

エストロゲン受容体と脳の性分化

佐久間 康雄
日本医科大学

今晚のセッションの目的は動物モデルにおける性分化のプロセスについてお話することです。私は厳密に持ち時間を守るように言われていますが、最初にこの非常に重要な会議でセッションを開く機会を下さった環境省と他の後援者に感謝の意を表したいと思います。最初の3つの講演は、ラット脳における、電気生理学的、行動的、および形態学的性差に焦点を置きます。その後長濱教授が、モデル魚のメダカにおける性決定遺伝子の最近の重要な発見を報告して、比較の観点から講演される予定です。

私の講演は、エストロゲンの影響下で雌ラットの性行動を制御するラット脳の神経回路の電気生理学的特性評価に関するものです。

生理学者の観点から申しますと、動物の雌と雄は2つの特性に基づいて区別されます。1つは生殖内分泌学的特性です。季節的繁殖や反射作用としての排卵という例外が一部ありますが、雌の哺乳動物は一般に生殖周期を繰り返します。この周期性は、脳に対するエストロゲンの正のフィードバック作用の結果であり、これは雄で作用しません。その結果、雄は連続発情を呈します。

2つ目は、生殖行動の多くの側面が性的2型性を呈することです。ラットでは、母性行動、性交懇願行動、特にロードシス反射は雌に特有です。雄のラットには縄張行動が見られ、縄張に進入する同種の雄を攻撃します。マウンティングは、雄の性行動を特徴付ける行動です。雌雄双方の性的相互作用では異性愛志向が優勢です。

行動上の性別はラットでは周産期に遺伝的性別とは関わりなく決定され、「臨界期」に実験的な操作により、性的表現型が容易に変わります。例えば、芳香化するアンドロゲンの1種であるテストステロンは、雄性化を生じさせ、その結果、雄性の内分泌または行動が現れます。雌または新生児期に去勢した雄では、芳香化するアンドロゲンが存在せず、雌の特徴が現れます。

この映像はロングエヴァンス系のぶちの雄ラットとアルビノ雌の間の雌雄の相互作用を示しています。雄は雌の臀部に前足を押し付けて雌にマウントします。触覚的刺激に応答して、雌は脊柱の背屈であるロードシス反射を示します。ロードシス反射は、発現頻度あるいは強度により評価することができます。その2つは通常対応しており、何れもロードシス反射の感受性を計る信頼性の高い測定法です。雄では、マウンティング行動は、発現頻度またはマウンティング行動が発現するまでに必要な時間である潜伏時間に基づいて評価することが可能です。

こちらの映像は、アンドロゲンを投与した雌と新生仔期に性腺摘除した雄の性行動の実験的逆転を示しており、いずれの処置も出生直後、すなわち臨界期に実施しました。ロードシスやマウンティングだけでなく、性交懇願または誘導行動などの他の性行動にも逆転が見られることに注意してください。

げっ歯類では、芳香化されるアンドロゲンが持つ雄性化作用は、「アロマターゼ仮説」によって説明されています。妊娠18日目から出生5日目までの後期胎仔期および新生仔期には、胎児の肝臓はエストロゲンと結合するガンマグロブリンを分泌します。このタンパクは、血流中のエストロゲンに結合し、エストロゲンの脳への進入を妨げます。この母体または胎盤由来のエストロゲンは脳血液関門を通過できません。雌の新生仔では、エストロゲン作用の欠如下で脳が発達します。雄ではこの時期にテストステロンが大量に生産されます。このステロイドは、エストロゲン結合タンパクと結合せず、何の障害もなく脳に進入します。テストステロンからエストラジオール、または、アンドロステンジオンからエストロンを生産するアロマターゼは、視床下部と脳の辺縁部のニューロンに豊富に存在し、生殖の内分泌と行動に関与しています。その産物であるエストロゲンは、核または未知の膜受容体を通して、ニューロンの成長、シナプス形成、髄鞘形成の遺伝子制御を制御し、脳の男性化を生じさせます。この素晴らしいシステムにおける問題は、エストロゲン結合タンパクが過量のエストロゲンによって飽和状態になると、エストロゲン結合タンパクはエストロゲン受容体に容易にアクセスし、エストロゲン様作用のある他の非ステロイド系分

