



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15316
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91900
Type	doctoral thesis
File Information	Keiichiro_Sato.pdf



博士学位論文

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

佐藤 圭一郎

北海道大学 大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬理学研究室

2023 年 3 月

目次

略語表	2
第1章 はじめに	
哺乳類の親子関係と神経制御	4
本研究の目的	5
第2章 活動依存的な特異的神経回路標識法の確立	
緒言	7
結果	9
考察	16
第3章 標識されたニューロン集団の特性探索	
緒言	17
結果	17
考察	26
第4章 特定のニューロン集団の薬理学的な操作	
緒言	27
結果	27
考察	40
第5章 さいごに	
総括	42
IニューロンとPニューロンに活性化による機能	44
IニューロンとPニューロンの制御メカニズム	44
vPAL法の活用	45
実験方法	47
参考文献	59
謝辞	63

略語表

5-HT	5-hydroxytryptamine
AAV	adeno associated virus
AC	adenylate cyclase
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AHi	amygdalohippocampal area
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
CA3	cornu ammonis 3
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium
Cre	cre recombinase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DD	destabilization domain
DEG	differentially expressed gene
DG	dentate gyrus
DMSO	dimethyl sulfoxide
dNTP	deoxynucleotide triphosphates
Dox	doxycycline
DRN	dorsal raphe nucleus
DTT	dithiothreitol
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EPSC	excitatory postsynaptic current
ESARE	enhanced synaptic activity-responsive element
gc	genome copies
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G protein-coupled receptor
GRAB	GPCR-activation-based sensor
HC	home cage
HCR	<i>in situ</i> hybridization chain reaction
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Htr7	5-hydroxytryptamine receptor 7
IPSC	inhibitory postsynaptic current
KO	knock out
LNA	locked nucleic acid
LV	lateral ventricle

MeA	medial amygdala
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic current
mIPSC	miniature inhibitory postsynaptic current
MPN	medial preoptic nucleus
MPOA	medial preoptic area
n.s.	not significant
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline with Triton X-100
PFA	paraformaldehyde
PLC	phospholipase C
Plcg1	phospholipase C, gamma 1
PTX	picrotoxin
RMP	resting membrane potential
s.e.m.	standard error of the mean
scRNA-seq	single-cell RNA sequence
sEPSC	spontaneous excitatory postsynaptic current
sIPSC	spontaneous inhibitory postsynaptic current
SSC	saline-sodium citrate
SSCT	saline-sodium citrate with Tween 20
Sstr3	somatostatin receptor 3
Tet	tetracycline
TMP	trimethoprim
Tph2	tryptophan hydroxylase 2
TRE	Tet response element
TTL	transistor-transistor logic
TTX	tetrodotoxin
UMAP	uniform manifold approximation and projection
vHipp	hippocampus, ventral part
Vipr1	vasoactive intestinal peptide receptor 1
VMHvl	ventrolateral division of ventromedial nucleus of the hypothalamus
vPAL	virus-mediated projection-specific and activity-dependent cell labeling

第1章 はじめに

哺乳類の親子関係と神経制御

虐待は子ども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¹⁻⁷。幼少期に虐待を経験した成人の健康被害報告についてメタ解析によると、虐待を経験していない成人と比較して、肥満やがん、心臓病、糖尿病、呼吸器疾患、精神疾患、暴力性のリスクが増大しており、特に暴力性は強く相関していた（オッズ比7以上）²。また、幼少期に虐待を経験した成人が親になると子どもに虐待をしてしまうリスクが増大する^{8,9}。これは先ほどの暴力性の増大に加え、自身が適切な養育行動を経験していないため子どもへの接し方が分からないためであると推測される。では、なぜ親は子供に対して虐待をしてしまうのだろうか。

多くの哺乳類において、新生児は親の世話を受けることで生存・成長をすることができる。親は子に対して授乳や保温、看護、教育、外敵からの保護など様々な養育行動を行う一方で、子は声や接触を介して親への愛着行動を示す。これらの愛着行動は、親の養育行動を促進させ、経験や学習を重ねることで子育てを上達させる。このような親子関係は生来的に備わっている本能によって形成されている。しかしながら、生まれた子に十分な養育行動を与えない育児放棄（ネグレクト）や身体に傷害を与える虐待がヒトを含めた哺乳動物で観察されている。例えば、ライオンやサル的一种であるハヌマンラングール、マウスなどの一夫多妻制をとる種では、オスによる子殺しがみられる。リーダーのオスは複数のメスと子を成しハーレムを構築するが、新しく来たオスに負けるとメスの群れを乗っ取られる。この際、新しいオスは群れに元からいるオスの子を殺す子殺し行動（infanticide）を行う。これは、メスの養育行動を中断させ、自身の子孫を残すための繁殖活動を速やかに行うためである。興味深いことに、メスとの交尾や同居を経験すると子殺しを行っていた個体が子殺しを止め、養育行動を示すようになる。子という同一の対象に対して「子殺し」から「養育」と

いう相反する行動への転換は、脳神経制御が「子殺し」から「養育」をするように変化していると考えられる。したがって、それぞれの神経制御を理解し、ヒトへの研究に応用することで、虐待を抑制し、養育を促進するような方策開発につながることを期待される。

視床下部の前部に位置する内側視索前野（medial preoptic area; MPOA）は、げっ歯類を含む哺乳類の養育行動に深く関与している脳領域である¹⁰⁻¹⁷。MPOA の破壊や遺伝学的な抑制で父親マウスや母親マウスでみられていた養育行動が消失し、子殺しを行うようになったことから MPOA は養育行動に必要であることが示唆されている。当研究室では、この MPOA へ入力する抑制性神経伝達が父親になることで減弱することを明らかにしている。すなわち、MPOA への入力が社会経験によって変化することでその活動が変化し、結果として子への行動選択を「子殺し」から「養育」へと転換させると推測した。我々は、扁桃体海馬野（amygdalohippocampal area; AHi）という脳領域が MPOA へ密な神経投射を送っており、かつ仔マウスへの子殺し時、養育時の両方で活動していることを見出した¹⁸。この MPOA 投射型 AHi ニューロンを人為的に活性化させると、養育行動が阻害され子殺しが促進されたことから、AHi は MPOA を負に制御し子殺しを促進する脳領域であると結論付けた。

本研究の目的

上記の研究の一方で、MPOA 投射型 AHi ニューロンは子殺し時のみならず、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¹⁸。そこで本研究では、以下の3点を大目的として研究を進めた。

1) 活動依存的な特異的神経回路標識法の確立

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 MPOA 投射型 AHi ニューロンを標識しその機能を明らかにしてきたが、上述の通り、投射先が同じであってもその神経活動によって特性が異なる可能性がある。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。本手法を MPOA 投射型 AHi ニューロンに適応し、子殺し時・養育時に活動するニューロン集団の同定を目指す。

2) 標識されたニューロン集団の特性探索

同じ脳領域に細胞体を有し、かつ、同じ投射先を有するニューロン集団がどのように制御され、異なる行動制御に寄与しているかを明らかにするためには、それぞれのニューロン集団の特徴を理解する必要がある。本研究では、ホールセルパッチクランプ法を利用した電気生理学的特性、および single-cell RNA-seq (scRNA-seq) を利用した分子的特性を明らかにする。既存の分類法では抽出することが困難であったニューロン集団を新たに同定し、その特徴を解析することで行動制御に関わる神経回路研究のさらなる深化が期待される。

3) 特定のニューロン集団の薬理的な操作

(2) にて見出した各ニューロン集団特異的な特徴を利用し、特定のニューロン集団を特異的に操作することで雄マウスの仔マウスに対する行動がどのように変化するかを検討する。中でも養育行動時に活動する MPOA 投射型 AHi ニューロンを薬理的に活性化させることで、通常は仔に対して子殺しを行う交尾未経験雄マウスの行動がどのように変化するかを検討する。

第2章 活動依存的な特異的神経回路標識法の確立

緒言

MPOA 投射型 AHi ニューロンを仔マウスに対する子殺し時・養育時に活動するニューロンごとに分類するため、活動依存的な特異的神経回路標識法の確立を行った。逆行性アデノ随伴ウイルス (AAV2retro) ベクターを用いて、投射先特異的かつ活動依存的な Cre リコンビナーゼ発現により、特定の行動に関連する投射型ニューロンを標識することが可能となる。高い S/N 比で活動依存的な Cre 発現を行うために、活動依存性プロモーターである E-SARE¹⁹ によって制御される薬剤制御型不安定化 Cre リコンビナーゼ (DD-Cre)²⁰ と Tet-ON システムを組み合わせた AAV2retro ベクターを作成した。このベクターでは、神経活性化により reverse tetracycline-sensitive transactivator である Tet3G²¹ が、E-SARE プロモーターから迅速かつ一過性に発現する。活性化された Tet3G は、ドキシサイクリン (Dox) 存在下で Dox 誘導性プロモーター TRE3Gs²² に結合して DD-Cre を発現する。DD-Cre は速やかにプロテアソーム分解を受けるが、トリメトプリム (TMP) によって安定化される。この逆行性ウイルスベクターを脳の標的部位に注入すると、標的部位に投射する神経細胞は、Dox と TMP の二重投与により一過性に Cre 活性を獲得する。赤色蛍光タンパク質 tdTomato を Cre 依存的に発現する Ai9 マウスにこの方法を適応すると、薬剤の二重投与時に神経活動があった投射型ニューロンが tdTomato で標識される。この活動依存的な特異的神経回路標識法を vPAL 法 (virus-mediated projection-specific and activity-dependent cell labeling) と名付けた (図 1)。

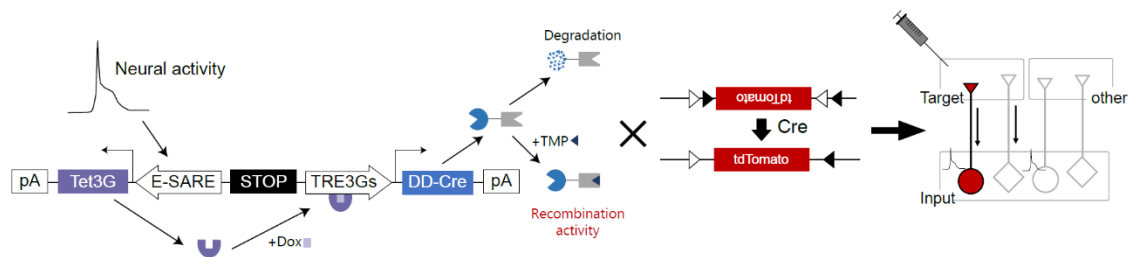


図 1 vPAL 法の原理

Tet-ON システムと DD-Cre を E-SARE プロモーターの下流に配置した AAV2retro ベクター（左）。このウイルスベクターを標的部位（Target）に注入すると、標的部位へ投射を行う神経細胞（Input）にて活動依存的な DD-Cre の発現が可能となる。特定の行動時に Dox および TMP を投与すると一過性に Cre 活性が起こる。Cre 依存的に tdTomato を発現するマウス（Ai9）に対して以上の処置を行うと、特定の行動で神経活動が起こった Input を tdTomato で標識することが可能となる（右）。

本章では、vPAL 法の条件検討として背側海馬 CA3 (dorsal CA3) に投射を行う歯状回 (DG) ²³ に適応し、新規環境暴露によって活性化する dorsal CA3 投射型 DG ニューロンを標識する。Tet-ON システムにおける Dox の濃度、投与時間はすでに多くの報告がされているので ^{21,22,24-26}、本研究では TMP の濃度および投与タイミングの条件検討を行った。また、最適化された条件で MPOA 投射型 AHi ニューロンを子殺し時・養育時に活動するニューロンに分類し、各ニューロンの活動特異性を神経活動マーカーである c-Fos の免疫染色を組み合わせる。

結果

TMP 投与条件の最適化

dorsal CA3 に AAV2retro-ESARE-Tet3G-STOP-TRE3Gs-DD-Cre を注入したマウスに Dox を投与し、新規環境暴露した (図 2)。暴露 15 分後に、0、15、150 mg/kg の TMP を投与したところ、150 mg/kg の TMP を投与したマウスでのみ DG ニュー

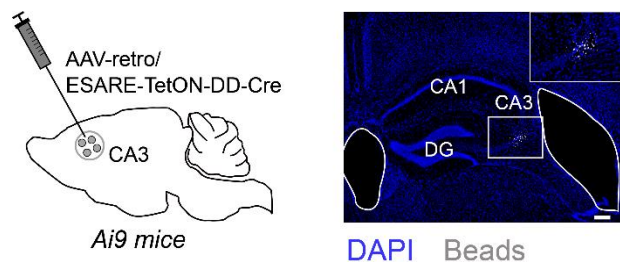


図 2 実験スキームと AAV 注入部位 (CA3)
Retrobeads (Beads) は注入部位を可視化するために用いた。スケールバーは 200 μ m を表す。

ロンが標識された (図 3) ^{23,27}。次に、新規環境暴露の 15 分後、2 時間後、24 時間後に 150 mg/kg の TMP を投与した。その結果、暴露 2 時間後に TMP を投与したマウスでは、標識細胞はほとんど検出されなかった (図 4)。これは、新規環境暴露により発現した DD-Cre が 2 時間後にはほとんど分解されていることを示している。

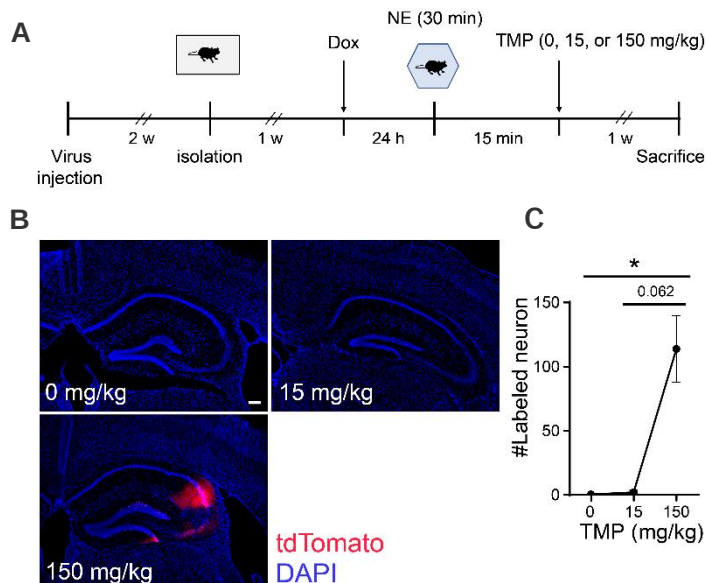


図 3 新規環境暴露にて活性化する CA3 投射型 DG ニューロンによる vPAL 法の検証 (TMP 濃度)

A. タイムコース。TMP 投与は NE 暴露の 15 分後に固定し、TMP の濃度を 0、15、150 mg/kg に設定した。B. tdTomato 標識細胞の代表写真。スケールバーは 200 μ m を表す。C. 標識細胞数の定量解析。n = 4 (0 mg/kg)、4 (15 mg/kg)、3 (150 mg/kg); Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test; mean $\pm$ s.e.m. * P < 0.05.

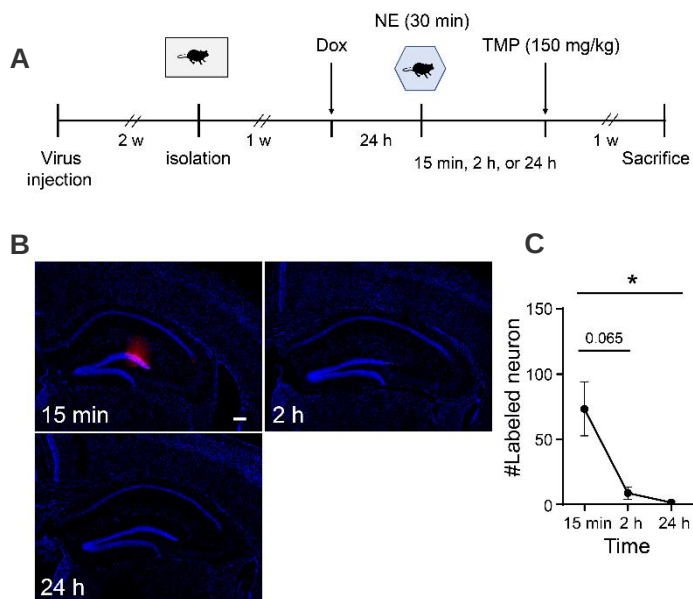


図 4 新規環境暴露にて活性化する CA3 投射型 DG ニューロンによる vPAL 法の検証 (TMP 投与時間)

A. タイムコース。TMP 濃度を 150 mg/kg に固定し、TMP 投与を NE 暴露の 15 分後、2 時間後、24 時間後に設定した。B. tdTomato 標識細胞の代表写真。スケールバーは 200 μ m を表す。C. 標識細胞数の定量解析。n = 6 (15 分後)、5 (2 時間後)、5 (24 時間後); Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test; mean $\pm$ s.e.m. * P < 0.05.

子殺し時・養育時に活動する MPOA 投射型 AHi ニューロンの同定

子殺しや養育行動で活性化された MPOA 投射型 AHi ニューロンが vPAL により tdTomato で標識されるかどうかを調べるために、以下の 2 つのグループを設定した (図 5、図 6A)。

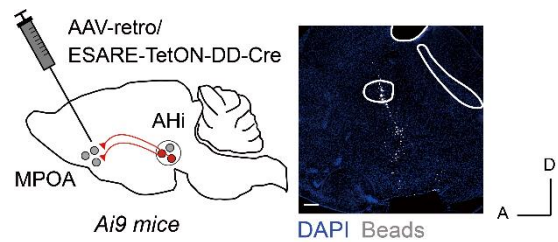


図 5 実験スキームと AAV 注入部位 (MPOA) Retrobeads (Beads) は注入部位を可視化するために用いた。スケールバーは 200 μm を表す。

- 1) virgin グループは交尾経験のない雄マウスで構成されており、子殺し行動を示す。
- 2) paternal グループは雌マウスと同居させ、交配を経験させ、仔の出産を経験させた雄マウスで構成されており、養育行動を示す。

Dox 投与後、各群のマウスは仔暴露、もしくはホームケージ (HC) に待機させた。virgin グループには、対象マウスが仔マウスを咬まずに接触し舐めることができるように穴を開けた金網ボールに入れた仔を、paternal グループには金網ボールを使わずに仔を 3 匹ずつ暴露した。子殺しや養育行動で活性化される AHi 内標識ニューロンの数は、HC 群と比較して多かった (図 6B-E)。

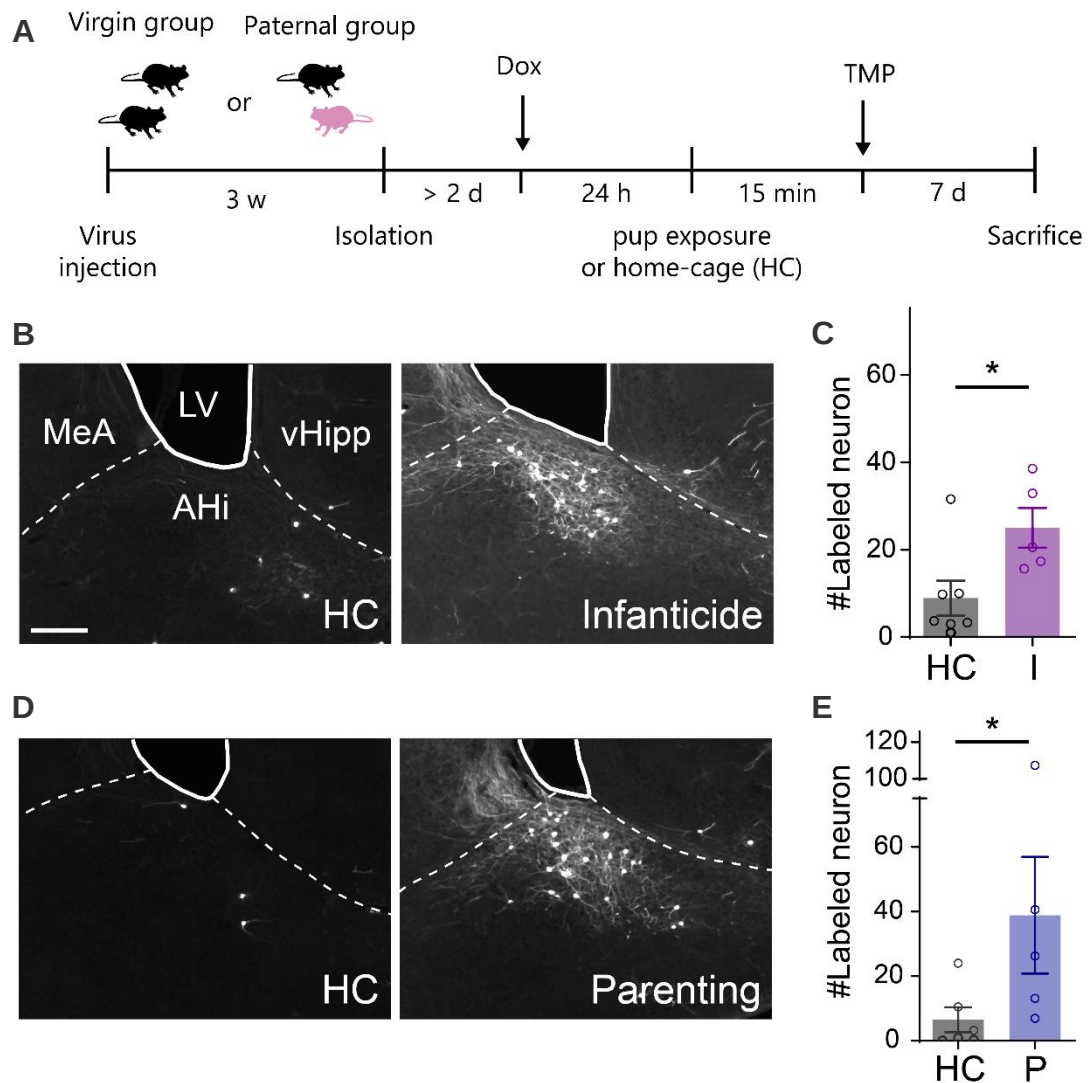


図 6 vPAL 法による子殺し・養育行動時に活動する MPOA 投射型 AHi ニューロンの標識

A. タイムコース。黒色のマウスは雄マウス、ピンク色のマウスは雌マウスを表す。B. virgin マウスにおける HC および子殺し (Infanticide; I) にて活性化した tdTomato 標識細胞。スケールバーは 200 μ m を表す。C. 標識細胞数の定量解析。n = 7 (HC) 、 5 (I) ; Mann-Whitney test; mean $\pm$ s.e.m. * P < 0.05. D. paternal マウスにおける HC および養育行動 (Parenting; P) にて活性化した tdTomato 標識細胞。E. n = 6 (HC) 、 5 (P) ; Mann-Whitney test; mean $\pm$ s.e.m. * P < 0.05. Abbreviations: LV, lateral ventricle; MeA, medial amygdala; vHipp, ventral hippocampus.

これらの標識ニューロンの特異性を確認するために、vPAL によって tdTomato で標識されたニューロンと c-Fos を発現しているニューロンとの重複を、子殺しまたは養育行動のいずれかの行動後に調べた。子殺しによって活性化したニューロンを標識したマウスをさらに 2 群に分けた (図 7A)。

- 1) I-I (infanticide-infanticide) グループは、virgin マウスを雄マウスと同居させ待機期間の後、金網ボール内の仔マウスを再暴露させた。
- 2) I-P (infanticide-parenting) グループは、virgin マウスを雌マウスと交尾させ父親マウスとした後、3 匹の仔マウスに曝露させた。

また、養育行動によって活性化したニューロンを標識したマウスは P-P (parenting-parenting) グループとして、引き続きメスと一緒に飼育し、再び 3 匹の仔マウスに曝露させた。解析の結果、異なる行動をとるマウス (I-P グループ) では、同じ行動をとるマウス (I-I グループ、P-P グループ) に比べて、標識ニューロンの c-Fos との重複率が低いことがわかった (図 7B、C)。

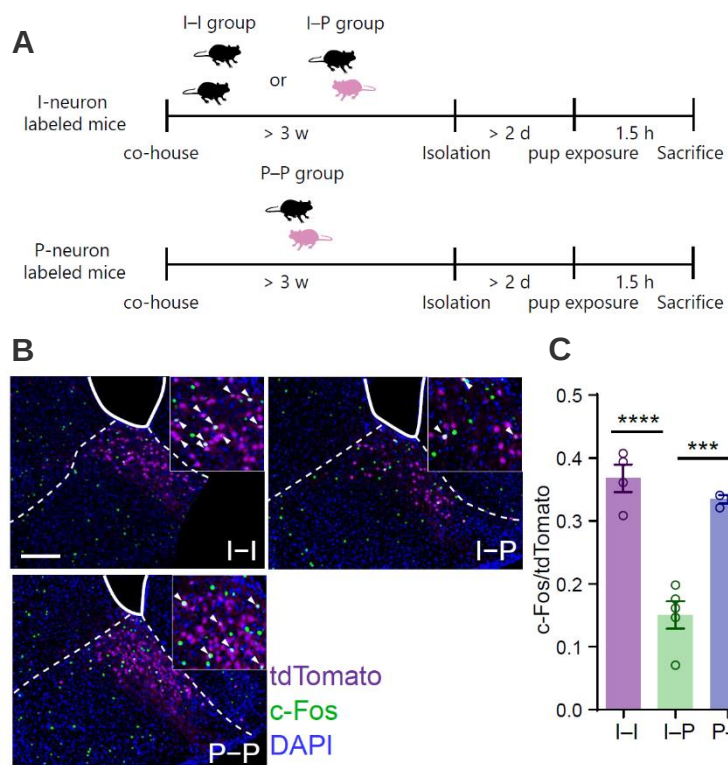


図 7 vPAL 法にて標識された細胞の特性の検討

A. タイムコース。B. 各グループにおける tdTomato 標識細胞および c-Fos 陽性細胞。白矢印は tdTomato および c-Fos 陽性細胞を示す。スケールバーは 200 μm を表す。C. tdTomato 標識細胞中の c-Fos 陽性細胞割合。n = 4 (I-I), 5 (I-P), 4 (P-P); One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; mean $\pm$ s.e.m. *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Abbreviations: LV, lateral ventricle; MeA, medial amygdala; vHipp, ventral hippocampus.

腹側海馬（vHipp）ニューロンも MPOA に投射しており^{28,29}、子殺しと養育行動によって vPAL で標識された（図 8A）。しかし、c-Fos⁺/tdTomato⁺の割合は、I-I グループ、I-P グループ、P-P グループの間で差が見られなかった（図 8B）。これらのデータは、MPOA 投射 AHi ニューロンのうち、子殺しによって活性化するニューロン（以下、I ニューロン）と、養育行動によって活性化するニューロン（以下、P ニューロン）の2つの機能的に異なる亜集団が有意に分離していることを示唆するものである。

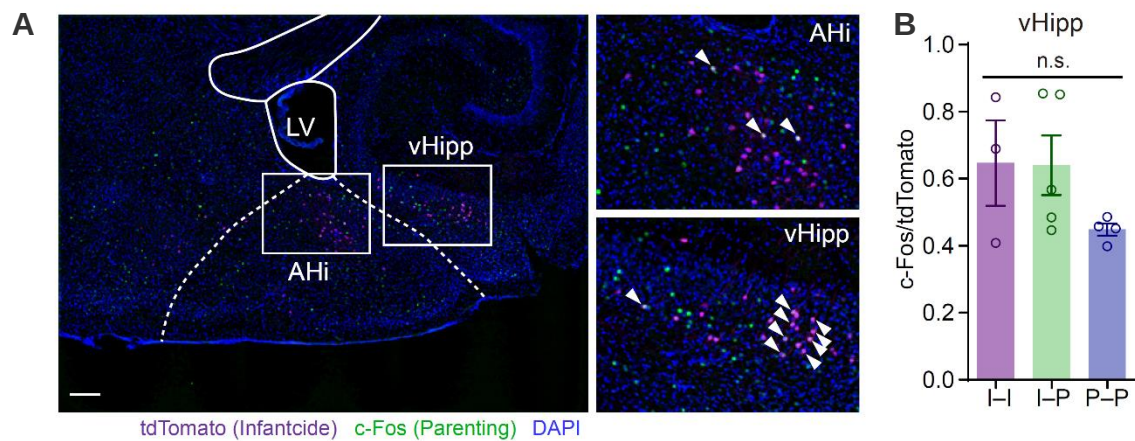


図 8 子殺し・養育行動時に活動する MPOA 投射型 vHipp ニューロンの特異性の検証

A. I-P グループの tdTomato 標識細胞および c-Fos 陽性細胞（左）。パネル（右）はそれぞれ AHi と vHipp を拡大したものである。白矢印は tdTomato および c-Fos 陽性細胞を示す。スケールバーは 200 μ m を表す。B. tdTomato 標識細胞中の c-Fos 陽性細胞割合。n = 3 (I-I), 5 (I-P), 4 (P-P); One-way ANOVA; mean $\pm$ s.e.m. n.s., not significant.

考察

AHi は機能が明らかではない脳領域であったが、2020 年以降、複数の研究により、交尾、攻撃、子殺しなどの社会行動に寄与していることが報告された^{18,30-32}。視床下部腹外側 (VMHvl) 投射型 AHi ニューロンはオス-オス間の攻撃行動を制御し³⁰⁻³²、内側視索前核 (MPN) 投射型 AHi ニューロンはオス-メス間の交尾を制御する³¹。このように、AHi は投射先に応じて複数の社会行動を制御する神経ハブであると考えられる。我々は、AHi の MPOA 投射ニューロンが養育行動を抑制し、子殺しを促進することを報告した¹⁸。一方、c-Fos 免疫染色のデータより、MPOA 投射型 AHi ニューロンの中には、子殺しもしくは養育行動によって活性化されるようなヘテロな集団が存在することが示唆されていた。しかし、技術的な制約から、MPOA 投射型 AHi ニューロン間の異なる集団を詳細に分類することはできなかった。今回、新たに開発した vPAL 法を用いて、MPOA 投射型 AHi ニューロンの 2 つの集団、子殺し時に活性化する I ニューロンと養育時に活性化する P ニューロンを同定することに成功した。

MPOA 投射型 vHipp ニューロンも子殺しと養育行動によって標識されたが、c-Fos との重複率は同じ行動をさせたグループ (I-I グループ、P-P グループ) と異なる行動をさせたグループ (I-P グループ) の間に有意差は認められなかった。この結果は、MPOA 投射型 vHipp ニューロンは仔マウスとの社会性行動全般を同一のニューロンが制御していることを示唆しており、MPOA 投射型 AHi ニューロンにおける I ニューロンおよび P ニューロンの機能多様性を支持している。このように、vPAL 法は、同じ出力領域に投射するニューロンであっても、複数のヘテロな集団を分離することが可能である。

第3章 標識されたニューロン集団の特性探索

緒言

第2章ではMPOA 投射型 AHi ニューロンには、子殺し時に活性化する I ニューロンと養育時に活性化する P ニューロンが存在することを明らかにした。しかし、I ニューロンと P ニューロンがどのような特徴を有しているかは不明である。本章では、vPAL を用いて標識した I ニューロンと P ニューロンに対して、1) ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的特性探索、2) single cell RNA-seq による発現遺伝子解析を行う。各ニューロン集団を詳細に分類し、特異的操作するために必要な分子マーカーやチャネル・受容体の探索を行う。既存の分類法では抽出することが困難であったニューロン集団を新たに同定し、その機能を解析することで行動制御に関わる神経回路研究のさらなる深化が期待される。

結果

I ニューロンと P ニューロンの電気生理学的特性

virgin グループの I ニューロンおよび paternal グループの P ニューロンの電気生理学的特性を調べるために、ホールセルパッチクランプ記録を行った(図9)。AHi ニューロンは父性発現に伴うシナプス可塑性を示すため¹⁸、virgin グループの I ニューロンに加えて、paternal グループの I ニューロン (I-P ニューロン) も解析した。膜特性解析の結果、P ニューロンは I ニューロンや I-P ニューロンと比較して、静止膜電位 (RMP) がより脱分極し、入力抵抗が低くなっ

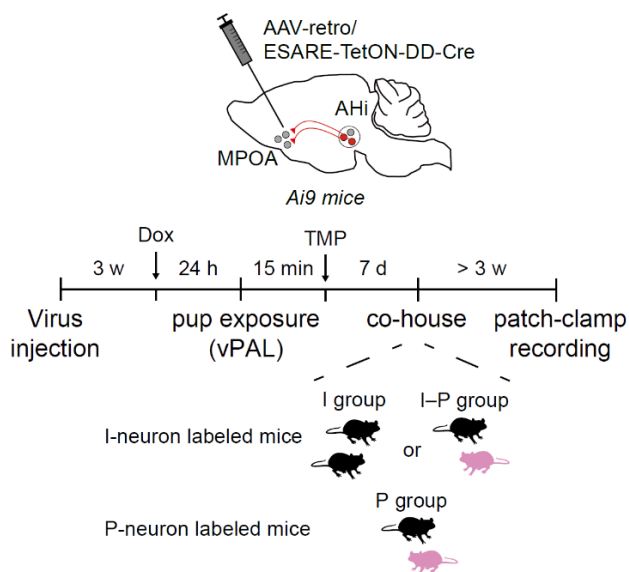


図9 電気生理学実験の実験スキーム

ていた（図 10、表 1）。興奮性は、Voltage-clamp mode で電位を-71 mV に固定し、ステップ電流を注入して誘発された活動電位の数として測定した（+20 pA step、0→380 pA）。P ニューロンは I ニューロンよりも入力抵抗が低いことと一致して、興奮性が低かった（図 11、表 2）。また、I-P ニューロンでは、I ニューロンと比べて低い興奮性が観察されたが、これらの亜集団の間で膜電位に差はなかった（図 10、表 1）。次に、これらのシナプス入力の特徴を調べるために、自発的興奮性シナプス後電流（sEPSC）と自発的抑制性シナプス後電流（sIPSC）の記録を行った。I-P ニューロンでは、I ニューロンと比べて sEPSC の頻度が有意に減少したが、振幅には変化がなかった（図 12A、B）。I ニューロン、I-P ニューロン、P ニューロン間では、sIPSC の頻度や振幅に差は見られなかった（図 12C、D）。さらに、微小 EPSC（mEPSC）と微小 IPSC（mIPSC）の頻度と振幅のいずれにも有意な差は観察されなかった（図 13）。これらの結果は、I ニューロンと P ニューロンが独自の膜特性を持つことを示している。また I ニューロンは父親になることで興奮性が低下し、sEPSC の頻度が減少していた。

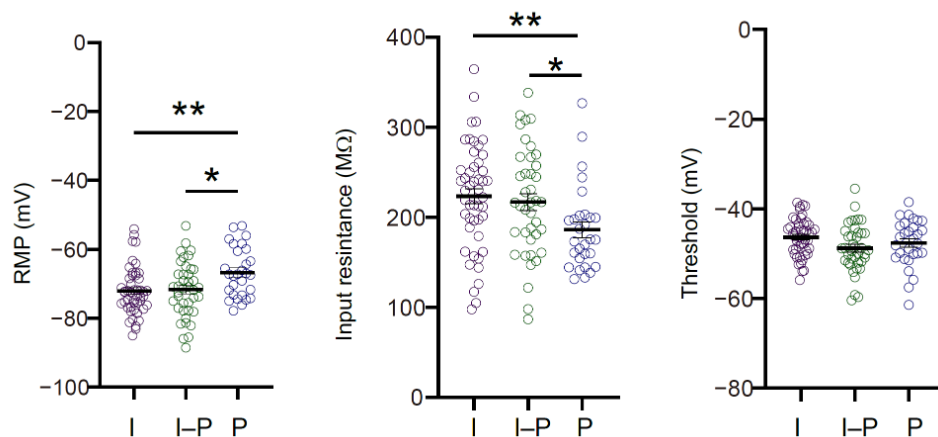


図 10 I ニューロン、I-P ニューロン、P ニューロンの静止膜電位 (RMP)、入力抵抗 (Input resistance)、閾値 (Threshold)

n = 48 (I) , 40 (I-P) , 29 (P-P) ; One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (RMP) ; Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test (Input resistance) ; One-way ANOVA (Threshold) ; mean $\pm$ s.e.m. * P < 0.05; ** P < 0.01.

	I	I-P	P
Membrane capacitance (pF)	74.74 $\pm$ 5.00	63.82 $\pm$ 4.22	58.05 $\pm$ 4.71
Time constant (msec)	47.55 $\pm$ 2.12	49.64 $\pm$ 2.41	44.75 $\pm$ 3.12
Sag fraction (%)	27.83 $\pm$ 1.24	29.26 $\pm$ 1.61	30.11 $\pm$ 1.78
Sag amplitude (mV)	9.58 $\pm$ 0.57	10.53 $\pm$ 0.63	11.43 $\pm$ 0.70

表 1 I ニューロン、I-P ニューロン、P ニューロンの膜特性

n = 48 (I) , 40 (I-P) , 29 (P-P; Time constant 以外) , 28 (P-P; Time constant) ; Kruskal-Wallis test (Membrane capacitance, Sag fraction) ; One-way ANOVA (Time constant, Sag amplitude)

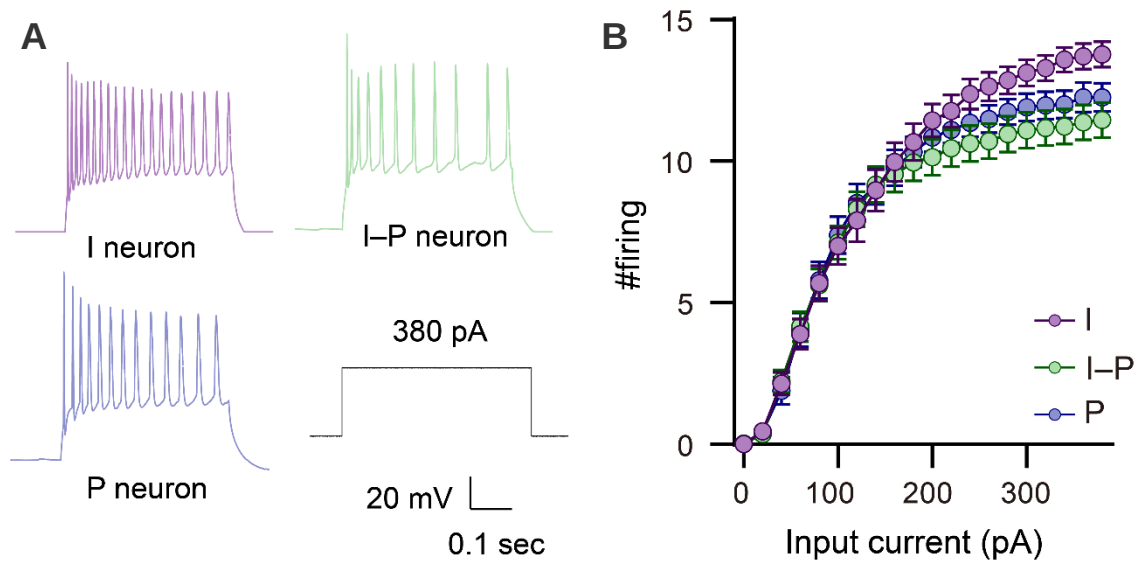


図 11 Iニューロン、I-P ニューロン、P ニューロンの注入電流に対する発火数

A. +380 pA を注入した際の代表トレース。電位は-71 mV に固定した。B. 0 pA から+380 pA まで+20 pA ずつ電流を注入した際の発火数。n = 33 (I) , 36 (I-P) , 29 (P-P) ; Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

Adjusted P Value	0 pA	20 pA	40 pA	60 pA	80 pA	100 pA	120 pA	140 pA	160 pA	180 pA	200 pA	220 pA	240 pA	260 pA	280 pA	300 pA	320 pA	340 pA	360 pA	380 pA
I vs. I-P	0.5818	0.921	0.7261	0.6068	0.8593	0.677	0.9118	0.9775	0.8865	0.7118	0.309	0.2905	0.0927	0.0497	0.0532	0.0315	0.0218	0.008	0.0091	0.0103
I vs. P	NA	0.981	0.9934	0.8395	0.898	0.6376	0.8172	0.9895	0.9726	0.907	0.7233	0.6581	0.3435	0.2349	0.2279	0.1747	0.1311	0.0499	0.094	0.0766
I-P vs. P	0.5818	0.9703	0.6738	0.9209	0.9968	0.9963	0.9704	0.9973	0.9646	0.9023	0.6748	0.6927	0.632	0.5809	0.5856	0.5626	0.5727	0.5917	0.5249	0.5857

表 2 図 13B の post-hoc test 詳細

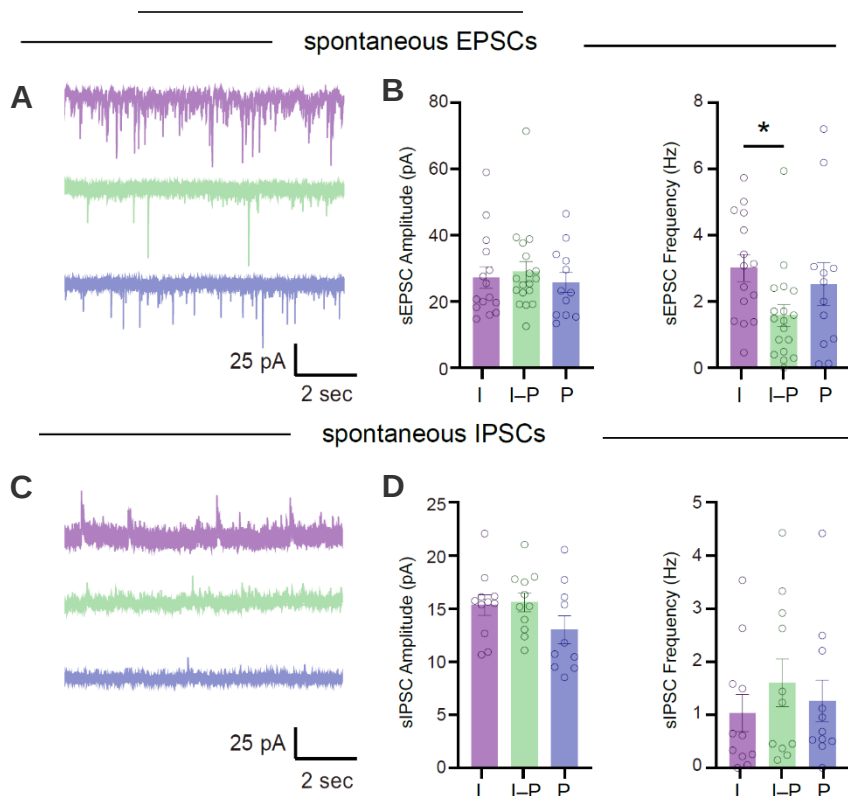
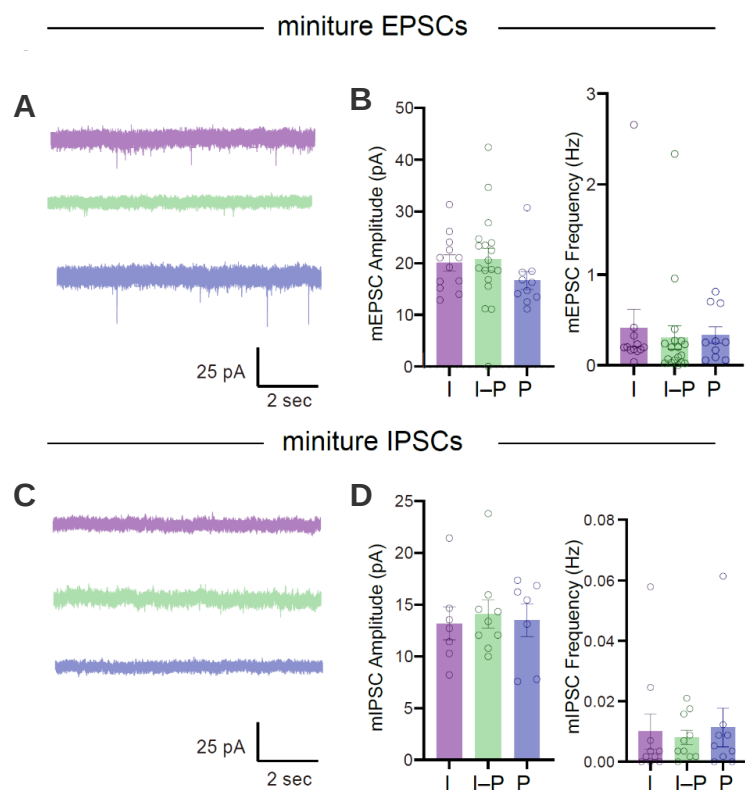


図 12 Iニューロン、I-Pニューロン、Pニューロンの自発的 (spontaneous) EPSC および IPSC

A. sEPSC の代表トレース。電位は-86 mV に固定した。B. sEPSC の振幅 (Amplitude) および頻度 (Frequency)。n = 15 (I), 18 (I-P), 12 (P-P); Kruskal-Wallis test (Amplitude); One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (Frequency); mean $\pm$ s.e.m. * P < 0.05. C. sIPSC の代表トレース。電位は-60 mV に固定した。D. sIPSC の振幅 (Amplitude) および頻度 (Frequency)。n = 11 (I), 11 (I-P), 10 (P-P); One-way ANOVA (Amplitude); Kruskal-Wallis test (Frequency); mean $\pm$ s.e.m.

図 13 Iニューロン、I-Pニューロン、Pニューロンの微小 (miniature) EPSC および IPSC

A. mEPSC の代表トレース。電位は-86 mV に固定した。B. mEPSC の振幅 (Amplitude) および頻度 (Frequency)。n = 12 (I), 18 (I-P), 10 (P-P); Kruskal-Wallis test; mean $\pm$ s.e.m. C. mIPSC の代表トレース。電位は-60 mV に固定した。D. mIPSC の振幅 (Amplitude) および頻度 (Frequency)。n = 7 (I), 9 (I-P), 7 (P-P); Kruskal-Wallis test; mean $\pm$ s.e.m.



IニューロンとPニューロンのトランスクリプトーム解析

IニューロンとPニューロンの遺伝子発現プロファイルを比較するために、single-cell RNA-seq (scRNA-seq) を実施した。ホールセルパッチクランプ法と同様の手法でIニューロンもしくはPニューロンを標識したマウスの脳スライスを作製し、ガラスピペットを用いてAHiのtdTomato陽性ニューロンを採取した(図14)。第2章でMPOA投射型AHiニューロンの一部はHCでも標識されることが示されている。そこで、非特異的な標識のコントロールとして、仔マウスに曝露していないマウス(HC)のtdTomato陽性ニューロンも採取した。各サンプルの遺伝子プロファイル獲得後、教師なしクラスタリングにより2つのクラスターが同定された(図15)。クラスターをvPAL法による標識時の行動とリンクさせると、非特異的な標識のコントロール(HC)はクラスター2にのみ含まれ、クラスター1には含まれなかった(図16A)。次に、AHiはanterior-posterior方向に広がる脳領域であるため、空間的なトランスクリプトームの違いを解析した。しかし、単一ニューロンを採取したAHiの垂核では、クラスター内の特定の空間分布パターンは観察されなかった(図16B)。

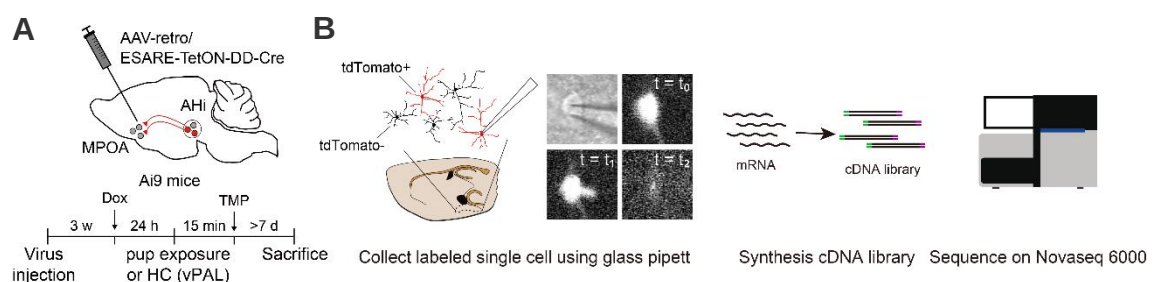


図14 scRNA-seqの実験スキーム

A. 実験のタイムコース。B. 単一細胞回収からシーケンスまでのスキーム。脳スライスからvPAL法にてtdTomato標識された単一細胞を微小ガラスピペットを用いて採取した(左)。パネルは単一細胞を採取する様子を経時的に表している。単一細胞から得られたmRNAからcDNAを合成し、ユニバーサルプライマーを付与した後、シーケンスを行った(右)。

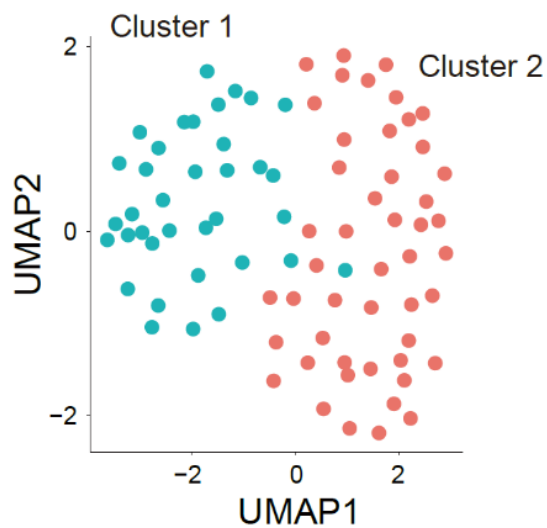


図 15 遺伝子プロファイルの UMAP
プロット
各サンプルの遺伝子プロファイルを UMAP
によって2つのクラスターに分類した。

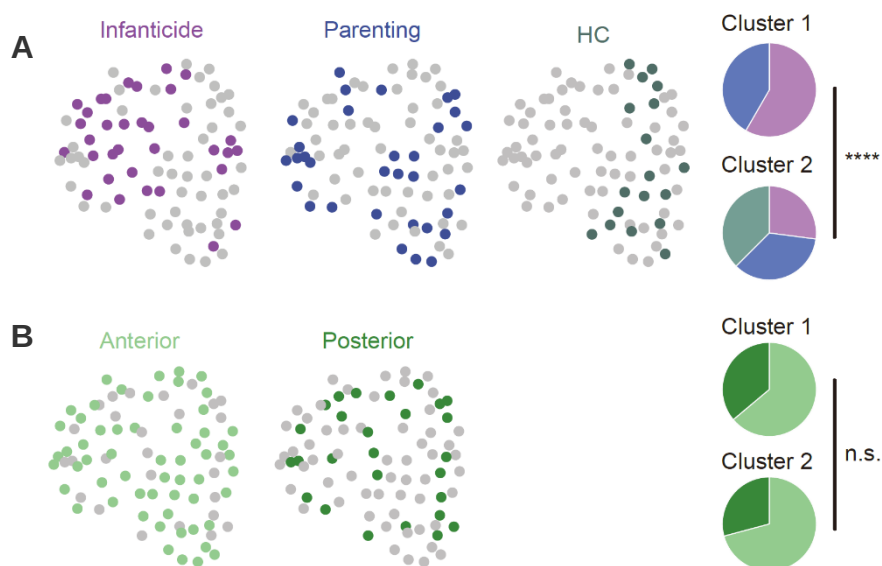


図 16 クラスターに含まれる要素の検証

A. vPAL 法にて標識した際の行動を示す UMAP プロット。B. 単一細胞を採取した AHi の垂核を示す UMAP プロット。円グラフは各クラスターに含まれる要素を表す。Chi-square test; **** $P < 0.0001$; n.s., not significant.

クラスター2には非特異的な標識のコントロールが含まれていたため、クラスター1に属するニューロンが特に行動による神経活動が引き起こされていたと考えた。そこで、クラスター1内のIニューロンとPニューロン間の発現変動遺伝子(DEGs)を調べた。その結果、346個の遺伝子がIニューロンよりもPニューロンで高い発現レベルを示し、673個の遺伝子が逆のパターンを示した(図17)。これらの遺伝子のうち、ホスホリパーゼC(PLC)シグナルを介する遺伝子(*Plcg1*; Phospholipase C, gamma 1)とGタンパク質共役受容体(GPCR)シグナルを介する遺伝子(*Htr7*; 5-hydroxytryptamine receptor 7、*Sstr3*; Somatostatin receptor 3、*Vipr1*; Vasoactive intestinal peptide receptor 1)を、それぞれの集団を薬理的に操作するための有力な候補として着目した。これらの遺伝子のIニューロンおよびPニューロン特異的な転写パターンを検証するために、*in situ* hybridization chain reaction(HCR)³³を行った。Iニューロンでは、Pニューロンよりも*Vipr1*⁺*Htr7*および*Sstr3*⁺*Plcg1*⁺ニューロンが多く観察された(図18A、B)。一方、Pニューロンでは*Htr7*⁺*Vipr1*⁺と*Plcg1*⁺*Sstr3*⁺ニューロンが大きな割合を示した(図18C、D)。

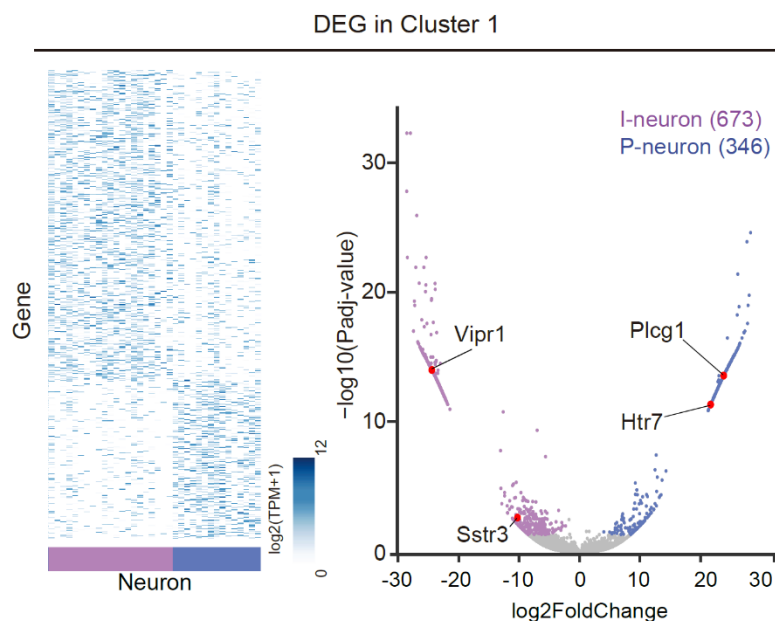


図 17 クラスター1におけるIニューロンとPニューロン間の発現変動遺伝子解析

見出された発現変動遺伝子 (DEG) の発現量を示すヒートマップ (左)、および volcano プロット (右)。紫色はIニューロン、青色はPニューロンで発現上昇している DEG を表す。

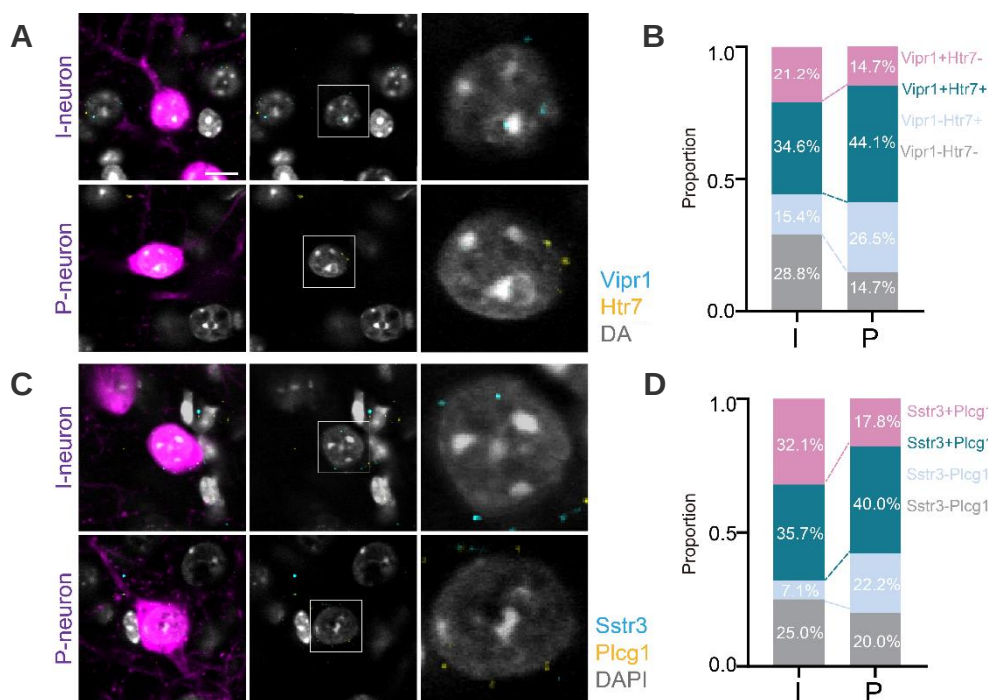


図 18 IニューロンおよびPニューロンにおける mRNA の可視化

A. tdTomato 標識細胞および *Vipr1*、*Htr7* 陽性細胞。パネルは DEG を発現した tdTomato 標識細胞の代表写真。スケールバーは 10 μm を表す。B. IニューロンおよびPニューロンにおける *Vipr1*、*Htr7* の発現割合。n = 52 (I) , 34 (P) 。C. tdTomato 標識細胞および *Sstr3*、*Plcg1* 陽性細胞。D. IニューロンおよびPニューロンにおける *Sstr3*、*Plcg1* の発現割合。n = 28 (I) , 45 (P) 。

これらの結果は、c-Fos 免疫染色および電気生理学的データと合わせて、MPOA 投射型 AHi ニューロンの亜集団 I ニューロンと P ニューロンが機能的、電気生理的、分子的に異なることを示すものである。

考察

電気生理学的実験により、virgin マウスの I ニューロンと paternal マウスの P ニューロンとの間に、異なる膜特性が存在することが明らかになった。以前の研究では、I ニューロンと P ニューロンを区別せず、MPOA 投射型 AHi ニューロン全体の電気生理学的解析を行ったところ、virgin マウスと paternal マウスの間に膜特性の有意差は認められなかった¹⁸。これは、従来の細胞標識法では異なるニューロン集団間の特性の違いが十分に検出できないことを示唆している。vPAL 法は、従来は検出できなかった異なる機能や特性を持つ集団を明らかにすることが可能である。

I ニューロンは父親になることでその興奮性および sEPSC の頻度が減少することが明らかになった。興奮性は I ニューロンの、sEPSC は I ニューロンへ興奮性神経投射を行う上流脳領域の活動が可塑的に変化していることを示唆している。以前の研究では、AHi 内抑制性介在ニューロンのオキシトシンに対する感受性が父親になることで増大することを報告している¹⁸。このように AHi は父親になることで可塑的变化を引き起こしやすい脳領域であることが予想される。

第4章 特定のニューロン集団の薬理的な操作

緒言

第3章のトランスクリプトーム解析に基づき、Pニューロンで多く発現するタンパク質を薬理的に操作することで、特定の神経集団の活性と機能を調節できるかどうかを検討した。5-HT7 受容体は Gs 結合型 GPCR であり^{34,35}、神経細胞の脱分極^{36,37}と可塑的变化³⁸を引き起こすことが報告されている。そこで、5-HT7 受容体アゴニスト LP44 の投与により、*Htr7*を発現するPニューロンが優位に活性化されるかどうかを調べた。さらに、*virgin* マウスのPニューロンを薬理的に活性化させることで、仔マウスに対する子殺しがどのように変化するかを確かめた。また、養育行動時に AHi 内で 5-HT 放出が起こっているかを確かめるために、ファイバーフォトメトリー記録による 5-HT 濃度変化を測定した。

結果

5-HT7 受容体シグナルを介した P ニューロンの脱分極

vPAL 法にて I ニューロンを標識した *virgin* マウスと P ニューロンを標識した *paternal* マウスに LP44 (10 mg/kg) を腹腔内投与した後、c-Fos の免疫染色を行った (図 19)。LP44 の投与により、*virgin* マウスおよび *paternal* マウスの AHi における c-Fos 陽性ニューロンの数が、vehicle 投与マウスと比較して増加した (図 20A、B)。しか

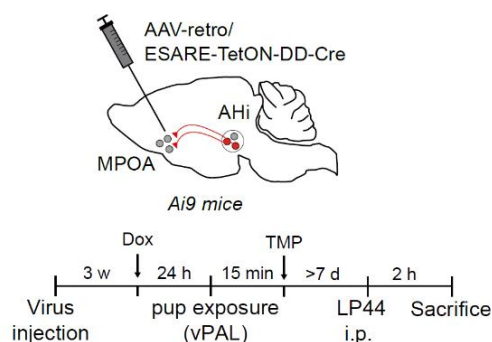


図 19 LP44 投与による c-Fos 免疫染色の実験スキーム

し、LP44 によって誘導された c-Fos 陽性ニューロンの割合は、P ニューロンの方が I ニュ

ーロンよりも有意に高かった（図 20C）。これは、LP44 が P ニューロンをより選択的に活性化させることを示唆するものである。

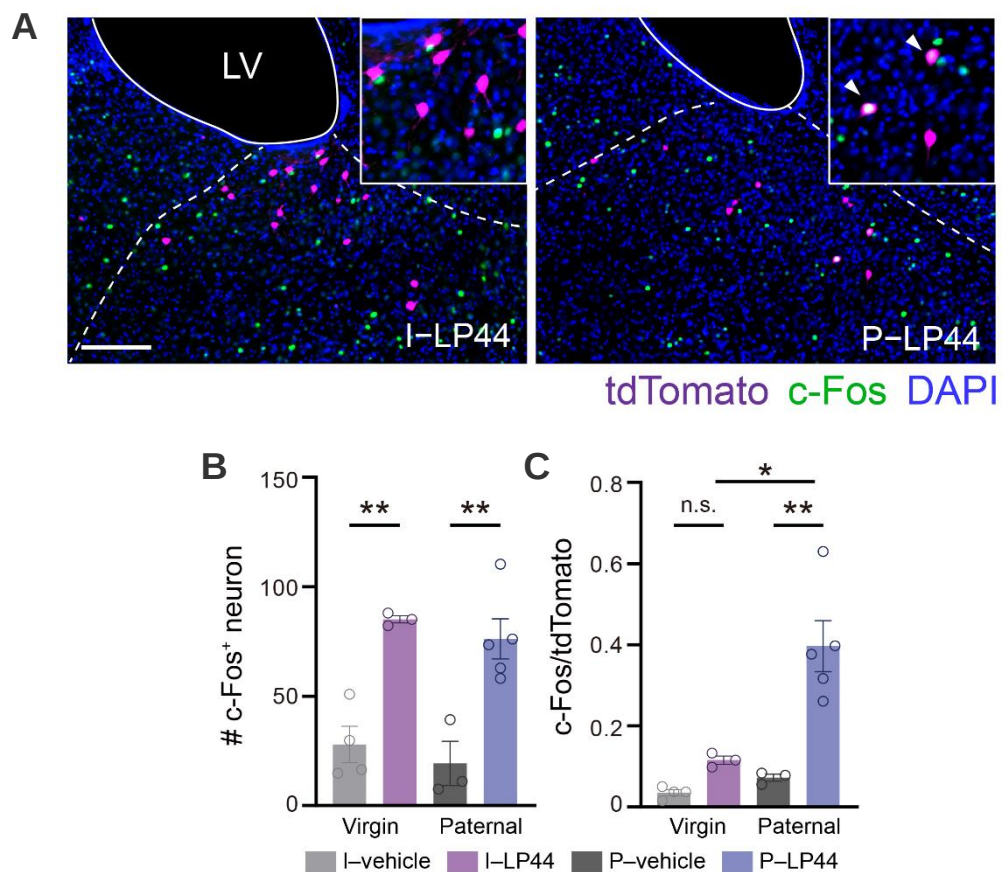


図 20 LP44 投与による P ニューロンの活性化

A. 各グループにおける tdTomato 標識細胞および c-Fos 陽性細胞。白矢印は tdTomato および c-Fos 陽性細胞を示す。スケールバーは 200 μ m を表す。B. AVH 内 c-Fos 陽性細胞数。C. tdTomato 標識細胞中の c-Fos 陽性細胞割合。
 $n = 4$ (I-vehicle), 3 (I-LP44), 3 (P-vehicle), 5 (P-LP44); Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test; mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

次に、Pニューロンに対するLP44の効果
 評価するために、Pニューロンに対してホールセルパ
 ッチクランプ記録を行い、LP44を処置する前後の膜
 特性を比較した（図 21）。LP44の処理により、RMP
 の有意な脱分極が引き起こされ、入力抵抗が増加した
 （図 22A 左、B; 他の膜特性変化については表 3 を参
 照）。この作用は選択的 5-HT₇ 受容体拮抗薬 SB269970
 の存在下で消失した（図 22A 右、C; 他の膜特性変化に
 ついては表 4 を参照）。これらのデータは、LP44 の投与は 5-HT₇ 受容体シグナルを介し
 た脱分極によって Pニューロンを Iニューロンよりも優位に活性化させることを示してい
 る。

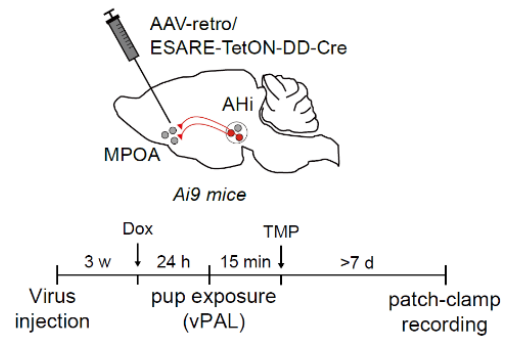


図 21 LP44 による電気生理学的特性解析の
 実験スキーム

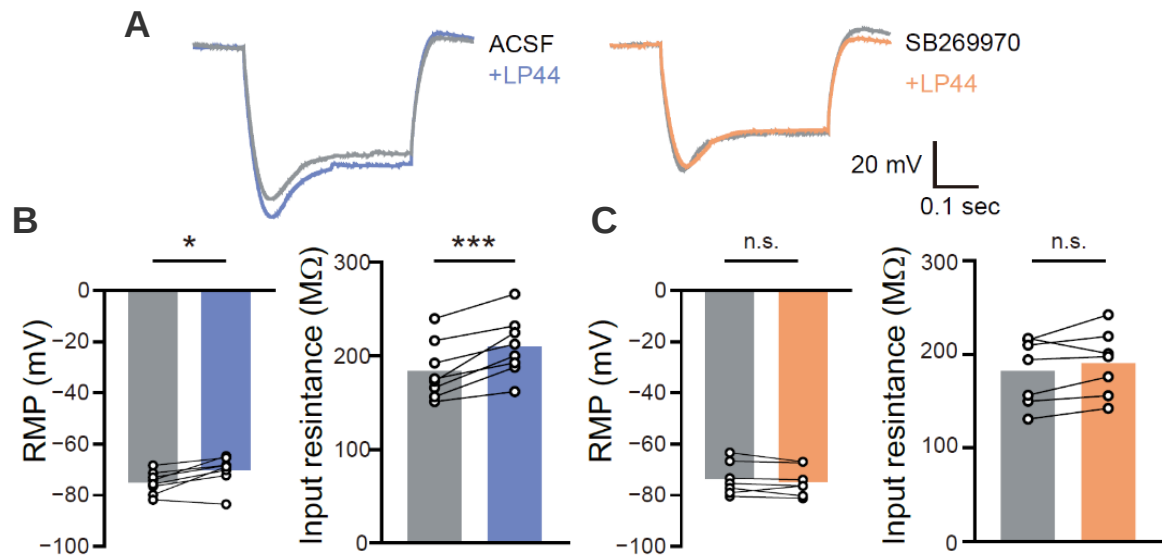


図 22 LP44 処置による Pニューロンの脱分極

A. LP44（左）、および SB269970 前処置時の LP44 処置前後（右）における過分極性応答の代表トレース。灰色は LP44 処置前、青色およびオレンジ色は LP44 処置後を表す。B. LP44 処置前後の RMP および Input resistance. $n = 8$; Wilcoxon matched-pairs signed rank test (RMP) ; paired t -test (Input resistance) . C. SB269970 を前処置した際に LP44 処置前後の RMP および Input resistance. $n = 7$; paired t -test; mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; n.s., not significant.

	pre	post	<i>p</i> -value
Membrane capacitance (pF)	59.23+3.00	56.71+3.09	0.3929
Time constant (msec)	48.71+5.59	36.89+4.68	0.0024
Threshold (mV)	-46.27+1.81	-45.86+2.55	0.7637
Sag fraction (%)	29.03+2.25	25.70+1.97	0.0535
Sag amplitude (mV)	12.00+0.93	10.56+0.86	0.0349
sEPSC amplitude (pA)	32.57+11.56	27.62+8.43	0.1094
sEPSC frequency (Hz)	2.98+1.04	3.30+0.99	0.9453

表 3 LP44 処置による P ニューロンの膜特性変化

n = 8; paired *t*-test; mean (Membrane capacitance, Time constant, Threshold, Sag fraction, Sag amplitude) ; Wilcoxon matched-pairs signed rank test (sEPSC amplitude, sEPSC frequency) ; mean $\pm$ s.e.m.

	pre	post	<i>p</i> -value
Membrane capacitance (pF)	65.66+11.97	63.82+10.29	0.5781
Time constant (msec)	48.17+6.02	47.73+8.07	0.8125
Threshold (mV)	-47.73+1.51	-46.89+1.91	0.5781
Sag fraction (%)	28.61+5.08	27.01+3.53	0.375
Sag amplitude (mV)	11.70+1.84	10.84+1.40	0.4687
sEPSC amplitude (pA)	22.77+5.26	20.89+2.77	0.9375
sEPSC frequency (Hz)	2.29+0.74	2.30+0.70	0.9375

表 4 LP44 処置による P ニューロンの膜特性変化

n = 7; paired *t*-test; mean (Time constant, Threshold, Sag fraction, sEPSC frequency) ; Wilcoxon matched-pairs signed rank test (Membrane capacitance, Sag amplitude, sEPSC amplitude) ; mean $\pm$ s.e.m.

