

氏名	森下 雅大
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 1192 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 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	性的二型核の性差形成機構と生理機能に関する研究
論文審査委員	委員長 教授 塚原 伸治 委員 教授 小林 哲也 委員 准教授 坂田 一郎 委員 連携准教授 前川 文彦

## 論文の内容の要旨

有性生殖を行う動物は、雌雄で異なる行動や生殖機能を制御するため、脳が性的に分化している。形態学的に性差がある神経核は性的二型核と呼ばれ、脳機能の性差の構造基盤であるが、性的二型核の性差形成機構や生理機能は不明である。本博士論文では脳の性分化の理解を深めることを目的として、マウスの性的二型核の形成機構と生理機能を解析した研究について論じた。

マウスの内側視索前野にはカルシウム結合タンパク質の一種であるカルビンディン-D28K (Calb) を発現する性的二型核 (CALB-SDN) が存在する。CALB-SDN を構成する Calb ニューロンの数には雄優位な性差がある。また、CALB-SDN の背側に位置する分界条床核主核 (BNSTp) も性的二型核である。BNSTp の背側 (CALB-BNSTp) には Calb ニューロンが豊富に存在し、腹側部 (BNSTpv) は Calb ニューロンが少ない。CALB-BNSTp の Calb ニューロンの数には雄優位な性差がある一方、BNSTpv の Calb を発現しないニューロン (non-Calb ニューロン) の数には雌優位な性差がある。これらの性的二型核の性差形成には性ステロイドホルモンが重要である。周生期のアンドロゲンは CALB-SDN と CALB-BNSTp の Calb ニューロンを増加させ、BNSTpv の non-Calb ニューロンを減少させる。さらに、春機発動期において雄マウスの CALB-SDN と CALB-BNSTp の Calb ニューロンは増加するが、春機発動期前に精巣を除去すると増加が阻害される。このことから、春機発動期のアンドロゲンも CALB-SDN と CALB-BNSTp の雄性化を促すと考えられるが、その作用機序は不明である。また、春機発動期前に卵巣を除去すると、BNSTpv の non-Calb ニューロンが減少することから、春機発動期の卵巣ホルモンが BNSTpv の雌性化を促すと考えられるが、エストロゲンの作用か否かは明らかではない。そこで、春機発動期前に精巣を除去した雄マウスにテストステロン (T)、エストラジオール ( $E_2$ ) または芳香化されないアンドロゲンであるジヒドロテストステロン (DHT) を代償投与し、その影響を組織学的に解析した。その結果、T と DHT の投与により、CALB-SDN と CALB-BNSTp の Calb ニューロンが増加した。しかし、 $E_2$  投与の影響はなかった。このことから、CALB-SDN と CALB-BNSTp の雄性化は、春機発動期における精巣由来のアンドロゲンがアンドロゲン受容体に結合して作用することで、引き起こされると考えられた。一方、春機発動期前に精巣を除去した雌マウスに  $E_2$  を代償投与した結果、BNSTpv の non-Calb ニューロンが増加した。このことから、BNSTpv の

雌性化には、春機発動期の卵巣由来のエストロゲンが関与することが示唆された。

次に、性的二型核が構築する神経回路の性差を明らかにすることを目的として、Calbニューロン特異的にCreリコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスとアデノ随伴ウイルスベクターを用いてCALB-SDNの投射部位を調べた。その結果、CALB-SDNを構成するCalbニューロンには、中脳の腹側被蓋野（VTA）に投射するニューロンと内側視索前野で局所神経回路を構成する介在ニューロンの2種類が存在することが明らかになった。さらに、VTAに投射するCalbニューロンの数には雄優位な性差があることが分かった。次に、CALB-SDNからVTAに投射するCalbニューロンの性差形成機構を明らかにするため、出生日に精巣除去し、春機発動期にTもしくはコレステロールを代償投与した雄マウスと周生期に偽手術を施し、春機発動期前に精巣除去した後、Tもしくはコレステロールを代償投与した雄マウスのCALB-SDNにおけるVTA投射Calbニューロンの数を計測した。また、出生日にプロピオン酸テストステロン（TP）もしくはゴマ油を投与し、春機発動期に卵巣を除去した後、春機発動期にTもしくはコレステロールを投与した雌マウスのCALB-SDNにおけるVTA投射Calbニューロンの数を計測した。その結果、出生日に偽手術を施し、春機発動期にTを投与した雄マウスと出生日にTPを投与し、春機発動期にTを投与した雌マウスのCALB-SDNにおいて、VTA投射Calbニューロンが多く存在しており、他の処置を施した雌雄マウスのCALB-SDNに存在するVTA投射Calbニューロンは僅かであった。このことから、VTAに投射するCalbニューロンの性差の形成には周生期と春機発動期の両方の時期におけるアンドロゲンの作用が重要であると考えられた。

最後に、CALB-SDNからVTAに投射するCalbニューロンの生理機能を明らかにすることを目的として、化学遺伝学的手法を用いてCalbニューロンの神経活性を抑制した雄マウスの性行動に対する影響を解析した。その結果、VTA投射Calbニューロンの神経活性を抑制した雄マウスでは、イントロミッションの回数が減少し、射精が観察されなくなった。一方、マウントに影響はなかった。これらのことから、CALB-SDNからVTAに投射するCalbニューロンは陰茎の勃起の制御あるいは性的動機付けの維持に関与すると考えられた。

以上の研究を総括すると、マウスのCALB-SDN、CALB-BNSTpおよびBNSTpvの性差形成には周生期だけでなく、春機発動の性ステロイドホルモンも重要であると考えられた。CALB-SDNにはVTAに投射し、雄性行動の制御に関与するCalbニューロンが存在することが明らかになった。そして、CALB-SDNからVTAに投射するCalbニューロンの性差形成にも周生期と春機発動期のアンドロゲンが重要であることが示された。これらのことから、周生期と春機発動期の性ステロイドホルモンには、マウスの性的二型核の細胞数および神経投射の性差を形成し、性行動の制御に必要な神経回路を構築する働きがあると考えられた。

## 論文の審査結果の要旨

森下雅大氏の学位論文について、学位論文審査委員会は、令和3年2月22日に公開でオンラインによる発表会を開催し、論文の内容を審査したので報告する。

有性生殖を行う動物は、雌雄で異なる行動や生殖機能を制御するため、脳が性的に分化する。性分化した脳には形態学的に性差がある神経核が内在し、これらは総称して性的二型核と呼ばれる。性的二型核は脳機能の性差に重要な働きをすると考えられているが、性的二型核の性差形成機構は解明されておらず、生理機能についても不明な点が多く残されている。本博士論文では、脳の性分化機構の理解を深めることを目的として、マウスの性的二型核の形成機構と生理機能を解析した研究について論じている。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。

第1章では、脳の性分化に関するこれまでの研究知見と本論文に記述される研究の目的が述べられている。脳の性分化に関する研究は主に齧歯類を用いて行われており、性的に未分化な脳が雄型あるいは雌型に分化するために必要な要因として、周生期と春機発動期の精巣から分泌されるアンドロゲン、春機発動期の卵巣から分泌されるエストロゲンおよび脳内で発現する性染色体遺伝子の働きが詳細に記されている。さらに、本論文の解析対象領域であるマウスの視索前野と分界条床核に存在する性的二型核について、これまでの研究より明らかされた形態学的特徴および性差形成に関わる周生期のアンドロゲンの作用が説明されている。マウスの視索前野と分界条床核における性的二型核はともにカルシウム結合タンパク質であるカルビンディンを発現するニューロンが豊富であり、その数は雄において雌よりも多いことが知られている。本論文に記述された研究では、カルビンディンニューロンの性差形成に対する春機発動期の性ホルモンの影響、神経投射部位および生理機能を明らかにすることが目的であり、次章よりその詳細が述べられている。

