

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791706

研究課題名(和文) 網膜変性疾患におけるステロイドの機能的役割と作用機序の分子生物学・組織化学的解析

研究課題名(英文) Steroid metabolizing enzymes in the rat retina: immunohistochemical study.

研究代表者

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

研究成果の概要(和文)：重篤な視機能障害を引き起こす網膜変性疾患は、アルツハイマー病などの神経変性疾患と同様に神経細胞死の異常によって発症し進行性に神経細胞の障害が進む原因不明の疾患でありその多くが有効な治療法が確立していない。本研究は、網膜変性疾患の発症機序の解明および治療法の確立につながる基礎的研究という位置づけで、網膜における神経ステロイドの役割を分子生物学的および組織化学的手法を用いて解析を行った。様々な神経ステロイドを合成する酵素の網膜内での局在を調べるため、抗体を作製し、免疫組織化学法により染色を行った。これらの結果は、今後網膜変性疾患のモデル動物などを用いた研究において網膜変性疾患の原因究明、治療法の確立などへと広く展開できることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Neurosteroids are synthesized from cholesterol or other steroidal precursors and affect neuronal functions by modulating neurotransmission in the central nervous system. Recent studies have shown that neurosteroids are produced also in the retina. However, it is unclear where the enzymes are located in the retina and how they contribute to retinal physiology. Here, we investigated the localization of steroid metabolizing enzymes in the developing and adult rat retina by using immunohistochemistry with specific antibodies. Furthermore, to evaluate the developing expression of the enzymes in the retina, we carried out reverse transcription-polymerase chain reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：解剖学、神経内分泌学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜・神経ステロイド・免疫組織化学・ウエスタンブロット

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンは、生体内の恒常性の維持など、内的要因および外部からの刺激な

ど外的要因に対応して副腎や生殖器などの末梢の内分泌器官で分泌され、血流を通じて全身の標的器官に送られ生理作用を発揮する。

その作用機序は、標的細胞内のステロイドレセプターと結合し、核内に移行した後にホルモン応答エレメントと呼ばれるDNAの特定の塩基配列と結合し、特定の遺伝子に作用してホルモンの生理機能の発現を制御している。1987年にBaulieとRobelによって脳内で、末梢の内分泌器官と同様に、ステロイドホルモンの原材料であるコレステロールから、もしくは末梢由来の前駆体から、生理活性のあるステロイド（プログネロン、デヒドロエピアンドロステロン、プロゲステロン）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。神経ステロイドの作用については、例えばプロゲステロンを基質として、 5α -reductase, 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HSD) によって生成されるアロプレグネロンが、細胞内のステロイドレセプターを介さずに、細胞膜に存在するGABA_A受容体と結合することによって、鎮静、抗不安、鎮痛などの神経抑制作用を示すことが知られており、またGABAが胎生期では神経発生に促進的に作用することも分かっている。さらに近年、グルココルチコイドがグルタミン酸による興奮毒性に対する神経保護作用をもつことや、エストロゲンによる脳虚血後の細胞死の抑制、ヒトの閉経後のアルツハイマー病の増加とホルモン補充療法によるその抑制など、ステロイドによる神経変性疾患からの神経細胞の保護作用が大きな注目を集めている。

網膜は本来、神経外胚葉に起源を持ち、発生学的にも中枢神経系の一部である。網膜においては、コレステロールからプレグネロンを合成するコレステロール側鎖切断酵素(P450_{scc})が神経節細胞に存在し神経ステロイド合成能があることがGuarneriらによって報告され、さらに網膜内に存在するステロイドの神経細胞に対する作用が、脳と同様にあ

ることが予測される。事実、虚血時などに見られるNMDA受容体を介した興奮毒性による神経細胞死に対して、プロゲステロン、ジヒドロエピアンドロステロン、エストロゲンがその進行を遅延させることや、光障害による視細胞死に対してグルココルチコイド受容体が保護する作用といった神経細胞に対する保護作用が報告されている。一方、プレグネロンの硫酸エステルは、中枢神経系に最も多く存在する神経ステロイドであるが、グルタミン酸の放出やNMDA受容体を刺激して神経毒として作用することが知られており、これら網膜の神経ステロイドが神経細胞の機能調節に大きく関与していることが考えられる。

網膜変性疾患は、失明などの視機能障害を引き起こす神経変性疾患の一つであり、その主な原因は網膜神経細胞のアポトーシスである。緑内障、虚血性網膜症および糖尿病性網膜症は、網膜内層の神経節細胞のアポトーシスにより、次いで内顆粒層から外顆粒層へと細胞死が進行する疾患であり、アポトーシスの原因は一過性の細胞外グルタミン酸濃度上昇に伴う興奮毒性によるものと考えられている。また、光受容細胞である視細胞のアポトーシスが原因の視細胞変性症には、代表的な遺伝性網膜疾患である網膜色素変性症があり、視細胞や視細胞に密着する網膜色素上皮細胞に特異的に働いている遺伝子の異常によって起こるとされており、その原因遺伝子は多種にわたり、ごく一部の遺伝子のみが明らかにされているだけである。これら、網膜変性の発症機序の解明や、神経細胞の保護・再生療法の開発には、モデル動物系統の確立や、実験的に網膜変性を引き起こす手法などを通して研究が進められているが、神経ステロイドが網膜変性に対してどのような作用機序で関与しているのかの詳細も含めて、未だ十分な解明には至っていない。

2. 研究の目的

網膜内で産生される神経ステロイドの一連の代謝経路を統合的に解析し、網膜疾患モデルにおける神経ステロイドの産生およびその変化をとらえることによって、網膜変性疾患の作用機序と網膜内神経ステロイドとの連関、さらに神経ステロイドの視機能調節に果たす機能的役割を明らかにすることを目的とする。

網膜における神経ステロイドが、網膜にある6種類の神経細胞とグリア細胞であるミューラー細胞の内、いつ、どの細胞で合成されているのかについての形態学的な研究は非常に少ない。これら一連のステロイド代謝経路の場を明らかにすることは、網膜内に存在する6種類の神経細胞とミューラー細胞の間におけるステロイド合成に関する役割を解明するだけでなく、網膜疾患モデル動物を用いた神経変性疾患の研究につながる基礎的研究として重要な意義があると考えられる。

(1). 網膜における一連のステロイド代謝経路の場を明らかにするために、ステロイド代謝酵素の発現を組織学的に解析する。また、網膜内で産生されるステロイドの変化についても検討する

(2). 胎生期から生後、および成熟期に至る発生過程に伴うステロイド代謝酵素の発現の変化について、調べる。さらに、胎生期に神経ステロイドを添加することにより、網膜の発達に対して神経ステロイドがどのような役割をするのかについて検討する。

(3). 網膜変性疾患のうち、神経節細胞のアポトーシスが原因の緑内障や虚血性網膜症、視細胞のアポトーシスが原因の視細胞変性症、さらに網膜剥離などの網膜変性の3つのタイプについて、これらの網膜疾患モデル動物や、実験的に網膜変性を誘発した動物モデルを用いてステロイド代謝酵素の発現と変化につい

て調べ、正常網膜と比較解析する。

(4). 網膜疾患モデル動物について、これらの実験結果を基に神経ステロイド添加やステロイド代謝酵素の強制発現などを行い、神経ステロイドを用いた神経保護・再生療法への新たな可能性について検討する。

3. 研究の方法

本研究の目的は、様々なタイプの神経細胞死を引き起こす網膜変性動物における神経ステロイドの動態を調べ、ステロイド合成酵素と産生される神経ステロイドがどのように関与しているのかを明らかにすること、さらに神経ステロイドの視機能調節に果たす機能的役割を明らかにすることにある。そのため、まず一連のステロイド代謝経路の統合的な解析を計画し、次いで網膜疾患動物を用いた実験を行う。

網膜変性疾患には、神経節細胞のアポトーシスを引き起こす緑内障や虚血性網膜症、遺伝性網膜疾患である網膜色素変性症などの視細胞のアポトーシスを引き起こす視細胞変性症、機械的外傷や網膜剥離など、様々なタイプがあり、それぞれ動物モデルや網膜変性を誘発する実験モデルが存在する。これら網膜変性動物において、ステロイド合成酵素と産生される神経ステロイドの、網膜変性のメカニズムへの関与について解明する。

(1). 各種ステロイド代謝酵素特異抗体の作製、およびその特異性の検討

ステロイド代謝経路に関与する酵素である 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD), 17α -hydroxylase/ $17,20$ -lyase (P450c17), 5α -reductase type-1, type-2, aromatase の特異抗体を作製する。免役したウサギから得られた抗血清を、アフィニティ精製した後、ウエスタンブロットにより抗体の特異性について検討する。ウエスタンブロ

ットには、ラット肝臓、精巣、卵巣などの組織ホモジネートをサンプルとして用いる。

また、それぞれのステロイド代謝酵素を発現するベクターを作製し、COS-1 培養細胞にトランスフェクションを行い、各種酵素を強制発現させて得た細胞抽出物をサンプルとして用いる。

(2). 各種ステロイド代謝酵素の網膜内における局在および発現時期の検討

作製した各種ステロイド代謝酵素に対する抗体を用いて免疫組織学的に正常網膜での局在について検討する。免疫陽性細胞については各種細胞のマーカーとなるマウスモノクローナル抗体を用いて蛍光二重染色により同定する。

発現時期の検討については、生後～成熟期のラット網膜から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により mRNA の発現を調べる。

4. 研究成果

(1). これまでに得た抗ステロイド代謝酵素抗体は、aromatase, 5α -reductase type I, および type II, 5β -reductase, 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HSD), 3β -HSD, CYP17であり、それぞれ動物組織ホモジネートを用いたウエスタンブロット法を行なった。また、 5α -reductase は type I, II といった isoform が存在するため各抗体の交差性の確認に、培養細胞にそれぞれのステロイド代謝酵素を強制発現させる系を作成し、それらを用いたウエスタンブロットにより検討をおこなっており、これによって抗体を用いた免疫組織化学法により各種ステロイド代謝酵素の網膜における発現、局在等を明らかにすることが可能となる。

(2). アンドロゲンやプロゲステロンの代謝に関する酵素である 3α -HSD について、成熟ラット網膜および生後の発生過程におけるラット網膜を用いた研究により、 3α -HSD は

形態学的に成熟されるまでの期間、神経節細胞や血管内皮細胞に発現し未成熟な網膜において細胞の分化・発達に関与し、成熟網膜のミュラー細胞に発現する 3α -HSD は、細胞の分化とは別の機能に関与していることが示唆された。

次に、神経ステロイド合成酵素の一つである、アンドロゲンやプロゲステロンの合成に関与する酵素 3β -HSD について、網膜を構成する6種類の神経細胞と、グリア細胞であるミュラー細胞のいずれの細胞に局在するのかを、成熟ラット網膜で検索した結果、視細胞の内節や内顆粒層の細胞、視神経細胞に存在することを明らかにした。

現在、その他のステロイド代謝経路に関与するすべての酵素についてステロイド代謝の場、さらに産生されるステロイドの変化について研究を継続的に進めており、これにより網膜における神経ステロイドの機能的役割の統合的解析、次いで変性網膜を用いた結果と比較検討することは、神経変性疾患の研究につながる基礎的研究として重要な意義があると考えられる。これらの正常網膜での結果を基にして、網膜変性疾患のモデル動物などを用いて、網膜変性過程におけるステロイド代謝酵素と産生される神経ステロイドの関与、作用機序の解明へと展開していくことを計画している。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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