

氏 名	さっじゃういりやーしょーていっぶ Sajjaviriya Chortip
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 670 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	深層学習による保育行動の評価と V1b パソプレシンノックアウトマウスでの知見
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 尾 仲 達 史 (委 員) 教 授 須 田 史 朗 准教授 高 橋 秀 徳

論文内容の要旨

1 研究目的

Maternal behavior is a crucial characteristic for promoting the survival of offspring and parents' large efforts made during childcare can affect mental and physical health. The neurohypophysial hormone, arginine vasopressin (AVP), has been known to regulate maternal behavior mainly through activation of vasopressin V1a subtype receptors in the central nervous system (CNS). According to recent studies, blockage of another vasopressin receptor subtype in CNS, V1b receptor, was implied in maternal care. However, our knowledge of V1b receptors on maternal behavior is very limited. Because the complex and long-lasting behavior observation generates a large scale of the dataset, therefore, this study aims to investigate the role of V1b receptor on the relationships between dam and pups in free moving and non-stressed conditions using deep learning methods for the first time. Moreover, we had investigated activities of the brain and V1b receptor expression in the maternal behavior-specific brain area, the median preoptic area (MPOA), to understand the efficiency of maternal care during the lactation period.

2 研究方法

2.1 Open-field test

Male and female of Wild-type (WT) and V1b knockout (V1bKO) mice at 8 – 12 weeks of age (N = 10 per genotype) were observed their movement. A mouse was put in the center of the new polymethylpentene (TPX) cage (18 x 26 x 13 cm) and recorded by video camera without human interference for 15-minute. The experiment was performed between 9.00 and 12.00 A.M.

2.2 Pup retrieval test

Pup retrieval test was used to study maternal behavior. WT and V1bKO mothers with their pups were used at the lactation day2 and day4. Four pups were placed in each corner of the cage prior to the test. Then mother was placed in the center of the cage and the number of

retrieved pups by their mother in 15 minutes were counted by an investigator. During the observation, they were recorded by video.

2.3 Supervised training of deep learning model

We prepared a computer server and accessed the server from a personal computer for data transfer and analysis. Our machine learning models need to be trained by different sets of mother and pup images. Thousands of images and objects were boxed and annotated by an investigator. After the annotation, the initial model was trained using annotated images to make calculation models. The accuracy of the models was evaluated before further analysis by an investigator.

2.4 Object detection and analysis of mouse behavior

We used our model of deep learning algorithms to recognize mother and/or baby in the picture. Next, the x-y coordinates of the objects were extracted and distances between mother and baby during the test were calculated. The number of the objects became one after successful retrieval of all babies by a mother. The number of objects was compared between WT and V1bKO group. Images were extracted from video records of pup retrieval test and open-field test in the frequency of 1 image per second. About one thousand pictures generated from each 15 minutes test were analyzed. The model will recognize mother and baby and evaluate the distance of recognized objects throughout the observation period. Mother's nurturing behavior in terms of total distances among objects was plotted on the graph overtime.

2.5 *c-Fos* immunohistochemistry

Furthermore, the brain MPOA activities of dams were examined using an immunohistochemical technique to check *c-Fos* expression at MPOA. Brain tissue sections were processed with avidin-biotin peroxidase complex kit (Vectastain Elite Kit; Vector Laboratories) before stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Cells with positive *c-Fos* expression signals were compared between nursing dams of WT and V1bKO and evaluated by Image-J.

2.6 In situ hybridization

Virgin female and lactation day 2 mother of WT mice were sacrificed and the brain included MPOA was collected. Brain tissue sections were subjected to fluorescence in situ hybridization with ACDBio RNAscope® multiplex fluorescence assay. The positive target probe was a combination of ACD bio: Mm-Gal (#400961), -Mm-Avpr1b-C2 (#480141-C2), and -Mm-Fos-C3 (#316921-C3). DAPI staining was performed at the last step. A fluorescent confocal microscope was used to detect positive signals.

3 研究成果

3.1 Deep learning analysis of freely moving mice

After confirming the detection accuracy, we evaluated the effect of V1b receptor deletion on basal locomotion in an open-field test for 15 min. The deep learning models showed high

accuracy percentage and detected the specific objects in images. The total moving distances of female V1bKO mice in the open-field environment were significantly reduced compared to WT mice. Especially, when the tracking movement showed V1bKO female mice were less exploring and moving through the center of cages than WT.

3.2 Manual measurement and deep learning analysis of pup retrieval test

To examine the role of V1b in maternal care during the early lactation period, pup retrieval test was performed on lactation days 2 and 4. Manual counting of pup retrieval showed that the V1bKO mother collected her pups faster than the WT mother. The deep learning models detected mother and baby. The accumulated total moving distances was reduced in V1bKO dams on lactation day 4.

3.3 Histological examination in MPOA

The results showed that the number of *c-Fos* positive nuclei was significantly lower in V1bKO dams. In galanin-positive and -negative neurons in MPOA of virgin female mice and dams on lactation day 2, the number of V1b transcript-positive neurons was similar independent of the status of mother's pregnancy. V1b transcript was detected in both galanin-positive and -negative neurons.

4 考察

V1bKO virgin female and postpartum dam entered less into center of the field, indicating anxiety-like phenotype. Our environment for pup retrieval test was set up in a new cage with small amount of new bedding. However, WT female and dam explored more by moving more distances. Our results of V1bKO mother on pup retrieval is in good agreement with a previous study, which reported that blockage of the V1b receptor by local administration of the antagonist into MPOA led to faster pup retrieval. Moreover, we showed, for the first time to our knowledge, that mother-infant relationship can be analyzed by deep neural network and computer vision. Therefore, deep learning analysis can be effectively applied to investigation of mother-pup interactions.

5 結論

In summary, the V1b receptor is involved in the exploration of new environment and collection of pups by lactation mothers. Moreover, knowledges from deep learning analysis are useful to help understand large efforts of parents to foster their infants during early phase of postpartum period.

論文審査の結果の要旨

深層学習を用いて母性行動を定量化する方法を確立させ、バゾプレシン V1b 受容体の母性行動における働きをノックアウトマウスで検討した研究である。深層学習で母マウスと仔マウスを分けて認識させることに成功し、仔マウス巣戻しテスト中の母マウスと仔マウスの距離の総計と母

マウスと仔マウスのかたまりの数を定量化することが母性行動の一つの指標になりうることが示唆された。

また、新しいケージにおける移動距離とケージ中央滞在時間を定量化すると、メス V1b 受容体ノックアウトマウスで野生型マウスと比較し移動距離が少ないこと中央滞在時間が短いことが分かった。このデータは V1b 受容体がないと不安が高くなるという考えで説明がつく。これに対し、オス V1b 受容体ノックアウトマウスでは移動距離は少ないが中央滞在には有意な変化がないことが見出された。

さらに、授乳 2 日目と 4 日目に仔マウス巣戻しテストを行ったところ、V1b 受容体ノックアウトマウスでより少ない時間で仔マウスを集めることを実験者の手動観察により見出した。機械学習を使用した解析により母仔マウス間距離と母仔の塊の数を計算したが、授乳期 2 日目には有意差を見出すことができなかった。授乳 4 日目には母仔マウス間距離と母仔の塊の数が有意に少ないことが明らかになり、V1b 受容体がないことで母性行動が促進されることが示唆された。また、母親の移動距離を見てみると 2 日目と 4 日目でともに野生型マウスと比較し低値を示した。

仔暴露に対し母性行動の中核と考えられている正中視索前野において、神経活動の指標である Fos 蛋白質陽性の細胞数が少ないこと、これに対し帯状皮質の Fos 陽性細胞数には差がないことが組織化学的検討で示された。さらに、Galanin 陽性 V1b 受容体陽性細胞数、Galanin 陰性 V1b 陽性細胞数がともに授乳マウスと virgin マウスとの間の比較で有意な差がないことが示された。

以上の結果から、古典的な深層学習による母性行動の定量化が可能で、V1b 受容体が母性行動に関与していることが示唆されたと結論している。

提出された学位論文に対し、深層学習を用いることの科学的な意義について将来の可能性と共に今回実際に実現できたことに関して追加記載すること、これまでのアンタゴニスト投与実験で明らかにされていた過去の報告と今回の遺伝子ノックアウト動物の実験結果の異同についての合理的な説明を追加すること、他グループから最近発表されたノックアウトマウスの行動解析報告との異同についての議論を追加することが指摘された。

期限内に適切に追加訂正された論文が提出され、全員一致で学位にふさわしいと認められた。

最終試験の結果の要旨

脳におけるバズプレシンの働き、母性行動におけるこれまで報告されている V1b 受容体の働き、母性行動の神経機構、深層学習についての短いまとめがなされた。続いて、本実験結果である深層学習により母マウスと仔マウスを同時に区別して認識させることができること、V1b 受容体ノックアウトマウスの移動距離が短くメスマウスでは中央滞在が少なく、V1b 受容体欠損によりメスマウスで不安が高い可能性が示された。さらに、実験者の手動観察記録で V1b 受容体欠損マウスでは授乳 2 日目から仔マウス巣戻し行動の潜時が短くなっていること、さらに深層学習による母仔間距離と母仔マウスの塊数の計測においても授乳 4 日目には母性行動の促進を観察することができ、V1b 受容体欠損で母性行動が促進している可能性が示された。

さらに、母性行動の中核として知られている正中視索前野における活動性が、Fos 蛋白質の発現検討実験で、母性行動が促進していると考えられる V1b 受容体ノックアウトマウスで減少していること、これに対し帯状皮質の Fos 陽性細胞数には差がないことが示された。さらに、Galanin

陽性 V1b 受容体陽性細胞数、Galanin 陰性 V1b 陽性細胞数がともに授乳マウスと virgin マウスとの間の比較で有意な差がないことが in situ hybridization 実験で示された。

これまでの行動解析ソフトがある中で深層学習を使用することの意義、今回の深層学習を用いる方法で初めて可能になった事柄、これまでの受容体アンタゴニスト実験との見かけ上の矛盾点をどう合理的に説明するのか、母性行動が促進しているノックアウトマウスのほうが正中視索前野の活動性が減少しているという見かけ上の矛盾をどう説明するのか、授乳期に V1b 受容体の発現が変わらないことの意義について質問があった。

これらの質問に対し、候補者は真摯にまた適切に答えた。発表と質疑応答から、申請者は周辺領域の知識も十分にあり、申請者の研究能力、科学的素養、態度は、博士の学位にふさわしいと全員一致で認めた。