

発情期を過ぎた雌マウスで性的受容行動が減少する神経基盤を解明

発情周期の各ステージでのホルモン状態に応じて雌マウスが示す行動を制御するメカニズムのうち、発情期の終わりから非発情期への移行期での行動の変化を支える神経機構について調べました。その結果、発情期の終わりに雌マウスの性的受容行動の減少を促す神経回路を発見しました。

マウスなど雌が明確な発情周期を持つ社会性動物では、雄が雌の発情状態を識別した上で雄特有の性行動を示すだけでなく、雌も雄からの性的アプローチに対して、受容あるいは拒絶という雌特有の性行動を示すことによって、効率的な繁殖を実現しています。雌マウスは妊娠可能な発情期にのみ、雄の性的アプローチを受け入れる行動を示します。しかしながら、発情期を過ぎた雌がこのような受容行動を示さなくなる過程については、未だ十分に理解されていません。

本研究では、この過程が単に発情を支えるホルモンの分泌レベルだけで決まるのではなく、脳内に性的受容行動の減少を促す神経機構も存在すると考え、その候補として、中脳の背側縫線核に広く分布するエストロゲン受容体ベータ陽性細胞（DRN-ERβ⁺細胞）に着目しました。

雌マウスのDRN-ERβ⁺細胞の神経活動を薬理遺伝学的手法により抑制したところ、発情期を過ぎても、性的受容行動の減少が全く見られず、発情期と同様に高い受容性を示すようになりました。また、発情期を過ぎて性的受容行動の発現頻度が減少した雌マウスのDRN-ERβ⁺細胞の神経活動を調べると、雄の性的アプローチに対して、発情期よりも強く反応していることが分かりました。さらにDRN-ERβ⁺細胞は、性的受容行動の制御に関与する脳内のいくつかの領域に神経投射し、その神経活動を変化させていることも確かめられました。以上より、発情期の終わりに受容行動を抑制する神経機構の一つとして、DRN-ERβ⁺細胞を起点とする神経回路が働いていると結論付けました。

研究代表者

筑波大学人間系

小川 園子 特命教授

村川 友哲（人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻 博士後期課程3年）

研究の背景

マウスをはじめとして雌が明確な発情周期（マウスでは性周期とよぶ）を持つ社会性動物では、雄が雌の発情状態を識別した上で雄特有の性行動を示すだけではなく、雌の側でも雄からの性的アプローチに対して、受容あるいは拒絶という雌特有の性行動を示すことによって、効率的な繁殖を実現しています。雌マウスは妊娠可能な発情期にのみ雄の性的アプローチを受け入れる行動（ロードーシス）を示し、発情期を過ぎるとこのような行動を示さなくなります。発情期の雌のロードーシスの発現を支える分子神経基盤については、その大部分がすでに解明されていますが、発情期を過ぎた雌がロードーシスを示さなくなる過程については、未だ十分に理解されていません。そこで今回、この過程が単に発情を支えるホルモンの分泌レベルの減少だけで決まるのではない、との考えに基づき研究を進めました。

本研究グループでは、これまでに、2種類のエストロゲン受容体アルファ（ER α ）とベータ（ER β ）のうち、ER β が欠損した雌マウスでは、発情期が過ぎても高い頻度でロードーシスを示すようになることを報告しており（Ogawa et al., 1999）、さらに、ER β が多数分布する中脳の背側縫線核（DRN）に着目しこの脳部位でのみ ER β を欠損させたところ、やはり発情期を過ぎた雌にロードーシスが高頻度で見られることを見出しています（Sano et al., 2018）。しかし、このような行動現象の基盤となる神経機構については未解明のままでした。

研究内容と成果

本研究では、中脳の背側縫線核に分布する ER β 陽性（DRN-ER β^+ ）ニューロンに着目し、ER β^+ 細胞のみを選択的に操作できるようにした遺伝子組み換えマウス（ER β -iCre マウス；Takenawa et al., 2023）を用い、DRN-ER β^+ 細胞の神経活動を薬理遺伝学的手法^{注1}により、抑制もしくは過度に興奮させることにより雌の行動にどのような変化が見られるのかを、性行動テスト^{注2}を実施して検討しました。内因性のホルモン変動による性周期の発現を抑えるためにあらかじめ卵巣を除去したのち、性ホルモンの投与により人工的に発情状態となった雌マウスが、雄からのアプローチに対して示すロードーシスの生起頻度を、発情日とその翌日とで比較しました。その結果、発情日に DRN-ER β^+ ニューロンの活動を抑制しても、雌マウスの行動に変化は見られず、通常通り、高い頻度のロードーシスが見られたのに対し、発情の翌日に同様の操作をすると、発情期を過ぎているにもかかわらず、前日と同様にロードーシスが高頻度で観察されました（図1）。逆に、発情日に DRN-ER β^+ ニューロンを過度に興奮させると、ロードーシスの発現量は減少しました。これらのことから、DRN-ER β^+ ニューロンの興奮は、基本的に雌の受容行動に抑制的に働くこと、そして、発情期が過ぎた雌が受容行動を示さなくなるには、DRN-ER β^+ ニューロンが活動していることが必須であることが分かりました。

そこで、発情期を過ぎて性的受容行動の発現頻度が減少した雌マウスについて、ファイバーフォトメトリ法^{注3}を用いて DRN-ER β^+ 細胞の神経活動を記録したところ、雄の性的アプローチに対して、発情期よりも強い反応が見られました（図2）。さらに、DRN-ER β^+ 細胞の神経活動が脳内のどの領域の活動に影響してロードーシスの調節を行っているのかを決定するため、ER β^+ 発現細胞の投射神経細胞のみを選択的に可視化できるトレーサーウイルス^{注4}を DRN に投与してみると、DRN-ER β^+ 細胞は、分界条床核（BST）と呼ばれる領域を含む多くの脳領域に投射していることが分かりました（図3）。実際に、DRN-ER β^+ ニューロンを刺激すると、これらの領域の多くにおいて神経活動の亢進が見られることが、最初期遺伝子 cFos の発現の解析^{注5}により明らかになりました。さらに、DRN-ER β^+ 細胞からの直接的投射を受けていない領域、特に、ロードーシスの調節に関わっていることが知られている内側視索前野（MPO）でも同様の cFos 発現が見られました（図4）。従って、DRN-ER β^+ 細胞は BST への神経投射を通して、MPO の神経活動に影響を与えることで雌マウスの行動を調節していると考えられます。

以上のことから、DRN-ERβ⁺細胞を起点とする神経回路が存在し、発情期が過ぎた雌マウスでは、この回路の神経活動の亢進により、ロードーシスに代表される性的受容行動が減少すると結論付けられました（図5）。

今後の展開

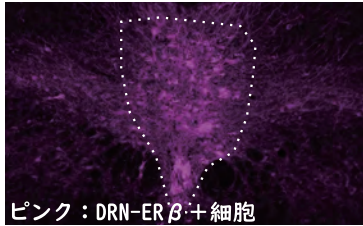
本研究では、DRN-ERβ⁺細胞の神経活動に注目し、発情期が過ぎた雌でその性行動が抑制される際にこの神経細胞集団の神経活動が極めて重要な役割を担うことを発見しました。今後、どのような脳領域からのどのような入力か、DRN-ERβ⁺細胞の神経活動の制御に関わるのか、特に何が発情期とその翌日における DRN-ERβ⁺細胞の神経活動の差を生むのかについて、雄雌間での行動インタラクション中に雌マウスが受け取る感覚刺激入力にも着目して、さらなる解明を進めます。

また、同じ齧歯類に属するラットでは、雌 DRN 領域に、マウスほど多くの ERβ が発現しておらず、種間の ERβ 発現の差が行動表出に生み出す差や、そのメカニズムについても検討する予定です。

性周期の各ステージに応じて変化する雌マウスの適応的な行動表出を支える神経基盤の解明は、究極的にはヒトの社会性行動の理解にも寄与すると考えられます。

参考図

薬理遺伝学的受容体を
DRN-ERβ + 細胞特異的に発現



性行動テスト

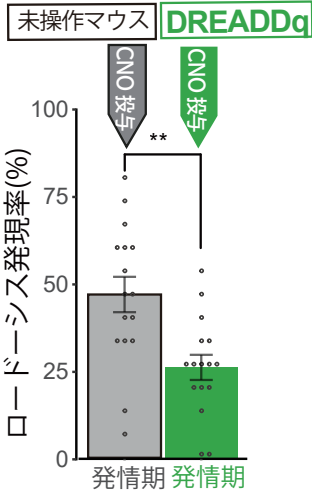
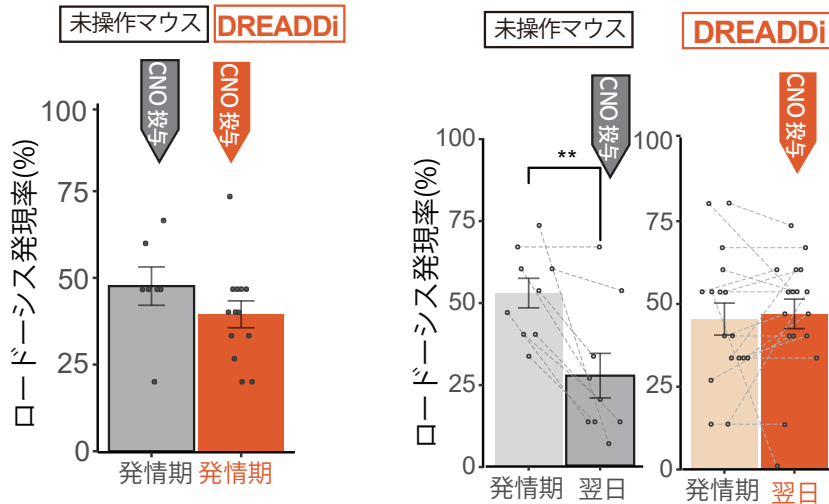
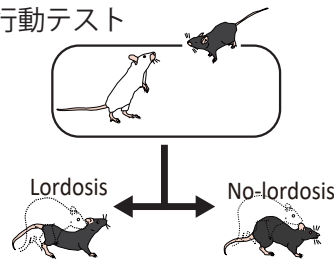


図1 背側縫線核に局在する ERβ 陽性 (DRN-ERβ⁺) 細胞の神経活動操作がロードーシス発現に与える影響

薬理遺伝学的手法 (DREADD 法: 上段左) による DRN-ERβ⁺細胞の神経活動の操作により、発情期雌にみられるロードーシス行動 (上段右) の生起頻度がどのように変化するかを検討した。

発情日には、抑制性の DAREDD (DREADDi) とその選択的作動薬クロザピン N-オキシド (CNO) を用いて DRN-ERβ⁺細胞の神経活動を抑制しても、ロードーシスの発現に影響はなかった (中段左)。一方、本来はロードーシス発現量が低下する発情翌日に神経活動を抑制すると、発情日と同程度の高い頻度でロードーシスが発現した (中段右)。

また興奮性の DREADDq と CNO を用いて、DRN-ERβ⁺細胞の神経活動を過度に興奮させると、発情日特有のロードーシスの発現が見られなくなった (下段)。

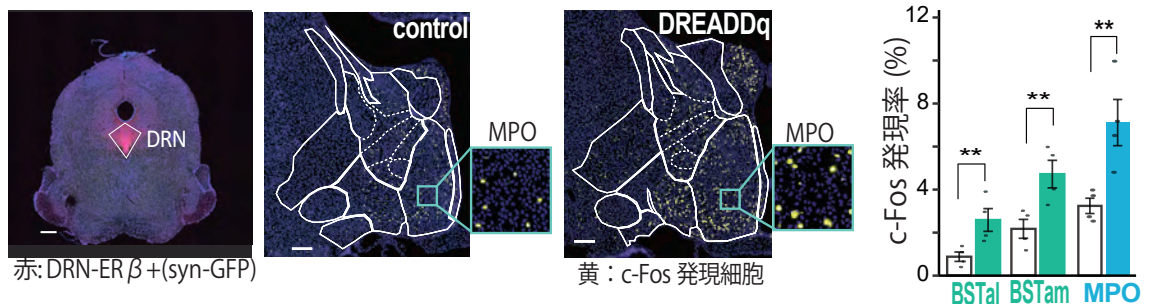
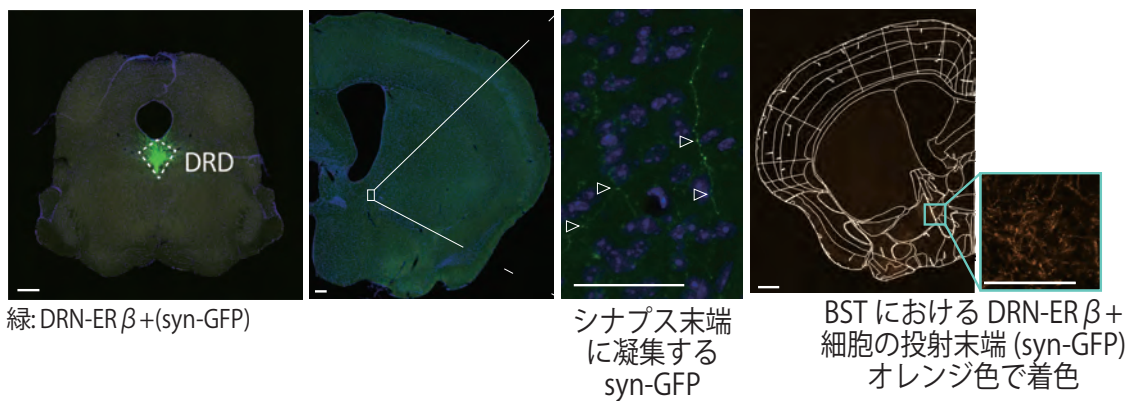
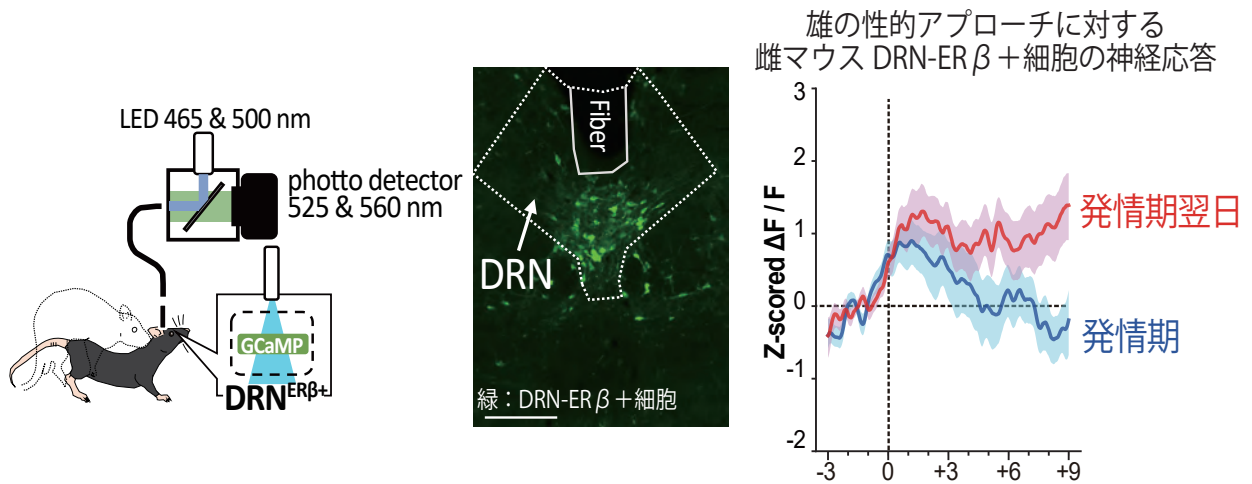


図2 発情日翌日のロードーシス抑制に関わる神経回路の探索

ファイバーフォトメトリー法（上段左）を用いて、DRN-ER β +細胞（上段中央）の神経活動を測定したところ、発情期とその翌日には、雄の性的アプローチに対する神経応答性が異なり、発情期翌日の方が強い応答が見られた（上段右）。DRN-ER β +細胞の投射先を同定できるトレーサーウイルスを DRN に投与すると、分界条床核 (BST) に強い蛍光シグナルが認められたことから、DRN-ER β +細胞は、この領域に神経投射を伸ばすことが分かった（中段）。さらに、興奮性の DREADDq と CNO により DRN-ER β +神経を活性化させると、BST に加えて、DRN-ER β +細胞からの直接的投射を受けていない MPO でも、cFos の発現量が、コントロール群に比べて増加した(下段)。

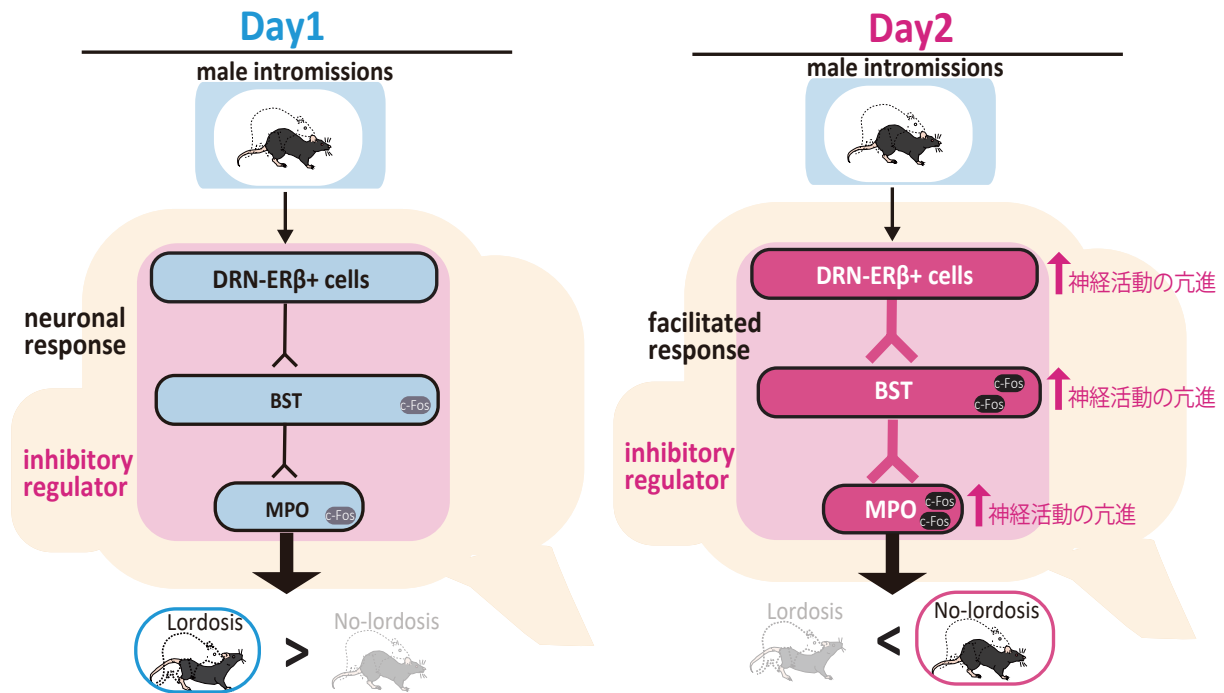


図3 発情期を過ぎた雌マウスで性的受容行動が減少する神経基盤の概要

雌マウスには、DRN-ERβ⁺細胞から BST を経て MPO に至る神経回路が存在し、この神経回路の活性化がロードーシスを抑制する効果があると考えられる。通常、発情日にはこの神経回路は強く活性化することはなく、このため発情日にはロードーシス行動が高頻度で観察された(左)。しかしその翌日では、雄からの性的アプローチに対して、DRN-ERβ⁺細胞の応答性が高まり、BST および MPO における神経活動が活性化すると予想される。これがロードーシスの抑制効果（生起頻度の減少）をもたらすと考えられる(右)。

用語解説

注1) 薬理遺伝学的手法

人工的に遺伝子改変を行った受容体タンパク質と、これに結合して働く作動薬を用いて、任意のタイミングで神経細胞を操作する技術。本研究では、作動薬 CNO の投与によって神経活動を抑制的に制御する受容体と亢進性に活性化する受容体のうち一種類を、それぞれ実験ごとに DRN-ERβ⁺細胞に導入し、行動や最初期遺伝子 cFos の発現を検討した。

注2) 性行動テスト

本研究では、訓練された雄マウスの飼育ケージに雌を導入し、雄雌間にみられる性行動を観察した。雄が雌に馬乗りになる行動（マウント）や、それに続く、陰茎の挿入を伴って腰を振る行動（イントロミッション）に対して、雌マウスが背中を逸らして臀部を持ち上げて受け入れる行動（ロードーシス）を示すかどうかを記録した。

注3) ファイバーフォトメトリー法

特定の神経細胞へ蛍光センサータンパク質を導入、発現させ、その蛍光強度の変化を光ファイバーを用いて測定する技術。本研究では、ERβ-iCre マウスの背側縫線核（DRN）の ERβ 発現細胞に蛍光カルシウムセンサータンパク質を導入し、カルシウム動態を計測することで、DRN-ERβ⁺細胞の神経活動を記録した。

注4) 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、DRN-ER β ⁺細胞に GFP を導入し、そのシグナルを検索することにより、DRN-ER β ⁺細胞の投射先を同定した。

注5) 最初期遺伝子発現解析

中枢神経系では、強い神経活動が生じると、それに伴って最初期遺伝子と呼ばれる遺伝子群のタンパク質の翻訳が行われる。本研究では免疫組織化学染色法を用いて最初期遺伝子 (cFos タンパク質) の発現を脳切片上で検出し、陽性細胞数を脳領域ごとに数えた。

研究資金

本研究は、科研費による研究プロジェクト (21J10590 : 村川、15H05724, 21K18547, 22H02941 : 小川) の一環として実施されました。

掲載論文

【題名】 Estrous Cycle-Dependent Modulation of Sexual Receptivity in Female Mice by Estrogen Receptor Beta-Expressing Cells in the Dorsal Raphe Nucleus

(背側縫線核のエストロゲン受容体 β 発現細胞は雌マウスの性的受容性の発情周期依存的調節に関わる)

【著者名】 Tomoaki Murakawa¹, Lisa Kogure¹, Kakuma Hata¹, Kansuke Hasunuma¹, Satoshi Takenawa¹, Kazuhiro Sano¹, and Sonoko Ogawa¹

¹ Laboratory of Behavioral Neuroendocrinology, University of Tsukuba, Tsukuba, 305-8577, Japan

【掲載誌】 *Journal of Neuroscience (JNS)*

【掲載日】 2024年9月19日

【DOI】 10.1523/JNEUROSCI.1137-24.2024

問い合わせ先

【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