

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08577

研究課題名(和文) 海馬学習機能の性的二型性の成立機序に関する研究

研究課題名(英文) Studies of the mechanism for the establishment of sexual differences in hippocampal learning processes

研究代表者

船橋 利也 (Funabashi, Toshiya)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：齧歯類においては、脳によって調節される様々な機能が性腺ステロイドホルモンによって調節され、少なくとも一部は出生時に存在する性腺ステロイドホルモンの影響下にある。そこで海馬によって調節される空間学習能力の性差と神経系のつながり＝シナプスに関して、出生時の性腺ステロイドホルモンの影響を検討した。その結果、空間学習の性差の少なくとも一部は、脳の性分化の影響であることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験動物のラットなどの齧歯類は、脳によって調節される機能の少なくとも一部は性腺ステロイドホルモンに強く影響され、それは、出生時期の性腺ステロイドホルモン環境の違いによる脳の性分化の結果と考えられる。本研究から、性特異的な飼育環境による海馬機能の変容が、一部は出生時期の性腺ステロイドホルモン環境の違いによる性分化の結果である事がわかった意義がある。

研究成果の概要(英文)：In rodents, sex steroid hormones control many functions regulated by the central nervous system. The sex difference in the brain functions is at least in part as the result of steroid hormone milieu during prenatal development and immediately after birth. We examined in the present study whether this sex steroid hormone milieu affected the sex specific alteration of hippocampal neuronal function by feeding experiences. As the results, we revealed that the sex specific alteration by the feeding experience in spatial learning regulated by the hippocampus was at least in part as the result of the sex difference in steroid hormone milieu immediately after birth.

研究分野：生理学

キーワード：海馬 エストロジェン シナプス 空間学習 LTP 性分化

## 1. 研究開始当初の背景

脳が調節する様々な機能は、齧歯類においては明確な性差が認められる。例えばゴナドトロピンの調節において、雌性では性腺ステロイドホルモン、例えばエストロジェンによるネガティブフィードバックとポジティブフィードバックが認められるが、雄性においてはネガティブフィードバックのみである。すなわち、雄性においていくらエストロジェンを投与しても、排卵を惹起するような黄体形成ホルモンの分泌の高まり、いわゆるサージ状分泌は認められないのである。これは胎生期～出生期にかけてのアンドロジェン暴露による脳の性分化の結果と考えられている。すなわち、脳が雄型に分化したあとはいくらエストロジェンを投与しても、サージ状黄体形成ホルモン分泌は認められない。一方、齧歯類においては、様々な高次機能にも性差があると考えられてきた。海馬の調節する空間学習機能、例えば放射状迷路課題は雄性が雌性に優ると考えられている。実際、放射状迷路課題の獲得には雌性の方が雄性よりも日数を要する。これは脳の性分化の結果であろうか？それ以前に、本当にこれらの高次機能に性差があるのでしょうか？我々は、飼育環境が雌性においてのみ海馬の高次機能に影響を与えることを明らかにしてきた。逆に言えば、雌性に適した環境で飼育すれば、例えば、放射状迷路課題の性差は消失するのである。つまり、脳の性分化や性腺ステロイドホルモンの影響を強く受けている齧歯類といえども性腺ステロイドホルモンの影響を適した環境がくつがえせるかもしれないのである。特に高次機能に関しては、興味を持たれる。本研究では、雌性にのみ認められる飼育環境の影響が生物学的には雌性であるが脳の性分化を雄型にして、飼育環境の影響が認められるのか否かを命題とした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、齧歯類において海馬の調節する高次機能に及ぼす飼育環境の影響が、脳の性分化の影響を受けるか否か、シナプス機能レベルで行動解析および電気生理学的な検討により明らかにすることにある。シナプス機能は、電気生理学的にパッチクランプ法をもちいて単一神経細胞を解析し、行動学的には、受動的回避学習や空間機能をはかる Y 迷路、情動の評価としてオープンフィールドを解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 行動解析

