

氏名	金谷 萌子
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 971 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Mechanism of Sex Steroid Action on Sexual Differentiation of Brain (脳の性分化における性ステロイドホルモンの作用機構に関する研究)
論文審査委員	委員長 准教授 塚原 伸治 委員 教授 小林 哲也 委員 准教授 根本 直人 委員 准教授 坂田 一郎

## 論文の内容の要旨

Sexual differentiation of the brain is essential to achieve sexual reproduction for species survival. Studies performed for many decades revealed that there are three major contribution factors of sexual differentiation of the brain: sex chromosome gene expressing in the brain, testicular testosterone in developing period, and ovarian and testicular hormones during puberty. Of these factors, sex steroids have major role in sexual differentiation of the brain, because hormonal manipulation in rodents such as rats and mice in the perinatal period can be reversed the sex of the brain from the genetic sex. However, it is not clarified the detailed mechanisms, by which the brain is sexually differentiated under the influence of sex steroids in the perinatal and pubertal periods.

Sexually differentiated brain contains nuclei exhibiting morphological sex differences, which are termed sexually dimorphic nuclei (SDNs). SDNs have been identified in the brain of many species including rodents and primates, and they are considered to be a critical component of the neural systems regulating sex- or gender- biased physiological functions. In rodents, there is a female-biased SDN termed the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and a male-biased SDN termed the principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis (BNSTp). The AVPV is larger and has more neurons in female mice. In contrast, the BNSTp is larger and has more neurons in male mice. In this dissertation, for better understanding of sexual differentiation of the brain, I aimed to determine the mechanisms of sex steroid actions on the formation of the AVPV and BNSTp in mice.

It is well known that ovarian estradiol acts in the brain via two types of nuclear receptors, estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ). Testicular testosterone acts via androgen receptor (AR). In addition to the direct action of testosterone via AR, testosterone can affect the brain by binding with ERs after it was locally converted into estradiol in the brain. It has been demonstrated that masculinization of the BNSTp in mice requires the gene expression of ER $\alpha$  and aromatase, but not ER $\beta$ . First, I examined the morphology of the AVPV in transgenic mice lacking aromatase, ER $\alpha$ , or ER $\beta$  gene to determine what genes are required for the sexual differentiation of the AVPV. I also examined the AVPV and BNSTp of AR knockout mice to determine the role of AR on the formation of the AVPV and BNSTp. As a result, defeminization of the AVPV in male mice was disrupted by deletion of the aromatase and ER $\alpha$  genes, but not by deletion of the ER $\beta$

and AR genes. The volume and neuron number of the AVPV in aromatase knockout and ER $\alpha$  knockout male mice were significantly larger than those in wild-type male mice. Masculinization of the BNSTp was disrupted by deletion of the AR gene, although deletion of the AR gene did not have any significant effect on defeminization of the AVPV. These findings suggest that defeminization of the AVPV involves the actions of aromatized testosterone binding with ER $\alpha$ . For masculinization of the BNSTp, direct actions of testosterone via AR are also required in addition to the actions of aromatized testosterone binding with ER $\alpha$ .

Second, to investigate the mechanisms of sex steroid actions on the sexual differentiation of the AVPV and BNSTp during the perinatal period, the AVPV and BNSTp were isolated from the brain of wild-type mice on embryonic day 18 (ED18, ED1 = the day of vaginal plug confirmation) and on postnatal day 4 (PD4, PD0 = day of birth), and the mRNA levels of aromatase, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR in the AVPV and BNSTp were measured. Additionally, the mRNA levels of ARKO mice on ED18 and PD4 were measured to determine whether testosterone actions via AR modulate the mRNA levels. In the AVPV, the aromatase mRNA level was higher on ED18, while the ER $\alpha$  mRNA level was higher on PD4 without any effect of AR gene deletion and sex difference. AR mRNA in the BNSTp and AVPV of wild-type mice was not expressed on ED18 and emerged on PD4. Aromatase and ER $\alpha$  mRNA levels in the male BNSTp were significantly increased on PD4 by AR gene deletion, suggesting that testosterone signaling via AR during the postnatal period attenuates aromatized testosterone signaling via ER $\alpha$ . The mRNA levels of aromatase, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR in the AVPV and BNSTp of male and female mice from PD20 to PD60 were also measured to investigate the mechanisms of sex steroid actions on the sexual differentiation of the AVPV and BNSTp during puberty. From PD20 to PD60, the mRNA level of ER $\alpha$  in the AVPV was higher in female mice, while the mRNA level of ER $\beta$  in the AVPV was higher in male mice, although no sex difference in AR expression was found. The AVPV from PD20 to PD60 did not express aromatase in both sexes. In the BNSTp from PD20 to PD60, the mRNA levels of ER $\alpha$  and ER $\beta$  were significantly higher in female mice, while the mRNA level of AR was significantly higher in male mice. The BNSTp expressed aromatase from PD20 to PD60 without sex difference.

In conclusion, this study suggested that defeminization of the AVPV in male mice involves aromatized testosterone signaling via ER $\alpha$  during the perinatal period. Aromatized testosterone signaling via ER $\alpha$  during the perinatal period and testosterone signaling via AR during the puberty are presumably required for masculinization of the BNSTp. Thus, there are regional differences in sex steroid action on the formation of SDNs.

## 論文の審査結果の要旨

金谷萌子氏の学位論文について、学位論文審査委員会は、平成27年2月12日に理学部1番教室において公開で発表会を開催し、論文の内容を審査したので報告する。

有性生殖をおこない種の存続を図るほ乳類では、雌雄で異なる生殖機能を制御するため、脳が性的に分化している。脳を性分化させる重要因子として、発達期と思春期の精巣から分泌されるテストステロンと思春期の卵巣から分泌されるエストラジオールが知られているが、脳の性分化に影響を及ぼす性ステロイドホルモンの作用機構は解明されていない。性分化した脳には、形態学的性差がみられる神経核が存在し、これらは性的二型核と称される。ほ乳類のモデル動物であるマウスの脳には、前腹側脳室周囲核 (AVPV) と境界条床核主核 (BNSTp) と呼ばれる性的二型核が存在する。AVPV の体積や神経細胞数は雌において多く、反対に、BNSTp の体積や神経細胞数は雄において多い。申請者は、AVPV と BNSTp に着目し、性的二型核の形成に対する性ステロイドホルモンの作用機構を明らかにするための研究を行った。本論文に記述されている主要な研究成果は以下の通りである。

エストラジオールは、エストロゲン受容体  $\alpha$  と  $\beta$  (ER  $\alpha$  と ER  $\beta$ ) に結合して作用する。テストステロンは、アンドロゲン受容体 (AR) に結合して作用する他、芳香化酵素によりエストラジオールに転化した後、ER  $\alpha$  や ER  $\beta$  に結合して作用する。BNSTp の雄性化には、ER  $\alpha$  に結合する芳香化テストステロンが必要であるが、ER  $\beta$  は関与しないことが明らかになっている。そこで、申請者は、芳香化酵素、ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  のノックアウトマウスを用いて、AVPV の組織学的解析を行った。その結果、ER  $\alpha$  と芳香化酵素の欠損により、雄マウスの AVPV は雌性化した。しかし、ER  $\beta$  欠損による影響はみられなかった。さらに、AR ノックアウトマウスの AVPV および BNSTp を解析した結果、BNSTp の雄性化は AR の欠損により阻害されが、AVPV への影響はみられなかった。以上の結果から、AVPV の脱雌性化には、芳香化テストステロンの ER  $\alpha$  を介した作用が必要であることが示された。BNSTp の雄性化には、芳香化テストステロンの ER  $\alpha$  を介した作用に加えて、AR に結合するテストステロンの作用も必要であることが示唆された。

次に、発達期の AVPV と BNSTp における性ステロイド作用機構を明らかにするため、胎生18日と生後4日の野生型マウスの AVPV と BNSTp を採取し、芳香化酵素、ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  及び AR の mRNA 発現量を測定した。また、AR 遺伝子欠損による mRNA 発現量への影響を調べるため、AR ノックアウトマウスより採取した AVPV 及び BNSTp の mRNA 発現量も測定した。その結果、AVPV の芳香化酵素の mRNA 発現量は胎生18日に高く、ER  $\alpha$  の mRNA 発現量は生後4日に高かった。これらの発現量には性差はなく、AR 欠損の影響もみられなかった。胎生18日の BNSTp では、AR の mRNA 発現がみられなかった。生後4日の BNSTp では、芳香化酵素と ER  $\alpha$  の mRNA 発現量が AR 欠損により増加した。以上の結果から、AVPV の脱雌性化に関与する発達期の精巣由来テストステロンは、主として、胎生後期に芳香化テストステロンとして ER  $\alpha$  に結合することで作用すると考えられた。BNSTp の雄性化に関与するテストステロンも、エストラジオールに転化され、ER  $\alpha$  に結合して作用するが、ER  $\alpha$  を介した間接作用は、出生後に発現する AR を介したテストステロンの直接作用によって減弱すると考えられた。

最後に、思春期の AVPV と BNSTp における性ステロイド作用機構を明らかにするため、生後20、30、40、及び60日の雌雄マウスの AVPV と BNSTp を採取し、芳香化酵素、ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$  及び AR の mRNA 発現量を測定した。その結果、AVPV の ER  $\alpha$  mRNA 発現量は雌において高く、ER  $\beta$  の mRNA 発現量は雄において高かった。AVPV では芳香化酵素の発現がみられず、AR の発現には性差はなかった。BNSTp における ER  $\alpha$  と ER  $\beta$  の mRNA 発現量は雌において雄よりも多く、AR の発現量は雄において多かった。

BNSTp では芳香化酵素が発現していたが、性差はみられなかった。

以上を総括すると、本論文から、AVPV の脱雌性化には ER  $\alpha$  と芳香化酵素が必要であることが明らかになった。AVPV における芳香化酵素の発現は胎生後期に高く、出生後になると減少し、思春期では消失した。このことから、周生期の精巣から分泌されたテストステロンが、芳香化酵素によりエストラジオールに転化し、ER  $\alpha$  に結合して作用することが、AVPV の脱雌性化に重要であると考えられた。BNSTp の雄性化には、ER  $\alpha$  と芳香化酵素に加えて、AR も必要であることが明らかになった。BNSTp の AR 発現は、胎生後期ではみられず、出生後に増加し、思春期では雄において雌よりも高くなった。BNSTp の雄性化には、周生期の ER  $\alpha$  に結合する芳香化テストステロンの作用と思春期の AR に結合するテストステロンの作用の両方が必要であることが示唆された。これらの研究成果は、脳の性分化機構解明のための重要な知見である。申請者は本論文の内容を筆頭著者として査読付き英語論文 1 編に発表している。その他にも、筆頭著者として査読付き英語論文 1 編を発表し、共著者として共同研究の成果を査読付き英語論文 1 編および総説 1 編に発表している。以上のことから、審査委員会は本学位論文を博士（理学）の学位授与に相応しいものと判断した。