

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460320

研究課題名(和文)心の性を司る視索前野性的二型核および分界条床核の性差形成機構

研究課題名(英文)Sexual differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis responsible for the gender identity.

研究代表者

濱田 知宏 (Hamada, Tomohiro)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90312058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心の性形成には脳の性差が重要であると思われるがその詳細は不明である。本研究は「エストロゲンによる細胞移動制御」が性差形成機構の本体であるという仮説について、視索前野性的二型核の形成過程を可視化し、その性差形成機構の解明を目指した。その結果、視索前野性的二型核形成には2段階の細胞移動が関与し、第2移動がエストロゲンにより分散方向になること、エストロゲンの作用はRac1/cofilin/actinという細胞内情報伝達機構を介することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Sex differences of the brain would be important for the gender identity, however, the mechanism of the sexual differentiation of the brain remains largely unknown. The sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) is thought to contribute to the gender identity. In this study, we examined the sexual differentiation of the SDN-POA using the organotypic brain slice cultures and time-lapse imaging in vitro to test the hypothesis that neural migration regulated by estrogen is critical for the sexual differentiation of the SDN-POA. The scattering neural migration by estrogen was observed in the masculinization of the SDN-POA. This estrogen induced scattering migration was mediated through the estrogen receptor alpha/Rac1/cofilin/actin pathway. These results suggest that scattering neural migration by estrogen is critical role for the masculinization of the SDN-POA.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：脳の性差 性差形成機構 エストロゲン 性別違和

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物学的な性と心の性

生物学的な性は遺伝子で決まり、雌と雄に区別される。しかし心の性は雌と雄に区別できるほど単純ではなく、雌と雄の間には多種多様な色合いが存在する。近年、社会的な問題となっている「性同一性障害」は生物学的性と心の性が一致しないものであるが、これは決して障害ではなく、心の多様性がもたらすものという立場があり、2013年米国精神医学界では“gender dysphoria”に呼称を変更することが決定され、日本精神神経学会は「性別違和」という訳語を制定している。

(2) 性別違和と脳の性差

脳には解剖学的な性差があり、機能的な性差の基盤として考えられている。例えば視索前野性の二型核 (SDN-POA, 文献) や境界条床核主部 (BNSTp, 文献) は雌に比べ雄で有意に大きい神経核であるが、雄に指向性のある雄ヒツジの SDN-POA が雌並みに小さいことが知られている (文献)。ヒトでも相同の神経核が存在し (文献)、性別違和の男性は女性並みに小さかったという報告がある (文献)。また BNSTp でも同様の知見が得られており (文献)、これら性差の存在する神経核が性別違和の責任部位であることが想定されているが、その詳細はほとんど分かっていない。

(3) SDN-POA 及び BNSTp の性分化機構

ラット SDN-POA や BNSTp の性差形成機構では、出生前後の critical period におけるステロイドホルモン環境が重要で、性ホルモンが影響しなければ雌型になるが、雄胎仔精巣から一過性に分泌されるテストステロンがアロマターゼによる芳香化でエストロゲンに変換され、 α 型エストロゲン受容体 (ER α) を介して作用すると雄性化を引き起こすことが示されていた (文献) (BNSTp はテストステロンの直接作用もある)。しかし、ER α 以降の性差形成機構についてはよく分かっていないのが現状で、当初ホルモンによる細胞死制御が重要であるとされていたが、それだけでは説明がつかず、神経新生や細胞移動などの影響が想定されている。

(4) SDN-POA 及び BNSTp の可視化

我々は ER α 遺伝子プロモーター 0/B トランスジェニックラット (ER-GFP ラット) を作出することで、SDN-POA 及び BNSTp を緑色蛍光タンパク (GFP) により、特異的に可視化することに成功している (文献)。すなわち、GFP 蛍光を指標とすることで、生きた状態の SDN-POA 及び BNSTp ニューロンを、細胞レベルで特定することが可能となり、それぞれを 0/B-SDN、0/B-BNST と定義した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心の性を司ると考えられている SDN-POA および BNSTp の形成過程に着目し、両神経核が GFP で特異的に標識

された ER-GFP ラットを活用することで、両神経核形成過程を *in vitro* で可視化し、性分化機構を解明することにある。そして、エストロゲンによる神経細胞移動が性分化機構の本体であるという作業仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) 動物

ER α 遺伝子プロモーター 0/B の下流に EGFP 遺伝子をつなげた導入遺伝子を用いて作出した ER-GFP ラットを供試した。ER-GFP ラットでは GFP 発現が SDN-POA や BNSTp に特異的に観察される。