子は、ジエチルスチルベストロール（DES）の場合と同様に、認識されずに脳に進入し、エストロゲン受容体 α と考えられるエストロゲン受容体と結合します。

エストロゲン受容体分子の独特の特性は、性分化の時期または成体においても、その発現はそのリガンドによって制御されていることです。この写真は、視索前野と視床下部の腹内側核の双方において、エストロゲン受容体 α 陽性ニューロンの数は著しい性差があることを示しています。エストロゲン受容体 α 陽性ニューロンは雄よりも雌で多く見られます。

視床下部の腹内側核はエストロゲンの主なターゲットであり、雌ラットのロードシス反射を促進させます。この構造を電気刺激するとロードシス反射を強化し、腹内側核を電解により損傷するとロードシス反射を減少させます。

腹内側核が軸索投射する主なターゲットは、中脳中央灰白質の背側です。このパネルに示すように、電気刺激は、電流の強度に対し用量依存的に、ロードシス反射を強化します。

我々は、成体時に卵巣摘出した雌、新生仔期にテストステロンを投与した雌、出生時に精巣摘出した雄、および正常な雄の間でこのニューラルの接続に対するエストロゲンの影響を検討しました。それらが性的に成熟したときに行動を調査して、実験を完了しました。卵巣摘出した雌と新生仔期に精巣摘出した雄は、エストラジオールを投与するとロードシスを呈し、テストステロンを投与した雌にはロードシスは見られませんでした。刺激用電極は中央灰白質に配置し、麻酔下での視床下部からの細胞外作動電位を記録しました。グループ間には記録されたニューロンの数に量的な差がないことに注意してください。

神経の興奮性に対するエストロゲンの作用の測定は、逆行性の活性化の域値と不応期でした。ニューロンが容易に励起される場合は、域値は低いです。より短い不応期は増大した興奮性を示します。

この図は中脳中央灰白質へ伸びる腹内側核の軸索投射に対するエストロゲンの作用を要約しています。エストロゲンによる行動への影響であるロードシス反射が見られた動物群、すなわち卵巣摘出した雌と新生仔期に精巣摘出した雄では、エストロゲンが逆行性活性化の域値を著しく低下させました。

腹内側核から始まり中央灰白質に伸びた神経回路は、電気生理学的パラメータに関しては性的に2型性を呈します。軸索投射は中央灰白質のシナプスを変化させ、髄質へ続きます。我々は髄線へ接続する中央灰白質の軸索投射がエストロゲンによって励起させられることを示しました。

ロードシス反射の制御に対するエストロゲン作用のもう1つのターゲットは視索前野です。この部位はエストロゲン感受性が高い脳の構造体を起源とする多くの軸索が接続しているため、我々は視索前野の背側の求心路遮断によりこれらの軸索を分断しました。この切断では、とりわけ中隔、帯状皮質部、および小脳扁桃から線維を除去します。切断を施した雌のラットは、手術から回復すると活発なロードシス反射を示し、この挙動の何らかの抑制が除去されたことが示されました。これらの動物の視索前野を電気刺激すると、この構造の局所的ニューロンを活性化すると考えられ、このパネルに示されるように、ロードシス行動の的確かつ強力な抑制を誘発します。同様のロードシス反射の抑制は、視索前の遠心性神経のターゲットである腹側被蓋部の電気刺激によっても誘発されます。

腹側被蓋部へ連絡する視索前軸索投射の感受性は、類似した方法を視床下部腹内側部の軸索投射に適用して動物群の間で比較しました。麻酔した動物で、刺激用電極を腹側被蓋部に配置し、視索前野からの逆行性作動電位を記録しました。

視床下部腹内側部の遠心性神経とは顕著に異なり、エストロゲンは視索前の遠心性神経の興奮性を低下させました。このパネルは、卵巣摘出した雌および新生仔期に精巣摘出した雄で域値が上昇したことを示しています。エストロゲンは、新生仔期に雄性化した雌では域値あるいは不応期に影響を及ぼしませんでした。

これらの結果は、エストロゲンが神経回路を励起させてロードシスを容易に発生させ、その神経回路は視床下部腹内側部の遠心性神経であり、同時に神経回路を抑制してロードシス行動を抑制することを示唆しています。これは性別特異的な作用です。この部位とエストロゲン作用の性別特異性の機序は、我々が現在行っている研究の課題の1つです。

単一ユニットの作用は、性的相互作用の間に覚醒した自由に移動できる動物から記録することができます。我々は、ビデオフレームから、雌行動を4つのクラスに分類しました。性交誘導で雄に接近した雌には雄

がマウントし、挿入が起こり、最終的に雄が射精します。この図に示されるように、ラットにおける性的相互作用は、雄による 10 から 15 回のマウントで構成され、射精が起こると終了します。

ヒストグラムは、雄のパートナーとの性的相互作用の際に記録された雌ラットにおけるエストロゲンによる視索前神経の作用を示しています。これら視索前ニューロンは、それぞれの行動フォントと密接に関連して励起されていました。

イベント関連のヒストグラムは、これらのニューロンが試験的に 4 つのグループに分けられることができ、それぞれは性交懇願行動、体性感覚インプット、またはロードシス行動と関連していることを示しています。ここに示したニューロンの最後のグループは、雌がロードシス姿勢にあるときは静かであるため、顕著でした。我々は、これらのニューロンは、ロードシスを抑制しており、このパネルに描写されているように、腹側被蓋部へ突起を伸ばしていると考えています。

私の講演の 2 つ目のトピックは性的志向に関するものです。ラットの性的志向は、主に匂いに依存しています。この箱は、中央のコンパートメントにいる被験動物の性的志向を測定するよう設計されています。刺激動物を 2 つの部屋に配置し、中央のコンパートメントに陰圧をかけ、両側の透明なチューブを經由して空気が進入し、刺激動物の匂いを運んできます。我々は、ビデオフレームを検討することにより、被験動物が匂いをかぐ時間を測定しました。

左のパネルは、性的に活発な雄の性的志向を示しています。皆さんが予測されている通り、この雄は発情期の雌ラットを好みます。雄ラットが性的に活発な雄よりも精巣摘出した雄の方を好む事実は、選択が攻撃行動ではなく性的嗜好に基づく証左と考えられます。発情期の雌は卵巣摘出した雌よりも好ましく、雄ラットは性的に活発でない雄と雌の間です。発情期の雌ラットを試験すると、類似しているが逆方向のパターンが認められます。発情期の雌はとりわけ性的に活発な雄を好みます。

この試験の注目すべき点は、試験が動物のホルモンの状態に感受性が高いことです。被験動物が精巣摘出または卵巣摘出されていると、どんな刺激の間でも中立になりました。我々はその際に被験動物に異性のホルモンを投与しました。卵巣摘出した雌にテストステロンを投与すると、恐らくは芳香化により、雌特有の志向が回復しました。左側に示した通り、卵巣摘出した雌にエストロゲンを投与すると、雌の性的志向を誘発しました。この観測は、匂いの志向に関する神経回路の性的二形性がロードシス回路の性的二形性とは幾分異なることを示しています。ロードシス回路は成体の血中性ステロイドにより依存しています。

この漫画に示した通り、嗅覚経路はエストロゲンに高い感受性を示すニューロンを含んだ複数の構造内を經由しています。小脳扁桃の内側核と視索前野は、嗅覚回路に対するエストロゲン作用の 2 つの主要なターゲットです。ここで、我々はこれらの構造に選択的な小さな損傷を設けました。このセクションは内側小脳扁桃を描写しており、図は損傷の概要を示しています。

このパネルに示した通り、内側小脳扁桃の損傷は、発情期の雌の性的パートナーの志向、すなわち性的に活発な雄に対する志向を低下させました。被験動物が匂いをかいだ総時間は手術した偽雌と同じであり、内側小脳扁桃の損傷は性的な動機付けに影響を及ぼさないことを示唆していた点は注目すべきです。

一方、視索前野の損傷は、性的なパートナーの志向と動機付けの両方を低下させました。結果は、視索前野が性交誘導行動の際に励起されるニューロンを含んでいるという我々の以前の観察と一致しています。

図は、エストロゲンに対する異なる感受性を持つ視索前野の複数の遠心性神経の接続を要約しています。例えば、分界条の内部を走る青い線で示した内側小脳扁桃へ連絡する視索前の軸索投射は、エストロゲンにより抑制されます。中脳の運動領域に接続するこれらの軸索投射は、性交誘導の動きと関連しており、線維で構成され、視索前野のこの領域に依存してエストロゲンにより励起または抑制されます。

最終トピックは、エストロゲン受容体ベータ陽性ニューロンの分布パターンの性的二形性に関するものです。エストロゲン受容体ベータは、現在はエストロゲン受容体アルファと称されている古典的なエストロゲン受容体とは異なる分子としてスウェーデンのグループにより 1996 年に複製されました。非同位 *in situ* ハイブリダイゼーションにより、我々のチームの Orikasa 博士は、雌と雄の間の ER ベータ陽性ニューロンの分布パターンが非常に異なることを発見しました。

分布パターンの性差は新生仔の内分泌物の投与により容易に操作できました。左のパネルには、遺伝的雌がエストロゲン投与により雄の表現型に修正され、テストステロンの芳香化をシミュレートするものでした。新生仔を精巣除去すると、D に示す雌の表現型を発現しました。我々は、ER ベータ陽性ニューロンの総数に差がないことに気づきました。この結果は、性差がニューロンの移動率の差に起因している可能性があることを示唆しています。これについては、このセッションでトベット博士が詳述される予定です。

性差は視索前野の前腹周室核と称される領域に発見され、この性差はゴナドトロピンのエストロゲン誘発性排卵性サージと関連していました。従って、我々は ER ベータ mRNA に対してアンチセンスオリゴヌクレオチドを輸注し、この投与が排卵を阻害するかどうかを調査しました。このチャートは雌の膣の周期性を示しており、雌には生理食塩水、対照とするスクランブルドオリゴ、およびアンチセンスの脳室内輸液を行いました。この例に示される通り、アンチセンスオリゴを投与した雌には発情現象の延長が見られました。

統計分析では、アンチセンスオリゴ投与すると、下のパネルに示したように、ER ベータ陽性ニューロンの数を有意に減少させたことを示しました。対照動物の1匹に現れた連日にわたる発情現象は、同じく有意な上昇を示しました。雌ラットで雄よりも雌のラットで大きな体積を占めると報告されている前腹周室核は、性腺刺激ホルモン分泌に対するエストロゲンの正のフィードバックに関与しており、雌哺乳動物に独特の機能です。

視索前野はエストロゲン受容体アルファ陽性ニューロンを含んでいます。既に言及した通り、ER α 陽性ニューロンの数は雄よりも雌で多く、ER α メッセージについてこのパネルに示されている通りです。ER α 免疫反応と ER ベータメッセージの二重染色では、多くの ER ベータ陽性ニューロン、約 90%が、ER α 免疫反応を発現することが示されました。

我々は次に ER ベータ分布の性分化において ER アルファが果たす役割を解明しようと、ER アルファノックアウトマウスにおける可能性の研究を試みました。

ラットとマウスは多くの面で異なりますが、ロックフェラー大学の Sonoko Ogawa との共同研究で、マウスでは雄が視索前野により多くの ER ベータメッセージ陽性のニューロンを発現することが分かったときには驚きました。

このチャートは、マウスとラットが視索前野のこの特定の領域における ER ベータ陽性ニューロンの性分化の方向が非常に異なることを要約しています。

これらの意外な結果にも関わらず、ER ベータ陽性ニューロンの分布における性差が ER アルファに依存しているように見えたことです。なぜなら、ER アルファノックアウト雄が雌の表現型を呈していたからです。

この性差は、視索前野に特有であり、ER ベータを含んでいるが既知の性差がない周室核には見られません。

性差は、早くも出生後1日目には検出され、臨界期の間に明確に確立されます。

これは私の講演の最後のスライドになります。この研究プロジェクトの共同研究に参加された人々に感謝の意を表します。

ご清聴ありがとうございました。質問がある方は前の方へお進みください。質問がないようでしたら、ジムフォウスに性分化のプロセスに関する彼の新しい解釈を発表していただきます。彼の解釈は、私の現在のどちらかと言うとオーソドックスな説とは異なる見方を皆様を示すものになると思います。