LP44 の投与による養育行動の促進

LP44 を用いた P ニューロンの選択的活性化が、仔マウスに対する社会的行動を制御するかどうかを検証した。AHi に LP44 を直接注入するために、*virgin* マウスにガイドカニユーレを埋め込み、回復期間後、行動試験を行った（図 23）。*vehicle* または LP44 を投与しない Pre-test では、マウスは子殺しを示した（図 24A）。翌日以降、行動試験の 15 分前に *vehicle* または LP44 を AHi にマイクロインジェクションした。その結果 LP44 の投与により、Pre-test と比較して子殺しが抑制され、子育て行動が促進されたが、*vehicle* 投与ではこの行動変化は観察されなかった。仔マウスに対する行動パターンに従って評価した parenting score^{18,39} は、LP44 グループが *vehicle* グループに比べ有意に高かった（図 24B）。

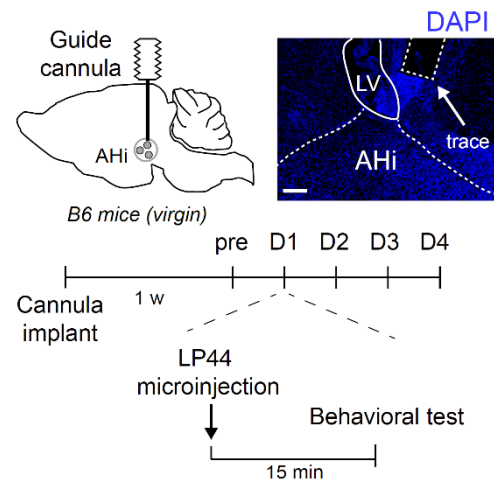


図 23 実験スキームとカニユーレ痕

スケールバーは 200 μm を表す。

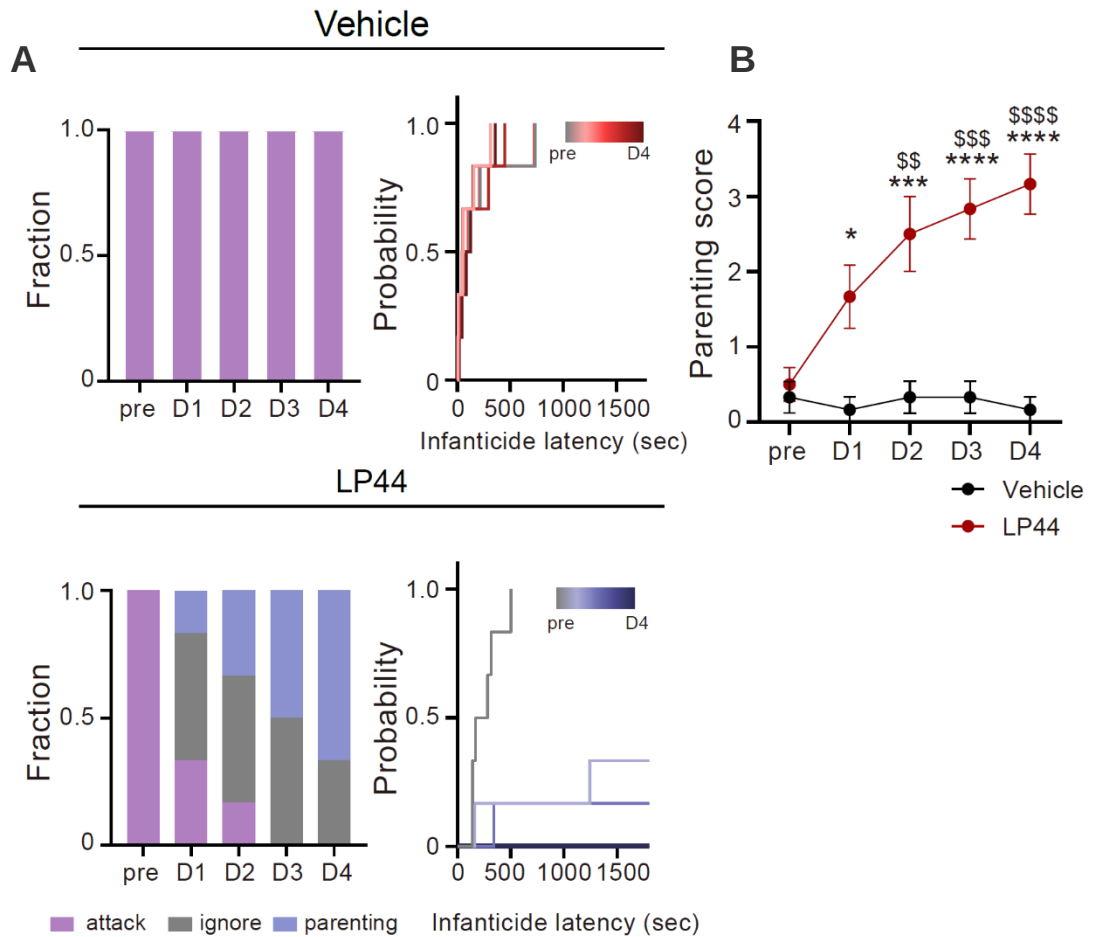


図 24 AHi への LP44 局所投与が virgin マウスの子殺しに与える影響

A. 仔マウスに対する行動の割合（左）と子殺しを行うまでの潜時の累積確率（右）。上段は vehicle を、下段は LP44 を行動試験前に投与したグループである。B. Parenting score. $n = 6$ (Vehicle), 6 (LP44); Two-way RM ANOVA with Tukey's multiple comparisons test; means $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ (同日の vehicle グループと比較); ** $P < 0.01$; \$\$\$ $P < 0.001$; \$\$\$\$ $P < 0.0001$ (グループ内の pre と比較)。

次に、LP44 の全身投与でも同様の効果が得られるかを検討した（図 25A）。
virgin マウスに LP44（10 mg/kg）を腹腔内投与すると、Pre-test と比較して一部の個体で子殺しが抑制された（図 25B）。しかし、LP44 グループと vehicle グループの間で parental score は統計的に有意ではなかった（図 25C）。そこで virgin マウスの代わりに、仔マウスに対して子殺しと養育行動を示す個体が混在した中間的なモデル（father in gestation experience; FGE）^{18,40} に LP44 の腹腔内投与を行った（図 25D）。過去の報告の通り Pre-test では子殺しと養育行動を示す個体が混在していた（図 25E）。vehicle グループでは養育行動を示す個体の割合が日々増加したが、予想と反して LP44 群では増加せず、parental score にも有意差がないことが観察された（図 25F）。この結果は、特に FGE マウスにおける全身性 5-HT₇ 活性化の未知の効果を示唆していると思われる。

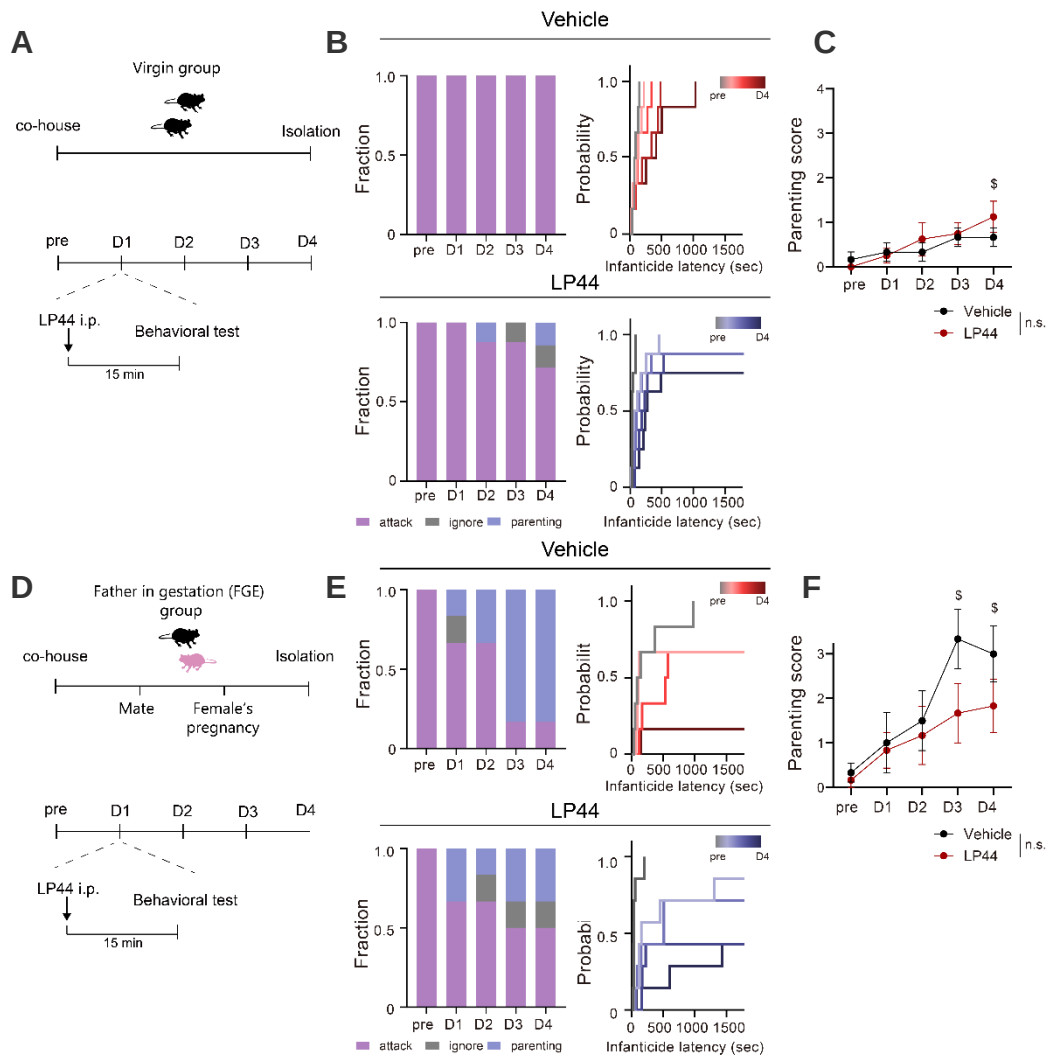


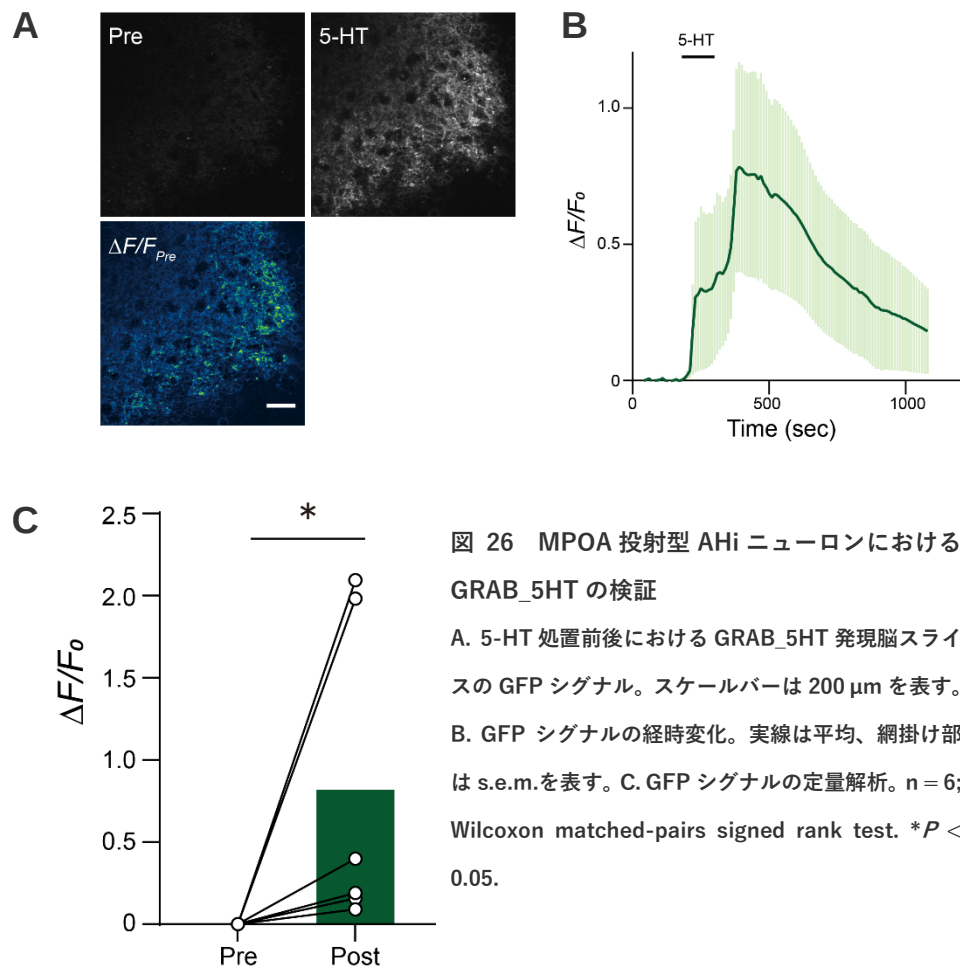
図 25 LP44 全身投与が virgin マウスおよび FGE マウスの仔マウスに対する行動に与える影響

A. virgin マウスを用いた実験タイムコース。B. 仔マウスに対する行動の割合（左）と子殺しを行うまでの潜時の累積確率（右）。上段は vehicle を、下段は LP44 を行動試験前に投与したグループである。C. Parenting score. $n = 6$ (Vehicle), 8 (LP44); Two-way RM ANOVA with Tukey's multiple comparisons test; means $\pm$ s.e.m. $^{\$}P < 0.05$ (グループ内の pre と比較)。D. FGE マウスを用いた実験タイムコース。E. 仔マウスに対する行動の割合（左）と子殺しを行うまでの潜時の累積確率（右）。上段は vehicle を、下段は LP44 を行動試験前に投与したグループである。F. Parenting score. $n = 6$ (Vehicle), 6 (LP44); Two-way RM ANOVA with Tukey's multiple comparisons test; means $\pm$ s.e.m. $^{\$}P < 0.05$ (グループ内の pre と比較); n.s. not significant.

組織学的、電気生理学的、行動学的データを総合すると、AHi への LP44 の局所注入による P ニューロンの薬理学的活性化は、仔マウスへの行動を子殺しから養育行動へと十分に偏らせることが示唆された。

養育行動の開始に関連する 5-HT の放出

養育行動中の AHi における内在的な 5-HT の動態を理解するために、GPCR-activation-based 5-HT sensor (GRAB_5HT)⁴¹ を用いて 5-HT 放出をモニターするファイバーフォトメトリー記録実験を実施した。GRAB_5-HT は 5-HT_{2c} 受容体に改変型 GFP を結合した 5-HT センサーであり、細胞外 5-HT の結合に伴う受容体の立体構造変化によって GFP シグナルを発する。そこでまず、GRAB_5HT の機能確認を行った。MPOA 投射型 AHi ニューロンに GRAB_5HT を発現させた脳スライスを作製し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光強度を経時的に観察した (図 26)。5-HT を処置した際に GFP シグナルの有意な増大が見られたことから、GRAB_5HT は既報の通りセロトニン依存的に蛍光強度を変化させることが示された。



雄マウスの MPOA に逆行性に Cre を発現する AAV (AAVretro2-CAG-Cre)、AHi に Cre 依存的に GRAB_5HT を発現する AAV (AAV9-hsyn-DIO-GRAB_5HT3.5) を注入し、AHi の上に光ファイバーを埋め込んだ (図 27)。回復後、雌マウスと一緒に飼育し paternal マウスを作製した。GRAB_5HT シグナルは、仔マウスをケージ内に置いたとき (placing a pup)、および仔マウスの匂いを嗅ぐ (sniffing)、仔マウスを咥え巣へ連れて帰る (lifting)、巣内で養育行動を行う (parenting) などの仔マウスに対する行動時に記録された。ファイバーフォトメトリー記録により、MPOA 投射型 AHi ニューロンは lifting のタイミングで GRAB_5HT シグナルの有意な増加を示したが、他の行動では見られなかった (図 28)。

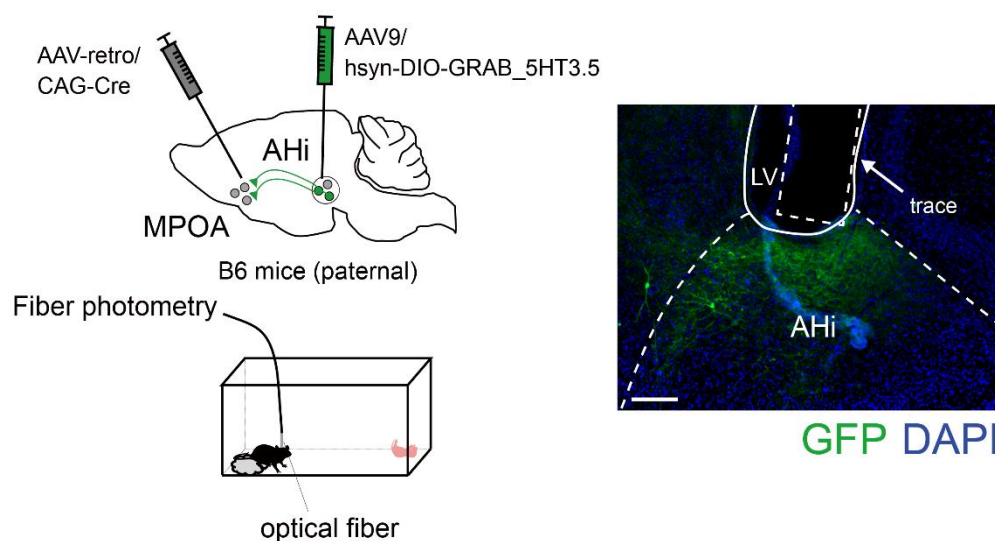


図 27 実験スキームと AAV 注入部位 (AHi)
スケールバーは 200 μm を表す。

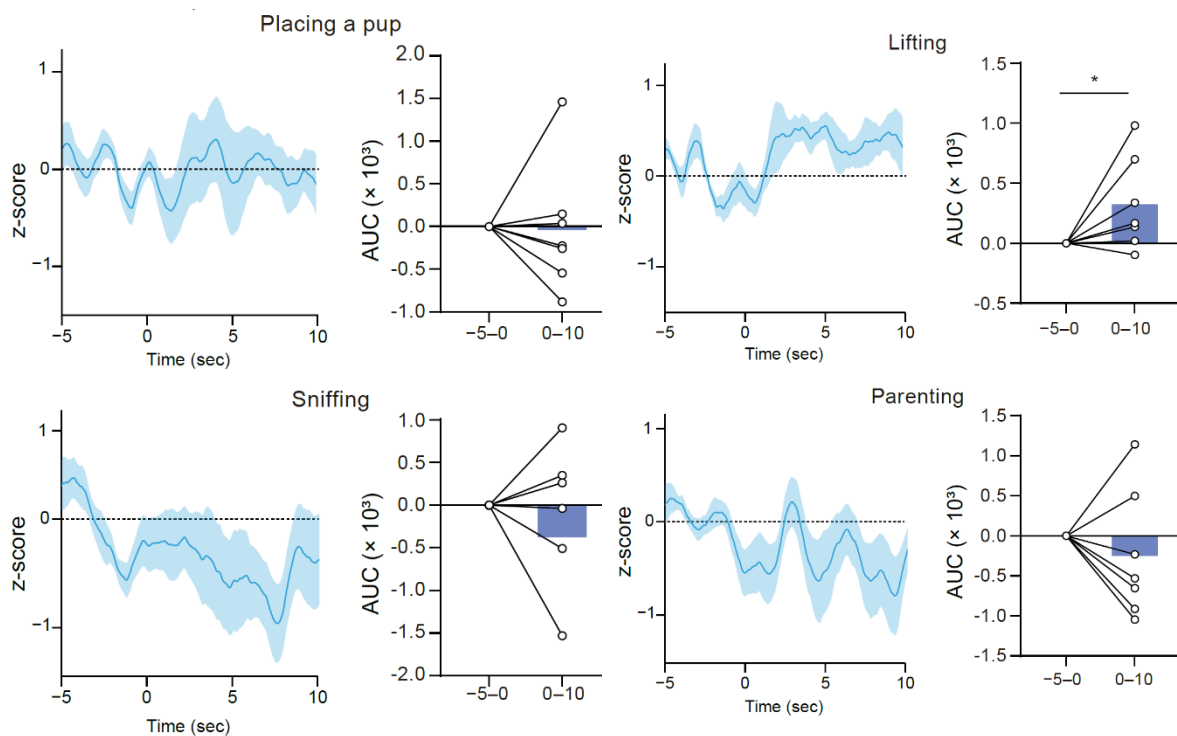


図 28 仔マウスへの行動における 5-HT ダイナミクス

各行動前後における MPOA 投射型 AHi ニューロンの蛍光強度変化（左）。各行動は 0 秒のタイミングで開始されている。実線は平均、網掛け部は s.e.m.を表す。蛍光シグナルの曲線下面積（AUC）変化（右）。行動の開始前 5 秒と開始後 10 秒を比較した。n = 7; paired *t*-test (Placing a pup, Sniffing, Parenting) ; Wilcoxon matched-pairs signed rank test (Lifting) ; **P* < 0.05.

選択的セロトニン再取り込み阻害剤であるエスシタロプラムを腹腔内投与し、シナプス間隙に 5-HT を蓄積させたところ、MPOA 投射 AHi ニューロンの GRAB_5HT シグナルが増加した（図 29）。したがって、lifting 後の GRAB_5HT シグナル増加は AHi での 5-HT 放出によるものであることが示唆された。

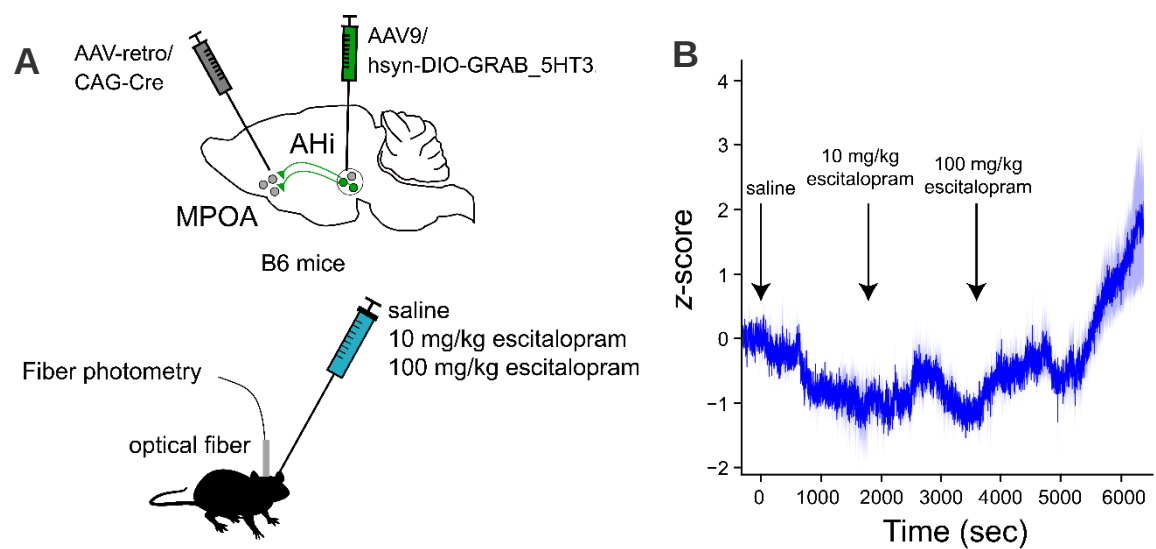


図 29 エスシタロプラム投与による蛍光強度変化

A. 実験スキーム。B. 蛍光強度の経時変化。実線は平均、網掛け部は s.e.m.を表す。n = 3。

考察

LP44 は I ニューロンよりも P ニューロンを優位に脱分極させ、*virgin* マウスの AHi に局所投与し、P ニューロンを活性化させることで養育行動を促進させることができた。一方、LP44 の全身投与でも *virgin* マウスの養育行動を一部促進させたが、AHi への局所投与に比べその寄与は小さかった。さらに、FGE マウスへの全身投与では逆説的な効果が観察された。5-HT7 受容体は脳辺縁系に広く発現しており、その活性化は AHi 以外の領域でも複雑な制御を及ぼす⁴²。scRNA-seq により、*Htr7* は背側縫線核 (DRN) のセロトニン作動性ニューロンを制御するグルタミン酸または GABA 作動性ニューロンに発現していることが明らかに⁴³、同じく 5-HT7 受容体作動薬 AS19 の全身投与は DRN のセロトニン作動性ニューロンの発火頻度を下げることが細胞外記録から実証されている⁴⁴。いくつかの矛盾はあるものの、5-HT レベルは攻撃性の高さと負の相関がある (セロトニン欠乏仮説)⁴⁵。したがって、LP44 の全身投与によって、DRN ニューロンからの 5-HT の放出が減少し、AHi を介した子育てが妨害される可能性がある。

社会的行動は複数の神経調節物質によって厳密に制御されている。その中でも 5-HT は、性行動、攻撃行動、社会性を制御していることが広く知られている⁴⁶⁻⁴⁸。仔マウスへの社会性行動において、5-HT 作動性ニューロンを含む DRN は、*virgin* マウスに比べ、*paternal* マウスでは仔マウスとの接触により活性化されることが報告されている⁴⁹。さらに、5-HT を合成する酵素であるトリプトファン水酸化酵素 2 (Tph2) を欠損したセロトニン欠損母マウスは、ネグレクトなどの不適切な養育行動を示す⁵⁰ことから 5-HT による養育行動への寄与が示唆されているが、5-HT が養育行動を直接的に制御しているかどうかは、あまり分かっていない。LP44 を用いた一連のデータおよび GRAB_5-HT のファイバーフォトメトリー記録から、仔マウスを巣へ連れて帰る際に放出される 5-HT と AHi の 5-HT7 受容体を介した養育行動の促進との間に重要な関連性を示唆された。

GRAB_5HT を用いたファイバーフォトメトリー記録により、paternal マウスの仔マウスへに対する社会性行動のうち、子育ての開始ともいえる lifting の後 10 秒において 5-HT の増大を観察した。この結果は、MPOA 投射型 AHi ニューロンへの 5-HT 放出が lifting を促進するのではなく、lifting によって 5-HT 放出が促進されていることを示唆している。すなわち、5-HT は仔マウスに対する行動選択よりも、行動決定後の養育行動の促進・維持にかかわっていると考えられる。仔マウスに対する行動選択が他の脳領域の寄与により決定し、仔マウスを咥えた際の感覚入力 DRN の 5-HT ニューロンの活動を上昇させ、MPOA 投射型 AHi ニューロンへの 5-HT 放出が誘発されることで、巣内での養育行動が促進されるのだろう。virgin マウスも paternal マウスと同様に仔マウスを咥えるが、しばらく咥えた後、そのまま噛み殺してしまう。LP44 の投与は、virgin マウスが仔マウスを咥えた際の 5-HT 放出を模倣することで養育行動を促進することが推測される。

第5章 さいごに

総括

本研究では、投射特異性と活動依存性に基づく新しい細胞標識法である vPAL 法を用いて、MPOA 投射型 AHi ニューロンにおいて、それぞれ I ニューロン、P ニューロンという子殺しと養育行動を仲介する 2 つの異なるニューロン集団を同定した。これらの相反するニューロン集団は、電気生理学のおよび分子的に異なる特性を示した。さらに、P ニューロンで優位に発現する 5-HT₇ 受容体のアゴニストを投与すると、P ニューロンが脱分極し、子殺しが抑制され、*virgin* マウスの養育行動が促進されることが明らかになった（図 30）。

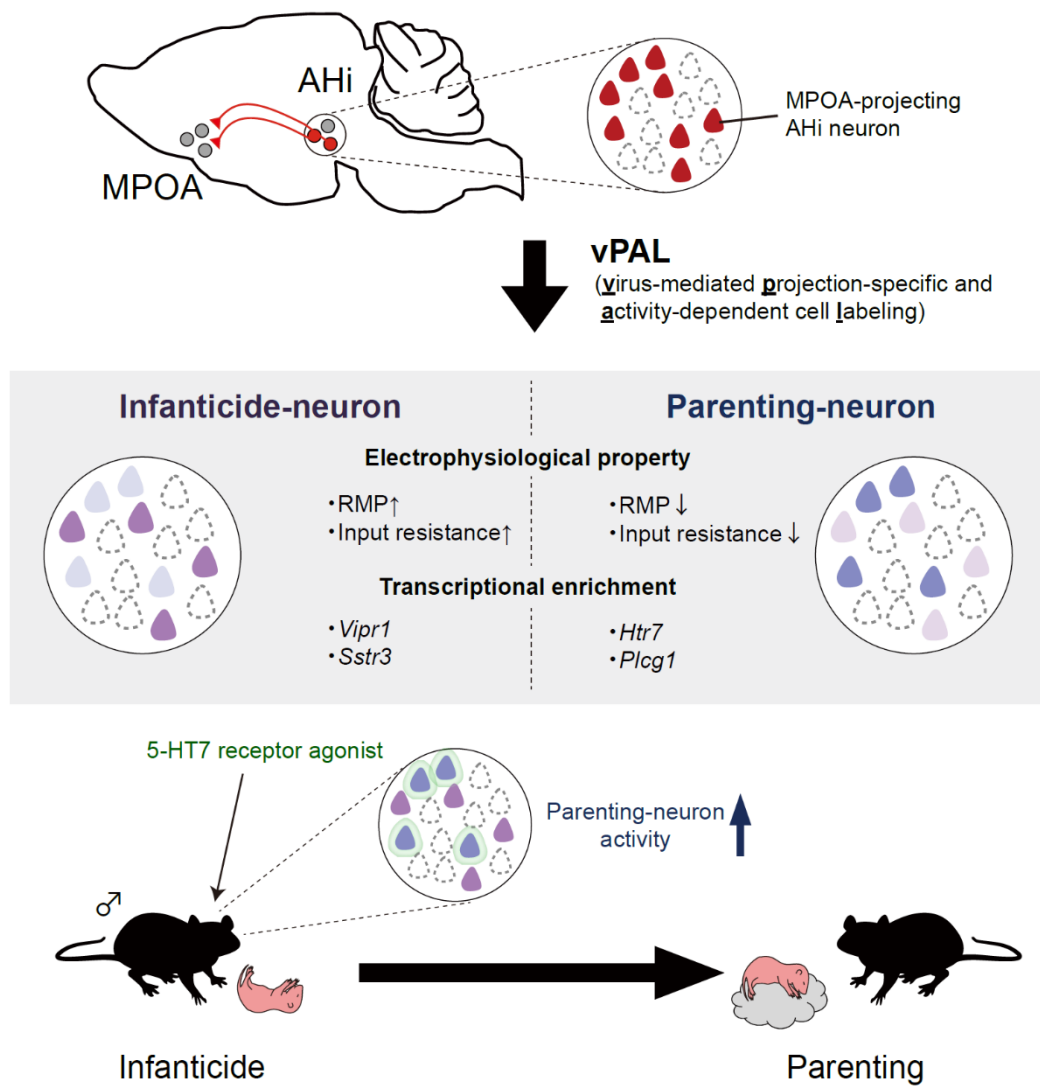


図 30 本研究で明らかになったこと

IニューロンとPニューロンの活性化による機能

我々は、Pニューロンの薬理学的な活性化が子育てを促進することを実証した。一方、以前の研究でMPOA投射型AHiニューロン全体（おそらくIニューロンおよびPニューロン）を活性化したところ、むしろ子殺しが促進された¹⁸。これは、IニューロンとPニューロンの興奮性の違いで説明できるかもしれない。IニューロンはPニューロンに比べて入力抵抗性と興奮性が高いことから、MPOA投射型AHiニューロンを同時に活性化させるとIニューロンの活性化が優位に働くため、Iニューロンを介した行動制御が優先的に引き起こされた可能性が考えられる。

IニューロンとPニューロンの制御メカニズム

IニューロンとPニューロンを個別に制御する *in vivo* のメカニズムには、1) 各ニューロンの個別での活性化、2) 各ニューロンの出力先での制御が想定される。1については、各ニューロン特異的に発現している受容体と神経伝達物質によって引き起こされていると推測しており、候補として5-HTが挙げられる。仔マウスを抱き上げるとAHiでの5-HT放出が見られ、PニューロンはHtr7の発現が高いため、IニューロンよりもむしろPニューロンが優位に脱分極することがわかった。Iニューロンについても優位に発現している受容体やチャネル遺伝子が見つかったことから、特定の神経伝達物質が個々のニューロン集団を制御していることが予想される。

もしくは、IニューロンとPニューロンを制御する上流脳領域が異なっているかもしれない。これまでに、仔マウスへの行動選択には嗅覚情報が重要であることが報告されている^{40,51}。嗅覚情報は嗅上皮を介した主嗅球系と鋤鼻器を介した副嗅球系に分類される。主嗅球系の匂い受容体には3型アデニル酸シクラーゼ（AC3）が必要であるが⁵²、AC3をKOしたマウスは養育行動を示さないことが明らかになっている⁵¹。一方で、鋤鼻器を外科的に切除すると子殺しが見られなくなり、*virgin* マウスであっても養育行動を示

す⁴⁰。したがって、主嗅球系と副嗅球系および下流シグナルがそれぞれ養育行動と子殺しに必要である。これらの感覚入力がどのように各下流脳領域に伝達され行動を引き起こすかは不明であるが、本研究で見出された I ニューロンと P ニューロンがこれらの感覚入力をそれぞれ特異的に受け取っており、異なる行動が引き起こされている可能性が考えられる。

2 については、I ニューロンおよび P ニューロンの出力先である MPOA が機能的⁵³⁻⁵⁵、分子的⁵⁶にヘテロであることに着目した仮説である。MPOA 内には養育行動のみならず^{12-14,16}、子殺し時に活性化するニューロン集団が存在することが報告されている⁵⁷。このことから、子殺しに寄与する MPOA ニューロンが AHi の I ニューロンから選択的に入力を受け、養育行動に寄与する MPOA ニューロンは P ニューロンから選択的に入力を受けるという仮説を検証する必要がある。

vPAL 法の活用

これまでの中枢神経研究は、特定の脳領域あるいは神経路に着目した研究が主であった。しかし、詳細な神経機能解析や医療応用へつなげるためには、特定の脳機能との関連にも着目したアプローチが必要である。本研究では、①vPAL 法を用いて、投射先に応じて分類されたニューロンを特定の行動時における活性化状態でさらに分類し、②分類されたニューロン集団に対して scRNA-seq を行い各行動時に活動するニューロン集団を特異的に活動操作するための標的受容体を同定し、③脳スライスパッチクランプ法を行い電気生理学的特性の違いを明らかにし、④各ニューロン集団を特異的に活性化・抑制する薬物を投与し行動変化の解析を行った。これら一連のアプローチにより、行動あるいは病態を制御するための標的分子の探索法を構築し、中枢神経疾患に対する新規治療薬開発に役立つ研究手法と治療標的分子の獲得が望まれる。また、本研究により確立された vPAL 法は様々な脳科学研究に広く活用でき、既存の細胞標識法では抽出することが困難であった、特定の

脳機能に関与するニューロン集団を新たに同定することで、脳科学研究に大きなインパクトを与えることが期待される。

実験方法

1 実験動物

すべての実験は米国国立保健研究機構のガイドラインに沿って行われ、北海道大学動物実験委員会の承認を得ている。実験には、C57BL/6J および Ai9 (RRID:IMSR_JAX:007909) マウスを用いた。すべての実験動物は、明暗周期が 12 時間(明期; 7:00-19:00, 暗期; 19:00-7:00)、さらにマウスは摂食・飲水が自由に行える室内環境の下で飼育した。出生後 28 日で離乳し、雌雄別々に 2-6 匹を同じケージ内で集団飼育した。父親マウスは 1 匹の雌マウスと同居させ、交尾、パートナーの出産、仔マウスとの 3 日以上同居を経験させることで作製した。Father in gestation (FGE) マウスは父親マウスと同様の手順で、妊娠後期まで 1 匹の雌マウスと同居させ、出産や仔マウスと対面させなかったマウスのことを指す。

