

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860764

研究課題名(和文) 副腎髄質の発生分化における副腎皮質由来の 5ステロイドの役割の検討

研究課題名(英文) Identifying a role of delta-5 steroids from adrenal cortex for development of adrenal medulla

研究代表者

滝島 茂 (Takishima, Shigeru)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：70648146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：副腎髄質のモデルとしてSK-N-BE細胞を用いたところ、pregnenolone, 17-OH pregnenolone は有意にSK-N-BE細胞の増殖を20%程度促進した。一方DHEAは20 μ Mで70%という強く増殖抑制を起こすことが判明した。遺伝子発現の変化の検討を行ったところ、DHEAによりNestinの発現が通常に比べ2倍近く発現が増加することが判明した。Nestinは神経外胚葉前駆細胞特有のフィラメントであるが、近年では核内への情報伝達、細胞代謝機能への関与が示唆されている。5ステロイドは、こうした機構を介して、神経細胞の増殖分化を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For elucidating the role of delta-5 steroid for neurogenic cells, we used SK-N-BE cells as a model of human neurogenic cells. Although, Pregnenolone and 17-OH pregnenolone significantly activated the proliferation of the cells by 20%, DHEA strongly suppressed by 70%, suggesting that delta-5 steroids regulate the proliferation of neurogenic cells. In order to clarify the molecular mechanisms, we evaluated the change of the genes in SK-N-BE cells by delta-5 steroids. DHEA increased the expression of Nestin twice. Nestin is a filament protein and specifically expressed in neurogenic ectoderm cells, and recently it has been suggested to have a role for signal transduction into nucleus and for cell metabolism. We speculate that delta 5 steroids regulate the differentiation and the proliferation of neurogenic cells via those mechanisms.

研究分野：小児科学

キーワード：細胞分化 副腎髄質 5ステロイド

1. 研究開始当初の背景

副腎は発生学的に全く由来の異なる、内側の髄質(adrenal medulla)と、それを取り囲む外側の皮質(adrenal cortex)からなっている。副腎皮質は中胚葉性の細胞由来で、副腎髄質は外胚葉性の交感神経母細胞に由来するクロム親和細胞が皮質に侵入し、副腎皮質に隣接して形成される。副腎髄質細胞の起源は神経提由来であるが、交感神経系を支配するカテコールアミンを分泌する内分泌細胞に分化しているという特長をもつ。以前より副腎髄質の発生、分化に副腎皮質の存在が必要であることが知られていた。これらの報告は主に Glucocorticoid 作用によるものと理解されていた(Anderson DJ et al, Cell. 1986 Dec 26;47(6):1079-90.)

一方、胎児副腎とよばれる未分化の副腎皮質では 3 HSD の活性が生理的に低く、生体内に必須であるコルチゾルよりも中間代謝産物である 5 系ステロイド産生に有利に働く。体内における 5 ステロイドの明確な役割は明らかでなく、その生理的意義は乏しいと考えられている。しかしこれらの胎児副腎の機能の偏りは 5 系ステロイドがなんらかの形で胎内の発生に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。これを裏付けるように、近年、代表的な 5 ステロイドである progesterone が zebrafish において microtubule を安定させ、epiboly と呼ばれる初期胚の発生分化過程に重要な役割を果たしているという報告がされた(Hsu HJ et al, Nature. 2006 Jan 26;439(7075):480-3.)。

2. 研究の目的

副腎髄質の発生分化には副腎皮質由来の 5 ステロイドが必要であることを、in vitro, in vivo を用いて証明し、最終的には副腎過形成など先天性の副腎疾患の病態解明、およびその治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

今回の検討では Sf1 遺伝子改変マウスの作成が当初の予定通り進まず、in vitro の解析を行った。

具体的にはヒト神経細胞のモデルとして、SK-N-BE 細胞を用いて、5 ステロイドの細胞増殖への影響、および遺伝子発現の変化の検討を RT-PCR 法を用いて行った。

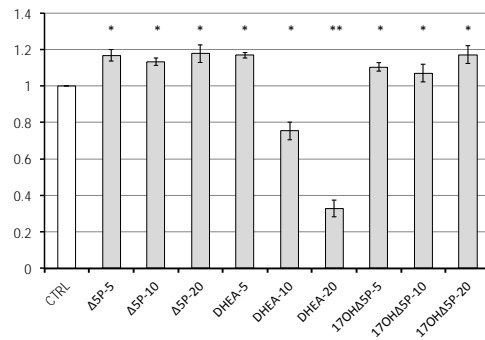
(1) 12well に SK-N-BE 細胞を培養、5 ステロイドを投与し、48 時間後に細胞を改修を、Cell Counting Kit-8 で細胞数を計測し、5 ステロイド非投与群をコントロールとし、その比を算出し、比較検討を行った。

