

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713044

研究課題名(和文)社会経験依存的な分界条床核の機能変化機構の解明

研究課題名(英文) Social experience-dependent functional changes to synaptic input to the bed nucleus of the stria terminalis

研究代表者

天野 大樹 (AMANO, Taiju)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：00591950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：交尾未経験雄マウスは仔マウスに対して攻撃行動を示すが、雌との同居によって交尾・出産を経験すると攻撃行動が抑制され、雌と同様に養育行動を示す。この行動様式の変化の機構を探るために攻撃行動に関係が深いと考えられる分界条床核菱形核に着目し電気生理学的検討を行った。その結果、抑制性シナプス伝達効率変化が養育行動経験、および養育行動に重要である内側視索前野に依存して起こることを見出した。性ホルモンも攻撃または養育行動に影響するが、分界条床核菱形核よりむしろ内側視索前野におけるシナプス伝達効率に影響する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：While virgin adult male mice attack pups, mice who have fathered pups care for them. To determine the neural mechanisms associated with paternal caregiving in mice, we performed whole-cell patch clamp recording in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis (BSTrh), which was activated after attack. By comparing of the amplitude of the postsynaptic potentials evoked by electrical stimulation among the virgin male, paternal males prior to the birth of their pups, and paternal males who have an experience with pups. We found increased inhibition in BSTrh depending on the experience of mice with pups. Excitotoxic lesioning of the medial preoptic area (MPOA), a region considered to be central to parental behavior, reversed this inhibition to the level seen in virgin males.

研究分野：神経薬理学

キーワード：養育行動 攻撃行動 分界条床核 内側視索前野 電気生理学 薬理学

1. 研究開始当初の背景

雌マウスは交尾経験の有無に関わらず仔集めや巣作りといった養育行動を示す一方、交尾未経験の雄マウスの多くが新生仔への攻撃行動(子殺し=喰殺)を示す。しかし交尾やメスとの同居などを経て父親となると喰殺を停止する。そして仔や雌マウスとの同居経験によって父マウスも母と同様に養育を開始する。従って雌雄とも養育に関わる共通の神経基盤を持つが、交尾未経験の雄マウスと父マウスとでは、仔から同一の感覚情報を受けたとしても、過去の社会経験に応じて養育と喰殺という正反対の行動を選択すると言える。この行動選択は社会経験に依存した脳内神経回路の可塑的な変化に支えられると考えられる。申請者が所属する研究グループで事前に行われた研究の成果から、喰殺には背外側分界条床核の一部である菱形核が重要である事が示唆された。しかし、社会経験を反映した神経可塑的变化が分界条床核菱形核で起き、またそれが行動改善につながるかを判断するための生理学の実証がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では分界条床核で社会経験依存的に起きる可塑的变化を生理学的に特定した上で、内在する機能調節機構を明らかにすることとした。これにより、喰殺から養育、つまり攻撃性から親和性へと促すための重要な手掛かりを得た上で、薬物の処置や光遺伝学実験などによる仮説の再現を目指した。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の確立

本研究は雄性 C57BL/6J 系マウスを用いて実験を行った。交尾未経験雄マウスが雌との同居し、出産、養育を経験した父親マウスとなるまでの間の社会経験をそれぞれ詳細に調べるために、交尾未経験雄マウス、同一ケージに雌を入れて交尾後も引き続き妊娠した雌マウスと同居した雄マウス、雌が仔マウスを出産してから仔マウスと3日間同居を経験した雄マウスについて検討を行った。また養育行動開始に重要とされる性行動および仔マウスとの経験について調べるために、去勢手術および各種性ホルモン補充を施したマウスを作成した。

(2) 養育・喰殺行動試験

アルファドライ床敷きおよびコットンパッドを入れたケージに対象動物を入れ、コットンパッドを用いた巣作りを促した。1~2日後、4隅のうち巣以外の3点に1日齢から6日齢までの自力歩行困難な仔マウスを3匹置き、仔マウスを巣に運ぶまでの時間、運ばれた仔マウスの数、または攻撃開始までの時間を測定した。この試験を4日間連続して行った。

(3) 電気生理学的解析

各種社会経験を持つマウスから脳スライ

スを作成し、特定の神経核に存在する神経細胞の電気生理学的反応性を比較する *ex vivo* 実験を行い、特定の神経回路で起こる伝達強度の変化を調べた。

(4) 薬理的検討

分界条床核菱形核には多くの種類の神経伝達物質を放出する神経線維入力が存在している。本研究ではモノアミンに着目し、インビボマイクロダイアリシス法による行動と関係した脳内神経伝達物質遊離レベル変化を解析した。さらに脳内へ薬物注入した時の行動観察を行った。

