

社会的行動低下マウスモデルにおける
小細胞性オキシトシン神経の選択的脆弱性

鶴谷 雅文

目次

要旨	3
1. 序論	5
1.1. オキシトシンと社会性の制御	5
1.2. 母体環境因子と社会的行動低下モデル	7
2. 材料と方法	9
2.1. 実験動物	9
2.2. VPA マウスの作成	9
2.3. 行動実験	9
2.4. 一細胞核 RNA シーケンス (Single nucleus RNA sequencing、snRNA-seq) : ラ イブラリー調製	10
2.5. snRNA-seq : データ解析	13
2.6. snRNA-seq : 発現に差異のある遺伝子 (Differentially expressed genes、DEGs)、 Gene Ontology (GO)、パスウェイの解析	14
2.7. 母親の高脂肪食摂取	15
2.8. ウイルス調製	15
2.9. 定位注射および眼窩静脈叢注射	15
2.10. PVH ^{OT} ニューロンの光遺伝学的刺激	16
2.11. 組織学及び組織化学	16
2.12. <i>In situ</i> ハイブリダイゼーション (<i>in situ</i> hybridization、ISH)	16
2.13. 定量化と統計 : snRNA-seq データ	18
2.14. 定量化と統計 : 組織化学および ISH データ	18
3. 結果	19
3.1. VPA マウスを用いた視床下部室傍核におけるオキシトシンの組織学解析	19
3.2. 母親の食事依存的な社会行動低下モデルマウスにおけるオキシトシンの組織学解 析	21
3.3. オキシトシン神経を含む視床下部 PVH を用いた一細胞核トランスクリプトーム 解析	22
3.4. オキシトシン神経の薬理遺伝学的興奮による社会的行動の促進	31
3.5. オキシトシン神経の興奮による非社会行動への影響と長期的な社会的行動の促進	36
3.6. オキシトシン神経の光遺伝学的興奮による社会的行動の促進	36
3.7. オキシトシン神経への早期介入による社会的行動の促進	38

3.8. オキシトシン神経への早期介入を行った個体を用いた視床下部 PVH の一細胞核 トランスクリプトーム解析.....	40
4. 議論	45
4.1. 社会的行動低下の背景に想定される Parvo-OT の選択的な脆弱性.....	45
4.2. 社会的行動の回復モデル	47
4.3. 本研究の限界.....	49
5. 参考文献.....	51
6. 謝辞	60

要旨

神経発達障害 (neurodevelopmental disorder, NDD) は、胎児の遺伝的要因、母体免疫活性化や胎児の脳発達期に投与された薬剤などの母体環境要因と密接に関連している。これらの因子は神経系全体に広く影響を及ぼすため、NDD の発症の根底にある正確なメカニズムは、ほとんど解明されていない。例えば、げっ歯類の社会的行動を制御する神経回路に関する理解は急速に進んでいるにもかかわらず、NDD において、パーキンソン病のように特定の神経細胞集団が選択的に影響を受けているのかどうかは、わかっていなかった。そこで、本研究は社会的行動の低下を示すモデルマウスにおいて、視床下部室傍核 (paraventricular hypothalamus, PVH) のオキシトシン (oxytocin, OT) 神経 (PVH^{OT} ニューロン) に注目した。

近年、げっ歯類の研究により、社会性行動、絆形成、親としての行動の典型的な発達における OT システムの重要性が強調されてきた。多くの脳領域が OT 受容体を発現しており、脳全体に OT が広く機能していることが示唆されている。PVH^{OT} ニューロン集団のうち、大細胞性 (magnocellular) OT ニューロン (Magno-OT) は、下垂体後葉および前脳構造への軸索投射を示す。一方小細胞性 (parvocellular) OT ニューロン (Parvo-OT) は、腹側被蓋野や黒質などの中枢に選択的に投射し、それによりドーパミン系を調節し、社会的報酬に貢献している。加えて後脳や脊髄を支配し、情動、痛み、食欲、代謝に対して多様な神経調節を行っている。

OT システムの障害は、さまざまな遺伝的・環境的な要因によって作出された社会的行動低下のげっ歯類モデルにおいて広く報告されている。例えば、*Shank3b* 遺伝子の遺伝子変異、*Maged1* 遺伝子変異、*Necdin* 遺伝子変異、高脂肪食を摂取した母親の子孫、バルプロ酸 (valproic acid, VPA) に胎内暴露したラットでは、PVH 内での OT 免疫反応性や OT mRNA 発現の低下が観察されている。しかし、これらの研究では観察された減少が OT 発現の低下に由来するのか、それとも細胞レベルでの PVH^{OT} ニューロンの損失に由来するのか、判別されていない。さらに、PVH^{OT} ニューロンの異なる細胞タイプに対する影響も不明であった。一細胞 RNA シーケンスを用いた最近の重要な研究により、Magno-OT と Parvo-OT の異なるトランスクリプトームの特性が明らかにされ、後者は自閉症スペクトラム障害のリスク因子遺伝子発現が多く見られ、社会的報酬においてより重要な役割を果たしていることが示された。このことから、Parvo-OT は、社会的行動の低下を誘発する胎生期の要因による障害の影響を受けやすいのではないかという仮説が立てられた。

本研究ではまず、遺伝子改変マウスを用いて健常群と胎児期に VPA に暴露された VPA 群の PVH^{OT} ニューロンを遺伝的に標識し、さらに Magno-OT と Parvo-OT を区別しながら OT タンパク質発現の定量を試みた。その結果、VPA 群の Parvo-OT でのみ OT 発現量が低下していた。PVH^{OT} ニューロンの数に違いはなかったことから、Parvo-OT の選択的

脆弱性が示唆された。そこで、一細胞核 RNA シーケンス (Single nucleus RNA sequencing、snRNA-seq) を用いて PVH ニューロンを網羅的に解析したところ、VPA 暴露は多くの PVH ニューロンに遺伝子発現上の影響を与えていた。しかし、神経細胞の機能に重要な役割を果たすシグナル伝達遺伝子やシナプス機能に関わる遺伝子の変動は Parvo-OT で選択的に蓄積していた。この結果は組織学的にも裏付けられたことから、トランスクリプトームレベルでも Parvo-OT の選択的脆弱性が示唆された。

次に、ウイルスツールを用いて青年期マウスの PVH^{OT} ニューロンを化学遺伝学的に興奮させたところ、VPA 暴露群の社会的行動が促進され、緩やかに OT 発現レベルも回復することが示された。さらに、遺伝子改変マウスを用いて出生直後に OT 陽性細胞を化学遺伝学的に興奮させると、青年期になっても効果が持続しており、社会的行動の促進、OT 発現レベルの回復が見られた。そこで最後にこの回復モデルにおけるトランスクリプトームを snRNA-seq を用いて解析したところ、Parvo-OT を含む複数の PVH ニューロンで遺伝子発現が活発になっており、Parvo-OT では VPA 群において低下していた複数の遺伝子の発現が改善傾向にあった。このことから、Parvo-OT の選択的脆弱性は出生後の介入により改善する可能性があり、その効果は長期的に持続する可能性が示唆された。

本研究は NDD のモデルマウスにおいて選択的脆弱性の枠組みを適用した初めての報告であり、細胞種に焦点を当てた介入の可能性を示している。

1. 序論

七色に輝く可視光のように人の社会性には幅があり、それが個人を作っている。LGBTや性の多様性と同様に、社会性の低下などを中核症状とする精神障害として知られる自閉症スペクトラム障害（autism spectrum disorder、ASD）にもその概念は適応され、個性としての認知が高まりつつある。多様な個性を持った個々人が、お互いの尊厳を認め合い、幸せに暮らせる社会が切望されている。

1.1. オキシトシンと社会性の制御

ASDを含め、神経発達障害（neurodevelopmental disorder、NDD）は環境要因と多くの遺伝的要因が報告されている^{1,2,3,4}。NDDで低下がみられる社会的行動は、内側前頭前野、前帯状皮質、島皮質などの皮質のみならず、側坐核、扁桃体基底外側部、腹側被蓋野などを含めた様々な脳領域で調節されており、さらにオキシトシン、ドーパミン、セロトニンなど複数の神経伝達物質が関与している⁵。例えば内側前頭前野の神経には社会的行動中に活動する神経と抑制される神経があり⁶、これらの神経は側坐核、扁桃体基底外側部、腹側被蓋野といった他の社会的行動に関与する脳領域と相互的な回路を形成し⁷、社会的行動を制御する⁸。特に内側前頭前野と扁桃体の回路は社会行動に重要であるとされている⁹が、前帯状皮質や島皮質も社会行動に寄与しており社会行動が低下したモデルマウスで現在研究が進められている^{10,11}。一方、側坐核は腹側被蓋野と黒質からドーパミンシグナルを受け取っており¹²、腹側被蓋野から側坐核への回路を活性化させると社会的活動が促進される。側坐核におけるドーパミン伝達シグナルは社会的ストレスに関与しているとされ、社会的敗北ストレスを受けやすいC57BL/6の近交系マウス¹³は腹側被蓋野から側坐核へ投射する神経の発火パターンがストレス耐性のある系統マウスとは異なる。またASDに関連するヒト遺伝子の情報はリスク評価も含めて収集、公開がされており¹⁴、遺伝子変異マウスの解析も進められている。例えば*Nlgn3*遺伝子の変異¹⁵は腹側被蓋野のドーパミン神経に異常が生じ、*Nf1*遺伝子の変異¹⁶、*Pten*遺伝子の変異¹⁷は内側前頭前野と扁桃体の回路に異常が生じる。しかし、これまでの研究は領域レベル、あるいは全身性の遺伝子変異で議論されており、これらの要因がどのように社会性の低下を引き起こすのかはよくわかっていない。例えばパーキンソン病でドーパミン神経細胞が選択的にダメージを受けるように、特定の神経が不調になる¹⁸ののだろうか。そこで本研究では社会的行動の低下を示すマウスを用いて、社会性に関与する神経として有名なOTニューロンに着目した。

脳の視床下部室傍核(paraventricular hypothalamus, PVH)には、幸せホルモンと呼ばれるオキシトシン(oxytocin, OT)という神経ペプチドを産生するOTニューロン(PVH^{OT}ニューロン)が存在している。ここ数十年、げっ歯類を用いて社会的行動を制御する神経回路の理解が進むと同時に^{19,20}、社会的行動、絆形成、親としての行動といった様々な行動にOTシステムが重要であることが示されてきた^{19,21,22}。例えば、PVH^{OT}ニューロンは授乳

中に同期発火することで射乳反射を形成しており²³、一般的な社会的行動中にも活動があるとされている²⁴。一方、OT 受容体は数多くの脳領域で発現しており²⁵ OT システムが脳全体に広く機能していることが示唆されている。そしてこれまでの研究では、*OT* 遺伝子と *OTR* 遺伝子の変異マウス解析においても社会行動が変容すると報告されている^{26, 27}。PVH^{OT} ニューロンはこれまでに二つの亜集団が知られている。前側 PVH には大細胞性 (magnocellular) OT ニューロン (Magno-OT) が分布し、下垂体後葉および様々な前脳構造への軸索投射を示しており²⁸、主に血中に OT を分泌している (図 1)。一方、後側 PVH に局在する小細胞性 (parvocellular) OT ニューロン (Parvo-OT) は、様々な脳領域および脊髄に軸索を投射している (図 1)。具体的には、側坐核、腹側被蓋野や黒質などの中枢脳に選択的に投射することでドーパミン系を調節し、社会的報酬に貢献している^{24, 29, 30}。さらに、Parvo-OT は後脳や脊髄を支配することで、情動、痛み、食欲、代謝に対して多様な神経調節を行っている^{28, 31, 32}。例えば PVH^{OT} ニューロンを興奮さ

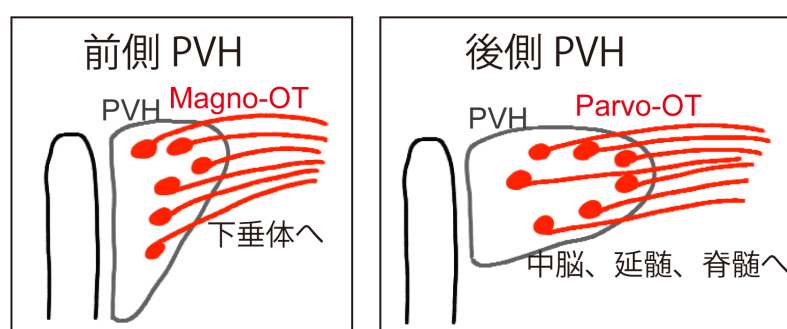


図 1. PVH^{OT} ニューロンの模式図

Magno-OT の分布領域である前側 PVH (左) と Parvo-OT の分布領域である後側 PVH の模式図

せることで胸髄の OT 受容体交感神経が活動し、血糖値が上昇することが知られている³²。

OT システムの障害は社会的行動の低下を引き起こすさまざまな遺伝的・環境的げっ歯類モデルにおいて、広く報告されている。例えば、*CAPS2* 遺伝子の変異³³ は社会的行動の低下と下垂体からの OT 放出低下を引き起こす。*CD38* 遺伝子の変異³⁴ は社会記憶障害と下垂体からの OT 放出低下がみられる。*Cntnap2* 遺伝子の変異^{35, 36} は社会的行動の低下と OT 発現細胞の減少を示す。*Shank3b* 遺伝子の変異^{4, 37} もまた、社会的行動の低下と OT 発現細胞の減少がみられる。*Maged1* 遺伝子変異³⁸、*Necdin* 遺伝子変異³⁹、高脂肪食を摂取した母親の仔 (maternal high-fat diet, MHFD)³、バルプロ酸 (valproic acid, VPA) に胎内暴露したラット^{40, 41} でも、PVH 内での OT 免疫反応性や *OT* mRNA 発現の低下が観察されている。しかしこれらの研究では、PVH^{OT} ニューロンが消失しているのかそれとも PVH^{OT} ニューロンは存在するものの OT の発現が低下するのか、そして PVH^{OT} ニューロンの二つの亜集団で違いがあるのかは未解明であった。近年の一細胞 RNA シーケンスを用いた研究では、Magno-OT と Parvo-OT はトランスクリプトームとして異なる集団であり、後者では ASD リスク因子遺伝子の濃縮発現が見られ¹⁴、社会的報酬においてより重要な役割を果

たしている¹。これらの知見から、胎児が社会性の低下を引き起こす環境要因に晒された場合、Parvo-OT は障害を受けやすいのではないかと考えた。

OT のシステム障害は、様々な方法で表現型の回復が調べられてきた。例えば、*CAPS2* 遺伝子変異³³の表現型は OT の腹腔投与や経鼻投与で回復する。*CD38* 遺伝子の変異³⁴は OT の皮下投与で回復し、*Cntnap2* 遺伝子の変異^{21, 22}は OT の腹腔投与や経鼻投与、OT 神経の化学遺伝学的活性化で回復する。*Shank3b* 遺伝子の変異^{4, 37}は OT の経鼻投与や腸内細菌の一種を投与することで回復し、MHFD³は腸内細菌の一種を投与することで、VPA では OT の経鼻投与や腸内細菌の一種を投与することで表現型が回復する。OT システム障害の回復において、OT の腹腔投与や経鼻投与で PVH^{OT}ニューロンが活動するのかは不明であるが、例えば OT 受容体は G タンパク質共役型受容体(G protein coupled receptor, GPCR)であり迷走神経求心路上の OT 受容体細胞を利用した PVH^{OT}ニューロンの活性化が想定される⁴²。一方で化学遺伝学的活性化は、ムスカリン性 GPCR を変異させた人工受容体 (designer receptors exclusively activated by designer drugs、DREADD)を、遺伝子改変マウス等を用いて特定の細胞集団にのみ発現させ、選択的な人工リガンドであるクロザピン-N-オキシド (CNO) を投与することで細胞種特異的に神経を興奮、あるいは抑制させる技術⁴³である。生体脳への DREADD の導入にウイルスツールを使うことで場所と細胞集団の両方を制御できるため、本研究における表現型の回復実験は主に化学遺伝学的活性化の戦略を採用した。

1.2. 母体環境因子と社会的行動低下モデル

本研究では *OT-Cre* マウスと⁴⁴ Cre 依存的なレポーターマウスを交配し、遺伝学的に OT を発現したことの細胞を網羅的に標識する戦略を用いた。この手法により、OT の発現が低下した OT ニューロンも可視化することが可能となった。

環境依存的な社会的行動低下モデルの一つに、母体免疫活性化モデルがある¹。これは感染症などで母体免疫が活性化することで胎児の神経発達に影響が及ぶというモデルで、ヒトでは一般的な感染症にかかった妊婦から生まれた子どもは ASD のリスクが 13%上昇するという報告がある⁴⁵。さらに、感染症以外にも肥満、心理的要因、貧困など様々な妊娠期の環境要因が NDD のリスク上昇に関わっていると考えられている¹。母体免疫活性化はマウスモデルでも研究が進められており、これまでに内側前頭前野から扁桃体への興奮性入力が過剰になることが報告されている⁹。

本研究では、環境依存的な社会的行動低下モデルとして、VPA^{40, 46}と母親の高脂肪食摂取 (maternal high-fat diet, MHFD)³を用いた。前者はげっ歯類を用いた研究で起用されるだけでなく抗てんかん薬として広く流通しているが、子宮内で VPA に曝露した子どもの神経発達が遅れることが報告され^{47, 48, 49}、大規模なコホート研究で ASD のリスクが上昇する⁵⁰ことが確かめられたことから、妊娠中の女性が服薬することは禁忌となっている。作用機序としてはヒストン HDAC 阻害剤として働くと考えられている⁵¹が、他の作用機序が関与して

いる可能性も残されている。例えば VPA は Wnt シグナルの活性化を促進する⁵² 可能性があり、また β -カテニン-Ras-ERK-p21 経路を活性化させ、神経前駆細胞の分化と増殖に影響を与える⁵³ 可能性がある。げっ歯類を用いたモデル動物実験では、妊娠 12.5 日目 (E 12.5) に VPA を一回投与すると社会的行動が低下する⁵⁴ が、なぜ生まれた仔の社会行動が低下するのかは不明である。後者はその名の通り高脂肪食を食べ続けている母親から生まれた仔が社会的行動の低下を示すというモデルである。MHFD の社会的行動低下には腸内細菌叢の変化が関与しているとされている³ が、VPA 投与マウスでは腸内細菌叢の変化はみられなかった³。しかし、どちらも先行研究では OT 陽性細胞 PVH 内での OT 免疫反応性が報告されている³ ことから、両モデルで同じように PVH^{OT} ニューロンに障害が起きている可能性があると考えた。

2. 材料と方法

2.1. 実験動物

OT-Cre マウス (JAX #024234) は Jackson Laboratory から購入した。*Rosa26^{tm9}(CAG-tdTomato)Hze* マウス (別名 *Ai9* マウス) (JAX #007909) は、Jackson Laboratory から購入した今井猛氏のご厚意により提供された。*Rosa26^{dreaddm3}* マウス (別名 *stop-hM3Dq* マウス) は櫻井武氏のご厚意により提供された。野生型 C57BL/6J 雌マウスは、交配用に株式会社日本 SLC (日本、静岡) から購入した。すべてのマウスは C57BL/6J のバックグラウンドで維持された。動物は理化学研究所生命機能科学研究センター (RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research、RIKEN BDR) の動物飼育施設で、室温 (18-23 度)、12 時間明期、12 時間暗期のスケジュールで飼育した。湿度は約 45% に保たれていた。マウスは特に断りのない限り、実験用飼料 (MFG; オリエンタル酵母工業、3.57kcal/g) と水を自由に摂取できた。本研究では、出生前の VPA 暴露が雄に偏って社会的行動に影響を与えることが以前に報告されていることから、雄マウスのみを用いた^{40, 46}。

2.2. VPA マウスの作成

VPA^{40, 51} 投与マウスを作製するため、膈栓形成による交配日の同定に基づき、妊娠 12.5 日目 (E 12.5) の妊娠雌マウスにバルプロ酸ナトリウム (Sigma、#P4543) を 500 mg/kg、腹腔投与した。コントロール群として、同じ時期の妊娠雌マウスに 10 mL/kg の生理食塩水を腹腔注射した。

2.3. 行動実験

3 チャンバーテストは、20 × 30 × 30cm (幅 × 長さ × 高さ) の 3 室からなる装置を用いた。2 つの側室は 5 × 3cm (幅 × 高さ) の小さな通路で中央室とつながっていた。テストは以前に記載された方法⁵⁵ に従って行った。まず、動物を空の部屋に 10 分間馴化させた。その後、グリッドを両側のチャンバーに設置し、さらに 10 分間馴化させた。そして、馴染みのない C57BL/6 若齢成体マウスまたはレゴブロックをグリッド上に置き、動物の行動を 10 分間記録した。記録には GoPro8 カメラ (GoPro; #CHDHX-801-FW) を使用した。実験は、明期開始からおよそ 6 時間後に行われた。青年期の薬理遺伝学的活性化 (図 12、13、15) では、クロザピン N-オキシド (Clozapine N-oxide、CNO) (5 mg/kg、Tocris、#4936/10) または生理食塩水 (200 μ L) を腹腔内投与した 30 分後に行動実験を開始した。新生児期の薬理遺伝学的活性化 (図 19 および 23) については、生後 2 日 (postnatal day 2、PND2) に CNO (5 mg/kg) または生理食塩水 (10 μ L) を経口投与し、5 週齢で行動実験を行った。

