

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

Neural mechanism underlying regulation
of maternal behavior
in the posterior paraventricular thalamic nucleus
of lactating mouse

2020年 1月

麻布大学 獣医学研究科

伴侶動物学専攻 博士後期課程

DV1608 度会 晃行

目次

要旨	4
Abstract	9
総合緒言	14
第1章 視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞は養育行動を促進する	16
1.1 緒言	16
1.2.1 実験 1-1 の材料と方法	17
1.2.2 実験 1-1 の結果	20
図 1.2.2-1 視床室傍核におけるオキシトシン受容体発現細胞	21
図 1.2.2-2 視床室傍核におけるオキシトシン受容体の発現分布	22
1.3 実験 1-2 : 仔マウス提示による母マウスの視床室傍核におけるオキシトシン受容体発現細胞の反応	23
1.3.1 実験 1-2 の材料と方法	23
1.3.2 実験 1-2 の結果	25
図 1.3.2-1 仔マウスの提示により活性化された視床室傍核におけるオキシトシン受容体発現細胞	26
図 1.3.2-2 仔マウスの提示により活性化された視床室傍核-吻側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の割合	27
図 1.3.2-3 仔マウスの提示により活性化された視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の割合	28
1.4 実験 1-3 : 養育行動に対する視床室傍核尾側部へのオキシトシン入力の影響	29
1.4.1 実験 1-3 の材料と方法	29
1.4.2 実験 1-3 の結果	31
図 1.4.2-1 視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体阻害薬を投与した位置	33
図 1.4.2-2 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を急性的に投与した際の養育行動の変化 1	34
図 1.4.2-3 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を急性的に投与した際の養育行動の変化 2	35
図 1.4.2-4 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を慢性期に投与した際の養育行動の変化 1	36
図 1.4.2-5 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を慢性期に投与した際の養育行動の変化 2	37
1.5 考察および結論	38

第2章	視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の活性化は行動を強化する.....	40
2.1	緒言.....	40
2.2	実験1：視床室傍核尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の活性化.....	41
2.2.1	実験2-1の材料と方法.....	41
2.2.2	実験2-1の結果.....	41
2.3	考察および結論.....	42
第3章	視床室傍核-尾側部における内側前頭前野からの神経入力を受ける細胞は養育行動を抑制する ...	43
3.1	緒言.....	43
3.2	実験3-1：養育行動の減少に伴う視床室傍核関連領域の神経活性の変化.....	44
3.2.1	実験3-1の材料と方法.....	44
3.2.2	実験3-1の結果.....	45
3.3	実験3-2：養育行動の減少に伴う内側前頭前野における視床室傍核尾側部へ投射する細胞の活性状態の変化.....	46
3.3.1	実験2-2の材料と方法.....	46
3.3.2	実験3-2の結果.....	47
3.4	実験3-3：内側前頭前野からの視床室傍核-尾側部への神経入力の人為的操作.....	48
3.4.1	実験3-3の材料と方法.....	48
3.4.2	実験2-3の結果.....	49
3.5	考察および結論.....	50
総合考察.....		51
図4	視床室傍核-尾側部におけるクラウチング行動の発現量を調節する神経メカニズム ...	54
参考論文.....		55
参考文献.....		56
謝辞.....		64

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 からの入力を受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。

Abstract

[General Introduction]

The mother of mammals, including humans, cares their offspring by breast-feeding. The placenta, formed shortly after fertilization, not only provides fresh blood to the offspring from the mother but also synthesizes various hormones during pregnancy, inducing changes necessary for maternal behaviors. The hormones synthesized by the placenta include progesterone, estrogen, prolactin, and oxytocin (OT). These endocrine changes act not only on peripheral tissues such as the uterus and mammary gland but also on contribution on promoting the onset of od maternal behaviors in the central region. In particular, estrogen, which increases in late pregnancy, plays a central role in the development of nurturing behavior (Siegel and Rosenblatt, 1975; Terkel and Rosenblatt, 1972). Estrogen increases the expression of oxytocin receptors (OTR) (Champagne et al., 2001; Ostrowski et al., 1995). It has been reported that maternal behaviors are induced in mice deficient in the OT and OTR gene (Takayanagi et al., 2005 a, 2005 c) and that the expression level of OTR in the central region correlates with the number of maternal behaviors (Champagne et al., 2001). Thus, the estrogen-driven OT system plays an important role in the development of nurturing behavior.

OT-synthesizing neurons in the hypothalamus extend their axons to the various regions in the brain (Knobloch et al., 2012). In the lateral septum and paraventricular thalamic nucleus (PVT) of the mother mouse, the terminals of OT neurons are observed at high densities (Knobloch et al., 2012). OTR-expressing neurons in the lateral septum have been implicated in stress response and have been shown to contribute to maternal tolerance to fear during lactation (Menon et al., 2018). On the other hand, PVT is involved in associated learning (Do-Monte et al., 2015), but there are few previous findings of social behavior and nurturing behavior. In the present study, we investigated how the OTR-expressing neurons

in PVT contribute to maternal behavior.

[Chapter1: Oxytocin receptor-expressing neurons in the posterior paraventricular thalamic nucleus enhance maternal behavior of dams]

Along the anterior-posterior axis, the pattern of neural input to the rostral aPVT and caudal pPVT is not identical, and some nuclei project more strongly to one side (Li and Kirouac, 2012). Also, aPVT and pPVT have different responses to rewarding stimuli, and pPVT has more neurons that are more responsive to rewarding stimuli (Choi et al., 2019). Therefore, it was considered necessary to separate aPVT and pPVT, which have different anatomical and functional properties, for experimental and analytical studies on PVT. We longitudinally examined the distribution of OTR-expressing neurons in PVT and defined the regions of aPVT and pPVT from the pattern. We provided pups to a dam and quantified the number of activated OTR-expressing neurons in aPVT and pPVT. OTR-expressing neurons in pPVT are predominantly activated by pup exposure. Additionally, when the OT input to pPVT was inhibited by the chronic blockade of OTR, the dams showed a specific decrease in the crouching behavior. These results suggest that OTR-expressing neurons in pPVT are actively involved in crouching behavior.

[Chapter2: The activation of oxytocin receptor-expressing neurons in the posterior paraventricular thalamic nucleus reinforces behaviors]

Behavior is induced by a specific sensory stimuli, which are called antecedent stimuli. An increase in the behavioral frequency results from a stimulus or treat accompanying the behavior, which is called reinforcement. An inhibition of OTR, which is involved in processing the antecedent stimuli, results in an immediate reduction in maternal

behaviors of mouse dams (Marlin et al., 2015). On the other hand, maternal behaviors are not decreased by a blockade of OTR involved in the reinforcement, but decreases by multiple times block (Pedersen et al., 1995). In Chapter 1, although the acute blockade of OTR in pPVT was ineffective in the reduction of crouching behavior, the chronic blockade reduced that duration. Furthermore, OTR-expressing neurons in PVT were activated by OT (Febo et al., 2005), which suggests that activation of OTR-expressing neurons in pPVT contributes to the reinforcement. Then, we combined optogenetic techniques with conditional place preference test (CPP) to examine whether activation of OTR-expressing neurons in pPVT contributes to the reinforcement. The relationships between specific neural activity and the reinforcement have been quantified by increasing or decreasing the interesting behavior or have been evaluated as a more sensitive method by CPP (Gul Dolen et al., 2013). In this study, CPP was performed as a conditioned stimulus for activation of OTR-expressing neurons in pPVT. This activation allowed the experimental mice to stay longer in the conditioned area. The result suggests that the activation of neurons expressing OTR in pPVT is involved in the reinforcement.

[Chapter 3: In the posterior paraventricular thalamic nucleus, neurons projected from the medial prefrontal cortex inhibit maternal behavior of dams]

From the results of Chapters 1 and 2, it was suggested that crouching behavior is regulated by the reinforcement through the activation of OTR-expressing neurons in pPVT. On the other hand, there are cases in which activation of PVT causes behavioral extinction (Lkhagvasuren et al., 2014; Zhu et al., 2018). These suggest that PVT contains not only neurons that are activated to enhance behavior but also neurons to decrease behavior. In other words, we hypothesized that, in the pPVT of dams in which the maternal behavior was eliminated, the other neurons were enhanced instead of OTR-expressing neurons. We prepared mother mice in which maternal behaviors were decreased due to a stress

sensitization (stressed dams). Hereinafter, the mouse is referred to as stressed dams. The pPVT in stressed dams exposed to pups showed no difference in the number of activated neurons, compared with control dams. On the other hand, pup exposure activated mPFC, which is the main input region of pPVT (Li and Kirouac, 2012), in stressed dams than in control dams. Additionally, compared with control dams, stressed dams had an increased proportion of neurons activated by pup exposure in the mPFC neurons projecting to pPVT. Using pharmacogenetic techniques, the chronic activation of mPFC neurons projecting to the pPVT reduced the crouching behavior of dams. These results suggest that neurons projected from the mPFC in the pPVT reduce crouching behavior of dams through the chronic activation.

[General consideration]

To date, studies of the neural mechanisms for the onset of maternal behaviors have been conducted extensively by many researchers, and many findings have been presented (Kohl et al., 2018; Numan and Young, 2015). Dams usually maintain high levels of nurturing behavior, but when significant changes occur in their physiology or environment, they flexibly regulate the amount of maternal behavior (Murgarroyd et al., 2016). Although some neural mechanisms involved in regulating the amount of maternal behavior have been previously reported (Bosch and Neumann, 2008; Figueira et al., 2008; Francis et al., 2002), many aspects of the neural mechanisms remain unclear. The present study showed that the crouching behavior of the mother mice was enhanced by activation of OTR-expressing neurons in the pPVT and abolished by activation of neurons receiving neural projections from the mPFC. It has been shown that an excitability of neurons involved in behavioral reinforcement in PVT are inhibited by punishments, whereas neurons involved in behavioral extinction are inhibited by reinforcers (Zhu et al., 2018). As with other thalamic regions, PVT contains few inhibitory neurons (Zhu et al., 2016). Moreover, NAc, which receives projections from the PVT, regulates behavioral expression in a

learning manner by inhibitory projections and mutually projects to the PVT (Broms et al., 2017). These results suggest that OTR-expressing neurons to receive OT from the PVN and neurons projected from mPFC in pPVT mutually suppresses each other through NAc. The single neural manipulations in pPVT did not affect maternal behavior, but the decreases of crouching behavior were observed by chronic manipulations in pPVT. PVT has been shown to induce plastic changes and alter a behavioral expression by repeated trials (Zhu et al., 2018). This suggests that the regulation of crouching behavior by pPVT requires plastic changes in the postsynaptic neurons of pPVT projected from the PVN or the mPFC. Taken together, all results obtained through this study suggest that the crouching behavior of mouse dams is regulated to enhance by OT secretion from the PVN and to inhibit by projections from the mPFC. It is also important in the regulation of crouching behaviors that plastic changes of the pPVT neurons are induced by repeated activations through each input.

