

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	東 邦 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	新規性差マーカーを用いた性差ニューロンの機能解剖学的研究		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①視床下部 ②ニューロン ③性的二型 ④本能行動 ⑤光遺伝学 ⑥単一シナプスラベル ⑦薬理遺伝学		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
船 戸 弘 正	東 邦 大 学 医 学 部	教 授	研究統括とデータ解析

○研究分担者

[illegible]

新規性差マーカーを用いた性差ニューロンの機能解剖学的研究

1. 研究の目的

人口の高齢化や社会の高度情報化を背景に、アルツハイマー病に代表される神経変性疾患患者や、うつ病に代表される精神科疾患患者が激増している。これらの発症には明瞭な性差がある。脳の構造や機能には明瞭な性差があり、このことが生理的機能や疾患発症リスクをもたらしている。この脳の構造的機能的性差がどのように形成され、どのように生理的な性差を生み出しているのかを明らかにすることは、生物学的にも医学的にも重要な課題である。

古典的な染色方法によってサイズやニューロン数に雌雄差のある脳部位が、視床下部や扁桃体に見出されてきた。雌雄差のあるニューロンがどのような役割を果たしているかを明らかにするためには、そのニューロン集団のみを薬理遺伝学的手法によって人為的に活性化したり、細胞内カルシウムセンサーによってニューロン活動を可視化したり、順行性もしくは逆行性とレーザー蛍光蛋白質によって軸索の投射先や投射元を同定することが必要になる。これらの手法はすべ標的ニューロンのみに発現するマーカー遺伝子の利用が前提になっている。そのマーカー遺伝子座に DNA 組み換え酵素 Cre を挿入することによって、標的遺伝子のみに DNA 組み換え酵素 Cre を発現させることが可能となる。この Cre 依存的なシステムが使えるかどうか、研究の進展がかかっている。

これまで、脳の構造的な性差は精細な観察によって報告されていたものの、その機能的な意義については明らかにされてこなかった。その理由は性差ニューロン特異的なマーカーが存在しなかったためである。我々は、明瞭な性差を示す視床下部視索前野、分界条床核、腹内側扁桃核のニューロン特異的に発現する Moxd1 を見出した。すでに Moxd1 特異的に DNA 組み換え酵素 Cre を発現する Moxd1-Cre マウスを作成し、期待通りに性差ニューロン特異的な DNA 組み換えができることを確認済みである。

目標は、我々が独自に見出し作成した性差ニューロン特異的 Cre マウスを用いた機能解剖学な検討により、脳の構造的性差が機能的な性差や性行動等の性特異的行動を制御しているのかを解明することである。

2. 研究の計画

性差ニューロンの光遺伝学的操作による行動変容観察視床下部腹内側核、分界条床核、腹内側扁桃核に存在する性差ニューロン (Moxd1発現ニューロン) の機能的役割を明らかにするために、アデノ随伴ウイルスをMoxd1-Creマウスの視床下部腹内側核、分界条床核または腹内側扁桃核に局所投与する。アデノ随伴ウイルスには、DIO-ChR2 (光刺激による脱分極) もしくはDIO-ArchT (光刺激による活動抑制) が組み込まれているため、Moxd1発現ニューロンのみがチャネルロドプシン (ChR2) もしくはArchTを発現する。光ファイバーと高輝度LED (Cree社) を用いた光刺激により、ChR2を発現させた場合は神経活動が促進し、ArchTを発現させた場合は神経活動が抑制される。観察する行動は、性行動、養育行動、攻撃行動、営巣行動である。光刺激による急性の行動変容効果を検討するとともに、光刺激を1時間断続的に実施する亜急性刺激を行うことで、行動モチベーションの加算的效果を検討する。睡眠覚醒行動は脳波筋電図に基づいて判定する。

光遺伝学的操作は高い時間分解能で秒単位から分単位の行動変容を検討できるが、多くの行動は数時間の経過で変化する。また、睡眠覚醒のように恒常性を持って制御されている行動も時間単位、もしくはそれ以上の観察が必要になる。性差ニューロン (Moxd1発現ニューロン) を薬理遺伝学的に操作することにより、時間単位で活性化もしくは抑制した際の行動変容を検討する。アデノ随伴ウイルスをMoxd1-Creマウスの視床下部腹内側核、分界条床核または腹内側扁桃核に局所投与する。

アデノ随伴ウイルスには、DIO-hM3Dq (CNOまたはDCZの腹腔内投与により活性化する) もしくはDIO-hM4Di (CNOまたはDCZの腹腔内投与により活動抑制) が組み込まれている。観察する行動は、性行動、養育行動、攻撃行動、営巣行動である。

性差ニューロンの薬理遺伝学的操作による行動変容観察 研究計画 1 の光遺伝学的操

作は高い時間分解能で秒単位から分単位の行動変容を検討できるが、多くの行動は数時間の経過で変化する。また、睡眠覚醒のように恒常性を持って制御されている行動も時間単位、もしくはそれ以上の観察が必要になる。性差ニューロン（Moxd1発現ニューロン）を薬理遺伝学的に操作することにより、時間単位で活性化もしくは抑制した際の行動変容を検討する。アデノ随伴ウイルスをMoxd1-Creマウスの視床下部腹内側核、分界条床核または腹内側扁桃核に局所投与する。アデノ随伴ウイルスには、DIO-hM3Dq (CNOまたはDCZの腹腔内投与により活性化する) もしくはDIO-hM4Di (CNOまたはDCZの腹腔内投与により活動抑制) が組み込まれている。観察する行動は、社会行動、性行動、養育行動、攻撃行動、営巣行動である。

性差ニューロン操作による変化が確認された行動に、生理的な条件で性差ニューロンが関与しているかを検討する。Moxd1-Creマウス脳へのアデノ随伴ウイルス局所投与により細胞内カルシウムセンサーGCaMP6をMoxd1発現ニューロンに発現させる。ファイバーフォトメトリや超小型蛍光内視鏡をマウス脳に埋め込みMoxd1発現ニューロンの活動を可視化する。薬理遺伝学に基づく予備的検討から、性行動、攻撃行動、営巣行動および摂食行動時のニューロン活動の変動を検討する計画である。

3. 研究の成果

(1) 性差ニューロンの薬理遺伝学的操作による行動変容観察

内側視索前野のMoxd1陽性細胞の薬理学的な神経活動亢進を行ったところ、オスマウスの性行動が強く抑制された。オスマウスはメスマウスに対して近づき、匂いを嗅ぐ行動の頻度は変化が無かったものの、その後に引き続くマウント行動や挿入行動がほとんど見られなくなった。また、オスマウスからメスマウスへの求愛発声については変化が無かった。一方、オスマウスからオスマウスへの攻撃行動については匂い嗅ぎ行動の回数と潜時、攻撃行動の回数と潜時、およびそれらのトータル時間について差が見られなかった。

同様に、内側視索前野のPenk陽性細胞の薬理学的な神経活動亢進を行った結果、オスマウスの性行動が促進した。Moxd1の操作の結果と同様に、オスマウスがメスマウスの匂いを嗅ぐ行動の頻度に差は見られず、求愛発声についても変化はなかった。一方で、オスマウスのマウント潜時と回数、挿入行動の潜時と回数、マウント行動から挿入行動までの潜時の全てにおいて性行動の亢進が見られた。オスマウスからオスマウスへの攻撃行動については変化が無かった。一方、Penk陽性細胞の薬理学的な神経活動抑制を行った結果、概ね神経活動亢進実験と逆の結果となり、オスマウスの性行動が抑制された。ただし、オスマウスがメスマウスの匂いを嗅いだ回数、オスマウスによる求愛発声の回数には変化が無かった。一方でオスマウスのマウント回数や挿入行動の回数は大きく減少し、行動の潜時は延長された。また、オスマウスからオスマウスへの攻撃行動に変化は見られなかった。

