

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07584

研究課題名(和文) 養育行動発現に向けた分界条の分類と内側視索前野入力シナプス機能の解明

研究課題名(英文) The analysis of stria terminalis projecting to the medial preoptic area

研究代表者

天野 大樹 (Amano, Taiju)

北海道大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：00591950

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)：内側視索前野は子供に対する養育行動か攻撃行動いずれかを選択する上で重要な機能を担っているが、神経回路レベルの機能調節メカニズムは不明な点が多い。本研究では内側視索前野へのグルタミン酸作動性投射を持つ脳領域のうち扁桃体海馬野を活性化することで、仔マウスに対する攻撃行動が増加することが示された。組換え狂犬病ウイルスを用いた実験から外側視床下部、後部扁桃体皮質核、視床などの領域が内側視索前野投射型扁桃体海馬野神経細胞へ入力することが示された。さらに扁桃体海馬野にはオキシトシン受容体やエストロゲン受容体が高密度に存在しているが、それらの機能について電気生理学的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は扁桃体海馬野の神経活動がどのようなメカニズムで調節されているのかについてc-TRIO法による特異的な上流神経回路解析や、単一細胞からの電気生理学的記録、薬理的、組織化学的手法など様々な角度から検証することが出来た。扁桃体海馬野は攻撃行動に寄与することを明らかにしただけでなく、更なる詳細な解析から、雄マウスが父性発現を経て仔マウスへの攻撃をやめ養育を開始した後では、扁桃体海馬野において神経可塑的变化が起こっている可能性が示唆された。以上を踏まえ、将来的には父性発現を含む社会適応時の神経機能変化を説明できる分子メカニズムの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：The medial preoptic area (MPOA) plays an important role for behavioral choice between parenting and aggressive behaviors toward pup. However, the neural mechanism how the neural activity of MPOA neurons are controlled is still unclear. The present study showed that activation of the amygdala-hippocampal area (AHi), which provides glutamatergic projection to the cMPOA, increased the ratio of male mice showing aggressive behavior toward pups. Experiments using a modified rabies virus showed that the MPOA projecting AHi neurons received projection from regions such as the lateral hypothalamus, posterior amygdala cortical nucleus, and thalamus. Furthermore, we addressed the function of oxytocin receptor and estrogen receptor alpha in the AHi by electrophysiological and histochemical experiments.

研究分野：神経薬理

キーワード：内側視索前野 扁桃体海馬野 エストラジオール オキシトシン 攻撃行動 養育行動

1. 研究開始当初の背景

暴力的虐待やネグレクトといった幼少期のストレスは、子供の生命を大きく脅かすのみならず、子供が成人した後のうつ病や不安障害などの精神疾患の発症リスクを上昇させることが報告されている。そのため、子供への暴力的虐待や社会親和性を生み出す脳内メカニズムの解明と養育を促す方策確立が社会的に望まれている。

交尾未経験の雄マウスは仔マウスに対して攻撃することが多く観察されるが、これは性成熟期の間には始まることから、性成熟期に分泌量が増加する性ホルモンが攻撃行動を増強していることが示唆されている (Amano, 2017)。一方で、雌との交尾をはじめ一定期間の同居を経験すると仔マウスに対して母親マウスと類似した養育行動を取るようになる。しかしこのような行動変化のメカニズムについては不明な点が多い。

養育行動および仔マウスに対する攻撃抑制について内側視索前野 (medial preoptic area : MPOA) が中心的な役割を果たしていることが知られている (Tsuneoka, 2013, 2015)。また扁桃体の一部の亜核や分界条床核菱形核 (rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis : BNSTrh) は仔マウスへの攻撃に寄与している可能性が示唆されている。近年トレーサー実験により MPOA の上流神経回路が報告されているが、それぞれのシナプス入力元がどのような機能を持つのか、明らかにすることが課題となっていた。

2. 研究の目的

扁桃体と MPOA・分界条床核との間には分界条と呼ばれる神経線維束が存在しているがそれらの機能について詳細は不明であった。本研究では MPOA に対するシナプス入力元のうち、社会行動に多様な作用を示すエストロゲン受容体や養育行動への寄与が知られるオキシトシン受容体を高密度に発現する扁桃体海馬野 (amygdalohippocampal area : AHi) について調べた。具体的には AHi が行動選択に及ぼす影響やその神経回路ネットワーク機能、および AHi におけるオキシトシンやエストロジールの効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は雄性 C57BL/6J 系マウスを用いて行動試験や組織化学的解析、電気生理学的解析を行った。一部のマウスにおいて、ネプタールまたは塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルファノールの三種混合麻酔下において、脳定位固定装置で固定したマウスに対しては外科的手術を施し、性腺除去やホルモン補充用チューブの皮下への埋め込み、および各種トレーサーや活性化型・抑制型の人工 G タンパク質共役型受容体 (GPCR)、光感受性イオンチャンネル・チャンネルロドプシン等を発現させるための各種アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの各脳領域領域への微小注入を行った。

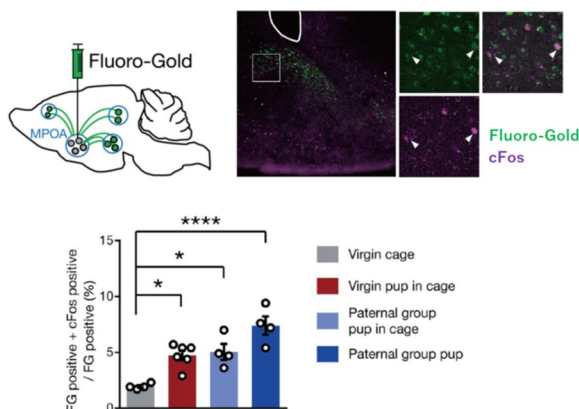


図1 養育・攻撃後のMPOA投射型AHi神経細胞におけるcFos発現

4. 研究成果

MPOA 投射型 AHi 神経細胞の機能解析 (Sato, 2020)

(1) 逆行性トレーサーである Fluoro-Gold 微小注入によって MPOA 投射型 AHi 神経細胞を標識した。この処置を受けたマウスに対して仔マウス暴露を行い、行動パターンを確認後、パラホルムアルデヒド灌流を経て脳切片を作成した。さらに神経活動マーカー-c-Fos に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、養育行動および仔マウスに対する攻撃行動いずれによっても c-Fos 陽性となる MPOA 投射型 AHi 神経細胞が多く存在することが明らかとなった (図1)。

(2) マウス MPOA に逆行性に Cre リコンビナーゼを発現させることが可能な AAV を、AHi に loxP 配列と機能性タンパク質をコードする AAV を注入して、MPOA 投射型 AHi 神経細胞に Cre 依存的に入

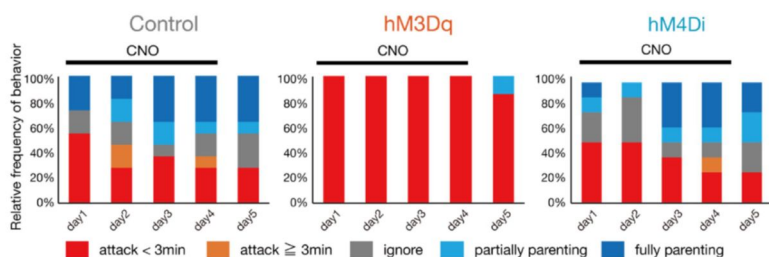


図2 化学遺伝学的にMPOA投射型AHi神経細胞を活性化すると攻撃が促進される

工 GPCR を発現させた。これにより MPOA 投射型 AHi 神経細胞の活動を上昇もしくは抑制させることが可能となる。この手法を用いて雄マウスの経験段階に応じて AHi 神経細胞の活動と行動パターンの相関関係を調べた。

雄マウスに雌との交尾・同居を経験させ、仔マウスを受け入れるまでの中間状態とした。さらに人工 GPCR のリガンドであるクロザピン-N-オキsidを腹腔内投与することで MPOA 投射型の AHi 細胞を活性化した。この状態で仔マウスに対する行動様式を観察したところ、仔マウスに対する攻撃行動が促進された。

仔マウスとの同居経験がある父親マウスはその殆どが養育行動を示す。父親マウスの AHi 細胞を活性化した時の仔マウスに対する行動パターンを調べた。その結果、約 40%のマウスで仔マウスへの攻撃が見られたが、仔マウスとの接触日数を経るごとに攻撃行動を示すマウスの割合は低下した(図2)。

交尾未経験マウスはその殆どが仔マウスに対して攻撃行動を示す。AHi 細胞を抑制した状態で仔マウス提示したところ、攻撃行動の有意な抑制は認められなかった。

(3) 逆行性トレーサーを用いて蛍光標識した MPOA 投射型 AHi 細胞からホールセル記録を行い、電気生理学的特性について調べた。オキシトシンを添加すると、自発的抑制性シナプス後電流の発生頻度が増加することが明らかとなった。また交尾未経験マウスに比べ、父親マウスでは抑制性シナプス発生頻度の増加率が大きい傾向がみられた(図3)。

(4) AHi は MPOA に対して主にグルタミン酸作動性シナプスを投射していることが、光感受性イオンチャネル・チャンネルロドプシンと電気生理学的手法を用いた実験から明らかとなった。

(5) 組換え狂犬病ウイルスを用いて MPOA 投射型 AHi 細胞が受けるシナプス入力元を調べた。その結果、外側視床下部、後部扁桃皮質核、視床などの領域が MPOA 投射型 AHi へ入力していた。さらに AHi 内のオキシトシン受容体陽性 GABA 作動性神経からも投射を受けていることが示された。

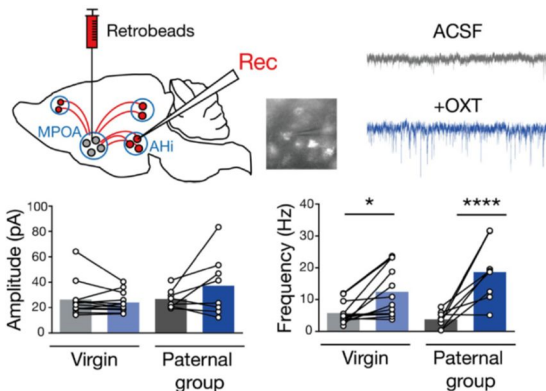


図3 MPOA投射型AHi神経細胞にオキシトシンを作用させると抑制性シナプス後電流の発生頻度が上昇する

以上の結果から、AHi 神経は養育を阻害し、仔マウスへの攻撃を促進させる機能を持つことが明らかとなった。一方で、オキシトシンによる介在神経活性化を介した投射型神経機能の調節機構が存在していた。特に父性発現後にはその調節機能が増強され、MPOA 投射型 AHi 神経細胞による養育行動阻害が起こりにくい状態となっている可能性が示唆された。

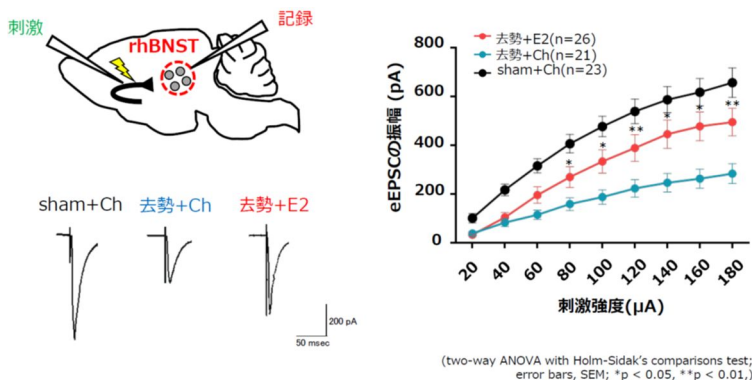


図4 エストラジオールによってrhBNSTにおける電気刺激誘発性興奮性シナプス伝達が増強される

AHi - BNSTrh 経路のシナプス特性解析 (Fukui, 2022)

(1) 性成熟期前の去勢およびホルモン補充実験から、エストロゲンの一つであるエストラジオールが雄マウスの攻撃行動および BNSTrh における興奮性シナプス機能を亢進させる機能を持つことを報告した(Fukui, 2019)。さらに性成熟後についても同様の現象が観察されることを見出した(図4)。

(2) BNSTrh に逆行性ウイルスベクター-rAAV2-EGFP を微小注入し、AHi に加え扁桃基底外側核、基底内側核、視床、大脳皮質運動野などが蛍光タンパク質標識されることを確認した。さらにエストロゲン受容体 ERαとの共染色パターンを評価したところ、AHi は BNSTrh への投射元のうち最も高密度に ERαを発現する脳部位であることが示された(図5)。

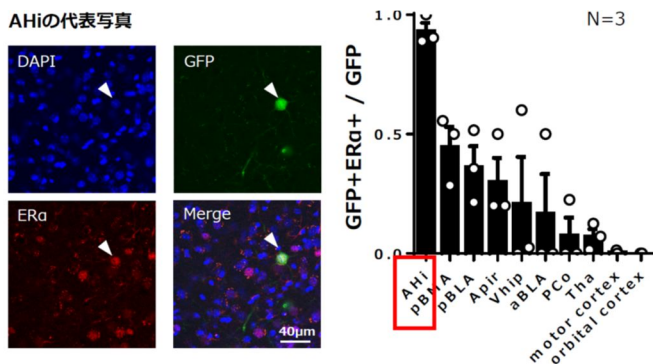


図5 rhBNSTが投射を受ける脳領域のうちAHi神経のERα陽性率が最も高かった

(3) AHi から BNSTrh への投

射シナプス機能を評価するために、AAV ベクターを用いて AHi に光感受性イオンチャンネル・チャンネルロドプシンを発現させた。このマウスから脳スライス標本を作成し、BNSTrh 細胞から記録中に青色光照射することでグルタミン酸作動性シナプス電流 (oEPSC) が確認された。また去勢手術を施したマウスでは oEPSC が観察される確率が低下した。次に AHi には ER α 陽性細胞が高密度に存在することから、AHi から BNSTrh へのグルタミン酸作動性投射シナプスに対するエストラジオールの効果を評価することを試みた。その結果、去勢時にコレステロールを補充したマウスに比べてエストラジオールを去勢手術時より持続的に補充すると oEPSC が観察される確率が上昇した (図 6)。また oEPSC の振幅はエストラジオール処置により有意に上昇していた。以上よりエストラジオールは AHi - BNSTrh 経路のシナプス機能増強に寄与する可能性が示された。

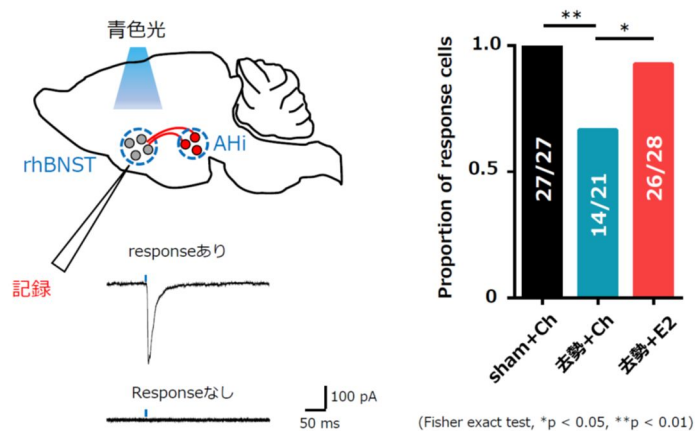


図 6 去勢手術により rhBNST における AHi 由来シナプスの光刺激応答確率が低下したが、エストラジオール処置によって回復した

以上の結果より、BNSTrh へのグルタミン酸作動性シナプス入力元の 1 つである AHi はエストロゲンによる調節を受けていることが明らかとなった。ホルモン濃度によって行動選択が変化する脳内機構の 1 つとして AHi - BNSTrh 経路のシナプス機能変化が関与している可能性が考えられる。

参考文献

Amano, T., Shindo, S., Yoshihara, C., Tsuneoka, Y., Uki, H., Minami, M., Kuroda, K. O., 2017. Development-dependent behavioral change toward pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Behav Brain Res* 325, 131-137.

Fukui, K., Sato, K., Murakawa, S., Minami, M., Amano, T., 2022. Estrogen signaling modulates behavioral selection toward pups and amygdalohippocampal area in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis circuit. *Neuropharmacology* 204, 108879

Fukui, K., Uki, H., Minami, M., Amano, T., T., 2019. Effect of gonadal steroid hormone levels during pubertal development on social behavior of adult mice toward pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci Lett* 708, 134357.

Kohl, J., Babayan, B. M., Rubinstein, N. D., Autry, A. E., Marin-Rodriguez, B., Kapoor, V., Miyamishi, K., Zweifel, L. S., Luo, L. Q., Uchida, N., Dulac, C., 2018. Functional circuit architecture underlying parental behaviour. *Nature* 556, 326

Sato, K., Hamasaki, Y., Fukui, K., Ito, K., Miyamichi, K., Minami, M., Amano, T., 2020. Amygdalohippocampal Area Neurons That Project to the Preoptic Area Mediate Infant-Directed Attack in Male Mice. *J Neurosci* 40, 3981-3994.

Tachikawa, K. S., Yoshihara, Y., Kuroda, K. O., 2013. Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system. *J Neurosci* 33, 5120-5126.

Tsuneoka, Y., Maruyama, T., Yoshida, S., Nishimori, K., Kato T., Numan, M., Kuroda, K. O., 2013. Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 521, 1633-1663

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., 2015. Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *EMBO J* 34, 2652-267

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 0件）

1. 著者名 Fukui K, Sato K, Murakawa S, Minami M, Amano T	4. 巻 204
2. 論文標題 Estrogen signaling modulates behavioral selection toward pups and amygdalohippocampal area in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis circuit.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2021.108879	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 天野大樹	4. 巻 32
2. 論文標題 養育行動発現に関する脳内神経回路とその調節機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 発達心理学研究	6. 最初と最後の頁 171-183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Sato K, Hamasaki Y, Fukui K, Ito K, Miyamichi K, Minami M, Amano T	4. 巻 40
2. 論文標題 Amygdalohippocampal area neurons that project to the preoptic area mediate infant-directed attack in male mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3981-3994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0438-19.2020	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 Fukui K, Uki H, Minami M, Amano T	4. 巻 708
2. 論文標題 Effect of gonadal steroid hormone levels during pubertal development on social behavior of adult mice toward pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.134357	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 天野大樹	4. 巻 86
2. 論文標題 雄の養育行動発現に関する神経・生理学	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 心理学ワールド	6. 最初と最後の頁 27-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 天野 大樹、福井 清志郎、佐藤 圭一郎、南 雅文
2. 発表標題 エストラジオールは分界条床核菱形核の興奮性シナプス機能を増強する
3. 学会等名 第141回 日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunsaku Murakawa, Haruka Uki, Masabumi Minami, Taiju Amano
2. 発表標題 扁桃体中心核から分界条床核菱形核への抑制性入力と養育行動への影響
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiichiro Sato, Yumi Hamasaki, Kiyoshiro Fukui, Masabumi Minami, Taiju Amano
2. 発表標題 The amygdalohippocampal area that projects to the medial preoptic area mediates aggression toward the infant
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyoshiro Fukui, Keiichiro Sato, Masabumi Minami, Taiju Amano
2. 発表標題 Effect of estradiol on behavioral selection for pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱崎友美、南雅文、天野大樹
2. 発表標題 MEK1/2阻害薬U0126を用いた父性発現メカニズムの検討
3. 学会等名 第141回 日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumi Hamasaki, Masabumi Minami, Taiju Amano
2. 発表標題 Long-term administration of D2 receptor blocker sulpiride changes social behavioral pattern in male mice
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱崎 友美, 南 雅文, 天野 大樹
2. 発表標題 内側視索前野のMEK1/2阻害によりGABA作動性シナプス応答と仔への攻撃行動を促進する
3. 学会等名 第43回 日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 圭一郎, 南 雅文, 天野 大樹
2. 発表標題 内側視索前野に投射する扁桃体海馬野ニューロンによる他領域への神経支配
3. 学会等名 第43回 日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井清志郎, 佐藤圭一郎, 南雅文, 天野大樹
2. 発表標題 エストロジオールによる仔マウスへの行動選択制御への影響
3. 学会等名 第71回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱崎友美, 南雅文, 天野大樹
2. 発表標題 MAPK阻害薬による内側視索前野シナプス入力及び行動選択への効果
3. 学会等名 日本薬学会 北海道支部 第147回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Amano T, Ito K, Uki H, Sato K, Tsuneoka Y, Sakurai T, Maejima T, Minami M, Kuroda KO
2. 発表標題 Synaptic plasticity at inputs to the medial preoptic area encodes social experiences with female
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato K, Fukui K, Hamasaki Y, Miyamichi K, Minami M, Amano T
2. 発表標題 Infanticide mediated by the amygdalohippocampal area that projects to the medial preoptic area
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Amano T, Ito K, Maejima T, Sakurai T, Minami M, Kuroda KO
2. 発表標題 Synaptic plasticity at the inputs from medial amygdala to the medial preoptic area
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Amygdala Function in Emotion, Cognition and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Amano T
2. 発表標題 Neural circuit function changes due to parenting experience
3. 学会等名 NIPS Learning & Memory meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野大樹
2. 発表標題 父性の目覚め：パートナーや子供との経験によって変わる脳機能
3. 学会等名 東京理科大学 総合研究院 脳学際研究部門 主催 第3回公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野大樹
2. 発表標題 親行動の発現と相関するシナプス機能変化
3. 学会等名 第31回 日本発達心理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野大樹、濱崎友美、南雅文
2. 発表標題 MEK1/2阻害薬U0126は父性発現を阻害する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taiju Amano
2. 発表標題 内側視察前野に投射する扁桃体海馬野ニューロンの役割
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤圭一郎、福井清志郎、濱崎友美、宮道和成、南雅文、天野大樹
2. 発表標題 内側視察前野投射型に着目した扁桃体海馬野ニューロンの回路に基づく機能と入力解析
3. 学会等名 Neuro2019 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学学会大会 合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野大樹、伊藤和貴、宇木遥、佐藤圭一郎、恒岡洋右、前島隆司、櫻井武、南雅文、黒田公美
2. 発表標題 雌との社会行動経験によって起こる内側視索前野シナプス可塑的变化
3. 学会等名 Neuro2019 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野大樹
2. 発表標題 養育行動発現を調節する神経回路に対するホルモンの作用
3. 学会等名 第45回日本神経内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天野大樹
2. 発表標題 雌・子供との社会関係によって変化する雄マウスの神経回路と行動
3. 学会等名 遺伝研研究会「遺伝要因と環境要因の相互作用による行動決定のメカニズム」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤圭一郎、伊藤和貴、南雅文、天野大樹
2. 発表標題 養育行動に関係する内側視索前野上流領域の探索と機能解析
3. 学会等名 第29回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井清志郎、宇木遥、伊藤和貴、南雅文、天野大樹
2. 発表標題 二次性徴期における性ホルモンの役割と神経回路メカニズムの解明
3. 学会等名 第29回日本行動神経内分泌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taiju Amano, Kazuki Ito, Keiichiro Sato, Masabumi Minami
2. 発表標題 The effects of the medial preoptic area input to the downstream brain area on the behaviors toward pup
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichiro Sato, Masabumi Minami, Taiju Amano
2. 発表標題 The exploration and functional analysis of brain regions projecting to the medial preoptic area related to parental behavior
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院薬学研究院 薬理学研究室
<https://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------