

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790241

研究課題名(和文) ストレス応答の性差を作るエピジェノミクス - 視床下部CRFニューロンに着目して -

研究課題名(英文) Investigation on the sex difference in the epigenetic regulation of the CRF gene in the hypothalamus

研究代表者

肥後 心平 (Higo, Shimpei)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50623922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスに応答には雌雄差があることが知られている。本研究では視床下部CRFニューロンの性差に着目し、室傍核におけるCRF遺伝子プロモーター領域のエピジェネティックな発現調節機構を調査した。本研究の結果、1)室傍核の基底状態のCRF発現量はオス、メスの間で差がないが、4時間の拘束ストレスによる発現上昇率はメスが高い、2)CRFプロモーター領域のDNAメチル化はオス・メス間で差がないことが分かった。拘束ストレス後のヒストンアセチル化はメスで高い傾向があり、CRF発現上昇の雌雄差はDNAメチル化ではないヒストン修飾によるものであることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Male and female respond differently to various stress. In this study, the epigenetic status of the CRF gene promoter in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus of male and female rats were investigated in order to elucidate the underlying mechanisms of the sex differences in the stress response. No sex difference was observed in basal CRF expression in the PVN, whereas the restraint-stress induced increase in the CRF expression in the female rats were larger than that of the male. Regarding the epigenetic status of the CRF promoter region in the PVN, no sex difference was observed in the DNA methylation profile, whereas the level of histone acetylation after restraint stress tends to higher in the female. These results indicate the involvement of the histone modification but not DNA methylation in sex difference in the CRF expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：ストレス 性差 CRF

1. 研究開始当初の背景

視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA-axis) を中心とするストレス応答系には様々なレベルで性差が存在することが知られており、その一部は性ホルモンの影響によることが報告されている (Ref.1 Handa et.al., *J Neuroendocrinol.* 2009). HPA-axis の最上流に位置する視床下部のコルチコトロピン放出ホルモン (CRF) ニューロンでは、ストレス負荷による CRF の発現上昇の性差が報告されている (Ref.2 Iwasaki-Sekino et.al., *Psychoneuroendocrinol.* 2009). しかしながら、どのような機序でこのような差が生じるのか、その分子的なメカニズムはわかっていない。近年、遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化やヒストン修飾を含むエピジェネティックな制御が個々の遺伝子発現に重要な役割を担うことがわかってきている。ストレス応答に関しても、室傍核 CRF ニューロンにおける CRF 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化がストレス抵抗性に関与するという報告がなされており (ref.3 Elliott et.al., *Nat. Neurosci.* 2010), エピジェネティックな発現制御がストレス応答に影響を与える可能性を示している。

2. 研究の目的

CRF の発現上昇における性差は CRF 遺伝子のプロモーター領域におけるエピジェネティックな状態の違いに起因するのではないかと考え、視床下部室傍核に存在する CRF ニューロンの

(1) プロモーター領域の DNA メチル化

(2) ヒストンのアセチル化

における性差を調査することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

動物: 10-12 週齢オスおよびメス Wistar Rat, メスに関しては 2 周期以上の性周期を確認し、血中エストロゲン濃度が高い発情前期 Proestrus および血中エストロゲン濃度が低い発情間期 diestrus にて試料採取をおこなった。また、ラットのの一部にはプラスチック製シリンダーによる 4 時間の拘束ストレス負荷を行った。

試料採取: 採取した脳を凍結し 250 μ m に薄切後 1mm の生検パンチにより視床下部室傍核を採取し実験に用いた。室傍核パンチアウトから DNA, および RNA を抽出し試料とした。

発現解析: 基底状態およびストレス負荷時の視床下部室傍核における CRF 遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。

DNA メチル化解析: CRF プロモーター領域のメチル化状態を調査するため、室傍核パンチアウトから得られた DNA を CRF プロモーター領域の CpG island を含む領域を標的に bisulfite sequencing 法により解析を行った。

ヒストンアセチル化解析: 抗アセチル化ヒストン H3 および H4 抗体を用いた ChIP アッセイにより解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、使用する実験手技、とくに遺伝子プロモーター領域のエピジェネティック解析 (bisulfite sequencing および ChIP assay), 免疫組織化学染色の条件設定を初期の段階で行っており、その一部を論文とした (5. 発表論文 および, 学会発表)。

(1) 基底状態とストレス負荷時の CRF 発現量の雌雄差

ストレスによる発現上昇が起こっていない基底状態の CRF 発現量、および 4 時間の拘束ストレス負荷群の発現量の平均値をコントロール群の発現量平均値で規格化し解析を行った。基底状態の発現量には発情前期メス、発情間期メス、オスの間に差は見られなかった。拘束ストレスによる発現量変化はオスラットに比べメスラットが高いことがわかった (下図 1)。ストレス応答における性差はストレスの種類、方法により差が生じることがわかっているが本研究の拘束ストレスの結果はお概ね先行研究との一致を示している。(Ref2 および Ref4. Sterrenburg et.al., *J Neurosci Res.* 2012 など)

