

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06880

研究課題名（和文）心の性決定神経回路形成を主導する思春期エストロゲン

研究課題名（英文）Pubertal estrogen leads to formation of neural network for sexual orientation

研究代表者

濱田 知宏（Hamada, Tomohiro）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90312058

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳には解剖学的な性差があり、視索前野性的二型核は雄で有意に大きい神経核として有名である。本研究の目的はこの神経核を中心とする神経回路が性指向性に寄与し、その神経回路形成に思春期エストロゲンが重要であるという仮説を検証することである。結果として、思春期エストロゲンにより発情雌が雄の匂いを好むようになり、性差のある脳領域が活性化され、視索前野性的二型核ニューロンが雌の性行動中枢である視床下部腹内側核に投射していることが示され、思春期エストロゲンの性指向性に対する作用の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性指向性は心の性のひとつであるが、LGBTQsに見られるように、ヒトでは多様性が存在する。その多様性発現の機序を考える上で、本研究の成果は学術的・社会的意義があると考えられる。思春期は視床下部一下垂体－性腺軸が機能的に完成する時期で、そのダイナミックな内分泌環境の変化のため、思春期特有の精神疾患が問題となっている時期でもある。本研究成果はLGBTQs発現の機序解明に寄与するだけでなく、他の精神疾患への応用につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：There are anatomical sex differences in the brain, and the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area is well known as a nucleus that is larger in males. The purpose of this study was to test the hypothesis that neural circuits centered on this nucleus contribute to sexual orientation and that puberty estrogen is important in the formation of these neural circuits.

The results showed that puberty estrogen induces estrous females to prefer male odors, activates sexually dimorphic brain regions, and projects the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area neurons to the ventromedial hypothalamic nucleus, the center of female sexual behavior, revealing one aspect of puberty estrogen's effects on sexual orientation.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：思春期 性指向性 視索前野性的二型核 分界条床核 エストロゲン 性差

## 1. 研究開始当初の背景

生物学的な性は遺伝子で決まり、雌と雄に区別される。しかし心の性は雌と雄に区別できるほど単純ではなく、雌と雄の間には多種多様な色合いが存在する。近年、社会的な問題となっている「性同一性障害」は生物学的性と心の性が一致しないものであるが、これは決して障害ではなく、心の多様性がもたらすものという立場があり、2013年米国精神医学会では“gender dysphoria”に呼称を変更することが決定され、日本精神神経学会は「性別違和」という訳語を制定している。

ヒトの心の性は性自認、性的役割、性的指向の成分に概念化できると考えられている。性自認とはそのヒトの性別に関する自己表現、性的役割とは性別の典型的行動を示す心理学的特徴、性的指向とは性愛的関心の方向と定義されており、それらの発達は脳機能を基盤として、様々な環境因子に影響されると考えられている。

一方で脳には解剖学的な性差があり、機能的な性差の基盤として考えられている。例えば視索前野性の二型核 (SDN-POA, 1) や分界条床核主部 (BNSTp, 2) は雌に比べ雄で有意に大きい神経核であるが、雄に指向性のある雄ヒツジの SDN-POA は雌並みに小さいことが知られている(3)。ヒトでも相同の神経核が存在し(4)、性別違和の男性は女性並みに小さかったという報告がある(5,6)。またヒト BNSTp でも同様の知見が得られており(7,8)、これら性差の存在する神経核が性分化異常の責任部位であることが想定されているが、その詳細はほとんどわかっていない。本研究では、この心の性差形成機構に思春期のステロイドホルモン環境が重要であるという仮説に基づき、解剖学的な性差のみならず、機能的な性差形成機構を明らかにすることを目的とする。

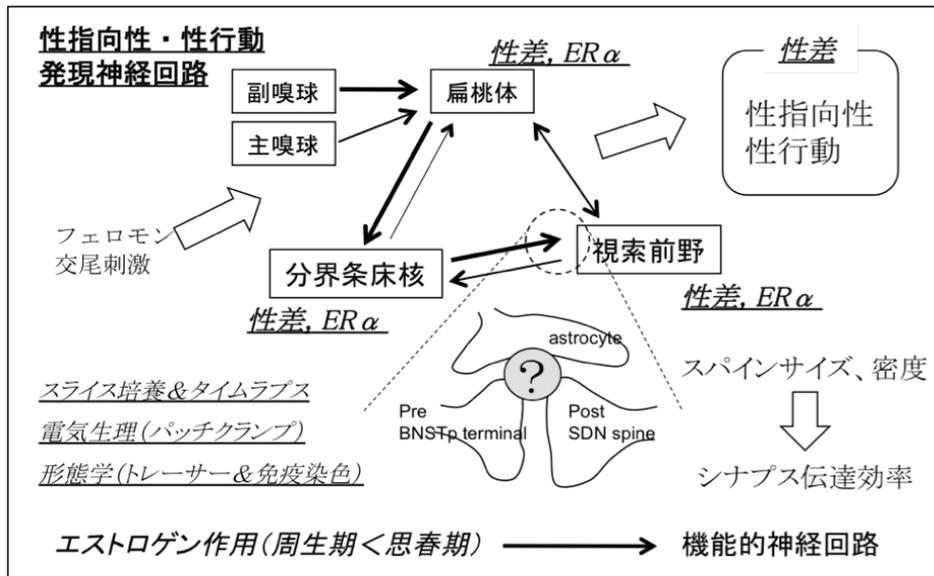
ラット SDN-POA や BNSTp の性差形成機構は、出生前後の critical period におけるステロイドホルモン環境が重要で、性ホルモンが影響しなければ雌型になるが、雄胎仔精巣から一過性に分泌されるテストステロンがアロマターゼによる芳香化でエストロゲンに変換され、作用すると雄性化を引き起こすことが示されていた。我々は SDN-POA や BNSTp を特異的に可視化し (ER-GFP 遺伝子改変ラット、9)、神経核形成過程をスライス培養とタイムラプス記録を用いた *in vitro* で観察し得るシステムを構築することで、これらの性差がエストロゲンの細胞移動制御作用により形成されることを明らかにしてきた。しかし、脳機能は神経核のサイズよりむしろ神経回路で担われるもので、また、性指向性が現れるのは思春期以降であり、critical period だけでなく、思春期に焦点を絞った研究推進が必要であると思われた。

思春期はさまざまな問題行動が発症しやすい時期として知られており、不安行動の過剰や不足、性指向の逸脱などがその基盤となっている。性別違和の来院数で比較すると、思春期前は男児が多く、思春期以降は性差が少なくなる(10)。思春期前の差は critical period における性ホルモン作用不足が原因と考えられ、思春期後に差がなくなるのは、思春期の性ホルモン作用不足等で、女性の性指向性に対する違和感が増加するためと考えられる。つまりこれら臨床知見からも、性指向性神経回路が機能的に完成するのは思春期であることが想定された。

## 2. 研究の目的

本研究では「心の性」の指標として「性指向性」に着目し、性指向性神経回路の機能的な完成機構を、行動学的、形態学的、電気生理学および *in vitro* イメージングにより明らかにすることを目標とした。概念図に示すように、嗅球、扁桃体を介して BNSTp や SDN-POA に至る経路が考えられている。これらの領域に特徴的なのは、解剖学的性差が存在し、 $\alpha$ 型エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) を発現するニューロンが局在している点である(11)。また ER $\alpha$  ノックアウトマウスでは性指向性が見られない(12)ことから、エストロゲン-ER $\alpha$  は性指向性発現のキープレーヤーであると考えられることができる。

さらにエストロゲンはシナプスやスパイン形成を促進することが示されている(13)。神経回路の中で細胞間の結合の度合いが変化することが機能的な変化につながることから、本研究では思春期エストロゲンの SDN-POA および BNSTp ニューロンのシナプスおよびスパイン形成調節により、機能的に性指向性神経回路が完成するという仮説を検証することを目的とした。



本研究の概念図 性指向性・性行動発現神経回路は性差およびERαを発現する領域で構成され、特に思春期のエストロゲンが、この回路におけるスパイン形成を促進することが、機能的神経回路完成に寄与するという仮説を、BNSTpから入力を受けるSDN-POAニューロンに着目して検証する。

### 3. 研究の方法

ER-GFP ラットにより特異的に可視化された SDN-POA と BNSTp を活用し、性指向性神経回路完成に対する思春期エストロゲンの作用機序を明らかにすることを試みた。すなわち①性指向性神経回路に対する思春期エストロゲンの影響に関する行動学的解析、②性指向性神経回路における SDN-POA と BNSTp の役割に関する行動学的解析、③性指向性神経回路の可視化と形態学的解析、④スライス培養とタイムラプス観察によるスパイン形成イメージングなどを実施した。実験動物として SDN-POA(9)と BNSTp を GFP によって特異的に可視化できる ER-GFP ラットを用いた。

(1) 性指向性神経回路における思春期エストロゲンと性的二型核の関与

性指向性テストは研究分担者の佐久間ら(14)が開発した装置(図1A)を用いた。性指向性は、中央の被験動物が左右の刺激動物の匂いを嗅ぐ時間を測定し判定される。思春期後に卵巣摘除した動物は、エストロゲン投与で発情させると、初回のテストでも性指向性が観察されるが、思春期前卵巣摘除では初回テストで性指向性が観察されず、卵巣摘除後、思春期エストロゲン環境を模倣した場合は、初回テストから性指向性を示すという仮説の検証を行った。

(2) 性指向性神経回路の可視化

性指向性テスト時に活性化される神経細胞に関し cFos 発現を指標に検討した。cFos は神経細胞活性時に発現する分子である。また脳定位手術による蛍光トレーサーの微小注入(15)を組み合わせ、形態学的な検討を行うことで性指向性回路の同定を試みた。

(3) エストロゲンによる性指向性神経回路形成

エストロゲンによる性指向性神経回路形成過程を、思春期前雌脳を用いたスライス培養とタイムラプスイメージングを用いて検討した。SDN-POA 及び BNSTp を含む脳スライスを界面培養し、GFP 蛍光を指標にタイムラプス観察を行い、培養液中エストロゲンの有無でのシナプスやスパイン形成の違いについて検討した。

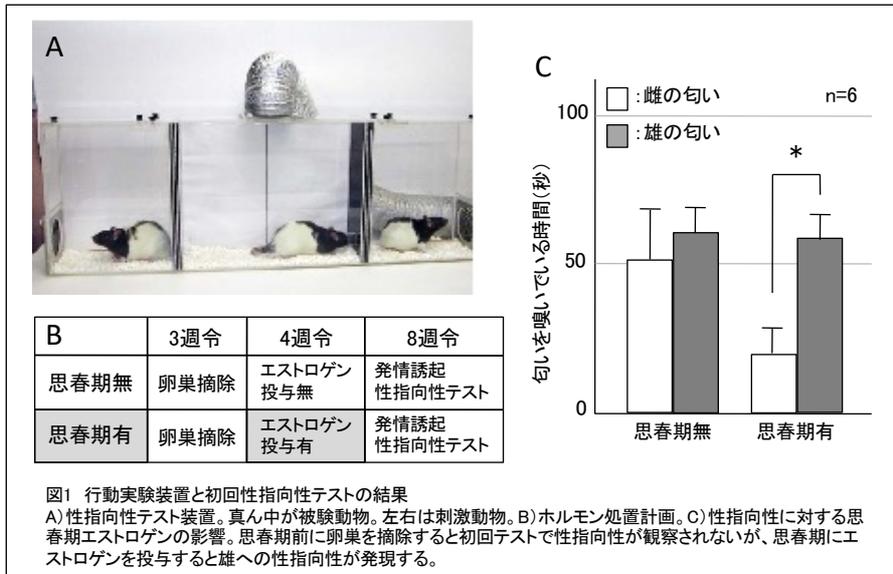
(4) 供試していた遺伝子改変ラットの繁殖成績が落ち、十分な研究を進めることが難しくなったため、別の動物を用い神経細胞の活性化をリアルタイムに観察しうるシステム構築を試みた。すなわち cFos 発現に伴って赤色蛍光タンパクを発現するトランスジェニックラット (cFos-mRFP, 16) の脳神経初代培養細胞を用い、興奮性アミノ酸投与時のタイムラプス記録を行った。

### 4. 研究成果

(1) 性指向性神経回路における思春期エストロゲンと性的二型核の関与 (図1)

性指向性形成に対する思春期エストロゲンの役割は、研究分担者らが開発した行動実験装置を用いて検討した。ラットの場合、性指向性は主として匂い刺激によりもたらされ、発情雌は通常、成熟雄の匂いに指向性を示すが、思春期前に卵巣摘除すると、ホルモン処置で発情させても成熟雄への指向性を示さなかった。一方で卵巣摘出後、思春期を模倣する形でホルモン投与をすると、成熟雄への指向性を示し、性指向性に関わる神経回路形成に思春期のエストロゲンが必要

であることが示唆された。



### (2) 性指向性神経回路の可視化 (図2)

神経活動の指標である cFos 発現について検討したところ、性指向性発現時に性差のある領域とその周辺の活性化が観察された。また、蛍光トレーサー脳内微小注入により GFP でラベルされた神経細胞が、雌の性行動中枢である視床下部腹内側核に投射していることが示唆された。

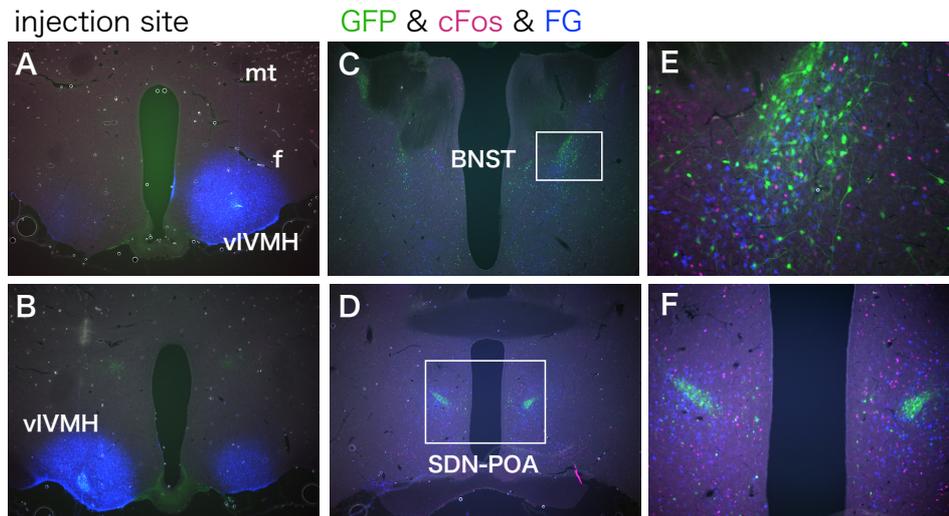


図2 逆行性蛍光トレーサー (FG) を左右腹内側核 (VMH) に微小注入し、性指向性試験を実施したER-GFP ラットの脳切片蛍光顕微鏡写真。AとBはFG注入部位。分界条床核 (BNST, CおよびE) と視索前野性的二型核 (SDN-POA, DおよびF) はGFPを発現しており、緑に光った細胞が集積している。それらとその周囲に青く光る細胞が見られ、これらの細胞はVMHへ投射している。またマゼンタに光るのは活動した神経細胞のマーカである cFosの局在で、性指向性試験時に活動した神経細胞がBNSTやSDN-POAおよびその周辺に観察される。

### (3) エストロゲンによる性指向性神経回路形成

性指向性に関わる神経回路を含む視床下部スライス培養を用いて、思春期におけるエストロゲンの影響を観察することを試みたところ、視索前野性的二型核におけるスパイン数が増加する傾向が見られたが例数が少なく、結論に至るには今後の研究によるところが大きい。

(4) 神経細胞の活性化をリアルタイムに観察する目的で、cFos 発現に伴って赤色蛍光タンパクを発現するトランスジェニックラットの脳神経初代培養細胞のタイムラプス記録を行ったところ、興奮性アミノ酸を培養液中に投与することで、赤色蛍光タンパクが発現する過程を観察することができた。これにより、個々の神経細胞がどのような神経伝達物質に反応するかを網羅的に解析することが可能となると思われる。

### <引用文献>

1. Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res*, 148:333-346, 1978
2. del Abril A, Segovia S, Guillamon A. The bed nucleus of the stria terminalis in the rat: regional sex differences controlled by gonadal steroids early after birth. *Brain Res*, 429:295-

300, 1987

3. Roselli CE, Larkin K, Resko JA, Stellflug JN, Stormshak F. The volume of a sexually dimorphic nucleus in the ovine medial preoptic area/anterior hypothalamus varies with sexual partner preference. *Endocrinology*, 145:478-483, 2004
4. Swaab DF, Fliers E. A sexually dimorphic nucleus in the human brain. *Science*, 228:1112-1115, 1985
5. LeVay S. A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science*, 253:1034-1037, 1991
6. Swaab DF, Hofman MA. Sexual differentiation of the human hypothalamus in relation to gender and sexual orientation. *Trends Neurosci*, 18:264-270, 1995
7. Zhou JN, Hofman MA, GoorenLJ, Swaab DF. A sex difference in the human brain and its relation to transsexuality. *Nature*, 378:68-70, 1995
8. Kruijver FP, Zhou JN, Pool CW, Hofman MA, Gooren LJ, Swaab DF. Male-to female transsexuals have female neuron numbers in a limbic nucleus. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:2034-2041, 2000
9. Hamada T, Sakuma Y. Estrogen receptor  $\alpha$  gene promoter O/B usage in the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Endocrinology*, 151:1923-1928, 2010
10. Cohen-Kettenis PT, Pfafflin F. The DSM diagnostic criteria for gender identity disorder in adolescents and adults. *Arch Sex Behav*, 39:499-513, 2010
11. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 294:76-95, 1990
12. Wersinger SR, Rissman EF. Oestrogen receptor alpha is essential for female-directed chemo-investigatory behaviour but is not required for the pheromone-induced luteinizing hormone surge in male mice. *J Neuroendocrinol*, 12:103-110, 2000
13. Woolley CS, McEwen BS. Role of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol*, 336:293-306, 1993
14. Kondo Y, Sakuma Y. The medial amygdala controls the coital access of female rats: a possible involvement of emotional responsiveness. *Jpn J Physiol*, 55:345-353, 2005
15. Zhang CX, Hamada T, Huang M. Nerve connections of sexually dimorphic nucleus of preoptic area. *Journal of Jilin University Medicine Edition*. 36:281-284, 2010
16. Fujihara H, Ueta Y, Suzuki H, Katoh A, Ohbuchi T, Otsubo H, Dayanithi G, Murphy D. Robust up-regulation of nuclear red fluorescent-tagged fos marks neuronal activation in green fluorescent vasopressin neurons after osmotic stimulation in a double-transgenic rat. *Endocrinology*, 150:5633-5638, 2009

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakuma Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Mechanisms of Behaviors Related to Reproduction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience in the 21st Century	6. 最初と最後の頁 1783-1794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4614-1997-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱田知宏、佐久間康夫
2. 発表標題 エストロゲンの細胞移動制御によるラット視索前野性的二型核の雄性化
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro Hamada, Yasuo Sakuma
2. 発表標題 Sexual differentiation of the preoptic area by estrogen-induced cell migration through Rac1 pathway
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐久間 康夫  (Sakuma Yasuo)  (70094307)	日本医科大学・大学院医学研究科・研究生    (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------