

機関番号：16101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590192
 研究課題名（和文） 海馬における神経ステロイド合成および作用機構の細胞化学的・分子生物学的解析
 研究課題名（英文） Cytochemical and molecular biological analysis of neurosteroid synthesis and action mechanism in the hippocampus
 研究代表者
 石村 和敬（ISHIMURA KAZUNORI）
 徳島大学・大学院ヘルスパイオサイエンス研究部・教授
 研究者番号：90112185

研究成果の概要（和文）：

神経系で独自に産生される神経ステロイドの生理的意義を解明するために、海馬におけるステロイド合成酵素および受容体の発現について解析を行った。その結果、海馬の神経細胞において、ステロイド合成酵素および受容体が発現していることを確認した。また、ステロイド合成酵素のひとつであるアロマターゼは、末梢で産生されるステロイドホルモンによって発現調節が行われる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the physiological role of neurosteroid that was produced in the central nerve system, we analyzed the expression of steroid hormone synthesizing enzymes and receptors in the hippocampus. As a result of immunohistochemical analysis, several enzymes and receptors were localized in nerve cells in the hippocampus. Change of aromatase expression level suggests that aromatase may be regulated by the steroid hormone produced in peripheral endocrine glands.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞組織化学

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンは主に性腺や副腎皮

質など内分泌腺で産生され、血流を介して全身の器官・組織に作用し、生体機能に著明な

影響を及ぼす多彩な生理活性を有する。神経系に対しても、末梢内分泌腺で産生されたものが中枢神経系に入り、そこでそのまま、又は代謝されて作用を発揮するものと考えられていた。しかしながら、大脳皮質にステロイド合成代謝の key enzyme であるコレステロール側鎖切断酵素が存在し、末梢器官とは独立して神経系組織で生合成されることがわかり、神経系で独自に産生されるステロイドに対して“神経ステロイド”なる名称が与えられた。その後神経系におけるステロイド合成能については生化学的にはその存在が同定され、また脳の様々な領域で多様に発現していることがわかってきているが、他方で必ずしも確固とした形態学的裏付けを持たぬ形で進んできた観がある。これは神経ステロイドの合成と作用部位がニューロンかグリアかという議論に加え、ステロイドが諸酵素によって多段階的に合成されること、合成されたステロイドは受容体に作用して機能発現するが、その受容体の存在様式について細胞種と細胞内局在に十分な確証が得られていないこと等に起因すると考えられる。この考察は、申請者が長年、末梢のステロイド合成機構を中心に研究してきた結果得られたステロイド代謝の特性の理解に基づいており、ステロイドそのものだけでなく、代謝酵素と受容体の分子・組織・細胞レベルの局在と発現の探求が、より正確なステロイドの理解には不可欠であると考えている。従来の研究を基盤としたこの視点により、申請者は最近、神経ステロイドについて、マウス・ラット全脳における代謝酵素の発現解析を行い、更に機能と構造の対応が比較的容易な脳領域、具体的には嗅球と小脳について行ってきた。本研究は、一連の流れにおいて神経ステロイドの海馬についての解析を行うことを目的としたものである。海馬は学習・記

憶に重要な役割を担うことから、分子レベルから行動レベルの解析、特にシナプス結合を含めた神経構築の基礎的研究がかなり進んでいる。またエストロゲンによる学習・記憶機能が性周期に応じて変動するという興味深い行動科学的知見が得られていること、その解析結果を他の脳領域にも応用可能なことから神経ステロイドの機能と存在意義を解明するためには適した解析対象であり、更に内分泌攪乱化学物質の外界環境からの生体への影響、特に学習記憶や生殖機能への影響などの研究に発展する可能性を秘めている。

2. 研究の目的

これまで、分子レベルと行動レベルでステロイドホルモンの海馬への多様な生理活性が示されたにもかかわらず、その生理機能や存在意義の理解が判然とせず、依然として推量の域を超えないのは、細胞・組織レベルでの解析が進んでいないことに起因すると考えられる。このため、海馬における神経ステロイドの発現動態、海馬におけるステロイドホルモンの作用、海馬ニューロン新生とステロイドの関係について研究を推進する。具体的には、海馬におけるステロイドホルモン合成酵素の発現と局在、またステロイド受容体の局在を検索し、ステロイド合成酵素および受容体の発現動態の解析を行う。これにより、海馬機能と構造にステロイドホルモンがどのように影響を及ぼすのかを明らかにし、単なる生化学的同定のみならず、確固とした形態学的基盤に基づいて、ステロイドホルモンと海馬の関係について、より深く、より正確に理解したいと考えている。

3. 研究の方法

1) 実験動物

実験は Wistar 系のラットを用いて行った。生後 2 ヶ月齢の雌ラットを卵巣摘除したグループ、偽手術したグループ、未処置のグループに分け解析を行った。また、卵巣摘除後からエストラジオール投与を行ったグループについても解析を行った。

2) 組織化学的解析

麻酔後 4% PFA により灌流固定を行い、脳を摘出した。摘出後さらに同固定液において一晩浸漬固定した。ビブラトームにより 30 μm の厚さに薄切し、ステロイド合成酵素およびステロイド受容体に対する抗体を用いた免疫染色をおこなった。

2) 遺伝子発現解析

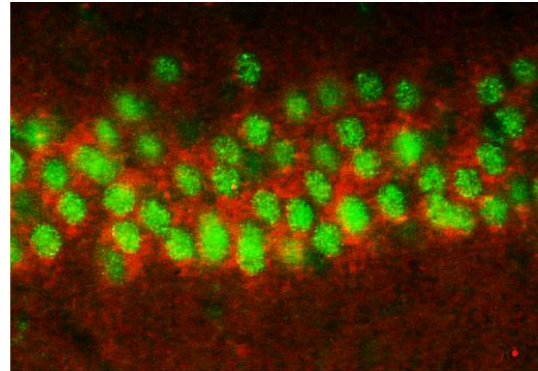
麻酔後海馬を摘出し、使用するまで -80°C で凍結保存した。摘出された海馬から RNA を抽出し、cDNA を合成した。ステロイド合成酵素について特異的プライマーを用いて PCR を行い、遺伝子発現について解析を行った。

4. 研究成果

1) 海馬におけるステロイド合成酵素およびステロイド受容体の局在

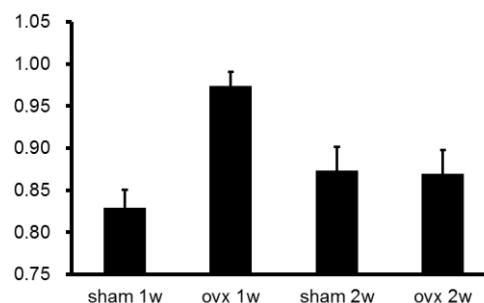
ステロイド合成酵素であるコレステロール側鎖切断酵素、 17α 位水酸化酵素、 3β 位水酸基脱水素酵素、 17β 位水酸基脱水素酵素、芳香化酵素 (アロマターゼ)、ステロイド受容体であるエストロゲン受容体 α の局在を明らかにするために、未処理のラットを用いて各抗体による免疫染色を行った。その結果、各種ステロイド合成酵素は海馬の CA1 領域の神経細胞の細胞質に、またエストロゲン受容体 α は神経細胞の核に局在している所見を得た。さらに、ステロイド合成酵素のうちテストステロンをエストラジオールに変換

する酵素であるアロマターゼとエストロゲン受容体 α が同じ神経細胞の細胞質と核に存在していることを確認した (図 1)。



2) 卵巣摘除によるアロマターゼの遺伝子発現の変化

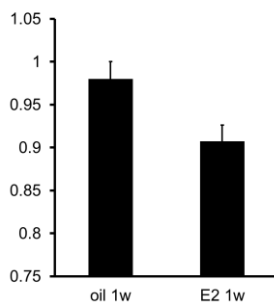
海馬に発現しているアロマターゼの発現調節に末梢で産生されるステロイドホルモンが関係しているかを検索するために、卵巣摘除したラットの手海馬から遺伝子を抽出し RT-PCR を行った。その結果、アロマターゼ遺伝子の海馬における発現は、卵巣摘除後 1 週間で一過性に上昇するが、2 週間後ではコントロールと同じレベルになることを確認した (図 2)。この結果から、アロマターゼ遺伝子の発現は、卵巣由来のエストロゲンによって発現調節を受ける可能性が考えられた。



3) 卵巣摘除後エストラジオール投与による

アロマターゼの発現動態の変化

卵巣摘除後1週間におけるアロマターゼ遺伝子発現の一時的な上昇が、卵巣で産生されるエストロゲンに起因することが示唆されたことから、卵巣摘除後からエストラジオールを皮下投与し、アロマターゼ遺伝子の発現動態を RT-PCR によって解析した。その結果、アロマターゼ遺伝子の1週間後の発現の上昇が低減することが明らかとなった(図3)。しかし、卵巣摘除後のアロマターゼ遺伝子の上昇は、エストラジオール投与によって摘除していないものと同じレベルにまで低下することはなかった。このことは、末梢由来のエストロゲン以外の発現調節因子がある可能性を示している。

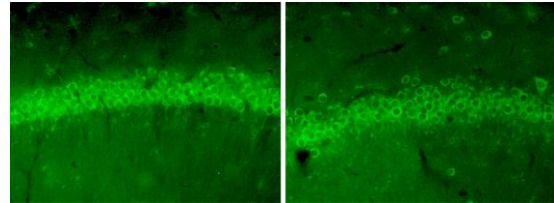


また、卵巣摘除後エストラジオール投与によるアロマターゼの発現動態をタンパク質レベルで確認するために免疫染色を行った。その結果、アロマターゼ陽性のシグナル強度が強い傾向にあり、遺伝子の発現動態と同様であった(図4)。

4) 卵巣摘除および卵巣摘除後エストラジオール投与によるエストロゲン受容体遺伝子の発現動態の変化

エストロゲン受容体 α 遺伝子がアロマターゼと同様に一過性の発現動態の変化を示すかを確認するために RT-PCR を行った。そ

の結果、エストロゲン受容体 α 遺伝子の発現は卵巣摘除後1週間ですでに低下し、2週間後も同等であった。また、エストロゲン受容体 α の遺伝子発現は、エストラジオール投与でコントロールレベルまで回復した。



以上のことから、海馬の神経細胞で産生されるエストロゲンは神経細胞自身に発現している受容体に作用する可能性が示唆された。また、アロマターゼおよびエストロゲン受容体の発現は、末梢由来のエストロゲンによって発現調節を受けることが示唆された。

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)

[学会発表] (計2件)

- 1) 小野公嗣、小林杏奈、石村和敬: ラット海馬におけるアロマターゼおよびエストロゲン受容体 α の免疫組織化学的解析. 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011. 3. 30. 横浜
- 2) 小野公嗣、宍戸裕二、朴煥埼、Rabab M. Abou EI-Magd、鄭丞弼、頼田和子、佐野暢哉、有馬邦正、坂井隆志、石村和敬、福井清: 免疫組織学並びに in situ hybridization 法を用いたヒトおよびラット脳における D-アミノ酸酸化酵素の発現解析. 第50回日本組織細胞化学学会総会・学術集会, 2009. 9. 27. 大津

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石村 和敬 (ISHIMURA KAZUNORI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：90112185

(2) 研究分担者

小野 公嗣 (ONO KOJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：00548597