

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590307

研究課題名(和文) 脳におけるレトロトランスポゾン発現の性差と生殖機能

研究課題名(英文) The expression of retrotransposon in brain, sex difference and reproduction

研究代表者

前川 文彦 (MAEKAWAW, FUMIHIKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号：40382866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路の性差は性行動や生殖生理等、性特有の機能の性差に結びつくのみならず、特定の疾患に対する罹患率の性差や環境要因に対する影響の感受性の性差を形成する基盤となる。様々な化学物質の曝露影響バイオマーカーとしてレトロトランスポゾンL1が知られているが、本研究では脳におけるその発現の性差について検討した。その結果、視索前野においてL1発現に性差がみられ、またそのL1発現の性差は環境因子と相互作用し変化する可能性が明らかとなった。今後はその発現がどのような機能的な性差に結びつくのか、より詳細に検討することにより脳の性分化機構の解明に少しでも近づけるように研究をすすめたい。

研究成果の概要(英文)：The sex differences of brain neuronal circuits is related not only to the sex differences of sexual behavior and physiology, but also to the sex differences of prevalence to diseases and of tolerance to environmental factors. The expression of retrotransposon L1 is well-known as a biomarker of the effect of adverse chemicals. In this study, I investigated the sex difference of L1 expression in mice brain. As a result, I found that the sex difference of L1 expression in the preoptic area. I also found the possibility that the L1 expression varied depending on the interaction between sex difference and the exposure to environmental factors. In the future study, I would like to try to examine whether the sex difference of the L1 expression leads to physiological difference between sexes especially focusing on the sex difference of sensitivity to environmental chemicals. I believe that such endeavor will bring us closer to the elucidation of the sexual differentiation of the brain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：性差 脳

1. 研究開始当初の背景

脳の性差は雌雄特有の性行動・内分泌機能発現に必須であり、ほ乳類では(影響の程度は異なるものの)主に染色体の性差、周生期の性ステロイドによる神経回路形成作用、性成熟に伴う性ステロイドの神経回路活性化作用、の3つの機構が関与すると考えられている。

染色体の性差は、高等動物では鳥類において脳細胞の染色体の性差が機能の一部に直接影響することが米国 Arnold 教授らの研究から指摘されているが、ほ乳類における機能的な関与については未解明な部分が多い。現在の仮説では、周生期の性ステロイド作用が脳の性分化に最も大きな影響を与えられている。その仕組みとして脳の原形が雌型で、雄では精巣から放出されたテストステロンを材料として脳内で合成されたエストロゲンが脳を雄型にするとの「芳香化学説」が有力である。分化した神経回路は性成熟に伴う血中中性ステロイド上昇により活性化される。脳の性分化には、生殖中枢となる神経核が周生期を経て大きさ・機能が異なる性的二型性を呈するようになることが重要だと考えられている。近年、性行動・生殖生理の中枢である中隔等の神経細胞群において周生期に性ステロイド依存的に起こる細胞新生・細胞死が性的二型核形成に必須であることが明らかになっている。しかし、周生期にどのような細胞内イベントが細胞の生死を決定し性的二型核形成を導くのかは未解明である。

このように形成される神経回路の性差は、性行動や生殖生理等性特有の機能の性差に結びつくのみならず、特定の疾患に対する罹患率の性差や、環境要因に対する影響の感受性の性差を形成する基盤となる。

2. 研究の目的

子どもを取り巻く環境変化が後発的な生殖機能異常の発症を導く可能性が懸念されており、特に環境化学物質が生殖・性分化に影響を与える可能性が懸念されている。

様々な化学物質の曝露影響バイオマーカーとしてレトロトランスポゾン L1 が知られている。機能的には、L1 が増加し、ゲノム再編が亢進すると、負の側面として、再挿入部位の遺伝子破壊、ゲノム不安定性増加、等の細胞機能異常を誘導することが報告されており、癌など細胞周期に関わる病態発症の“原因”となる可能性が示唆されている。一方、脳では神経活動依存的な L1 発現増加が報告されており、L1 によるゲノム再編の結果、“発達と共に細胞機能の多様性が増す”という良い効果をもたらす可能性も報告されている。本研究では、化学物質曝露によ

て起こる感受性の違いの性差を調べる第一歩として、L1 発現の性差について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) L1 RNA 定量法の検討

B6 系統のマウスの脳を採取してホモジナイズした後、total RNA を抽出した。逆転写反応で、cDNA を作成し、Real time PCR により L1 RNA の発現量を定量した。ゲノム DNA 混入率を算出し、total RNA へのゲノム DNA 混入を最も抑えられる RNA 抽出法を検討した。

(2) 脳の領域毎の発現分布に関する検討

脳の各種領域を採取しホモジナイズした後 total RNA を抽出し、(1) で確立した手法を用いて L1 発現を検討した。脳以外の臓器として肝臓も同時に採取し、脳と肝臓で L1 遺伝子発現量を比較する検討も行った。

(3) L1 発現の雌雄差

7 週令の雌雄のマウスの脳より海馬と視索前野を採取し、その発現を比較した。

(4) L1 発現を制御するエピジェネティック因子の性差

視索前野における遺伝子発現を制御する DNA メチル化の制御因子である Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b、Mecp2、Tet1、Tet2、Tet3 の遺伝子発現量を雌雄で比較した。

(5) 環境因子が L1 発現に及ぼす影響と行動異常の相関性検討

L1 発現を変化させる化学物質曝露を検討し、その結果行動異常等が起こるかどうかが検討することで、L1 発現と脳機能との関連を探った。特に、大気・水中の環境因子が L1 発現に及ぼす影響を調べるために、大気中の因子として二次有機エアロゾル、水中の因子として無機ヒ素の発達期曝露を行い、L1 発現がどのように変化するかを調べた。二次有機エアロゾルに関しては、母マウス妊娠 9 日目から生後 21 日目までガス曝露チャンバーを用いて曝露した。一方、無機ヒ素曝露に関しては、母マウス妊娠 8 ~ 18 日目まで亜ヒ酸ナトリウム 85ppm を含む水を飲ませることにより曝露した。いずれの場合も、仔が成長後に全自動行動記録解析システム・インテリケージを用いて行動解析を行うとともに、脳における L1 RNA 発現量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) L1 RNA 定量法の検討

TURBO DNA-free kit (Ambion 社製)を用いて DNase 処理を行うことで、ゲノム DNA の混入を 1% 以下に減少することに成功し、正確な L1 RNA 定量が可能となった。

(2) 脳の領域毎の発現分布に関する検討

脳において他の臓器でより L1 遺伝子発現量が高いことが知られている。そこで、脳以外の臓器として肝臓を用い、L1 遺伝子発

現量を脳の各領域と比較した。また、脳部位によって L1 遺伝子発現量が異なるか検討するため、脳領域毎で比較した。その結果、嗅球以外の脳の各領域において、肝臓と比べ L1 遺伝子発現が高いことを確認することができた。また、領域毎に L1 遺伝子発現量が大きく異なることが明らかとなった (図 1)。

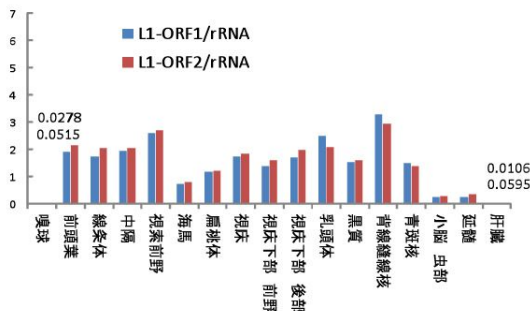


図 1. 脳の領域毎の L1 発現分布

(3) L1 発現の雌雄差

雌雄における L1 遺伝子発現の検討を行うため、海馬および視索前野を用い、L1 ORF1、L1 ORF2 の遺伝子発現量を雌雄で比較した。その結果、視索前野において、LINE-1 ORF1、LINE-1 ORF2 の遺伝子発現量が雌で高い性差が存在することが明らかとなった (図 2)。

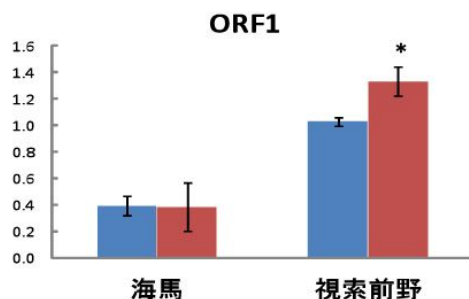


図 2. 海馬と視索前野における L1 発現の性差 (青: 雄, 赤: 雌, * $p < 0.05$, Student t-test)

(4) L1 発現を制御するエピジェネティック因子の性差

遺伝子発現を制御する DNA メチル化の制御因子である Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b、Mecp2、Tet1、Tet2、Tet3 の遺伝子発現量を視索前野において、雌雄で比較した。その結果、Tet2 の遺伝子発現量に性差があることが明らかとなった。

(5) 環境因子が L1 発現に及ぼす影響と行動異常の相関性検討

発達期の二次有機エアロゾル曝露や無機ヒ素曝露により、脳内での L1 発現の上昇が観察された。一方行動異常に関しては二次有機エアロゾル曝露では顕著な影響が確認されなかったが、一方、無機ヒ素曝露においては、行動柔軟性の低下が認められた。また、特に無機ヒ素曝露に関しては、性差で違いがみら

れた視索前野において L1 発現の上昇傾向もみられたため、性差と環境因子と相互作用が存在する可能性が示唆された。

(6) 総括

視索前野において L1 発現に性差がみられ、またその L1 発現の性差は環境因子と相互作用し、変化する可能性が明らかとなった。今後はその発現がどのような機能的な性差に結びつくのかより詳細に検討することにより、脳の性分化機構の解明に少しでも近づけるように研究をすすめたい。

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 14 件)

Maekawa F*, Tsukahara S, Kawashima T, Nohara K, Ohki-Hamazaki H* (2014) The mechanisms underlying sexual differentiation of behavior and physiology in mammals and birds: relative contributions of sex steroids and sex chromosomes. *Frontiers in Neuroscience* 8:242(9 pages) *equally correspondence. 査読有 DOI: 10.3389/fnins.2014.00242

前川文彦、チョウ・テツ・アウン、中村和昭、佐野一広、ティン・ティン・ウィン・シュイ、田上昭人、野原恵子、塚原伸治 (2014) 培養細胞を用いた発達神経毒性評価試験法の近年の動向 *化学工業* 65(7)538-547. 査読無 URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/40020135307>

Shimogawa Y, Maekawa F, Yamanouchi K (2014) Unilateral lesion increases oestrogen receptor expression in the intact side of the ventromedial hypothalamic nucleus in ovariectomised rats. *Journal of Neuroendocrinology* 26(4)258-266. 査読有 DOI: 10.1111/jne.12149

浜崎浩子、前川文彦 (2013) 正常な性周期の発現には、脳が遺伝的に雌であることが必要である ~ 雌雄のニワトリで脳を入れ替えたキメラの解析から ~ *細胞工学* 32(9)990-991. 査読無 URL: <http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901467.html>

Maekawa F, Fujiwara K, Toriya M, Maejima Y, Nishio T, Toyoda Y, Nohara K, Yashiro T, Yada T (2013) Brain-derived neurotrophic factor in VMH as the causal factor for and therapeutic tool to treat visceral adiposity and hyperleptinemia in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 5:7 (13 pages) 査読有 DOI: 10.3389/fnsyn.2013.00007

Maekawa F, Tsuboi T, Oya M, Aung KH,

Tsukahara S, Pellerin L, Nohara K (2013) Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons. *Neurotoxicology* 37:197-206 査読有 DOI: 10.1016/j.neuro.2013.05.006

Maekawa F, Sakurai M, Yamashita Y, Tanaka K, Haraguchi S, Yamamoto K, Tsutsui K, Yoshioka H, Murakami S, Tadano R, Goto T, Shiraiishi J, Tomonari K, Oka T, Ohara K, Maeda T, Bungo T, Tsudzuki M, Ohki-Hamazaki H (2013) A genetically female brain is required for regular reproductive cycle in chicken brain chimeras. *Nature Communications* 4:1372 (11 pages) 査読有 DOI:10.1038/ncomms2372

Aung KH, Kurihara R, Nakashima S, Maekawa F, Nohara K, Kobayashi T, Tsukahara S (2013) Inhibition of neurite outgrowth and alteration of cytoskeletal gene expression by sodium arsenite. *Neurotoxicology* 34:226-235. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuro.2012.09.008

Nakamori T, Maekawa F, Sato K, Tanaka K, Ohki-hamazaki H (2013) Neural basis of imprinting behavior in chicks. *Development, Growth & Differentiation* 55 198-206. 査読有 DOI: 10.1111/dgd.12028

Maekawa F, Shimba S, Takumi S, Sano T, Suzuki T, Bao J, Ohwada M, Ehara T, Ogawa Y, Nohara K (2012) Diurnal expression of Dnmt3b mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork. *Epigenetics* 7(9) 1046-1056. 査読有 DOI:10.4161/epi.21539

Kato Y, Nakashima S, Maekawa F, Tsukahara S (2012) Involvement of postnatal apoptosis on sex difference in number of cells generated during late fetal period in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in rats. *Neurosci. Lett.* 516(2)290-5. 査読有 DOI:10.1016/j.neulet.2012.04.017

Yada T, Kohno D, Maejima Y, Sedbazar U, Arai T, Toriya M, Maekawa F, Kurita H, Nijima A, Yakabi K (2012) Neurohormones, Rikkunshito and hypothalamic neurons interactively control appetite and anorexia. *Current Pharmaceutical Design*, 18(31) 4854-4864. 査読有 DOI:10.2174/138161212803216898

Nohara K, Tateishi Y, Suzuki T, Okamura K, Murai H, Takumi S, Maekawa F, Nishimura N, Kobori M, Ito T (2012) Late-onset increases in oxidative stress and other tumorigenic activities and tumors with a Ha-ras

mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic. *Toxicol. Sci.* 129(2)293-304. 査読有 DOI: 10.1093/toxsci/kfs203

Suzuki K, Maekawa F, Suzuki S, Nakamori T, Sugiyama H, Kanamatsu T, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H (2012) Elevated expression of brain-derived neurotrophic factor facilitates visual imprinting in chicks. *Journal of Neurochemistry* 123(5) 800-810. 査読有 DOI: 10.1111/jnc.12039

〔学会発表〕(計 22 件)

前川文彦 幼少期の環境が行動発達に及ぼす影響 第20回「性と生殖」公開シンポジウム「人間科学における神経内分泌研究からの展開」早稲田大学所沢キャンパス 2014年12月20日

Tin-Tin-Win-Shwe、藤谷雄二、前川文彦、柳澤利枝、古山昭子、野原恵子、新田裕史、平野靖史郎 (2014) ディーゼル排気由来 SOA の胎児期～乳児期曝露がマウスの社会行動・空間学習行動に及ぼす影響 大気環境学会第55回大会 愛媛大学 2014年9月17日

佐野一広、Tin Tin Win Shwe、藤谷雄二、野原恵子、掛山正心、前川文彦、平野靖史郎 ディーゼル排ガス由来二次生成有機エアロゾルの発達期曝露が後発的に雄性行動および行動柔軟性に及ぼす影響の解析 第21回日本行動神経内分泌研究会 ホテル 美やま(埼玉県秩父市) 2014年9月3-5日

須山成朝、前川文彦、前島裕子、窪田直人、門脇孝、矢田俊彦 アディポネクチンによる視床下部弓状核 POMC および NPY ニューロンの制御 日本生理学会 第91回大会 鹿児島大学 郡元キャンパス 2014年3月17日

前川文彦、藤原研、鳥谷真佐子、野原恵子、矢田俊彦 全身エネルギー代謝における BDNF の役割と糖尿病性内臓肥満症における治療可能性 日本生理学会 第91回大会 "シンポジウム:食事と全身代謝による脳機能の制御" 鹿児島大学 郡元キャンパス 2014年3月17日

前川文彦、浜崎浩子 発生工学的手法を用いた鳥類における脳の性分化機構の解析 第19回「性と生殖」公開シンポジウム「人間科学における生命研究の最前線」早稲田大学国際会議場 2013年12月21日

前川文彦、野原恵子、浜崎浩子 鳥類の脳における性腺ステロイドホルモン依存的・非依存的な性分化機構 環境ホルモン学会 第16回研究発表会 東京大学 山上会館 2013年12月12-13日

浜崎浩子、前川文彦 ニワトリの性分化制御における脳の役割 第37回鳥類内分泌研究会 熊本県阿蘇郡南阿蘇村 アソシエ

ート 2013年11月21日
浜崎浩子、前川文彦 ニワトリの脳キメラにおける性分化 第38回日本比較内分泌学会大会・第40回日本神経内分泌学会学術集会 比較内分泌学会企画委員会主催 シンポジウム「比較生物学からみた性」宮崎市民プラザ 2013年10月26日
前川文彦、浜崎浩子 ニワトリ脳原基移植で明らかになった脳の性分化の新たな仕組み 日本動物学会 第84回大会 岡山大学津島地区一般教育棟 2013年9月28日
浜崎浩子、前川文彦 脳の性と性分化～鳥類キメラを用いた解析～ 第28回日本下垂体研究会学術集会 花巻温泉 ホテル千秋閣 2013年8月8日
前川文彦、村井景、野原恵子 マウス胎児期無機ヒ素曝露による後発的血糖制御異常 第19回日本行動神経内分泌研究会 鹿児島 国民宿舎レインボー桜島 2013年7月5日
前川文彦、坪井貴司、塚原伸治、野原恵子 無機ヒ素による神経細胞のAMPA型グルタミン酸受容体発現抑制 第12回分子予防環境医学研究会 つくばサイエンス・インフォメーションセンター 2013年2月2日
Aung KH, Kurihara R, Nakashima S, Maekawa F, Nohara K, Kobayashi T, Tsukahara S. Live imaging analysis of sodium arsenite-induced inhibition of neurite outgrowth in Neuro-2a cells 第12回分子予防環境医学研究会 つくばサイエンス・インフォメーションセンター 2013年2月1日
前川文彦、榛葉繁紀、内匠正太、佐野友春、野原恵子 肝臓におけるDNAメチル基転移酵素遺伝子発現とDNAメチル化の日内変動 日仏生物学会 第177回例会 京都産業大学むすびわざ館 2012年12月1日
Maekawa F, Tsuboi T, Tsukahara S, Nohara K. Impairment of glutamate AMPA receptor expression by sodium arsenite is related to the neurite suppression in mouse cortical neurons. Society for neuroscience 42nd annual meeting. New Orleans Ernest N. Morial Convention Center Oct 15, 2012
下川雄二、前川文彦、山内兄人 視床下部腹内側部片側破壊による反対側におけるエストロゲン受容体 免疫陽性細胞数の増加 第39回日本神経内分泌学会学術集会 北九州市 北九州国際会議場 2012年9月28-29日
前川文彦、坪井貴司、塚原伸治、野原恵子 マウス神経細胞において無機ヒ素がAMPA型グルタミン酸受容体発現に与える影響 第35回日本神経科学大会 名古屋名古屋国際会議場 2012年9月20日
下川雄二、前川文彦、山内兄人 卵巣除去

ラット視床下部腹内側部片側破壊による反対側 ER 免疫陽性細胞数、mRNA量の増加 日本動物学会第83回大会 大阪 大阪大学豊中キャンパス 2012年9月13日

Aung KH, Kurihara R, Nakashima S, Maekawa F, Nohara K, Kobayashi T, Tsukahara S. Evaluation of sodium arsenite-induced inhibition of neurite outgrowth by live cell imaging and alteration of cytoskeletal gene expression in Neuro-2a cells. 第17回日本行動神経内分泌研究会 京都 関西セミナーハウス 2012年8月31日

②前川文彦、榛葉繁紀、内匠正太、佐野友春、鈴木武博、包金花、大和田美佳、江原達弥、小川佳宏、野原恵子 肝臓におけるDNAメチル基転移酵素 mRNA 発現の日内変動：摂食と時計遺伝子による制御 第17回日本行動神経内分泌研究会 京都 関西セミナーハウス 2012年8月31日

②前川文彦、榛葉繁紀、内匠正太、佐野友春、包金花、大和田美佳、野原恵子 マウス肝臓におけるDNAメチル基転移酵素 mRNA 発現とDNAメチル化レベルの日内変動調節機構 第6回日本エピジェネティクス研究会年会 東京 学術総合センター 2012年5月14-15日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nies.go.jp/health/labo/toxi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川文彦 (MAEKAWA FUMIHIKO)
独立行政法人国立環境研究所
環境健康研究センター・主任研究員
研究者番号：40382866

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

石坂幸人 (ISHIZAKA YUKIHITO)
独立行政法人国立国際医療研究センター研究所・難治性疾患研究部・部長
研究者番号：30281687

山内兄人 (YAMANOUCHI KOREHITO)
早稲田大学大学院・人間科学研究科・教授
研究者番号：10053357