

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780292

研究課題名(和文) 脳の養育中枢における摂食調節分子アミリンの新規機能の解明

研究課題名(英文) Behavioral analysis of function of amylin in the brain center of the parental behavior

研究代表者

恒岡 洋右 (TSUNEOKA, Yousuke)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：50549011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：養育行動は哺乳類の繁殖に必須であり、社会経験などにより可塑的に変化する。養育行動の制御機構解明は効率的な繁殖、子世代の育児放棄や不安行動・攻撃性の増加といった問題の解決において重要である。脳の内側視索前野の一部にある、養育に必須と考えられている部位におけるアミリンと呼ばれる摂食関連ペプチド機能についての知見を得ることを目的として研究を行った。アミリンは生殖周期に応じた発現変動があると共に、同居個体の有無といった社会環境に応じて発現が変動した。また、アミリンの投与によってマウスの摂食行動や攻撃行動に変化が見られた一方で養育行動には変化は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Parental behavior is essential for mammalian reproduction, and its plasticity depending on the social experiences has been known. Understanding such mechanisms on the plasticity of parental behavior should contribute the effective reproduction of domestic animals and solve the offsprings' mental problems caused by poor parental care. Amylin is known as feeding control polypeptide, expressed in the brain center of the parental behavior, the medial preoptic area. In this study, we showed the dynamics of amylin expression related to the reproductive cycle and the cohabitation with others. ICV injection of amylin reduced feeding and aggressive behavior of mice, while the amylin treatment did not alter the parental behavior of mice.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：アミリン 内側視索前野 養育行動

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の仔は単独では生存できず、親は哺乳・保温・外敵からの保護といった「養育行動」を行う。養育行動は出産といった生理環境の変化や、交尾・育児などの社会経験に応じて可塑的に変化することが知られている。このような養育行動の可塑的な変化を実現している神経メカニズムの解明は、効率的な家畜・伴侶動物の繁殖や子世代の育児放棄・不安行動・攻撃性の増加といった問題の解決に繋がる重要な課題である。

養育行動の制御機構は、主に齧歯類をモデルとして研究されてきた。脳の破壊実験等により、視床下部の内側視索前野(MPOA)が養育中枢と考えられている(Numan and Insel 2003. *The Neurobiology of Parental Behavior*)。また、オキシトシンやプロラクチンなど、出産・授乳に関連するホルモンが養育行動を促進するとの報告もある(Takayanagi et al. 2005. *PNAS*, 102: 19096 など)。しかし、養育中枢 MPOA は多種多様な神経細胞が存在する不均一な脳領域であり、その中の養育に関わる神経細胞はどれなのか、どういう機能を持つ神経細胞なのかといった基本的な知見が欠如していたため、出産以外の要因による養育行動の変化についてはメカニズムにまで踏み込めていなかった。申請者のこれまでの研究から、養育行動中に活性化される神経細胞では、アミリン受容体である *Calcrl* 遺伝子が特異的に発現することが明らかになった。

アミリンはグルカゴンの分泌抑制や、後脳の最後野に作用して摂食行動の抑制を行うペプチドホルモンである。アミリンは神経伝達物質の一種としても知られ、その受容体は MPOA を始めとして、情動に関連する扁桃体や神経内分泌の中核である室房核などの脳の広範な部位に発現している。これらの発現からアミリンは摂食以外にも多様な機能を持つことが示唆されるものの、脳内でのアミリン産生は非常に限定的であり、特にこれらの受容体が発現する場所ではアミリンが発現していないことも一因となって、その機能は不明であった。

近年になって、アミリンの発現には雌雄差があり、ラットのメスでは出産後に養育中枢近傍でアミリンが発現するという報告がなされた(Dobolyi 2009. *J. Neurochem*, 111:1490)。このようなアミリンの発現における性差はアミリンが性特異的な行動や生体機能を制御している可能性を示している。そこで、予備的にマウスのアミリンの脳内発現について調べたところ、養育行動と非常に良く関連しており、性差や社会経験を反映していた(丸山・恒岡, 未発表)。以上から申請者はアミリンが養育中枢に作用し、養育行動を制御する機能を持っているとの仮説の着想に至った。

## 2. 研究の目的

マウスモデルを用いてアミリンを中心とした養育行動の制御機構の解明に取り組む。生理状態、社会経験などによって養育行動は可塑的に変化することが知られており、予備的な研究結果から、アミリンの脳内発現量と養育行動は関連していた。アミリンが養育行動の各要素にどのような機能を持つかを検討するため、以下について調べる。

A 性差、年齢差、社会経験によって変化するアミリンの発現量を調べる。

B アミリン及びその阻害剤の脳内注入によって養育行動が促進及び抑制されるかについて調べる。また、アミリンの効果に対する性差や社会経験の影響も検討する。

C アミリン受容体 *Calcrl* 遺伝子の養育中枢特異的 KO マウスを作成し養育行動解析を行う。

## 3. 研究の方法

アミリンの発現動態と養育行動の関係について性別ごとに詳細に調べた。メスマウスは未経産メス、妊娠メス、産後メス(出産当日、1、2、3、4週間後)について調べ、オスマウスについては、未交尾オス、交尾ペアメスの出産1、2、3週間後まで同居したものについて調べた。また、研究の過程でアミリンが出産だけでなく社会環境によっても変動する可能性が出てきたため、群飼育のメスと単独飼育のメス、さらに単独飼育後に再度群飼育を行ったメスについても調べた。雌雄差について検討するため、メスでは卵巣除去及びエストラジオール投与群、オスでは精巣除去した個体についてアミリンの変動を検討した。

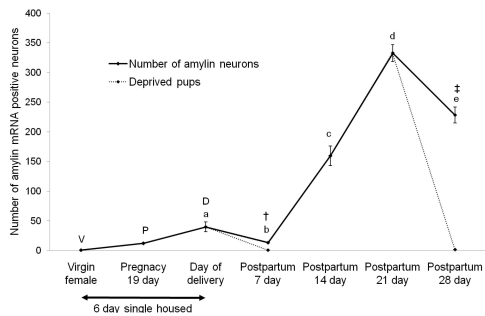
アミリンの発現は免疫組織化学染色、*in situ hybridization*、の2つを用いて検討した。また、アミリン受容体の発現についても同様に確認を行った。

アミリンの機能に関する具体的な知見を得るため、アミリンを浸透圧ポンプによって連続的に脳室内投与した個体について、養育行動・攻撃行動・摂食行動・オープンフィールドでの行動・嗅覚について検討した。また、2週間の単独飼育によってアミリンの発現を検出限界感度以下まで低下させたマウスの養育行動についても検討した。

アミリン受容体の脳特異的 KO マウスを作成し、その行動解析を行う予定であった。BAC クローンを入手し、Red-ET システムによる相同組み換え法を用いてマウスゲノムに変異を導入した。導入したコンストラクトをマウス ES 細胞に導入してキメラマウスを得る予定だったが、研究期間内に個体化できなかった。そのため、養育行動を始めとした表現型解析に関しては未着手である。ただし、行動解析に関しては研究期間終了後であっても KO マウスが出来次第解析を始める予定である。

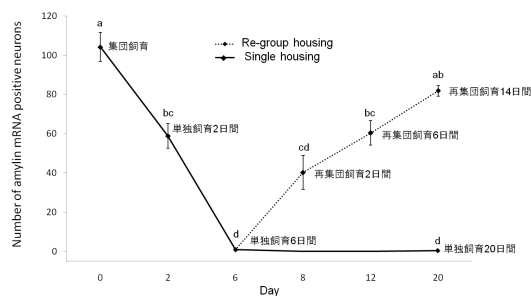
#### 4. 研究成果

アミリンはメスの生殖周期に関連して発現変動していた(下図)。単独飼育下でアミリンの発現量はタンパク、mRNA 共に検出限界以下であったが、妊娠、出産に連れて増大した。出産1週間後には一度発現量が落ち、2週間後は一転して数10倍に発現量が増加し、3週間後に最大値となった。また、これらのアミリン発現は出産した仔マウスを剥奪することで劇的に低下した(図点線部)。



アミリンの発現は仔マウスの存在によって変動した一方で、養育行動中にはアミリン陽性神経細胞にc-Fosタンパクは5%程度しか検出できなかった。このことから、アミリン陽性細胞は養育行動中にはあまり活性化していないことが示唆された。