総合緒言

哺乳類の名のごとく、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。齧歯類では、リッキングとグルーミング、レトリビング、そしてクラウチングと呼ばれる定型的な行動によって養育が行われる(Stern and Johnson, 1990)。齧歯類の養育行動は一般的に性経験のないメスでは発現が低く、出産、泌乳期に入ることによってその発現が増える(Numan and Young, 2015)。このような繁殖経験に依存的な養育行動の発現には、妊娠に伴う内分泌の変化が大きな役割を担う。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。これらの内分泌変化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、妊娠末期に増えるエストロゲンは養育行動の発現に中心的な役割を果たす。例えば、雌性ホルモンを合成できないよう卵巣が除去されたラットでは、養育行動の発現は乏しく、仔ラットの回収には非常に長い時間を要する。ところが、卵巣の切除後にエストロゲンが補充されると、ラットはすみやかに仔ラットの回収を示す(Siegel and Rosenblatt, 1975; Terkel and Rosenblatt, 1972)。

このように、エストロゲンが養育行動の発現に中心的な役割を担うのは、オキシトシン受容体(OTR)の発現を増やすためだと考えられている(Champagne et al., 2001; Ostrowski et al., 1995)。OTは視床下部室傍核(PVN)と視床下部視索上核によりそのほとんどが合成されており、PVNは主に脳内へ分泌し、視床下部視索上核は抹消への分泌が多いことが示唆されている(Eliava et al., 2016; Knobloch et al., 2012)。抹消では上述のように乳腺や子宮の平滑筋に収縮をもたらす、中枢では養育行動の発現に必要な様々な神経修飾に関与している(Grinevich and Stoop, 2018)。そのため、OT遺伝子やOTR遺伝子が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, 2005c)、また中枢領域におけるOTRの発現量が養育行動の発現量が相関することが報

告されている(Champagne et al., 2001)。

OTR を発現した細胞は、脳内のあらゆる領域に分布している(Mitre et al., 2016; Olazbal and Alsina-Llanes, 2016; Yoshida et al., 2009)。それに対応して視床下部における 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いる(Knobloch et al., 2012)。泌乳期における母マウスの視床下部室傍核 (PVN) における OT 神経細胞をウイルスによって可視化した実験では、分界条床核や側坐核-被殻、扁桃体内側核などの比較的 OT システムが発達しているとされる領域よりも、外側中隔と視床室傍核(PVT)においてより高い密度の OT 合成細胞の神経終末が観察された(Knobloch et al., 2012)。外側中隔における OTR 発現細胞はストレス応答に関わるとされ、泌乳期における母マウスの恐怖刺激への耐性に寄与していることが明らかにされている(Menon et al., 2018)。一方で、PVT については学習に関与することが示されていたものの(Do-Monte et al., 2015)、社会行動はおろか、養育行動に関する知見は極めて少ない状況であった(Kasahara et al., 2016; Lonstein et al., 1997)。そこで、本研究では、母マウスで豊富なオキシトシンを受けることが示されている PVT 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を目的とした。

第1章 視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞は養育行動を促進する

1.1 緒言

養育行動は哺乳類の母動物に共通して観察され、仔の生存には不可欠なものである。齧歯類の養育行動は、はぐれた仔を巣へと持ち帰る回収行動、仔を舐める(以下、LG)、仔の上に背中を丸めて覆いかぶさるクラウチングなどのいくつかの定型的な行動によって構成される(Stern, 1996)。各母性行動は、仔の発する異なる感覚刺激によって誘起される。具体的には、仔ラットまたは仔マウスの発する匂いや鳴き声は巣へ仔を回収する行動を促し、(Marlin et al., 2015; Numan and Young, 2015)、仔ラットとの接触や授乳により生じる接触刺激はクラウチングを引き起こす(Voloschin and Tramezzani, 1979)。

OT神経系は様々な社会行動に関与し、とくに養育行動において有用な役割を担っている。OTRは感覚情報を処理する神経領域に多く発現し、母マウスが仔マウスの発する社会的シグナルを適切に受け取ることを可能にしている(Grinevich and Stoop, 2018)。嗅球と聴覚皮質におけるOTR発現細胞は、それぞれ仔マウスの匂いと鳴き声を受け取り、母マウスの回収行動に必要な因子となっている(Marlin et al., 2015; Yu et al., 1996)。仔マウスからの接触刺激、とりわけ吸乳刺激はOTRを介して、DMTや体性感覚皮質を活性化させる(Febo et al., 2005; Lonstein et al., 1997)。DMTのなかのひとつであるPVTは、ドーパミン、バソプレシン、そしてOTといった社会行動の制御に関わる神経修飾物質の受容体が発現している(Clark et al., 2017; Knobloch et al., 2012; Matzeu et al., 2016; Zhang et al., 2006)。DMTに発現するOTR細胞はそのほとんどがPVTに存在し(Olazbal and Alsina-Llanes, 2016; Yoshida et al., 2009)、PVNからの豊富なOT分泌を受けている(Knobloch et al., 2012)。

PVTにおいてOT神経系が発達していることが示されている一方で、PVTのOTR発現細胞の詳細な分布や、

その機能については未だ明らかでない。そこで実験 1-1 では、吻尾側に長い PVT を 5 つのセクションに分け、OTR 発現細胞の発現パターンから、aPVT と pPVT を定義した。実験 1-2 では、aPVT と pPVT に機能的な差があるのか調べるために、母マウスに仔マウスを提示し、そのときの aPVT と pPVT における活性化した OTR 発現細胞の数を比較した。実験 1-3 では、PVT の OTR 発現細胞の養育行動への関与明らかにするため、OT 入力を薬理的に阻害し、その後の母マウスの養育行動の変化を観察した。第 1 章では、これら実験を通して、aPVT と pPVT をそれぞれ定義し、pPVT への OT 入力 が養育行動に対して促進的に働いているのか検証した。

1.2 実験 1-1：視床室傍核におけるオキシトシン受容体の発現分布

1.2.1 実験 1-1 の材料と方法

第1章の全ての実験は 麻布大学実験動物委員会の承認(#180346-7)を得て行なった。

動物

本実験には、C57BL/6のOTR遺伝子に蛍光緑色蛋白(Venus)を翻訳する遺伝子が挿入されたOxtr^{Venus/+}(以下、OTR-Venusマウス)を用いた(Yoshida et al., 2009)。OTR-Venusマウスは、12 時間の明暗周期で室内灯が点灯し(6 時点灯、18時消灯)、一定の室温($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$)、湿度($45 \pm 5\%$)に保たれた室内にて飼育された。

飼育ケージ(175 × 95 × 105 mm)には、床敷(Corncob, Shepherd Specialty Paper)と巣材(パルマス μ , 天然素材探索研究所)を敷くことで、適切な飼育環境をつくとともに、後述のレトリビングテストに必要な巣の特定を

可能にした。水と飼育用固形飼料(MM-3、株式会社船橋農場)は自由摂取とした。本実験には、性経験のない OTR-Venusメス6匹と出産から7日目の泌乳期のメスを用いた。

灌流固定

ペントバルビタール(ソムノペンチル, 共立製薬株式会社)を0.1 mL/10 gで腹腔内投与し、深麻酔下にて、0.1 Mリン酸緩衝生理食塩水(以下、PBS)を20mL、左心室より灌流させた。続いて、0.1 M PBSにて4%に希釈したパラホルムアルデヒド溶液(以下、4% PFA)を20mL灌流し、全身灌流固定を行なった。抜脳後、4% PFA に浸漬し、4°Cの冷蔵庫で24時間保存した。その後、30%スクロースPBSにて薄切まで保管した。

免疫染色

固定後の脳は、薄切機(Vibratome VT 1200S, Leica Microsystems)にて30 μ mずつ冠状に切り出した。脳地図である“The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos and Franklin, 2004)”を参考に、ブレグマより後方に0.70 mmから1.90 mm(以下、-0.70 – -1.90 from Bregma)でのPVTを標的として切片を選択し、免疫染色を行なった。PBSを用い切片を洗浄し、さらに界面活性剤(Triton X-100, Alfa Aesar)を0.5%含むPBS(PBST)にて切片を3回、各10分ずつ洗浄した。ブロッキングのためにPBSTで5%になるように希釈した正常ロバ血清(Normal Donkey Serum, Jackson ImmunoResearch)に切片を1時間浸漬した。その後、緑色蛍光タンパクを標的とするウサギ由来のGFP抗体(No. 0598, 医学生物学研究所MBL)をブロッキング液で 1:1000 になるように希釈し、この一次抗体液で切片を 4°Cにて1晩反応させた。その後、PBST で3回、各10分ずつ洗浄した。ウサギ由来の抗体を緑色に蛍光標識するロバ由来の二次抗体(Donkey anti-Rabbit IgG Alexa488, Jackson ImmunoResearch)をブロッキング液

で 1:1000 になるように希釈し、この二次抗体液で切片を 4°Cにて一晚反応させ、陽性細胞を可視化した。その後、PBSTにて切片を3回洗浄した後、PBSで切片を洗浄した。細胞の核を可視化するために、Hoechst solution(H342, DOJINDO)をPBSで1:100000に希釈し、この核染色液にて15分間反応させた。染色した切片をスライドガラスに貼り付け、封入剤 (Fluoromount/Plus, Diagnostic BioSystems)にて切片を封入した。蛍光画像は顕微鏡(BX51-N, OLYMPUS)に装着した蛍光観察用照明と顕微鏡用デジタルカラーカメラ(DP71, OLYMPUS)にて撮影した。

染色画像解析

PVT(-7.0 -- -1.90 from Bregma)から、0.12 mmごとに切片を10枚回収した。そして、PVTを0.24mm(切片2枚分)間隔に5つのセクション(Section1: -0.70-0.94 from Bregma, Section2: -0.940--1.18 from Bregma, Section3: -1.18--1.42 from Bregma, Section4: -1.42-1.66 from Bregma, Section5: -1.66--1.90 from Bregma)に分割し、各セクションの切片2枚におけるVenus陽性細胞の数を比較した。

Venus陽性細胞はMATLAB (MATLAB 2018a, The MathWorks) を用いて定量した。カラーカメラにより撮影された画像から緑色要素を抽出し、一次元の数列に変換した。さらに、各切片におけるバックグラウンド強度の誤差を解消するために、各数列を標準化した。各数列を任意の閾値によりバイナリー数列に変換し、陽性細胞の輪郭を抽出した。この輪郭が細胞の大きさに一致しないものを数列より除いた。抽出された輪郭に対し、ウォーターシェッドの関数をかけることで重心を求め、重心の数を陽性細胞の数とみなした。

統計解析

繁殖ステージの異なる性的未経験マウスと泌乳期のOTR-Venusマウスからデータを取得した。また、PVTを5つのセクションに分割した。そこで、MATLABを用いて、繁殖ステージとPVTの分割がデータに対して、主効果およびそれらの相互効果を有するのか、Repeated Measure ANOVA(以下、rANOVA)により分析した。また、群間の周辺平均の推定値は多重比較し、ボンフェローニ補正を行なった。

1.2.2 実験 1-1 の結果

性的未経験および泌乳期にある OTR-Venus マウスの PVT における OTR 発現細胞の詳細な分布を調べるために、PVT を 5 つのセクションに分け、それぞれにおける OTR-Venus 陽性細胞の数を比較した。各セクションにおける OTR の代表的な発現の様子を図に示した (図 1.2.2-1)。rANOVA の結果、繁殖ステージはデータに対する主効果がなかったのに対し(Reproductive Stages, $F = 2.77$, $p = 0.12$)、PVT の分割は主効果が存在した(Sections, $F = 20.93$, $p < 0.01$)。また、データに対するそれらの相互効果についても見られなかった(Interaction between Reproductive Stages and Sections, $F = 1.01$, $p = 0.41$)。そこで、各セクションにおける OTR-Venus 陽性細胞の数を比較したところ、Section4 と Section5 が Section1-3 に対して有意に多いことが明らかになった(図 1.2.2-2; Section4: vs Section1, $p < 0.01$, Section2, $p < 0.01$, Section3, $p < 0.01$; Section5: vs Section1, $p < 0.01$, Section2, $p < 0.01$, Section3, $p < 0.01$)。過去の知見では、PVT は-1.46 from Bregma の位置で側坐核(NAc, Nucleus Accumbens)への投射細胞の分布が異なることが示されている(Cheng et al., 2018)。過去の知見と本実験の結果には組織学的な変化が生じる位置に一致が見られることから、本研究では-0.70--1.42 from Bregma までの PVT を aPVT とし、-1.42--1.90 from Bregma に位置する PVT を pPVT と定義した。

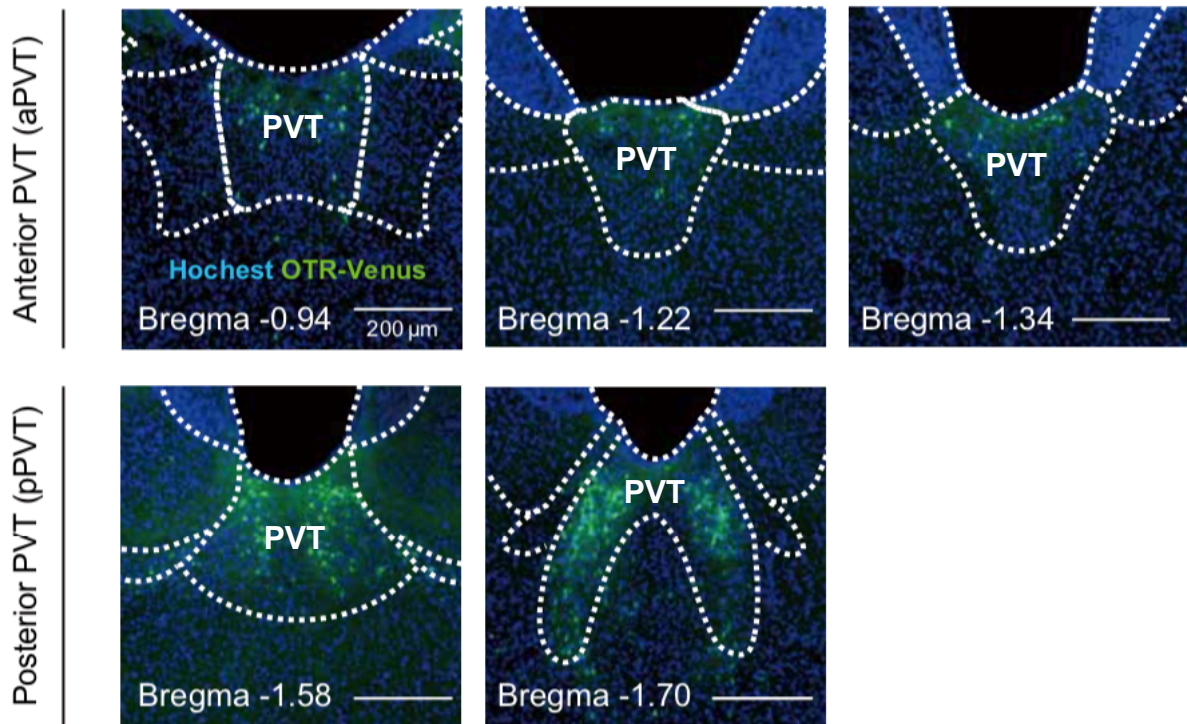


図 1.2.2-1 視床室傍核におけるオキシトシン受容体発現細胞

上図は OTR-Venus マウスの PVT における OTR-Venus 発現細胞を免疫染色により可視化した組織標本の例を示している。緑色は OTR-Venus を可視化したものであり、青色は Hoechst により神経細胞核を可視化したものである。中心の OTR-Venus が限局して発現している領域が PVT である。本研究では、上列 3 枚(-0.70—1.42 from Bregma)を aPVT、下列 2 枚を(-1.42—1.90 from Bregma)を pPVT と定義した。

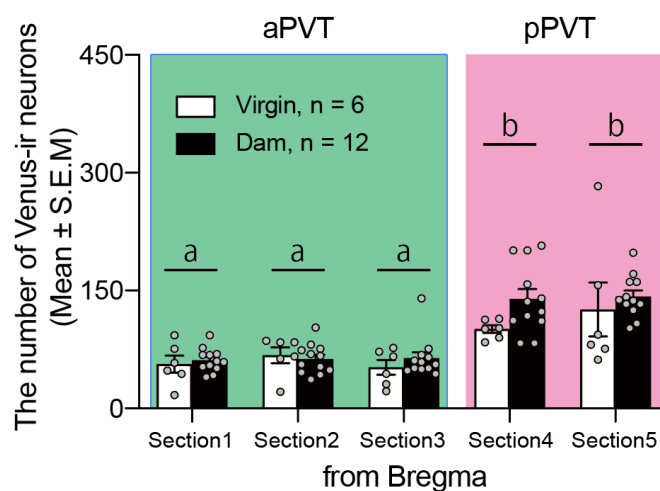


図 1.2.2-2 視床室傍核におけるオキシトシン受容体の発現分布

上図は、性的未経験(Virgin)および泌乳期(Dam)にある OTR-Venus マウスの PVT を 5 つのセクション(Section1: -0.70–0.94 from Bregma, Section2: -0.94–1.18 from Bregma, Section3: -1.18–1.42 from Bregma, Section4: -1.42–1.66 from Bregma, Section5: -1.66–1.90 from Bregma)に分け、各セクションにおける切片 2 枚分の OTR-Venus 陽性細胞数をプロットしたものである。Section4 と Section5 の OTR-Venus の数は、Section1–3 のいずれと比べても、有意に多かった(a vs b, $p < 0.01$)。

1.3 実験 1-2 : 仔マウス提示による母マウスの視床室傍核におけるオキシトシン受容体 発現細胞の反応

1.3.1 実験 1-2 の材料と方法

動物

実験に使用した OTR-Venus マウスは実験 1-1 と同じ方法で飼育した。本実験では、被験マウスに仔マウスを提示した Pup-exposure 群(n = 6)とその対照群である Non-exposure 群(n = 6)を用意した。各群は、OTR-Venus マウスを野生型の C57BL/6 と 2 週間同居させ、仔マウスを出産させることで作出した。OTR-Venus マウスは出産確認から 4 日後 (以下、PD5) に新しいテストケージ (175×245×125 mm) に移動させ、仔マウスから分離された。PD7 において、Pup-exposure 群に対して生後 4~6 日齢の仔マウスを提示した。

灌流固定

Non-exposure 群ではテストケージの蓋を開け、閉めてから 90 分後に、Pup-exposure 群では仔マウスの提示より 90 分後に、実験 1-1 の手順に準じて灌流固定を行なった。

二重免疫染色

固定後の脳は、薄切機(Vibratome VT 1200S, Leica Microsystems)にて 30 μm ずつ冠状に切り出した。脳地図である“The mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos and Franklin, 2004)”を参考に、aPVT と pPVT を標的として切片を選択し、免疫染色を行なった。PBS を用い切片を洗浄し、さらに界面活性剤 (Triton X-100, Alfa Aesar) を 0.5%含む PBS (PBST) にて切片を 3 回、各 10 分ずつ洗浄した。ブロッキングのために PBST で 5%になる

ように希釈した正常ロバ血清 (Normal Donkey Serum, Jackson ImmunoResearch) に切片を 1 時間浸漬した。その後、緑色蛍光タンパクを標的とするウサギ由来の GFP 抗体 (No. 0598, 医学生物学研究所 MBL) が 1:1000 に、神経活性の指標となるヤギ由来の c-Fos の抗体 (SC52-G, Santa Cruz Biotech) が 1:250 になるようにブロッキング液で希釈し、この一次抗体液で切片を 4°C にて 2 晩反応させた。その後、PBST で 3 回、各 10 分ずつ洗浄した。ウサギ由来の抗体を緑色に蛍光標識するロバ由来の二次抗体 (Donkey anti-Rabbit IgG Alexa488, Jackson ImmunoResearch) とヤギ由来の抗体を赤色に蛍光標識するロバ由来の二次抗体 (Donkey anti-Goat IgG Alexa594, Jackson ImmunoResearch) をブロッキング液で 1:1000 になるように希釈し、この二次抗体液で切片を 4°C にて一晩反応させ、陽性細胞を可視化した。その後、PBST にて切片を 3 回洗浄した後、PBS で切片を洗浄した。細胞の核を可視化するために、Hoechst solution (H342, DOJINDO) を PBS で 1:100000 に希釈し、この核染色液にて 15 分間反応させた。染色した切片をスライドグラスに貼り付け、封入剤 (Fluoromount/Plus, Diagnostic BioSystems) にて切片を封入した。蛍光画像は顕微鏡 (BX51-N, OLYMPUS) に装着した蛍光観察用照明と顕微鏡用デジタルカラーカメラ (DP71, OLYMPUS) にて撮影した。

染色画像解析

組織画像解析のためのサンプリングは、実験1-1の手順に従って行なった。PVT(-7.0 – -1.90 from Bregma)から、0.12 mmごとに切片を10枚回収した。実験1-1の結果を受け、PVT (-0.70–1.42 from Bregma)の6枚の切片をaPVTとし、PVT (-0.70–1.42 from Bregma)の4枚の切片をpPVTとして、各領域における陽性細胞の数を比較した。aPVTおよびpPVTにおけるVenus陽性細胞、c-Fos陽性細胞、および二重陽性細胞は、MATLABを用いて定量した。Venus陽性細胞の定量は実験1に準じて行なった。c-Fos陽性細胞の定量は、画像より赤色を抽出し、この手順は実験1-1に準じて行なった。二重陽性細胞は、緑色および赤色で抽出されたオブジェクトの輪郭が

重なる領域を抽出した。抽出された領域の大きさが細胞体の大きさを超えるものは数列から除いた。残された領域にウォーターシェッドをかけ、求められた重心を二重陽性細胞とみなした。

統計解析

MATLABを用いて、F検定により Non-exposure群と Pup-exposure群の分散が等しいか調べ、t検定により Venus陽性細胞と c-Fos陽性細胞の数、Venus陽性細胞に対する二重陽性細胞の割合を比較した。

1.3.2 実験 1-2 の結果

本実験では、実験 1-1 で定義した aPVT と pPVT に機能的な差があるのか調べるために、泌乳期にある OTR-Venus マウスに仔マウスを提示し、a PVT と p PVT における OTR 発現細胞の応答性の差異を調べた。Non-exposure 群と Pup-exposure 群の代表的な組織像を図に示した(図 1.3.2-1A-F)。本実験に使用した個体において、Non-exposure 群と Pup-exposure 群の母マウスの aPVT における OTR-Venus 陽性細胞の数に有意な差は見られなかった(図 1.3.2-2A, $t = -0.10$, $p = 0.34$)。また、c-Fos 陽性細胞および OTR-Venus に対する二重陽性細胞の割合についても、2 群間に有意な差は見られなかった(図 1.3.2-2A, $t = -1.13$, $p = 0.30$; 図 1.3.2-2B, $t = -0.97$, $p = 0.35$)。一方で、pPVT における OTR-Venus 陽性細胞数に群間差はなかったが(図 1.3.2-3A, $t = -0.77$, $p = 0.46$)、c-Fos 陽性細胞および OTR-Venus に対する二重陽性細胞の割合は pup-exposure 群において有意に多かった(図 1.3.2-3A, $t = -6.91$, $p < 0.01$; 図 1.3.2-3B, $t = -4.66$, $p < 0.01$)。これらの結果は、仔マウス提示によって活性化される細胞は、aPVT に比べて、pPVT で多く、その傾向は OTR 発現細胞においても同様であることを示唆している。

