

早稲田大学審査学位論文  
博士（人間科学）

視床下部腹内側核における  
エストロゲン受容体の発現機構

Regulatory system of the expressions of estrogen receptor  
in the ventromedial hypothalamic nucleus

2015年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

下川 雄二

SHIMOGAWA, Yuji

研究指導教員： 山内 兄人 教授

# 目次

[頁]

第 1 章	緒言	4
1-1.	視床下部腹内側核	4
1-2.	ロードーシス行動神経制御機構における VMN の役割	6
1-3.	エストロゲン受容体	8
1-4.	本研究の目的	11
第 2 章	左右神経連絡による視床下部エストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ ) 発現の制御	13
2-1.	序	13
2-2.	材料と方法	14
2-2-1.	動物	
2-2-2.	ER $\alpha$ 免疫染色	
2-2-3.	ER $\alpha$ 免疫陽性細胞数の計測	
2-2-4.	脳手術	
2-2-5.	Realtime PCR 法による ER $\alpha$ -mRNA の定量	
2-2-6.	統計解析	
2-3.	結果	20
2-3-1.	動物の状態	
2-3-2.	VNN と ARCN の前後による ER $\alpha$ 免疫陽性細胞数の違い (実験 1)	
2-3-3.	片側 VMH 破壊による vVMN と ARCN の ER $\alpha$ 免疫陽性 細胞数 (実験 2)	
2-3-4.	ER $\alpha$ -mRNA の定量 (実験 3)	
2-4.	考察	27

第3章	視床下部腹内側核の求心性神経投射	33
3-1.	序	33
3-2.	材料と方法	33
3-2-1.	動物	
3-2-2.	逆行性神経トレーサー注入	
3-2-3.	蛍光画像解析	
3-3.	結果	35
3-3-1.	FG 注入部位	
3-3-2.	FG 標識細胞(FG 細胞)分布	
3-4.	考察	43
第4章	視床下部腹内側核の遠心性神経投射	45
4-1.	序	45
4-2.	材料と方法	45
4-2-1.	動物	
4-2-2.	順行性神経トレーサー注入	
4-2-3.	PHA-L 免疫染色と解析	
4-3.	結果	48
4-3-1.	PHA-L 注入部位	
4-3-2.	PHA-L 陽性神経細胞線維(PHA-L 線維)分布	
4-4.	考察	57
第5章	結語	59
	謝辞	66

参考文献.....67

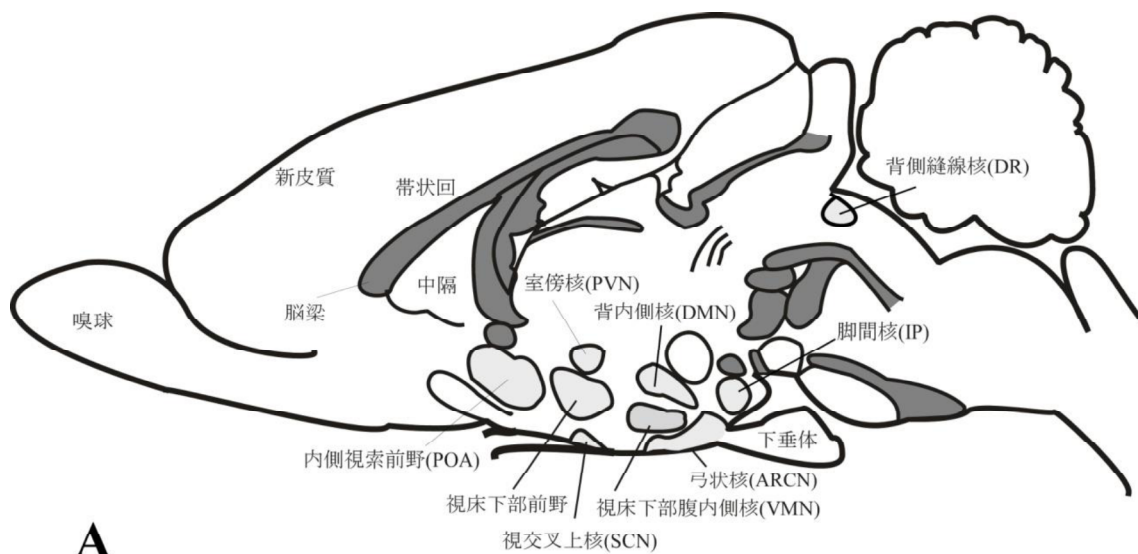
研究業績.....78

## 第1章 緒言

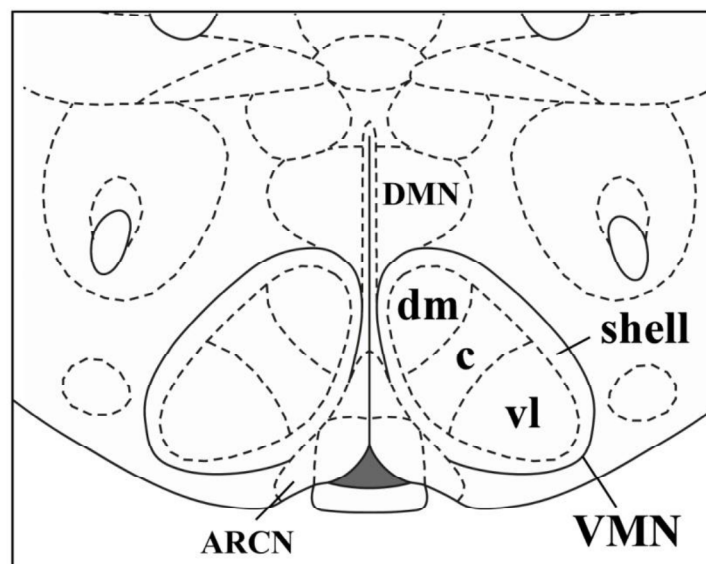
### 1-1. 視床下部腹内側核

ラットの視床下部腹内側核(ventromedial hypothalamic nucleus: VMN)は背内側部(dorsomedial: dmVMN)、中心部(central part: cVMN)、腹外側部(ventrolateral: vlVMN)からなる卵円形の神経核である(Paxinos and Watson, 2007) (図1 . B)。この神経核は視床下部内側底部に存在し、視床下部背内側核(dorsomedial hypothalamic nucleus: DMN)、外側視床下部、視床下部弓状核(arcuate hypothalamic nucleus: ARC)に隣接している (図1 . A)。VMN 周囲は VMN の神経突起やシナプスにより構成される殻(shell)と呼ばれる細胞体が欠如している組織に囲まれている (Millhouse, 1973)。殻の部分にも多くの神経投射がある。VMN は前脳から下位脳幹にいたる多くの神経核と神経連絡をもっている (Saper et al., 1976, Canteras et al., 1996)。また、dmVMN、cVMN、vlVMN はそれぞれの領域は異なった神経投射パターンを持つことが報告されている (Bleier and Byne, 1985)。

VMN の神経細胞はエストロゲンやアンドロゲン、プロゲステロンなどの性ホルモンの受容体があり (Stumpf and Grant, 1974)、生殖機能制御に関わっている。VMN はげっ歯類における雌特有の性行動であるロードシス(後述)を調節している重要な神経核であり、雌の勧誘行動であるホッピング行動や耳を小刻みに震わせるイヤウイグリング、ダーティングなどといった誘惑行動の制御 (Okada et al., 1980, Yamanouchi and Arai, 1983)、雄の性行動制御 (Christensen et al., 1977, Matsumoto and Yamanouchi, 2000)にも関係している。さらに、生殖にかかわる攻撃行動にも重要な役割を担っている (Lammers et al., 1988)。



**A**



**B**

図 1 . A: Schematic illustrations of the nucleus in the rat brain sagittal section. B: Schematic illustrations of distribution area of VMN in the rat brain coronal section (Image from Paxinos and Watson 2007). VMN: ventromedial hypothalamic nucleus. ARCN: arcuate hypothalamic nucleus. DMN: dorsomedial hypothalamic nucleus. dm : dorsomedial VMN. c : central part of VMN. vl : ventrolateral VMN.

## 1-2. ロードーシス行動神経制御機構における VMN の役割

雌ラットは4日に1度の周期で排卵し、その前後それぞれ5-6時間発情する(Hardy, 1972)。発情している雌ラットは雄にマウントされると、頭部と尾部をもち上げて脊柱を湾曲させるロードーシスを示す。この行動は背面からの交尾をしやすくするための動きで、雄の前肢が雌の腰の皮膚に触れた結果生じる反射的な行動である(Kow and Pfaff, 1976)。排卵前日の午前中に卵巣除去を行うとロードーシスの発現は消失し(Moreines and Powers, 1977)、エストロゲンを補充すると回復することから、ロードーシス行動発現にエストロゲンが必須である。排卵前日の午前中に成熟卵胞から多量に分泌されるエストロゲンが、脳の排卵制御にかかわる神経回路に作用して排卵を引き起こすとともに、ロードーシス制御神経回路に作用して発情を引き起こす。

ロードーシスを引き起こす皮膚刺激の情報は、脊髄の第1、第2腰神経を通り、中脳中心灰白質(midbrain central gray: MCG)に伝わることを示されている(Pfaff, 1980)。吻側MCGの背外側部を破壊するとロードーシスの発現が顕著に低下し、電気刺激によって促進される(Sakuma and Pfaff, 1979 a, b)ことからMCGがロードーシス行動を指令する中枢であると考えられている。皮膚の刺激情報を受けたMCGはロードーシス指令情報を出す。この神経情報は延髄網様体で中継され、網様体脊髄路を通り腰髄に下行する(Pfaff, 1980)。脊髄神経により伝えられた指令が腰髄から腰部深部総背筋や外側最背長筋などロードーシス行動を構成する筋を収縮させることでロードーシスが生じる。MCGは前脳に発達しているロードーシスを促進する機構と抑制する機構から情報を受け、ロードーシス発現を調節している。

VMNを破壊するとロードーシスが減少し(Pfaff and Sakuma, 1979b)、

電気刺激をすると促進される(Pfaff and Sakuma, 1979a)。また、VMN にはエストロゲンの受容体が豊富に存在し(Hayashi et al., 1997, Stumpf and Grant, 1974)、卵巣除去ラットの VMN にエストロゲンを直接植えるとロードーシスが促進される(Barfield and Chen, 1977, Rajendren et al., 1991)。このように、VMN はロードーシス発現に必須の部位であり、エストロゲンが VMN に作用しロードーシスを促進させる。

VMN の電気刺激によるロードーシス促進効果が MCG 破壊により消失すること(Sakuma and Pfaff, 1979b)、解剖学的にも VMN は MCG に神経投射があることが示されている(Canteras et al., 1994)ことから、VMN のロードーシス促進情報は MCG に行くものと考えられている。VMN の前、外側部を切断するとはロードーシスが抑制される(Yamanouchi and Arai, 1979, Hennessey et al., 1990)。したがって、VMN のロードーシス促進情報は前外側部の出力線維をとおり MCG の機能を修飾すると考えられる。

一方、卵巣除去ラットの外側中隔(lateral septal nucleus:LS) 破壊(Nance et al., 1975, Kondo et al., 1990)や出力神経線維切断(Yamanouchi and Arai, 1977)を行うと少量のエストロゲンで強いロードーシスがみられるようになり、ハムスターの LS の電気刺激はロードーシスを抑制する(Zasorin et al., 1975)。さらに、エストロゲンを LS に直接植えると、ロードーシスの発現が促進される(Satou and Yamanouchi, 1999)ことから、エストロゲンは中隔の抑制力を解除するように働くのであろう。逆行性神経トレーサーを MCG に注入して解析した実験により、MCG へ神経投射している LS 中間部の神経細胞がロードーシス抑制力をもつことが明らかにされ(Tsukahara and Yamanouchi, 2001, 2002)、LS の抑制力は腹側から視索前野を下降し、内側前脳束を通過して MCG 吻側部



に行くことが示された。LS の抑制力と VMN の促進力の関係については、両者を切断または破壊する実験により、LS と VMN は独立して働いていることが確認されている (Yamanouchi, 1980)。

中隔の下に位置する内側視索前野(preoptic area nucleus: POA)についても、POA の破壊(Powers and Valenstein, 1972)がロードーシスを促進させることから、ロードーシスの抑制力をもつと考えられる。エストロゲンの直接の局所投与によってもロードーシスが促進されるため (Yanase and Gorski, 1976)、中隔と同様にエストロゲンによってロードーシスの抑制が解除される仕組みが推察される。

セロトニン神経を多くもつ背側縫線核(dorsal raphe nucleus: DR)もロードーシスに抑制的に機能している (Yamanouchi and Arai, 1985, Kakeyama and Yamanouchi, 1992, 1993, 1996)。DR はセロトニン神経線維を VMN に投射しており (Kanno et al., 2008)、VMN にセロトニン神経毒の 5,7-ジヒドロキシトリプタミンを注入するとロードーシスが促進される (Luine et al., 1983)ことから、DR から VMN のセロトニン神経投射が VMN のロードーシス促進機構を抑制していると考えられる。

### 1-3. エストロゲン受容体

中枢神経系の生殖機能におけるエストロゲンの作用は、神経細胞に存在するエストロゲン受容体(ER)の量や質により影響を受ける。ER はステロイドホルモン受容体のスーパーファミリーに属するタンパクである。ER に対してエストロゲンなどのリガンドが結合すると、ER は DNA への結合が促進され、遺伝子の転写を制御する転写因子として機能し、生殖制御に必要なタンパクの合成が開始される。エストロゲン受容体分子には N 末端から C 末端にかけて 4 つの異なる機能を持つ領

域があり、N 末端側から順に A/B、C、D、E/F の領域で構成される (Weihua et al., 2003) (図 2)。A/B 領域は ER の転写活性を促進しており、AF-1 と呼ばれている。C 領域は DNA 結合領域である。D 領域はヒンジ領域とよばれ、際立った機能をもつ領域ではない。E/F 領域はリガンド結合領域であり、A/B 領域と同様に遺伝子転写活性に関わる機能をもち、AF-2 と呼ばれている。熱ショックタンパク質との相互作用、さらに受容体の 2 量体形成に関わる機能などももっている。ER には 2 種類のサブタイプが存在し、分子構造の違いから  $\alpha$  受容体(ER $\alpha$ )と  $\beta$  受容体(ER $\beta$ )がある (Kuiper et al., 1996)。

ER $\alpha$  遺伝子には、転写を開始する上流領域のプロモーターが複数存在しているが、どのプロモーターが用いられても同様の ER $\alpha$  が生産される (Wilson et al., 2009)。ラットの ER $\alpha$  遺伝子では 0S, 0N, 0U, 0, C, 0T といった多くのプロモーターが機能していることが報告されている (Ishii et al., 2010) ことから、転写に用いられるプロモーターの違いが ER $\alpha$  転写発現の局在的制御や時間的制御に関わっている事を示唆している。

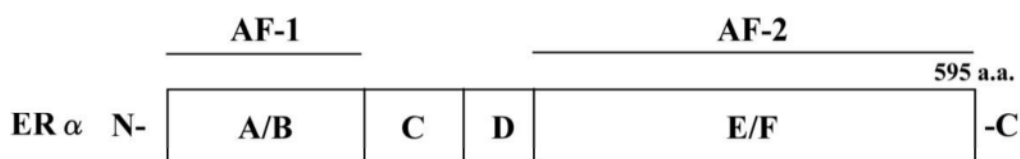


図 2 . Schematic illustrations of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) structure. Image was modified from Weihua et al., 2003.

ER $\alpha$  ノックアウトマウスは排卵機能がなく、ロードーシスをしない (Ogawa et al., 1998)ことから、エストロゲンが ER $\alpha$  に働くことが生殖機能の調節に重要であると考えられる。ER $\alpha$ 、ER $\beta$  はともに子宮や精巣、大腸といった様々な臓器に広く同程度に分布するだけでなく、脳の中樞神経系において多く存在している。ER $\alpha$  は、ロードーシス促進中枢である VMN、ロードーシスの統御機構である MCG,下垂体ホルモンの分泌メカニズムに関係する ARCNや排卵に重要な POA とその一部である性的二形核の前腹側脳室周囲核 (anteroventral periventricular nucleus: AVPV)、内側がロードーシスに促進的、外側が抑制的に機能する扁桃体 (amygdaloid nucleus: AMG)、扁桃体との連絡が性機能に関連するとされる分界条床核 (bed nucleus of the stria terminalis: BNST)、さらに雌の生殖機能に関連するほとんどの部位に ER $\alpha$  が多く存在している (Shughrue et al., 1997)。

VMN における ER $\alpha$  の分布には領域による差がある。それぞれの領域に ER $\alpha$  はみられるが、特に vVMN に非常に多くみられ、それに比べると cVMN、dmVMN にみられる ER $\alpha$  は非常に少ない。卵巣除去をしたラットにエストロゲンを投与すると、VMN、MCG、AVPV、ARCN に発現する ER $\alpha$  免疫陽性細胞数が低下する (Yamada et al., 2009)。ER メッセージャー RNA (ER-mRNA) も同様にエストロゲンを投与することで減少する (Lauber et al., 1990)。このように、脳視床下部における ER $\alpha$  の発現はエストロゲンによってダウンレギュレーションされている。さらに、雌ラットの脳内 ER-mRNA の総量は、排卵周期によって変化していることも報告されている (Helena et al., 2006, Shughrue et al., 1992)。

#### 1-4. 本研究の目的

先述のように、VMNは雌の生殖機能の制御に重要な役割をもっており、その神経細胞におけるER $\alpha$ の発現調節は生殖制御に重要な因子の一つと考えられる。VMNのER $\alpha$ 発現調節にはエストロゲンによるダウンレギュレーションが重要な機能であるが、神経入力があるER $\alpha$ 発現に影響しているのかどうか明らかになっていない。視床下部の神経核は脳の左右にそれぞれ存在し、両側で機能をコントロールしている。片側のVMNを破壊してもロードーシスの発現は消失することではなく、片側を電気刺激するとロードーシスは促進される(Pfaff and Sakuma, 1979a)。このように、ホルモン分泌や発情状態の誘起など左右差を必要としない機能を制御するには、左右の神経核の働きが同期している必要がある。そのためには左右の神経核が情報の共有を行なっていることが推察できる。したがって、VMNのER $\alpha$ 発現が神経により制御されている可能性がある。しかし、左右のVMNがどのように影響しているのか全く明らかになっていない。それらの点を明らかにするため、VMNとARCNを含む視床下部腹内側部(VMH)の片側を破壊し、残された側のVMNとARCNに発現するER $\alpha$ 免疫陽性細胞数やER $\alpha$ -mRNAの発現量に変化があるかどうかをしらべた(2章)。

さらに左右の神経核が情報の共有、または互いの影響をどのような神経回路で行なっているか明らかにする目的で、逆行性神経トレーサーであるFluoro Gold (FG)、順行性神経トレーサーであるPhaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L)をそれぞれ左側のVMNに注入し、それぞれトレーサーの免疫組織化学的検索を行った。それにより左右のVMNに直接の神経連絡があるかどうか、VMNが生殖機能、特にロードーシス行動に関わる神経核とどのように互いの神経連絡をしている

のか検討を行った(3章、4章)。

## 第2章 左右神経連絡による視床下部エストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )

### 発現の制御

#### 2-1. 序

ER $\alpha$  の発現は血液中のエストロゲン濃度によって影響を受ける。ラットの vIVMN や ARCN における ER $\alpha$ -mRNA レベルは発情周期に依存して変動するという報告があり (Shughrue et al., 1992)、これはエストロゲンによる ER $\alpha$  のダウンレギュレーションが関与していると考えられる。卵巣除去を施したラットの vIVMN と ARCN に見られる ER $\alpha$  免疫陽性細胞数は、エストロゲンを投与後 24 時間で減少する (Yamada et al., 2009)。一方、卵巣除去ラットの vIVMN と ARCN における ER-mRNA もエストロゲンにより急速に減少する (Lauber et al., 1991, Simerly and Young, 1991)。ホルモン以外では、絶食やストレス (Estacio et al., 1999)、血流不全などに起因する脳障害 (Westberry et al., 2008) で ER $\alpha$  のタンパク、mRNA 発現がともに増加するという報告がある。

VMN は生殖行動、特に雌ラットのロードーシス行動制御に重要な役割をもつが、左右の VMN がお互いにどのように影響をしているのか全く明らかにされていない。第2章では左右の vIVMN の ER $\alpha$  発現や ER $\alpha$ -mRNA 発現にお互いがどのように関わっているのか、片側破壊の手法を用い、免疫組織科学的に、また Real-time PCR により調べた。最初に、VMN は前後に長い神経核であることから、前後の部位で ER $\alpha$  発現細胞数に違いがあるかどうか確かめるため、卵巣除去ラットに前後等間隔で vIVMN と ARCN の免疫陽性細胞数を調べた (実験1)。左右間の影響を見るために卵巣除去を施した雌ラットの右または左の vIVMN と ARCN を含む VMH を破壊し、残った側の vIVMN と ARCN

の ER $\alpha$  免疫陽性細胞数を計測した(実験 2)。さらに、片側 VMH を破壊したラットの残存側 VMN と ARCN における ER $\alpha$ -mRNA 量を Real-time PCR を用いて計測した(実験 3)

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 動物

8 週齢の Wistar 系雌ラット(230-290g)を実験に用い(高杉実験動物、埼玉)、一定周期の照明(明:暗=10:14, 消灯:19:00)と一定温度(22-24 °C)の環境で飼育を行った。水および餌は自由摂取とした。エストロゲンの影響による脳内 ER の発現変動を無くすため、すべてのラットにイソフルラン麻酔下で卵巣除去を施した。卵巣除去から 1 週間後、イソフルラン麻酔下で片側 vVMN の破壊を行った(詳細は後述)。本研究はすべて早稲田大学実験動物に関する指針(承認番号 No.2011, 2012-A005)に従って行った。

### 2-2-2. ER $\alpha$ 免疫染色

VMH 片側破壊手術から 2 4 時間後に灌流固定を行い、脳を摘出した。血液凝固阻害剤のノボ・ヘパリン(0.1ml/100g body weight, 持田製薬)を腹腔内に注射して 1 5 分以上経過した後、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル, 6.48mg/100g body weight, 共立製薬)を腹腔内に注射し麻酔をかけた。この深麻酔下で開胸し、右心耳を切開した後、0.05M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を左心室より 100ml 注入した。連続して 4%パラホルムアルデヒド(PFA) (in 0.05M PBS)を 100ml 注入し、灌流固定を行った。

迅速に脳を摘出し、4%PFA (in 0.05M PBS)で浸漬固定(4°C, 24 時間)

した後、30%スクロース (in 0.05M PBS)に浸して保存した(4°C, 4日間)。クリオスタット内で、OCTコンパウンドを用いて脳をステージに固定し(-20°C, 30分)、VMHを含む範囲の厚さ 50 $\mu$ m の凍結切片を作成した。切片は3枚おきに4つのシリーズに分け、MgCl<sub>2</sub>、スクロース、グリセロールを溶解したアジ化ナトリウム入りの PBS (0.1%NaN<sub>3</sub>/0.05M PBS)に入れて保存した。

免疫染色は1個体につき、4シリーズの脳切片のうち1シリーズを用いて行った。0.1%NaN<sub>3</sub>/0.05M PBS で3回洗浄し、3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in Methanol)で15分間インキュベートすることで、内在性ペルオキシターゼの不活性化を行った。続けて0.1%NaN<sub>3</sub>/0.05M PBS で3回洗浄し、10%ヤギ正常血清(Normal Goat Serum, NGS, Chemicon, CA, USA)が入った0.1%Triton-X-100/0.05M PBS に90分間浸して非特異的結合のブロッキングを行った。その後、ER $\alpha$ 一次抗体(rabbit anti-ER $\alpha$ : 1:400000, c1355, Millipore, MA, USA)が入った0.1% Triton-X-100/0.05M PBS に浸し4°Cで72時間インキュベートした。インキュベート後、0.1M Tris-HCl buffer(TBS) で3回洗浄し、ポリマー試薬(Envision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit, Dako, Glostrup, Denmark) に30分浸して1次抗体と反応させた。0.05M Tris-HCl buffer(TBS)で3回洗浄し、Metal Enhanced DAB Substrate Kit (34065, Thermo Fisher Scientific, IL, USA) によってER $\alpha$ 抗原部位を褐色に発色した。染色した切片はゼラチンコートガラスに載せて乾燥させたのち、上昇系エタノールで脱水しキシレンで透徹させ、マリノールを用いて封入した。

### 2-2-3. ER $\alpha$ 免疫陽性細胞数の計測

実験1では、ブレインマップ(Paxinos and Watson, 2007)に基づき、



VMN はブレグマから体軸方向に後方 1.72-3.36mm の領域にあると定めた。ブレグマから 2.28, 2.52, 2.76, 3.00, 3.24 mm 後方の VMN を含む 5 つの切片を、vIVMN と ARC� における ER $\alpha$  免疫陽性細胞数を計測した。光学顕微鏡に接続したデジタルカメラ (PDMCII/OL Olympus) を用いて vIVMN の画像を撮影し、コンピューターに取り込んだ。取り込んだ画像は Photoshop CS(ver.8.0.1 Adobe Systems Inc.) によって処理し、一辺が 0.2mm の正方形の枠をそれぞれの切片の vIVMN に当てはめ、枠内の ER $\alpha$  免疫陽性細胞数を計測した(図 3 . A)。切片の厚さ(50 $\mu$ m)をもとにその数値を 1mm<sup>3</sup> 中の値(密度)に換算して、それぞれの個体の数値とした。

実験 2 では実験 1 の結果をふまえ、ER $\alpha$  免疫陽性細胞数が一定であるブレグマから後方 2.28-2.76 mm の 3 枚数分の計測数を平均し、切片の厚さ(50 $\mu$ m)をもとにその数値を 1mm<sup>3</sup> 中の値(密度)に換算して、それぞれの個体の数値とした。

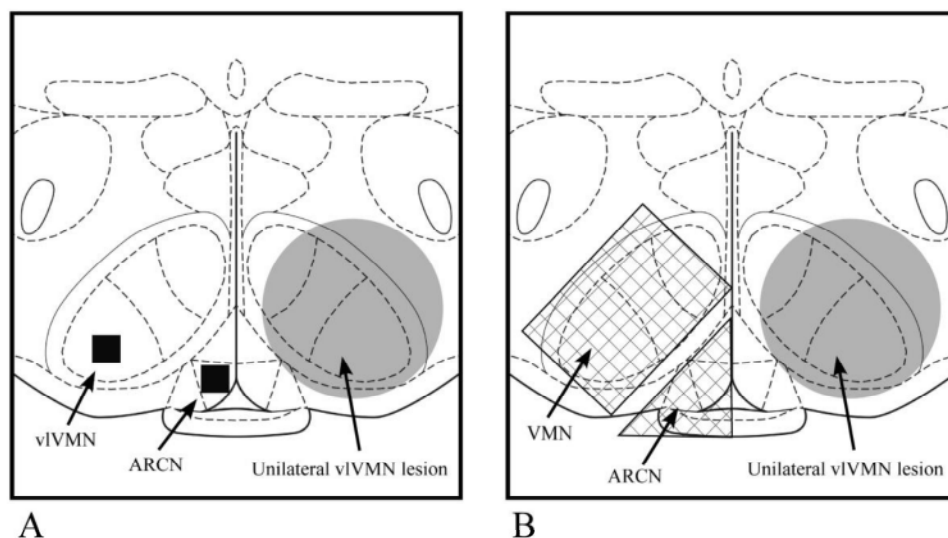


図 3 . Schematic illustrations of samplings from vIVMN. In experiment 1 and 2, ER $\alpha$ -ir cells were counted in a 0.2 mm<sup>2</sup> frame in digital images of the vIVMN and ARC� in unilateral vIVMN lesioned rats (A). In experiment 3, tissues including the VMN or ARC� were dissected in unilateral vIVMN lesioned rats to measure the ER $\alpha$ -mRNA by realtime PCR (B). (Images from Paxinos and Watson, 2007)

#### 2-2-4. 脳手術

実験 2 では卵巣除去手術から 1 週間後、歯の位置を外耳道から 3.3mm 下方に設定した脳定位固定装置にラットを固定し、イソフルラン麻酔下で左または右の vIVMN を破壊した。ブレインマップ(Paxinos and Watson, 2007) に基づいた vIVMN の位置(Bregma より後方 2.5mm, 左右方 0.8mm, 下方 9.8mm) に直径 0.7mm の電極を下ろし、高周波破壊装置(RGF-4A, Radionics Inc., MA, USA) を用いて、60℃で 1 分間通電することにより片側 vIVMN の高周波破壊を行った。実験群として、左側破壊群(L-lesion: n=9) 右側破壊群(R-lesion: n=5)、左側に電極を下ろしただけの偽手術群(sham: n=7)、脳手術を行わない対照群(control: n=11) を用意した。実験 3 でも同様の方法を用いて、左側破壊群(L-lesion: n=12)と偽手術群(sham: n=5)を用意した。

実験 2 では免疫染色した後、光学顕微鏡を用いて組織学的に VMN の破壊位置の確認を行った。vIVMN の大部分が破壊されている個体を用いて ER $\alpha$  免疫陽性細胞を計測した。

#### 2-2-5. Realtime PCR 法による ER $\alpha$ -mRNA の定量

脳手術から 24 時間後、ラットをペントバルビタール麻酔にかけ(50 mg/kg body weight, Somnopentyl, Kyoritsu Seiyaku, Tokyo)、断頭した後、脳を取り出した。

RNA を抽出するために、VMN 及び ARCN を含む 1.5mm の厚さの切片を氷上のブレインロッカー(室町機械、東京)を用いて作成し、右側の VMN または ARCN を含む組織を切片から迅速に切り出した(図 3 B)。組織はメルカプトエタノールを加えた RLT バッファーによって直ちにホモジナイズし、-80℃で保存した。

過去に報告がある実験手法に従って(Maekawa et al., 2012)、Real-time PCR法を用いて total ER $\alpha$ -mRNA と ER $\alpha$  のプロモーター遺伝子の 0S, 0N, 0, 0T, E1 (表 1) を計測した。

組織から total RNA を RNeasy mini kit and RNase-Free DNase set (QIAGEN) によって抽出し、濃度を NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, DE, USA) によって測った後にサンプルを  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。total RNA (0.1  $\mu\text{g}$ ) から cDNA サンプルを抽出するため、Oligo d (T)-adaptor primer, 10 mM dNTP Mixture, AMV Reverse Transcriptase XL (TAKARA BIO, Tokyo, Japan) を用いて  $55^{\circ}\text{C}$  で逆転写を行った。cDNA サンプルを SYBR Green I Master によって増幅し、Light Cycler 480 (Roche, IN, USA) によって解析した。total ER $\alpha$ -mRNA (Chaban 2004)、ER $\alpha$  プロモーター、リボソーム RNA のプライマー配列を表 1 に示した。PCR 産物のバンドサイズは電気泳動によって確認した(図 4)。それぞれの mRNA 量からリボソーム RNA 量を割ることによって、mRNA 量の標準化をした。偽手術群のそれぞれの群の平均値を 1.00 に設定し、破壊群と比較を行った。

#### 2-2-6. 統計解析

ER $\alpha$  免疫陽性細胞密度の比較をするために、実験 1 における control 群の部位ごと、実験 2 における L-lesion 群とその他の群に対してテューキーの HSD 法による一元配置分散分析法を用いて比較をした。それ以外の実験群では、スチューデントの t 検定を用いて比較を行った。すべての統計解析は StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いて行い、 $p < 0.05$  の場合に統計的有意差があるとした。

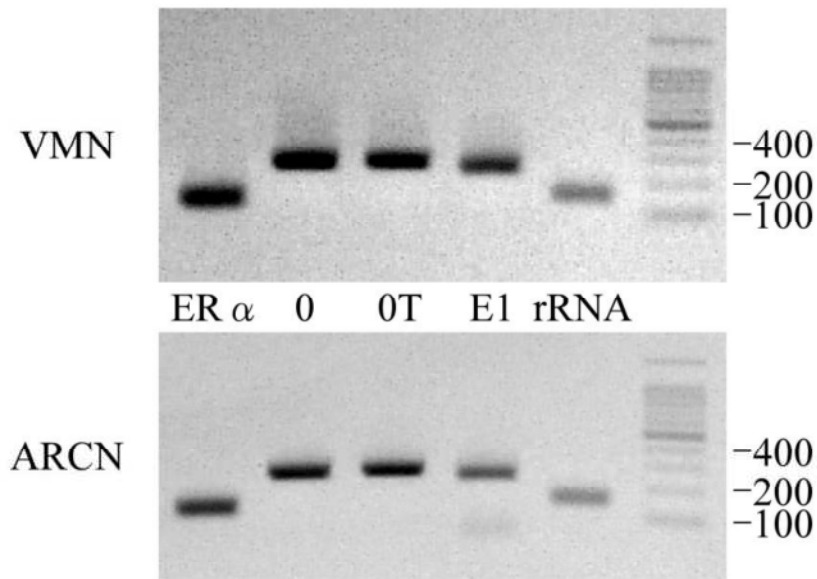


图 4 . Confirmation of PCR products with expected size by agarose gel electrophoresis. Total ER $\alpha$ -mRNA and mRNA variants of exon 0, 0T, and E1 in control rats in VMN and ARCN could be amplified by RT-PCR using specific primers for variants. PCR product sizes were exactly matched with expected sizes. The sizes of DNA ladder size maker are shown on the right in base pairs.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Genbank accession no.
ER $\alpha$	Forward:TACGAAGTGGGCATGATGAA	138	NM_012689
	Reverse:AAGGTTGGCAGCTCTCATGT		
ER $\alpha$ -0S	Forward:CCGAAAACACAAGGCTCCATGCT	336	NW_047550
ER $\alpha$ -0N	Forward:CTGGGGCATCTCCTTCAATATG	304	NW_047550
ER $\alpha$ -0	Forward:GACTTCTACAAACCCATGGA	272	NM_012689
ER $\alpha$ -0T	Forward:CAGCAGGTTTGGCGATGTCTAA	275	X98236
ER $\alpha$ -E1	Forward:TTTAACCTCGGGCTCTACTC	247	X98236
Exon 1	Reverse:GGGCTTGCTGTTGTCCACGTAC		NM_012689
rRNA(TA101)	TACCACATCCAAGGAAGGCAG	151	
rRNA(TA102)	TGCCCTCCAATGGATCCTC	151	

表 1. Primers and PCR products for RT-PCR experiments

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 動物の状態

実験 2 において、卵巣除去手術を施した時点の control 群、sham 群、L-lesion 群、R-lesion 群の平均体重はそれぞれ 270.5, 257.1, 272.0, 261.0 g で、統計的に差がなかった。脳摘出した時点(脳手術から 1 日後、卵巣除去から 8 日後)でのそれぞれの群の平均体重は 317.5, 315.7, 320.6, 313.0 g であり、統計的差はみられなかった。すべての群のラットにおいて正常の体重増加がみられ、脳手術から 1 日後のラットにおいても特徴的な行動の変化はみられなかった。

### 2-3-2. VNN と ARCN の前後による ER $\alpha$ 免疫陽性細胞数の違い(実験 1)

vIVMN、ARCN の吻側尾側軸における ER $\alpha$  免疫陽性細胞の分布を明らかにするために、5 つのレベルの切片を選び、ER $\alpha$  免疫陽性細胞密度を比較した(図 5 A)。5 つのレベルの内、vIVMN の吻側の 3 つ(ブレグマよりそれぞれ 2.28, 2.52, 2.76 mm 後方)の ER $\alpha$  免疫陽性細胞密度はほぼ同じ値を示した(図 5 B)。左右とも vIVMN の尾側(ブレグマより 3.24mm 後方)における ER $\alpha$  免疫陽性細胞密度は、吻側の 3 つに比べて高い値を示した[Right side:  $F(4,45)= 6.88$ ,  $P<0.001$ , Left side:  $F(4,45)=5.26$ ,  $P<0.01$ 。一方、ARCN は前後で大きな違いが見られなかったが、左側の ARCN のみ尾側の ER $\alpha$  免疫陽性細胞数が高い値を示していた [ $F(4,45)= 4.14$ ,  $P<0.05$ ]。vIVMN と ARCN どちらも ER $\alpha$  免疫陽性細胞数に左右の差はみられなかった(図 5 A)。

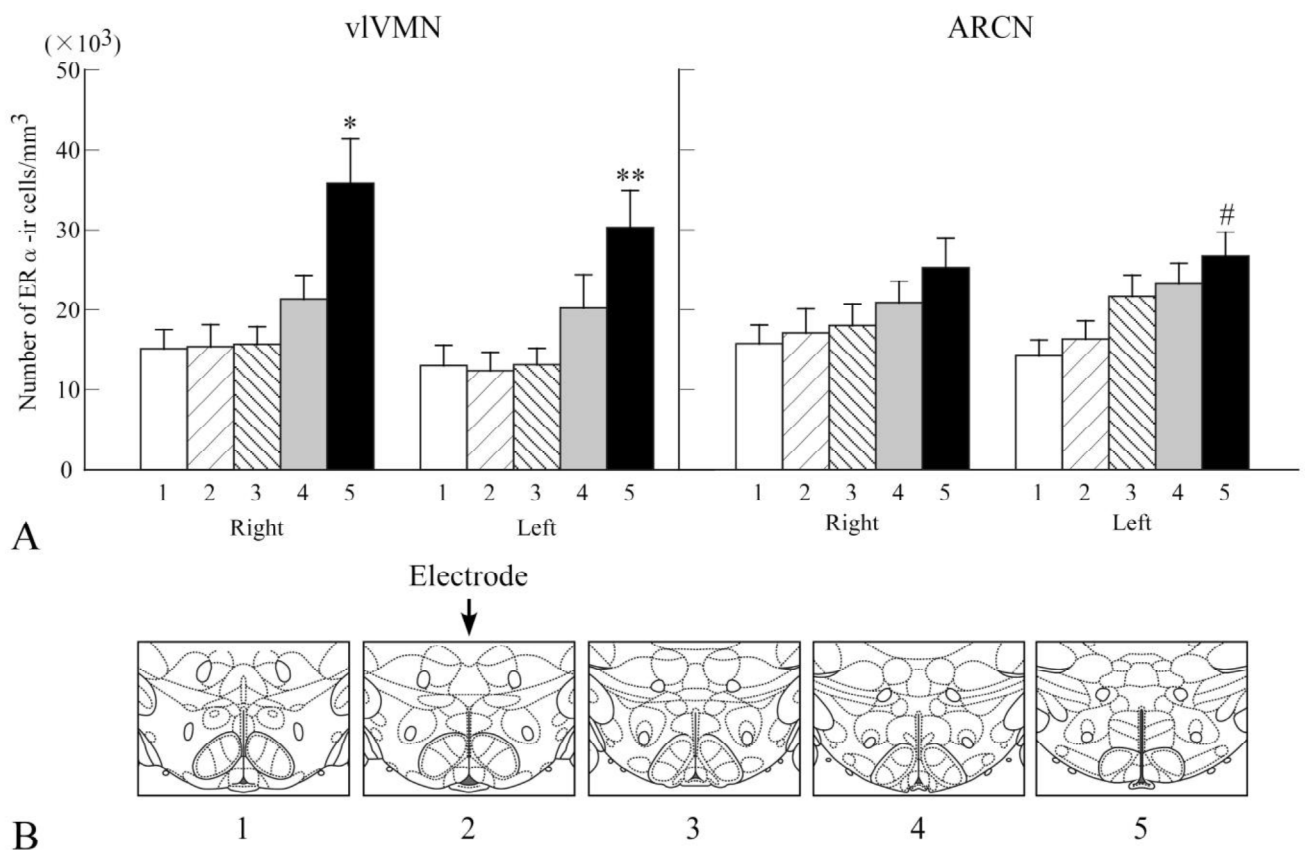
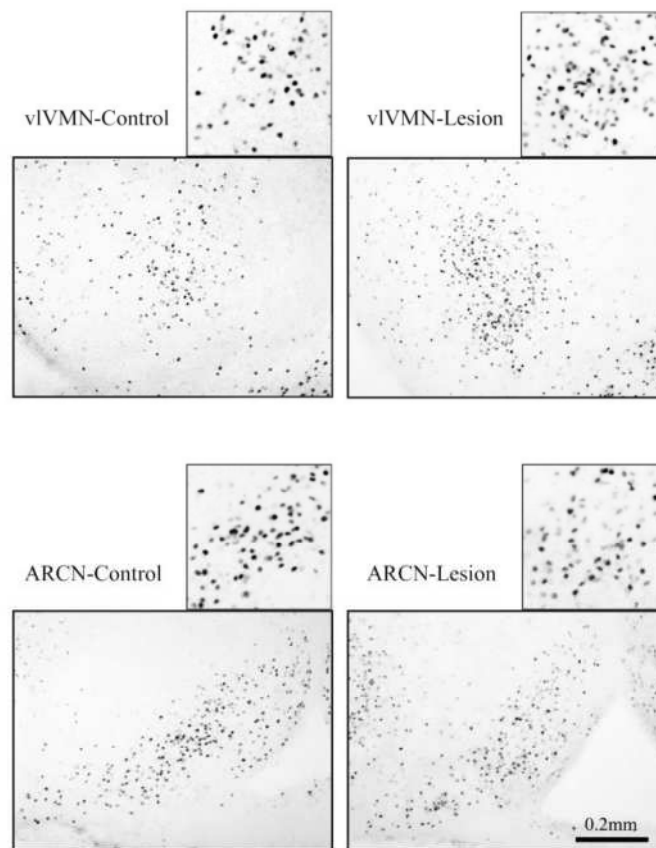


図 5. Antero-posterior and right-left differences of ER $\alpha$ -ir cells in the vIVMN. A: Mean number (density) of ER $\alpha$ -ir cells in the vIVMN and ARCN of 5 different regions that corresponded to the brain maps (1-5) shown in B in ovariectomised rats without brain surgery. B: Numbers (1-5) under the brain maps correspond to 2.28, 2.52, 2.76, 3.00 and 3.24 mm posterior to the bregma (Paxinos and Watson, 2007). Densities of ER $\alpha$ -ir cells in the posterior region of the bilateral vIVMN and left-side ARCN were higher than those in anterior regions. \*  $P < 0.05$ , vs 1, 2, 3 and 4. \*\*  $P < 0.05$ , vs 1, 2 and 3. #  $P < 0.05$ , vs 1 and 2.

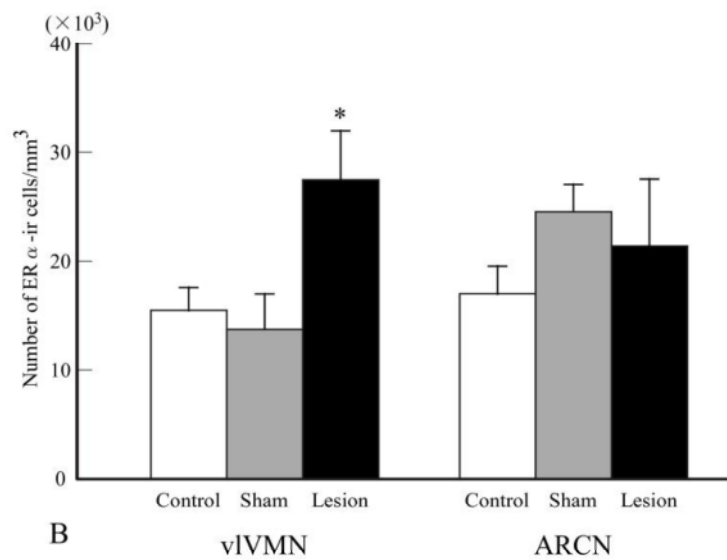
### 2-3-3. 片側 VMH 破壊による vIVMN と ARCN の ER $\alpha$ 免疫陽性細胞数(実験 2)

#### 左側破壊

L-lesion 群における右側 vIVMN の ER $\alpha$  免疫陽性細胞密度は control 群、sham 群に比べて統計的有意に高く [F (2, 23) = 4.83,  $P < 0.05$ ] (図 6)、それぞれ 1.78 倍、2.00 倍の数値を示していた。右側 ARCN においては、それぞれの群の ER $\alpha$  免疫陽性細胞密度に有意な差はみられなかった。

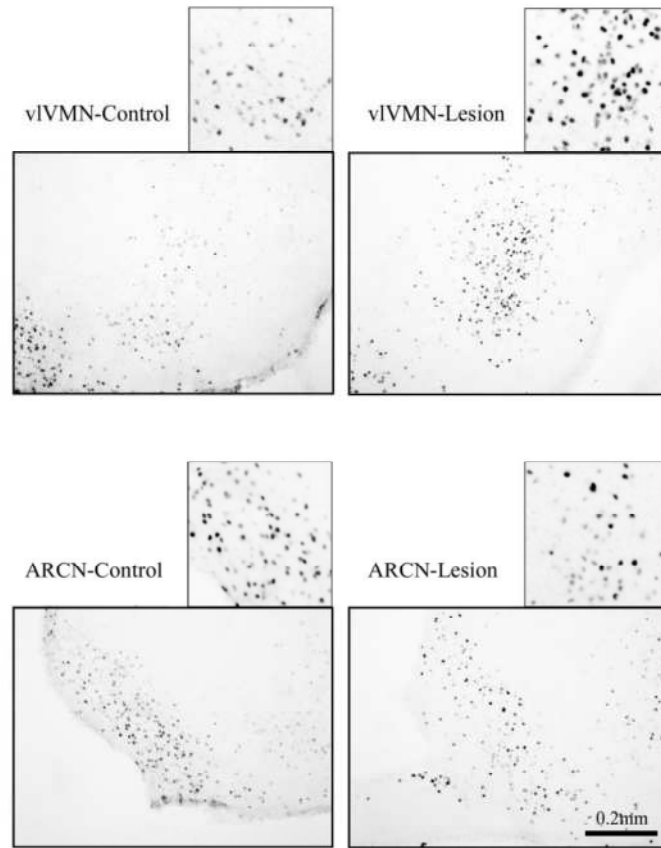


A

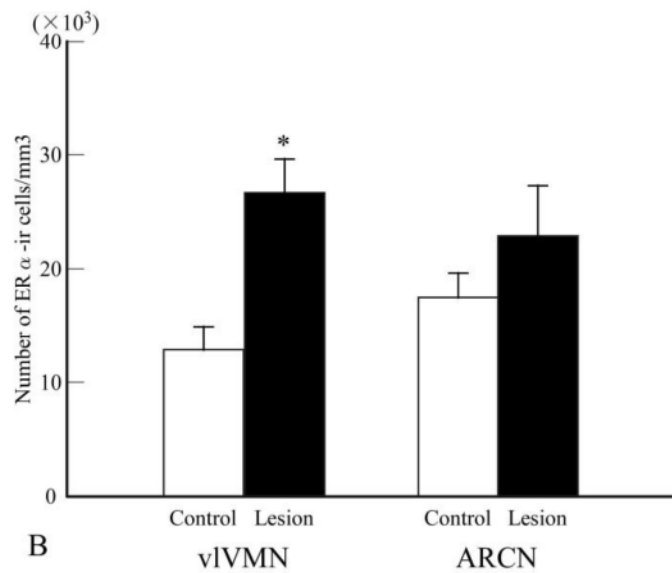


B

图 6 . The ER $\alpha$  immunoreactivity in the right side of vIVMN and ARC in left side lesioning of VMN. A: Representative photomicrographs of the right side of the vIVMN and ARC in left side lesioned-ovariectomised rats after ER $\alpha$  immunostaining. An image above each photomicrograph is high magnification in counting area (0.2 X 0.2 mm flame) B: Mean number (density) of ER $\alpha$ -ir cells in the right side of the vIVMN and ARC in left side lesioned-ovariectomised rats. \* P < 0.05, left side lesioned vs control and sham.



A



B

Fig 7. The ER $\alpha$  immunoreactivity in the left side of vIVMN and ARC in right side lesioning of VMN. A: Representative photomicrographs of the left side of the vIVMN and ARC in right side lesioned- ovariectomised rats after ER $\alpha$  immunostaining. An image above each photomicrograph is high magnification in counting area (0.2 X 0.2 mm frame). B: Mean number (density) of ER $\alpha$  ir cells in the left side of the vIVMN and ARC in right side vIVMN lesion-ovariectomised rats. \* P < 0.01, right side-lesioned vs control.



## 右側破壊

R-lesion 群においても、L-lesion 群と似た結果が得られた(図 7)。R-lesion 群の左側 vIVMN の ER $\alpha$  免疫陽性細胞密度は control 群より有意に高く(P<0.01)、2.07 倍の値を示していた。左側 ARCN は R-lesion 群と control 群の ER $\alpha$  免疫陽性細胞数に有意差はみられなかった。

## 破壊位置確認

右側および左側 VMN において、視床下部前部の後部から視床下部中間部までの領域に破壊傷がみられた(図 8)。L-Lesion 群において、9 匹全ての個体の vIVMN の主要部分が完全に破壊されていた。cVMN も大部分に傷がみられたが、dmVMN はすべての個体で無傷であった。このうちの 4 匹では ARCN の側部に部分的な傷がみられた。また R-lesion 群における破壊傷の位置は L-lesion 群のものと似通っており、すべての個体で vIVMN の大半が破壊されていた。5 匹中 2 匹のラットの ARCN において、小さい傷がみられた。

vIVMN の外側の隣接部は脳手術群のすべてのラットに破壊がみられた。また脳手術群では電極を下ろした痕もみられた。

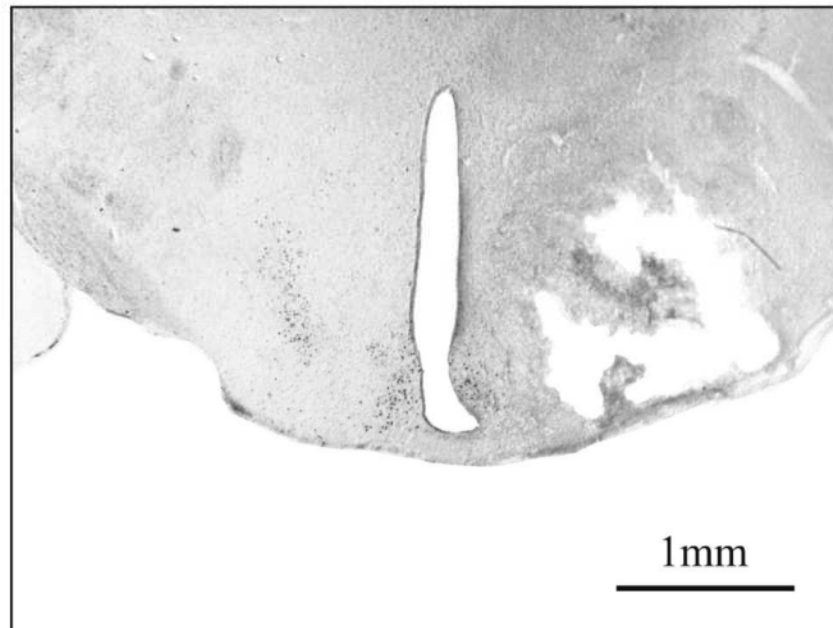


図 8 . A representative photomicrograph of the medial hypothalamus in left side vlVMN lesioned-ovariectomised rat (#6). Large lesions 24 hrs after brain surgery in the right side of the vlVMN and adjacent areas, though not including the ARC.N.

#### 2-3-4. ER $\alpha$ -mRNA の定量 (実験 3)

右側 VMN の total ER $\alpha$ -mRNA の量は、Lesion 群のものが sham 群に比べて有意に多かった( $P < 0.05$ ) (図 9)。ARC.N においては、Lesion 群と sham 群の間に統計的有意差はみられなかった。VMN における ER $\alpha$  プロモーターの OS, ON, O, OT, E1 についても定量化を行った。OS と ON は検出されなかったものの、O, OT, E1 については realtime PCR 法を用いて定量化を行った。O の発現量は Lesion 群のものが sham 群よりも多く、有意差がみられた( $P < 0.05$ ) (図 10)。一方で、OT と E1 の発現量は破壊による差はみられなかった。

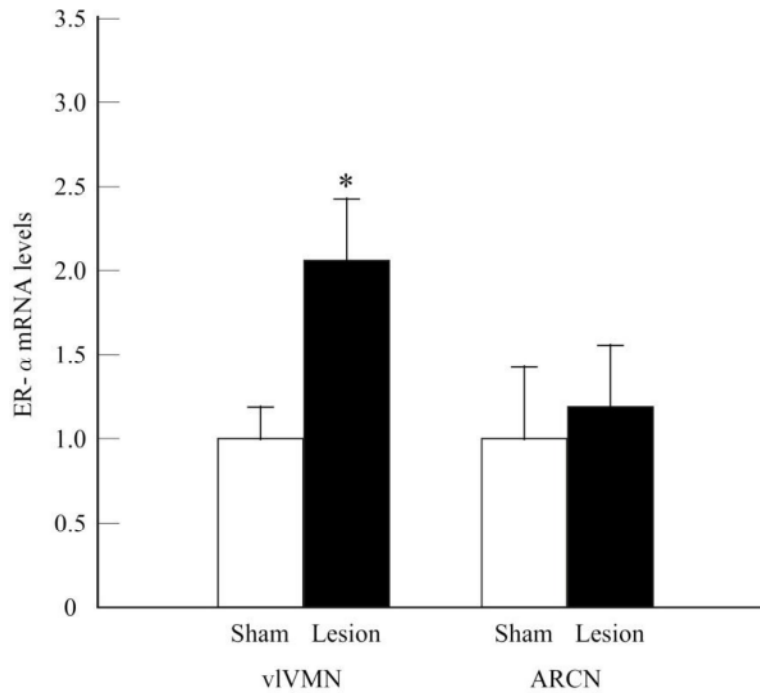


图 9 . Amounts of ER $\alpha$ -mRNA in the right side of the vIVMN and ARCN in control and left-side vIVMN lesioned- ovariectomised rats. \*P<0.05 left-side lesioned vs control

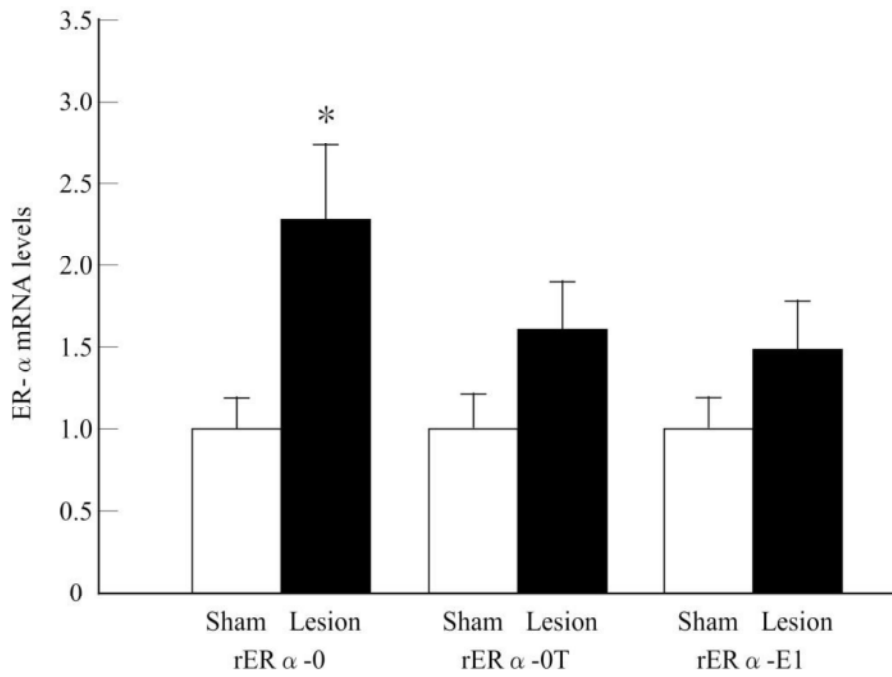


图 1 0 . Amounts of ER $\alpha$ -mRNA 0, 0T and E1 in the vIVMN in control and left-side vIVMN lesioned-ovariectomised rats. \*P<0.05 left side-lesioned vs control

#### 2-4. 考察

今回の結果では vIVMN の ER $\alpha$  発現細胞数に前後での違いが顕著に見られた。この差は vIVMN の前後での機能の違いと関係があると考えられるが、後部で ER $\alpha$  発現細胞が多い理由は明らかではない。片側破壊の結果では、卵巣除去ラットの左側 VMN 破壊群の右側 vIVMN にみられる ER $\alpha$  免疫陽性細胞数は control 群、sham 群のよりも統計的有意に多かった。右側 VMN 破壊群においても同様の結果が得られた。卵巣除去は視床下部における ER $\alpha$  の発現を増加させるが、VMN の片側破壊はそれ以上に ER $\alpha$  発現を増加させることが明らかになった。副腎や脂肪組織などからもエストロゲンは産生されるため、卵巣除去では体内からエストロゲンを完全に排除することはできない。したがって、卵巣除去によって増加する VMN の ER $\alpha$  発現量は最大ではないと考えられ、その部分が反対側破壊によって ER $\alpha$  の発現を促された可能性がある。また片側 VMN 破壊群における ER $\alpha$ -mRNA と ER $\alpha$  0 の発現量は対照群より多かったことから。片側 VMN 破壊によって ER $\alpha$  の増加するメカニズムは ER $\alpha$  0 プロモーターが関係していると考えられる。

ラット VMN 前部の両側神経切断(Yamanouchi and Arai, 1979)や両側矢状切断(Pfeifle et al., 1980)はロードーシス行動を減少させることが知られている。またハムスターでも同様の結果が得られている(Malsbury, 1979)。これは、VMN の前背側部からの両側出力がロードーシス行動を制御している事を示している。一方で、ラット(Edwards and Pfeifle, 1981)とハムスター(Ostrowski and Scouten, 1981)の VMN 出力線維の片側切断ではロードーシス行動の明瞭な低下を引き起こさなかった。VMN における ER $\alpha$  の発現とロードーシス行動との関連は十分に解析されていない。しかし、VMN の片側損傷による機能に対する結果

や今回の実験の結果から、片側が損傷しても残された側の VMN に発現する ER $\alpha$  が増加することで、エストロゲンへの感受性が高くなり、雌の性受容性が回復する代償効果をもつのではないかと推測できる。神経細胞のエストロゲンに対する感受性は ER $\alpha$  の数だけでなく、リン酸化といった要因でも増加する(Lannigan, 2003)。したがって、これらの点においても調べる必要がある。

卵巣除去ラットの視床下部において、エストロゲンによる ER $\alpha$  のダウンレギュレーションの程度は神経核によって異なることが報告されている(Yamada et al., 2009)。この神経核によるエストロゲンに対する反応性違いはそれぞれの部位のエストロゲンに対する感受性の違いに由来すると考えることができる。したがって、それぞれの部位の ER 発現量の違いがこれに関係してくるであろう。これらの脳内メカニズムは生殖行動、生殖生理の変化に関係していると考えられる。しかし、片側破壊による ER $\alpha$  を増加させる神経細胞内のメカニズムについては現在説明することができない。今後、分子生物学的な解析を行う必要があるであろう。

今回の実験では VMH の破壊範囲が vIVMN と cVMN ばかりでなく、dmVMN の一部にも及んでいた。dmVMN は vIVMN とのシナプス連絡があまりないことが報告されていることから(Canteras et al., 1994)、VMH の片側破壊効果による ER $\alpha$  の発現増加に対して、dmVMN 破壊の影響は少ないと考えられる。cVMN 破壊による影響については、今回の実験では確かなことがわからないため、ないとはいえない。

## VMN の前後及び左右間の ER $\alpha$ 免疫陽性細胞数

VMN の前後における ER $\alpha$  免疫陽性細胞数を比較すると、その数は前部が後部よりも多かった。その傾向は ARCN でも観察された。また、vIVMN と ARCN どちらも ER $\alpha$  免疫陽性細胞数に左右差はみられなかった。VMN に直接エストロゲンを注入し雌の発情状態を誘起する実験において、右側に入れた場合と比較して左側に入れた場合効果が弱かったことが示されており (Roy and Lynn, 1987)、エストロゲンに対する感受性が左右で異なる可能性がある。今回の実験では vIVMN の ER $\alpha$  免疫陽性細胞数に左右差がみられなかったことから、前述の VMN におけるエストロゲンに対する感受性の左右差は左右の VMN の神経入力の違いによって生まれるものである可能性が考えられるであろう。

## 片側 VMN 破壊による ER $\alpha$ 免疫陽性細胞増加のメカニズム

脳内 ER $\alpha$  発現制御にはいくつかの因子が関わっている。中でも特にエストロゲンや、ER $\alpha$  に働いて発情状態を引き起こすような関連化合物 (Pfaff et al., 2006) は、ユビキチン・プロテアソーム系路を介して ER $\alpha$  発現を制御している (Reid et al., 2003)。雌の vIVMN の ER $\alpha$  免疫陽性細胞数は雄よりも多いが、vIVMN と ARCN における ER $\alpha$  のエストロゲンによるダウンレギュレーション機構は雌雄どちらにも見られる (Yamada et al., 2009)。今回の実験において、卵巣除去ラットの血中エストロゲン濃度は極めて低いことから、片側破壊による ER $\alpha$  発現増加がエストロゲンの影響によりおこることはないと考えられる。エストロゲンが関与しているとする、vIVMN と一緒に破壊が見られた ARCN でも同様に増加が起こるはずであるが、みられなかった。これらの結果は、ホルモンとは関係ない仕組みで残存側 VMN の ER $\alpha$  発現

増加が生じたことを強く示している。拘束ストレスやエネルギー減少、脳障害によっても ER $\alpha$  発現が変動することが報告されている(Estacio et al., 1996, Westberry et al., 2008)。これらの場合、神経活動が ER 発現を変化させると考えられているが、直接に神経系が細胞の ER 発現機構に影響を及ぼしているのか明らかではない。今回の実験では、sham 群と control 群との間に免疫染色結果や体重の差がみられなかったため、脳手術のストレスによる影響は除外できると考えられる。

