

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19800027
 研究課題名（和文）グルココルチコイドによる成獣および胎子の
 脳内性ステロイド受容体の発現制御
 研究課題名（英文）Effect of Glucocorticoid on Sex steroidal Receptor Expression in the
 Adult and Fetal Rat Brain.
 研究代表者
 國分 啓司（KOKUBU KEIJI）
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：00432740

研究成果の概要：

成獣ラットの脳内アンドロゲン受容体 (AR) はアンドロゲン投与によって発現が増加し、エストロゲン受容体 (ER) α はエストロゲンによって減少することが明らかになったが、AR・ER α ・ER β の発現にはコルチコステロンの影響は見られなかった。

しかし雄ラット脳内の芳香化酵素の発現領域においては、エストロゲンが AR に結合し、AR を介した遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	970,000	0	970,000
2008年度	1,170,000	351,000	1,521,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,140,000	351,000	2,491,000

研究分野： 神経解剖学

科研費の分科・細目： 神経科学・神経科学一般

キーワード：(1)脳 (2)コルチコステロン (3)アンドロゲン受容体 (4)エストロゲン受容体 α
 (5)エストロゲン受容体 β (6)アンドロゲン (7)エストロゲン (8)核移行

1. 研究開始当初の背景

脳の性分化と性的反応誘発は精腺由来の性ステロイドに依存しており、その作用を仲介するステロイド受容体の制御機構の解明は、脳の形態・機能から個体の情動・行動の性差を理解するために必須である。当分野の研究は、それぞれのリガンドの面から研究がなされてきた経緯がある。しかしながらそれぞれのステロイドは構造が大変似通っており、ひとつのステロイド受容体に対し複数のリガンドが存在する。従って各ステロイドの働き

を正確に把握するには、個々のリガンドと行動パターンの解析のみでは不十分である。脳の性分化においても、ステロイドと受容体の制御機構は不明な点が多く、受容体の動きを捉えた大局的な検証が必要不可欠である。

一方で、妊娠中にストレスを与えたラットから産まれた新生仔の脳の形態や行動に性差が消失することが報告されていることから、副腎ステロイドも性ホルモン作動系に作用し、脳の性分化機構に対し強い影響力を持つことが予想される。それにも関わらず、こ

れまで報告されてきた実験では母体にストレスを与えることで、母体ストレスと新生仔の脳の形態や性行動を関連付けるに止まり、ストレス関連ホルモンであるコルチコステロン(CS)と脳の性分化を直接結びつける実験はこれまで報告されていない。また、脳の性分化に対するステロイドの作用は、性ステロイドのみに目が奪われがちであり、副腎ステロイドに着眼した報告は圧倒的に不十分である。

2. 研究の目的

ストレスによって脳の性ステロイド感受性にどのような変化があるのかを、より詳細に明らかにする。

具体的にはグルココルチコイドを介して、脳内性ホルモン受容体発現に影響があるのかを実験的に捕らえることを試みる。

3. 研究の方法

コルチコステロンによって、脳内のステロイド受容体発現に影響を及ぼすのかを明らかにするため、精巣摘出(OCX)および副腎摘出(ADX)した成獣雄ラットを準備し、これにコルチコステロン(CS)を投与し、脳内のアンドロゲン受容体 (AR)、エストロゲン受容体 (ER α ・ER β) の発現分布と発現強度の変化を検討する。

<対照群>

Sham + vehicle (sesame oil)

<実験群>

ADX + vehicle OCX + ADX + vehicle
ADX + CS OCX + ADX + CS
CSの投与は副腎摘出5日間投与する。

対照群・実験群として上記の5群を準備し、以下の実験を行う。

- ①実験群の脳内ステロイド受容体の発現分布及び発現強度を、免疫組織化学およびWestern Blot法により対照群と比較する。領域特異性を検証するため、大脳皮質・海馬・中隔・扁桃体・分界条床核・内側視索前野・視床下部腹内側核・乳頭体前核に特に着目する。これらの領域では染色強度に従いクラス分けを行い、各クラスの細胞数を計数する。
- ②実験群・対照群ともサンプリング時の血清を採取し、血中のテストステロン・エストロゲン・コルチコステロンの濃度をIBL社Hormone ELISA kitによって計測する。各性ステロイド受容体発現に影響を及ぼすCS投与からの時間差を検討する。

- ③CS1回投与からCSが血中から消失するまでの、CS血中濃度タイムコースグラフをIBL社Hormone ELISA kitを用いて作成する。

- ④投与するCS量を変え、各性ステロイド受容体発現に影響を及ぼす血中CS濃度の閾値または濃度依存性の有無を検討する。

4. 研究成果

成獣ラット脳内におけるアンドロゲン受容体(AR)、エストロゲン受容体(ER) α および β の脳内発現分布と、性ホルモンによる受容体蛋白量の変化を捉えた。

脳内AR蛋白は精巣および副腎を摘出することで減少し、アンドロゲン投与によって再び増加した。ER α 蛋白は精巣摘出および副腎摘出したラットで対照群よりも増加するが、ER α の増加は扁桃体および分界条床核でより顕著であった。精巣および副腎を摘出したラットにエストロゲンを外因性に投与することで、扁桃体・分界条床核だけでなく内側視索前野・視床下部腹内側核のER α も減少することが明らかになった。ER α 蛋白の増減が、mRNAの増減によるものか、蛋白の安定性の変化によるものかは現在のところ結論が得られていない。また、ER β 蛋白は精巣摘出・副腎摘出・性ホルモン投与の影響を受けなかった。

ER α 蛋白の増減がエストロゲンに依存することで、脳内芳香化酵素(AROM P450)の分布および発現変動を調べた。ラットのAROM P450免疫陽性神経細胞群は、芳香化酵素発現ピーク時期により胎生型、胎生新生仔型、若年成獣型の3群に分類される。精巣と副腎を摘出した雄ラットに性ステロイド投与を行い、上記3群の脳内AROM P450蛋白とmRNA発現への性ステロイドによる制御を、免疫組織化学法およびin situ hybridization法により解析した。胎生型と胎生新生仔型AROM P450免疫陽性神経細胞群のAROM P450蛋白とmRNA発現は精巣・副腎摘出で減少し、性ステロイド投与によって回復した。若年成獣型AROM P450免疫陽性神経細胞群の免疫反応性は摘出手術や性ステロイドに反応せず、AROM P450 mRNAは検出されなかった(Zhao C et al. Cell Tissue Res. 2008)。成獣と胎齢18日のAROM P450遺伝子ノックアウトマウス(ArKO)脳でAROM P450の免疫組織化学法を行うと、胎生型と胎生新生仔型AROM P450免疫陽性神経細胞群の免疫反応性は消失したが(Fig. 1)、若年成獣型AROM P450免疫陽性神経細胞群の免疫反応性はArKOでも失われなかった(Fig. 2)。

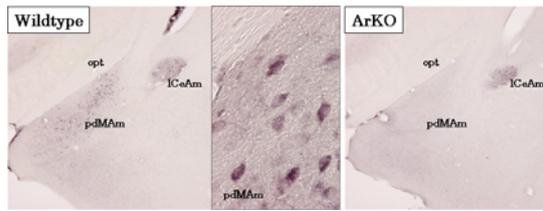


Fig. 1 Wildtype (左) および ArKO (右) マウスの内側扁桃核(pdMAm)における AROM P450 染色。Wildtype マウスの内側扁桃核に観察された AROM P450 免疫陽性反応は ArKO マウスでは消失していた。

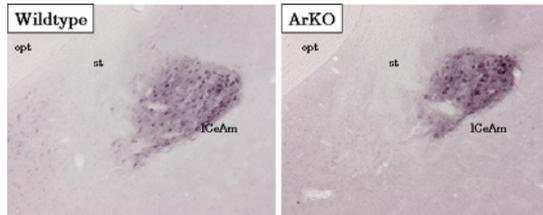


Fig. 2 Wildtype (左) および ArKO (右) マウスの中心扁桃核(ICeAm)における AROM P450 染色。Wildtype マウスの中心扁桃核に観察された AROM P450 免疫陽性反応は ArKO マウスでも消失しなかった。

以上より、脳内 AROM P450 には性ステロイド反応性の卵巣由来 mRNA 型と性ステロイド非反応性の非卵巣由来 mRNA 型の 2 種類の亜型の存在が示唆された。前者は胎生型および胎生新生仔型 AROM P450 免疫陽性神経細胞群の AROM P450 であり、これらは同一の遺伝子に由来する。後者は若年成獣型 AROM P450 免疫陽性神経細胞群の AROM P450 であり、その免疫陽性反応蛋白は、前者とは異なる遺伝子に由来することが明らかになった。

AR・ER α ・ER β 蛋白の増減に対するコルチコステロン(CS)の影響を調べるため、Sham 群および精巣および副腎を摘出したラットに CS の投与を行ったところ、Sham+CS 群において対照群よりも AR の減少傾向が観察されたが、詳細な解析の結果、CS による AR・ER α ・ER β の脳内発現分布および発現量には変化がないことが明らかになった (Fig. 3)。

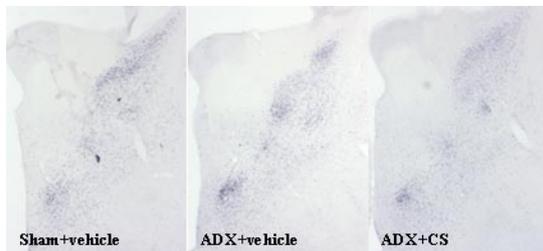


Fig. 3 無処置ラット (左)、副腎摘出ラット (中)、副腎摘出+CS 投与ラット (右) の内側視索前野における AR 染色

様々なステロイドの投与によって、脳内性ステロイド受容体の脳内発現分布と発現量

を調べていく中で、無処置の雄ラットでは、AR 蛋白は外側中隔核、海馬 CA1 領域、内側視索前野、視床下部腹内側核、内側扁桃核、前乳頭体核から検出され、それらは全て神経細胞の核内に見られた。精巣を摘出することで血中テストステロン濃度を低下させると、免疫反応性は低下したものの、AR 蛋白は依然として核内に存在した。精巣に加えて副腎も摘出することで、AR 蛋白は神経細胞内の細胞質へ移行した。細胞質へ移行した AR 蛋白はジヒドロテストステロン (DHT) の投与により、再び核内に移行した。そして細胞質 AR は、エストラジオール (E2) を投与することでも核内に移行する現象が観察された。さらに AR を核移行させる E2 投与量と血清 E2 濃度や、E2 投与から AR が核移行するまでの時間も明らかとなった (Fig. 4)。

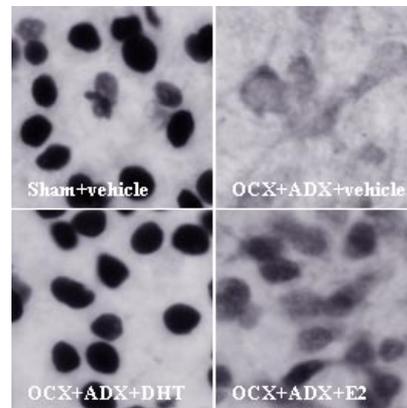


Fig. 4 無処置ラット (左上)、精巣副腎摘出 (OCX+ADX) ラット (右上)、OCX+ADX+DHT 投与ラット (左下)、OCX+ADX+E2 投与ラット (右下) の前乳頭体核における AR 染色

E2 による AR の核移行は、GFP-AR をトランスフェクションした培養細胞を用いても確認を行い、AR 核移行を誘導する培養液中の E2 濃度には一定の閾値が有ることを突き止めた。

脳内の芳香化酵素発現部位 (分解上床核、内側扁桃核) においては、E2 が血清中異常に高濃度で存在することが予想され、AR も同時に発現していることから、AR に作用する E2 が作動性なのか、抑制性なのかは不明であるが、上記の内容までをまとめ論文を作成している。

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 1 件)

Zhao C, Fujinaga R, Yanai A, Kokubu K, Takeshita Y, Watanabe Y, Shinoda K.

Sex-steroidal regulation of aromatase mRNA expression in adult male rat brain:

a quantitative non-radioactive in situ hybridization study.

Cell Tissue Res. 332: 381-391. 2008.
査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 國分啓司、趙長久、藤永竜太郎、柳井章江、戸田勝巳、篠田晃
3群の脳内芳香化神経細胞に関するアロマテース発現と性ステロイドによる制御特性の組織化学的解析
第114回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2009. 3. 28 岡山
- ② 藤永竜太郎、吉岡和博、中村裕幸、竹下幸男、柳井章江、國分啓司、篠田晃
ハンチントン病関連蛋白質 HAP1 が誘導形成する stigmoid body と glucocorticoid receptor の相互関連
第114回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2009. 3. 28 岡山
- ③ 柳井章江、藤永竜太郎、國分啓司、篠田晃
Stigmoid body のオルガネラ起源を明らかにする
第114回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2009. 3. 28 岡山
- ④ 藤永竜太郎、吉岡和博、中村裕幸、竹下幸男、柳井章江、國分啓司、篠田晃
ハンチントン病関連タンパク質 HAP1 と glucocorticoid receptor の細胞内相互関連
Biochemistry and Molecular Biology 2008. 12. 9 神戸
- ⑤ 國分啓司、趙長久、藤永竜太郎、柳井章江、篠田晃
性ステロイドによる脳内アンドロゲン受容体の細胞内局在の変化
第113回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2008. 3. 28 大分
- ⑥ 藤永竜太郎、魚住加奈子、竹下幸男、柳井章江、吉岡和博、國分啓司、篠田晃
ハンチントン病関連蛋白質 HAP1 の発現により誘導合成される stigmoid body は aggresome とは異なる構造である
第113回 日本解剖学会総会・全国学術集会 2008. 3. 28 大分
- ⑦ Zhao C, Fujinaga R, Tanaka M, Yanai A, Kokubu K, Nakahama K, Watanabe Y, Shinoda K
Steroidal Regulation on Aromatase Protein and mRNA Expression in the Adult Rat Brain

Biochemistry and Molecular Biology 2007. 12. 12. 横浜

- ⑧ Fujinaga R, Uozumi K, Takeshita Y, Zhao C, Kokubu K, Yanai A, Shinoda K
Formation of the stigmoid body and its characteristics in huntingtin-associated protein 1-transfected cells
Biochemistry and Molecular Biology 2007. 12. 12. 横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國分 啓司 (KOKUBU KEIJI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00432740

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

