

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15907

研究課題名（和文）周産期におけるオキシトシン神経回路の構造・機能的イメージング

研究課題名（英文）Structural and functional imaging of in maternal oxytocin neural circuits in mice

研究代表者

幸長 弘子（Yukinaga, Hiroko）

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：30729207

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）：分娩は胎盤、胎児を含む子宮の内分泌系と母体の脳神経系との協調的なネットワークによって制御されているが、周産期の母体の神経回路における変化の動態やその機能解析に踏み込んでいる研究はまだ少ないのが現状である。本申請では、出産に伴う神経回路の変化をトランスシナプス標識によって調べ、その神経細胞種の特特定を行った。また、出産や授乳時の神経細胞の活性化パターンをファイバーフォトメトリーによって測定した。最後に薬理遺伝学によってターゲットとなる神経細胞の活性を変化させることにより、授乳の人為的なコントロールを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、出産や授乳におけるオキシトシン神経細胞の活動を作り出す分子基盤や神経回路基盤の解明に貢献するとともに、授乳の「質」や「量」に影響を与える遺伝的要因と環境因子の探索を促進し、授乳期のQOLの改善に貢献する技術の開発につながるものと期待できる。

特に、母親において子からの吸啜シグナルがオキシトシン神経細胞を強く活性化させる神経経路や増強の仕組みが解明できれば、人為的に効率良くオキシトシン系を活性化させる技術の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Delivery is regulated by a coordinated network between the endocrine system of the uterus, including the placenta and fetus, and the maternal nervous system. However, few studies have yet explored the dynamics of changes in maternal neural circuits during the perinatal period and their functional analysis. In this application, I investigated the changes in neural circuits during childbirth by trans-synaptic labeling and identified the neuronal cell types involved. We also measured the activation patterns of neurons during childbirth and lactation by fiber photometry. Finally, we aimed to artificially control lactation by altering the activity of target neurons through pharmacogenetics.

研究分野：神経科学

キーワード：メスマウス

1. 研究開始当初の背景

分娩は胎盤、胎児を含む子宮の内分泌系と母体の脳神経系との協調的なネットワークによって制御されているが、周産期の母体の神経回路における変化の動態やその機能解析に踏み込んでいる研究はまだ少ないのが現状である。オキシトシンは出産中の子宮の収縮や、授乳中の乳汁放出(射乳)に関わっていることが知られている。オキシトシンは視床下部の室傍核および視索上核に存在するオキシトシン神経の独特な活動パターンによって生成され、下垂体後葉から血中へと放出される。従来の研究では、麻酔下でのラットやウサギの *in vivo extracellular recording* 技術を用いて、推定されたオキシトシン神経を特徴付けてきた。しかし、これらの研究では、技術的制限のために、オキシトシン神経の同定は、その電気生理学的特性や下垂体後葉への軸索投射に基づくものであり、オキシトシン遺伝子発現に基づくものではなかった。下垂体へ投射する他の視床下部神経の中からオキシトシン神経の活動を特定し、細胞種類特異的な神経科学技術をより効果的に利用するためには、分娩と授乳の研究のための遺伝学的に確証の取れたマウスモデルを開発する必要があった。

2. 研究の目的

本申請では、出産、授乳に伴う神経回路の変化や神経活性を捉えることを目標にした。神経回路の変化はトランスシナプス標識によって調べ、その神経細胞種の特定を行う。また、出産時や授乳時のオキシトシン神経細胞の活性化パターンをファイバーフォトメトリーによって測定する。最後に光遺伝学や薬理遺伝学によってターゲットとなる神経細胞の活性を変化させることにより、出産のタイミングや娩出間隔、授乳の人為的なコントロールを目指した。

3. 研究の方法

分娩、授乳を制御する神経回路の理解のためにマウスをモデルとして、視床下部の室傍核と視索上核に位置し、分娩時の子宮収縮や授乳時の射乳を制御するオキシトシン細胞に注目し研究を行なった。妊娠や出産、授乳に伴う神経回路の変化をトランスシナプス標識によって調べ、その神経細胞種の特定を試みた。トランスシナプス標識は指定した脳領域の特定の種類の神経に特異的に感染するように細工した改変型狂犬病ウイルスベクターを用いて、その一段階だけ上流に位置するシナプス前細胞を脳全域にわたって可視化することができる。また、妊娠や出産、授乳時の神経細胞の活性化パターンをファイバーフォトメトリーによって測定した。カルシウムイオン (Ca^{2+}) センサーとして働くタンパク質 GCaMP をオキシトシン細胞特異的に発現する雌マウスを用いた。一