社会的行動を評価するために、10 分間の記録セッション中、マウスが馴染みのないマウスの入ったグリッドとレゴブロックの入ったグリッドを探索した時間を手動で定量化した。グリッドの調査時間はマウスが積極的に匂いを嗅いだり、グリッドを探索したりした時間とした。各馴化セッションと記録セッションの間に側室をエタノールで洗浄した。

ビー玉埋没試験は先行研究⁵⁶に従い、約 4cm のウッドチップ床敷を敷いた 14 × 32 × 14cm (幅 × 長さ × 高さ) のケージ内で行った。動物は空のケージに 10 分間馴化させた。その後、20 個のビー玉をケージに入れ、動物の行動を 10 分間記録した。テスト終了後、動物をケージから出し、埋まったビー玉を手作業で数えた。ビー玉は、横方向から観察して、高さの 3 分の 2 が床敷に沈んでいれば「埋まっている」と判断した。

2.4. 一細胞核 RNA シーケンス (Single nucleus RNA sequencing、snRNA-seq) : ライブラリー調製

Frankenstein プロトコル (doi:10.17504/protocols.io.3fkgjkw) は、核を単離するために以下のように修正された。図 6、8、9、11 のデータについては、5 週齢の雄性 *OT-Cre; Ai9* マウスをイソフルラン (富士フイルム、#099-06571) で深麻酔し、4 度に冷却したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流して血球を除去し、断頭して安楽死させた。脳を取り出し、顕微鏡下で 1000- μ m の冠状切片に切り出し、切片を 1%BSA-PBS (ナカライテスク、#0128197 およびタカラ、#T9181) に浮遊させた。そして *OT-Cre; Ai9* 雄マウスの tdTomato (tdT) の蛍光に基づいて PVH を解剖し、氷冷した Nuclei EZ Lysis Buffer (Millipore Sigma, N-3408) で十分にホモジナイズした。得られた懸濁液を氷上で 5 分間インキュベートし、70- μ m ストレーナーで濾過した。核を 500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離してペレット化し、上清を除去した。次に核を Nuclei EZ Lysis Buffer に再懸濁し、500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、5 分間の遠心分離で再度ペレット化した。その後、0.2 U/ μ L RNase Inhibitor (Roche, 3335399001) を含む 1% BSA-PBS (Resuspension Buffer) に再懸濁した。各条件で 2-4 匹の雄マウスを用い、単離した核をプールし、再度 500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心して核をペレ

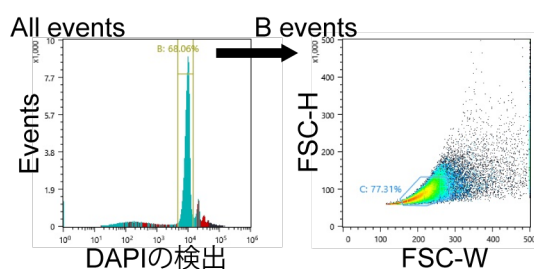


図 2. 大きな核を優先的に選択するように設定されたセルソーターのゲート

snRNA-seq のために *OT-Cre; Ai9* 雄マウスに由来する 30000 個程度の核を分取した一例を示す。左のヒストグラムは DAPI 染色の強度に対する分布を示し、黄土色の縦線に囲まれたエリア B に分取ゲートを設定した。次に右の二次元プロットは、幅を示す FSC-W と高さを示す FSC-H の値によって展開したもので、青色の枠で囲ったエリア C に分取ゲートを設定した。

ト化した。その後、核を再懸濁バッファーと 10 μ g/mL DAPI に再懸濁し、40- μ m ストレーナーで濾過した。この懸濁液から、セルソーター (SH800Z、ソニー) を用いて、5°C で核を選別した。ゲートは、まず DAPI シグナルに基づいて一細胞核集団を同定し、次に大きな核を優先的に選択するように設定し、同時に多核を除外しながらニューロンを推定した (図 2)。選別が完了した直後に、DAPI で染色した核を、血球計数板を使って数え、核の収量を確認した。その後、核を再懸濁バッファーに再懸濁し、10X Genomics Chromium プラットフォームを用いて、1 条件あたり 8000 核をターゲットに snRNA ライブラリーを作製するために使用した。ライブラリーは 10X Genomics RNA 3' v3 kit (#1000269) を用いて調製した。完成したライブラリーは、HiSeqX で 110Gb の深さまで配列を決定した (Novogene 社が実施)。

図 21、23、24 のデータでは、VPA 投与した 5~7 週齢の *OT-Cre; stop-hM3Dq* 雄マウスに PND 2 で CNO または生理食塩水を与えて実験した。このとき上記のプロトコールに若干の変更を加えた。具体的には、*OT-Cre; stop-hM3Dq* マウスは、解剖過程で OT ニューロンを可視化しやすくするため、3 週齢で PVH と視索上核領域にアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus、AAV) が導入された。また、神経細胞核の収集収量を最適化するため、FACS ゲーティングを調整してより大きな核に対応させた。各バッチは、Chromium システムを用いて 5,000 個の核の単離を目指した。完成したライブラリーは、HiSeqX で 105Gb の深さまで配列を決定した (AZENTA が実施)。

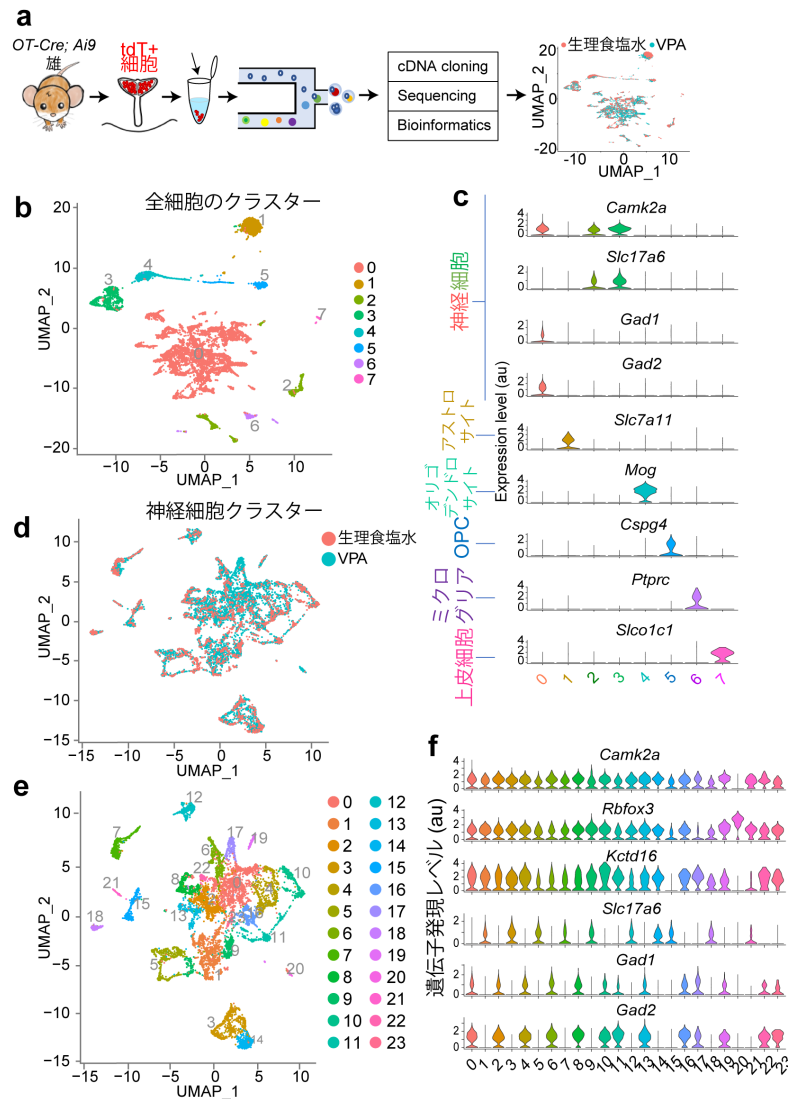


図 3. snRNA-seq 解析の概略と神経細胞集団の抽出

a. snRNA-seq 解析の概略図と最初のクラスターリングで得られた全細胞の多次元近似と投影 (Universal manifold approximation and projection、UMAP)。**b.** 全細胞のクラスター番号と UMAP。**c.** **b** の各クラスターの代表的なマーカー遺伝子 (神経: *Camk2a*, 興奮性神経: *Slc17a6*, 抑制性神経: *Gad1*, *Gad2*, アストロサイト: *Slc7a11*, オリゴデンドロサイト: *Mog*, オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell, OPC): *Cspg4*, ミクログリア: *Ptprc*, 上皮細胞: *Slco1c1*)。**d. e. f.** **b** で得られた神経細胞クラスターのみを集めて再クラスターリングをして得られた、コントロール群と VPA 群の重なりを示す UMAP (**d**)、クラスター別 UMAP (**e**)、神経 (*Camk2a*, *Rbfox3*, *Kctd16*) マーカーと興奮性 (*Slc17a6*)、抑制性 (*Gad1*, *Gad2*) マーカーのバイオリンプロット (**f**)。

2.5. snRNA-seq：データ解析

解析を行うために、Cell Ranger パイプラインを用いて、各ライブラリーの fastq ファイルをマウスのレファレンストランスクリプトーム (mm10、genecode version vm23) にアライメントした。アライメント後、Seurat (R パッケージ、v4.3.0) にフィーチャーバーコード行列をロードした。細胞は少なくとも 800 個の Unique Molecular Identifiers (UMI) が検出された場合に、遺伝子は少なくとも 3 つの細胞で 1 つ以上の UMI が検出された場合に保持された。図 6、8、9、11 のデータでは、品質管理と初期フィルタリングを行った後、生理食塩水および VPA ライブラリーから、それぞれ 5491 個および 10,904 個の全核を回収した。遺伝子数/核の中央値は、生理食塩水ライブラリーで 3232、VPA ライブラリーで 2460 であった。生理食塩水ライブラリーには、UMI とバーコードの平均数が 2 倍以上であることから明らかな、ダブレットと思われる細胞が相当数含まれていた。この問題に対処するため、Cloupe を使用して、細胞当たり 4300 個以上のバーコードを含む細胞集団がダブレットクラスターを形成していることを確認し、そのような細胞を除去した。同様に、VPA ライブラリーでは平均 UMI 数の 2 倍以上の細胞を除去した。次に生理食塩水および VPA ライブラリーを Seurat の `sctransform` 関数を使用して統合した。カウントデータの正規化は `LogNormalize` を用いて行った。この方法では、以下の計算を行った。各セルの特徴カウントをそのセルの総カウントで割り、スケールファクターを掛けた。これを、`log1p` を用いて自然対数変換した。

主成分 (principal components, PC) 分析を行うため、上位 3000 の特徴的な遺伝子を同定し、主成分分析の入力として採用した。神経細胞集団と非神経細胞集団を区別するために、0.02 の解像度で上位 35 の主成分を用いて最初のクラスタリングを行った (図 3b, c)。クラスタリングされた細胞集団から *Camk2a*、*Slc17a6*、*Gad1*、*Gad2* の発現に基づいて神経細胞集団を同定し、`subsetUmapClust` 関数を利用して再クラスタリングを行った。さらに、先ほどと同じパラメーターを用いて、*Slc17a6*、*Gad1*、*Gad2* の発現に基づいて、神経細胞集団を *vGluT2+* と *Gad1/2+* の亜集団に分離した。*vGluT2+* ニューロン集団について、生理食塩水および VPA ライブラリーでそれぞれ 1133 個および 3225 個の核を同定し、これらは 1.00 の解像度で上位 40 個の PC を用いて、まとめて 30 個のクラスターを構成した。図 6a および b では、以下のようにカウントした。生理食塩水ライブラリーでは、17 個と 21 個の核がそれぞれ Magno-OT と Parvo-OT に分類され、VPA ライブラリーでは、94 個と 90 個の核がそれぞれ m Magno-OT と Parvo-OT に分類された。図 11 では、0.25 の解像度で上位 40 の PC を用いて、*GAD1/2* ニューロン集団に 17 のクラスターを同定した。

図 21、23、24 のデータについては、前述の手順に若干の調整を加えた。具体的には、CNO 群については 1 および 2 とラベル付けした 2 つのバッチを収集し、一方、生理食塩水群については 1 つのバッチからデータを得た。生理食塩水と CNO のバッチ 1 の両方について、ダブレットを形成する核を除去するために、前述の方法を適用した。その結果、生理食塩水

では 5500 バーコード以上、CNO バッチ 1 では 5800 バーコード以上の核を除去した。CNO バッチ 2 は、Cell Ranger のバーコード順位プロットでかなりの数の核が RNA 分解の傾向を示していた。そこで、生理食塩水および CNO バッチ 1 の Parvo-OT が、細胞あたり 4000 以上のバーコードを保持していたため、CNO バッチ 2 では 4000 以上のバーコードを含む核を解析した。また、下限値の約 1.8 倍のバーコードを持つ細胞まではダブレットを形成していない単一の細胞であると考え、CNO バッチ 2 のバーコードの上限値を 7000 に設定した。神経細胞集団と非神経細胞集団を区別するため、0.02 の解像度で上位 50 個の PC を用いて最初のクラスタリングを行った。*Camk2a*、*Slc17a6*、*Gad1*、*Gad2* の発現に基づき、神経細胞集団を同定し、subsetUmapClust 関数を利用して、0.50 の解像度で上位 30 個の PC を用いて再クラスタリングを行った。生理食塩水と CNO ライブラリーでは、*vGluT2*+ニューロン集団内にそれぞれ 880 個と 1242 個の核を同定し、1.50 の解像度で上位 50 個の PC を用いて合計 27 個のクラスターを作った。

図 21d、e では、0.9 の解像度で上位 20 個の PC を用いて、*vGluT2*+ニューロン集団内のクラスター13 (図 6 のクラスター19 に相当) とクラスター9 (図 6 のクラスター18 に相当) に、大細胞性および小細胞性の PVH^{OT} ニューロンを同定した。図 21 では、以下のようにカウントした：生理食塩水ライブラリーでは、35 個の核が Magno-OT、19 個の核が Parvo-OT に分類され、CNO ライブラリーでは、37 個の核が Magno-OT、12 個の核が Parvo-OT に分類された。CNO グループのバイオリンプロット (図 21f) は、代表的なバッチからのデータに基づいている。

図 24 の *GAD1*/2+クラスターについては、CNO バッチ 2 はバーコード数が少なかったため、生理食塩水と CNO バッチ 1 に限定して比較した。0.5 の解像度で上位 40 の PC を利用し、20 のクラスターを同定し、生理食塩水と CNO ライブラリーで *GAD1*/2+ニューロン集団についてそれぞれ 1558 と 1348 の核を解析した。

2.6. snRNA-seq : 発現に差異のある遺伝子 (Differentially expressed genes、DEGs)、Gene Ontology (GO)、パスウェイの解析

ある細胞クラスターで 30%以上の細胞に少なくとも 1 つの遺伝子が検出された場合、その遺伝子は「発現」していると考えた。これを前提に、特定の比較条件下で発現が上昇あるいは低下を示した DEGs を同定した。DEGs は、 $\log_2$ -fold change の絶対値 ($|\log_2\text{-FC}|$) が 0.5 より大きく、 p 値が 0.05 より小さいことで定義された。自閉症関連遺伝子のリストは、2023 年 9 月 26 日現在の SFARI Gene データベース (<https://gene.sfari.org>) から入手した。図 8d では、SFARI Gene データベースの「SYNDROMIC」、「CATEGORY 1」、「CATEGORY 2」、「CATEGORY 3」、および「Archive only」遺伝子をそれぞれ「S」、「1」、「2」、「3」、および「Acv」と表記した。

図 9、11、23 では、指定した比較条件下で発現が上昇または低下した DEGs をもとに、

各細胞クラスターについて clusterProfiler^{57, 58, 59} を用いて生物学的プロセスの GO およびパスウェイ解析を行った。GO 用語とパスウェイは、既存のデータベースから入手した。一つの遺伝子が複数のアイソフォームパスウェイにマッピングされている場合は、これらを統合して一つのパスウェイとして解析に用いた。

2.7. 母親の高脂肪食摂取

雌マウスに、総カロリーの 5.5%を脂肪、27.8%をタンパク質、48.6%を炭水化物とした普通食 (regular diet、RD、オリエンタル酵母; MGF)、または 62.2%を脂肪、18.2%をタンパク質、19.6%を炭水化物とした高脂肪食 (high-fat diet、HFD、オリエンタル酵母; HFD-60) を与えた。それぞれの飼料で 8 週間以上飼育した後、雌マウスを *OT-Cre* 成体雄と交配させた。HFD は妊娠期間と授乳期間中続けられた。得られた仔は 3 週齢で離乳させ、母親の食餌状態にかかわらず、すべて RD に移行させた。

2.8. ウイルス調製

以下のアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus、AAV) ベクターは、群馬大学ウイルスベクターコアおよび Addgene 社が対応するプラスミドを用いて作製した。ウイルスベクターの力価は 1mL あたりのゲノム数 (gp) で示した。

AAV serotype 8 *hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry* (2.1×10^{13} gp/mL) (Addgene #44361)

AAV serotype 8 *hSyn-DIO-mCherry* (1.7×10^{13} gp/mL) (Addgene #50459)

AAV serotype 5 *EF1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA* (1.8×10^{13} gp/mL) (Addgene #20298)

AAV serotype 5 *EF1a-DIO-EYFP* (1.6×10^{13} gp/mL) (Addgene #27056)

AAV serotype 9 *OTp-mCherry* (2.3×10^{13} gp/mL) (Addgene #184754)

2.9. 定位注射および眼窩静脈叢注射

注射には 3 週齢の雄マウス (*OT-Cre*、*OT-Cre; Ai9*、*OT-Cre; stop-hM3Dq*) を用いた。すべての脳定位注射は、65 mg/kg のケタミン (第一三共) と 15 mg/kg のキシラジン (Sigma-Aldrich、cat# X1251) による全身ケタミン-キシラジン麻酔下で、脳定位固定装置 (RWD、cat#68045) を用いて行った。PVH への注入座標は以下の通りであった：脳表から前方 0.78 mm、側方 ± 0.1 mm、腹側 4.5 mm。250 nL の AAV8 *hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry*、AAV8 *hSyn-DIO-mCherry*、AAV5 *EF1a-DIO-hChR2 (H134R) -EYFP-WPRE-HGHpA*、または AAV5 *EF1a-DIO-EYFP* のいずれかを、Micro-4 (World Precision Instruments) で制御された UMP3 ポンプを使用して、50 nL/分の速度で PVH に両側注入した。視索上核への注入座標は以下の通りであった：脳表から前方 0.78 mm、外側 ± 0.2 mm、腹側 5.5 mm。250 nL の AAV9 *OTp-mCherry* を、Micro-4 で制御された UMP3 ポンプを用いて、PVH と視索上

核に 50 nL/分の速度で両側注入した。

Magno-OT を Fluoro-Gold (FG) で選択的に標識するために、1 mL 注射器と 25G 注射針を用いて、2%FG (Fluorochrome、cat#526-94003) 生理食塩水 30 μ L を、片側または両側の眼窩静脈叢に投与した。FG 注入から少なくとも 24 時間以上経過したのち、組織化学解析のために脳組織を採取した。

2.10. PVH^{OT} ニューロンの光遺伝学的刺激

ChR2 を用いて PVH^{OT} ニューロンを活性化するために (図 16)、先行研究^{60, 61}のプロトコルに従って光遺伝学的な刺激を行った。AAV [AAV5 *EF1a-DIO-hChR2 (H134R)* - *EYFP-WPRE-HGHpA* or AAV5 *EF1a-DIO-EYFP*]投与 2 週間後に、光ファイバー (NA = 0.50、コア直径 = 400 μ m、京セラ) を PVH の上 (脳表面から腹側 4.5 mm) に両側から設置した。設置されたファイバーは歯科用のセメントで頭蓋骨に固定された。1 週間の回復期間を置いて、465 nm の青色レーザー光 (IOS-465、RWD 社製) を周波数 30Hz、パルス幅 10ms で 1 時間照射した。光ファイバー先端でのレーザー出力強度は 4-6 mW/mm² であった。7 日後、組織化学解析のために脳組織を採取した。

2.11. 組織学及び組織化学

OT-Cre、*OT-Cre ; Ai9*、*OT-Cre ; stop-hM3Dq* マウスの脳を以下に示す抗体で免疫標識した。マウスをイソフルラン過剰投与で麻酔し、PBS で灌流した後、4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde、PFA) in PBS で灌流した。脳組織は 4%PFA in PBS、4°Cで一晩後固定し、30%スクロース PBS 溶液で少なくとも 24 時間置換し、O.C.T.コンパウンド (Tissue-Tek、cat#4583) に凍結包埋した。クライオスタット (型番 CM1860 ; Leica) を用いて全脳の 30- μ m の冠状切片を得て、MAS コートスライドガラス (マツナミ、cat#MAS-13) 上に置いた。免疫標識には以下の一次抗体を用いた : rabbit anti-OT (1:500、IMMUNOSTAR、cat#20068) および goat anti-mCherry (1:500、Acris Antibodies GmbH、cat# ACR-AB0040-200-0.6)。一次抗体を以下の二次抗体で検出した : donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:250、Invitrogen、cat# A32790)、donkey anti-goat Alexa Fluor 555 (1:500、Invitrogen、cat# A32816)、および donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647 (1:250、Invitrogen、cat#A31573)。切片を DAPI (2.5 μ g/mL) で染色し、10 $\times$ 対物レンズ (開口数 0.4) を装着した Olympus BX53 顕微鏡を用いて画像化した。

2.12. *In situ* ハイブリダイゼーション (*in situ* hybridization、ISH)

蛍光 ISH は既述の方法で行った⁶²。具体的には、マウスをイソフルランで深麻酔し、PBS で灌流した後、4%PFA in PBS で固定した。脳は 4%PFA で一晩後固定した。クライオスタット (Leica) を用いて 30- μ m の冠状脳切片を作成した。cRNA プローブを作製するた

めに、C57BL/6J マウスゲノムまたは全脳 cDNA (Genostaff, cat#MD-01) から DNA テンプレートを PCR で増幅した。T3 RNA ポリメラーゼ認識部位 (5' - AATTAACCCTCACTAAAGGG) をリバースプライマーの 3' 末端に付加した。cRNA プローブ用の DNA テンプレートを作製するためのプライマーセットは以下の通りであった (1つ目がフォワードプライマー、2つ目がリバースプライマー) :

Esr2-1 5' - AGACAAGAACCGGCGTAAAA; 5'- CGTGTGAGCATTTCAGCATCT
Esr2-2 5' - CTCAATCTCGGGGTCTGAGT; 5'- CCAAGCAGGAAGAAAGAGGA
Tsc1-1 5' - AGGGGTTGCCTCACCTTACT; 5'- GGCACAGTCCTCCAACCTTA
Tsc1-2 5' - GGGTGGAGGCTTCTGTTTTA; 5'- ACCAGGGTGTCTGTGTCTC
Tsc1-3 5' - CTCAGTTTGCCTGCAGCAT; 5'- TGGCATCTGATTTGGATTGT
Sox5-1 5' - CCCTCCATGTGGGAATAGAA; 5'- CAAACTTGAGGGTGGCATTT
Sox5-2 5' - AACGCATACAATGTGAAAACAGA; 5'- GGGCTTTAACCCATTTTCTTC
Sema5a-1 5' - CCCAACAAATCAAGCCAAAT; 5'- ATTTGCACCAGGCTCTGAAT
Sema5a-2 5' - CTCCACCCCTTCATAATCCA; 5'- TGGTGCATCTTATTGGCAGA
Sema5a-3 5' - TGA CTTGACACCTGCTACGC; 5'- TGTTTCTTAAATGGCAGGGTTT
Prickle1-1 5' - GAGGACCGCAGCTCTCAAC; 5'- ACCGAGGCTTGAGCAGTTC
Prickle1-2 5' - CGCTAACGAGGAATTCTGGA; 5'- AGTCTGTCCTTGGCGGAGTA
Prickle1-3 5' - GACTCGTG GTGTTCTGTCCTC; 5'- ACAAGCAGTCACCTCATCCA
Ntrk2-1 5' - GACTGAGCCTGGAGATTTGC; 5'- CAAACCTGGAATGGAATGCT
Ntrk2-2 5' - TGCACACATGTAGTGTGTTTGTG; 5'- AGTGATGAATCCCTCCCAAC
Ntrk2-3 5' - ATTTTGCAGCCTACGCATTC; 5'- AGGGTGAGAGAAGCTGGTCA
ErbB4-1 5' - TGATGAGGACAATGACAAATGA; 5'- AGCATTCCAAAGGTGCTGAC
ErbB4-2 5' - TGGGGCAAATAGGAAATTGT; 5'- GCATTTGAAGGCAAAGGCTA
ErbB4-3 5' - CCTCCTGTGACTTTTGTGTTGGA; 5'- GTGCATGTGCCATGAATGAT
OT 5' -TGGCTTACTGGCTCTGACCT; 5'- AGGAAGCGCGCTAAAGGTAT
Esr1-1 5' - TAAGAAGAATAGCCCTGCCTTG; 5'- ACAGTGTACGCAGGAGACAGAA
Esr1-2 5' - AGGCATGGTGGAGATCTTTG ; 5'- AAGCCATGAGATCGCTTTGT
Fam19a1-1 5' - GCATTCATTTGGGGATTTCAC ; 5'- GCCAGAACGAGTTTCAGAGG
Fam19a1-2 5' - GCTACTGAATGCCTGGGAAA ; 5'- AAGAGATCCACTTGGCTTGC
Fam19a1-3 5' - TGTGAGGTGGCTGGTGTATC ; 5'- TCAGAGTGACCCACATGGAA
Htr2c-1 5' - GGTGCACCAGGCTTAATGAT ; 5'- GAGACAGGGGCATGACAAGT
Htr2c-2 5' - ATGCACATGACTGTGGTGGT ; 5'- AGCAGGTCCACGAATGAAAC
Htr2c-3 5' - CAGCTACTTGACACACCTTGG ; 5'- GCAGTCTGTTGCACGTGTCT

PCR で増幅した DNA 鋳型 (500-1000 ng) を、DIG (cat#11277073910) または Flu

(cat#11685619910) -RNA 標識ミックスと T3 RNA ポリメラーゼ (cat#11031163001) を用いて、製造元の説明書 (Roche Applied Science) に従って *in vitro* 転写を行った。シグナル／ノイズ比を高めるために、最大3つの独立した RNA プローブを混合した。anti-mCherry 染色と組み合わせた ISH では、ハイブリダイゼーションと洗浄の後、切片を西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 Dig (1:500, Roche Applied Science cat#11207733910) と goat anti-mCherry (1:500, Acris Antibodies GmbH, cat# ACR-AB0040-200-0.6) 抗体で一晩インキュベートした。シグナルは TSA-plus Biotin (AKOYA Bioscience, NEL749A001KT, 1:70、1× plus amplification diluent) で 25 分間増幅した後、洗浄し、donkey anti-goat Alexa Fluor 555 (1:500、Invitrogen, cat#A32816) で mCherry 陽性細胞を可視化した。

2.13. 定量化と統計：snRNA-seq データ

VPA データは RStudio Server v1.4.1717 と R v2.1.2 で行った。CNO データは RStudio Server 2023.06.1 Build 524 および R v4.3.1 で実施した。GO タームおよびパスウェイ解析は RStudio 2022.12.0+353 および R v4.2.2 で行った。snRNA-seq 解析に使用した統計学的検定および基準は、関連する方法の詳細セクションに記載されている。各実験の生物学的レプリケート数は、関連する図の凡例に記載されている。

2.14. 定量化と統計：組織化学および ISH データ

すべての画像解析は napari ソフトウェア (doi:10.5281/zenodo.3555620、napari version 0.4.15、Python version 3.8.0、Numpy version 1.23.1) を用いて行った。個々の Parvo-OT における anti-OT 免疫染色と RNA プローブの強度を評価するため、ブレグマから 1000-1120 μm 後方に位置する冠状切片を選択した。これらの領域は FG+ tdT+ (Magno-OT) の存在がほぼゼロであることを示す図 4f のデータに基づいて決定した。同様に、Magno-OT については、ブレグマから 520-640 μm 後方に位置する冠状切片を選択した。ここでは、ほぼすべての tdT+細胞が FG+であった。napari の labels ツールを利用し、これらの切片内に存在するすべての tdTomato-陽性、hM3Dq-mCherry-陽性、YFP-陽性細胞を関心領域 (ROI) として選択し、napari-skimage-regionprops (バージョン 0.5.3) を用いて各 ROI における蛍光強度を計算した。各条件について、少なくとも 3 匹の動物から OT ニューロンの ROI を 55-300 個無作為に集めた。最後に、バックグラウンドの蛍光強度を差し引き、補正した蛍光強度を用いて統計解析を行った。図 4g と図 5g の目盛りが異なっているのは、技術的な問題によりこれらの実験では anti-OT を検出するために使用した二次抗体が異なっていたためである。同様に、図 13c と図 16c の縮尺も異なる。

3. 結果

3.1. VPA マウスを用いた視床下部室傍核におけるオキシトシンの組織学解析

本研究ではまず、既報で知られている VPA 投与マウス^{40,46}の作出方法で社会性行動低下マウスが生まれるのかを 3 チャンバーテストで評価した (図 4a)。VPA 投与マウスは雄で強く表現型が見られるという報告を基に^{40,46}、実験では雄マウスのみを用いた。その結果、VPA を投与した雄 *OT-Cre* マウス⁴⁴は、有意に社会行動の低下を示した。具体的には、出生前に生理食塩水を投与されたコントロール群では、見慣れないマウスが入ったケージを調査する時間が、レゴブロックが入ったケージと比較して有意に長かったが、VPA 投与群ではこの嗜好性を示すことができなかった (図 4b)。

次に、血液脳関門の外に軸索投射を行うのは Magno-OT だけである⁷という事実に基づき、Magno-OT と Parvo-OT を軸索投射パターンで選択的に可視化するために、逆行性トレーサーである FG の静脈注射を行った (図 4c)。さらに、*OT-Cre; Ai9* (Cre 依存的な tdTomato レポーターマウスライン⁶³) ダブルノックインマウスを利用して、解析時の OT リガンド発現に関係なく、遺伝的な OT ニューロンを標識した。その結果、VPA 投与マウスでは tdTomato 標識細胞の総数に変化はなかった (図 4d)。先行研究²⁹と一致して、FG+ の Magno-OT は PVH の前側に、FG-と推定される Parvo-OT は後側に位置していた (図 4e、f)。anti-OT 抗体で検出された OT 発現細胞数は、VPA 投与群の Parvo-OT で選択的に減少した (図 4g、上)。蛍光強度の定量解析からは、VPA 投与群では両方のタイプの PVH^{OT} ニューロンで OT リガンド発現の有意な減少が示され、Parvo-OT ではより顕著な減少が見られた (図 4g、下)。これらの結果は、VPA 投与マウスにおける PVH^{OT} ニューロンの細胞消失の可能性を排除すると同時に、Parvo-OT に優先的な、タンパク質レベルでの OT 発現の減少を示している。

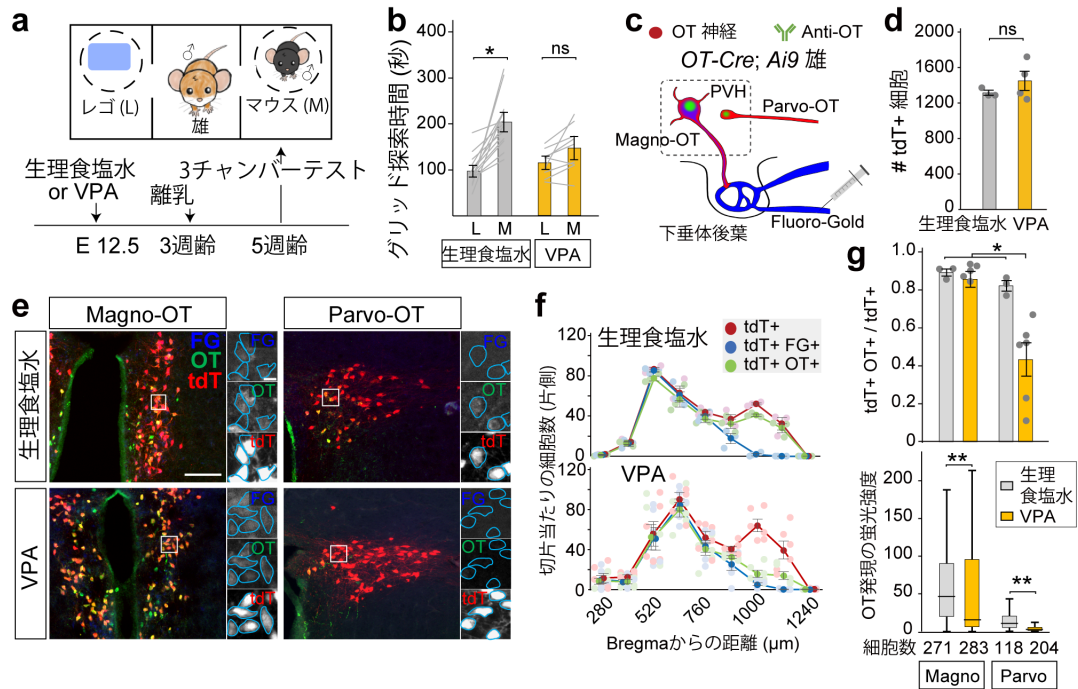


図 4. VPA マウスの社会行動低下と OT ニューロンの組織学的解析

a, 実験のタイムライン（下）と 3 チャンバーテストの模式図（上）。**b**, 物体（Lego block, L）と見慣れない雄マウス（M）をのグリッドの匂いを嗅いだり探索したりすることに積極的に関与した時間。生理食塩水群 N = 14、VPA 群 N = 9。*、 $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定。**c**, PVH^{OT} ニューロンの標識戦略を示す模式図。**d**, PVH における tdTomato (tdT+) 細胞の数。両側 Wilcoxon 順位和検定で差は認められなかった。生理食塩水群は N=3、VPA 群は N=4。**e**, tdT+, anti-OT 染色 (OT+)、および Fluoro-Gold (FG+) を示す PVH の典型的な冠状切片。スケールバー、低倍率画像は 200 μm 、拡大画像は 20 μm 。**f**, 1 スライスあたりの tdT+, tdT+ FG+, tdT+ OT+ 細胞の数。生理食塩水群および VPA 群ではそれぞれ N = 3 および 6。**g**, (上) tdT+ 細胞に対する tdT+ OT+ 細胞の割合。*、 $p < 0.05$ 。2 元配置 ANOVA と Tukey-Kramer 検定。生理食塩水群および VPA 群では N = 3 および 6。(下) 抗 OT 染色の蛍光強度。生理食塩水群と VPA 群それぞれ N = 3 匹から、表示された細胞数を数えた。箱内の線は中央値、枠の上辺と下辺は第 1 四分位点と第 3 四分位点、ひげは四分位点間の 1.5 倍までの最大値と最小値を示す。**、 $p < 0.01$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定と Bonferroni 補正。

エラーバーは標準誤差。

3.2. 母親の食事依存的な社会行動低下モデルマウスにおけるオキシトシンの組織学解析

これらの知見の一般性を調べるため、高脂肪食 (high-fat diet, HFD) を与えた母親から生まれた雄マウス (ここでは母体高脂肪食 (maternal high-fat diet, MHFD) 群と呼ぶ) でも同様の実験を行った (図 5a)。以前の研究³と一致し、MHFD 群は体重の表現型を伴わずに社会性行動の低下を示した (図 5b, c)。*Ai9* で遺伝的な OT ニューロンを標識しながら OT リガンド発現を定量すると、*Ai9* 標識細胞の総数に影響を与えることなく、PVH の前後軸全体に沿って anti-OT 免疫染色の有意な減少が観察された (図 5d-f)。Parvo-OT が存在する PVH の後側に注目すると、MHFD では OT リガンドを発現する細胞の数と蛍光強度が、普通食を与えたコントロール群と比べて有意に減少していた (図 5g)。これらの結果は、外因性または母性因子によって社会的行動の低下を示す 2 つの独立したマウスモデル

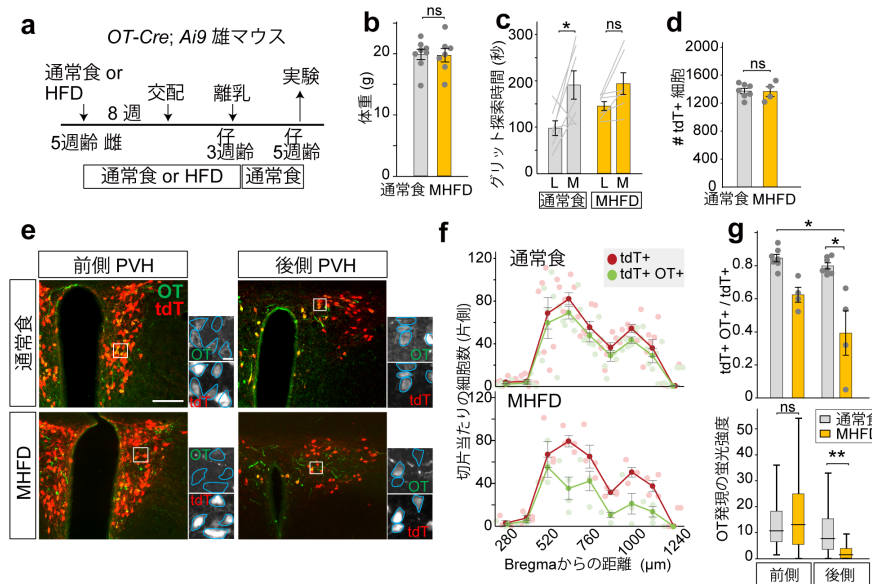


図 5. MHFD マウスの社会行動低下と OT ニューロンの組織学的解析

a, 実験のタイムライン。 **b**, 5 週齢時の体重。Wilcoxon 順位和検定で差はみられなかった。 **c**, 実験マウスがレゴブロック (L) と見慣れない雄マウス (M) を探索している時間。各 $N = 7$ 。*, $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定。 **d**, tdT+細胞の数。 **e**, tdT+と OT+を示す PVH の典型的な冠状切片。スケールバーは $200 \mu\text{m}$ 。 **f**, 1 スライスあたりの tdT+および tdT+ OT+細胞の数。 **g**, (上) tdT+細胞に対する tdT+ OT+細胞の割合。*, $p < 0.05$ 。二元配置分散分析と Tukey-Kramer 検定。(下) anti-OT 染色の蛍光強度。**, $p < 0.01$ 。Wilcoxon 順位和検定と Bonferroni 補正。

エラーバーは標準誤差。f の MHFD では前側 PVH で OT+細胞が減少しているが g の anti-OT 染色の蛍光強度では減少していない。これは実験者が OT+と判断した基準と蛍光強度にずれがあった為であると考えられる。

が、共通して Parvo-OT における OT リガンド発現の減少を示すことを示している。

3.3. オキシトシン神経を含む視床下部 PVH を用いた一細胞核トランスクリプトーム解析

次に、OT 発現の減少が mRNA レベルで起こっているのか、もし起こっているのであれば、遺伝子発現異常は *OT* 遺伝子に特異的なものか、それとももっと広範囲に及んでいるのかを調べることを目指した。さらに、OT ニューロンに限らず PVH 内またはその近傍に存在する他の神経細胞タイプへの影響を評価することも目指した。これらの問題を解決するため、VPA を投与した *OT-Cre; Ai9* 雄マウス 2 匹と、出生前に生理食塩水を投与されたコントロール雄マウス 4 匹から、PVH を含む視床下部領域を外科的に解剖した。10X Genomics 社の Chromium プラットフォームを用いて、VPA 投与群 10,060 細胞と生理食塩水投与群 3750 細胞の一細胞核 (sn) RNA-seq プロファイルを得た (図 3 および「材料と方法」を参照)。両群のシーケンスデータを組み合わせ、Cell Ranger⁶⁴ と Seurat⁶⁵ を用いて教師なしグラフベースのクラスタリングを行い、OT ニューロンが含まれる、小胞グルタミン酸トランスポーター2型 (*vesicular glutamate transporter type 2*, *vGluT2*, 遺伝子名は *solute carrier family 17 member 6*, *Slc17a6* として知られる) を発現する興奮性ニューロンを 30 クラスターに分類した (図 3a および図 6a)。VPA 投与群と生理食塩水投与群は各クラスター内で混在しており 2 群間の比較が可能であった (図 3a、d)。

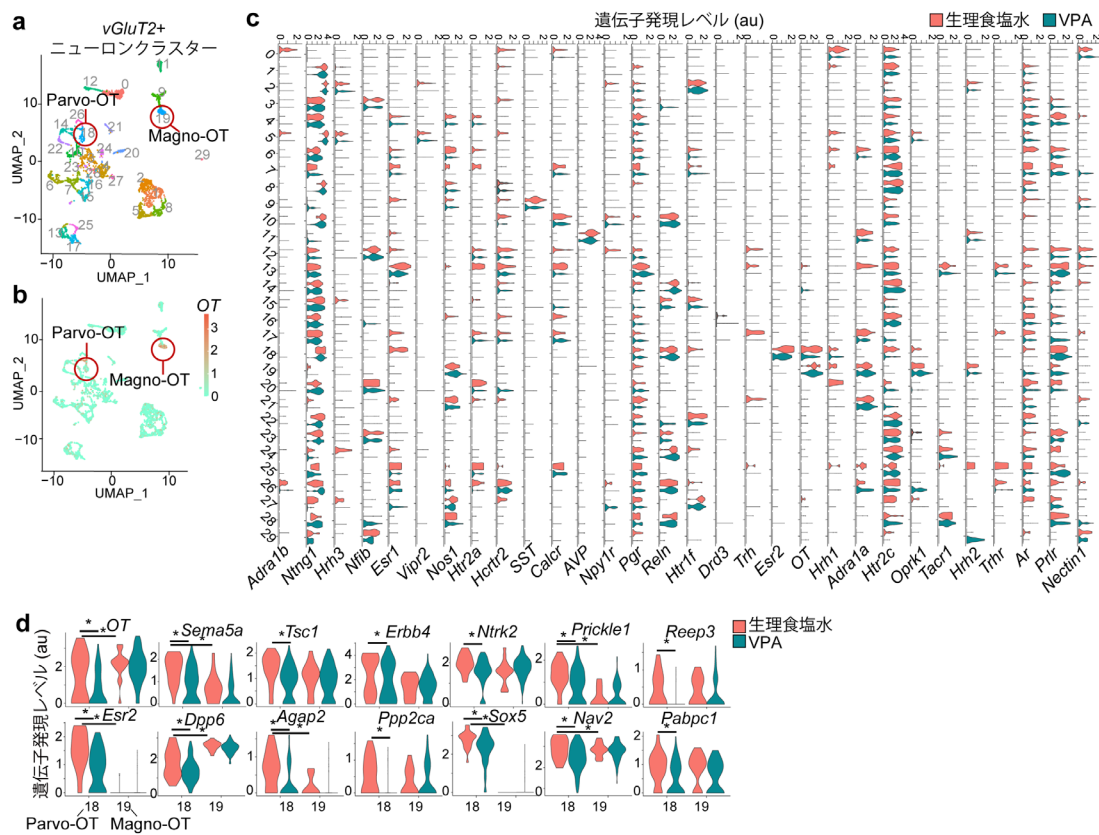


図 6. OT ニューロンを含む PVH^{vGluT2} ニューロンのクラスタリング

a, b, *vGluT2*+興奮性ニューロンクラスター(a)と *OT* 遺伝子発現の UMAP 表示、カラースケールは正規化された対数発現(b)を示す。**c,** *vGluT2*+ニューロンクラスター (a) 内で同定された 30 個のクラスターにおける、マーカー遺伝子の発現を示すバイオリンプロット。**d,** Parvo-OT (クラスター18) および Magno-OT (クラスター19) における、VPA 投与群で発現が低下した DEGs の発現を示すバイオリンプロット。*、 $p < 0.05$ 。Wilcoxon 順位検定。

OT 陽性クラスターは、*OT* 遺伝子の特徴的な発現により、容易に識別可能だった(図 6a、b)。先行研究⁷で概説された *Sox5*、エストロゲン受容体 2 型 (*estrogen receptor type 2*、*Esr2*)、*Reelin* 遺伝子を含む遺伝子発現の解析と、独自の *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) データ (図 7) に基づき、Parvo-OT (クラスター18) と Magno-OT (クラスター19) の PVH^{OT} ニューロンを同定することができた (図 6b、c)。VPA 投与群とコントロール群間における発現に差異のある遺伝子 (Differentially expressed genes、DEGs) は、1.4 倍以上の変化を示し、0.05 未満の偽発見率基準を満たすものと定義した (図 6d、図 8a)。注目すべきことに、*OT* 遺伝子自体の発現は、生理食塩水を投与したコントロールマウスと比較して、VPA 投与マウスの Parvo-OT で有意に減少しており (図 6d、図 8a)、観察された *OT* リガンド発現の低下 (図 4e–g) は、RNA 発現の減少の結果であることが示唆された。

上位 25 の *vGluT2*陽性 (+) クラスターには、さまざまな数の発現上昇 DEG と発現減少 DEG が見られた (図 8b)。さらに、各 *vGluT2*+クラスター内には、以前に ASD リスク因子遺伝子²²として判定された DEG が様々な数同定された (図 8c)。重要なことに、各クラスターにおいて ASD リスク因子 DEGs の異なるセットが発現しており、2つ以上のクラスターで共通する遺伝子はごく一部であった。例えば、Magno-OT と Parvo-OT では、ASD リスク因子 DEGs のセットが全く重複していなかった (図 8d)。これらのデータは、VPA が Parvo-OT の *OT*遺伝子だけでなく、PVH 内やその近傍の幅広い細胞クラスターにおいて、多様な ASD リスク因子遺伝子を含む多数の他の遺伝子にも影響を及ぼすことを示している。

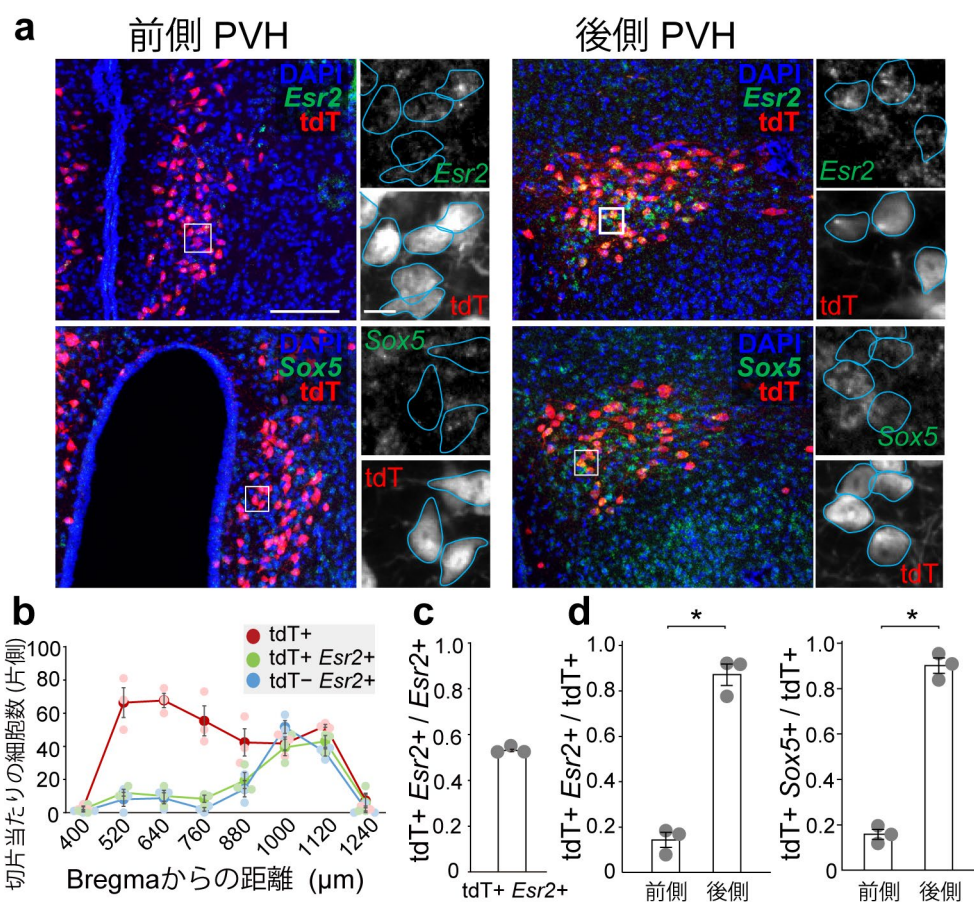


図 7. Parvo-OT に特徴的な遺伝子の ISH

a, 典型的な発育をした（生理食塩水を注射した）コントロール *OT-Cre; Ai9* マウスの PVH の前側および後側の典型的な冠状切片で、tdT+と図 6d で示された遺伝子の RNA 発現を示す。スケールバー、200 μm。 **b**, PVH の前後軸に沿ったスライスあたりの tdT+, tdT+ *Esr2*+, および tdT- *Esr2*+細胞の数。N = 3 マウス。 **c**, *Esr2*+細胞に対する tdT+ *Esr2*+細胞の割合。 **d**, *Esr2* (左) と *Sox5* (右) の tdT+細胞に対する二重標識細胞の割合。前側および後側の切片は、前後軸に沿って、ブレグマから後方 640-760 μm および 1000-1120 μm に対応する。各 N = 3。*, $p < 0.05$ 。Wilcoxon 順位和検定。

エラーバーは標準誤差。注目すべきことに、これらのマーカー遺伝子の分布は、Parvo-OT の細胞分布に似ている⁷。

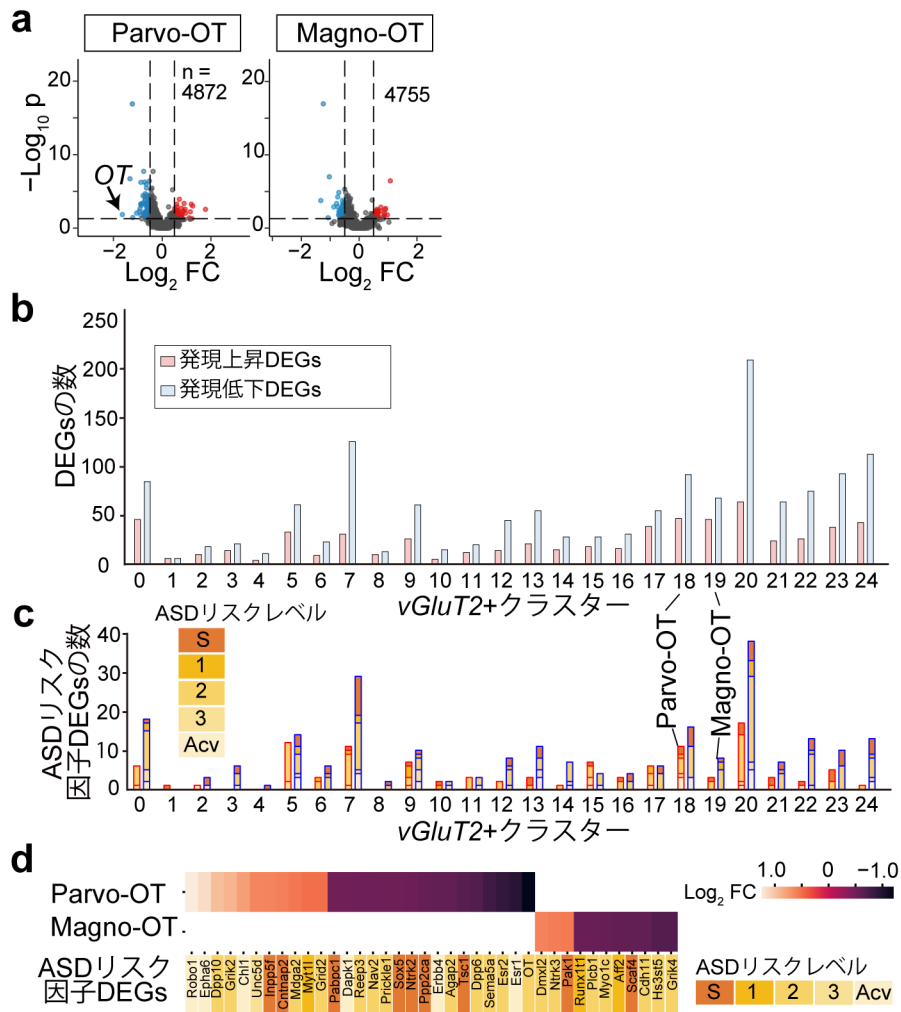


図 8. OT ニューロンを含む PVH *vGluT2* ニューロンの DEGs 解析

a, Parvo-OT および Magno-OT における DEGs (発現上昇、赤ドット；発現低下、青ドット) を表すボルケーノプロット。X 軸は $\log_2$ 変換した fold-change 比を表し、Y 軸は $\log_{10}$ 変換した p 値を表す。解析した遺伝子の数 (n) はパネルに示されている。 p 値は多重比較の調整なしの Wilcoxon 順位と検定に基づく。**b**, *vGluT2*+クラスター内の発現上昇 (赤) と発現低下 (青) の DEGs の数。クラスター 25-29 は核数が少なすぎる (57 未満) ため解析から除外した。**c**、発現上昇 DEGs (赤棒) と発現低下 DEGs (青棒) 内の ASD リスク因子 DEG の数。**d**, Parvo-OT および Magno-OT で見つかった ASD リスク因子 DEGs の対数変換した fold change のヒートマップ。グラフ (c) と遺伝子名 (d) のカラーコードは、ASD リスク¹⁴のランクを示している。

次に、上位 25 の *vGluT2*+クラスター内で見つかった DEGs について、遺伝子オントロジー (Gene Ontology, GO) 解析^{57,58}を行った (図 9a)。その結果、Parvo-OT (クラスター18) は、発現が上昇した DEGs と発現が低下した DEGs の両方において、有意に関連する GO の数が最も多かった (図 9a, b)。具体的には、Parvo-OT ではシナプス機能、行動制御、細胞内シグナル伝達に関わる DEGs が濃縮されているのに対し、アルギニン・バソプレシン (arginine vasopressin, AVP; クラスター11) ニューロンや Magno-OT (クラスター19) では、これらの機能との関連はほとんど見られなかった。さらに、発現が低下した DEGs をパスウェイ解析⁵⁹にかけたところ、Parvo-OT において、多様な生物学的機能を持つシグナル伝達経路に影響がみられ、影響を受けたパスウェイの数が最も多いことがわかった (図 9c 下)。これらの経路は、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / プロテインキナーゼ B (protein kinase B, Akt) シグナル伝達経路 (図 9d) に関与しており、脳におけるシナプス神経伝達と神経可塑性の細胞内統合に関連していた⁶⁶。ASD リスク因子遺伝子¹⁴は、この経路に主に濃縮されていた (図 9e)。対照的に、発現上昇した DEGs と有意に関連するパスウェイは、他の細胞クラスターでより濃縮されていた (図 9c)。独立した方法で DEGs を検証するため、Parvo-OT で見つかった発現量の低下した ASD リスク因子 DEGs の発現を、*in vivo* で ISH により可視化した結果、調べた 8 の遺伝子はすべて、mRNA 発現の有意な減少を示した (図 10)。特に、*ErbB4*、*Ntrk2*、*Tsc1* といった PI3K/Akt 経路関連遺伝子の発現低下が確認された。これらの結果は、VPA 投与マウスにおける Parvo-OT の脆弱性は DEGs の数やヒトで同定された ASD リスク因子 DEGs の数によって特徴付けられるのではなく、重要な神経機能やシグナル伝達経路への特異的な影響によって特徴付けられている可能性があることを示唆している。一方先行研究では Parvo-OT には ASD リスク因子遺伝子の濃縮発現が見られることから¹⁴、なぜ Parvo-OT が脆弱性を持つのかは遺伝的な社会的行動低下モデルマウスを含めて広く調査する必要がある。

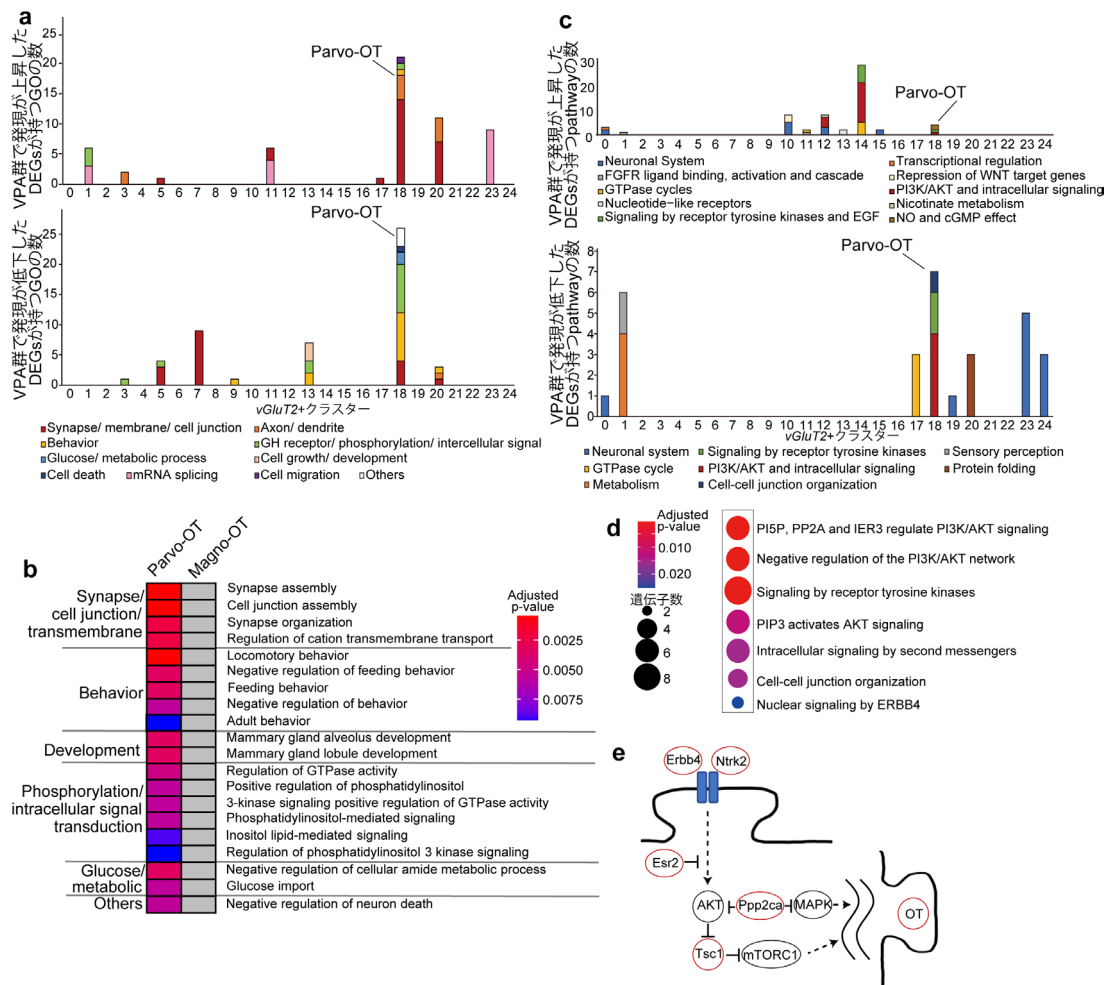


図 9. OT ニューロンを含む PVH^{vGluT2} ニューロンの高次解析

a, 上位 25 の *vGluT2*+ クラスター内の DEGs と有意な関連を示した GO の数 ($p < 0.01$)。 **b**, Parvo-OT と Magno-OT で発現低下した DEGs を用いた GO 解析の p 値のヒートマップ。 p 値は Benjamini-Hochberg 補正を用いた片側 Fisher's exact test に基づく。

c, 上位 25 の *vGluT2*+ クラスター内の DEGs と有意な関連を示したパスウェイの数 ($p < 0.05$)。 **d**, Parvo-OT で発現低下した DEGs を用いたパスウェイ解析の p 値のヒートマップ。 p 値は Benjamini-Hochberg 補正を用いた片側 Fisher's exact test に基づく。 **e**, Parvo-OT で発現低下した DEGs に基づき、影響を受けたと考えられるシグナル伝達経路を示す模式図。赤丸は ASD リスク因子 DEGs を強調している。これらの経路は過去の文献^{56, 59, 61, 67}に基づいて描かれている。

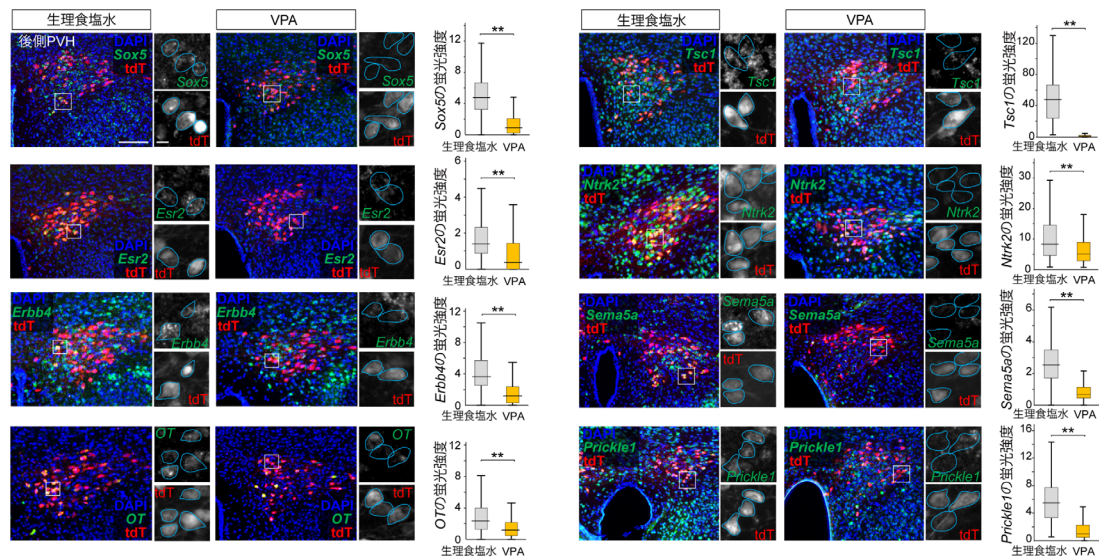


図 10. Parvo-OT において発現が低下した代表的な ASD リスク因子 DEGs (*Sox5*, *Esr2*, *Erbb4*, *OT*, *Tsc1*, *Ntrk2*, *Sema5a*, *Prickle1*) の *in vivo* ISH と蛍光強度の定量
OT-*Cre*;*Ai9* マウスの、Parvo-OT が存在する後側 PVH の典型的な冠状切片で、tdTomato と ISH による遺伝子の mRNA 発現を示す。スケールバー、200 μ m. 各条件について 3 匹の動物から 100-300 個の細胞を解析し、個々の細胞について遺伝子に対する ISH 染色の蛍光強度を定量化した。**, $p < 0.01$. Wilcoxon 順位和検定。

加えて、PVH 内またはその近傍の抑制性ニューロンにおける遺伝子発現プロファイル異常の可能性を調査した。グルタミン酸デカルボキシラーゼ 2 型 (*glutamate decarboxylase type 2*, *GAD2*) 遺伝子陽性の抑制性神経細胞集団は 17 のクラスターに分けられた (図 11a, b)。*GAD2* 陽性クラスターには、様々な数の発現上昇 DEGs と発現低下 DEGs、ASD リスク因子 DEGs が見られた (図 11c, d)。GO 解析を行うと、*GAD2* 陽性クラスターの中でもクラスター 10 (エストロゲン受容体 1 型、*estrogen receptor type 1*, *Esr1* 陽性クラスター) とクラスター 11 (チロトロピン放出ホルモン受容体遺伝子、*thyrotropin-releasing hormone receptor*, *Thr* 陽性クラスター) では、シナプス機能や感覚機能など、多様な GO が特に濃縮されていた (図 11e)。これらの神経細胞もまた、VPA 投与マウスで観察された社会的行動異常に寄与している可能性がある。しかし、OT リガンドが GABA ニューロンの成熟に関与していることが先行研究で報告されていることから⁶⁸、*GAD2* 陽性クラスターのトランスクリプトーム変化は Parvo-OT の異常による可能性も否定できない。

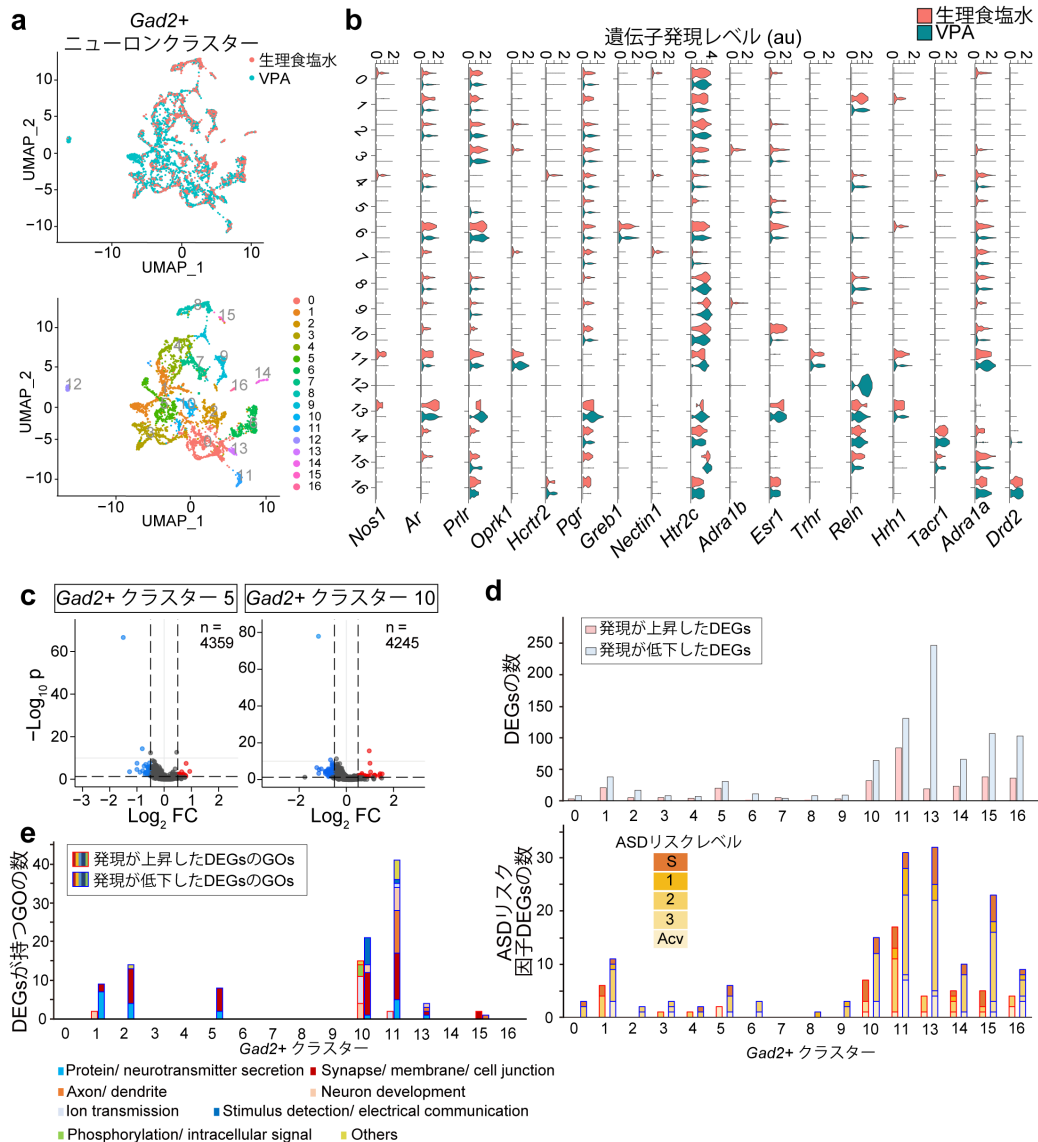


図 11. PVH^{GAD2} ニューロンのクラスタリングと DEGs 解析

a, (上) *GAD2*+ニューロンクラスターの生理食塩水群と VPA 群を示した UMAP。(下) *GAD2*+ニューロンクラスター内の 17 クラスタを示した UMAP。**b**, *GAD2*+ニューロンクラスター内で同定された 17 のクラスターのマーカー遺伝子発現レベルを示したバイオリンプロット。特に、クラスター12は VPA 群に特異的で、*Reelin* (*Reln*) 遺伝子の高発現が特徴である。**c**, 図 7a と同様に、クラスター5 (左) とクラスター10 (右) において、発現が上昇した (赤) と低下した (青) DEGs をボルケーノプロットで表した。**d**, (上) *GAD2*+クラスター内で発現上昇 (赤) あるいは発現低下 (青) した DEG の数。クラスター12は VPA 群に特異的であるため、この解析から除外した。(下段) 発現上昇 (赤) と発現低下 (青) DEGs 内の ASD リスク因子 DEGs の数。**e**, *GAD2*+クラスター内の DEGs と有意な関連 ($p < 0.01$) を示す GO の数。

まとめると、胎児期の VPA 暴露が遺伝子発現に与える影響は、細胞種特異的かつ不均一であることが示唆された。特に、重要な神経機能に関連する特定の遺伝子発現ネットワークは、Parvo-OT を含む PVH 内およびその近傍のいくつかの特定の細胞タイプにおいて、選択的に脆弱であることが示唆された。

3.4. オキシトシン神経の薬理遺伝学的興奮による社会的行動の促進

PVH^{OT} ニューロンの化学遺伝学的活性化⁶⁹は、げっ歯類モデル、特に *Cntnap2* 欠損マウス^{35, 36}や *Shank3* 欠損ラット⁷⁰において、社会的行動^{37, 71}を促進させる可能性があるとして広く用いられてきた。同様に、OT の経鼻または腹腔内投与は、*Shank3b* 欠損マウス⁴、*Maged1* 欠損マウス³⁸、近交系マウス系統 (BALB/cByJ および C58/J)⁷³、および VPA 処理ラット²¹において、社会的行動に好影響を与えることが報告されている。しかし、社会的行動が促進された時、PVH^{OT} ニューロンの遺伝子発現異常にどのような影響があるのかは不明である。OT の経鼻投与や腹腔内投与は、迷走神経求心路の G タンパク質共役型受容体 (G protein coupled receptor, GPCR) である OT 受容体細胞を介して内因性 OT ニューロンを活性化すると想定される⁴²。しかし社会的行動の低下モデルで内因性 OT ニューロンや中枢性 OT 受容体⁷³が活性化するのは不明であり、活性化したとしてもごく一部しか活性化しない可能性があることから、本実験では化学遺伝学的活性化の戦略を採用した。まず、AAV ベクターを用いて、VPA を投与した *OT-Cre* マウスの PVH^{OT} ニューロンに hM3Dq-mCherry⁴³を導入した。これは人工的なリガンドのみで活性化される人工受容体 (designer receptors exclusively activated by designer drugs、DREADD) 技術を使用して神経活動の特異的かつ可逆的に調節する手法であり、ムスカリン性 GPCR を変異させて天然リガンドに結合する能力を失わせた一方で、薬理的に不活性なリガンドであるクロザピン-N-オキシド (CNO) に結合する能力を持つ。hM3Dq は Gq シグナル伝達経路を活性化させる DREADD に対して命名されたもので、本実験で AAV により導入された遺伝子カセットは Cre 依存的に発現するように設計されており⁴³、領域と細胞種の両方をコントロールして特定の細胞集団のみ興奮させることが出来る。本実験では PVH^{OT} ニューロンを選択的に興奮させた。コントロール群には mCherry のみを発現するウイルスを用いた。さらに、胎児期に VPA ではなく生理食塩水を投与した hM3Dq 発現コントロール群も準備した (図 12a)。5 週齢時の 3 チャンバーテストで評価した社会行動は、生理食塩水投与群では CNO による影響を受けなかった (図 12b)。hM3Dq のみを発現させて CNO を投与しなかった VPA 投与マウス、mCherry を発現させて CNO を投与した VPA 投与マウスでは、社会的行動の低下が観察された。しかし、hM3Dq 発現 VPA 投与マウスに CNO を単回投与すると、社会的行動が促進された (図 12b、右、VPA, hM3Dq, CON のパターンはグラフに書き込まれている)。このように、PVH^{OT} ニューロンを化学遺伝学的に活性化は VPA 投与マウスの社会的行動に好影響を与え、VPA 投与マウスのみで社会的行動が促進された。

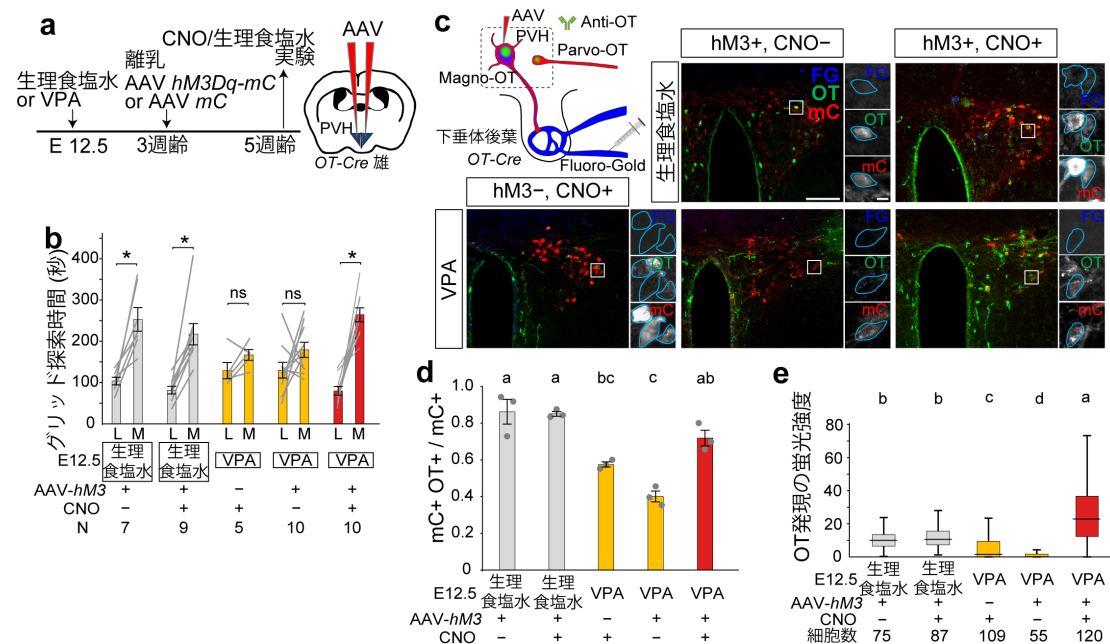


図 12. AAV を用いた PVH^{OT} ニューロンの薬理遺伝学的操作

a, 実験タイムラインとウイルス注入の模式図。mC, AAV から mCherry。

b, マウスがレゴブロック (L) と見慣れない雄マウス (M) を探索する時間。動物数 (N) はパネルに示されている。*, $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定、Bonferroni 補正。c, mCherry (hM3Dq またはコントロール) および anti-OT 染色 (OT+) を示す後側 PVH の Parvo-OT (FG-) を含む典型的な冠状切片。d, e, hM3Dq-mCherry+細胞 (d) に対する hM3Dq-mCherry+ OT+細胞の割合 (各 N = 3 マウス) と、個々の傍細胞 PVH^{OT} ニューロンにおける抗 OT 染色の蛍光強度 (e)。N = 3 匹ずつから、表示された細胞数を数えた。グラフ上部の異なる文字 (a-d) は、一元配置 ANOVA に Tukey-Kramer ポストホック検定を加えたもの (d) と、一元配置 ANOVA に Bonferroni 補正を施したポストホック t 検定を加えたもの (e) により、 $p < 0.05$ の有意差を示す。

スケールバー、低倍率画像は 200 μ m、拡大画像は 20 μ m。

エラーバーは標準誤差。

次に、hM3Dq 発現 VPA マウス、mCherry 発現 VPA マウスそして hM3Dq 発現生理食塩水投与コントロールマウスを用いて、CNO を単回投与して 1 週間後の個体で組織化学解析を行い、OT リガンド発現を定量化した。胎児期に生理食塩水を投与したコントロール群では、CNO の投与は OT リガンドの発現レベルに有意な影響を与えなかった (図 12 c-e)。対照的に、VPA 投与群へ CNO を投与してニューロンを化学遺伝学的に活性化すると FG-推定 Parvo-OT における OT リガンドの発現低下は有意に回復した (図 12c-e)。この回復

の時間経過を評価するため、CNO 単回投与後 2.5 時間、1 日、3 日、1 週間後に得られた脳サンプルを分析した (図 13a)。その結果、FG-の推定 Parvo-OT における OT リガンド発現は、CNO 投与後 2.5 時間と 1 日では変化していなかった。その後、OT リガンドの発現は徐々に有意に増加した (図 13b、c)。これらの結果は、青年期に PVH^{OT} ニューロンを単回、化学遺伝学的に神経刺激するだけで、Parvo-OT における異常な OT リガンド発現を長期にわたって回復するのに十分であることを示している。OT リガンド発現が回復する前に社会性の促進がみられるが、これは Parvo-OT に残っていた僅かな OT が神経興奮によって強制的に放出されたのだと推察できる (図 13b、c)。また OT 発現レベルと社会行動の間に明確な相関はみられなかったが、これはおそらく 3 チャンバーテストによる定量の限界を示していると考えられる (図 14)。

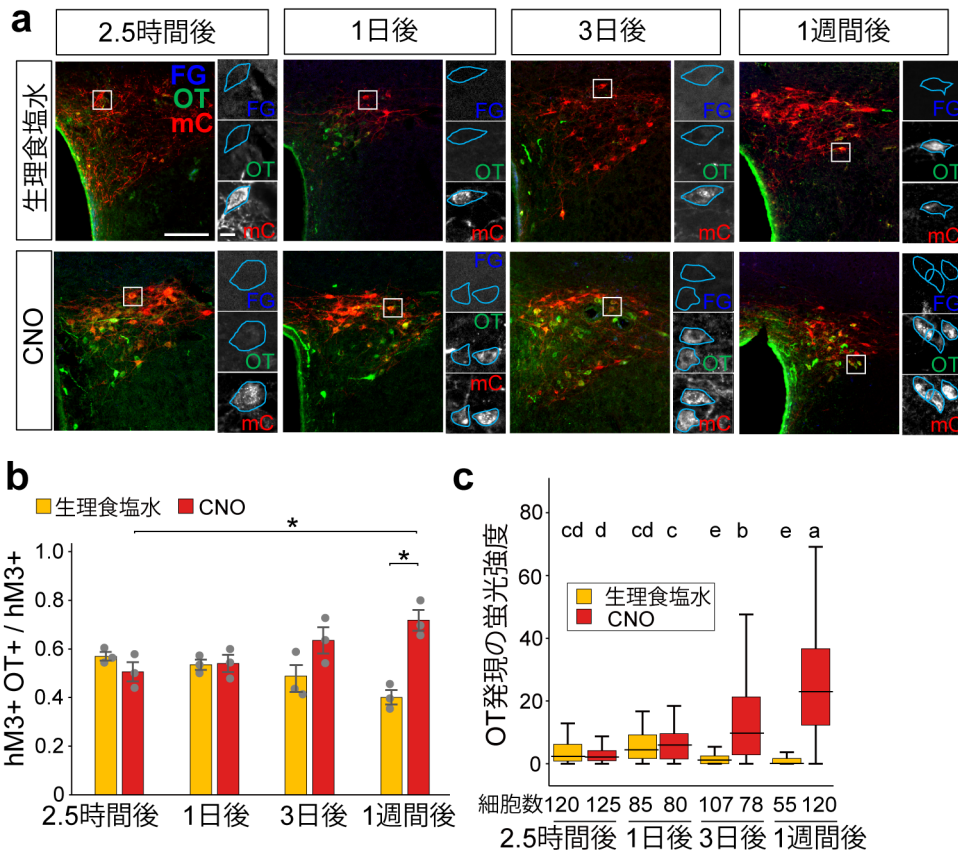


図 13. 薬理遺伝学的操作による OT リガンド発現回復のタイムコース

a, hM3Dq-mCherry+細胞に対する hM3Dq-mCherry+OT+細胞の割合の時間経過解析の組織像。**b**, hM3Dq-mCherry+細胞に対する hM3Dq-mCherry+OT+細胞の割合の時間経過解析。*, $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定。各 $N = 3$ 匹。**c**, 個々の Parvo-OT における anti-OT 染色の蛍光強度。各 $N = 3$ 匹から、図示された細胞数を数えた。グラフ上部の異なる文字(a-e)は、二元配置分散分析(ANOVA)と Bonferroni 補正を用いたポストホック t 検定により、 $p < 0.05$ の有意差を示す。

スケールバー、低倍率画像は $200 \mu\text{m}$ 、拡大画像は $20 \mu\text{m}$ 。

エラーバーは標準誤差。

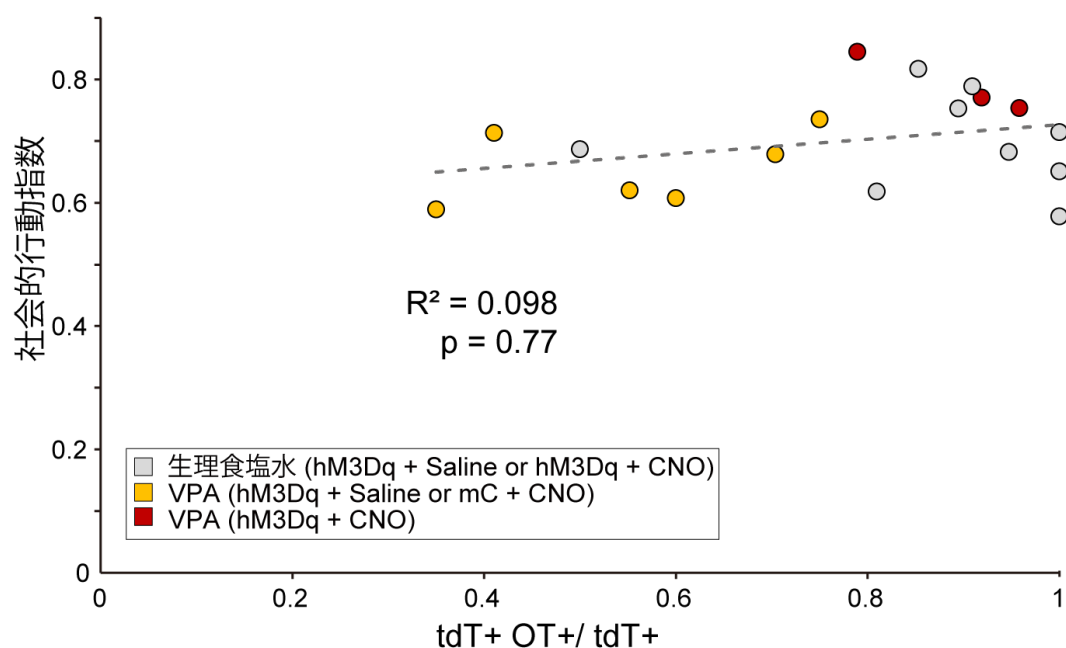


図 14. OT レベルと社会行動の関係

社会的行動指数（マウスグリッドの調査に費やした時間の割合を全調査時間で正規化したものと定義）と OT 発現の割合との相関。図 12 a-c および図 13a-c に示した動物のサブセットを用い、生理食塩水または CNO 投与 2.5 時間後に犠牲にした。この時間枠内では、OT 発現の有意な変化は観察されなかった（図 13b、c）。全体として、これらのデータは、社会的行動指数と OT 発現の割合との間に明確な相関があることを支持するものではなかった。VPA を投与したコントロール群（黄色の点）は社交性の低下と OT 発現の低下を示し、VPA を投与し AAV で hM3Dq を発現させ 5 週齢で CNO を投与した群（赤色の点）は OT 発現と社交性の促進を示したが、コントロールの生理食塩水投与群は社会的行動に高い変動性を示した。この結果は、コントロールの生理食塩水投与群には OT の発現レベルが高くても社会的行動が多いとはいえない個体が存在すること示唆している。3 チャンバーテストは複雑な個性まで定量することは出来ないで、これは 3 チャンバーテストによる定量の限界を示していると考えられる。

3.5. オキシトシン神経の興奮による非社会行動への影響と長期的な社会的行動の促進

次に、CNO の単回投与が社会的行動に持続的な好影響を与えるかどうか、また、出生前の VPA 暴露によって誘発される非社会的な行動の変化⁴⁰にも影響を与えるかどうかを調べるため、CNO 投与 1 週間後の VPA 投与かつ hM3Dq 発現雄マウスの行動を分析した (図 15a)。非社会的行動の指標として、マウスの反復強迫様行動を反映するビー玉埋没試験⁵⁶を行った。これまでの知見⁵⁶と一致して、VPA 投与群は生理食塩水投与コントロール群よりも有意に多くのビー玉を埋めた。しかし、これらの行動は CNO の単回注射後 1.5 時間経過しても変化しなかった (図 15b)。対照的に、3 チャンバーテストの結果は CNO 投与 1 週間後でも社交性の有意な促進を示した (図 15c)。このように、CNO の単回投与は、社会的行動に対する持続的なプラスの効果を維持しながら、非社会的行動の変化を元に戻すことはなかった。ただし、長期的な非社会的行動の変化は調査していないので、非社会的行動が長期的には変化する可能性は残されている。

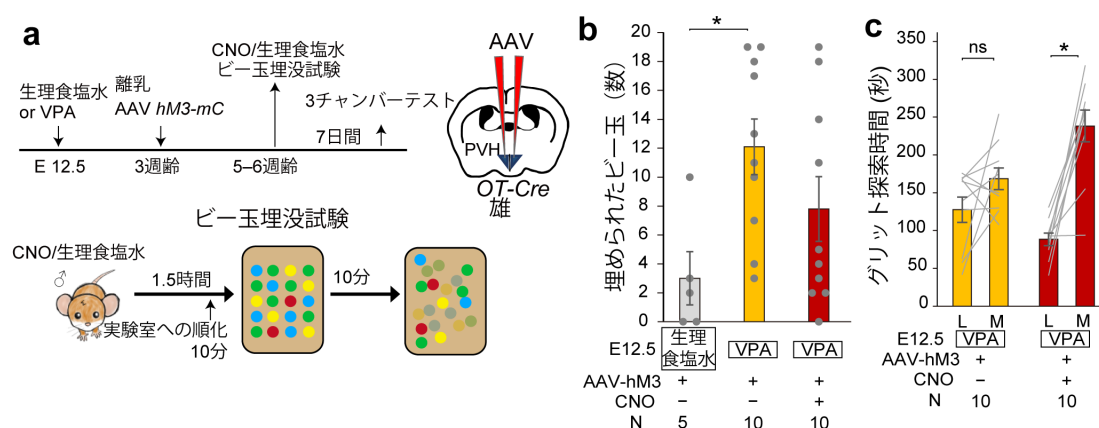


図 15. 薬理遺伝学的操作による非社会行動の変化及び長期的な行動変化

a, (上) 実験タイムラインとウイルス注入の概略図。(下) ビー玉埋没試験の模式図。 **b**, 3 つの実験群におけるビー玉埋没数。この試験は CNO または生理食塩水投与 1.5 時間後に行った。動物数 (N) はパネルに示されている。*, $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定と Bonferroni 補正。 **c**, ビー玉埋没試験の 1 週間後に行った 3 チャンバーテストにおいて、マウスがレゴブロック (L) と見慣れない雄マウス (M) を探索した時間。動物数 (N) はパネルに示されている。*, $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定と Bonferroni 補正。

エラーバーは標準誤差。

3.6. オキシトシン神経の光遺伝学的興奮による社会的行動の促進

さらに、PVH^{OT} ニューロンの光遺伝学的刺激によって OT リガンドの発現が回復するかどうかを調べた。この実験では、光ファイバーを用いて VPA を投与した雄マウスの PVH^{OT}

ニューロンを 30Hz で 1 時間、光遺伝学的に刺激した (図 16a)。刺激の 1 週間後、Parvo-OT の分布領域である PVH 後側の PVH^{OT} ニューロンで OT リガンド発現の有意な増加が観察された (図 16b、c)。これらのデータは、OT 発現の回復には光遺伝学的刺激でも十分であることを示唆している。

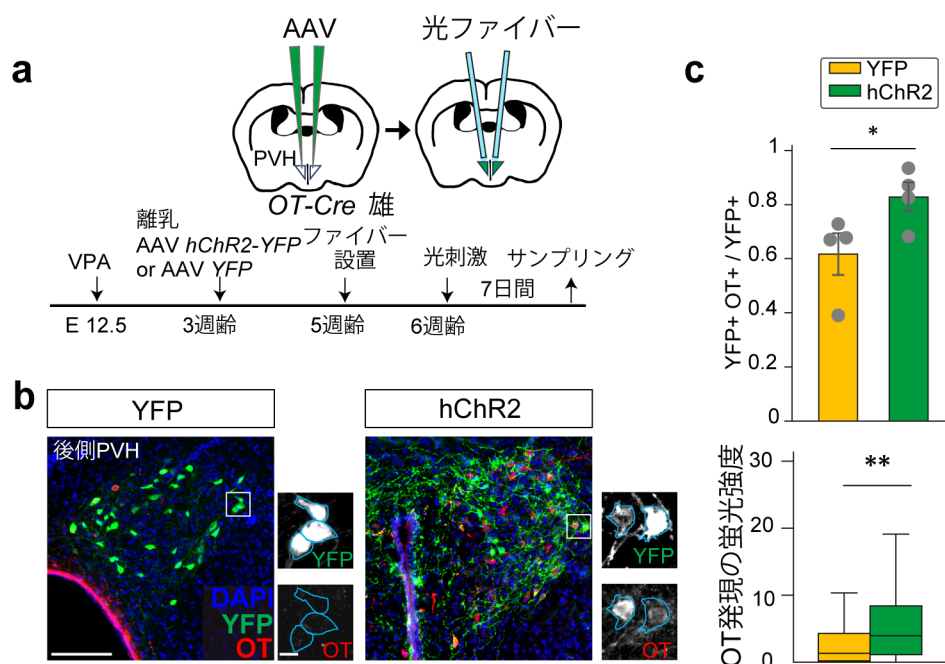


図 16. 光遺伝学的操作による OT リガンドの発現回復

a, 実験タイムラインとウイルス注入とファイバー設置の模式図。**b**, VPA を投与した OT-Cre 雄マウス (7 週齢) の PVH^{OT} ニューロンに対する光遺伝学的刺激 (30Hz、1 時間) の 1 週間後の後側 PVH の代表的な冠状切片。スケールバー、低倍率画像は 200 μ m、拡大画像は 20 μ m。**c**, (上) YFP+細胞中の YFP+ OT+細胞の割合。*、 $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定。(下) 抗 OT 染色の蛍光強度。箱内の線は中央値、枠の上辺と下辺は第 1 四分位数と第 3 四分位数、ひげは四分位数間の 1.5 倍の範囲内の最大値と最小値を示す。**、 $p < 0.01$ 。Wilcoxon 順位和検定と Bonferroni 補正。

エラーバーは標準誤差。

この実験では染色条件が図 13c と異なるため、強度データが比較できない。しかし、蛍光強度は、PND 2 (生後 2 日目) での化学遺伝学的活性化後、5 週齢で OT 発現を測定した図 19g と比較することができる。光遺伝学的刺激後の後側 PVH の OT 強度は、薬理遺伝学的活性化で達成された強度よりも一般的に弱いことが観察され、Gq シグナルが VPA 投与マウスにおける OT 発現の回復にさらなる有益な効果を及ぼす可能性が示唆された。

3.7. オキシトシン神経への早期介入による社会的行動の促進

AAV を用いた OT ニューロンの刺激実験で観察された長期的な効果を考慮すると、新生児期に OT ニューロンを化学遺伝学的に刺激することで、社会的行動低下への早期介入モデルとして機能する可能性があると考えた。新生児マウスにおける VPA 投与の影響を調べるため、PND2 (生後 2 日目) の *OT-Cre; Ai9* 雄マウスの PVH の切片を調べたところ、生理食塩水投与マウスと VPA 投与マウスの両方で同程度の数の tdTomato 陽性細胞が観察され、新生児期の PVH^{OT} ニューロンにおける Cre による組み換えの存在を示した (図 17a-c)。一方で生後 5 週齢のデータ (図 4) と比べると tdTomato 陽性細胞の数は少なかった。さらに、生後 5 週齢のデータ (図 4) とは対照的に、VPA 投与群では PND 2 の時点で PVH の前後軸全体にわたって OT リガンド発現細胞数は変化していなかった (図 17a, b, d) ことから、Parvo-OT における OT 発現の減少は PND 2 以降に起こることが示唆された。

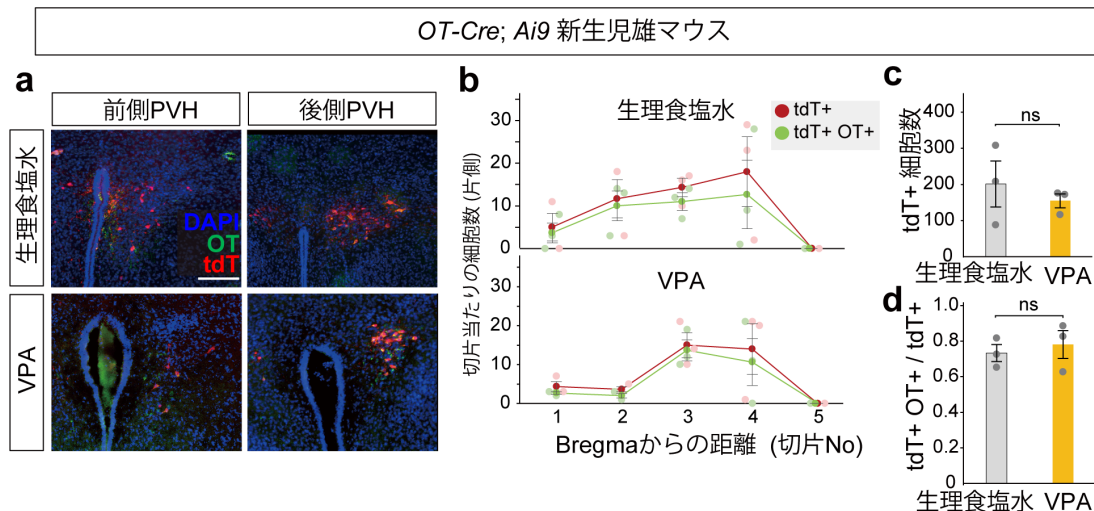


図 17. 生後 2 日の新生児マウスにおける PVH^{OT} ニューロンの解析

a, 生理食塩水 (上) または VPA (下) 注射を出生前に受けた PND 2 の *OT-Cre; Ai9* 雄マウスの PVH 前側および後側の典型的な冠状切片。スケールバー、200 μ m. **b**, PVH の前後軸に沿ったスライス 1 枚あたりの tdT+細胞と tdT+ OT+二重陽性細胞の数. **c**, tdT+細胞の数。両側 Wilcoxon 順位和検定で、生理食塩水群と VPA 群との間に有意差は認められなかった ($N = 3$)。 **d**, tdT+細胞に対する tdT+ OT+細胞の割合。両側 Wilcoxon 順位和検定で有意差は認められなかった ($N = 3$)。 エラーバーは標準誤差。

PND2 における OT ニューロンの化学遺伝学的活性化の影響を調べるため、*OT-Cre* マウスと、Cre 依存的に hM3Dq-mCherry を発現するマウス系統を交配し、ダブルヘテロ雄マウスを作製した⁷⁴。組織化学的解析により、これらのマウスにおける hM3Dq 発現の特異

性を確認した (図 18a-d)。そこで、OT-Cre マウスと、Cre 依存的に hM3Dq-mCherry を発現するマウス系統を交配して E12.5 で VPA を投与し、PND 2 に CNO を投与した。コントロール群として、PND2 で生理食塩水を投与したグループを用いた (図 19a)。その後、生後 5 週齢で 3 チャンバーテストを用いて社会行動を評価した。その結果、CNO 投与群では生理食塩水を投与したコントロール群と比較して、社会的行動が促進されていることが観察された (図 19b)。PND 2 での CNO 投与によって hM3Dq 発現 PVH^{OT} ニューロンの数は変化しなかったが、hM3Dq を発現した PVH 後側の PVH^{OT} ニューロンにおける OT リガンド発現は、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して有意に回復した (図 19c-g)。これらの結果は、VPA を投与したマウスの新生児期に OT ニューロンを標的に神経刺激することで、青年期の社会的行動が促進され、さらに OT リガンド発現が回復することを示しており、社会的行動の低下に早期に介入するためのモデルを提供する。

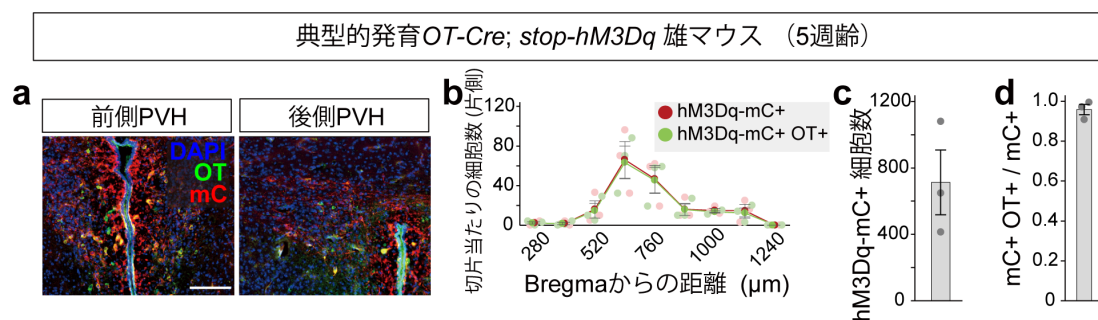


図 18. OT-Cre; stop-hM3Dq 雄マウスの hM3Dq 発現解析

a, E12.5 で生理食塩水を投与された典型的発育 OT-Cre; stop-hM3Dq 雄マウス (5 週齢) の PVH 前側および後側の典型的な冠状切片。スケールバー、200 μm。 **b**, PVH の前後軸に沿ったスライスあたりの hM3Dq-mCherry+細胞と hM3Dq-mCherry+ OT+二重陽性細胞の数。この分布は OT-Cre; Ai9マウスで観察された分布と類似しており、hM3Dq が Magno-OT と Parvo-OT の両方で発現していることを示唆している。各 N = 3 匹。 **c**, hM3Dq-mCherry+細胞の数。図 19e の VPA 投与群と同程度であるが、図 4d の OT-Cre; Ai9マウスで観察された tdT+細胞の数よりは少ない。 **d**, hM3Dq-mCherry+細胞よりも hM3Dq-mCherry+OT+細胞の割合が高いことから、PVH^{OT} ニューロンにおける導入遺伝子発現の特異性は高い。

エラーバーは標準誤差。

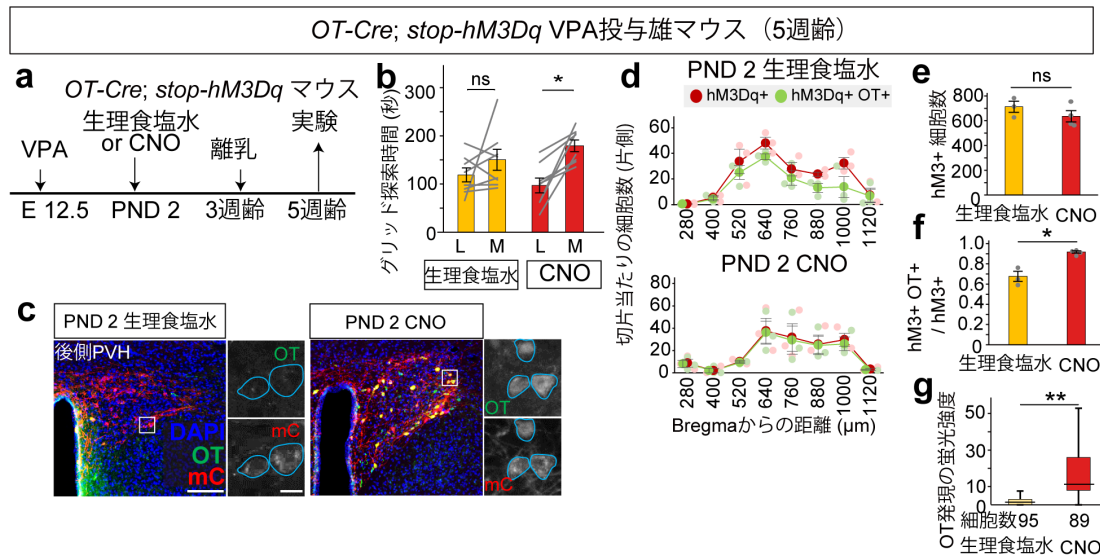


図 19. *OT-Cre; stop-hM3Dq* 雄 VPA マウスを用いた PND2 での OT ニューロン刺激実験

a, 実験のタイムライン。 **b**, 実験マウスがレゴブロック (L) と見慣れない雄マウス (M) を探索する時間。生理食塩水群と CNO 群で各 $N = 8$ 。*, $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定。 **c**, mCherry 染色 (hM3Dq の推定) と anti-OT 染色 (OT+) を示す後側 PVH の代表的な冠状切片。スケールバー、低倍率画像は $200 \mu\text{m}$ 、拡大画像は $20 \mu\text{m}$ 。 **d**, hM3Dq-mCherry+ および hM3Dq-mCherry+ OT+ 細胞のスライスあたりの数。 **e**, hM3Dq-mCherry+ (hM3) 細胞の数。両側 Wilcoxon 順位和検定で有意差は認められなかった。 **f**, hM3Dq-mCherry+ 細胞に対する hM3Dq-mCherry+ OT+ 細胞の割合。*, $p < 0.05$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定。生理食塩水群は $N = 3$ 、CNO 群は $N = 4$ (d-f)。 **g**, 図 4g と同様 Parvo-OT が存在する後側 PVH の、個々の細胞における anti-OT 染色の蛍光強度。箱内の水平線は中央値を示し、枠の上下は第 1 四分位数と第 3 四分位数を示し、ひげは四分位数間の 1.5 倍の範囲内の最大値と最小値を示す。 $N = 3$ 匹ずつから、表示された細胞数を数えた。**, $p < 0.01$ 。両側 Wilcoxon 順位和検定順位和検定。エラーバーは標準誤差。

3.8. オキシトシン神経への早期介入を行った個体を用いた視床下部 PVH の一細胞核トランスクリプトーム解析

次に、新生児 OT ニューロン刺激が PVH 細胞集団の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのかを調べた。E12.5 で VPA を投与し、PND2 で CNO またはコントロールとして生理食塩水を投与した *OT-Cre; stop-hM3Dq* 雄マウスを用いて、5 から 7 週齢で snRNA-seq を行った (図 20a)。CNO 投与群では 4635 個、生理食塩水投与群では 4245 個の細胞の snRNA-

seq プロファイルを得た。マーカー遺伝子の発現に基づいて、*vGluT2*+ クラスターを図 6b のデータに基づいて以前に同定した細胞クラスターのいずれかに分類し (図 20b、d-f、赤文字は図 6b で示したクラスターに対応)、小細胞および大細胞 PVH^{OT} ニューロンを同定した (図 20 b-e)。

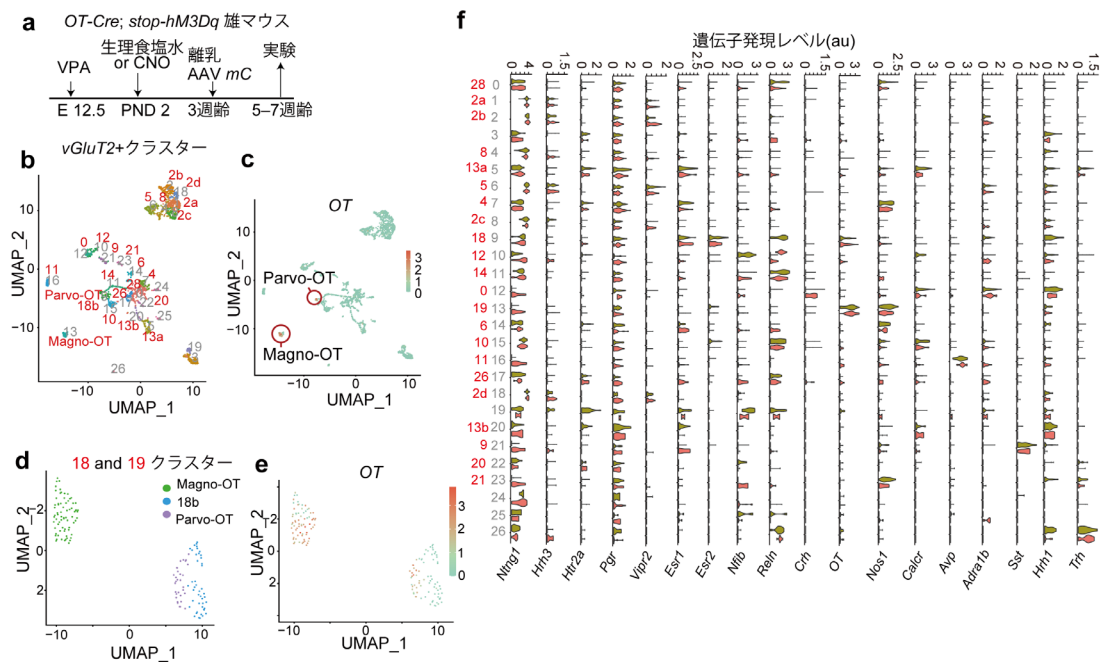


図 20. PND2 での OT ニューロン刺激における snRNA-seq 解析

a, 実験のタイムライン。**b, c**, *vGluT2*+ 細胞クラスターの UMAP (**b**) と OT 遺伝子発現 (**c**)。カースケールは正規化対数発現を示す。赤でハイライトしたクラスターは、マーカー遺伝子の発現に基づく図 6b の *vGluT2*+ クラスターに対応する。**d, e**, 図 6b のクラスター 18 と 19 にそれぞれ対応するクラスター 9 と 13 (**d**)、および OT 遺伝子発現 (**e**) を示す UMAP、カースケールは正規化対数発現を示す。これらのデータは、この snRNA-seq データセットの中で、クラスター 9 (図 6b のクラスター 18 に対応) が 2 つのサブクラスターを含んでいることを示している: 1 つは OT+ で、もう 1 つは OT- である。したがって、以下の解析では OT+ クラスター 9 集団を Parvo-OT、OT- クラスター 9 集団をクラスター 18b と分類した。**f**, *vGluT2*+ ニューロンクラスター内で同定された 27 のクラスターにわたる、選択されたマーカー遺伝子の発現レベルを表示したバイオリンプロット。これらのマーカー遺伝子の発現に基づいて、各クラスターを図 6b の *vGluT2*+ クラスター (赤で示す) の 1 つに手動で分類した。27 クラスター中 22 クラスターについて、図 6b の対応するクラスターを同定したが、対応は必ずしも 1 対 1 ではなかった。残りの 5 つのクラスターは図 6b で同定されなかったが、これはサンプリング条件にばらつきがあったためと思われる。

DEGs 解析により、CNO 投与群の特に Parvo-OT において、より多くの遺伝子が発現上昇していた (図 21a、b)。これらの DEGs は、Parvo-OT と Magno-OT に重複はほとんど見られなかった (図 21c)。OT 遺伝子自体は CNO 投与マウスの Parvo-OT で有意に発現が上昇し (図 21a、c)、観察された OT リガンド発現の回復 (図 19 c–g) が RNA 発現の回復の結果であることが示された。さらに、VPA 投与群の Parvo-OT で発現が低下した DEGs (図 8a) は、CNO 投与群で有意な発現増加傾向と回復を示した (図 21d 右)。一方、VPA 投与群で発現上昇した DEGs は回復傾向を示さなかった (図 21d 左)。遺伝子発現の回復をさらに検証するため、Parvo-OT で見つかったいくつかの発現上昇 DEGs について、ISH により *in vivo* で可視化した。OT 遺伝子を含む調べた 4 つの遺伝子はすべて、mRNA 発現の有意な増加を示した (図 22)。Parvo-OT 以外にも、AVP ニューロン (クラスター11) や甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone、Trh) 発現ニューロン (クラスター12) など、主要な *vGluT2*+ クラスターで多数の DEGs が発現上昇していることが観察され (図 21b)、新生児における OT 細胞刺激が PVH の他の細胞タイプに非細胞自律的に作用していることが示唆された (図 23a)。発現上昇した DEGs の GO およびパスウェイ解析を Magno-OT と Parvo-OT で比較すると、Magno-OT ではなく、Parvo-OT において機能的に関連する GO とパスウェイが濃縮されていることが強調された (図 23 b–d)。*vGluT2*+ クラスターとは対照的に、GABA ニューロンクラスターにはわずかな効果しか認められなかった (図 24a、b)。

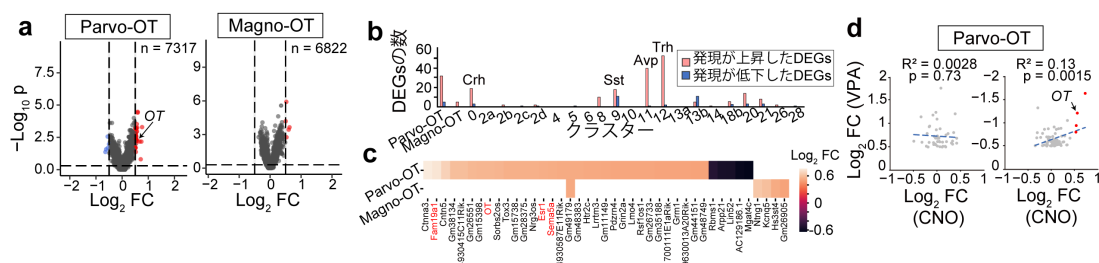


図 21. PND2 での OT ニューロン刺激における snRNA-seq の DEGs 解析

a, 図 7a と同様に、Parvo-OT と Magno-OT における発現上昇 (赤) と発現低下 (青) の DEGs をボルケーノプロットで表したもの。b, *vGluT2*+ クラスター内の発現上昇 (赤) および発現低下 (青) DEGs の数 (クラスター名は図 6b に基づく)。c, Parvo-OT および Magno-OT で見つかった DEGs の fold change を示すヒートマップ。d, 図 7 のデータに基づき、CNO 投与群 (X 軸) と VPA 処理群 (Y 軸、左が発現上昇、右が発現下降した DEGs) の対数変換した fold change の相関。赤い点は CNO 投与群で有意に発現が上昇した遺伝子を示す。p 値は片側 t 検定に基づく。

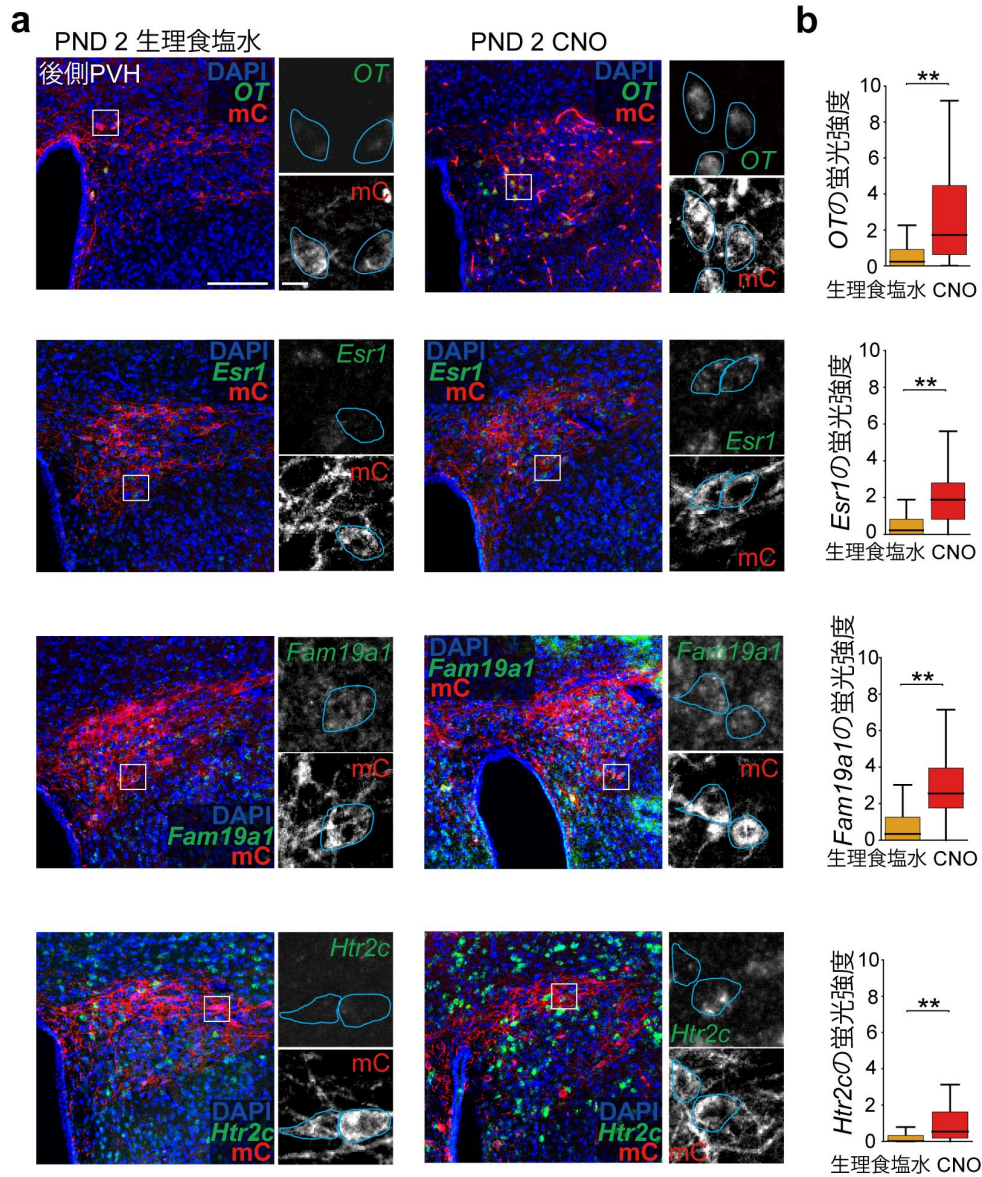


図 22. PND2 での OT ニューロン刺激 snRNA-seq 解析で見つかった発現上昇遺伝子の *in vivo* ISH

a, PND 2 で生理食塩水（左）または CNO（右）を投与した VPA 投与 OT-Cre; stop-hM3Dq 雄マウス（5 週齢）の、Parvo-OT が存在する後側 PVH の代表的な冠状切片。これらの切片を OT、Esr1、Fam19a1、Htr2c 遺伝子の ISH プローブ（緑色）と抗 mCherry（mC）染色（赤色、hM3Dq 発現の推定）で染色した。bregma から 1000-1120 μ m 後に相当する切片を解析した。低倍率画像のスケールバーは 200 μ m、拡大画像は 20 μ m。

b, 個々の PVH^{OT} ニューロンにおける各 mRNA の ISH 染色の蛍光強度；各条件について 3 匹の動物から 80-160 個の細胞を分析した。**, $p < 0.01$ 。Wilcoxon 順位和検定。

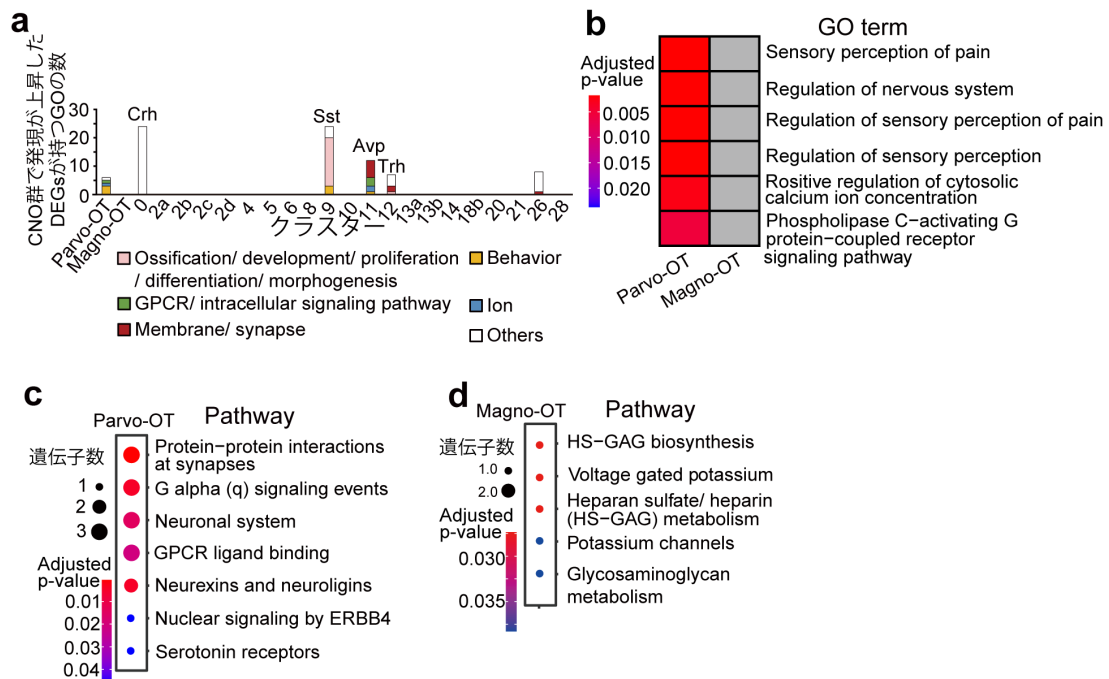


図 23. PND2 での OT ニューロン刺激 snRNA-seq における高次解析

a, *vGluT2*+クラスター（クラスター名は図 6b に基づく）において、発現上昇した DEGs と有意な関連（Benjamini-Hochberg 補正を用いた片側 Fisher's exact 検定、 $p < 0.01$ ）を示した GO の数。OT ニューロンの新生児刺激は、コルチコトロピン放出ホルモン（*corticotropin-releasing hormone*, *Crh*）+、ソマトスタチン（*somatostatin*, *Sst*）+、*Avp*+、および *Trh*+クラスターに非自律的な効果を誘導する。**b**, 発現上昇した DEGs に関連する GO を、Parvo-OT と Magno-OT における各 GO の p 値のヒートマップとともに示す。**c**, Parvo-OT で発現上昇した DEGs を用いたパスウェイ解析の p 値をヒートマップで示す。**d**, Magno-OT で発現上昇した DEGs を用いたパスウェイ解析の p 値をヒートマップで示す。b-d の p 値は Benjamini-Hochberg 補正を用いた片側 Fisher's exact 検定。

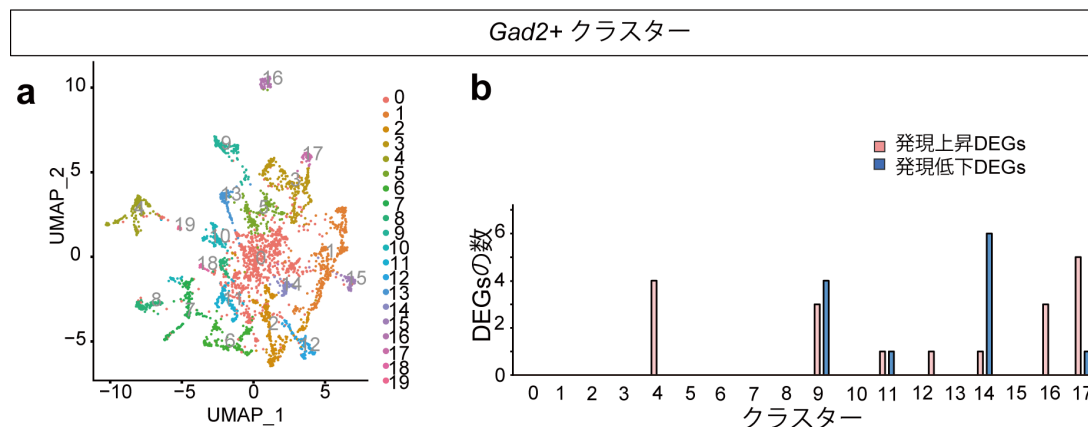


図 24. PND2 での OT ニューロン刺激における *GAD2*+神経の snRNA-seq 解析

a, 20 個の *GAD2*+ニューロンクラスターの UMAP 表示。 b, 上位 18 個の *GAD2*+クラスター内の発現上昇（赤）と発現低下（青）の DEG 数。*vGluT2*+クラスター（図 21b）と比べると、新生児 OT ニューロン刺激の影響は *GAD2*+クラスターでは小さかった。

まとめると、これらのデータは、新生児における OT ニューロン刺激が Parvo-OT を含む PVH ニューロンにおける特定の遺伝子発現に対して、細胞タイプ特異的かつ長期間に影響を及ぼし、それらが社会的行動の促進に寄与する可能性があることを示している。

4. 議論

社会的行動の低下は、多数の遺伝的リスク因子^{75, 76}と、胎児の脳発達過程における母体および環境からの広範な影響^{1, 2}との間の複雑な相互作用から生じており、これらは神経系全体に影響を及ぼす可能性がある。これまでの研究では、大脳皮質における症状に関連した形質が中心であった^{77, 78, 79}ため、社会的行動を制御する視床下部は比較的注目されてこなかった^{4, 29}。本研究では、snRNA-seq 法を用いて、社会的行動を制御する視床下部中枢における遺伝子発現への特異的影響を、特に社会性行動の低下と回復モデルに焦点を当てて明らかにした。ここでは、本研究によって得られた生物学的知見について、その限界とともに考察する。

4.1. 社会的行動低下の背景に想定される Parvo-OT の選択的な脆弱性

社会性行動低下モデル動物において、PVH における OT 免疫反応の減少は遺伝的モデル^{4, 37, 38, 39}および環境的モデル^{3, 40, 41}のいずれにおいても一般的であったが、これまでの研究では PVH^{OT} ニューロンの減少と OT 発現の低下は区別されてこなかった。本研究によって、VPA 投与マウスにおける PVH^{OT} ニューロンの減少は否定された。一方、*OT* 遺伝子を含む

Parvo-OT の遺伝子発現異常は、特に神経機能とシグナル伝達に集中していた。その結果、Parvo-OT が下流の標的に情報を伝達する能力が著しく損なわれることになると考えられる。これらの結果は、パーキンソン病でドーパミン神経が選択的に障害を受けるといった神経変性疾患¹⁸において見られる特定の細胞タイプへの顕著な影響と同様に、「選択的脆弱性」という概念が社会的行動低下の背景にも存在することを明らかにした。この概念はより広い文脈における社会的行動低下の理解を促進することができる。

では、Parvo-OT における遺伝子発現の異常はどのように生じているのだろうか。興味深いことに、本研究のデータでは VPA 投与群の新生児期のマウスは OT の発現量が生理食塩水群と比較して低下していなかった (図 17)。従って、少なくとも OT 遺伝子の発現に関しては VPA 投与から約 10 日後の新生児期にはまだ異常が見られず、5 週齢の VPA 投与群においてみられる OT の発現量の低下は、生後の発達の過程で出現する表現型と考えられる。VPA は胎生 12.5 日目に暴露していることを考えると、このような表現型出現にタイムラグが生じることは興味深い。一つの仮説として、VPA の投与がエピジェネティックな傷²⁰を誘導し、その結果、乳児期以降の社会的行動発達に重要な遺伝子制御ネットワークに変化が生じたと想定することができる。実際に VPA は HDAC の活性を阻害することで、皮質におけるパルアルブミンや K⁺チャネルをコードする遺伝子⁸⁰などの広範囲な遺伝子発現に影響を与えると考えられている。VPA 投与は塩化物輸送体 KCC2 の発現低下を引き起こし、興奮性神経から抑制性神経への転換を阻害するという報告もある⁶⁸。胎児期に VPA に暴露した 3 時間後の脳におけるバルクのトランスクリプトームを検討した最近の研究によると、約 400 種類の ASD リスク因子遺伝子を含め 7000 以上の遺伝子発現に変動が見られた⁸¹。これらの報告から、VPA 投与後の OT ニューロンでは何らかの重要な遺伝子の発現制御領域におけるエピジェネティックな修飾に変化があり、その結果、生後発達の段階で活動や機能に異常を生じるのではないかと推測される。もしかすると、母親や同腹子との社会的な関わりにおいて活性化されるべき OT ニューロンが上手く活性化できず、これが Parvo OT の細胞レベルあるいは神経回路レベルにおける成熟を阻害してしまうのかもしれない。OT ニューロンは胎児期では未成熟とされ⁸²、本研究においても新生児の段階でラベルされた OT ニューロンは青年期の OT ニューロンよりも数が少ない (図 17) ことから、OT ニューロンの成熟、OT の発現と社会的行動形成の關係に着目することは意義深い。このような仮説を検証するためには、社会行動形成のさまざまな段階における PVH のトランスクリプトームや細胞のエピジェネティックな状態を解析して比較することが必要である。

本研究で明らかにした Parvo OT の選択的な脆弱性は本研究で詳しく調べた VPA 投与モデルを超えて一般に成立するだろうか。本研究では、全く異なる環境的因子による社会行動低下のモデルとして MHFD モデルを検討し、社会的行動低下や OT 発現の低下は完全に VPA モデルと一致しているわけではない (図 4、5) ものの、共通して Parvo-OT の存在する PVH 後方の OT ニューロンに顕著な変化を認めた。VPA 投与と MHFD では OT 発現

減少の根底に異なるメカニズムが存在する³可能性を含め、今後さらに詳しく検討される必要がある。その際、本研究で確立された PVH のトランスクリプトーム解析は引き続き有用なプラットフォームである。今後の研究では、OT 発現の減少が様々な遺伝的・社会行動低下モデル^{4, 37, 38, 39}に共通して見られるのか、共通の脆弱性が存在するのであればそれは各モデルの OT 発現減少にどのように寄与しているのかどうかを探る必要がある。

複数の PVH トランスクリプトームを集めて解析した研究では、Parvo-OT を含む PVH の脊髄投射型ニューロンは、RNA 編集酵素をコードする遺伝子を発現する特徴的な細胞集団であると報告されている⁸³。この遺伝子がいつから発現しているのかはわからないが、例えば VPA を投与する E12.5⁵⁴前後で将来的に Parvo-OT に分化する細胞集団は VPA の影響を受けやすい特徴的な遺伝子⁴⁰を発現しているのかもしれない。その遺伝子が直接的に OT の発現に影響を与えなくとも、しかるべきタイミングでの遺伝子発現が少しずつ崩れることで、青年期に大きな差となって OT の発現に影響を及ぼすといった推測ができる。このような仮説を検証するためには、やはり胎児期から青年期まで様々な段階での PVH のトランスクリプトームを得て、Parvo-OT がどのタイミングでどのような遺伝子を発現しているのか、網羅的かつ時系列的に調査する必要がある。

