trends in Neuroendocrinology from Asia and Oceania to Global”, August 16,

- 2014, Novotel Sydney Manly Pacific, Sydney, Australia.
5. 小川園子: 脳に働くホルモンと環境要因による社会行動の調節. 第25回日本発達心理学会大会シンポジウム「社会行動の発達を司る脳の働き・ホルモンの働き: 行動神経内分泌学研究の最前線」、2014年3月21日 京都大学、京都府京都市.
  6. Ogawa S: Neuroendocrine Basis of Sex Differences in Social and Emotional Behavior. 第90回日本生理学会大会シンポジウム「生理学からみた性差とダイバーシティの理解」、2013年3月29日 タワーホール船堀、東京都江戸川区.
  7. Ogawa S: Life-long action of steroid hormones on social bonding. In the Symposium on "New Animal Models for Social Neuroscience", 2013年1月24日 岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市.
  8. Ogawa S: Neuroendocrine regulation of social behavior. The International Neuroscience Symposium 2012, July 23, 2012, University of Malaysia, Sabah, Malaysia.
  9. 小川園子: 脳に働くホルモンと環境要因による情動・社会行動の調節. 第30回日本小児心身医学会学術集会メインシンポジウム「子どもの心身症は予防できるか～周産期からの支援を通して～」、2012年9月8日 名古屋国際会議場、愛知県名古屋市.
  10. 小川園子: 社会行動の調節を司るホルモンの働き 第72回日本動物心理学会大会、2012年5月13日 関西学院大学、兵庫県西宮市.
  11. 小川園子: 社会行動を制御する神経内分泌機構 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会「行動制御に関わる神経系とその相互関係」、2012年3月28日 山梨大学、山梨県山梨市.
  12. Ogawa S: Neural mechanisms of social behavior: Role of steroid receptors. The US-Japan Joint Seminar on "Neurobehavioral Mechanisms of Affiliative Behavior and Cooperation: Prospects for Translational Advances for Psychiatric Disorders", October 23, 2011, Emory University, Atlanta, USA.
  13. 小川園子: エストロゲンによる社会行動制御の脳内機構 第82回日本動物学会大会シンポジウム「脊椎動物の行動を制御する神経とホルモンのはたらき」、2011年9月21日 大雪クリスタルホール、北海道旭川市.
  14. Ogawa S: Hormonal and Environmental Regulation of Social Behavior. 第34回日本神経科学大会シンポジウム「ホルモンと環境情報による行動制御とこころの健康維持」、2011年9月15日 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市.
  15. Ogawa S: Brain mechanisms of estrogenic regulation of social behavior. The Sino-Japan Joint Seminar on "Neurobiological Basis of Social Behavior", July 27, 2011, Xi'an, China. (中国西安市)
- [図書] (計2件)
- ① 小川園子 2013 感性認知脳科学の方法論: 行動科学からのアプローチ 筑波大学感性認知脳科学研究プロジェクト (編) 感性認知脳科学への招待, 199 (11-22), 筑波大学出版会.
  - ② 小川園子 2013 情動と動機づけ 森寿志他 (編) 神経科学イラストレイテッド (3rd Ed.), 397 (242-248), 羊土社.
- [その他]  
ホームページ:  
<http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ogawalab/>  
<http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ogawalab/?lang=en>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
小川 園子 (OGAWA, Sonoko)  
筑波大学・人間系・教授  
研究者番号: 50396610
  - (2) 研究分担者  
塚原 伸治 (TSUKAHARA, Shinji)  
埼玉大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 90318824  
  
坂本 浩隆 (SAKAMOTO, Hirotaka)  
岡山大学・自然科学研究科・准教授  
研究者番号: 20363971  
  
西森 克彦 (NISHIMORI, Katsuhiko)  
東北大学・農学研究科・教授  
研究者番号: 10164609  
  
坂本 敏郎 (SAKAMOTO, Toshiro)  
京都橘大学・健康科学部・准教授  
研究者番号: 40321765