

51. マウスにおいて父親の子育て行動を制御する神経回路メカニズムの 解明

理化学研究所生命機能科学研究センター チームリーダー 宮道 和成

概要

雄性動物が子に直接的な養育行動を行う生物学的メカニズムは、近年、世界的に人間の父親による育児が増加していることと並行して注目を集めています。しかし、父親の養育行動に関する神経科学の基礎研究は未だ十分に進展していません。マウスをモデルとした私たちの最近の研究では、視床下部室傍核 (PVH) から分泌されるオキシトシン (OT) が父性養育行動において重要であることを明らかにしました。しかし、OT だけではこの行動変化を完全に説明することはできず、その下流の特定の神経細胞やシグナル伝達メカニズムは未解明のままです。本研究では、以下の3つの主要な知見を提示します。第一に、成体期に特異的な遺伝的細胞除去システムを用いて、PVH のバソプレッシン (AVP) ニューロンが父性養育行動において極めて重要な役割を果たしていることを実証しました。AVP が様々な社会的行動に関与していることはこれまでも広く知られていますが、PVH の AVP ニューロンが養育行動に不可欠であることを示したのは、これが初めての証拠と考えられます。第二に、AVP ニューロンが誘導する父性養育行動が主に視索前野 (POA) におけるオキシトシン受容体 (OTR) を介して媒介されることを示しました。OT と AVP およびその受容体の化学構造は非常に類似していますが、これまでの研究では、非正規のリガンド-受容体結合によるクロストークの可能性を薬理的データに基づいて示唆するにとどまっていた。本研究では、Otr 遺伝子の条件的ノックアウト (cKO) データを豊富に提示し、薬理学的手法を補完する形で、この AVP から OTR へのクロストークが父性行動の変化を支えるメカニズムであることを特定しました。第三に、POA の OTR を発現するニューロンが OT および AVP シグナルの両方を媒介し、父性養育行動において重要な役割を果たすことを示しました。これら OTR 発現ニューロンは、POA における養育行動の中核とされる領域の近傍に位置しており、PVH 由来のホルモンシグナルを統合し、POA の親行動プログラムを調節する回路ハブとして機能する可能性を示しています。これらの知見は、乳幼児に対する雄性の養育行動の神経基盤を理解する上で、重要な知見を提供しています。

背景および目的

哺乳類において、親ではない動物は、同種の幼獣にほとんど関心を示さないか、場合によっては攻撃的な行動を示すことがあります。しかし、自身の子が期待される段階になると、幼獣への攻撃性が消失し、養育行動が促進されます (Dulac C *et al.*, *Science* **345**, 765, 2014)。雄マウスは、この行動可塑性を研究する上で優れたモデルです。性的に未経験な成獣雄マウスは子マウスに対して攻撃的ですが、交配や妊娠中の雌マウスとの同居により、養育行動へと移行することが知られています。ペプチドホルモンは父性行動に関与すると考えられています。たとえば、両親が育児を行うハタネズミの雄では、父性養育行動中に視床下部室傍核 (PVH) のオキシトシン (OT) 産生ニューロンが活発に活動することが知られています (He Z *et al.* *J Neurosci* **41**, 6699, 2021)。また、マウスを用いた私たちの最近の研究では、PVH の OT ニューロンが父性養育行動の調節に重要であることが明らかになりました。具体的には、PVH OT ニューロンの化学遺伝学的活性化が、性的に未経験な雄マウスにおいて子マウスへの攻撃性を抑制し、養育行動の特徴である子の回収行動を促進しました。この効果は OT リガンドに依存

しており、一方で、PVHにおける *OT* 遺伝子の条件付ノックアウト (cKO) は父性養育行動を著しく減少させ、父親が子を無視する一方で攻撃や回収行動を示さない結果となりました (Inada K *et al.*, *Neuron* **110**, 2009, 2022)。しかし *OT* を欠損させた場合でも、父親となる際の子マウスへの攻撃性抑制は維持されており、他に何らかの代償システムの存在が考えられました。この候補として、様々な社会的行動に関与するバソプレッシン (AVP) が挙げられます。

