

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592584

研究課題名(和文)RNAi法を用いた網膜における神経ステロイド代謝酵素の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of steroid metabolizing enzymes in the rat retina

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：神経ステロイドは脳内において合成されるステロイドで、末梢内分泌器官と同様に生理活性を示す。近年網膜においても種々のステロイドが合成されることが報告され、神経ステロイドが網膜の神経細胞の発達と分化およびその機能調節に重要な役割を果たすことが示唆されている。本研究では、網膜で産生される神経ステロイドが、網膜の発生と視機能調節にどのように関与しているのかを明らかにするために、ステロイド代謝酵素のうち、アンドロゲンやプロゲステロンの代謝に関与する酵素である5 α -リダクターゼおよび5 β -リダクターゼの特異抗体を作製し、ラット網膜におけるこれら酵素の局在を免疫組織学的に検討した。

研究成果の概要(英文)：Neurosteroids are synthesized from cholesterol or other steroidal precursors in the central nervous system. Recent studies have shown that neurosteroids are produced in the retina and affect neuronal functions by modulating neurotransmissions. However, it is unclear where the steroid metabolizing enzymes are located in the retina and how they contribute to the retinal physiology. The enzymes 5 α -reductase and 5 β -reductase catalyze the transformation of testosterone and progesterone into 5 α -reduced and 5 β -reduced metabolites, respectively. Among androgens, 5 α -dihydrotestosterone, which is produced from testosterone by the enzyme steroid 5 α -reductase, is more potent androgenic effects than testosterone. Here, we investigated the localization of the steroid metabolizing enzymes in the rat retina by using immunohistochemistry with specific antibodies.

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、内的要因および外部刺激などの外的要因に反応して副腎や生殖器などの末梢内分泌器官で分泌され、血行性に全身の標的器官に送られ生体内の恒常性維持などの生理作用を発揮する。ステロイドは、標的細胞内にあるステロイド受容体と結合し、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、目的の遺伝子に作用してその生理機能を発揮する。これまでに、脳内においても、末梢内分泌器官と同様に、プロゲネロン、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、プロゲステロンを基質として合成されるアロプレグナロンは従来知られている細胞内のステロイド受容体と結合せず、細胞膜に存在する GABA_A 受容体と結合し、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 GABA_A 受容体を介してスパイン新生、樹状突起の伸長、シナプスの形成などの神経細胞の増殖作用を示すことが分かっている。」さらに近年、グルタミン酸による興奮毒性に対してグルココルチコイドが神経保護作用を示すことや、エストロゲンが脳虚血後の細胞死の抑制やアルツハイマー病の発症を抑制することから、神経変性疾患での神経ステロイドによる神経保護作用が大きな注目を集めている。

網膜におけるステロイドの産生については以前から示唆されているが、ほとんど研究が進んでおらず、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が神経節細胞に存在することが報告されている程度である。網膜は、視覚機能をつかさどる感覚器としての側面を持つ一方、発生学的には外胚葉に由来する中枢神経系の一部でもあることから網膜においてもここで合成されるステロイドが網膜内の神経細胞に対して脳と同様な作用を示すことが推測される。実際、虚血性網膜症や緑内障で見られる一過性の興奮毒性による神経細胞死において、プロゲステロン、デヒドロエピアンドロステロン、エストロゲンなどのステロイドがグルタミン酸濃度を調節することによって神経細胞死の進行を遅延させたり、光傷害によって生じた視細胞の細胞死に対してグルココルチコイドが保護作用を示すなど、網膜内での神経細胞死に対する保護作用が報告されている。

しかしながら、網膜において、神経ステロイドがいつ、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く、神経ステロイドが単一の細胞内で合成されるのか、近隣する細胞の相互連絡によって合成されるのか、また網膜内で合成されるステロイドの機能についても十分には解明されていない。

2. 研究の目的

網膜において胎生期から生後および成熟期、老齢期に至る一連の発生過程における神経ステロイド代謝酵素の局在および経時的発現量の変化を組織学的手法、分子生物学的手法を用いて調べ、さらに RNAi 法とよばれる標的遺伝子の発現を抑制させて遺伝子の機能を解析する手法により、一連の発生過程での網膜神経細胞、グリア細胞に対するステロイド代謝酵素の機能を統合的に解析することを目的としている。

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ラー細胞のうち、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、網膜内に存在する神経細胞とグリア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、神経ステロイドの視機能調節に果たす役割の解明にもつながる。

RNAi 法は、相補的な二本鎖 RNA を用いることによって、細胞や生体内の特異的な標的 mRNA を分解することにより、コードされているタンパク質の発現をノックダウンして遺伝子の機能を解析する方法である。通常、遺伝子の機能阻害の研究には機能欠損型の遺伝子を導入することでノックアウト動物を作成しなければならなかったが、RNAi 法の開発により、標的遺伝子の塩基配列情報さえあれば siRNA を化学合成し、トランスフェクション法などで細胞、組織内に導入することで比較的簡便な方法で遺伝子の機能を調べることが可能となった。この手法を用いて、それぞれのステロイド代謝酵素の発現を抑制することにより、網膜内で合成される神経ステロイドの、網膜神経細胞とグリア細胞に対する発生過程における役割、視機能調節にはたす役割を解析する。

(1). 網膜においてステロイドが代謝される一連の経路の局在を明らかにするために、ステロイド代謝酵素の発現を特異抗体による免疫組織化学と *in situ* hybridization 法を用いて、組織学的に解析する。また、網膜内の酵素の発現量の変化についても、ウエスタンブロットおよび real time PCR を用いて解析する。

(2). 胎生期から生後早期および成熟期、老齢期に至る発達過程に伴うステロイド代謝酵素の発現の変化、および合成される神経ステロイドを調べる。

(3). RNAi 法を用いて、発生過程における各々のステロイド代謝酵素の発現を抑制することにより、網膜内で合成される神経ステロイドの、発生過程における網膜組織形成に対する役割、視機能調節に果たす役割を解析する。

3. 研究の方法

本研究では、網膜において産生される神経系ステロイドの一連の代謝経路をステロイドの一連の代謝経路を、ステロイド代謝酵素の局在と発現動態を統合的に解析することによって、網膜の発生とし機能調節に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を目的としている。さらに、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の発現と変化を調べ、正常網膜と比較解析する。このような目的のために、ステロイド代謝酵素特異抗体を用いた組織化学的手法、およびウエスタンブロットなどの分子生物学的手法を駆使して研究を行う。さらにステロイド代謝酵素の遺伝子機能の解析には、近年広く用いられるようになった強力な遺伝子解析法である RNAi 法を用いて行う。

(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のうちアンドロゲンやプロゲステロンの合成・代謝に関与する酵素である1型5-リダクターゼ、2型5-リダクターゼ、および5-リダクターゼの特異抗体を作製する。免疫したウサギから得られた血清を、アフィニティ精製して抗体を得る。得られた抗体は、ウエスタンブロットにより特異性の検討を行う。ウエスタンブロットには、ラット肝臓、精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特異抗体を用いて免疫組織学的にラット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網膜内の各種神経細胞およびグリア細胞であるミュラー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細胞を同定する。発現時期の検討については、生後から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). 本研究期間に得た抗ステロイド代謝酵素抗体は、アンドロゲンやプロゲステロンの合成・代謝に関与する酵素である1型5-リダクターゼ、2型5-リダクターゼ、および5-リダクターゼ抗体であり、それぞれの抗体の特異性についてウエスタンブロット

法を用いて検討した。

5-リダクターゼ

ラット肝臓組織の抽出タンパクをサンプルとしてウエスタンブロット解析を行った。一次抗体として作製した5-リダクターゼ抗体と免疫前血清を用いたところ、5-リダクターゼ抗体を使用したレーンにのみ単一のバンドが検出された。COS-1 細胞に5-リダクターゼ発現ベクターとコントロールとしてベクターのみをトランスフェクションし24時間後に回収した細胞抽出液をサンプルとしてウエスタンブロット解析を行った(一次抗体として5-リダクターゼ抗体を用いた)。5-リダクターゼ発現ベクターを強制発現させた細胞で分子量35kDa付近に単一のバンドが認められた。ラット肝臓組織、COS-1 培養細胞を用いた2つの解析結果とも、5-リダクターゼ抗体は、同じ高さの位置(分子量)に単一のバンドを検出した。