#### 受動的回避学習

受動的回避学習装置は、ドアで隔たれた明るい部屋と暗い部屋の2連部屋からなり、動物を明るい部屋におくと速やかに暗い部屋に移動する。暗い部屋に移動した時にドアをしめて床のグリッドから電気ショック(0.8-1.6 mA, 2秒)を与える。その後再び明るい部屋に入れると受動的回避学習が成立しているので、明るい部屋に行かない。行動しないこと(明るい部屋に行かない)により電気ショックを回避する学習海馬依存性である事がわかっている。

#### Y迷路学習

動物をY迷路の一つの選択肢に置き、5分間の自発的交替行動(spontaneous alternation)を算出する。自発的交替行動は探索行動で、自発的に異なる選択肢に入る性質を利用し、既に入った選択肢を記憶していることにより可能となる行動で、迷路の上にテレビカメラを置き、接続したパソコン上にデータを取り込み、自動解析する。

#### オープンフィールド

オープンフィールド装置の中に動物を置き、テレビカメラを接続したパソコン上にデータを取り込む。10分間行動を観察し、仮想的に場所を2分割し、周辺部領域と中心部領域に分ける。それぞれの領域の滞在時間をもとめ、不安状態の高い動物は中心部領域にいかないことを観察する。

### (2) 電気生理学的解析

イソフルラン麻酔をしてから脳を摘出し、スライス切片をリニア振動型ビブラトームで作成する。我々が改良した2段階インキュベーション法を用いる。記録は、パッチクランプ膜電位固定法を用いる。また、電気刺激は、シェーファー線維を刺激することにより行う。

#### AMPA/NMDA 比の解析

ビククリン存在下に -60 mV に膜電位を固定した時の電気刺激により電流応答(excitatory post synaptic current, EPSC)を記録し、また、+40 mV の EPSC を記録する。-60 mV の EPSC (AMPA 受容体成分)を電気刺激 150 msec 後の +40 mV の EPSC (NMDA 受容体成分)で除した値を計算する。

#### AMPA 受容体のサブユニット構成

ビククリンおよび APV 存在下(NMDA 受容体成分を切る)に電気刺激し、膜電位 -60 mV にした時の EPSC を +40 mV の EPSC で割った値を rectification index (RI) と定義する。通常は 1.5 ~ 1.6 であるが、GluR2-lacking 受容体があると、約 2.0 になる。つまり、RI があがると GluR2-lacking 受容体があるという、機能的な解析となる。重要なことに、GluR2-lacking 受容

体になるとカルシウム透過性が出てくる。

#### LTP の検討

膜電位を -60 mV に固定する。テタヌス刺激は paired 刺激で、0 mV の脱分極刺激と、3-10 Hz 90 秒間の電気刺激を同時に行う。テタヌス刺激前に、10 秒間に 1 回電気刺激し、その 30 回（すなわち 5 分間）の平均を 100% として、その後 1 時間、10 秒間に 1 回電気刺激をして、経過を観察する。

#### (3) 脳の性分化

飼育環境として餌の形状が性特異的に海馬の担う高次機能に影響することを調べるために、Margaret, M.M. らの方法に準じて出生直後にテストステロンプロピオネート (TP, 100 μg) を処置して雌性ラットを雄性化する。離乳直後から、対照群としては通常の餌で飼育し、実験群は柔らかい餌で飼育する。7-8 週の成熟に達してから実験に用いる。性腺ステロイドホルモンによる脳の性分化が、餌の形状による高次学習機能の性差形成に関与するか検討する。

#### 4. 研究成果

雌性のエストロジェンは、海馬の担う空間学習機能に対して負の作用もあることを、我々は、行動学、形態学、機能(電気生理学)学の観点から明らかにしてきた。一方、餌の形状が、雌性特異的に作用することも明らかにしてきた。具体的には、柔らかい餌で飼育すると雌性特異的に海馬空間学習機能を向上させることが明らかになってきた。2017 年度からの 3 年間で、この雌性特異的な作用について脳の性分化の影響を検討することを目的とした。2017 年度は、これまでにやり残した海馬 LTP 実験と、新たな AMPA/NMDA 比の実験を中心に進めた。海馬学習脳を飽和させるために 2 種類の異なった海馬空間学習を負荷して、海馬機能を評価した。次の 2018-2019 年度

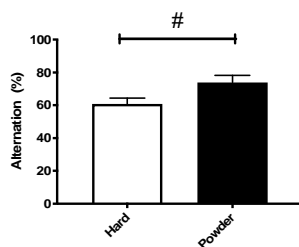


図1 Y迷路

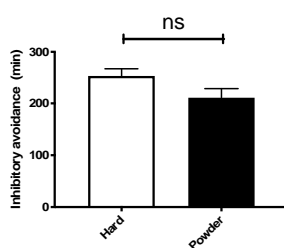


図2 受動的回避学習

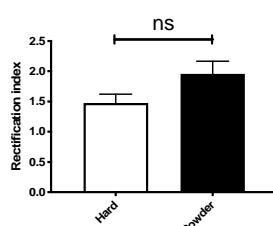


図3 RI

の 2 年間で、これらの雌性特異的に海馬空間学習機能を変える神経細胞の機能について脳の性分化の影響を検討した。Y 迷路実験は 3 つの通路からなり、一つの選択肢にラットを置き、自由に通路を探索させ、5 分間の自発的交替行動 (spontaneous alternation) を算出した。図 1 に示したように生物学的には雌性であるがテストステロン処置により脳を雄性化しても粉餌という飼育環境は、Y 迷路で評価した海馬空間学習機能を向上させることが明らかとなった ( $\# = 0.028$ ,  $n=10-11$ )。オープンフィールドで情動機能を評価した場合、飼育環境による差はなかった (data not shown)。このことは、飼育環境による海馬空間学習機能向上作用は、脳の性分化の影響を受けず、生物学的な性に依存することが示唆された。一方、受動的回避学習は、暗い部屋に移動した時にドアを閉めて床のグリッドから電気ショック (0.8 mA、2 秒) を与え、30 分後に再び明るい部屋に入れ、暗い部屋に移動するまでの時間を計測することにより行った。図 2 に示したように ( $ns=0.067$ ,  $n=40-46$ )、テストステロン処置により脳を雄性化すると粉餌飼育環境は、もはや海馬空間学習機能に影響を与えないことが示唆された。粉餌飼育の方が暗い箱に入る潜時が短い、すなわち、記憶の保持能力が低い傾向にあったが、有意ではなかった。このことは解釈が難しいが、脳の性分化によって脳を雄型にした場合、通常の雄性ラット同様に、飼育環境の影響を受けないと推測される。

海馬神経細胞の電気生理学的な検討は、例えば Rectification index (RI) の測定等、スライス切片をホールセルモードのパッチクランプ膜電位固定法を行った。シェーファー線維を刺激し、記録は海馬 CA1 から行った。膜電位 -60 mV にした時の EPSC を +40 mV の EPSC で割った値、RI は、図 3 に示したように、テストステロン処置により脳を雄性化したラットでは柔らかい餌で飼育した群が高い傾向を示したが有意ではなかった ( $ns=0.086$ ,  $n=20-26$ )。す

なわち、飼育環境による性特異的な海馬神経細胞の機能に有意には影響しなかったことになる。Long-term Potentiation (LTP) や AMPA/NMDA 比の実験では、テストステロン処置により脳を雄性化しても、もはや海馬神経細胞の機能には飼育環境による性特異的な影響は観察されなかった (data not shown)。

以上から、これまで明らかにした性特異的な海馬神経細胞の機能の向上は、一定はしないが、脳を雄性化した場合、少なくとも一部は失われることが明らかとなった。逆に言えば、性特異的な海馬神経細胞の機能の向上は、少なくとも一部は脳の性分化の影響であることが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Takafumi Kubota, Atsushi Fukushima, Hiroko Hagiwara, Yoshinori Kamiya, Miyako Furuta, Tomoyuki Miyazaki, Hitomi Fujioka, Sei-Etsu Fujiwara, Toshiya Funabashi and Tatsuo Akema | 4. 巻<br>671         |
| 2. 論文標題<br>Short-term fasting decreases excitatory synaptic inputs to ventromedial tuberoinfundibular dopaminergic neurons and attenuates their activity in male mice                    | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience Letters   | 6. 最初と最後の頁<br>70~75 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neulet.2018.02.017  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-           |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Toshiya Funabashi, Naoya Sakakibara, Fumiki Hirahara and Fukuko Kimura  | 4. 巻<br>9         |
| 2. 論文標題<br>Reduced luteinizing hormone induction following estrogen and progesterone priming in Female-to-Male transsexuals | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Endocrinology  | 6. 最初と最後の頁<br>212 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fendo.2018.00212   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-         |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Hitomi Fujioka, Toshiya Funabashi and Tatsuo Akema  | 4. 巻<br>360           |
| 2. 論文標題<br>Prostaglandin E2 modulates presynaptic regulation of GnRH neurons via EP4 receptors in accordance with estrogen milieu | 5. 発行年<br>2017年       |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>139-145 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neuroscience.2017.07.025   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Atsushi Fukushima, Miyako Furuta, Hitomi Fujioka, Toshiya Funabashi  |
| 2. 発表標題<br>Effects of Omega-3 fatty acids feeding on high-fat induced impairment of glucose tolerance and behavioral performances |
| 3. 学会等名<br>The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Mitsutoshi Kurosaka, Yuji Ogura, Kazuhisa Kohda, Toshiya Funabashi       |
| 2 . 発表標題<br>STAT6 negatively regulates differentiation and fusion of mouse myoblasts |
| 3 . 学会等名<br>The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan            |
| 4 . 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Miyako Furuta, Chiaki Kakehashi, Toshiya Funabashi   |
| 2 . 発表標題<br>Effects of the experience of pregnancy-delivery-nurturing on excitatory synaptic inputs to tuberoinfundibular dopaminergic neurons |
| 3 . 学会等名<br>The 49th Society for Neuroscience ( 国際学会 )   |
| 4 . 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Yuji Ogura, Chiaki Kakehashi, Toshiya Funabashi  |
| 2 . 発表標題<br>Atypical Inhibitor of kappa beta is associated with denervation-induced muscle atrophy in mice |
| 3 . 学会等名<br>The 48th European muscle conference ( 国際学会 )   |
| 4 . 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1 . 発表者名<br>Hiroko Hagiwara, Toshiya Funabashi  |
| 2 . 発表標題<br>Role of CRH neurons in the dorsolateral BST on the sex difference in pain response in mice. |
| 3 . 学会等名<br>NEURO 2019  |
| 4 . 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Atsushi Fukushima, Toshiya Funabashi   |
| 2 . 発表標題<br>Intracerebroventricular infusion of PDGF-AA induces weight gain by reducing locomotor activity and decreases MEF2C expression in the dorsomedial hypothalamus. |
| 3 . 学会等名<br>NEURO 2019   |
| 4 . 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Hitomi Fujioka, Atsushi,Fukushima, Toshiya Funabashi, Tatsuo Akema   |
| 2 . 発表標題<br>Involvement of kiss-1 neurons in the suppression of LH surge by LPS and amelioration of this suppression by minocycline pretreatment in ovarian steroid-primed ovariectomized rats |
| 3 . 学会等名<br>NEURO 2019   |
| 4 . 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Yuji Ogura, Mitsutoshi Kurosaka, Chiaki Kakehashi, Ryo Kakigi, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi |
| 2 . 発表標題<br>Ketogenic diet induces slow-type shift of skeletal muscle in male rat                          |
| 3 . 学会等名<br>FAOPS2019  |
| 4 . 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1 . 発表者名<br>Mitsutoshi Kurosaka, Yuji Ogura, Kazuhisa Koda, Toshiya Funabashi      |