般に、神経細胞が活動すると細胞内 Ca^{2+} の濃度が上昇し、GCaMP の蛍光強度の変化として可視化できる。GCaMP が正しくオキシトシン神経細胞に発現し、それ以外の細胞に発現していないことを確かめ、室傍核の直上に光ファイバーを設置した。非妊娠時、妊娠時、そして出産予定日の前日から翌日にかけて、雌マウスをファイバーフォトメトリーにつないで出産、その後の授乳の様子を観察した。GCaMP の蛍光強度を捉えるのに加えて、マウスのケージを横と下からビデオ撮影し、母仔の様子も記録した。次に、授乳期の母マウスにおけるオキシトシン神経細胞の活動も記録した。最後に DREADD システムによってターゲットとなる神経細胞の活性を変化させることにより、オキシトシン細胞活性の人為的なコントロールを行なった。

4 . 研究成果

本研究では、マウスを用いたウイルス遺伝子学的アプローチを導入し、ファイバーフォトメトリーによってオキシトシン神経の母性活動を特徴づけた。出産時のオキシトシン神経細胞は、仔が完全に膈外に出てくる 10~15 分前からリズムカルな活動を開始し、このリズムは娩出に至るまで持続することが分かった。このような神経活動は、非妊娠時や妊娠時にはみられなかったものである。さらに、出産期から授乳期までを連続して観察すると、分娩の終了からおよそ 4 時間後に母マウスが仔にまたがって授乳行動を開始し、出産時よりもはるかに高くリズムカルな波が発生する様子が捉えられた。出産後 12 日目の母マウスを一晩観察すると、非常に明瞭な神経活動のピークが観察された。出産後 1 日目には活性の高さが低いが、12 日目までにはおよそ 2 倍の高さを示した。また、離乳後に再び妊娠・出産を経験すると、活性の高さはいったん元に戻って、それからまた大きくなった。授乳を続けると波が高くなる変化の理由には、仔が成長して吸啜が強くなったためか、それとも母マウス側でオキシトシン神経細胞自身が変わっているのかの二つの可能性が考えられた。そこで、生後間もない仔と十分成長した仔を用意して、人為的に仔を入れ替える里子実験を行った。その結果、母マウスの示すオキシトシン神経細胞の活動ピークの高さは仔の日齢に影響を受けなかった。従って、母マウスのオキシトシン神経細胞には自身の授乳経験に依存して、自律的に活動の強度を変化させる仕組みがあると考えられる。トランスシナプス標識法を用いて、オキシトシン神経に入力する神経細胞のマッピングを作製したところ、視床下部のさまざまな神経核や視床下部の外側の構造、例えば分界条床核 (BST) に多くの標識が見られた。また、標識される細胞の種類を調べてみると、興奮性、抑制性いずれのタイプの神経細胞も見いだされたが、BST ではほとんどが抑制性の神経細胞であった。

そこで、新たに見つかった入力神経細胞の役割を調べるために、薬理遺伝学を用いてこれらの神経細胞の活動を制御する実験を行った。授乳中の母マウスに薬剤 CNO を投与して BST の抑制性神経細胞を人為的に活性化すると、薬の効いている期間にオキシトシン神経細胞の活動が少なくなることが分かった。これらの成果をまとめ、学術誌に発

表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yaguchi Kasane, Hagihara Mitsue, Konno Ayumu, Hirai Hirokazu, Yukinaga Hiroko, Miyamichi Kazunari	4. 巻 -
2. 論文標題 Dynamic Modulation of Pulsatile Activities of Oxytocin Neurons in Lactating Wild-type Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	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） 10.1101/2022.10.17.512455	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 Yukinaga Hiroko, Hagihara Mitsue, Tsujimoto Kazuko, Chiang Hsiao-Ling, Kato Shigeki, Kobayashi Kazuto, Miyamichi Kazunari	4. 巻 32
2. 論文標題 Recording and manipulation of the maternal oxytocin neural activities in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3821 ~ 3829.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.06.083	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroko Yukinaga
2. 発表標題 Analyses of maternal oxytocin pulses in mice
3. 学会等名 2021年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸長弘子, 矢口花紗音, 宮道和成
2. 発表標題 マウスを用いたウイルス遺伝学的アプローチによる周産期オキシトシン神経活動解析
3. 学会等名 第66回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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