第2章では、視索前野と分界条床核におけるカルビンディンニューロン数の性差形成に対する春機発動期の性ホルモンの影響について述べられている。これまでの研究から、周生期のアンドロゲンは視索前野と分界条床核の性的二型核の性差形成に関与することが知られていたが、春機発動期の精巣と卵巣から分泌される性ホルモンの働きは不明であった。本論文では、春機発動期以前に性腺を除去した後、各種性ホルモンを代償投与したマウスを用いた組織学的解析の結果が記されており、解析の結果、テストステロンあるいはジヒドロテストステロンを代償投与された雄マウスでは視索前野と分界条床核におけるカルビンディンニューロンの数が増加することが明らかになった。しかし、エストラジオールを代償投与された雄マウスのカルビンディンニューロン数は変化せず、エストラジオールを代償投与された雌マウスでもその数は変化しなかった。これらの結果から、春機発動期の精巣から分泌されるアンドロゲンには、カルビンディンニューロンによって構築される視索前野と分界条床核の性的二型核の雄性化を促す働きがあると結論づけている。

第3章以降では、視索前野の性差を構築するカルビンディンニューロンに着目して、同ニューロンの投射部位とその性差および生理機能を解析した研究の結果が記されている。第3章では、視索前野のカルビンディンニューロンの投射部位とその性差を調べるため、カルビンディンニューロン特異的にCreリコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウスの視索前野に、Creリコンビナーゼ依存的に神経トレーサーを発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを注入し、組織学的に解析した結果が記されている。解析の結果、視索前野のカルビンディンニューロンには、中脳の腹側被蓋野に投射するニューロンと視索前野で局所神経回路を構成する介在ニューロンの2種類があることが分かった。さらに、前者は雄においてのみ存在するという明瞭な性差があるのに対して、後者の数には性差がないことが明らかになった。第4章では、腹側被蓋野に投射するカルビンディンニューロンの性差に対するアンドロゲンの影響を調べた結果が記されており、解析の結果、

視索前野のカルビンディンニューロンは周生期のアンドロゲンの働きで増加し、その後、春機発動期に再びアンドロゲンが作用することで腹側被蓋野へ神経投射することが分かった。

第5章では、雄マウスの視索前野から腹側被蓋野へ投射するカルビンディンニューロンの働きを調べた研究の結果が記されている。雄マウスの視索前野は性行動の制御中枢であることが知られており、本論文では、視索前野から腹側被蓋野へ投射するカルビンディンニューロンの神経活性を化学遺伝的に抑制した雄マウスの性行動を解析した。解析の結果、腹側被蓋野へ投射するカルビンディンニューロンの神経活性を抑制した雄マウスでは、交尾相手である発情雌マウスに対して性行動を起こすものの、その頻度が低下し、交尾の完了を意味する射精がほとんど起こらなくなった。これらのことから、カルビンディンニューロンは、陰茎の勃起や性的動機付けの維持に関与することを考察している。さらに、第6章では、研究成果を包括した総合的な考察がなされ、今後の展望が述べられている。

以上を総括すると、本論文から、脳の性差を生み出す細胞集団の一つであるカルビンディンニューロンの性差形成には周生期および春機発動期に精巣から分泌されるアンドロゲンが重要な役割を果たすことが明らかになった。さらに、視索前野から腹側被蓋野へ投射するカルビンディンニューロンは雄に特異的な細胞集団であり、これらは雄性機能の発現に必要不可欠であることが明らかになった。本論文に記載された研究成果は、性的二型核の性差形成機構と生理機能に関する新たな知見であり、脳の性分化機構の理解に大きく貢献するものである。なお、本論文の内容は、査読付き国際学術専門誌に発表されている。以上のことから、本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、学位論文審査に合格とした。