

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590285

研究課題名(和文) 組み換えアデノウイルスベクターを用いた脳の性差形成機構の解明

研究課題名(英文) Physiological function of the rat SDN-POA analyzed by sst-siRNA recombinant adenovirus vector

研究代表者

折笠 千登世 (Orikasa, Chitose)

日本医科大学・付置研究所・講師

研究者番号：20270671

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)：本研究では、SDN-POAに発現するソマトスタチンの生理機能解析のために、ラットソマトスタチン遺伝子に対するsiRNA発現組換えアデノウイルスを用いて、脳内に局所感染させ部分的にソマトスタチン遺伝子をノックダウンすることで、性的二型核性差形成(SDN-POA)にかかわる生理機能及び嗅覚選好性を含めた性行動に及ぼす影響の有無を検討した。組換えアデノウイルスの脳への感染効率が低く感染に対する効果を確認することができなかったため複数のソマトスタチンsiRNA混合液による脳内に局所投与を行った。ソマトスタチン発現SDN-POAは、雄の性行動に影響のある神経核としての関連性を見出すことができなかった。

研究成果の概要(英文)：We have shown earlier that during development, somatostatin (sst) gene is transiently transcribed in neurons in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area (SDN-POA) characterized by calbindin immunoreactivity. We hypothesized that mechanisms other than apoptosis are involved in the establishment of the SDN-POA. BrdU immunoreactivity showed up in calbindin-labeled neurons in the SDN-POA of PD15 cohorts treated on 14, 16 or 18 embryonic days (ED). The number of BrdU-positive neurons was largest in animals given BrdU on 18 ED. Daily injections of BrdU during postnatal day 1-10 labeled a few calbindin-immunoreactive cells in the SDN-POA of PD15 brain of male and female rats. Next step, we analyzed the physiological function of the male rat SDN-POA by the treatments of sst-siRNA recombinant adenovirus vector and esi sst-siRNA followed by preference and sexual behavior test. Sst neurons expressed in the SDN-POA are unlikely involved in sexual behavior of male rat.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：SDN-POA calbindin ソマトスタチン 性的二系核 siRNA sexual behavior male rat

## 1. 研究開始当初の背景

### ステロイドホルモンによる生後の細胞新生の有無についての検討

我々は、視索前野性の二型核 (SDN-POA) に、ソマトスタチンの発現を見出し、性差が認められることを明らかにした (Orikasa ら 2007)。ソマトスタチンの SDN-POA での発現は、生後 8 日目までは形態学的な差異を示しておらず、生後 15 日になってはじめて雌雄で神経核の大きさの差が顕著になっていた (図 1)。

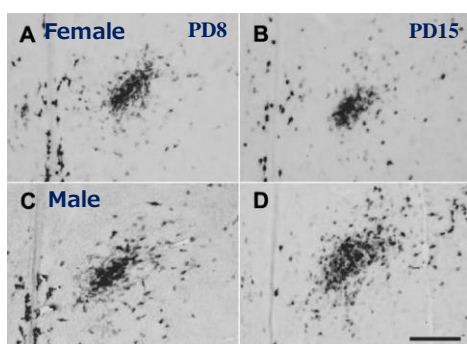


図 1

## 2. 研究目的 1

これらの事実は、脳の性差形成においては、生後のステロイドによってダイナミックな変化を引き起こされる可能性を示唆していた。Jacobson ら(1985)は  $[^3\text{H}]$ -thymidine を用い、視索前野の脳室周囲にある細胞が脳室上衣層から側方に移動していく様子を報告しているが、胎生期に誕生した神経細胞が、性による差や生後のステロイドによる処理によって差が認められなかったため、その後現在にいたるまで SDN-POA の性差成立は細胞死によっているとする説が有力である (Arai ら 1986)。しかし TUNEL 法によるある瞬間の細胞死を捉える方法は、細胞死を起こした数が 1000 個中 10 個から 20 個前後と圧倒的に少なく、また同一切片上で、SDN-POA の隣接脳領域でエストロゲンによる影響に対する調査データも示されていないという問題点があげられ、SDN-POA の性差の成

立がすべて細胞死によっているとする考えはいささか疑問である。BrdU を出生直後に投与し、従来光学顕微鏡により観察してきたが、共焦点レーザー顕微鏡を用い詳細に検討した結果、生後にも神経細胞新生が引き起こされる可能性がでてきた。

## 3. 研究方法 1

### Bromodeoxyuridine (BrdU) による細胞新生時期の検証

$[^3\text{H}]$ thymidine と同様に分裂細胞に取り込まれることがわかっている BrdU によって細胞新生時期の調査を行なった。妊娠 14 日、16 日、18 日目の母ラットに BrdU を投与し、生後 15 日目の雌雄ラットの SDN-POA の細胞新生時期を調べた。calbindin をマーカーとしそれに対する抗体を用い、性的二型核の特定を行い BrdU 陽性神経細胞との二重染色を試みた。性的二型核を構成する細胞が、どれくらいの割合で BrdU 陽性であるか、性差はあるのかの検討を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に行った。

## 4.1 研究結果 1

### Bromodeoxyuridine (BrdU)

BrdU を妊娠 14 日、16 日、18 日目の母ラットに投与し生後 15 日における神経細胞の凝集を観察した。雌雄において胎生期 18 日目に誕生した細胞が SDN-POA の形成に寄与していることが明らかとなった (図 2)。

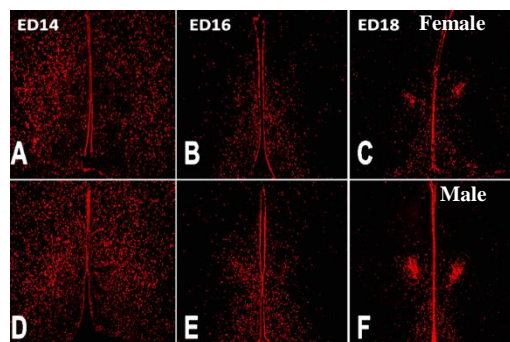


図 2

カルビンジンと BrdU の免疫組織化学による共陽性細胞の組織化学を行った結果、胎生期 18日目に誕生した細胞が SDN-POA のマーカータンパクを持っている細胞に最も多く存在していた (図 3)。その割合には雌雄の差がなかった。

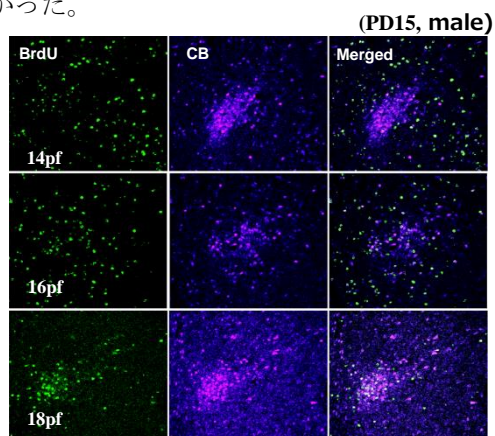


図 3

SDN-POA の大きさを決定する要因として生後の細胞新生の有無を検討した。生後、生まれてすぐの仔ラットに BrdU を 10 日間連続投与して SDN-POA を形成する細胞が、生後に新生されているのかどうかの検討を行った。共焦点レーザー顕微鏡による解析によって、SDN-POA において、生後の細胞新生があることを示唆する染色像が得られた (図 4)。

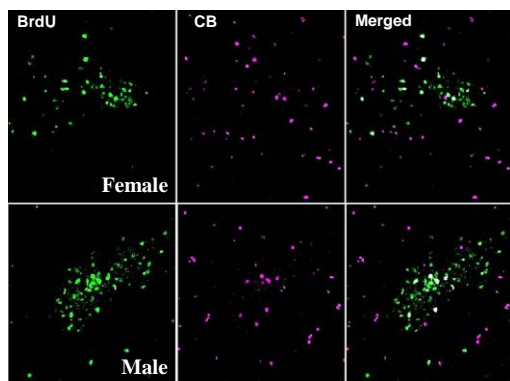


図 4

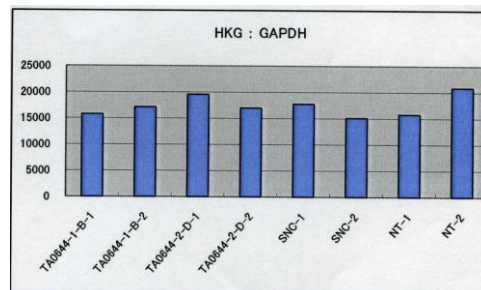
## 4.2 研究方法 ・ 結果 2

### SDN-POA の生理機能の解析 組換えアデノウイルスベクターの遺伝子導入 による検討

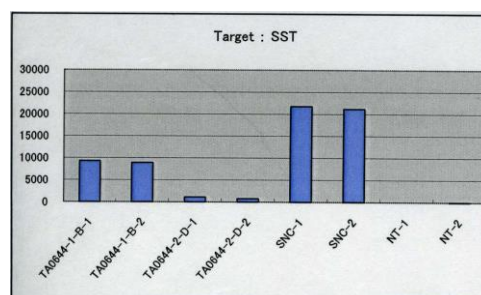
SDN-POA に発現するソマトスタチンの生理機能解析のために、ソマトスタチン遺伝子

を脳内に局所感染させ部分的にノックダウンすることを目的として、ラットソマトスタチン遺伝子に対する siRNA 発現 EGFP 組換えアデノウイルスベクターを作成した。まず、ソマトスタチンに対する siRNA 遺伝子導入効率の検討を 293 細胞用い、リアルタイム PCR 法にて検討した (図 5-7)。ソマトスタチン siRNA は、ラットのソマトスタチンに対して 1 種類のみを含む siRNA 組み換えアデノウイルス発現ベクターであり組み換えコスミド pAxcwit2-TA0644-2 を用いた完全長 DNA 導入法により作成した。対照群としてスクランブルネガティブコントロール発現プラスミドを用いた。このコントロールプローブはヒト、マウスおよびラットの Unigene 代表配列に対して BLAST 検索によって 19 塩基中、16 塩基以上の相同性が認められないものを用いた。このようにして得られた組み換えコスミドを大腸菌 DH5  $\alpha$  にトランスフォームし拡大調整した。293細胞に制限酵素 Bspt104I でダジェストしたコスミドをトランスフェクトし 1 次から 4 次ウイルスまで作成した。Hela 細胞に最終 4 次ウイルスを感染させ組み換えアデノウイルスの感染性の確認を行った。

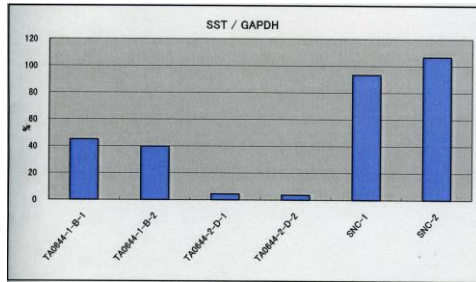
RT-PCR(ソマトスタチン) (図 5)



RT-PCR(DAPDH) (図 6)



ソマトスタチンの遺伝子発現量 (図 7)



### 4.3 組換えアデノウイルスベクター投与による行動学的解析 1 方法・結果

幼若期の脳にソマトスタチン EGFP 組み換えアデノウイルスベクターを感染させ、性成熟が完了したのち preference テストの検討を行った。しかしながら、EGFP 組み換えアデノウイルスベクターの脳への感染効率が低く感染に対する効果を確認することができなかった。

#### 4.4.1 ソマトスタチン siRNA 投与による行動学的解析 2 方法

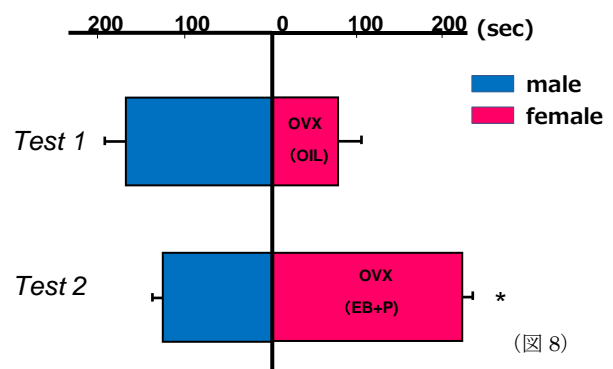
そこで複数のソマトスタチン esi-siRNA 混合液による投与を行った。神経細胞に感染させやすくすることができる薬剤 (INTERFERRin) 用い、長く siRNA が投与部位にとどまることができる様調整し、嗅覚選好性を含めた性行動に及ぼす影響の有無を siRNA 投与 3-4 週間後に検討した。嗅覚選好性を含む性行動テストで用いるテストケージは、3つの仕切りで区切られており、中央にソマトスタチン siRNA 投与のテスト動物をおき、両側にそれぞれ異なる条件の刺激雌雄ラットを提示した。刺激成体雄ラットをアクリル板で仕切ったテストケージの左か右におき、対照群として、卵巣摘除し摘除 1 週間後に oil を投与した雌ラットを、雄とは反対側に提示し、嗅覚選好性の行動テストを行った。さらにその 1 週間後に卵巣摘除の雌に Estradiol benzoate (EB) と

progesterone(P)を投与し発情状態にした上で、上述と同様に雄とは反対側に雌ラット (EB+P)を提示し嗅覚選好性行動テストを行った。

#### 4.4.2 結果

その結果、OIL 投与対照群雌ラットを提示した場合は、雄の匂いをかぎに行った時間との有意な差は認められなかった(図 8-test1)。卵巣摘除 EB+P 投与雌ラットを示した場合に、雄の匂いかぎ時間との間に有意な差が認められ匂いかぎ時間が長じていた (図 8-test2)。この結果から、嗅覚選好性の行動テストにおいて、ソマトスタチン siRNA 投与による効果がないと判断された。すなわち、OIL 投与の卵巣摘除雌提示では、雄の匂いをかぎに行く時間に差がなかったのに対して、卵巣摘除し EB+P を投与した雌ラットを提示した場合には、雌の匂いかぎ時間が有意に増大した。これらの結果は、通常の成熟雄ラットの行動に類似した行動と判断され、ソマトスタチン siRNA 投与による嗅覚選好性の行動に効果がないと推察された。また、EB+P 投与卵巣摘除雌ラット対しての性行動においても、正常雄ラットの性行動との差は認めず、この点においても雄の性行動に影響のある神経核としての関連性を見出すことができなかった (図 8)。

sst-siRNA 投与雄ラットの匂いかぎ時間



(図 8)

## 引用文献

- Orikasa C, Kondo Y, Sakuma Y 2007 Transient transcription of the somatostatin gene at the time of estrogen-dependent organization of the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area. *Endocrinology* 148: 1144-1149.
- Jacobson CD, Davis FC, Gorski RA 1985 Formation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: neuronal growth, migration and changes in cell number. *Brain Res* 353: 7-18.
- Arai Y, Sekine Y, Murakami S 1996 Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res* 25:403-407.

## 5. 主な発表論文等

- 1) 折笠千登世 “ラット脳視索前野性的二型核及び分界上床核二領域の非連続的神経核形成” エストロゲンと本能行動 “第17回 “性と生殖” 公開シンポジウム (東京, 早稲田大学, 2011)
- 2) Orikasa C., Kondo Y., Usui S. & Sakuma Y “Neurons in the sexually dimorphic nucleus are born later in the embryonic rat brain than those in the surrounding preoptic area” 15 th Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology (June 23-26 in Mexico) (2011)
- 3) Orikasa C., Kondo Y., Usui S. Sakuma, Y. ”Neurons in the two sexually dimorphic structures of the rat brain were born on different embryonic days” 第 89 回日本生理学会大会 (2012)
- 4) Orikasa C. Nagaoka K. Kondo Y. & Sakuma Y. “Display of paternal mouse pup crouching behavior following social isolation of virgin males” 第 36 回日本神経科学大会 (2013)
- 5) Orikasa C. Nagaoka K. Kondo Y. Minami S. & Sakuma Y. “Mouse pup retrieval and crouching behavior following social isolation in virgin malemice” (Aug. 17-20 in Sydney) (2014)
- 6) 折笠千登世, 永岡健太郎, 近藤保彦, 南史朗, 佐久間康夫 “社会的隔離条件下における性的未経験マウスの養育行動” 第 37 回日本神経科学学会大会 (横浜パシフィコ, 9.11-9.13, 2014)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
折笠千登世 (ORIKASA, Chitose)  
日本医科大学・付置研究所・講師  
研究者番号：20270671
- (2) 連携研究者  
三宅弘一 (MIYAKA, Koichi)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90267211