

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790247

研究課題名（和文） 脳の性分化決定因子としての PGE₂ の新規役割の解明研究課題名（英文） The study of the PGE₂ as a new sexual differentiation factor in the brain.

研究代表者

土屋 裕義（TSUCHIYA HIROYOSHI）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80508755

研究成果の概要（和文）：脳の性分化決定因子としての PGE₂ の関与が示唆されていたが、研究者の EP 受容体遺伝子欠損マウスの解析から性ステロイドホルモンと密接な関係があることが示された。また、視床下部の分化成熟モデルの解析から、PGE₂ は神経突起伸長促進作用を持ち、その効果は EP4 受容体を介すものであることが分かった。このことは解熱鎮痛剤が胎児神経の分化成熟期に悪影響を与え、潜在的な中枢性の性分化障害を引き起こす可能性を示す。

研究成果の概要（英文）：Our study in the EP receptor-deficient mice showed that PGE₂, which was suggested as a new sexual differentiation factor, was closely related to the effect of the sexual steroid hormones; abnormalities of some male-type sexual behaviors in EP receptor-deficient mice were improved by testosterone treatment or testosterone deprivation. In the in vitro differentiation model of hypothalamic neurons, PGE₂ accelerated the neurite elongation and this effect was mediated by EP4 receptor. These results indicate that antipyretic analgesic agents may have the potential to induce the disorders of neural sexual differentiation by influencing the formation of the neural network in the fetal period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、薬理学一般

キーワード：中枢・末梢神経、PGE₂、テストステロン

1. 研究開始当初の背景

性同一性障害は近年注目を浴びるようになった心と体の性が解離した疾患で患者の QOL を著しく損ない社会生活を困難なもの

にしているが、成因に関わる知識の蓄積は不十分であり詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。本研究はそうした障害を引き起こす病態メカニズム解明を主眼とし、新

規の因子やシグナル経路の同定に注目している。

脳の性分化は臨界期（マウスやラットでは出生前後の時期）のステロイドホルモンにより運命付けられる。この時期のテストステロンシャワーと呼ばれる一過性のテストステロン産生増大の結果、脳の感受性領域ではテストステロンからエストロゲンが合成され、それが作用することで脳のオス化は誘導されると考えられている。実際にこの時期に去勢してテストステロンを消失させたオスではオス型性行動は減弱し、去勢後に外来的にテストステロンを投与することで回復する。性同一性障害はこの一連のシステムが機能しなくなった結果であると提唱されている。すなわち何らかの障害により生物学的なメスの脳でテストステロンの被曝が起りオス型の脳が形成され、逆に生物学的なオスの脳でテストステロンの分泌不全のためにメス型の脳が形成されるのではないかと考えられている。しかしながら、性ステロイドの関与は指摘されているもののそれがその後どのようなメカニズムによって脳の性差形成を誘導しているかは全く分かっていない。特にステロイドホルモンと神経細胞の研究の多くは *in vitro* の培養系で行われたもので、そこで得られた実験事実を *in vivo* のレベルにまで反映させたものは非常に少ない。

2. 研究の目的

最近、視床下部を中枢とする生理機能の一つであるオス性行動の獲得に PGE₂ の関与を示唆する研究が報告された (Amateau et al. *Nat. Neurosci.* 7: 643, 2004)。PGE₂ は、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼを律速酵素として産生される最も代表的なオータコイドであり、産生後速やかに細胞外に放出され、産生局所に存在する特異的な受容体 (EP1, EP2, EP3, EP4) に結合して多彩な作用を発揮する。そこで研究者は PGE₂ によるオス型性行動獲得はどの EP 受容体を介しているのか、それぞれの受容体欠損マウスのオス性行動を解析することによってオス性行動に対する PGE₂ の中枢神経調節の分子機構の同定を試みた。その結果 EP4 受容体欠損マウスのオスで顕著なオス性行動の減弱が観察された。また EP 受容体欠損マウスの新生仔期視床下部の遺伝子発現変化を解析することで脳の性分化の誘導を示唆する遺伝子を同定した。さらに、EP 受容体欠損マウスのオスで性行動の解析を行う一方で、同様のプロセスのもとメスを対象に実験を行ったところ、非常に興味深いことに EP1 欠損マウスのメスでオス型性行動の非常に顕著な活性化が観察された (図 1)。そこで、テストステロンとの関連性を検証するために EP 受容体欠損マウスのステロイドホルモンにつ

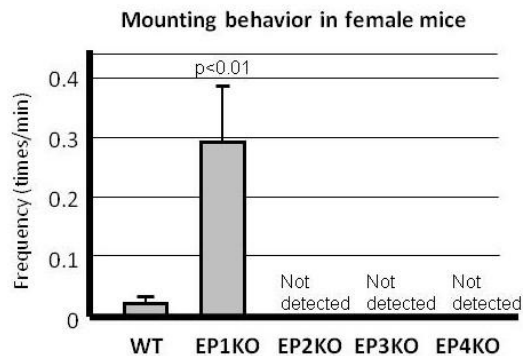


図 1 : EP 受容体欠損メスマウスのオス型性行動発現

いて解析を行ったところ、EP1 欠損メスマウスでは臨界期での異常は見られなかったが、成体では顕著に血中テストステロン量の増大が観察された (図 2)。すなわち、このテストステロンの増大がメスでのオス型性行動獲得の key factor ではないかと考えている。そこで本研究では PG とステロイドホルモンに関係を中心に解析を進め、PGE₂ の中枢神経調節の分子機構を解明する。

Testosterone conc. in female mice

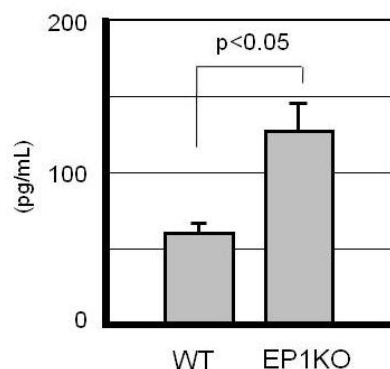


図 2 : EP1 欠損メスマウスの血中テストステロン濃度

3. 研究の方法

オス型性行動に対する PG とステロイドホルモンの関係を解明するために、本実験は *in vitro* ならびに *in vivo* の両面からのアプローチを進めた。具体的には *in vivo* の実験では EP 受容体欠損マウスにさまざまな処置を行い、そのオス型性行動を観察した。一方で *in vitro* の実験としては初代神経培養系あるいは不死化神経細胞培養系を用いて視床下部での PGE₂ の役割についての解析を行った。

(1) *in vivo* の解析

これまでの血中性ホルモンの濃度測定の結果から EP1 受容体欠損メスマウスでは野生型に比べてテストステロンの増加傾向が観察されている。そこで、野生型マウスにテストステロンを投与し持続的な血中濃度上昇

を引き起こした場合、メスマウスのオス型性行動がどのように変化をするかを観察した。また、逆に EP1 受容体欠損メスマウスでテストステロンの効果を減弱させたときにオス型性行動を抑制できるかどうかを観察した。メスは精巣を持たないためにオスに比べればテストステロンの産生量は顕著に少ない。しかし完全に産生量が無いわけではなく、卵巣を筆頭に一部の組織でテストステロン産生が行われていることが分かっている。そこで卵巣切除をすることで EP1 受容体欠損メスマウスのテストステロン量の削減を行い、その後のオス型性行動を観察する。

加えて、オス型性行動の減弱が観察された EP4 受容体欠損マウスの更に詳細な検討をするべく細胞特異的遺伝子欠損マウスの技術を用いてオス型性行動解析を行った。この実験には京都大学大学院医学研究科 神経細胞薬理学の古屋敷智之助教に供与いただいた神経細胞特異的 EP4 欠損マウスを使用した。この遺伝子欠損マウスは *nestin* プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼの配列が組み込まれるとともに、EP4 受容体の遺伝子が loxP 配列で挟み込まれている。つまり *nestin* が発現する細胞、すなわち神経細胞では Cre リコンビナーゼが産生され、loxP 配列に挟まれた EP4 受容体遺伝子を無効化するため、神経特異的な遺伝子欠損マウスが得られる。このマウスのオス型性行動を観察することで、神経細胞に存在する EP4 受容体の役割について解析することができる。

以上のマウスについてオス型性行動の観察を行うが、今回の観察では mounting (マウンティング行動)、intromission (挿入行動)、ejaculation (射精行動) の潜時と頻度を解析する。また行動測定に際しては acceptor として卵巣切除後に性ステロイド投与によって発情させたメスマウスを利用する。

(2) in vitro の解析

視床下部は性行動制御の中枢であり、ステロイドホルモン分泌に続く神経細胞の分化・成熟および神経突起伸長による神経ネットワーク形成は新生仔期に成立する。そこでこれらの神経ネットワーク形成期に対する PGE₂ の役割を解析するために、視床下部神経細胞の不死化神経細胞セルラインを用いてその遺伝子発現変化等を解析する。

本研究に用いた N37 細胞は視床下部を由来とする神経細胞セルラインである。しかしながら、これまでほとんど使用されることがなく既存の報告がないために、まずその特性を調べる検討を重ねた。その結果、他の神経細胞セルラインと同様にメEDIUM中から血清を除去する starvation 処理により分化誘導がかけられることがわかった。また、遺伝子発現解析から EP 受容体のうち EP1 受容体

と EP4 受容体の発現が確認された。このことは本研究で対象としている受容体サブタイプとも合致し、使用に適していることを表している。

そこで本研究では上記 starvation 処理による分化誘導後に各種薬物で刺激し、その後の遺伝子発現変化や形態変化を解析して視床下部機能に影響を与える因子の同定並びにシグナルの探索を行った。

4. 研究成果

(1) in vivo の解析

① テストステロン投与メスマウスでのオス型性行動解析

野生型メスマウスに持続分泌タブレットを用いてテストステロンの持続投与を行ったところ、顕著なオス型性行動 (mounting, intromission) の潜時の減少と頻度の増加が観察された。このオス型性行動の活性化はマウスの二次性徴に相当する 4 週齢の時期に限らず、成長が進んだ段階である 8 週齢の時期への投与でも同様な結果が得られた (図 3)。

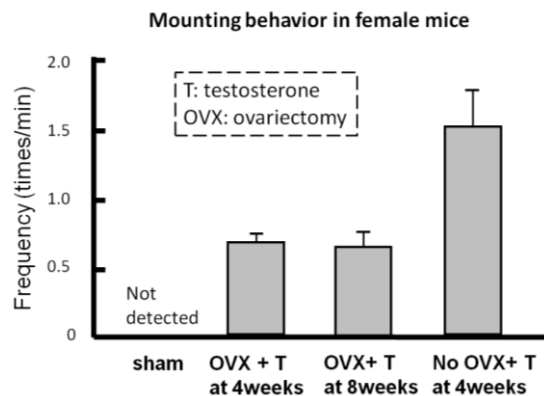


図 3 : テストステロン処理後のメスマウスのオス型性行動発現

② 卵巣切除後のメスマウスでのオス型性行動解析

これまでの実験結果から EP1 受容体欠損マウスではオス型性行動の活性化と血中テストステロン量の上昇が分かっていた。加えて、上記記載の通りメスでのテストステロン産生の主要組織は卵巣であることから、卵巣切除後の EP1 受容体欠損マウスのオス型性行動解析を行った。その結果、卵巣切除後のマウスではオス型性行動は完全に消失した。このことから、EP1 受容体欠損マウスで観察されたオス型性行動の活性化は卵巣で作られる過剰なテストステロンに由来することが示唆される。

③ EP4 受容体欠損オスマウスのテストステロン投与後のオス型性行動解析

これまでの検討から EP4 受容体欠損マウスのオスは顕著にオス型性行動が減弱することが分かっている。そこで、PGE₂とステロイドホルモンとの関わりについて明らかにすべく、EP4 受容体欠損オスマウスに持続分泌タブレットを用いてテストステロンの持続投与を行いオス型性行動を観察した。その結果、非常に興味深いことに mounting と intromission 行動に関しては潜時、頻度ともにテストステロンの投与により野生型マウスに匹敵するほどの回復が見られた。一方で ejaculation 行動に関しては潜時の回復は観察されなかった。このことから、オス型性行動と一括りに表現していても、mounting, intromission, ejaculation のそれぞれが異なる制御を受けていることを示し、前者2つに関してはテストステロンが調節に関わっていることを示している。

④組織特異的遺伝子欠損マウスの解析

nestin プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼの配列を持つマウスを利用した、神経細胞特異的 EP4 受容体欠損マウスを作成し、そのオス型性行動を解析した。その結果、全身の EP4 受容体欠損マウスで見られたオス型性行動の減弱は観察されなかった。このことは性行動の減弱が神経細胞に発現する EP4 受容体に由来するものではないことを示すものである。引き続き別の細胞に注目し EP4 受容体の役割について解析を行う。

(2) in vitro の解析

①PGE₂によるステロイド関連遺伝子発現変化の解析

性分化の中核は視床下部であることが知られているため、視床下部の不死化神経細胞セルラインを用いることにより PGE₂の神経細胞に与える影響について解析を行った。その結果、PGE₂の刺激を加えても性ステロイド合成酵素関連の遺伝子の発現変化は観察されなかった。

②PGE₂による神経突起の形態変化の解析

上記視床下部神経細胞セルラインを分化誘導後に PGE₂で刺激をすると顕著に神経突起伸長が促進されることが明らかになった(図4)。

一方で PGE₂の合成を阻害するインドメタシンを培養液中に含ませておくことと有意に突起伸長が減弱することも明らかとなった。これは上記視床下部神経細胞の分化過程において、PGE₂が産生され内在的に神経突起伸長に作用していることを示している。

さらに各 EP サブタイプ特異的な作動薬を処理することでその後の突起伸長の変化を観察したところ、EP4 受容体作動薬でのみ PGE₂の効果が再現されたことから、神経突起

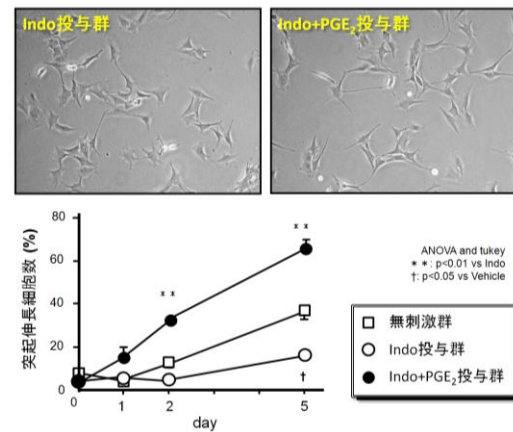


図4：PGE₂による視床下部神経細胞の神経突起伸長促進

伸長促進作用を担っているのは EP4 受容体であることが推測される(図5)。このとき EP3 受容体についても効果が見られるようなグラフが得られているが、そもそもセルラインでの EP3 受容体発現が確認できないことや細胞生存率が著しく低いことから非特異的な効果を見ているものと考えられる。

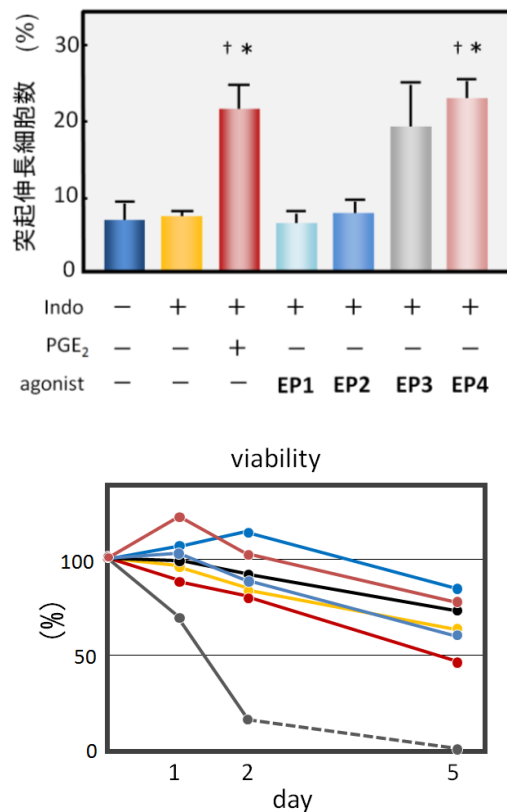


図5：各種 EP 作動薬による視床下部神経細胞の神経突起への影響と細胞生存率

次に下流のシグナルについて解析を進めたところ、PGE₂刺激後にカルシウムの流入は見られず、加えて代表的な cAMP アナログで

の刺激による神経突起伸長や PKA 阻害薬での阻害効果も観察されなかった。しかしながら、このシグナル経路には ERK が関与していることが明らかとなった。以上の結果から PGE₂ は G タンパク質共役型受容体で見られるカルシウム上昇や cAMP の変化といった古典的なシグナル経路を介さず、新規の経路で神経突起伸長を誘導していると推察される。

以上の結果より in vivo, in vitro ともに非常に有意義な新規知見を得ることができた。これらをつなぐ経路の同定を急ぎ、速やかな業績公開に至るよう研究をまとめる。

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 1 件)

① 土屋裕義, 男と女の脳の違いを“見る”アロマターゼの発現部位の同定、ファルマシア、査読有、46 巻、2010、458-459

<http://farumashia.pharm.or.jp/mokuji/2010/46-05.html>

[学会発表] (計 3 件)

① 土屋裕義, 杉本幸彦, 藤原葉子, 藤村昭夫, 奥水崇鏡、視床下部神経細胞の突起伸長に対する PGE₂ の作用、第 83 回 日本生化学会大会、2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド

② 土屋裕義, 杉本幸彦, 藤原葉子, 藤村昭夫, 奥水崇鏡、プロスタグランジン E₂ は EP4 受容体を介してマウス視床下部神経細胞の突起伸長を促進する、第 84 回 日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、国立京都国際会館

③ 土屋裕義, 杉本幸彦, 藤原葉子, 藤村昭夫, 奥水崇鏡、EP4 受容体を介した PGE₂ の神経突起伸長促進作用、第 85 回 日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、国立京都国際会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 裕義 (TSUCHIYA HIROYOSHI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：80508755

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：