

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22310041
 研究課題名（和文）
 発達期の神経毒性に対する脳由来ステロイドホルモンの保護作用
 研究課題名（英文）
 Protective effect of neurosteroids on developmental brains
 研究代表者
 山崎 岳（YAMAZAKI TAKESHI）
 広島大学・大学院総合科学研究科・教授
 研究者番号：30192397

研究成果の概要（和文）：

発達期のラット海馬へのメチル水銀やトリブチルスズによる神経毒性が、海馬の合成するエストラジオールによって軽減されることとその作用機序を明らかにした。これにより、毒性の脳内部位特異性が、ステロイドホルモン合成活性の部位特異性で説明できる可能性が示された。さらにトリブチルスズによる神経毒性の作用機序、それがプロゲステロンやアロプレグナノロンによって軽減されるメカニズム、脳内ステロイドの分布や変動を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Neurotoxic effect of methylmercury or tributyltin was attenuated by *de novo* synthesized estradiol in rat hippocampal organotypic slice culture. The self-protective function of the neurosteroid might be one of the possible mechanisms for the selective sensitivity of the brain to neurotoxicants. Neurotoxic mechanism of tributyltin, neuroprotective effect of progesterone and allopregnanolone, and distribution of steroids in rat brain were studied.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 7,200,000 | 2,160,000 | 9,360,000 |
| 2011年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 2012年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：神経毒性

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンであるエストラジオールとプロゲステロンは、強力な神経保護作用を持つ。従来は、これらはメスでは卵巣から供給され、オスでは精巣が分泌するテストステロンが脳内でP450aromによってエストラジオールに変換されることによって脳を保護すると考えられていた。

エストラジオールは脳内でも合成される。脳内で合成されるステロイドホルモンをニューロステロイドと呼ぶが、我々はニューロステロイドがコレステロールから合成されることを示し (*Brain Res.* 678, 1-9, 1995)、ラット海馬スライスを用いてエストラジオールが新規に合成されていることを示した (*Endocrinology* 150, 4260, 2009)。ニューロステロイド合成には部位特異性があり、海馬や視床下部、嗅球などで合成活性が高い。

脳の発達期には、性腺はほとんど性ステロイドを分泌しない。この時期の脳は、脳自身が合成するニューロステロイドで守られていると推定できるが、証明されていない。特にプロゲステロンの脳内での合成についてはほとんど報告例がない。

2. 研究の目的

- (1) 化学物質による中枢神経毒性の暴露時期特異性と部位特異性の原因の一つが、神経保護作用を持つステロイドホルモンの脳内濃度の不均一性ではないか、との仮説を検証する。
- (2) エストラジオールやプロゲステロンによる神経保護作用の分子機構について、特に有機金属の毒性と活性酸素種の関連に重点を置いて、明らかにする。

3. 研究の方法

発達期のラット脳から海馬スライスを

作製し、神経毒やステロイドホルモン、さまざまな阻害剤などを作用させてニューロステロイドによる神経保護作用と神経毒の発現機序を調べた。

ニューロステロイド合成酵素の mRNA 量の脳内分布を調べ、有機金属による神経毒性の暴露時期特異性と部位特異性が、脳内ステロイド濃度で説明可能かどうか解析を行った。

10日、3カ月、12カ月齢のラットの脳内と血清中のステロイドホルモンを定量し、脳内の合成活性を解析した。

ラットにトリメチルスズを腹腔内投与し、海馬のダメージとステロイドホルモン濃度の関連を追及した。

4. 研究成果

ラット海馬スライスを用いて、メチル水銀による神経毒性が、海馬の合成するエストラジオールによって軽減されること、その作用はエストロゲンレセプター α と β を介していることを明らかにした。この成果は、メチル水銀毒性の脳内部位特異性が、脳内のステロイドホルモン濃度や合成活性の部位依存的な差異に基づく可能性を示唆するものである。

環境汚染物質であるトリブチルスズによる神経毒性の発現メカニズムを明らかにした。海馬スライスにトリブチルスズを作用させると、細胞内の活性酸素種や脂質過酸化物質濃度が増加して細胞死が引き起こされた。細胞の活性酸素除去作用を高めると毒性が軽減された。さらに、トリブチルスズ毒性が、グルタチオン S-転移酵素活性の阻害によって引き起こされることを明らかにした。

続いて、そのトリブチルスズの神経毒性が、プロゲステロンで軽減されることを見出し、その作用機序を調べた。プロゲステロンの神経保護作用は、アロプレグナロンへと代謝されて発揮されること、GABA レセプターを介した作用であることを明らかにした。

10日、3カ月、12カ月齢のラット海馬と血清のエストラジオール、テストステロン、プロゲステロン濃度を質量分析によって定量した。10日齢から3ヶ月齢にかけて、海馬内で3種のステロイド濃度が全て上昇した。テストステロン、プロゲステロン濃度は血中濃度と良く相関していたが、エストラジオールは、血中より脳内の方が高かった。また、脳内のテストステロン濃度が変動してもエストラジオール濃度は変化せず、脳内での合成が独自に調節されていることが示唆された。

10日齢ラットの脳内エストラジオール濃度の分布を、RIAで調べた。海馬は小脳や大脳の2倍以上高かった。同じく10日齢ラットのステロイドホルモン合成酵素のmRNAを定量したところ、エストラジオール合成酵素であるP450aromのmRNA量が海馬だけ5倍以上有意に高く、海馬でエストラジオール合成活性が高いことが示唆された。

ラットにトリメチルスズを腹腔内投与したところ、海馬のCA3領域のニューロンの特異的な脱落が観測された。トリメチルスズの投与は、体重の減少、副腎重量の増加、新規環境での自発運動量（オープンフィールド実験）の増加を引き起こしたが、脳や海馬の重量には影響しなかった。海馬のエストラジオールを定量したところ、溶媒投与ラットに比較してエストラジオール量が約2倍に増加しており、海馬へのダメージによって、海馬を保護するエストラジオールの合成が活性化されたと推定した。

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 24 件)

1. Yamazaki T, Yamamoto M, Ishihara Y, Onizaki M, Komatsu S, Munetsuna E, Ishida A, Kawato S, Mukuda T. *De novo* synthesized estradiol protects against methylmercury-induced neurotoxicity in

cultured rat hippocampal slices. *Pros One*. (査読あり) 8:e55559 (2013).

2. Fujii H, Sato-Akaba H, Emoto M, Itoh K, Ishihara Y, Hirata H. Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*. (査読あり) 31:130-8 (2013).

3. Oki K, Kopf PG, Campbell WB, Luis Lam M, Yamazaki T, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP. Angiotensin II and III Metabolism and Effects on Steroid Production in the HAC15 Human Adrenocortical Cell Line. *Endocrinology* (査読あり) 154:214-21 (2013).

4. Ishihara Y, Kawami T, Ishida A, Yamazaki T. Allopregnanolone-mediated protective effects of progesterone on tributyltin-induced neuronal injury in rat hippocampal slices. *J Steroid Biochem Mol Biol*. (査読あり) 135:1-6 (2013).

5. Sueyoshi N, Nimura T, Onouchi T, Baba H, Takenaka S, Ishida A, Kameshita I. Functional processing of nuclear Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP-N): evidence for a critical role of proteolytic processing in the regulation of its catalytic activity, subcellular localization and substrate targeting in vivo. *Arch Biochem Biophys*. (査読あり) 517:43-52 (2012).

6. Takeda K, Ishida A, Takahashi K, Ueda T. Synaptic vesicles are capable of synthesizing the VGLUT substrate glutamate from α -ketoglutarate for vesicular loading. *J Neurochem*. (査読あり) 121:184-96 (2012).

7. Ishihara Y, Tsuji K, Ishii S, Kashiwagi K, Shimamoto N. Contribution of reductase activity to quinone toxicity in three kinds of hepatic cells. *Biol Pharm Bull*. (査読あり) 35:634-8 (2012).

8. Ishihara Y, Kawami T, Ishida A, Yamazaki T. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Int*. (査読あり) 60:782-90 (2012).

9. **Ishihara Y**, Shimamoto N. Sulfaphenazole attenuates myocardial apoptosis accompanied with ischemia-reperfusion by suppressing the expression of BimEL and Noxa. *J Pharmacol Sci.* (査読あり) 119:251-259 (2012).
10. Onouchi T, Sueyoshi N, **Ishida A**, Kameshita I. Phosphorylation and activation of nuclear Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP-N/PPM1E) by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI). *Biochem Biophys Res Commun.* (査読あり) 422:703-9 (2012).
11. Baba H, Sueyoshi N, Shigeri Y, **Ishida A**, Kameshita I. Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP) by oxidation/reduction at Cys-359 *Arch Biochem Biophys.* (査読あり)526:9-15 (2012).
12. Hama S*, **Ishihara Y***, Watanabe M, Danjo S, Nakamura Y, Itoh K. *: equally contributed. Effects of sulfaphenazole after collagenase-induced experimental intracerebral hemorrhage in rats. *Biol Pharm Bull.* (査読あり) 35:1849-53 (2012).
13. **Ishihara Y**, Hamaguchi A, Sekine M, Hirakawa A, Shimamoto N. Accumulation of cytochrome P450 induced by proteasome inhibition during cardiac ischemia. *Arch Biochem Biophys.* (査読あり) 527:16-22 (2012).
14. Nehira T, Ishihara K, Matsuo K, Izumi S, **Yamazaki T**, **Ishida A**. A sensitive method based on fluorescence-detected circular dichroism for protein local structure analysis. *Anal Biochem.* (査読あり) 430:179-184 (2012)
15. Higo S, Hojo Y, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ooishi Y, Murakami G, Mukai H, **Yamazaki T**, Nakahara D, Barron A, Kimoto T, Kawato S. Endogenous synthesis of corticosteroids in the hippocampus. *PLoS One.* (査読あり) 6:e21631. (2011)
16. Munetsuna E, Hattori M, Sakimoto Y, **Ishida A**, Sakata S, Hojo Y, Kawato S, **Yamazaki T**. Environmental enrichment alters gene expression of steroidogenic enzymes in the rat hippocampus. *Gen Comp Endocrinol.* (査読あり) 171:28-32 (2011).
17. Kaneko K, Sugiyama Y, Yamada Y, Sueyoshi N, Watanabe A, Asada Y, **Ishida A**, Kameshita I. CoPK32 is a novel stress-responsive protein kinase in the mushroom *Coprinopsis cinerea*. *Biochim Biophys Acta.* (査読あり) 1810:620-629. (2011).
18. **Ishida A**, Kameshita I. In-Gel Protein Phosphatase Assays and Other Useful Methods for the Detection of Protein Phosphatase Activities. *Anticancer Agents Med. Chem.* (査読あり) 11:47-53 (2011).
19. **Ishihara Y**, Ishii S, Sakai Y, Yamamura N, Onishi Y, Shimamoto N. Crucial role of cytochrome P450 in hepatotoxicity induced by 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in rats. *J Applied Toxicol.* (査読あり) 31:173-8 (2011).
20. **Ishihara Y**, Takeuchi K, Ito F, Shimamoto N. Dual regulation of hepatocyte apoptosis by reactive oxygen species: increases in transcriptional expression and decreases in proteasomal degradation of BimEL. *J Cell Physiol.* (査読あり) 226:1007-16 (2011).
21. **Ishihara Y**, Ito F, Shimamoto N. Increased expression of c-fos by ERK activation under sustained oxidative stress elicits BimEL upregulation and hepatocyte apoptosis. *FEBS J.* (査読あり) 278:1873-81 (2011).
22. **Ishihara Y**, Katayama K, Sakabe M, Kitamura M, Aizawa M, Takara M, Itoh K. Antioxidant properties of rare sugar D-allose: Effects on mitochondrial reactive oxygen species production in Neuro2A cells. *J Biosci Bioeng.* (査読あり) 122:638-642 (2011)
23. Nishimoto K, Nakagawa K, Li D, Kosaka T, Oya M, Mikami S, Shibata H, Itoh H, Mitani F, **Yamazaki T**, Ogishima T, Suematsu M, Mukai K. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *J Clin Endocrinol Metab.* (査読あり) 95:2296-2305 (2010)
24. Kitamura S, Sugihara K, Fujimoto N, **Yamazaki T**. Organophosphates as the endocrine disruptors. In

“ *Anticholinesterase pesticides* ” eds. Satoh T, Gupta RC, (査読あり) Wiley, pp.189-202 (2010)

[学会発表] (計 17 件)

1. 富士谷法子「グルコース・酸素欠失条件により引き起こされる神経細胞死に対するステロイドホルモンの保護作用」第 133 年会日本薬学会 2013 年 3 月 27-30 日 横浜
2. 石原康宏「トリブチルスズにより引き起こされる海馬神経障害の機序」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日福岡
3. 根平達夫「蛍光検出円二色性(FDCD)測定装置によるタンパク質立体構造ピンポイント解析の可能性」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日福岡
4. 石田敦彦「C 末端切断型ヒト CaM キナーゼフォスファターゼ N(CaMKP-N/PPM1E)の発現と酵素学的性質」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日福岡
5. T.Yamazaki “Neurosteroid, regional steroidogenesis” The 50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450, Dec. 2-3, 2012 Fukuoka (招待講演)
6. T.Yamazaki “Neuroprotective effect of female sex steroids against neurotoxicity of organo-metallic compounds in rat hippocampal slice culture” 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer Nov 15-17, 2012 Kanazawa
7. 石原康宏「チトクロム P450 阻害によるキノン肝毒性の亢進」第 51 回日本薬学会中国四国支部学術大会 2012 年 11 月 10-11 日松江 (奨励賞受賞講演)
8. 山崎 岳「海馬での神経ステロイドの合成と神経保護作用」第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 18-22 日名古屋 (招待講演)
9. 石原康宏「アルツハイマー症モデルマウスにおける脳内酸化還元状態と認知機能の相関」第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会 2012 年 6 月 7-8 日徳島
10. 山崎 岳「メチル水銀毒性に対するニューロステロイドによる神経保護作用」第 153 回日本獣医学会学術集会 2012 年 3 月 27-29 日大宮 (招待講演)

11. T.Yamazaki “ Neuroprotective effect of hippocampus-synthesized estradiol against neurotoxicity of methylmercury” 1 *Neuroscience* 2011 Nov 15-18, 2011 Washington DC, USA

12. 山崎 岳「脳由来ステロイドホルモンによる神経保護作用」第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21-24 日京都 (招待講演)
13. 大山勤「異なる飼育環境におけるトリメチルスズの中枢神経毒性評価」第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 14-17 日横浜
14. 北條 泰嗣「ラット海馬シナプスにおける性ホルモンの合成と局所分泌」第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 14-17 日横浜
15. 山崎 岳「メチル水銀毒性とステロイドホルモン」第 151 回日本獣医学会学術集会 2011 年 3 月 30-4 月 1 日東京 (招待講演)
16. 石原 郁「蛍光検出円二色性 (FDCD) を用いたタンパク質立体構造解析のピンポイント検出の試み」第 83 回日本生化学会大会 2010 年 12 月 7-10 日神戸
17. 大山勤 “Effect of housing conditions on neurotoxicity of trimethyltin in rat brain” 第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2-4 日神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 岳 (YAMAZAKI TAKESHI)
広島大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号：30192397

(2) 研究分担者

坂田 省吾 (SKATA SHOGO)
広島大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号：50153888

古武 弥一郎 (KOTAKE YAICHIROU)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授
研究者番号：20335649

石田 敦彦 (ISHIDA ATSUHIKO)
広島大学・大学院総合科学研究科・准教授
研究者番号：90212886

椋田 崇生 (MUKUDA TAKAO)
広島大学・大学院総合科学研究科・助教
研究者番号：60346335

石原 康宏 (ISHIHARA YASUHIRO)
広島大学・大学院総合科学研究科・助教
研究者番号：80435073
(H23～)

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：