



Title	養育行動と攻撃行動に関する扁桃体海馬野ニューロンの同定と機能研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐藤, 圭一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15316号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89875
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keiichiro_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 佐藤 圭一郎

学 位 論 文 題 名

養育行動と攻撃行動に関する扁桃体海馬野ニューロンの同定と機能研究

【序論】

警視庁が発表した犯罪情勢統計（2022 年）によると、2022 年の児童虐待の通告児童数は 10 万人を超えており、ニュースでも日々痛ましい事件が報道されている。不適切な子育てや育児放棄は子供の生命を脅かすのみならず、精神疾患や情動障害の発生リスクを上昇させることが報告されており、親と子の社会親和性を生み出す脳内メカニズム解明と養育を促す方策開発が社会的に強く望まれている。本研究ではこの解明のために、攻撃か養育かを区別しやすい雄マウスの仔マウスに対する社会性行動に着目し、基盤となる中枢神経メカニズムの解明を目指した。

多様なニューロンが複雑に接続した中枢神経において、特定の行動表出に関わるニューロン集団を同定・分類することは重要である。脳科学研究の最先端では、①行動時の活動依存性、②投射先の特異性、③遺伝子発現の特異性、などに基づく神経細胞標識が、特定のニューロン集団の同定・分類に利用されてきた。我々はこれまでに、②投射先特異性を利用して雄マウスの養育行動に重要な脳領域である内側視索前野（MPOA）に投射する扁桃体海馬野（AHi）ニューロンの活性化によって、仔マウスに対する養育行動が阻害され攻撃行動が促進されることを明らかにしてきた（Sato et al., J Neurosci, 2020）。しかし、MPOA 投射型 AHi ニューロンは攻撃時のみならず養育時にも活性化しており、MPOA 投射型 AHi ニューロンには異なった特性をもつ複数のニューロン集団が存在することが示唆された。活動依存的な細胞標識法は複数報告されているが、いずれの手法も MPOA 投射型に標的を絞る本研究では利用することができない。そこで我々は、従来にはなかった活動依存性と出力特異性を組み合わせた特異的神経回路標識法を確立することを目的とした。さらに、確立した手法を用いて MPOA 投射型 AHi ニューロンを仔マウスへの攻撃時・養育時に活動するニューロンに分類し、脳スライスパッチクランプ法による電気生理学的解析、single-cell RNA-seq による発現遺伝子解析、および薬理学的手法による行動解析により、それぞれのニューロン集団の特徴を探索した。

【方法と結果】

1. 活動依存的な特異的神経路標識法の確立

まず、活動依存的な特異的神経路標識法となる vPAL 法（virus-mediated projection-specific and activity-dependent cell labeling）の確立を試みた。活動依存的プロモーターである E-SARE プロモーターの下流に、薬剤依存的リコンビナーゼ DD-Cre を配置した逆行性ウイルスベクターの構築を行い、Cre 依存的に目的タンパク質を発現するウイルスを組み合わせることで出力特異性に加えて、活動依存性によっても神経細胞を識別できると考えた。構築したウイルスベクターを雄マウスの MPOA へ注入し、薬剤投与後に養育行動もしくは攻撃行動をさせることで、各行動時に活性化した MPOA 投射型ニューロンに機能的な DD-Cre を発現させる。さらに、Cre 依存的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスの MPOA にウイルスを注入することで、MPOA 投射型 AHi ニューロンのうち養育時あるいは攻撃時に活動したニューロンをそれぞれ特異的に蛍光標識できる。標識された細胞と神経活動マーカーである c-Fos の免疫染色を用いた組織学的解析と組み合わせた検証実験により、vPAL 法が目的通りに機能しており、さらに、養育時と攻撃時に活性化する MPOA 投射型 AHi ニューロン集団が異なっていることが明らかになった（以下、それぞれを養育ニューロン；P ニューロン、攻撃ニューロン；I ニューロンと表記する）。

2. IニューロンとPニューロンの電気生理学的解析

vPAL法にて蛍光標識された父親マウスのPニューロンと交尾未経験マウスのIニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、電気生理学的特性を解析した。また、以前の研究でAHiニューロンは父性の発現に伴って可塑的变化を示すことが明らかになっている。そこで、父親のIニューロンにおける電気生理学的特性を同様に記録し、交尾未経験マウスのIニューロンと比較した。PニューロンはIニューロンと比較して静止膜電位が脱分極側にシフトしており、入力抵抗が小さいことが明らかになった。一方、父性の発現に伴うIニューロンの膜特性の有意な変化は見られなかった。次に、各細胞の興奮性を確かめるために注入電流に対する発火数を記録した。その結果、PニューロンはIニューロンと比較して興奮性が低いことが分かった。また、交尾未経験雄マウスと比較して父親マウスにおけるIニューロンの興奮性が低下していた。最後に、各ニューロンのシナプス伝達を記録したところ、交尾未経験マウスと比較して父親マウスのIニューロンに対する興奮性シナプス伝達の減弱が見られた。一方、抑制性シナプス伝達に有意な差は見られなかった。以上より、IニューロンとPニューロンは電気生理学的特性が異なっており、また、父親になるとIニューロンの興奮性、および興奮性シナプス伝達が抑制されることが示された。

3. IニューロンとPニューロンの単一細胞遺伝子発現解析

vPAL法にて蛍光標識されたIニューロンとPニューロンについてsingle-cell RNA-seqによる発現遺伝子解析を行った。その結果、PニューロンではIニューロンと比較して、346個の遺伝子の発現レベルが高く、673個の遺伝子の発現レベルが低いことが示された。このうち、Pニューロンで発現レベルが高かった*Plcg1* (Phospholipase C, gamma 1)、*Htr7* (5-hydroxytryptamine receptor 7)と、Iニューロンで発現レベルが高かった*Sstr3* (Somatostatin receptor 3)、*Vipr1* (Vasoactive intestinal peptide receptor 1)に着目した。*Plcg1*は受容体型チロシンキナーゼの下流シグナル分子、*Htr7*、*Sstr3*、*Vipr1*はGタンパク質共役型受容体であり、これらに対する薬剤を作用させることで各ニューロン集団を特異的に操作できる可能性が考えられる。*in situ* hybridization法によりこれらmRNAの可視化を行ったところ、single-cell RNA-seqの結果と一致した各ニューロン集団特異的な発現パターンが認められた。以上より、IニューロンとPニューロンは異なる遺伝子発現パターンを有していることが示された。

4. 5-HT7受容体アゴニスト処置による養育行動の促進

single-cell RNA-seqの結果をもとに、Pニューロンで多く発現しているタンパク質を薬理的に操作することで、Pニューロンの活動や機能の特異的に調整することができるかを検討した。セロトニン受容体7型(5-HT7受容体)はGsカップリングGPCRであり、神経の脱分極や可塑的变化を引き起こすことが知られている。そこで、5-HT7受容体のアゴニストであるLP44を処置することで*Htr7*が多く発現するPニューロンを活性化させることができるかを調べた。vPAL法にてIニューロンとPニューロンをそれぞれ標識したマウスにLP44を腹腔内投与しc-Fosの免疫染色を行ったところ、Pニューロンでのみ有意な活性化が見られた。次に、LP44がPニューロンにどのように作用しているかを確かめるために、ホールセルパッチクランプ法にてLP44処置前後の膜特性の変化を記録した。その結果、静止膜電位の脱分極と入力抵抗の増大がLP44処置によって観察された。最後に、LP44をAHiに局所投与し、Pニューロンを薬理的に活性化させることで、交尾未経験雄マウスでみられる仔マウスへの攻撃行動が減弱するかを確かめた。その結果、LP44投与前に見られていた攻撃行動が投与後には抑制され、養育行動が促進された。

【総括】

本研究から、MPOAに投射するAHiニューロンには仔マウスへの養育と攻撃という機能が相反したニューロン集団が存在することが示された。また、これらのニューロン集団は遺伝子発現パターンや電気生理学的特性が異なることが明らかになった。このうち、Pニューロンに多く発現している5-HT7受容体を標的としたアゴニストの投与にて、Pニューロンを選択的に活性化させると仔マウスへの攻撃行動が減弱し、養育行動が促進されることが明らかになった。

vPAL法を活用することで、投射先が同じであってもヘテロな細胞集団を同定することが可能となり、これまで分類が困難であった細胞集団の機能や特性が新たに見出されることが期待される。