

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08527

研究課題名(和文)オキシトシン神経の投射経路別機能分担の解明

研究課題名(英文)Analysis of projections from oxytocin neurons and oxytocin receptors

研究代表者

犬束 歩 (Inutsuka, Ayumu)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：30584776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部に局在するオキシトシン神経は多様な脳領域に投射しており、社会行動・摂食・ストレス応答といった多様な生理現象に関与している。本研究は、複雑な入出力を持つオキシトシン神経の個別の投射経路を選択的に描出・活動操作し、その機能分担あるいは機能連関を明らかにすることを目的とした。研究成果として、前頭前皮質のオキシトシン受容体発現細胞には従来報告されているソマトスタチン陽性インターニューロン以外の投射ニューロンが存在することを見出した。また、逆行性感染するAAVベクターを用いた遺伝子発現制御によって、視床室傍核のオキシトシン受容体発現細胞が扁桃体に投射していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、社会性に関わるホルモンとして知られるオキシトシンの効果がなぜ多様に変化しうるのかを調べたものです。オキシトシンを作り出す神経は脳内の様々な場所に繋がっています。この繋がりは複雑ですが、遺伝学的な手法を駆使することでそれを解きほぐすことができました。今後は得られた知見を基に、それぞれの繋がりがどんなはたらきをしているのかを明らかにします。

研究成果の概要(英文)：Oxytocin neurons localized in the hypothalamus project to diverse brain regions, and are involved in diverse physiological responses such as social behavior, feeding, and stress response. We aimed to visualize and manipulate individual projection pathways of oxytocin neurons that have complex inputs and outputs. The purpose of this study was to elucidate individual functions or the functional relationship between the projections. Our results showed that the oxytocin receptor-expressing neurons in the prefrontal cortex includes projection neurons other than somatostatin-positive interneurons. In addition, we used retrograde infection of AAV vectors to investigate the projection pattern of oxytocin receptor-expressing neurons in the paraventricular nucleus.

研究分野：神経科学

キーワード：オキシトシンニューロン オキシトシン受容体 前頭前皮質 GFP-dependent Cre 逆行性感染 視床室傍核

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物が生存にとって最適な行動を選択するためには、いくつもの生理応答を統合的に変化させる必要がある。神経ペプチドの一つ、オキシトシンには出産時の子宮収縮や授乳時の乳汁射出への関与が古くから知られている。その後、つがい関係の構築(Ross, 2005-J Neurosci)や子育て行動に必要であること(Takayanagi, 2005-PNAS)、ヒトにおいても経済学ゲームにおける信頼性に関与すること(Kosfeld, 2005-Nature)、といった社会性への関わりが明らかとなった。近年では点鼻投与することで自閉症において損なわれている社会性を改善させることも報告され(Guastella, 2010-Biol Psychiatry)、日本でも大規模な臨床試験が進行中である。しかし、オキシトシンの効果は社会的文脈、人格、生育歴、性別などに依存して変化することが明らかになりつつある。

オキシトシンニューロンには、摂食抑制に関わること(Atasoy, 2012-Nature)、脊髄の交感神経に投射してエネルギー消費量の調節をすること(Sutton, 2014-J Neurosci)など摂食やエネルギー代謝に関わる報告もなされており、多様な生理応答を複雑に調節するハブとして機能していると考えられる。こうした入出力に関わる投射経路の複雑さがオキシトシンの機能実態を分かりにくくしている。複雑な入出力を持つ神経集団においては、投射経路の異なるサブpopulationが存在することが想定される。例えば、中脳黒質緻密部に局在するドーパミン神経は線条体に投射する一方で、腹側被蓋野に局在するドーパミン神経は側坐核へと投射している。こうしたドーパミン神経における投射経路の違いは解剖学的な違いにとどまらず、機能的な特性の違いも示している(Lammel, 2008-Neuron)。オキシトシンニューロンにも、下垂体後葉に投射する神経群と辺縁系・脳幹部に投射する神経群が存在し、投射先の異なる個別の神経回路ユニットとして機能している。近年では、このそれぞれの神経群の中にも個別の投射経路を持つサブpopulationが存在することも指摘されている。

### 2. 研究の目的

上記のように視床下部に局在するオキシトシンニューロンは、多様な脳領域に投射しており、機能的にも社会行動・摂食・ストレスといった多様な生理現象に関与している。現在、オキシトシンが社会行動に果たす役割が大きく注目を集めているが、オキシトシンのもたらす効果は生育歴や社会的文脈などの多彩な要因に修飾され、その実態が捉えづらい。本研究は、複雑な入出力を持つオキシトシンニューロンの個別の投射経路を選択的に活動操作し、その機能分担/機能連関を明らかにすることを目的とした。本研究によって、オキシトシンニューロンによる複雑な制御機構を分解し、個別の生理機能に対応する神経回路の集合体として捉えることが可能になると期待した。3年の研究期間内に次の2点について明らかにすることを目的とした。オキシトシンニューロンの投射経路における解剖学的特性。オキシトシンニューロンの投射経路ごとの機能的役割分担。

