

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06509

研究課題名(和文) 行動の性差を生み出す内側視索前野の機能解剖学的解析

研究課題名(英文) Functional and anatomical study of medial preoptic area regulating sexual dimorphic behaviors

研究代表者

恒岡 洋右 (Tsuneoka, Yousuke)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：50549011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内側視索前野は性的二型がみられる生得的な行動の中核領域として知られている。我々は内側視索前野において新規な遺伝子Moxd1などによって性的二型細胞集団を見出した。この細胞集団の機能を検討するため、遺伝子改変マウスの作成とその局所的遺伝子導入により、行動表現型の変化を検討した。その結果、我々が見出した性的二型細胞集団は性行動や養育行動と深く関わっていることが示唆された。また、その過程で新たなISH法の開発に迫られ、その開発に成功した。この手法では簡便性や再現性に優れていると共に、感度も非常に高い技術であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、性は社会的にも連続的なものであり多様性があるものとして捉えられるようになりつつあるものの、性典型的な行動がどのようなメカニズムで表出されるのかについては大部分が不明である。そのような性差を脳の構造的な差異として示すことが出来るという点に本研究の意義がある。また、新規ISH法は非常に簡便かつ低コストであり、様々な生体情報をこれまで以上に容易に得ることが出来る技術である。

研究成果の概要(英文)：The medial preoptic area has been known to be a brain center of instinctive behaviors. We identified some gene expressions for the markers of sexually dimorphic area in the medial preoptic area, such as Moxd1 gene. To verify the functions of the sexually dimorphic cell groups, we investigated the behavioral change in the transgenic Cre-driver mice introduced some genes by AAV local injection. As a result, it was suggested that the cell groups which showed sexual dimorphism had functions on the sexual behavior and/or the parental behavior. In addition, we developed new ISH protocol. In this ISH protocol, we can visualize single copy mRNA in tissue, and other advantages in our protocol were shown.

研究分野：神経科学

キーワード：MPOA 性的二型 ISH Moxd1

1. 研究開始当初の背景

多くの行動を制御する神経回路は雌雄で共通であるにも関わらず、同じ刺激に対して雌雄で異なる行動をするのはなぜかという問いへの解答は、様々な環境からの刺激に対してどのように最適な振る舞いを選択するかという神経機構の本質を知る上で良いモデルとなる (de Vries and Södersten, *Horm Behav* 2009; Yang and Shah, *Neuron* 2014)。

行動の雌雄差の一つとして性ホルモンの関与が挙げられる。性ホルモンは多くの遺伝子発現を制御することがわかっているが、その作用はあくまで修飾的なものに過ぎず、行動における「雄型の行動をとるか雌型の行動をとるか」という選択を説明するものではない。このため、性ホルモンよりも脳の構造的な性差(性的二型)が行動の性差を実現していると考えられているが (de Vries and Södersten, *Horm Behav* 2009)、実際にそれが実証された研究は極めて少ない (Scott et al. *Nature* 2014; Yang et al. *Cell* 2013)。内側視索前野は養育行動や性行動の中核として知られ、攻撃行動への関与も指摘されているが、解剖学的知見に乏しく亜領域レベルでの機能は検討されてこなかった。我々はこの領域において新たに複数の性的二型細胞集団があることを発見した。

2. 研究の目的

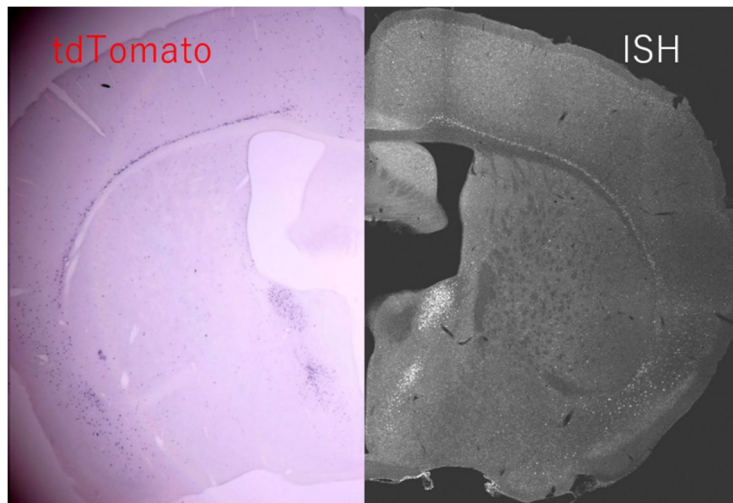
内側視索前野の性的二型行動に対する役割を解明するため、内側視索前野で新たに発見した性的二型細胞集団と既知の性的二型細胞集団について、その組織学的特徴を明らかにし、機能における示唆を得る。特に本研究では、性行動と養育行動における検討を行った。

3. 研究の方法

- 1) 内側視索前野の性的二型マーカーである、*Moxd1*, *Penk*, *Neurotensin* について、その発現を ISH 法を用いて確認する。それぞれの細胞が性的二型を示す行動のいずれで活動しているかについて検討するために、性行動や養育行動を行わせたマウスの脳切片を作製し、神経活動マーカーである *c-Fos* を免疫組織化学的に検出することで、それぞれの細胞における機能的示唆を得る。
- 2) 通常の ISH 法では *c-Fos* との共染色は難しいため、新規な ISH 法の開発も行う。*In situ* HCR 法は非特異的反応が少なく、高感度な染色方法であり、1 コピーレベルの検出が可能である。この手法を改良した。具体的には、*in situ* HCR 法で用いられる長い一本鎖 DNA の構造を検討し、その鎖長を短くすることで組織への浸透性を向上し、*c-Fos* 抗原性を失わせるような細胞浸透処理無くして mRNA 検出が出来るような系である。
- 3) それらの遺伝子の Cre ドライバーマウスを作製もしくは購入し、アデノ随伴ウイルス(AAV) による部位特異的・細胞種特異的遺伝子導入を行うことで、細胞の形態について確認するとともに、薬理遺伝学的な細胞活性の操作を併用することで行動に与える影響を検討する。AAV による遺伝子導入としては、軸索標識が可能な細胞膜移行型 GFP の導入と、人工受容体である *hM3Dq* もしくは *hM4Di* の導入を行う。それぞれのマウス系統について、上記の *c-Fos* 染色から示唆される行動について、細胞の神経活動操作をした際に、行動に変化が起こるかについて検討した。

4. 研究成果

- 1) *Moxd1* 遺伝子については研究開始前にその性的二型を持った発現については報告していた。そこで、*Moxd1* 遺伝子の下流に 2A 配列を用いて Cre 遺伝子を導入した *Moxd1*-Cre マウスの作成を行った。CRISPER-Cas9 システムにより相同組み換えを起こしたマウス ES 細胞を導入し、得られた組み換えマウスから PCR 法によって選抜を行い、結果として 2 系統が *Moxd1*-Cre マウスとして得られた。このマウスに、赤色蛍光タンパクである tdTOMATO を Cre 依存的に発現するマウスを交配させ、脳内の Cre 発現の分布を確認したところ、ISH 法による発現とほぼ一致した結果が得られた(図 1)ことから、マウスの作成は成功したと考えられた。



このマウスを用いて、膜移行型 GFP を持つ AAV を SDN-POA 及び BNSTpr に導入したところ、SDN-POA への導入では BNSTpr, AVPV, PVN, Mamillary Nucleus, VMHvl などに投射が確認された。一方で、BNSTpr への GFP 導入では MPOA のやや内側と、AVPV, PVN, VMHvl, Mamillary Nucleus, MePD および stria terminalis に投射が確認できた。

図 1 . Moxd1-Cre マウスのバリデーション

- 2) Neurotensin 陽性細胞の組織学的検討ではオスで細胞数が多く、雌で細胞数が少ないという性的二型が確認できた。さらにこの細胞集団では養育行動や性行動の双方で c-Fos の発現が見られたことから、性行動依存的な養育行動変化における機能も示唆された。特に養育行動では c-Fos の発現が多く、養育行動のいずれかに関わっている可能性が高い。そこで、hM3Dq を用いた細胞活動の亢進実験を行ったところ、仔への暴露が無い状態では巣作り行動の大幅な亢進が見られた。また、雄マウスは交尾未経験では仔へ攻撃行動を行うが、Neurotensin 陽性細胞の活性を上昇させたところ、仔への攻撃性の減弱が見られた。ただし、この変化が見られたマウスは数個体に留まることから、より特異的な操作で結論を出す必要がある。同様に、hM4Di による活性の抑制では、既に養育行動を行った実績のある雄マウスにおいて、仔への攻撃性が高まる傾向が見られた。
- 3) Penk 陽性細胞の検討では、通常の細胞数は雌が多く、雄で少ない二型があったが、性ホルモン処理によって変動したため、細胞の種類で実際に二型があるのかについては今後検討していく必要がある。一方、Penk 陽性細胞は雄の性行動時に c-Fos 発現が多く見られたことから、雄の性行動に関わる細胞群であることが強く示唆された。実際に、hM3Dq による神経活動の亢進を行ったところ、性行動モチベーションの上昇が見られ、時間当たりのマウント回数や挿入回数の増加が起こった。また、射精に至るまでの時間が大幅に短縮された。マウスによっては、通常は性行動を行わない麻酔した雌に対しても活発な性行動を行っていた。また、マウスによっては雄マウスに対する攻撃行動の上昇も見られたが、このような表現型は一部のマウスに限られていたことから、手術の際の AAV 導入部位の差によるものと考えられる。内側視索前野に限らず、その近傍領域である BNST も攻撃行動に強く関与していると考えられ、Penk 陽性細胞は攻撃行動時に BNST で c-Fos の活性が見られたことから、Penk 陽性細胞は領域特異的に別の性的二型行動を制御している可能性がある。
- 4) *In situ* HCR 法を改良するために行ったヘアピン DNA の短鎖化では、既存のヘアピンの鎖長である 72 塩基のものに対して、36 塩基では十分な反応性が得られなかった。しかしながら、toehold 部位の鎖長について条件検討を行ったところ、42 塩基のヘアピン DNA で効率的な反応が誘導でき、同時に安定にノイズを出さない配列も見出すことが出来た。ただし、このような安定なヘアピン DNA は配列に強く依存しており、同様の構造であっても配列が異なる場合にはノイズを産むという特徴があった。蛍光修飾の方法や、適した蛍光色素についても検討してみたところ、DNA と蛍光物質の間にある程度の距離が必要であることが示唆された。このように設計したヘアピン DNA を用いて *in situ* HCR 法を行ったところ、以下のような性質があることが分かった。既存の 72 塩基のヘアピン DNA に比べてコストが半分以下になること、浸透性の上昇に伴ってシグナルも上昇し、ProK 処理も不要であった。さらに、1 コピーレベルの解像度と感度も確保することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuneoka Yousuke, Funato Hiromasa	4. 巻 13
2. 論文標題 Modified in situ Hybridization Chain Reaction Using Short Hairpin DNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2020.00075	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 Kakizaki Miyo, Tsuneoka Yousuke, Takase Kenkichi, Kim Staci J., Choi Jinhwan, Ikkyu Aya, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Yanagisawa Masashi, Funato Hiromasa	4. 巻 20
2. 論文標題 Differential Roles of Each Orexin Receptor Signaling in Obesity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.09.003	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 Tsuneoka Yousuke	4. 巻 94
2. 論文標題 Molecular neuroanatomy of the mouse medial preoptic area with reference to parental behavior	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 39~52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-018-0468-4	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 Tsuneoka Yousuke, Funato Hiromasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Cellular Composition of the Preoptic Area Regulating Sleep, Parental, and Sexual Behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.649159	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 恒岡洋右, 船戸弘正
2. 発表標題 内側視索前野における雄性行動関連細胞の機能解剖学的解析
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 恒岡洋右, 船戸弘正
2. 発表標題 ショートヘアピンDNAを用いたin situ HCR法の開発
3. 学会等名 第125回解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恒岡洋右, 船戸弘正
2. 発表標題 内側視索前野-性的二型核におけるMoxd1陽性細胞の解剖学的解析
3. 学会等名 第124回解剖学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yousuke Tsuneoka, Misaki Minamihara, Sachine Yoshida, Satoko Oda, Takenori Miyamoto, Masaru Kuroda, Hiromasa Funato
2. 発表標題 Glutamatergic neurons in the mouse medial preoptic area regulate parental motivation
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuneoka Y, Funato H
2. 発表標題 Neuroanatomy of the sexually dimorphic nucleus of the medial preoptic area
3. 学会等名 The 3rd Sino-Japan Symposium on the frontier of behavioral neuroendocrinology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 特許権	発明者 恒岡洋右、船戸弘正	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-102648	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 特許権	発明者 恒岡洋右、船戸弘正	権利者 恒岡洋右、船戸弘正、ネッパ ジーン株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2021-008882	出願年 2021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
研究 分 担 者	船戸 弘正 (Funato Hiromasa) (90363118)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------