4.2. 社会的行動の回復モデル

本研究では、OT ニューロンの化学遺伝学的刺激が、Parvo-OT の遺伝子制御に持続的な効果を及ぼし、社会性の促進と関連することを立証した。これまでも OT の経鼻投与、腹腔投与、OT ニューロンの薬理遺伝学的な活性化等が社会性行動を向上させるとの報告は複数あるが、本研究の独自性は、社会行動の回復に相関して変化する遺伝子発現を細胞タイプの解像度で捉えたところにある。特に、生後すぐの PND 2 において OT ニューロンを単回刺激するだけで 5 週齢における社会行動と OT 遺伝子発現がいずれも回復するというモデルは、社会性行動不調の治療戦略を研究するモデルとして興味深い。今後の研究においてなぜこのような持続的な効果が得られるのかを明らかにする必要がある。

上述したように、Parvo-OT における OT 遺伝子の発現低下は生後の社会性発達期に表れる表現型である。一つのモデルとして、生後の母子や同腹子との社会的相互作用において OT ニューロンが活性化し、この活性化が OT 遺伝子の発現の安定化を含めた Parvo-OT の成熟に必要な鍵となっていると想定することができる。この説によると、化学遺伝学あるいは光遺伝学を用いて OT ニューロンを強く活性化することは、生後の脳で本来起きるべき Parvo-OT の活性化を模倣することで機能回復を実現していることになる。そして、5 週齢においても単回の化学遺伝学あるいは薬理遺伝学的な OT ニューロンの活性化が有効であることを踏まえると、機能回復に臨界期があるにしても十分に長いことが想定できる。現状、新生児期の脳深部において神経細胞の活性化を可視化する方法論は存在せず、このようなモデルは想像の域を出ないが、将来において脳深部の低侵襲的なイメージング技術が進む

ことで、社会性の発達する新生児期や幼児期の脳内でどのような神経活動があるのか、それが各神経細胞の発達や成熟にどのように関与するのかが明らかとなるように期待したい。

本研究では回復可能性の臨界期については調査していない。一般に、新たな友達を作るといった社会性は学童期～青年期に高く、成人後に低下していくことが知られており、マウスモデルにおいても社会性臨界期の存在が知られている。この背景に、側坐核における OT 受容体機能の低下を指摘した先行研究もある⁸⁴。これら知見から、社会性行動の回復を目指す介入はできるだけ幼年～青年期までに行われることが望ましいと考えられる。しかし、ある種の向精神薬によって成獣マウスにおいて社会性臨界期を再び開くことができるという報告もあり、このプロセスにも側坐核における OT の分泌が関与している。また OT ニューロンは成体マウスでも母子関連行動の際に可塑性が見られる⁵ため、OT を用いることで社会性臨界期のコントロールができるのかもしれない。

本研究では、光化学遺伝学的活性化による Parvo-OT における Gq シグナル伝達の活性化の方が、光遺伝学的な刺激よりも効果的に OT 発現の回復をもたらす可能性を示唆した (図 16)。しかしこの効果量の違いは、それぞれの方法による Parvo-OT の活性化の程度が異なることを反映するに過ぎないかも知れない。例えば、化学遺伝学の場合には単回の CNO 投与により 4 時間ほどの神経活動の亢進が見られるのに対して、光遺伝学的な活性化は 1 時間しか行わなかったことが効果量の違いを説明できる。しかし、いずれにしても OT ニューロンの活性化させることが Parvo-OT の機能的回復に重要な因子である。この文脈では、血液脳関門透過性の低分子化合物で OT ニューロンを刺激する戦略が考えられる。snRNA-seq データはエストロゲン受容体 $ER\alpha/\beta$ 、セロトニン受容体 5-HT_{2c}、PI3K/Akt を含むシグナル伝達経路が Parvo-OT を刺激する潜在的な標的として有望であることを示唆している (図 7a、8、9e、21)。早期介入のために確立されたモデルと snRNA-seq 解析を組み合わせることで、効果的な薬物治療戦略とその基礎にあるメカニズムを研究するための貴重なプラットフォームになると考えられる。一方、これらのシグナル伝達経路がどのようにして OT の発現に関与しているのかは不明であり、これからの研究課題である。

Parvo-OT は、社会的報酬^{24, 29, 85}を含む多様な脳機能^{28, 31, 77}を調節することができる。その局所神経回路は Magno-OT⁸⁶に影響を与え、それによって OT システム全体を制御し、皮質の興奮性/抑制性バランス^{60, 61}など、様々な回路機能²⁵を一括して制御する。さらに、Parvo-OT は、AVP ニューロンを含む様々な細胞タイプ⁶⁸の遺伝子発現に影響を与え (図 21)、社会的行動にも寄与している²¹。社会的行動を制御する上で、Parvo-OT の役割を多様な脳領域や細胞型にわたって解明するためには、標的を絞った遺伝子操作による操作系の確立が極めて重要である。今後の研究でこれらの目標を達成するためには、OT ミニプロモーター^{22, 31}に基づく操作系、今回および以前の研究²⁹で同定された細胞型特異的マーカー遺伝子、Parvo-OT の軸索投射パターンを利用した逆行性標識を組み合わせることが有望である。

4.3. 本研究の限界

最後に、本研究における4つの大きな限界について述べる。第一に、出生前にVPAを投与した雌のげっ歯類では、社会的行動に対する影響が不均一であることが報告されているため、本研究では雄マウスのみを用いた^{46, 67}。ASD⁸⁷における強い雄性バイアス、およびParvo-OTによる様々な性ステロイド関連遺伝子の発現(図6、9、20)を考慮すると、遺伝的および環境的要因がParvo-OTに及ぼす可能性のある性二型的な影響について、さらなる調査が必要である。

第二に、我々は社会行動に関連するPVH^{OT}ニューロンの活動パターンを調べていない²⁴。典型的な発達マウス、VPA投与マウス、あるいはOTニューロン刺激による回復モデルマウスにおいて、社会的相互作用中のParvo-OTの神経活動ダイナミクスを調べることは特に興味深い。そのためには、マイクロ内視鏡⁸⁸のような一細胞分解能のイメージング技術を前述の遺伝学的アプローチと組み合わせることで、Parvo-OTを標的にすることができる。このような方法で授乳あるいは母性養育行動中のPVH^{OT}ニューロンを一細胞分解能のイメージング技術で観察した最近の研究によると、養育行動中に活動するPVH^{OT}ニューロンは全体の10%にも満たない少数であることが分かっている⁸⁹。社会性行動に伴って活動するPVH^{OT}ニューロンはParvo-OTに限られるのか、そのような亜集団はどのような脳領域に軸索を投射するのか、それらを特異的に不活性化すると社会行動が阻害されるのだろうか、これらの重要な疑問に答えるためにも、社会行動中の動物から一細胞レベルでPVH^{OT}ニューロンの活動記録を行う技術の確立が求められている。

第三に、本研究ではVPA投与マウスにおける社会行動の上昇にPVH^{OT}ニューロンのOTが直接寄与したのか、他の神経伝達物質の寄与は無いのか、OTの作用点はどこにあるのかといった点が未解明である。先行研究ではOTの脳室投与や経鼻投与で社会性の改善がみられている³³ことから、社会行動の上昇にPVH^{OT}ニューロンのOTが寄与している可能性は高いものの、これらは重要な今後の課題である。これらの問題を解明するため、例えば不足するOTの発現を補うような過剰発現系の開発、OTセンサーを用いた各脳領域におけるOT分子の分泌をリアルタイムにモニタリングできる系の実装、領域特異的なOTR遺伝子のコンディショナルノックアウトによる作用点の特定、などを組み合わせて包括的に検証する必要がある。そのためには、AAVを用いたOTニューロン特異的なOTの過剰発現系やGRAB_{DA}センサー^{90, 91}のように高感度なOTセンサーの開発が待たれる。

そして最後に、典型的な発達マウスの社会性とOT発現レベルに相関がみられなかった(図14)ように、典型的な発達をしていても社会性には不均一性があり、それはOT発現レベルだけで説明することは出来ないかもしれない。また、人の社会性は実際には高い低いで示される二次元的な表現には収まりきらない、多次元的なものである。そして同時に、それが個性を形成している。一方、今回の実験で用いた3チャンバーテスト⁵⁵ではこのような複雑な社会性まで定量することは出来ておらず、今回示された社会的行動の促進モデル

が個性をどう変容させるのかは未解明であることに留意する必要がある。このような複雑な社会性を形成する神経基盤はまだ未解明の領域であり、ヒトに至っては Magno-OT と Parvo-OT がマウスと同じ割合で存在しているのすら不明であるため、今後さらなる研究の進展が必要である。

5. 参考文献

1. Han VX, Patel S, Jones HF, Dale RC. Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol* **17**, 564-579 (2021).
2. Kwon HK, Choi GB, Huh JR. Maternal inflammation and its ramifications on fetal neurodevelopment. *Trends Immunol* **43**, 230-244 (2022).
3. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell* **165**, 1762-1775 (2016).
4. Sgritta M, *et al.* Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* **101**, 246-259 e246 (2019).
5. Sato M, *et al.* Social circuits and their dysfunction in autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry* **28**, 3194–3206 (2023).
6. Liang B, *et al.* Distinct and Dynamic ON and OFF Neural Ensembles in the Prefrontal Cortex Code Social Exploration. *Neuron* **100**, 700-714.e9 (2018).
7. Ko J, *et al.* Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns. *Front. Neural Circuits* **11**, 41 (2017).
8. Klein-Flügge MC, *et al.* Medial and orbital frontal cortex in decision-making and flexible behavior. *Neuron* **110**, 2743-2770 (2022).
9. Gangopadhyay P, *et al.* Anterior cingulate cortex dysfunction underlies social deficits in Shank3 mutant mice. *Nat Neurosci.* **24**, 5–18 (2021).
10. Guo B, *et al.* Prefrontal–amygdala circuits in social decision-making. *Nat Neurosci.* **22**, 1223–1234 (2019).

11. Gogolla N, *et al.* Prefrontal–amygdala circuits in social decision-making. *Neuron*. **83**, 894-905 (2014).
12. Salgado S and Kaplitt MG. The nucleus accumbens: a comprehensive review. *Stereotact Funct Neurosurg*. **93**, 75–93 (2015).
13. Krishnan V, *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. **131**, 391-404 (2007).
14. Abrahams BS, *et al.* SFARI Gene 2.0: a community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs). *Mol Autism* **4**, 36 (2013).
15. Hörnberg H, *et al.* Rescue of oxytocin response and social behaviour in a mouse model of autism. *Nature*. **584**, 252–256 (2020).
16. Molosh AI, *et al.* Social learning and amygdala disruptions in Nf1 mice are rescued by blocking p21-activated kinase. *Nat. Neurosci* **17**, 1583–1590 (2014).
17. Huang WC, *et al.* Hyperconnectivity of prefrontal cortex to amygdala projections in a mouse model of macrocephaly/autism syndrome. *Nat Commun*. **7**, 13421 (2016).
18. Fu H, Hardy J, Duff KE. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* **21**, 1350-1358 (2018).
19. Froemke RC, Young LJ. Oxytocin, Neural Plasticity, and Social Behavior. *Annu Rev Neurosci* **44**, 359-381 (2021).
20. Chen P, Hong W. Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron* **98**, 16-30 (2018).
21. Lukas M, Neumann ID. Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders. *Behav Brain Res* **251**, 85-94 (2013).

22. Inada K, *et al.* Plasticity of neural connections underlying oxytocin-mediated parental behaviors of male mice. *Neuron* **110**, 2009-2023 (2022).
23. Teruyama R and Armstrong WE. Changes in the Active Membrane Properties of Rat Supraoptic Neurons During Pregnancy and Lactation. *J Neuroendocrinol.* **14**, 933-44 (2002).
24. Hung LW, *et al.* Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. *Science* **357**, 1406-1411 (2017).
25. Newmaster KT, *et al.* Quantitative cellular-resolution map of the oxytocin receptor in postnatally developing mouse brains. *Nat Commun* **11**, 1885 (2020).
26. Ferguson JN, *et al.* Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet.* **25**, 284–288 (2000).
27. Takayanagi Y, *et al.* Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 16096-16101 (2000).
28. Althammer F, Grinevich V. Diversity of oxytocin neurons: beyond magno- and parvocellular cell types? *J Neuroendocrinol*, doi: 10.1111/jne.12549 (2017).
29. Lewis EM, *et al.* Parallel Social Information Processing Circuits Are Differentially Impacted in Autism. *Neuron* **108**, 659-675 e656 (2020).
30. Xiao L, Priest MF, Nasenbeny J, Lu T, Kozorovitskiy Y. Biased Oxytocinergic Modulation of Midbrain Dopamine Systems. *Neuron* **95**, 368-384 e365 (2017).
31. Knobloch HS, *et al.* Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* **73**, 553-566 (2012).
32. Harima Y, *et al.* Parallel labeled-line organization of sympathetic outflow for selective organ regulation in mice. *Nat Commun* **15**, 10478 (2024).

33. Fujima S, *et al.* CAPS2 deficiency impairs the release of the social peptide oxytocin, as well as oxytocin-associated social behavior. *J Neurosci*. **41**, 4524–35 (2000).
34. Jin D, *et al.* CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature*. **446**, 41–45 (2007).
35. Choe KY, *et al.* Oxytocin normalizes altered circuit connectivity for social rescue of the Cntnap2 knockout mouse. *Neuron* **110**, 795-808 e796 (2022).
36. Penagarikano O, *et al.* Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the Cntnap2 mouse model of autism. *Sci Transl Med* **7**, 271ra278 (2015).
37. Resendez SL, *et al.* Social Stimuli Induce Activation of Oxytocin Neurons Within the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus to Promote Social Behavior in Male Mice. *J Neurosci* **40**, 2282-2295 (2020).
38. Dombret C, *et al.* Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus. *Hum Mol Genet* **21**, 4703-4717 (2012).
39. Muscatelli F, *et al.* Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**, 3101-3110 (2000).
40. Nicolini C, Fahnstock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol* **299**, 217-227 (2018).
41. Dai YC, *et al.* Neonatal Oxytocin Treatment Ameliorates Autistic-Like Behaviors and Oxytocin Deficiency in Valproic Acid-Induced Rat Model of Autism. *Front Cell Neurosci* **12**, 355 (2018).
42. Iwasaki Y, *et al.* Relay of peripheral oxytocin to central oxytocin neurons via vagal afferents for regulating feeding. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **519**, 553-558 (2019).

43. Krashes MJ, *et al.* Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Invest* **121**, 1424-1428 (2011).
44. Wu Z, *et al.* An obligate role of oxytocin neurons in diet induced energy expenditure. *PLoS One* **7**, e45167 (2012).
45. Jiang HY, *et al.* Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.* **58**, 165–172 (2016).
46. Kim KC, *et al.* Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *J Neurochem* **124**, 832-843 (2013).
47. Bromley RL, *et al.* Early cognitive development in children born to women with epilepsy: a prospective report. *Epilepsia*. **51**, 2058-2065 (2010).
48. Cummings C, *et al.* Neurodevelopment of children exposed *in utero* to lamotrigine, sodium valproate and carbamazepine. *Arch. Dis. Child.* **96**, 643-647 (2011).
49. Shallcross R, *et al.* Child development following in utero exposure: levetiracetam vs. sodium valproate. *Neurology* **76**, 383-389 (2011).
50. Christensen J, *et al.* Prenatal exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* **309**, 1696-1703 (2013).
51. Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol* **16**, 91-103 (2013).
52. Hall AC, *et al.* Valproate Regulates GSK-3-Mediated Axonal Remodeling and Synapsin I Clustering in Developing Neurons. *Mol. Cell. Neurosci* **20**, 257-270 (2002).

53. Jung GA, *et al.* Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1. *BMC Cell Biol* **9**, 66 (2008).
54. Schneider T and Przewlocki R. Behavioural alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* **30**, 80-89 (2005).
55. Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. *Nat Protoc* **15**, 3464-3477 (2020).
56. Huang F, *et al.* Betaine ameliorates prenatal valproic-acid-induced autism-like behavioral abnormalities in mice by promoting homocysteine metabolism. *Psychiatry Clin Neurosci* **73**, 317-322 (2019).
57. Yu G, Wang LG, Yan GR, He QY. DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis. *Bioinformatics* **31**, 608-609 (2015).
58. Wu T, *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* **2**, 100141 (2021).
59. Yu G, He QY. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol Biosyst* **12**, 477-479 (2016).
60. Marlin BJ, Mitre M, D'Amour J A, Chao MV, Froemke RC. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature* **520**, 499-504 (2015).
61. Froemke RCC, I. Oxytocin and Brain Plasticity. *Principles of Gender-Specific Medicine*, 161-182 (2017).
62. Ishii KK, *et al.* A Labeled-Line Neural Circuit for Pheromone-Mediated Sexual Behaviors in Mice. *Neuron* **95**, 123-137 e128 (2017).
63. Madisen L, *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133-140 (2010).

64. Zheng GX, *et al.* Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat Commun* **8**, 14049 (2017).
65. Hao Y, *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **184**, 3573-3587 e3529 (2021).
66. Sanchez-Alegria K, Flores-Leon M, Avila-Munoz E, Rodriguez-Corona N, Arias C. PI3K Signaling in Neurons: A Central Node for the Control of Multiple Functions. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
67. Maisterrena A, de Chaumont F, Longueville JE, Balado E, Ey E, Jaber M. Female mice prenatally exposed to valproic acid exhibit complex and prolonged social behavior deficits. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **131**, 110948 (2024).
68. Tyzio R, *et al.* Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science* **343**, 675-679 (2014).
69. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5163-5168 (2007).
70. Harony-Nicolas H, *et al.* Oxytocin improves behavioral and electrophysiological deficits in a novel Shank3-deficient rat. *Elife* **6**, (2017).
71. Grund T, *et al.* Chemogenetic activation of oxytocin neurons: Temporal dynamics, hormonal release, and behavioral consequences. *Psychoneuroendocrinology* **106**, 77-84 (2019).
72. Teng BL, *et al.* Prosocial effects of oxytocin in two mouse models of autism spectrum disorders. *Neuropharmacology* **72**, 187-196 (2013).
73. Ino D, Tanaka Y, Hibino H, Nishiyama M. A fluorescent sensor for real-time measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain. *Nat Methods* **19**, 1286-1294 (2022).

74. Takahashi TM, *et al.* A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature* **583**, 109-114 (2020).
75. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* **16**, 551-563 (2015).
76. Gaugler T, *et al.* Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet* **46**, 881-885 (2014).
77. Nakai N, Overton ETN, Takumi T. Optogenetic Approaches to Understand the Neural Circuit Mechanism of Social Deficits Seen in Autism Spectrum Disorders. *Adv Exp Med Biol* **1293**, 523-533 (2021).
78. Gandal MJ, *et al.* Broad transcriptomic dysregulation occurs across the cerebral cortex in ASD. *Nature* **611**, 532-539 (2022).
79. Del Pino I, Rico B, Marin O. Neural circuit dysfunction in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol* **48**, 174-182 (2018).
80. Lauber E, *et al.* Prenatal Valproate Exposure Differentially Affects Parvalbumin-Expressing Neurons and Related Circuits in the Cortex and Striatum of Mice. *Front. Mol. Neurosci* **9**, 150 (2016).
81. Dorsey SG, *et al.* Rapid effects of valproic acid on the fetal brain transcriptome: implications for brain development and autism. *Translational Psychiatry* **14**, 482 (2024)
82. Grinevich V, *et al.* Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. *Front. Neuroanat* **8**, 164 (2014).
83. Berkhout JB, *et al.* An integrated single-cell RNA-seq atlas of the mouse hypothalamic paraventricular nucleus links transcriptomic and functional types. *J. Neuroendocrinol* **36**, e13367 (2024).

84. Nardou R, *et al.* Psychedelics reopen the social reward learning critical period. *Nature* **618**, 790-798 (2023).
85. Dolen G, Darvishzadeh A, Huang KW, Malenka RC. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature* **501**, 179-184 (2013).
86. Tang Y, *et al.* Social touch promotes interfemale communication via activation of parvocellular oxytocin neurons. *Nat Neurosci* **23**, 1125-1137 (2020).
87. Fombonne E. Epidemiological trends in rates of autism. *Mol Psychiatry* **7 Suppl 2**, S4-6 (2002).
88. Ghosh KK, *et al.* Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods* **8**, 871-878 (2011).
89. Yaguchi K, *et al.* Flexible adjustment of oxytocin neuron activity in mouse dams revealed by microendoscopy. *Sci. Adv* **10**, eadt1555 (2024).
90. Sun F, *et al.* A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice. *Cell* **174**, 481-496.e19 (2018).
91. Sun F, *et al.* Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nat. Methods* **17**, 1156-1166 (2020).

6. 謝辞

本研究は理化学研究所生命機能科学研究センター神戸キャンパス、比較コネクトミクス研究チームにおいて行いました。終始熱心なご指導頂いた宮道 和成先生には心より感謝申し上げます。また研究面でご指導、生活面ではご支援頂きました研究室の皆様にも、御礼申し上げます。誠にありがとうございました。

そして、同センターの染色体分配研究チームの北島 智也教授、非対称細胞分裂研究チームの松崎 文雄教授（受け入れ当時）は学生として受け入れて頂き誠にありがとうございました。北島先生、松崎先生、並びに染色体分配研究チームの方々には日々お心遣い頂き、お陰様で京都大学の学生としての生活を無事送ることができました。心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、本研究に携わっていただいたすべての方々に、心より感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Tsurutani M, Goto T, Hagihara M, Irie S, Miyamichi K.

Selective vulnerability of parvocellular oxytocin neurons in social dysfunction.

Nature Communications.15: 8661 2024.

doi: 10.1038/s41467-024-53092-w

