

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15097

研究課題名（和文）雌雄における遺伝子の発現量の差異が脳皮質の性分化に与える役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of differential gene expression in the male and female mice on the sexual differentiation of the cerebral cortex

研究代表者

越智 翔平（Ochi, Shohei）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30884217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の脳には、性差が存在することが知られている。脳の性分化は、出生前後における性ホルモンの影響が大きく、主に生後に進行すると考えられてきた。しかし、私たちは、マウス胎仔の終脳において、遺伝子発現や組織構築に雌雄差が現れることを見出した。従来、脳の性分化には性ホルモンが強く関与すると考えられてきたが、本研究の知見として、性ホルモンの依存度が小さい胎生期においても、遺伝的なプログラムとして性差が形成される可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の性差は、出産前後以降の性ホルモンによって決定されると考えられてきた。しかし、本研究における解析から、胎生期の脳皮質において既に遺伝子発現や組織構築に関して性差が現れる可能性を成果として見出した。自閉スペクトラム症を含む神経発達障害は、発症頻度や病態に性差が存在することが知られているが、本研究にて示唆された遺伝子発現プログラムの性差が病態の原因となる可能性が考えられる。本研究は、学術的に神経発達障害を脳の性差研究という新たな切り口から焦点を当てた研究である。

研究成果の概要（英文）：Sex differences are known to exist in mammalian brains. Sexual differentiation of the brain has been thought to primarily progress after birth, largely due to sex hormones released perinatally. However, we found that sex differences in gene expression and tissue architecture appeared in the embryonic mouse telencephalon. While sex hormones have conventionally been believed to play a crucial role in brain sexual differentiation, our findings suggest that sex differences may be established as a genetic program even during the embryonic period, when sex hormones are less dependent.

研究分野：神経発生学

キーワード：性差 性分化 脳皮質 神経分化 組織構築 Pax6 RNA-seq マウス

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の脳には、脳のサイズや形態、病気の発症頻度に関する性差が存在することが知られている。脳の性分化決定には、出生前後における精巣由来の性ホルモン（テストステロン）の影響によって雄化され、生後では、脳の性分化に応じて雌雄で異なる行動が発露する。先行研究では、このような性ホルモンの影響による脳構造や行動の変化に関する報告が数多くなされてきた。性ホルモン非依存的な脳の性分化決定についてはほとんど未知であるが、視床下部で発現する転写制御因子 *Ptfl1a* が、脳の性分化に影響することが報告された (Fujiyama et al., 2018)。 *Ptfl1a* を欠損すると、周産期に発現するテストステロンの曝露の有無に応じた脳の性分化がうまくなされず、雌雄共に性特異的な行動の頻度が低下することが認められたが、胎生期大脳皮質の遺伝子発現の性差については考慮されていない。脳のサイズには性差があることは比較的よく知られている。ヒトの検体を用いた先行研究によると、男性の脳の重さや体積は平均して女性より約 10% 増加する (Dekaban, 1978; Maney, 2016) と報告されている。また、生後マウスの大脳皮質における興奮性ニューロンの樹状突起の数は雌で増加し、より複雑な構造を示す (Keil et al., 2017)。このことから、男性では脳のサイズの増加、女性ではニューロンの成熟に繋がる分子機構が存在している可能性がある。申請者は予備的研究として、性ホルモン分泌以前の 2 つの発生時期（神経幹細胞の増殖が盛んである胎生 11.5 日齢およびニューロン新生が開始する胎生 14.5 日齢）における終脳（大脳皮質＋大脳基底核原基）組織を採取し、RNA-seq を用い、雌雄における遺伝子の発現量の差を網羅的に解析した。主成分解析によると、胎生 11.5 日齢では雌雄において発現を認める遺伝子の差異が小さい一方、胎生 14.5 日齢では差異が大きくなることが示唆された (未発表)。また、ニューロン新生が開始する時期である胎生 14.5 日齢において、終脳サンプルにおける種々のニューロン関連遺伝子の発現量の雌雄差を探索したところ、雌で強く発現している遺伝子を複数種見出したが、雄では強く発現している遺伝子はみられなかった (未発表)。このことから雌では、神経幹細胞からニューロンへの分化が亢進している可能性があると考えられる。上記の胎生期終脳において雌雄で発現量の差が認められたニューロン関連遺伝子は、公開データベース Gene Paint (Visel et al., 2004) によると、大脳皮質に強く発現しているため、これらの遺伝子発現量の性差は大脳皮質における発生に寄与している可能性が考えられる。そこで本研究では、胎生期の大脳皮質におけるニューロン新生過程に着目して、遺伝子発現量・発現局在が雌雄の発生過程に与える影響を解析する。

### 2. 研究の目的

未開拓な領域である性ホルモン分泌以前の大脳皮質における遺伝子発現量の性差が発生過程に与える影響を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

性ホルモン分泌以前の 2 つの発生時期（神経幹細胞の増殖が盛んである胎生 11.5 日齢およびニューロン新生が開始する胎生 14.5 日齢）における終脳（大脳皮質＋大脳基底核原基）組織から取得した RNA-seq に関して主成分解析やボルケーノプロットなどの情報解析を実施した。加えて、RNA-seq にて遺伝子発現量に差を認めた差次的発現遺伝子に関して、qPCR にて RNA-seq の再現性を検証した。マウス胎仔大脳皮質における神経分化関連遺伝子・細胞増殖・細胞死に関する発現の雌雄差解析を実施した。具体的には、雌雄それぞれにおける、神経分化の影響を探索するために、胎生 11.5 日齢（神経幹細胞増殖期）、14.5 日齢（深層ニューロン新生期）、17.5 日齢（表層ニューロン新生期）のそれぞれにおいて免疫染色を実施し、神経分化・細胞増殖・細胞死の影響を探索する (図 1)。

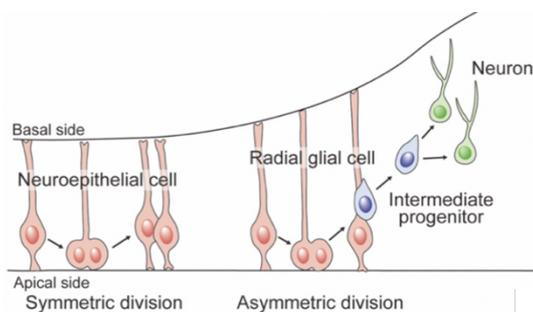


図 1. マウス胎仔大脳皮質における神経分化の模式図。(左) 神経幹細胞増殖期。(右) ニューロン新生期。Ochi et al., *Int J Mol Sci.* 2022 から引用。

神経分化関連遺伝子に関しては、脳室帯 (Pax6)、脳室下帯 (Tbr2)、皮質板ならびに中間帯 (Tubb3(Tuj1)) の相対的な厚さを探索した (図 2)。大脳皮質において、神経分化関連遺伝子の活性の指標を示すために、Western blotting、qPCR を用いた発現量解析を実施した。細胞増殖・細胞死に関しては、Ki67 (細胞増殖能)、pH3 (細胞分裂能)、active caspase-3 (細胞死) の免疫染色を実施し、脳室面側、基底膜側における陽性細胞の数を計測し、未分化型前駆細胞ならびに中間型前駆細胞の細胞増殖能、アポトーシス活性が雌雄それぞれの大脳皮質の構築に与える影響を探索した。これらの解析を通じ、胎生期における脳構築の遺伝的プログラムの性差の一端に迫った。

#### 4. 研究成果

RNA-seq を用いた予備解析から、神経幹細胞増殖期において、遺伝子発現の性差が認められないものの、ニューロン新生期 (胎齢 14.5 日) において、遺伝子発現の性差が現れることを見出した。ニューロン新生期においては、種々のニューロン関連遺伝子の発現が雌で増加することを認めた。RNA-seq、qPCR 共に、胎齢 14.5 日の終脳原基において、Notch シグナル関連遺伝子の発現が雌で亢進することを見出した。Notch シグナルは、神経幹細胞における細胞増殖に重要な役割を示すことが知られている (Ochi et al., 2020)。次に、マウス胎仔大脳皮質を用い組織構築の雌雄差に関する検証を実施した (図 2)。胎齢 17.5 日において Tuj1 陽性のニューロン層が肥厚化することを見出した。形態学的にニューロン層を中間帯、皮質板に大別した (図 2) ところ、皮質板の厚みに関しては雌雄差を認めなかったものの、中間帯の厚みが雌で肥厚化することを見出した。一方、細胞増殖・細胞死に関しては、胎生期の大脳皮質原基においては雌雄差を認めなかった。

以上の結果から、野生型マウス胎仔終脳においては、胎齢 14.5 日前後に遺伝子発現に関して雌雄差が現れるものの、脳の組織構築に与える影響は小さい可能性が示唆された。

現在、女兒を含む自閉症集団患者にて、Pax6 遺伝子が含まれる 11p13 領域が高いオッズ比を認めた (Szatmari et al., 2007) ことから、Pax6 を性差に寄与する遺伝子の一つと考え (Ochi et al., Int J Mol Sci. 2022)、Pax6 変異マウスの雌雄胎仔脳を用いた、RNA-seq やシングルセル RNA-seq 解析ならびに組織解析に着手している。

本研究の成果は、性ホルモンの依存度が低い環境にて、遺伝的なプログラムの性差が影響し、胎生期から大脳皮質の性分化が運命決定される仮説を補助する知見となり得る。

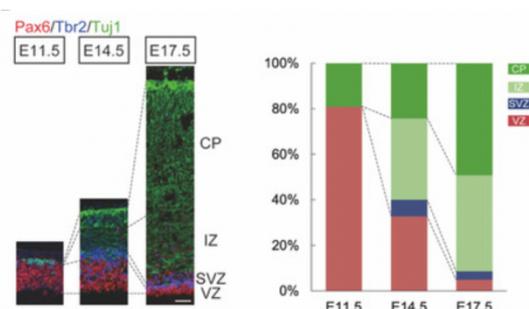


図 2. 神経発生過程の大脳皮質における層構造の組織解析。(左) 胎齢 11.5 日、14.5 日、17.5 日における Pax6 (神経幹細胞)、Tbr2 (中間前駆細胞)、Tuj1 (ニューロン) の免疫組織染色。Tuj1 陽性のニューロンは、形態学的に皮質板 (CP) と中間帯 (IZ) に大別できる。(右) 発生過程の大脳皮質における相対領域の推移。本研究においては、同様の解析手法を用い、雌雄両体を解析した。Ochi et al., Int J Mol Sci. 2022 から引用。

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 1件）

1. 著者名 Shohei Ochi, Shyu Manabe, Takako Kikkawa, Noriko Osumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Thirty Years' History since the Discovery of Pax6: From Central Nervous System Development to Neurodevelopmental Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6115 ~ 6115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23116115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 越智 翔平, 眞鍋 柊, Seung Hee Chun, 吉川 貴子, 大隅 典子
2. 発表標題 胎生期大脳皮質におけるPax6下流因子 カテニンの発現推移と雌雄差解析
3. 学会等名 日本解剖学会 第67回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智 翔平, 眞鍋 柊, Seung Hee Chun, 吉川 貴子, 大隅 典子
2. 発表標題 胎生期大脳皮質におけるPax6下流因子 カテニンの発現推移と雌雄差解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shohei Ochi, Shyu Manabe, Seung Hee Chun, Takako Kikkawa, Noriko Osumi
2. 発表標題 Understanding sex differences in the expression pattern of the $\beta$ -catenin, a downstream to Pax6, in the mammalian corticogenesis
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shohei Ochi, Natsumi Joko, Hitoshi Inada, Noriko Osumi
2. 発表標題 IntelliBoard system: Development of a novel social behavior evaluation system and its application to Autism Spectrum Disorder model mouse
3. 学会等名 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智 翔平、大隅 典子
2. 発表標題 IntelliBoard を用いた新規マウス社会行動評価システムの確立
3. 学会等名 第14回自閉症学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智 翔平、上甲 なつみ、稲田 仁、大隅 典子
2. 発表標題 集団飼育環境における神経発達障害様行動特徴の解析
3. 学会等名 第4回共調的社会脳研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智 翔平
2. 発表標題 マウス大脳皮質原基における雌雄差形成に関わる分子メカニズム解明への取り組み
3. 学会等名 先進ゲノム支援2022年度拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shohei Ochi, Natsumi Joko, Hitoshi Inada, Noriko Osumi
2. 発表標題 IntelliBoard system: Development of a novel social behavior evaluation system and its application to autism spectrum disorder model mouse
3. 学会等名 The 21st Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智 翔平、大隅 典子
2. 発表標題 マウス集団飼育を用いた長期神経発達症様行動特徴の解析
3. 学会等名 第15回自閉症学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智 翔平、眞鍋 柊、Seung Hee Chun、吉川 貴子、大隅 典子
2. 発表標題 大脳皮質形成過程における Pax6 下流の カテニンの発現に関する性差研究への取り組み
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越智 翔平、眞鍋 柊、Seung Hee Chun、吉川 貴子、大隅 典子
2. 発表標題 大脳皮質形成過程における Pax6 下流の カテニンの発現に関する性差研究への取り組み
3. 学会等名 日本解剖学会 若手研究者の会 2022 年度 春の学校
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shyu Manabe, Shohei Ochi, Takako Kikkawa, Noriko Osumi
2. 発表標題 The analysis towards understanding sex differences in the murine developing cerebral cortex
3. 学会等名 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society The 1st CJK international Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shyu Manabe, Shohei Ochi, Seung Hee Chun, Takako Kikkawa, Noriko Osumi.
2. 発表標題 The study towards understanding the expression patterns and the sexual differences of the -catenin, a downstream to Pax6, in the mammalian corticogenesis
3. 学会等名 The 80th Fuihara Seminar Molecular and cellular mechanism of brain systems generating individuality (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shyu Manabe, Seun Hee Chun, Shohei Ochi, Takako Kikkawa, Noriko Osumi.
2. 発表標題 The study towards understanding sex differences in the murine developing cerebral cortex.
3. 学会等名 第15回神経発生討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shyu Manabe, Shohei Ochi, Takako Kikkawa, Noriko Osumi
2. 発表標題 Sex difference in the gene expression pattern during murine corticogenesis
3. 学会等名 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蘭 子国、越智 翔平、大隅 典子
2. 発表標題 IntelliCage を用いた自閉スペクトラム症モデルマウスの行動解析
3. 学会等名 第14回自閉症学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞鍋 柊、越智 翔平、大隅 典子
2. 発表標題 マウス大脳皮質原基における雌雄差を形成する分子メカニズムの解明
3. 学会等名 NGS発生物学現場の会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上甲 なつみ、越智 翔平、大隅 典子
2. 発表標題 自閉スペクトラム症モデルマウスにおける前交連の性差の解析
3. 学会等名 第15回自閉症学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 眞鍋 柊、越智 翔平、大隅 典子
2. 発表標題 Elucidating the molecular mechanism leading to the sexual differentiation of the murine cortical primordium
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科発生発達神経科学分野・研究内容  
<http://www.dev-neurobio.med.tohoku.ac.jp/researchoutline/osumi/sexual/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------