

論文の内容の要旨

論文題目

Histological and Molecular Basis of Macaque Sexual Skin

(マカク性皮の組織学と分子基盤)

氏名 小野 英理

ヒトのメスは月経周期中の排卵日を明確に示さず、これはヒト進化の過程で得られた形質であると考えられている。旧世界ザルの複雄複雌群を形成するいくつかの種において、メスの臀部に特有の性皮が存在し、その機能としてオスへの性的アピールと排卵隠蔽が考えられている。性皮の変化として腫脹と紅潮が観察されるが、この変化は性ホルモンによって調節され繁殖行動に関連している。性皮の誇張的腫脹の機能についてはこれまでに様々な仮説が提出されているが、現時点で最もその機能を説明していると考えられるのが **graded-signals hypothesis** である。この仮説では次の2点を軸に腫脹の機能を説明する。①妊娠可能期と一致する腫脹の最大期にメスは優位オスの保護を受ける。②腫脹の最大期以外の時期でも腫脹が段階的に持続しているためメスは下位オスとも交配可能となり、結果的に父性が攪乱され子殺しのリスクが低減される。この仮説はチンパンジーやヒヒなど成獣メスの多くが腫脹を示す種について良い説明となっているが、ニホンザルなど主に若年メスが腫脹を示す種については十分に適合的ではない。従って紅潮の関与が考えられるが、紅潮が排卵期を示すか否かは賛否が分かれる。その理由として、性皮色とその組織学的背景の対応に関する情報が乏しいことが上げられる。一般に皮膚色の変化の背景には必ず組織学的要因が存在する。表皮付近の毛細血管中のヘモグロビンやメラニン顆粒などである。組織学的要因が性ホルモンの調節を受けどの程度皮膚色に寄与するのか明らかにすることで、紅潮の機能解明に有益な知見となる。

本研究では対象種としてマカク属で季節性繁殖をするニホンザル (*Macaca fuscata*) とアカゲザル (*Macaca mulatta*) を選択した。適応能の高いマカクは広範囲に分布をしており、また多様な性皮の性状を呈するため、性皮研究に適している。また両種とも季節性繁殖をするため、月経周期が動いている繁殖期と、その対照として非繁殖期で検索することで、性ホルモン調節の性皮色変化への寄与を明らかにできる。このマカク 2 種は先行研究において同様の性皮変化を示すとされてきたが、経験的に差異が言われていた。本研究ではこれら性皮について客観的に評価し、その組織学的背景と性ホルモンに関連した分子基盤を明らかにすることを目的とした。

まずニホンザル 12 頭とアカゲザル 13 頭を対象とし、非繁殖期と繁殖期に性皮の測色と生検をおこなった。測色は分光測色計を用い CIELAB 色空間に展開したところ、両種において同傾向の色変化の傾向が見られた (関連 2 標本 T 検定、5%有意水準)。性皮は繁殖期になると暗く (L^* 低下、両種とも $p<0.01$)、赤く (a^* 上昇、両種とも $p<0.01$)、黄色に傾く (b^* 上昇、両種とも $p<0.05$)。一方で両時期においてニホンザルはアカゲザルに比べて暗く赤かった (Welch の T 検定、両時期の L^* , a^* においてすべて $p<0.01$)。次に紅潮の組織学的背景を調べるために、生検した組織から切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色切片を用いて毛細血管の密度 (血管新生の指標) とその内腔面積 (血管拡張の指標) を、またマッソン・フォンタナ染色を用いてメラニン顆粒の密度を画像解析によって算出し、色値との相関を調べた (ピアソンの相関係数)。結果、ニホンザルにおいて血管密度・面積が色値 (L^* , a^*) と相関した (すべて $p<0.05$)。アカゲザルでは血管面積に色値 (L^* , a^* , b^*) との相関が見られた (すべて $p<0.01$)。メラニンは紅潮へ寄与しなかった。これら組織学的パラメータの生物学的意味から、両種における季節的な紅潮の共通要因として血管拡張が見出された。

本研究で観察した個体において、アカゲザルでは繁殖期に 15 頭中 13 頭に腫脹が見られ、ニホンザルでは 15 頭全頭で明確な腫脹が認められなかった。腫脹時には水和によって体積が上昇するヒアルロン酸の増加に伴い皮膚透過度が上がり皮膚色に寄与すると考えられる。そこで非繁殖期と繁殖期にニホンザル 7 頭、アカゲザル 8 頭の測色と生検を行い、色値とヒアルロン酸量の関係を調べた。ヒアルロン酸量を客観的かつ画像解析的に推定するため、ホモロジー画像解析を用いてヒアルロン酸量の指標を得た。結果、8 頭中 6 頭のアカゲザルにおいてヒアルロン酸量指標の増加が認められた。さらに相関解析 (ピアソンの相関係数) の結果、繁殖期のアカゲザルにおいてヒアルロン酸量指標は色値と相関し (L^* : $p<0.01$, a^* : $p<0.05$)、ヒアルロン酸が増加すると性皮は明度が上がり、赤色が減退する傾向が見られた。前述の血管・メラニンの画像解析の結果と合わせると、両種では血管拡張を季節的紅潮の共通要因とし、ニホンザルにおける血管新生と多量のメラニン、アカゲザルにおけるヒアルロ

