

雄マウスが示す社会的不安行動を制御する神経内分泌基盤を解明

大脳辺縁系の外側中隔に発現するエストロゲン受容体 β が、社会的場面で雄マウスが示す不安様行動の抑制に重要な役割を果たしていることが分かりました。また、エストロゲン受容体 β の分布や発現領域が、エストロゲン受容体 α サブタイプとは異なることも新たに発見しました。

性ステロイドホルモンのエストラジオール (E2) は、未知の他個体に出会った際の不安 (社会的不安) の亢進をはじめとするさまざまな社会行動に重要な役割を果たしています。雄においても、精巣から分泌されるテストステロンが脳内で E2 に転化され、2 種類のエストロゲン受容体 (ER)、ER α と ER β に結合することで社会行動を制御しています。しかし、その神経内分泌基盤はほとんど解明されていませんでした。本研究は、社会的不安の制御に関与する外側中隔 (LS) に着目し、雄マウスを用いて、この領域に発現する ER α と ER β の役割を検討しました。

まず、ER β 発現細胞を赤色蛍光タンパクで標識した遺伝子組み換え雄マウスを用いて、LS における ER α と ER β の発現の様相を検討したところ、両者の分布は大きく異なり、それぞれ独立した細胞集団を形成していることが分かりました。そこで、雄マウスの LS において、ER α もしくは ER β の発現を阻害し、社会的不安および非社会的場面での不安への影響を調べました。その結果、ER β の発現阻害によって、社会的不安のみが亢進することが明らかになりました。また、LS の ER α および ER β 陽性細胞は、それぞれ、視床下部の異なる領域に神経投射していることを見いだしました。以上より、雄マウスの LS において、ER α 発現細胞と ER β 発現細胞とは局在や投射先が異なる別々の細胞集団を形成しており、中でも ER β 集団は、社会的場面での不安様行動を制御する神経回路において重要な役割を果たしていると結論付けられました。

研究代表者

筑波大学人間系

小川 園子 特命教授

蓮沼 寛介 (人間総合科学学術院ニューロサイエンス学位プログラム 博士後期課程3年)

研究の背景

主に卵巣から分泌される性ステロイドホルモンであるエストラジオール (E2) は、未知の他個体に出会った際の不安 (社会的不安) をはじめとする、さまざまな社会行動の表出調節に重要な役割を果たしています。雄においても、精巣から分泌されるテストステロンが脳内へ運ばれ、芳香化酵素の働きによって一部が E2 へと変換された後、エストロゲン受容体 α (ER α) と β (ER β) への結合を介して社会行動の制御に寄与しています。本研究グループでは、これまで複数の脳領域で、ER α と ER β がそれぞれ、性行動、攻撃行動、性的選好性などの社会行動の制御・調節に果たす役割を同定してきました (eNeuro, 2016; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2016, 2023)。しかしながら、ER α と ER β を介して社会的不安を制御する神経内分泌基盤については、ほとんど解明されていませんでした。

大脳辺縁系の外側中隔 (LS) は、視床下部の諸領域への神経投射を介して、社会的不安などの社会行動を制御する脳領域です。本研究では LS に着目し、雄マウスにおいて、この領域に発現する ER α と ER β が社会的不安の調節に果たす役割を検討しました。

研究内容と成果

まず、ER β を発現する ER β 陽性細胞を赤色蛍光タンパクで標識した遺伝子組み換えマウス (ER β -RFPtg) の雄を用いて、LS における ER α と ER β の発現の様相を二重蛍光免疫組織化学法^{注1)}によって検討しました。その結果、全体として、ER α と比べて ER β 陽性細胞数が約 2.5 倍ほど多く見られたことに加え、両受容体が共発現する細胞はほとんど観察されませんでした (ER 発現細胞全体の 1.2%)。すなわち、LS においては ER β が多く存在し、ER β 陽性細胞群は ER α 陽性細胞群とは異なる独立した細胞集団を形成していることが明らかになりました (図 1)。

