

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19790181

研究課題名(和文) 幼弱期の脳で合成される脳ニューロステロイドは神経回路構築を調節する。

研究課題名(英文) Brain neurosteroids synthesized in the neonatal brain modulate the construction of neural circuits.

研究代表者

石井 寛高 (Ishii Hirotaka)

日本医科大学・大学院医学研究科・ポストドクター

研究者番号：20445810

研究成果の概要：性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）を分泌する神経細胞である GnRH ニューロンは、幼弱期神経細胞様の特徴を持った神経細胞である。本研究は、幼弱期神経細胞のモデルとして GnRH ニューロンを用い、脳ニューロステロイドであるアロプレグナノロンやエストロゲンの作用機構の解析を行った。さらに、脳ニューロステロイド合成の調節因子として知られるメラトニンの作用を解明するため、その受容体を同定し、受容体の発現調節機構・作用機構の解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：神経内分泌学・生殖生理学・生物物理学

## 1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンは、脳神経系の様々な生理現象に関与することが知られている。それら脳神経系に影響を及ぼすステロイドホルモンは、性腺・副腎といった末梢のステロイド合成器官で合成され、それらが脳に送られ作用すると考えられていた。しかし、近年、神経細胞がコレステロールからステロイドホルモンを合成していることが明らかになった。この脳で合成されるステロイドホルモンは、脳ニューロステロイドと呼ばれている。

研究代表者らは、記憶・学習の中枢である

脳の海馬で神経細胞がコレステロールから女性ホルモンであるエストロゲンを合成することを見出している。

## 2. 研究の目的

本研究は、アロプレグナノロンやエストロゲンといった脳ニューロステロイドの幼弱期脳神経系に対する神経回路網構築調節機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

神経回路網構築の調節には、神経細胞の電氣的活動が重要である。それゆえ、脳ニュー

ロステロイドによる神経細胞興奮の調節機構を解析した。この解析過程で GnRH ニューロンが GABA に対して興奮性を示し、幼弱期神経細胞様の特徴を持つことを発見した(Yin et al., *J.Neuroendocrinol.* (2008))。さらに、この細胞は、神経伝達に関わる各種イオンチャネルや受容体を発現している (Kato et al. *J.Neuroendocrinol.* (2009))。それゆえ、幼弱期神経細胞のモデルとして GnRH ニューロンを用いて解析を行った。

加藤らが樹立した GnRH-EGFP トランスジェニックラットを用い、急性スライスまたは、GnRH ニューロンの分散培養系を作成し、GnRH ニューロンに発現する各種イオンチャネルを Perforated patch-clamp 法といった電気生理学的手法、Multi-cell RT-PCR 法といった分子生物学的手法で解析した。そして、脳ニューロステロイドとして知られる、アロプレグナロンやエストロゲンによるそれらイオンチャネルの調節作用を解析した。

さらに、脳ニューロステロイド合成調節因子であるメラトニンの受容体を視床下部からクローニングし、放射性標識リガンドを用いた結合実験や分子生物学的発現解析により、メラトニン受容体の基本的な特性を同定した。さらに、GnRH ニューロンの株化細胞として知られる GT1-7 細胞を用いて、メラトニン受容体の発現調節機構を解析した。

#### 4 . 研究成果

GnRH ニューロンは GABA に対して興奮性を示し、幼弱期ニューロンの特徴を持つ (Yin et al., *J.Neuroendocrinol.* (2008))。GnRH ニューロンは、脳ニューロステロイドに対して感受性の高いタイプの GABA<sub>A</sub> 受容体を発現しており、アロプレグナロン及び THDOC (tetrahydroxydeoxycorticosterone) といった一連の脳ニューロステロイドは、細胞膜上に存在する GABA<sub>A</sub> 受容体に直接作用し、急性的に GABA<sub>A</sub> 受容体電流を増強した。

さらに、GnRH ニューロンのイオンチャネルの発現を解析したところ、ステロイド膜受容体として知られる BK チャネルが発現していることを見出した (Hiraizumi et al., *J.Physiol.Sci.* (2008))。GnRH ニューロンの株化細胞である GT1-7 細胞を用いて脳ニューロステロイドであるエストロゲンの作用を検討したところ、生理的濃度の 17β-estradiol が、エストロゲン受容体βを介して BK チャネルサブユニットの発現を増やすことで BK チャネル電流を増強していることが判明した (Nishimura et al. *Endocrinology* (2008))。

脳ニューロステロイド産生は、睡眠ホルモ

ンであるメラトニンによって調節されることが筒井グループの報告で明らかになっている。メラトニンは、MT1 及び MT2 という 2 種類の受容体を介して作用を発揮する。ラットではこれら受容体が同定されておらず、メラトニン作用の研究が滞っていた。それゆえ、ラットでこれら受容体を同定し、生化学解析・発現解析を行った (Ishii et al., *J.Physiol.Sci.* (2009))。GnRH ニューロンでは、MT1 受容体が発現しており、電気生理学的解析から GABA<sub>A</sub> 受容体電流を急性的に調節することが明らかとなった。さらに、細胞株 (GT1-7 細胞) を用いた解析では、MT1 受容体は GnRH の作用により発現が抑制されることが判明し (Ishii et al. *Neuroendocrinology (in press)*)、幼弱期でのメラトニン作用の重要性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1 . "Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in adult rat gonadotropin-releasing hormone neurons."

加藤昌克、田中伸幸、石井寛高、尹成珠、佐久間康夫

*J.Neuroendocrinol.* (2009) 21(4), 312-315

(査読有)

2 . "Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist, Cetrorelix, Induces the Expression of Melatonin Receptor 1a (MT1) in the GnRH Neuronal Cell Line GT1-7."

石井寛高、佐藤俊、尹成珠、佐久間康夫、加藤昌克

*Neuroendocrinology (in press)* (査読有)

3 . "Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors."

石井寛高、田中伸幸、小林桃子、加藤昌克、佐久間康夫

*J.Physiol.Sci.* (2009) 59(1), 37-47. (査読有)

4 . " Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory."

北条泰嗣、村上元、向井秀夫、肥後心平、畑中悠佑、荻上(池田)真理、石井寛高、木本哲也、川戸佳

*Mol Cell Endocrinol.* (2008) 290(1-2), 31-43.  
( 査読有 )

5 . "Local Production of Estrogen and its Rapid Modulatory Action on Synaptic Plasticity."

川戸佳、北条泰嗣、向井秀夫、村上元、荻上(池田)真理、石井寛高、木本哲也

*in Neuroactive Steroids in Brain Function, Behavior and Neuropsychiatric Disorders* (2008) 143-169 ( 査読有 )

6 . "Activation of A-type  $\gamma$ -amino butyric acid receptors (GABA<sub>A</sub>Rs) excites gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons isolated from adult rats."

尹成珠、石井寛高、田中伸幸、佐久間康夫、加藤昌克

*J.Neuroendocrinol.* (2008) 20(5), 566-575  
( 査読有 )

7 . "Rat GnRH neurons exhibit large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) currents and express BK channel mRNAs."

平泉良枝、西村一路、石井寛高、田中伸幸、竹下俊行、佐久間康夫、加藤昌克

*J.Physiol.Sci.* (2008) 58(1), 21-29 ( 査読有 )

8 . "17 $\beta$ -estradiol at physiological concentrations augments Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents via estrogen receptor  $\beta$  in the

GnRH neuronal cell line GT1-7."

西村一路、宇井-程久美子、西郷薫、石井寛高、佐久間康夫、加藤昌克

*Endocrinology* (2008) 149(2), 774-782.  
( 査読有 )

9 . "Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity."

石井寛高、釣木澤朋和、荻上(池田)真理、浅島誠、向井秀夫、村上元、北条泰嗣、木本哲也、川戸佳

*Neuroscientist* (2007) 13(4), 323-334 ( 査読有 )

10 . "Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons."

向井秀夫、釣木澤朋和、村上元、小南思郎、石井寛高、荻上(池田)真理、高田則雄、田辺伸聡、古川愛造、北条泰嗣、大石悠貴、Morrison J.H.、Janssen W. G.M.、Rose A. J.、Chambon P.、加藤茂明、泉俊輔、山崎岳、木本哲也、川戸佳

*J. Neurochem.* (2007) 100(4), 950-967 ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

1 . ○石井寛高、尹成珠、加藤昌克、佐久間康夫

「GnRH アンタゴニストの cetrorelix は、GT1-7 細胞のメラトニン受容体 1a の発現を誘導する」

第 35 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本下垂体学会合同学術集会、2008 年 8 月 28 日、政策研究大学院大学(六本木・東京)、( 口頭発表・査読なし )

2. ○田中伸幸、石井寛高、尹成珠、加藤昌克、佐久間康夫

「ラット GnRH ニューロンにおける電位依存性カルシウムチャネルの発現の発達段階における差異」

第 35 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本下垂体学会合同学術集会、2008 年 8 月 30 日、政策研究大学院大学（六本木・東京）（口頭発表・査読なし）

3. ○小林桃子、石井寛高、田中伸幸、加藤昌克、佐久間康夫

「ラットメラトニン受容体の生化学的解析」  
第 35 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本下垂体学会合同学術集会、2008 年 8 月 30 日、政策研究大学院大学（六本木・東京）（口頭発表・査読なし）

4. ○田中伸幸、石井寛高、尹成珠、加藤昌克、佐久間康夫

「Expression of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel mRNAs in GnRH neurons of male and female adult rats」

第 31 回日本神経科学学会大会、横浜、2008 年 7 月 10 日、パシフィコ横浜（横浜・神奈川）（ポスター発表・査読なし）

5. ○木本哲也、肥後心平、石井寛高、村上元、川戸佳

「Neurosteroids synthesis in the rat hippocampus」

第 31 回日本神経科学学会大会、横浜、2008 年 7 月 9 日、パシフィコ横浜（横浜・神奈川）（ポスター発表・査読なし）

6. ○尹成珠、田中伸幸、石井寛高、加藤昌克、佐久間康夫

「Presence of gabazin-resistant GABA<sub>A</sub>

receptor currents and their modulation by neurosteroids in rat GnRH (LHRH) neurons」

第 30 回日本神経科学学会大会、2007 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜（横浜・神奈川）（口頭発表・査読なし）

7. ○木本哲也、肥後心平、北條泰嗣、石井寛高、川戸佳

「Neurosteroids synthesis in the rat hippocampus」

第 30 回日本神経科学学会大会、2007 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜（横浜・神奈川）（ポスター発表・査読なし）

〔図書〕（計 0 件）  
なし

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）  
なし

取得状況（計 0 件）  
なし

〔その他〕  
○遺伝子登録（18 種）

ラットエストロゲン受容体 $\alpha$ 関連（13 種）  
AB477027-AB477039  
石井寛高、小林桃子、佐久間康夫

メラトニン受容体関連（3 種）  
AB377274

Rattus norvegicus melatonin receptor 1a, complete cds  
石井寛高、小林桃子、佐久間康夫  
AB377275

Rattus norvegicus melatonin receptor 1b, complete cds  
石井寛高、小林桃子、佐久間康夫  
AB377276

Mus musculus melatonin receptor 1b,

**complete cds**

石井寛高、小林桃子、佐久間康夫

イオンチャネルサブユニット関連 (2 種)

**AB374360**

**Rattus norvegicus voltage-dependent L  
type calcium channel alpha 1S subunit,  
complete cds**

石井寛高、小林桃子、佐久間康夫

**AB297662**

**Rattus norvegicus potassium large  
conductance calcium-activated channel,  
subfamily M, beta member 3, complete cds**

石井寛高、碓井澄子、佐久間康夫

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石井 寛高 (Ishii Hirotaka)

日本医科大学・大学院医学研究科・ポスト  
ドクター

研究者番号 : 20445810

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし