

雌マウスにおける
オキシトシン神経パルスの可視化と
そのダイナミクスの解析

矢口 花紗音

目次

要旨	4
1. 序論.....	6
1.1 射乳反射と OT 神経のパルス状活動	6
1.2 視床下部 OT 神経のバースト状同期発火の生成機構	7
1.3 OT の多機能性とパルス状出力の生理的意義	8
1.4 OT 神経活動記録技術の進展と課題	9
1.5 授乳の時期特異性への問いと、生殖段階を跨ぐ OT 系動態.....	10
2. 仮説と目的	12
2.1 仮説と研究の目的.....	12
2.2 具体的目的 (Aims)	12
2.3 期待される知見	13
3. 方法.....	14
実験動物.....	14
ウイルス作成.....	14
ウイルスの定位注入.....	14
ファイバーフォトメトリー	15
生体内微小内視鏡イメージング	16
生体内微小内視鏡画像データからの測定および定量	18
パルス状活動の検出	18
日をまたいだ縦断的追跡.....	18
クラスタリング分析	19
仔マウス回収試験	19

PVH における仔マウス回収反応細胞の検出	20
組織学と組織化学染色	20
仔マウスの体重測定	21
卵巣切除実験	21
腔細胞診による発情周期モニタリング	21
定量化・統計解析	21
4. 結果	23
4.1 授乳中の野生型マウスにおける OT 神経のパルス状活動の動的調節	23
4.1.1. OT プロモーター駆動型 AAV ベクターによる GCaMP6s 発現	23
4.1.2 母子隔離が OT 神経活動に与える影響の評価	24
4.1.3 母子の相互作用と OT 神経活動の相関関係	25
4.1.4 各授乳期間における OT 神経の活動頻度の定量的解析	25
4.1.5 仔マウスの成長が OT パルスの発生分布に与える影響	26
4.1.6 離乳期における OT 神経のパルス状活動の動態	26
4.2 生体内微小内視鏡観察による 1 細胞イメージングで明らかになった OT 神経活動の柔軟な調整	27
4.2.1 産後日数による OT 神経のパルス状活動のダイナミクス	27
4.2.2 産後異なる日数にわたる同じ OT 神経の追跡	29
4.2.3 PVH OT 神経のサブセットは、仔マウスの回収に対して時間同期した反応を示す	30
4.2.4 離乳後期における乳汁分泌がない時の OT 神経のパルス状活動	31
4.3 性成熟に依存しない吸啜誘発 PVH OT パルスと OT 発現量指標の解離	32
4.3.1 性成熟した Naïve 雌における吸啜誘発 OT パルス	32
4.3.2 性成熟不全 (早期 OVX) でも吸啜誘発 OT パルスは生じる	33

4.3.3 性成熟不全では PVH の OT タンパクが低下する	34
4.4 図表	35
5. 考察	59
5.1. 授乳期における OT 神経活動の動態および汎用的イメージング基盤の確立	59
5.1.1 射乳反射時の OT 神経活動には仔による直接の吸啜刺激が必須である	59
5.1.2. 授乳期間の進行に伴う OT 神経活動と母仔相互作用のダイナミクス	60
5.1.3. OT 神経活動の研究における AAV9 OTp-GCaMP6s の利点と展望	61
5.2. 1 細胞イメージングで捉える OT パルスの可塑性と技術的展望	61
5.2.1 1 細胞イメージングが示す授乳ステージに伴う OT パルス波形の再編	61
5.2.2 離乳後の OT パルスの再編と乳汁生成との解離、および産後初期への回帰	62
5.2.3 OT パルスの波形変化を担う分子機構の可能性	62
5.2.4 PVH OT 微小内視鏡の限界と改良技術への展望	63
5.3 生殖状態に依らず吸啜により生じる OT パルスと、OT 産生指標の乖離	64
5.4 OT パルス生成の段階的枠組みと、共通指標による検証可能性	65
6. 結論	68
7. 参考文献	70
8. 謝辞	78

要旨

我々ヒトを含めた哺乳類は、授乳を介して母子の絆を確立し、それを基盤に社会性を発達させる。母乳は新生期の養分となるのみならず、消化系・免疫系の成熟を助ける多様なシグナル分子を子に与える。このように、授乳は哺乳類を特徴づける重要な機能の一つである。しかし、授乳を成立させる母体神経系の仕組みは、分子・神経回路いずれのレベルでも十分に理解されてこなかった。

授乳において、子の乳頭への吸啜刺激は求心性回路を経て視床下部室傍核 (Paraventricular hypothalamic nucleus, PVH) および視索上核 (Supraoptic nucleus, SO) のオキシトシン (OT) 神経群を駆動し、数分に一回の同期的な神経活動を生じさせる。本研究では、この同期的な神経活動を「OT パルス」と定義し、OT 神経におけるカルシウムイオン (Ca^{2+}) 動態として計測する。この OT パルスに伴い、下垂体後葉からの OT 放出もパルス状に生じ、血流を介して乳腺の収縮を引き起こす射乳反射が成立すると考えられている。なお、本研究の計測は OT 神経の活動に焦点を当てており、OT 分子のパルス状の放出そのものを直接定量するものではない。

1970–80 年代の古典的研究は、主にラットの視床下部において単一ユニットの電気生理学的記録を行い、吸啜中に数分おきのバースト状発火が発生することや、この活動が左右の神経核において高い同期性を示すことを明らかにした。しかし記録細胞数が少ないうえ、記録細胞が確実に OT 神経かどうかの厳密な同定がなされていなかった。またこれらの研究の多くは麻酔下で実施され、覚醒・自由行動下で同一個体を長時間追跡することはできなかった。そのため、覚醒下でいつ・どれくらい OT 神経が活動し、どのようにその強度・頻度が調節されるのか、その活動は授乳期の母体に限定されているのかといった活動ダイナミクスや時期特異性が未解明の課題として残されている。

本研究は、授乳時の OT 神経活動に残された未解決課題に対して、以下の方針で取り組んだ。まず自由行動下のマウスにおいて OT 神経の集団活動を長期・連続記録できる計測系を確立し、OT パルスの頻度・間隔・振幅・波形幅といった指標を、共通の解析手順で定義して比較可能にした。OT 遺伝子のミニプロモーター (OTp) 配列を搭載したアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus, AAV) である OTp-GCaMP6s により、野生型マウスの PVH OT 神経に Ca^{2+} 感受性蛍光タンパクである GCaMP6s を発現させ、光ファイバーを通して神経集団の蛍光を測定するファイバーフォトメトリーで長時間記録する計測系を構築した。この系を用いた野生型 C57BL/6 マウスの全授乳期を通じた経時的観察から、安定した OT パルスの誘発には母仔の物理的接触に伴う吸啜刺激が必要であること、授乳期の進

行に伴いパルス頻度の再構成が生じ、クラスター状にまとまる傾向が特に暗期において顕著になること、等が明らかとなった。これらにより、覚醒・自由行動下で「いつ・どれくらい」OT 神経集団が活動するかを記述する基盤が整備された。

次にファイバーフォトメトリーと単一細胞解像度を有する生体内微小内視鏡による OT 活動記録を組み合わせ、授乳期以外の OT パルスの可塑性と各 OT 神経のパルス状活動への参加動態を解析した。ファイバーフォトメトリーによる長期的な OT 神経活動追跡の結果、離乳後であっても、再導入した仔の吸啜刺激に対して PVH OT 神経群はパルス状の Ca^{2+} シグナルの上昇を示し、集団としての拍動性は残存することが明らかとなった。しかし GRIN レンズ (細径の屈折率勾配レンズ) を用いた一細胞記録で同一の OT 神経群を経時的に観察したところ、その出力特性は授乳中期と比べて変化しており、個々の OT 神経が示すパルス波形の振幅および発生頻度は低下し、同時にパルス状活動に参加する OT 神経の数も減少した一方、パルス内での応答時刻、即ち細胞間同期は高い水準で維持されていた。

最後に発達過程に着目し、性成熟が PVH の OT 発現量およびパルス状活動の特性に及ぼす影響を検証し、内分泌学的な因果関係を評価した。具体的には、性成熟前の卵巢摘出 (Ovariectomy, OVX) を行ったのち、OT パルスの計測と OT 分子の定量を同一個体内で行った。OVX 個体では PVH において OT タンパクの発現が著しく減少したが、ファイバーフォトメトリーで観察される OT パルスは頻度・振幅ともに概ね保たれた。すなわち、性成熟依存的に OT 発現を調節する機構が存在するものの、OT パルスの形成やその強度は OT の発現や性成熟に依存せず頑強に発達し維持されることが明らかになった。

以上を総合すると、乳頭への仔による吸啜という連続的な感覚入力は求心性回路を通して視床下部 PVH の OT 神経集団のパルス状活動へと変換され、その振幅は単一細胞ごとの参加動態と活動の可塑性によって規定されることが分かった。このパルス状活動は、授乳期に限らず、性的に未成熟な段階から離乳後に至るまでの広範なライフステージにおいて頑強に維持されていた。本研究は、時系列、細胞群、内分泌状態を一体的に結び、授乳神経機構の作動原理の一端を明らかにした。これにより、母子相互作用の神経内分泌学における基礎的理解を更新するとともに、将来的な回路・内分泌標的への介入の設計に資する定量的な枠組みを提供した。

1. 序論

1.1 射乳反射と OT 神経のパルス状活動

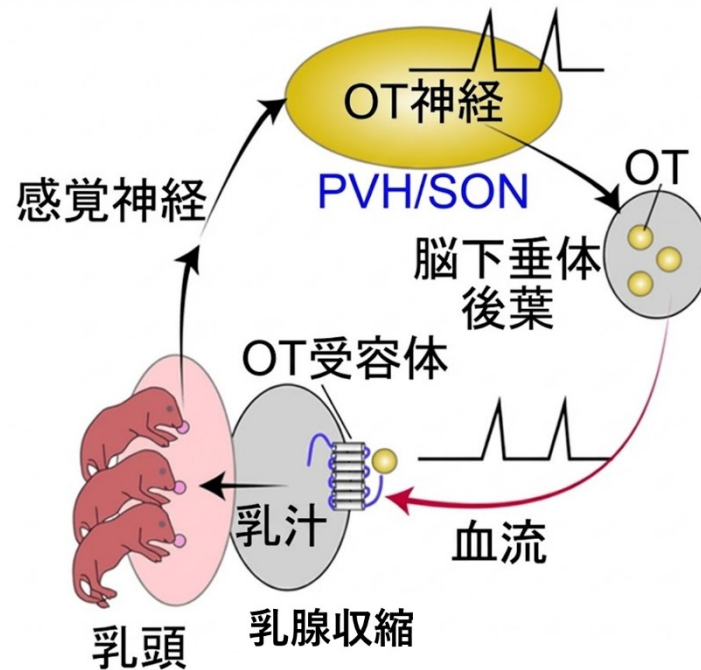
哺乳類における授乳は、母体が体内で合成した栄養・水分・免疫因子を、子へ継続的に移送する生物学的機構である。母体は胎内発達を終えた子の成長段階を、母子一体の生理として支える必要があり、授乳の成否は母子保健にも直結する重要な周産期課題である[1,2]。従って、授乳を支える生体機構の正確な理解は、授乳不全の治療戦略や周産期の母子の健康問題に寄与すると考えられる[3]。さらには、畜産における泌乳の管理[4]など、基礎医学を超えた産業的応用へも接続しうる。子の側から見れば、吸吮行動を介して生存に必須の母乳を確保しつつ、母体の生理状態に応じて摂取機会を調整する相互作用が生じる。この相互作用は単なる栄養供給ではなく、外界環境と個体発達を結びつける適応戦略として理解できる。この相互作用を支える中枢機能の一つが、吸吮刺激により駆動される射乳反射である[5]。

授乳のプロセスのうち乳汁射出 (射乳) は、母親の脳で起こる反応である射乳反射によって引き起こされる[5]。この反射は子が母親の乳頭を吸吮することで誘発され、求心性回路を介して視床下部の室傍核 (paraventricular hypothalamic nucleus; PVH) と視索上核 (supraoptic nucleus; SO) にある中枢オキシトシン (OT) 神経が活性化され、下垂体後葉から OT が分泌される。放出された OT は乳腺を収縮させることで乳汁の射出を誘発する[5,6]。特筆すべきは、吸吮刺激に応じた OT 神経の活動が連続的ではなく、間欠的なパルス (pulse) として反復する点である。ラットでは、射乳イベントと対応する乳腺内圧の上昇を生理指標として用いることで、射乳が離散的イベントとして繰り返されることが明らかにされ、視床下部神経のバースト状発火が射乳の直前に急増することが示された[7]。吸吮中に見られる SO および PVH の活動については、吸吮刺激と推定 OT 神経のスパイク活動との対応が解析された。その結果、吸吮刺激に対して乳腺内圧の上昇が約 4–8 分間隔で反復し、それぞれに 12–18 秒先行して PVH/SO の神経群が 1–4 秒間の一過性バーストをほぼ同時に示すことが報告された。これは、吸吮刺激に応じて OT 神経群が一定の時間間隔でまとまって動員されることを支持する[8]。覚醒・非麻酔条件での電気生理記録は、これらの現象が麻酔・拘束条件の作用によるものではないことを支持した[9]。

OT パルスが射乳に必須であることは遺伝学的にも裏づけられる。OT または OT 受容体 (OTR) 遺伝子を欠損した母マウスは分娩はできるが射乳することができないため、生後 24 時間以内に乳が乳腺に残ったまま仔マウスが死亡する[10–12]。

以上より、射乳反射は吸吮刺激を契機として OT パルス放出を生じ、乳腺の収縮を介して乳

汁射出を実現する神経内分泌反射であり、その成立には OT システムが必須であると理解されてきた (概略図 1) [7,10,12]。



概略図 1

1.2 視床下部 OT 神経のバースト状同期発火の生成機構

OT 神経は、解剖学的・機能的に大細胞性 (magnocellular) と小細胞性 (parvocellular) に大別される[13]。小細胞性 OT 神経は主として中枢内へ投射する一方、大細胞性 OT 神経は下垂体後葉へ軸索を投射して血中へ OT を放出する。射乳反射への寄与が大きいのは、この下垂体後葉投射性の大細胞性 OT 神経である。授乳中、これら大細胞性 OT 神経では多数の細胞が同期的にバースト発火し、その結果として脳下垂体後葉から大規模な OT のパルス状放出が引き起こされる[7,8]。射乳直前の発火加速は顕著であり、PVH 神経の発火率が通常の 20–40 倍に増大することが定量されている[7]。なお、本研究で用いた OT ミニプロモーター駆動 AAV による標識・記録は大細胞性／小細胞性の区別を与えないため、本論では両者を包含して 1 つの PVH OT 神経集団として扱う。この急峻な同期バーストは、末梢標的に対して閾値を一気に超える OT シグナルを与えるという点で機能的に合理的であると言える。

同期発火の直接的な証拠として、SO と PVH にまたがるペア電気生理記録研究が挙げられる。解剖学的に離れた SO と PVH の OT 細胞が同一エピソードで同時に活動することは、OT パルスが局所的な現象の偶然の一致ではなく同期した集団での発火として存在するこ

とを直接支持する。麻酔下ラットでは、SO と PVH の OT 神経が射乳時に高精度に同調してバースト発火し、発火開始の時間差が極めて短いことが示された[14]。また覚醒下のウサギにおいても射乳反射に伴う OT 神経のパルス状活動が観察され、射乳における OT パルスという神経活動が種を超えて保存された原理であることが示唆されている[15]。

この同期バーストには、妊娠から授乳への移行に伴う構造的な可塑性が関与し得る。妊娠期から授乳期にかけて、大細胞性神経間の膜接触や特殊シナプスの増加が報告されており、回路構造の再編が同期化を支える可能性が示唆されている[16]。同様に、授乳期の同期発火を支える形態学的基盤として、SO における同期化のための形態変化が議論されてきた[17]。また、神経内分泌細胞間の結合様式として、ギャップ結合を介した色素移行の報告もあり、細胞間の直接的な結合の存在も示唆されている[18]。

さらに、局所での OT 分子の作用が同期バーストの形成に寄与し得る。大細胞 OT 神経を含むような *in vitro* のスライス培養系では、OT が自身の放出を促進し得ることが示唆されている[19,20]。これに加え、SO 内への OT 受容体拮抗薬投与が、神経核内および末梢における OT 放出を減弱させることも報告されており、局所機構の重要性が考えられている[21]。

1.3 OT の多機能性とパルス状出力の生理的意義

OT 分子は、下垂体後葉から血中へ分泌され、子宮筋収縮の調節など末梢臓器にも作用する[22,23]。一方で中枢では、仔に対する養育行動の成立や維持に関与することが示されている[24–29]。中枢作用の具体例として、Marlin らは性経験のない雌において、養育行動の一種である仔回収行動に左聴覚皮質が必要であり、同領域での OT 作用が仔の鳴き声に対する皮質応答を増強して仔回収行動を促進することを示した[24]。Yuan & Hou はこの知見を踏まえ、PVH OT 神経の活性化や OT 投与が未経験雌マウスの仔回収を促進することを解説し、OT が経験依存的な養育行動の獲得を加速するという解釈を示した[25]。さらに Valtcheva らは、仔の鳴き声情報が posterior intralaminar thalamus (PIL) を介して PVH OT 神経へ伝達され、反復入力による持続的脱抑制を通じて中枢での OT 放出と養育行動が調節されることを示した[26]。また OT は性的未経験な雌マウスにおける養育行動の立ち上がりを促進し[27]、内側視索前野、腹側被蓋野、側坐核などを含む回路において新生児刺激の価値づけを高めること、ならびにストレス・不安の低減を介して養育行動に間接的に寄与すると考えられている[28]。

このように OT 分子は、生殖・養育にまたがる幅広い局面での作用を持つ。しかし、同一のリガンドが多様な標的と行動に関与する以上、作用が状況に応じて選択的に現れるための

仕組みが必要である。よって、OT 分子の持つ作用の多面性は放出だけでなく受容体応答など標的側によっても制御されると考えられる。この受容体側の制御の一例として、OT 受容体 (OTR) は持続刺激に伴う脱感作・ダウンレギュレーションを示すことが知られている[22]。ヒトの子宮筋細胞では OT 分子への長時間曝露 (最長 20 時間) により OT 結合能が約 10 分の 1 まで低下し、OTR mRNA の低下が観察されている[29]。

以上を踏まえると、OT 分子が生体内で作用するうえで、OT シグナルがどのような時間動体で出力されるかは無視できない。すなわち、持続的な OT 刺激が OTR 応答を低下させるなら、OT 神経の出力がパルス状か持続的かによって OT 分子の作用の維持可能性が左右される。授乳時に観察される OT 神経のパルス状活動は、その中でも時間構造が明確に現れる生理現象であり、OT の多機能性を理解するうえで価値のある研究対象と言える。

1.4 OT 神経活動記録技術の進展と課題

射乳反射研究は、神経活動とホルモン放出を同時計測する技術の進展により発展してきた。1970–80 年代にはラットにおける単一細胞記録により射乳時のバースト発火が捉えられ、発火率の急増や周期的駆動が発見された[7–9]。しかし、当時は麻酔や拘束条件での記録が一般的であったうえに、OT 神経の同定が電気生理学的特徴や下垂体への軸索投射に依存しており、一細胞から同時に記録できる神経数もせいぜい数個だった[30]。よって、母体全体の OT 神経集団動態を精密に評価し長期的に追跡するには不十分であった。

近年、遺伝子導入と光学計測の発展により、カルシウムイオン (Ca^{2+}) イメージングを用いて自由行動下での神経細胞集団の活動記録が可能となった[31]。ファイバーフォトメトリーは、特定細胞群に発現させた Ca^{2+} センサーの蛍光変化から集団活動を長期間記録できる手法であり[32]、OT 研究にも導入され、マウス PVH における射乳関連パルスが集団 Ca^{2+} シグナルとして記録・操作されている[31,33]。

これらの研究において、OT 神経の可視化・特異標識には OT 神経特異的に Cre 組み換え酵素を発現する遺伝子改変マウスが広く用いられてきた[33,34]。これらの遺伝子改変は GCaMP6s の細胞タイプ特異的な発現を可能にしたが、この戦略はさまざまな Cre 依存性神経科学ツールキットの使用を制限してしまう。OT 神経活動を記録するための Cre に依存しない方法を開発できれば、この問題を克服できる可能性がある[35]。さらに、以前の研究[33,35]では授乳の初期段階のみが分析されていたため、授乳のさまざまな段階を通じての OT 神経のパルス状活動のダイナミクスは不明のままであった。よって、長期的なダイナミ

クスの解析が必要とされていた。本研究の最初のパート (4.1) では主にこの問題を取り扱う。

一方で、ファイバーフォトメトリーは集団平均としてのシグナルであるため空間解像度が低く、同期発火への個々の OT 細胞の参加・不参加、同期精度、サブセットの再編といった「集団内部の再構成」を解析するには限界が残っていた。この限界を補う手法として、マウスの頭部に装着できる生体内微小内視鏡 (microendoscopy) と GRIN レンズを用いた単一細胞分解能の *in vivo* Ca^{2+} イメージングが考えられる。この手法では覚醒行動下での深部脳領域における多数細胞の同時記録が可能であり[36,37]、社会行動や視床下部機能解析へも応用されてきた[38–41]。これを OT 神経の研究へと展開することで、授乳経験に伴う OT パルスへの OT 神経動員の柔軟性や単一細胞の波形変化を含む集団内部再編の解析が可能になると考えられた。本研究の第二パート (4.2) ではこの課題を取り扱う。

本論文ではこれらの技術的基盤の上で、授乳期全体を通した OT パルス動態に加えて、次節で述べる離乳後の状態 (4.2) および性成熟・卵巢ホルモン環境の違いが、吸吮誘発パルス活動に与える影響も検証対象として位置づける (4.3)。

1.5 授乳の時期特異性への問いと、生殖段階を跨ぐ OT 系動態

既存研究の多くは主として授乳期個体を対象としてきた[7,9]ことから、生殖サイクルを通した普遍的な OT 神経の発火動態の研究には空白が残る。少数のヒトの臨床的報告においては、出産に続く授乳という時期特異性に限られない時間スケールで再授乳 (relactation) が成立し得ることが示されている。授乳の中断あるいは終了後であっても、乳房刺激と吸吮入力を再導入することにより乳汁分泌が再開し得る現象は再授乳として報告されている。Bose らは、病児・早産児をもつ母親において、産後早期に授乳維持が困難となった場合でも再授乳が成立し得ることを示し、乳汁分泌の立ち上がりから最大産生に至るまでに要する期間が一定ではないこと、ならびに産後からの経過が短く乳房の退縮が軽い条件ほど成立しやすいことを報告した[42]。この結果は、授乳が出産に伴い始まる場合にのみ付随する固定的状態ではなく、産後の時間経過と組織状態に依存して再構成され得る可塑的な過程であることを示す。同様に、授乳不全や低乳量を呈する母親に対しても、頻回授乳を中心とする介入と支援により、少なくとも部分的な再授乳が成立し得ることが示されている[43]。さらに、妊娠・分娩を経っていない養母であっても、乳房・乳頭刺激を基盤とした準備 (必要に応じたホルモン補助を含む) により授乳を試み得る誘発授乳 (induced lactation) の成功例が報告されている[44]。以上の臨床報告は、授乳の成立が必ずしも出産に伴い始まる授乳

時期に閉じず、生殖サイクルにおける可塑的な過程として捉える必要性を支持する根拠となる[42–44]。

またいくつかの古典的研究から、OT 神経は生殖周期と連動して分子・機能状態が変化し、卵巢ホルモンが OT 遺伝子発現を調節することが示唆されてきた。例えば、ラットを用いた研究において、発情周期・妊娠・授乳各期で OT とその類縁ホルモンであるバソプレシンの遺伝子発現が変動することが示されている[45]。また、雌ラットでは思春期以降に OT mRNA が増加し、卵巢摘出 (OVX) により OT mRNA が低下し、エストロゲン補充で回復することも報告されている[46]。このように、卵巢ホルモンの欠如が OT 系に及ぼす影響の存在は長年示唆されてきた[47]。一方で、性成熟や卵巢ホルモン環境が、吸啜刺激により誘発される OT 神経のパルス状活動の成立そのものに必須かどうかは十分に確定していない。これに対し、本論文では、性成熟前後のホルモン環境変化と OT 神経活動の関係を、*in vivo* 計測に基づいて検証する。産生・貯蔵されている OT の分子量と OT 神経のパルス状活動を分解して扱うことが、射乳反射の分子機構の一端を理解する一助となると考える[48,49]。

以上より、射乳反射を支える OT 神経のパルス状活動は古典研究により理解の基礎が築かれてきた一方、性成熟や妊娠出産前、離乳後など長期スケールでの神経活動の動態には未解決点が残る。次章では、これらの未解決点を検証可能な形に定式化し、中心仮説と具体的目的を提示する。

2. 仮説と目的

第 1 章で整理した古典研究と近年の計測技術により、射乳に伴い OT 神経が同期してバースト発火し、それがパルス状の OT 放出として現れることは、理解されてきた。一方で、(i) 授乳段階や離乳後を含む長期スケールでの OT 神経の集団動態、(ii) 個々の OT 神経の同期発火への参加・不参加や波形変化を含む OT 神経集団内部の再編、(iii) 性成熟・卵巢ホルモン環境が吸啜誘発パルス活動と OT 産生量に与える影響、の 3 点に関しては十分に理解されていない。そこで本章では、これらを *in vivo* 計測に基づいて検証するための中心仮説と具体的目的を示す。

2.1 仮説と研究の目的

本研究は、OT システムを「吸啜刺激に応じてパルス発火する神経回路」と、「OT を産生・貯蔵しパルス状に放出する内分泌機構」が一体となって働く可塑的システムであると捉える。そして、繁殖段階 (授乳段階・離乳後・性成熟/卵巢ホルモン環境) の違いに伴う OT 出力の変化は、神経回路側で現れるパルスの時間的特徴 (頻度・振幅・持続・タイミングなど) の変化と内分泌側の産生・貯蔵状態の寄与として説明できると考える。これらの仮説を *in vivo* 計測に基づき生殖周期スケールで検証することが本研究の目的である。本研究の新規性は、第一に Cre 非依存型の OTp に基づく OT 神経パルスの可視化[50]、第二に微小内視鏡による PVH OT 神経の単一細胞レベルの記録、離乳後の再吸啜に伴うパルス活動の再活性化動態の解析[51]、第三に性成熟を操作し、吸啜誘発パルス活動と OT 産生量指標の解離を検討した点である。

2.2 具体的目的 (Aims)

以上を踏まえ、本論文の目的は以下の通りである。

Aim1: Cre 非依存型の OTp-AAV による OT 神経パルス活動の可視化、および授乳期全体を通じた OT 神経活動ダイナミクスの解明。

Aim2: 微小内視鏡による PVH OT 神経の同時多細胞記録、および離乳後再吸啜での再活性化と集団内部再編の解析。

Aim3: 性成熟の有無と「OT 神経活動 vs 産生量」の解離の検証。

結果においては、4-1 で Aim 1 に対応し、Cre 非依存型の計測系の確立を確立したうえで、授乳期全体を通して OT 神経集団のパルス活動がどのように推移するかを示す[50]。4-2 では Aim 2 に対応し、PVH OT 神経の同時多細胞記録により、授乳経験に伴いパルスに参加する OT 神経の増減や集団内部構造を単一細胞レベルで解析し、ならびに離乳後再吸啜での

再活性化過程を解析する[51]。4-3 では Aim 3 に対応し、性成熟状態を操作した条件で、吸啜誘発パルス活動と OT 産生量指標の関係を比較し、両者の解離を検証する。

最後に、これらの結果を統合し、生殖サイクルを通して OT 神経系の状態がどのように調節されるかという観点から、射乳反射の確実性と可塑性を議論する。

2.3 期待される知見

本研究により、生殖ステージが異なっても共通して観察される OT 神経集団パルスの特徴と、ステージによって変化する特徴の幅を、*in vivo* 計測に基づいて定量的に整理されることが期待される。あわせて、集団平均を捉えるフォトメトリーと、同じ集団の単一細胞活動を同時に捉える微小内視鏡の単一細胞同時記録を比較することで、集団として見えるパルスの変化が「集団内部の個々の OT 神経の再編」によってどのように生じるのかを説明できる可能性がある。さらに、性成熟環境の操作により、吸啜誘発パルス活動（ネットワーク現象）と OT 産生量指標（内分泌側）の解離を検証し、パルス活動の変化を主として制約するのが神経回路側の変化か、内分泌側の OT 量の変化かを切り分ける枠組みが得られる。これらの知見は、生殖ステージをまたぐ時間スケールにおいて哺乳類を特徴づける授乳を支える神経基盤を理解する手がかりとなり、将来的に母子の生活の質を向上させる医療技術や介入・評価法を考える際の基盤となることが期待される。

3. 方法

実験動物

実験に使用したマウスは、餌と水を自由に摂取できる 12 時間明期/12 時間暗期のサイクルで飼育した。C57BL/6N マウスおよび ICR マウスは JAPAN SLC (Hamamatsu, Japan) から購入した。野生型 FVB マウスはクレアジャパン株式会社 (東京、日本) から購入し、生体内微小内視鏡イメージング実験用に C57BL/6 と FVB 系統の F1 雑種 (生後 2~5 ヶ月) を作製した。F1 雑種を用いることで、生体内微小内視鏡を設置した際の比較的ストレスの多い状況において、良好な授乳や母性行動パフォーマンスが期待できる[52]。すべての実験手順は、理化学研究所神戸支部の動物倫理委員会により承認された (A2017-15-14)。

ウイルス作成

pAAV-OTp-GCaMP6s を構築するために、C57BL/6J マウスゲノムを鋳型として、PCR プライマー 5'-agatgagctggtgagcatgtgaagacatgc と 5'-ggcgatggtgctcagatccgctgt を用いて、ラット *OT* プロモーター (*OTp*) [53] と相同性がある 2.6-kb マウス *OTp* [54] をサブクローン化した。この 2.6 kb 配列は *OT* 神経での発現を与える実用上のプロモーターとして機能するが、当該領域内の責任配列や結合転写因子などは同定されておらず、*deletion assay* などによる領域マッピングも本研究では行っていない。従って、本研究における *OTp* は配列要素レベルで機能的に定義されたものではなく、細胞特異的発現を実現するための実装として位置づける。*pAAV.CAG.Flex.GCaMP6s.WPRE.SV40* (Addgene #100842) を PCR テンプレートとして使用し、*GCaMP6s* カセットを増幅して導入した。*AAV Serotype 9 OTp-GCaMP6s* は、群馬大学ウイルスベクターコアで作成し、超遠心法を用いて精製した [55]。*pAAV-OTp-GCaMP6s* は、Addgene に提供済みである (Addgene #81765)。

ウイルスの定位注入

AAV を特定の脳領域に注入するために、まず、マウス脳アトラスに基づいて定位座標を定義した [56]。マウスは、65 mg/kg ケタミン (第一三共) と 13 mg/kg キシラジン (シグマ アルドリッチ) の腹腔内注射により麻酔し、頭部を定位装置 (ナリシゲ) に固定した。ファイバーフォトメトリー記録のため、*AAV9 OTp-GCaMP6s* (titer: 2.9×10^{12} genome particles per ml) 200 nl を以下の座標の PVH (ブレグマから 0.60 mm 前方、ブレグマから 0.3 mm 左側方、脳表面から 4.5 mm 腹側) に注入した。ウイルス注入後、切開部を縫合

し、マウスを麻酔から回復させた。その後、マウスをホームケージに戻した。

ファイバーフォトメトリー

ファイバーフォトメトリー記録は、先行研究の手法を参考に実施した [33]。400 μm コア、0.5NA 光ファイバー (Thorlabs、cat#FP400URT) を、AAV 注入した野生型雌マウス (2~5 ヶ月齢) の PVH 直上に埋め込んだ。手術後、雌マウスは同系統の雄マウスと交配し、記録までホームケージで飼育した。GCaMP6s を発現する神経細胞は、465nm (309.944Hz で変調) および 405nm (208.616Hz で変調) の光で照射された。GCaMP6s が発した蛍光は、集積型蛍光ミニキューブ (Doric Lenses, iFMC4_AE (405)_E (460-490)_F (500-550)_S) を用いて収集した。集光・フィルタリング・復調は、Doric photometry setup と Doric Neuroscience Studio Software (Doric Lenses) を用いて行った。405 nm の信号はバックグラウンド (非カルシウム依存性) として記録し、465 nm の信号はカルシウム依存性の GCaMP6s 応答として使用した。ファイバー先端の出力は、フォトダイオードパワーセンサー (S120VC、Thorlabs 社製) により計測し、約 5 μW であった。信号は最初 12 kHz で取得し、その後 120 Hz にデシメートした。OT 神経のパルス状活動を解析する前に、5 Hz の low pass フィルターを使用した。

OT 神経のパルス状活動の解析には、自作の Python コードを使用した。概略すると、最小二乗法で 405 nm の信号を 465 nm の信号にフィッティングした後、バックグラウンドの 405 nm の信号を 465 nm の信号から減算した。そして $\Delta F/F$ (%) を、 $100 \times (F_t - F_0) / F_0$ として算出した。ここで、 F_0 は全記録期間にわたるバックグラウンド減算後の信号の平均値、 F_t は時間 $= t$ におけるバックグラウンド減算後の信号である。PVH に対する光ファイバーの位置は個体により変動するため、各母体マウスのパルスの高さは個体間で一致しない。OT 神経のパルス状活動は、Python の Scipy モジュールの findpeaks 関数を用いて、閾値を推定パルス高さの半分、半値幅 (Full Width at Half Maximum : FWHM) の閾値を 1 秒以上として自動的に検出した。次に、パルスの高さが半分に達した時刻を 0 秒として、これを中心に -10 秒から +15 秒までの $\Delta F/F$ データを抽出し、-8 秒から -3 秒のベースライン期間の蛍光の中央値を 0 に調整し、データのベースが 0 になるよう y 軸を調整した。授乳期のパルス状活動を解析するため、分娩日の 1 日後を出産後日数 (Postpartum day : PPD) 1 と定義した。仔の数が OT 神経の活動パターンに影響を与える可能性を排除するため、PPD 0 の時点で仔の数を $n = 6$ に調整し、仔の数が 6 に満たない場合、または仔が授乳期に死亡した場合は、同じ日齢の養仔を追加した。

図 2 では、PPD 2-4 の C57BL/6N と ICR の母親を明期と暗期にそれぞれ 6 時間ずつフォトメトリー記録を行った。図 3 では、PPD 12-14 の母親で同じく明期と暗期にそれぞれ

6 時間ずつフォトメトリー記録を行った。母マウスが実験環境に慣れるように、記録の 2 日前からホームケージ内に直径 5 cm の半球状の金網の囲いを 2 つ設置した。実験当日は、まず母仔分離前の「Before」の OT 神経のパルス状活動のデータを得るために、明期に 2 時間フォトメトリー記録を行った。その後、暗期に入るタイミングで密閉した金網の中に仔マウスを隔離し、母マウスに金網を自由に探索させ、物理的隔離中の仔マウスから視覚、聴覚、嗅覚の入力を得させた。翌日の明期開始 6 時間後に仔を金網から解放し、さらに連続して 2 時間のフォトメトリー記録を行って「After」データを取得した。この過程をビデオ撮影し、母マウスが金網を探索するタイミングを手作業で記録した。隔離中や隔離後に死亡したり衰弱したりした仔はおらず、すべての母親が隔離後に母乳を与え、母性行動をすることが確認された。

図 4b、4c、4e~4g、5 および 7 では、明期と暗期でそれぞれ 6 時間ずつ測光信号を記録した。仔の回収行動中のフォトメトリー記録 (図 4D) では、PPD12~14 の授乳中の母マウスのホームケージに仔を順に導入した。母親 1 匹あたり 30 分間測光記録を行い、3 匹の母マウスで 41 回の回収行動を観察した。図 6 では、異なる日齢の養仔を授乳中の母マウスに導入した。まず、授乳前期 (PPD 2~4) に、生後 17~19 日の年長の養仔を母マウスに導入した。次に、授乳後期 (PPD17~19) に、生後 2~4 日の年少の養仔を母マウスに導入した。3 日連続して、明期に 6 時間フォトメトリー記録を行った。1 日目は自身の仔、2 日目と 3 日目は養仔を使用した。里親セッション (2 日目と 3 日目) では、1 日目の夕方に養仔を母マウスに同居させ、母マウスが里親に慣れるようにした。元の仔は他の里親のもとで健康に保たれ、3 日目以降に元の母マウスの元に戻された。図 7 では、 $\Delta F/F$ の正確な値は異なる個体間で比較できないため、ピークの高さを比較するためにすべての $\Delta F/F$ を同一動物内の PPD 18 のピークの平均値で正規化し、正規化 $\Delta F/F$ とした。

図 4 では、マウスケージ上部に設置した赤外線カメラ (DMK33UX273; The Imaging Source) からの映像をファイバーフォトメトリーの記録と同期させた。母マウスが巣に滞在している時間を解析するために、巣を以下のように定義した。ほとんどの場合、母マウスは巣材を 1 か所に集めているために巣が目視で確認でき、すべての仔マウスが巣材内に位置していた。まれに巣材がうまく集まっていない場合は、仔を回収して集めた場所を巣と定義した。ビデオ撮影をもとに、母マウスが全身を巣内に位置させ、仔に接触している間の総時間を手動で計測した。

生体内微小内視鏡イメージング

生体内微小内視鏡記録のために、ProView GRIN レンズ (直径 500 μm 、長さ 8.4 mm、

Inscopix) を PVH に挿入した。マウスは、腹腔内投与によるケタミン (65 mg/kg、第一三共) およびキシラジン (13 mg/kg、Sigma-Aldrich) で麻酔され、頭部は定位固定装置 (Narishige) に固定された。レンズ標的領域の中心をブレグマの後方 0.5 mm、正中線の外側 0.5 mm に配置し、直径 1 mm の開頭手術を行った。残りの骨および上にある硬膜を細いピンセットで慎重に除去した。脳組織を表面から 3 mm の深さまで吸引した。GRIN レンズを ProView レンズホルダーに取り付け、Inscopix nVista に装着した。次に、開頭手術によりレンズの中心を合わせ、nVista で GCaMP6s の発現をモニタリングしながら、レンズを垂直方向に 5° の角度で 4.4 mm 進め、アセンブリをゆっくりと脳内に下ろした。このアプローチにより、レンズの中心が正中線から約 200 μ m、脳表面から 4.3 mm 下に位置することが保証される。目的の深さに到達したら、レンズは Super-Bond (Sun Medical) を使用して永久的に固定し、頭蓋骨に密着させた。顕微鏡の着脱を容易にするために、金属バー (CF-10、Narishige) も取り付けた。接着剤が完全に硬化した後、カメラとレンズホルダーをレンズから慎重に取り外し、露出したレンズ表面を保護するために KWIK-CAST (World Precision Instruments) を使用した。3 週間以上の回復期間の後、マウスを麻酔し、再び定位固定装置に配置した。GCaMP6s 標識細胞に焦点が合うように焦点面を調整し、ベースプレート (Inscopix) を Super-Bond で永久接着した。1 週間以上の回復期間の後、顕微鏡を装着し、マウスはホームケージ内で 5~10 分間自由に探索できるようにした。この馴化セッションは、最初のイメージングセッションの前に 2 回以上実施した。

GCaMP の発現が安定するよう、AAV 注入後 8 週間以上、GRIN レンズ移植後少なくとも 6 週間の期間を置いた。これまでの研究では、視野は GRIN レンズ移植後約 5 週間で安定することが実証されている[57]。Inscopix nVista システム (Inscopix) を使用して、1 日以内のイメージングセッション間で再焦点を合わせることなく生体内微小内視鏡イメージングを行ったが、焦点面は毎日最初のイメージングセッションの前に調整した。イメージングの前に、埋め込まれたヘッドバーを固定することで生体内微小内視鏡をマウスに取り付けた。画像 (1080 × 1080 ピクセル) は、nVista HD ソフトウェア (Inscopix) を使用して 10 Hz で取得した。LED パワーは 0.4~0.8 mW/mm²、ゲインは 2.0~3.0 に設定した。数回の画像化セッションを実施し、各セッションは 15 分間続き、セッション間には数分間の間隔があった。画像データは 800 × 700 ピクセルにトリミングし、Inscopix データ処理ソフトウェアを使用して .tiff ファイルとしてエクスポートした。神経信号抽出のための推定細胞体を特定するために、空間ダウンサンプリング率 2 で MIN1PIPE [<https://github.com/JinghaoLu/MIN1PIPE> ; [58]] の v2 を使用した。特定された細胞からのすべてのトレースは、信号の品質を確認するために手動で検査し、異常な形状や隣接細胞からの信号が重複している場合は除外した。カルシウム蛍光の相対的变化は、

$\Delta F / F_0 = (F - F_0) / F_0$ (ここで、 F_0 はトレース全体の蛍光の中央値を表す) で計算した。

生体内微小内視鏡画像データからの測定および定量

背景信号の計算には、GRIN レンズの外側にある ROI からの平均信号を測定した。

MATLAB の polyfit 関数を用いて、この背景信号を GCaMP6s 信号と最小二乗線形フィッティングで整列させ、フィッティング信号を生成した。 $\Delta F / F$ は、動きやその他の一般的なアーティファクトを除去するために、フィッティングされた背景信号を GCaMP6s 信号から差し引くことで得た。

パルス状活動の検出

パルス状活動イベントを検出するため、同時に記録されたすべての ROI から $\Delta F / F$ の平均トレースを計算した。次に、MATLAB findpeaks 関数を使用してピークを特定し、ピーク時間を 0 と定義した。各 ROI がパルス状活動を示しているかどうかを評価するために、ROI と集団平均パルス状イベントのピーク時間を基準として、-15 秒から 15 秒の範囲でノイズ相関と相互相関を測定した。ノイズ相関が 0.25 を超え、相互相関が 0.65 を超える ROI は、パルス状活動を示していると分類した。2 つの ROI 間の相互相関の値と遅延は、MATLAB xcorr 関数を使用して、複数のパルスそれぞれについて得られた平均相互相関を使用して計算された。

個々の細胞の脈拍タイミングを決定するために、集団平均パルスイベントのピークを基準として -15~15 秒の時間ウィンドウを使用し、各 ROI のピークはピーク高さのしきい値を 0.1 にした MATLAB の findpeaks 関数を使用して検出した。細胞間でピーク高さが異なるため、 $\Delta F / F$ トレースは、トレース全体のピークが 1 に設定されるように正規化した。これらの条件下でピークが検出されなかった場合は、集団平均パルス状活動のピークタイミングが、その特定のパルス状活動イベントの時間 0 として使用した。ベースライン活動を定義するために、パルス状ピーク後 30-60 秒の 30 秒の時間ウィンドウを使用した。これは、一部のイメージングセッションでは、-45~-15 秒などの十分な時間ウィンドウがパルス状活動前に利用できなかったためである。このようなセッションを分析から除外してイベント前のベースラインを使用した場合、実質的な違いは見られなかったため、このベースライン定義はデータの解釈に影響を与えないことを確認した。

日をまたいだ縦断的追跡

図 9 の縦断的追跡では、PVH OT 神経の分布がまばらであるため、手作業による検査で

異なる日に同じ細胞を識別した。具体的には、Inscopix データ処理ソフトウェアを使用して、パルス状活動期間中に投影画像を作成し、検出された ROI を重ね合わせた。これらの画像を比較することにより、PPD 1-2 と PPD 11-12 の間で同じ細胞を一致させた。パルス状に活動しない細胞は分析から除外した。PPD 1-2 と PPD 11-12 の両方で検出された細胞は「維持」と分類し、PPD 11-12 でのみ観察された細胞は「新規参加」と分類した。図 5L では、同じ手順を使用して、PPD 11-12 と PPD 34-35 の間の細胞を追跡した。

クラスタリング分析

OT 神経のパルス状活動パターンの不均一性を評価し客観的な分類を与えるため、パルス状活動中の平均応答に対してクラスタリング分析を実行した。集団平均パルス状活動のピークを基準として-15 秒から 30 秒の範囲の平均パルス状活動データを使用した。PPD 1-2、PPD 5-6、および PPD 11-12 からのデータをプールし、各 ROI のピーク活動を 1 に設定して正規化した。結果として得られた正規化されたデータマトリックス (375×450) は、主成分分析 (PCA) により次元削減し、データ分散の大部分を捕捉する主成分 (PC) を抽出した。PCA は MATLAB `pca` 関数を使用して実行し、PC、スコア、および説明分散などのその他の関連出力を生成した。分散の 95%以上を占める最初の 6 つの PC のスコアに k 平均法クラスタリングを適用した。再現性を確保するために、固定ランダムシードを使用して 6 つのクラスターで k 平均法クラスタリングを実行した。

離乳後の養仔実験においては、既存のクラスターに追加のサンプルを割り当てるために、まず元の 375×450 データ行列から得られた平均値を用いて入力データを正規化し、入力データセットが元のデータと同様に中心化されるようにした。次に、中心化された追加データは、元の PCA から得られた PC ベクトルを用いて PCA 空間に投影した。追加サンプルを定義済みクラスターに割り当てるために、MATLAB の `knnsearch` 関数を用いて k 近傍探索を行い、元のクラスタリングから最も近いクラスターの重心を求めた。

仔マウス回収試験

母マウスは、回収試験の少なくとも 1 日前に、標準的なウッドチップ床材を敷いたホームケージ ($191 \text{ mm} \times 376 \text{ mm} \times 163 \text{ mm}$) に入れた。イメージングセッションの前に、仔マウスを巣から取り出し、巣には 2-3 匹の仔マウスを残した。2-3 分間の待機の後、イメージングセッションを開始した。回収試験は、巣の反対側の角に 2 匹の仔マウスを配置することから開始した。母マウスが 2 匹の仔マウスの回収に成功した場合、さらに 2 匹の仔マ

ウスを同じ角に配置した。このプロセスは、6 分間のイメージングセッションが終了するまで継続した。

PVH における仔マウス回収反応細胞の検出

仔マウスの回収中に有意に反応する細胞を識別するために (図 10)、行動イベントとベースライン期間との間で試行平均 Ca^{2+} シグナルを Mann-Whitney U 検定を用いて比較した (有意水準 $P < 0.05$)。行動のビデオはカメラ (DMK 33UX174、Imaging Source) を使用して 20 Hz で録画した。WaveSurfer は、行動追跡と生体内微小内視鏡画像化を同期させるために、精密なトランジスタ-トランジスタ ロジック (TTL) パルスを生成した。先行研究に倣って[59]、細胞は仔マウスへの接触、仔マウスの回収開始、および回収完了の 3 つの行動カテゴリーのいずれかで増加または抑制される 6 タイプに分類した。平均化には次の時間ウィンドウを使用した。接触: 接触開始後 0~+1 秒、開: 仔マウスの回収開始後 1.5 秒、完了: 回収完了後 1.5 秒。ベースラインの時間ウィンドウは、各行動イベントに対して -1.5~0 秒であった。まず、反応が高まった細胞を、接触、回収開始、完了の順に割り当てた。場合によっては、抑制された反応によってベースラインが変動することが分かった。例えば、接触時に抑制された反応を示した細胞は、ベースラインが低下したために、開始時または完了時に反応が高まった細胞に誤って割り当てられる可能性があった。このような場合、有意性を再評価するために、接触開始を基準としてベースラインを-1.5 秒から 0 秒に再計算した。3 つの行動カテゴリーのいずれかに対して反応が高まった細胞をすべて割り当てた後、残りの細胞は、接触、回収開始、完了の順に有意な抑制反応を示したかどうかで分類した。

組織学と組織化学染色

マウスにイソフルランを過剰投与し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で経心臓灌流した後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS 溶液で灌流した。脳組織を 4%PFA を含む PBS 溶液で 4°Cで一晩後固定し、30%スクロースを含む PBS 溶液で 4°Cで 24~48 時間凍結保護し、最適切断温度 (OCT) 化合物 (カタログ番号 4583、Tissue-Tek) に包埋した。GCaMP6 の免疫染色のために、クライオスタット (モデル番号 CM1860、Leica) を使用して、全脳の 30 μm 冠状切片を採取した。遊離スライスをブロッキング溶液 (PBS 中の 5%熱不活化ヤギ血清および 0.4%トリトン X-100) の溶液中で室温で穏やかに攪拌しながら 2 時間インキュベートした。室温で一晩、一次抗体 1:1000 マウス抗緑色蛍光タンパク (GFP) (GFP-1010、Aves Labs) を含むブロッキング溶液で処理した後、2~3 時間、二

