

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		NISHIHARA MASUGI				
①研究代表者氏名		西原 真杉			②所属研究機関・部局・職	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
③研究課題名	和文	性ステロイド中枢作用の分子機構に関する研究				
	英文	Studies on the action of sex steroids in the brain				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	24,400	21,900	15,200	15,200		76,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
西原 真杉	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授	獣医生理学	成熟動物における性ステロイド中枢作用の分子機構の解明			
鈴木 正寿 (平成16年辞退)	University of Wisconsin-Madison・Stem Cell Research Program・Associate Scientist	幹細胞生物学	性ステロイドによる脳の性分化誘導の分子機構の解明			
山内 啓太郎 (平成16年追加)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教授	獣医生理学	性ステロイドによる脳の性分化誘導の分子機構の解明			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>性ステロイドは、主として核内受容体と結合し特定の遺伝子群の転写を活性化することによりその生理作用を発揮すると考えられている。脳においては、発生過程の特定の時期（臨界期）に、雄ではアンドロジェンがエストロジェンへと代謝されて受容体と結合し、特定の遺伝子群が転写されることにより、その雄型への分化が起こる。一方、臨界期にエストロジェンの作用を免れて雌型へと分化した脳では、成熟後、エストロジェンによりやはり特定の遺伝子群の転写が起こり、性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の一過的大量分泌（サージ）が誘起され、雌に特有の性周期が回帰する。このような性ステロイドの中枢作用は、多数の遺伝子の協調的な発現と、それらのコードするタンパク群の複雑な相互作用により発現すると考えられる。さらに、時期により発現する遺伝子群は異なることが想定され、このことは個々の遺伝子が時期特異的な転写制御を受けていることを意味している。</p> <p>本研究においては、脳の性分化誘導や GnRH サージ発生などの性ステロイド中枢作用をモデルとしてその分子機構を解明するために、ラットを用いて新生期（ラットにおける性分化の臨界期）、および成熟期のそれぞれの時期において、性ステロイドにより転写が活性化される遺伝子群を同定し、神経細胞の分化や興奮性に対する遺伝子産物の作用機序を解析するとともに、それらの遺伝子の性ステロイドによる転写制御機構を明らかにすることを目的とした。</p>						

⑦研究成果の概要（研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。）**1) 脳の性分化関連遺伝子群の解析**

脳の性分化の臨界期に視床下部において発現量に性差のある遺伝子を cDNA マイクロアレイ法により解析し、vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase、glutamic acid decarboxylase 65、BDNF/NT-3 growth factor receptor precursor、putative G protein coupled receptor、p130、putative vomeronasal organ receptor などの遺伝子を同定した。特に p130 遺伝子についてはテストステロンとジヒドロテストステロンにより発現量が変化するがエストラジオールでは変化しないことなどが明らかになり、アンドロジェン受容体を介して性特異的な神経回路を形成する機構が存在する可能性が考えられた。さらに、我々が既に脳の性分化関連遺伝子として同定していたグラニューリン遺伝子についてノックアウトマウスの作出に成功し、性行動をはじめとする性的二型行動の解析を行った。その結果、射精頻度の低下などが明らかとなり、グラニューリンが雄型性行動を発現する神経回路の構築に重要な役割を果たしていることが示された。

2) GnRH サージ発生機構の解析

多ニューロン発射活動 (MUA) 記録法を用いて視床下部における電気活動を記録し、性ステロイド処置の影響を検討した。その結果、視交叉上核近傍 (peri-SCN) において一過的なバースト状の発火 (MUA volley) の出現によって特徴づけられる神経活動が観察され、さらにクロラロース麻酔下で性ステロイド処置により LH サージを誘起した場合、血中 LH 濃度の上昇に先立つ MUA の基底値の上昇が観察された。Peri-SCN で LH サージと相関する MUA の上昇が見られたことから、同部位を含む領域においてエストロジェン依存性に発現する遺伝子を解析することにより GnRH サージ発現の分子機構を解明できるものと考えられた。このような GnRH サージ発現に関連してエストロジェンにより発現の上昇する候補遺伝子として、ヘアレス遺伝子が同定された。

3) グラニューリン遺伝子の転写制御機構および細胞増殖作用の解析

グラニューリンのエストロジェンによる転写調節機構の解析を MCF-7 細胞 (ヒト乳癌由来細胞株) を用いて行った。グラニューリン遺伝子上流域のプロモーター活性を測定した結果、1.0 kb のコンストラクトでエストロジェンにより最も効率よく転写活性は上昇した。グラニューリン遺伝子に対するエストロジェンの効果は完全なエストロジェン応答配列 (classical ERE) を介してではなく、Exon 1 から上流約 930 bp に存在する ERE half-site、Spl site、NF- κ B site などが協調的に作用してプロモーター活性を高めることが示唆された。さらに、グラニューリン発現ベクターを MCF-7 細胞および PC12 細胞 (ラット副腎褐色細胞種由来細胞株) にトランスフェクトした結果、グラニューリンは両細胞株の増殖を促進した。この結果より、グラニューリンが乳腺細胞のみならず、神経前駆細胞の増殖を促進し得ることが示された。

4) 神経保護作用等のステロイド中枢作用の解析

本研究においては、成熟動物における性ステロイド中枢作用のモデルとして神経保護作用についても解析を行い、エストロジェンによる海馬歯状回の神経増殖に伴いグラニューリン遺伝子の発現が上昇することを見出した。さらに、老齢動物においてはこれらの作用が共に見られなくなることが明らかとなり、エストロジェンによる成熟動物の脳における神経細胞の増殖促進作用がグラニューリンにより仲介されていることが示唆された。また本研究においては、内分泌攪乱化学物質としての可能性が疑われているフタル酸/アジピン酸エステル類の周産期暴露がグラニューリンおよび p130 の遺伝子発現を変化させることにより脳の性分化に影響を与えること、性ステロイドは脳内ペプチドの放出パターンを変化させることにより GH パルスを制御すること、グルココルチコイドは脳内のプロスタグランジン合成酵素 (COX2) の発現を抑制することによりストレス条件下での GnRH パルスを維持すること、などを明らかにした。さらに、我々は 20α -水酸化ステロイド脱水素酵素のノックアウトマウスを作出しているが、本マウスでは脳内のニューロステロイド代謝が変化して鬱傾向が強くなることが示唆された。これらの知見はステロイドが様々な機序で多様な脳機能を制御していることを示すもので、今後さらにその分子機構の解明を進めていきたいと考えている。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

1) 脳の性分化の分子機構について

脳の性分化は臨界期と呼ばれる周生期の一定期間に性腺から分泌される性ステロイドに依存して起こる。すなわち、臨界期に精巣から分泌されるテストステロンが存在すると脳は不可逆的かつ永続的に雄型へと分化するが、テストステロンの非存在下では脳は雌型へと分化する。テストステロンはさらに脳細胞内で芳香化酵素によりエストラジオールへと変換され、この芳香化が脳を雄性化する上で重要であると考えられている。我々はグラニューリン遺伝子の発現がエストロジェン依存性に臨界期のラット視床下部で上昇することを見出すとともに、グラニューリン・ノックアウトマウスでは雄型性行動が低下することを示し、本遺伝子が性分化関連遺伝子であることを実証した。

一方、テストステロンは直接に、あるいは還元化酵素によりジヒドロテストステロン (DHT) に変換され、アンドロジェン受容体に結合することによっても作用を発現し得るが、この経路がラットの脳の性分化に関与しているか否かについては未解明である。しかし、DHT が発達期視床下部の神経細胞の分化を誘導すること、アンドロジェン受容体が臨界期の視床下部の様々な神経核に発現することなど、DHT やアンドロジェン受容体がラットの脳の性分化に関与することを示唆する報告もある。本研究により周生期の視床下部における発現に性差の認められた遺伝子のなかで、retinoblastoma 遺伝子ファミリーに属する増殖抑制因子である p130 遺伝子の発現は、新生雌ラットへの性ステロイド投与実験からテストステロンと DHT により変化するがエストラジオールによっては変化しないことが明らかになった。これらの新知見は、脳の性分化の過程がエストロジェン受容体のみではなく、アンドロジェン受容体を介した経路によっても制御されていることを示唆しており、従来の脳の性分化の分子機構の概念に修正を迫るインパクトをもつものである。

2) エストロジェンによる遺伝子転写調節機構について

本研究において、グラニューリン遺伝子 5'-上流域をクローニングし、プロモーターアッセイを行ったところ、エストロジェン応答配列 (classical ERE) が存在しないにもかかわらずエストロジェンにより用量依存性に転写活性が上昇した。このプロモーター領域には ERE half-site、あるいは SP1、AP-1、NF- κ B などの転写因子結合部位が存在した。エストロジェン受容体は、これらの転写因子群を介して間接的に DNA に結合できることが知られている。すなわち、グラニューリン遺伝子の発現はエストロジェンだけで調節されているのではなく、様々な転写因子群とエストロジェン受容体の共役を介した複雑なシステムによって制御されていることが示唆された。さらに、このような転写因子群が、グラニューリン遺伝子発現の組織特異性や時期特異性の決定に重要であると考えられる。

3) 性ステロイドの神経保護作用について

性ステロイドの中核作用として、発生過程の脳に作用して性分化を誘導する作用 (形成作用)、および成熟動物の脳に作用して性行動や性ホルモンの分泌パターンを制御する作用 (活性作用) が知られている。さらに、近年、性ステロイドが認知、記憶など脳の高次機能の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。また、脳虚血後の細胞死の抑制、ヒトの閉経後のアルツハイマー病の増加とホルモン補充療法によるその抑制など、変性疾患からの神経細胞の保護作用も大きな注目を集めている。このような作用は神経保護作用と呼ばれ、その作用機序の詳細は明らかではないが、性ステロイドによる細胞死の制御や、脳内に存在する幹細胞からの神経細胞の増殖、再生などの関与が想定されている。

本研究においては、海馬歯状回における神経細胞の増殖がエストロジェンにより促進されることを確認し、さらに脳の性分化関連遺伝子として同定したグラニューリン遺伝子が成熟動物における神経細胞増殖部位に発現していることを見出した。これらのことは、従来独立した作用と考えられてきた形成作用と保護作用が、本質的には作用メカニズムを共有していることを強く示唆するものである。両者には神経細胞の増殖、分化、細胞死など共通する過程が関わっており、我々の形成作用に関する知見を敷衍することで、エストロジェンの神経保護作用の機構解明を大きく進展できるものと考えられる。本研究ではさらに、PC12 細胞にグラニューリン遺伝子をトランスフェクトすることにより増殖を促進することを見出したが、このことはグラニューリンの性分化誘導作用や神経保護作用が神経前駆細胞の増殖を促進することにより発現することを示唆するものである。

- ⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

<学術論文等>

Lee HC, Yamanouchi K, Nishihara M. Effects of perinatal exposure to phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. J Reprod Dev, in press.

- Matsuwaki T, Kayasuga Y, Yamanouchi K, Nishihara M. Maintenance of gonadotropin secretion by glucocorticoids under stress conditions through the inhibition of prostaglandin synthesis in the brain. Endocrinology 147, 1087-1093, 2006.

Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sako R, Yamanouchi K, Nishihara M. Modulation of growth hormone pulsatility by sex steroids in female goats. Endocrinology 146, 2736-2743, 2005.

鈴木正寿, 西原真杉. 脳の性分化の分子・遺伝子機構. Horm Front Gynecol 12, 227-234, 2005.

鈴木正寿, 西原真杉. 脳の性分化における分子機構- グラニューリンの関わり-. 性差と医療 2, 157-160, 2005.

Suzuki M, Lee HC, Chiba S, Yonezawa T, Nishihara M. Effects of methoxychlor exposure during perinatal period on reproductive function after maturation in rats. J Reprod Dev 50, 455-461, 2004.

Takagi H, Shibutani M, Lee KY, Lee HC, Nishihara M, Uneyama C, Takigami S, Mitsumori K, Hirose M. Lack of modifying effects of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats. Reprod Toxicol 18, 6, 2004.

Matsuwaki T, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Glucocorticoid counteracts the suppressive effect of tumor necrosis factor- α on the surge of luteinizing hormone secretion in rats. J Endocrinol 181, 509-513, 2004.

Hirabayashi K, Ishida M, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Characterization and functional analysis of the 5'-flanking region of the mouse 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene. Biochem J 382, 975-980, 2004.

石田真帆, 平林啓司, 鈴木正寿, 山内啓太郎, 西原真杉. 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素ノックアウトマウスの生殖機能. 日本生殖内分泌学会雑誌 9, 35-38, 2004.

Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Expression analyses of sex steroid-regulated genes in neonatal rat hypothalamus. J Reprod Dev 49, 547-552, 2003.

Fujioka H, Suzuki M, Yamanouchi K, Ohta A, Nagashima H, Kato M, Nishihara M. Generation of transgenic rats expressing enhanced green fluorescent protein in gonadotropin-releasing hormone neurons. J Reprod Dev 49, 523-529, 2003.

Ishida M, Hirabayashi K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Cloning and chromosomal localization of mouse 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene. J Reprod Dev 49, 79-85, 2003.

Matsuwaki T, Watanabe E, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Glucocorticoid maintains pulsatile secretion of LH under infectious stress condition. Endocrinology 144, 3477-3482, 2003.

- Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Androgen induces p130 mRNA expression in the neonatal rat hypothalamus. Neurosci Lett, 334, 107-110, 2002.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

Mogi K, Li JY, Suzuki M, Sawasaki T, Takahashi M, Nishihara M. Characterization of growth hormone pulsatility in male Shiba goats: Effects of postpubertal castration and KP102. *Endocrine J* 49, 145-151, 2002.

Yonehara K, Suzuki M, Nishihara M. Sex-related differences in gene expression in neonatal rat hypothalamus assessed by cDNA microarray analysis. *Endocrine J* 49, 131-137, 2002.

○ Suzuki M, Nishihara M. Granulin precursor gene: a sex steroid-inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol Genetic Metab* 75, 31-37, 2002.

Suzuki M, Nishihara M. Estrogen affects gene expression of estrogen receptors, androgen receptor, and aromatase in the neonatal rat hypothalamus. *J Reprod Dev* 48, 17-23, 2002.

Hirabayashi K, Kuranaga E, Suzuki M, Takahashi M, Nishihara M. Expression of ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in rat thymus. *Endocrine J* 48, 557-563, 2001.

Suzuki M, Yonezawa T, Fujioka H, Matsumuro M, Nishihara M. Induction of granulin precursor gene expression by estrogen treatment in neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 297, 199-202, 2001.

<国際会議・学会等>

西原真杉. 性ステロイドの中枢作用と脳内ペプチド. 第141回日本獣医学会, 筑波, 2006年3月.

Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Protective effects of glucocorticoid on luteinizing hormone secretion under stress conditions. 35th annual meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November 2005.

千葉秀一, 山内啓太郎, 西原真杉. 成体脳の神経新生に対するエストロゲン作用の加齢に伴う変化. 第10回日本生殖内分泌学会, 東京, 2005年11月.

Nishihara M. Brain sciences in animal science field in Japan. College of Life Science and Agriculture, Hainan University, Haikou, China, October 2005.

Lee HC, Yamanouchi K, Nishihara M. Effects of preinatal exposure to DBP, DINP and DEHA on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. The 4th Meeting of the Polish Society for Biology of Reproduction. Krakow, Poland, September 2005.

Nishihara M. Molecular mechanisms underlying sex steroid actions in the brain. College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea, April 2005.

李輝哲, 山内啓太郎, 西原真杉. 周産期ラットにおけるフタル酸/アジピン酸エステル類曝露の視床下部遺伝子発現および性行動に対する影響. 第140回日本獣医学会, 鹿児島, 2005年9月.

千葉秀一, 山内啓太郎, 西原真杉. グラニューリンノックアウトマウスの海馬歯状回における神経新生の解析. 第140回日本獣医学会, 鹿児島, 2005年9月.

松脇貴志, 山内啓太郎, 西原真杉. ストレス条件下における視床下部-下垂体-性腺 (HPG) 系に対するグルココルチコイドの保護作用. 第32回日本神経内分泌学会, 沖縄, 2005年7月.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

土屋純一，石田真帆，菊水建史，山内啓太郎，西原真杉．20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素ノックアウトマウスを用いた新規ニューロステロイド代謝の解析．第139回日本獣医学会，和光，2005年3月．

Nishihara M. Neuroendocrine control of the estrous cycle in monkeys. Primate/Animal Disease Model Symposium. Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea, December 2004.

西原真杉．哺乳類における脳の性分化機構の解析．特定領域研究「性分化機構の解明」公開シンポジウム，東京，2004年10月．

栢菅遊子，鈴木正寿，菊水健史，山内啓太郎，岩倉洋一郎，西原真杉．グラニューリン・ノックアウトマウスの作出とその攻撃性の評価．第138回日本獣医学会，札幌，2004年9月．

西原真杉．脳の性分化に対する内分泌攪乱化学物質の影響．第14回神経行動毒性研究会，東京，2003年12月．

Matsuwaki T, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Glucocorticoid maintains luteinizing hormone secretion under infectious stress condition. 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November 2003.

Yonezawa T, Mogi K, Li JY, Sawasaki T, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Changes in pulsatile pattern of growth hormone secretion during estrous cycle in goats. 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, USA, November 2003.

Suzuki M, Lee H-C, Chiba S, Yonehara K, Yonezawa T, Nishihara M. Perinatal exposure of female rats to environmental endocrine disrupting chemicals interferes with lordosis behavior and LH surge on the proestrous day in adulthood. 32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Orland, USA, November 2002.

Suzuki M, Lee H-C, Chiba S, Yonehara K, Yonezawa T, Nishihara M. Effect of perinatal exposure to environmental endocrine disrupting chemicals on sexual behaviors and serum hormone levels in rats. 5th International Congress of Neuroendocrinology. Bristol, UK, September 2002.

米原圭祐，鈴木正寿，山内啓太郎，西原真杉．cDNA マイクロアレイを用いた脳の性分化関連遺伝子群の探索．第134回日本獣医学会，岐阜，2002年9月．

Nishihara M. Molecular endocrinological approaches to the regulation of animal function. Molecular Bioengineering of Food Animal Resources, Research for the Future Program, JSPS, Osaka, Japan, May 2002.

Nishihara M., Suzuki M. Estrogen action in the brain. 2nd Canada-Japan Bilateral Exchanges in Reproductive Biology and Human Reproduction, Fukui, Japan, November 2001.

西原真杉．脳の性分化の誘導機構について．第94回日本繁殖生物学会シンポジウム，東京，2001年9月．

Suzuki M, Takahashi M, Nishihara M. Granulin precursor gene as a sex-steroid inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. 83rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Denver, USA, June 2001.