

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20700292

研究課題名 (和文) 脳の性決定におけるエピジェネティックスの関与の解析

研究課題名 (英文) Analysis of involvement of epigenetics in the sexual differentiation of the brain

研究代表者

松田 賢一 (MATSUDA KEN ICHI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40315932

研究成果の概要 (和文) : エピジェネティックヒストン修飾は発達中の脳にホルモンの作用を伝搬する重要なメカニズムとして注目されている。本申請者は、性ステロイドホルモンによって出生前後の脳内でヒストンのアセチル化状態に変化が生じることが脳の性分化の本体であると仮説を立てた。胎生 21 日の内側視索前野のエストロゲン受容体 α および芳香化酵素遺伝子プロモーターにおけるヒストンアセチル化状態に性差が検出され、生後 3 日までに再変化された。また、ヒストン脱アセチル化酵素 2 および 4 の同プロモータへの結合は雄において有意に高かった。ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、またはヒストン脱アセチル化酵素 2 および 4 遺伝子のアンチセンスオリゴ DNA を新生雄脳室内に投与し、同酵素を阻害したところ、成熟後の雄性行動の発現が抑制された。以上より、出生前後のヒストン脱アセチル化酵素によるヒストンアセチル化状態の性差制御が脳の雄性化に重要な働きを果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : Epigenetic histone modifications are emerging as potentially important mechanisms to convey effect of hormonal milieu to the developing brain. We hypothesized that alteration of histone acetylation status early in development by sex steroid hormones is important for sexual differentiation of the brain. We found that histones associated with the estrogen receptor alpha and aromatase gene promoters in the medial preoptic area were differentially acetylated between the sexes at embryonic day 21, and this difference in acetylation state was rearranged by postnatal day 3. Moreover, histone deacetylase (HDAC) 2 and 4 bound to ERalpha and aromatase promoters at higher frequencies in males than in females. We inhibited HDACs in vivo by intracerebroventricular infusion of the HDAC inhibitor, trichostatin A (TSA), or antisense oligodeoxynucleotide (ODN) directed against the mRNAs for HDAC2 and 4 in newborn male rats, and examined the effects on masculinization of the brain by analyzing male sexual behavior in adulthood. Male sexual behaviors were reduced by either administrations of TSA or antisense ODN during the neonatal period. These results demonstrate that histone deacetylase activity during the early postnatal period plays a crucial role in the masculinization of the brain through sexual dimorphic modifications of histone acetylation status.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：性差、性行動、エピジェネティクス、エストロゲン、アンドロゲン

1. 研究開始当初の背景

近年、性同一性障害者や同性愛者など、体の性と心の性が一致しない人を、社会がどう受け入れていくか、そのような人に性転換治療を認めるかなど、「脳の性」に関わる問題についての議論が活発に行われており、社会的注目度も非常に高い。これらの問題を解決していくためには、まず、「脳の性」が生じるメカニズムについて理解することが必要であると考えられるが、性差形成のメカニズムに関しては不明な点が多い。脳の性差形成に中心的役割を果たしている性ステロイドホルモンの受容体は核受容体スーパーファミリーに属し、リガンド依存的な転写因子である。この機能発現にはヒストンアセチル化やDNAメチル化などのエピジェネティック変化を介することが乳ガン細胞などの系で報告されている。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、脳の性分化におけるクロマチンのエピジェネティック変化の関与について、個体レベル、組織レベルおよび分子レベルの解析で包括的に検証することである。

3. 研究の方法

個体レベル（行動解析）

出生直後の雄ラットの脳室内に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるトリコスタチンA (TSA) およびヒストン脱アセチル化酵素サブタイプ遺伝子のアンチセンスオリゴDNAを投与し、成熟後の性行動を解析、エピジェネティック変化の関与を行動レベルで直接検証する。

組織レベル

行動実験を行ったラット脳を固定し、切片を作成する。ニッスル染色を行って、性行動に関与する神経核の構造が変化しているかを解析する。さらに、エストロゲン受容体および性行動に関与する神経核に発現する各種神経マーカーの発現・分布を免疫組織化学法にて解析する。以上、脳機能と神経核の形態との相関を検証する。

分子レベル

性的二型核におけるエピジェネティック変化を継時的に解析し、脳の性決定の分子基盤を明らかにする。オスラットおよびメスラットから、内側視索前野（オスで優位な神経核）を継時的に回収し、抗アセチル化ヒストン抗体あるいはヒストン脱アセチル化酵素サブタイプに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降後、沈降物中の性分化にかかわる遺伝子のプロモーターDNAの含有量を測定することにより、神経核におけるでのヒストンのエ

ピジネティック修飾の変化を解析する。

4. 研究成果

個体レベルの解析では、新生児期にヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、あるいはヒストン脱アセチル化酵素 2 および 4 のアンチセンスオリゴ DNA 投与した群では、対象群に比べて、陰茎挿入率が低下し、背乗り、陰茎挿入および射精潜時が延長したことから、脳の雄性化が阻害されていることが明らかになった。一方、他の脳機能（運動機能、不安行動）は、阻害剤投与によって影響を受けていなかった。血清中のテストステロン（男性ホルモン）の濃度にも差が見られなかった。以上より、阻害剤投与により性行動制御系が選択的に発達阻害されることが分かった。

組織レベルの解析では、性行動をつかさどる脳領域において、性ステロイドホルモン受容体の発現が変化しているという予備的結果を得ている。今後、検証を続ける。

分子レベルの解析では、胎生 21 日の内側視索前野において、エストロゲン（女性ホルモン）受容体 α およびテストステロンをエストロゲンに変換する芳香化酵素遺伝子のプロモーターのヒストンアセチル化状態に性差が見られることを発見した。また、この差は新生 3 日までに再変化するところが明らかになった。一般に、雄においては胎生 21 日から新生 3 日の間にアセチル化が抑制されるが、雌ではそれほど変化が見られない傾向が見られた。新生 1 日においてヒストン脱アセチル化酵素 2 および 4 の発現量に性差がなかったが、同遺伝子プロモーターへの結合量をは雄において有意に高かった。これらの差が、脳の雄性化を制御していると考えられた。

以上の結果を学術論文としてまとめ、現在、科学雑誌 Proceedings of National Academy of Science USA に 投稿中である。

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 19 件）

1. Tachiiri H, Morihara T, Iwata Y, Yoshida A, Kajikawa Y, Kida Y, Matsuda KI, Fujiwara H, Kurokawa M, Kawata M, Kubo T. Characteristics of donor and host cell in the early remodeling process after transplant of Achilles tendon with and without live cells for the treatment of rotator cuff defect. Journal of Shoulder and Elbow Surgery in press (2010) 査読有
2. Takanami K, Sakamoto H, Matsuda KI, Hosokawa K, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. Brain Research 1310: 17-28 (2009) 査読有
3. Sawamura K, Ikeda T, Nagae M, Okamoto SI, Mikami Y, Ikoma K, Yamada T, Sakamoto H, Matsuda KI, Tabata Y, Kawata M, Kubo T. Characterization of in vivo effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on degenerated intervertebral discs. Tissue Engineering 15: 3719-3727 (2009) 査読有
4. Sakamoto H, Takanami K, Zuloaga DG, Matsuda KI, Jordan CL, Breedlove SM, Kawata M. Androgen regulates the sexual dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord that mediates male sexual function. Endocrinology 150: 3672-3679 (2009) 査読有
5. Mori H, Matsuda KI, Pfaff DW, Kawata M. Sagittalis Nucleus: A novel hypothalamic nucleus. Journal of Neuroendocrinology 21: 406-409 (2009) 査読有
6. Kitagawa T, Matsuda KI, Inui S, Takenaka

- H, Katoh N, Itami S, Kishimoto S, Kawata M. Keratinocyte growth inhibition through the modification of Wnt signaling by androgen in balding dermal papilla cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94: 1288-1294 (2009) 査読有
7. Sakamoto H, Matsuda KI, Zuloaga DG, Nishiura N, Takanami K, Jordan CL, Breedlove SM, Kawata M. Stress affects a gastrin-releasing peptide system in the spinal cord that mediates sexual function: Implications for psychogenic erectile dysfunction. *PLoS One* 4: e4276 (2009) 査読有
8. Yoshida A, Morihara T, Kajikawa Y, Arai Y, Oshima Y, Kubo T, Matsuda KI, Sakamoto H, Kawata M. In vivo effects of ovarian steroid hormones on the expression of estrogen receptors and the composition of extracellular matrix in the anterior cruciate ligament in rats. *Connective Tissue Research* 50: 121-131 (2009) 査読有
9. Hirahara Y, Matsuda KI, Gao W, Arvanitis DN, Kawata M, Boggs JM. The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes. *Glia* 57: 153-165 (2009) 査読有
10. Matsuda KI, Sakamoto H, Kawata M. Androgen action in the brain and spinal cord for the regulation of male sexual behaviors. *Current Opinion in Pharmacology* 8: 747-752 (2008) 査読有
11. Mori H, Matsuda KI, Pfaff DW, Kawata M. A recently identified hypothalamic nucleus expressing estrogen receptor alpha. *Proceedings of National Academy of Science U. S. A.* 105: 13632-13637 (2008) 査読有
12. Kawata M, Nishi M, Matsuda KI, Sakamoto H, Kaku N, Masugi-Tokita M, Fujikawa K, Hirahara-Wada S, Takanami K, Mori H. Steroid receptor in the brain-lessons learned from molecular imaging. *Journal of Neuroendocrinology* 20: 673-676 (2008) 査読有
13. Matsuda KI, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa K, Kawamura A, Itose M, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. Expression and Intracellular Distribution of the G protein-Coupled Receptor 30 in Rat Hippocampal Formation. *Neuroscience Letters* 441: 94-99 (2008) 査読有
14. Wakabayashi Y, Tsujimura A, Matsuda KI, Yoshimura N, Kawata M. Appearance of LFA-1 in the initial stage of synaptogenesis developing hippocampal neurons. *Archives of Histology and Cytology* 71: 23-36 (2008) 査読有
15. Sakamoto H, Matsuda KI, Zuloaga DG, Hongu H, Wada E, Wada K, Jordan CL, Breedlove SM, Kawata M. Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal cord controls male reproductive functions. *Nature Neuroscience* 11: 634-6 (2008) 査読有
16. Kaku N, Matsuda KI, Tsujimura A, Kawata M. Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with importin alpha/beta and Ran-GTP systems. *Endocrinology* 149: 3960-3669 (2008) 査読有
17. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda KI, Oshima Y, Yoshida A, Nagae M, Arai Y, Kawata M, Kubo T. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *Journal of Cellular Physiology* 215: 834-45 (2008) 査読有

18. Iwata Y, Morihara T, Tachiiri H, Kajikawa Y, Yoshida A, Tokunaga D, Matsuda KI, Sakamoto H, Kurokawa M, Kawata M, Kubo T. Behavior of host and graft cells in the early remodeling process of rotator cuff tendon defect in a transgenic animal model. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery* 17: 101-107 (2008) 査読有

19. Matsuda KI, Nishi M, Takaya H, Kaku N, Kawata M. Intranuclear mobility of estrogen receptor alpha and progesterone receptors in association with nuclear matrix dynamics. *Journal of Cellular Biochemistry* 103: 136-148 (2008) 査読有

[学会発表] (計 20 件)

1. 森浩子, 松田賢一, 塚原伸治, 河田光博: 子宮内環境が視床下部領域のエストロゲン受容体alphaの発現におよぼす影響について. 第 115 回日本解剖学会. 2010. 3. 28-30. 盛岡

2. 橋本隆, 松田賢一, 河田光博: 転写制御因子SAFBの中枢神経系における組織細胞内分布と核内動態. 第 115 回日本解剖学会. 2010. 3. 28-30. 盛岡

3. 森浩子, 松田賢一, DW Pfaff, 河田光博: ラット視床下部における新たな神経核の同定. 第 50 回日本組織細胞化学会. 2009. 9. 26-27. 大津

4. 平原幸恵, 松田賢一, 高浪景子, 河田光博: 脱髄変性ラットにおける膜結合型エストロゲン受容体GPR30 を介した再ミエリン化促進作用. 第 50 回日本組織細胞化学会. 2009. 9. 26-27. 大津

5. 橋本隆, 松田賢一, 河田光博: ラット脳におけるSAFB1/2の局在解析. 第50回日本組織細胞化学会. 2009. 9. 26-27. 大津

6. 高浪景子, 坂本浩隆, 松田賢一, 細川康

二, 西真弓, ER Prossnitz, 河田光博: Different localization of G protein-coupled receptor 30 and nuclear estrogen receptor alpha in the somatosensory system. 第 50 回日本組織細胞化学会. 2009. 9. 26-27. 大津

7. 澤村和秀, 池田巧, 岡本慎一, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷斉, 梶川佳照, 松田賢一, 河田光博, 久保俊一: GFPキメララットを用いた椎間板の変性過程における骨髄由来細胞の動態解析. 第 50 回日本組織細胞化学会. 2009. 9. 26-27. 大津

8. 澤村和秀, 池田巧, 長江将輝, 三上靖夫, 長谷斉, 岡本慎一, 生駒和也, 山田哲也, 松田賢一, 田端康彦, 河田光博, 久保俊一: 多血小板血漿を用いた椎間板変性に関するMRI・組織細胞化学研究. 第 50 回日本組織細胞化学会. 2009. 9. 26-27. 大津

9. 松田賢一, 森浩子, 河田光博: 脳の雄性化におけるヒストンアセチル化の関与. 第 32 回日本神経科学会. 2009. 9. 16-18. 名古屋

10. 森浩子, 松田賢一, 塚原伸治, 河田光博: 子宮内環境による視床下部内エストロゲン受容体alphaの発現量の制御. 第 32 回日本神経科学会. 2009. 9. 16-18. 名古屋

11. 坂本浩隆, 松田賢一, DG Zuloaga, 本宮久之, 和田恵津子, 和田圭司, CL Jordan, SM Breedlove, 河田光博: 性的二型を示す腰髄ガストリン放出ペプチド系は雄性性機能を制御する. 第 32 回日本神経科学会. 2009. 9. 16-18. 名古屋

12. 和田 (平原) 幸恵, 松田賢一, 河田光博, JM Boggs: ミエリン形成過程におけるエストロゲンの細胞骨格再構築への関与. 第 32 回日本神経科学会. 2009. 9. 16-18. 名古屋

13. 高浪景子, 坂本浩隆, 松田賢一, 細川康二, 西真弓, ER Prossnitz, 河田光博: ラットの体性感覚神経系における膜結合型GPR30

の発現とエストロゲンによる発現制御. 第32回日本神経科学会. 2009. 9. 16-18. 名古屋

14. 橋本隆, 松田賢一, 河田光博: ラット脳におけるSAFB1 およびSAFB2 の局在解析. 第32回日本神経科学会. 2009. 9. 16-18. 名古屋

15. Takanami K, Sakamoto H, Matsuda KI, Hosokawa K, Nishi M, Prossnitz ER, Kawata M. Distribution of G protein-coupled receptor 30 and nuclear estrogen receptor alpha in the rat dorsal root ganglion. SBN annual meeting. 2009. 6. 25-27. East Lansing. MI. USA

16. Matsuda KI. Sexual Differentiation of Preoptic Area and Hypothalamic Nuclei in Rat. US/JAPAN Neurosteroid Symposium. 2008. 9. 10-12. Gifu

17. 森浩子, 松田賢一, 河田光博: 視床下部における新規神経核とその性的二型性について. 第113回日本解剖学会. 2008. 3. 27-29. 大分

18. 森浩子, 松田賢一, DW Pfaff, 河田光博: 視床下部におけるエストロゲン感受性新規神経核の同定. 第31回日本神経科学大会. 2008. 7. 9-11. 東京

19. 和田幸恵, 松田賢一, 河田光博, JM Boggs: オリゴデンドロサイトにおける新たなエストロゲン作用の解析. 第31回日本神経科学大会. 2008. 7. 9-11. 東京

20. 坂本浩隆, 松田賢一, DG Zuloaga, 本宮久之, 和田恵津子, 和田圭司, CL Jordan, SM Breedlove, 河田光博: ラット腰髄におけるガストリン放出ペプチド系は性的二型であり、雄性機能を制御する. 第35回日本神経内分泌学会. 2008. 8. 28-30. 東京

[その他]

ホームページ等:

<http://www.kpu-m.ac.jp/k/anat1/res.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 賢一 (MATSUDA KEN ICHI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 40315932

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: