

平成23年 5月 30日現在

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21890307

研究課題名（和文）

マウス養育中枢に発現する神経ペプチドが養育行動の各要素に果たす役割の遺伝学的解析

研究課題名（英文）

Genetic analyses of the roles of neuropeptides expressed in the center of mouse maternal behaviors.

研究代表者

恒岡 洋右 (TSUNEOKA YOUSUKE)

独立行政法人理化学研究所・黒田研究ユニット・研究員

研究者番号： 50549011

研究成果の概要（和文）：

オキシトシンとバソプレシンおよびその受容体は養育行動を含む哺乳類の多くの社会行動の制御に重要であると考えられている。これらの分子の役割についての知見を得るため本研究で作成した4遺伝子破壊マウスの養育行動は、ほぼ正常であった。このことは養育行動においてこれらの分子が種間及び異なる環境間で大きく異なる作用を持ち、本研究で検討したC57BL/6マウス系統の養育行動には必須とはいえないことを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Oxytocin and vasopressin are considered the neuropeptides which have important roles in regulating mammalian social behaviors, such as maternal behavior. To obtain insight about their function, we created quadruple knockout mice of these genes, and these mice expressed normal maternal behavior. The result of this study suggested that these neuropeptides have different effects on maternal behavior among species and among behavioral contexts, and that they have rather a limited role in the C57BL/6 mouse maternal behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	890,000	267,000	1,157,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,940,000	582,000	2,522,000

研究分野： 医歯薬学

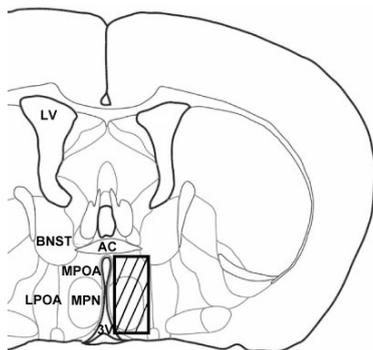
科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード： 養育行動・KOマウス・視床下部・オキシトシン・バソプレシン

## 1. 研究開始当初の背景

児童虐待や母性剥奪が成人後のうつ病、不安神経症、人格障害、次世代への虐待などの発症率を高めることは臨床的に古くから知られている。一方で、なぜ虐待するかという親側の要因についてはまだほとんどわかっていない。その原因としては正常な養育行動の分子神経基盤が不明であることが挙げられる。養育行動とは「仔の生存の可能性を高めるような親の行動」であり、全ての哺乳類の仔の生存に必須である。そのため、親の脳内で養育本能をつかさどるメカニズムの基本的な部分は進化的に保存されていると考えられ、齧歯類が主なモデルとして研究されている。養育開始後、脳内の内側視索前野 (MPOA, 図1) で転写活性の指標である c-Fos 及び FosB の発現が上昇することなどから、MPOA が養育中枢と考えられているが、その分子神経基盤については国内外でもほとんど研究が進んでいなかった。

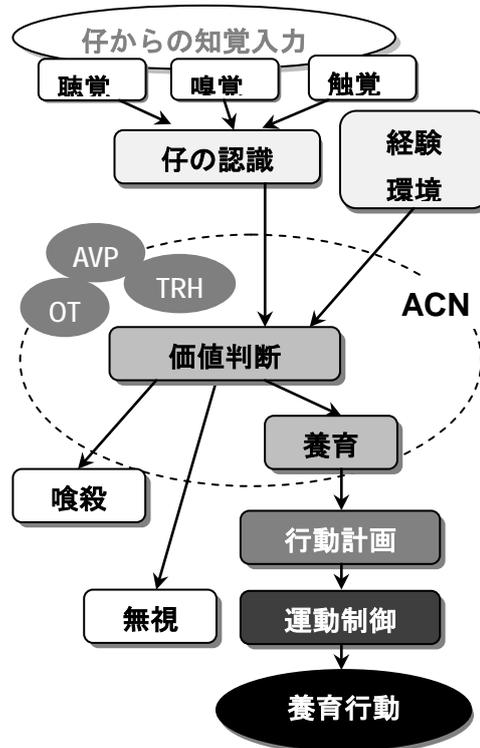
図1 視床下部 内側視索前野 (MPOA, 斜線部)



このような背景を踏まえ、申請者の所属研究室では哺乳類に共通する養育行動理解とその異常の原因解明を目指し、養育行動の分子神経基盤を明らかにしてきた。その結果、これまで脳内養育行動中枢と考えられてきた MPOA の中でも前交連核 (ACN) が特に養育行動に重要であることが明らかになっていた (図2)。ACN にはオキシトシン (OT) やバソプレシン (AVP)、サイロトロピン放出ホルモン (TRH) といった神経内分泌細胞が分布しており、MPOA の神経細胞にはそれらの受容体を発現するものが多くあることから、これらの分子は養育行動の発現に深くかかわっていることが示唆されていた。しかし、OT もしくはその受容体をノックアウトしたマウスの表現型に養育行動の異常が検出できたとする報告 (Pedersen ら 2006; Takayanagi ら 2005) と異常が検出できなかった報告があり

(Nishimori ら 1996; Young ら 1996; Macbeth ら 2010)、一貫した結果は得られていない。またその他の分子の遺伝子改変マウスでは養育行動の異常は報告されておらず、養育行動における機能は不明であった。

図2 養育行動の神経回路モデル



## 2. 研究の目的

養育行動中枢である MPOA 内で、特に養育行動時に転写活性が高くなる ACN には OT、AVP、TRH の 3 種の神経内分泌細胞が分布する。したがってこれらの神経ペプチドは養育行動に必要な情報処置の各段階に重要な役割を果たしている可能性が高い (図2)。しかし、これらの遺伝子単独の遺伝子改変マウスの養育行動は、上述の通り一貫した結果は得られていない。その原因としてこれらのニューロンは発生的起源が同一であること、これらのホルモンのレセプターは全て Gq/11 を下流に持つ 7 回膜貫通型レセプターであることなどから冗長的機能を担っている可能性がある。また、前脳特異的に Gq/11 の発現を抑制した遺伝子改変マウスでは顕著な養育行動異常が見られる。以上のことから、これらの 3 つの神経ペプチドは共同して養育行動の発現を促進している可能性の着眼に至った。

そこで、これらの神経ペプチドの養育行動の発現制御における機能についての知見を得るため、これらの分子もしくはその受容体のノックアウトマウスを交配させ、2 重もしくは 3 重、4 重に遺

伝子を破壊したマウスを作製した。これらのマウスの表現型解析によって、これらの神経ペプチドの役割を行動レベルで明らかにすることを目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

オキシトシン (OT)、オキシトシンレセプター (OTR)、バソプレシンレセプター1a 及び 1b (AVPR1a, AVPR1b)、TRH の各遺伝子を KO したマウス 5 系統を用いて、[OT, AVPR1a, AVPR1b, TRH] の 4 遺伝子を破壊したマウスと、[OTR, AVPR1a, AVPR1b] の 3 遺伝子を破壊したマウスを作製した。各マウスの遺伝子型判定には PCR 検定法を用いた。

作成した多重 KO マウスとその同腹のマウスをコントロールとして用いて、仔に対する行動を評価した。使用した C57BL/6J 系統のマウスでは、メスの場合未経産でも仔に対する養育行動を示す。オスの場合、交尾未経験だと仔に対する攻撃行動を示し、交尾の経験があり、一定期間メスと同居すると仔に対する養育行動を示すようになる。これらのことから、実験では雌雄ともに交尾前及び出産 (交尾) 後の個体において仔に対する行動を観察した。

養育行動を行う個体ではマウスの飼育ケージに仔マウスを導入すると、仔を巣へ運び、仔をなめるなどの一連の行動を示すことが知られている。評価項目は、仔を巣に運び始めるまでの時間、仔を巣に全て運び終わるまでの時間と、仔に対する抱え込み行動、仔をなめる行動、巣作り行動の長さを養育行動の指標として用いた。また、仔に対して攻撃行動を示した場合にはその時間を計測し、その後の観察は行わなかった。

### 4. 研究成果

作成した全てのマウス系統において、成長及び繁殖行動に明らかな異常は検出されなかった。ただし、OT 及び OTR 遺伝子のいずれかを欠いた全てのマウスに射乳障害が確認され、また一部のマウスでは出産遅延などの異常が認められた。このため、明らかに出産に異常が見られた個体 (OT+/-: 0/16, OT-/-: 1/16; OTR+/-: 0/18, OTR-/-: 8/27) においては、メスの出産後の行動試験は行わず、安楽死処分を行った。

検討した 5 項目のうち、仔を巣に運び始めるまでの時間と、仔を巣に全て運び終わるまでの時間は全ての系統で行動試験の回数を重ねるごとに短くなっていった。同様に、仔を抱え込む行動は行動試験の回数を重ねるごとに長くなり、出産後が最も長かった。また、巣作り行動については逆の傾向が見られ

た。これらの行動に関しては遺伝子型間で有意な差は検出されなかった。一方、仔をなめる行動に関しては遺伝子型間で差が見られた。交尾前では有意差がなかったが、出産後の 1 回目の観察では、各 KO マウスで有意に仔を舐めていた時間が長くなった。ただし、この差は出産後の 2 回目の観察時には消失した (図 3)。

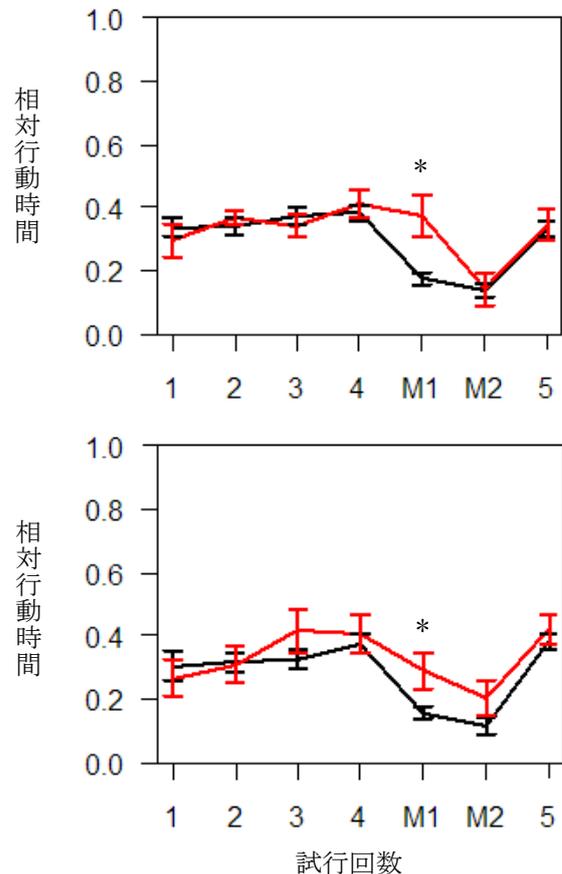


図 3 多重遺伝子破壊マウスの仔をなめる行動  
上段は 3 遺伝子破壊 (TKO)、下段は 4 遺伝子破壊 (QKO) のもの。M1 及び M2 は仔導入直後の観察 (M1) 及び導入から 30 分後の観察 (M2) を示す。赤線が多重 KO マウス、黒線がその同腹マウス  
\*:  $p < 0.05$

交尾前のオスの仔に対する行動については、多くの個体で仔への攻撃行動が観察されたが、遺伝子型間で有意な差は検出されなかった (QKO: 19/21, コントロール: 18/21; TKO: 7/11, コントロール: 11/18, 図 4)。また、オスによる仔への攻撃行動は交尾及び妊娠メスとの同居経験によって抑制され、オスは養育行動を示すようになることが知られている。本研究でも多くのオスが交尾、メスとの同居を経て養育行動を示すようになったが、遺伝子型間で有意な差は検出されなかった (QKO: 13/19, コントロール: 13/18; TKO: 5/7, コントロール: 9/11, 図 4)。ただし、TKO に関し

では例数が十分とは言えず、実験を追加する必要がある。

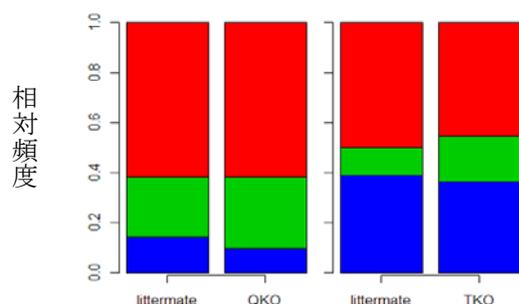


図 4 多重遺伝子破壊オスマウスの仔に対する行動

青:交尾経験に関わらず仔に攻撃しなかった個体, 緑: 交尾経験の有無に関わらず仔に攻撃した個体, 赤: 交尾前に仔に攻撃し、交尾後に仔への攻撃をしなくなった個体

オキシトシンを始めとするこれらの神経ペプチドの養育行動における重要性は古くから示唆されてきており、例えば Pedersen と Prange(1979)はオキシトシンの脳室内投与によってメスラットの養育行動が促進されることを示した(他にも、Pedersenら 1985, Champagneら 2001などもオキシトシンと養育行動の関連について報告している)。また、オキシトシンもしくはその受容体遺伝子をノックアウトしたメスマウスでは養育異常があることが報告されている(Pedersenら 2006; Takayanagiら 2005, ただし養育異常はないとする Macbethらの 2010年の報告もある)。本研究ではこれらの報告とはマウスのバックグラウンド系統や実験手法に違いがあり、本研究で用いた手法では養育行動の異常は検出できなかった。本研究の結果は少なくとも C57BL/6J 系統のマウスの養育行動においてはこれらの分子が中心的な役割を果たしているとは言えないことを示唆しており、これらの分子が種間及び異なる環境間で大きく異なる作用を持つ、もしくは養育行動の中でも非常に限定的な状況にのみ作用することを示唆している。さらに、マウス養育行動には今回検討した 4 遺伝子以上に重要な役割を果たす分子が存在することも示唆された。

## 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 1 件)

① K.O. Kuroda, K. Tachikawa, S. Yoshida, Y. Tsuneoka, M. Numan, 2011(in press). Neuromolecular basis of parental behavior in laboratory mice and rats: with special emphasis on technical issues of using mouse genetics. Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry.

〔学会発表〕(計 2 件)

① Y. Tsuneoka, S. Yoshida, K. Tachikawa, T. Kato, M. Numan and K.O. Kuroda. Role for the anterior commissural nucleus and adjacent areas in regulating mouse maternal behaviour. Parental Brain Conference IV, Edinburgh, U. K., 2010 年 9 月 2 日

② Y. Tsuneoka, S. Yoshida, K. Tachikawa, T. Kato, M. Numan and K.O. Kuroda. Possible role for anterior commissure nucleus in the regulation of mouse maternal behaviors. 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones, Kitakyusyu, Japan., 2009 年 9 月 5 日

〔その他〕

ホームページ等

[http://asb.brain.riken.jp/index\\_j.html](http://asb.brain.riken.jp/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

恒岡 洋右 (TSUNEOKA YOUSUKE)

独立行政法人理化学研究所・黒田研究ユニット・研究員

50549011

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者