

氏名(本籍)	度会晃行(岐阜県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第162号
学位授与年月日	令和2年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	マウスの視床室傍核-尾側部における養育行動の発現量を調節する 神経メカニズム
論文審査委員	(主査) 菊水健史 (副査) 折戸謙介 茂木一孝

論文内容の要旨

【総合緒言】

その名のごとく、ヒトを含めた哺乳類の母動物は母乳を介して仔を育てる。受精後、間もなく形成される胎盤は、母から仔へ新鮮な血液を供給するだけでなく、様々なホルモン合成を行い、妊娠中の母体に養育に必要な変化を引き起こす。胎盤によって合成されるホルモンはプロゲステロンやエストロゲン、プロラクチン、オキシトシン(OT)などが挙げられる。これらホルモンは子宮や乳腺などの末梢組織に限らず、養育行動を司る中枢領域に作用し、養育に必要な形質を作り上げる。とくに、OTは養育行動の発現に中心的な役割を果たす。OT遺伝子やOTR遺伝子を欠損したマウスでは養育行動の発現は見られず(Takayanagi et al., 2005a, 2005b)、また中枢領域におけるOTRの発現量が養育行動の発現量に相関することが報告されている(Champagne et al., 2001)。

視床下部におけるOT含有神経細胞は脳内のあらゆる領域にその軸索を伸ばしており、母マウスの外側中隔と視床室傍核(PVT)では高い密度のOT神経細胞の神経終末が観察される(Knobloch et al., 2012)。外側中隔はストレス応答に関わるとされ、そのOTR発現細胞は母マウスの恐怖刺激に対する耐性に寄与することが明らかにされている(Menon et al., 2018)。一方で、PVTは一般学習課題に関与することが示されていたものの(Do-Monte et al., 2015)、社会行動に関する知見は極めて少なく、PVTにおけるOTR発現細胞の機能については未だ明らかにされていない状況であった(Kasahara et al., 2016; Lonstein et al., 1997)。そこで、本研究では、豊富なオキシトシンを受けるPVTと、そのOTR発現細胞が養育行動に対してどのような機能を有するのか調べることにした。

【第1章：視床室傍核-尾側部における養育行動を強化する神経細胞】

吻尾側に長い PVT では、吻側側の aPVT と尾側側の pPVT への神経入力のパターンは同一ではなく、一方に対してより強く投射を行う神経核が存在する(Li and Kirouac, 2012)。また、aPVT と pPVT では報酬性刺激に対する応答性が異なり、pPVT の方が報酬性刺激に対して反応性の高い細胞が多く存在している(Choi et al., 2019)。したがって、PVT に関する研究を進める上で、異なる解剖学および機能的性質を持つ aPVT と pPVT は分離して、実験および解析を行う必要があると考えられた。

そこで本研究では、第1章にて、PVT の OTR 発現細胞の分布を縦断的に調べ、そのパターンより aPVT と pPVT とする領域を定義した。次に、仔マウスを提示し、aPVT と pPVT それぞれにおいて活性化される OTR 発現細胞の数を定量したところ、pPVT においてのみ活性化した OTR 発現細胞の割合が増加していた。さらに、OTR のアンタゴニストを用いて pPVT への OT 入力を慢性的に阻害したところ、母マウスは母性行動のひとつであるクラウチング行動(仔への覆いかぶさり行動)の特異的な減少を示した。これらの結果は、pPVT における OTR 発現細胞が養育行動に対して促進的に関わっていることを示唆している。

【第2章：視床室傍核-尾側部における活性化により強化子となる神経細胞】

行動の発現は特定の感覚刺激により誘起され、そのような刺激を先行刺激と呼ぶ。また、行動に随伴する刺激によって、その行動頻度が増すことを強化と呼ぶ。先行刺激となる仔マウスからの情報処理に関与する OTR を阻害すると、操作を受けた母マウスは直ちに養育行動を減少させる(Levy et al., 2004)。しかし、行動の強化に関与する OTR は複数回の阻害によってのみ行動の減少を引き起こす(Pedersen et al., 1995)。第1章では、pPVT における OTR の阻害は単回では効果はなく、慢性的な阻害によってのみクラウチング行動の減少が観察された。これらのことから、pPVT における OTR は行動の強化に寄与していると考えられた。また、PVT の OTR 発現細胞は OT の受容により活性化することから(Febo et al., 2005)、pPVT における OTR は細胞を活性化させることで行動の強化に寄与していると仮説を立てた。そこで、光遺伝学的手法と場所指向性テスト(CPP, Conditional Place Preference Test)を組み合わせ、その仮説を検証した。具体的には、条件づけ刺激の提示として、pPVT の OTR 発現細胞の活性化をもたらす光照射を実験装置内の特定の場所で行なった。これにより、実験マウスは光照射が行われた場所での滞在時間を延長させた。この結果は、pPVT の OTR 発現細胞の活性化が行動の強化に寄与していることを示唆している。

【第3章：視床室傍核-尾側部における養育行動を消去する神経細胞】

第1章および第2章の結果から、母マウスのクラウチング行動は pPVT の OTR 発現細胞の活性化を通して強化されていると考えられた。しかしながら、PVT は報酬だけでなく、消去を引き起こす罰の曝露によっても活性化され(Zhu et al., 2018)、その活性化が行動の消去をもたらすことが示されている(Lkhagvasuren et al., 2014; Zhu et al., 2018)。これらのことから、PVT には活性化することで、

行動の強化をもたらす細胞だけでなく、行動の消去をもたらす細胞が存在すると考えられた。そこで、養育行動が消去されている母マウスの pPVT では、OTR 発現細胞に変わって他の細胞の神経活性が増強され、養育行動の発現が制御されていると仮説を立てた。

まず、ストレス感作により養育行動の発現量が減少した母マウスを作出した。以下、そのマウスをストレス母マウスと呼称する。仔マウスを提示した際のストレス母マウスの pPVT における神経活性を調べると、仔マウスを提示された通常の母マウスと比較しても差は見られなかった。一方、pPVT の主要な入力領域である mPFC では(Li and Kirouac, 2012)、ストレス母マウスは通常の母マウスに比べて仔マウス提示により多くの細胞が活性化していた。そこで、ストレス母マウスの mPFC における pPVT へ投射する神経細胞が活性化される割合を調べた。すると、ストレス母マウスは、通常の母マウスに比べて、仔マウス提示により活性化される mPFC の pPVT へ投射する神経細胞の割合を増加させていた。さらに、遺伝薬理学的手法を用いて、pPVT へ投射する mPFC の神経細胞を慢性的に活性化させると、母マウスのクラウチング行動は減少した。これらの結果は、pPVT における mPFC からの入力をうける神経細胞が慢性的に活性化されることで、クラウチング行動に対して抑制的に働くことを示唆している。

【総合考察】

これまで、養育行動の獲得や実行に必要な神経メカニズムに関する研究は、多くの研究者によって広く行われ、多くの知見が示されてきた(Kohl et al., 2018; Numan and Young, 2015)。一般に獲得された母ラットの養育行動の発現量は高く維持されているが、自身の生理的状态や環境に応じて、柔軟にその量が調節される(Murgatroyd et al., 2016)。このような養育量を調節する神経機構については、いくつかの知見が示されているものの(Bosch and Neumann, 2008; Figueira et al., 2008; Francis et al., 2002)、その神経メカニズムについては未だ明らかでない点が多く残っている。本研究は、養育のひとつであるクラウチング行動が、pPVT における OTR 発現細胞の活性化により強化され、mPFC からの神経投射を受ける細胞の活性化により消去されることを示唆した。

PVT における強化に関与する細胞は罰の提示によりその活性が抑制され、消去に関わる細胞は報酬により抑制されることが示めされている(Zhu et al., 2018)。また、他の視床領域と同様、PVT の構成する細胞に抑制性細胞はほとんど存在しない(Zhu et al., 2016)。さらに、PVT からの投射を受ける NAc は抑制性伝達により行動発現を学習性に制御しており、PVT へ投射している(Broms et al., 2017)。これらのことから、pPVT は NAc に対して興奮性伝達を行うとともに、NAc から抑制性の負のフィードバックを受けていると考えられた。そして、行動の強化と消去を効率的に行うために、PVN からの OT を受ける OTR 発現細胞と mPFC からの神経投射を受ける細胞は、その下流である NAc を介して、相互に抑制する回路を形成していると考えられた。

pPVT に対する神経操作は、いずれも行動試験中の単回の操作では影響を与えず、養育期間中の慢性的な操作によってのみ行動の変化を引き起こした。PVT は複数回の試行を繰り返すことで、神経の可

塑的な変化を引き起こし、学習した行動の発現量を変化させていることが示されている(Zhu et al., 2018)。また、同研究において、強化された行動の発現量は PVT の単回の神経操作では変化せず、繰り返し神経操作が行われることで影響を受けることが示されている(Zhu et al., 2018)。このことから、pPVT によるクラウチング行動の発現調節には、養育行動を促進する PVN または養育行動を抑制する mPFC から pPVT への投射におけるポストシナプス側である pPVT の神経細胞の可塑的な変化が必要となると考えられた。

本研究を通して得られた結果をまとめると、母マウスのクラウチング行動は PVN からの OT 分泌と mPFC からの神経投射により、強化または消去が引き起こされ、その発現量が調節されていることを示唆している。また、その強化や消去のプロセスには、それぞれの入力を受ける pPVT の細胞が繰り返し活性化されることで可塑的な変化を起こすことが重要であるといえる。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の母動物による養育行動はオキシトシン(OT)をはじめとするホルモンにより適切に制御されている。本学位論文は、OT を受ける神経核のひとつである視床室傍核(PVT)に注目し、そのオキシトシン受容体(OTR)発現細胞の機能を解明、PVT が授乳期における養育行動の発現量を調節するメカニズムを示唆している。

PVT はこれまで養育行動への関与が予想されていた。しかしながら、PVT は吻尾側に長い神経核であり、その領域ごとに異なる機能を有するため、その仮説を検証すべき PVT 内の領域の見当をつけることすらできない状況にあった。学位申請者はそのような状況を打破すべく、養育行動との関連の高い OT に着目し、以下 3 章からなる実証を実施し、PVT におけるオキシトシン受容体発現細胞の、養育行動調整における機能を明らかにした。以下、章毎の内容を記載する。

【第 1 章：視床室傍核-尾側部における養育行動を強化する神経細胞】

吻尾側に長い PVT では、吻側側の aPVT と尾側側の pPVT への神経入力のパターンは同一ではなく、一方に対してより強く投射を行う神経核が存在する(Li and Kirouac, 2012)。また、aPVT と pPVT では報酬性刺激に対する応答性が異なり、pPVT の方が報酬性刺激に対して反応性の高い細胞が多く存在している(Choi et al., 2019)。したがって、PVT に関する研究を進める上で、異なる解剖学および機能的性質を持つ aPVT と pPVT は分離して、実験および解析を行う必要があると考えられた。

そこで本研究では、第 1 章にて、PVT の OTR 発現細胞の分布を縦断的に調べ、そのパターンより aPVT と pPVT とする領域を定義した。次に、仔マウスを提示し、aPVT と pPVT それぞれにおいて活性化される OTR 発現細胞の数を定量したところ、pPVT においてのみ活性化した OTR 発現細胞の

割合が増加していた。さらに、OTR のアンタゴニストを用いて pPVT への OT 入力を慢性的に阻害したところ、母マウスは母性行動のひとつであるクラウチング行動（仔への覆いかぶさり行動）の特異的な減少を示した。これらの結果は、pPVT における OTR 発現細胞が養育行動に対して促進的に関わっていることを示唆している。

