

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14556

研究課題名(和文)性的二型核に着目した脳への系統進化的アプローチ

研究課題名(英文) Approach of phylogenetic evolution to brain with focusing on sexually dimorphic nucleus

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：形態学的な性差がみとめられる神経核は性的二型核と呼ばれ、様々な動物の脳に存在する。しかし、性的二型核の種差や類似性に関する研究知見は乏しい。本研究ではマウス、スンクス、コモンマーモセットおよびウズラの脳を調べて、性的二型核を比較した。解析の結果、哺乳類に属するマウス、スンクスおよびコモンマーモセットの性的二型核には種差もあったが、多くの類似点が見出された。一方、鳥類のウズラと他の動物の間には明確な種差がみとめられた。

研究成果の概要(英文)：Nuclei exhibiting morphological sex differences are termed sexually dimorphic nuclei (SDNs). The SDNs have been identified in the brain of several animal species, although the difference and similarity in the SDNs among animal species are poorly understood. In the current study, we examined the brain of mice, musk shrews, common marmosets, and quails to compare the SDNs among the animal species. There were species differences in the SDNs among mice, musk shrews, and common marmosets. However, many similarities of the SDNs were found among them. When compared quails to mice, musk shrews, and common marmosets, striking differences were found between the avian model and the mammalian models.

研究分野：行動神経内分泌学

キーワード：性的二型核 種差 カルピンディン 性差

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物には雌雄という二つの性別があり、外見と内部器官は互いに異なる部分がある。脳は、肉眼的には性差が殆ど見られない器官であるが、顕微鏡レベルの組織構造には明瞭な性差が見られ、様々な生理現象の性差を引き起こす。1970年代に世界で初めて性差がみられる神経核(性的二型核)がラットの視索前野で発見されて以来、ヒトを含めた様々な動物種において性的二型核が見つけれられてきた。研究代表者は、げっ歯類を用いて、性的二型核の形成機構を明らかにするための研究に取り組んできた。しかし、脳の性分化に関する研究には、今も尚、未解決な問題が山積している。例えば、脳の性差がどのようなメカニズムによって生じるのか? 既知の性的二型核の他に未知のものが在るのか? 脳の性差には種間を超えた普遍性はあるのか? それとも種差があるのか? 種差があるとすれば、その法則性は存在するのか? 脳の性差を理解する上で、これらは解明すべき重要な問題である。

2. 研究の目的

小型実験動物として汎用されるマウスの脳には、カルシウム結合タンパク質の一つであるカルビンディンを発現するニューロンによって構築される性的二型核が二つ存在する(図1)。一つは分界条床核の亜核である分界条床核主核(BNSTp)であり、もう一つは視索前野に存在し、カルビンディンの性的二型核(CALB-SDN)と呼ばれる。BNSTp

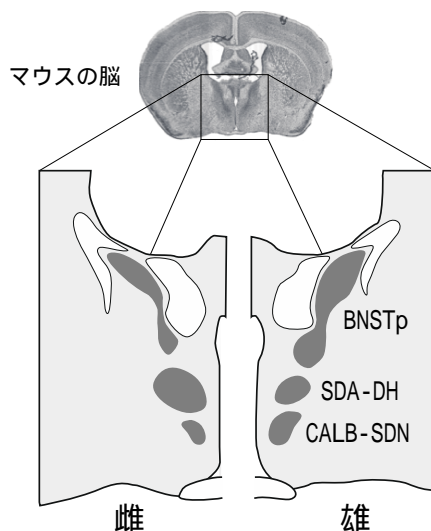


図1. 性的二型核の性差と位置関係

と CALB-SDN はともに雄優位な性差がみとめられ、カルビンディンニューロンの数と神経核の大きさが雄マウスにおいて雌マウスよりも多い。最近、研究代表者は、BNSTp と CALB-SDN の間に位置する背側視床下部に形態学的性差を示す新たな領域を発見した(図1)。この領域に含まれるニューロンの

数とエストロゲン受容体の発現量には雌優位な性差がみとめられた。我々は、雄優位な性的二型核である BNSTp と CALB-SDN に挟まれ、雌優位な性差を示した領域を“背側視床下部の性的二型領域(sexually dimorphic area of the dorsal hypothalamus: SDA-DH)”と命名した。

本研究では、マウスの脳に存在する BNSTp、CALB-SDN および SDA-DH が他の動物種にも存在するのか否か明らかにし、性的二型核の種差や種間を超えた普遍性について考察することを目的にした。

3. 研究の方法

(1) 実験に使用した動物

本研究では、マウス、スunks、コモンマーマセットおよびウズラの成熟した雌雄個体を用いた。

(2) 性的二型核の組織学的解析

マウス、スunks、コモンマーマセットに麻酔を施し、左心室より灌流した4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液により固定処置を行った。その後、灌流固定した動物から脳を摘出した。深麻酔したウズラから採取した脳を4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液にて浸漬し、固定処置を行った。次に、凍結ミクロトームを用いて、凍結した脳から前額断凍結脳切片を作製した。

カルビンディンはマウスの BNSTp および CALB-SDN のマーカータンパク質である。さらに、マウスの SDA-DH は BNSTp と CALB-SDN に挟まれ、カルビンディンニューロンの分布により SDA-DH を同定することが可能である。本研究では、抗カルビンディン抗体を用いて、マウス、スunks、コモンマーマセットおよびウズラの脳切片に免疫染色を施した。対比染色として、免疫染色を行った脳切片にメチルグリーン染色あるいはニッスル染色を施した。また、スunksとウズラの脳切片の一部にはニッスル染色を施した。組織標本を光学顕微鏡下で観察し、前脳におけるカルビンディンニューロンおよびニッスル染色ニューロンの分布を調べた。さらに、カルビンディン免疫陽性細胞あるいはニッスル染色ニューロンが密集する領域の体積と細胞数を計測し、各動物種において雌雄で比較した。

複数の動物種におけるカルビンディンの脳内分布を調べることから、免疫染色に使用する抗カルビンディン抗体が解析対象にする動物種のカルビンディンタンパク質を認識するかどうか検討する必要があった。多くの動物種において、小脳のプルキンエ細胞はカルビンディンを発現することが知られている。マウス、スunks、マーマセットおよびウズラの小脳より作製した脳切片にカルビンディンの免疫染色を行った。その結果、全ての動物種の小脳プルキンエ細胞にカルビンディン免疫陽性反応が観察された(図2)。さらに、マウス、スunksおよびウズラの小

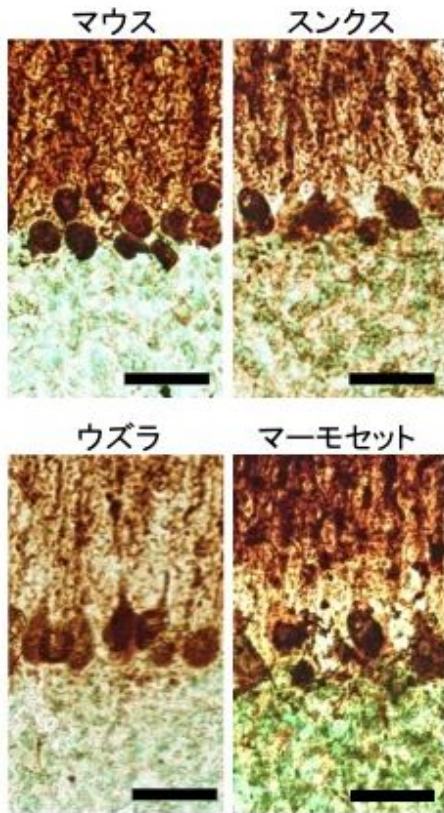


図2. カルビンディンを発現する小脳プルキンエ細胞
スケールバー: 50 ミクロン.

脳組織を用いてカルビンディンのウェスタンブロットを実施した。その結果、カルビンディンの分子量 (28kDa) に相当するタンパク質が抗カルビンジン抗体で検出された (図3)。以上の結果から、本研究で使用した抗カルビンジン抗体はマウス、スunks、コモンマーモセットおよびウズラのカルビンジンタンパク質を検出することが示された。

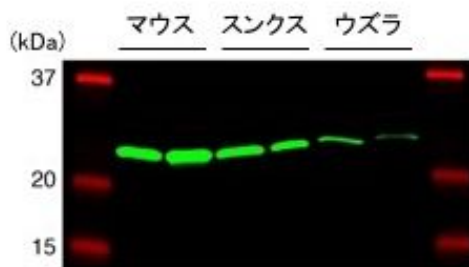


図3. 抗カルビンジン抗体で検出された小脳組織のタンパク質

4. 研究成果

(1) マウスの解析

マウスの視索前野と分界条床核にはカルビンジン免疫陽性細胞が密集する CALB-SDN と BNSTp が確認された (図4)。雌

雄で比較すると、CALB-SDN と BNSTp のカルビンジン免疫陽性細胞数と体積は雄マウスにおいて雌マウスよりも有意に多かった。

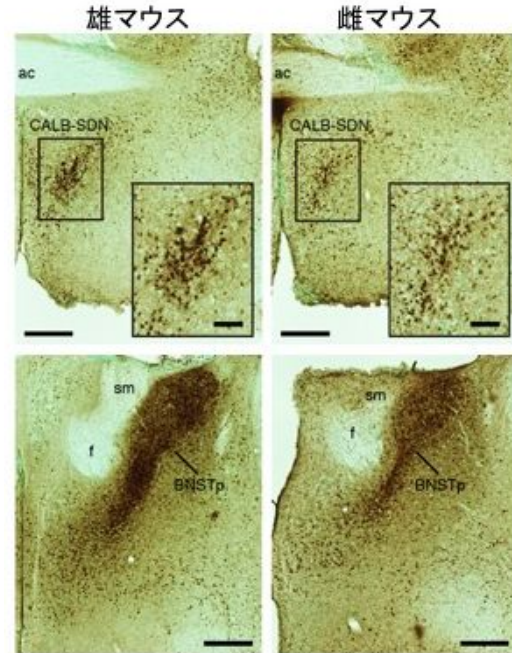


図4. マウスの CALB-SDN(上段)と BNSTp(下段)

ac: 前交連; f: 脳弓; sm: 視床髄条. スケールバー: 300 ミクロン (挿入図 100 ミクロン).

(2) スunksの解析

スunksの視索前野にはカルビンジン免疫陽性細胞の集団が観察された (図5)。この集団に含まれるカルビンジン免疫陽性細胞数と体積は、雄スunksにおいて雌スunksよりも有意に多かった。このことから、スunksにはマウスと同様に CALB-SDN が存在することが明らかになった。

しかし、スunksの分界条床核にはカルビンジン免疫陽性細胞が少なかった (図5)。一方、スunksの視床紐傍核には多数のカルビンジン陽性細胞が観察され、その数は雄スunksにおいて雌スunksよりも有意に多かった。このことは、スunksの視床紐傍核が雄優位な性的二型核であることを示唆する。マウスの視床紐傍核にはカルビンジン免疫陽性細胞が観察されないことから (図4)、視床紐傍核にはカルビンジンの発現に種差があることが明らかになった。

ニッスル染色したスunksの分界条床核を観察した結果、分界条床核には雄優位な性差がみとめられる亜核が存在することが分かった (図6)。この亜核に含まれるニッスル染色ニューロンの数および体積は雄スunksにおいて雌スunksよりも有意に多かった。

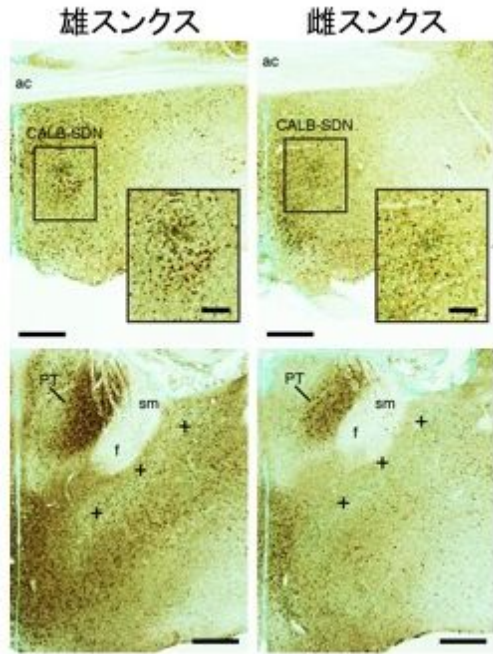


図5. スンクスの CALB-SDN (上段) と視床紐傍核 (下段)
ac: 前交連; f: 脳弓; PT: 視床紐傍核; sm: 視床髄条. スケールバー: 300 ミクロン (挿入図 100 ミクロン). + は BNSTp の位置を示す.

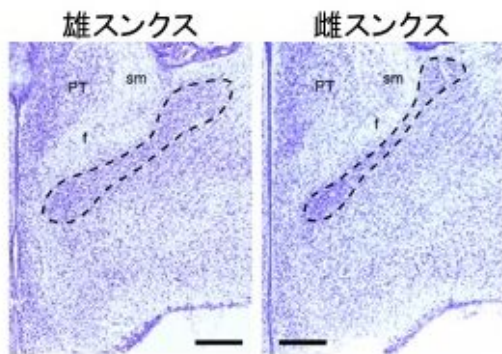


図6. スンクスの BNSTp (破線で囲まれた領域)
f: 脳弓; PT: 視床紐傍核; sm: 視床髄条. スケールバー: 300 ミクロン.

以上の結果から、スンクスとマウスの間には分界条床核のカルビンディン発現に違いが見られたが、どちらの動物種でも分界条床核には形態学的に雄優位な性差がみられる亜核が存在することが明らかになった。

(3) コモンマーモセットの解析

コモンマーモセットの視索前野にはカルビンディン免疫陽性細胞の集団が観察された(図7)。雄マーモセットではカルビンディン免疫陽性細胞が分布する領域が広く、雌

マーモセットではより狭い領域にカルビンディン免疫陽性細胞が密集していた。

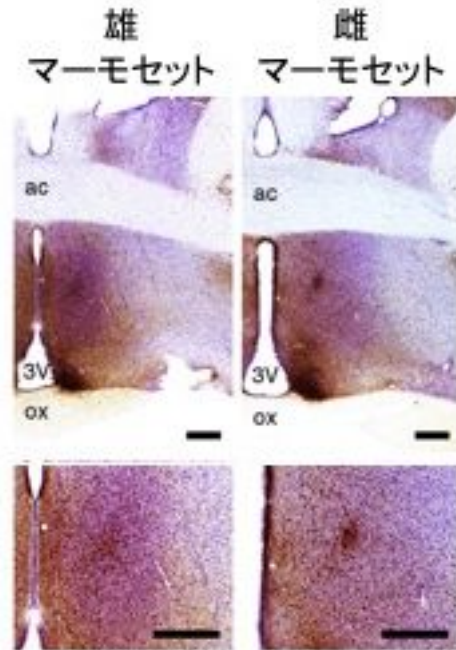


図7. コモンマーモセットの CALB-SDN
ac: 前交連; ox: 視交叉; 3V: 第三脳室. スケールバー: 500 ミクロン.

分界条床核にもカルビンディン免疫陽性細胞の集団が観察された(図8)。分界条床核に観察されたカルビンディン免疫陽性細胞は非常に多く、雄マーモセットにおける分布領域は雌マーモセットのそれよりも広がっていた。以上のように、コモンマーモセットの視索前野と分界条床核には、マウスの CALB-SDN と BNSTp に相同する神経核が存在することが示唆された。

マーモセットでは、マウスやスンクスでは観察されなかったカルビンディン免疫陽性細胞の集団が2つ確認された。一つは、雌雄マーモセットの脳室周囲視床下部に観察された(図8)。もう一つは、雌マーモセットの内側視床下部に観察された(図8)。CALB-SDN、BNSTp、脳室周囲視床下部と内側視床下部にあるカルビンディン免疫陽性細胞集団に囲まれた背側視床下部にはカルビンディン免疫陽性細胞が少なく、相対的にニッスル染色ニューロンが多く分布していた(図8)。この領域は雌マーモセットにおいて雄マーモセットよりも広がっており、雌優位な性的二型領域であるマウスの SDA-DH に相同する領域であると考えられた。

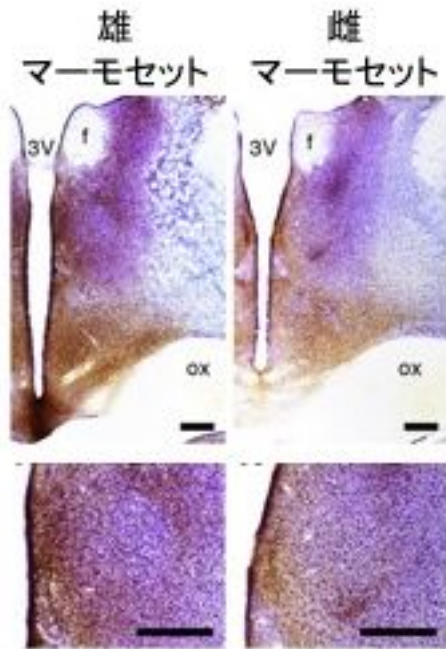


図8. コモンマーモセットの BNSTp (上段) と SDA-DH、脳室周囲視床下部と内側視床下部のカルビンディン免疫陽性細胞の集団 (下段)
f: 脳弓; ox: 視交叉; 3V: 第三脳室. スケールバー: 500 ミクロン.

(4) ウズラの解析

ウズラの小脳では、殆どのプルキンエ細胞がカルビンディンを強く発現していたが(図2) 視索前野と分界条床核に存在するカルビンディン免疫陽性細胞は僅かであり、細胞が密集する様子は観察されなかった(図9)。

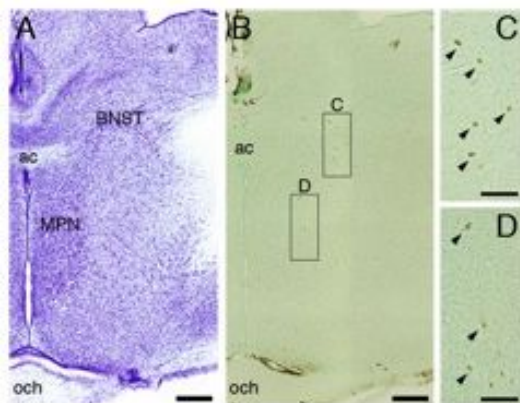


図9. ウズラの内側視索前野 (MPN) と分界条床核 (BNST) のカルビンディン免疫陽性細胞
(A) ニッスル染色像、(B) カルビンディン免疫染色像、(CとD)パネルB中の拡大写真.
ac: 前交連; och: 視交叉. スケールバー: 300 ミクロン (パネルAとB)、100 ミクロン (パネルCとD).

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13件)

Aung, KH., Kyi-Tha-Thu, C., Sano, K., Nakamura, K., Tanoue, A., Nohara, K., Kakeyama, M., Tohyama, C., Tsukahara, S., Maekawa, F. Prenatal Exposure to Arsenic Impairs Behavioral Flexibility and Cortical Structure in Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10, 137. DOI: 10.3389/fnins.2016.00137 (査読あり)

Htike, NT., Maekawa, F., Soutome, H., Sano, K., Maejima, S., Aung, KH., Tokuda, M., Tsukahara, S. Arsenic exposure induces unscheduled mitotic S phase entry coupled with cell death in mouse cortical astrocytes. *Frontiers in Neuroscience*, 2016, 10, 297. DOI: 10.3389/fnins.2016.00297 (査読あり)

Moe, Y., Tanaka, T., Morishita, M., Ohata, R., Nakahara, C., Kawashima, T., Maekawa, F., Sakata, I., Sakai, T., Tsukahara, S. A comparative study of sex difference in calbindin neurons among mice, musk shrews, and Japanese quails. *Neuroscience Letters*, 2016, 631, 63-69. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.08.018 (査読あり)

Moe, Y., Kyi-Tha-Thu, C., Tanaka, T., Ito, H., Yahashi, S., Matsuda, KI., Kawata, M., Katsuura, G., Iwashige, F., Sakata, I., Akune, A., Inui, A., Sakai, T., Ogawa, S., Tsukahara, S. A sexually dimorphic area of the dorsal hypothalamus in mice and common marmosets. *Endocrinology*, 2016, 157, 12, 4817-4828. DOI: 10.1210/en.2016-1428 (査読あり)

Kyi-Tha-Thu, C., Okoshi, K., Ito, H., Matsuda, KI., Kawata, M., Tsukahara, S. Sex differences in cells expressing green fluorescent protein under the control of the estrogen receptor-promoter in the hypothalamus of mice. *Neuroscience Research*, 2015, 101: 44-52. DOI: 10.1016/j.neures.2015.07.006 (査読あり)

Maejima, S., Ohishi, N., Yamaguchi, S., Tsukahara, S. A neural connection between the central part of the medial

preoptic nucleus and the bed nucleus of the stria terminalis to regulate sexual behavior in male rats. *Neuroscience Letters*, 2015, 606: 66-71. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.08.047 (査読有り)

Aung, KH., Tsukahara, S., Maekawa, F., Nohara, K., Nakamura, K., Tanoue, A. Role of Environmental Chemical Insult in Neuronal Cell Death and Cytoskeleton Damage. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2015, 38, 8, 1109-1112. DOI: 10.1248/bpb.b14-00890 (査読有り)

[学会発表](計 34 件)

塚原伸治, 哺乳類における性的二型核の比較と性差形成機構、第 46 回ホミニゼーション研究会、2017 年 3 月 24 日、京都大学霊長類研究所、愛知県犬山市

塚原伸治, 脳の性差を構築する性ホルモンの作用機構、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Tsukahara S. Sex and species differences in brain structure. Mini-Symposium: Application of Recent Advances in Neuroscience to Environmental Health Research, 2016 年 11 月 22 日、国立環境研究所、茨城県つくば市

Tsukahara S. Difference and homology of sexually dimorphic brain structures among quails, mice, musk shrews, and common marmosets. Joint Events of 22nd International Congress of Zoology and 87th Meeting of Zoological Society of Japan, 2016 年 11 月 17 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市

Tsukahara S. Gonadal steroid action on sex-specific formation of the brain. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016 年 7 月 21 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Tsukahara, S., Kanaya, M. Region-specific actions of sex steroids on the formation of morphological sex difference in the brain. 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2016 年 3 月 22 日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

塚原伸治, 脳の性差：新たに見つかった視床下部の性的二型領域、第 42 回日本神経内分泌学・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会、2015 年 9 月 19 日、戦災復興記念館、宮城県仙台市

[図書](計 2 件)

北口哲也、塚原伸治、坪井貴司、前川文彦、化学同人、*みんなの生命科学*、2016、213 (78-86, 104-111, 147-159, 170-171)

塚原伸治 他、裳華房、*ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ IV：求愛・性行動と脳の性分化*、2016、130 (70-93)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

前川 文彦 (MAEKAWA, Fumihiko)
国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
研究者番号：40382866