#### オキシトシンニューロンの投射経路における解剖学的特性

オキシトシンニューロンの投射先には、摂食・代謝機能に関与している弓状核、情動に関与している扁桃核、報酬系に関与している側坐核、といった領域的にも機能的にも異なる複数の脳領域が含まれている。申請者はこうした異なる脳領域に投射しているオキシトシンニューロンが、(A)局在の異なる細胞集団を形成しているのか、(B)モザイク状に混在しているが分離した細胞集団を形成しているのか、(C)同一の細胞集団が複数の領域に同時に投射しているのか、といった解剖学的特性について明らかにすることを目的とした。

#### オキシトシンニューロンの投射経路ごとの機能的役割分担

これまで、オキシトシンニューロン特異的な活動操作によって、オキシトシンニューロンが摂食・代謝、情動、社会行動など多様な行動に関与していることが示されてきた。こうした実験的な活動操作においては全てのオキシトシンニューロンが活性化される。しかし、同期的な活性化は、分娩や射乳といった特殊な状況を除いて生じ得ないと考えられる。また、多様な行動が個別の投射経路によって、どのように連動して、あるいは分離して制御されているかは分かっていない。本申請では、オキシトシンニューロンからの投射経路を個別に活動操作し、表出する行動を解析する。それによって、社会的記憶の形成や摂食といった異なる機能がどのように機能分担して、あるいは統合的に制御されているのか明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、当初イヌアデノウイルス(CAV)ベクターを利用した逆行性感染の利用を想定していたが、研究期間内に導入した逆行性感染するキャプシド(Tervo, 2016-Neuron)を用いたアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの逆行性感染効率が高かったために、主にAAVベクターを用いた遺伝子発現制御に方針転換した。また、逆行性トレーサーとしてRetrobeadsの脳内局所投与を行い、投射経路の描出を試みた。順行性のトレーシングとしては、膜移行性GFPを選択的に発現させるAAVベクターを用いて視床下部の室傍核に存在するオキシトシンニューロンから延びる軸索を描出し、それぞれの脳領域における密度を解析した。オキシトシン受容体は、抗体を用いた脳切片の免疫染色では局在を捉えるのが未だに困難である。そのため、オキシトシン受容体の発現細胞の同定には主にオキシトシン受容体の発現細胞にGFPの改変体であるVenusを発現す

る O<sub>xtr</sub>-Venus ノックインマウスを用いた。さらに、オキシトシン受容体発現ニューロン特異的な遺伝子発現制御をおこなうために、GFP-dependent Cre(Tang, 2015-Nat Neurosci)を利用した。これは GFP を標的として結合するナノボディを Split-Cre と連結し、GFP 存在下でのみ Cre の再会合によって遺伝子発現制御を達成する分子ツールである。よって、O<sub>xtr</sub>-Venus マウスの脳内標的領域に GFP-dependent Cre を発現させる AAV と Cre 特異的に遺伝子発現する AAV を混合して局所投与することで、オキシトシン受容体発現細胞特異的な遺伝子発現制御が達成される。GFP-dependent Cre の作動原理は Split-Cre に連結するナノボディを選択することで、GFP 以外の標的分子にも応用できる可能性がある。GFP とともに遺伝子改変動物で幅広く細胞同定に使用されている蛍光分子としては赤色蛍光タンパク質(RFP)がある。そこで、GFP と同程度のサイズであり複数の特異的なナノボディが作成されてきた RFP を標的とし、RFP-dependent Cre を作成することを試みた。

#### 4. 研究成果

研究期間内において、大別して以下の3つの研究成果を得た。

##### (1) オキシトシンニューロンおよびオキシトシン受容体発現細胞の投射経路解明

膜移行性 GFP を選択的に発現させる AAV ベクターを用いて視床下部室傍核のオキシトシンニューロンから延びる軸索を可視化することに成功した。オキシトシンニューロンから延びる軸索は前頭前皮質や視床室傍核、視床下部腹内側核、中脳水道周囲灰白質など多くの脳領域に及んでいた。社会的敗北ストレスを与えた動物では特に視床室傍核、視床下部腹内側核、中脳水道周囲灰白質などで cFos が上昇することも判明した(Nasanbuyan, 2018-Endocrinology)。しかし、オキシトシンニューロンから軸索が多く伸びていることが判明している領域に対する逆行性トレーサーや CAV2、AAV retro などを用いた逆行性感染を試みた実験は、オキシトシンニューロンにおける陽性細胞が少ないという問題に突き当たった。この結果は、トレーサーを局所投与した動物の他の脳領域では多くの逆行性感染・逆行性輸送が観察されたことを併せて考えると、オキシトシンニューロンの細胞としての特性に由来している可能性がある。そこで、途中からはオキシトシンニューロンではなく、オキシトシン受容体発現細胞を対象とした投射経路解明に重点をシフトした。O<sub>xtr</sub>-Venus マウスを用いた逆行性トレーサーの局所投与実験で、前頭前皮質のオキシトシン受容体発現細胞には従来報告されていたソマトスタチン陽性のインターニューロンだけでなく、扁桃体に投射する投射ニューロンが存在することを見出した。通常、脳内におけるオキシトシン受容体発現細胞における遺伝子発現制御には O<sub>xtr</sub>-Cre マウスの利用が適切であると想定される。研究期間内において我々は O<sub>xtr</sub>-Cre マウスを複数ライン導入し、Cre 依存的に tdTomato を発現させるレポーターマウスとの交配を通じて Cre の発現分布を検討した。その結果、同じノックインマウスであるにも拘らず、発現部位や発現量にはそれぞれのラインで違いが見られており、O<sub>xtr</sub>-Cre マウスを用いた遺伝子発現制御には慎重な検討を重ねている。以上の理由から、本研究の研究期間内においては主に O<sub>xtr</sub>-Venus マウスに対する GFP-dependent Cre の利用によって、遺伝子発現制御を行った。

##### (2) 蛍光分子で標識された細胞を特異的に遺伝子発現制御する手法の開発

前頭前皮質のオキシトシン受容体発現細胞を特異的に遺伝子発現制御するために、我々は GFP-dependent Cre を利用した。GFP-dependent Cre の作動原理は Split-Cre に連結するナノボディを選択することで、GFP 以外の標的分子にも応用できる可能性があった。そこで、GFP と同程度のサイズであり複数の特異的なナノボディが作成されてきた RFP を標的とした RFP-dependent Cre を作成することを試みた。Split-Cre の N 末端側と C 末端側に連結させる RFP 特異的なナノボディもしくは DARPin(designed ankyrin repeat protein)と呼ばれる人工タンパク質を  $8 \times 8 = 64$  通りスクリーニングし、RFP の存在下のみで Cre リコンビナーゼの組換え活性が発揮される組み合わせを複数見出した(ICN2018 発表等)。グルココルチコイド受容体(GR)はストレス応答に深く関与している。社会的敗北ストレスは GR の活性化を誘導し、その結果、GR 関連遺伝子が発現する。GR はリガンドが結合した後、二量体を形成して核内移行する。GR 活性化による RFP の核内移行は、RFP 依存的な Cre 活性を誘導した。この結果は、生きた動物の GR 活性化を検出する新しい方法を提供する可能性がある。

##### (3) 青色光の生体内透過性を可視化する遺伝学的手法の開発

投射経路を同定した後にその機能を解析するためにはオプトジェネティクスや in vivo 顕微鏡法など青色光を用いた光操作あるいはイメージング技術が必要となる。そこで、生体内での青色光の透過範囲を簡便に可視化する手法として、LINuS(light-inducible nuclear localization signal)を用いた遺伝学的手法を開発した(Inutsuka, 2020-BBRC)。これは血液脳関門を透過する AAV ベクターを利用することで、眼窩静脈叢投与によって簡便に生体内に青色光によって核内移行する赤色蛍光分子を発現させる技術である。現在、この技術を利用しながらオキシトシン受容体発現細胞におけるカルシウムイメージング等に着手している状況である。

以上の研究成果の他に AAV ベクターを用いた共同研究などで挙げた成果については成果欄参照。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Matsui Sho, Sasaki Tsutomu, Kohno Daisuke, Yaku Keisuke, Inutsuka Ayumu, Yokota-Hashimoto Hiromi, Kikuchi Osamu, Suga Takayoshi, Kobayashi Masaki, Yamanaka Akihiro, Harada Akihiro, Nakagawa Takashi, Onaka Tatsushi, Kitamura Tadahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07033-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Thannickal Thomas C., John Joshi, Shan Ling, Swaab Dick F., Wu Ming-Fung, Ramanathan Lalini, McGregor Ronald, Chew Keng-Tee, Cornford Marcia, Yamanaka Akihiro, Inutsuka Ayumu, Fronczek Rolf, Lammers Gert Jan, Worley Paul F., Siegel Jerome M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Opiates increase the number of hypocretin-producing cells in human and mouse brain and reverse cataplexy in a mouse model of narcolepsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaa04953 ~ 4953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aao4953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kikusui Takefumi, Kajita Mayu, Otsuka Natsumi, Hattori Tatsuya, Kumazawa Kanako, Watarai Akiyuki, Nagasawa Miho, Inutsuka Ayumu, Yamanaka Akihiro, Matsuo Naoki, Covington Herbert E., Mogi Kazutaka	4. 巻 346
2. 論文標題 Sex differences in olfactory-induced neural activation of the amygdala	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 96 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2017.11.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nasanbuyan Naranbat, Yoshida Masahide, Takayanagi Yuki, Inutsuka Ayumu, Nishimori Katsuhiko, Yamanaka Akihiro, Onaka Tatsushi	4. 巻 159
2. 論文標題 Oxytocin-Oxytocin Receptor Systems Facilitate Social Defeat Posture in Male Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 763 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2017-00606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikusui Takefumi, Kajita Mayu, Otsuka Natsumi, Hattori Tatsuya, Kumazawa Kanako, Watarai Akiyuki, Nagasawa Miho, Inutsuka Ayumu, Yamanaka Akihiro, Matsuo Naoki, Covington Herbert E., Mogi Kazutaka	4. 巻 346
2. 論文標題 Sex differences in olfactory-induced neural activation of the amygdala	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 96 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2017.11.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ayumu Inutsuka, Akira Yamashita, Srikanta Chowdhury, Junichi Naka, Masamichi Ohkura, Toru Taguchi & Akihiro Yamanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep29480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Miyamoto, Daichi Hirai, Chi Chung Alan Fung, Ayumu Inutsuka, Maya Odagawa, Takayuki Suzuki, Roman Boehringer, Chinnakkaruppan Adaikkan, Chie Matsubara, Norio Matsuki, Tomoki Fukai, Thomas J McHugh, Akihiro Yamanaka & Masanori Murayama	4. 巻 352
2. 論文標題 Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1315-1318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaf0902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chowdhury Srikanta, Hung Chi Jung, Izawa Shuntaro, Inutsuka Ayumu, Kawamura Meiko, Kawashima Takashi, Bito Haruhiko, Imayoshi Itaru, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Yamanaka Akihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Dissociating orexin-dependent and -independent functions of orexin neurons using novel Orexin-Flp knock-in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.44927	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inutsuka Ayumu, Kimizuka Norihiro, Takanohashi Natsuki, Yakabu Hisashi, Onaka Tatsushi	4. 巻 522
2. 論文標題 Visualization of a blue light transmission area in living animals using light-induced nuclear translocation of fluorescent proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 138 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 犬束歩、溝口博之、金子涼輔、野村黎、高浪景子、坂本浩隆、尾仲達史
2. 発表標題 RFPを用いたグルココルチコイド受容体の核内移行・二量体形成の検出
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayumu Inutsuka, Tatsushi Onaka
2. 発表標題 RFP-BASED MOLECULAR TOOLS TO DETECT AND UTILIZE GLUCOCORTICOID RECEPTOR ACTIVATION
3. 学会等名 International Congress of Neuroendocrinology 2018 (ICN 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayumu Inutsuka, Hiroyuki Mizoguchi, Ryosuke Kaneko, Rei Nomura, Keiko Takanami, Hirotaka Sakamoto, Tatsushi Onaka
2. 発表標題 Monomeric and dimeric RFP-dependent Cre and its application to detect glucocorticoid receptor activation
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 犬束歩、吉田匡秀、高柳友紀、尾仲達史
2. 発表標題 前頭前皮質に局在するオキシトシン受容体発現ニューロンのストレス応答における機能解析
3. 学会等名 第46回自律神経生理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 犬束 歩、溝口 博之、金子 涼輔、尾仲 達史
2. 発表標題 ナノボディおよびDARPinを利用したRFP-dependent Creの開発
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 犬束 歩、尾仲 達史
2. 発表標題 RFP を用いたグルココルチコイド受容体の核内移行・二量体形成の検出
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 犬束歩、吉田匡秀、高柳友紀、山中章弘、尾仲達史
2. 発表標題 視床下部特定回路の活動操作と活動記録
3. 学会等名 自律神経研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ayumu Inutsuka, Masahide Yoshida, Yuki Takayanagi, Tatsushi Onaka
2. 発表標題 Genetic manipulation of oxytocin receptor-expressing neurons using GFP-dependent Cre recombinase and Oxtr-Venus knockin mice
3. 学会等名 13th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 犬束歩、山中章弘	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 139
3. 書名 実験医学2018年9月号 Vol.36 No.14 (担当範囲:クローズアップ実験法: DREADDsを用いた自由行動下の動物における神経活動操作)	

1. 著者名 犬束歩、山中章弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 脳科学辞典編集事務局	5. 総ページ数 1
3. 書名 脳科学辞典 (視床下部の項目)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 遺伝子発現制御方法及び遺伝子発現制御キット	発明者 犬束歩、尾仲達史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P16035	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	尾仲 達史  (Onaka Tatsushi)  (90177254)	自治医科大学・医学部・教授    (32202)	行動実験に係る協力