2 インジェクション手術

術前にマウスを 3 種混合麻酔⁵⁸ (メデトミジン 0.3 mg/kg、ミタゾラム 4.0 mg/kg、酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg) もしくはケタミン/キシラジン (塩酸ケタミン 65 mg/kg、塩酸キシラジン 13 mg/kg) の腹腔内投与により深麻酔した。頭蓋にドリルで穴をあけ、ミネラルオイルで満たしたガラス電極を用いてアデノ随伴ウイルス (AAV) を MPOA (Bregma に対して AP +0.1 mm; ML ±0.70 mm; DV -5.1 mm)、AHi (Bregma に対して AP -2.4 mm; ML ±2.60 mm; DV -5.1 mm) もしくは dorsal CA3 (Bregma に対して AP -1.9 mm; ML ±2.50mm; DV -2.0 mm) に注入した。

活動依存的かつ出力特異的な標識法のために、AAV2retro-ESARE-Tet3G-STOP-TRE3Gs-DD-Cre (2×10^{12} genome copies (gc) /ml; 鹿児島大学・奥野教授より提供) と 0.1 % Green Retrobeads (LumaFluor) を Ai9 雄マウスの左側 MPOA に 200 nL 注入した。回復後、AAV 注入マウスを他の雄マウスと集団飼育、または雌マウスと同居し、3 週間以上待機さ

せ導入遺伝子を発現させた。

トリメトプリム (TMP) の投与条件検討のために、Ai9 雌雄マウスの左側 dorsal CA3 に AAV2retro-ESARE-Tet3G-STOP-TRE3Gs-DD-Cre と 0.1 % Green Retrobeads を注入した。回復後、AAV 注入マウスを同性マウスと集団飼育し、3 週間以上待機させ導入遺伝子を発現させた。

薬理学実験のために、C57BL/6J 雄マウスに 26G ガイドカニューレを両側 AHi から 0.5 mm 上部に埋め込んだ。ガイドカニューレはスーパーボンド (サンメディカル株式会社) を用いて頭蓋骨に固定した。マウスは個飼いで 3-4 日飼育した。

ファイバーフォトメトリー実験のために、C57BL/6J 雄マウスの左側 MPOA に AAV2retro-CAG-Cre (5.3×10^{12} gc/mL; UNC Vector Core) と 0.1 % Red Retrobeads (LumaFluor) を、左側 AHi に AAV9-hsyn-DIO-GRAB_5HT3.5 (9.95×10^{13} gc/ml; WZ Biosciences Inc.) をそれぞれ 200 nL 注入した。さらに、光ファイバー (0.50 NA, $\phi 400 \mu\text{m}$; Thorlabs) を左側 AHi に埋め込み、スーパーボンドで頭蓋骨に固定した。回復後、AAV を注入したマウスを雌マウスと 4 週間以上同居させ、導入遺伝子を発現させた。光ファイバーが外れたマウスは *ex vivo* 脳スライスイメージング実験に使用した。

3 使用薬物

ドキシサイクリン塩酸塩水和物 (Cayman Chemical) およびエスシタロプラムシュウ酸塩 (東京化成工業株式会社) は生理食塩水で、トリメトプリム (Sigma-Aldrich) はジメチルスルホキシド (DMSO) で、塩酸セロトニン (Sigma-Aldrich) は HEPES-Tyrode で希釈したものを使用直前に調製した。20% DMSO/生理食塩水で希釈した LP44 (Abcam) と 17% DMSO/生理食塩水で希釈した SB269970 塩酸塩 (Tocris) をストック溶液として分注し、 -20°C で保存した。

4 vPAL 法を用いた活動依存的かつ出力特異的な標識法

vPAL 法による I ニューロンと P ニューロンの標識のため、MPOA に AAV2retro-ESARE-Tet3G-STOP-TRE3Gs-DD-Cre を注入したマウスは、仔暴露の 2 日前まで集団飼育し、その後は新しい床敷き（Alpha-Dri; Shepherd Specialty Papers）と巣材（Nestlet; Ancare）を含むケージに個別に加えた。仔暴露の 1 日前に、マウスに 100 mg/kg のドキシサイクリン（Dox; 10 mg/mL）を腹腔内投与した。翌日、I ニューロンの標識のために、子殺し群マウスに金網ボール（直径 45 mm; Minex Metal）に入れた仔マウスに 30 分間暴露した。金網ボールには 10 個の穴（直径約 5 mm）が開いており、マウスは噛むことなく直接仔マウスに接触し、なめることができる。P ニューロンの標識のために、父親群マウスに 3 匹の仔マウスに 30 分間直接接触させた。ホームケージ（HC）群マウスは元のケージにとどめた。15 分後、マウスに 150 mg/kg の TMP（75 mg/mL）を腹腔内投与した。1 週間後、マウスを安楽死させ標識細胞の定量解析を行った。ほかの実験では、1 週間以上待機してからマウスを安楽死させた。

c-Fos 免疫染色実験では、vPAL 法で標識した各マウスを雄マウス、もしくは雌マウスと同居させ、3 週間以上の待機期間の後、再度仔暴露を行った。仔暴露の 90 分後にマウスを麻酔し、PBS に溶解した 4% パラホルムアルデヒド（PFA）で経心灌流した。脳サンプルは免疫組織学実験に利用した。

vPAL 法による新奇環境活性化ニューロンの標識のため、AAV2retro-ESARE-Tet3G-STOP-TRE3Gs-DD-Cre を dorsal CA3 に注入したマウスを新奇環境に暴露する 1 週間

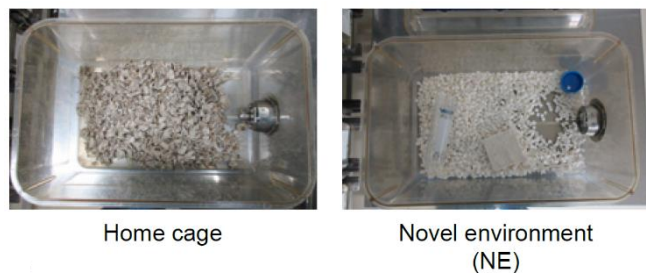


図 31 新奇環境暴露に用いたテストケージ

間前まで集団飼育し、その後は新しい床敷きを含むケージで個飼いとした。Dox 腹腔内投与の 1 日後、マウスを Alpha-Dri、巣材、50mL ファルコンチューブ、綿棒を含む新規ケージに 30 分間導入した（図 31）。TMP の用量依存的な細胞標識を確認するために、新規環境暴露

の 15 分後に、0 (vehicle)、15、もしくは 150 mg/kg の TMP を腹腔内投与した。DD-Cre のターンオーバーの時間経過を評価するために、新規環境暴露の 15 分後、2 時間後、もしくは 24 時間後に 150 mg/kg の TMP を腹腔内投与した。1 週間後、マウスをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、4% PFA で経心灌流した。

5 薬理学実験

LP44 の局所投与実験のために、ガイドカニューレを埋め込んだマウスを 2 日間、ハンドリングとカニューレ注入に慣らした。その後、アルファドライと巣材を入れたケージで飼育した。被験マウスのケージに 3 匹の仔マウス (生後 1-6 日) を巣以外の隅に加え、仔マウス指向性行動試験を行った (図 32)。試験

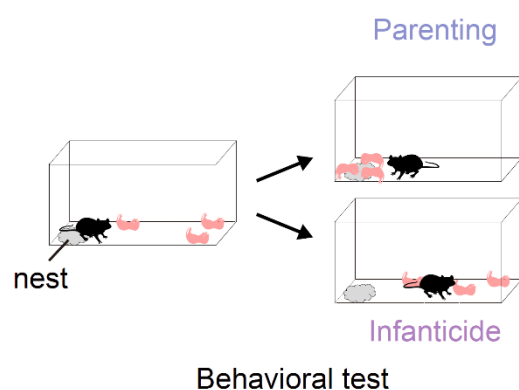


図 32 仔マウス指向性行動試験の概略図

は 1 日 1 回、5 日連続で日中に 30 分間行った。Pre-test では被験マウスは薬液を投与せずに試験を実施した。Day1-4 では、マイクロシリンジポンプ (100 nL/min) に接続した 33G インターナルカニューレを介して LP44 (5 mM/200nL/side) または vehicle を注入した。注入 15 分後に仔マウス指向性行動試験を行った。Parental score は、過去の報告^{18,39}に従って評価した (4=全頭回収、3=1-2 頭回収、2=回収せず、1=実験ケージに入れてから 3 分以降に少なくとも 1 頭が攻撃された、0=実験ケージに入れてから 3 分以内に少なくとも 1 頭が攻撃された)。仔マウスが 2 秒以上悲鳴をあげる、もしくは目に見える傷が見えた場合、実験を終了した。傷がある仔マウスは直ちに安楽死させた。行動試験後、ガイドカニューレの痕跡の位置から注入部位を確認した。

LP44 の全身投与のために、1-4 日目に LP44 (10 mg/kg) または vehicle を腹腔内投与した。投与後 15 分で仔マウス指向性行動試験を行った。

6 ファイバーフォトメトリー

ファイバーフォトメトリー記録は、4 ports Fluorescence Mini Cube (ilFMC4-G2_IE (400-410) _E (460-490) _F (500-550) _S)、LED Driver (LEDD_2)、Doric Neuroscience Studio V5 (Doric Lenses)で制御する Fiber Photometry Console で構築した Doric system で実施した。GRAB_5HT の isosbestic fluorescence (405 nm) および 5-HT 依存性蛍光 (465 nm) を 100 Hz で記録した。465 nm と 405 nm の LED は、221 Hz と 334 Hz で正弦波的に変量された。LED の強度は、各信号に対して 150-200 mV の電圧を返すように調整した。EthoVision XT 16 (Noldus) を用いてファイバーフォトメトリー記録中の行動をビデオ録画した。光計測信号とマウスの行動を一致させるために、ビデオ録画と同時に TTL パルスを Doric Neuroscience Studio V5 へ送信した。

養育行動中のファイバーフォトメトリー記録は、パッチコードをマウスに接続後少なくとも 30 分間待機させてから実施した。被験マウスのホームケージに 1 匹の仔マウスを加え、養育行動が観察されるまで記録を行った。行動イベント（仔マウスを巣内に置く、仔マウスの匂いを嗅ぐ、仔マウスを咥える、巣内で養育行動を行う）のタイミングはファイバーフォトメトリー記録を観察していない実験者が決定した。「仔マウスを巣内に置く」とは、仔マウスがホームケージに置かれ、実験者の手がケージの上部から離れたときと定義した。「仔マウスの匂いを嗅ぐ」とは、被験マウスが初めて仔マウスに鼻を近づけたときと定義した。「仔マウスを咥える」とは、被験マウスが初めて仔マウスを口で咥え、仔マウスを傷つけることなく巣まで運んだときと定義した。「巣内で養育行動を行う」とは、被験マウスが巣の中で仔マウスをなめることと定義した。

エスシタロプラム投与後のファイバーフォトメトリー記録は、パッチコードをマウスに接続後少なくとも 30 分間経過してからベースライン信号を記録した。その後、被験マウスに生理食塩水、10 mg/kg エスシタロプラム、100 mg/kg エスシタロプラムを 30 分お

きに腹腔内投与した。

ファイバーフォトメトリー記録は Guppy⁵⁹ を用いて解析した。ベースライン蛍光は、465 nm チャンネルに対する 405 nm チャンネルの最小二乗多項式フィッティングにより算出した。蛍光強度変化 $\Delta F/F$ は以下の式で算出した。

$$\Delta F/F = (F_{465} - F_{405_fitted}) / F_{405_fitted}$$

刺激前後時間ヒストグラム (PSTH) は各行動イベントの開始時刻に z スコアの $\Delta F/F$ シグナルを合わせて作成した。養育行動について、-5-0 秒と 0-10 秒の z スコア化 $\Delta F/F$ シグナルの曲線下面積 (AUC) を比較した。

7 電気生理学実験

ペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg, i.p.) によりマウスを深麻酔し、混合ガス (95% O₂/5% CO₂) を飽和させた氷冷 cutting solution (126 mM choline chloride, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, pH 7.3) を経心灌流した。振動刃ミクロトーム (VT1200; Leica) を用いて AHi を含む脳スライス (厚さ 230 μ m) を作製した。作製した脳スライスは 20-30 分間、32°C の混合ガス (95% O₂/5% CO₂) を飽和させた人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid; ACSF, 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, pH 7.3) でインキュベーションし、その後記録まで室温に保った。記録時には、混合ガスを飽和させた ACSF (32°C-34°C) が 2-4 ml/min で灌流されるチャンバー内に脳スライスを移した。tdTomato を発現している神経細胞は、40 倍の拡大レンズと赤外線カメラ (IR-1000; DEGE-MTI) を用いて観察した。信号は Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices) を用い、3 kHz でフィルタリングして取得した。記録用ガラス電極の抵抗は 4-9 M Ω になるよう作製した。内部溶液は、132 mM K-gluconate, 3 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 12 mM Na-phosphocreatine, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.2% biocytin (pH 7.25) で約 295 mOsm とし

た。液間電位差（11 mV）は補正を行った。アクセス抵抗が 30 M Ω 以下で、正電流注入により活動電位がオーバーシュートする神経細胞を解析に含めた。膜特性として、静止膜電位、入力抵抗、膜容量、発火閾値、Time constant、

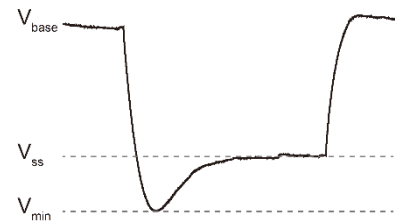


図 33 Voltage sag の代表トレース

Sag fraction、Sag amplitude を記録した。入力抵抗は、

Current-clamp mode で電流注入に対する活動電位の振幅から得られた電圧-電流の近似直線から推定した。発火閾値は、Current-clamp mode の発火時における活動電位の微分値 (dV/dt) が 10 mV/ms を超えた際の膜電位と定義した。Time constant は、Current-clamp mode で -20 pA の電流注入に対する過分極電圧応答について、Clampfit v.11.2 (Molecular Devices) の "exponential, standard" 関数でフィットさせて決定した。Voltage sag は、Current-clamp mode で過分極電位のピーク (V_{min}) が -100 mV 付近となるトレースを用いて、ベースとなる電位 (V_{base}) および安定時の電位 (V_{ss}) から次の計算式により Voltage sag を算出した⁶⁰(図 33)。また、 $V_{min}-V_{ss}$ を sag amplitude と定義した。

$$\text{Voltage sag (\%)} = \frac{(V_{min} - V_{ss})}{(V_{min} - V_{base})} \times 100$$

興奮性シナプス後電流 (EPSC) の記録では、Voltage-clamp mode で -86 mV に電位を固定し、自発的興奮性シナプス後電流 (sEPSC) には ACSF にピクロトキシン (PTX; 100 μ M) を、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の記録にはさらにテトロドトキシン (TTX; 1 μ M) を添加した。抑制性シナプス後電流 (IPSC) の記録では、Voltage-clamp mode で -60 mV に電位を固定し、自発的抑制性シナプス後電流 (sIPSC) には ACSF に 6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2,3-ジオン (CNQX; 20 μ M) と MK-801 (20 μ M) を、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) の記録にはさらに TTX (1 μ M) を添加した。すべての自発的シナプス後電流および微小シナプス後電流は 10 分間記録した。

LP44 と SB269970 の膜特性と sEPSC に対する効果を確認するために、100 μ M PTX を前処理した後、LP44 処置前の膜特性と 5 分間のベースライン sEPSC を記録した。次に、

10 μ M LP44 を 15 分間処置し、最後の 5 分間の sEPSC を処置後として記録した。その後、処置後の膜特性を記録し、それぞれ処置前と比較した。5-HT7 受容体の活性を阻害するため、10 μ M SB269970 を記録の少なくとも 10 分前に前処置した。

8 単一細胞サンプリング

vPAL 法を用いて、MPOA 投射型 AHi ニューロン中の I ニューロン、P ニューロン、HC で活性化したニューロンを標識した。標識後 1 週間以上経過したマウスの AHi を含む脳スライスを電気生理学実験と同じプロトコルで作製した。ACSF を含む 1–3 M Ω のガラス電極を用いて、tdTomato 陽性の神経細胞にアプローチした。陽圧をかけた後、他の細胞を回収しないように、弱い陰圧で単一神経細胞を吸引した。採取した神経細胞をシリコンコーティングされた PCR チューブ (Biomedical Science) 中の 10 μ L の細胞溶解バッファー (0.5% Triton X, 0.5 U/ μ L RNase Inhibitor, 5 ng/ μ L yeast tRNA) に懸濁して直ちにドライアイス上で冷凍、逆転写で処理するまで -80°C で保存した。

9 scRNA-seq

cDNA ライブラリーを合成するために Smart-seq2 法⁶¹ を一部改変したプロトコルを利用した。dT₃₀VN オリゴヌクレオチド (最終濃度 1 μ M) を PCR チューブに加え、70°C で 3 分間インキュベートした後、直ちに氷上に置いた。次に、ジチオスレイトール (DTT; 2.5 mM)、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP; 1 mM)、RNase inhibitor (1 U/ μ L)、ロック核酸テンプレートスイッチングオリゴプライマー (LNA-TSO; 0.6 μ M)、SMARTscribe Reverse Transcriptase (5 μ M) および 5 $\times$ 1st Standard buffer (1 $\times$) を含む逆転写反応溶液と混合した。42°C で 120 分間インキュベーションした後、70°C で 10 分間加熱して反応を停止させた。その後、2 $\times$ Tks Gflex DNA Polymerase Low DNA (1 $\times$) と IS primer (0.19 μ M) を含む PCR mix に cDNA サンプルを混合した。次に、PCR 増幅 (95°C、1 分 $\rightarrow$ [98°C、10 秒 $\rightarrow$ 65°C、30 秒

→68°C、4 分] ×24 サイクル) を行った。増幅された cDNA サンプルは、同量の固層可逆的固定ビーズ (AMPure XP; Beckman Coulter) と混合し、MilliQ グレードの H₂O で溶出することにより精製した。cDNA の品質と量は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) と High-sensitivity DNA kit (Agilent) を用いて測定した。低品質のサンプルは除外し、低量のサンプルは 2 サイクルの PCR を追加して増幅した。以下のプライマーとオリゴヌクレオチドを使用した。

dT₃₀VN: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT30VN-3' (V; A, C or G, N; any base)

LNA-TSO: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACrGrG+G-3' (rG; riboguanosine, +G; LNA-modified guanosine)

IS primer: 5'-NH2-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

NEBNext Multiplex Oligos for Illumina 96 Unique Dual Index Primer Pairs (New England Biolabs) を用いて、メーカーのプロトコルにしたがって、ユニークインデックスアダプターを cDNA に付加した。Novaseq 6000 (Illumina) で 2×150 bp のペアエンドライブラリーを用いてシーケンスを行った。アライメントは、STAR⁶² によりマウスゲノム (GRCm38/mm10) に対して行った。遺伝子長とその遺伝子にマッピングされたリード数から Transcripts per million (TPM) を R (v.4.1.0) で算出し、全サンプルで TPM < 5 の遺伝子は解析から除外した。非神経細胞とのコンタミネーションの有無を判断するため、オリゴデンドロサイト (遺伝子マーカー: *Gfap*、*S100b*、*Aqp4*) とアストロサイト (遺伝子マーカー: *Olig1*、*Olig2*、*Mbp*) の共発現スコア⁶³ を以下のように算出した。

$$S_{astro} = \text{TMP}_{Gfap} \times \text{TMP}_{S100b} \times \text{TMP}_{Aqp4}$$

$$S_{oligo} = \text{TMP}_{Olig1} \times \text{TMP}_{Olig2} \times \text{TMP}_{Mbp}$$

S_{astro} または S_{oligo} が 0 より大きい細胞は解析から除外した。教師無しクラスタリングは、Seurat^{64,65} (v.4.0.3) と UMAP⁶⁶ (v.0.2.7.0) を用いて行った。DESeq2 (v.1.32.0) を用いて adjusted *P*-value ≤ 0.05 かつ |log₂ fold change| ≥ 2 の遺伝子を発現変動遺伝子 (DEG) として同定した。gplots (v.3.1.1) と ggplot2 (v.3.3.5) を用いてヒートマップと volcano plot を描

画した。

10 組織学実験

マウスをペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, i.p.）で麻酔し、4% PFA で経心灌流した。脳を頭蓋骨から取り出し、4% PFA にて一晩 4°C で後固定し、PBS に溶解した 15% および 30% スクロースで凍結保護した。脳組織は、optimal-cutting-temperature compound（Sakura Finetek）に包埋し -80°C で保存した。組織学的実験のために、30 μ m 厚の脳切片をクライオスタット（CM3050S; Leica）を用いて作製した。

蛍光免疫染色のために、切片を 0.1% Triton X-100 を含む PBS（PBST）で 15 分間洗浄し、PBS に溶解したブロックエース（KAC）で 1 時間処理した。ブロックエースで希釈した一次抗体溶液にて 4°C で一晩インキュベーションした。一次抗体はウサギ由来抗 c-Fos 抗体（1:1000; #226003; Synaptic Systems）、もしくはニワトリ由来抗 GFP 抗体（1:1000; #AB13970; Abcam）を使用した。翌日、PBST で 5 分間 3 回洗浄した後、切片を PBST で希釈した二次抗体溶液にて室温で 2 時間インキュベーションした。二次抗体は Alexa Fluor 647 標識ロバ由来抗ウサギ IgG 抗体（1:500; #A-31573; Thermo Fisher Scientific）もしくは、Alexa Fluor 488 標識ロバ由来抗ニワトリ IgY 抗体（1:500; #703-545-155; Jackson Immuno Research Laboratories）を使用した。最後に、切片を PBST で 1 回洗浄し、PBS で希釈した DAPI 溶液（1:10000; #PK-CA707-40043; PromoKine）にて 10 分間処理し、PBS ですすぎ、Fluoromount（Diagnostic BioSystems）を使用してカバーガラスにマウントした。

in situ hybridization chain reaction（HCR）のプロープと試薬は Molecular Instruments 社から入手した。切片を PBST で 5 分間 2 回洗浄した後、4% PFA で 10 分間処理した。0.1 M triethanolamine-HCl で希釈した 0.25% 無水酢酸溶液（pH 8.0）で 10 分間アセチル化し、再度 PBST で 5 分間 2 回洗浄した。次に、hybridization buffer にて 30 分間 37°C でインキュベーションした後、hybridization buffer で希釈したプロープ溶液にて 37°C で一晩インキュベ

ションした。プローブ濃度 (*Htr7*, *Plcg1*, *Sstr3*: 4 nM; *Vipr1*: 2 nM) はパイロット実験により決定した。翌日、wash buffer にて 37°C で 15 分間 3 回洗浄した後、0.1% Tween 20 を含む 5×SSC (5×SSCT) で 5 分間 3 回洗浄した (以下、室温で処置)。amplification buffer を 30 分間処置し、hairpin h1、h2-488、647 (それぞれ 30 pmol) を含む hairpin 溶液で一晩インキュベーションした。翌日、5×SSCT にて 5 分間 2 回、30 分間 1 回洗浄し、5×SSCT で希釈した DAPI 溶液にて 30 分間処理した。5×SSCT にて 5 分間洗浄した後、Fluoromount を使用してカバーガラスにマウントした。

すべての画像は共焦点レーザー顕微鏡 (10×または 60×; FV-10; Olympus) および蛍光顕微鏡 (10×; BZ-X700; Keyence) を用いて取得した。細胞計測は、Fiji (National Institutes of Health) を使用して手動で行った。

11 ex vivo 脳スライスイメージング

MPOA 投射 AHi ニューロンで GRAB_5HT を発現している脳切片は、上記のように MPOA に AAV2retro-CAG-Cre、AHi に AAV9-hsyn-DIO-GRAB_5HT3.5 を注入したマウスから調製した。イメージングは共焦点レーザー顕微鏡 (60×; FV-10) を用いて 10 秒ごとに行った。各スライスを 35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業株式会社) に置き、HEPES-Tyrode (150 mM NaCl₂, 4 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.4) で灌流した。ベースラインの GRAB_5HT シグナルを 3 分間記録した後、50 μM のセロトニン (5-HT) を 2 分間処置した。ベースラインでの 3 分間の平均蛍光強度をシグナルのベースライン (F_0) とした。蛍光強度変化 $\Delta F/F_0$ は以下の式で算出した。

$$\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$$

12 統計処理

統計ソフトは GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) を用いた。パラメトリック検定のため

の正規性と分散の均質性の仮定は、Shapiro-Wilk 検定と Levene 検定を用いて検定した。これらの検定が棄却された場合は、Mann-Whitney test、Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test、Chi-square test、Wilcoxon matched-pairs signed rank test を利用した。検定が満たされている場合は、Paired *t*-test、One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test を利用した。Two-way ANOVA、Two-way RM ANOVA については、標本分布の正規性を仮定し、その後 Tukey's multiple comparisons test 検定を行った。

参考文献

1. Heim, C. & Nemeroff, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatry* **49**, 1023–1039 (2001).
2. Hughes, K. *et al.* The effect of multiple adverse childhood experiences on health: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Public Heal.* **2**, e356–e366 (2017).
3. Widom, C. S., Czaja, S. J., Bentley, T. & Johnson, M. S. A prospective investigation of physical health outcomes in abused and neglected children: New findings from a 30-year follow-up. *Am. J. Public Health* **102**, 1135–1144 (2012).
4. Hovens, J. G. F. M. *et al.* Childhood life events and childhood trauma in adult patients with depressive, anxiety and comorbid disorders vs. controls. *Acta Psychiatr. Scand.* **122**, 66–74 (2010).
5. Beitchman, J. H. *et al.* A review of the long-term effects of child sexual abuse. *Child Abuse Negl.* **16**, 101–118 (1992).
6. Greene, C. A., Haisley, L., Wallace, C. & Ford, J. D. Intergenerational effects of childhood maltreatment: A systematic review of the parenting practices of adult survivors of childhood abuse, neglect, and violence. *Clin. Psychol. Rev.* **80**, 101891 (2020).
7. Widom, C. S., Horan, J. & Brzustowicz, L. Childhood maltreatment predicts allostatic load in adulthood. *Child Abuse Negl.* **47**, 59–69 (2015).
8. Mehta, D. *et al.* Child Maltreatment and Long-Term Physical and Mental Health Outcomes: An Exploration of Biopsychosocial Determinants and Implications for Prevention. *Child Psychiatry Hum. Dev.* 1–15 (2021) doi:10.1007/s10578-021-01258-8.
9. Black, D. A., Smith Slep, A. M. & Heyman, R. E. Risk factors for child psychological abuse. *Aggress. Violent Behav.* **6**, 189–201 (2001).
10. Numan, M. & Sheehan, T. P. Neuroanatomical circuitry for mammalian maternal behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **807**, 101–125 (1997).
11. Tsuneoka, Y. *et al.* Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J. Comp. Neurol.* **521**, 1633–1663 (2013).
12. Wu, Z., Autry, A. E., Bergan, J. F., Watabe-Uchida, M. & Dulac, C. G. Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature* **509**, 325–330 (2014).
13. Wei, Y.-C. C. *et al.* Medial preoptic area in mice is capable of mediating sexually dimorphic behaviors regardless of gender. *Nat. Commun.* **9**, 279 (2018).
14. Fang, Y.-Y. Y., Yamaguchi, T., Song, S. C., Tritsch, N. X. & Lin, D. A Hypothalamic Midbrain Pathway Essential for Driving Maternal Behaviors. *Neuron* **98**, 192–207.e10 (2018).
15. Kohl, J. *et al.* Functional circuit architecture underlying parental behaviour. *Nature* **556**, 326–331 (2018).
16. Tsuneoka, Y. *et al.* Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *EMBO J.* **34**, 2652–70 (2015).
17. Shinozuka, K. *et al.* A calcitonin receptor-expressing subregion of the medial preoptic area is involved in alloparental tolerance in common marmosets. *Commun. Biol.* **5**, 1243 (2022).
18. Sato, K. *et al.* Amygdalohippocampal Area Neurons That Project to the Preoptic Area Mediate Infant-Directed Attack in Male Mice. *J. Neurosci.* **40**,

- 3981–3994 (2020).
19. Kawashima, T. *et al.* Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. *Nat. Methods* **10**, 889–895 (2013).
20. Sando, R. *et al.* Inducible control of gene expression with destabilized Cre. *Nat. Methods* **10**, 1085–1091 (2013).
21. Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B. & Das, A. T. Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Ther.* **13**, 1382–1390 (2006).
22. Loew, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H. & Gossen, M. Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnol.* **10**, 1–13 (2010).
23. Hainmueller, T. & Bartos, M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 153–168 (2020).
24. Hasan, M. T. *et al.* A Fear Memory Engram and Its Plasticity in the Hypothalamic Oxytocin System. *Neuron* **103**, 133–146.e8 (2019).
25. Dogbevia, G. K., Marticorena-Alvarez, R., Bausen, M., Sprengel, R. & Hasan, M. T. Inducible and combinatorial gene manipulation in mouse brain. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–8 (2015).
26. Dogbevia, G. K., Roßmanith, M., Sprengel, R. & Hasan, M. T. Flexible, AAV-equipped Genetic Modules for Inducible Control of Gene Expression in Mammalian Brain. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **5**, e309 (2016).
27. Dillingham, B. C. *et al.* Fear Learning Induces Long-Lasting Changes in Gene Expression and Pathway Specific Presynaptic Growth. *bioRxiv* 571331 (2019) doi:10.1101/571331.
28. Herman, J. P. & Mueller, N. K. Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behav. Brain Res.* **174**, 215–224 (2006).
29. Myers, B., Mark Dolgas, C., Kasckow, J., Cullinan, W. E. & Herman, J. P. Central stress-integrative circuits: Forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Struct. Funct.* **219**, 1287–1303 (2014).
30. Zha, X. *et al.* VMHvl-Projecting Vglut1+ Neurons in the Posterior Amygdala Gate Territorial Aggression. *Cell Rep.* **31**, 107517 (2020).
31. Yamaguchi, T. *et al.* Posterior amygdala regulates sexual and aggressive behaviors in male mice. *Nat. Neurosci.* **23**, 1111–1124 (2020).
32. Stagkourakis, S., Spigolon, G., Liu, G. & Anderson, D. J. Experience-dependent plasticity in an innate social behavior is mediated by hypothalamic LTP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 25789–25799 (2020).
33. Choi, H. M. T. *et al.* Third-generation in situ hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust. *Development* **145**, dev165753 (2018).
34. Shen, Y. *et al.* Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **268**, 18200–18204 (1993).
35. Ruat, M. *et al.* Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8547–8551 (1993).
36. Ohmura, Y. *et al.* Serotonin 5-HT₇ receptor in the ventral hippocampus modulates the retrieval of fear memory and stress-induced defecation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, 1–12 (2016).
37. Santello, M. *et al.* The brain-penetrant 5-HT₇ receptor agonist LP-211 reduces the sensory and

- affective components of neuropathic pain. *Neurobiol. Dis.* **106**, 214–221 (2017).
38. Bijata, M. *et al.* Activation of the 5-HT₇ receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior. *Cell Rep.* **38**, (2022).
 39. Amano, T. *et al.* Development-dependent behavioral change toward pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Behav. Brain Res.* **325**, 131–137 (2017).
 40. Tachikawa, K. S., Yoshihara, Y. & Kuroda, K. O. Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system. *J. Neurosci.* **33**, 5120–5126 (2013).
 41. Wan, J. *et al.* A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics. *Nat. Neurosci.* **24**, 746–752 (2021).
 42. Neumaier, J. F., Sexton, T. J., Yracheta, J., Diaz, A. M. & Brownfield, M. Localization of 5-HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J. Chem. Neuroanat.* **21**, 63–73 (2001).
 43. Huang, K. W. *et al.* Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *Elife* **8**, 1–34 (2019).
 44. Mnie-Filali, O. *et al.* Pharmacological blockade of 5-HT₇ receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1275–1288 (2011).
 45. Francesco Ferrari, P., Palanza, P., Parmigiani, S., De Almeida, R. M. M. & Miczek, K. A. Serotonin and aggressive behavior in rodents and nonhuman primates: Predispositions and plasticity. *Eur. J. Pharmacol.* **526**, 259–273 (2005).
 46. Walsh, J. J. *et al.* 5-HT release in nucleus accumbens rescues social deficits in mouse autism model. *Nature* **560**, 589–594 (2018).
 47. Hull, E. M., Muschamp, J. W. & Sato, S. Dopamine and serotonin: Influences on male sexual behavior. *Physiol. Behav.* **83**, 291–307 (2004).
 48. Berman, M. E., Tracy, J. I. & Coccaro, E. F. The serotonin hypothesis of aggression revisited. *Clin. Psychol. Rev.* **17**, 651–665 (1997).
 49. de Jong, T. R., Chauke, M., Harris, B. N. & Saltzman, W. From here to paternity: Neural correlates of the onset of paternal behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Horm. Behav.* **56**, 220–231 (2009).
 50. Alenina, N. *et al.* Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10332–10337 (2009).
 51. Wang, Z. & Storm, D. R. Maternal behavior is impaired in female mice lacking type 3 adenylyl cyclase. *Neuropsychopharmacology* **36**, 772–781 (2011).
 52. Argyrousi, E. K., Heckman, P. R. A. & Prickaerts, J. Role of cyclic nucleotides and their downstream signaling cascades in memory function: Being at the right time at the right spot. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **113**, 12–38 (2020).
 53. McHenry, J. A. *et al.* Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit. *Nat. Neurosci.* **20**, 449–458 (2017).
 54. Park, S.-G. G. *et al.* Medial preoptic circuit induces hunting-like actions to target objects and prey. *Nat. Neurosci.* **21**, 364–372 (2018).
 55. Nakamura, K. & Morrison, S. F. Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J. Physiol.* **589**, 3641–3658 (2011).
 56. Moffitt, J. R. *et al.* Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic

- region. *Science* **362**, eaau5324 (2018).
57. Dimén, D. *et al.* Sex-specific parenting and depression evoked by preoptic inhibitory neurons. *iScience* **24**, 103090 (2021).
 58. Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. & Kurosawa, T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* **60**, 481–7 (2011).
 59. Sherathiya, V. N., Schaid, M. D., Seiler, J. L., Lopez, G. C. & Lerner, T. N. GuPPy, a Python toolbox for the analysis of fiber photometry data. *Sci. Rep.* **11**, 1–9 (2021).
 60. Yamauchi, N. *et al.* Activation of the neural pathway from the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis to the central amygdala induces anxiety-like behaviors. *Eur. J. Neurosci.* **48**, 3052–3061 (2018).
 61. Picelli, S. *et al.* Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protoc.* **9**, 171–181 (2014).
 62. Dobin, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
 63. Liu, J. *et al.* Integrative analysis of in vivo recording with single-cell RNA-seq data reveals molecular properties of light-sensitive neurons in mouse V1. *Protein Cell* **11**, 417–432 (2020).
 64. Stuart, T. *et al.* Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888–1902.e21 (2019).
 65. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* **36**, 411–420 (2018).
 66. McInnes, L., Healy, J. & Melville, J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. *arXiv preprint arXiv:1802.03426* (2018).

謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導、ご鞭撻を頂きました南雅文 教授、天野大樹 准教授、竹内雄一 准教授、奥野浩行 教授（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科）、野村洋 寄附講座教授（名古屋市立大学 大学院医学研究科 脳神経科学研究所）、人羅奈津子 特任助教（熊本大学 大学院生命科学研究部）に心より感謝いたします。

本研究に関して scRNA-seq の解析について貴重なご指導、ご助言を賜りました東京大学 大学院新領域創成科学研究科 鈴木穰 教授ならびに文部科学省科学研究費新学術領域研究ゲノム支援に謹んで感謝の意を表します。

また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂きました薬理学研究室の先輩、同期、後輩の皆様心より感謝致します。

最後に、これまで長きに渡り私の研究生活を温かく支えて下さいました、家族、親族、友人に心より感謝致します。