(2) 12 well に SK-N-BE 細胞を培養し、12 時

間後に 5 ステロイドを投与し 48 時間後に RNA を回収、SuperscriptIII (Invitrogen)を用いて cDNA を作成した後に、SYBR Green PCR Master Mix を用いて RT-PCR を施行した。

4. 研究成果

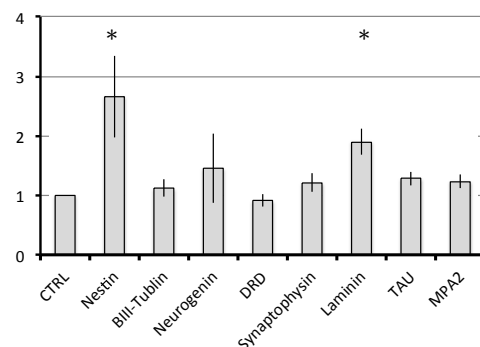
(1) 細胞増殖における 5 ステロイドの影響は以下の通りであり、プレグネノロン



5 ステロイドによる細胞数

(コントロール比, Error Bar +/-SD, *:<0.05) (Δ5-P)、17-OH プレグネノロン(5-17OHP)は有意に細胞の増殖を促進、DHEA は逆に有意に抑制した(単位は μM/l)

(2) さらに以下の如く、DHEA の影響による神経細胞分化に重要な役割を果たすと考えられる分子の発現について RT-PCR 法を用いて定量を行ったところ、以下の如くとなり、Nestin で発現が 2 倍以上に増加していた。また Laminin でも有意に発現が増加していた



DHEA 10uM 投与下での発現の変化

(コントロール比, Error Bar +/-SD, *:<p<0.05)

(3) 以下の実験を同様にそのほかのステロイドでも同様に行ったが、有意な差が得られなかった

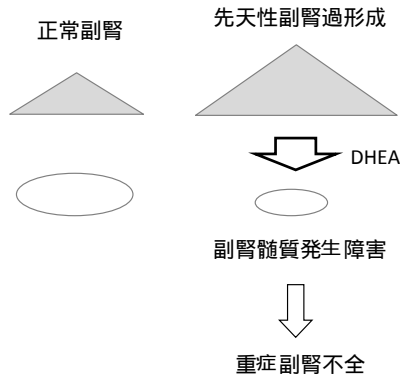
【考察】

Nestin は神経外胚葉前駆細胞特有の中間径フィラメントであるが、近年では核内への情報伝達、細胞代謝機能への関与が示唆されている。5 ステロイドは、こうした機構を介して、神経細胞の増殖分化を制御している可能性が示唆された。

本研究においては in vitro の検討において、今まで神経系の発生において意義が明らかでなかった DHEA を含む 5 ステロイドが重要な意義をもつ可能性について明らかにした。先天性副腎皮質過形成は比較的頻度の高い内分泌先天性疾患であり、その殆どは 21-OHD が占める。これらの患者では副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドの産生が障害されている以外に副腎髄質の発生が障害されている。副腎髄質発生の障害はそのまま CAH 患者の副腎不全時の症状を重症化させ、時に致命的になることもある。従って、副腎髄質の発生障害の機構を知ることは重要である。

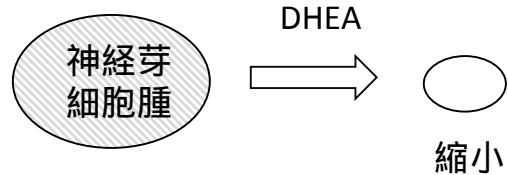
今回の我々の実験では、DHEA が神経細胞の増殖に抑制的に働くことが示された。21-OHD では、5 ステロイドの過剰産生が起こることが示されており、罹患児でも同様に治療前には DHEA を含む 5 ステロイドが著明高値になることが知られており、これらが副腎髄質の発生に影響している可能性が示唆される。

我々の報告は、すぐに CAH の根治に結びつく治療法の開発に結びつくものではない。ただし本疾患は遺伝性疾患であり、出生前診断も場合によって可能な疾患である。例えば出生前より、DHEA の作用を阻害する薬物を母体に投与することで、出生した児の重症度を軽減できる可能性を考えることはできる。将来的な治療法の開発、および病態の解明に重要な役割を果たす研究であるとされており、今後、さらに DHEA の作用とその機構の検討を加えることで、地方法の開発に結びつけて行きたいと考える。



また DHEA は生理的に我々の身体にあり、

弱いアンドロゲン作用を示す以外にはあまり生理的作用は知られていなかった。今回の我々の実験結果は、例えば神経細胞の増殖性の疾患、例えば神経芽細胞腫の治療として使える可能性なども含んでおり、今後こうした治療面の開発についても検討を加えていきたい。



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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

2016 年度 日本小児内分泌学会発表 (予定)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

滝島 茂 (Takishima Shigeru)

研究者番号：70648146

東京医科歯科大学医歯学総合研究科

非常勤講師

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：