(2) スライス培養とタイムラプス記録

胎生 18 日齢の ER-GFP ラットを用い、Millicell insert を活用した脳スライス界面培養を行った。脳スライスはメンブレン上で培養され、上から酸素供給、下の培養液から栄養素の供給を受ける。スライス培養は、構造的、機能的に *in vivo* の状態をよく反映し、*in vitro* で観察することができる方法である。

観察は 1 時間ごとに脳スライスの写真撮影を行うタイムラプス記録で行い、形成された神経核のサイズ計測及び個々の細胞の挙動をトレースした。観察や撮影にはオールインワン顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) を用い、計測やトレースは付属の解析ソフト (キーエンス) を用いた。

(3) ホルモンや各種阻害薬の影響

培養液中にエストロゲン (1 nM)、テストステロン (1 nM)、デヒドロテストステロン (1 nM) を添加し、神経核形成過程に与える影響を観察した。また、ER α 阻害薬 (ICI 182,780, 20 μ M) を培養液中に添加し、エストロゲンの作用が ER α を介するものかどうかを検討した。さらに、ER α の下流で機能する候補分子の一つである Rac1 (文献) の阻害 (NSC23766) を行うことで、エストロゲンの雄性化作用に与える影響を観察した。

4. 研究成果

0/B-BNST はデータ数が少ないため、0/B-SDN に関する結果のみを以下に示す。

(1) 脳スライス培養切片的 0/B-SDN におけるホルモンによる性差形成

in vitro で形成された 0/B-SDN のサイズに対する各種ホルモンと ER α 阻害薬の影響を図 1 に示した。前額断脳スライスを左右にわけて培養し、一方は対照群、もう一方は投与群とし、培養開始 200 時間後の 0/B-SDN のサイズを計測した。ホルモンや阻害薬の投与は、培養開始時から行った。エストロゲン投与により、対照群と比較して有意に大きい

0/B-SDN が形成され、その雄性化作用は ER α を阻害することで観察されなくなった。芳香化可能なテストステロンはエストロゲン同様、0/B-SDN の雄性化を引き起こしたが、芳香化されない男性ホルモンであるデヒドロテ

ストステロンは対照群と同じサイズの0/B-SDNが形成された。

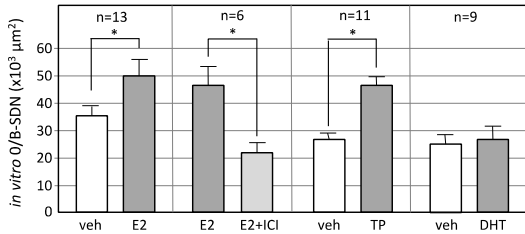


図1 in vitroにおける0/B-SDNの雄性化
前額断脳スライスを左右にわけて培養し、一方は対照群、他方は投与群として20時間後の0/B-SDNのサイズを計測。エストロゲン(E2)、テストステロン(TP)では0/B-SDNのサイズが優位に大きくなったが、芳香化されないテストステロン(DHT)では大きくならなかった。またERα阻害薬(ICI)はエストロゲンの雄性化作用を阻害した。

また、in vitroで形成された0/B-SDNはin vivo同様、SDNのマーカーとして知られているカルピンディンを免疫組織学的に発現していた。これらの結果は、in vitroにおける0/B-SDN形成が、in vivoの状態をよく反映し、研究モデルとして活用できることを示唆している。

(2) in vitro 0/B-SDN形成過程におけるサイズの変化

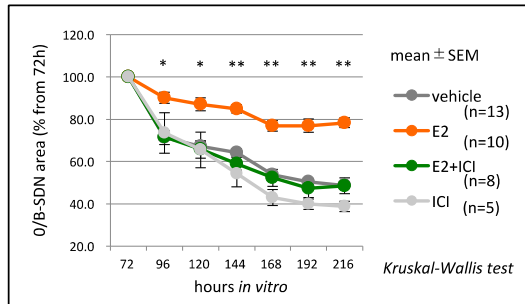


図2 in vitroにおける0/B-SDN形成の経時的変化
培養開始72時間の0/B-SDNのサイズを100%とした時の24時間毎のサイズ変化

図2は培養開始72時間の0/B-SDNサイズを基準として、その後の24時間毎のサイズ変化を216時間まで示したものである。エストロゲンや阻害薬は培養開始72時間から培養液に添加した。培養開始時にはGFPでラベルされた細胞集団は観察されないが、72時間後には0/B-SDNの概形が形成されるため、72時間のサイズを100%とした。いずれの場合もサイズが減少傾向にあるが、対照群ではその減少率が半分程度になるのに対し、エストロゲン存在下では80%程度にとどまった。また、エストロゲン存在下でも、ER阻害により、対照群と同等の減少率になった。エストロゲンのサイズを維持する作用は、エストロゲンを作用させた24時間以内に観察され、216時間まで維持された。