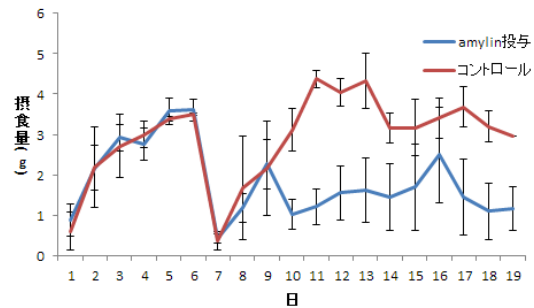
アミリンは単独飼育及び群飼育によっても発現変動し、その発現は可塑的に変化した。つまり、群飼育という社会環境はメスマウスにおいてアミリンの発現を上昇させた(下図)。



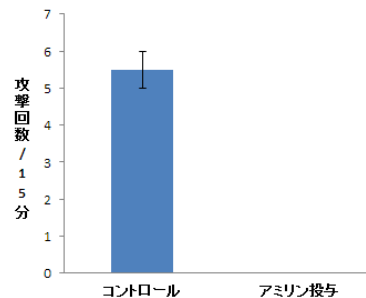
アミリンはオスマウスではほとんど発現は観察されず、去勢したオス、出産に立ち会ったオスにおいても同様であった。また、卵巣除去によってアミリンの発現は有意に減少し、アミリン陽性細胞数はオスとほぼ同数になった。また、エストラジオール処理によって、卵巣除去によって減少したアミリンの発現量はある程度回復した。

アミリンの受容体に関しては、免疫組織化学的染色及びin situ hybridization法の双方で個体間変異を観察できなかった。ただし、養育行動中にはアミリン受容体陽性細胞の約半分にc-Fos免疫活性が見られた。このことから、アミリン受容体陽性細胞は養育行動中に活性化していることが示唆された。

アミリンの脳室内投与により、様々な行動変容が観察された。まず、摂食行動に明らかな差異が認められた(下図、7日目に手術)。



また、摂食行動の減少に関連して、体重もアミリン投与群では減少した。攻撃行動はアミリン投与により有意に減少した(下図)。オープンフィールド試験、嗅覚試験では有意な差は認められなかったが、サンプル数が少ないため結論は保留した。



アミリンの投与によって養育行動は変化せず、オスマウスにおいては、両群ともに仔マウスへの喰殺が観察された。

単独飼育によるアミリン発現が減少していると予想されるメスマウスの養育行動についても、対照群の群飼育下のメスマウスと比べて、仔マウスを巣に連れ帰るまでの時間、仔マウスにまたがっていた時間、巣作りを行っていた時間、仔マウスをなめていた時間のいずれについても有意な差は観察されなかった。

以上のことから、仔マウスとの同居を始めとする社会環境の変化に対して、メスマウス特異的にアミリンの発現が変化することが明らかになった。アミリンの投与実験から、このアミリンの発現量の変化自体が養育行動を制御するのではなく、養育行動などによってアミリンの発現量が変化し、その結果として摂食行動や攻撃行動などの養育行動と関連する行動を制御している可能性が考えられた。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計 4 件)

恒岡洋右・高瀬堅吉・黒田優・船戸弘正:  
マウス内側視索前野と分界条床核の解剖学的  
解析と遺伝子発現. 第 19 回日本行動神経  
内分泌研究会, 鹿児島, 2013. 7.6

恒岡洋右, 吉原千尋, 黒田公美  
雄マウスの仔マウスへの行動選択に関わる  
神経機構. 第 83 回日本動物学会大会, 大阪,  
2012. 9.13

丸山徹歩, 恒岡洋右, 黒田公美  
マウス養育行動中枢におけるアミリン(膵ラ  
島アミロイド蛋白)の発現動態の解析. 第 83  
回日本動物学会大会, 大阪, 2012. 9.13

恒岡洋右, 天野大樹, 吉原千尋, 黒田  
公美  
仔マウスに対する行動選択を司る神経機構.  
第 17 回日本行動神経内分泌研究会, 京都,  
2012. 8.30

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

恒岡 洋右 (TSUNEOKA, Yousuke)

東邦大学・医学部医学科・助教

研究者番号: 50549011

(2)研究分担者

該当なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

該当なし ( )

研究者番号: