

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670114

研究課題名(和文)新規な性的二型核の探索と探索した性的二型核の性差形成機構および生理機能の解明

研究課題名(英文)Study of a novel sexually dimorphic structure in the hypothalamus

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)：脳構造には性差があり、これにより脳機能の性差が生じる。これまでの研究から、エストロゲン受容体 α の発現に雌優位な性差がある新規領域をマウスの視床下部で発見した。本研究では、当該脳領域の形態学的特徴、性差形成のメカニズム、生理機能について解析した。その結果、ニューロン数には雌優位な性差があること、その性差の形成には性ステロイドホルモンが重要な働きをすることが示された。当該脳領域は雌性行動の発現制御に関与しないことが示唆された。生理機能の解明には更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Morphological sex differences in the brain underlie sex-biased brain functions. We recently found a hypothalamic area that has a female-biased sex difference in estrogen receptor- α expression (hereafter called the area X). In the current study, we examined the morphology of the area X, the effects of sex steroids on formation of the area X, and physiological roles of the area X. We found that the number of neurons in the area X of female mice was greater than that in male mice. Sex steroids affected this female-biased sex difference. Testicular testosterone in the postnatal and pubertal periods acts to decrease the number of neurons in the area X, while ovarian estradiol in the pubertal period acts to increase the number. Physiological function of the area X is still unclear, although our study showed that the area X is not related to female sexual behavior. Further studies are needed to determine the physiological functions of the area X.

研究分野：神経内分泌

キーワード：視床下部 エストロゲン受容体 性差 性分化 エストラジオール テストステロン

1. 研究開始当初の背景

脳の内部構造には性差があり、これにより脳機能の性差が生じる。複数の脳領域において、領域の大きさや内在細胞の数や形態に性差がみとめられることが知られているが、形態学的な性差に関して未知な脳領域は多い。研究代表者は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) でエストロゲン受容体 (ER) 発現ニューロンを可視化した遺伝子改変マウス (ER-GFP TG マウス) を用いた研究から、ER 発現ニューロンの数に性差がある領域としては、これまでに知られていなかった部位 (以後、領域 X とする) を視床下部の中で発見した (図 1)。領域 X は分界条床核と視索前野の境界領域に存在し、GFP を発現する細胞が雌において雄よりも多く分布していた。このことは、領域 X が雌優位な形態学的な性差が生じた部位であることを示唆している。

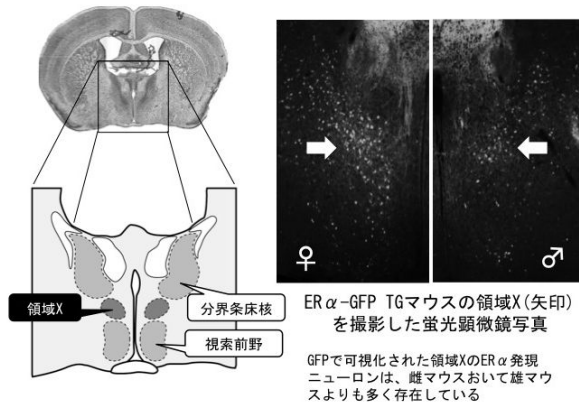


図 1. 領域 X の局在 (左) と GFP 発現細胞の性差 (右)

脳の性差が構築される要因として、脳に作用する性ステロイドホルモンと脳内で発現する性染色体の遺伝子が明らかにされている。中でも発達期の精巣から分泌されるテストステロンは、脳の雄性化に重要な働きをすることが古くより知られている。発達期には、精巣のテストステロン産生が活発な時期があり、高濃度のテストステロンが分泌される。このテストステロンが、性的に未分化な脳に作用すると、脳の雄性化が起こる。一方、発達期の雌では、卵巣のホルモン産生能は低く、ホルモンが脳に作用することは極めて稀である。発達期に性ステロイドホルモンが作用しない脳は、雌性化の過程を辿る。げっ歯類では、テストステロンは周生期に分泌され、脳内に移行したテストステロンは芳香化酵素によりエストラジオールに転化して作用すると考えられている。近年では、思春期に分泌される性ステロイドホルモンも脳の性分化に重要な働きをすることが明らかになりつつある。思春期は、性腺から分泌される性ステロイドホルモンの量が増加する時期であり、卵巣から分泌されたエストラジオールは脳の雌性化を促す。発達期にテストステロンを分泌した精巣は、思春期に再びテスト

ステロンの分泌を増加させて、脳の雄性化の過程を進行させる。以上のように、性ステロイドホルモンは、脳の性分化に重要な役割を果たしている。しかし、脳の性差形成機構および性ステロイドホルモンの作用機序には未だ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、ER-GFP TG マウスの解析から見出された領域 X の形態学的特徴、性差形成のメカニズム、そして生理機能を明らかにすることを目的とした。

はじめに、領域 X の形態学的特徴を明らかにするため、野生型雌雄マウスを用いた領域 X の定量組織学的解析を行った。次に、発達期および思春期に分泌される性ステロイドホルモンが領域 X の性差形成にどのような影響を及ぼすのか検証した。ER-GFP TG マウスの解析より、領域 X には ER 発現の雌優位な性差が示されていることから、エストラジオールが重要な調節因子となる雌性行動の発現制御における領域 X の関与について検討した。

3. 研究の方法

(1) 領域 X の組織学的解析

成熟した雌雄マウスを実験に用いた。一部の動物では、性腺除去手術を行い、性腺除去の 2-3 週間後に組織学的処置を施した。深麻酔した動物の左心室より 4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液を灌流し、脳を固定した。その後、クリオスタットを用いて、前額凍結脳切片を作製した。脳切片に免疫染色を施した後、領域 X の組織解析を行った。

領域 X のニューロンおよびグリアの数を計測するため、脳切片にカルビンディンの免疫染色とニッスル染色を施した。分界状床核の亜核である分界状床核主核 (BNSTp) と視索前野に存在する性的二型核 (Calb-SDN) はカルビンディンを発現するニューロンが豊富に存在しており、カルビンディンは BNSTp と Calb-SDN のマーカーとして広く用いられている。解析対象である領域 X は分界状床核と視索前野の境界領域に局在しており、本研究ではカルビンディン免疫陽性を示した BNSTp と Calb-SDN に挟まれた領域に観察されたニッスル染色ニューロンおよびグリアの数を計測した。また、カルビンディン免疫染色とニッスル染色を行った組織標本に加えて、カルビンディンと ER の免疫二重染色を施した組織標本も作製した。この標本を用いて、領域 X に存在する ER 免疫陽性細胞数を計測した。

(2) 領域 X の性差形成に対する性ステロイドホルモンの影響

新生仔期の精巣から分泌されるテストステロンの領域 X に対する影響を調べるため、出生日に精巣を除去した雄マウスを作製した。対照群の雄マウスには出生日に偽手術を

施した。加えて、出生日にゴマ油に溶解した 100 µg のテストステロンプロピオネート (TP) あるいは溶媒であるゴマ油を皮下注射した雌マウスも作製した。成熟後、性腺除去した雄マウス、偽手術を施した雄マウス、出生日に TP を投与した雌マウス、そして出生日に溶媒を投与した雌マウスを深麻酔して、4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液による灌流固定を行った。その後、作製した脳切片にカルピンディンの免疫染色とニッスル染色を施し、領域 X に存在するニッスル染色ニューロンとグリアの数を計測した。

思春期の卵巣から分泌されるエストラジオールと精巣から分泌されるテストステロンの領域 X の組織構築への影響を調べるため、思春期以前の生後 20 日に卵巣除去あるいは精巣除去を行った。対照群の雌雄マウスには偽手術を施した。成熟後、性腺除去あるいは偽手術を行った雌雄マウスの脳切片を作製した。脳切片にカルピンディンの免疫染色とニッスル染色を施し、領域 X におけるニッスル染色ニューロンとグリアの数を計測した。

(3) 雌性行動の発現制御における領域 X の関与についての検討

雌性行動の発現制御における領域 X の関与を検討するため、神経活性のマーカである c-Fos タンパク質発現を指標にして、ロードーシスを起こした雌マウスの領域 X における神経活性を調べた。

成熟雌マウスに卵巣除去手術を施した。手術の 1 週間後、エストラジオールベンゾエート (10 µg/0.1 ml ゴマ油) を皮下注射した。エストラジオールベンゾエート投与の 48 時間後、プロゲステロン (250 µg/0.1 ml ゴマ油) を皮下注射した。プロゲステロン投与の 4 時間後より、被験動物を正常雄マウスの飼育ケージに入れて、行動観察を行った。雄マウスが被験動物に対してマウント行動を 15 回行うまで観察し、マウント行動に対する被験動物のロードーシス発現の有無を記録した。ホルモン投与と行動観察は 1 週間おきに計 3 回実施した。対照群を作製するため、卵巣除去雌マウスの半数には、上記のホルモン投与のみを行い、行動観察は実施しなかった。

行動観察終了 (最後のマウント刺激) から 60 分後、深麻酔した動物に 4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液を灌流した。対照群の動物も同時期に灌流固定した。固定した脳の前額断凍結切片を作製し、c-Fos とカルピンディンの二重免疫染色を行い、領域 X に観察された c-Fos 免疫陽性細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) 領域 X の組織学的解析

BNSTp および Calb-SDN には、カルピンディン免疫陽性細胞が多数密集していた。BNSTp と Calb-SDN に挟まれた領域 X にもカルピンディン免疫陽性細胞が観察されたが、その数は BNSTp と Calb-SDN に比べて少なく、領域 X

では散在していた。領域 X に観察されたニッスル染色ニューロンとグリアの数を計測した結果、ニッスル染色ニューロンの数は雌マウスにおいて雄マウスより多かった (図 2)。領域 X におけるニューロン数の性差は、

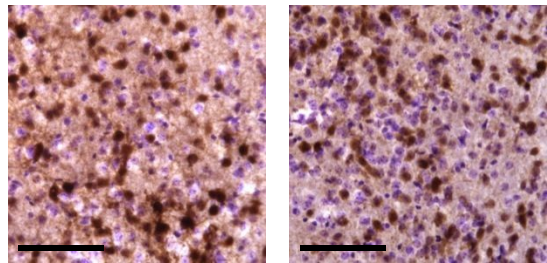


図 2. 領域 X におけるニッスル染色ニューロン (紫色) の性差
雄マウスの領域 X (左) と雌マウスの領域 X (右)、スケールバー: 100 ミクロン

正常雌雄マウスだけでなく、性腺除去した雌雄マウスの間でもみとめられた。これらの結果から、領域 X のニューロン数には雌優位な性差があり、この性差は成熟期の性ステロイドホルモンの影響を受けないことが示された。一方、ニッスル染色グリアの数には性差はみられなかった。

ニッスル染色ニューロンと同様、雌マウスの領域 X には多数の ER 免疫陽性細胞が観察され、雄マウスに比べて、その数は多かった (図 3)。正常マウスと性腺除去マウスを比

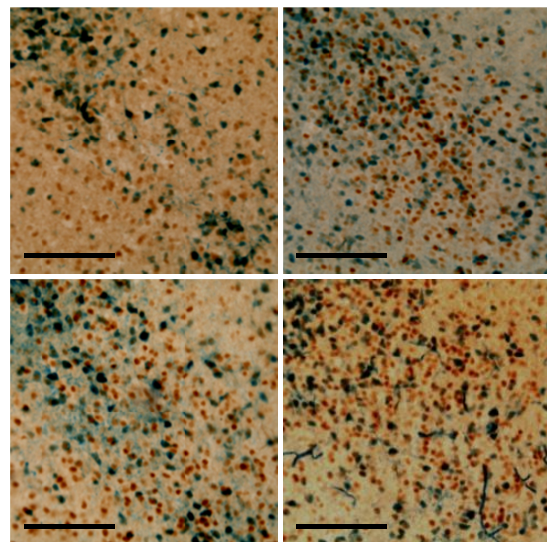


図 3. 領域 X における ER 免疫陽性細胞 (茶色) の性差
正常雄マウス (左上)、精巣除去雄マウス (左下)、正常雌マウス (右上)、卵巣除去雌マウス (右下)、スケールバー: 300 ミクロン

較すると、ER 免疫陽性反応は性腺除去マウスにおいて強くなっていった。しかし、ER 免疫陽性細胞の数自体は、正常マウスと性腺除去マウスとの間で有意な差はみられなかった。これらの結果から、領域 X の ER 発現ニューロン数には雌優位な性差があることが明らかになった。また、成熟雌雄マウス

の領域XにおけるER 発現は性ステロイドホルモンの作用により調節されていることが示唆された。

(2) 領域Xの性差形成に対する性ステロイドホルモンの影響

出生日に精巣を除去した成熟雄マウスの領域Xのニューロン数は、対照群の雄マウスに比べて、多くなっていた。反対に、出生日にTPを投与した成熟雌マウスの領域Xのニューロン数は、溶媒を投与した対照群の雌マウスよりも少なくなっていた。これらの結果から、新生仔期の精巣から分泌されるテストステロンは、領域Xのニューロン数を減少させる働きがあることが示された。

出生日の精巣除去した雄マウスと同じく、生後20日に精巣を除去した雄マウスの領域Xにおけるニューロン数は、対照群の雄マウスに比べて多くなった。一方、生後20日に卵巣を除去した雌マウスでは、対照群の雌マウスに比べて、領域Xに存在するニューロンが少なくなった。以上のことから、領域Xの雌優位なニューロン数の性差形成には、新生仔期と思春期の性ステロイドホルモンの影響を受けることが明らかになった。新生仔期および思春期の精巣由来テストステロンは、領域Xのニューロン数を減少させる働きがあり、思春期の卵巣由来のエストラジオールはニューロン数を増加させる作用があると推察された。

(3) 雌性行動の発現制御における領域Xの関与についての検討

エストラジオールとプロゲステロンを投与した卵巣除去雌マウスは、雄マウスのマントによる刺激を受けて、高頻度のロードシスを示すことが確認された。ロードシスを示した雌マウスと対照群の雌マウス(ホルモンを投与したが雄のマウント刺激を受けなかった卵巣除去マウス)の領域Xにおけるc-Fos免疫陽性細胞数には違いがみられなかった。これらの結果から、領域Xは、雌マウスの性行動発現制御には関係しないと考えられた。領域Xの生理機能を明らかにするための研究を今後さらに進めてゆく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

Kanaya M, Tsuda CM, Sagoshi S, Nagata K, Morimoto C, Chaw Kyi Tha Thu, Toda K, Kato S, Ogawa S, Tsukahara S: Regional difference in sex steroid action on formation of morphological sex differences in the anteroventral periventricular nucleus and principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. PLoS One, 9, 11, doi:10.1371/journal.pone.0112616

,2014.(査読あり)

Tsukahara S, Kanaya M, Yamanouchi K: Neuroanatomy and sex differences of the lordosis-inhibiting system in the lateral septum. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 299, doi: 10.3389/fnins.2014.00299, 2014.(査読あり)

Maekawa F, Tsukahara S, Kawashima T, Nohara K, Ohki-Hamazaki H: The mechanisms underlying sexual differentiation of behavior and physiology in mammals and birds: relative contributions of sex steroids and sex chromosomes. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 242, doi: 10.3389/fnins.2014.00242, 2014.(査読あり)

Iwakura T, Sakoh M, Tsutiya A, Yamashita N, Ohtani A, Tsuda M, Ogawa S, Tsukahara S, Nishihara M, Shiga Y, Goshima Y, Kato T, Ohtani-Kaneko R: Collapsin response mediator protein affects the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the sexually dimorphic nucleus in female mice. *Developmental Neurobiology*, 73, 7, 502-517, doi: 10.1002/dneu.22076, 2013.(査読あり)

Matsuda KI, 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, 2, 2242-2249, doi: 10.1111/ejn.12227, 2013.(査読あり)

[学会発表](計26件)

Shinji Tsukahara: Sex steroid actions on the formation of morphological sex difference in the rodent brain. Satellite Meeting of ICN 2014 "Recent and Future Trends in Neuroendocrinology from Asia and Oceania to Global", Sydney, Australia, August 16, 2014.

Kanaya M, Tsuda CM, Sagoshi S, Nagata K, Morimoto C, Chaw Kyi Tha Thu, Toda K, Kato S, Ogawa S, Tsukahara S: Regional differences in sex steroid action on formation of sexually dimorphic nuclei in mice. 8th International Congress of Neuroendocrinology 2014, Sydney, Australia, August 17-20, 2014.

Chaw Kyi Tha Thu, Ito H, Okoshi K, Matsuda KI, Kawata M, Tsukahara S: A

female-dominant sexually dimorphic area sandwiched between male-dominant sexually dimorphic nuclei in brain of mice. 8th International Congress of Neuroendocrinology 2014, Sydney, Australia, August 17-20, 2014.

塚原伸治:行動の性差を生み出す脳の性分化機構. 日本発達心理学会第25回大会(日本発達心理学会・日本動物心理学会共催シンポジウム), 京都大学、京都、2014年3月21日.

Shinji Tsukahara: Mechanism of brain sexual differentiation and development of neurotoxicology method using live imaging. Seminar in University of Medicine (1), Yangon, Myanmar, November 5, 2013.

Chaw Kyi Tha Thu, Ito H, Okoshi K, Matsuda KI, Kawata M, Tsukahara S: A female-dominant sexually dimorphic area located between two male-dominant sexually dimorphic nuclei in mice. 第40回日本神経内分泌学会学術集会、宮崎市民プラザ、宮崎、2013年10月24-26日.

塚原伸治:雄ラットの性的覚醒を引き起こす神経機構. 日本動物学会第84回大会、岡山大学、岡山、2013年9月26-28日.

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神経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、国立京都国際会館、京都、2013年6月20-23日.

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

松田 賢一 (MATSUDA, Kenichi)
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

(3) 連携研究者

小川 園子 (OGAWA, Sonoko)
筑波大学・人間総合研究科(系)・教授
研究者番号: 50396610