

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：32701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660252

研究課題名(和文) 妊娠維持に関わるフェロモン記憶細胞の同定～新たな記憶モデルの確立～

研究課題名(英文) Identification of cells involved in pheromonal memory governing pregnancy maintenance.

研究代表者

茂木 一孝 (MOGI, KAZUTAKA)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：50347308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの妊娠は、雌マウスが交尾した雄マウスのフェロモン情報を副嗅球で記憶することで維持される。本研究では、特定の刺激で活性化した細胞を追跡できるGFP-GluR1c-fosTgマウスや、特定の刺激で活性化した細胞を時期特異的に抑制できるDREADDs-Gic-fosTgマウスを駆使して副嗅球のフェロモン記憶細胞を探索した。結果として、副嗅球の顆粒細胞層尾側に、交尾時および交尾雄マウス再会時の両方で活性化する細胞群が存在した。また、交尾時に活性化した副嗅球顆粒層尾側の細胞群を雄マウス再会時に抑制すると、交尾雄マウスとの再会でも流産した。副嗅球顆粒層の尾側にフェロモン記憶細胞の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Female mice terminate their pregnancy following exposure to the urinary pheromones from unfamiliar males. However, mated partner's pheromones do not block the pregnancy. It has been suggested that the female mice can memorize specific pheromones from their mated males in the accessory olfactory bulb (AOB) and the pheromonal memory prevents female mice from pregnancy block. The present study was conducted to investigate the cellular localization concerned with pheromonal memory. In experiments using female GFP-GluR1c-fosTg mice, some cells were activated both by mating and by 2nd exposure of the mated males, and those cells were observed in the caudal part of granule cell layer in the AOB. When we suppressed the activity of those cells in female DREADDs-Gic-fosTg mice during 2nd exposure of their mated males, the female mice terminated the pregnancy. These suggested that the cells concerned with pheromonal memory were localized in the caudal part of granule cell layer in the AOB.

研究分野：神経行動学

キーワード：副嗅球 フェロモン ブルース効果 社会記憶

1. 研究開始当初の背景

雌マウスは交尾後に交尾相手と異なる系統の雄マウスに曝露されると着床阻害がおこり流産する。この現象はブルース効果として知られているが、この際にはフェロモン情報伝達の一次神経核である副嗅球の出力ニューロン“僧帽細胞”からの情報が視床下部のドーパミン神経を活性化することが明らかとなっている。それにより下垂体からのプロラクチン分泌が抑制されて黄体機能を維持できずに流産する。一方、交尾雄とともにいる状況では、副嗅球から視床下部への情報伝達が抑制され、妊娠が成立する。つまり、副嗅球内に記憶メカニズムの存在が考えられる。

副嗅球内には僧帽細胞以外にも抑制性の介在ニューロン“顆粒細胞”があり、僧帽細胞と相反性シナプスで結合しているが(図1)その超微形態は交尾で変化することが明らかとなっている。また、申請者はこれまでに、交尾雄との再会で副嗅球尾側にある顆粒細胞群が特に強く活性化する結果を得たことから、“交尾時に嗅いだフェロモン刺激により活性化した顆粒細胞は、相反性シナプスの超微形態変化に起因する機能増強により、同じ刺激ではより強く活性化して僧帽細胞を抑制する”というフェロモン記憶仮説を立てるに至った。

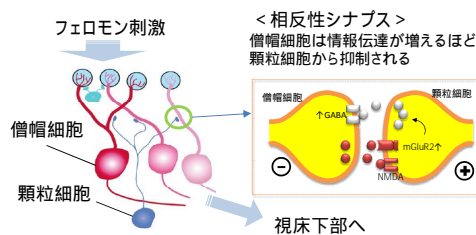


図1. 副嗅球の構成細胞

2. 研究の目的

本研究では、任意の時間に活性化した細胞を長期的に追跡できる GFP-GluR1^{c-fos}Tg マウスや、任意の時間に活性化した細胞を時期特異的に抑制できる DREADDs-Gi^{c-fos}Tg マウスを駆

使し、副嗅球のフェロモン記憶神経細胞を特定することで、フェロモン記憶メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

GFP-GluR1^{c-fos}Tg マウスを用いた妊娠維持に関わる記憶細胞の探索

神経細胞の活性に伴い発現が誘導される最初期遺伝子 c-fos のプロモーター下流に tet-on/off システムを導入した GFP-GluR1^{c-fos}Tg マウスを用い(図2) 妊娠維持に関わる記憶細胞を探索した。具体的、tTA はドキシサイクリン(Dox)存在下では tetO 配列に結合しないため、Dox を飲水投与しておけばGFPを持続的に発現させる改変遺伝子が発現しない仕組みになっている。そこでまずは Dox を作用させたままの状態GFP-GluR1^{c-fos}Tg の雌マウスを防音室に導入して十分に慣らし、発情前期に Dox 投与を中断して Balb/c 系統の雄マウスを導入する。交尾を確認後にその雄マウスを取り除いて再び Dox を投与し始める。交尾の2日後に今度は Dox を作用させたまま交尾雄と同系統の Balb/c 系統の雄マウスまたは異系統の B6 系統の雄マウスを導入し、その2時間後に GFP-GluR1^{c-fos}Tg 雌マウスの脳を環流固定して、副嗅球を取り出す。交尾時のフェロモン情報伝達に用いられた細胞には GFP が持続的に発現することとなり、雄マウスの再暴露で活性化した細胞には c-fos が発現するため、副嗅球切片において GFP 抗体と c-fos 抗体で2重免疫染色された細胞こそ、交尾時と雄マウスとの再暴露時の両方に関与する記憶細胞の候補だといえる。

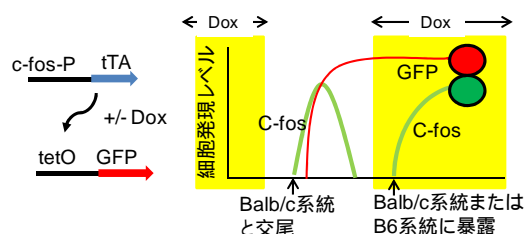


図2. GFP-GluR1^{c-fos}Tg マウスの特徴

DREADDs-Gi^{c-fos}Tg マウスを用いた妊娠維持に関わる記憶細胞の特定

DREADDs-Gi^{c-fos}Tg マウスを用いて から推測される記憶細胞の活性を抑制し、交尾雄と同系統雄との再暴露でも記憶が失われ、流産するか調べた。このマウスでは、c-fos のプロモーター下流にある tet-on/off システムにより、任意の時間に活性化した細胞に抑制性の G タンパクである Gi が共役した DREADDs-Gi を発現させられる。具体的に、まず実験前の DREADDs-Gi^{c-fos}Tg 雌マウスに で明らかとなる副嗅球の 2 重免疫細胞の高分布部位を狙った脳カニューラをあらかじめ留置する。その後、 と同様に Dox の非存在下で Balb/c 系統の雄マウスと交尾させ、その後は常に Dox を作用させる。これにより交尾時の刺激を受けた細胞に DREADDs-Gi が発現する (図 3)。交尾 2 日後から 3 日間、交尾雄と同系統の Balb/c 系統か異系統の B6 系統の雄マウスを再暴露させるが、その再暴露の 2 時間前から雄マウスの再暴露が終わるまで、CNO を定期的に脳カニューラから投与する。これにより交尾時の刺激で DREADDs-Gi を発現した細胞を特異的に抑制できる。再暴露が終了した 3 日後に開腹して子宮をチェックし、妊娠維持か流産かを調べた。

