

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻  
平成16年度博士課程 入学  
氏名 千葉 秀一  
指導教員名 西原 眞杉

論文題目 性ステロイドの中枢作用におけるグラニューリンの役割に関する研究

### 第一章 序論

哺乳類の性腺で合成される性ステロイドは、発生段階の脳に作用して性分化を誘導し、性成熟後の脳に作用して雌雄それぞれの性的役割を発揮させる。前者は形成作用と呼ばれ、神経細胞の増殖や分化に関わる不可逆的な過程であり、後者は活性作用と呼ばれる神経細胞の興奮制御を介した可逆的な作用である。さらに、近年性ステロイド、中でもエストロジェンが認知、記憶など脳の高次機能の維持や虚血性脳疾患からの回復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り、この作用は保護作用と呼ばれている。閉経を迎える女性に対する性ステロイドの補充療法が認知機能の改善やうつなどの気分障害に対する効果が認められることから、性ステロイドの保護作用には現在強い関心が寄せられている。このような治療の有効性に関する知見が精力的に集められており、性ステロイドの中枢作用の作用機序に関する体系的な学術的基盤が強く求められている。

筆者らの研究室ではこのような性ステロイドの中枢作用の分子機構を研究する過程で、ラットの脳の性分化期に視床下部において性ステロイドにより発現が誘導される遺伝子としてグラニューリン (Grn) 遺伝子を同定し、脳の雄型化に関与する遺伝子であることを示唆した。さらに、Grn ノックアウト (KO) マウスを作出し、その表現

型を解析した結果、雄型性行動の低下や攻撃行動の上昇など雄型行動の変化が観察されている。性ステロイドの形成作用と保護作用には、ともに神経細胞の増殖、分化や細胞死の制御が関与することから両者に共通する作用機構の存在が想定され、Grnが形成作用のみならず保護作用にも関与している可能性が考えられる。本研究は、ラットおよびGrn KOマウスを実験モデルとして、性ステロイドの形成作用および保護作用におけるGrnの役割の解明を目的としたものである。

## 第二章 エストロジェンの神経新生促進作用におけるグラニューリンの役割

海馬歯状回では成体においても神経前駆細胞の増殖と神経細胞への分化が生じており、これが記憶などの海馬機能に関与していることが示唆されている。エストロジェンはこの海馬歯状回における細胞増殖を促進することが知られている。このようなエストロジェンの作用は細胞増殖を促進するような成長因子により仲介されている可能性が考えられ、そのような成長因子の候補として、エストロジェンにより発現上昇することが知られているGrn、インスリン様成長因子(IGF)-Iおよび脳由来神経栄養因子(BDNF)を想定した。本章では、3ヶ月齢の卵巣摘出ラットを用いて、安息香酸エストラジオール(EB)投与4時間後の海馬歯状回において、増殖細胞マーカーとして投与したブロモデオキシウリジン(BrdU)を取り込んだ細胞数が増加していることを確認した。また、リアルタイムRT-PCR法により各成長因子の遺伝子発現量を検討した結果、EB投与4時間後の海馬ではGrn前駆体のmRNA量が増加していたが、IGF-IやBDNFの発現量は変化しなかった。一方、12ヶ月齢のラットではエストロジェンの神経新生およびGrn遺伝子発現に対する促進作用はともに見られなかった。次に、3ヶ月齢の雌ラット海馬由来の神経前駆細胞をニューロスフェア法を用いて培養し、神経前駆細胞の増殖に対するエストロジェンの作用を検討した。その結果、エストラジオール添加24時間後の神経前駆細胞数は、培養液中のエストラジオール濃度依存的に増加していた。また、エストラジオールによる細胞増殖促進作用は、培養液中へのGrn前駆体に対する抗体の添加により低下した。これらの結果から、エストロジェンは海馬歯状回の神経前駆細胞に作用してGrnの発現を誘導すること、さらに分泌されたGrnが神経前駆細胞の増殖を促進することが示唆されたが、このようなエストロジェンの作用は加齢により低下すると考えられた。

## 第三章 成体海馬の神経新生および機能維持におけるグラニューリンの役割

本章では、Grn KOマウスを用いて成体海馬の神経新生に対するGrnの作用をさらに検討した。7週齢の雄Grn KOマウスへのBrdUの投与後、海馬歯状回においてBrdU標識された細胞数は予想に反して野生型(WT)よりもKOマウスで有意に多く、

他の増殖細胞マーカーである Ki67 を用いた解析でも同様の傾向が見られた。さらに、BrdU 投与 21 日後において、成熟ニューロンマーカーである NeuN を発現する新生ニューロン数が KO マウスにおいて増加していた。Grn には共通の前駆体タンパク質からプロセッシングにより形成される数種の分子種が存在し、それらの分子種のうち上皮細胞の増殖を促進させるものと抑制させるものの両方の存在が知られている。海馬歯状回における細胞増殖に対する Grn の作用が第二章と本章では異なっていたが、その原因として、雄マウスにおけるアンドロジェンの存在などの内分泌環境の違いが細胞増殖を抑制する分子種の Grn を分泌させた可能性が考えられた。

次に、神経新生の関与が示唆されている海馬の機能、すなわち空間学習に対する Grn の役割を検討した。Morris 式水迷路を用いた空間学習試験では、6 ヶ月齢の KO マウスにおけるプラットホームへの到達時間が短い傾向が見られ、探索試験の結果も良い傾向が見られた。ところが、18 ヶ月齢の KO マウスでは到達時間の有意な延長が見られた。さらに、新奇環境下の自発行動をオープンフィールド試験によって解析したところ、KO マウスにおいて新奇環境下の不安傾向が増大していることが示唆され、この点については第四章にて詳細に検討することにした。以上のことより、Grn KO マウスでは細胞の増殖や生存が促進されることによって新生神経細胞数が増加しており、これを反映して空間学習能力が高い傾向にあると考えられた。しかし、18 ヶ月齢の Grn KO マウスでは空間学習能力の低下が見られ、老齢期の脳の高次機能の維持に Grn が関与していることが示唆された。最近、Grn 前駆体タンパク質をコードする遺伝子の変異が老齢期のヒトで見られる前頭側頭型認知症の原因として報告された。このことは、Grn が種を越えて老齢期のニューロンの生存や機能の維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

#### 第四章 新奇環境に対する不安傾向の性分化におけるグラニューリンの役割

性ステロイドによる周生期の脳の性分化は性的二型を示す行動の発現に影響を及ぼすことが知られている。第三章では Grn KO マウスにおいて新奇環境下の不安傾向が増大していることを見出したが、不安傾向には性差が存在することが知られている。本章では不安傾向に関する性分化の機序を検討することにより、周生期の脳における Grn の役割を検討した。実験には 7 週齢の WT および KO マウスの雌雄を用い、オープンフィールド試験および高架式十字迷路試験によって新奇環境下の不安傾向を評価した。その結果、WT マウスにおいて雄は雌と比較すると不安傾向が低いという性差の存在が示された。一方、KO マウスにおける雄の不安傾向は WT の雄より高く、雌とほぼ同じレベルであった。また、高架式十字迷路試験による解析でも同様の傾向が見られた。次に、このような不安傾向の性差に関与していると考えられる性的

二型を示す神経核の発達について検討した。青斑核は不安様行動への関与が示唆されており、ラットにおいては雄よりも雌においてその体積が大きいことが知られている。青斑核の体積は、WT マウスでは雄に比べて雌の方が大きい傾向が見られ、KO マウスでは雌雄の WT マウスよりも有意に大きく、かつ性差も認められなかった。一方、同じく不安傾向への関与が知られる室傍核では、性および遺伝子型間に体積の差は認められなかった。以上の結果から、Gm は青斑核の発達を抑制することで形態学的な性差を形成し、この形態学的な性差が不安傾向の性差発現の基盤となっていることが示唆された。

次に、不安傾向に対する成熟期におけるアンドロジェンの影響を検討するために、5 週齢で精巣摘出したマウスとその後 6~7 週齢にテストステロンを充填したシリコンチューブを皮下に留置したマウスについて不安傾向の解析を行った。しかし、WT および KO マウスのいずれにおいても、精巣摘出やテストステロンの補充は不安傾向に対して影響を与えなかった。さらに、不安傾向の性分化に対する周生期のアンドロジェンの影響を検討するために、生後 1 日および 3 日にプロピオン酸テストステロン (TP) を皮下に投与した雌マウスについて不安傾向の解析を行った。溶媒投与群および TP 投与群の WT マウスと比較して、TP 投与群の KO マウスの不安傾向は高かった。このことから不安傾向の性分化において、Gm の存在により TP の不安傾向増大作用が抑制されることが示唆された。

## 第五章 総括

以上の研究により、性ステロイドにより誘導された Gm は、神経前駆細胞の増殖や分裂を終えた神経細胞の生存を調節することにより性的二型核や海馬の形成に関与し、それらの機能に影響していることが考えられた。このような Gm の作用は、成体海馬におけるエストロジェンの神経保護作用のみならず、周生期における性ステロイドによる脳の性分化においても共通して働いていると考えられた。性ステロイドが Gm を介して脳に形態学的な可塑性を付与することは、周生期においては性に特徴的な行動の発達を促進することで社会的な役割に自らを適合させ、成体においては環境の変化に対して巧みに対応することで自らの生存率を高めることに寄与し、これらが最終的に繁殖成功率を高めることに貢献するからではないかと考えられた。