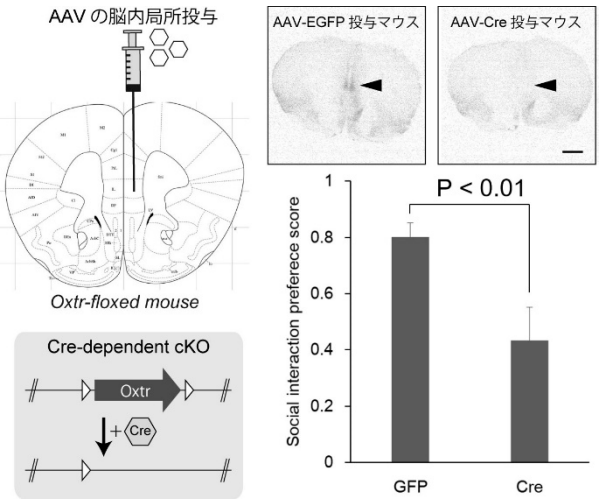
123　社会的孤立を防ぐ神経機構の解明	犬束　歩

【目的】近年、社会における競争的傾向が高まっている。その際、競争に敗北した人達が精神的健康をいかに保つかということは、個人にとっても社会全体にとっても重要な課題である。マウスやラットといった齧歯類においても、社会的敗北は社会的忌避行動や報酬への嗜好性減弱、不安様行動の亢進といった、うつ病に類似した現象をもたらす。しかし、その神経機構は良く分かっていない。社会的敗北ストレスによって誘導される社会的忌避行動には、前頭前皮質が関与する。また、前頭前皮質にはオキシトシン受容体が発現しており、社会的敗北ストレスによるオキシトシン産生ニューロンの活性化は不安解消を介して社会的忌避行動を緩和しているという仮説が立てられる。本研究では前頭前皮質のオキシトシン受容体発現ニューロンの投射経路選択的な活動操作・活動記録を達成し、社会的敗北ストレスによって引き起こされる社会的接触を求める意欲の変化における役割を明らかにすることを目的とした。
【方法】前頭前皮質のオキシトシン受容体を特異的にノックアウトするため、オキシトシン受容体（Oxtr）のトランスジェニックマウスに対するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの脳内局所投与を行った。具体的には、オキシトシン受容体が Cre 依存的に脱落する *Oxtr-floxed* マウスの前頭前皮質に、AAV-CMV-EGFP-2A-Cre あるいは対照群として AAV-CMV-EGFP を、脳定位固定装置を用いて局所投与した。AAV 投与の 4 週後から高架式十字迷路、社会的忌避行動試験、尾懸垂試験、強制水泳試験を行った。その後、10 日間の ICR マウスによる社会的敗北を与えてから、一連の行動実験を繰り返し行った。最後に、ウイルス投与したマウスの脳切片に対して ^{125}I で放射性標識した OVTA を用いたオートラジオグラフィーを行い、オキシトシン受容体の脳内における発現を確認した。
【結果】オートラジオグラフィーでは、前頭前皮質に対照群で見られるオキシトシン受容体の発現が、テスト群では大幅に欠損していることが確認された。対照群において、社会的敗北ストレスの前後で高架式十字迷路では open arm の滞在時間低下、尾懸垂試験、強制水泳試験では無動時間の増加が確認され、社会的忌避行動試験では他個体への社会的接触の時間が有意に低下していた。テスト群と対照群との間では社会的敗北を与える前の行動試験では有意差が見られるものはなかった。一方、社会的敗北ストレスを与えた後の行動試験では、高架式十字迷路、尾懸垂試験、強制水泳試験では有意差が無かったものの、社会的忌避行動試験では他個体への社会的接触がテスト群において優位に低かった。こうした実験結果は、前頭前皮質のオキシトシン受容体が社会的敗北ストレスによる社会的忌避行動を緩和するような働きを果たしていることを示唆している。

前頭前皮質オキシトシン受容体の欠失による社会的忌避行動への影響



123. 社会的孤立を防ぐ神経機構の解明

犬束　歩

自治医科大学 医学部 生理学講座 神経脳生理学部門

Key words：前頭前皮質，社会的敗北ストレス，オキシトシン受容体，核内移行の光操作

緒　言

孤独は肉体的・精神的な健康を損なう大きな社会問題である。特に競争志向が高まっている現代においては、競争に敗北した人達がいかにして精神的な健康を保ち、社会的なつながりを維持していくのかは重要な課題である。マウスやラットにおいても、繰り返される社会的敗北によってうつ病に類似した生理応答・行動変容が生じ、社会的忌避行動が生じる。しかし、その神経機構は良く分かっていない。我々は、ストレス状況下にあっても社会的接触を求める神経機構について明らかにすることを目的とした。

従来の研究から、社会的敗北ストレスによって誘導される社会的忌避行動には、前頭前皮質の関与が報告されてきた。前頭前皮質はオキシトシン神経の主要な投射先の一つであり、我々は社会的敗北ストレスによってオキシトシン神経が強く活性化されることを見出している［1]。前頭前皮質にはオキシトシン受容体が豊富に発現しており、社会的敗北ストレスによるオキシトシン神経の活性化は不安解消を介して社会的忌避行動を緩和しているという仮説が立てられる。本研究では、前頭前皮質におけるオキシトシン受容体の選択的なノックアウトを行い、社会的忌避行動への影響を解析した。前頭前皮質におけるオキシトシン受容体を欠損させたマウスでは、社会的敗北後におこる社会的忌避行動が対照群よりも強かった。こうした結果はオキシトシン受容体の活性化が社会的敗北ストレスによる社会的忌避行動を緩和しているという仮説を支持している。なお、財団による支援期間内においては、青色光によって駆動される LOV ドメインの構造変化を核内移行シグナルの露出と関連付ける機能モジュール（LINuS）を利用した分子ツールの開発が論文発表に至った［2]。このツールは神経突起形成を制御する ERK シグナルの脳内における光操作に応用できる可能性がある。

方　法

1.　行動実験ウイルスベクターの局所投与

Oxtr-floxed マウス（オス、10 週齢）の前頭前皮質に AAV ベクターを局所投与した。AAV ベクターは既報の手法に基づいて作製し［3]、1 匹当たり 5×10^{8} vg のウイルス量を導入した。投与部位は Stereotaxic を用いてブレグマから前後方向に＋1.8 mm、左右方向に±0.3 mm、深さ 2.3 mm の位置とした。テスト群としては AAV-CMV-EGFP-2A-Cre、対照群としては AAV-CMV-EGFP を投与し、回復と導入遺伝子の発現のため行動実験までの間に 4 週間待った。解析に使用したマウスは各群 9 匹である。

2. 社会的敗北ストレス

AAV ベクターを投与したマウスを攻撃性の高いオス ICR マウスのホームケージに入れることで、社会的敗北ストレスを与えた。テストマウスへの攻撃暴露は 1 回 10 分間、10 日間連続で行った。攻撃に偏りが生じないように毎日 ICR マウスを変えて実験を行った。攻撃を受けたマウスが後ろ足で立ち上がり、前足を ICR マウスに突き出すような敗北姿勢を見せることを確認した。

3. 行動実験

高架式十字迷路、社会的忌避行動テスト、自由行動下における二個体近接記録、尾懸垂試験、強制水泳試験からなる一連の行動実験群を、社会的敗北ストレスを与える前と後に行った。

4. オートラジオグラフィー

脳内におけるオキシトシン受容体の分布を見るため、放射性同位体を用いたオートラジオグラフィーを行った。行動試験をテスト群および対照群のマウスから速やかに脳を摘出し、ドライアイス上で凍結した。クライオスタットを用いて凍結した脳を厚さ 20 μm で切片を作製し、スライドガラス上に貼り付けた。サンプルを室温に戻し、0.1%パラホルムアルデヒドで 2 分間固定した。固定したサンプルは 50 mM の Tris buffer（$-MgCl_2$）を用いて 10 分間で 2 回洗浄したのち、50 pM の ^{125}I で標識された OVTA で 1 時間結合させた。その後、4℃の条件下で 50 mM Tris buffer（$+MgCl_2$）を用いて 5 分間、4 回洗浄した。次に、室温で 50 mM Tris buffer（$+MgCl_2$）を用いて 30 分間、洗浄したのち、Milli-Q 水に漬けた。スライドをドラフトで乾かしてからカセットに入れ、暗室で感光フィルムをセットした。感光開始 6 日後、フィルムを現像して画像を観察した。

結果および考察

1. 前頭前皮質におけるオキシトシン受容体のコンディショナルノックアウト

オキシトシン受容体は脳内の多くの領域に発現しており、前頭前皮質はその一つである。オートラジオグラフィーでは、対照群マウスの脳切片において前頭前皮質の深い領域にオキシトシン受容体の分布が確認された。このシグナルは Cre を発現する AAV ベクターを投与したマウスでは大幅に低下していた（図 1）。こうした結果は、AAV ベクターを利用した組換え酵素の発現により、前頭前皮質におけるオキシトシン受容体を選択的にノックアウトできたことを示している。

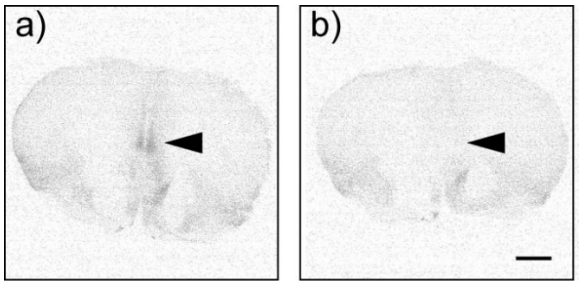


図 1. AAV ベクターによる前頭前皮質におけるオキシトシン受容体のコンディショナルノックアウト

a）対照群である AAV-CMV-EGFP 投与マウスの脳切片画像。

b）テスト群である AAV-CMV-EGFP-2A-Cre 投与マウスの脳切片画像。

対照群の脳切片では、前頭前皮質の深い領域に矢頭で示されるオキシトシン受容体の分布が確認されるが、テスト群の脳切片ではそのシグナルが大きく減少している。スケールバーは 1 mm。

2. 行動実験の結果

高架式十字迷路試験では、社会的敗北ストレスを与える前後でテスト群、対照群どちらの群においても open arm の滞在時間が低下していた。一方で、テスト群と対照群との比較においては社会的敗北ストレスの前後どちらにおいても有意な差は検出されなかった。

尾懸垂試験では、社会的敗北ストレスを与える前後でテスト群、対照群どちらの群においても尾懸垂時の無動時間が増加していた。一方で、テスト群と対照群との比較においては社会的敗北ストレスの前後どちらにおいても無動時間の有意な差は検出されなかった。

強制水泳試験では、社会的敗北ストレスを与える前後でテスト群、対照群どちらの群においても強制水泳時の無動時間が増加していた。一方で、テスト群と対照群との比較においては社会的敗北ストレスの前後どちらにおいても有意な差は検出されなかった。

自由行動下における二個体近接記録では、社会的敗北ストレスを与える前後でテスト群、対照群どちらの群においても二個体間の近接時間のグラフに大きな変化は見られなかった。テスト群と対照群との比較においても社会的敗北ストレスの前後どちらにおいても二個体間の近接時間のグラフに大きな変化は見られなかった。

社会的忌避行動試験では、社会的敗北ストレスを与える前後でテスト群、対照群どちらの群においても提示マウスに対する指向性が減少していた。さらに、テスト群と対照群との比較においては社会的敗北ストレスの後ではテスト群の方が対照群よりも提示マウスに対する指向性が有意に低かった（図 2）。

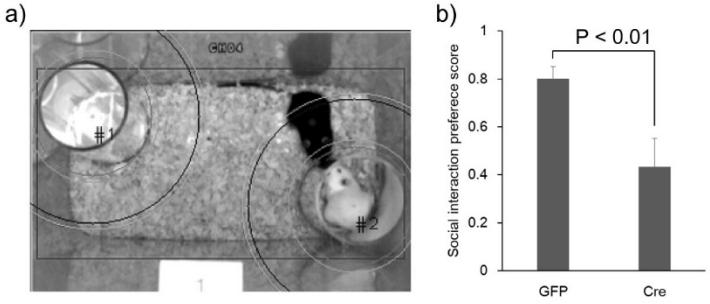


図 2. 前頭前皮質におけるオキシトシン受容体の cKO による社会的忌避行動への影響

a）社会的忌避行動試験における提示マウスに対するテストマウスの探索行動。

b）社会的敗北ストレスを与えた後のテスト群と対照群との提示マウスに対する指向性の比較。

テスト群では対照群に対して、提示マウスに対する指向性が有意に低かった（Student's t-test）。

こうした結果はオキシトシン受容体の活性化が社会的敗北ストレスによる社会的忌避行動を緩和しているという仮説を支持するものといえる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、自治医科大学大学院医学部の尾仲達史教授およびその教室員の方々である。この場を借りて感謝の意を伝えたい。

文　献

1） Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, Inutsuka A, Nishimori K, Yamanaka A, Onaka T. Oxytocin-Oxytocin Receptor Systems Facilitate Social Defeat Posture in Male Mice. Endocrinology. 2018 Feb 1;159(2):763-775. PMID: 29186377 doi: 10.1210/en.2017-00606

2） Inutsuka A, Kimizuka N, Takanohashi N, Yakabu H, Onaka T. Visualization of a blue light transmission area in living animals using light-induced nuclear translocation of fluorescent proteins. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Jan 29;522(1):138-143. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31757418 doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.023

3） Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, Yamanaka A. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. Sci Rep. 2016 Jul 7;6:29480. PMID: 27385517 doi: 10.1038/srep29480.