

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590257

研究課題名(和文) 生殖腺を欠く遺伝子破壊マウスを利用した脳の性分化分子機構の研究

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanisms of brain sex differentiation of the SF-1 KO mouse

研究代表者

池田 やよい (IKEDA, YAYOI)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：00202903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳の性分化の分子機構を明らかにする目的で、SF-1ノックアウトマウスの脳の性分化を調べた。生後の各段階での脳の性分化マーカーの発現を免疫組織化学法により野生型とノックアウトで比較した。SF-1ノックアウトマウスは雌雄ともに、マーカー陽性細胞数および陽性細胞の分布パターンが野生型のメスと類似していた。この結果は、周生期の生殖腺からの性ホルモンが脳の雄化に働くという従来の仮説を支持するものであった。

研究成果の概要(英文)：To study the molecular mechanisms of brain sex differentiation, we analyzed the expression of several markers in the SF-1 knockout (KO) mice using immunohistochemistry. The localization and the positive cell number for these markers of SF-1 KO male and female mice were similar to those of WT females, indicating that the two brain regions of SF-1 KO male mice are feminized. The results support the idea that perinatal gonadal hormones are required for masculinization of the brain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳の性分化 性ホルモン ノックアウトマウス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) NR5A1(略称 SF-1、或は Ad4BP)  
申請者らは、ステロイドホルモン合成系の転写制御因子として働く核内受容体 NR5A1(略称 SF-1、或は Ad4BP) の役割について研究している。マウスでの発現解析および SF-1 遺伝子破壊マウスの研究により、SF-1 が内分泌・生殖系の発生と性分化に重要であることを示唆している。SF-1 は、生殖腺の発生と分化において、Sry の発現と性ホルモン合成に関与するが、脳の性分化とどう関わるのかは明らかでない。

#### (2) 脳の性分化

脳の性分化は、性決定因子 Sry と性ホルモンの影響を受けると考えられている。従来、脳の性分化の研究方法としてはホルモン暴露実験が行われてきたが、この方法では生殖腺の影響を除くための前処置として出生後に生殖腺除去手術を行う必要があり、胎生期の精巣からのホルモンの影響は排除できないという点に問題がある。

#### (3) 本研究の発想

そこで、生殖腺をもたない SF-1KO マウスをホルモン暴露実験に用いることにより上述の問題を克服できるという点で、本研究は脳の性分化の研究において画期的な方法であると考えられる。上述の脳の性分化機構の仮説を検証する方法として SF-1KO マウスを利用するという本研究の発想に至った。

### 2. 研究の目的

オリジナル SF-1KO マウスをホルモン補填と副腎移植によりレスキューし、(1)神経核の構造、(2)遺伝子発現、(3)アポトーシス、(4)エピジネティック変化、(5)性行動、の5点を指標として、脳の性分化を解析し、Sry 遺伝子型、性ホルモンとの関連を明らかにすることにより、脳の性分化の分子機構解明を目指す。本研究は、我々が行なっている一連の“SF-1 の役割に関する研究”において、哺乳類の“生殖腺の発生・性分化の機構”に重要な因子である SF-1 が、“脳の性分化の分子機構”にどう関わるかに着目している点に特色があり、その役割を明らかにできる、という点に意義がある。また、哺乳類の脳の性分化に関与すると考えられている2つの要素、即ち性決定遺伝子 Sry と性ホルモン、の作用について検証することにより、分子機構解明を目指す。したがって、当該分野においては、“遺伝的制御、内分泌制御の両側面から性差の分子基盤を探る研究”としての特色をもち、研究推進に貢献できる。臨床医学においては、性同一性障害は、身体、脳、心の性の不一致を症状とするものであり、社会的にも関心の高い疾病である。本研究の成果は、このような疾病の原因解明を目指す基礎研究の成果として貢献できる。

### 3. 研究の方法

本研究では、申請者らの作製したオリジナル

SF-1KO マウスを用いて、

#### (1) Sry による遺伝子型

(2) 胎児期の性ホルモンについて、脳の性分化への影響

(3) 生後思春期前の性ホルモンについて、脳の性分化への影響

という3つの条件が囊の性分化に及ぼす影響を1 神経核の構造、2 遺伝子発現、3 アポトーシス、4 エピジネティック変化、5 性行動、という5つの観点から解析を行い、脳の性分化の分子機構解明を目指す。

本研究において、SF-1KO マウスをホルモン暴露実験に利用するという研究方法は独創的で、生殖腺除去を必要とする従来の方法より優れている。

### 4. 研究成果

(1) オリジナル SF-1KO マウスの神経核の性差の解析

性ホルモンと脳の性分化に関する仮説を検証する目的で、SF-1 ノックアウトマウスの脳を調べた。生後7日、14日、21日の各生後発達段階で、脳の性差の起こる領域 POA における性分化マーカー ER、ER、progesterone receptor、kisspeptin の発現を免疫組織化学法により調べた。その結果、雌雄の SF-1 ノックアウトマウスの脳ではいずれのマーカー因子の発現も正常の雌と同様の発現パターンを示したことから、POA 領域は雌化していることが示唆された。さらに、脳の性分化の臨界期に相当する出生前後の時期に合成エストロゲン diethylstilbestrol を投与する実験を行うと、これら性分化マーカーの発現に変化が認められたが、投与時期、雌雄、脳の部位、各因子により結果が異なっていた。

(2) 出生直後の性ホルモンは脳を雄化するか？ および (3) 思春期前の性ホルモンは、脳を雌化するか？ の2点を検証するために、合成エストロゲン(DES)暴露実験を行った。

ER : 生後14日、21日に雌では雄より発現細胞の数が多いという明瞭な雌雄差が認められた。SF-1KO は雌型の発現を示したが、DES を投与すると雄型の発現を示した(図1)。

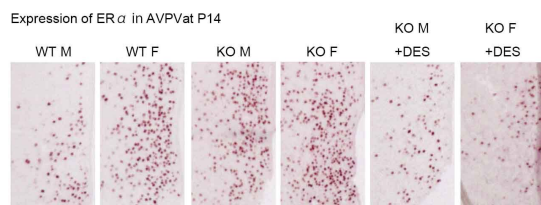


図1. 生後14日のAVPVにおけるERの発現

ER : 生後0日、7日に雄では雌より発

現細胞の数が多いという明瞭な雌雄差が認められた。SF-1KO の雄は雌型の発現を示したが、SF-1KO の雌には雌型を示さない場合が見られた。DES を投与すると雄型の発現を示した (図 2)。

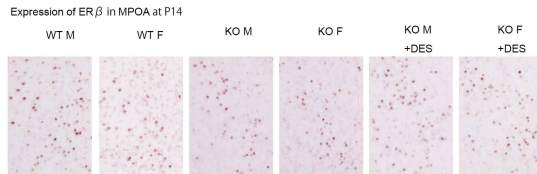


図 2. 生後 14 日の MPOA における ER の発現

progesterone receptor (PR) : 生後 0 日、7 日に雄では雌より発現細胞の数が多いという明瞭な雌雄差が認められた。SF-1KO は雌型の発現を示したが、DES を投与すると雄型の発現を示した (図 3)。

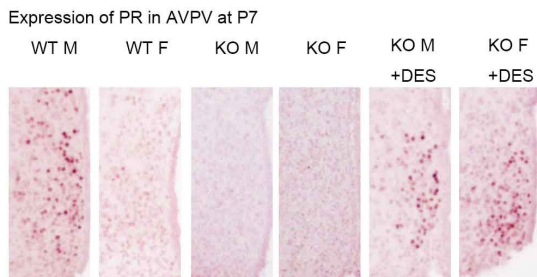


図 3. 生後 7 日の AVPV における PR の発現

kisspeptin : AvPv において、生後 14 日、21 日に雌では雄より発現細胞の数が多いという明瞭な雌雄差が認められ、SF-1KO は雌型の発現を示した。DES を投与すると生後 14 日には雄型の発現を示したが、生後 21 日には雄型を示した。ARC では、生後 7 日にのみ雌では雄より発現細胞の数が多いという明瞭な雌雄差が認められ、SF-1KO は雌型の発現を示した (図 4)。

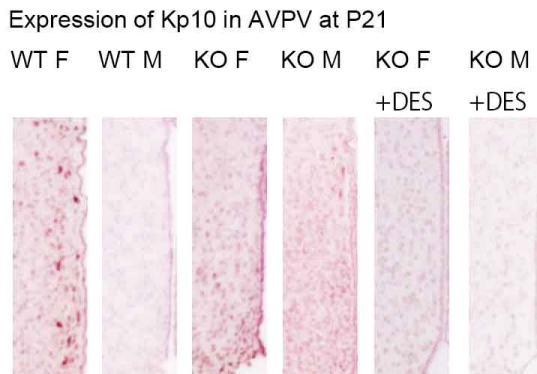


図 4. 生後 21 日の AVPV における kisspeptin の発現

研究当初は、ノックアウトマウスの作製、維持は順調で、免疫組織化学法による解析、およびホルモン暴露実験とその解析も順調に進んでいた。しかし、平成 25 年度以降オリ

ジナル SF-1KO マウスが出生直後に死んでしまい、生後の副腎皮質ホルモン補填によるレスキューができない状況が生じており、脳のサンプルが得られず研究計画が研究通りに進まないという状況となった。このため、当初の実験計画であったアポトーシスの解析、エピジェネティックな変化については研究計画期限内では行うことができなかった。しかし、免疫組織化学法による解析過程で、キスペプチンが下垂体で発現することを発見し、これについて解析を進め、非常に興味深い結果を得た。

(3) kisspeptin の下垂体における発現解析結果

kisspeptin の C 端を認識する抗体 Kp10 を用いて免疫組織化学法により調べた。Kp10 陽性細胞は、胎生 13 からおとなに至るすべての発生段階で前葉の限局した部位に認められた (図 5, 図 6)。下垂体前葉の各細胞マーカーとの二重染色により、胎生期下垂体のゴナドトロフ前駆細胞に発現が認められたが、分化したゴナドトロフには認められなかった。また、kisspeptin をコードしている Kiss1 遺伝子の mRNA の発現を RT-PCR により認めた (図 7)。

Kisspepsin のはたらきとしてこれまでは脳における生殖機能成熟のゲートキーパーとして報告されている。本研究結果から、下垂体に発現する kisspeptin がゴナドトロフの分化に関連した役割をもつ可能性が示唆された。

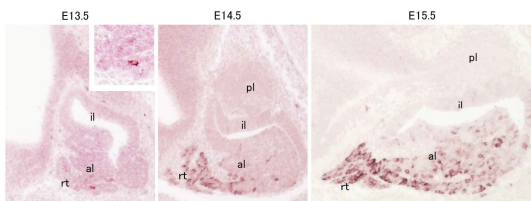


図 5. 胎生期下垂体における kisspeptin の発現

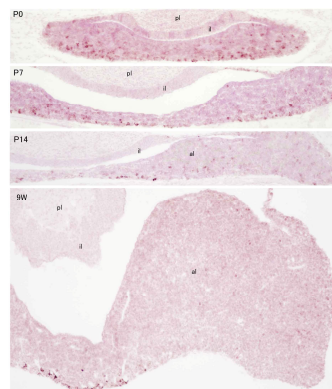


図 6. 生後下垂体における kisspeptin の発現

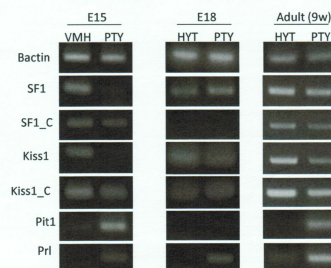


図7.下垂体における Kiss1 mRNA の発現  
5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Komada M, Itoh S, Kawachi K, Kagawa N, Ikeda Y, Nagao N. Newborn mice exposed prenatally to bisphenol A show hyperactivity and defective neocortical development. *Toxicology*, 2(323): 51-60, 2014, 査読有, DOI: 10.1016/j.tox.2014.06.009

Kato T, Esaki M, Matsuzawa A, Ikeda Y. NR5A1 is required for functional maturation of Sertoli cells during postnatal development. *Reproduction*, 143:663 - 672, 2012, 査読有, DOI:10.1530/REP-11-0365

Koibuchi N, Ikeda Y. Hormones and cerebellar development in "The Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders". Eds. Manto M, Gruol D, Schmahmann J, Koibuchi N, and Rossi F. Springer, 2012, 査読有, ISBN:978-94-007-1332-1

[学会発表](計 14 件)

Komada M, Itoh S, Kawachi K, Nagao T, Ikeda Y. Newborn mice exposed prenatally to bisphenol A show hyperactivity and defective neocortical development. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015.3.22, 神戸

Mori A, Takahashi M, Komada M, Ikeda Y. Expression of Osterix in the cleft palate of A/J mouse embryo. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015.3.22, 神戸

Ito T, Hayakawa A, Takeuchi R, Ikeda Y. A rare case of inferior vena cava duplication. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015.3.21, 神戸

駒田致和, 長尾哲二, 池田やよい, 菅野純. 胎児期低用量ビスフェノール A 曝露は発生・発達期の大脳皮質に形態・機能的異常を誘発する. 第17回環境ホルモン学会研究発表会, 2014.12.9, 東京

Ikeda Y, Ikeda MA. Immunohistochemical detection of cyclin E in postmitotic neurons of the mouse adult hippocampal dentate gyrus. 北米神経科学会, 2014.11.17, Washington DC

駒田致和、浅井泰子、守井見奈、松木美

知枝、河内宏太、池田やよい、長尾哲二. 胎児期低用量ビスフェノール A 曝露による大脳皮質における影響の神経発生毒性学的評価 第41回日本毒性学会学術年会, 2014.7.2~4, 神戸

駒田致和、池田やよい. 大脳皮質形成におけるステロイドホルモンの局在と役割. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014.3.27-29, 宇都宮

Ikeda Y, Kato T, Komada M. Immunohistochemical localization of estrogen receptors alpha and beta, progesterone receptor, and kisspeptin in the preoptic area of SF-1 knockout mice. 北米神経科学会, 2013.11.9-13, San Diego

駒田致和、池田やよい. 大脳皮質形成におけるステロイドホルモンの局在と役割 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013.9.20-22, 岡山

池田やよい、加藤朋子、加藤大貴、高橋幸子、駒田致和. SF-1 ノックアウトマウスの POA におけるプロゲステロン受容体と kisspeptin の発現. Neuro2013 (第36回日本神経科学大会. 第56回日本神経化学学会大会. 第23回日本神経回路学会大会), 2013.6.20-23, 京都

池田やよい、加藤朋子、駒田致和、加藤大貴、高橋幸子. 生後 SF-1 ノックアウトマウス POA における脳の性分化マーカーの発現. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013.3.28-30, 香川

池田やよい、加藤朋子. SF-1 ノックアウトマウスの POA における ERα と PR 発現の免疫組織学的解析. 第35回日本神経科学大会, 2012.9.18-21, 名古屋

池田やよい、加藤朋子. 生殖腺特異的 SF-1 ノックアウトマウスの精巣におけるセルトリ細胞の分化異常. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012.3.26-28, 山梨

池田やよい、加藤朋子. 生殖腺特異的 SF-1 ノックアウトマウスの性腺分化異常. (哺乳類の性分化・性成熟の新知見: 性腺機能を制御する遺伝子ネットワークとその破綻による疾患). 第35回日本分子生物学会年会, 2012.12.13, 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 やよい (IKEDA, Yayoi)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00202903

### (2) 研究分担者

池田 正明 (IKEDA, Masaaki)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 20193211