ン酸増加が、性皮色の種差に副次的に寄与することが明らかになった。

非繁殖期の皮膚でも性皮は高いレベルの血管密度・面積を示したため、その血管動態が性ホルモンの影響を受けるのか調べるために、ニホンザル 3 頭、アカゲザル 3 頭の額、背、性皮を非繁殖期に一週間おきに 4 回、測色と生検、採血を行った。生検組織から作製した切片を画像解析し、ELISA によって血中ホルモン濃度（エストラジオール、プロゲステロン）を測定した。その結果、非繁殖期において性皮色 (a^*) の変動は血管面積と相関した（ピアソンの相関係数、 $p<0.05$ ）。かつプロゲステロン量は血管面積と相関した（ $p<0.01$ ）。従って月経周期が働いていない非繁殖期においても性皮色は性ホルモンの増減を通じて血管拡張/収縮の影響を受けることが示唆された。同時に、血管拡張/収縮は低レベルのホルモン量でもその影響によって変動しやすく、血管新生やメラニン量より短期的な変動を示す現象であることが示唆された。

毛細血管の新生や拡張には血管内皮細胞や周皮細胞が関与する。また皮膚線維芽細胞はヒアルロン酸を産生する。これらの細胞種において性ホルモンの受容体（エストロゲン受容体 α 、エストロゲン受容体 β 、プロゲステロン受容体）の発現様態を調べた。非繁殖期にニホンザル 1 頭、アカゲザル 1 頭を用いて額、背、腹、性皮の生検を行った。生検した組織切片を免疫組織化学染色しエストロゲン受容体 α 、エストロゲン受容体 β 、プロゲステロン受容体の局在を調べた。その結果エストロゲン受容体 β とプロゲステロン受容体は性皮以外の皮膚領域でも発現が広く見られたのに対し、エストロゲン受容体 α は性皮で多く発現していた（Welch の T 検定、ニホンザル: $p<0.05$ 、アカゲザル: $p<0.01$ ）。従ってエストロゲン受容体 α が性皮に特徴的な血管動態に寄与していることが示唆された。

季節的な紅潮へのエストロゲン受容体 α の関与を調べるために、非繁殖期と繁殖期にニホンザル 4 頭、アカゲザル 4 頭を用いて測色と生検を行い、組織切片をエストロゲン受容体 α に対して免疫組織化学染色した。結果、性皮におけるエストロゲン受容体 α 発現細胞数は 8 頭中 7 頭で繁殖期になると増加した（Welch の T 検定、 $p<0.05$ が 1 頭、 $p<0.01$ が 2 頭、 $p<0.001$ が 4 頭）。またエストロゲン受容体 α を発現する細胞数の指標と性皮の色値、そして画像解析によって算出した血管密度・面積との相関解析（ピアソンの相関係数）を行った。結果、エストロゲン受容体 α を発現する細胞の指標は、血管拡張の指標である面積（ $p<0.05$ ）、 a^* と相関を示した（ $p<0.01$ ）。一方エストロゲン受容体 α 発現細胞の指標は血管新生の指標である密度とは相関せず、また血管新生に関連する血管内皮細胞におけるエストロゲン受容体 α の発現が僅少であったため、血管新生の調節にエストロゲン受容体 α が関わるかについては詳細な検討が必要である。さらに血管拡張との関係を調べるために周皮細胞に限定して相関解析をしたところ、アカゲザルにおいて、エストロゲン受容体 α 発現周皮細胞の指標は、血管面積（ $p<0.001$ ）と色値 a^* （ $p<0.05$ ）と相関を示し、ニホンザル

ではエストロゲン受容体 α 発現周皮細胞の指標と色値 a^* とのみ相関が見られた ($p<0.05$)。以上から、繁殖期に性皮でエストロゲン受容体 α が増加し、特に血管拡張の顕著であったアカゲザルではエストロゲン受容体 α を発現する周皮細胞の増加が血管拡張を引き起こし、これが性皮紅潮に寄与するという一連の流れを見出した。ニホンザルとアカゲザルの間には性ホルモンの調節の強弱という点で種差が存在する可能性が示唆された。

先行研究では同様の性皮変化を示すとされてきた近縁マカク 2 種について、本研究は紅潮を客観的に示し性皮の血管拡張が紅潮の共通要因であることを見出した。またニホンザルにおける血管新生と多量のメラニン、アカゲザルにおけるヒアルロン酸増加が紅潮の種差を説明すると考えられた。さらに少なくともアカゲザルではエストロゲン受容体 α を発現する周皮細胞の季節的な増加が血管拡張を生じるという示唆を得た。