OT には *OT* 受容体 (OTR) という単一の正規受容体が存在する一方、AVP は 3 種類の AVP 受容体 (VR : V1aR, V1bR, V2R) が存在します。哺乳類の脳では、OTR と V1aR は広範な領域に発現し、しばしば異なる分布を示しますが、V1bR はより限られた分布を持ち、V2R は主に末梢組織で機能します。さらに、AVP と *OT* はアミノ酸配列が 9 つのうち 7 つを共有する構造的類似性を持つため、AVP がその正規の VR だけでなく OTR も活性化する可能性があります。しかし、OTR または VR シグナルが父性養育行動にどのように関与するかは分かっていませんでした。

方法

本研究では父性ライフステージへの移行期における PVH AVP ニューロンの役割を明らかにするため、Cre 依存性 AAV ベクターを用いてアポトーシスを誘導する taCasp3-TEVp40 を PVH AVP ニューロンに導入し、細胞除去を行いました (図 1A)。また、通常子マウスに対して攻撃的な行動を示す性的に未経験な雄マウスの行動に PVH AVP ニューロンの活性化が与える影響を明らかにするため、PVH AVP ニューロンに hM3Dq-mCherry を発現させ、行動試験の 30 分前に、クロザピン-N-オキシド (CNO) または対照として生理食塩水を腹腔内注射で投与しました (図 1D)。

PVH AVP ニューロンの活性化と同時に様々な領域における *Otr* を cKO により阻害するため、*AVP-Cre; Otr^{flx/flx}* マウスの局所に AAV-Cre を導入しました (図 2)。この条件では、視索前野内側核や前交連核を含む広義の視索前野 (POA) において広範な *Otr* の発現低下を認めました。

次に、POA の OTR 発現ニューロンを特異的に操作するため、*Otr-Cre* マウス (Inoue YU *et al.*, *eNeuro* **9**, 10.1523, 2022) を用いて hM3Dq-mCherry を発現させました (図 3)。

結果および考察

PVH AVP ニューロンを欠損させる実験において、taCasp3 群では PVH AVP ニューロンが有意に減少した一方で、PVH *OT* ニューロンには影響が見られませんでした (図 1B)。対照群の父親 (生理食塩水を注射) ではすべての個体が子育てをしましたが、taCasp3 群では、回収行動の割合が減少しただけでなく、子に対する攻撃行動も見られました。養育性を表す養育スコアは、taCasp3 群の父親で有意に低下しました (図 1C)。一方、PVH AVP ニューロンの活性化実験において、生理食塩水を注射した性的に経験の雄マウスでは子に対する攻撃行動が観察されましたが、CNO 注射によりこの攻撃行動が有意に抑制され、子育て行動が促進されました。その結果、養育スコアは有意に増加しました (図 1E, F)。これらの結果は、PVH *OT* ニューロンと同様に、PVH AVP ニューロンが父性養育行動に重要な役割を果たすことを示しています。

PVH AVP ニューロンは下流においてどのように父性行動を促進するのでしょうか。薬理的な検討によると、PVH AVP ニューロンを活性化と共に OTR または V1aR 拮抗阻害薬を脳室内投与したところ、OTR 阻害薬は AVP ニューロンによる子育て行動を強く障害することが分かりました。そこで、OTR による AVP の受容が子育て行動を促進するというモデルを更に検証するべく、*Otr* の cKO 実験を行いました。視索前野領域 (POA) から広く *Otr* を cKO したところ、PVH AVP ニューロン活性化による父性養育行動の促進が消失しました (図 2)。POA 内には複数の核が存在し、*Otr* はこれらの領域全体に広く分布しています。そこで養育行動の中核が位置する内側視索前野 (MPNm) と前交連核 (ACN) において特異的に *Otr* を cKO したところ、AVP ニューロン誘発性の養育行動が低下することが分かりました。しかし、MPNm または ACN に特異的な *Otr* cKO では、POA 全域の *Otr* cKO と比較して AVP ニューロン誘発性の父性行動の障害は部分的でしたので、POA 内の複数の OTR ニューロンが協調して父性行動の変化を媒介していることが示唆されました。興味深いことに、同様の *Otr* cKO は PVH *OT* ニュー

ロンを活性化された際に見られる父性養育行動を部分的に阻害しました。これらのデータから、MPNm および ACN 内の OTR が、PVH 内の AVP および OT ニューロンによって引き起こされる父性行動に関与し、これら二種類のホルモンシグナルが POA 内の下流ターゲットに収斂する可能性を示しています。

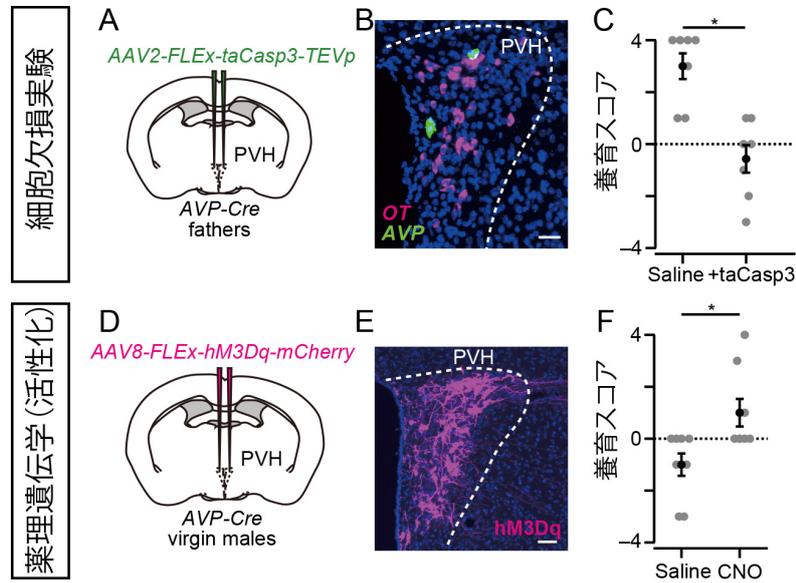


図 1. PVH AVP ニューロンはマウスの父性養育を促進する

(A, D) 実験のスキーム。(B) taCasp3 を導入して AVP ニューロンを欠損させた個体の室傍核切片。In situ hybridization 法により OT 発現をマゼンタ、AVP 発現を緑に示し、青色は DAPI による核染色を示す。本操作により、AVP ニューロンのみが減少した。(C, F) 養育スコアは、雄マウスが回収した子の数を+1、攻撃した子の数を-1 と計算し、2 分以内に 3 匹の子全てを回収または攻撃した場合、それぞれ+1 点または-1 を与えた。その結果、養育スコアの最大値は 4、最小値は-4 となる。*, $p < 0.05$, two-tailed Mann-Whitney U-test。(E) hM3Dq-mCherry (マゼンタ) を導入した PVH の代表的切片。スケールバーは 50 μm 。

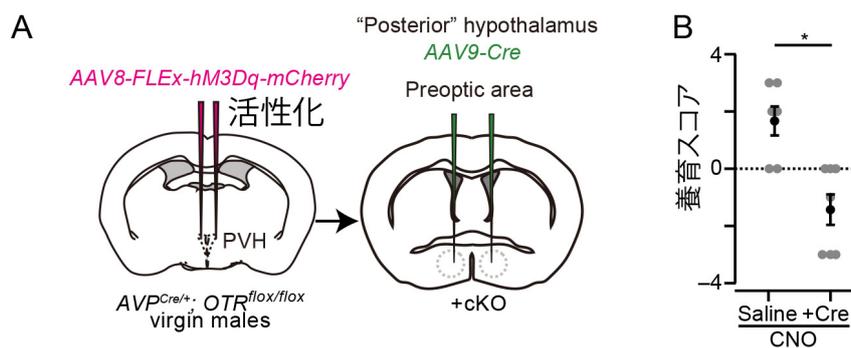


図 2. 視索前野の OTR は PVH AVP 神経活性化による父性養育行動を担う

(A) 実験スキーム。PVH AVP 神経の薬理遺伝学的活性化と同時に視索前野の *Otr* を AAV-Cre により cKO した。(B) この操作により養育スコア (図 1 参照) が有意に減少した。

最後に、MPNm 及び ACN 内の OTR が生理学的な条件において養育行動に果たす役割を調査するため、父親マウスにおいて *Otr* 遺伝子を cKO しました (図 3A)。これらの父親マウスは子マウスを無視し、養育スコアが有意に低下しました (図 3B)。したがって、POA 内の OTR は、父性行動を促進するために必要不可欠であると考えら

れます。逆に、MPNm または ACN 内の OTR ニューロンを薬理遺伝学的に活性化することで、性的に未経験の雄マウスにおける子マウスへの攻撃行動が顕著に抑制され、父性養育行動が惹起されました (図 3C, D)。これらの結果は、ACN および MPNm の OTR ニューロンが父性行動を促進する能力を有することを示しています。

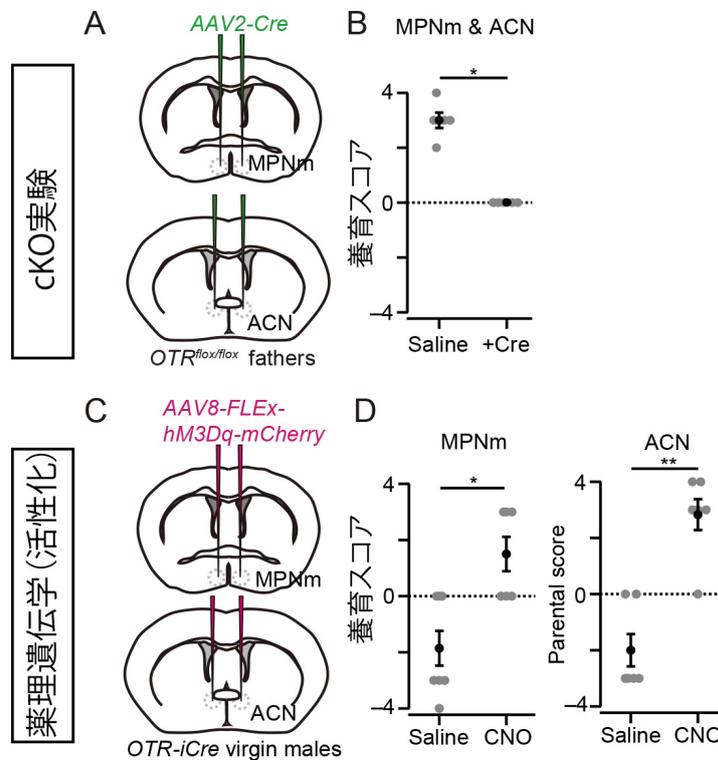


図 3. 視索前野の OTR ニューロンは父性養育行動に必要なである

(A, C)実験のスキーム。(B) 父親マウスにおいて POA 領域の MPNm と CAN において *Otr* を cKO した場合、父性養育行動が阻害され子マウスを無視するようになった。(D) 性的に未経験の雄マウスにおいて、MPNm または CAN の OTR ニューロンを薬理遺伝学により活性化させた場合、いずれのケースでも薬剤依存的に父性養育行動が発動した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, two-tailed Mann-Whitney U-test。

以上をまとめると、1) PVH AVP ニューロンは雄マウスの子マウスへの攻撃性を抑制し、養育行動を促進する能力を持つこと、2) AVP ニューロンによる父性行動の大部分は POA 内、特に MPNm および ACN の OTR により媒介されること、3) これらの OTR ニューロンが父性養育行動の調節に重要な役割を果たすこと、が明らかになりました (図 4)。本研究の cKO データは、父性行動移行を調節する際の AVP から OTR へのクロストークの重要性を強調しています。PVH AVP および OT ニューロンが父性獲得への移行中にいつ、どのように、どの程度活性化されるかについては今後さらなる研究が必要です。

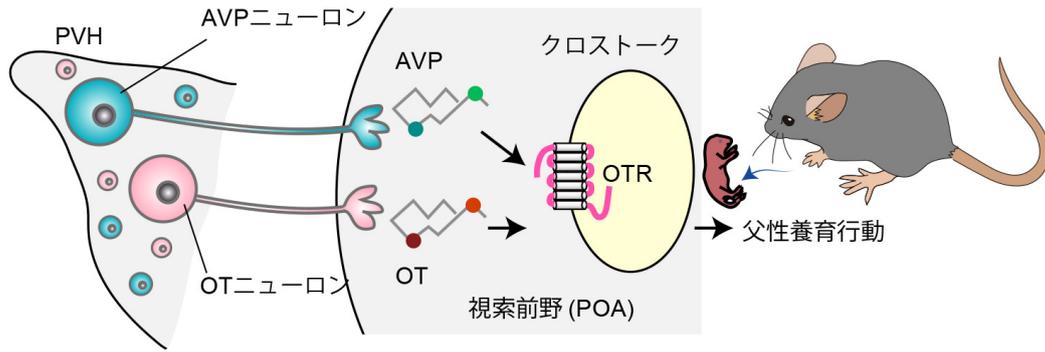


図 4. 本研究のまとめ

PVH の AVP、OT ニューロンはいずれも父性養育行動を促進するが、その下流には視索前野の OTR ニューロンが存在する。本研究は AVP から OTR への非正規のクロストークが父性養育行動を駆動することを明らかにした。

(完)

発表論文

- 1) Inada K, Hagihara M, Yaguchi K, Irie S, Inoue YU, Inoue T, Miyamichi K.
Vasopressin-to-Oxytocin Receptor Crosstalk in the Preoptic Area Underlying Parental Behaviors in Male Mice.
BioRxiv **601605**, 2024 doi: doi.org/10.1101/2024.07.01.601605
- 2) Yaguchi K, Miyamichi K, Tasaka GI.
Flexible adjustment of oxytocin neuron activity in mouse dams revealed by microendoscopy.
Sci Adv. **10**: eadt1555, 2024 doi: 10.1126/sciadv.adt1555
- 3) Harima Y, Tsurutani M, Yamada S, Uchida S, Inada K, Hagihara M, Irie S, Shigeta M, Abe T, Inoue YU, Inoue T, Miyamichi K.
Parallel labeled-line organization of sympathetic outflow for selective organ regulation in mice.
Nat Commun **15**: 10478, 2024 doi: 10.1038/s41467-024-54928-1.
- 4) Tsurutani M, Goto T, Hagihara M, Irie S, Miyamichi K.
Selective vulnerability of parvocellular oxytocin neurons in social dysfunction.
Nat Commun **15**: 8661, 2024 doi: 10.1038/s41467-024-53092-w.
- 5) Miyamichi K.
Neural basis for behavioral plasticity during the parental life-stage transition in mice.
Front Neural Circuits. **17**: 1340497, 2024 doi: 10.3389/fncir.2023.1340497.

引用文献

- 1) Dulac C, O'Connell LA, Wu Z.
Neural control of maternal and paternal behaviors
Science **345**, 765, 2014
- 2) He Z *et al.*
Paraventricular Nucleus Oxytocin Subsystems Promote Active Paternal Behaviors in Mandarin Voles.
J Neurosci **41**: 6699, 2021
- 3) Inada K, Hagihara M, Tsujimoto K, Abe T, Konno A, Hirai H, Kiyonari H, Miyamichi K.

Plasticity of neural connections underlying oxytocin-mediated parental behaviors of male mice.
Neuron **110**: 2009, 2022.

4) Inoue YU *et al.*

Targeting Neurons with Functional Oxytocin Receptors: A Novel Set of Simple Knock-In Mouse Lines for Oxytocin Receptor Visualization and Manipulation
eNeuro **9**: ENEURO.0423-21, 2022.