【第 2 章：視床室傍核-尾側部における活性化により強化子となる神経細胞】

行動の発現は特定の感覚刺激により誘起され、そのような刺激を先行刺激と呼ぶ。また、行動に随伴する刺激によって、その行動頻度が増すことを強化と呼ぶ。先行刺激となる仔マウスからの情報処理に關与する OTR を阻害すると、操作を受けた母マウスは直ちに養育行動を減少させる(Levy et al., 2004)。しかし、行動の強化に關与する OTR は複数回の阻害によってのみ行動の減少を引き起こす(Pedersen et al., 1995)。第 1 章では、pPVT における OTR の阻害は単回では効果はなく、慢性的な阻害によってのみクラウチング行動の減少が観察された。これらのことから、pPVT における OTR は行動の強化に寄与していると考えられた。また、PVT の OTR 発現細胞は OT の受容により活性化することから(Febo et al., 2005)、pPVT における OTR は細胞を活性化させることで行動の強化に寄与していると仮説を立てた。そこで、光遺伝学的手法と場所指向性テスト(CPP, Conditional Place Preference Test)を組み合わせ、その仮説を検証した。具体的には、条件づけ刺激の提示として、pPVT の OTR 発現細胞の活性化をもたらす光照射を実験装置内の特定の場所で行なった。これにより、実験マウスは光照射が行われた場所での滞在時間を延長させた。この結果は、pPVT の OTR 発現細胞の活性化が行動の強化に寄与することを示唆している。

【第 3 章：視床室傍核-尾側部における養育行動を消去する神経細胞】

第 1 章および第 2 章の結果から、母マウスのクラウチング行動は pPVT の OTR 発現細胞の活性化を通して強化されていると考えられた。しかしながら、PVT は報酬だけでなく、消去を引き起こす罰の曝露によっても活性化され(Zhu et al., 2018)、その活性化が行動の消去をもたらすことが示されている(Lkhagvasuren et al., 2014; Zhu et al., 2018)。これらのことから、PVT には活性化することで、行動の強化をもたらす細胞だけでなく、行動の消去をもたらす細胞が存在すると考えられた。そこで、養育行動が消去されている母マウスの pPVT では、OTR 発現細胞に変わって他の細胞の神経活性が増強され、養育行動の発現が制御されていると仮説を立てた。

まず、ストレス感作により養育行動の発現量が減少した母マウスを作出した。以下、そのマウスをストレス母マウスと呼称する。仔マウスを提示した際のストレス母マウスの pPVT における神経活性を調べると、仔マウスを提示された通常の母マウスと比較しても差は見られなかった。一方、pPVT の主要な入力領域である mPFC では(Li and Kirouac, 2012)、ストレス母マウスは通常の母マウスに比べ仔マウス提示により多くの細胞が活性化していた。そこで、ストレス母マウスの mPFC における pPVT へ投射する神経細胞が活性化される割合を調べた。すると、ストレス母マウスは、通常の母マウス

スに比べて、仔マウス提示により活性化される mPFC の pPVT へ投射する神経細胞の割合を増加させていた。さらに、遺伝薬理学的手法を用いて、pPVT へ投射する mPFC の神経細胞を慢性的に活性化させると、母マウスのクラウチング行動は減少した。これらの結果は、pPVT における mPFC からの入力をうける神経細胞が慢性的に活性化されることで、クラウチング行動に対して抑制的に働くことを示唆している。

本研究を通して、以下の結果が得られた。まず母マウスのクラウチング行動は PVN からの OT 分泌と mPFC からの神経投射により、強化または消去が引き起こされ、その発現量が調節されていることを示唆している。次に、その強化や消去のプロセスには、それぞれの入力を受ける pPVT の細胞が繰り返し活性化されることで可塑的な変化を起こすことが重要であるといえる。

このように、学位申請者は研究対象となる神経核の解剖学的特徴および生理学的特性を調べ、それらをもとに改めて仮説を立て、行動実験により検証した。このような研究手続きは適切なものであり、提出された学位申請論文において一貫していた。また本研究は、これまで養育行動に関わるとされている多くの神経核とは異なり、pPVT が単調な上方制御ではなく、養育行動の発現量を二相性に調節していることを示唆している。

以上の点を考慮し、本学位申請論文を適切な研究手続きを介して行われ、関連分野において新規性と重要性を併せ持つものとし、申請者は学位授与に相当するものと判断した。