次抗体 1:500 抗ニワトリ免疫グロブリン Y Alexa488 標識 (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号 703-545-155) を含むブロッキング溶液で処理した後、15 分間、PBS 中の 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI、2.5 μ g/ml、Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号 sc-3598) で処理した。切片をスライドガラスに封入し、封入剤 (Fluoromount、Diagnostic BioSystems) でカバーガラスをかぶせた。

切片は、冷却 CCD カメラ (DP80、オリンパス) を装備した 4 $\times$ (NA 0.16) または 10 $\times$ (NA 0.4) 対物レンズを備えたオリンパス BX53 顕微鏡、または 10 $\times$ (NA 0.45) 対物レンズを備えた Zeiss Axio Scan.Z1 を使用して画像化した。

仔マウスの体重測定

記録前の仔マウスの体重を 100%とし、6 時間のフォトメトリー記録のあとに再び仔マウスの体重を測定して、元の体重からの増減を 100 分率で表した。1 回あたり 6 匹の仔マウスを実験に用い、6 匹の仔マウスの体重の増減率を平均し 1 つのデータポイントとした。

卵巣切除実験

3 週齢のマウスを、65 mg/kg ケタミン (第一三共) と 13 mg/kg キシラジン (シグマ アルドリッチ) の腹腔内注射により麻酔した。腹部を切開し卵巣を露出させ、卵管切開部から摘出した。Sham 手術群では、卵巣を摘出せずに同様の処置を行った。マウスは麻酔から回復後、5 週間回復させ成体マウスへ成長させた。卵巣摘出の有効性は、4 日間連続して採取した膣スメアの分析によって確認した。Sham 群に割り当てられたすべてのマウスは、正常な発情周期を示した。

膣細胞診による発情周期モニタリング

発情周期モニタリングには膣細胞診を使用した。偽妊娠を誘発しないよう最小限の挿入で、水道水 10 μ L を 1 回か 2 回、膣内に静かに注入した。これらの膣スメアをスライドガラス上に置き、先行研究[60,61]に従い、白血球、角化上皮細胞および核形成上皮細胞の有無に基づいて発情周期の段階を判定した。図 12、13 では、マウスの膣の状態を 0~3 のスケールで評価した。発情休止期 (0)、発情前期 I (1)、発情前期 II (2)、発情期 (3)。

定量化・統計解析

使用した統計検定や n 数の正確な値など、各実験の統計的詳細は各図の凡例に示す。p 値は各図パネルまたは凡例に示した。有意差のない場合は記載を省略した。

フォトメトリーの解析には、カスタム Python コードを使用した。生体内微小内視鏡データの解析には、カスタム MATLAB コードを用いて統計検定を実施した。すべての検定は両側検定で実施した。サンプルサイズと統計検定の詳細は、図または図の凡例に記載されている。統計的有意差は $P < 0.05$ とした。特に断りのない限り、データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) として示されている。

クラスター内の PPD18 データ上のパルス状活動の間隔である Inter-peak interval (IPI) が指数分布に従うかどうかを検証するために、観察された IPI 分布によりよく適合するように指数分布のパラメータをスクリーニングした。そして、Kolmogorov-Smirnov test を用いて、データポイントの大きさを実験データの大きさと揃え、最も適合する指数分布に基づいてコンピュータシミュレーションで生成したデータと実験データとを比較した。

研究で使ったカスタム MATLAB/Python スクリプトと、ファイバーフォトメトリーおよび生体内微小内視鏡のデータは、SSDB デポジトリ (<https://doi.org/10.24631/ssbd.repos.2024.09.397>) に寄託した。

4. 結果

4.1 授乳中の野生型マウスにおける OT 神経のパルス状活動の動的調節

4.1.1. OT プロモーター駆動型 AAV ベクターによる GCaMP6s 発現

Cre/loxP システムを用いずに GCaMP6s を OT 神経へ導入するために、2.6 kb のマウス OT プロモーター[54]の下で GCaMP6s を駆動する AAV ベクターを構築した (図 1a)。この AAV を用いた GCaMP6s の OT 神経への特異的発現を調べるため、ウイルスの注入から 2 週間後、PVH を含む冠状脳切片を OT 用 RNA プローブによる in situ hybridization で染色した後、抗 GFP 抗体による GCaMP6s の免疫組織化学染色を行った (図 1b)。この解析により、GCaMP6s+神経の $96.7\% \pm 0.37\%$ (平均 $\pm$ 標準誤差) が OT 陽性であることが判明し (図 1b,c)、Cre/loxP システムを用いた手法[33]と同等以上の高い特異性を示した。なお、本 AAV は OT 遺伝子のプロモーター配列を利用して GCaMP6s を発現させるため、生殖段階や卵巢ホルモン環境の変化に伴いレポーターの発現量が変動し得る可能性があるが、本研究ではこの点は定量していない。

この GCaMP6s の発現が、授乳中の野生型マウスにおいて OT 神経の活動をファイバースコープによって選択的に記録することが可能かどうかを検証するために、次に GCaMP6s を導入した雌マウスの PVH の真上に光ファイバーを埋め込んだ (図 1d)。手術から回復した後、これらの雌マウスを同系統の雄マウスと交配し、PPD 13 で Ca^{2+} イメージングを行った (図 1e)。図 1f に示す 6 時間の連続測光トレースには 30 の明確なパルス状活動があり、以前の Cre ベースの戦略で観察されたものと非常に類似していた [33,35]。パルス発生時の周辺トレースの拡大表示 (図 1g) は、OT 神経のパルス状活動の代表的な波形を示した。これらのデータは、AAV9 OTp-GCaMP6s が、生殖細胞系に遺伝学的な変更を加えることなく、野生型マウスの授乳期における OT 神経のパルス状活動の記録を可能にすることを実証した。

Cre 依存的なイメージング戦略と比較した AAV9 OTp-GCaMP6s の利点は、あらゆる遺伝的背景や系統のマウスに容易に適用できることである。加えて、遺伝子改変動物の交雑を必要としないため、授乳期全体や離乳に至るまでの長期記録を、繁殖計画上の制約を比較的小さくして実施できる点でも実務上有利である。この有用性を示すために、C57BL/6N

と ICR 系統の PPD 2-4 で PVH OT 神経を明期と暗期でそれぞれ 6 時間の記録を行った (図 2)。全体として、パルスの形は 2 種類のマウス系統間で類似していた (図 2a, b)。次に、OT 神経のパルス状活動のピークの数、パルス間隔 (IPI) の累積分布、波形を定量的に解析した。ピーク数は C57BL/6N と ICR で差がなかった (図 2c)。また、パルス状活動の最大値を 1 として正規化した後のパルス状活動の半値幅を比較したところ、C57BL/6N と ICR マウスの間に有意差は見られなかった (図 2d)。一方、IPI の累積分布にはわずかながら有意差が認められ、ICR マウスでは短い IPI の割合が高く、両系統間でパルス状活動の時間的な構造が異なることが示唆された (図 2e)。

以上のことから、AAV9 OTp-GCaMP6s を用いたイメージングが遺伝子交雑を伴わずに ICR 系統に適用できることを確認し、今後、様々なタイプの遺伝子改変マウスにおける OT 神経のパルス状活動に関する研究を促進することが期待される。

4.1.2 母仔隔離が OT 神経活動に与える影響の評価

射乳反射は、母親の乳頭への吸啜刺激が求心性神経回路を經由して中枢の OT 神経に伝わることで開始される [5]。実際、所属研究室の先行研究では、OT 神経のパルス状活動は仔マウスがいないと観測されず、OT 神経のパルス状活動の開始には 3 匹以上の仔が同時に吸啜刺激することが必要だと示された [33]。しかし、授乳経験のある女性 [3] や雌牛などの家畜では物理的な哺乳をしなくても子の泣き声や視覚情報だけで血漿中の OT 濃度が上昇することから [62]、1 回以上の出産・授乳経験があり安定して授乳が行える母マウスにおいても、仔マウスが乳頭に直接触れることができない場合に OT 神経のパルス状活動が見られるかどうかは興味深い点である。これを検証するために、まず授乳経験のある

C57BL/6N 母マウスを仔マウスと共にケージに入れ、実験前の 2 日間にケージ内に小さな金網の囲いを設置し馴化させた。PPD 12-14 の実験当日、フォトメトリー記録から 2 時間後に、仔マウスを金網の囲いの中に入れて、直接仔が乳頭を吸啜できないようにした。この物理的隔離の間、母親は金網の囲いを自由に探索し、仔の視覚、聴覚、嗅覚の入力を得ることができた。隔離後、仔マウスは通常の飼育環境に戻された (図 3a, b)。その結果、仔マウスが金網に隔離されている間、特に母マウスが活発に金網を探索している間にも、OT 神経のパルス状活動は観察されなかった (図 3b)。これらのデータから、授乳の経験が豊富な母マウスであっても、OT 神経のパルス状活動には、仔マウスが乳頭に直接触れることが必須であることが示唆された。また、物理的隔離を解除すると、OT 神経のパルス状活動がすぐに回復することも分かった (図 3a, b)。興味深いことに、授乳期が回復す

ると、パルス状活動の頻度と強度が増加した (図 3b, c) 。特に、「Before」の $\Delta F/F$ の最大値を 1 として正規化した $\Delta F/F$ で評価した強度は、平均で 1.4 倍と有意に増加した。また、2 時間の測定時間あたりのピーク数も平均 1.8 倍と有意に増加した (図 3c) 。これらのことから、OT 神経の活動は先行する授乳パターンに応じて動的に調節されることが示された。

4.1.3 母仔の相互作用と OT 神経活動の相関関係

次に、授乳期の C57BL/6N マウスの OT 神経のパルス状活動の時間動態を、ホームケージ内の母仔相互作用と関連付けて解析することを目指した。このため、PVH OT 神経のファイバーフォトメリー記録と組み合わせて母マウスの行動をビデオ録画し、母マウスが巣に滞在する時間と OT 神経のパルス状活動の発生との相関を調べた (図 4a) 。授乳初期 (PPD 2-4) 、中期 (PPD12-14) 、後期 (PPD18) の明期と暗期でそれぞれ 6 時間ずつ記録した (図 4b) 。その結果、OT 神経のパルス状活動は、明暗期や授乳期の違いに関わらず、母マウスが巣にいるタイミング (主に仔の上にしゃがんでいる間) と密接に相関していることがわかった (図 4b) 。注目すべきことに、以前の研究では、ピーク高が PPD 1 から PPD 12-14 にかけて増加したことが示された[33]一方、図 4c では PPD 2-4 と PPD 12-14 の間に大きな変化は見られなかったことから、授乳の最初の 1 日か 2 日でピーク高が大幅に増加することが示唆される。さらに、母親が仔マウスを回収する過程では、PVH OT 神経のパルス状活動は発生しなかった (図 4d) 。このことから、射乳反射には仔の乳頭への直接刺激が必須であるという仮説がさらに支持された。

ビデオ解析により、暗期に母マウスが巣にいる時間は、授乳期が進むにつれて減少することが明らかになった (図 4e) 。6 時間の記録における OT 神経のパルス状活動の総数は授乳期の段階を通して一定であったが (図 4f) 、母マウスが巣に滞在する時間で正規化した暗期のパルス数は授乳期の後期で有意に増加した (図 4g) 。一方、明期には、それぞれの授乳期の間で、巣への滞在時間や相対的なパルスの発生回数に違いは見られなかった。これらのデータは、明期と暗期の間で、母仔相互作用と OT 神経のパルス状活動の時間的動態が異なることを示している。

4.1.4 各授乳期間における OT 神経の活動頻度の定量的解析

授乳期ごとの OT 神経のパルス状活動の動態を定量的に調べるため、IPI のヒストグラムと累積分布を解析した (図 5a, b) 。明期、暗期ともに分布は大きく変化し、授乳期後半になるほど累積確率分布の曲線が急峻になり、授乳期の進行とともにパルス頻度が増加する

ことが示唆された。IPI の分布を明期と暗期で比較すると、授乳中期と後期で有意差が見られた (Fig.5c) 。IPI は授乳後期により明確にクラスター化されていたため、次にクラスター内の IPI 分布の特徴を明らかにすることを目指した。PPD 18 では IPI の 85% が 450 秒以内に位置していたため、450 秒以内の IPI をクラスターと定義した。正規分布に基づく Q-Q プロットは、クラスター内の PPD 18 におけるパルス状活動の分布に正規性を支持しなかった (図 5d) 。次に、IPI の分布が指数分布に従い、パルス状活動の発生がポアソン過程に従うかどうかを検証した。その結果、明期・暗期に関わらずクラスター内の IPI の累積分布は、指数関数分布に基づくコンピュータシミュレーションで生成された分布とよく一致することが確認された (図 5e) 。これらの結果から、クラスター内の OT 神経のパルス状活動の発生はポアソン過程に従っており、他のパルス状活動とは独立してランダムに発生することが示唆された。これらのデータを総合すると、野生型マウスの自然な授乳プロセスが進行する過程における OT 神経のパルス状活動の時間的動態が明らかになった。

4.1.5 仔マウスの成長が OT パルスの発生分布に与える影響

4.1.4 の結果から、授乳の初期と後期で IPI 分布に違いがあることが明らかになったが、これは母親の神経内分泌系における自律的な変化だけでなく、仔マウスの成長に伴う行動の変化に起因している可能性がある。IPI パターンに及ぼす仔マウスの日齢の影響を評価するため、異なる年齢の養仔を授乳中の母マウスに与えた。まず、年長仔マウス (PND 17-19) を授乳初期 (PPD 2-4) の母マウスに与えた。次に、幼弱仔マウス (PND 2-4) を泌乳後期 (PPD17-19) の母マウスに与えた。3 日間連続して、明期の 6 時間のフォトメトリー記録を行った。1 日目は自身の仔マウス、2 日目と 3 日目は養仔に授乳を行った (図 6a) 。IPI の分布、6 時間ごとの OT パルス数、パルスの大きさを分析した。年長仔マウスを PPD 3-4 で母マウスに与えた場合、短い IPI の割合がかなり増加し (図 6b、上) 、授乳後期に観察されたパターンを模倣した。逆に、幼弱仔マウスを PPD 18-19 の母マウスに与えると、短い IPI の割合は中程度に減少し、長い IPI (3000 秒以上) は消失した (図 6b 下) 。OT パルス数、パルスの大きさには有意差は見られなかった (図 6c および 6d) 。これらのデータを総合すると、授乳後期のパルス状活動のクラスター化は、母マウスの脳における自律的な変化の可能性を排除するものではないが、少なくとも部分的には、仔マウスの成長によって誘発される可能性が高いことが示唆された。

4.1.6 離乳期における OT 神経のパルス状活動の動態

離乳期前後から授乳終了までの OT 神経のパルス状活動の動態を明らかにするために、

PPD 18–27 の明期と暗期に各 6 時間、毎日 OT 神経のファイバーフォトメリー記録を行った (図 7a)。OT 神経のパルス状活動は PPD 18 にはクラスターを形成していたが、PPD 22 付近でまばらになり、PPD 26 付近で消失した。定量的な解析の結果、6 時間あたりのパルス数は PPD 23 以降に著しく減少し、PPD 26 には完全に消失していた (図 7b)。この傾向は明期と暗期で共通して見られたが、パルス数の減少は暗期で顕著に見られた (図 7b、c)。評価したパルス状活動の強度は個体間で異なり $\Delta F/F$ の最大値では評価や比較ができないため、次に各データポイントの $\Delta F/F$ を PPD 18 時点での同一個体の $\Delta F/F$ で正規化して解析した。強度は離乳期前後を通じて概ね一定であり (図 7d)、同様にパルスの波形もまた概ね一定であった (図 7e)。これらのデータを総括すると、離乳期周辺では、暗期が明期に先行して、OT 神経のパルス状活動の数が徐々に減少することが明らかになった。

4.2 生体内微小内視鏡観察による 1 細胞イメージングで明らかになった OT 神経活動の柔軟な調整

4.2.1 産後日数による OT 神経のパルス状活動のダイナミクス

4.1 では OT ミニプロモーター (*OTp*) の制御下で GCaMP6s を駆動する AAV を開発し、PVH OT 神経における活動測定を可能とした[50]。本研究は次に、個々の PVH OT 神経の活動測定を目指した。この目的のために、AAV9 *OTp*-GCaMP6s を、頑強な母性行動を示す C57BL/6 と FVB 系統の F1 雑種の成体雌野生型マウスの PVH に注入した[52]。ウイルス注入 3 週間後に、GRIN レンズ (直径 500 μm) を PVH 上に移植した (図 8a)。GCaMP6s の発現とレンズの位置は組織学的に確認した (図 8b)。図 8C および 図 8d は、PPD 6 の授乳中の母マウスの代表例を示しており、視野内に 37 個の関心領域 (regions of interest : ROI、個々の細胞に相当すると考えられる) が含まれている。母マウスがホームケージ内で 8~10 匹の仔マウスと自由に相互作用できるようにしたところ、1 つの ROI [(D) のオレンジ色の #30] を除くすべての ROI で、 Ca^{2+} シグナルの同期した上昇が観察された。ピーク間隔は数分で、射乳反射中にファイバーフォトメトリーによって 4.1 で特徴付けられた PVH OT 神経のパルス状活動の性質と非常によく似ていた [33,35,50]。さらなる分析のために、集団平均活動が最大に達した瞬間をピーク時間と定義した (図 8e, f) ノイズ相関解析の結果、パルス状活動中の個々の ROI 間には強い相関が見られ、一方でベースラインの活動間にはほとんど相関が見られなかった (図 8g)。これらのデータは、ラットにおける少数の単一ユニット電気生理学的記録[5,7,14]で以前に示唆さ

れていたように、PVH OT 神経の高度な同期性を裏付けるものであり、マウス母体における PVH OT 神経のパルス状活動の検出には生体内微小内視鏡検査が適していることを実証した。

さらなる分析により、合計 7 頭の母マウスから記録された ROI の 96%以上がパルス状活動を示したことが示された (図 9a, b)。*OTp* の標的特異性が約 95%であることを考えると[50]、残りの数パーセントの神経は、非特異的に標識された非 OT 神経を表している可能性がある。パルス状活動中に応答する ROI の数は、産後期間にわたって徐々に増加した (図 9b, c)、産後 11~12 日目の応答 ROI は産後 1~2 日目の 1.4 倍の増加となった (図 9d)。パルス状活動の周辺イベント時間ヒストグラムのピーク振幅によって決定された個々の ROI の応答の大きさ (図 9e) は、グループ間で差がなかった (図 9f 左)。対照的に、平均半値幅は徐々に有意に増加した (図 9f、中央)。その結果、パルス状活動の曲線下面積 (AUC) は産後 11~12 日目に有意に増加した (図 9f、右)。これらの結果は、ファイバーフォトメトリーを用いた以前の研究で観察されているように[33,35]、中期授乳期までにより多くの PVH OT 神経がパルス状活動に動員され、細胞がより広いパルス状活動を示し、集団レベルでより大きく広いパルス状活動につながることを示唆している。これらの変化は、母が授乳初期よりも多くの乳を仔に供給する必要がある授乳後期に、血漿への OT のパルス状分泌量が多くなることに寄与している可能性があり、実際にウサギにおける OT 量の測定ではこのような変化が支持されている[63]。

次に、個々の細胞間のパルス状活動の時間的ダイナミクスを特徴付けるために、授乳中に同時に記録された ROI の各ペアの相互相関を比較した。相互相関分析は、2 つの神経の活動パターン間の時間的関係を定量化し、同期の程度と潜在的な時間差を明らかにする[64,65]。図 9g は、産後 6 日目において同時に記録された 3 つの ROI の相互相関分析の例を示す。異なる授乳段階での相互相関分析から時間差の分布を分析した (図 8H) ところ、ほとんどのペアの時間差は小さく、産後 1~2 日目では全ペアの 88.1% が 1 秒以内の時間差に収まっており、授乳中のパルス状活動の同期性は高いことが示された。対照的に、後期の授乳ステージでは、時間差の累積分布曲線がより広くなっており、授乳ステージが進むにつれて時間的変動が増加することを示唆している (図 9h および i)。

次に、異なる授乳ステージにわたるパルス状活動パターンの不均一性を評価するために、パルス状活動中のイベント平均応答に対して k 平均クラスタリング解析を行った (図 9j)。パルス状イベント中の活動に基づいて、6 つの ROI クラスタを特定した (図 9k)。これらのクラスタを次のように定性的に注釈付けした：正常 (クラスタ1)、鋭い拍動型 (クラスタ2)、広い拍動型 (クラスタ3)、早期 (クラスタ4)、ロングテ

ール型 (クラスター5)、および活動後の抑制 (クラスター6)。PPD 1-2 の ROI の大部分はクラスター1と2に属し、比較的定型的なパルス状活動パターンを示し、集団の87%を占めた。対照的に、中期授乳期にはクラスター3~6が拡大し、クラスター1と2の相対的な割合は減少した (図 9I)。特に、クラスター4~6は産後11~12日には集団の最大41%を占めていた。これらのデータは、個々のPVH OT神経のパルス状活動パターンが、授乳期初期から中期にかけて動的に調節されることを示唆している。

4.2.2 産後異なる日数にわたる同じ OT 神経の追跡

これまでのところ、PVH OT神経の2つの集団が明らかになった。1つは産後1日目からパルス状活動を行い、もう1つは授乳が進むにつれて徐々に動員されるものである。これらの集団間の生理学的差異を調査するために、OT神経のスパース標識を利用して、異なる産後日数にわたって同じROIを追跡した。産後11~12日目では産後5~6日目よりも差異が顕著になったため (図 9i)、ここでは産後1~2日目と産後11~12日目に焦点を当てた。数日間にわたって持続するROIを「維持型」(maintained)、授乳期後期に動員されたROIを「新規参加型」(recruited)、途中で検出されなくなったROIを「消失型」(disappeared)と定義した (図 10a)。産後11~12日目では、144個のROIのうち97個がmaintained、47個がrecruitedと分類された (図 10b)。disappearedに分類されたROIは7つだけだった。

まず、maintained ROIを分析した (図 10c)。これらのROIは、図9に示したクラスター化分析で観察された傾向を反映して、パルス状活動の半値幅とAUCの大幅な増加を示した (図 10Dd e)。次に、パルス状活動パターンに基づいてクラスターの遷移を調べた (図 10f, g)。PPD 1-2のクラスター1と2の多くのROIは、PPD 11-12により広いパルス状形状を示した (図 10g)。たとえば、PPD 1-2のクラスター1のROI 40個のうち15個は、PPD 11-12にクラスター3から6に遷移した。対照的に、PPD 1-2のクラスター5と6のROIは安定していた。注目すべきことに、産後11~12日目のクラスター2のほぼすべてのROIは産後1~2日目のクラスター2に由来しており、パルス形状の狭小化を示す細胞はほとんどなかった。

次に、recruited ROI (図 10h) を解析した。これらのROIは、maintained ROIと比較してAUCが有意に小さく、ピーク振幅と半値幅に有意差はなかった (図 10i, j)。recruited ROIにはすべてのクラスターが存在し、集団全体で観察された割合からの偏りはなかった (図 10K と図 9L の比較)。

本イメージングシステムには、いくつかの技術的な限界がある。(i) 母体で観察されるベースライン活動が低いことを考慮すると、PVH OT 神経の一部は、相当なパルス状活動を示さない限り検出できない可能性がある。(ii) たとえ一貫したパルス状活動を示す神経であっても、Z 軸解像度の限界により細胞検出にばらつきが生じる可能性がある。したがって、recruited ROI の神経が産後 1 日目に検出閾値を下回る弱い活動を示していたり、にわずかに焦点から外れた位置にあった可能性を完全に排除することはできない。これらの限界にもかかわらず、本データは、授乳ステージが進むにつれて、recruited に分類された OT 細胞のパルス状活動の強度が大幅に増加し、maintained に分類された OT 細胞の波形が広がる方向に変化が生じることを示した。

4.2.3 PVH OT 神経のサブセットは、仔マウスの回収に対して時間同期した反

応を示す

次に、養育行動の一種である仔マウスの回収行動とそれに続く授乳中に微小内視鏡を用いた Ca^{2+} イメージングを実施し、これらのエピソード中の PVH OT 神経の応答を比較した (図 11a)。仔マウスの回収については、既存の仔マウスが回収されるとすぐに新しい仔マウスが提示される 6 分間の記録セッションを実施した (図 11b)。仔マウスの回収は、仔マウスとの接触、回収の開始、仔マウスを巣に落とす (完了) という順序で、3 段階の主要な行動カテゴリーで構成される (図 11c) [27]。特定の ROI では、回収の開始に反応して Ca^{2+} の一過性の増加が観察された (図 11d)。7 匹のマウスから合計 127 個の ROI を記録した結果、ROI の 10% で Ca^{2+} 増加が見られ、さらに 10% で減少が見られ (それぞれ亢進反応または抑制反応と呼ぶ)、3 つの行動カテゴリーのいずれかに同期していた (図 11e–h)。ほとんどの反応は、回収の開始と同期していた (図 11f)。

次にこれらの回収反応性 OT 神経の授乳中の活動を調べたところ、仔マウスの回収中に反応が亢進した ROI と反応が抑制された ROI の両方で、授乳中に有意に活動が増加し、この反応の大きさは仔マウスの回収中に観察された大きさを遥かに上回った (亢進した集団の図 11g と i を比較)。これらのデータは個々の OT 神経の活動が、授乳中に養育行動中よりも大きくなることを示唆しているが、授乳中のより大きな振幅は単一光子イメージングの限界である Z 軸上で重なった他の細胞の寄与を拾って見えている可能性があるため、注意が必要である。さらに、仔マウスの回収中に反応が亢進した OT 神経では、反応が抑制されたり応答がなかったりする OT 神経と比較して、授乳関連のパルス状活動の傾向がわずかに弱いことを観察した (図 11j)。これらのデータは PVH OT 神経の不均一性

を示し、仔マウスの回収中の PVH OT 神経の比較的弱い活動を検出する上での生体内微小内視鏡イメージングの有用性を強調している。

4.2.4 離乳後期における乳汁分泌がない時の OT 神経のパルス状活動

OT のパルス状分泌は乳汁の射出に必須であるが、PVH OT 神経におけるこの活動が分娩後の授乳中の母マウスに限られるかどうかは依然として不明である。ヒト研究では、女性は数ヶ月間授乳を中断した後でも再開できることが示唆されており、このプロセスは「再授乳」(relactation)として知られている[42,44,66]。PVH OT 神経のパルス状活動が離乳後の母マウスで仔の吸啜刺激後に起こるかどうかを検討するために、仔が離乳する生後 21 日頃まで正常の分娩と授乳を経験した雌マウスから離乳後に養仔を与えてファイバーフォトメトリー記録を行った。離乳後 2 週間で、膣細胞診により発情周期の回復が確認された後[60]、これらの雌マウスを授乳中の母マウスと仔マウスと一緒に 1 日間飼育し慣らした。PPD 37 頃、離乳後の母マウスは 12 日齢の養仔と自由に触れ合える環境を与え、ファイバーフォトメトリー記録により PVH OT 神経の活動を記録した (図 12a)。その結果、同じマウスの PPD 12 に観察されたものと非常によく似た PVH OT 神経のパルス状活動が観察された (図 12b)。しかし、イメージングセッション後、仔マウスの体重は有意に減少しており、離乳後の母マウスの乳汁分泌が不十分もしくは全く無かったことを示している (図 12c)。さらに詳しく調べたところ、実際の授乳中の PPD 11~12 に観察されたものと比較して、PPD 36~38 での再吸啜中のパルス状活動の頻度は有意に低く、振幅も小さいことが明らかになった (図 12d-f)。さらに、パルスの波形は離乳後の母マウスで有意に狭かった (図 12f 右)。これらのデータは、(i) 授乳刺激後の PVH OT 神経のパルス状活動が離乳後の母マウスで生殖周期が回復した後でも観察できること、および (ii) この活動の頻度、強度、波形が出産後の授乳期間と離乳後の再吸啜試験で大幅に異なることを示している。

フォトメトリー記録で見られたこれらの変化を単一細胞解像度で解明するために、母マウスが産後 11~12 日目に仔マウスの世話をしているときと、離乳後 2 週間目の産後 34~35 日目に同じ母マウスが養仔に接触したときの生体内微小内視鏡イメージングを行った (図 12g)。実際に母乳を飲んだかどうかを外部から直接観察するために、生後 12 日齢の仔マウスではなく生後 2 日齢の養仔マウスを使用した。ファイバーフォトメトリー記録と一致して、離乳後の母マウスを用いた場合には仔マウスの体重は減少しており、同時にそれらの仔マウスの胃には母乳が見られなかった。このことは、離乳後の母マウスは乳汁分泌が不十分であることを示している。しかしながら、PVH OT 神経のパルス状活動は観察された。個々の ROI の分析により、PPD 11-12 と比較して PPD 34-35 での応答 ROI 数が減少

することが明らかになった (図 12h)。パルス状活動中のピーク振幅や半値幅などの基本特性には有意差は見られなかった (図 12i, j)。

パルス状活動のパターンを評価するために、産後 11～12 日 (実際の授乳期) から産後 34～35 日まで同じ ROI を追跡し、産後 34～35 日のデータを、図 10g で使用した授乳中の母親の既存の 6 つのクラスターに割り当てた (図 12k)。全体的に、クラスター 1 と 2 の ROI の数はほとんど変化しなかった。これは、産後 11～12 日から産後 34～35 日にかけて比較的安定した ROI が同じクラスターにとどまり、さらに ROI がより広いクラスター (クラスター 3～5) からクラスター 1 に移行したためである。対照的に、産後 11～12 日のクラスター 3～6 の ROI のほとんどは産後 34～35 日には消失した。これらの変化により、離乳後の母マウスのクラスターの割合は授乳初期、産後 1～2 日と似ており、クラスター 1 と 2 が大部分を占め、クラスター 3～6 はごく僅かであると言える。最後に、産後 1～2 日、産後 11～12 日、産後 35～36 日にわたる縦断的追跡の解析により、産後 34～35 日でパルス状活動を示す細胞の帰属を調査した。産後 11～12 日で maintained ROI の 72% が産後 34～35 日でも保持されたのに対し、recruited ROI の 48% は産後 34～35 日で消失した (図 12l)。このように、産後 11～12 日で recruited された細胞は離乳後に無応答の状態に戻る可能性が高く、このことはこれらの細胞がさまざまな状態にわたって PVH OT 神経のパルス状活動の調整因子として機能していることを示唆している。

4.3 性成熟に依存しない吸啜誘発 PVH OT パルスと OT 発現量指標の解離

吸啜刺激により PVH の OT 神経が同期してパルス状活動を示すことは知られているが、この同期発火性が雌マウスの発達過程のどの段階で獲得されるのかは十分に検討されてこなかった。またパルス状活動の成立に OT 発現は当然同調するものと考えられてきたが、それらが本質的に神経活動に必須かどうかを実証した研究は行われていない。よって、この神経活動が性成熟や性経験を経て獲得されるのか、あるいはそれ以前から成立し得るのか、そして OT タンパクがパルス状活動に与える具体的な作用はいまだ明確でない。

そこで本節では、雌マウスの性成熟状態を操作し、吸啜誘発性の PVH OT 神経のパルス状活動と、PVH における OT タンパク発現量指標を併せて評価した。

4.3.1 性成熟した Naïve 雌における吸啜誘発 OT パルス

吸啜誘発性の PVH OT 神経のパルス状活動が、性成熟したが性経験・妊娠・分娩を伴わない雌 (Naïve) において成立し得るかを検討した (図 13)。8 週齢の性的未経験な Naïve 雌マウスに対し、生後 12 日齢の養仔マウス 6 匹によって吸啜刺激を与えた。記録日の前日から、養仔マウスおよびその母マウスと 24 時間同居させた後、Naïve 雌マウスと養仔マウスのみを同居させて明期に 6 時間のフォトメトリー記録を行い、同時にビデオで行動を記録した。

その結果、養仔マウスによる乳頭吸啜行動が観察され、これに対応して PVH OT 神経のファイバーフォトメトリー記録で、周期的に繰り返されるパルス状の Ca^{2+} シグナルが検出された (Naïve) (図 13 a)。この Naïve 雌マウスを実験終了後に雄マウスと交配し妊娠・出産を経験させ、出産後 12 日目に再びフォトメトリー記録を行った (Mother) (図 13 a)。

Naïve と Mother で OT パルスを比較したところ、パルスの大きさが有意に増加していた。巣滞在時間に関しては母マウスの方が僅かだが有意に長かったものの、巣滞在時間あたりのパルス頻度に大きな差は見られなかった (図 13 b-f)。膣スメアにより発情周期段階を判定したところ、性成熟後の Naïve 雌では発情周期のどの段階においてもパルス状活動が観察された (図 13 g)。したがって、吸啜誘発 OT パルスは、妊娠・分娩や性経験を経ずとも、また発情周期に関らず、成立し得ることが明らかになった。妊娠出産の経験は OT パルスの有無ではなく強度を変化させ得るものと考えられる。

4.3.2 性成熟不全 (早期 OVX) でも吸啜誘発 OT パルスは生じる

以上より、吸啜誘発性の PVH OT 神経のパルス状活動は、授乳期に限らず、性成熟後の Naïve 雌において成立し得ることが示された。そこで次に、吸啜誘発 OT パルスの成立が卵巣ホルモン環境を介した性成熟に依存するかを検討するため、性成熟前に卵巣摘出を行い性成熟不全とした雌において、吸啜誘発性の OT 神経のパルス状活動を評価した (図 14)。

3 週齢で OVX を実施し (早期 OVX 個体)、回復後 8 週齢時に 4.3.1 と同一の吸啜条件 (生後 12 日齢の養仔マウス 6 匹、記録前日から 24 時間同居、明期 6 時間の連続記録) でフォトメトリー記録を行った。その結果、OVX 個体に対しても養仔マウスによる乳頭への吸啜行動が観察され、PVH OT 神経のパルス状の Ca^{2+} シグナルが検出された (図 14 a-c)。

OVX の成立は膣スメアにより確認し、OVX 群で発情周期が止まっていることを確認した (図 14d)。したがって、吸啜誘発 OT パルスの成立そのものは性成熟に依存しないことが明らかになった。一方で、パルスの強度や発生頻度については、性成熟・卵巣ホルモン環

境が量的側面に関与する可能性は残る。

4.3.3 性成熟不全では PVH の OT タンパクが低下する

OVX が PVH の OT 発現に影響するとの先行知見に基づき、早期 OVX 個体における PVH の OT タンパクの発現を評価した。この目的のために、図 14 の実験に用いた個体を 8 週齢時の記録終了後に灌流固定し、PVH を含む脳切片を作成した。免疫組織染色により OT ミニプロモータにより発現させた GCaMP6s を anti-GFP 抗体により検出し、また OT タンパク陽性細胞を anti-OT 抗体により可視化した。その結果、OVX 群でも GCaMP6s は十分に発現していたが、Sham 手術群に比して PVH における GCaMP6s 発現細胞における OT ペプチドの発現量が著しく減少することが明らかとなった (図 15 a, b)。

この減少が AAV の感染及び GCaMP6s の発現による副作用ではないことを確認するために、AAV やファイバーの埋め込みを実施せず、3 週齢の時点で OVX あるいは Sham 手術を実施した個体について、8 週齢時に OT タンパク陽性細胞を計測した。その結果、AAV を使用しなかった群でも OVX による OT タンパクの発現低下を確認した (図 15 c, d)。これらの結果は、卵巢ホルモン環境の欠如が OT 発現量指標の低下につながることを示唆する。卵巢ホルモンの欠如した状態であっても、吸啜誘因性の OT 神経のパルス状活動が観察されたことから (図 14)、パルス状活動の形成と、末梢効果を支える OT 産生・供給能は独立して制御されているものと解釈できる。

4.4 図表

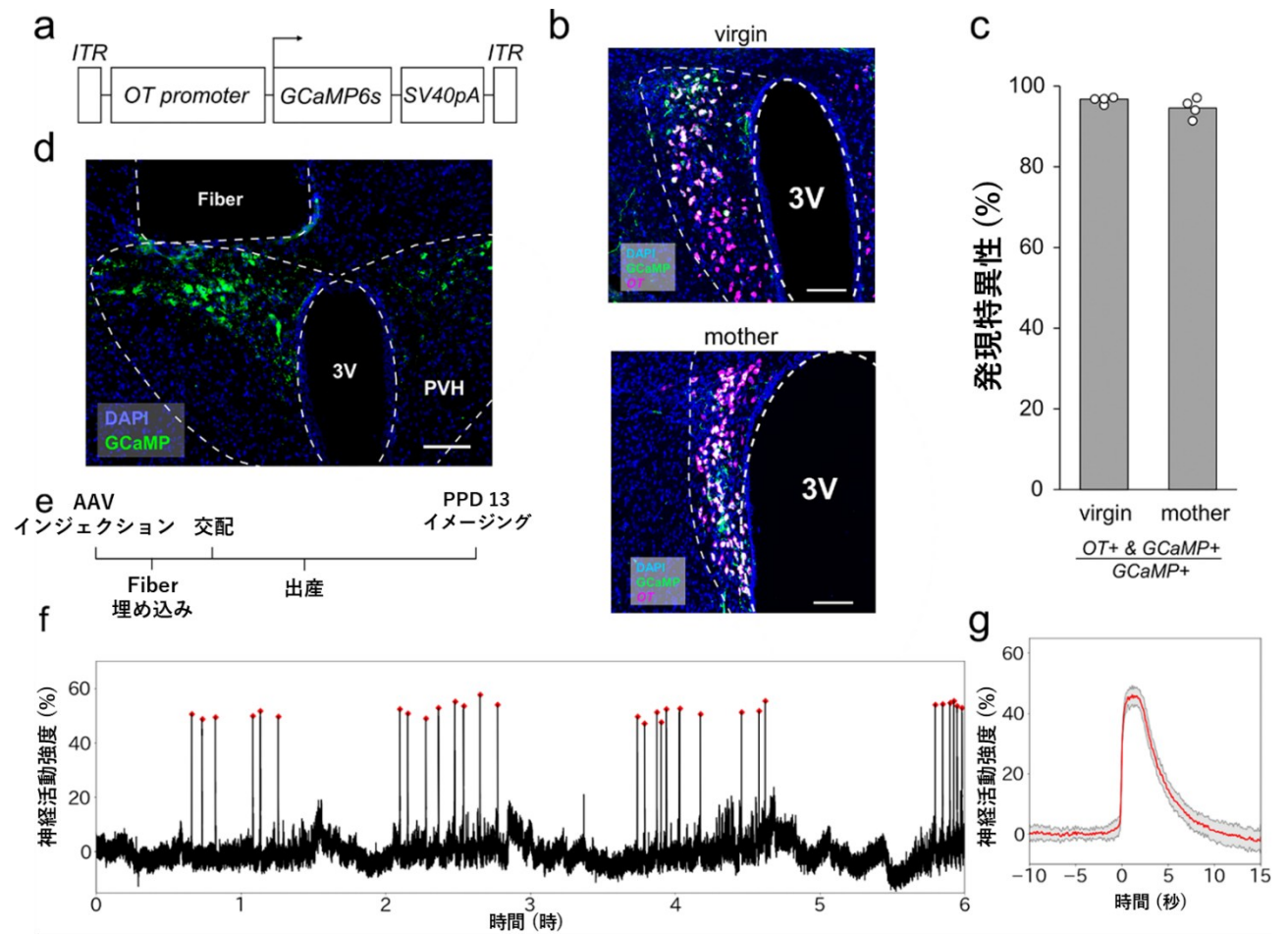


図 1 AAV9 OTp-GCaMP6s の発現と OT 神経活動の記録

a. AAV9 OTp-GCaMP6s のコンストラクトの模式図。

b. AAV9 OTp-GCaMP6s を注射した雌マウスの PVH の 30 μ m 冠状切片の代表例。OT mRNA 検出用の in situ hybridization (マゼンタ) と GCaMP6s 発現検出用の抗 GFP 抗体 (緑) により共染色した。青は DAPI による核染色。

c. PVH OT 神経における AAV9 OTp-GCaMP6s の発現特異性の定量化 (OT+ & GCaMP6s+ / GCaMP6s+)。白抜きの点は個々のデータ (n = 4) を表し、グレーの棒グラフは平均値を表す。

d. PVH における光ファイバーの位置と GCaMP6s の発現 (緑) を示す代表的な 30 μ m 冠状切片。青色は DAPI による核染色。

e. 実験の時系列を示す模式図。

f. PPD13 の母親の OT 神経活動を 6 時間明期に示す代表的なフォトメトリー記録。赤色の点は、OT 神経のパルス状活動を示す。

g. パネル f に示した 6 時間の記録で観察されたパルス状活動のフォトメトリー記録の拡大図。赤線が平均値、グレー部分が標準偏差を表す。

PVH、室傍視床下部。3V、第 3 脳室。スケールバー、100 μm 。

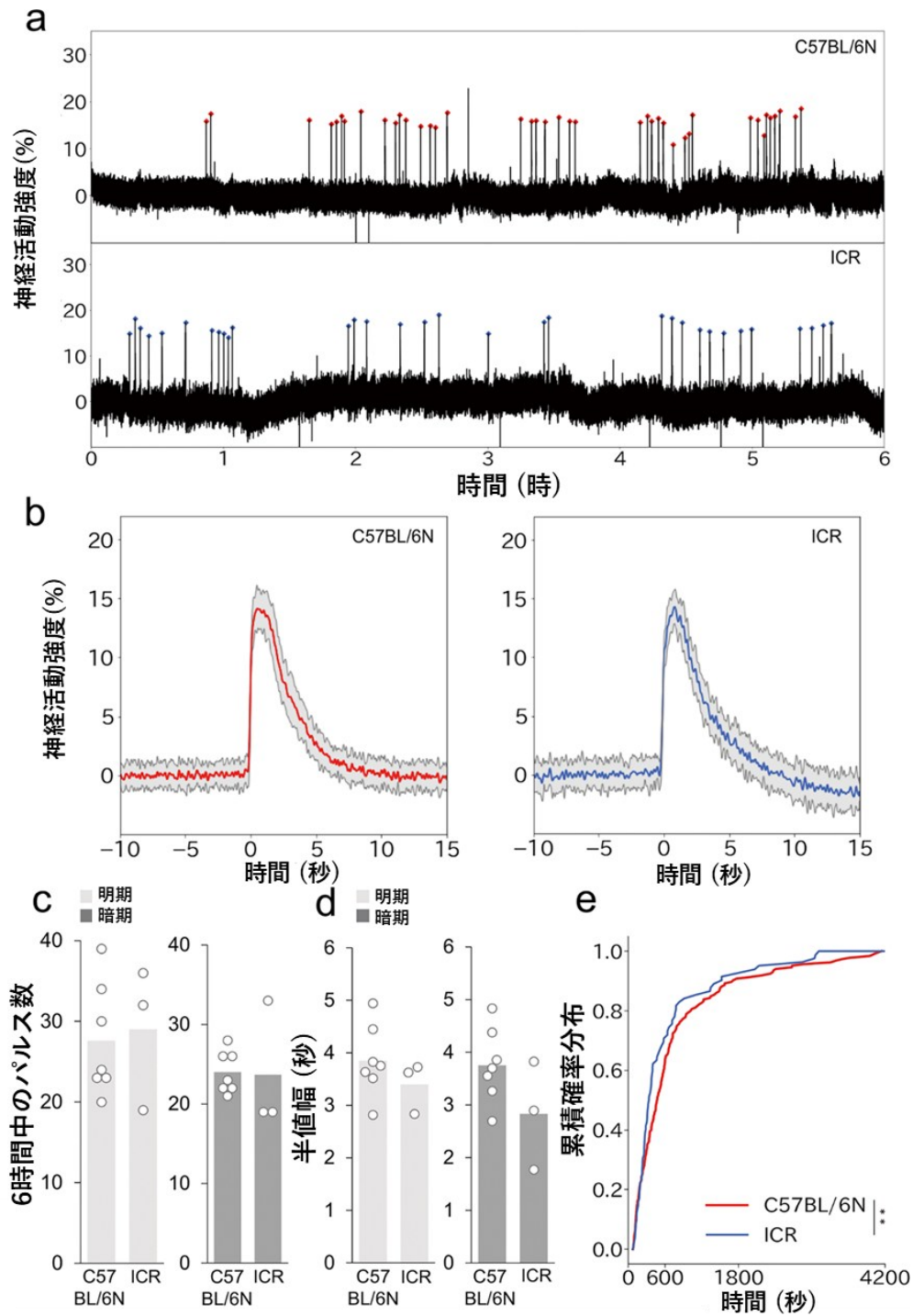


図2 C57BL/6N と ICR 母マウスのフォトメトリー記録の比較

a. PPD2-4 の C57BL/6N (上) と ICR (下) の母マウスの明期における代表的な 6 時間のフォトメトリー記録。赤色の点は OT 神経のパルス状活動を示す。

b. パネル a の 6 時間の記録で観察された C57BL/6N (左、赤線) および ICR (右、青線) 母

マウスの OT 神経のパルス状活動のフォトメトリー記録の拡大図。それぞれの線は平均値、グレー部分は標準偏差を示す。

c. C57BL/6N と ICR の母親マウスにおける明期 (左) と暗期 (右) の 6 時間あたりの OT 神経のパルス状活動の数。C57BL/6N, $n = 7$, ICR, $n = 3$ 。白抜きの点は個々のデータを表す。両側 Paired t-test (明期-暗期) および両側 Welch t-test (C57BL/6N-ICR) では有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

d. 明期 (左) と暗期 (右) における C57BL/6N と ICR の母マウスの波形の FWHM による定量化。両側 Paired t-test (明期-暗期) および両側 Welch t-test (C57BL/6N-ICR) では有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

e. C57BL/6N と ICR の母マウスのパルス状活動の IPI の累積分布。**, Kolmogorov-Smirnov test により、 $p < 0.01$ 。

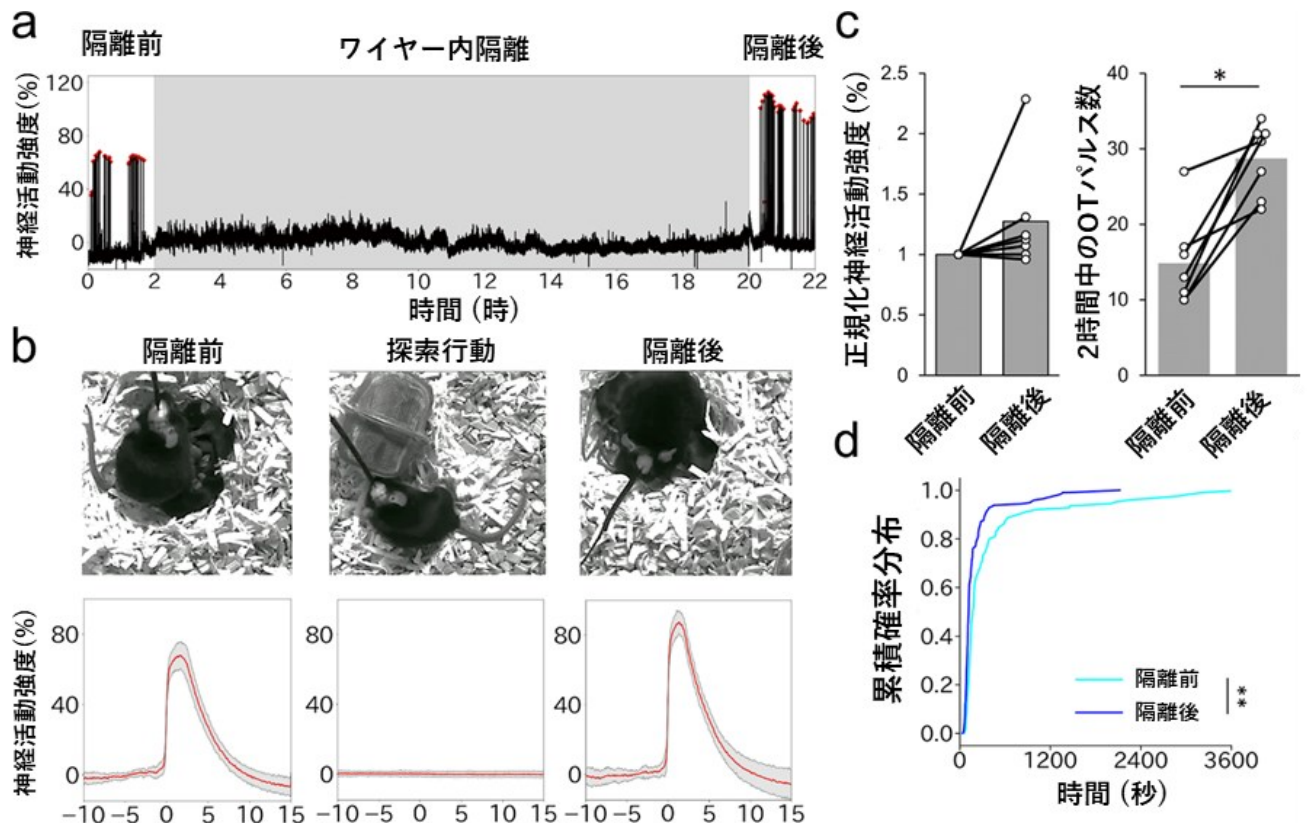


図3 母子の物理的隔離がOT神経の活性に及ぼす影響

- a. 仔マウスを金網に隔離する前、隔離中、隔離後の PPD12-14 母マウスの PVH OT 神経の代表的なフォトメトリー記録。グレー部分は仔マウスが金網の中にいた時間を表す。赤色の点は OT 神経のパルス状活動を表す。
- b. 実験中の母マウスと仔マウスの画像 (上)、パネル a で観察した仔マウスの隔離前、隔離中、隔離後のフォトメトリー記録の拡大図 (下、赤線は平均値、グレー部分は標準偏差を表す)。「隔離前」と「隔離後」のデータにおける時間 0 s は、 $\Delta F/F$ がパルス状活動の最大値の半分に達した時点とし、「探索行動」のデータ (母マウスによる $n = 202$ の探索エピソードに基づく) における 0 s は、隔離中に母親が金網の探索を開始した時点と定義する。
- c. OT 神経のパルス状活動の数 (上) および隔離前の $\Delta F/F$ の最大値を 1 として正規化した $\Delta F/F$ の極大値で定義したピーク強度 (下)。 $n = 4$ 。*、両側 Paired t-test により、 $p < 0.05$ 。

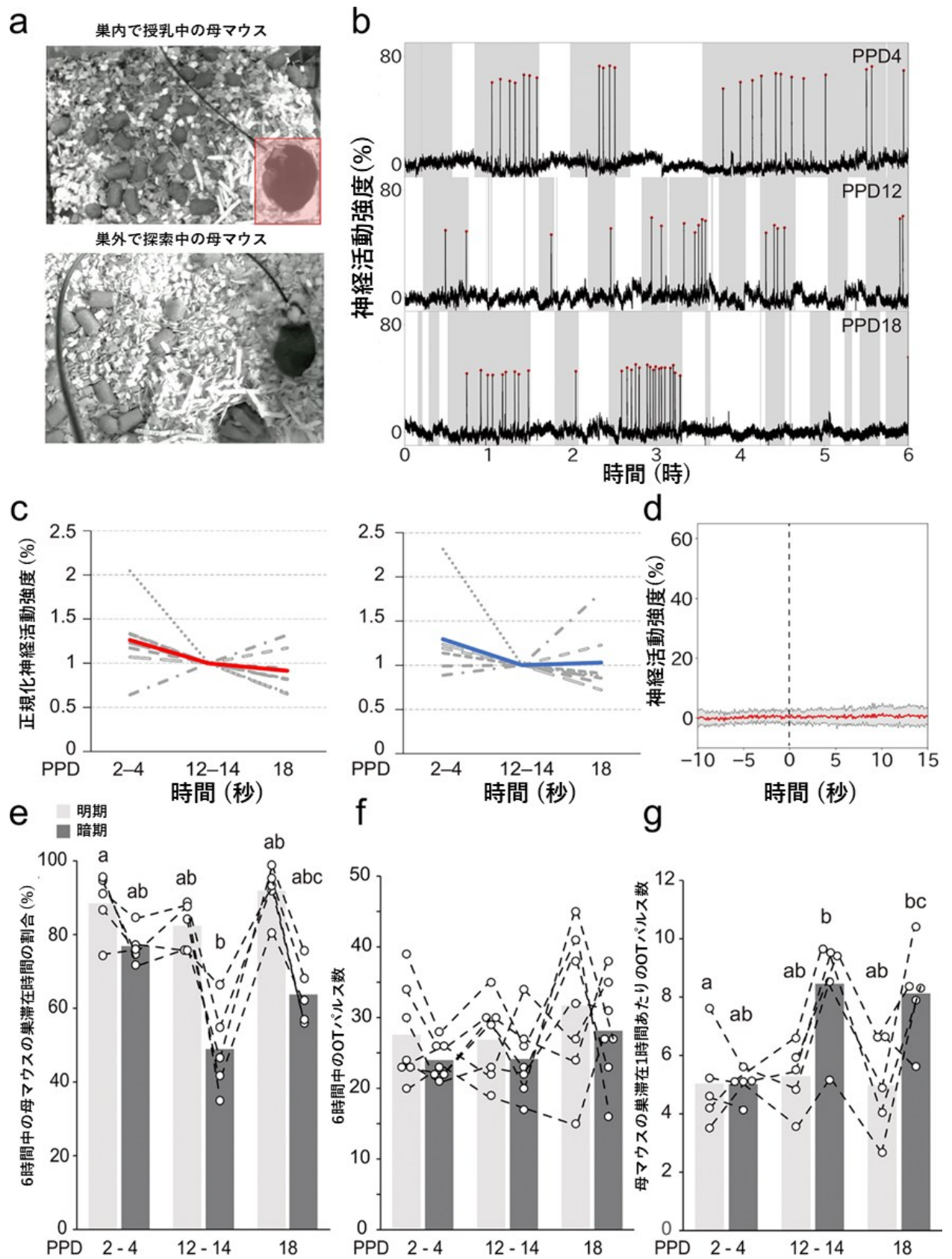


図4 母仔相互作用と OT 神経のパルス状活動の動的変化

a. 母マウスが巣の中の仔マウスにしゃがんでいる場合の例 (上) と、巣の外にいる場合の例 (下) 。赤い部分が巣を示す。

b. 授乳初期 (PPD2) 、中期 (PPD13) 、後期 (PPD18) の代表的なフォトメトリー記録。赤色の点は OT 神経のパルス状活動を表す。データは暗期に 6 時間記録した。グレー部分は母マウスが巣にいた時間を表す。

c. 母マウスが巣にいた時間の割合の定量化。n = 5。

d. 6 時間の記録あたりのパルス状活動の数の定量化。n = 7。

e. 母マウスが巣にいた 1 時間あたりのパルス状活動の数の定量化。n = 5。

#, 両側一元配置分散分析及び post hoc Tukey HSD (各授乳期間) 、*、両側一元配置分散分析及び post hoc Tukey HSD (明期-暗期) により、 $p < 0.05$ 。

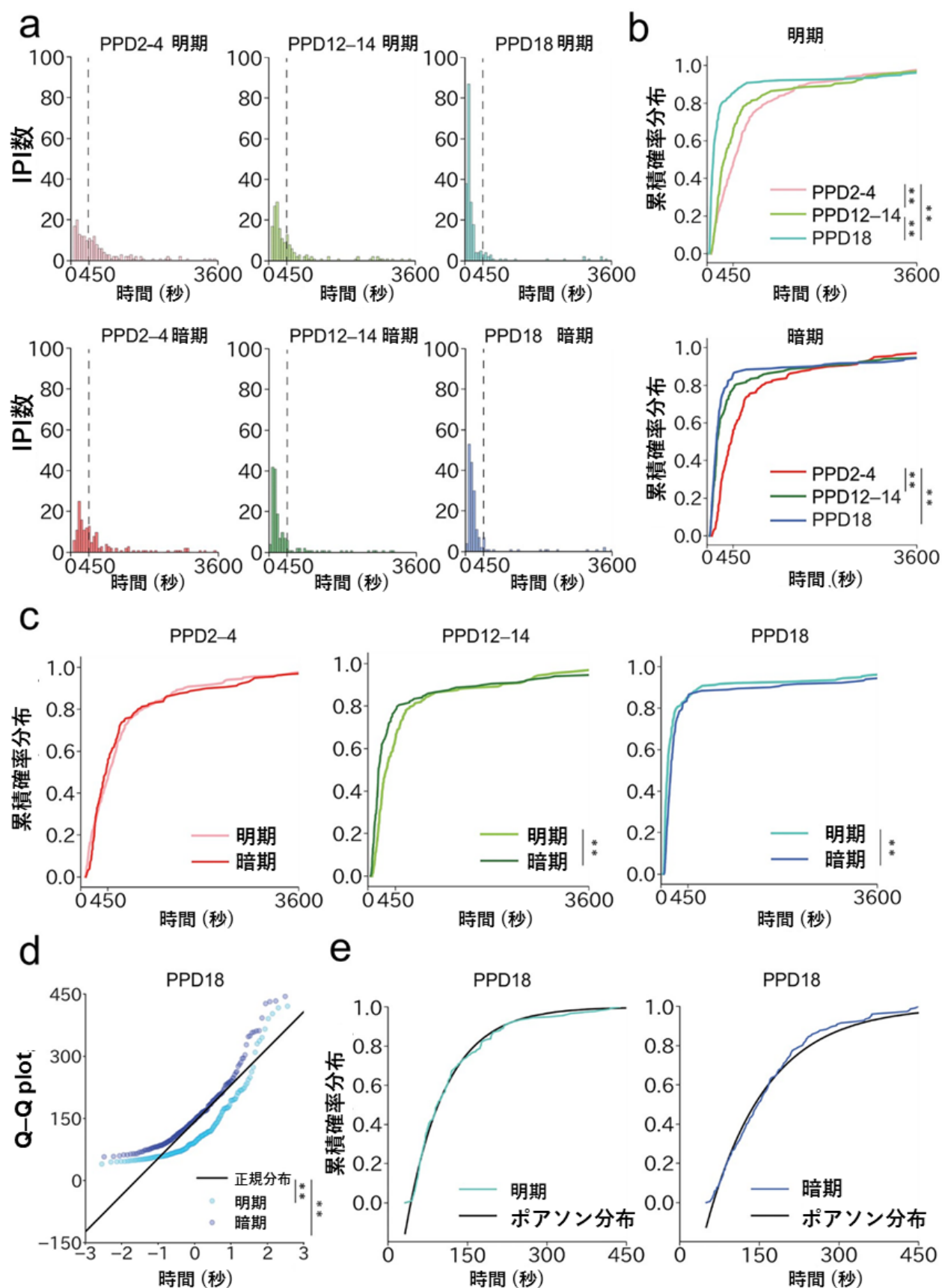


図5 OT神経のパルス状活動の発生間隔 IPI の定量化

- a. PPD2–4、PPD12–14、PPD18 における明期と暗期の IPIs のヒストグラム。1 bin = 60 秒。
- b. PPD2–4、PPD12–14、PPD18 の母マウスで観察された授乳パターンを比較するための明期 (上) と暗期 (下) の IPI の累積分布。**、Bonferroni 補正を加えた Kolmogorov-Smirnov test により、 $p < 0.01$ 。
- c. PPD2–4 (左)、PPD12–14 (中)、PPD18 (右) の母マウスにおける IPI の累積分布を示し、明期と暗期に観察されるパターンを比較する。**、Bonferroni 補正を加えた Kolmogorov-Smirnov test により、 $p < 0.01$ 。
- d. PPD18 の 450 秒以内の IPI 分布の正規性を可視化するための Q-Q プロット。**、Shapiro-Wilk test により、 $p < 0.01$ 。
- e. PPD18 の明期 (左) と暗期 (右) で 450 秒以内に観測された IPI の累積分布と、指数分布に基づくコンピュータシミュレーションの累積分布の比較。Kolmogorov-Smirnov test による有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。
- n = 7。

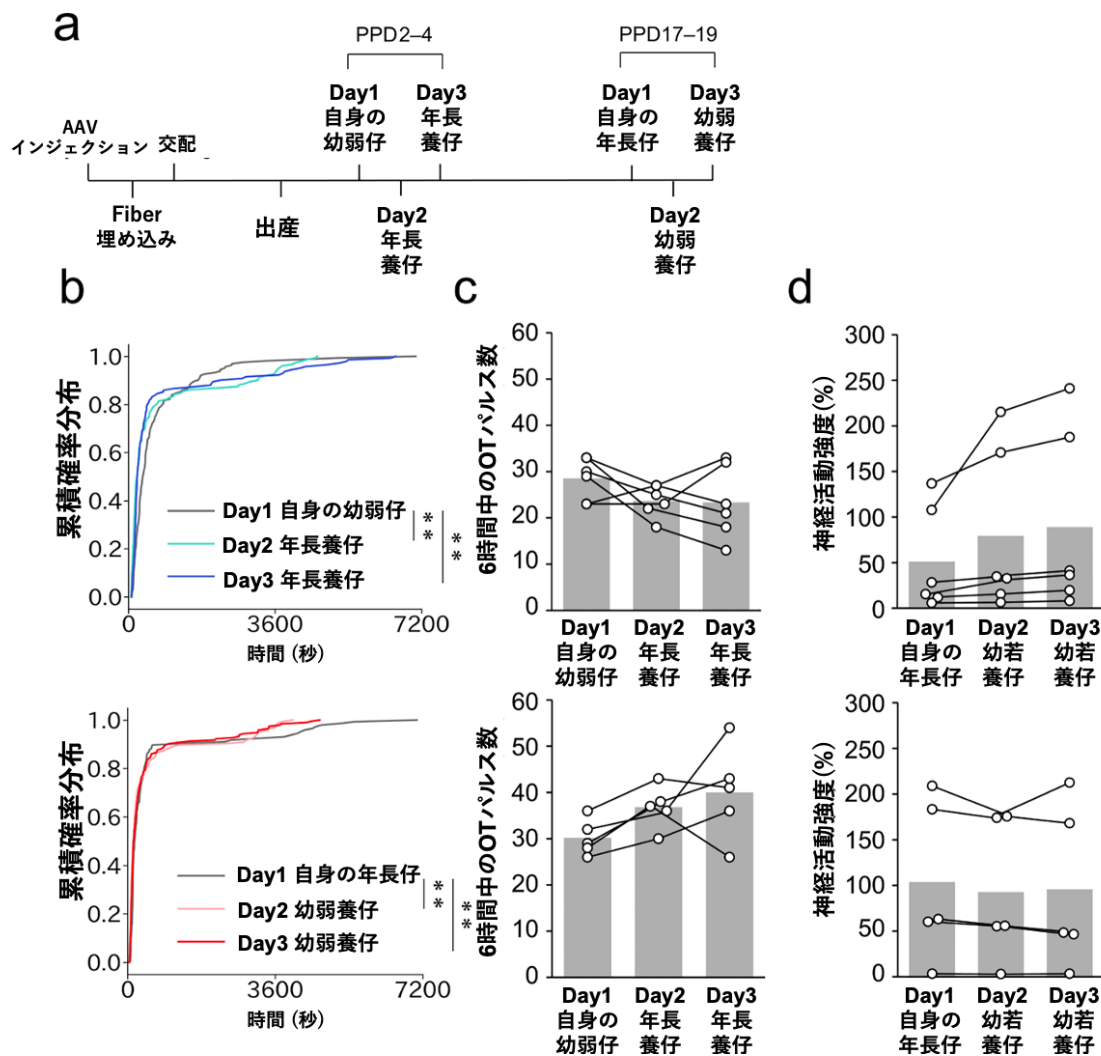


図 6 仔マウスの日齢は OT パルス分布に影響する

a. 実験タイムラインの概略図。幼弱仔マウスを PND 2-4、年長仔マウスを PND17-19 と定義した。

b.PPD2-4（上）および PPD17-19（下）の母マウスの IPI の累積分布。IPI 分布を自身の仔マウス（1 日目）および養仔（2 日目および 3 日目）と比較した。**、Bonferroni 補正を加えた Kolmogorov-Smirnov test により $p < 0.01$ 。

c. PPD2-4（上）および PPD17-19（下）の母マウスの 6 時間記録あたりの OT パルス数の定量化。両側一元配置分散分析では有意差は認められなかった。

d. PPD2-4（上）および PPD17-19（下）の母マウスにおける $\Delta F/F$ の大きさの定量化。両側一元配置分散分析では有意差は認められなかった。

PPD2-4（上）では $n = 6$ 、PPD17-19 では $n = 5$ 。

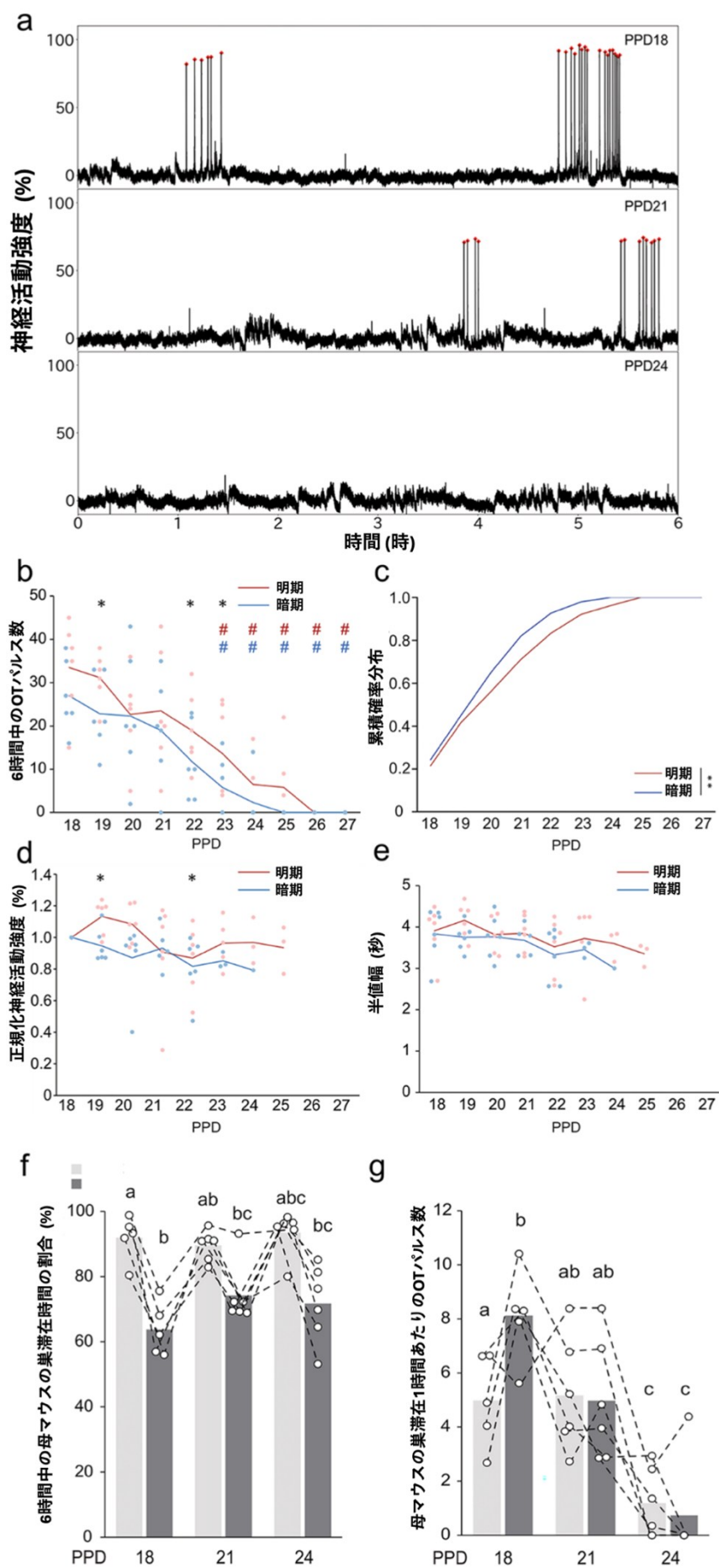


図 7 離乳期前後における OT 神経活動の変化の記録

a. PPD18、PPD22、PPD26 の代表的なフォトメトリー記録。赤色の点は OT 神経のパルス状活動を示す。

b. 離乳期前後の 6 時間ごとのパルス状活動の数の推移を示す。

赤線と青線は明期と暗期の平均値、赤色と青色の点是对应する個々のデータを示す。

*、Wilcoxon signed-rank sum test (明期-暗期) により、 $p < 0.05$ 。

赤色# (明期) ・青色# (暗期) 、両側二元配置分散分析及び post hoc Tukey HSD (PPD18 との比較) により、 $p < 0.05$ 。

c. 離乳期前後の明期 (赤線) と暗期 (青線) における IPI の累積分布。**, Kolmogorov-Smirnov test により、 $p < 0.01$ 。

d. 離乳期におけるパルス状活動の強度を PPD18 のピークの高さの平均値で正規化することとで定量化した。記号および統計量はパネル b と同様である。

e. 離乳期の波形を半値幅により定量化した。記号および統計量はパネル b と同様である。

f. 母親が巣にいた時間の割合の定量化。PPD18 では $n = 5$ 、PPD21 と 24 では $n = 6$ 。

g. 母親が巣にいた 1 時間あたりの OT パルス数の定量化。PPD18 では $n = 5$ 、PPD21 と 24 では $n = 6$ 。

パネル f,g の PPD18 データは図 4 のものと同じ。

パネル f,g の記号と統計値は図 4e,f,g のものと同じ。

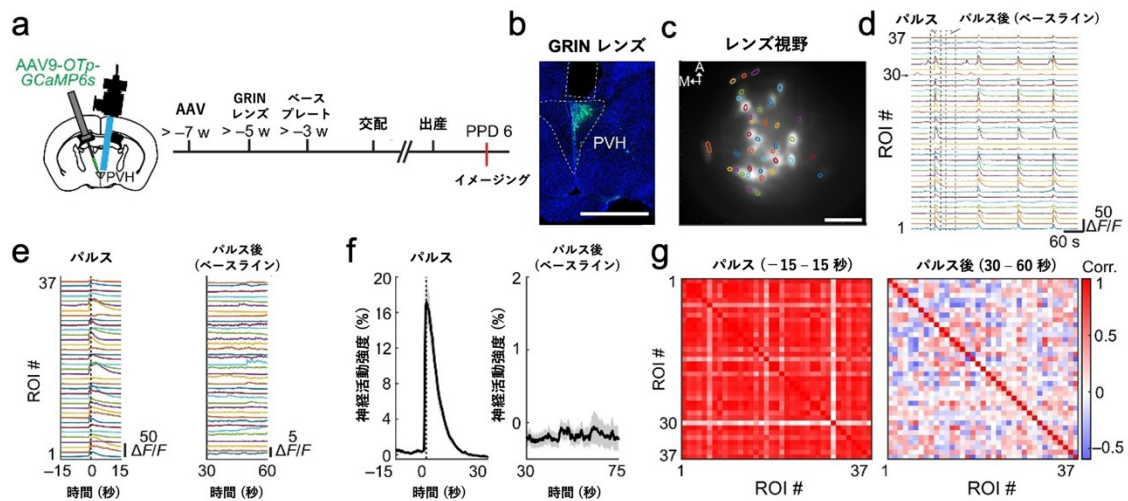


図 8 PVH OT 神経の生体内微小内視鏡的 Ca^{2+} イメージング。

- a. 実験タイムラインの概略図。PPD、産後日数。w、週。
- b. GRIN レンズと GCaMP6 (緑) の発現を示す代表画像。青は DAPI による核染色。スケールバー、1 mm。
- c. PPD 6 の母マウスの最大投影画像を含む関心領域 (ROI) を示す空間マップの例。スケールバー、100 μm 。
- d. 授乳中の ROI からの Ca^{2+} 応答の例。データの色は c. の ROI の色に対応する。
- e. d の点線で示されたパルス中およびパルス後の個々の ROI からの代表的な Ca^{2+} 応答。集団平均のパルス状活動のピーク時間を 0 と設定した。
- f. d の点線でマークされたパルス中の集団平均活動。グレーは SEM を表す。
- g. パルス状活動および活動後の各 ROI 間のノイズ相関行列。これらの ROI のうち、ROI#30 のみが同期したパルス状活動を示さなかった。

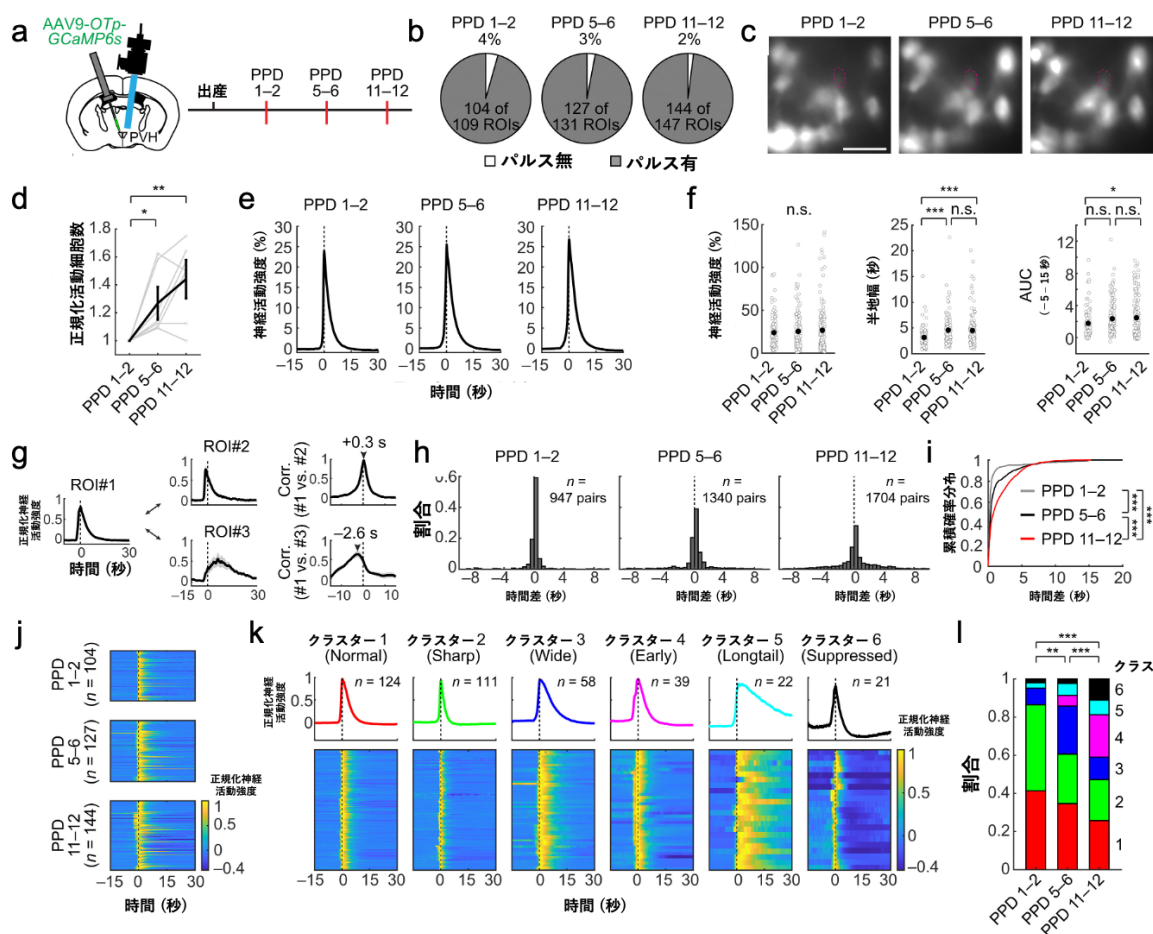


図9 産後日数ごとの OT 神経のパルス状活動のダイナミクス。

a.実験タイムラインの概略図。

b.異なる授乳ステージにわたるパルス状活動を示す ROI の割合。n = 7 マウスからのプールされたデータ。

c. パルス状活動中の代表的な最大投影画像。破線の円は、PPD 5-6 および PPD 11-12 で検出され、PPD 1-2 では検出されない ROI を示す。スケールバー、50 μ m。

d. パルス状活動を示す ROI の数。n = 7 マウス。エラーバー、SEM。* $P < 0.05$ および ** $P < 0.01$ は、有意な Kruskal-Wallis test 後の post hoc Tukey HSD による。

e. パルス中の平均活動トレース。

f. ピーク振幅 (左)、半値幅 (中央)、および -5 秒から +15 秒の間の曲線下面積 (AUC) (右) の定量化。*有意な一元配置分散分析 (ANOVA) 及び post hoc Tukey HSD により $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。ns、有意ではない。

g. 同時に記録された 3 つの ROI からの相互相関分析の例。正規化された $\Delta F/F$ トレー

スは、母集団平均ピーク (左) および相互相関結果 (右) に揃えられている。相関係数のピークは、矢印で示されている。

h. 相互相関分析からの時間差の分布。n、ペアの数。

i. ピーク時間差の分布の累積プロット。*** Bonferroni 補正を加えた Kolmogorov-Smirnov test により $P < 0.001$ 。

j. 個々の ROI の正規化および平均化された応答を集団平均ピークに合わせてヒートマップで表したもの。

k. イベント平均活動に基づく ROI の 6 つのクラスターへの分類。上のトレースは集団平均活動を表し、下のヒートマップは各クラスターの個々の ROI のイベント平均応答を表す。

l. 各クラスターに分類された ROI の割合。** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$ は、Bonferroni 補正を加えたカイ 2 乗検定による。

グレー (e. および g.) は SEM を表す。

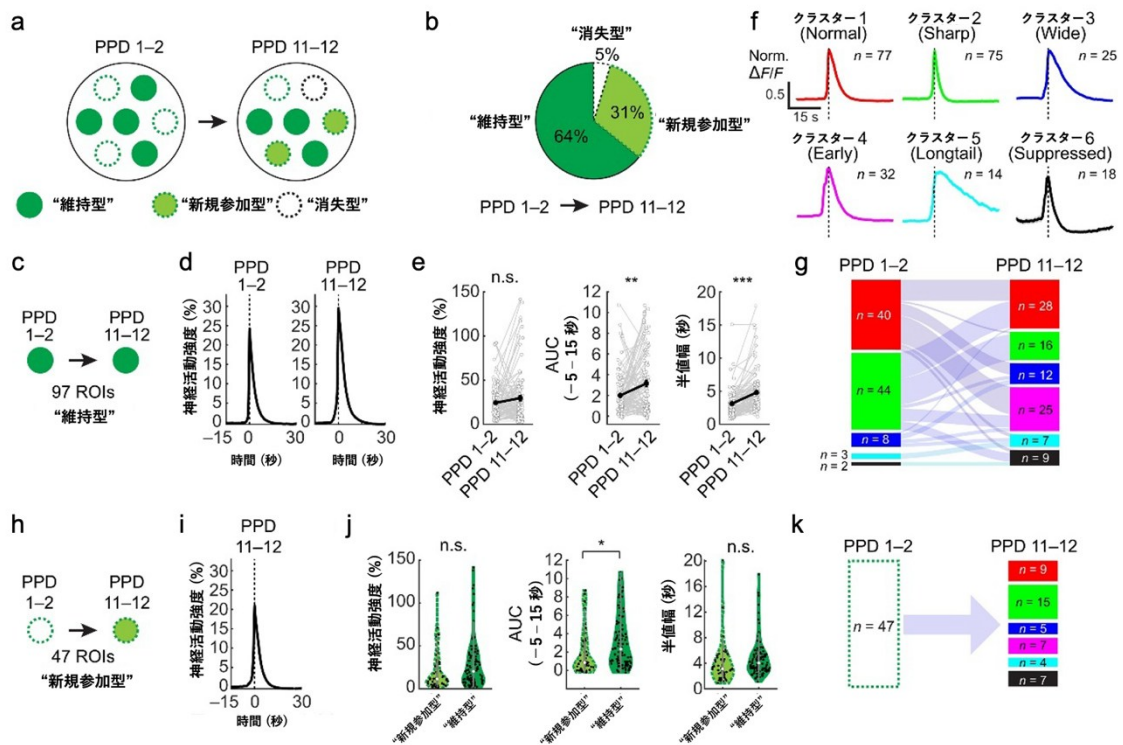


図 10 PPD 1-2 から PPD 11-12 にわたる縦断的追跡。

- パルス状活動を示す OT 神経の 3 つの異なるタイプの模式図。
- 3 つの異なるタイプに属する ROI の割合。n = 7 マウスからのプールされたデータ。
- 「維持型」細胞の模式図。
- PPD 1-2 と PPD 11-12 の間で追跡に成功した ROI からのパルス状活動中の平均活動トレース。各 ROI のピーク時間は 0 に揃えられた。
- 振幅 (左)、-5 秒と +15 秒の間の AUC (中央)、および FWHM (右) の定量化。* $P < 0.01$ および *** $P < 0.001$ (両側 Paired t-test による)。
- 各クラスター内でのパルス状活動中の集団平均活動。
- 異なる授乳ステージ間での「維持型」細胞集団内のクラスターの保持または遷移を示す模式図。
- 「新規参加型」細胞の模式図。
- パルス状活動中の平均活動トレース。
- 振幅 (左)、-5 秒から+15 秒の間の AUC (中央) 、および FWHM (右) の定量化。
* Welch の t 検定による $P < 0.05$ 。

k. 「新規参加型」細胞集団内で割り当てられたクラスターの数と割合。

グレー (d および i) は SEM を表す。

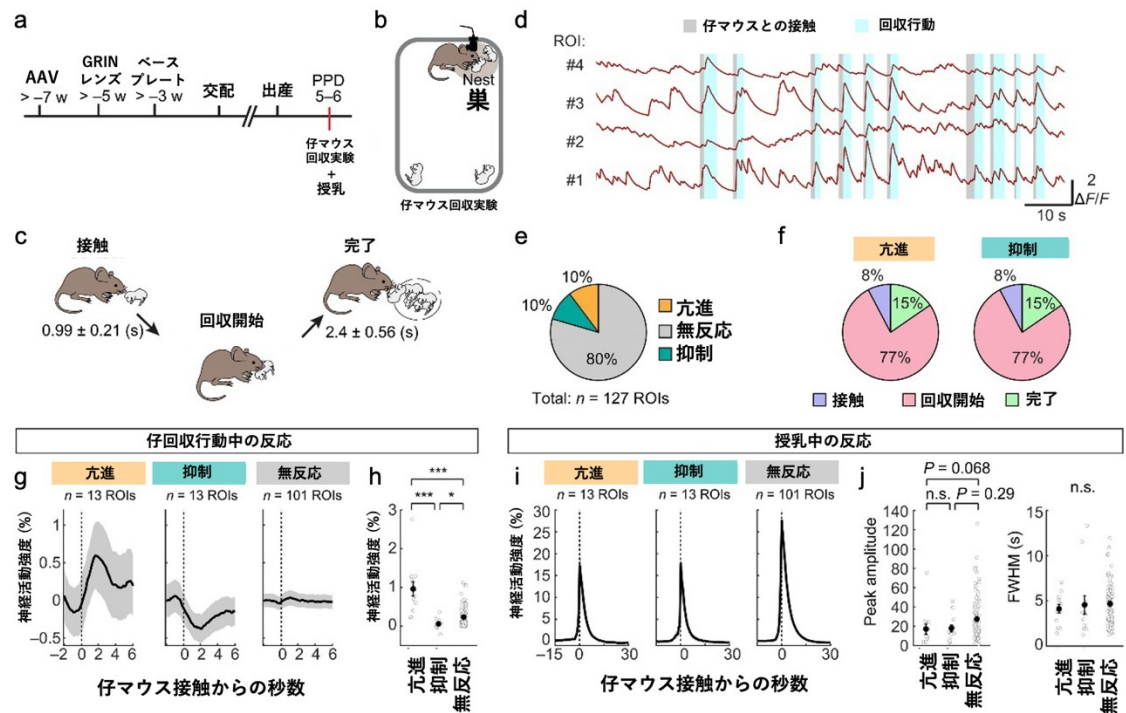


図 11 . 仔マウス回収中の PVH OT 神経の反応。

- 実験タイムラインの概略図。
- Ca^{2+} イメージング中の仔マウス回収実験の概略図。
- 仔マウス回収中の連続行動カテゴリーの概略図。数字はイベント間の期間を示す ($\pm$ SD)。
- 1 匹の母マウスにおける回収の開始に反応する 4 つの ROI からの Ca^{2+} 応答の例。
- 仔マウス回収中の亢進応答 (オレンジ) と抑制応答 (青) の割合。
- 亢進(左) または抑制 (右) 集団の中で 仔マウス回収の 3 つの行動カテゴリーのいずれかに反応した ROI の割合。
- 仔マウスとの接触に対して有意に反応した ROI と反応しなかった ROI の平均活動トレース。
- 平均ピーク振幅の定量化。*有意な Kruskal-Wallis test 及び post hoc Tukey HSD で $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。
- パルス中の平均活動トレース。各 ROI のピーク時間は 0 に設定された。
- 平均振幅 (左) と FWHM (右) の定量化。示された P 値は、有意な Kruskal-Wallis test 及び post hoc Tukey HSD で測定された。エラーバーは SEM。

グレー (g,i) は SEM を表す。

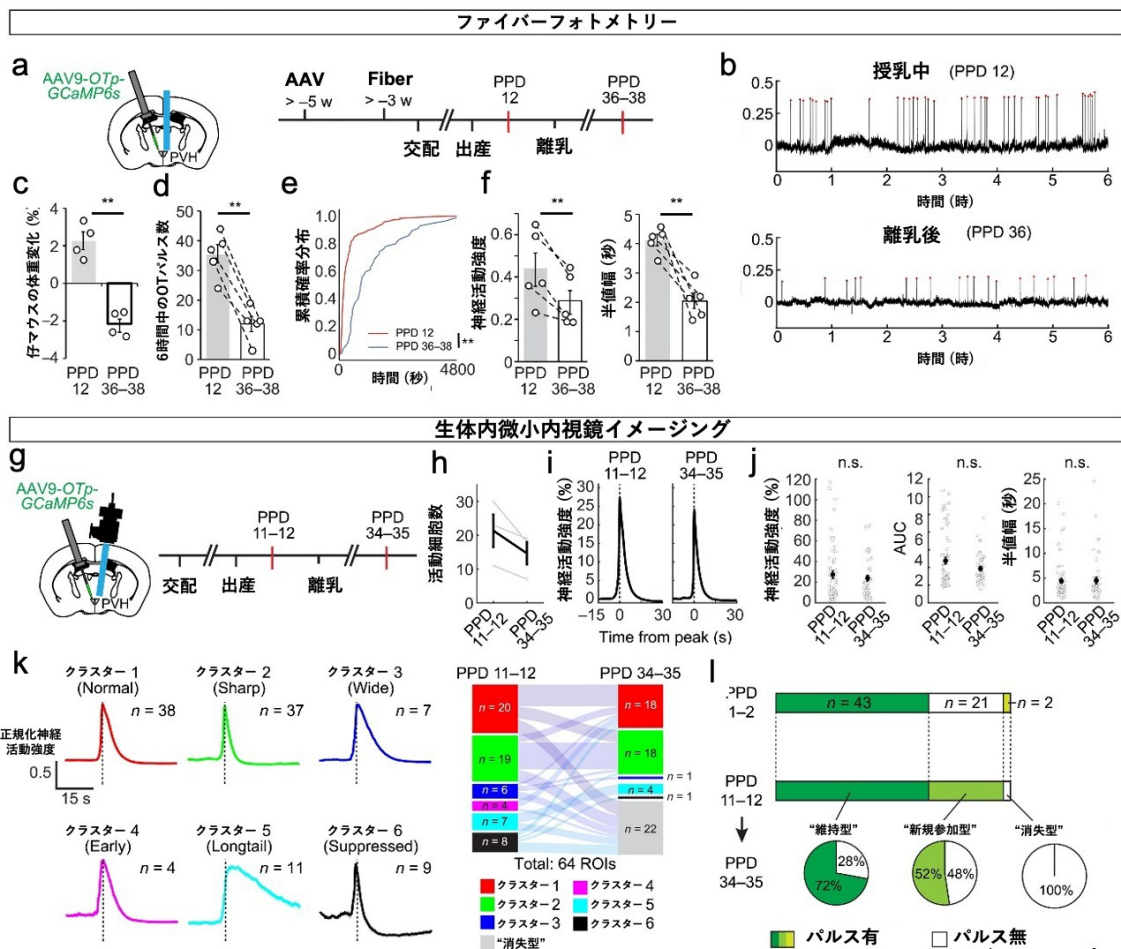


図 12 離乳後の PVH OT 神経のパルス状活動。

- a. ファイバーフォトメトリーの実験タイムラインの概略図。
- b. 授乳中の PPD 12 (上) と離乳後 12 日齢の養子へ同居時の PPD 36 (下) の同一個体でのフォトメトリー例。赤い点は、OT 神経のパルス状活動を示す。
- c. 記録から 6 時間後の仔マウスの体重変化の定量化。 **両側 Paired t-test で $P < 0.01$ 。
- d. PPD 12 と PPD 36–38 の OT 神経のパルス状活動の数。 $n = 5$ マウス。 **両側 Paired t-test で $P < 0.01$ 。
- e. PPD 12 (赤) と PPD 36–38 (青) のパターンを比較したパルス間隔の累積分布。 ** Kolmogorov-Smirnov test で $P < 0.01$ 。
- f. 振幅 (左) と FWHM (右) の定量化。 $n = 5$ マウス。 **両側 Paired t-test で $P < 0.01$ 。
- g. 生体内微小内視鏡イメージングの実験タイムラインの概略図。
- h. 各マウスのパルス状活動を示す ROI の数。 $n = 3$ マウス。

- i. パルス中の平均活動トレース。グレーは SEM を表す。
 - j. 平均振幅 (左)、-5 秒と +15 秒の間の AUC (中央)、および FWHM (右) の定量化。
ns、両側 Welch t-test で $p > 0.05$, 有意差なし。
 - k. 左: トレースは、各クラスター内の脈動活動中の集団平均活動を表す。右:
 - l. PPD 1-2 から PPD 11-12 までの反応パターンに基づき、維持型、新規参加型、消失型に分類された ROI の割合 (上)。下の円グラフは、PPD 34-35 にパルス状活動を示した割合と示さなかった割合を表す。
- エラーバーは標準誤差 (SEM) 。

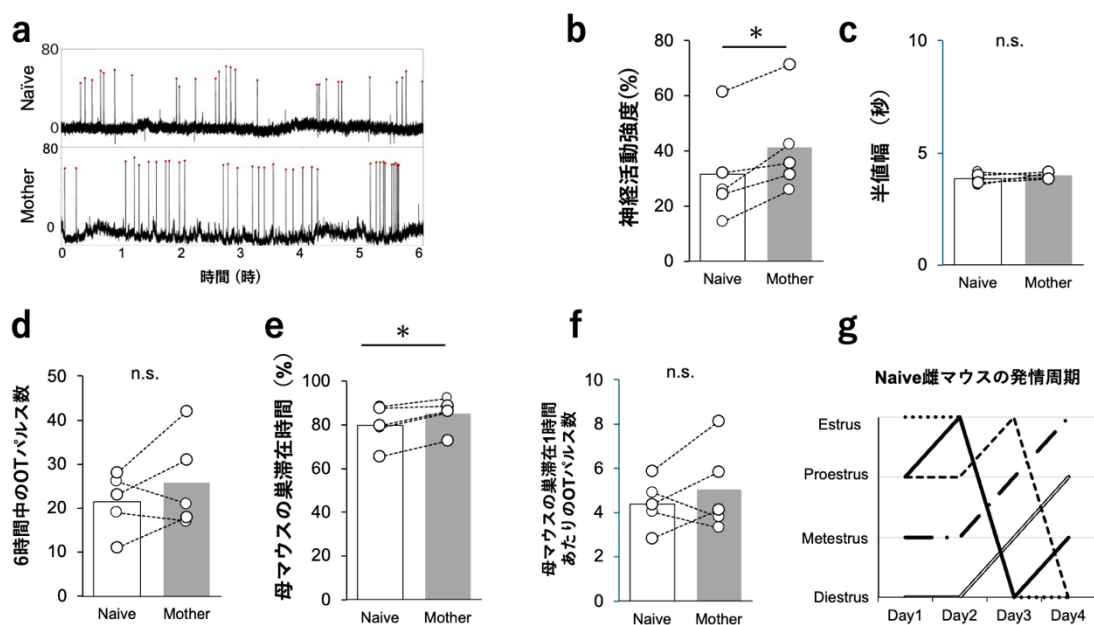


図 13 同一個体における Naïve と PPD12 での PVH OT パルス動態比較

a. 性経験・妊娠・分娩を伴わない雌 (Naïve) (上) と、その後交配・出産を経験し授乳中の PPD12 母マウス (Mother) (下)の同一個体でのフォトメトリー例。赤い点は、OT 神経のパルス状活動を示す。

b. Naïve マウスと Mother マウスでの同一個体間での OT パルスの大きさの比較。

c. Naïve マウスと Mother マウスでの同一個体間での OT パルスの半値幅の比較。

d. Naïve マウスと Mother マウスでの同一個体間での 6 時間中の OT パルスの発生数の比較。

e. Naïve マウスと Mother マウスでの同一個体間での巣滞在時間の比較。

f. Naïve マウスと Mother マウスでの同一個体間での巣滞在 1 時間あたりの OT パルス数の比較。

g. 図 13 で使用した Naïve マウスの膣細胞診による発情周期。Day2 をフォトメトリー記録日とし、記録前 1 日、記録後 2 日の計 4 日間記録した。

b-f, *両側 Paired t-test で $P < 0.05$ 。n.s. 両側 Paired t-test で $P > 0.05$, 有意差無し。

n = 4 マウス。

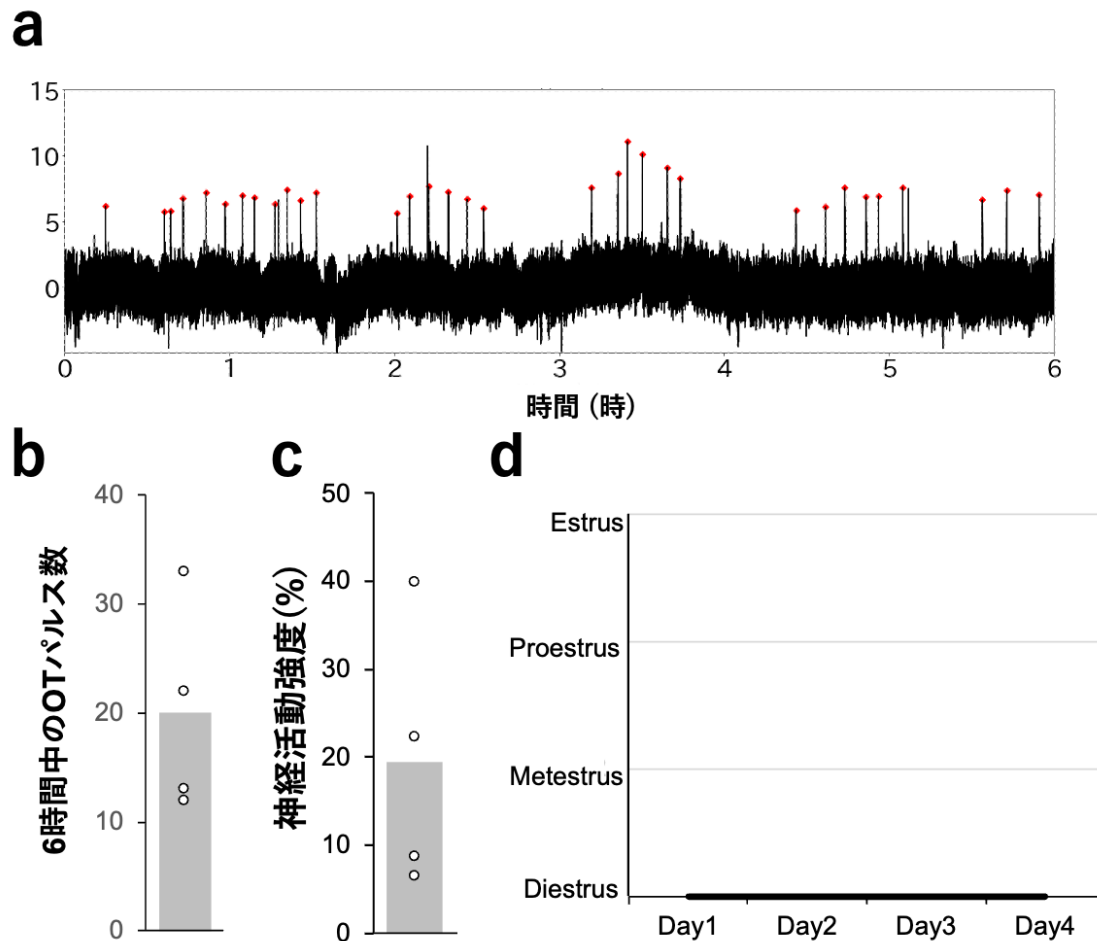


図 14 性成熟不全雌マウスにおける OT 神経のパルス状活動

a. 性成熟不全雌マウスに PND12 の養仔を同居させ吸啜刺激を与えた際のフォトメトリー例。赤い点は、OT 神経のパルス状活動を示す。

b. 性成熟不全雌マウスで記録された OT 神経のパルス数。

c. 性成熟不全雌マウスで記録された OT 神経のパルスの大きさ ($\Delta F/F$)。

d. 図 14 で使用した性成熟不全雌マウスの膣細胞診による発情周期。Day2 をフォトメトリー記録日とし、記録前 1 日、記録後 2 日の計 4 日間記録した。すべてのマウスにおいて、発情周期が止まっていることが確認された。

n = 4 マウス。

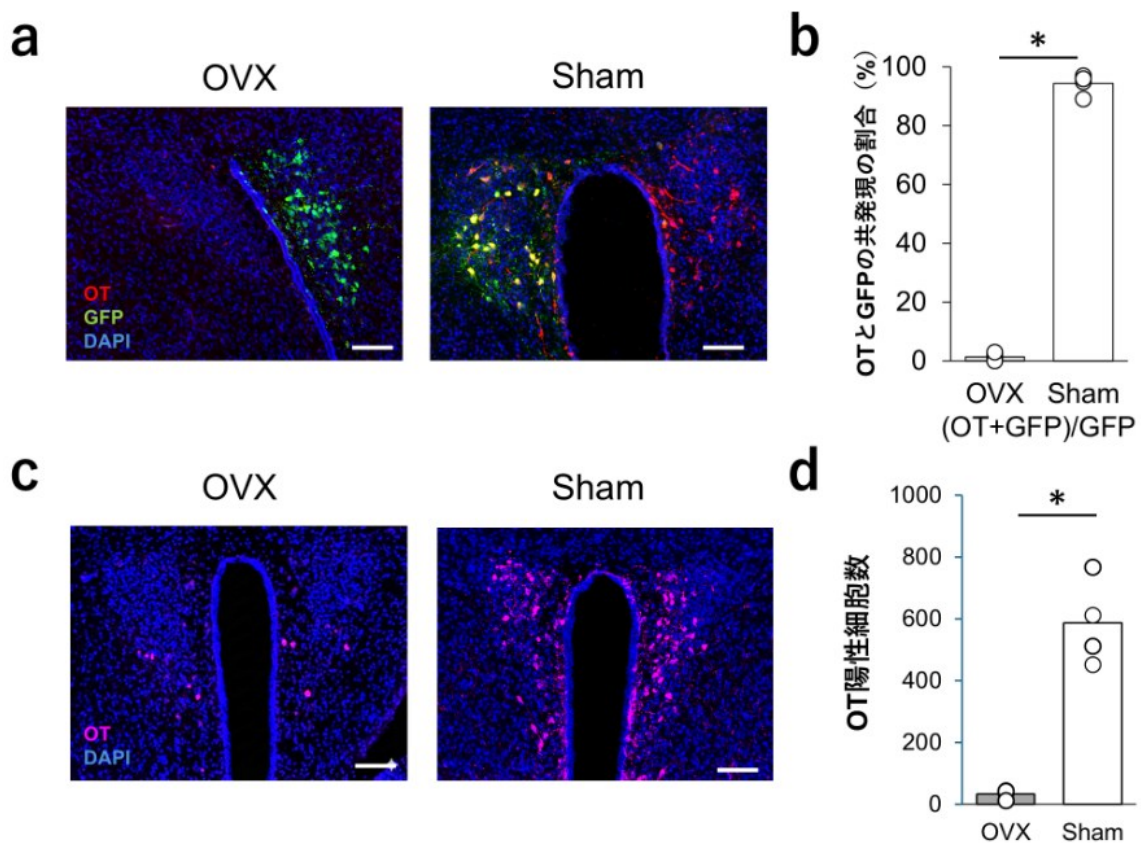


図 15 性成熟不全に伴う PVH OT タンパクの減少

a, 結果 4.3.2 および図 14 で使用した個体における、PVH の 30 μ m 冠状切片の代表例。抗 OT 抗体 (赤) および抗 GFP 抗体 (緑) により共染色した。青は DAPI による核染色。

OVX 群では Sham 群に比して、GFP 陽性細胞における OT シグナルが著しく低下した代表像を示す。

b. GFP 陽性細胞のうち OT 陽性であった細胞の割合の定量。各点は個体ごとのデータを示し、棒は平均を示す。*両側 Welch t-test で $P < 0.05$ 。

c, AAV 投与およびファイバー埋め込みを行わず、3 週齢で OVX または Sham 手術を行った個体の 8 週齢時 PVH の 30 μ m 冠状切片の代表例。抗 OT 抗体 (マゼンタ) と DAPI による核染色 (青) の共染色。

d. c の条件における PVH の OT 陽性細胞数の定量。各点は個体ごとのデータを示し、棒は平均を示す。*両側 Welch t-test で $P < 0.05$ 。

n = 4 マウス、スケールバー、100 μ m。

5. 考察

授乳は、母体の神経内分泌系と母子の行動との双方向の相互作用を含む複雑な生物学的プロセスであり、その異常は現代社会の発展以前には子の栄養不足や死亡につながる可能性が高かった。このように授乳は産後の女性や生後間もない子の QOL に直接関わり臨床的にも重要なプロセスであるにもかかわらず、授乳期に関する基礎的な神経科学研究はいまだ限られている。視床下部に存在する個々のホルモン産生神経が、多様な生理学的・行動学的プロセスをどのように調整するのかを解明することは、神経科学における大きな課題である[67]。本研究では、OT ミニプロモーターによって駆動される Cre 非依存的な AAV によって、自由行動下の野生型マウスにおける OT 神経の母性行動時のパルス状活動を検出する Ca^{2+} イメージングの有用性を拡大した。さらに微小内視鏡イメージングを用いて、自由行動下の授乳期および離乳後の母マウスにおいて、吸啜刺激誘発性の PVH OT 神経のパルス状活動を単一細胞解像度で観察した。そして、PVH OT 神経の活動頻度や強度は動的に調整されている一方、パルス状活動自体はマウスにおいて生得的かつ頑強に保存され、性成熟不全や離乳後の状態であっても吸啜刺激により誘因されることを明らかにした。

本章では、本研究から得られた生物学的知見とその限界について考察する。

5.1. 授乳期における OT 神経活動の動態および汎用的イメージング

基盤の確立

5.1.1 射乳反射時の OT 神経活動には仔による直接の吸啜刺激が必須である

本研究は、マウスの射乳反射には、仔マウスが乳頭と物理的に接触し吸啜刺激を与えることが必須であることを証明した。安定して授乳を行う PPD 12–14 の母親でも、物理的な分離時 (図 3) や母親が巣の外にいた時 (図 4) には、OT 神経のパルス状活動は生じなかった。授乳中の女性や雌牛などの家畜は、直接的な授乳時以外でも、泣き声など乳児に関連したシグナルを学習し乳汁を排出することができるため、この反射には種差があると考えられる[3,62]。マウスにおいても、オペラント条件付けパラダイムによる連合学習を強制することで人間や家畜のような射乳反射が成立する余地が残されているが、今回の結果から、少なくとも自然授乳の条件下では母マウスは仔に関連した匂いや声などの感覚信号に対して射乳を起こす条件学習を形成していないことが示唆された。

5.1.2. 授乳期間の進行に伴う OT 神経活動と母仔相互作用のダイナミクス

本研究は、ファイバーフォトメリー記録と母マウスの行動のビデオ記録解析を組み合わせることで、授乳期を通じて OT 神経のパルス状活動と母仔相互作用の時間的動態を明らかにした。授乳初期において、母マウスが授乳のために巣の中で過ごす時間は明期・暗期に関わらず同程度であった。巣の滞在時間やパルスの発生回数は明期では授乳期間を通してほぼ一定である一方、暗期では、授乳が進むにつれて、母マウスが巣にいる時間は短くなるが、滞在 1 時間あたりのパルス発生回数が増えてより集中的に授乳を行うようになり (図 4)、OT 神経のパルス状活動のパターンもより密集するようになった (図 5)。この観察結果の解釈として、次のようなことが考えられる。授乳初期には、新生児である仔マウスは常にミルクを必要とするため、明期と暗期で母マウスの授乳パターンに差は生じない。仔マウスが成長し、一回の食事量が増え、夜行性の母マウスは暗期に授乳やケージ内の探索行動など授乳以外の活動に多くの時間を割くことができ、結果として授乳期間は短くなり集中的に授乳が行われるようになる。このような母性行動の変遷が、母親の神経内分泌系の自律的な変化や、あるいは成長に伴い変化した仔の行動にどの程度媒介されているのかは興味深いところである。このことは、授乳期後半に母マウスが育てる仔マウスの数を変えたり、異なる日齢の仔マウスを母マウスに与えて吸啜刺激の強さや回数を変えたりすることで検証できるかもしれない。

離乳期前後 (PPD 22–26) には、OT 神経のパルス状活動の数は、突然消失するのではなく徐々に減少し、この時パルスの強度や波形は変化しなかった (図 7)。パルスの減少は暗期が明期に先行しており、暗期では離乳が先行して起こっていることが示唆される。この現象の一つの解釈として以下のようなことが考えられる。暗期に母マウスが活動している場合には母マウスは仔マウスを遠ざけることで必要のない授乳を避けることができる。一方、明期に母親が寝ている時には、離乳期でも乳汁を欲する仔に母乳を“盗まれて”しまう。これはいわゆる親子間の対立[68]の一例となる可能性がある。生態学的な解釈のほか、離乳期の神経学的なメカニズムについて問うことも重要である。一定量の乳頭刺激に対する OT 神経の感度が、離乳期において変化している可能性が考えられる。仔の吸啜刺激は変化しなくとも、母マウス側の OT 神経の感度が変化し、吸啜刺激に対する射乳反射が徐々に起こりにくくなるのかもしれない。また、分娩からの日数や仔の日齢を母マウスが認知しているかどうか、OT 神経の活動にどう影響を与えるのかも調べる必要がある。これらの疑問に答えることで、授乳期のみに見られる集中的な射乳反射の時期特異性のメカニズムに新たな知見が得られると思われる。

5.1.3. OT 神経活動の研究における AAV9 OTp-GCaMP6s の利点と展望

AAV9 OTp-GCaMP6s を用いた OT 神経のイメージング方法は、GCaMP6s を OT 神経特異的に発現させるための複雑な遺伝子制御に依存した以前の戦略[33]とは異なり、様々なマウス系統や、突然変異マウス、遺伝子組み換えマウスに広く適用可能である。本研究では、遺伝子交配を伴わずに OT 神経をイメージングすることが可能であることの実証実験として、授乳期初期の OT 神経のパルス状活動を 2 系統のマウスで比較した (図 2)。今後、OT または OTR のコンディショナルノックアウトマウス[6,54]を用いて、OT を介した射乳反射の促進機能[9,15]の検討に役立てられると期待される。さらに、乳汁分泌に異常がある変異マウスや乳幼児との絆形成に障害がある変異マウスの研究に応用することは、母性ケアに問題を持つ動物モデルとして興味深いと考えられる。

本手法は、Cre を用いた細胞種特異的な神経操作 (opto-genetics や pharmaco-genetics など) と組み合わせることが可能なので、細胞種解像度を高めて実験が行えるという観点から、乳頭から OT 神経への求心性回路の研究を促進することが期待される。さらに原理的には、マウスやラット[35]以外の多くの哺乳類種にも本戦略を適用し、授乳期における OT 神経の神経活動を特徴づけることが可能である。このような比較研究は、ヒトを含むすべての哺乳類の基本的な特徴である授乳の共通スキームおよび、種特異性の理解を深めるという点で有益であると期待される。

5.2. 1 細胞イメージングで捉える OT パルスの可塑性と技術的展望

5.2.1 1 細胞イメージングが示す授乳ステージに伴う OT パルス波形の再編

古典的な細胞外記録研究では射乳反射中の推定 OT 神経のバースト活動が特定されているが[5,7,8]、異なる授乳ステージにわたる個々の OT 神経活動の時間的ダイナミクスは不明だった。本研究は、授乳初期から中期にかけて、recruited ROI の活動強度の高まりと maintained ROI の波形の広がりをも明らかにした (図 8、9)。Maintained ROI と recruited ROI の分子のおよび細胞的特性は不明なため、今後の調査の重要な主題となる。不偏クラスタリングによると、授乳初期から中期にかけてのパルス幅の全体的な広がりが見られ、PPD 11~12 でより幅広のクラスターが拡大している。個々の ROI を追跡すると、授乳ステージ全体にわたるパルス波形の複雑で動的な変化がさらに明らかになった。これらの変化は、PVH OT 神経のパルス状活動の増強に総合的に寄与し、神経集団として

広い波形の活動を形成している。下垂体後葉からの OT 放出が集団活動波形の積分値を反映していると仮定すると、これらの変化は授乳量の増える授乳中期において、射乳の強度と持続時間を増強させ乳腺からの十分な乳汁分泌の確保に貢献している可能性がある。

5.2.2 離乳後の OT パルスの再編と乳汁生成との解離、および産後初期への帰

これまでにヒトの再授乳は報告されているが[1,42,44]、雌マウスの PVH OT 神経が授乳刺激に反応し、通常の授乳期間を超えてパルス状活動を示すかどうかは不明であった。本研究のデータは、離乳後 2 週間が経過した時期であっても、養仔からの吸吮刺激を受けると OT 神経のパルス状活動を再開できることを明らかにしている。再吸吮試験中に乳汁の放出が不十分または全く見られなかったことから、PVH OT 神経のパルス状活動は、主にプロラクチンによって制御される乳汁生成とは分離可能であると思われる[69,70]。複数の OT 神経が同期したパルス状活動を形成する正確なメカニズムは不明であるが、我々のデータは、そのような活動パターンが分娩直後の特定の授乳期間に限定されているわけではないことを示している。この見解は新生児ラット PVH 神経の体外培養において推定 OT 神経の同期したパルス状活動を示す可能性を見出した過去の知見と合致する[71]。

これらの再吸吮試験中、多くのパルス状活動特性は産後 1 日目と同様の状態に戻っていた。つまり、(i) パルスの間隔は産後 1 日目で観察されたように長くなる[50]。(ii) 有意に反応する OT 神経の数は減少する。(iii) 波形パターンはクラスター 1 と 2 が優勢となるより単純な状態に戻る。(ii) と (iii) は、ファイバーフォトメトリーにより離乳後の母マウスにおける OT 神経の集団的な活動を記録した際に、産後 1 日目で観察されるものに似た狭く小さな活動が見られたことをうまく説明できる。これらのデータから、離乳後の期間は授乳中期に観察されるパルス状活動の高まりをリセットし、次の出産と授乳に備える役割を果たす可能性があることが示唆される。この見解と一致して、所属研究室の先行研究では、離乳後の 2 回目の授乳期における PVH OT 神経の集団パルス状活動が、初産マウス母マウスの産後 1 日目に観察されるレベルに戻ることが示されている[33]。

5.2.3 OT パルスの波形変化を担う分子機構の可能性

波形変化の根底にある分子あるいは細胞メカニズムは未だ解明されていないが、イオンチャネルやトランスポーターの発現レベルの変化が膜特性の変化に寄与している可能性があ

る。例えば、ラットを用いた先行研究では、授乳期に外向き整流性カリウム電流が増加することが報告されている[72]。今後、単一細胞トランスクリプトームアプローチを用いることで、OT 神経が授乳初期から中期にかけてどのように変化するかを解明できる可能性がある。さらに、パルス状活動に観察される変化の根底にはシナプス変化が存在する可能性があり、これは授乳期の様々な段階における PVH OT 神経の逆行性入力マッピング[33]によって解析できる可能性がある。

5.2.4 PVH OT 微小内視鏡の限界と改良技術への展望

PVH OT 神経の微小内視鏡イメージングは、上で概説したように生物学的知見をもたらすが、本方法には 4 つの大きな限界があることを述べる。第 1 に、単一光子イメージングでは、特に Z 軸に沿った空間分解能が低い。イメージング面の下隣接細胞や細胞体の微細樹状突起や軸索突起が個々の ROI を汚染し、特異性を損なう可能性がある。第 2 に、母マウスの PVH OT 神経の基礎活動が低いため、ROI の特定は主にパルス状活動に依存し、パルス状活動を示さない PVH OT 神経の特性評価が損なわれる。第 3 に、マウス 1 匹あたりの ROI の数は 20~30 と少なく、大脳新皮質や海馬で得られる数よりもはるかに少ない[73]。第四に、GCaMP6s の時間分解能が比較的低いため[74]、観察されたパルス状活動の強度が活動電位の数に正確に反映しているか明らかではない。射乳反射の間、個々の PVH OT 神経は最大約 80Hz のもの高速度で発火すると言われている[7]。加えて、本研究の OT ミニプロモーター駆動 AAV による標識・記録は大細胞性／小細胞性 OT 神経の区別を与えないため、記録された PVH OT 神経集団の内訳（後葉投射性か中枢投射性か）を本研究のデータのみから確定できない。さらに、本研究では末梢出力としての血中（plasma）OT 濃度を定量していない。血中 OT は射乳反射の議論と関連づけられることが多い一方、測定値が前処理や測定法に大きく依存し、安定した定量や研究間比較が困難であることが指摘されている。従って本研究は、血中 OT 濃度の絶対定量に基づく議論ではなく、OT 神経のパルス状活動という中枢側指標と、OT 産生量指標（免疫染色等）との関係に焦点を絞って解釈を行った。この点は本研究のスコープ上の限界であり、将来的には、末梢出力（血中 OT、乳汁射出の定量など）と中枢パルスとの対応を、測定系の妥当性を担保したうえで統合的に評価する必要がある。理想的には、将来の研究では、これらの制限を克服するために、改良された電位センサーを用いて小型二光子顕微鏡技術[75]によりイメージングを実施する必要があるだろう。加えて、本研究で示唆された二層モデル（パルス生成と産生容量の解離）を検証するために、パルス活動とは独立に OT リガンドの合成・貯蔵・放出可能量を操作する系を導入し、パルスの量的特性および末梢出力との対応を切り分けて評価する必要がある。自由に行動するマウスにおけるホルモン産生 PVH 神経の生体内イメージングは、行動および生理学的プロセスの視床下部による制御に関する理解を

深めるのに今後も有用であると期待される。

5.3 生殖状態に依らず吸啜により生じる OT パルスと、OT 産生指標

の乖離

本研究では、性成熟後で性的未経験な雌 (Naive) および性成熟を完全に抑制した卵巢摘出 (OVX) マウスにおいても、吸啜刺激により PVH OT 神経のパルス状活動が観察された。一方で、OVX 条件では OT タンパク大幅に低下していた。この「パルスの存在」と「OT 産生指標の低下」の並存は、OT 系を (i) 吸啜入力のパルスへ変換する回路ダイナミクスと、(ii) ペプチド合成・貯蔵・分泌という内分泌装置の容量、という二層に分けて考える必要性を示している。

最有力の解釈は、吸啜入力に対するパルス生成機構そのものは、生殖段階に依存せず生得的に形成され頑強に保存されており、パルスは回路の応答様式として成立する一方、産生指標は卵巢ホルモン環境や授乳経験により変動し、末梢へ供給できる OT 量が制御される、という二層モデルである。実際、卵巢摘出により脳内 OT mRNA が低下し得ること、逆に授乳では増加し得ることは古典的研究でも示唆されている[46]。また、OT はマウスの授乳 (射乳=出力) に必須であることが遺伝学的にも支持される[10]。したがって、4-3 章で観察された産生指標の低下は、母乳の産生が十分に起きていない離乳後の母マウスにおいても吸啜によりパルス様の Ca^{2+} 活動は起こるというパルスと末梢出力の分離可能性 (4-2 章の結果) [51]とも整合する。

代替仮説として、少なくとも以下の可能性を区別しておく必要がある。性未経験あるいは OVX 条件で観察される OT パルスが、授乳期と同一の機能的意味 (射乳反射の駆動) を持つかは自明ではない。4-1 章に示したように、マウスでは乳頭刺激がパルスの必要条件であるが[50]、その生理的帰結 (乳汁射出) は本来乳腺の発達や乳産生と不可分である。具体的には、OVX/Naive では乳腺側の組織 (乳腺発達・筋上皮の反応性) が授乳期と異なるため、中枢で OT パルスが成立しても乳汁射出としては表れない。性成熟不全モデルである OVX 条件で観察された OT パルスは、射乳反射を駆動する末梢出力としてではなく、仔刺激に対する中枢応答を養育行動へ結び付けるための信号として機能する可能性がある。具体的には、同居下で未経験雌が母マウスの仔回収を視覚的に観察することにより PVN OT 神経が活性化し、その後の *alloparenting* (他個体養育) 獲得が促進されることが報告されており、OT 系は仔刺激に対する行動レパトリーの獲得を加速するシグナルとして位置付

けられる[76]。一方で、仔への接近・回収は感覚処理のみならず忌避・不安などの情動状態にも強く依存し、ストレス条件下では OT 受容体系の破綻が養育行動の低下につながる事が示されている[77]。また、OT は感覚皮質における仔の鳴き声などの刺激に対する応答を増強し、養育行動を可能にする回路可塑性に関与することが示されている[24]。したがって OVX/Naive で観察されるパルスは、射乳反射に直接は関与せずとも、仔刺激の顕著性を高めて学習を促進すると同時に、ストレス反応や忌避を緩和して養育行動が出現し得る内的条件を整える、という二重の役割を担う可能性がある。

5.4 OT パルス生成の段階的枠組みと、共通指標による検証可能性

OT 神経が同期したパルス状バーストを示す成立機構は未解明であるが、現時点では「上流からの時間構造的な入力」と「PVH/SON 局所での同期化」の二つの要素に分けて考える枠組みが提示されている。前者は、乳頭からの吸啜入力 that 脊髄背角や延髄などを経て PVH/SON へ到達するまでの上流過程に、一定のパルス状リズムを作り出す回路が存在し、そのリズムが OT 神経集団へ伝えられる可能性である。OT 神経のバースト活動がこのような上流機構により駆動され得ることを支持する報告もある[78]。後者は、OT 神経自身が放出する OT が受容体 (OTR) を介して興奮性の正のフィードバックを形成し、バーストの立ち上がりや同期性を局所的に増幅する可能性である[79]。

吸啜誘発 OT パルスの成立には、乳頭からの機械感覚入力 that 重要な役割を果たすと考えられる。本研究の結果は乳頭刺激がパルス生成に必要な入力であることを支持するが、乳頭刺激が十分条件であるか、あるいは他の体性感覚刺激がどの程度代替可能かについては、本研究の結果のみからは結論できない。また、人工的に乳頭刺激を再現する試みは、ストレス応答が OT 神経活動および射乳反射の安定性に影響し得ることから、解釈に慎重さを要する。したがって、低侵襲かつ低ストレスで感覚入力を操作できる実験系の確立が、吸啜入力と OT パルス生成の因果関係を厳密に検証するための今後の重要な課題である。

感覚情報が OT 神経へ入力する経路については、乳頭への機械感覚入力 that 脊髄を經由して脳幹へ到達し、さらに視床下部へ伝達されるという階層構造が提案されている[5]。一方で、この経路のうち、どの中継核が主要なボトルネックとなるのか、また各段階で情報を担う細胞種 (興奮性/抑制性ニューロン、神経ペプチド発現細胞、グリア等) の実体は十分に同定されていない。したがって現時点では、吸啜入力 that PVH/SON の OT 神経集団へ到達するという大枠は支持されるものの、特定の細胞群に帰属させた回路図としては未完成である。本研究ではこの点を直接検証していないため、吸啜入力の伝達経路を細胞種解像度で特定し、OT 神経の同期パルス生成に対してどの段階が必要十分条件となるかを切

り分けることは今後の重要な課題である。

さらに、PVH には下垂体後葉投射性の大型細胞性 OT 神経と中枢投射性の小型細胞性 OT 神経が混在し、後者の入力経路や出力先、同期化の動態が前者と同一であるとは限らない。本研究の OT ミニプロモーター駆動 AAV による計測は両者を分離しないため、観察されたパルス状活動がどの集団に主として由来するかは未確定であり、この点を解釈上の限界として述べる。

局所機構としては、OT 神経自身が放出する OT が受容体 (OTR) を介して興奮性の正のフィードバックを形成し、バーストの立ち上がりや同期性を局所的に増幅する可能性が議論されている[79]。しかし、本研究では OT 産生量指標が低下し得る条件でも吸啜誘発パルスが観察されたことから、OT-OTR 結合がパルス生成に必須であるとは少なくとも本研究からは断定できない。従って現時点では、OT-OTR 結合はパルス生成の「成立」そのものというより、同期化の程度、振幅、波形の急峻さ、あるいは反復パルスに対する安定性など、パルスの量的・質的側面に寄与し得る要素として位置づける。もっとも、OT 産生量指標の低下が局所放出の完全な欠如を意味するかは未検証であり、この点も解釈上の限界として併記する。

以上より、吸啜入力の上流で形成される時間構造化入力と、PVH/SON 局所での増幅・同期化という二層の枠組みは、同期パルスの成立機構を整理するうえで有用である。一方で、本研究が示した「吸啜誘発パルスの成立」と「OT 産生量指標の変動」の解離は、局所での同期化仮説 (OT-OTR によるフィードバックなど) を単純な必須因子として一義的に解釈することはできない。したがって、今後は、局所の OT/OTR シグナルがパルス生成の必須条件であるか否かに加え、立ち上がりの急峻さ、同期性、振幅、枯渇のしやすさなど、パルスの量的・質的側面にどのように寄与するかを段階的に検証する必要がある。

この検証において、本研究で行った「生殖段階を通じたパルス特性の定量」と「単一細胞解像度での OT 神経の可塑性解析」は、異なる機構仮説を同じ尺度で評価するための共通の軸となる。すなわち、上流回路の遮断・賦活や OTR シグナルの遮断・回復を行った際に、パルス頻度・同期性・波形・参加細胞数がどの成分として変化するかを比較し議論することを可能にする。これにより、本研究で観察した段階差や個体差が、上流入力、局所増幅、あるいは出力 (末梢放出) に至るどの階層に主として由来するかを同定できると期待される。

そのためには、パルス活動と独立に OT リガンド量 (合成・貯蔵・放出可能量) を操作する介入と、OTR シグナルを段階的に変調する介入を組み合わせ、(i) パルス活動の成立、

(ii) パルス波形・同期性、(iii) 末梢出力の各レベルで影響を分離して評価する実験系が求められる。現時点では直接検証できていないが、二層モデルは、こうした介入実験により反証可能な予測へ落とし込める点で、今後の研究の指針となる。

具体例として、吸啜入力 of 経路特異的操作により上流の寄与を検証したり、OTR の細胞種特異的欠損や薬理学的遮断により局所増幅の寄与を検証したりすることが考えられる。加えて、吸啜入力 of 「必要性」を支持する所見を、低侵襲・低ストレスの入力操作へ接続し、十分条件性や代替感覚刺激の寄与を切り分けることが、上流モデルの実体化に不可欠である。回路同定の観点では、中継核のボトルネックや細胞種の同定が遅れているため、細胞種解像度での伝達経路の特定と、どの段階が必要十分条件となるかの因果切り分けが重要となる。

さらに、パルス状出力の生理的意義を検証する観点からは、同等量の OT シグナルを「パルス状」と「持続的」に与えた場合に、末梢出力（射乳反射の頑健性、反復時の枯渇、筋上皮収縮の閾値など）がどのように変化するかを比較する必要がある。しかし現時点では、持続刺激が射乳を十分に誘発しないという見解を支持する直接的な実験的裏付けは限定的であり、時間パターンが出力に与える因果的寄与は今後の検証課題である。従って、上流入力と局所同期化の寄与を同定する研究と並行して、出力段階での時間パターン依存性を、操作と共通指標に基づき実証することが求められる。

これらの OT パルス生成機構の研究が進むことにより、授乳という内分泌出力がどのように制御されているかを、入力（感覚）から局所回路、末梢放出に至る階層横断的な枠組みとして説明することが可能になると考えられる。

6. 結論

本研究では、遺伝学的改変を要しない OT ミニプロモーター駆動 AAV (AAV9 OTp-GCaMP6s) を用いて、授乳中の雌マウスにおける PVH OT 神経集団の Ca^{2+} 活動を長期に記録する計測系を初めて可能にした。これにより、従来は遺伝子改変動物の交雑に制約されていた OT 神経活動の定量が、野生型を含む多様な遺伝的背景・系統で比較可能となり、変異マウスモデルにおける母性ケアの神経基盤解析へ汎用的に展開できるようになった。また、授乳関連段階の変化に伴い OT パルスが可塑的に再編され得ること、ならびに吸啜誘発性 OT パルスの発生と OT 産生量指標が必ずしも一対一に連動しないことを明らかにした。

Aim 1 として、自由行動下で授乳期全体の OT パルス発生を時系列に記述し、母仔相互作用と結び付けて解析した。その結果、母マウスが授乳のために巣に滞在する時間および滞在 1 時間当たりのパルス発生回数は、授乳初期では明期・暗期に依らず同程度であった。一方、授乳の進行に伴い、明期ではこれらが概ね一定に保たれるのに対し、暗期では巣滞在が短縮しつつ単位時間当たりのパルス発生回数が増加し、授乳がより集中的な様式へ移行することが明らかになった。

Aim 2 として、生体内微小内視鏡による単一細胞同時記録を導入し、授乳経験に伴うパルス波形と参加細胞構成の再編を単一細胞レベルで示した。さらに離乳後の再吸啜では、パルスは再出現する一方で出力が減弱し、その背景に参加率および単一細胞波形の変化があることを明らかにした。これらは、同一の吸啜入力、生殖段階に応じて異なる集団内部構造へ変換され得ることを示す。

Aim 3 として、性成熟および卵巣ホルモン状態を操作し、吸啜誘発 OT パルス活動と OT 産生量指標の関係を検証した。性的未経験個体や卵巣摘出個体においても吸啜刺激で PVH OT パルスが生じる一方、性成熟状態に依存して OT 発現量が変動し得ると考えられることから、OT システムにおいてパルス生成とペプチド合成・貯蔵としての内分泌機能が解離し得ることを示した。

以上より、授乳に伴うパルス発生様式の変化は、(i) 仔の成長と母体の採餌・休息との両立を図る行動戦略という生態学的側面、(ii) 吸啜入力を一過性のパルスへ変換する回路の閾値・同期性・参加動態が授乳経験により調節されるという神経学的側面の双方から解釈できる。今後の主要な課題として、乳汁射出・末梢 OT 放出の同時計測、求心性入力や局所回路の操作、ならびに単一細胞トランスクリプトーム等による分子基盤の同定などがある。

げられる。

本研究の成果は、乳汁分泌異常や母子絆形成の障害を伴う変異マウスモデルにおいて、OT神経活動の量的・質的变化を同一尺度で評価する基盤を提供する。ひいては、母子相互作用の神経内分泌学の理解を更新し、授乳および母性ケアの困難さの機序解明と改善に向けた介入設計に更なる発展をもたらすものである。

7.参考文献

1. Lawrence RA, Lawrence RM. Breastfeeding: A guide for the medical profession. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier - Health Sciences Division; 2021.
2. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet*. 2016;387: 475–490.
3. McNeilly AS, Robinson IC, Houston MJ, Howie PW. Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;286: 257–259.
4. Bruckmaier RM, Blum JW. Oxytocin release and milk removal in ruminants. *J Dairy Sci*. 1998;81: 939–949.
5. Armstrong WE. Central nervous system control of oxytocin secretion during lactation. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier; 2015. pp. 527–563.
6. Leithead AB, Tasker JG, Harony-Nicolas H. The interplay between glutamatergic circuits and oxytocin neurons in the hypothalamus and its relevance to neurodevelopmental disorders. *J Neuroendocrinol*. 2021;33: e13061.
7. Wakerley JB, Lincoln DW. The milk-ejection reflex of the rat: a 20- to 40-fold acceleration in the firing of paraventricular neurones during oxytocin release. *J Endocrinol*. 1973;57: 477–493.
8. Lincoln DW, Wakerley JB. Factors governing the periodic activation of supraoptic and paraventricular neurosecretory cells during suckling in the rat. *J Physiol*. 1975;250: 443–461.
9. Summerlee AJ, Lincoln DW. Electrophysiological recordings from oxytocinergic neurones during suckling in the unanaesthetized lactating rat. *J Endocrinol*. 1981;90: 255–265.
10. Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93: 11699–11704.
11. Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, Ross HE, Kawamata M, Onaka T, et al. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 2005;102: 16096–16101.

12. Young WS 3rd, Shepard E, Amico J, Hennighausen L, Wagner KU, LaMarca ME, et al. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. *J Neuroendocrinol.* 1996;8: 847–853.
13. Althammer F, Grinevich V. Diversity of oxytocin neurons: beyond magno- and parvocellular cell types? *J Neuroendocrinol.* 2017;30: e12549.
14. Belin V, Moos F. Paired recordings from supraoptic and paraventricular oxytocin cells in suckled rats: recruitment and synchronization. *J Physiol.* 1986;377: 369–390.
15. Paisley AC, Summerlee AJ. Activity of putative oxytocin neurones during reflex milk ejection in conscious rabbits. *J Physiol.* 1984;347: 465–478.
16. Hatton GI, Tweedle CD. Magnocellular neuropeptidergic neurons in hypothalamus: increases in membrane apposition and number of specialized synapses from pregnancy to lactation. *Brain Res Bull.* 1982;8: 197–204.
17. Theodosis DT, Poulain DA, Vincent JD. Possible morphological bases for synchronisation of neuronal firing in the rat supraoptic nucleus during lactation. *Neuroscience.* 1981;6: 919–929.
18. Andrew RD, MacVicar BA, Dudek FE, Hatton GI. Dye transfer through gap junctions between neuroendocrine cells of rat hypothalamus. *Science.* 1981;211: 1187–1189.
19. Moos F, Freund-Mercier MJ, Guerné Y, Guerné JM, Stoeckel ME, Richard P. Release of oxytocin and vasopressin by magnocellular nuclei in vitro: specific facilitatory effect of oxytocin on its own release. *J Endocrinol.* 1984;102: 63–72.
20. Yamashita H, Okuya S, Inenaga K, Kasai M, Uesugi S, Kannan H, et al. Oxytocin predominantly excites putative oxytocin neurons in the rat supraoptic nucleus in vitro. *Brain Res.* 1987;416: 364–368.
21. Neumann I, Koehler E, Landgraf R, Summy-Long J. An oxytocin receptor antagonist infused into the supraoptic nucleus attenuates intranuclear and peripheral release of oxytocin during suckling in conscious rats. *Endocrinology.* 1994;134: 141–148.
22. Arrowsmith S, Wray S. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. *J Neuroendocrinol.* 2014;26: 356–369.

23. Lee H-J, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS 3rd. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol.* 2009;88: 127–151.
24. Marlin BJ, Mitre M, D'amour JA, Chao MV, Froemke RC. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature.* 2015;520: 499–504.
25. Yuan T-F, Hou G. Commentary: Oxytocin enables maternal behavior by balancing cortical inhibition. *Front Behav Neurosci.* 2015;9: 311.
26. Valtcheva S, Issa HA, Bair-Marshall CJ, Martin KA, Jung K, Zhang Y, et al. Neural circuitry for maternal oxytocin release induced by infant cries. *Nature.* 2023; 1–8.
27. Yoshihara C, Numan M, Kuroda KO. Oxytocin and parental behaviors. *Curr Top Behav Neurosci.* 2018;35: 119–153.
28. Olazábal DE. Role of oxytocin in parental behaviour. *J Neuroendocrinol.* 2018;30: e12594.
29. Phaneuf S, Asbóth G, Carrasco MP, Liñares BR, Kimura T, Harris A, et al. Desensitization of oxytocin receptors in human myometrium. *Hum Reprod Update.* 1998;4: 625–633.
30. Armstrong WE, Foehring RC, Kirchner MK, Sladek CD. Electrophysiological properties of identified oxytocin and vasopressin neurones. *J Neuroendocrinol.* 2019;31: e12666.
31. Yukinaga H, Miyamichi K. Oxytocin and neuroscience of lactation: Insights from the molecular genetic approach. *Neurosci Res.* 2025 [cited 17 Feb 2025]. doi:10.1016/j.neures.2025.01.002
32. Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell.* 2014;157: 1535–1551.
33. Yukinaga H, Hagihara M, Tsujimoto K, Chiang H-L, Kato S, Kobayashi K, et al. Recording and manipulation of the maternal oxytocin neural activities in mice. *Curr Biol.* 2022;32: 3821-3829.e6.
34. Hashimoto H, Matsuura T, Ueta Y. Fluorescent visualization of oxytocin in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Front Neurosci.* 2014;8: 213.
35. Thirtamara Rajamani K, Leithead AB, Kim M, Barbier M, Peruggia M, Niblo K, et al.

Efficiency of cell-type specific and generic promoters in transducing oxytocin neurons and monitoring their neural activity during lactation. *Sci Rep*. 2021;11: 22541.

36. Ghosh KK, Burns LD, Cocker ED, Nimmerjahn A, Ziv Y, Gamal AE, et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods*. 2011;8: 871–878.
37. Zhang L, Liang B, Barbera G, Hawes S, Zhang Y, Stump K, et al. Miniscope GRIN lens system for calcium imaging of neuronal activity from deep brain structures in behaving animals. *Curr Protoc Neurosci*. 2019;86: e56.
38. Li Y, Mathis A, Grewe BF, Osterhout JA, Ahanonu B, Schnitzer MJ, et al. Neuronal representation of social information in the medial amygdala of awake behaving mice. *Cell*. 2017;171: 1176-1190.e17.
39. Karigo T, Kennedy A, Yang B, Liu M, Tai D, Wahle IA, et al. Distinct hypothalamic control of same- and opposite-sex mounting behaviour in mice. *Nature*. 2021;589: 258–263.
40. Larosa A, Zhang TR, Wong AS, Fung CYH, Long XLYJ, Singh P, et al. Diminished social memory and hippocampal correlates of social interactions in chronic social defeat stress susceptibility. *Biol Psychiatry Glob Open Sci*. 2025;5: 100455.
41. Xue F, Li F, Zhang K-M, Ding L, Wang Y, Zhao X, et al. Multi-region calcium imaging in freely behaving mice with ultra-compact head-mounted fluorescence microscopes. *Natl Sci Rev*. 2024;11: nwad294.
42. Bose CL, D'Ercole AJ, Lester AG, Hunter RS, Barrett JR. Relactation by mothers of sick and premature infants. *Pediatrics*. 1981;67: 565–569.
43. Mehta A, Rathi AK, Kushwaha KP, Singh A. Relactation in lactation failure and low milk supply. *Sudan J Paediatr*. 2018;18: 39–47.
44. Auerbach KG, Avery JL. Induced lactation. A study of adoptive nursing by 240 women. *Am J Dis Child*. 1981;135: 340–343.
45. Van Tol HH, Bolwerk EL, Liu B, Burbach JP. Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology*. 1988;122: 945–951.
46. Miller FD, Ozimek G, Milner RJ, Bloom FE. Regulation of neuronal oxytocin mRNA by ovarian steroids in the mature and developing hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 1989;86: 2468–2472.

47. De Melo VU, Saldanha RRM, Dos Santos CR, De Campos Cruz J, Lira VA, Santana-Filho VJ, et al. Ovarian hormone deprivation reduces oxytocin expression in paraventricular nucleus preautonomic neurons and correlates with baroreflex impairment in rats. *Front Physiol.* 2016;7: 461.
48. Russell JA, Leng G, Douglas AJ. The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy. *Front Neuroendocrinol.* 2003;24: 27–61.
49. Brown CH, Bains JS, Ludwig M, Stern JE. Physiological regulation of magnocellular neurosecretory cell activity: integration of intrinsic, local and afferent mechanisms. *J Neuroendocrinol.* 2013;25: 678–710.
50. Yaguchi K, Hagihara M, Konno A, Hirai H, Yukinaga H, Miyamichi K. Dynamic modulation of pulsatile activities of oxytocin neurons in lactating wild-type mice. *PLoS One.* 2023;18: e0285589.
51. Yaguchi K, Miyamichi K, Tasaka G-I. Flexible adjustment of oxytocin neuron activity in mouse dams revealed by microendoscopy. *Sci Adv.* 2024;10. doi:10.1126/sciadv.adt1555
52. Tasaka G-I, Feigin L, Maor I, Groysman M, DeNardo LA, Schiavo JK, et al. The temporal association cortex plays a key role in auditory-driven maternal plasticity. *Neuron.* 2020;107: 566-579.e7.
53. Knobloch HS, Charlet A, Hoffmann LC, Eliava M, Khrulev S, Cetin AH, et al. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron.* 2012;73: 553–566.
54. Inada K, Hagihara M, Tsujimoto K, Abe T, Konno A, Hirai H, et al. Plasticity of neural connections underlying oxytocin-mediated parental behaviors of male mice. *Neuron.* 2022;110: 2009-2023.e5.
55. Konno A, Hirai H. Efficient whole brain transduction by systemic infusion of minimally purified AAV-PHP.eB. *J Neurosci Methods.* 2020;346: 108914.
56. Franklin KBJ, Paxinos G. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2013.
57. Resendez SL, Jennings JH, Ung RL, Namboodiri VMK, Zhou ZC, Otis JM, et al.

Visualization of cortical, subcortical and deep brain neural circuit dynamics during naturalistic mammalian behavior with head-mounted microscopes and chronically implanted lenses. *Nat Protoc.* 2016;11: 566–597.

58. Lu J, Li C, Singh-Alvarado J, Zhou ZC, Fröhlich F, Mooney R, et al. MIN1PIPE: A miniscope 1-photon-based calcium imaging signal extraction pipeline. *Cell Rep.* 2018;23: 3673–3684.
59. Tasaka G-I, Hagihara M, Irie S, Kobayashi H, Inada K, Kobayashi K, et al. Orbitofrontal cortex influences dopamine dynamics associated with alloparental behavioral acquisition in female mice. *Sci Adv.* 2025;11: eadr4620.
60. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One.* 2012;7: e35538.
61. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2009;Appendix 4: Appendix 4I.
62. Fuchs AR, Ayromlooi J, Rasmussen AB. Oxytocin response to conditioned and nonconditioned stimuli in lactating ewes. *Biol Reprod.* 1987;37: 301–305.
63. Fuchs AR, Cubile L, Dawood MY, Jørgensen FS. Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation. *Endocrinology.* 1984;114: 462–469.
64. Cohen MR, Kohn A. Measuring and interpreting neuronal correlations. *Nat Neurosci.* 2011;14: 811–819.
65. Kohn A, Coen-Cagli R, Kanitscheider I, Pouget A. Correlations and neuronal population information. *Annu Rev Neurosci.* 2016;39: 237–256.
66. Lawrence RA, Lawrence RM. *Breastfeeding: A guide for the medical professional.* 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2010.
67. Xu S, Yang H, Menon V, Lemire AL, Wang L, Henry FE, et al. Behavioral state coding by molecularly defined paraventricular hypothalamic cell type ensembles. *Science.* 2020;370: eabb2494.
68. Ishii KK, Osakada T, Mori H, Miyasaka N, Yoshihara Y, Miyamichi K, et al. A Labeled-Line Neural Circuit for Pheromone-Mediated Sexual Behaviors in Mice. *Neuron.* 2017;95: 123-137.e8.

69. Ni Y, Chen Q, Cai J, Xiao L, Zhang J. Three lactation-related hormones: Regulation of hypothalamus-pituitary axis and function on lactation. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;520: 111084.
70. Neville M. Lactation and Its Hormonal Control. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* Elsevier; 2006. pp. 2993–3054.
71. Israel J-M, Le Masson G, Theodosis DT, Poulain DA. Glutamatergic input governs periodicity and synchronization of bursting activity in oxytocin neurons in hypothalamic organotypic cultures: Glutamate synchronizes firing of OT neurons. *Eur J Neurosci.* 2003;17: 2619–2629.
72. Stern JE, Armstrong WE. Changes in the electrical properties of supraoptic nucleus oxytocin and vasopressin neurons during lactation. *J Neurosci.* 1996;16: 4861–4871.
73. Zhou P, Resendez SL, Rodriguez-Romaguera J, Jimenez JC, Neufeld SQ, Giovannucci A, et al. Efficient and accurate extraction of in vivo calcium signals from microendoscopic video data. *Elife.* 2018;7. doi:10.7554/eLife.28728
74. Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature.* 2013;499: 295–300.
75. Zong W, Obenaus HA, Skytøen ER, Eneqvist H, de Jong NL, Vale R, et al. Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice. *Cell.* 2022;185: 1240-1256.e30.
76. Carcea I, Caraballo NL, Marlin BJ, Ooyama R, Riceberg JS, Mendoza Navarro JM, et al. Oxytocin neurons enable social transmission of maternal behaviour. *Nature.* 2021. doi:10.1038/s41586-021-03814-7
77. Tsuneoka Y, Yoshihara C, Ohnishi R, Yoshida S, Miyazawa E, Yamada M, et al. Oxytocin facilitates allo-parental behavior under stress in laboratory mice. *eNeuro.* 2022. doi:10.1523/ENEURO.0405-21.2022
78. Jourdain P, Israel JM, Dupouy B, Oliet SH, Allard M, Vitiello S, et al. Evidence for a hypothalamic oxytocin-sensitive pattern-generating network governing oxytocin neurons in vitro. *J Neurosci.* 1998;18: 6641–6649.
79. Neumann I, Douglas AJ, Pittman QJ, Russell JA, Landgraf R. Oxytocin released within the supraoptic nucleus of the rat brain by positive feedback action is involved in

parturition-related events. *J Neuroendocrinol.* 1996;8: 227–233.

8.謝辞

本研究は、理化学研究所生命機能科学研究センター比較コネクトミクス研究チーム 宮道和成チームディレクターのご指導のもと行われました。真摯なご指導及びご助言を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

日々の研究生活でお世話になりました比較コネクトミクス研究チームの皆様には、実験手法や結果の考察、研究に必要な論理的思考や姿勢に至るまで、細部にわたるご指導をいただきました。心から感謝し、御礼申し上げます。

また AAV ベクターの作製・精製をしていただきました群馬大学大学院医学系研究科脳神経再生医学分野 平井宏和教授・今野歩講師に心より感謝申しあげます。

そして連携大学院制度を利用し本研究を行う上で、学生として受け入れていただき貴重な機会を与えてくださり、ご指導及びご協力を頂きました京都大学生命科学研究科高次生命科学専攻分子病態学分野 北島智也教授および染色体分配研究チームの皆様我心より感謝いたします。

最後に、本論文を執筆するにあたりご協力いただいた全ての方々に厚く御礼申し上げます。

本研究は理化学研究所 大学院生リサーチ・アソシエイト制度の下での成果です。

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。

Yaguchi, K., Hagihara, M., Konno, A., Hirai, H., Yukinaga, H., & Miyamichi, K. (2023).
Dynamic modulation of pulsatile activities of oxytocin neurons in lactating wild-type mice.
PLoS One, 18(5), e0285589.