次に、LS の ER α と ER β が社会的不安の表出に果たす役割を明らかにするために、雄マウスの LS にアデノ随伴ウイルスベクター^{注2)}を導入し、RNA 干渉法^{注3)}による ER α もしくは ER β の発現阻害を行いました。その上で、社会的探索テスト^{注4)}により社会的場面での不安様行動を、明暗箱往来テスト^{注5)}およびオープンフィールドテスト^{注6)}で非社会的場面での不安様行動を測定し、ER α と ER β の欠損が行動表出へ及ぼす影響を調べました。その結果、ER α の発現阻害による行動表出への影響は確認されませんでした。一方で、ER β の発現阻害では、社会的探索テストで測定された社会的不安のみが亢進していることが分かりました (図 2)。このことから、雄マウスの LS において、ER α と ER β が不安様行動の制御に果たす役割は異なっており、特に ER β は社会的不安の抑制に寄与していると考えられます。

さらに、異なる分布や役割を持つ LS の ER α と ER β が、どのような脳領域に神経投射しているのかを明らかにするために、ER α または ER β 陽性細胞を選択的に標的とすることができる遺伝子組み換えマウス ER α -Cre および ER β -iCre (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2023) を使用し、順向性のトレーサーウイルス^{注7)}を LS に局所投与して神経解剖学的な探索を行いました。その結果、LS の ER α 陽性細胞と ER β 陽性細胞では視床下部の諸領域への投射が異なり、特に ER β 陽性細胞は ER α 陽性細胞と比較して、不安様行動の制御に関与する視床下部前野へ非常に強い投射を送っていることが示されました (図 3)。

以上の結果から、雄マウスの LS において、ER α 陽性細胞と ER β 陽性細胞とは異なる解剖学的特徴を有する細胞集団を形成しており、特に ER β 集団は社会的場面での不安様行動を制御する神経回路において重要な役割を果たしていると結論付けられました。

今後の展開

本研究は LS に局在する ER β を介したエストロゲンの作用に着目し、社会的不安がどのように制御されるかを解明しました。次のステップとして、社会的不安の制御に関わる神経回路全体の中での、LS の ER β 陽性細胞の位置付けを解明していきます。これにより、社会的不安を制御する神経基盤の包括的な理解が進むと期待されます。

参考図

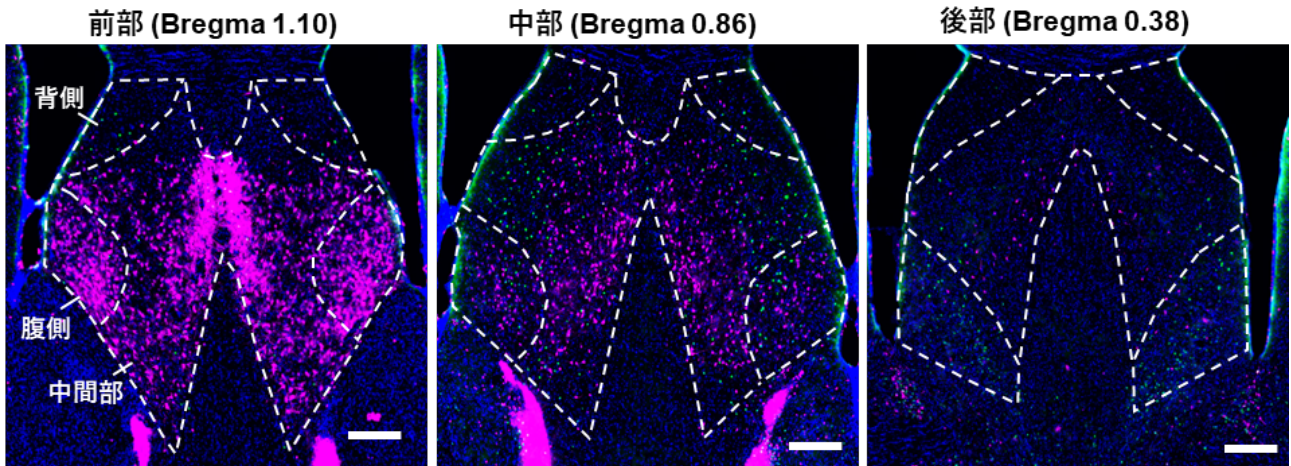
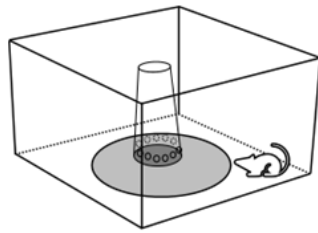


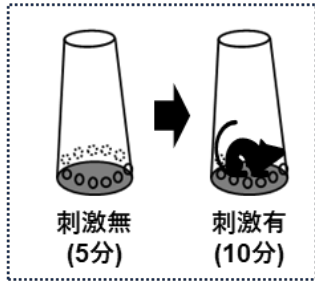
図1 外側中隔における ER α 陽性細胞と ER β 陽性細胞の局在

ER α 陽性細胞 (グリーン) と ER β 陽性細胞 (マゼンタ) を二重蛍光免疫組織化学法によって可視化した、前部 (左)、中部 (中央)、後部 (右) の切片画像。前部から中部にかけて ER β 陽性細胞が極めて多い一方で、ER α 陽性細胞は主に中部から後部で観察された。また、同一切片上での分布にも大きな違いがあるばかりでなく、同じ領域に発現が見られる場合にも、同一の細胞での ER α と ER β との共発現はほとんど見られなかった。スケールバー：200 μ m。

社会的探索テスト



ケージの中心に、空の筒と刺激マウス(雄)入りの筒を続けて提示



筒へのおい嗅ぎ行動

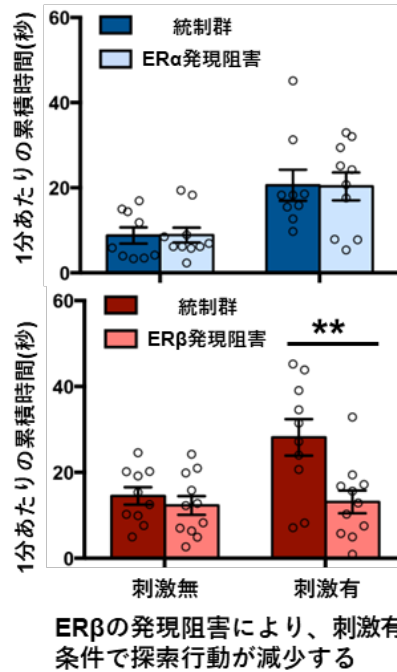
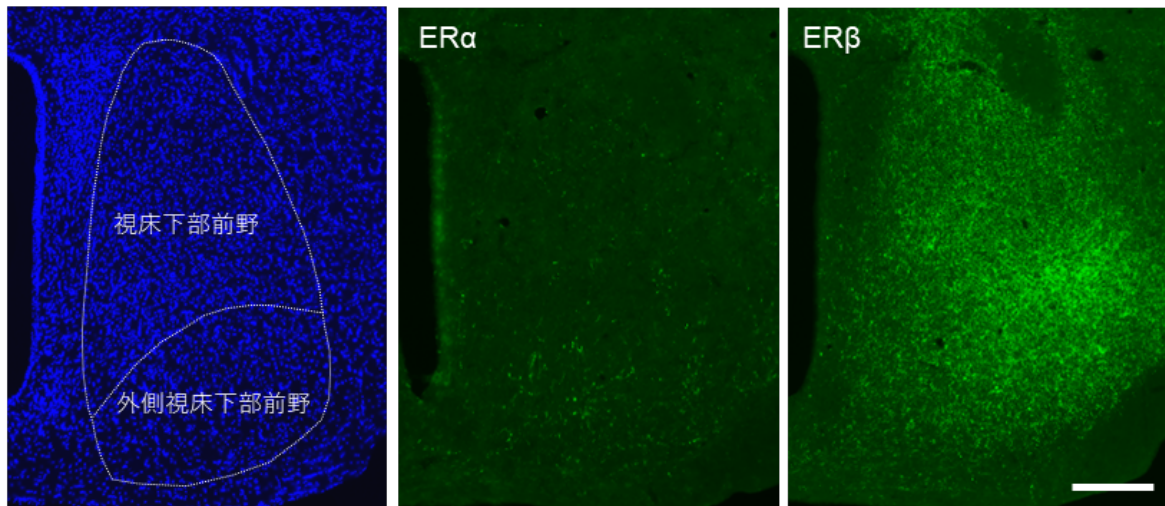


図2 エストロゲン受容体の発現阻害が社会的不安に及ぼす影響

社会的探索テスト (左) により、未知のマウスという刺激の無し・有りのそれぞれの条件で筒に対する探索量を測定し、ER α あるいはER β の発現阻害が社会的不安の表出に及ぼす影響を検討した。ER α 発現阻害では行動に変化はみられなかった (右上) のとは対照的に、ER β の発現阻害では刺激有条件下において嗅ぎ行動が大きく減少したことから、LSのER β が社会的不安を調節していると考えられる (右下)。

LSのER α ・ER β 陽性細胞の神経投射を、緑色蛍光タンパクで標識されたトレーサーウイルスを用いて測定



ER β 陽性細胞においてのみ、視床下部前野・外側視床下部前野への強い投射が確認された

図3 外側中隔のエストロゲン受容体陽性細胞の神経投射

緑色蛍光タンパクで標識されたトレーサーウイルスを用いて、LSのER α 陽性細胞とER β 陽性細胞の神経投射脳領域を同定した。視床下部前野と外側視床下部前野 (左) において、ER α 陽性細胞の場合 (中央) とは対照的に、ER β 陽性細胞の神経投射末端が非常に多く観察された (右)。スケールバー: 200 μ m。

用語解説

注1) 二重蛍光免疫組織化学法

2種類の異なるタンパク質を同一の組織切片上で標識する方法。それぞれのタンパク質に結合する特有の一次抗体と反応させたのち、波長の異なる蛍光タンパク質を結合させた二次抗体に反応させることにより、2種のタンパク質それぞれを発現する細胞を同定することができる。

注2) アデノ随伴ウイルスベクター

感染細胞内において増殖し、導入遺伝子の継続的な産生を促す非病原性ウイルス由来の安全性の高いウイルスベクター。

注3) RNA 干渉法

ターゲットとなる mRNA に相補的な塩基配列を持つ 1 本鎖 RNA とその逆鎖となる RNA を、ウイルスベクターとして導入して mRNA の不安定化を引き起こし、任意の遺伝子発現を抑制する方法。

注4) 社会的探索テスト

本研究では、匂いを探索できるように、下部に多数の小さな穴を開けた円形の筒を用い、空の状態で5分間、雄の刺激個体を入れた状態で10分間、ケージ中央に配置した。被験体マウスにケージ内を自由に探索させ、筒への匂い嗅ぎ行動の時間から社会的不安を測定した。

注5) 明暗箱往来テスト

マウスは不安が高いほど、明るい箱での滞在時間が減少することが知られている。そのため、明るい箱と暗い箱が通路でつながっている装置を使用し、明るい箱における滞在時間から、非社会的場面での不安を測定した。

注6) オープンフィールドテスト

マウスは不安が高いほど、開けた空間の中央領域での滞在時間が減少することが知られていることから、広い正方形の装置において、装置中央での滞在時間を指標として、非社会的場面での不安を測定した。

注7) トレーサーウイルス

蛍光タンパク質 (GFP) を発現することで、特定の神経細胞の神経投射先、投射元を解剖学的に特定可能にするウイルスの総称。本研究では、神経終末端に局在するシナプシンと呼ばれるタンパク質に GFP を融合したタンパク質を、アデノ随伴ウイルスを用いて LS の ER α もしくは ER β 陽性細胞に導入し、GFP シグナルを検索することにより投射先を同定した。

研究資金

本研究は、科研費による研究プロジェクト (15H05724, 21K18547, 22H02941) の一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Estrogen Receptor β in the Lateral Septum Mediates Estrogen Regulation of Social Anxiety-like Behavior in Male Mice.

(外側中隔のエストロゲン受容体 β が雄マウスの社会的不安行動のエストロゲンによる調節を制御する)

【著者名】 K. Hasunuma, T. Murakawa, S. Takenawa, K. Mitsui, T. Hatsukano, K. Sano, M. Nakata, S. Ogawa

Laboratory of Behavioral Neuroendocrinology, University of Tsukuba, Tsukuba, 305-8577, Japan

【掲載誌】 *Neuroscience*, 537: 126-140.

【掲載日】 2023年11月30日

【DOI】 10.1016/j.neuroscience.2023.11.019

問合わせ先

【研究に関すること】

小川 園子（おがわ そのこ）

筑波大学人間系 特命教授

URL: <https://trios.tsukuba.ac.jp/ja/researcher/0000001581>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp