

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07278

研究課題名(和文)社会性を育む社会的遊び行動：オキシトシン神経回路の役割

研究課題名(英文) Promoting social development through social play: Roles of oxytocin neural pathways.

研究代表者

高柳 友紀 (Takayanagi, Yuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10418890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幼少期の社会的遊びによってオキシトシン神経回路が可塑的に変化して成熟後の社会性が促進される可能性を検証した。社会的遊びによって活性化されるオキシトシン神経回路を同定し、活動を操作するための遺伝子改変ラットと、幼少期の社会的遊びによって活性化されるオキシトシン神経回路が可塑的に機能亢進するかを検証するための遺伝子改変ラットを開発した。一方で、オキシトシン受容体遺伝子欠損ラットでは幼少期の社会的遊び行動に異常が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼少期の社会的遊びによる社会性発達の神経基盤はこれまでほとんど明らかになっていない。本研究では、この神経基盤の有力な候補であるオキシトシン神経回路を可視化し、同定し、活動操作する手法を確立した。この神経機序の同定は、社会行動障害を改善する方法の開発につながる可能性がある。また、開発した遺伝子改変ラットは社会行動のみならず、ストレス、エネルギー代謝、生殖などの多様なオキシトシン関連機能の研究にも利用できるため、学術的に有用である。

研究成果の概要(英文)：We tested the possibility that oxytocin neural circuit plasticity altered by social play in childhood may promote sociality after maturation. We developed two kinds of genetically modified rats to identify and manipulate the oxytocin neural circuitry activated by social play and to test whether plastic changes in the oxytocin neural circuit activated by social play in childhood affect social development. On the other hand, rats deficient in the oxytocin receptor gene showed no abnormalities in social play behavior during childhood.

研究分野：生理学、神経科学

キーワード：オキシトシン 思春期 社会行動 遊び ラット 社会性

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとした哺乳動物の子供にとって社会的遊びは報酬価が非常に高く、成熟までの長い時間を社会的遊びに費やす。社会的遊びは快情動を生み出すだけでなく、他者との相互交渉や他者理解といった社会性の発達に重要な役割を果たす。社会性やコミュニケーションの障害を特徴とする自閉症の子供には社会的遊びの欠如傾向があり、これが社会的スキルの発達を妨げていると考えられている。しかし、社会的遊びによる社会性発達の神経基盤はほとんど明らかになっていない。

我々は、マウスやラットを用いて、オキシトシン系が幼若期と成熟期の両方で社会行動制御に重要であること、仔のオキシトシン受容体の活性化が正常な社会行動の発達に必須であることを示してきた。また、幼少期に虐待やネグレクトの様な社会的ストレスを経験したヒトで、血中オキシトシン濃度が低下しているとの報告がある。これらの結果は、幼少期の社会的経験によってオキシトシン神経回路の活動が可塑的に変化し、成体になってからの社会行動に影響を及ぼす可能性を示している。一方で、我々はラットの幼少期に社会的遊びを阻害すると、成体の社会的親和行動が阻害されることを見出した。このラットでは、遊び行動中の快情動を示す 50 kHz の超音波発声を録音再生して聞かせると、再生スピーカーへの接近行動が減弱していることも見出した。さらに、ラットが遊び行動を示す時に視床下部室傍核尾側部のオキシトシン産生ニューロンが特異的に活性化されることを見出した。これらのことから、幼少期の社会的遊びによって可塑的に機能亢進されたオキシトシン神経回路が成熟後の社会行動を促進している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では「幼少期の社会的遊びによりオキシトシン神経回路が可塑的に機能亢進することで成熟後の社会行動が促進される」という仮説を検証することを目的とした。そのため、社会的遊びで活性化されるオキシトシン産生ニューロンの投射先の同定、社会的遊びでオキシトシン神経回路が可塑的に機能亢進するかの解明、社会的遊びで活性化されたオキシトシン神経回路が成体の社会行動を制御するかの解明を進めることにより、オキシトシン神経回路の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 社会的遊びによって活性化されるオキシトシン神経回路を同定・活動操作するための遺伝子改変ラットの作製とその解析: オキシトシン受容体遺伝子座に蛍光タンパク質 Venus と DNA 組換え酵素 Flippase を導入したラットを CRISPR-Cas9 システムで作製した。このラットの挿入配列付近の DNA 配列について PCR 法、サザンブロッティング、デジタル PCR、DNA シーケンシングによる解析を行い、さらに Venus の免疫組織化学法を行って脳における Venus の発現を確認して、ラインを選定した。このラットを用いて、社会的遊びが多く見られる 5 週齢と成体の雄について Venus の免疫組織化学法を行い、Venus の発現を指標にして脳全体におけるオキシトシン受容体の発現部位についての検証を行った。また、オキシトシン受容体-Venus マウスとの発現部位や発現量の比較を行った。さらに、社会的遊びで活性化されるオキシトシン受容体発現ニューロンを同定するため、神経活動の指標である c-Fos と Venus の二重免疫組織化学法を行った。

(2) FosTRAP ラットの確立: c-Fos 遺伝子座にタモキシフェン誘導型 DNA 組換え酵素の CreERT2 を導入したラットを Combi-CRISPR 法を用いて作製した。このラットの挿入配列付近の DNA 配列について PCR 法、サザンブロットング、デジタル PCR、DNA シーケンシングによる解析を行い、ラインを選定した。ここで選定したラインと Cre 依存的に赤色蛍光の tdTomato を発現するレポーターラットを交配し、その子孫を用いて Cre が正常に動くかの検証と、4-OH タモキシフェンの投与量と投与タイミングの検討を行った。4-OH タモキシフェンを投与し、刺激として高張食塩水負荷あるいは社会的遊びを与え、5 日後に再度同じ刺激を与えて 90 分後に灌流固定を行った。この動物の脳に対して、c-Fos と tdTomato の二重免疫組織化学法を行い、発現部位と発現量の比較を行った。

(3) オキシトシン受容体遺伝子欠損ラットの幼少期の社会的遊び行動の解析: 33-37 日齢の雄ラットを用いて、兄弟でも同居動物でもない同じ遺伝子型同士のペアを作って社会的遊び行動を行わせた。24 時間の隔離後に明期に 2 lux の照明環境下で、ビデオ撮影と超音波発声の録音を行いながら 15 分間社会的遊びを行わせた。ビデオを観察して、社会的遊び行動 (pouncing, pinning, boxing/wrestling, chasing/following) と遊び以外の社会的行動 (anogenital sniffing, crawling over/under, huddling, licking and grooming)、一人遊び行動 (bouncy gait) の 9 項目について、頻度、持続時間、潜時のカウントを手動で行った。

4. 研究成果

(1) オキシトシン受容体ニューロンを同定して社会的遊び行動によって活性化されるオキシトシン神経回路を明らかにすると共に、神経活動の人為的な操作をする事を可能にするため、オキシトシン受容体遺伝子座に蛍光タンパク質 Venus と DNA 組換え酵素 Flippase を導入したラットを作製した。このラットにおいて挿入した遺伝子配列付近の解析を行ったところ、正しい位置に 1 コピーの遺伝子が挿入されているラインを 2 ライン得た。さらに挿入遺伝子の配列を解析し、Venus 配列に 2 箇所 (アミノ酸置換有りが 1 箇所とアミノ酸置換無しが 1 箇所) と挿入遺伝子の下流の Exon に 2 箇所の変異 (1 塩基挿入と 1 塩基置換) が存在していた 1 ラインで、最も遺伝子変異が少ないことが分かった。このラインのラットの脳に対して Venus の免疫組織化学法を行ったところ、問題無く Venus を検出することが出来たため、変異の一番少ないラインを選定した。このラットを用いて、社会的遊びが多く見られる 5 週齢と成体の雄の脳全体におけるオキシトシン受容体の発現を検証するため、Venus の発現を指標として観察した。5 週齢と成体のラットの比較では、発現量に多少の違いはあったが発現部位に違いは見られなかった。一方で、成体ラットとオキシトシン受容体-Venus 成体マウスの比較をすると、発現部位の大半は一致しており、オキシトシン受容体特異的と考えられる Venus の発現を確認できた。しかし、視床下部室傍核、視索上核などの 7 箇所において、マウスでは見られない領域で Venus の発現が見られることを確認した。これらの領域におけるオキシトシン受容体が、ラット特有の行動や生体機能の調節に関わる可能性がある。さらに、今後 In situ hybridization 法によるオキシトシン受容体の局在を確認し、このラットにおける Venus の発現がオキシトシン受容体特異的なものであるかを比較検証する。また、現在オキシトシン受容体-Venus ラットを用いて幼少期の社会的遊びによってどこのオキシトシン受容体が活性化されるかを同定する実験に着手したところである。

(2) 幼少期の社会的遊び行動によって活性化されたオキシトシン神経回路が可塑的に機能亢進するかの検証を行うため、神経活動依存的にタモキシフェン誘導型の Cre を発現する FosTRAP ラ

ットを確立した。挿入した遺伝子配列付近の解析を行い、挿入遺伝子が正しく1コピー挿入されている1ラインを選定した。このラットと、Cre 依存的に tdTomato を発現するレポ-ターラットを交配し、高張食塩水負荷によって神経活動を誘導した際に Cre が正常に動くかの検討と、4-OH タモキシフェンの投与時間と量の検討を行った。神経活動の指標である c-Fos の免疫染色を行い、高張食塩水負荷で活性化される脳部位で tdTomato の発現を確認できた。刺激の1時間後に4-OH タモキシフェンを投与すると tdTomato の発現が多い傾向を見出した。しかし、2度目の刺激で発現した c-Fos 陽性細胞数に比べると tdTomato 陽性細胞数が少ないため、4-OH タモキシフェンの投与量や時間に関して引き続き検討を行う。また、幼少期の社会的遊び刺激による tdTomato と c-Fos の発現比較についても引き続き検討する。今後は、当研究室で保有しているオキシトシン-オキシトシン受容体システム関連の遺伝子改変ラットと組み合わせて用い、幼少期の社会的遊びによって活性化されたオキシトシン神経回路特異的に標識を行うシステムを確立する。

(3) 幼少期の社会的遊びにおけるオキシトシン-オキシトシン受容体システムの役割を明らかにするため、オキシトシン受容体遺伝子欠損雄ラットを用いて社会的遊び行動の詳細な解析を行った。テスト中の社会的遊び行動とそれ以外の社会的行動、社会的遊び行動時に快情動を示す50 kHz の超音波発声数について、野生型との間に差は無かった。これによって、社会的遊び自体の表出にはオキシトシン受容体は必須では無いことが示された。これまで我々が得てきた結果との矛盾に関しては様々な理由が考えられるが、まず、遺伝子欠損ラットでは胎児期からオキシトシン受容体がないことにより相補的な作用が働いている可能性に関して、生後にオキシトシンシステムを阻害したときの影響を引き続き検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 高柳 友紀、尾仲 達史	4. 巻 75
2. 論文標題 特集 アロスタシス-ホメオスタシスを超えて 神経内分泌からみたアロスタシスとレジリエンス	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 1205 ~ 1209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416202506	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 -
1. 著者名 Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Onaka T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Novel 31-kHz calls emitted by female Lewis rats during social isolation and social inequality conditions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106243	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 Yoshida M, Saito T, Takayanagi Y, Totsuka Y, Onaka T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Necessity of integrated genomic analysis to establish a designed knock-in mouse from CRISPR-Cas9-induced mutants.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24810-5	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 Takayanagi Y, Onaka T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles of Oxytocin in Stress Responses, Allostasis and Resilience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010150	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 Watanabe J, Takayanagi Y, Yoshida M, Hattori T, Saito M, Kohno K, Kobayashi E, Onaka T.	4. 巻 33
2. 論文標題 Conditional ablation of vasopressin synthesizing neurons in transgenic rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e13057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.13057	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 Onaka T, Takayanagi Y.	4. 巻 33
2. 論文標題 The oxytocin system and early life experience dependent plastic changes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e13049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.13049	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 Usui N, Yoshida M, Takayanagi Y, Nasanbuyan N, Inutsuka A, Kurosu H, Mizukami H, Mori Y, Kuro o M, Onaka T.	4. 巻 33
2. 論文標題 Roles of fibroblast growth factor 21 in the control of depression like behaviours after social defeat stress in male rodents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e13026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.13026	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 Matsumoto M, Yoshida M, Jayathilake BW, Inutsuka A, Nishimori K, Takayanagi Y, Onaka T.	4. 巻 33
2. 論文標題 Indispensable role of the oxytocin receptor for allogrooming toward socially distressed cage mates in female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 e12980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jne.12980	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 Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Onaka T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Post-weaning stroking stimuli induce affiliative behavior toward humans and influence brain activity in female rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83314-w.	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22件(うち招待講演 10件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高柳友紀
2. 発表標題 社会行動制御に関わるオキシトシン
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会(招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高柳友紀、岡部祥太、Naranbat Nasanbuyan、松本まきや、犬束歩、吉田匡秀、尾仲達史
2. 発表標題 オキシトシンによる社会性の制御
3. 学会等名 遺伝研研究会「社会性の個体差を生み出す生物学的基盤」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高柳友紀、岡部祥太、Ariunbold Anurad、吉田匡秀、尾仲達史
2. 発表標題 発達期の接触刺激による親和的關係性構築とオキシトシンの関与
3. 学会等名 第49回日本神経内分泌学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsushi Onaka, Naranbat Nasanbuyan, Masahide Yoshida, Shota Okabe, Yuki Takayanagi, Ayumu Inutsuka
2. 発表標題 Roles of oxytocin-oxytocin receptor systems in the control of adaptive behaviors toward conspecifics.
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会 (Neuro2023) (招待講演)
4. 発表年 2023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 ストレス応答におけるオキシトシンの機能とその伝達様式の解析
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Inutsuka A, Hattori A, Yoshida M, Takayanagi Y, Inoue Y, Onaka T
2. 発表標題 Cell type-specific modulation of oxytocin receptor expression in the cerebellum.
3. 学会等名 第33回バソプレシン・オキシトシン研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 犬束歩、服部愛咲、吉田匡秀、高柳友紀、井上(上野)由紀子、尾仲達史
2. 発表標題 小脳におけるオキシトシン受容体発現の多様性とその調節
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shota Okabe, Yuki Takayanagi, Ayumu Inutsuka, Masahide Yoshida, Tatsushi Onaka
2. 発表標題 Toward elucidating the biological meaning of the 31-kHz calls of Lewis female rats.
3. 学会等名 日本動物心理学会第83回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naranbat N, Yoshida M, Takayanagi Y, Inutsuka A, Onaka T.
2. 発表標題 Characterization of oxytocin receptor-expressing neurons in the ventromedial hypothalamus.
3. 学会等名 第32回バソプレシン・オキシトシン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部祥太、高柳友紀、吉田匡秀、尾仲達史
2. 発表標題 他者との親和的關係性構築の研究から見出されたラットの新規超音波発声と オキシトシンニューロンの賦活化
3. 学会等名 第32回 バソプレシン・オキシトシン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田匡秀、渡辺純、高柳友紀、尾仲達史
2. 発表標題 下垂体後葉性ホルモン産生ニューロンの時期・部位特異的な破壊法の開発
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shota Okabe, Yuki Takayanagi, Masahide Yoshida, Tatsushi Onaka
2. 発表標題 A novel ultrasonic vocalization emitted by rats during social inequality condition
3. 学会等名 日本動物心理学会第82回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 犬束歩、向井康敬、吉田匡秀、高柳友紀、山中章弘、尾仲達史
2. 発表標題 社会的敗北ストレスによって誘導される行動変容における前頭前皮質オキシトシン受容体発現ニューロンの生理機能
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 滝野沙紀、高柳友紀、西丸広史、瀬戸川剛、Batpurev Temuge、柴田智広、西条寿夫、松本惇平
2. 発表標題 変分自己符号化器のラットの社会的遊び行動の自動解析への応用
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高柳友紀、岡部祥太、吉田匡秀、尾仲達史
2. 発表標題 発達期におけるオキシトシンのストレス・社会行動における役割
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾仲達史, 岡部祥太, 高柳友紀, 吉田匡秀
2. 発表標題 思春期接触刺激と愛着成形: オキシトシンの関与の可能性
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾仲達史, 高柳友紀
2. 発表標題 エネルギー代謝と社会的行動におけるオキシトシンの働き
3. 学会等名 第42回日本肥満学会・第39回日本肥満症治療学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inutsuka A, Yoshida M, Takayanagi Y, Onaka T.
2. 発表標題 Selective manipulation of oxytocin receptor-expressing neurons in the medial prefrontal cortex affects stress responses.
3. 学会等名 第31回バソプレシン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, Inutsuka A, Onaka T.
2. 発表標題 Role of the ventromedial hypothalamus oxytocin receptor in social defeat stress.
3. 学会等名 第31回バソプレシン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayanagi Y, Yoshida M, Matsumoto M, Nasanbuyan N, Inutsuka A, Onaka T.
2. 発表標題 Roles of oxytocin receptor in allogrooming behavior toward socially defeated cage mates in mice.
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高柳友紀
2. 発表標題 オキシトシンの多様な機能とオキシトシンの分泌を制御する因子
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田匡秀, 薄井 直, 高柳友紀, Nasanbuyan Naranbat, 犬束 歩, 尾仲達史
2. 発表標題 FGF21は社会的敗北ストレスによる抑うつ行動を減弱させる
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 糖尿病・内分泌代謝科	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 糖尿病・内分泌代謝科 第55巻第5号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 医学部 生理学講座 神経脳生理学部門 ホームページ
<https://www.jichi.ac.jp/usr/pys1/admpys1/>
自治医科大学 教員業績データベース
https://kyouingyousekidb.jichi.ac.jp/cvclients/researchers/tyuki?frame_id=68

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