

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590239

研究課題名(和文) 発達過程におけるステロイド代謝の微小環境での変化と痛覚情報伝達との相互関係

研究課題名(英文) Correlation of the pain information transmission and the microenvironmental alteration of steroid metabolism during development.

研究代表者

鶴尾 吉宏 (TSURUO, Yoshihiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：90207449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド代謝酵素である3 β -ヒドロキシステロイド・デヒドロゲナーゼ(3 β -HSD)は、5 α -リダクターゼとの作用で合成されるアロプレグネロンはGABA-A受容体に結合し、GABAの機能を亢進させる。そこで、痛みを含むストレス環境下において、中枢神経系におけるストレス情報の重要な中継部位である視床下部の室傍核における3 β -HSDの発現をラットを用いて免疫組織化学的に解析した。片側の手足に2%PFAを投与した群では、無処置群と比較して室傍核における3 β -HSD免疫陽性細胞数と反応性が増加した。よって、痛みを伴うストレス反応に、視床下部室傍核での3 β -HSDが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The steroid metabolizing enzyme, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), in cooperation with 5 α -reductase, synthesizes allopregnanolone that can bind to the GABA-A receptor, facilitating the function of GABA. The appearance of 3 β -HSD was analyzed immunohistochemically in the hypothalamic paraventricular nucleus, the prerequisite relay site to mediate the stress information in the central nervous system, under the stressful environment including pain. The number and immunostainability of 3 β -HSD-immunopositive cells in the hypothalamic paraventricular nucleus increased in the group of 2% PFA injected into the unilateral paws, compared with the control group. Hence, 3 β -HSD is suggested to be involved in the stress reaction mediating pain in the hypothalamic paraventricular nucleus.

研究分野：解剖学

キーワード：ステロイド 代謝酵素 痛覚 ストレス 中枢神経系 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

ステロイドは副腎などの末梢内分泌器官から血行性に全身の標的器官に送られ、細胞内のステロイド受容体と結合して核内で転写因子として生体の恒常性を維持していると考えられていた。しかし、1987年に Baulieu と Robel によって脳内でデヒドロエピアンドロステロン、プロゲステロンなどの生理活性を示すステロイドが合成されることが報告され、神経ステロイドとして知られるようになった。神経ステロイドのうち、例えばプロゲステロンを基質として、5 β -reductase と 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)の酵素作用によって生合成されるアロプレグナロンは従来知られているような細胞内のステロイド受容体とは結合せずに、細胞膜に存在する GABA_A 受容体と結合して、抗不安、鎮静、鎮痛などの神経抑制作用を示し、また胎生期には神経細胞の増殖作用を示す。神経ステロイドは液性に働いて傍分泌的に作用することに特徴があるが、疼痛の情報伝達において鎮痛作用を示す神経ステロイドの産生機構やその局在と働きに関する研究はほとんどないのが現状である。

そこで、ステロイド代謝酵素の発現およびそこで産生される神経ステロイドが、細胞内の塩素イオン(Cl⁻)濃度による微小環境と如何なる関係をもって疼痛情報を制御しているのか、またこの調節機構が発達過程においてどのように成立してくるのかについて形態学的な観点から検討し、GABA_A 受容体と結合して鎮痛作用を示す神経ステロイドの産生による疼痛情報伝達の調節機構を明らかにする。

GABA_A 受容体は塩素イオンチャンネル型の受容体であり、GABA 以外にも神経ステロイドなどのリガンドと結合し、塩素イオンチャンネルとして細胞膜に存在する。塩素イオンは細胞内・外の濃度勾配によって移動し、移動方向によって細胞の活動性は全く逆の反応を示す。つまり、リガンドが GABA_A 受容体に結合してイオンチャンネルが開くと、成熟時では細胞内の塩素イオン濃度は細胞外に比べて低く保たれており、塩素イオンは細胞内に流入して細胞

の機能を抑制する。これが一般的に GABA は抑制性の神経伝達物質であることの原因である。しかし、胎仔期あるいは特殊な条件下では細胞内の塩素イオン濃度は細胞外よりも高く保たれており、塩素イオンは細胞外に流出して逆に細胞は興奮状態を示す。

細胞内の塩素イオン濃度は、陽イオン-塩素イオン-共輸送体ファミリーに属する分子によって調節される。細胞内に塩素イオンを取り込む分子には2種類(NKCC1, 2)があり、細胞外に塩素イオンを排出する分子には4種類(KCC1~4)が知られている。このうちNKCC1とKCC2の作用はよく研究されているが、腎臓のみに発現するNKCC2を除いて、他の3つのKCCについては十分に検討されていない。

2. 研究の目的

疼痛情報伝達に関わる視床下部に焦点を当て、GABA_A 受容体と結合して鎮痛作用を示す神経ステロイドの産生に關与するステロイド代謝酵素の発現とその局在について、細胞内の塩素イオン濃度を調節する陽イオン-塩素イオン-共輸送体分子の発現と局在との空間的・時間的な関係を、形態学的に含有細胞を特定して発生学的な観点から検討する。

神経ステロイド代謝酵素の局在については形態学的な報告はあるが、結果が不正確なことが多い。例えば、5 β -reductase には2種類のアイソフォームがあり、神経系に優位な1型の他に、2型の存在は示唆されてはいるが形態学的に十分解析されていない。また、3 β -HSD には4種類のアイソフォームがあり、aldo-keto reductase スーパーファミリーに属する類似した他酵素との識別が難しく、抗体を用いて細胞レベルでの局在を特定出来ていないのが現状である。我々の教室では、鎮痛作用を示す神経ステロイドの産生に關与する5 β -reductase や3 β -HSDのステロイド代謝酵素の他に複数の代謝酵素についても特異抗体を作製し、その局在の研究を進めており、良い結果を得ている。

このようにして得た特異抗体による免疫組織化学と *in situ* hybridization 法によって、含有細胞の局在をタンパクおよび mRNA のレ

ベルで明らかにする。酵素の発現量の変化は、ウエスタンブロットおよび real-time PCR による。また、目的の組織を培養条件下で生育させ、分泌される神経ステロイドを、RIA ならびに薄層クロマトグラフィーなどで特定し定量する。ステロイド代謝酵素の局在および発現されたステロイドの生化学的解析については、我々はラット胃のエストロゲン産生について報告している。

さらに、種々の疼痛モデル動物を用いて、対照と比較検討し、鎮痛に係るステロイド代謝酵素および神経ステロイドならびに、細胞内塩素イオン濃度を調節する陽イオン-塩素イオン-共輸送体のアイソフォームの発現とその変化について解析し、ステロイド代謝酵素および産生される神経ステロイドの疼痛情報伝達の調節への関与を明らかにする。

本研究では、このようにして疼痛情報伝達の調節に關与するステロイド代謝酵素および産生される神経ステロイドが細胞内の塩素イオンによる微小環境によってどのような機能的役割を果たしているのかを解明する。

3. 研究の方法

神経ステロイドによる疼痛情報伝達の新しい調節機構の仕組みを解明するために、痛覚情報伝達で重要である視床下部に焦点を当てて、GABA_A 受容体と結合して鎮痛作用を示す神経ステロイドの産生に關与するステロイド代謝酵素の局在と発現について、その働きに影響する細胞内の塩素イオン濃度を調節する陽イオン-塩素イオン-共輸送体分子の発現と関連させ、形態学的に解析を行う。胎生期から生後早期さらに成熟期に至る発達過程に伴う局在と発現量の変化を調べ、種々の疼痛モデル動物および培養系を用いてステロイド代謝酵素および産生される神経ステロイドの疼痛情報伝達への関与を解明する。さらに上位の中樞神経系における調節機構についても検討する。

(1) 成熟ラットを用いて、痛覚情報伝達において末梢からの知覚情報処理に重要な役割を果たす視床下部およびこれらの神経路に焦点を当てて、GABA_A 受容体と結合して鎮痛作用を示す神経ステロイドの産生に關与するステロイド代謝酵素のうちで中心的な働きをしてい

ると考えられる 5 α -reductase と 3 β -HSD の代謝酵素を含めて、関連するその他のステロイド代謝酵素について、タンパクおよび mRNA レベルでの局在を新しく作製した特異抗体による免疫組織化学と *in situ* hybridization 法によって明らかにする。このようにして特定した神経ステロイド産生細胞において、細胞内の塩素イオン濃度を調節する陽イオン-塩素イオン-共輸送体分子がどのように発現しているのかを、NKCC1、KCC1~4 を識別する特異抗体を新規に作製あるいは利用および *in situ* hybridization 法も用いて局在を特定する。神経細胞とグリア細胞の特定には各々に特異的なマーカー分子を用いる。組織内で産生されるステロイド代謝酵素の発現量はウエスタンブロットと real-time PCR にて解析する。

(2) 成熟時で調べた、鎮痛作用を示す神経ステロイドの産生に關与するステロイド代謝酵素と陽イオン-塩素イオン-共輸送体分子の局在と発現をもとに、胎生期から生後早期さらに成熟期に至る発達過程に伴う局在と発現量の変化および神経ステロイドの産生量を調べる。発達過程において合成・分泌される神経ステロイドについては、発達過程の各段階にある組織を培養条件下で生育させて薄層クロマトグラフィーならびに RIA により調べる。これにより成熟時に働く痛覚情報伝達の機構が発達過程のどの時期から成立してくるのかを解析する。

(3) GABA_A 受容体と結合して鎮痛作用を示す神経ステロイドを代謝することによって、GABA_A 受容体と結合できないように不活化する代謝酵素の存在も指摘されており、この代謝酵素についても特異抗体を作製し良い結果を得ている。この不活化する酵素についても、上記と同様な解析を行い疼痛情報伝達への関与について検討する。また、GABA_A 受容体と結合するが、逆に GABA_A 受容体の働きを抑える作用を示す神経ステロイドの存在も知られており、この神経ステロイドを合成するステロイド代謝酵素についても、同様に解析を進めて疼痛情報伝達への関与を検討する。

4. 研究成果

ステロイド代謝酵素である 3 β -HSD は、

5 -reductase との作用で合成されるアロプレグネロンは GABA_A 受容体に結合し、GABA の機能を亢進させる。そこで、痛みを含むストレス環境下において、中枢神経系におけるストレス情報の重要な中継部位である視床下部の室傍核における 3 -HSD の発現についてラットを用いて免疫組織化学的に解析した。片側の手足に 2%PFA を投与した群では、無処置群と比較して、投与後 90 分後において、室傍核における 3 -HSD 免疫陽性細胞数と反応性が増加した。しかし、拘束による不動化ストレスでは、3 -HSD 免疫陽性細胞について有意な変化は認められなかった。また、細胞内の Cl⁻ イオン濃度を制御するトランスポーターである NKCC1 と KCC2 について、免疫組織化学的に室傍核における陽性細胞を検索したところ、NKCC1 陽性細胞が KCC2 陽性細胞よりも多く認められた。よって、痛みを伴うストレス反応に、視床下部室傍核での 3 -HSD が関与しており、5 -reductase と 3 -HSD の作用で産生されたアロプレグネロンが、NKCC1 と KCC2 のバランスによって細胞内の Cl⁻ イオン濃度が増加した神経細胞に対して脱分極の作用を起こしていることが考えられる。

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 3 件)

1. Yamamoto Y, Ueyama T, Ito T, Tsuruo Y. Gene expression profiling in rats with depressive-like behavior. *Genom Data*. 査読有 11(5):2015,279-280. doi: 10.1016/j.gdata.2015.04.030.
2. Yamamoto Y, Ueyama T, Ito T, Tsuruo Y. Downregulation of growth hormone 1 gene in the cerebellum and prefrontal cortex of rats with depressive-like behavior. *Physiol Genomics*. 査読有 47(5):2015,170-176. doi:10.1152/physiolgenomics.00119.2014.
3. Yamashita Y, Ueyama T, Nishi T, Yamamoto Y, Kawakoshi A, Sunami S, Iguchi M, Tamai H, Ueda K, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M. Nrf2-inducing anti-oxidation stress response in the

rat liver - new beneficial effect of lansoprazole. *PLoS One*. 査読有 9(5): 2014,e97419. doi:10.1371/journal.pone.0097419.

[学会発表](計 6 件)

1. 伊藤隆雄、山本悠太、鶴尾吉宏、上山敬司. 幼若期ラット網膜におけるステロイド代謝酵素 5 -リダクターゼサブタイプの発現について. 日本解剖学会総会・全国学術集会 2016 年 3 月 28 日 ビッグパレットふくしま 福島県郡山市
2. 伊藤隆雄、上山敬司、山本悠太、志波歩美、鶴尾吉宏. ステロイド代謝酵素 5 -reductase のラット網膜における発現. 日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 29 日 自治医科大学キャンパス 栃木県下野市
3. 志波歩美、山本悠太、伊藤隆雄、上山敬司、鶴尾吉宏. 3 -hydroxysteroid dehydrogenase のラット神経系における局在. 2014 年 3 月 27 日 自治医科大学キャンパス 栃木県下野市
4. 山本悠太、志波歩美、伊藤隆雄、上山敬司、鶴尾吉宏. うつ様行動を示すラット小脳で Gh1 の発現が減少する. 2014 年 3 月 27 日 自治医科大学キャンパス 栃木県下野市
5. 山本悠太、志波歩美、伊藤隆雄、上山敬司、鶴尾吉宏. ラット脳における 7 水酸化酵素 CYP7B1 の局在解析. 2013 年 3 月 28 日 サンポートホール高松・かがわ国際会議場 香川県高松市
6. 志波歩美、山本悠太、伊藤隆雄、上山敬司、鶴尾吉宏. スルフォトランスフェラーゼ 2B1a のラット小脳における局在. 2013 年 3 月 28 日 サンポートホール高松・かがわ国際会議場 香川県高松市

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴尾 吉宏 (TSURUO, Yoshihiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 90207449

(2)研究分担者

上山 敬司 (UEYAMA, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50264875

山本 悠太 (YAMAMOTO, Yuta)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00580672

伊藤 隆雄 (ITO, Takao)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30315931