

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590236

研究課題名(和文)神経ステロイドの合成と作用機構に関する組織化学的、機能形態学的解析

研究課題名(英文)Histochemical and biochemical study of the production and function of neurosteroid

研究代表者

石村 和敬 (ISHIMURA, Kazunori)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90112185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系で独自に産生される神経ステロイドの生理的役割を明らかにするため、脈絡叢におけるステロイド合成能について探索した。RT-PCR検索により、脈絡叢でステロイド合成酵素が発現していることを確認した。脳脊髄液中のステロイドは血液より少ないことから、これらの酵素は脳脊髄液中ステロイド濃度の恒常性の維持に関与している可能性がある。また、ストレス負荷による海馬の神経細胞死に対する卵巣摘除の影響を検討した。その結果、卵巣摘除後ストレス負荷により神経細胞は減少するものの、ラットの系統によって差があった。認知症の発症に性ホルモンとストレスが一部起因していること、さらに個体差が関係する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological role of neurosteroids that are produced in the central nervous system, we analyzed the expression of steroid synthesizing enzymes in the choroid plexus with RT-PCR. The results showed that several enzymes were expressed in the choroid plexus epithelial cells. The concentration of steroid hormones in cerebrospinal fluid is much lower than that in blood plasma, the steroidogenic enzymes expressed in the choroid plexus may play roles in homeostasis of steroids in the cerebrospinal fluid. We examined the effect of ovariectomy on hippocampal neuronal cell death of rats which were under heavy physical stress. The results showed that the nerve cells decreased in number by the stress in ovariectomized Fisher rat, but not in Wistar ones. There might be a lineage difference for neuronal cell viability in the rat under a combination of stress and estrogen deficiency.

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：海馬 神経細胞 神経ステロイド ステロイド合成酵素 免疫組織化学 酵素発現

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の内分泌組織で産生され、血流を介して全身の器官・組織に作用し、生体機能に多彩な効果を及ぼす。神経系に対しても、これらの内分泌腺で産生されたものが中枢神経系内に入り、そこでそのままあるい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の key enzyme であるコレステロール側鎖切断酵素が存在し、ステロイドが末梢の内分泌器官とは独立して神経組織内でも生合成されることがわかり、このような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」という名称が与えられた。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ままに進んできた感があり、神経ステロイドの存在と作用機序の詳細は依然として議論が多く、推測の域に留まっているというのが実情である。このような状況のもと、申請者は、神経ステロイドの生理的意義を解明するためには、ステロイドホルモンを合成する酵素の局在だけでなく、その発現の調節機構、さらには受容体の局在とその発現機序、ステロイドの欠乏による神経細胞もしくはグリア細胞の活動性や生存性の変化、個体レベルでの行動様式の変化などを統一的に捉えることが必要であると考える研究を行ってきた。これまでに、海馬におけるステロイドホルモンについて明らかにできたことは以下の通りである。ステロイド合成酵素 (P450_{scc}、3 β -HSD、17 β -HSD、P450_{c17}、アロマトラーゼ、5 α -リダクターゼ)のうち、アロマトラーゼはCA1の神経細胞に存在する。エストロゲン受容体(ER)は神経細胞に存在する。ラットについて、卵巣摘除をするとアロマトラーゼは1週間後に消失

し、2週間後に復活する。海馬CA1の神経細胞はエストロゲンを産生する能力を持つと同時にエストロゲンの標的でもある。以上のように、酵素の局在と発現に関してある程度の知見を得ることはできたが、なお神経ステロイドの役割について不明の点が多いのが実情である。特に、海馬は学習・記憶に重要な役割を担うことがわかっているほか、その学習・記憶機能が性ステロイドによって影響を受けるという興味深い知見が得られていることもあり、本研究によって海馬における性ステロイドの機能の一端を明らかにすることができるものと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は 神経ステロイド、すなわち神経組織そのものが産生するステロイドホルモンの生理的意義を明らかにすることである。具体的には、ラット及びマウスの海馬、嗅球などにおいて、ステロイドホルモンの合成及び代謝に関わる諸酵素の局在とその発現調節機構、生合成される各ステロイドホルモンの受容体の局在とその発現調節機構について、形態学を基礎として、生化学的、薬理的に明らかにし、同時に正常およびステロイドホルモン欠乏状態での行動の変化を行動生理学的に解析して神経ステロイドの役割を解明することを目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験は Wistar ラットおよび Fischer344 ラットを用いて行った。それぞれの系統について生後 2 カ月齢の雌ラットを 4 群に分けた。偽手術・ストレスなしグループ、偽手術・ストレスありグループ、卵巣摘除・ストレスなしグループ、卵巣摘除・ストレスありグループに分け解析を行った。いずれのグループも、餌と水を拘束時間以外は自由に与え