(3) 0/B-SDN形成過程における個々の細胞の挙動

培養開始当初、ほとんど観察されないGFP発現細胞が、時間経過に伴って観察されてくる。0/B-SDN形成部位でGFP蛍光を発現する細胞もあるが、多くは様々な方向からその部位に集まって来た(図3A, C)。この傾向は培養液中のエストロゲン有無に関わらず同様であった。このGFP細胞の移動を第1段階の移動(aggregation)とした。

この神経核の概形は培養開始60-72時間で形成されるが、その後、神経核内でGFP細胞

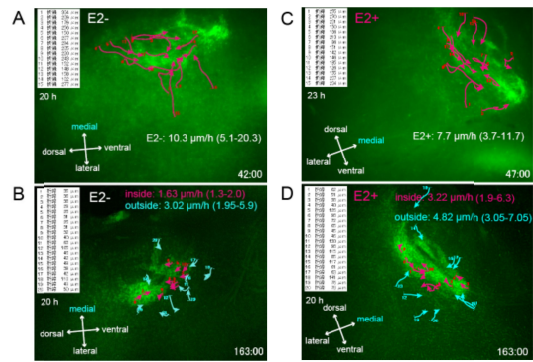


図3 0/B-SDN形成過程における2段階細胞移動

A, Bはエストロゲン非存在下、C, Dはエストロゲン存在下における個々の細胞の移動様式。培養開始23時間から20時間の細胞移動(A, C)はエストロゲンの有無に関わらず、様々な方向からSDN領域に細胞が移動していた。一方でSDNの概形が観察される培養開始144時間から20時間の細胞移動(B, D)では、SDN内での移動方向が異なり、エストロゲンが存在すると細胞は外側へ移動し、存在しないと内側に向かって移動する傾向が見られた。

が移動し続けていることが観察された(図3B, D)。この第2段階の移動は培養液中のエストロゲンの有無で方向性が異なり、エストロゲンが存在しないと神経核の中心部位に向かって移動(gathering)するのに対し、エストロゲンが存在すると外側に向かって移動(scattering)することが、個々の細胞の挙動を数値化することによって明らかとなった(図4)。この第2段階の移動方向の違いが、雌で小さく、雄で大きい神経核形成に寄与することが示唆された。

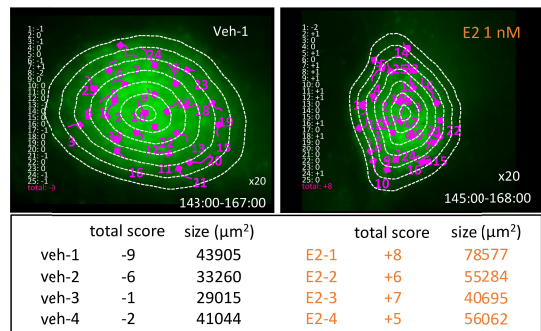


図4 0/B-SDN形成過程における第2段階の細胞移動方向
培養開始7日目におけるSDNニューロンの細胞移動。上段左が対照群、右がエストロゲン投与群。外形を元にSDNを7分割し、それぞれのエリアから外側へつ移動すると+1、内側へつ移動すると-1とし、25個のニューロンの移動を数値化し、合計したところ、対照群はマイナスに、エストロゲン投与群はプラスになった。

(4) エストロゲンの細胞移動制御に関する細胞内メカニズム

SDN-POAの性差形成機構にはERの下流としてRac1/cofilin/actinという細胞内機構が候補として示唆されている(文献)ため、培養液中にRac1阻害薬を添加し、0/B-SDN形成過程への影響を観察した。阻害薬単独では対照群と変化ないが、エストロゲンと阻害薬同時投与では、エストロゲンの雄性化作用を阻害する結果となった(図5)。これらにより、エストロゲンのSDN-POA雄性化作用は、ERの下流にRac1を介する細胞内機構があ

り、cofilinやactin制御に影響することで細胞移動を制御していることが示唆された。

以上をまとめると、脳スライス培養とタイムラプス記録により、in vitro における

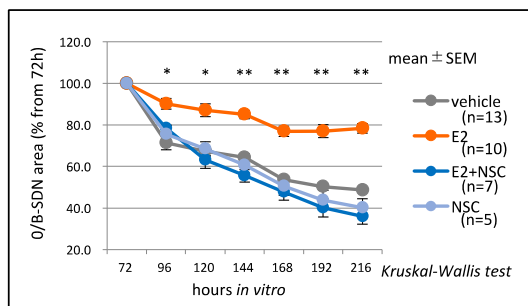


図5 O/B-SDN雄性化に対するRac1カスケードの関わり培養開始72時間のO/B-SDNのサイズを100%とした時の24時間毎のサイズ変化。エストロゲンの雄性化作用はRac1阻害薬(NSC)によって阻害された。

O/B-SDN 形成過程を可視化することに成功した。この系を活用することで、O/B-SDN 雄性化には、一旦概形ができた O/B-SDN 内の第2段階の細胞移動が重要であり、エストロゲンの作用は細胞移動の方向性を外側に向けることで細胞を分散させ、SDN-POAのサイズを大きくしていることが示唆された。また、この細胞移動制御にはエストロゲン-ER α -Rac1/cofilin/actin というカスケードが関与していることが示唆された。

<引用文献>

Gorski RA et al, Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain, **Brain Res**, 148:333-346, 1978

del Abril A et al, The bed nucleus of the stria terminalis in the rat: regional sex differences controlled by gonadal steroids early after birth, **Brain Res**, 429:295-300, 1987

Roselli CE et al, The volume of a sexually dimorphic nucleus in the ovine medial preoptic area/anterior hypothalamus varies with sexual partner preference, **Endocrinology**, 145:478-483, 2004

Swaab DF & Fliers E, A sexually dimorphic nucleus in the human brain, **Science**, 228:1112-1115, 1985

LeVay S, A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men, **Science**, 253:1034-1037, 1991

Swaab DF & Hofman MA, Sexual differentiation of the human hypothalamus in relation to gender and sexual orientation, **Trends Neurosci**, 18:264-270, 1995

Zhou JN et al, A sex difference in the human brain and its relation to transsexuality, **Nature**, 778:68-70, 1995

Kruijver FP et al, Male-to-female

transsexuals have female neuron numbers in a limbic nucleus, **J Clin Endocrinol Metab**, 85:2034-2037, 2000

Arnold AP & Gorski RA, Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system, **Annu Rev Neurosci**, 7:413-442, 1984

Hamada T & Sakuma Y, Estrogen receptor gene promoter O/B usage in the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, **Endocrinology**, 151:1923-1928, 2010

Wada-Kiyama Y et al, Estrogen-induced cell signaling in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area: Potential involvement of cofilin in actin dynamics for cell migration, **BBRC**, 434:287-292, 2013

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{雑誌論文}(計1件)

Wada-Kiyama Y, Suzuki C, Hamada T, Rai D, Kiyama R, Kaneda M, Sakuma Y. Estrogen-induced cell signaling in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area: Potential involvement of cofilin in actin dynamics for cell migration. **BBRC** (査読有) Vol.434, 2013, pp.287-292, 10.1016/j.bbrc.2013.02.117.

{学会発表}(計3件)

濱田知宏、佐久間康夫、「ラット視索前野性的二型核はエストロゲンの細胞分散作用により雄性化する」**第39回日本神経科学大会**、2016年7月20日-22日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

濱田知宏、佐久間康夫、「エストロゲンの細胞分散作用による視索前野性的二型核の雄性化」**第93回日本生理学会大会**、2016年3月22日-24日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

濱田知宏、佐久間康夫「視索前野性的二型核の性分化機構ではエストロゲンによる細胞移動制御が重要である」**第37回日本神経科学大会**、2014年9月11日-13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

{図書}(計1件)

Tomohiro Hamada, Yasuo Sakuma, Narosa Publishing House, **Adaptation Biology and Medicine**: Volume 8: Current Trends, 2017, 480

{その他}

ホームページ等

<http://tlo.nms.ac.jp/researcher/1790.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 知宏 (HAMADA, Tomohiro)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90312058

(2)研究分担者

塚原 伸治 (TSUKAHARA, Shinji)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：90318824

佐久間 康夫 (SAKUMA, Yasuo)

東京医療学院大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70094307