今回の実験で、破壊された VMN から残存側の VMN へ伝わる神経信号が、ER $\alpha$  発現制御に関わるシグナルの変換において重要な役割をもっている可能性がある。解剖学的解析により、VMN は前脳や下位脳幹の多くの神経核と相互の神経連絡があることが報告されている(Simerly, 1994)。順行性神経トレーサーを用いた VMN からの神経投射の詳細な解析では、vIVMN の軸索投射は vIVMN 内だけではなく VMN 内すべての領域にわたり核内回路を形成していることが示されている(Canteras et al., 1994)。この解析では、vIVMN は対側性に少しの神経連絡がある可能性が示唆されており、左右の神経連絡は視索上交連、前交連、正中隆起や第 3 脳室の上層部分を通る経路があることが示されている。これらのことから、左右 VMN の直接の神経連絡が ER $\alpha$  発現制御に関与している可能性がある。

左右 VMN の機能的な連絡は他の神経連絡路によることも考えられる。VMN は MCG にロドーシス促進の信号を送っている(Sakuma and Pfaff, 1979a)。VMN は MCG と相互に神経連絡をしており(Beitz, 1982)、vIVMN の ER $\alpha$  をもつ神経細胞が MCG に神経投射をしている事も明らかになっている(Morrell and Pfaff, 1982)。そのうえ、VMN の下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド神経が発情行動の制御に関わ

っており (Apostolakis et al., 2004)、MCG に神経投射している (Maekawa et al., 2006)。これらのことから、片側破壊の情報が残存側 VMN に伝えられる神経連絡は、直接の神経連絡だけでなく MCG を介した間接的な連絡路による可能性も考えられる。ラットやハムスターにおいて、VMN の前シナプス終末の数や性質はエストロゲンによって変化することから (Frankfurt et al., 1990, Meisel and Luttrell, 1990)、VMN への前シナプスからの入力にエストロゲンによって影響を受けることを示すものである。今回の実験結果と関連があると思われる報告に、片側 VMN を半分に切断すると、エストロゲンと関係なく VMN シナプス前終末が増加し、その増加は無傷側の VMN にも起こるというものがある (Sa et al., 2010)。この報告は、エストロゲンが VMN 神経だけでなく VMN に神経連絡をしてシナプス形成をする神経にも影響を与え、片側の神経切断が反対側のシナプス構造に影響を与えるという 2 つの重要な意味をもっている。したがって、片側破壊によるシナプスの新生や減少は ER $\alpha$  発現の増加に関わっている可能性がある。これらのメカニズムは、今回示された左右 VMN によるお互いの ER $\alpha$  発現制御に関わっている可能性もある。

最後に、片側破壊手術から 24 時間の間に、ER $\alpha$  発現させることのできる神経細胞が vlVMN に新生している可能性について検討する必要がある。この可能性を完全に排除することはできないが、この短い期間で ER $\alpha$  を発現させる神経が新生するというメカニズムを説明することは難しい。それよりもむしろ、ER $\alpha$  遺伝子発現が待機状態にある神経細胞、つまり予備の受容体をもつ細胞が片側損傷によって機能し始める可能性のほうが考えられる。このメカニズムを明らかにするために、さらなる研究が必要になる。



## 片側 VMN 破壊による ER $\alpha$ 発現増加における ER $\alpha$ -mRNA 0 の役割

片側破壊により反対側 VMN における ER $\alpha$ -mRNA が増加したことから、ER $\alpha$  免疫陽性細胞数の増加は ER $\alpha$  転写活性に起因したものと考えられる。

ER $\alpha$ -mRNA には多くの異なるプロモーターが存在している。今回の実験ではこれらのプロモーターの内、Monje et al.(2007)の実験に基づいて5つのプロモーター(0S, 0N, 0, 0T, E1)について計測し、exon 0、0T、E1 が VMN において発現していることがわかった。脳内ではこの3つの因子が発現するという報告と一致するものである(Monje et al., 2007)。この3つのうち、exon 0 が増加していたことから、VMN の片側破壊によって反対側の VMN における exon 0 のプロモーター領域が活性化することが考えられる。exon 0 はラットの ER $\alpha$ -mRNA の 5'非翻訳領域に存在することが分かっている(Kato et al., 1998)。ラットの脳において、Exon 0 を含むプロモーターはエストロゲン感受性をもっており、視索前野の性的二形核に重要な役割をもっている(Hamada et al., 2005, Hamada and Sakuma, 2010)。VMN において、exon 0 を含むプロモーターは通常状態では活性化していない(Hamada et al., 2005)。これらの報告と今回の結果を合わせて考えると、通常状態においては 0T,E1 のプロモーターが VMN の ER $\alpha$  発現維持に対して有意に活性化しており、片側破壊といった特別な状況下におかれた場合に 0 プロモーターが活性化されると推測できる。exon 0 プロモーターの活性化するメカニズムは全く分かっていない。DNA のメチル化といったエピジェネティクス制御に着目した exon 0 の活性化メカニズムを明確にすることが必要である。

## 第3章 視床下部腹内側核の求心性神経投射

### 3-1. 序

第2章により、vIVMNでは片側が破壊されると反対側のER $\alpha$ 発現が増加する現象が示された。これは、VMNの片側に損傷が生じてもエストロゲン感受性が補償されるメカニズムである可能性があり、雌の性行動であるロードーシスの発現機構には意味のあることである。この現象は破壊の情報が片側に伝わることでER $\alpha$ が増加する仕組みによるものであろうと考えられ、すなわち神経情報によりER $\alpha$ の発現が調節されていることを示唆するものである。VMNには多くの部位との神経連絡があることが神経解剖学的に示されているが(Conrad and Pfaff., 1976)、左右vIVMNが相互に直接の神経連絡の存在は照明されていない。片側破壊によるER $\alpha$ 発現増加は他の神経核を介した間接的なものの可能性もある。また、VMNは多くの部位から神経投射があると考えられるが、vIVMNを中心に解析したものはほとんどない。第3章では、vIVMNへ直接の神経入力をもつ神経核、特にロードーシスなどの生殖行動に関わる神経核への神経投射を解析するために、卵巣除去ラットの左側vIVMNに逆行性神経トレーサーであるFluoro Gold (FG)を注入して、蛍光顕微鏡により、反対側のvIVMN、終脳から中脳におけるロードーシス制御に関わる神経核のFG含有神経細胞を特定した。

### 3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. 動物

7週齢 Wistar 系雌ラット(230-290g)を購入し(高杉実験動物、埼玉)、一定周期の照明(明:暗=10:14, 消灯:19:00)と一定温度(22-24 °C)の環

境で飼育を行った。水および餌は自由摂取とした。本研究はすべて早稲田大学実験動物に関する指針（承認番号 No. 2011-A003, 2012-A004, 2013-A037）に従って行った。

購入から1週間後、エストロゲンの影響を除くためにイソフルラン麻酔下で全てのラットに卵巣除去を行った。その後、左側の vIVMN に逆行性神経トレーサーの FG を注入した。

### 3-2-2. 逆行性神経トレーサー注入

卵巣除去より1週間後、ガラスキャピラリー(先端 40~50 $\mu$ m)を用いて左側 vIVMN に電気泳動的に FG (8% in D.W., 80014, Biotium, Inc. Hayward, CA, USA) を注入した。イソフルラン麻酔下のラットを歯の位置を外耳道の下方 3.3mm に設定した脳定位固定装置に固定し、ブレインマップ(Paxinos and Watson, 2007) を参考にして vIVMN の位置(ブレグマより後方 2.5mm, 左方 0.8mm, 下方 9.8mm) に FG をつめたガラスキャピラリーを下ろし、電気泳動器(Midgard Precision Current Source, 室町機械) を用いて 2  $\mu$ A の交流電流を 8~14 分間流した。

FG 注入手術から6日後に灌流固定を行い、脳を摘出した。血液凝固阻害剤のノボ・ヘパリン(0.1ml/100g body weight, 持田製薬) を腹腔内に注射して15分以上経過した後、ペントバルビタールナトリウム(Somnopenyl, 6.48mg/100g body weight, 共立製薬) を腹腔内に注射し麻酔をかけた。この深麻酔下で開胸し、右心耳を切開した後、0.05MPBS を左心室より 100ml 注入した。連続して 4%PFA in 0.05M PBS を 100ml 注入し、灌流固定を行った。迅速に脳を摘出し、4%PFA in 0.05MPBS で浸漬固定(4 $^{\circ}$ C, 24 時間)した後、30%スクロース in 0.05M PBS に浸して保存した(4 $^{\circ}$ C, 4 日間)。

### 3-2-3. 蛍光画像解析

クリオスタット内で OCT コンパウンドを用いて脳をステージに固定し(-20°C,30 分)、厚さ 50 $\mu$ m の凍結切片を作成した。切片は MgCl<sub>2</sub>、スクロース、グリセロールを溶解した 0.1%NaN<sub>3</sub>/0.05M PBS に入れて保存した。この切片をゼラチンコートガラスに乗せ、エタノールを用いて脱水した後にキシレンで封入した。蛍光顕微鏡(OlympusBX 51)を用いて切片を観察し、FG 注入部位や FG 含有細胞の分布位置を同定し、ブレインマップ(Paxinos and Watson, 2007)に記載した。UV 励起光を当てることで白色の自家発光を誘起された細胞を FG 含有細胞とみなした。すみやかに蛍光顕微鏡に接続したデジタルカメラ (PDMCII/OL Olympus)によって画像を撮影し、画像はコンピューターに取り込んだのち、Photoshop CS(ver.8.0.1 Adobe Systems Inc.)によって処理、観察した。

## 3-3. 結果

### 3-3-1. FG 注入部位

FG を注入した 11 匹の全てで、ブレグマから後部に 1.89~3.36 mm のレベルにみられる右側 VMN に蛍光がみられ、注入場所はそれぞれのラットにおいて後部に 1.2mm の長さでみられた(図 1 1 B, 図 1 2 J-K)。ブレグマから後部 2.5mm のレベルで最も強い発光がみられた。すべてのラットで、vIVMN の大部分と cVMN の一部、VMN の殻部分と外側視床下部の一部分に FG が広がっていた。3 匹のラットで、dmVMN の一部分に FG がみられた。他の 3 匹では、vIVMN にのみ発光が観察され、ARCN は 2 匹を除いて FG がみられなかった。

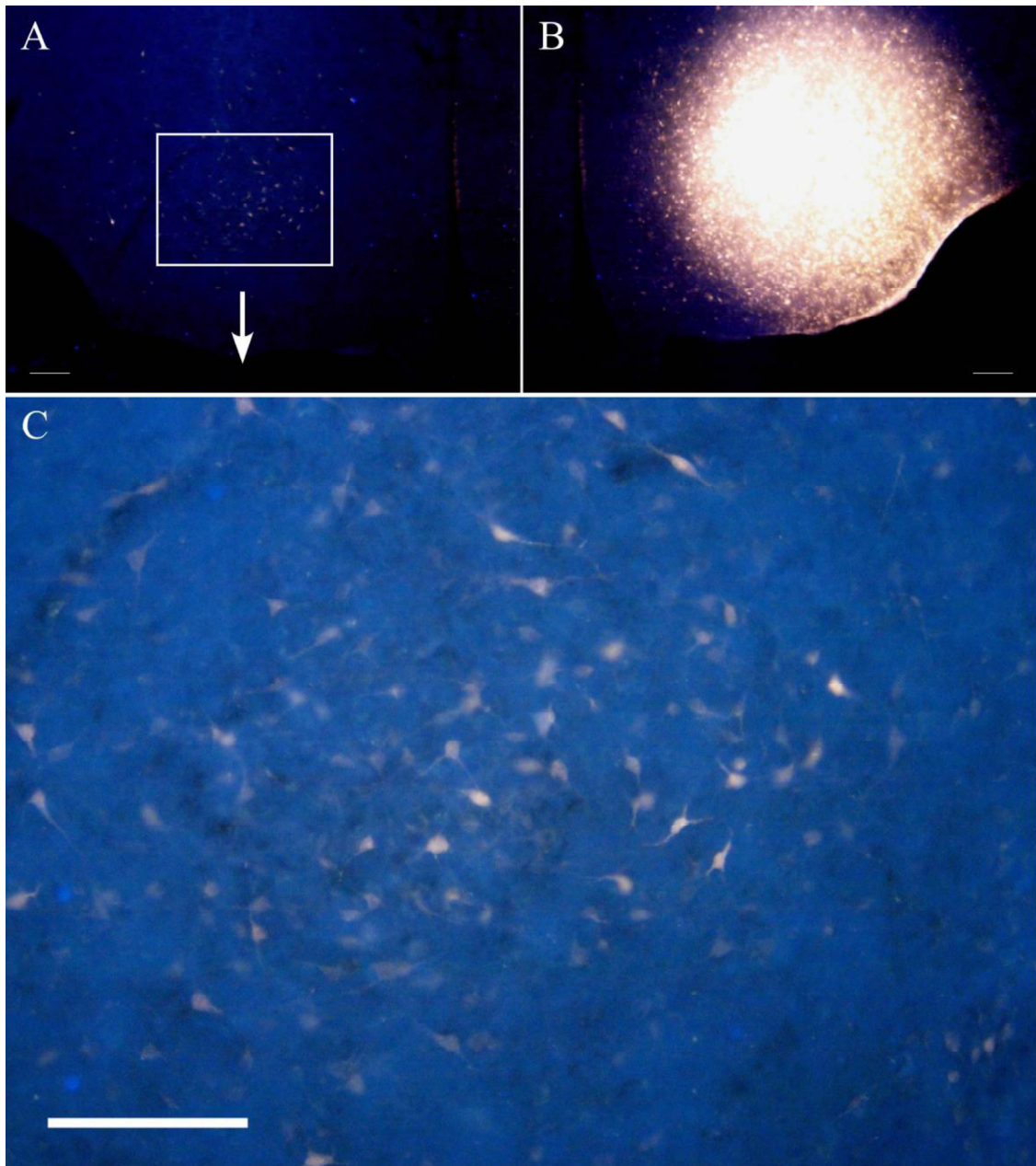


Figure 1. Representative photomicrograph of neural cells with fluorescence induced by UV excitation in the VMN in an ovariectomized rat that was injected with fluoro-gold (FG) into the ventrolateral (vl) VMN. (A) FG-labeled cells in the contralateral VMN (right side). (B) FG-injection site in the left vlVMN. (C) High-magnification view of the right side of the VMN in A. Bars indicate 200  $\mu\text{m}$ .

### 3-3-2. FG 標識細胞 (FG 細胞) 分布

FG 細胞は左側(注入側)の主な神経核、領域に観察された(表 2, 図 1 2, 1 3)。右側では少数の FG 細胞がみられた。

		FG	
		right	left
lateral septal nucleus (LS)	dorsal	-	-
	intermediate	+-	+
	ventral	-	+
medial septal nucleus (MS)		-	-
accumbens nucleus (ACCB)		-	+-
amygdaloid nucleus (AMG)	medial	+-	++
	lateral	-	+-
bed nucleus of the stria terminalis (BNST)		-	+
preoptic area nucleus (POA)		+	++
anteroventral periventricular nucleus (AVPV)		+	+
suprachiasmatic nucleus (SCN)		+-	+-
supraoptic nucleus (SON)		-	+-
anterior hypothalamic area (AH)		-	+
paraventricular hypothalamic nucleus (PVN)		-	+-
ventromedial hypothalamic nucleus (VMN)	dorsomedial	+-	+
	central	+	※
	ventrolateral	+	※
dorsomedial hypothalamic nucleus (DMN)		-	+
arcuate hypothalamic nucleus (ARCN)	anterior	-	+-
	posterior	+-	+
medial mammillary nucleus (MM)		-	+
lateral mammillary nucleus (LM)		-	+-
supramammillary nucleus (SM)		-	+-
medial habenular nucleus (MHB)		-	+-
lateral habenular nucleus (LHB)		-	+-
paraventricular thalamic nucleus (PV)		-	+-
interpeduncular nucleus (IP)		-	-
midbrain central gray (MCG)		+-	+
dorsal raphe nucleus (DR)	dorsal	+-	+-
	ventral	+-	+-
	lateral	+-	+
median raphe nucleus (MR)		+	+

表 2. Evaluation list of fluoro-gold (FG)-cells.

※: Injecting site of FG

Amounts: - none, +- a few, + many, ++ large

## 間脳視床下部

VMN: 多数のラットにおいて、FG 細胞は右側(注入側の反対側)の vIVMN、cVMN に多くみられたものの、dmVMN には少数しか見られなかった(図 1 1 A, 1 1 C, 1 2 I-K)。視床下部背内側核(DMN): すべてのラットの左側 DMN に多くの FG 細胞がみられたが、右側では全くみられなかった(図 1 2 J-K)。ARCN: 左側 ARCN において、特に尾部部分に多くの FG 細胞がみられた。吻側部分では 5 匹にのみ、少数の FG 細胞が観察された(図 1 1 A-B, 1 0 I-K)。右側 ARCN では、吻側にのみ少数の FG 細胞がみられた。AH: すべてのラットの左側領域に、多くの FG 細胞が散見されたが、右側では見られなかった(図 1 2 H-I)。室傍核(PVN)、視索上核(SON): 左側に少量の FG 細胞がみられたが、右側には全く見られなかった(図 1 2 G-I)。視交叉上核(SCN): すべてのラットで、両側に少数の FG 細胞がみられた(図 1 2 G, 1 3)。POA: 両側で多くの FG 細胞がみられ、特に左側で非常に多数観察された(図 1 2 E-G, 1 3)。AVPV: すべてのラットの両側 AVPV に多数の FG 細胞がみられた(図 1 2 E, 1 3)。内側乳頭体(MM)、外側乳頭体(LM)、乳頭上核(SM): 左側に少数の FG 細胞がみられたが、右側には全くみられなかった(図 1 2 L)。

## 視床

視床領域の脳室周囲核(PV): 左側の一部分に少数の FG 細胞がみられた(図 1 2 H-K)。手綱核(HB): 内側、外側 HB の両側に、FG は全くみられなかった(図 1 2 J-K)。

## 中脳

脚間核(IP): FG 細胞は両側に全くみられなかった(図 1 2 M-N)。MCG: 左側の吻側部分に少量の FG 細胞がみられた(図 1 2 L-P, 1 3)。DR: 左

側の外側領域に多くの FG 細胞がみられ、右側外側ではほとんどみられなかった(図 1 2 O-P, 1 3)。両側の背側、腹側 DR では全くみられないか、とても少数の FG 細胞がみられた。正中縫線核(MR): すべてのラットの両側 MR に、少数の FG 細胞が観察された(図 1 2 O-P)。

## 終脳

帯状回を含む大脳新皮質にはまったく FG 細胞がみられなかった。海馬においても両側にまったくみられなかった。外側中隔(LS): 左側 LS において、腹側領域とそれに隣接している中間部領域に多くの FG 細胞がみられた。右側 LS では、腹側部に少数の FG 細胞がみられた。背側 LS には左側にのみ少量の FG がみられた(図 1 2 A-F, 1 3)。内側中隔(MS): FG 細胞はまったくみられなかった。扁桃体内側部(MAMG): 非常に多くの FG 細胞が左側 MAMG にみられ、右側にも多くの FG 細胞が観察できた(図 1 2 F-M, 1 3)。扁桃体外側部(LAMG): 5 匹のラットの左側 LAMG に少数の FG 細胞が確認された(図 1 2 F-M, 1 3)。BNST: 左側 BNST の吻側、尾側核に非常に多くの FG 細胞がみられたが、外側核にはみられなかった(図 1 2 D-G, 1 3)。右側 BNST は、外側核を含むすべての領域に FG 細胞がまったくみられなかった。側坐核(ACCB): 左側の殻領域に少しの FG 細胞がみられ、右側にはまったくみられなかった(図 1 2 B-D)。



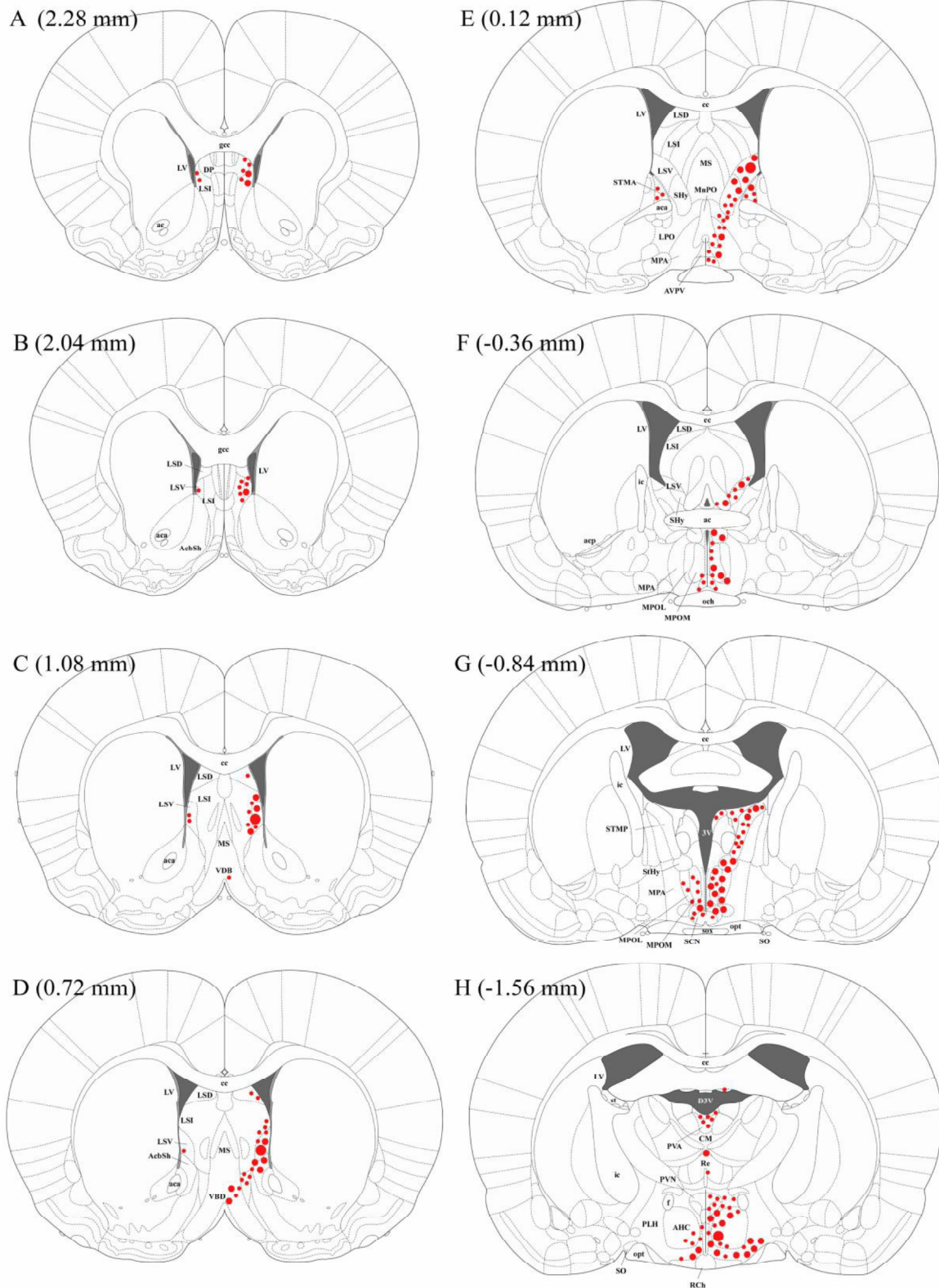
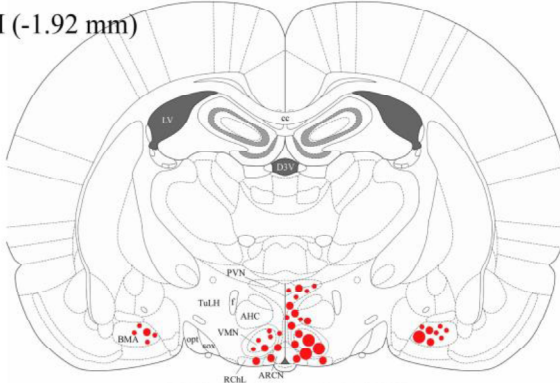
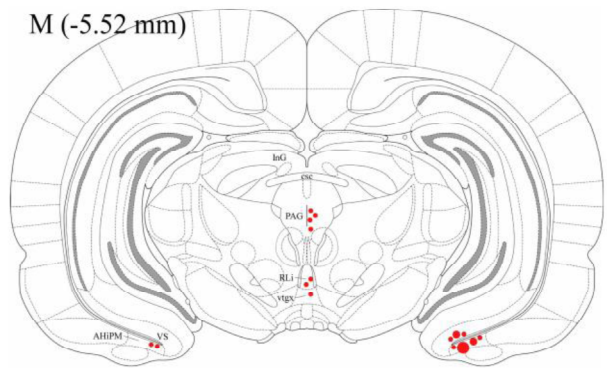


Figure 12. Distribution of fluoro-gold (FG)-labeled cells from rostral to caudal (A-P) of the rostral forebrain to the middle level of the midbrain in a female rat after direct injection of FG into the left vVMN. Pale red areas in the vVMN indicate the FG-injection site (see J-K). Drawings were modified from the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2007). Small dots indicate less than 5 FG-labeled cells; medium dots indicate 6–19 FG-labeled cells; large dots indicate more than 20 FG labeled cells. For further abbreviations, refer to Paxinos and Watson (2007)

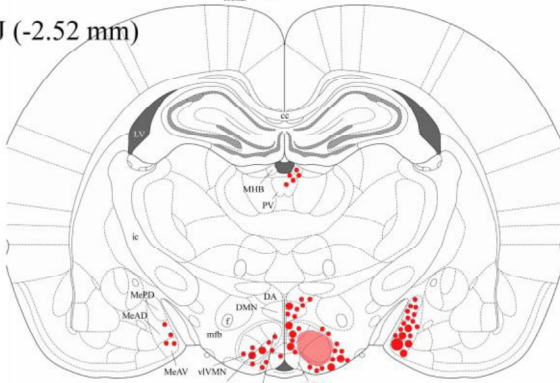
I (-1.92 mm)



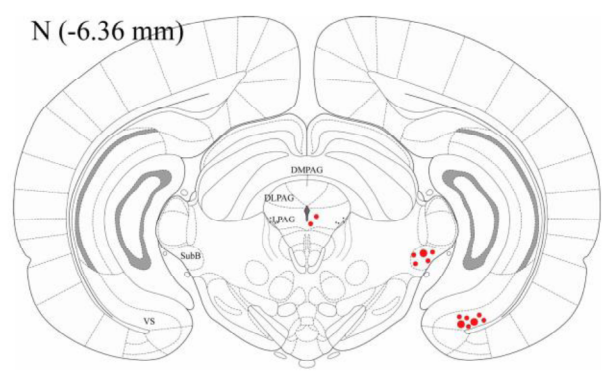
M (-5.52 mm)



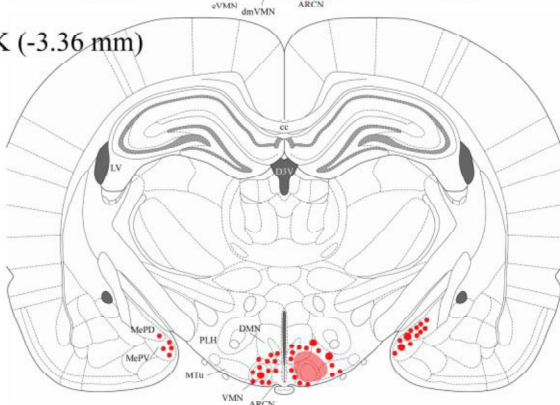
J (-2.52 mm)



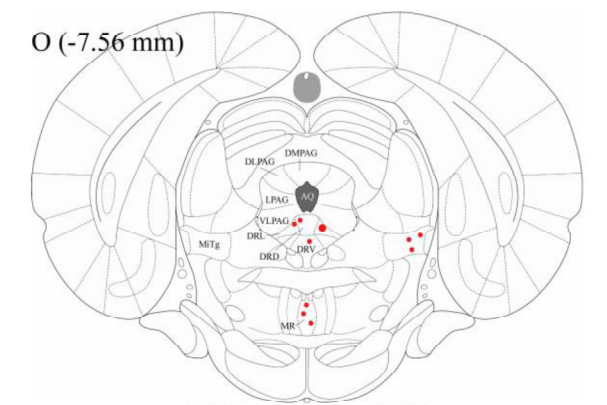
N (-6.36 mm)



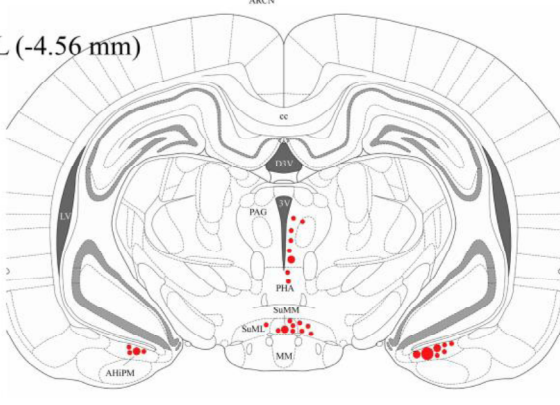
K (-3.36 mm)



O (-7.56 mm)



L (-4.56 mm)



P (-7.92 mm)

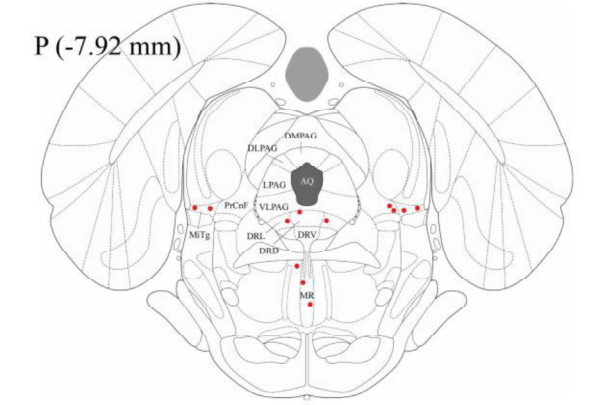


图 1 2 . Continued

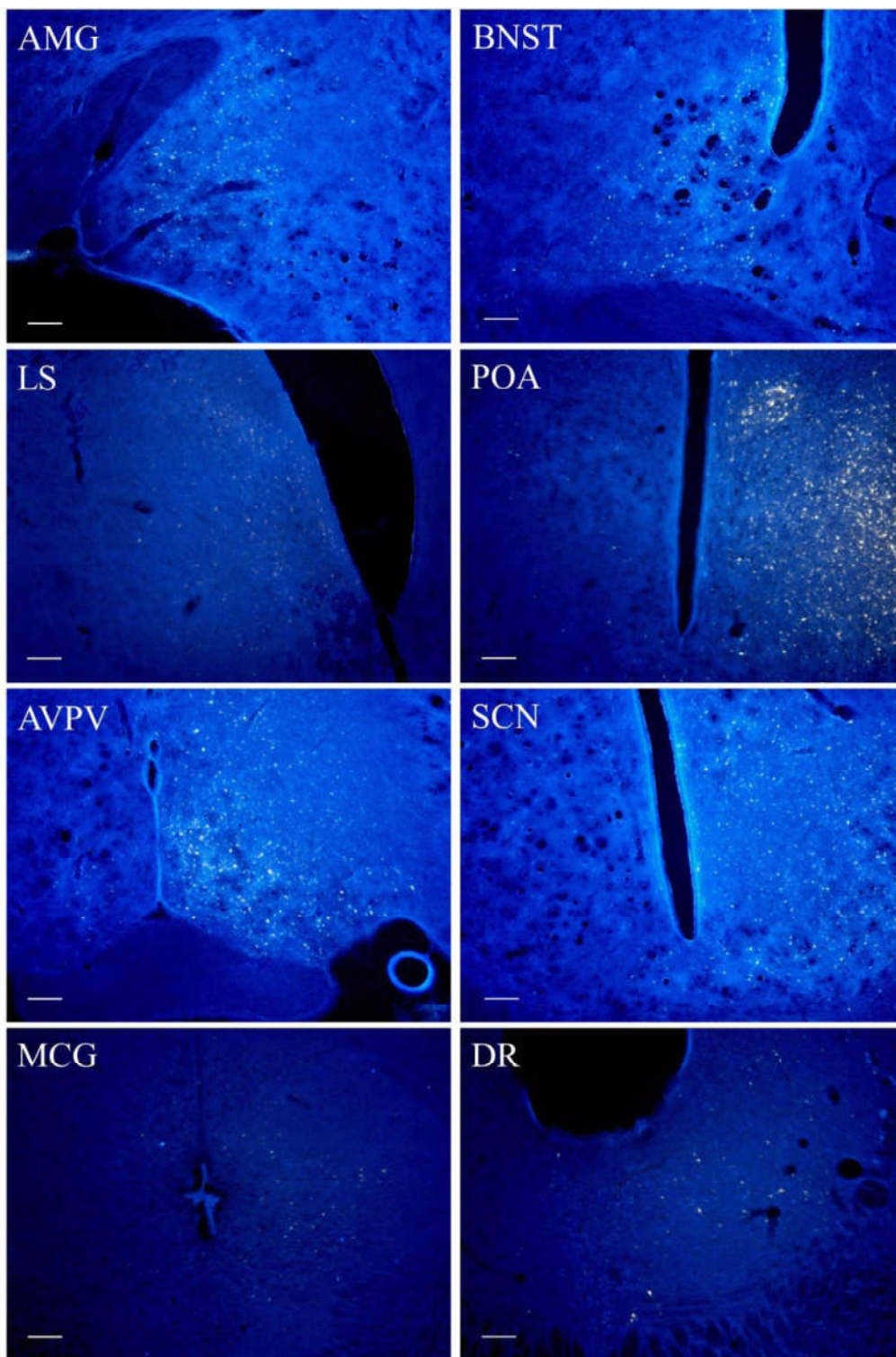


图 1 3 . Representative photomicrographs of coronal brain sections of the right side of nuclei important for lordosis regulation in a female rat injected with fluoro-gold (FG) into the vlVMN. Bars indicate 200  $\mu$ m. (Abbreviations 表 1 参照)

### 3-4. 考察

今回の実験による FG の解析によって、左側 vIVMN は右側 vIVMN から直接の神経投射を受けていることが明らかになった。さらに vIVMN は前脳、中脳の両側の神経核から神経投射を受けていたが、多くの神経核で同側性の神経投射入力が優位であった。

VMN からロードーシス促進情報を受けている MCG (Yamanouchi and Arai, 1979, Hennessey et al., 1990) は vIVMN に両側性の神経投射をおこなっており、同様にロードーシスを促進する MAMG (Masco and Carrer, 1980) から両側性の入力があった。どちらも同側性の入力が対側性入力よりかなり多かった。やはりロードーシス促進機能をもつ HB (Modianos et al., 1975) からは、同側性の入力のみみられた。HB からの神経入力を多く受け、ロードーシス行動制御関わっているとされる IP は、vIVMN へ全く神経投射をしていなかった。

一方、ロードーシスの抑制力をもつ部位である POA (Powers and Valenstein, 1972) から両側性の神経入力がみられ、同側性入力が優位であった。中隔はロードーシスの強い抑制力があるが、VMN に対して独立して働いていることが示されている (Yamanouchi, 1980)。解剖学的に、中隔は VMN へ神経投射していないと言われているが、本研究では ER $\alpha$  を多くもつ (Shughrue et al., 1997) 中隔腹側部に FG 陽性神経細胞がみられた。実際の FG 注入部分は VMN の殻部分にも広がっていたため、中隔腹側部からその領域に投射している可能性はある。VMN の殻部分には VMN 神経の樹状突起もあるため (Millhouse, 1973)、中隔腹側部は直接ではないものの、vIVMN の機能に影響を持つという可能性は否定できない。LMAG はロードーシスに抑制力をもつとされるが (Masco and Carrer, 1980)、vIVMN への投射は同側性のみの弱いもので

あった。VMN へのセロトニン神経がロドーシスに抑制的に働くとされる DR は(Yamanouchi and Arai, 1985, Kakeyama and Yamanouchi, 1992, 1993, 1996)両側性の神経を vIVMN に入力しており、特に同側の DR 外側部から強い反応がみられた。DR から VMN へのセロトニン神経投射は、DR 外側部から入力されているという報告がある(Kanno et al., 2008)。

## 第4章 視床下部腹内側核の遠心性神経投射

### 4-1. 序

VMN に逆行性神経トレーサーを注入した解析により、左右 VMN は直接の神経連絡をとっている事、ロードーシス行動に関わる多くの神経核から両側の神経投射を受けており、同側性の投射入力が優位である事が明らかになった。vlVMN の神経投射については詳しい解析がオートラディオグラフィや(Krieger et al., 1979) 順行性神経トレーサーにより(Canteras et al., 1994)行われているが、反対側への投射経路、ロードーシス行動に関わる神経核への投射についてはまだ明らかではない。第4章ではその点を明らかにするために、順行性神経トレーサーをvlVMN に注入し、vlVMN の神経投射先とその経路を解析した。

### 4-2. 材料と方法

#### 4-2-1. 動物

7週齢の Wistar 系雌ラット(230-290g)を購入し(高杉実験動物、埼玉)、一定周期の照明(明:暗=10:14, 消灯:19:00)と一定温度(22-24 °C)の環境で飼育を行った。水および餌は自由摂取とした。本研究はすべて早稲田大学実験動物に関する指針(承認番号 No. 2011-A003, 2012-A004, 2013-A037)に従った。

購入から1週間後、エストロゲンの影響を除くためにイソフルラン麻酔下で全てのラットに卵巣除去を行った。その後、左側の vlVMN に順行性神経トレーサーの PHA-L を注入した。

#### 4-2-2. 順行性神経トレーサー注入

卵巣除去手術より1週間後、ガラスキャピラリー(先端10~20 $\mu$ m)を用いて左側 vIVMN に電気泳動的に PHA-L (2.5% in PB., Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) を注入した。イソフルラン麻酔下のラットを歯の位置を外耳道の下方3.3mm に設定した脳定位固定装置に固定し、ブレインマップ(Paxinos and Watson, 2007) に基づいた vIVMN の位置(ブレグマより後方2.5mm, 左方0.8mm, 下方9.8mm) に PHA-L をつめたガラスキャピラリーを下ろし、電気泳動器(Midgard Precision Current Source, 室町機械) を用いて5 $\mu$ A の交流電流を18~20分間流した。PHA-L 注入手術から11日後に灌流固定を行い、脳を摘出した。血液凝固阻害剤のノボ・ヘパリン(0.1ml/100g body weight, 持田製薬) を腹腔内に注射して15分以上経過した後、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル, 6.48mg/100g body weight, 共立製薬) を腹腔内に注射し麻酔をかけた。この深麻酔下で開胸し、右心耳を切開した後、0.05M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を左心室より100ml 注入した。連続して4%パラホルムアルデヒド(PFA) in 0.05M PBS を100ml 注入し、灌流固定を行った。迅速に脳を摘出し、4%PFA (in 0.05MPBS) で浸漬固定(4 $^{\circ}$ C, 24時間)した後、30%スクロース (in 0.05M PBS) に浸して保存した(4 $^{\circ}$ C, 4日間)。クリオスタット内で、OCT コンパウンドを用いて脳標本をステージに固定し(-20 $^{\circ}$ C, 30分)、厚さ50 $\mu$ m の凍結切片を作成した。切片はMgCl<sub>2</sub>、スクロース、グリセロールを溶解した0.1%NaN<sub>3</sub>/0.05M PBS に入れて保存した

#### 4-2-3. PHA-L 免疫染色と解析

それぞれの個体の凍結切片を用いて PHA-L 免疫染色を行った。

0.1%NaN<sub>3</sub>/0.05M PBS で 3 回洗浄し、0.6%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in 0.05MPBS)で 1 5 分間インキュベートすることで、内在性ペルオキシターゼの不活性化を行った。続けて 0.1%NaN<sub>3</sub>/0.05M PBS で 3 回洗浄し、5%ヤギ正常血清 (Normal Goat Serum, NGS, Chemicon, CA, USA) が入った

0.1%Triton-X-100/0.05M PBS に 9 0 分間浸して非特異的結合のブロッキングを行った。その後、PHA-L 抗体(rabbit anti-PHA-L: 1:300, Vector Laboratories, Inc.) が入った 0.1%Triton-X-100/0.05M PBS に浸し 4 °C で 7 2 時間インキュベートした。インキュベート後、0.1M Tris-HCl buffer(TBS) で 3 回洗浄し、ポリマー試薬(Envision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit, Dako, Glostrup, Denmark) に 3 0 分浸して抗体と反応させた。0.05M TBS で 3 回洗浄し、Metal Enhanced DAB Substrate Kit (34065, Thermo Fisher Scientific, IL, USA) によって PHA-L 抗原部位を発色した。染色した切片はゼラチンコートガラスに載せて乾燥させたのち、上昇系エタノールで脱水しキシレンで透徹させ、マリノールを用いて封入した。染色した切片は電子顕微鏡で観察し、デジタル画像をコンピューターに取り込んだ。PHA-L 注入部位や PHA-L 発色した神経線維、神経細胞の分布位置を同定し、ブレインマップ (Paxinos and Watson, 2007)に記載した。



### 4-3. 結果

#### 4-3-1. PHA-L 注入部位

注入部位は線維が PHA-L に濃く染色され、多数の PHA-L 陽性細胞 (PHA-L 細胞)がみられた。6 匹中 4 匹において、PHA-L 注入領域は主にブレグマより後部に 2.04~3.24 mm の領域の左側 VMN に位置していた (Paxinos and Watson, 2007) (図 1 4 F)。2 匹のラットは PHA-L 標識領域が VMN の前部 (ブレグマより尾側に 1.54~2.64 mm) に位置していた。すべてのラットで、vIVMN の主な領域に PHA-L 細胞、線維の密集がみられ、ARCN には全くみられなかった。3 匹のラットにおいて、PHA-L 注入領域は vIVMN と外側視床下部の一部分に広がっていた。別の 3 匹では、vIVMN と cVMN、外側視床下部の一部分に PHA-L 細胞、線維がみられた。

#### 4-3-2. PHA-L 陽性神経線維 (PHA-L 線維)

PHA-L 線維は多くの場合、両側の神経核、領域にみられたが、右側に比べ左側 (注入側) に多くの数が観察できた (表 3, 図 1 5, 1 6)。いくつかの神経核では、左側にのみ PHA-L 線維がみられた。特に、第三脳室の周囲領域に多くの PHA-L 線維が密集していた (図 1 5 H-K)。

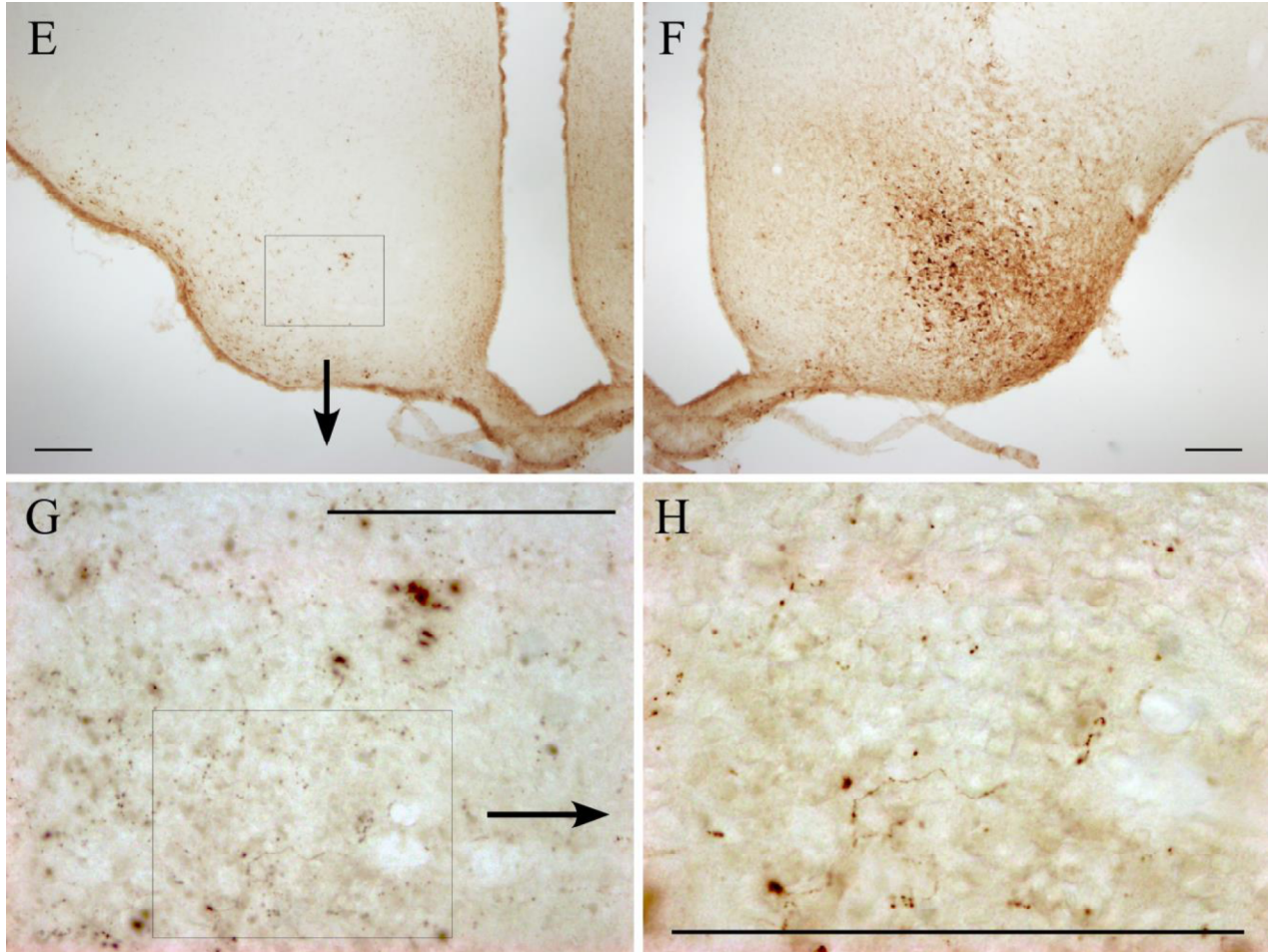


图 1 4 . Representative photomicrographs of the VMN of an ovariectomized rat injected with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) into the left side of the vlVMN. (E) PHA-L-labeled axons in the right VMN (contralateral to the injection). (F) PHA-L injection site in the left vlVMN. (G, H) High-magnification views of the right side of the VMN in E. Bars indicate 200  $\mu\text{m}$ .

		PHA-L	
		right	left
lateral septal nucleus (LS)	dorsal	-	-
	intermediate	+-	+
	ventral	+-	++
medial septal nucleus (MS)		-	-
accumbens nucleus (ACCB)		+-	++
amygdaloid nucleus (AMG)	medial	+-	++
	lateral	-	+-
bed nucleus of the stria terminalis (BNST)		+	++
preoptic area nucleus (POA)		+	++
anteroventral periventricular nucleus (AVPV)		+	++
suprachiasmatic nucleus (SCN)		+-	+-
supraoptic nucleus (SON)		-	+-
anterior hypothalamic area (AH)		+-	++
paraventricular hypothalamic nucleus (PVN)		+	++
ventromedial hypothalamic nucleus (VMN)	dorsomedial	+-	++
	central	+	※
	ventrolateral	+	※
dorsomedial hypothalamic nucleus (DMN)		+	++
arcuate hypothalamic nucleus (ARCN)	anterior	+	+
	posterior	+-	++
medial mammillary nucleus (MM)		-	+
lateral mammillary nucleus (LM)		+	+
supramammillary nucleus (SM)		+-	+
medial habenular nucleus (MHB)		-	+
lateral habenular nucleus (LHB)		-	+
paraventricular thalamic nucleus (PV)		+	++
interpeduncular nucleus (IP)		-	-
midbrain central gray (MCG)		+	++
dorsal raphe nucleus (DR)	dorsal	+-	+-
	ventral	-	-
	lateral	+-	+
median raphe nucleus (MR)		-	+-

表 3 . Evaluation list of phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) -fibers.

※: Injecting site of PHA-L

Amounts: - none, +- a few, + many, ++ large

## 間脳視床下部

VMN: 右側 VMN において、VMN のすべての領域で PHA-L 線維がみられたが、密度は左側よりも薄く、均一に分布していなかった。vIVMN は PHA-L 線維が他の領域に比べてより密に存在していた。右側第三脳室に沿う形で PHA-L 線維が観察された。注入部位範囲以外の左側 VMN においても、VMN のすべての領域で PHA-L 線維が密集していた(図 1 4 E-H, 1 5 I-K)。VMN に近接した領域、特に外側視床下部に多くの PHA-L 線維がみられた。右側と同様に、左側でも PHA-L 線維が第三脳室に沿って存在していた。

DMN: 左側 DMN において多くの PHA-L 線維がみられた(図 1 5 J-K)。ARCN: 左側にみられる PHA-L 線維は多く、右側では少なかった(図 1 4 E-F, 1 5 I-K)。両側ともに、正中隆起に PHA-L 線維がみられた。AH: 左側にて観察できたが、他の神経核のよりも少なかった(図 1 5 H-I)。PVN: 左側 PVN に PHA-L 線維がみられたが、右側では多くはなかった(図 1 5 H-I)。SCN、SON: 両側に少数の PHA-L 線維がみられた(図 1 5 G)。性的二形核(SDN)、視索前核(PON)を含む POA: 左側に多くの PHA-L 線維がみられた(図 1 5 D-G, 1 6)。AVPV: 左側に多くの PHA-L 線維が観察でき、右側では少数だった(図 1 5 E, 1 6)。MM: MM の内側部では左側に PHA-L 線維がみられ、右側にはみられなかった(図 1 5 L)。MM 外側部では、両側に少数の線維が観察できた。LM、SM: 両側の LM、SM にそれぞれ多くの PHA-L 線維がみられた(図 1 5 L)。

## 視床

PV: PV の吻側、尾側領域において、ある程度の数の PHA-L 線維が両側にみられた。しかし、右側にみられた数は左側よりも少なかった(図 1 5 H-K)。HB: 内側、外側 HB において、左側に少ない PHA-L 線維が

みられ、右側にはみられなかった。

### 中脳

IP: PHA-L 線維は左側にみられ、右側にはみられなかった(図 1 5 M-N)。MCG: 上丘から下丘にかけて、左側 MCG に非常に多くの PHA-L 線維がみられた(図 1 5 L-P, 1 6)。中脳水道に沿って、右側 MCG においても PHA-L 線維が存在していた。DR: 左側の背側、外側 DR に PHA-L 線維が発現していた(図 1 5 O-P, 1 6)。対照的に、腹側 DR には両側ともにみられなかった。MR: 左側に少量の線維がみられたが、右側には全くみられなかった。(図 1 6 O-P)

### 終脳

帯状回を含む大脳新皮質は、PHA-L 線維は両側ともに全くみられなかった。両側の海馬においても全くなかった。LS:両側 LS の背側部では、PHA-L 線維はまったくみられなかった(図 1 5 A-F, 1 6)。左側 LS の中間部に多くの線維があり、LS 腹側部にも非常に多くの線維がみられた。右側 LS の中間部、腹側部では少量の線維がみられた。MS:PHA-L の線維は全くみられなかった。MAMG:左側 MAMG に非常に多くの線維がみられ、右側では少量であった(図 1 5 F-M, 1 6)。LAMG:左側に少量の PHA-L 線維がみられたが、右側には全くみられなかった(図 1 5 F-M, 1 6)。

BNST:吻側、尾側、外側の左側 BNST の全ての領域に非常に多くの PHA-L 線維がみられ(図 1 5 D-G, 図 1 6)、右側においても多くの線維が観察できた。ACCB:左側 ACCB に多くの PHA-L 線維がみられた(図 1 5 B-D)。右側では、ACCB の周辺部にのみ少数の線維がみられた。

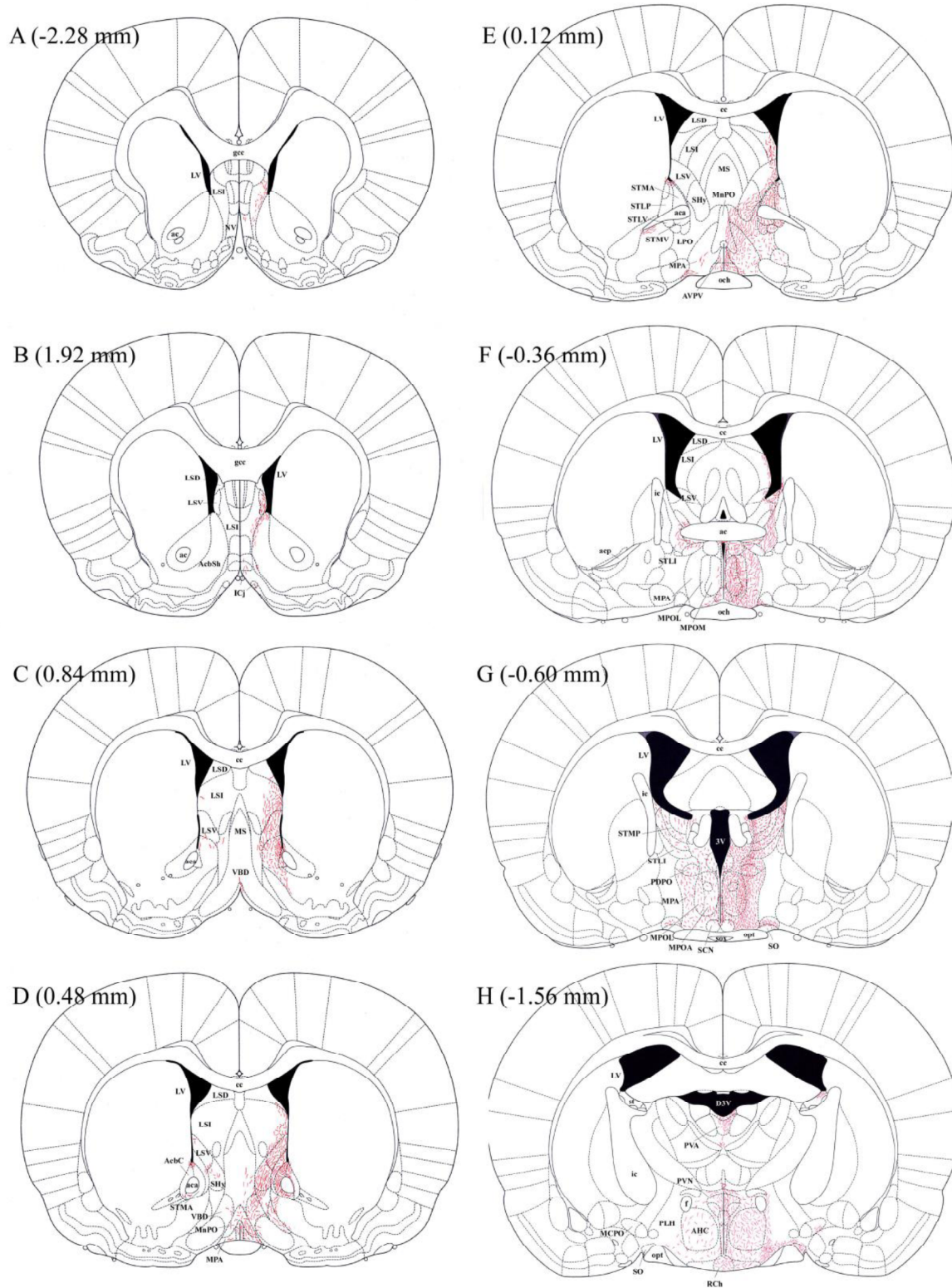
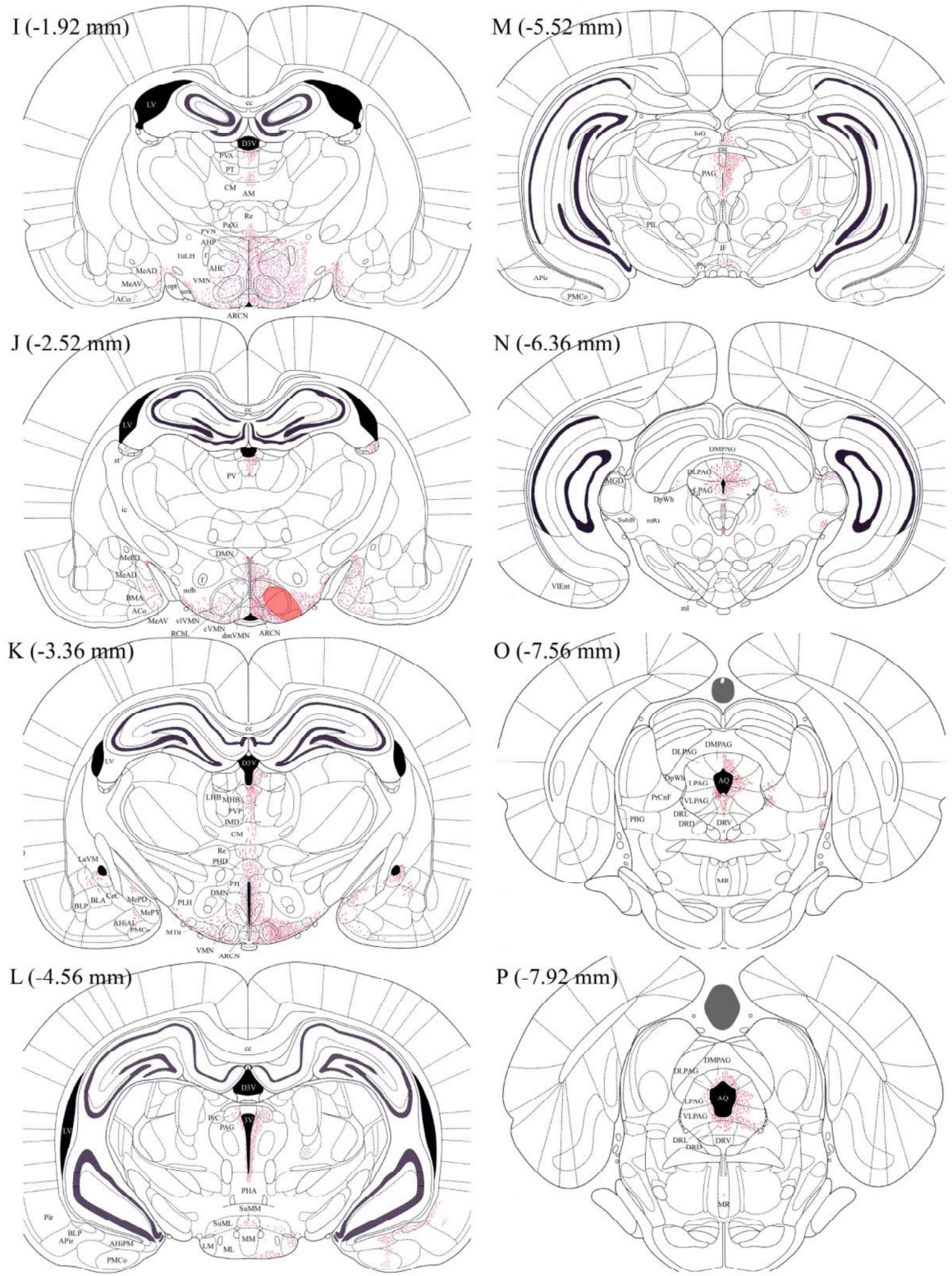


图 15. Distribution of phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L)-labeled fibers from rostral to caudal (A-P) in a female rat after direct injection of PHA-L in the left vlVMN. Pale red areas in J indicate the PHA-L-injection site. Drawings were modified from the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2007). For further abbreviations, refer to Paxinos and Watson (2007).



☒ 1 5 . Continued

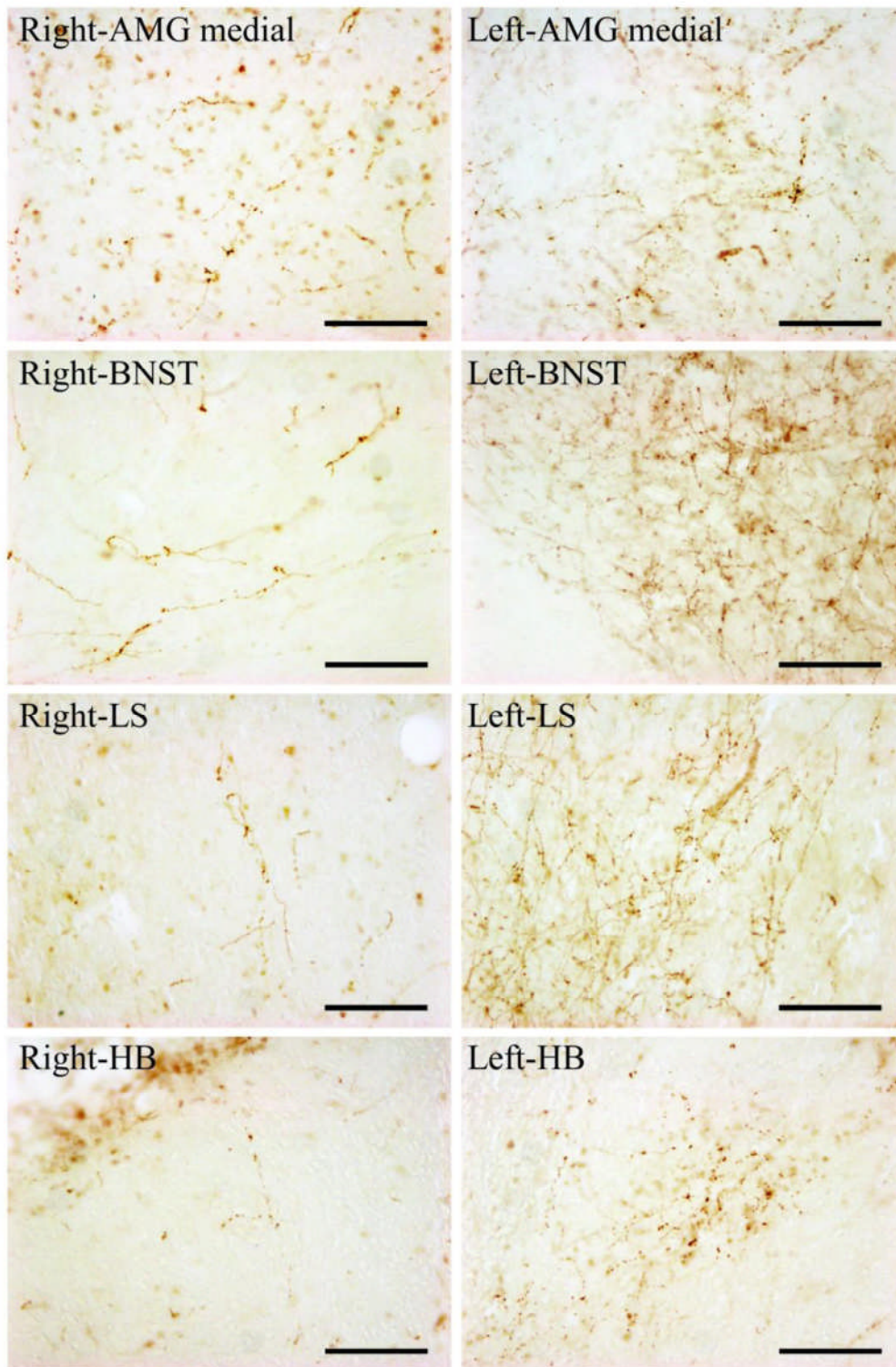


图 1 6 .Representative photomicrographs of coronal brain sections of the right and left side of nuclei important for lordosis regulation in a female rat injected with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) into the vVMN. Bars indicate 100 $\mu$ m. (Abbreviations 表 1 参照)



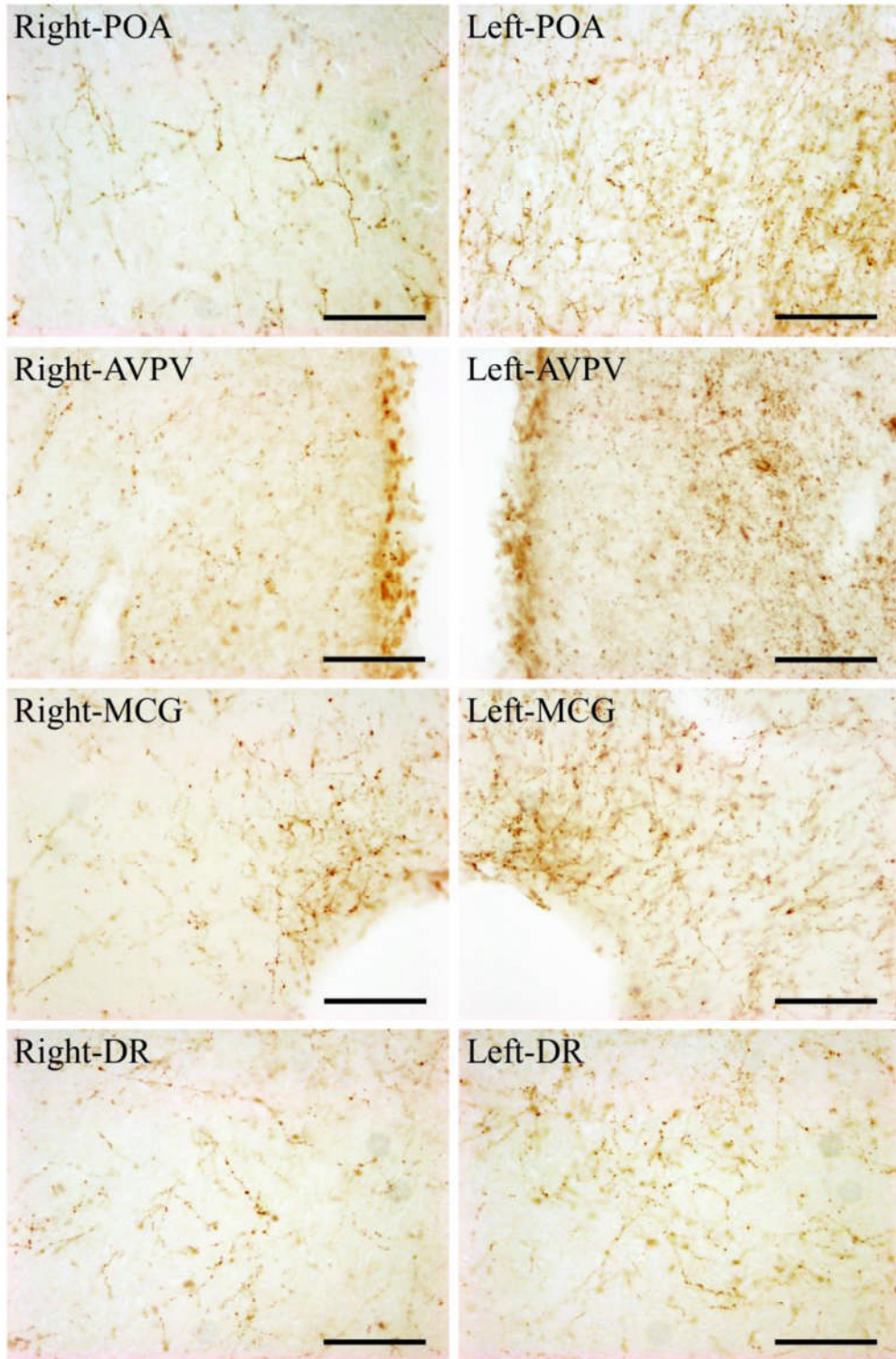


图 1 6 . Continued

#### 4-4. 考察

PHA-L 神経線維のトレースの結果、左側 vIVMN から前脳と中脳の多くの神経核の両側へ、神経投射をしていることが示された。また、同側性の投射が優位であることが示された。これは初期のオートラディオグラフィや順行性神経トレーサーの報告(Saper et al., 1976, Canteras et al., 1994)に一致する。

今回の結果では、左側 vIVMN が右側 VMN へ直接神経投射していることが明らかにされた。また、PHA-L 神経線維をおっていくと、左右 vIVMN の連絡路の一つに、第三脳室に沿って上行し、上部で左右を横断し、降りていくもの、正中隆起を通るものが顕著であった。これら2つの左右 vIVMN 交連線維は Canteras et al.(1994)によって報告されているものである。3つ目の経路として、VMN の前方への神経投射経路が考えられる。第三脳室前側近傍の右側、すなわち supraoptic commissure などにみられる PHA-L は少なかったが、その部位が左右 vIVMN を連絡する線維が通る可能性を否定することはできない。

vIVMN からロードーシス制御に関わる多くの神経核には同側優位の両側への神経投射が見られた。ロードーシスの統御機能をもつ(Sakuma, 2013)MCG へも、vIVMN から両側性の神経投射がみられ、特に同側性投射が多かった。この結果は解剖学的な報告と一致する(Canteras et al., 1994)。その他のロードーシスに促進的に働くMAMG(Masco and Carrer, 1980)には同側優位での両側性入力、やはり促進機能がある HB (Modianos et al., 1975)では MHB と LHB はともに vIVMN から同側性の神経投射のみがみられた。HB と神経連絡がある IP もロードーシス行動に関係しているとされているが(山内, 2006)、vIVMN からは全くの神経投射がみられなかった。

ロードーシスに抑制的に働く POA (Powers and Valenstein, 1972)や、LS 中間部にも vIVMN は両側性の神経投射をしていることが示された。どちらも同側が優位であった。LS に関してはロードーシスと関係しているという報告がない腹側部が、中間部より多い vIVMN からの投射を受けていた。ロードーシスを抑制している DR (Yamanouchi and Arai, 1985, Kakeyama and Yamanouchi, 1992, 1993, 1996) は左右同等の両側性神経投射を vIVMN から受けていた。視床の PV にも多くの投射が見られるが、機能は明らかではない。

## 第5章 結語

### vIVMN の ER $\alpha$ 発現に対する片側破壊の影響

2章では、卵巣除去雌ラットの片側 VMH を破壊すると、残存側の vIVMN の ER $\alpha$  免疫陽性細胞数と ER $\alpha$  mRNA が対照群より多かった。

この結果は片側の vIVMN は反対側の ER $\alpha$  発現を抑制していることを示す。すなわち、片側が障害されても vIVMN のエストロゲンに対する反応性が両側のある場合と同程度に維持される可能性を示すものである。

vIVMN にはロドーシス促進作用があり、エストロゲンが作用すると発情状態を生じさせる。従って、片側が損傷されても残った側の vIVMN の ER $\alpha$  が増加することで、発情状態が維持される仕組みがあると考えてよいだろう。卵巣除去をしていることから、今回みられた ER $\alpha$  発現の増加は体内のエストロゲンなどの液性の因子ではなく、左右相互の神経機構によるものと考えられる。つまり、左右の vIVMN がお互いの ER $\alpha$  発現を抑制していることになる。

## 左右 vIVMN の相互神経連絡

左右の vIVMN が ER $\alpha$  発現をお互いに抑制するためには、左右の神経連絡を解析する必要がある。3章、及び4章の逆行性、順行性神経トレーサーの左側 vIVMN への注入実験の結果、右側 vIVMN にそれぞれの神経トレーサーの陽性反応がみられたことから、左右の vIVMN に相互の直接の神経連絡がある事が明らかになった(図17)。さらに順行性トレーサーの解析により、左側 vIVMN から右側 vIVMN への神経投射経路として、左側脳室周囲を上行し、第三脳室上端を回り右側脳室周囲を下行していく経路、正中隆起部内を右に向かうものが示された。左右 vIVMN の ER $\alpha$  発現制御の神経情報は、これらのうちのいずれかの経路を通るものと考えられる。この点は神経線維の切断実験などによる更なる解析によって明らかにする必要がある。

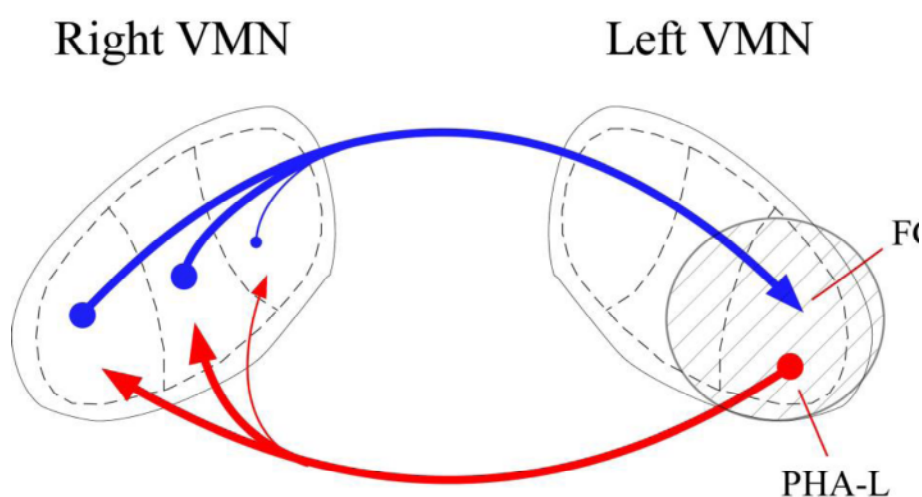


図17. Schematic illustrations showing left and right connections of the vIVMN from the present results of the FG injection (blue line) and PHA-L injection (red line).

## VMN と他の神経核との相互神経連絡

片側 vIVMN 破壊による反対側の vIVMN の ER $\alpha$  発現増加が、他の神経核を介した間接的な神経投射によって行われている可能性が否定できないため、VMN と他の神経核との解剖学的な神経連絡を 3 章と 4 章で解析した。

その結果、vIVMN が前脳と中脳の多くの神経核と神経連絡をもち、それらの神経核とは相互の連絡をしていることが示された。また、vIVMN から両側の神経核に神経投射をしているが、同側の神経連絡が主たるものであることも示された。従って、vIVMN は多くの場合同側の神経核を中心に、相互に影響を及ぼして機能していると考えられる。反対側の神経核とも相互連絡があることから、そちらとも多少の影響を及ぼしていると考えられる。

## VMN とロードーシス制御に関わる神経核との神経連絡 (図 1 8)

前述のように VMN は他の神経核との相互連絡をもっているが、例外的な連絡もみられた。それらを含め、ロードーシス制御に関わる神経核との神経連絡の詳細をまとめる。

ロードーシス発現に抑制的に働く LS では、腹側や腹側に近接する中間部の領域において、vIVMN と両側性の相互の神経連絡がみられた。求心性、遠心性ともに同側性に優位であり、特に同側性の腹側 LS に強い相互連絡が確認できた。腹側 LS には多く ER $\alpha$ -mRNA が発現していることが分かっており (Simerely et al., 1990)、中間部から MCG への神経投射がロードーシス制御に抑制的に働いていると考えられている (Tsukahara et al., 2014)。LS の腹側と中間部の LS について、機能的なつながりがあるかは解析されていない。

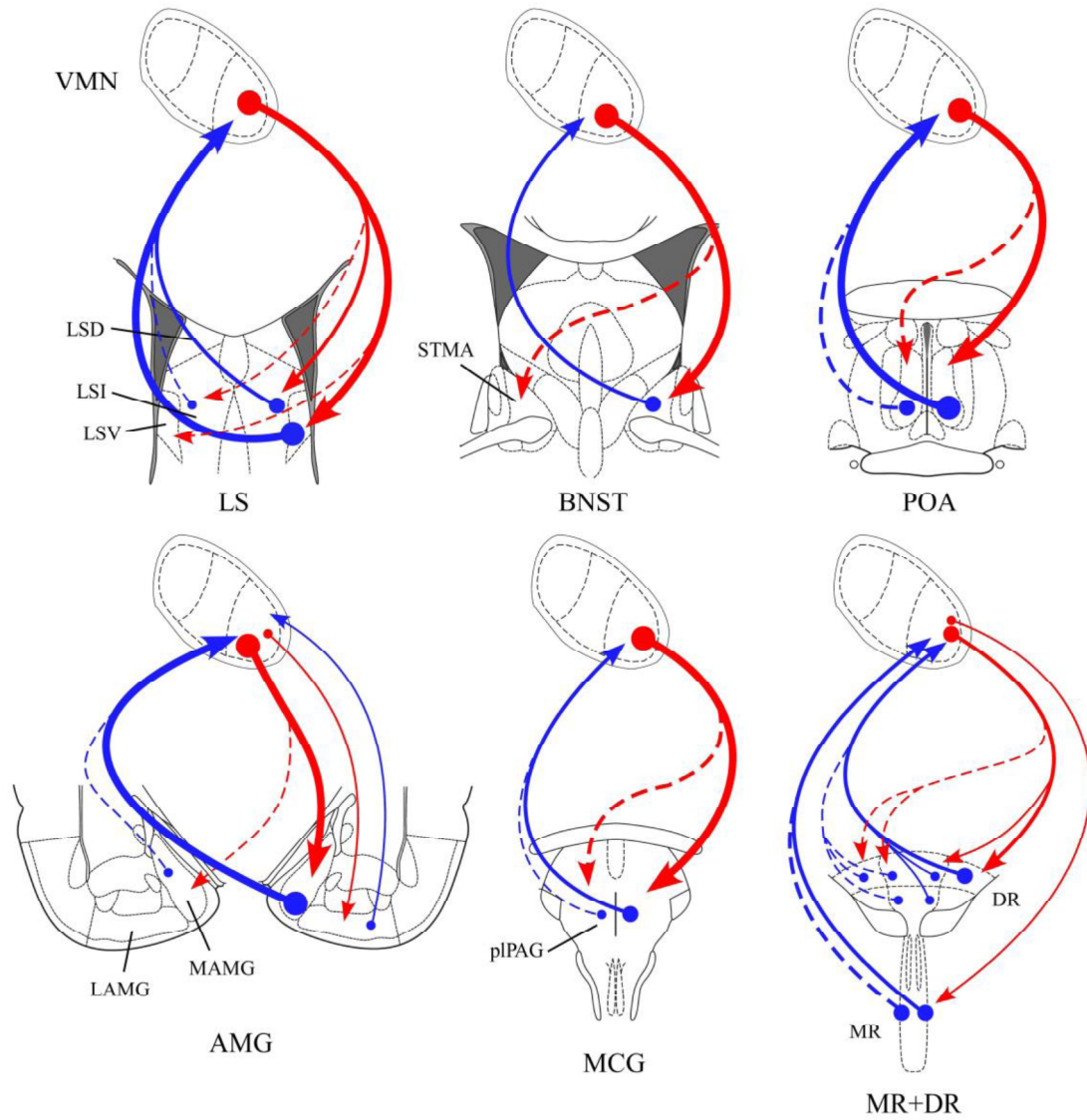


图 1 8 . Schematic illustrations showing reciprocal connections between the left VMN and both side of the LS、BNST、POA、AMG、MCG、DR and MR. Red and blue lines with arrow heads indicate afferent and efferent connections.

BNST は、ロードーシスに促進的に働く MAMG から神経入力を受け  
る神経核である。BNST のロードーシス制御における役割はまだ明らか  
になっていないものの、重要な経路であるとの報告もある (Takeo et  
al., 1993)。vIVMN からの連絡は両側 BNST の広い範囲にわたっていた  
が、BNST から vIVMN の投射は同側のみの吻側中間部を中心にみられ  
た。

POA は、vIVMN との間に多量の相互神経連絡が両側にみられた。同  
側が優位なものの、対側にもかなり多い相互連絡が示された。POA は  
ロードーシスの抑制制御機能をもっているが、排卵周期形成 (Wiegand  
et al., 1980) や勧誘行動抑制 (Sakuma, 1995) といった機能もあり、vIVMN  
とのロードーシス以外の機能的な関係も考えられる。

内側がロードーシスに促進的に、外側が抑制的に機能する AMG  
(Masco and Carrer, 1980) と vIVMN 間は、どちらも相互の神経連絡があ  
った。MAMG にのみ両側との神経連絡がみられたが、反対側の連絡は  
求心性、遠心性ともに少ないものであった。LAMG と同側に相互の少  
しの神経連絡があったが、反対側には全く神経連絡がなかった。vIVMN  
と AMG の連絡は、MAMG が主体となっている可能性がある。

MCG はロードーシス発現や VMN 機能調節に重要な統御機構である  
(Sakuma, 2013)。vIVMN と MCG 間には、両側性に相互の神経連絡がみ  
られた。vIVMN から MCG への入力は両側に多量の連絡が確認できた  
が、反対側 MCG から vIVMN への投射はかなり少ないものであった。  
モルモットでは、vIVMN の ER を含む神経細胞が MCG に神経投射を  
していることが報告されている (Turcotte and Blaustein, 1999)。今回の  
結果は、vIVMN から MCG へのロードーシス促進に関わる神経連絡の  
神経解剖学的な証拠になると考えられる。



DR の外側部と背側部において、vIVMN と相互に両側性の神経連絡がみられた(図 1 8)。左右 DR の全ての領域から vIVMN に神経入力があったが、特に同側の外側部に強い投射がみられた。ロードーシスに抑制力をもつ DR から VMN のセロトニン神経は、DR の外側部に多くみられたことが報告されており (Kanno et al., 2008)、今回みられた投射もセロトニンを伝達物質とする神経によるものの可能性がある。vIVMN から DR の投射は背側部と外側部にのみみられたが、投射量は左右同等のものであった。DR への対側性の入力がどのような意味をもつかは検討の必要がある。

DR の下方に位置する MR は、vIVMN と同側性に相互の連絡がみられた。特に MR から vIVMN への投射は両側性に多量の入力があった。それに比べると、vIVMN から MR への投射は同側性で少しのものであった。

HB はロードーシス行動に促進的に機能しており (Modianos et al., 1975)、ロードーシス制御に関係した神経核である IP (Modianos et al., 1975; Kawakami et al., 1979) に神経投射している (Herkenham and Nauta, 1979)。HB には同側性に相互の神経連絡がみられたが、IP と vIVMN 間には神経連絡が全くみられなかった。

ロードーシス制御に深く関連しないと考えられる神経核においても、vIVMN と相互の神経連絡をもつものが多くあった。ARCN においては、尾側領域に vIVMN との強い相互の両側性の連絡がみられ、多くは同側性であった。前後で投射の強さが違う事がどのような機能的意味をもつかは明らかではない。視床下部の吻側領域にある ACCB もまた vIVMN と相互の神経連絡があることが示された。DMN は同側性にのみ vIVMN に多くの神経投射をしていたが、vIVMN からの神経入力は

全くなかった。MM、LM、SUM では両側 vIVMN から多くの神経投射を受けていたが、vIVMN への投射は同側性のみが観察された。視床の PV は生殖機能制御にどのような機能をもっているか明らかでないが、vIVMN と同側性に相互の神経連絡がみられた。海馬や大脳新皮質と vIVMN の間には全く神経連絡が無かった。

本研究による、vIVMN と前脳、中脳神経核の間の求心性神経投射、遠心性神経投射の神経解剖学的証拠は、vIVMN と生殖機能を制御する神経核との神経連絡による機能制御の解析のための基礎になると考えられる。

## 謝辞

本研究は、すべて早稲田大学人間科学部神経内分泌教室で行われました。学部 3 年の演習加入以来、研究活動のみならず、物事の考え方など様々な事をご指導していただき、また大変ご迷惑をおかけしてしまつた山内兄人先生に心より感謝いたします。ありがとうございました。

国立環境研究所の前川文彦先生には第 2 章の研究で、様々なご指導をしていただいたことを大変感謝いたします。第 3 章、第 4 章の研究で、東京医療学院大学の佐久間康夫先生に多大なご助言をいただいたことに、深く御礼申し上げます。副査として本論文に助言してくださった今泉和彦先生、永島計先生に謹んで御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、諸先生方、神経内分泌研究室の方々に何度も助けていただきました。多くの貴重なご助言をいただけたこと、皆様に深く感謝いたします。

## 参考文献

Apostolakis, E. M., Lanz, R., O'Malley, B.W. 2004. Pituitary adenylatecyclase-activating peptide: a pivotal modulator of steroid-induced reproductive behaviour in female rodents. *Mol Endocrinol.* 18, 173-83.

Barfield, R.J., Chen, J.J., 1977. Activation of estrous behavior in ovariectomized rats by intracerebral implants of estradiol benzoate. *Endocrinology* 101, 1716–1725.

Beitz, A.J., 1982. The organization of afferent projection to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 7, 133–159.

Bleier, R., Byne, W., 1985. Septum and hypothalamus. In: Paxinos, G. (Ed), *The rat nervous system, vol. 1, forebrain and midbrain.* Academic press Australia, pp 87–118.

Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W., 1994. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: A phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 348, 41–79.

Christensen, L.W., Nance, D.M., Gorski, R.A. 1977. Effects of hypothalamic and preoptic lesions on reproductive behaviour in male rats. *Brain Res. Bull.* 2, 137-141.

Conrad, L.C.A., Pfaff, D.W. 1976. Efferents from Medial Basal Forebrain and Hypothalamus in the Rat. *J. Comp. Neurol.* 169, 185-246.

Edwards, D.A., Pfeifle, J.K. 1981. Hypothalamic and midbrain control of sexual receptivity in the female rat. *Physiol. Behav.* 26, 1061-1067.

Estacio, M.A., Yamada, S., Tsukamura, H., Hirunagi, K., Maeda, K. 1996. Effect of fasting and immobilization stress on oestrogen receptor immunoreactivity in the brain in ovariectomised female rats. *Brain Res.* 717, 55-61.

Frankfurt, M., Gould, E., Woolley, C.S., McEwen, B.S. 1990. Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: A Golgi study in the adult rat. *Neuroendocrinology.* 51, 530-535.

Hamada, T., Wada-Kiyama, Y., Sakuma, Y. 2005. Visualizing forebrain-specific usage of an oestrogen receptor alpha promoter for receptor downregulation in the rat. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 139, 42–51.

Hamada, T., Sakuma, Y. 2010. Estrogen receptor gene promoter 0/B usage in the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Endocrinology.* 151, 1923-1928.

Hardy, D.F. 1972. Sexual behavior in continuously cycling rats. *Behaviour* 41, 289-297.

Hayashi, S., Yokosuka, M., Orisaka, C. 1997. Developmental aspects of estrogen receptor in the rat brain. In *Neural Control of Reproduction-Physiology and Behavior* eds by Maeda, K-I. Tsukamura, H., Yokoyama, A., Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, 135-152.

Helena, C.V., Oliveira, Poletini, M.de., Sanvitto, G.L., Hayashi, S., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A., 2006. Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle, *J Endocrinol.* 188: 155-65.

Hennessey, A.C., Camak, L., Gordon, F., Edwards, D.A., 1990. Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. *Behav. Neurosci.* 104, 477-488

Herkenham, M., Nauta, W.J., 1979. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 19-47.

Ishii H, Kobayashi M, Sakuma Y., 2010. Alternative promoter usage and alternative splicing of the rat estrogen receptor  $\alpha$  gene generate numerous mRNA variants with distinct 5'-ends. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 118, 59–69.

Takeyama, M., Yamanouchi, K. 1992. Lordosis in male rats : The facilitatory effect of mesencephalic dorsal raphe nucleus lesion. *Physiol. Behav.* 51, 181-184.

Takeyama, M., Yamanouchi, K. 1993. Female sexual behaviors in male rats with dorsal raphe nucleus lesions: treatment with pchlorophenylalanine. *Brain Res. Bull.* 30, 705-709.

Takeyama, M., Yamanouchi, K., 1996. Inhibitory effect of baclofen on lordosis in female and male rats with dorsal raphe nucleus lesion or septal cut. *Neuroendocrinology* 63, 290–296.

Kanno, K., Shima, S., Ishida, Y., Yamanouchi, K., 2008. Ipsilateral and contralateral serotonergic projections from dorsal and median raphe nuclei to the forebrain in rats: immunofluorescence quantitative analysis. *Neurosci. Res.* 61, 207–218.

Kato, J., Hirata, S., Koh, T., Yamada-Mouri, N., Hoshi, K., Okinaga, S. 1998. The multiple untranslated first exons and promoters system of the oestrogen receptor gene in the brain and peripheral tissues of the rat and monkey and the developing rat cerebral cortex. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 281–293.

Kawakami, M., Akema, T., Ando, A., 1979. Electrophysiological studies on the neural networks among estrogen and progesterone effective brain areas on lordosis behavior of the rat. *Brain Res.* 169, 287-301.

Kondo, Y., Shinoda, A., Yamanouchi, K., Arai, Y., 1990. Role of septum and preoptic area in regulating masculine and feminine sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 24, 421–434.

Kow, L.-M., Pfaff, D.W. 1976. Sensory requirements for the lordosis reflex in female rats. *Brain Res.* 101, 47-66.

Krieger, M.S., Morrell, J.I. Pfaff, D.W., 1976. Autoradiographic localization of estradiol-concentrating cells in the female hamster brain. *Neuroendocrinology.* 22, 193-205.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 5925-5930.

Lammers, J.H.C.M., Kruk, M.R., Meelis, W., Van del Poel, A.M. 1988. Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. *Brain Res.* 449, 311-327.

Lannigan, D.A. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 2003; 68: 1-9

Lauber, A.H., Mobbs, C.V., Muramatsu, M., Pfaff, D.W. 1991. Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose, *Endocrinology.* 129, 3180–3186.

Luine, V.N., Frankfurt, M., Rainbow, T.C., Biegon, A., Azmitia, E., 1983. Intrahypothalamic 5, 7-dihydroxytryptamine facilitates feminine sexual behavior and decreases [3H] imipramine binding and 5-HT uptake. *Brain Res.* 264, 344–348.

Maekawa, F., Fujiwara, K., Tsukahara, S., Yada, T. 2006. Pituitary adenylatecyclase-activating polypeptide neurons of the ventromedial hypothalamus project to the midbrain central grey. *Neuroreport.* 17, 221-4.

Maekawa, F., Shimba, S., Takumi, S., Sano, T., Suzuki, T., Bao, J., Ohwada, M., Ehara, T. Ogawa, Y., Nohara, K. 2012. Diurnal expression of Dnmt3b mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork. *Epigenetics.* 7, 1046-1056.

- Malsbury, C.W., Marques, D.M., Daood, J.T. Sagittal knife cuts in the far-lateral hypothalamus reduce sexual receptivity in female hamsters. *Brain Res. Bull.* 1979; 4: 833-842.
- Masco, D.H., Carrer, H.F., 1980. Sexual receptivity in female rats after lesion or stimulation in different amygdaloid nuclei. *Physiol. Behav.* 24, 1073–1080.
- Matsumoto, T., Yamanouchi, K. Acceleration of mounting behaviors in female rats by ibotenic acid lesions in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Neurosci. Lett.* 291, 143-146.
- Meisel, R.L., Luttrell, V.R. 1990. Estradiol increases the dendritic length of ventromedial hypothalamic neurons in female Syrian hamsters. *Brain Res. Bull.* 25, 165-168.
- Millhouse O.E., 1973. Certain ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res.* 55, 89–105.
- Modianos, D.T., Hitt, J.C., Popolow, H.B., 1975. Habenular lesions and feminine sexual behavior of ovariectomized rats: diminished responsiveness to the synergistic effects of estrogen and progesterone. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89,231–237.
- Monje, L., Varayoud, J., Luque, E.H., Ramos, J.G. 2007. Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of oestrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J. Endocrinol.* 194, 201-212.
- Moreines, J.K., Powers, J.B. 1977. Effects of acute ovariectomy on the lordosis response of female rats. *Physiol. Behav.* 19(2), 277-283.
- Morrell, J.I., Pfaff, D.W. 1982. Characterization of oestrogen-concentrating hypothalamic neurons by their axonal projections. *Science.* 217, 1273-1276.



Nance, D.M., Shryne, J., Gorski, R.A., 1974. Septal lesions: Effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release. *Horm. Behav.* 5, 73–81.

Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W. 1998. Roles of estrogen receptor alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology.* 139, 5070-5081.

Okada, R., Watanabe, H., Yamanouchi, K., Arai, Y. 1980. Recovery of sexual receptivity in female rats with lesions of the ventromedial hypothalamus. *Exp. Neurol.* 68, 595-600.

Ostrowski, N.L., Scouten, C.W. 1981. Reduced lordosis response following unilateral hypothalamic knife cuts. *Physiol. Behav.* 27, 323-329.

Paxinos G, Watson C. (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. Academic Press, New York

Pfaff, D.W., 1980. *Estrogens and Brain Function: Neural Analysis of a Hormone-controlled Mammalian Reproductive Behavior*. New York, Springer-Verlag.

Pfaff, D.W., Sakuma, Y., 1979a. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol. (Lond.)* 288, 203-310.

Pfaff, D.W., Sakuma, Y. 1979b. Facilitation lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol. (Lond.)* 288, 189-202.

Pfaff, D.W., Sakuma, Y., Kow, L-M., Lee, A.W.L., Easton, A. 2006. Hormonal, neural, and genomic mechanisms for female reproductive behaviors, motivation, and arousal. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition, Vol. 34*. New York: Elsevier, 1825-1919.

Pfeifle, J.K., Shivers, M., Edwards, D.A. 1980. Parasagittal hypothalamic knife cuts and sexual receptivity in the female rat. *Physiol. Behav.* 21, 145-150.

Rajendren, G., Dudley, C.A., Moss, R.L., 1991. Role of ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats. *Physiol. Behav.* 50, 705–710.

Powers, J. B., Valenstein, E.S., 1972. Sexual receptivity: Facilitation by medial preoptic lesions in female rats. *Science.* 175, 1003–1005.

Reid, G., Hübner, M.R., Métivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., Gannon, F. 2003. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of oestrogen signaling. *Mol. Cell.* 11, 695-707.

Roy, E.J., Lynn, D.M. 1987. Asymmetry in Responsiveness of the Hypothalamus of the Female Rat to Estradiol. *Physiol. Behav.* 40, 267-269.

Sa, S.I., Pereira, P.A., Paula-Barbosa, M.M., Madeira, M.D. 2010. Role of neural afferents as mediators of oestrogen effects on the hypothalamic ventromedial nucleus. *Brain Res.* 1366, 60-70.

Sakuma, Y. 1995. Differential control of proceptive and receptive components of female rat sexual behavior by the preoptic area. *Jpn. J. Physiol.* 45:211-228.

Sakuma, Y., 2013. Mechanisms of behaviors related to reproduction. In: Pfaff, D.W. (Ed), *Neuroscience in the 21th Century*, LLC: Springer Science+Business, 1783-1794.

Sakuma, Y., Pfaff, D.W., 1979a. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am. J. Physiol.* 237, R278–R284.

Sakuma, Y., Pfaff, D.W., 1979b. Mesencephalic mechanisms for integration of female reproductive behavior in the rats. *Am. J. Physiol.* 237, R285–R290.

Saper, C.B., Swanson, L.H., Cowan, V.M., 1976. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169, 409–442.

Satou, M., Yamanouchi, K. 1999. Effect of direct application of estrogen aimed at lateral septum or dorsal raphe nucleus on lordosis behavior: regional and sexual differences in rats. *Neuroendocrinology.* 69, 446-452.

Shughrue, P.J., Bushnell, C.D., Dorsa, D.M. 1992. Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology.* 131, 381-388.

Shughrue, P.J., Lane, M.V., Merchenthaler, I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp. Neurol.* 388, 507-525.

Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L.W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294, 76–95.

Simerly, R.B., Young, B.J. 1991. Regulating of oestrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 5, 424-432.

Simerly, R.B. Anatomical Substrates of hypothalamic integration. 1994. In: Paxinos G, ed. *The rat nervous system.* second edition. Academic Press, 353-376.

Stumpf, W.E., Grant, L.D. (1974) *Anatomical Neuroendocrinology*, Karger, Basel.

Takeo, T., Chiba, Y., Sakuma, Y., 1993. Suppression of lordosis reflex of female rats by efferents of the medial preoptic area. *Physiol. Behav.* 53, 831–838.

Tsukahara, S., Yamanouchi, K., 2001. Neurohistological and behavioral evidence for lordosis inhibiting tract from lateral septum to periaqueductal gray in male rats. *J. Comp. Neurol.* 431, 293–610.

Tsukahara, S., Kanaya, M., Yamanouchi, K. 2014 Neuroanatomy and sex difference of lordosis-inhibiting system in the lateral septum. *Front. Neurosci.* 299, 1-8.

Tsukahara, S., Yamanouchi, K. 2002. Sex difference in septal neurons projecting axons to midbrain central gray in rats: a combined double retrograde tracing and ER-immunohistochemical study. *Endocrinology.* 143, 285-294.

Turcotte, J.C., Blaustein, J.D. 1999. Projection of the estrogen receptor-immunoreactive ventrolateral hypothalamus to other estrogen receptor-immunoreactive sites in female guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 69, 63-76.

Weihua, Z., Anderssona, S., Chenga, G., Simpsonb, E.R., Warnera, M., Gustafssona, J. 2003. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett.* 546, 17-24.

Westberry, J.M., Prewitt, A.K., Wilson, M.E. 2008. Epigenetic regulation of the oestrogen receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats. *Neuroscience.* 152, 982-989.

Wiegand, S.J., Terasawa, E., Bridson, W.E., Goy, R.W. 1980. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alternations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology.* 31, 147-157.

Wilson, M.E., Westberry, J.M., Prewitt, A.K. 2008. Dynamic regulation of estrogen receptor- $\alpha$  gene expression in the brain: a role for promoter methylation. *Front Neuroendocrinol.* 29, 375–385.

Yamada, S., Noguchi, D., Ito, H., Yamanouchi, K., 2009. Sex and regional differences in decrease of oestrogen receptor  $\alpha$ -immunoreactive cells by oestrogen in rat hypothalamus and midbrain. *Neurosci. Lett.* 463, 135–139.

Yamanouchi, K., 1980. Inhibitory and facilitatory neural mechanisms involved in the regulation of lordosis behavior in female rats: Effects of dual cuts in the preoptic area and hypothalamus. *Physiol. Behav.* 25, 721–725.

Yamanouchi, K., Arai, Y., 1977. Possible inhibitory role of the dorsal inputs to the preoptic area and hypothalamus in regulating female sexual behavior in the female rat. *Brain Res.* 127, 296-301.

Yamanouchi, K., Arai, Y., 1979. Effects of hypothalamic deafferentation on hormonal facilitation of lordosis in ovariectomized rats. *Endocrinol. Jpn.* 26, 307–312.

Yamanouchi, K., Arai, Y. 1983. Forebrain and lower brainstem participation in facilitatory and inhibitory regulation of the display of lordosis in female rats. *Physiol. Behav.* 28, 155-159.

Yamanouchi, K., Arai, Y. 1985. Presence of a neural mechanism for the expression of female sexual behaviors in the male rat brain. *Neuroendocrinology.* 40, 393-397.

山内 兄人, 2006. 4. 脳の機能の性分化. 山内 兄人, 新井 康允 編. 脳の性分化, 裳華房.

Yanase, M., Gorski, R.A., 1976. Sites of estrogen and progesterone facilitation of lordosis behavior in the spayed rat. *Biol Reprod.* 15, 536-543.

Zasorin, N.L., Blaustein, .J.D., De Vries, G.J. 1975. Suppression of lordosis in the hormone-primed female hamster by electrical stimulation of the septal area. *Physiol. Behav.* 14, 595-599.

## 研究業績

### 学位論文

1. 脳内エストロゲン受容体発現に対する神経機構 早稲田大学大学院人間科学研究科修士論文 2012年 3月

### 学術論文

1. Hiroyuki Ito, Tetsuji Moriizumi, Yuji Shimogawa, Korehito Yamanouchi. (2013) Postnatal changes in the number of serotonin-immunoreactive cells in midbrain raphe nuclei of male rats, *Anatomical Science International*. 89 (4): 199-206
2. Yuji Shimogawa, Fumihiko Maekawa, Korehito Yamanouchi. (2014) Unilateral lesion increases oestrogen receptor  $\alpha$  expression in the intact side of the ventromedial hypothalamic nucleus in ovariectomised rats, *Journal of Neuroendocrinology*. 26 (4): 258-266.
3. Hiroyuki Ito, Yuji Shimogawa, Daisuke Kohagura, Tetsuji Moriizumi, Korehito Yamanouchi. (2014) Inhibitory role of the serotonergic system on estrogen receptor  $\alpha$  expression in the female rat hypothalamus, *Neuroscience Letters*. (in press)
4. Yuji Shimogawa, Yasuo Sakuma, and Korehito Yamanouchi. (2014) Efferent and afferent connections of the ventromedial hypothalamic nucleus determined by neural tracer analysis: Implications for lordosis regulation in female rats, *Neuroscience research*. (in press)

### 学会発表

○は発表者

#### 《国際学会発表》

1. Hiroyuki Ito, Yuji Shimogawa<sup>○</sup>, Korehito Yamanouchi. (2010) Effects of serotonin-synthesis inhibitor, parachlorophenylalanine, on number of estrogen receptor  $\alpha$  immunoreactive cells in gonadectomized female and male rats, *The 7th International Congress of Neuroendocrinology*. Rouen, France, July. Supple. -P1-45.

2. Yuji Shimogawa<sup>○</sup>, Korehito Yamanouchi. (2011) Effects of unilateral lesion of ventromedial hypothalamus on density of estrogen receptor- $\alpha$  immunoreactive cells in intact side, 8th IBRO World Congress of Neuroscience. Florence, Italy, July. abstracts C128

《国内学会発表》

1. 下川雄二<sup>○</sup>, 山内 兄人 (2010) 視床下部腹内側左側破壊による右側エストロゲン $\alpha$ 受容体免疫陽性細胞数の変化, 日本動物学会 第81回大会, 東京. 予稿集 p.127.
2. 下川雄二<sup>○</sup>, 山内 兄人 (2011) 視床下部腹内側核の片側破壊による反対側のエストロゲン $\alpha$ 受容体免疫陽性細胞数の変化, 第34回日本神経科学学会大会, 横浜. Supple. P3-108.
3. 下川雄二<sup>○</sup>, 前川文彦, 山内 兄人 (2012) 視床下部腹内側核片側破壊による脳内エストロゲン $\alpha$ 受容体発現への影響, 日本動物学会 第83回大会, 大阪. 予稿集 p.115.
4. 下川雄二<sup>○</sup>, 前川文彦, 山内 兄人 (2012) 視床下部腹内側部片側破壊による反対側におけるエストロゲン受容体 $\alpha$ 免疫陽性細胞数の増加, 第39回日本神経内分泌学会学術集会, 福岡. 抄録集 p.683.
5. 下川雄二<sup>○</sup>, 山内 兄人 (2013) 左右視床下部腹内側核の神経連絡:逆行性及び順行性神経トレーサーによる解析, 日本動物学会 第84回大会, 岡山. 予稿集 p.142.
6. 伊藤広幸, 下川雄二<sup>○</sup>, 古波蔵 大祐, 山内 兄人 (2014) 雌ラット脳内エストロゲン受容体 $\alpha$ 発現に対するセロトニン神経系の役割, 日本動物学会 第85回大会, 宮城. 予稿集 p.112