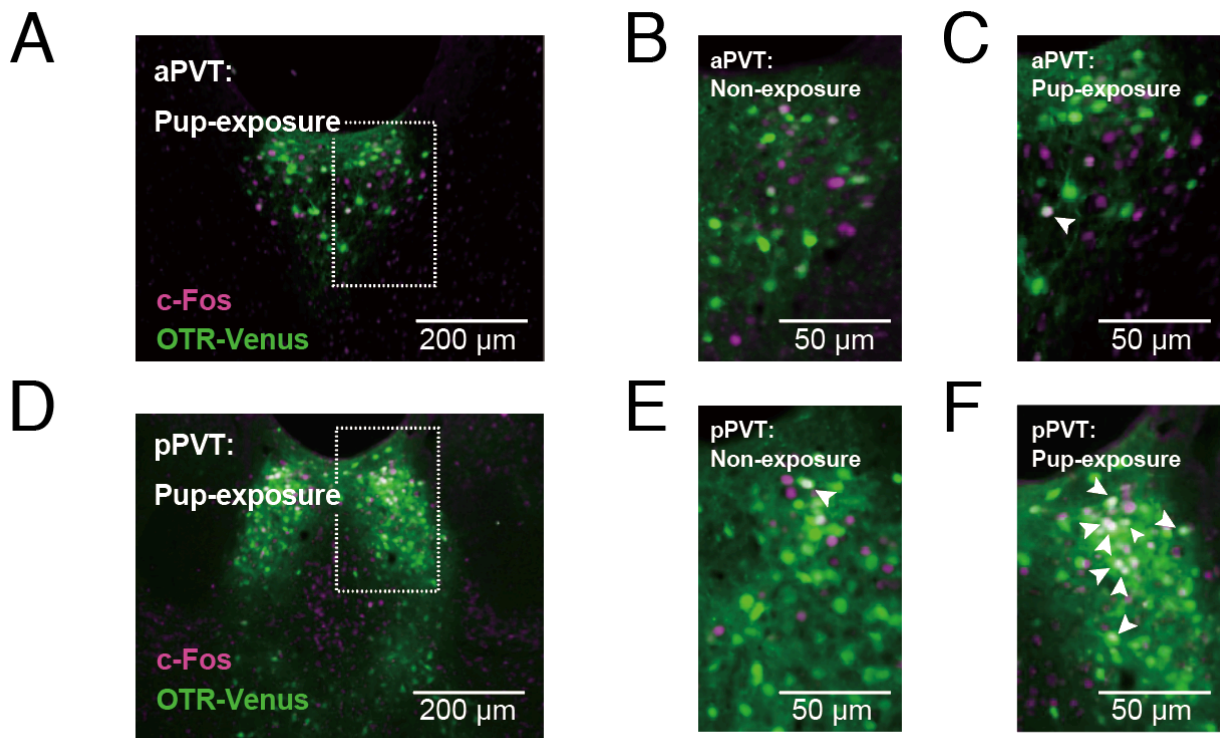


図 1.3.2-1 仔マウスの提示により活性化された視床室傍核におけるオキシトシン受容体発現細胞

上図は、仔マウスを提示した際の aPVT と pPVT における OTR-Venus および c-Fos 陽性細胞を免疫染色により可視化した組織標本の例である。緑色で標識されているのが OTR-Venus 陽性細胞であり、マゼンダで標識されているのは c-Fos 陽性細胞である。矢頭は、二重染色細胞を指している。(A)は、Pup-exposure 群の OTR-Venus マウスの aPVT 弱拡大像を示す。(B)は、Non-exposure 群の強拡大像を示す。(C)は、Pup-exposure 群の強拡大像を示し、(A)の白い破線により囲まれた領域を表す。(D)は、Pup-exposure 群の OTR-Venus マウスの pPVT 弱拡大像を示す。(E)は、Non-exposure 群の強拡大像を示す。(F)は、Pup-exposure 群の強拡大像を示し、(D)の白い破線により囲まれた領域を表す。

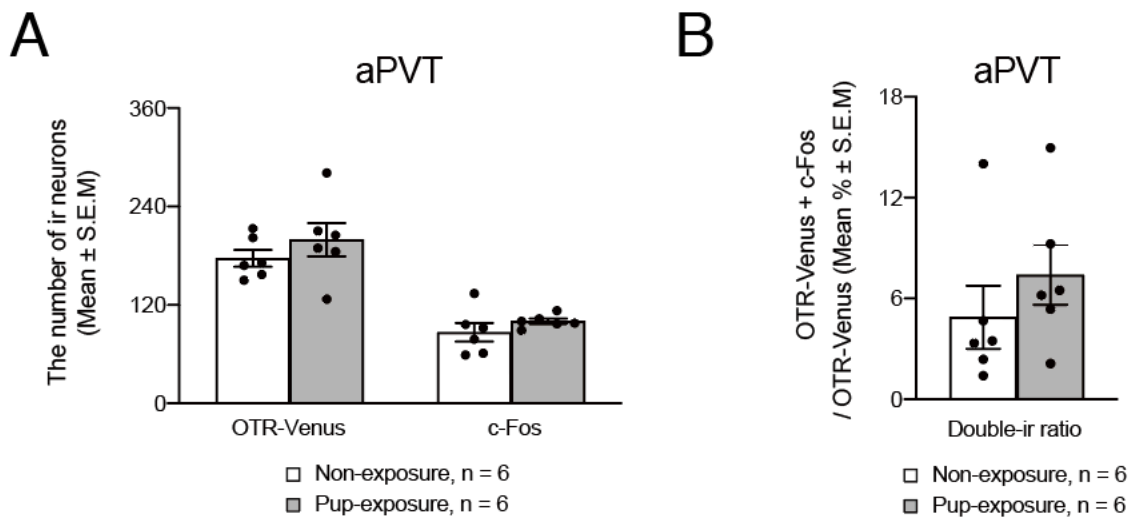


図 1.3.2-2 仔マウスの提示により活性化された視床室傍核-吻側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の割合

白色の棒は刺激の提示のなかった母マウス(Non-exposure)に関するデータを表し、灰色の棒は仔マウスを提示された母マウス(Pup-exposure)に関するデータを表す。(A)は、Non-exposure 群と Pup-exposure 群において、aPVT の切片 6 枚で観察された OTR-Venus 陽性細胞数と c-Fos 陽性細胞数をそれぞれプロットしたものである。(B)は、Non-exposure 群と Pup-exposure 群において、aPVT の切片 6 枚で観察された OTR-Venus 陽性細胞数に対する二重染色細胞数の割合(Double-ir ratio)を表したものである。

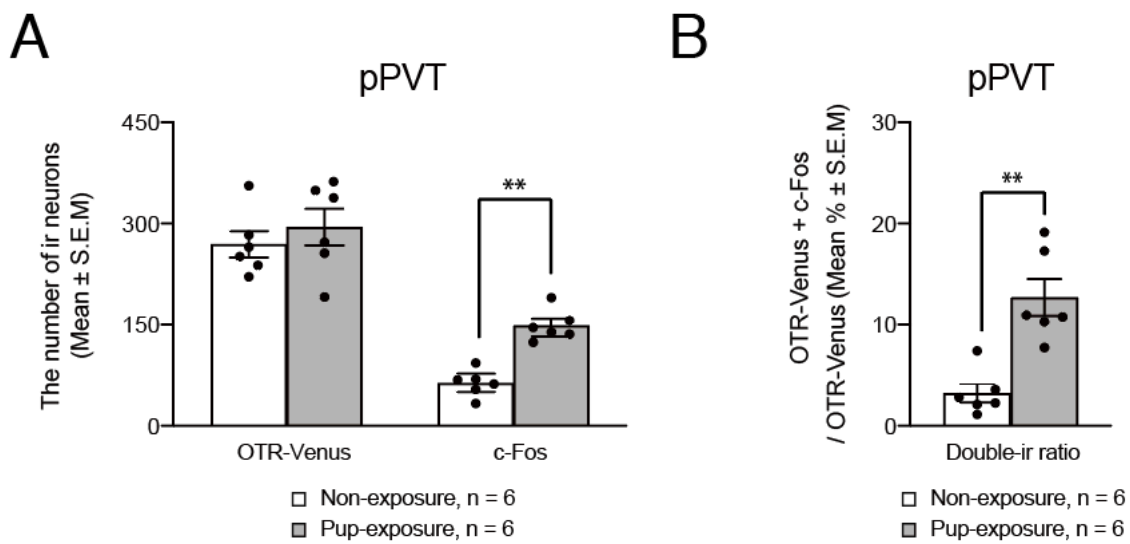


図 1.3.2-3 仔マウスの提示により活性化された視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の割合

白色の棒は刺激の提示のなかった母マウス(Non-exposure)に関するデータを表し、灰色の棒は仔マウスを提示された母マウス(Pup-exposure)に関するデータを表す。(A)は、Non-exposure 群と Pup-exposure 群において、pPVT の切片 4 枚で観察された OTR-Venus 陽性細胞数と c-Fos 陽性細胞数をそれぞれプロットしたものである。(B)は、Non-exposure 群と Pup-exposure 群において、pPVT の切片 4 枚で観察された OTR-Venus 陽性細胞数に対する二重染色細胞数の割合(Double-ir ratio)を表したものである。

図内の「**」は t 検定における p 値が 0.01 未満であることを示す。

1.4 実験 1-3：養育行動に対する視床室傍核尾側部へのオキシトシン入力の遮断による影響

1.4.1 実験 1-3 の材料と方法

動物

本実験には、野生型の C57BL/6J(以下、B6 マウス)の性的未経験メスを用いた。飼育方法については、実験 1-1 に準じた。本実験は、薬剤投与用のカニューラ留置のための手術から始まり、出産後に行動実験を行なった。

カニューラ留置手術の終了後、少なくとも 5 日間の回復期間を設け、野生型の B6 オスマウスと 2 週間、同居させた。実験 1-2 と同様に、PD2 に仔マウスの数を調整し、母マウスを PD5 にテストケージへ移動させた。行動実験は、レトリビングテストを PD7 または PD8 で行なった。

カニューラ留置手術

イソフルランを用いて、5%で導入麻酔をかけ、0.5–2%で維持麻酔を行なった。麻酔した実験マウスを脳固定装置に固定し、カニューラ留置を施した。実験に使用するカニューラは、ガイドカニューラ(22G, 長さ 4mm, Plastic One)、ダミーカニューラ(28G, 長さ 4.5mm, Plastic One)、インターナルカニューラ(28G, 長さ 4.0mm, Plastic One)の 3 つから構成される。ガイドカニューラを動物に留置し、薬剤の投与までダミーカニューラを挿入する。薬剤の投与は、ダミーカニューラを外し、インターナルカニューラをガイドカニューラに挿入して行う。ガイドカニューラは、ブレグマより後方 1.46mm の PVT (AP: -1.46, medial to lateral (ML): 0.0, dorsal to ventral(DV): -3.0 from Bregma)に挿入し、アクリルセメントによって頭蓋骨に固定した。

