

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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500297

研究課題名（和文） 視索前野性的二型核形成過程の可視化による性分化機構の解明

研究課題名（英文） Visualization of the sexual differentiation in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area.

研究代表者

濱田 知宏（HAMADA TOMOHIRO）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90312058

研究成果の概要（和文）：

視索前野性的二型核は雄で有意に大きい神経核として知られているが、その性差形成機構については、周生期のステロイドホルモンが重要であることを除いて良くわかっていない。本研究ではステロイドホルモン受容体遺伝子プロモーター遺伝子改変ラットを用いてこの神経核を GFP 蛍光で可視化し、その性差形成過程を *in vivo* および *in vitro* 両面から詳細に検討することで、神経核形成時の細胞移動がホルモンの調節を受け、雄性化を引き起こすことを示した。

研究成果の概要（英文）：

The sexually dimorphic nucleus in the preoptic area (SDN-POA) is larger in males than in females, however the mechanism of sexual differentiation of this structure remains largely unknown, except that androgen and/or estrogen during perinatal period cause the establishment of male-typical nuclei. We have shown recently that enhanced green fluorescent protein (EGFP) is expressed in the SDN-POA under the control of an estrogen receptor α gene promoter. The present study suggested that neural migration plays a key role in the sexual differentiation of the SDN-POA to visualize the nucleogenesis of the SDN-POA *in vivo* and *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：性分化、視索前野性的二型核、可視化、細胞移動、エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

(1) 性同一性障害

心の性と身体の性が一致しない障害で、近年社会的問題になったのを受け、平成 15 年

に特例法が成立し、戸籍の性別を変更することが可能となった。性同一性障害の治療は、もっぱら心の性を優先し、当事者がより良い社会生活を送ることのできる環境を整備す

ることを第一としており、性別変更はその手段のひとつである。一方で、性別変更後も多くの当事者が差別や偏見に苦しんでおり、さらなる社会支援策の必要性とともに、予防法の確立が急務であることは疑いようがない。性同一性障害の原因については、内分泌かく乱物質による脳の性分化異常との関係が示唆されているが、不明な点が多いのが現状である。

(2) 性同一性障害と脳の性差

脳には解剖学的性差のある領域がいくつか存在し、視索前野性の二型核 (SDN-POA) は雄で有意に大きい神経核として良く知られている。ヒトでは間質核と呼ばれる相同の神経核が存在し、性同一性障害の男性はこの神経核が女性並みに小さいことが報告されている。

(3) SDN-POA の性分化機構

SDN-POA の性差は 1978 年に始まる Gorski らの研究によりラットで見出された。ラットでは胎仔および新生仔精巣由来のアンドロゲンが脳内でエストロゲンに変換され、 α 型エストロゲン受容体 ($ER\alpha$) に結合することで、SDN-POA の雄性化が引き起こされることが知られているが、 $ER\alpha$ 以降の性差形成機構については良くわかっていないのが現状である。それは SDN-POA を生きた状態で特定することが困難であるため、エストロゲン作用を細胞レベルで検討できないことに起因している。

(4) SDN-POA の可視化

我々は $ER\alpha$ 遺伝子プロモーター0/B トランスジェニックラットを作成することで、SDN-POA を緑色蛍光タンパク (GFP) により可視化することに成功した。すなわち、GFP 蛍光を指標にすることで、生きた状態の SDN-POA を、細胞レベルで特定することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究は、SDN-POA 性差形成過程を可視化し、その性分化機構の解明を目的とするとともに、その性特異的機能を明らかにすることを目指すものである。すなわち、①エストロゲンによる細胞移動調節が SDN-POA の性分化機構には重要、②SDN-POA は性指向性決定に関わり、思春期に機能的性差形成が完成、という作業仮説を検証する。

3. 研究の方法

GFP 発現を指標にすることで SDN-POA を可視化するトランスジェニックラットを用いて、以下の研究を行う。

(1) in vivo における SDN-POA 形成過程の可視化

胎生 18 日から生後 8 日の脳を固定し、視索前野における GFP 発現を観察する。同時

に $ER\alpha$ 発現を免疫染色により検討する。これにより in vivo における SDN-POA 形成過程と $ER\alpha$ 発現との関係について観察する。

(2) in vitro における SDN-POA 形成過程の可視化

胎生 18 日の脳を用いたスライス培養と GFP 発現を指標としたタイムラプス記録を組合せ、in vitro における SDN-POA 形成過程を可視化する。特に GFP 発現細胞の移動様式について、培養液中にエストロゲンを添加して検討する。また、in vitro で形成された SDN-POA に性差が形成されるかについて検討する。

(3) 性行動に対する思春期の役割

思春期はホルモン環境が劇的に変化する時期である。この思春期ステロイドホルモン環境が、機能的性差形成に与える影響を検討するために、思春期前に卵巣摘除した動物を供試し、性行動および性指向性テストを行う。

4. 研究成果

(1) in vivo における SDN-POA 形成過程の可視化

胎仔脳における組織学的な検討を行い、E18 には分界条床核 (BNST) 領域で GFP の発現が観察されること、SDN-POA は E21 に GFP 発現が観察されることが示された (図 1 A,B)。また性差形成に重要な $ER\alpha$ 発現が GFP 発現細胞でなく、その周囲に観察され、SDN-POA 周囲の細胞が性分化機構に果たす役割という新規な考えを提唱することになった (図 1 C,D)。

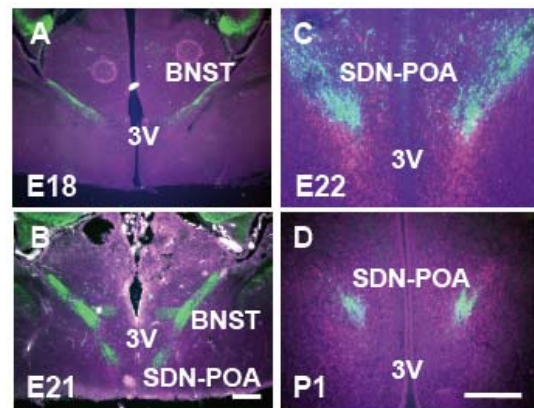


図1 in vivo における SDN-POA 形成。BNST (A) は胎生 18 日に、SDN-POA (B) は胎生 21 日に形成される。C, D) 周生期では GFP (緑) 発現細胞の周囲に $ER\alpha$ 免疫陽性シグナル (マゼンタ) が観察される。

$ER\alpha$ の C 末端を認識する抗体を用いた場合、周生期の $ER\alpha$ 発現は GFP 発現細胞でなく、その周囲の細胞の核に観察されたが、N 末端を認識する抗体を用いた場合、SDN-POA ニューロンの核外にシグナルが見られ、出生後徐々に核にシグナルが移行することが観察された。 $ER\alpha$ には各種バリエーションが知られていることから、これら神経核の性

分化機構には、周囲の ER α 陽性細胞からの影響のみならず、SDN-POA における ER α のスイッチングが関係すると考えられた。

(2) *in vitro* における SDN-POA 形成過程の可視化

胎生 18 日齢脳スライス切片を培養したところ、*in vitro* において GFP 発現細胞の集団形成が確認された。この集団は SDN-POA マーカーであるカルビンディンを発現 (図 2 A) し、培養液中へのエストロゲン添加によりそのサイズが大きくなる (図 2 B) ことから SDN-POA と同等のものであることが示された。

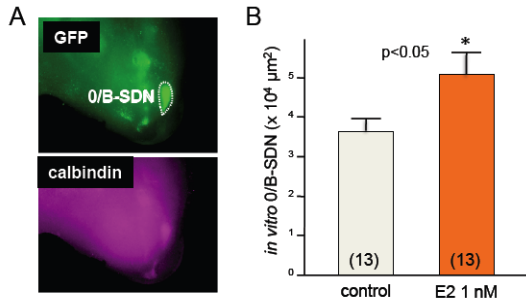


図2 *in vitro*におけるSDN-POA形成。A) スライス培養開始200時間後におけるGFP(緑)細胞の集団はSDN-POAのマーカーであるカルビンディン(マゼンタ)を発現している。B) 培養開始200時間後におけるSDN-POAサイズに対するエストロゲン(E2)の雄性化作用。

培養液中に添加した propidium iodide を指標にすると細胞死はエストロゲンの有無で差がなく、従来言われていた性分化機構における細胞死制御の重要性を否定する結果となった。一方で GFP 蛍光を指標にした1時間毎のタイムラプス観察 (図 3) の結果、SDN-POA 形成時にダイナミックな細胞移動が観察され、特に GFP 細胞が集団を形成後、その中で2段階目の細胞移動が観察され、移動方向にエストロゲンが影響を与えている可能性を示唆する結果が得られており、さらなる詳細な検討を加えている。

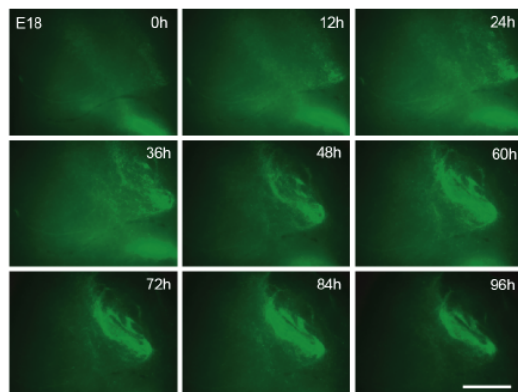


図3 *in vitro*におけるSDN-POA形成過程。スライス培養開始から12時間毎の蛍光写真。細胞移動によってGFP細胞集団が形成される。

(3) 性行動に対する思春期の役割

成熟動物から卵巣を摘除し、卵巣ステロイ

ドホルモンを投与すると、人為的に発情を引き起こすことができる。発情した雌は成熟雄の匂いに指向性があることが知られている。本研究では思春期前に卵巣を摘除することで、思春期の内分泌環境変化を経験させない動物を作出し、成熟後ホルモン投与で発情させたところ、成熟雄に対する指向性が失われた。さらに、思春期前に卵巣摘除した上で、思春期を模倣したホルモン環境を人為的に作出してやると、成熟雄に対する指向性が正常に観察された (図 4)。一方でロードシスなどの性行動に関しては、思春期前卵巣摘除の影響は観察されなかった。以上より性成熟期のステロイドホルモンが性指向性決定に重要であることを見出した。

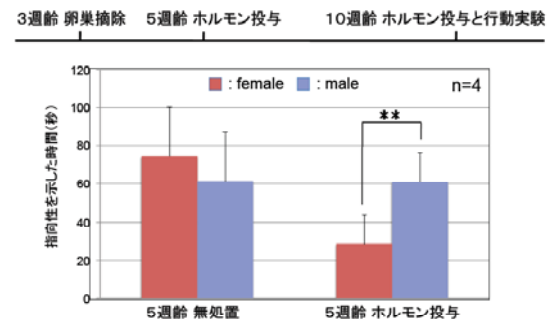


図4 思春期のホルモンが雌の雄に対する性指向性決定に関わる。

(4) 分界条床核 (BNST) の可視化

ER-GFP ラットにおいて、SDN-POA 同様、雄で有意に大きい BNST 主部を特異的に可視化するという結果 (図 5 A-C) も得られ、SDN-POA のみならず、BNST 主部についても、性差形成機構に関する検討が可能となった。この可視化された BNST は、出生日エストロゲン投与では完全な雄性化が見られず、テストステロン投与で雄性化される傾向が見られた (図 5 D-F) ため、SDN-POA とは異なり、エストロゲンだけでなく、アンドロゲンの直接作用による性分化機構が示唆された。

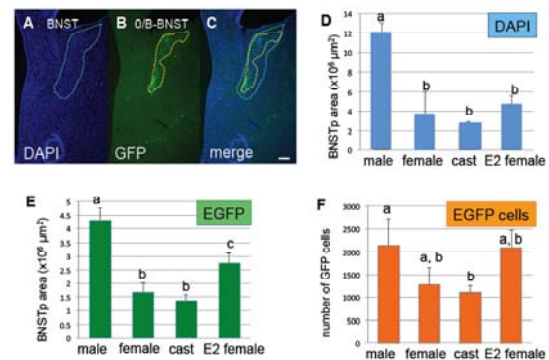


図5 ER-GFPラットのGFP発現によりBNSTは可視化される。DAPI染色より定義されたBNST(A)の中心部にGFP発現(B, C)が観察され、BNST同様の性差(D)がGFP発現(E, F)にも観察された。

以上、ER-GFP ラットを用いることで SDN-POA および BNST の可視化を実現し、周生期の性差形成機構を *in vivo* および *in*

in vitro で可視化することに成功し、その詳細を検討しうるモデルが確立された。今後さらなる詳細な検討を加えることで、周生期における両神経核の性分化機構を解明したい。また、思春期のホルモン環境が性指向性決定に重要であることが見出され、この機能的性分化機構についても、可視化した両神経核を用いることで明らかにしていきたい。

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 6 件)

1. Wada-Kiyama Y, Suzuki C, Hamada T, Rai D, Kiyama R, Kaneda M, Sakuma Y. Estrogen-induced cell signaling in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area: Potential involvement of cofilin in actin dynamics for cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有、2013 in press
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.117
2. 濱田知宏、石井寛高、佐久間康夫、中枢神経における性差科学の現状、*ファルマシア*、査読有、47: 213-217, 2011
3. Ishii H, Shoda Y, Yomogida K, Hamada T, Sakuma Y. Identification of C-terminally and N-terminally truncated estrogen receptor α variants in the mouse. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 査読有、124: 38-46, 2011
DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.01.003
4. 濱田知宏、エストロゲン受容体遺伝子プロモータートランスジェニックラットの利用価値、*アニテックス*、査読無、22: 10-15, 2010
5. 濱田知宏、佐久間康夫、ラット視索前野性的二型核の可視化、*日本医科大学医学会雑誌*、査読有、6: 96-97, 2010
<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>
6. Hamada T, Sakuma Y. Estrogen receptor α gene promoter O/B usage in the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Endocrinology*, 査読有、151: 1923-1928, 2010
DOI: 10.1210/en.2009-1022

[学会発表] (計 12 件)

1. 塩野拓人、濱田知宏、安藤亮、金田誠、佐久間康夫、分界条床核および視索前野性的二型核の性差形成機構を司るエストロゲン受容体発現、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 28 日、タワーホール船堀
2. 濱田知宏、安藤亮、藤掛雅博、小椋山哲平、佐久間康夫、視索前野性的二型核および

分界条床核における性分化機構の可視化、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場

3. 濱田知宏、佐久間康夫、視索前野性的二型核および分界条床核における性差形成過程の可視化、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、長野県松本文化会館
 4. 安藤亮、濱田知宏、佐久間康夫、エストロゲン受容体遺伝子プロモータートランスジェニックラットを用いた分界条床核および視索前野性的二型核の発達過程、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、長野県松本文化会館
 5. 小椋山哲平、濱田知宏、佐久間康夫、思春期の性腺ステロイドによって性指向性回路が形成される、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、長野県松本文化会館
 6. 藤掛雅博、濱田知宏、佐久間康夫、エストロゲン受容体遺伝子プロモータートランスジェニックラットにおける分界条床核主部の可視化、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、長野県松本文化会館
 7. 木山裕子、鈴木千晶、濱田知宏、木山亮一、佐久間康夫、ラット脳の視索前野性的二型核における臨界期のアクチン・ダイナミクス、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、長野県松本文化会館
 8. 石井寛高、棟朝亜理紗、濱田知宏、佐久間康夫、ヒト、マウス及びラットにおける C 末端欠損型エストロゲン受容体 α の同定、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、長野県松本文化会館
 9. 濱田知宏、脳の性分化におけるエストロゲンの細胞移動調節、第 17 回「性と生殖」公開シンポジウム (招待講演)、2011 年 12 月 4 日、早稲田大学井深ホール
 10. 濱田知宏、佐久間康夫、視索前野性的二型核の性分化機構には細胞移動が重要である、第 25 回日本下垂体研究会、2010 年 8 月 19 日、愛知県伊良湖ガーデンホテル
 11. Hamada T, Ishii H, Orikasa C, Sakuma Y. Cell specific usage of an estrogen receptor α gene promoter in the sexually dimorphic nucleus of the rat preoptic area. The 14th Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology, July 20, 2010, Hilton, Toronto, CANADA
 12. 濱田知宏、佐久間康夫、視索前野性的二型核の性分化機構には細胞移動が重要である、第 87 回日本生理学会大会、2010 年 5 月 20 日、いわて県民情報交流センター
- [図書] (計 1 件)
1. 濱田知宏、佐久間康夫、*メディカル・サイエンス・インターナショナル*、カラー図解症状の基礎からわかる病態生理第 2 版、2011

年、p278-p319

[その他]
ホームページ等
<http://www.h-ic.bb4u.ne.jp/~seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 知宏 (HAMADA TOMOHIRO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90312058

(2) 研究分担者

佐久間 康夫 (SAKUMA YASUO)

東京医療学院大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70094307

(H24：連携研究者に変更)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：