

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282220

研究課題名(和文) 父性発現に必要な内側視索前野の活性化メカニズムの探索

研究課題名(英文) Switching mechanism to activate the medial preoptic area for fatherhood

研究代表者

黒田 公美 (KURODA, KUMI)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：90391945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：未交尾オスマウスは子マウスに対して攻撃的であるが、メスとの交尾・同居を経験し父親になると、自分の子ばかりか他人の子まで養育する。この「父性の目覚め」において、攻撃には前脳分界条床核の一部分BSTrhが、養育には内側視索前野中央部cMPOAが重要であることを見出した。BSTrhの機能を阻害すると子への攻撃が弱まり、cMPOAの機能を阻害すると子を養育できなくなった。また光遺伝学的手法でcMPOAを活性化すると、子への攻撃が減る。さらにオスマウスが子を攻撃するか、養育するかは、cMPOAとBSTrhの2つの脳部位の活性化状態を測定するだけで、95%以上の確率で推定できることがわかった。

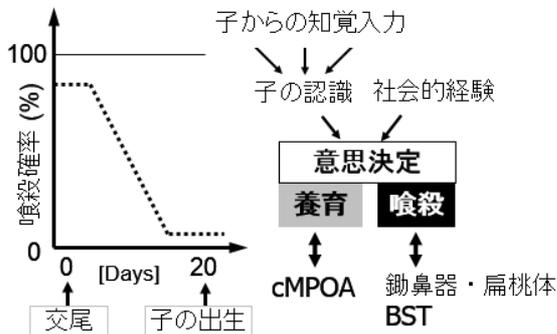
研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the c-Fos expression pattern in the four nuclei of the preoptic-bed nuclei of stria terminalis (BST) region could robustly discriminate five kinds of previous social behavior of male mice (parenting, infanticide, mating, inter-male aggression, solitary control). Specifically, neuronal activation in the central part of the medial preoptic area (cMPOA) and rhomboid nucleus of the BST (BSTrh) retroactively detected paternal and infanticidal motivation with a 97% accuracy. Moreover cMPOA lesions switched behavior in fathers from paternal to infanticidal, while BSTrh lesions inhibited infanticide in virgin males. The projections from cMPOA to BSTrh were largely GABAergic. Optogenetic or pharmacogenetic activation of cMPOA attenuated infanticide in virgin males. Taken together, this study identifies the preoptic-BST nuclei underlying social motivations in male mice, and reveals unexpected complexity in the circuit connecting these nuclei.

研究分野：神経科学・行動科学

キーワード：親子関係 養育行動 子殺し 父性

1. 研究開始当初の背景

交尾経験のないオスマウスの多くは、子マウスを見ると子殺しを行う。しかしひとたびメスと同居し交尾すると、オスは次第に子を攻撃しなくなる(下図左)(vom Saal et al, 1981)。そして自らの子が生まれ父親になる頃にはメスと同様、よその子に対しても養育するようになる。したがって子マウスから得られる知覚入力は全く同一であるのに、オスは子殺しと子育てという正反対の行動のいずれかを、社会的文脈に照らして瞬時に選択している(下図右)。メスとの交尾・同居という社会経験はオスの脳内に何らかの記憶痕跡を残し、喰殺か養育か意思決定過程を制御すると考えられる。同様のオスの行動変化はマウスだけではなくライオンやヒトなどでも古くから知られているが、その脳内機構についてはほとんど未知であった。



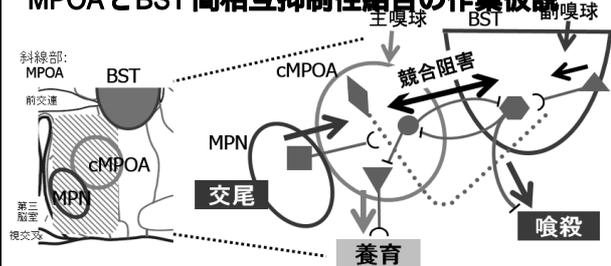
本申請者らのグループは視床下部内側視索前野(MPOA)のニューロンは子を喰殺したマウスと比べ子を養育したマウスで有意に活性化していること(Kuroda et al., 2007)、また MPOA の中央部 (cMPOA)を外科的に破壊すると養育経験の豊富なマウスであっても喰殺に転じる(Tsuneoka et al, 2013)ことを明らかにしている(上図右)。さらに喰殺したマウスにおいて養育群と比べ鋤鼻系神経路(副嗅球から内側扁桃体及び腹側境界条床核(BST))が有意に活性化していること、さらに鋤鼻器の破壊は未交尾オスマウスの喰殺を抑止し養育に転じさせることも見出している(Tachikawa et al, 2013)。

2. 研究の目的

広義扁桃体に属するBSTはMPOAに隣接し、この間に抑制性の神経投射が示唆されることから、子に対する行動選択において特に重要である可能性が高い。さらにMPOAの内側部にあるMedial preoptic nucleus (MPN)はオスの交尾行動の際に活性化することが知られており、交尾経験がcMPOAの活性に影響を与えて、近い将来に生まれる自らの子に対する喰殺の抑制に関与するという作業仮説が考えられた。

そこで本研究では、「養育か喰殺か」の、同種幼若個体に対する二者択一的意思決定に、MPN-cMPOA-BSTという近接する脳領域間の相互作用、とくにcMPOAとBSTの相互抑制性結合が関与するという作業仮説(下図)を検証する。

MPOAとBST間相互抑制性結合の作業仮説



3. 研究の方法

オスマウスはC57BL/6系統を用いた。マウスの仔に対する行動評価は(Kuroda et al, 2011)に準拠して行った。C57BL/6系統の未交尾および父マウス各45匹を金網に馴化した後、次の3群(N=15)に分けて2時間行動観察を行った。1)子を提示せず金網のみ提示、2)金網に包まれた子を提示、3)子を金網に入れずに提示。少数ではあるが未交尾でも養育する個体、父親でも喰殺する個体も10%程度存在するが、これらも解析に含める。2時間後にすべてのマウスを灌流固定し脳を摘出、MPOAとBSTを含む脳薄切片を作成してc-Fos免疫組織染色を行った。

cFos発現分布の解析に先立ち、まずMPOAとBSTを含む領域を種々の神経伝達物質やニューロペプチドなどのマーカー分子で染色し、神経化学的にMPOA・BST周辺領域を亜核に分割した。次に得られた亜核ごとのc-Fos陽性ニューロン数をNeuroLucida神経描画システムを用いて定量化した。そして各亜核のc-Fos陽性ニューロン数から過去の行動を最もよく説明する線型判別関数を求めた。次にLeave-one-out法を用いたクロスバリデーションにより、誤判別率を算出した。すなわち、単独・養育・喰殺の行動がどの程度のFalse positive/negativeで推定できるのかを明らかにすることにより、cMPOAとBSTの活性化と行動の相関関係を定量化した。c-Fosをはじめとする各種免疫染色、In situ hybridizationなどの組織学的解析は(Tsuneoka et al., 2013)と同様に行った。神経核間の投射解析は古典的な前向き・逆行性トレーサーとGlutamate/GABAニューロンマーカーとの共染色による解析により行った。

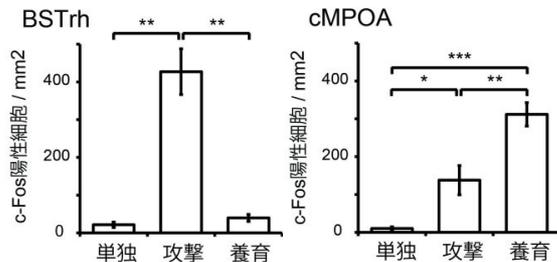
光遺伝学 Optogenetics は、アデノ随伴ウイルス AAV にチャネルロドプシン 2 (ChR2) をコードする遺伝子を組み込んだものを共同研究者 (Tom McHugh, RIKEN BSI) や米国 addgene 社等より入手し脳定位手術によって脳内に感染させ、同時に 100 μm の光ファイ

バーを片側の cMPOA に設置した。そして 4 週間後に 4 週後に光刺激下において、子を提示し被験マウスの行動を観察した。

3か月齢 未交尾オスC57BL/6マウス、予備実験にて喰殺行動を確認
 ↓
 AAV-EF1a-ChR2-GFP / AAV-EF1a-GFP をcMPOAに注入
 留置用光ファイバー(Φ100μm)をcMPOAに埋め込み
 ↓ (4週間、ウイルス感染とChR2発現)
 光刺激下行動実験(2mW, 473nm, 10msec x 20Hz)
 留置ファイバーを光ケーブルに接続、30分間馴化
 光刺激OFFで子マウスを1匹提示、行動観察(5分間)
 光刺激ONで子マウスを1匹提示、行動観察(5分間)
 光刺激OFFで子マウスを1匹提示、行動観察(5分間)
 光刺激ONで子マウスを1匹提示、行動観察(5分間)
 ↓
 光刺激15分の2時間後に還流固定 (⇒光刺激の部位・強度の妥当性確認)
 または
 新鮮脳スライス作成、光刺激下にてBSTニューロンのシナプス後電流の測定
 (⇒cMPOAニューロンの刺激がBSTIに与える影響の測定)

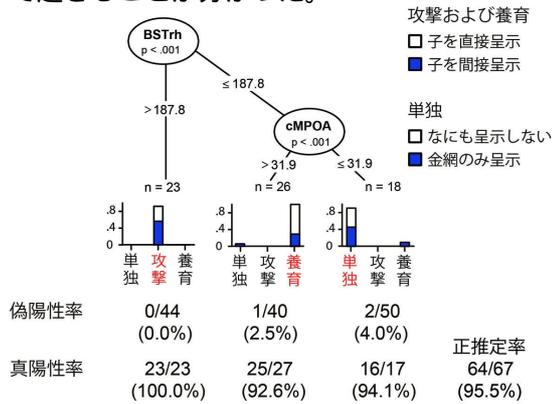
4. 研究成果

まず、子を攻撃する交尾未経験オスマウスと養育するオスマウスの2つのグループに対して、子と2時間同じケージ内に同居させたときに、脳のどの領域が活性化しているかを、神経細胞の活動の指標である c-Fos タンパク質を用いて調べた。対照群として、2時間単独でいたオスマウスのグループと比較したところ、攻撃する際にはオスマウスの前脳の分界条床核 BST の一部である BSTrh という部位で、養育する際には内側視索前野中央部 cMPOA という部位で、それぞれ c-Fos 陽性細胞密度が増加し、有意に活性化していた。また、子を金網で覆い、実際には攻撃や養育ができない状況(間接呈示)にしても、それぞれの行動に対応した活性化が見られた。この結果から、これらの2つの脳部位の活性化は、子に対して起こした行動の結果ではなく、行動を起こそうとする意欲や動機を反映していると考えられた。

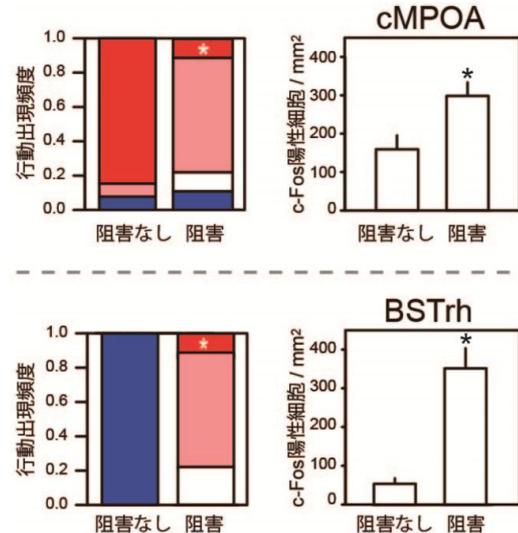


次に cMPOA と BSTrh の2つの脳部位の c-Fos 陽性細胞の密度を使って活性化状態を調べるだけで「あるオスマウスが子を攻撃するのか養育するのか」を推定できるか調べた。樹木モデル解析の結果、95%以上の高い精度でどちらの行動をとるかを推定できることが分かった。具体的には、どちらの行動をとるのか分からないオスマウスについて、BSTrh に発現する c-Fos 陽性細胞の密度を調べたとき、その値が 187.8 よりも大きい場合には攻撃するオスマウスであることが、真陽性率 100%、

偽陽性率 0%という非常に確かな精度で推定できた。さらに、BSTrh の c-Fos 陽性神経細胞の密度が 187.8 以下である場合は、cMPOA の c-Fos 陽性細胞の密度を調べる。その値が 31.9 よりも高ければ養育するオスマウスである、真陽性率 92.6%、偽陽性率 2.5%という、かなり高い精度で推定することができた。また、直接呈示と間接呈示の違いは、結果に影響を与えなかった。このことから、実際に行動したかどうかに関わらず、オスマウスが子に対して攻撃するのか、それとも養育するのか、脳の活性化状態から推測できるということが分かった。また、BSTrh や cMPOA の活性化は、行動の結果ではなく「行動への意欲」で起きることが分かった。



次に、cMPOA と BSTrh の神経活動が攻撃行動や養育行動に必要などうかを確かめるため、交尾未経験のオスマウスの BSTrh の働きを阻害すると、阻害しなかった時に比べ、子への攻撃行動が有意に減少した。これは、BSTrh の働きが攻撃行動を促進することを示唆している。一方で、父親マウスの cMPOA の働きを阻害すると、全く養育しなくなっただけでなく、子を攻撃するようになった。



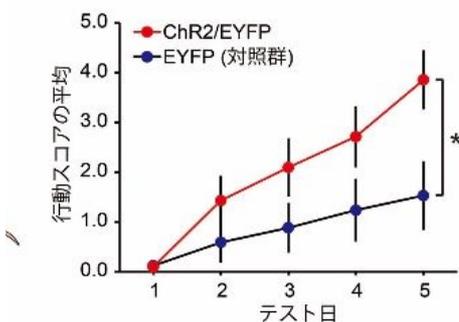
また、cMPOA の働きを阻害すると BSTrh が活性化されたことから、cMPOA は BSTrh を抑制していることが分かった。つまり、養育行動に関わる cMPOA が活性化されると、攻撃行動に関わる BSTrh の働きが抑えられるような神

経回路を形成しているといえる。さらに、この2つの部位の結合様式を解析すると、実際に GABA 作動性の抑制性神経が cMPOA から BSTrh へ投射していることが分かった。

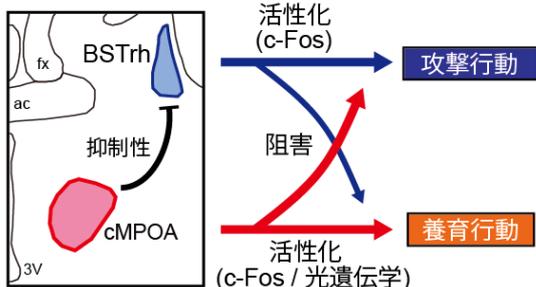
最後に、cMPOA の活性化が攻撃行動へ与える影響を最新の光遺伝学的手法を用いて調べた。交尾未経験のオスマウスの cMPOA にチャネルロドプシンを発現させ、光刺激で活性化すると子に対する攻撃行動が有意に減少したことから、実際に cMPOA の活性化は攻撃行動を抑制することが示された。また、父親になるためにはメスと交尾する経験が必要である。そこで、メスと交尾する経験が cMPOA に与える影響を検討するため交尾して2時間後のオスマウスを調べたところ、cMPOA が活性化していた。

行動の分類とスコア (テストは1日3回)

- 3点 仔を巣に回収
- 2点 仔に対して無関心
- 1点 興奮して仔に接触
- 0点 仔を攻撃



以上の結果から、オスマウスがメスとの交尾・同居を経て父親になる際には、まず交尾によって cMPOA の活性が高まり、cMPOA が攻撃行動を制御している BSTrh の神経活動を抑制することによって攻撃行動を抑え、養育行動を促進している可能性が示された。



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 4件)

T. Amano, S. Shindo, C. Yoshihara, Y. Tsuneoka, H. Uki, M. Minami, KO. Kuroda, Development-dependent behavioral change toward pups and synaptic

transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis, Behavioural Brain Research, 査読有, Vol1325, 2017, pp131-137,

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.029>

Y. Tsuneoka, K. Tokita, KO. Kuroda, Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice, EMBO Journal, 査読有, Vol34(21), 2015, pp 2652-70, DOI: 10.15252/embj.201591942

黒田公美, 父性愛と母性愛 親心の脳神経基盤, 生体の科学, 査読有, Vol66(1), 2015, pp58-65

黒田公美, 親子の愛と絆の脳科学, 科学, 査読無, Vol84(7), 2014, pp721-26

[学会発表](計 15件)

黒田公美, 子育て行動の脳内機構: げっ歯類とマーモセットでの知見, ホミニゼーション研究会, 2017/3/24, 霊長類研究所 犬山

黒田公美, 子育てを脳科学する, 埼玉県社会福祉会, 2017/2/18, 十文字学園新座

黒田公美, 家族関係の脳内基盤: マウスとヒトをつなぐマーモセット研究, 日本マーモセット研究会, 2016/12/12, 東京大学農学部弥生講堂 東京

黒田公美, 子ども虐待はなぜ起きるのか; 行動神経科学から見た親支援の必要性, 日本子ども虐待防止学会 2016/11/25, 大阪国際会議場 大阪

時田賢一, 雄マウスにおける子殺しと子育ての神経制御機構, 情動研究会, 2016/10/18, 生理学研究所 岡崎

時田賢一, 雄マウスにおける喰殺行動と養育行動の神経制御, 遺伝研行動遺伝学研究会, 2016/10/14, 国立遺伝学研究所 三島

黒田公美, 親子間愛着の脳神経機構とその問題, チャイルドラインおかやま, 2016/9/11, きらめきプラザ 岡山

時田賢一, マウス父性行動および喰殺行動に關与する神経回路, 代 39 回日本神経科学大会, 2016/7/20-22, パシフィコ横浜 横浜

時田賢一, Neural circuits controlling pup-directed behaviors in male mice, 17th Int'l Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9, パシフィコ横浜 横浜

黒田公美, 子ども虐待はなぜ起こるのか ~脳科学・進化生物学的考察~, 児童虐待防止法研究会, 2016/4/16, 東海大学校友会館 東京

黒田公美, マウス父性的養育行動発現の神経機構, 第 45 回日本神経精神やっく

り学会 & 第 37 回日本生物学的精神医学会、2015/9/25、タワーホール船堀 東京
天野大樹, 生殖腺ホルモンの分界条床核後部における抑制性神経伝達への効果, 第 38 回日本神経科学大会, 2015/7/28-31, 神戸国際会議場 神戸

黒田公美, Disclosure of social motivation in the preoptic-BST nuclei, the 2015 Bridging Biomedical Worlds Symposium, 2015/5/11-12, イイノホール&カンファレンスセンター 東京

天野大樹, 父性発現と神経可逆的变化, 生理学研究会, 2014/10/8, 岡崎コンフェレンスセンター 岡崎

天野大樹, 養育行動と分界条床核における抑制性シナプス伝達, Neuro2014, 2014/9/13, パシフィコ横浜 横浜

〔図書〕(計 2 件)

利根川進, 加藤忠史, 黒田公美ほか, 講談社, つながる脳科学, 2016, 322(pp282-313)

加藤忠史, 黒田公美, 白石優子, 篠塚一貴, 時田賢二ほか, 日本評論社, こころの科学 ここまでわかった脳とこころ, 2016, 152(pp16-24)

〔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
マウスの「父性の目覚め」に重要な脳部位を発見
http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150930_1/digest/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田公美 (Kuroda Kumi)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号: 90391945

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
天野大樹 (Amano Taiju)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員
研究者番号: 00591950

吉原千尋 (Yoshihara Chihiro)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号: 10647506

時田賢一 (Tokita Kenichi)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号: 70384188

(4) 研究協力者
()