4. 研究成果

(1) 去勢マウスの行動様式

去勢マウスでは偽手術群に比べ養育行動を示す割合が大幅に増加していた。一回目には喰殺を示した去勢マウスも回数を重ねることで養育行動開始を示す傾向が見られた。また各種性ホルモンを補充したところ、プロピオン酸テストステロン、エストラジオールによっては養育行動発現が阻害されたものの、ジヒドロテストステロンは養育行動阻害作用を示さなかった。

(2) 発達に伴う喰殺行動発現時期の検討

喰殺行動が安定して発現する時期を調べた結果、28日齢ではほとんど喰殺を示さなかったが、次第に増加して7週齢以降で安定して約90%のマウスが喰殺様の攻撃行動を示すことが明らかとなった。また28日齢から4日間仔マウスと接触をさせた。これによりその後1か月間にわたり仔マウスに対する攻撃性は大幅に低下した。さらに長期間にわたり定期的に仔マウスを外部から持ち込むことで接触させ続けたところ、このマウスは性成熟期以降であっても喰殺を示さず、養育行動を示した。

(3) 発達依存的な神経回路機能変化

分界条床核菱形核を含む脳スライスを作成し、興奮性・抑制性シナプス伝達効率を3週齢マウスと成熟マウスとで比較した。その結果、抑制性シナプス伝達効率に有意な変化は認められなかったが、興奮性シナプス後電流(eEPSC)のペアードパルス比が変化していた。したがって、成熟期では幼弱期に比べてグルタミン酸の放出確率が增大している可能性が示された(図1)。

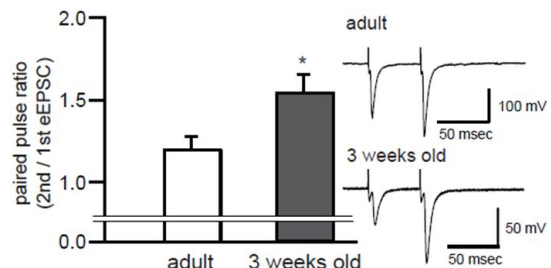


図1 ペアードパルス法によるシナプス特性の検討

(4) 経験依存的な神経回路機能変化

分界条床核菱形核を含む脳スライスを作成し、興奮性・抑制性シナプス伝達効率を交

尾末経験雄マウス、父親マウスとで比較した。その結果、興奮性シナプス伝達効率に変化は認められなかったが、仔マウスに対する接触経験によって抑制性シナプス伝達が増大していた(図2)。また去勢手術を施すことで、養育行動開始が促進されるが、去勢を施しただけでは分界条床核菱形核における抑制性シナプス伝達効率上昇は認められなかった。しかし去勢後に養育行動を経験したマウスでは抑制性シナプス伝達効率増大が認められた。さらに幼弱期から仔マウスに接触を継続したマウスでも分界条床核菱形核における抑制性シナプス伝達効率上昇が認められた。

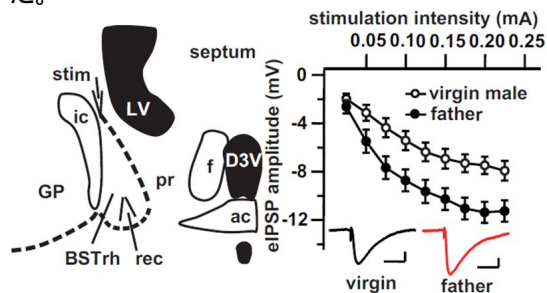


図2 分界条床核菱形核(BSTrh)における抑制性シナプス後電位の振幅は父親マウスで増大している

(5) 内側視索前野の分界条床核への効果

マウスの場合、雌雄ともに内側視索前野中心部(cMPOA)の破壊により養育行動は阻害され、喰殺を示すことが明らかとなっている。そこで分界条床核菱形核における養育行動依存的な抑制性シナプス可塑的变化が内側視索前野破壊による影響を受けるか検討した。交尾未経験雄マウスのcMPOAを破壊しても分界条床核菱形核における抑制性シナプス伝達効率に変化は認められなかったが、父親マウスでは有意に低下した。また、記録電極内にGタンパク質阻害薬を入れた状態で記録を行うと、父親マウスにおける抑制性シナプス伝達効率上昇は抑制され、交尾未経験雄マウスと同レベルになった。以上より、cMPOAの活動上昇によってGタンパク質結合型受容体が分界条床核菱形核で活性化した場合、抑制性シナプス伝達効率が上昇した可能性が考えられる。