た。術後 1 週間からストレス負荷を開始した。ストレス負荷は毎日 6 時間、ステンレス網内に拘束し、さらに身体の一部が水につかるようにして行った。これを 3 週間続けた。

また、2 カ月齢の雄の Wistar ラットを用いて、偽手術を施したグループ、精巣摘除グループを作製した。さらに、それぞれの群を 2 グループに分け、一方には 7 日間にわたり 1 日 1 回テストステロン (2mg/kg) を皮下投与し、もう一方には溶媒である sesame oil を皮下投与した。

(2) 組織化学的解析

麻酔後 4% PFA 溶液 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晚浸漬固定した。ピプラトームにより 30 μ m 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。

(3) 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) 脈絡叢におけるステロイド合成酵素の発現解析

脈絡叢は脳脊髄液を産生する組織であり、ステロイドホルモンによる脳への影響とは、脈絡叢及び脳脊髄液を介したものである可能性もある。また、脈絡叢にはエストロゲン受容体が、 $\text{ER}\alpha$ の両サブタイプとも存在することがわかっているが、その生理的な役割は明らかになっていない。そこで、脈絡叢におけるステロイドホルモン合成能について

探索した。正常及び去勢雄ラットの脈絡叢において、性ステロイドの合成および代謝に関わるコレステロール側鎖切断酵素、17 位水酸化酵素、3 位水酸基脱水素酵素、17 位水酸基脱水素酵素、芳香化酵素 (アロマターゼ)、5 α リダクターゼの遺伝子発現を RT-PCR で検索したところ、これらの酵素がいずれも脈絡叢に存在することが確認できた。さらに、17 β -水酸基脱水素酵素の発現について免疫組織化学的に調べた結果、脈絡叢上皮細胞に存在していることがわかった (図 1)。脳脊髄液中のステロイドホルモン濃度は血液中のそれより低いことから、脈絡叢におけるステロイドホルモン合成酵素は、可逆的な反応によってステロイドホルモンを代謝し、脳脊髄液を介した脳全体の恒常性の維持に関与している可能性が考えられる。

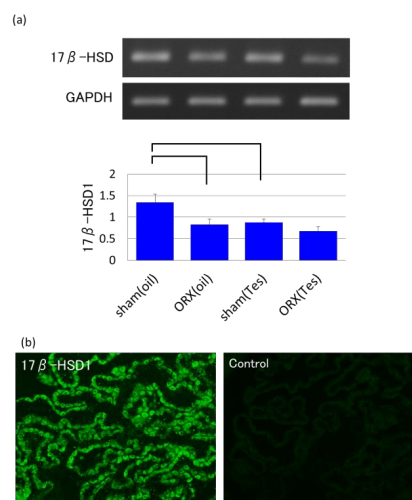


図 1 脈絡叢における 17 位水酸基脱水素酵素 (17 β -HSD) の発現解析。(a) 精巣摘除による 17 β -HSD 発現の変化。(b) 脈絡叢

(2) ストレス負荷による神経細胞死に対するステロイドホルモンの影響

認知症の発症には記憶をつかさどる海馬の神経細胞の障害が関係していると考えられ、一方エストロゲンには、神経細胞保護の作用が知られている。しかし、すべての女性で閉

経後に認知症が発症するわけではないので、他の要因もあると考えられる。そこで、ストレス負荷により引き起こされる海馬神経細胞の脱落が、卵巣摘除によりどのような影響を受けるかについて解析を行った。Fischer rat を用いて卵巣摘除後に慢性ストレスを加えたところ、海馬の神経細胞が減少することを見出した。しかし同様の処置を Wistar rat にも加えたところ、その影響は顕著ではなかった(図2)。

また、ステロイド合成酵素およびエストロゲン受容体発現が関与しているかについて免疫組織化学的手法により形態学的解析を行った。雌性のウィスターラットとフィッシャーラットに対し、卵巣摘除後にストレスを負荷し、アロマターゼとエストロゲン受容体の発現について免疫染色を行い比較したところ、系統間、並びにストレス負荷の有無による差は見られず、局在は同様であった。以上のことから、卵巣摘除と慢性ストレスを組み合わせると、ラットの系統によっては海馬の神経細胞の減少が強く引き起こされることが判明した。また、ストレス負荷後海馬で生存している神経細胞は、アロマターゼおよびエストロゲン受容体を発現し、エストロゲンの神経保護作用を受けている可能性を示唆している。

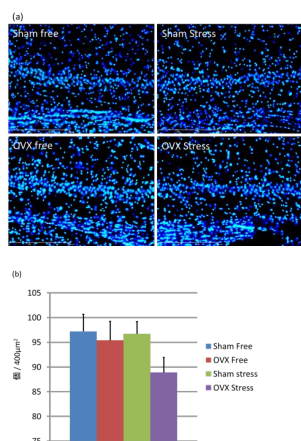


図2 ストレス負荷による海馬 CA3 神経細胞の神経細胞死と卵巣摘除が神経細胞死に与える影響。(a)精巣摘除後ストレス負荷の CA3 における DAPI 染色像。(b) 神経細胞数の比較。

以上のことから、脈絡叢のステロイド合成酵素は、脳脊髄液中のステロイドホルモン濃度の恒常性を保つために末梢由来のステロイドホルモンを代謝している可能性が示唆された。また、卵巣摘除後ストレス負荷による海馬の神経細胞の減少は、ラットの系統によって影響の大きさが異なることから、認知症の発症に性ホルモンの減少とストレスの組み合わせが一部起因していることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Kazuyoshi Kitaoka, Noriyuki Shimizu, Koji Ono, Sachiko Chikahisa, Madoka Nakagomi, Koichi Shudo, Kazunori Ishimura, Hiroyoshi Séi, Kazuo Yoshizaki, The retinoic acid receptor agonist Am80 increases hippocampal ADAM10 in aged SAMP8 mice, *Neuropharmacology*, 査読有, 72 巻, 2013, 58-65

Sun Mi Kim, Takashi Sakai, Huy Van Dang, Nam Hoang Tran, Koji Ono, Kazunori Ishimura, Kiyoshi Fukui, Nucling, a Novel Protein Associated with NF- κ B, Regulates Endotoxin-induced Apoptosis in vivo, *The Journal of Biochemistry*, 査読有, 153 巻, 2013, 93-101

小野公嗣, 宍戸裕二, 朴煥埼, Rabab M. Abou El-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, 統合失調症における D-アミノ酸化酵素の病態生理学的役割: ヒトおよびラット脳内における組織化学的発現解析, *ビタミン*, 査読有, 86 巻, 2012, 395-397

[学会発表](計4件)

矢野 明彦、脈絡叢におけるステロイドホルモン合成酵素の発現解析、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年03月28日-30日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県)

Koji Ono, Change in steroidogenic enzymes expression in the rat hippocampus after ovariectomy, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012年08月26日-29日、国立京都国際会館(京都府)

小野公嗣、ラット海馬における神経ステロイド合成酵素発現に対する卵巣摘除の影響、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012年3月26日-28日、山梨大学甲府キャンパス(山梨県)

小野公嗣、ラット海馬におけるステロイド合成酵素は卵巣摘除により変動する、日本解剖学会第66回中国・四国支部学術集会、2011年11月12日-13日、徳島大学蔵本キャンパス(徳島県)

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