

機関番号：32666

研究種目：研究基盤(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590238

研究課題名(和文) エストロゲンで誘導される神経細胞移動と脳の性差形成

研究課題名(英文) Sex steroids and the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area

研究代表者

折笠 千登世 (ORIKASA CHIOTSE)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20270671

研究成果の概要(和文)：視索前野性的二型核(SDN-POA)の細胞新生は雌雄ともに胎生期18日にもっとも多く認められたが、これら生後の神経核を形成する細胞総数に性差は認められなかった。ソマトスタチン発現細胞の発達時期による分布状況からSDN-POAの性差形成には、生後の細胞新生による増加というよりは、雄においてニューロンが神経核の中心から放射状に側方に移動したため性差が形成されたと推察された。

研究成果の概要(英文)： Although the SDN-POA was significantly larger in males than in females at PD15, the total numbers of neurons comprising the SDN-POA were not significantly different between sexes. Sexual dimorphism in the SDN-POA results from male-specific postnatal radial spreading of cells rather than cell proliferation during embryonic neurogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：環境生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：性差, エストロゲン, 神経細胞移動, 脳・神経, 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの研究で、脳の性差形成の要因は、ステロイドにより細胞死が引き起こされるためとされてきた(Araiら1986)。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、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AVPVや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。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、AVPVや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、AVPVやSDN-POAの性差の成立がすべて細胞死によっていると考えるのはいささか疑問である。

(2) 我々のこれまでの研究で、AVPVにおけるエストロゲン受容体 β 分布における性差は、エストロゲン受容体 β 陽性細胞が生後のステロイドによる影響で、内側視索前野の側方領域に移動して起こると推察される染色像が得られている (Orikasa ら 2002)。一方、雄のSDN-POA に発現するソマトスタチン陽性細胞の神経核サイズは、生後2週間まで増加しその後減少していく傾向にあるのに、雌では一過的な増加を認めなかった(Orikasa ら 2006)。陽性細胞が発現する神経核サイズの増加は細胞数の増加を反映するものと考え、生後のステロイド影響下で性差が引き起こされるため、雄では神経細胞新生が行われていると考えた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、まずこれら性的二型核の神経核形成において、胎生期におこる前駆細胞の移動に着目し、雌雄で異なるのか、視索前野性的二型核(SDN-POA)の細胞新生の主要な時期を検討する。

(2) 生後の性ホルモンの影響による細胞新生に焦点をあてて性差形成の解析を行う。

3. 研究の方法

神経細胞移動

①Bromodeoxyuridine (BrdU) による細胞新生時期の検証

[³H]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う。妊娠14日、16日、18日目の母ラットにBrdUを投与し、生後14日令の雌雄ラットの視索前野性的二型核 (SDN-POA) の細胞新生時期を調べる。SDN-POAについてはcalbindinをマーカーとしてする。そのためcalbindinに対する抗体を用いSDN-POAの同定を行い、BrdU陽性神経細胞との二重染色を試みる。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う。

②ソマトスタチンmRNAの発現解析

SDN-POAにおける、ソマトスタチンの発現を周生期のホルモン操作を行いin situ hybridization法により生後の発育時期に解析を行う。SDN-POAステロイドホルモンの影響をより詳細に検討する。

生後の神経細胞新生

生後の神経細胞新生の有無と性による差の検討

性的二型核で特定された神経細胞新生を生後の時期に行われるかどうかの検討をBrdUを生後5日間連続して投与し、生後14日令の雌雄ラットにおいて調べる。SDN-POAのマーカータンパク (上述①) とBrdU免疫組織化学による二重染色によって調べる。共焦点レーザー顕微鏡を用い共存の割合を算定し、定量的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 胎生期14日(A, D), 16日(B, E), 18日(C, F)にBrdUでラベルした細胞の生後15日における視索前野でのBrdU陽性細胞の分布の様子から(図1)胎生期の18日に生まれた細胞が雌雄ラットのSDN-POAに最もよく集積していた。胎生期14日に生まれた細胞は雌雄ともに視索前野全体に散在していた。胎生期16日に誕生した細胞ではSDN-POAに集積しつつある像が得られた。

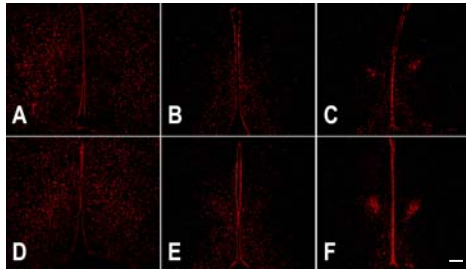


図 1

(2) 胎生期 14 日 (A, D), 16 日 (B, E), 18 日 (C, F) (図 2) に BrdU でラベルした細胞の生後 15 日における視索前野での BrdU 陽性細胞と SDN-POA のマーカータンパクである calbindin 抗体との共存を調べた。二重染色によってそれぞれの誕生時期での SDN-POA で占める割合と雌雄差について解析した。BrdU とカルビンジンとの共存が見られる細胞は胎生期 18 日に誕生した細胞 (図 2、C, F) が最も多く SDN-POA を構成する細胞の 40% 近くを示していた。しかし、雌雄の差は認められなかった (図 3)。胎生期 14 日 (A, D), 16 日 (B, E) に誕生した細胞も SDN-POA を構成する細胞として検出されたが、同様に雌雄差は認められなかった。

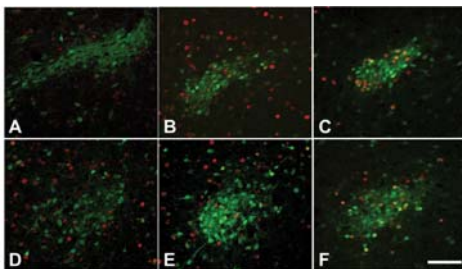


図 2

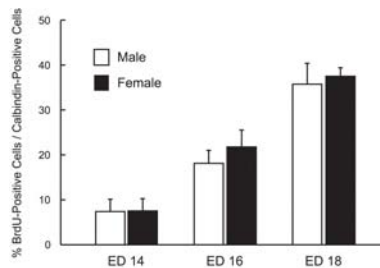


図 3

(4) BrdU を出生直後から連続 5 日間腹腔内に投与し、生後 15 日の雌雄で比較した。カルビンジンを用いて SDN-POA の同定を行い、BrdU と共存する細胞を検討した。出生後にも SDN-POA での細胞新生は検出された。雌雄において SDN-POA の神経核の周辺に共存細胞が

認められた (図 4)。

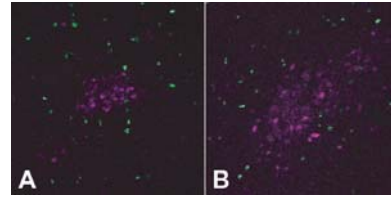


図 4

(3) 生後の SDN-POA でのソマトスタチンの発現を調べた。生後 8 日での発現細胞の分布を調べた結果、雌雄における差は認められなかった (図 5 A, C)。しかし、生後 15 日になると、発現細胞の分布は大きく異なり雄では、周辺に放射状に散在する様相であった (図 5 B, 図 6 B)。雌においてはカルビンジン陽性細胞の凝集は進み神経核の大きさが減少していた (図 5 D, 図 6 A)。

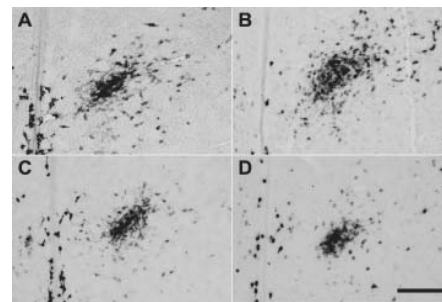


図 5

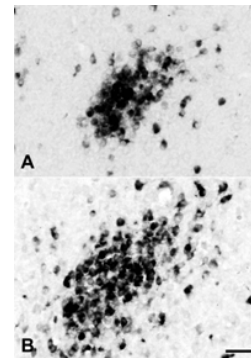


図 6

(5) SDN-POA を構成する細胞の総数に差は認められなかった。

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 8 件)

- ① Orikasa C. and Sakuma Y. “ Estrogen configures the sexual dimorphism in the

- preoptic area of C57BL/6J and ddN strains of mice” *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 518; 3618-3629 (2010) (査読有)
- ② Orikasa C., Kondo, Y., Usui, S. and Sakuma Y. “Similar numbers of neurons are generated in the male and female rat preoptic area *in utero*” *Neuroscience Research*, vol. 68; pp. 9-144 (2010) (査読有)
 - ③ Ishii H, Kobayashi M, Sakuma Y. “Alternative promoter usage and alternative splicing of the rat estrogen receptor gene generate numerous mRNA variants with distinct 5'-ends.” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 118(1/2): 59-69 (2010) (査読有)
 - ④ Hamada T., Sakuma Y. “Estrogen receptor α gene promoter 0/B usage in the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area.” *Endocrinology* 151(4): 1923-1928 (2010) (査読有)
 - ⑤ Orikasa C. “Sex steroids and the establishment of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area, *How Are Neuroendocrine Hypothalamic Structures Sculpted?* “ A Symposium at the 32nd Annual Meeting of Japan Neuroscience Society, Sept 16, 2009, Nagoya, Organizers: Kawata M, Sakuma Y (招待講演)
 - ⑥ Sakuma Y. “Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat.” *Journal of Neuroendocrinology* 21(4):410-414 (2009) (査読有)
 - ⑦ Ishii H, Sato S, Yin C, Sakuma Y., Kato M “Cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, induces the expression of melatonin receptor 1a in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7.” *Neuroendocrinology* 90(3):251-259 (2009) (査読有)
 - ⑧ Orikasa C. “Sex difference of somatostatin gene expression in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area. “ *Complementary Research Strategy for Morphology and Physiology. A symposium organized jointly by Anatomical and Physiological Societies of Japan* at The 85th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 25, 2008, Tokyo. Organizers: Kawata M and Sakuma Y (招待講演)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Orikasa C. and Sakuma Y. “Sexual Dimorphism in the Preoptic Area of C57BL/6J and ddN Strains of Mice.” The 7th International Congress of

- Neuroendocrinology – ICN 2010 (July 11-16 in Rouen) (2010)
- ② Orikasa C., Kondo Y., Usui S. and Sakuma Y. “Sex steroids and the establishment of the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area. “39th SfN the Annual Meeting Abs. (Oct.17-21 in Chicago) (2009)
 - ③ Orikasa C., Kondo Y, Usui S. and Sakuma Y. “Ontogeny of somatostatin neurons in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area.” 36th International congress of physiological Science Abs. (July 27-Aug.1, 2009 in Kyoto) (2009)
 - ④ Orikasa C., Kondo Y., Usui S. and Sakuma Y. “Postnatal neurogenesis does not contribute to estrogen-induced sex difference in the number of somatostatin neurons in the rat preoptic area.” Hormones and Behavior SBN Annual meeting Abs. (June 21-26 in Michigan) (2009)
 - ⑤ Orikasa C. “Sex steroid and the establishment of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area “How are neuroendocrine hypothalamic structure sculpted ?” The 32th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Nagoya, 2009)
 - ⑥ 折笠千登世 ““脳の性差形成とステロイドホルモン”第3回日本医科大学—早稲田大学シンポジウム「成体ホメオスタシスの神経科学的 神経内分泌的制御機構のupdate」(東京, 2009)
 - ⑦ Orikasa C., Kondo Y., and Sakuma Y. “Generation of the somatostatin neurons in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area” Hormones and Behavior SBN Annual meeting Abs. (July 7-10 in Groningen, the Netherlands) (2008)
 - ⑧ Orikasa C. “Sex difference of somatostatin gene expression in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area “ The 85th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 「Complementary research strategy for morphology and physiology」(Tokyo, JAPAN, 2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

折笠 千登世 (ORIKASA CHITOSE)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：20270671

(2) 研究分担者

佐久間 康夫 (SAKUMA YASUO)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70094307

濱田 知宏 (HAMADA TOMOHIRO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：90312058