薬剤投与

薬剤の投与は単回投与と慢性投与の2種類を行なった。急性投与は各行動実験の50分前に、0.9%生理食塩水または同生理食塩水で0.5 μg/μLに希釈したオキシトシン受容体阻害薬($(d(CH_2)_5^1, Tyr(Me)^2, Thr^4, Orn^8, Tyr-NH_2^9)$ -vasotocin trifluoroacetate salt)(以下、OTA)を用いて行なった。OTAは中枢神経に投与されると、およそ45分後にOTRに結合し、OTの結合を阻害する(Witt and Insel, 1991)。薬剤の急速投与は、イソフルランにより麻酔をかけ、1分をかけて0.5μLを注入し、注入から30秒後ゆっくりとインターナルカニューラを抜去した。本実験では、各個体がOTAと0.9%生理食塩水の2回の急速投与を受けており、薬剤を投与する順番はカウンターバランスをとった。慢性投与には、カニューラに加え、浸透圧ポンプ(MODEL 1004; DURECT Corporation)を利用した。浸透圧ポンプは生体内にインプラントされることで、補充された薬剤を1時間に0.11μLずつ排出する。補充薬剤は、0.9%生理食塩水またはOTAとした。浸透圧ポンプのインプラントはPD2に行われ、臀部の大臀筋の位置に行なった。

神経細胞の核染色

実験1-2の手順に従い、灌流固定と脳サンプルの保存、薄切を行なった。PBSTにて切片を3回洗浄した後、PBSで切片を洗浄した。細胞の核を可視化するために、Hoechst solution(H342, DOJINDO)をPBSで1:100000に希釈し、この核染色液にて15分間反応させた。染色した切片をスライドガラスに貼り付け、封入剤(Fluoromount/Plus, Diagnostic BioSystems)にて切片を封入した。蛍光画像は顕微鏡(BX51-N, OLYMPUS)に装着した蛍光観察用照明と顕微鏡用デジタルカラーカメラ(DP71, OLYMPUS)にて撮影した。カニューラを設置した個体のpPVTの組織像を図1.4.2-1に示した。

レトリビングテスト

レトリージングテストは、急速投与の場合、PD7 または PD8 に行い、慢性投与の場合には PD7 で行なった。それぞれ、実験の 50 分前に仔マウスをケージから回収し、50 分後、母マウスに対して仔マウスを再提示した。薬剤の投与は、仔マウスの回収と同じく 50 分前に行なった。仔マウスの提示は 3 匹の仔マウスが用いられ、母マウスがケージ内に作った巣とは反対側の壁際に 3 匹を配置した。提示から 20 分間、ビデオカメラで母マウスの行動を録画し、以下の定義に準じて各行動の発現時間を計測した。なお、レトリージングについては、回収した匹数と最初の 1 匹目の回収が終了するまでの時間(潜時)を観察した。

リッキング & グルーミング (以下、LG) : 仔を舐める、撫でる行動

クラウチング : 仔マウスの上で前後肢で腹部を浮かせ、背中を湾曲させる行動

レトリージング : 仔マウスをくわえ、巣に持ち帰る行動

統計解析

MATLABを用いて、順位和検定により群間の差を比較した。

1.4.2 実験 1-3 の結果

実験 2 において、aPVT に比べ、pPVT における OTR 発現細胞が仔マウスの提示により活性化された。このことから、PVT では主に pPVT における OTR 発現細胞が仔マウス情報に対して反応していると考えられた。そこで、pPVT の OTR と養育行動の関連性を調べるために、pPVT における OTR を行動試験直前に一度または、泌乳期に慢性的に阻害し、それら処置を受けた母マウスの養育行動を観察した。

養育行動試験中の OTR の阻害を目的とした OTA の急性投与は、生理食塩水を投与された際の養育行動と比

べて、LG とクラウチングの発現時間に影響を与えなかった(図 1.4.2-2A, $U = 18, p = 1.0$; 図 1.4.2-2B, $U = 14, p = 0.64$)。レトリービングについても同様であり、回収までの潜時と回収した仔マウスの匹数は OTA の急速投与による影響を受けなかった(図 1.4.2-3A, $U = 28, p = 0.20$; 図 1.4.2-3B, $U = 1.5, p = 1.0$)。

OTA の慢性投与は、急速投与と同様に、LG(図 1.4.2-4A, $U = 82, p = 0.16$)とレトリービングに対する影響を示さなかった (図 1.4.2-5A, $U = 56.5, p = 0.24$; 図 1.4.2-5B, $U = 71.5, p = 1.0$)。しかしながら、OTA の慢性投与はクラウチングに対して、有意な減少をひきおこした(図 1.4.2-4B, $U = 98, p < 0.01$)。また、麻酔手順の入る急性操作と麻酔をかけない慢性操作が行われた母マウスでは、行動試験中に LG が行われた時間は急性操作を受けた母マウスにおいて減少が観察された(図 1.4.2-2A および図 1.4.2-4A, $U = 190, p < 0.01$)。

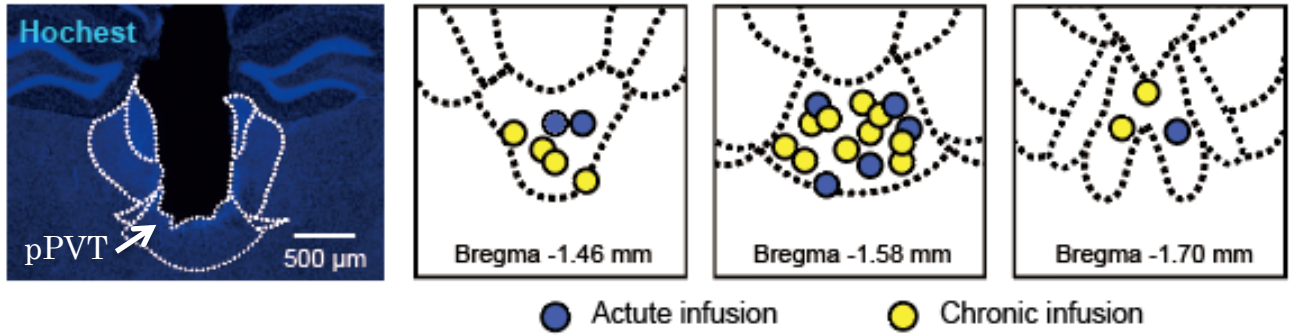


図 1.4.2-1 視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体阻害薬を投与した位置

青色の円(Acute infusion)はpPVTへOTAを行動試験直前に一度急速投与した個体を表し、黄色の円は(Chronic infusion)はOTAを慢性的に投与した個体を表す。

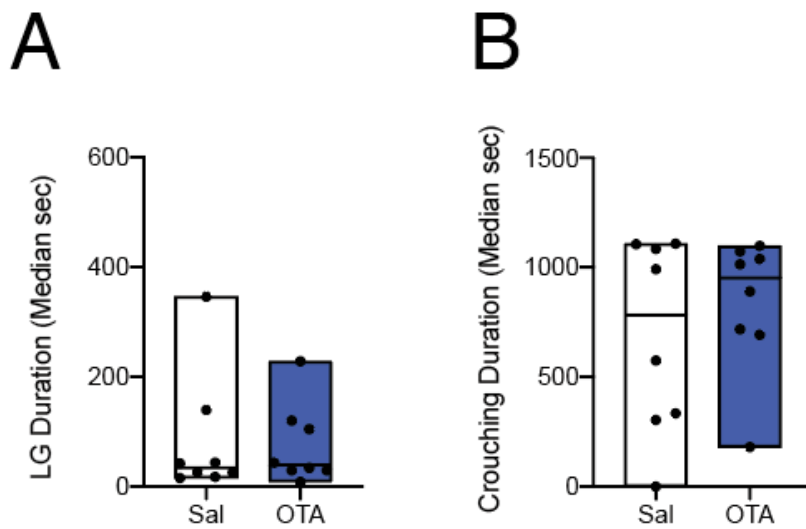


図 1.4.2-2 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を急性的に投与した際の養育行動の変化 1

白色の箱(Sal)は、行動テスト直前に生理食塩水を pPVT に投与された母マウスの養育行動に関するデータを示している。青色の箱(OTA) は、行動テスト直前に OTA を pPVT に投与された母マウスの養育行動に関するデータを表す。(A)は、各群の個体がリッキング&グルーミングを発現させた時間(LG Duration)をプロットしたものである。(B)は、各群の個体がクラウチングを発現させた時間(Crouching Duration)をプロットしたものである。

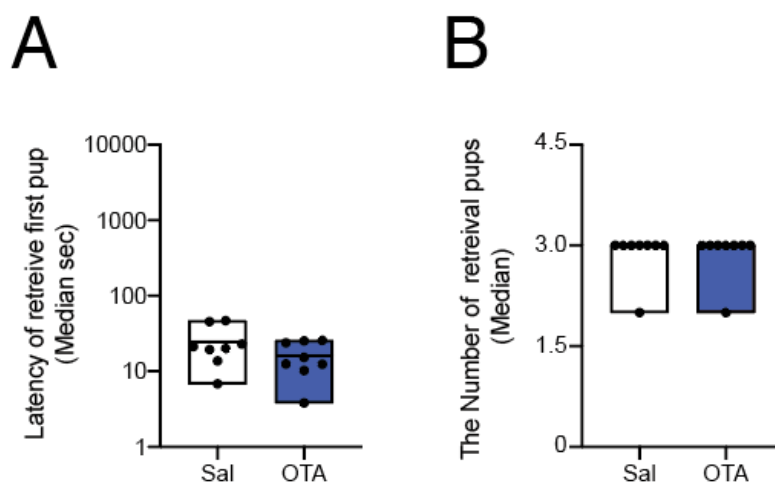


図 1.4.2-3 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を急性的に投与した際の養育行動の変化 2

白色の箱(Sal)は、行動テスト直前に生理食塩水を pPVT に投与された母マウスの養育行動に関するデータを示している。青色の箱(OTA) は、行動テスト直前に OTA を pPVT に投与された母マウスの養育行動に関するデータを表す。(A)は、各群の個体のレトリージング潜時(Latency of retrieve first pup)をプロットしたものである。(B)は、各群の個体がレトリージングによって回収した個体の数(The number of retrieval pups)をプロットしたものである。

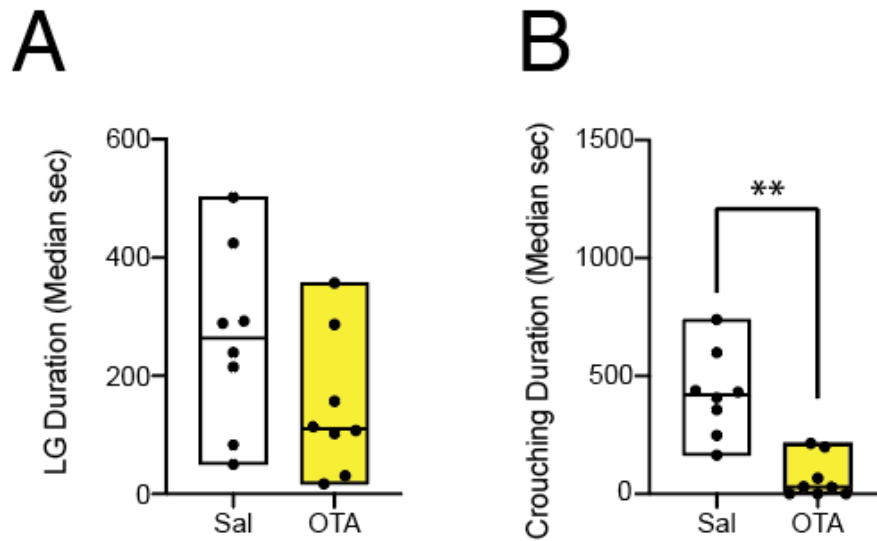


図 1.4.2-4 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を慢性期に投与した際の養育行動の変化 1

白色の箱(Sal)は、泌乳期に生理食塩水を pPVT に慢性的に投与された母マウスの養育行動に関するデータを示す。黄色の箱(OTA)は、泌乳期に OTA を pPVT に慢性的に投与された母マウスの養育行動に関するデータを表す。(A)は、各群の個体がリッキング&グルーミングを発現させた時間(LG Duration)をプロットしたものである。(B)は、各群の個体がクラウチングを発現させた時間(Crouching Duration)をプロットしたものである。図内の「**」は t 検定における p 値が 0.01 未満であることを示す。

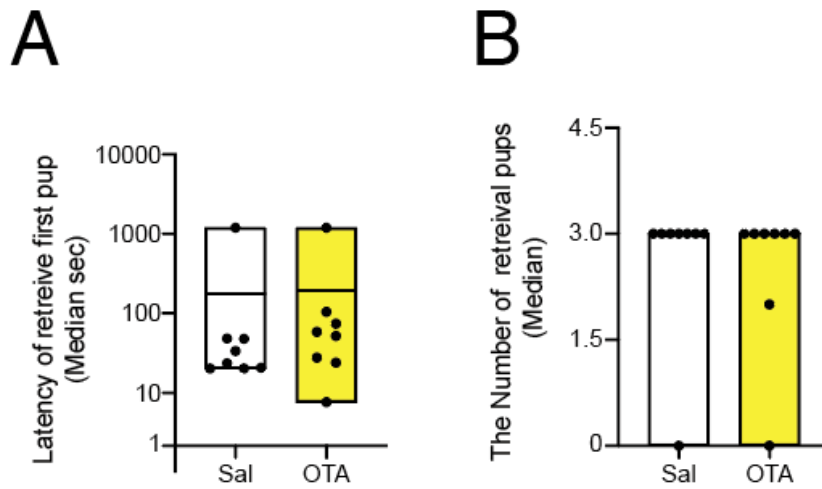


図 1.4.2-5 視床室傍核-尾側部にオキシトシン受容体阻害薬を慢性期に投与した際の養育行動の変化 2

白色の箱(Sal)は、泌乳期に生理食塩水を pPVT に慢性的に投与された母マウスの養育行動に関するデータを示す。黄色の箱(OTA)は、泌乳期に OTA を pPVT に慢性的に投与された母マウスの養育行動に関するデータを表す。(A)は、各群の個体のレトリービング潜時(Latency of retrieve first pup)をプロットしたものである。(B)は、各群の個体がレトリービングによって回収した個体の数(The number of retrieval pups)をプロットしたものである。

1.5 考察および結論

本章では、OT システムの発達した PVT の養育行動との関係性について調べた。PVT は吻尾側に長い構造体であり、その吻尾側で解剖学的な差異が存在することが示されている(Li and Kirouac, 2012)。そこで本章では、OTR 受容体発現細胞の分布により、aPVT と pPVT の 2 つの亜核に分けた。pPVT における OTR 発現細胞の数は、aPVT に比べて、有意に多かった。また、泌乳期の母マウスに仔マウスを曝露すると、pPVT でのみ、活性化した OTR 発現細胞の割合における有意な増加が観察された。これらのことから、仔とのインタラクションには、主に pPVT の OTR 発現細胞の活性化が何らかの寄与をしていると考えられた。

pPVT の OTR 発現細胞は OT の受容により活性化することが報告されている(Febo et al., 2005)。pPVT の OTR 発現細胞の活性化がどのように仔マウスとのインタラクションに関与しているのか明らかにするため、pPVT に対して OTA を投与し、養育行動への影響を調べた。pPVT における OTR 阻害は、LG やレトリービングには影響を与えなかったが、クラウチングを減少させた。レトリービングとクラウチングは連続的に行われ、それぞれ異なる刺激により誘起される。レトリービングは仔マウスの匂いや発声により誘起され、クラウチングは仔マウスからの接触刺激、とりわけ吸入刺激により引き起こされる(Stern, 1996)。また、pPVT は触覚刺激を受け取ることが示されている(Li and Kirouac, 2012)。これらのことから、pPVT における OTR 発現細胞は主に仔マウスからの触覚刺激を受けることで養育行動の促進に関与し、pPVT における OTR の阻害操作を受けた母マウスはクラウチング特異的に減少を示したと考えられた。

薬剤の投与は、急性と慢性の 2 つの投与方法により行なった。円滑に投与を行うため、急速投与では行動試験の 1 時間前にイソフルランによって麻酔したのち、薬剤の投与を行なった。一方で、慢性投与では行動試験の前に麻酔をかける手順は含まなかった。生理食塩水の急性投与が行われた母マウスは、慢性投与を受けた母マウスに比べて、LG を行う時間を減少させた。このような急性投与手順による減少は、クラウチングやレト

リービングでは見られなかった。LG を誘起する感覚刺激は、舌をはじめとする感覚器からの触覚情報だと考えられている(Stern and Johnson, 1990)。上述のように、クラウチングを誘起する主な感覚刺激は同じく触覚刺激であるが、異なる感覚器により受容される乳頭刺激となる。泌乳期にある母マウスの体性感覚皮質は、乳頭からの触覚刺激に対する応答性が増強されており、乳頭刺激に対する鋭敏な反応を可能にしている(Carcea and Froemke, 2013)。したがって、急性投与手順における麻酔は触覚刺激を介した養育行動に影響を与えてしまっていると考えられる。一方で、クラウチングは泌乳期における体性感覚皮質の可塑的变化により、影響を受けるに至らなかったと考えられる。

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。母マウスと母ラットは主に仔の匂い刺激を養育行動の先行刺激としている(Levy et al., 2004)。嗅球は先行刺激である仔ラットの匂いの情報処理に関与し、嗅球における OTR が阻害された母マウスは直ちに養育行動を減少させる(Yu et al., 1996)。しかし、行動の強化に関与する腹側被蓋野における OTR の阻害は複数回行われて初めて行動の減少を引き起こすことが示されている(Pedersen et al., 1995)。母マウスのクラウチング行動は pPVT における単回の OTR 阻害による影響は受けなかったが、慢性的に阻害されることで減少が観察される。さらに、PVT が行動の強化に関与することから(Matzeu et al., 2016; Zhu et al., 2018)、pPVT における OTR は行動の強化に関与するものであると考えられた。本章にて得られた結果より示唆されたことをまとめると、pPVT における OTR 発現細胞は仔マウスからの触覚刺激を受けて活性化し、その活性化はクラウチング行動の強化に寄与していると予想された。

第2章 視床室傍核-尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の活性化は行動を強化する

2.1 緒言

特定の行動を増やす操作や刺激は、その行動に対する強化子と呼ばれる。養育行動の場合、吸乳刺激をはじめとする仔ラットの発する様々な刺激が正の強化子、すなわち報酬となり、その発現量を高く維持している(Ferris et al., 2005; Hauser and Gandelman, 1985)。第1章では、pPVTにおけるOTR発現細胞の活性化が母マウスのクラウチング行動の強化に寄与していることが示唆された。PVTは一般学習課題において、行動の強化に必要な領域であることが示されている(Choi and McNally, 2017; Zhu et al., 2018)。さらに、PVTにおけるOTR発現細胞はOTと結合することで神経活性が高まり(Febo et al., 2005)、PVTの活性化は行動を強化することが過去の先行研究により示されている(Matzeu et al., 2016; Zhu et al., 2018)。これらのことから、pPVTのOTR発現細胞の活性化は行動の強化を引き起こすと考えた。

行動の強化は、側坐核(NAc, Nucleus Accumbens)をはじめとする脳内報酬系により行われている(Berridge, 2019)。NAcは活性化されることで行動を強化しており(Gul Dolen et al., 2013; Gunaydin et al., 2014; Hung et al., 2017)、PVTにおけるOTR発現細胞はNAcに対して興奮性の神経投射を行なっている(Gul Dolen et al., 2013)。これらの知見はpPVTのOTR発現細胞の活性化が行動の強化に寄与するという仮説を支持するものである。特定の神経活動と行動の強化に関する関係は、対象とする行動の増減により定量される他、より感度の高い行動実験法として場所指向性テスト(CPP, Conditional Place Preference Test)が用いられてきた(Gul Dolen et al., 2013)。CPPでは、特定の神経操作を行うことで生じる各部屋への滞在時間の変化から、その操作が強化子となっているのか評価する。なお、特定の神経操作が強化子となる場合、実験マウスはその操作が行われる部屋での滞在時間を増加させる。そこで、第2章では、CPPを用いることでpPVTにおけるOTR発現細胞の活性化が行動

の強化に寄与しているのか検証した。

2.2 実験 1 : 視床室傍核尾側部におけるオキシトシン受容体発現細胞の活性化

2.2.1 実験 2-1 の材料と方法

第 2 章の全ての実験は 東京大学定量生命科学研究所実験動物委員会の承認(#2915, IQB)を得て行なった。

動物

後日公開

ウイルス顕微注入と光ファイバーの留置

後日公開

場所嗜好性テスト

後日公開

2.2.2 実験 2-1 の結果

後日公開

2.3 考察および結論

詳細については後日公開するが、仔マウスからの接触刺激により活性化される pPVT における OTR 発現細胞は、その活性化により母マウスのクラウチング行動を強化することが示唆された。

第3章 視床室傍核-尾側部における内側前頭前野からの神経入力を受ける細胞は養育行動を抑制する

3.1 緒言

泌乳期にある母ラットは強化子となる仔ラットの刺激を受け取ることで養育行動を増やし、養育行動を増やすことでまた強化子となる刺激を受け取る機会を増やしている(Nagasawa et al., 2012)。そのため、泌乳期にある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大きな変化が生じると、柔軟に養育行動の量を調節する(Murgatroyd et al., 2016)。第1章では、pPVTにおけるOTR発現細胞が、クラウチング行動の強化に関与することを示唆した。さらに、第2章では光遺伝学的手法とCPPを組み合わせ、pPVTにおけるOTR発現細胞の活性化が行動の強化をもたらすことを示唆した。これらのことから、母マウスのクラウチング行動はpPVTのOTR発現細胞の活性化により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には活性化により行動を強化する細胞だけでなく、行動を消去する役割を持つ細胞が存在すると考えた。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していると仮説を立てた。

母ラットにとって見知らぬ異系統のオスは罰となるため、泌乳期に繰り返し曝露されると、母ラットは養育行動を減少させる(Murgatroyd et al., 2015, 2016)。そこで、まず実験3-1では、通常の泌乳期を過ごした母マウスと、異系統のオスマウスを提示され養育行動の減少した母マウスのpPVTの神経活性状態を比較した。神経活性状態を評価するために、第1章と同じく神経活性マーカーであるc-Fosの免疫染色を行い、その陽性細胞を定量することで比較した。さらに、本実験では、pPVTにおける養育行動の消去をもたらす細胞を活性化さ

せる神経領域の候補を見つけるために、PVT へ投射する神経領域のなかで行動の消去に關与する領域の活性状態について、同様に c-Fos を指標に調べた。実験 3-2 では、実験 3-1 より示唆された pPVT における養育行動の消去をもたらす細胞を活性化させる神経領域に注目した。そして、神経細胞の軸索から細胞体へ逆行するウイルスを用いて、該当の領域における投射細胞の活性状態が、実際に養育行動の減少した母マウスではどのように変化しているのか調べた。実験 3-3 では、実験 3-2 で観察した pPVT への投射細胞で生じていた変化を薬理遺伝学的手法により再現し、母マウスの養育行動への影響を観察した。本章では、これら実験を通して、養育行動の発現量を減少させる役割を持つ pPVT の細胞の存在について調べることにした。

3.2 実験 3-1：養育行動の減少に伴う視床室傍核関連領域の神経活性の変化

3.2.1 実験 3-1 の材料と方法

第 3 章の全ての実験は 麻布大学実験動物委員会の承認(#180346-7)を得て行なった。

動物

後日公開

ストレス感作

後日公開

レトリービングテスト

後日公開

灌流固定

後日公開

酵素抗体を用いた免疫染色

後日公開

染色画像解析

後日公開

統計解析

後日公開

3.2.2 実験 3-1 の結果

後日公開

3.3 実験 3-2 : 養育行動の減少に伴う内側前頭前野における視床室傍核尾側部へ投射する細胞の活性状

態の変化

3.3.1 実験 2-2 の材料と方法

動物

後日公開

視床室傍核へのアデノ随伴性ウイルスの顕微注入

後日公開

灌流固定

後日公開

組織解析

後日公開

統計

後日公開

3.3.2 実験 3-2 の結果

後日公開

3.4 実験 3-3 : 内側前頭前野からの視床室傍核-尾側部への神経入力の人為的操作

3.4.1 実験 3-3 の材料と方法

動物

後日公開

視床室傍核へのアデノ随伴性ウイルスの顕微注入

後日公開

灌流固定

後日公開

GFP と mCherry に対する二重免疫染色

後日公開

クロザピン-N-オキシド投与

後日公開

レトリビングテスト

後日公開

統計

後日公開

3.4.2 実験 2-3 の結果

後日公開

3.5 考察および結論

詳細については後日公開するが、mPFCにおけるpPVTへの投射細胞の慢性的な活性化は、OTR発現細胞と同様に仔マウスからの接触情報の処理に影響を与えていることが示唆された。

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、Michael Numan や Catherine Dulac をはじめとする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、OT システムが発達している pPVT が(Knobloch et al., 2012)、異なる 2 つの神経入力を介して、養育行動の発現量を調節していることを示した。

養育行動は様々な神経領域で多様な神経物質を介して制御されるが、特に OT は大きな役割を担っている(Grinevich and Stoop, 2018; Takayanagi et al., 2005b)。OT システムは社会行動に関わる様々な脳領域で発達しているが、外側中隔と PVT における OT 陽性の軸索末端と OTR の密度は他の領域と比較しても高いことが示されている(Grinevich and Stoop, 2018; Knobloch et al., 2012; Takayanagi et al., 2005b)。しかしながら、PVT の OTR の詳細な分布様式や養育行動における機能については、これまで明らかにされていなかった。PVT は吻尾側に長い構造体であり、その前後において解剖学的、機能的な差異が存在することが報告されている(Choi et al., 2019; Li and Kirouac, 2012)。PVT における OTR 陽性細胞の数を縦断的に調べると、aPVT におけるその数に比べ、pPVT の陽性細胞の数は有意に多かった。また、母マウスの pPVT は、aPVT に比べ、仔マウス提示によって活性化する OTR 発現細胞がより多く観察された。これらの結果より、PVT における OTR システムにも、吻尾側における解剖学的および機能的差異が存在し、主に pPVT の OTR 発現細胞によって仔マウスからの社会刺激を受けとられていることが示唆された。

次に、pPVT に注目し、母マウスの同領域に対する OT 入力を慢性的に遮断したところ、クラウチング行動の減少が観察された。PVT における OTR 発現細胞は OT の結合により神経活性を高めることから(Febo et al., 2005)、OTR を介した pPVT の活性化がクラウチング行動を促進していると考えられた。また、pPVT における OTR の遮断は単回では効果はなく、慢性的な遮断によってのみクラウチング行動の減少が観察された。OTR の遮断によるこのような行動の変化は行動の強化に関与する領域に発現する OTR を阻害したときに観察されることから(Pedersen et al., 1995)、pPVT における OTR 発現細胞は行動の強化に寄与していると考えられた。そこで、光遺伝学的手法と CPP を組み合わせて、pPVT における OTR 発現細胞の活性化が行動を強化するのか検証した。その結果、pPVT における OTR 発現細胞が活性化により実験マウスが部屋への滞在時間を延長させていたことから、pPVT における OTR 発現細胞の活性化は行動を強化すると結論づけられた。これらの結果をまとめると、母マウスのクラウチング行動は pPVT における OTR 発現細胞の活性化によって強化され、その活性化の慢性的な阻害がその消去をもたらすと考えられた。

一方で、PVT には活性化により行動の消去を引き起こす細胞が存在することが確認されている(Lkhagvasuren et al., 2014; Zhu et al., 2018)。このことから、母マウスのクラウチング行動の発現量は、pPVT における PVN からの OT 分泌をうける OTR 発現細胞の活性化だけでなく、その他の領域からの神経入力を受ける細胞の活性化の影響を受けて調節されていると考えられた。詳細については後日公開するが、mPFC から pPVT への投射の慢性的な活性化はクラウチング行動の発現に対して抑制的に働いていると考えられた。また、mPFC から PVT への投射は強化された行動の消去に関わることが示されており(Otis et al., 2017)、mPFC を介して活性化される pPVT の細胞は消去により母マウスのクラウチング行動を減少させていたものと考えられる。

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強化子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に、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 からの抑制性の負のフィードバックを受けていると考えられる。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(図 4)。

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 の一度の神経操作では変化せず、繰り返して神経操作を行うことではじめて発現の変化が生じることが示されている(Zhu et al., 2018)。これらのことから、pPVT への単回の神経操作が行動へ影響を引き起こせなかったのは、PVN または 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を再現していなかった為だと考えられた。

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、強化および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。今後の研究では、pPVT における消去をもたらす細胞種の特定や、強化や消去によって pPVT の細胞がどのような可塑的な変化を示しているのか調べていきたいと考えている。

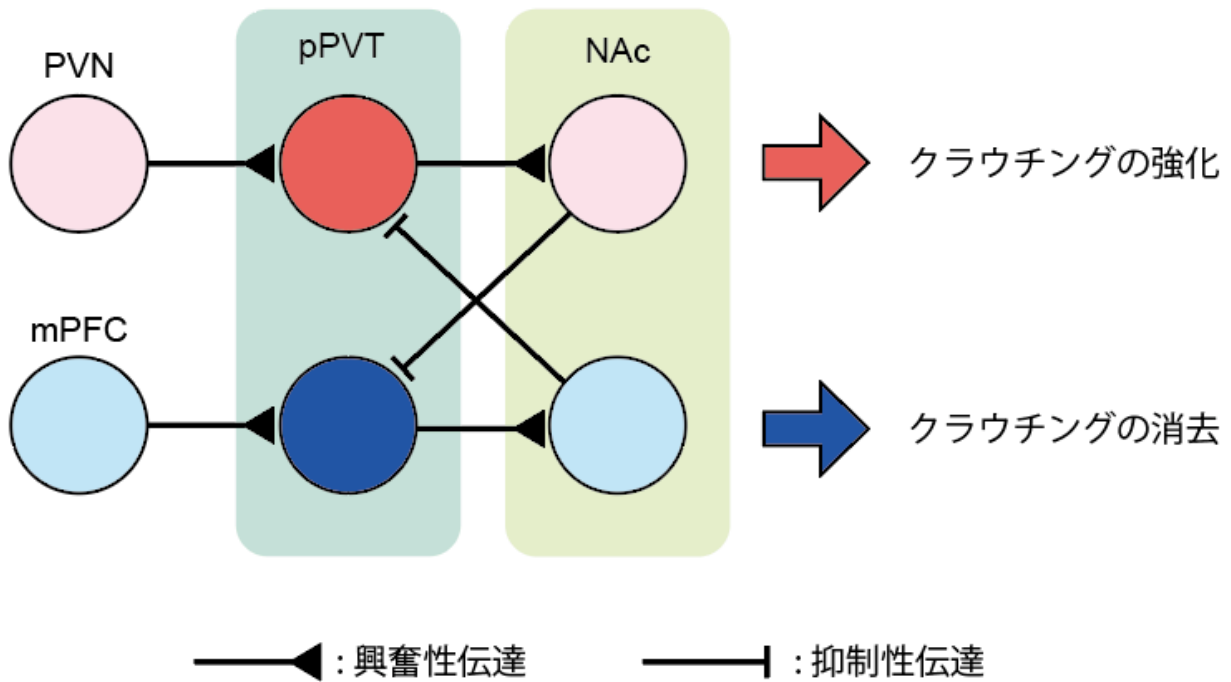


図4 視床室傍核-尾側部におけるクラウチング行動の発現量を調節する神経メカニズム

視床室傍核-尾側部(pPVT)における視床下部室傍核(PVN)からのオキシトシンを受けるオキシトシン受容体発現細胞(中央、赤色の円)と内側前頭前野(mPFC)からの神経投射を受ける細胞(中央、青色の円)は、その下流である側坐核(NAc)を介して、相互に抑制する回路を形成している可能性が考えられた。

参考論文

本論文の一部は以下に公表した。

Watarai A., Tsutaki S., Nishimori K., Okuyama T., Mogi K., Kikusui T. : The blockade of oxytocin receptors in the paraventricular thalamus reduces maternal crouching behavior over pups in lactating mice.

Neuroscience Letters, 720, 134761, 2020

doi:10.1016/j.neulet.2020.134761.

参考文献

- Berridge, K. C. 2019. Affective valence in the brain: modules or modes? *Nature Reviews Neuroscience*, 20, 225–234.
- Bosch, O. J., and Neumann, I. D. 2008. Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 17139–17144.
- Broms, J., Grahm, M., Haugegaard, L., Blom, T., Meletis, K., and Tingström, A. 2017. Monosynaptic retrograde tracing of neurons expressing the G-protein coupled receptor Gpr151 in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 525, 3227–3250.
- Carcea, I., and Froemke, R. C. 2013. Cortical plasticity, excitatory–inhibitory balance, and sensory perception, *Progress in brain research*, 207, 65–90.
- Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., and Meaney, M. J. 2001. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 12736–12741.
- Cheng, J., Wang, J., Ma, X., Ullah, R., Shen, Y., and Zhou, Y.-D. 2018. Anterior Paraventricular thalamus to nucleus accumbens projection is involved in feeding behavior in a novel environment. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 202.
- Choi, E. A., Jean-Richard-Dit-Bressel, P., Clifford, C. W. G., and McNally, G. P. 2019. Paraventricular thalamus controls behavior during motivational conflict. *J Neurosci*, 39, 4945–4958.
- Choi, E. A., and McNally, X. G. P. 2017. Paraventricular thalamus balances danger and reward. *J Neurosci*, 37, 3018–3029.
- Clark, A. M., Leroy, F., Martyniuk, K. M., Feng, W., McManus, E., Bailey, M. R., et al. 2017. Dopamine D2 receptors in

the paraventricular thalamus attenuate cocaine locomotor sensitization. *eNeuro*, 4, 0227-17.2017.

Do-Monte, F. H., Quiñones-Laracuente, K., and Quirk, G. J. 2015. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature*, 519, 460-463.

Donhoffner, M. E., Goings, S. P., Atabaki, K., Wood, R. I., and Wood, C. R. I. 2016. Intracerebroventricular oxytocin self-administration in female rats. *J Neuroendocrinol*, 28(10)

Eliava, M., Melchior, M., Knobloch-Bollmann, H. S., Wahis, J., da Silva Gouveia, M., Tang, Y., et al. 2016. A New Population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. *Neuron*, 89, 1291–1304.

Febo, M., Numan, M., and Ferris, C. F. 2005. Functional magnetic resonance imaging shows oxytocin activates brain regions associated with mother-pup bonding during suckling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 11637–11644.

Ferris, C. F., Kulkarni, P., Sullivan, J. M., Harder, J. A., Messenger, T. L., and Febo, M. 2005. Pup suckling is more rewarding than cocaine: evidence from functional magnetic resonance imaging and three-dimensional computational analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 149–56.

Figueira, R. J., Peabody, M. F., and Lonstein, J. S. 2008. Oxytocin receptor activity in the ventrocaudal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior in postpartum rats. *Behavioral Neuroscience*, 122, 618–628.

Francis, D. D., Young, L. J., Meaney, M. J., and Insel, T. R. 2002. Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin (V1a) receptors: Gender differences. *Journal of Neuroendocrinology*, 14, 349–353.

- Geddes, S. D., Assadzada, S., Lemelin, D., Sokolovski, A., Bergeron, R., Haj-Dahmane, S., et al. 2016. Target-specific modulation of the descending prefrontal cortex inputs to the dorsal raphe nucleus by cannabinoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 5429–34.
- Grinevich, V., and Stoop, R. 2018. Interplay between oxytocin and sensory systems in the orchestration of socio-emotional behaviors. *Neuron*, 99, 887–904.
- Gül Dölen, Darvishzadeh, A., Huang, K. W., and Malenka, R. C. 2013. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*, 501, 179–184.
- Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V, Lief, E., Adhikari, A., et al. 2014. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Neuron*, 82, 1535–1551.
- Hattori, T., Osakada, T., Matsumoto, A., Matsuo, N., Haga-Yamanaka, S., Nishida, T., et al. 2016. Self-exposure to the male pheromone ESP1 enhances male aggressiveness in mice. *Current Biology*, 26, 1229–1234.
- Hauser, H., and Gandelman, R. 1985. Lever pressing for pups: Evidence for hormonal influence upon maternal behavior of mice. *Hormones and Behavior*, 19, 454–468.
- Hung, L. W., Neuner, S., Polepalli, J. S., Beier, K. T., Wright, M., Walsh, J. J., et al. 2017. Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. *Neuron*, 94, 1406–1411.
- Jiang, Q. B., and Wakerley, J. B. 1995. Analysis of bursting responses of oxytocin neurones in the rat in late pregnancy, lactation and after weaning. *The Journal of Physiology*, 486, 237–248.
- Kasahara, T., Takata, a., Kato, T. M., Kubota-Sakashita, M., Sawada, T., Kakita, a., et al. 2016. Depression-like episodes in mice harboring mtDNA deletions in paraventricular thalamus. *Molecular Psychiatry*, 21, 39–48.
- Kirouac, G. J. 2015. Placing the paraventricular nucleus of the thalamus within the brain circuits that control behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 50, 1–11.

Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 56, 315–329.

Knobloch, H. S., Charlet, A., Hoffmann, L. C., Eliava, M., Khrulev, S., Cetin, A. H., et al. 2012. Evoked Axonal Oxytocin Release in the Central Amygdala Attenuates Fear Response. *Neuron*, 73, 553–566.

Kohl, J., Babayan, B. M., Rubinstein, N. D., Autry, A. E., Marin-Rodriguez, B., Kapoor, V., et al. 2018. Functional circuit architecture underlying parental behaviour. *Nature*, 556, 326–331.

Levy, F., Keller, M., and Poindron, P. 2004. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and behavior*, 46, 284–302.

Li, M., and Chou, S.-Y. 2016. Modeling postpartum depression in rats: theoretic and methodological issues. *Zoological research*, 37, 229–36.

Li, S., and Kirouac, G. J. 2012. Sources of inputs to the anterior and posterior aspects of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Structure and Function*, 217, 257–273.

Lkhagvasuren, B., Oka, T., Nakamura, Y., Hayashi, H., Sudo, N., and Nakamura, K. 2014. Distribution of Fos-immunoreactive cells in rat forebrain and midbrain following social defeat stress and diazepam treatment. *Neuroscience*, 272, 34–57.

Lonstein, J. S., Simmons, D. a., Swann, J. M., and Stern, J. M. 1997. Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience*, 82, 267–281.

Marlin, B. J., Mitre, M., D'amour, J. A., Chao, M. V., and Froemke, R. C. 2015. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature*, 520, 499–504.

Matzeu, A., Kerr, T. M., Weiss, F., and Martin-Fardon, R. 2016. Orexin-A/Hypocretin-1 mediates cocaine-seeking behavior in the posterior paraventricular nucleus of the thalamus via Orexin/Hypocretin receptor-2. *Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics, 359, 273–279.

Menon, R., Grund, T., Zoicas, I., Althammer, F., Fiedler, D., Biermeier, V., et al. 2018. Oxytocin Signaling in the Lateral Septum Prevents Social Fear during Lactation. *Current Biology*, 28, 1066-1078.e6.

Milosavljevic, N., Cehajic-Kapetanovic, J., Procyk, C. A., and Lucas, R. J. 2016. Chemogenetic Activation of Melanopsin Retinal Ganglion Cells Induces Signatures of Arousal and/or Anxiety in Mice. *Current Biology*, 26, 2358–2363.

Mitre, M., Marlin, B. J., Schiavo, J. K., Morina, E., Norden, S. E., Hackett, T. A., et al. 2016. A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors. *Journal of Neuroscience*, 36, 2517–2535.

Murgatroyd, C. A., Hicks-Nelson, A., Fink, A., Beamer, G., Gurel, K., Elnady, F., et al. 2016. Effects of chronic social stress and maternal intranasal oxytocin and vasopressin on offspring interferon- γ and behavior. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 1–11.

Murgatroyd, C. A., Taliefar, M., Bradburn, S., Carini, L. M., Babb, J. A., and Nephew, B. C. 2015. Social stress during lactation, depressed maternal care, and neuropeptidergic gene expression. 642–653.

Nagasawa, M., Okabe, S., Mogi, K., and Kikusui, T. 2012. Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6, 1–10.

Nephew, B. C., Carini, L. M., Sallah, S., Cotino, C., Alyamani, R. A. S., Pittet, F., et al. 2017. Intergenerational accumulation of impairments in maternal behavior following postnatal social stress. *Psychoneuroendocrinology*, 82, 98–106.

Numan, M., and Young, L. J. 2015. Neural mechanisms of mother–infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. *Hormones and Behavior*,.

- Olazbal, D. E., and Alsina-Llanes, M. 2016. Are age and sex differences in brain oxytocin receptors related to maternal and infanticidal behavior in naive mice? *Hormones and Behavior*, 77, 132–140.
- Ostrowski, N. L., Young, W. S., and Lolait, S. J. 1995. Estrogen increases renal oxytocin receptor gene expression. *Endocrinology*, 136, 1801–1804.
- Otis, J. M., Namboodiri, V. M. K., Matan, A. M., Voets, E. S., Mohorn, E. P., Kosyk, O., et al. 2017. Prefrontal cortex output circuits guide reward seeking through divergent cue encoding. *Nature*, 543, 103–107.
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. 2004. *Paxinos and Franklin's The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego.
- Pedersen, C. A., Johns, J. M., Musiol, I., Perez-Delgado, M., Ayers, G., Faggin, B., et al. 1995. Interfering with somatosensory stimulation from pups sensitizes experienced, postpartum rat mothers to oxytocin antagonist inhibition of maternal behavior. *Behavioral Neuroscience*, 109, 980–990.
- Siegel, H. I., and Rosenblatt, J. S. 1975. Progesterone inhibition of estrogen-induced maternal behavior in hysterectomized-ovariectomized virgin rats. *Hormones and behavior*, 6, 223–30.
- Stern, J. M. 1996. Somatosensation and maternal care in Norway rats. *Advances in the Study of Behavior*, 25, 243–294.
- Stern, J. M., and Johnson, S. K. 1990. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiology & Behavior*, 47, 993–1011.
- Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I. F., Ross, H. E., Kawamata, M., Onaka, T., et al. 2005a. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *PNAS*, 93, 11699–11704.
- Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I. F., Ross, H. E., Kawamata, M., Onaka, T., et al. 2005b. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 102, 16096–16101.

Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I. F., Ross, H. E., Kawamata, M., Onaka, T., et al. 2005c. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 16096–16101.

Terkel, J., and Rosenblatt, J. S. 1972. Humoral factors underlying maternal behavior at parturition: Cross transfusion between freely moving rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, Vol 80(3), 365-371.

Voloschin, L. M., and Tramezzani, J. H. 1979. Milk ejection reflex linked to slow wave sleep in nursing rats. *Endocrinology*, 105, 1202–1207.

Witt, D. M., and Insel, T. R. 1991. A selective oxytocin antagonist attenuates progesterone facilitation of female sexual behavior. *Endocrinology*, 128, 3269–3276.

Yoshida, M., Takayanagi, Y., Inoue, K., Kimura, T., Young, L. J., Onaka, T., et al. 2009. Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29, 2259–2271.

Yu, G. Z., Kaba, H., Okutani, F., Takahashi, S., and Higuchi, T. 1996. The olfactory bulb: a critical site of action for oxytocin in the induction of maternal behaviour in the rat. *Neuroscience*, 72, 1083–8.

Zhang, L., Doroshenko, P., Cao, X. Y., Irfan, N., Coderre, E., Kolaj, M., et al. 2006. Vasopressin induces depolarization and state-dependent firing patterns in rat thalamic paraventricular nucleus neurons in vitro. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290, R1226–R1232.

Zhu, Y., Nachtrab, G., Keyes, P. C., Allen, W. E., Luo, L., and Chen, X. 2018. Dynamic salience processing in paraventricular thalamus gates associative learning. *Science*, 362, 423–429.

Zhu, Y., Wienecke, C. F. R., Nachtrab, G., and Chen, X. 2016. A thalamic input to the nucleus accumbens mediates opiate dependence. *Nature*, 530, 219–222.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々からご指導とご協力を賜りました。菊水健史先生には、研究全般にわたり適切な指導とあたたかい励ましを頂きました。先生がたのもとで研究に携われたことを誇りに思うとともに、心より御礼申し上げます。

生理学研究室の折戸謙介先生、伴侶動物学研究室の茂木一孝先生には学位審査の副査をお引き受けいただきました。また、奥山輝大先生をはじめ東京大学 定量生命科学研究所 行動神経分野のみなさまには、OxtR-Cre マウスと光操作を用いた場所嗜好性テストに関わる実験系の立ち上げにお力添えいただくとともに、有益なご助言をたくさん頂きました。皆様に心より御礼申し上げます。そして、本研究の実施にあたり、貴い命を持って協力をいただいた多くの動物たちに深く感謝するとともに、あらためてご冥福をお祈り申し上げます。

2020年 2月 度会 晃行