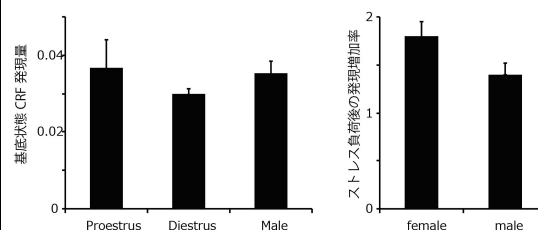


図 1

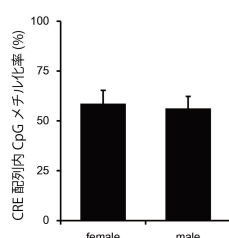
(2) 室傍核 CRF プロモーター領域の DNA メチル化解析

通常 DNA メチル化は個体発生の過程で大きく変動し、成体になってからの変動は数週間単位の長期間をかけて生じるものである。そのため、短期拘束ストレス負荷ラットは実験に用いず、通常時のコントロール群のみを解析した。CRF 遺伝子上流のプロモーター領域の構造を解析したところ、メチル化される CpG 配列がかたまって存在している CpG island が転写開始点より -114bp から +14bp までの領域に存在しており、またその上流にメチル化されると下流の遺伝子の発現量を大きく変化させることが報告されている CRE 配列 (TGACGTCA, -201bp) が存在することが分かったため、この CRE と CpG island を含む領域に PCR プライマーを設計し解析対象とした。

この結果、雌雄間での有意な差は、CpG island 内の平均メチル化率、および CRE 配列内部の CpG メチル化率ともに見られなかつ

た(図2).

図2



(3)室傍核 CRF プロモーター領域のヒストンアセチル化解析

DNA メチル化解析を行った配列を含むプロモーター領域にプライマーを設計し ChIP assay を行った。ChIP assay によるヒストンアセチル化解析では、CRF プロモーターにおけるヒストンアセチル化の度合いがストレス負荷群のメスでオスに比べ高い傾向にあった。

上記の結果よりストレス負荷時のストレス応答の性差は、発生時の DNA メチル化の差によるものではなく、ヒストン修飾によるものであることが示唆された。

ヒストン修飾にはアセチル化の他にメチル化、リン酸化などが種々存在し、それぞれに下流の遺伝子の発現に様々な影響を与えることが知られている。これらの修飾反応を触媒する酵素群の活性が外的なストレス負荷によって変化していることが考えられる。

また、HPA-axis の様々なレベルで性ステロイド濃度がストレス応答に影響を与えることが報告されている(Ref.1 など)。

これらのことを鑑み、今後はストレス負荷時のエピジェネティックな変化を担う酵素群の解析、また体内の性ステロイド環境による変化を中心に研究を進展させることを考えている。

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4件)

Mori K, Iijima N, Higo S, Aikawa S, Matsuo I, Takumi K, Sakamoto A, Ozawa H. "Epigenetic suppression of mouse Per2 expression in the suprachiasmatic nucleus by the inhalational anesthetic, sevoflurane." *PLoS One*. 2014 Jan 31;9(1):e87319. doi: 10.1371/journal.pone.0087319. 査読あり

Anzai M, Iijima N, Higo S, Takumi K, Matsuo I, Mori K, Ohe Y, Kadota K, Akimoto T, Sakamoto A, Ozawa H. "Direct and specific effect of sevoflurane anesthesia on rat Per2

expression in the suprachiasmatic nucleus." *PLoS One*. 2013;8(3):e59454. doi: 10.1371/journal.pone.0059454. 査読あり

Kato A, Hojo Y, Higo S, Komatsuzaki Y, Murakami G, Yoshino H, Uebayashi M, Kawato S. "Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines." *Front Neural Circuits*. 2013 Oct 18;7:149. 査読あり

Takumi K, Iijima N, Higo S, Ozawa H. "Immunohistochemical analysis of the colocalization of corticotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor in kisspeptin neurons in the hypothalamus of female rats." *Neurosci Lett*. 2012 Nov 30;531(1):40-5. doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.010. 査読あり

[学会発表](計5件)

松尾いづみ, 飯島典生, 肥後心平, 相川優子, 託見健, 坂本篤裕, 小澤一史. "吸入麻酔薬 Sevoflurane の GABA 受容体を介した時計遺伝子への影響" 2014年3月, 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(自治医科大学)ポスター

肥後心平, 相川優子, 小澤一史. "ラット泌乳期における kisspeptin 遺伝子の発現動態制御に関する分子組織化学的解析" 2013年3月, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会(高松市)ポスター

託見健, 飯島典生, 肥後心平, 小澤一史. "視床下部 kisspeptin ニューロンにおけるコルチコトロピン放出ホルモン受容体とグルココルチコイド受容体の発現" 2013年3月, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会(高松市)ポスター

森啓介, 相川優子, 肥後心平, 松尾いづみ, 飯島典生, 坂本篤裕, 小澤一史. "全身麻酔薬セボフルランによるマウス視交叉上核の時計遺伝子 mPer2 発現抑制に関するエピジェネティック解析" 2013年3月, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会(高松市)ポスター

若林正彦, 北条泰嗣, 肥後心平, 川戸佳. "海馬の神経シナプスを制御する性

ステロイド合成と受容体に性差はある
か” 2012年6月第35回日本神経科学大
会(名古屋市) ポスター

〔図書〕(計0件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
該当なし

取得状況(計0件)
該当なし
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥後 心平 (Higo, Shimpei)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：50623922

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし