

博士論文（要約）

A novel mechanism regulating sexual differentiation of sex behavior in rats
（ラットにおける性行動の性分化を制御する新奇なメカニズム）

中村翔

本博士論文の内容は共著論文として学術雑誌に掲載、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。本博士論文の内容は *Journal of Neuroendocrinology* に掲載される予定である。

哺乳類の性行動には性差が存在する。ラットでは発情した雌が雄のマウント行動を許容するロードシスとよばれる背骨を反らせた雌型性行動を示す。一方、雄はマウント、挿入、射精といった一連の雄型性行動を示す（雄性化）とともに、ロードシスが抑制されている（脱雌性化）。脳の性を含め、哺乳類の性の基本型は雌型であるが、遺伝的な雄では脳の発達期に精巣から分泌されるテストステロンが脳に作用し、雄性化および脱雌性化が誘起されることにより、様々な脳機能の性差が形成されると考えられている。

キスペプチンは *Kiss1* 遺伝子にコードされる神経ペプチドで、性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌を直接刺激することにより、性腺活動を制御している。脳の発達期に相当する周生期のラットの視床下部では、キスペプチンニューロンの発現が一時的に上昇することが報告されており、キスペプチンが雄性化や脱雌性化に関与することが示唆されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、*Kiss1* 遺伝子を赤色蛍光タンパク質 *tdTomato* に相同組換えした *Kiss1* ノックアウト（KO）ラットを用い、性行動中枢の雄性化および脱雌性化におけるキスペプチンの役割を明らかにすることを目的とした。

本論文は5章から構成され、第1章では背景と目的を論じた後、第2章から第4章では本研究で実施した実験について記述し、第5章において本研究で得られた成果をもとに総合的な考察を行った。

第1章は総合緒言であり、家畜の繁殖における鈍性発情や卵巣機能障害などの問題が、一部は脳の性分化異常が原因で起こることを示し、その問題解決において脳の性分化機構を解明することの重要性を述べた。その上で、中枢神経系の性分化に関する研究の歴史的な背景を概説するとともに、これまでに明らかにされてきたキスペプチンの機能および脳の性分化機構にキスペプチンが関与する可能性について述べ、本研究の意義や目的を示した。

第2章では、キスペプチンが性行動中枢の雄性化および脱雌性化に関与すること明らかにすることを目的に、*Kiss1* KO ラットの雄型性行動、雌型性行動、そして性的二型核を解析した。精巣除去を施した後、テストステロンを負荷した野生型の雄はマウント、挿入、射精行動を示したが、同処置を施した *Kiss1* KO ラットの雄は一連の雄型性行動を示さなかった。また、性腺除去後に高濃度のエストラジオールを負荷してから雌型性行動であるロードシスを解析したと

ころ、野生型の雌では明瞭なロードシスが認められたのに対し、雄では抑制されていた。一方、*Kiss1* KO ラットは雌雄共に野生型と同様の明瞭なロードシスを示した。これらの性行動解析の結果から、*Kiss1* KO ラットには性行動中枢の雄性化および脱雌性化に異常があることが示唆された。さらに、性的二型核を観察したところ、野生型では前腹側室周囲核 (AVPV) のキスペプチン発現は雌のみに見られ、また視策前野性的二型核 (SDN-POA) のマーカートンパク質である calbindin-D28K の発現は、雄に高く雌に低い性差を示した。これに対し、*Kiss1* KO ラットの AVPV ではキスペプチンに代わって tdTomato の発現が認められ、雌雄共に同等であった。また、SDN-POA の calbindin-D28K 発現にも性差が見られなかった。一方、勃起を制御する海綿体脊髄核 (SNB) の運動ニューロンの細胞数には *Kiss1* KO ラット、野生型ともに性差が認められ、雄では雌よりも有意に多い運動ニューロンが認められた。以上の結果から、*Kiss1* KO ラットの雄では性行動中枢の雄性化および脱雌性化が起こらず、キスペプチンが性行動中枢の雄性化および脱雌性化の過程に必要不可欠であることが示された。また、AVPV キスペプチンおよび SDN-POA calbindin-D28K の性差形成においてもキスペプチンの関与が示されたが、SNB 運動ニューロンの性分化には必要ないものと推察された。

第3章では、性行動中枢の雄性化におけるキスペプチンの役割を検討した。まず *Kiss1* KO ラットにおいて形成作用に重要とされる周生期のテストステロンが正常に分泌されているか明らかにするため、胎生18日、出生直後および成熟後に *Kiss1* KO ラットおよび野生型の雄の血漿中テストステロン濃度を測定した。*Kiss1* KO ラットの雄は野生型の雄と同様に胎仔期後期および出生直後に高いテストステロン分泌を示した。一方、成熟後の *Kiss1* KO ラットの雄のテストステロン濃度は検出限界値以下であった。これらの結果から、成熟後のテストステロン分泌がキスペプチンに依存して分泌されるのに対して、周生期のテストステロン分泌はキスペプチンに依存することなく分泌されることが明らかとなった。次に、*Kiss1* KO ラットの雄型性行動の消失が、性成熟期以降にキスペプチンに依存して分泌されるテストステロンの欠如によるものか検証するため、性成熟期からテストステロンの連続投与を行った。その結果、*Kiss1* KO ラットの雄では成熟後に雄型性行動であるマウントおよび挿入行動が回復した。一方、挿入頻度や hit rate などの勃起の指標は *Kiss1* KO ラットでは有意に低い値を示した。また、勃起を制御する SNB 運動ニューロン数は性成熟期からテストステロンを長期投与した *Kiss1* KO ラットの雄においても同処置を施した野生型の雄と同様に認められた。以上の結果から、キスペプチンは性成熟期にテストステロン分泌を促進することにより成熟後の雄型性行動の発現に関与することが示唆された。また、キスペプチンは性行動中枢の雄性化とは別の機構により勃起の制御にも関与することが考えられる。

第4章では、性行動の脱雌性化メカニズムにおけるキスペプチンの役割を検討した。第3章で雄性化に成功した性成熟期以降のテストステロン処置によって性行動中枢の脱雌性化が誘起されるか検証したところ、*Kiss1* KO ラットの雄のロードシスは依然として抑制されることはなかった。そこで、*Kiss1* KO ラットの雄の脱雌性化の異常は周生期テストステロンが分泌された以降の経路にキスペプチンが関与するか検証するため、出生直後の *Kiss1* KO ラットにキスペプチンを皮下投与した。その結果、成熟後の *Kiss1* KO ラットのオスでは野生型の雄同様にロードシスが抑制され、脱雌性化が起こることが明らかとなった。一方、雌の *Kiss1* KO ラットではロードシスは抑制されなかった。雌では周生期のテストステロン分泌が欠如していることと合わせて考えると、性行動中枢の脱雌性化にはキスペプチンおよびテストステロンが周生期に作用することが重要と考えられる。周生期のテストステロンは脳内のアロマターゼによってエストラジオールへと変換され、脱雌性化に作用すると考えられている（芳香化説）。したがって、エストラジオールが作用した以降の経路においてキスペプチンが機能を有するか検証するため、出生直後の *Kiss1* KO ラットに estradiol benzoate (EB) を皮下投与した。その結果、EB 処置した *Kiss1* KO ラットではロードシスが顕著に抑制された。これは脱雌性化を誘導するエストラジオール以降の経路が *Kiss1* KO ラットでは正常に機能していることを示している。また、出生直後の新生児の視床下部を採取し、アロマターゼ遺伝子の発現量を解析したところ、*Kiss1* KO ラットの雄と野生型の雄との間に差は認められなかった。以上の結果から、キスペプチンは周生期にテストステロンが分泌されて以降、エストラジオールに変換され効果を現すまでのいずれかの過程において機能を有すると推察された。

第5章では第2章から4章までの結果をふまえ、総合考察を行った。本研究では、*Kiss1* KO ラットを用いることにより、周生期のキスペプチンとテストステロンの両方が作用することにより性行動の脱雌性化が誘起されることを明らかにした。すなわち、これは周生期においてテストステロンから芳香化されたエストラジオールが脱雌性化を誘起する経路の中にキスペプチンが介入するという新たな知見を示唆するものである。また、性成熟以降にキスペプチンに依存して分泌されるテストステロンの作用により性行動の雄性化が誘起されることを明らかにした。このように雄ラットにおける脱雌性化と雄性化の両方にキスペプチンが必要不可欠であるが、その作用機序は異なることを示した。今後は周生期のキスペプチンがどのような神経回路および作用機序で脱雌性化を制御するのか解明することで、これまで提唱されてきた芳香化説に新たな機構が組み込まれることが期待される。