(2) 性差ニューロンの光遺伝学的操作による行動変容観察

①内側視索前野における性差ニューロンの光遺伝学的操作

内側視索前野のPenk陽性ニューロンの光遺伝学的な活動亢進を行ったところ、光刺激に即時的に応答した行動変容は見られなかった。ただし、光刺激を行った場合にはマウント行動の開始から挿入行動の開始までの時間の短縮が顕著に見られた。特に実験開始前にあらかじめ光刺激を行っておいた場合にはマウント行動の潜時と挿入行動の潜時が短縮し、それらの行動の回数が増加した。

②性差ニューロンの軸索末端の光遺伝学的操作

内側視索前野のPenkニューロンの投射先の一つである腹側被蓋野の軸索末端の光遺伝学的刺激を行ったところ、マウント行動の潜時が短縮し行動の回数が増加した。挿入行動に関しては増加傾向にあったものの、差はなかった。また、内側視索前野の刺激で観察されたマウント行動の開始から挿入行動の開始までの時間の短縮は見られなかった。一方、Penkニューロンのもう一つの投射先である中脳水道灰白質の軸索末端の光遺伝学的刺激を行った場合には、マウント行動の潜時と挿入行動の潜時が短縮し、それらの行動の回数が増加するとともに、マウント行動の開始から挿入行動の開始までの時間の短縮が見られた。

4. 研究の反省・考察

概ね計画通りに研究を遂行することで、性差のある *Moxd1* 陽性細胞等の内側視索前野に存在する多様なニューロン群の本能行動、特に攻撃行動や性行動における役割の解明を推進することができた。今回得られた知見をもとにさらに検討を進めていきたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Shinya Nakata, Tomoyuki Fujiyama, Fuyuki Asano, Haruna Komiya, Noriko Hotta-Hirashima, Motoki Juichi, Daiki Komine, Miyo Kakizaki, Aya Ikkyu, Seiya Mizuno, Satoru Takahashi, Chika Miyoshi, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa. Partial activation of SIK3 delays the onset of wakefulness and alleviates hypersomnia due to the lack of protein kinase A-phosphorylation site. *SLEEP* 48(2) zsa279, 1-14, 2025
- ② Deependra Kumar, Masashi Yanagisawa, Hiromasa Funato. Sleep-dependent memory consolidation in young and aged brains. *Aging Brain* 6:100124, 2024
- ③ Natsuki Tagawa, Keita Mori, Michinori Koebis, Atsu Aiba, Yuichi Iino, Yousuke Tsuneoka, Hiromasa Funato. Activation of lateral preoptic neurons is associated with nest-building in male mice. *Scientific Reports* 14, 8346, 2024
- ④ Shinya Nakata, Kanako Iwasaki, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Haruka Ozaki. Neuronal subtype-specific transcriptomic changes in the cerebral neocortex associated with sleep pressure. *Neuroscience Research* 207:13-25, 2024
- ⑤ Ayaka Nakai, Mitsuaki Kashiwagi, Tomoyuki Fujiyama, Kanako Iwasaki, Arisa Hirano, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Takeshi Sakurai, Yu Hayashi. Crucial role of TFAP2B in the nervous system for regulating NREM sleep. *Mol Brain* 17(1):13, 2024
- ⑥ Yousuke Tsuneoka, Hiromasa Funato. Whole brain mapping of orexin receptor mRNA expression visualized by branched in situ hybridization chain reaction. *eNeuro* ENEURO.0474-23.2024

(2) 口頭発表

- ① 吉田 さちね, 船戸 弘正 Alterations in activity levels induced by somatosensory stimulation in mouse pups. APPW 2025 解剖生理薬理合同 幕張メッセ Mar 19, 2025
- ② Hiromasa Funato. Different SIK3 isoforms regulate sleep. Cold Spring Harbor Asia Suzhou, China, September 11, 2024
- ③ Hiromasa Funato. Hypothalamic neurons regulate sleep, metabolism and innate behaviors. Sleep minisymposium at the National Institute of the Biological Science, Beijing September, 6, 2024
- ④ 恒岡 洋右 高感度マルチプレックス蛍光 in situ hybridization によって明らかになったマウス性行動の神経メカニズム. 第 47 回分子生物学会, 福岡, Nov 28, 2024

(3) 出版物

なし