

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500396

研究課題名(和文) 脳の性分化過程におけるエピジェネティック機構間相互作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of Interaction among Epigenetic Mechanisms during Sexual Differentiation of Brain

研究代表者

松田 賢一 (MATSUDA, Ken Ichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40315932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳の性差は出生前後に精巣由来のアンドロゲンの作用を受けるか否かで恒久的に構築されるが、このアンドロゲンの効果を成体まで維持する分子機構は不明であった。研究代表者は、従来の研究で、ヒストンアセチル化とDNAメチル化のエピジェネティック制御が、この機構の本体であることを示してきた。本研究では、脳の性分化過程において、異なるエピジェネティック機構がどのように相互作用することで、脳の性分化が成し遂げられるのが解明を行った。その結果、特に脳の性分化初期制御過程においてヒストンアセチル化、ヒストン脱アセチル化、DNAのメチル化といったエピジェネティックス機構間に上下関係が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sexual differentiation of the brain can be considered as a process during which effects of sex steroid hormones during development are maintained into adulthood. Epigenetic regulation is emerging as an important mechanism of lasting effects of the hormonal milieu in the developing brain. Evidence has accumulated that epigenetic regulation is involved in sexual differentiation of the brain. Epigenetic regulation occurs via different mechanisms, and interactions between histone modifications and DNA methylation have been suggested. There may be some synergistic and/or hierarchical interactions among the epigenetic modifications that control sexual differentiation of the brain. In this research, it was examined whether interactions among different epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain, and founded that the hierarchical order among epigenetics mechanisms (i.e., histone acetylation-deacetylation, and then DNA methylation) existed in its early process.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：脳の性差 性分化 エストロゲン アンドロゲン エピジェネティックス ヒストンアセチル化 ヒストン脱アセチル化 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

近年、脳の性差に関する問題についての議論が活発に行われており、社会的注目度も高い。これらの問題を解決するためには、まず、脳の性差が形成・維持されるメカニズムについて理解することが必要であるが、詳細は不明である。

脳の性差は脳形成過程の限られた時期(臨界期; ラットでは出生前後に存在)に精巣から一過的に分泌されるアンドロゲン(これをアンドロゲンサージと呼ぶ)の作用を受けるか否かで恒久的に構築される。性差のみられる脳機能制御に関わる領域は、アンドロゲンサージの有無により、雄型に分化するか、雌型に分化するかの運命を定め、臨界期後の性ホルモンの分泌が低値の間もその運命に従って発達する。このことは、脳の性分化とはアンドロゲンサージの作用を成体まで維持する刷り込みの過程であることを示しているが、この分子メカニズムは明らかになっておらず、当該研究分野において最も根本的かつ重大な課題であった。

研究代表者は、アンドロゲンサージにともないクロマチンにヒストンアセチル化や DNA メチル化といったエピジェネティックな変化がひきおこされることが、脳の性の恒久的決定の本体であると仮説を立てた。

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列を変えずに、クロマチンの化学的・物理的な性質の変化を介して遺伝子の転写を制御する機構を呼ぶ。例えば、ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)によるヒストンアセチル化は、ヌクレオソームを緩め転写因子のアクセスを容易にすることで、遺伝子の転写を活性化させる。逆に、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)はアセチル化ヒストンからアセチル基を取り除き、転写の抑制を導く。一方、一般に、遺伝子プロモーター領域での DNA メチル化の程度は転写レベルに逆相関する。すなわち、高度にメチル化された遺伝子は発現が抑制され

ており、活性の高い遺伝子ではメチル化の程度が低い。

エストロゲン受容体(ER)は、性差のみられる脳機能の制御に必須の遺伝子であり、その発現は、発達期から成体まで、雄に比べ雌の方が高い。したがって、ER 遺伝子のプロモーターが、アンドロゲンサージによりエピジェネティックな変化を受け、その結果、発現量の性差が長期にわたって維持されることが、脳の性分化において極めて重要な働きを担っていると推察される。

研究代表者は、従来の研究で、若手研究(B)平成 20~21 年度の助成のもと、この仮説の証明を行った。

ヒストン脱アセチル化の脳の性分化への関与

雄の性行動制御中枢における ER プロモーターのヒストンアセチル化状態に性差が検出された。HDAC 阻害薬を新生雄脳室内に投与し、同酵素を阻害したところ、成熟後の雄性性行動の発現が抑制された。以上、出生前後の脱アセチル化酵素によるヒストンアセチル化状態の性差制御が脳の性分化に重要な働きを果たしていることが明らかになった。

DNA メチル化の脳の性分化への関与

胎児期の性ホルモンの量の違いによって、成体になってからの性行動・攻撃行動に差が生じることが知られている。この理由を明らかにするために、成体雌ラットの雌の性行動制御中枢の ER の発現を調べたところ、性ホルモン量が多い群の方が有意に高く、同遺伝子プロモーターの DNA メチル化の程度は発現量と逆相関したことから、性ホルモン量の違いによる行動の差は、ER 遺伝子プロモーターのメチル化状態の違いに起因することが示された。

2. 研究の目的

上記に示したような脳の性分化におけるエピジェネティック機構の関与は、各エピジ

エネティック機構が個別に作用しているとは考えにくく、それぞれが相互に作用しあっているものと考えられる。本研究では、脳の性分化過程の出生前後から成熟後までの時間軸の中で、ヒストンアセチル化と DNA メチル化といった、異なるエピジェネティック機構がどのように相互作用することで、脳の性分化が成し遂げられるのかの解明を試みた。

具体的には、

アンドロゲンサージ期に HAT を、あるいは、新生期に HDAC を阻害した場合、発達期以降の ER の発現、同遺伝子プロモーターの DNA メチル化状態に変化が生じるか解析する。また、成熟期の性行動発現に影響を与えるかを検討する。

3. 研究の方法

胎生 19 日齢 - 出生 0 日齢 (アンドロゲンサージ期) のラット胎児にヒストンアセチル基転移酵素の阻害薬 (C646) を、出生 0 日齢 - 1 日齢にヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬 (TSA) を脳室内投与し、発達期以降の ER の発現およびプロモーターの DNA メチル化と、成熟後の雄性性行動に与える影響を解析する。

4. 研究成果

平成 23 - 24 年度に、胎児期から成体までの性分化の時間経過の中において脳の性差に関わる領域 (内側視索前野, MPO) で脳の性分化に必須のエストロゲン受容体遺伝子のエピジェネティック修飾のプロファイルを解析し、ヒストンアセチル化が DNA メチル化修飾に先んじて起きることを明らかにした。ヒストン脱アセチル化酵素を阻害した場合、このエピジェネティック修飾プロファイルに変化が起きるか明らかにするために、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬 (TSA) を生後に脳室内投与した個体から成体期に MPO を回収し、クロマチン免疫沈降

法を用いてヒストンアセチル化の程度を、バイサルファイトマッピング法で DNA メチル化の程度を解析した。その結果、阻害薬投与によりヒストンアセチル化が上昇し、次いで DNA メチル化パターンの雄性化が阻害されることが明らかになった。平成 25 年度は、ヒストン脱アセチル化に先立っておこるヒストンアセチル化反応が脳の雄性化に関与していることをこの反応をになう酵素の阻害薬 (C646) を投与した動物を用いた行動レベルでの解析で示した。すなわち、脳の性差形成過程において、ヒストンのアセチル化、ヒストン脱アセチル化、DNA のメチル化といったエピジェネティック機構間に上下関係が存在することが示唆された。以上の成果をもとに、Conference on Integrative Behavioral Science and Sino-Japan Integrative Symposium on Behavior and its Neuro-Mechanisms、日本神経内分泌学会、日本神経科学会、日本解剖学会、日本組織細胞化学会および環境ホルモン学会で発表し、注目を集めた。特に、日本神経内分泌学会では本研究の成果が評価され、学会賞を受賞した。さらに、学術論文として神経内分泌学、神経科学および生化学領域の学術雑誌に 9 編発表した。

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 10 件)

Mori H., Matsuda K. I., Yamawaki M., Kawata M. Estrogenic regulation of histamine receptor subtype H1 expression in ventromedial nucleus of the hypothalamus in female rats. *PLoS One* 9: e96232 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0096232. 査読有
Takanami K., Sakamoto H., Matsuda K.

L., Satoh K., Tanida T., Yamada S., Inoue K., Oti T., Sakamoto T., Kawata M. Distribution of gastrin-releasing peptide in the rat trigeminal and spinal somatosensory systems. *Journal of Comparative Neurology* 522: 1858-1873 (2014) doi: 10.1002/cne.23506. 査読有

Matsuda K. I., Yanagisawa M., Sano K., Ochiai I., Musatov S., Okoshi K., Tsukahara S., Ogawa S., Kawata M. Visualization and Characterization of Oestrogen Receptor α -Positive Neurons Expressing GFP under the Control of the Oestrogen Receptor α Promoter. *European Journal of Neuroscience* 38: 2242-2249 (2013) doi: 10.1111/ejn.12227. 査読有

Hirahara Y., Matsuda K. I., Yamada H., Liu Y., Kawata M., Boggs J. M. 17β -estradiol induces rapid phosphorylation of cofilin and cytoskeletal reorganization at the membrane leading edges of cultured oligodendrocytes. *Neuroscience* 235: 187-199 (2013) doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.070. 査読有

Hirahara Y., Matsuda K. I., Yamada H., Saitou A., Morisaki K., Takanami K., Boggs J. M., Kawata M. G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Glia* 61: 420-431 (2013) doi: 10.1002/glia.22445. 査読有

Morisaki S., Ota C., Matsuda K. I., Kaku N., Fujiwara H., Oda R., Ishibashi H., Kubo T., Kawata M. Application of raman spectroscopy for visualizing biochemical changes

during peripheral nerve injury in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Optics* 18: 116011 (2013) doi: 10.1117/1.JBO.18.11.116011. 査読有

Hashimoto T., Matsuda K. I., Kawata M. Scaffold attachment factor B (SAFB)1 and SAFB2 cooperatively inhibit the intranuclear mobility and function of ER α . *Journal of Cellular Biochemistry* 113: 3039-3050 (2012) doi: 10.1002/jcb.24182. 査読有

Matsuda K. I., Mori H., Kawata M. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 13: 163-171 (2012) doi: 10.1007/s11154-012-9202-z. 査読有

Sakamoto H., Takahashi H., Matsuda K. I., Nishi M., Takanami K., Ogoshi M., Sakamoto T., Kawata M. Rapid signaling of steroid hormones in the vertebrate nervous system. *Frontiers in Bioscience* 17: 996-1019 (2012) 査読有

Matsuda K. I., Mori H., Nugent B.M., Pfaff D. W., McCarthy M. M., Kawata M. Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology* 152: 2760-2767 (2011) doi: 10.1210/en.2011-0193. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

松田賢一 . 脳の性差維持機構としてのエピジェネティックス . 第 40 回日本神経内分泌学会 (宮崎) (2013 年 10 月 26 日) (招待講演)

松田賢一 , 井上敏昭 , 森浩子 , 河田光博 .

エピジェネティクス解析の基礎と組織細胞化学への応用．第38回日本組織細胞化学講習会（2013年8月1日）（東京）（招待講演）

松田賢一，柳沢美歩，佐野一広，Sergei Musatov，大越幸太，塚原伸治，小川園子，河田光博．エストロゲン受容体陽性細胞のフィードバック応答の可視化．第36回日本神経科学大会（2013年6月20日）（京都）

松田賢一，柳沢美歩，佐野一広，Sergei Musatov，塚原伸治，小川園子，河田光博．GFPトランスジェニックマウスを用いたエストロゲン受容体陽性細胞の可視化とエストロゲンシグナル抑制の影響．第118回日本解剖学会全国学術集会（2013年3月28日）

松田賢一，柳沢美歩，佐野一広，Sergei Musatov，塚原伸治，小川園子，河田光博．ERプロモーター制御下にGFPを発現する神経細胞におけるアデノ随伴ウイルスを用いたER発現抑制．第39回日本神経内分泌学会学術集会（2012年9月28日）（北九州）

Matsuda K. I. Epigenetic influence on the development of sexual behavior. First Asia-Pacific Conference on Integrative Behavioral Science and Sino-Japan Integrative Symposium on Behavior and its Neuro-Mechanisms (Xi'an, China) (2011年7月26日)（招待講演）

松田賢一．脳の性分化におけるエピジェネティクスの関与．環境ホルモン学会講習会（東京）（2011年6月16日）（招待講演）

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat1/>
<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2014/20140512.html>
<http://www.nacos.com/jns/j/kawakami.pdf>

6．研究組織

(1)研究代表者

松田 賢一（MATSUDA, Ken Ichi）
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
准教授

研究者番号：40315932