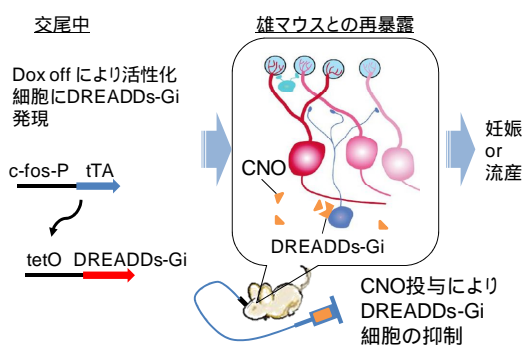


図3. GFP-GluR1^{c-fos}Tg マウスによる記憶細胞制御

4. 研究成果

GFP-GluR1^{c-fos}Tg マウスを用いた妊娠維持に関わる記憶細胞の探索

交尾後に、交尾雄と同系統の Balb/c 系統の雄マウスまたは異系統の B6 系統の雄マウスを再暴露し、副嗅球の各領域にて GFP 抗体と c-fos 抗体で 2 重免疫染色される細胞の数を比較した結果、顆粒細胞層の尾側に差がみられ、2 重染色細胞の数は交尾雄と同系統の雄マウス暴露群で有意に多かった (図 4)。この 2 重染色細胞が記憶細胞である可能性が考えられた。

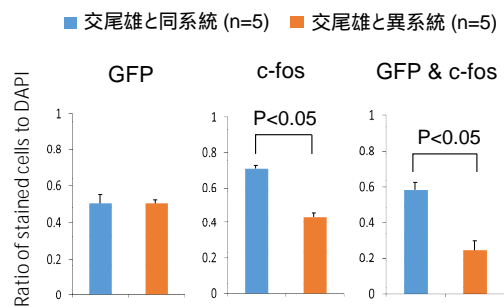


図4. 顆粒細胞層尾側の各細胞数

DREADDs-Gi^{c-fos}Tg マウスを用いた妊娠維持に関わる記憶細胞の特定

実験に用いる動物には、予め副嗅球尾側へ CNO を投与するためのカニューラを留置した。予備実験として、雌マウスへの CNO 投与が流産を引き起こさないことは確認した。交尾時に DREADDs-Gi を発現させた DREADDs-Gi^{c-fos}Tg 雌マウスに CNO 投与しながら同系統の雄マウスに再暴露した結果、これまで 2 匹中 2 匹とも流産が引き起こされた。現在例数を増やしている最中ではあるが、副嗅球顆粒細胞層の尾側にフェロモン記憶細胞の存在が示唆された。

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 16 件)

(1) M. Nagasawa, S. Mitsui, S. En, N. Ohtani, M. Ohta, Y. Sakuma, T. Onaka, K. Mogi, T. Kikusui; Oxytocin-gaze positive loop and the co-evolution of

- humans-dog bonds. *Science* 347(6232): 333-336, 2015. 査読有
DOI: 10.1126/science.1261022
- (2) T. Hattori, K. Kanno, M. Nagasawa, K. Nishimori, K. Mogi, T. Kikusui; Impairment of interstrain social recognition during territorial aggressive behavior in oxytocin receptor-null mice. *Neuroscience Research* 90: 90-94, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2014.05.003
- (3) K. Mogi, H. Takanashi, M. Nagasawa, T. Kikusui; Sex differences in spatiotemporal expression of AR, ER α , and ER β mRNA in the perinatal mouse brain. *Neuroscience Letters* 584: 88-92, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2014.10.028
- (4) H. Ohara, K. Mogi, T. Ichimaru, S. Ohkura, Y. Takeuchi, Y. Mori, H. Okamura; Effects of exposure to the male goat hair extracts on luteinizing hormone secretion and neuronal activation in seasonally anestrous ewes. *Journal of Veterinary Medical Science* 76: 1329-1337, 2014. 査読有
DOI: 10.1292/jvms.14-0260
- (5) A. Asaba, T. Hattori, K. Mogi, T. Kikusui; Sexual attractiveness of male chemical and vocalization in mice. *Frontiers in Neuroscience* 8:231, 2014. 査読有
DOI: 10.3389/fnins.2014.00231
- (6) A. Saito, H. Hamada, T. Kikusui, K. Mogi, M. Nagasawa, S. Mitsui, T. Higuchi, T. Hasegawa, K. Hiraki; Urinary oxytocin positively correlates with performance in facial visual search in unmarried males, without specific reaction to infant face. *Frontiers in Neuroscience* 8: 217, 2014. 査読有
DOI: 10.3389/fnins.2014.00217
- (7) T. Romero, M. Nagasawa, K. Mogi, T. Hasegawa, T. Kikusui; Oxytocin promotes social bonding in dogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 9085-9090, 2014. 査読有
DOI:10.1073/pnas.1322868111
- (8) K. Mogi, R. Oyama, M. Nagasawa, T. Kikusui; Effects of neonatal oxytocin manipulation on development of social behaviors in mice. *Physiology & Behavior* 133: 68-75, 2014. 査読有
DOI:10.1016/j.physbeh.2014.05.010
- (9) M. Nagasawa, A. Shimozawa, K. Mogi, T. Kikusui; N-acetyl- D-mannosamine treatment alleviates age-related decline in cognitive ability in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 76: 757-761, 2014. 査読有
DOI:10.1292/jvms.13-0351
- (10) A. Asaba, S. Okabe, M. Nagasawa, M. Kato, N. Koshida, T. Osakada, K. Mogi, T. Kikusui; Developmental social environment imprints female preference for male song in mice. *PLoS ONE* 9; e87186, 2014. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0087186
- (11) M. Nagasawa, Y. Shibata, A. Yonezawa, T. Morita, M. Kanai, K. Mogi, T. Kikusui; The behavioral and neuroendocrinological development of stress response in dogs. *Developmental Psychobiology* 56; 726-733, 2014. 査読有
DOI: 10.1002/dev.21141
- (12) M. Nagasawa, E. Kawai, K. Mogi, T. Kikusui; Dog shows left facial lateralization at a reunion with the owner. *Behavioral process* 98; 112-116, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.beproc.2013.05.012
- (13) S. Okabe, K. Kitano, M. Nagasawa, K. Mogi, T. Kikusui; Testosterone

inhibits facilitating effects of parenting experience on parental behavior and the oxytocin neural system in mice. *Physiology & Behavior* 118; 159-164, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.physbeh.2013.05.017

(14) 永澤 美保, 岡部 祥太, 茂木 一孝, 菊水 健史. オキシトシン神経系を中心とした母子間の絆形成システム. *動物心理学研究* 63; 47-63, 2013. 査読有
DOI: 10.2502/janip.63.1.4

(15) T. Kikusui, Y. Shimokawa, N Kanbara, M. Nagasawa, K. Mogi; Organizational effects of estrogen on male-type vulnerability to early weaning. *Hormones and behavior* 64; 37-73, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.04.007

(16) S. Okabe, M. Nagasawa, T. Kihara, M. Kato, T. Harada, N. Koshida, K. Mogi, T. Kikusui; Pup odor and ultrasonic vocalizations synergistically stimulates maternal attention in mice. *Behavioral Neuroscience* 118; 159-164, 2013. 査読有
DOI: 10.1037/a0032395

[学会発表](計3件)

- (1) K. Mogi, R. Ooyama, M. Nagasawa, T. Kikusui; Neonatal oxytocin treatments recover social deficits in oxytocin knock-out mice. *The International Congress of Neuroendocrinology 2014 including the 18th Annual Meeting of the Society for Behavioural Neuroendocrinology*, Sydney, Australia, 17-20 August 2014.
- (2) K. Mogi, S. Tsuchiya, K. Murata, M. Nagasawa, N. Matsuo, T. Kikusui; Cellular localization concerned with pheromonal memory in the accessory olfactory bulb in mice. *Neuroscience 2013*, San Diego, CA, USA, 9-13

November, 2013.

- (3) T. Kikusui, A. Asaba, S. Okabe, M. Nagasawa, K. Mogi; Chemical and auditory senses regulate mice social behavior. *Neuro2013*, Kyoto, Japan, 20-23 June, 2013.

[図書](計1件)

- (1) 動物たちは何を考えている? - 動物心理学の挑戦 -, 技術評論社, 2015年

[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

<http://azabu.carazabu.com/car/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 一孝 (MOGI KAZUTAKA)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 50347308

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

守屋 敬子 (MORIYA KEIKO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号: 70392371