5-リダクターゼ

アンドロゲンやプロゲステロンの合成・代謝に関与する酵素である5-リダクターゼは1型、2型の2つのアイソザイムが存在し、その塩基数、分子量も非常に近い。抗体の特異性およびそれぞれのアイソザイムとの交差性の確認のため、GFP 発現ベクターにそれぞれのステロイド代謝酵素の遺伝子を導入し、GFP との融合タンパクを発現する系を作製し、これをCOS-1 培養細胞に発現導入して得られた細胞抽出液をサンプルとしてウエスタンブロット解析を行った。

1型5-リダクターゼ抗体を用いた解析では、1型5-リダクターゼ-GFPを強制発現させた細胞でのみ単一のバンドが検出された。2型およびGFPを発現させた細胞ではバンドは認められなかった。

2型5-リダクターゼ抗体を用いた解析では、2型5-リダクターゼ-GFPを強制発現させた細胞でのみ単一のバンドが検出された。1型およびGFPを発現させた細胞ではバンドは認められなかった。

それぞれの抗体での検出の後、メンブレンから抗体を除去後、GFP 抗体により、それぞれ1型、および2型5-リダクターゼ-GFP 融合タンパクの発現についても確認した。

以上の結果は、作製した5-リダクターゼ抗体、1型および2型5-リダクターゼ抗体はそれぞれに特異的な抗体であることを示唆し、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合成・代謝に関与する酵素である1型5-リダクターゼ、2型5-リダクターゼ、および5

-リダクターゼについて、作製した特異抗体を用いて免疫組織学的に成熟および生後の発達過程におけるラット網膜における局在について検討を行った。

5 -リダクターゼ

ラット正常網膜における 5 -リダクターゼ陽性反応は、成熟ラットではグリア細胞であるミュラー細胞および視細胞に認められ、これらの陽性反応は、生後 2 週頃から継続して観察された。また、生後 1 日の未成熟な網膜の神経節細胞層に 5 -リダクターゼの陽性反応が認められ、神経節細胞の陽性反応は生直後から 3 週頃まで観察され以後次第に減少した。内顆粒層のアマクリン細胞にも陽性反応が 2 週から 3 週で認められたが、神経節細胞と同様に 3 週以後減少した。

5 -リダクターゼ

成熟ラットの網膜において、1 型 5 -リダクターゼは視細胞層の外節から神経節細胞層にかけて広い範囲で陽性反応を示した。一方 2 型 5 -リダクターゼは視細胞層の内節、外顆粒層、内顆粒層、内網状層、神経節細胞層に 1 型 5 -リダクターゼ陽性反応とは一部異なる反応を示した。また、1 型および 2 型 5 -リダクターゼとも生後 1 日の未成熟な網膜の神経節細胞層や顆粒細胞層に陽性反応が認められ、これらの陽性反応は生直後から 2 週まで観察された。生後 3 週以後では成熟ラット網膜とそれぞれ同じ発現パターンを示した。

これらの結果から、5 -リダクターゼ、1 型および 2 型 5 -リダクターゼによって代謝される神経ステロイドが、脳内と同様に様々な神経機能の調節に関与していることが示唆された。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についての研究を継続的に進めており、これによって網膜における神経ステロイドの機能的役割を明らかにすることは今後の網膜変性疾患などの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。また、これまで得られた研究データを基に現在、網膜における RNAi 法を用いた実験系を確立しているところである。

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)

[学会発表](計 2 件)

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 -リダクターゼのラット網膜における発現、日本解剖学会、2014 年 3 月 29 日、自治医科大学

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 -リダクターゼのラット網膜における発現局在、日本解剖学会、2012 年 3 月 28 日、山梨大学

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

(2) 研究分担者

鶴尾 吉宏 (TSURUO Yoshihiro)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：90207449