(6) 内側視索前野に対する神経入力の解析

cMPOAは養育中枢と考えられるが、シナプス入力についてはほとんど明らかではない。まずcMPOAに入力するシナプス投射元の同定を目指した。cMPOAの背側部には前交連が存在して水平方向に繊維を伸ばしている。この前交連の前部および後部を通して神経投射がcMPOAへ入力することが予想されたことから、それぞれ電気刺激を行った時にcMPOAでシナプス電流が観察されるか調べた。その結果、前交連後部を刺激した時にcMPOA神経細胞で抑制性シナプス電流が観察された。次にこの抑制性シナプスの入力元の同定を目指し、内側扁桃体の各亜核に順行性トレーサーを微小注入した。内側扁桃体後部背側部(MePD)はGABA作動性神経を多く持つことが

知られるが、前交連後部を通してcMPOAへ投射することが明らかとなった。さらに光感受性イオンチャネルであるチャンネルロドプシン遺伝子をウイルスベクターによってMePDに特異的に発現させ、cMPOA神経細胞から電気生理学記録を行った。その結果、光照射によって抑制性シナプス電流が観察されたことからMePD-cMPOA経路は機能的シナプスであることが確認された。

(7) 内側視索前野のシナプス伝達効率変化

cMPOA神経細胞から記録し、背側部を刺激した時の抑制性シナプス伝達効率を比較した。その結果、交尾未経験雄マウスに対し父親マウスでは抑制性シナプス伝達効率が低下していた。去勢手術を施したマウスでは仔マウスに対する接触・養育経験がなくても抑制性シナプス伝達効率が低下していた。プロピオン酸テストステロン、エストラジオールの補充を受けたマウスでは抑制性シナプス伝達低下は認められなかった。一方で交尾未経験であっても仔マウスとの継続的な接触を経験することで養育行動を示すマウスモデルでは抑制性シナプス伝達効率は交尾未経験雄マウスと同レベルであった。

(8) 光遺伝学的手法を用いた機能操作

ウイルスベクターを用いてMePDに特異的に抑制性光感受性イオンチャネルArchを発現させた。これによりcMPOAへの入力を特異的に抑制することを目指した。しかしArchがMePD-cMPOA経路で十分に機能していることを示すデータを得ることが出来なかった。

(9) 薬理的検討

覚醒下にあるマウスの神経伝達物質遊離量変化を調べるためインビボマイクロダイアリシス法による検討を行った。分界条床核菱形核に半透膜プローブを挿入して脳脊髄液の灌流を行い、5分毎に回収した。化学検出器で調べた結果、ドパミンが分界条床核菱形核で遊離していることが明らかとなった。この状態で養育行動試験時と同様に仔マウスをケージ内に入れたところ、喰殺行動を示したマウスではドパミン遊離レベルが一時的に低下する傾向が認められた。分界条床核菱形核におけるドパミンの作用を調べた結果、抑制性シナプス伝達より興奮性神経伝達を強く抑制することが明らかとなった。また脳内に直接D2様受容体作用薬を注入したところ交尾未経験雄マウスの喰殺様行動が抑制された。

(10) 本研究のまとめ

幼弱期から成熟期に至る過程、および交尾未経験雄マウスが父親となるに至るまでの社会経験を経ることで、仔マウスに対する行動様式は大きく変化する。それぞれの発達・経験段階に良く関連した分界条床核菱形核における興奮性および抑制性シナプス伝達の神経可塑的变化が見出された(図3)。また成熟後に仔マウスの養育経験に依存した可塑的变化には内側視索前野中心部が大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。内側

視索前野中心部においても雌との同居や性ホルモン動態変化に依存した変化が起きている可能性が示された。

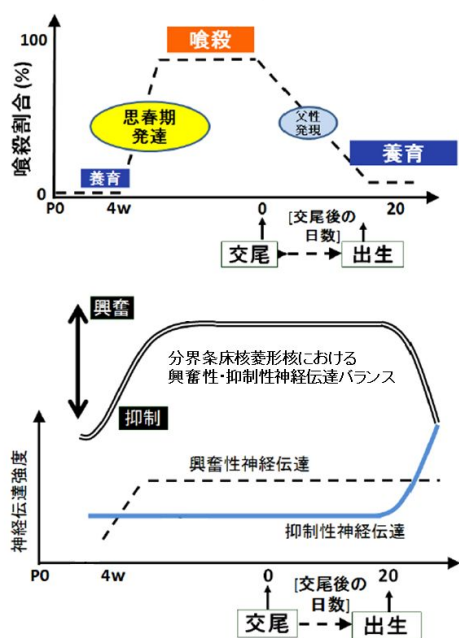


図3 分界条床核菱形核 (BSTrh)における発達・社会経験依存的な神経可塑的变化仮説

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 1件)

Tsuneoka Y., Tokita K., Yoshihara C., Amano T., Esposito G, Huang A.J., Yu L.M., Odaka Y., Shinozuka K., McHugh T.J., Kuroda K.O. Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *EMBO J*, 34(21):2652-70, 2015, 査読有、doi: 10.15252/embj.201591942

[学会発表](計 17件)

Taiju Amano, Sayaka Shindo, Chihiro Yoshihara, Yousuke Tsuneoka, Masabumi Minami, Kumi O Kuroda, The comparison of behavioral pattern toward pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis between mice before after weaning. 第39回神経科学大会、2016年7月20-22日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Kazuki Ito, Masabumi Minami, Taiju Amano, Rethinking of the boundary and the projection pattern of the medial amygdala subnuclei, 第39回神経科学大会、第39回神経科学大会、2016年7月20-22日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ken-Ichi Tokita, Yousuke Tsuneoka, Taiju Amano, Manami Sato, Kumi O Kuroda, マウス父性行動および喰殺行動に関する神経回路、Neural circuits involved in paternal and infanticidal behavior in mice 第39回神経科学大会、2016年7月20-22日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Kazuki Ito, Sayaka Shindo, Chihiro Yoshihara, Kumi O Kuroda, Masabumi Minami, Taiju Amano, The regulation of male pup-toward behavior by sexual hormones, 2016 30th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, July 5, 2016, Seoul (Korea)

伊藤 和貴、進藤 さやか、吉原 千尋、黒田 公美、南 雅文、天野 大樹、性ホルモンを介した養育行動の調節機構 第46回精神神経薬理学会年会、2016年7月2日、ソウル(韓国)

Ken-Ichi Tokita, Yousuke Tsuneoka, Taiju Amano, Manami Sato, Kumi O Kuroda, Neural circuits controlling pup-directed behaviors in male mice. 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 2016年6月5-9日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

天野 大樹、伊藤 和貴、恒岡 洋右、進藤 さやか、吉原 千尋、南 雅文、黒田 公美、雄マウスの養育行動の発現と神経可塑的变化 第11回環境生理学プレコングレス、2016年3月21日、北海道大学医学部(北海道・札幌市)

Taiju Amano, Chihiro Yoshihara, Sayaka Shindo, Yousuke Tsuneoka, Kazuki Ito, Masabumi Minami, Kumi O Kuroda, Medial preoptic area is involved in the regulation of the inhibitory synaptic transmission in the posterior bed nucleus of the stria terminalis, Gordon Research Conference 'Amygdala In Health & Disease' August 5, 2015, Easton (USA)

Taiju Amano, Chihiro Yoshihara, Sayaka Shindo, Yousuke Tsuneoka, Ito Kazuki, Masabumi Minami, Kumi O Kuroda, The effect of gonadal hormone on inhibitory synaptic transmission in the posterior bed nucleus of the stria terminalis, 2015年7月29日 第38回神経科学大会、神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

Taiju Amano, Yousuke Tsuneoka, Sayaka Shindo, Chihiro Yoshihara, Kumi O Kuroda, The electrophysiological analysis of the posterior division of the bed nucleus of stria terminalis in father mice, 44th Society for Neuroscience, November 17, 2014, Washington D.C. (USA)

天野 大樹、父性発現と神経可塑的变化、平成 26 年度生理研研究会 『感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻』、2014 年 10 月 8 日、生理学研究所（愛知県・岡崎市）

Taiju Amano, Yousuke Tsuneoka, Sayaka Shindo, Chihiro Yoshihara, Kumi O Kuroda, Paternal behavior and inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of stria terminalis, 第 37 回神経科学大会、2014 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Taiju Amano, Yousuke Tsuneoka, Sayaka Shindo, Chihiro Yoshihara, Kumi O Kuroda, Comparison of synaptic transmission in the bed nucleus of stria terminalis before and after being father, 9th FENS meeting, July 7, 2014, Milan (Italy)

天野 大樹、吉原 千尋、進藤 さやか、恒岡 洋右、黒田 公美、去勢による養育行動変化と神経可塑的变化、第 3 回社会神経科学研究会、2013 年 11 月 28 日、生理学研究所（愛知県・岡崎市）

Taiju Amano, Yousuke Tsuneoka, Sayaka Shindo, Chihiro Yoshihara, Kuroda O Kuroda, Activity changes of the posterior division of the bed nucleus of stria terminalis after being father. Gordon Research Conference ' Amygdala In Health & Disease ', July 29, 2013, Easton (USA)

Taiju Amano, Yousuke Tsuneoka, Sayaka Shindo, Chihiro Yoshihara, Kuroda O Kuroda, The effect of dopamine on the posterior division of bed nucleus of stria terminalis after being father. 5th Parental Brain Conference, July 12, 2013, Regensburg (Germany)

天野 大樹、恒岡 洋右、進藤 さやか、黒田 公美、背外側分界条床核における社会経験依存的な神経可塑的变化、平成 24 年度生理研研究会 第 2 回社会神経科学研究会 2013 年 1 月 31 日、生理学研究所（愛知県・岡崎市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 大樹 (AMANO, Taiju)
北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号：00591950

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し