| 2 . 発表標題<br>STAT6 promotes myoblast fusion via regulating myoblast differentiation |
| 3 . 学会等名<br>FAOPS2019  |
| 4 . 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yuji Ogura, Mitsutoshi kurosaka, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi  |
| 2. 発表標題<br>Involvement of early growth response 3 in myoblast proliferation  |
| 3. 学会等名<br>The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Miyako Furuta, Atsushi Fukushima, Tatsuo Akema, Tosiya Funabashi                          |
| 2. 発表標題<br>The effect of maternal experiences on spatial learning and hippocampal neural plasticity. |
| 3. 学会等名<br>The 48th Society for Neuroscience   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤岡仁美、船橋利也、明間立雄  |
| 2. 発表標題<br>LPS急性ストレスによるGnRHサージ発生機構の活動抑制とミノサイクリン前投与による抑制解除へのkiss1ニューロンの関与 |
| 3. 学会等名<br>第45回日本神経内分泌学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yuji Ogura, Mitsutoshi Kurosaka, Shuichi Sato, Takashi Kotani, Hiroto Fujiya, Toshiya Funabashi    |
| 2. 発表標題<br>Possible involvement of early growth response 3 in age-related reduction of muscle satellite cells |
| 3. 学会等名<br>2018 New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference                           |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>福島篤, 明間立雄, 船橋利也  |
| 2. 発表標題<br>血小板由来成長因子受容体 (PDGFR ) を介した細胞内シグナルは行動量を変化させることによりマウス視床下部による摂食の調節に関与する |
| 3. 学会等名<br>第45回日本神経内分泌学会学術集会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Atsushi Fukushima, Hiroko Hagiwara, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi   |
| 2. 発表標題<br>Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor -mediated signal transduction is involved in controlling feeding behavior by the hypothalamus in male mice |
| 3. 学会等名<br>The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Atsushi Fukushima, Hiroko Hagiwara & Toshiya Funabashi  |
| 2. 発表標題<br>Expression of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR )-immunoreactivity (ir) is suppressed by refeeding after 48-h fasting in the hypothalamus of male mice |
| 3. 学会等名<br>The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>小倉裕司, 黒坂光寿, 明間立雄, 船橋利也     |
| 2. 発表標題<br>骨格筋再生過程におけるTRPV1の役割        |
| 3. 学会等名<br>生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) |
| 4. 発表年<br>2017年                       |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大野真弘, 藤谷博人, 後藤勝正, 黒坂光寿, 小倉裕司, 谷田部かなか, 工藤貴章, 小林創, 内野彩, 油井直子, 船橋利也, 幸田和久, 明間立雄, 仁木久照, 武者春樹 |
| 2. 発表標題<br>ACL切断ラットにおける膝関節周囲筋群の長期経過観察 ACL切断肢, 対側肢および健常肢の比較  |
| 3. 学会等名<br>第32回日本整形外科学会基礎学術集会   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>工藤貴章, 藤谷博人, 後藤勝正, 黒坂光寿, 小倉裕司, 谷田部かなか, 大野真弘, 小林創, 船橋利也, 幸田和久, 仁木久照, 武者春樹 |
| 2. 発表標題<br>微弱電流刺激と高気圧酸素療法の併用による骨格筋損傷の修復促進効果  |
| 3. 学会等名<br>第32回日本整形外科学会基礎学術集会  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小倉裕司, 黒坂光寿, 明間立雄, 船橋利也                |
| 2. 発表標題<br>Egr3はNF- $\kappa$ B経路を介して筋芽細胞の増殖を制御する |
| 3. 学会等名<br>第72回日本体力医学会大会                         |
| 4. 発表年<br>2017年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hiroko Hagiwara, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi, Toshiya Funabashi  |
| 2. 発表標題<br>Sex specific changes in mEPSC of CRH neurons in the lateral BST in CRF-Venus Neo mice in association with formalin test |
| 3. 学会等名<br>The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

## 〔図書〕 計2件

|                    |                             |
|--------------------|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>船橋利也     | 4. 発行年<br>2019年             |
| 2. 出版社<br>医学書院     | 5. 総ページ数<br>1172(1045-1066) |
| 3. 書名<br>標準生理学 第9版 |                             |

|                                  |                           |
|----------------------------------|---------------------------|
| 1. 著者名<br>船橋利也(訳) John E Hall(著) | 4. 発行年<br>2018年           |
| 2. 出版社<br>エルゼビア・ジャパン             | 5. 総ページ数<br>1059(934-948) |
| 3. 書名<br>ガイトン生理学                 |                           |

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

-

## 6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 長谷 都<br><br>(Nagatani Miyako)<br><br>(20450611)   | 聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授<br><br><br>(32713) |    |
| 研究分担者 | 萩原 裕子<br><br>(Hagiwara Hi roko)<br><br>(90468207) | 聖マリアンナ医科大学・医学部・助教<br><br><br>(32713)  |    |