

## 論文内容の要旨

論文題目：海馬における新しいニューロステロイド合成機構の研究

氏名 北條泰嗣

ステロイドホルモン(steroid hormone)は、一般に、末梢のステロイド合成器官(副腎皮質・生殖器官)において合成され、血流を通じて標的器官に作用する。全てのステロイドはコレステロールが代謝されることにより合成される。ステロイドの標的器官の一つとして重要なものに脳神経系が考えられており、その情報処理機構にさまざまな影響を与えることが研究・報告されている。たとえば、ステロイドの一つである硫酸プレグネノロン(pregnenolone sulfate, PREGS)、あるいは硫酸デヒドロエピアンドロステロン(dehydroepiandrosterone, DHEAS)をマウスの海馬領域に注入することにより逃避学習(footshock active avoidance training)の効率が上昇することが知られている。また、ウズラなどのある種の鳥類の雄においては、脳において性ホルモンが作用することで雄特有の神経回路が発生し、これにより雄特有の鳴き声を学習できるようになるとの報告もある。細胞生物学的研究として、PREGS は NMDA 受容体の開口確率を上昇させ、細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入量を増やすことで長期増強(long-term potentiation, LTP)を増強することが知られている。このように、ステロイドホルモンは、脳神経系の情報処理に影響を与える重要な分子であることが示唆されている。記憶・学習以外にステロイドが神経系に与える作用として神経細胞死の抑制効果がある。たとえば、培養海馬神経細胞にデヒドロエピアンドロステロン(dehydroepiandrosterone, DHEA)およびDHEASを投与すると、興奮性のグルタミン酸による神経細胞死を防ぐ効果があることが報告されている。女性ホルモン 17β-エストラジオール(estradiol)にも、マウスの海馬神経細胞の細胞死を防ぐ効果があることが報告されている。以上のような効果は通常、末梢のステロイド合成器官で合成されたステロイドが血流を通じて脳神経系に作用すると考えられてきた。

一方、1981年に Baulieu らによって、ステロイドの一つである DHEA が、成熟ラットの脳内に血中よりも高い濃度で存在し、かつ、副腎皮質や生殖器官といった、末梢のステロイド合成器官を摘出(adrenalectomy, gonadectomy)した後も、脳内においてはその濃度が減少しないことが見出された。これに続き、PREG やプロゲステロン(progesterone, PROG)といったステロイドも脳内に血中よりも高い濃度で存在することが報告された。この十年間の研究によって、末梢の神経系のグリア細胞(シュワン細胞)が PREG や PROG を合成して、これらがミエリン鞘を形成する過程を誘導することが示されるなど、脳や末梢の神経系において血中よりも高い濃度で存在するステロイドをニューロステロイド(neurosteroid)と呼ぶようになった。

しかしながら、脳においては、ステロイド合成酵素の細胞における局在、および、ステロイド合成活性を持つ脳の細胞種を特定することについて、先行研究ではいずれも成功していないなど、脳内でのニューロステロイドの合成機構は、不明の点が多い。

川戸研究室では、記憶・学習の中核である海馬において、ステロイド合成反応の最初の段階である、コレステロールをミトコンドリアに輸送する StAR(Steroidogenic Acute Regulatory Protein)と、コレステロールから PREG を合成する cytochrome P450<sub>scc</sub> とが、ラットの海馬に存在することを発見した。このことから、海馬においても末梢のステロイド合成器官と同じく、ステロイド合成酵素が存在し、そこでステロイドが合成されている可能性が高いことが明らかにされつつある。しかしながら、PREGS や DHEA は、海馬で合成されていることはまだ示されていない。また、今までの研究で存在が報告されているニューロステロイドはコレステロールから 1、あるいは 2 段階の代謝を経たステロイドに限られている。女性ホルモン estradiol を初めとする性ホルモンは、上で述べたように、神経系に対して重要な作用を及ぼすことが報告されているにもかかわらず、それが脳や海馬において合成されるニューロステロイドであるとは考えられていないのが現状である。

本研究では、記憶・学習中枢のラット海馬を用い、Western blotting を行ない、ラットの海馬に PREG に硫酸基を付加して PREGS を産生する水酸化ステロイド硫酸基転移酵素(sulfotransferase)、DHEA 合成酵素である cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub>  (P450<sub>17 $\alpha$</sub> )、及び、女性ホルモン合成酵素 cytochrome P450 aromatase(P450<sub>arom</sub>)が存在することを証明した。検出されたタンパク質のバンドの光量を比較すると海馬での P450<sub>17 $\alpha$</sub>  と P450<sub>arom</sub> のタンパク質量は、生殖器官の約 1/200 であることもわかった。

さらに、海馬の凍結切片を用いて、sulfotransferase、P450<sub>17 $\alpha$</sub> 、P450<sub>arom</sub> に対する免疫組織染色を行い、これらの酵素が局在する細胞種を特定した。その結果、sulfotransferase、P450<sub>17 $\alpha$</sub> 、P450<sub>arom</sub> は、錐体神経細胞層および顆粒神経細胞層に局在しており、グリア細胞にはほとんど存在しなかった。これまでに神経系でステロイドを合成するのは、グリア細胞と考えられており、かつ、脳ではなく末梢のグリア細胞(シュワン細胞)についての研究が多かった。本研究の結果は、海馬においてはステロイド合成を行うのは、神経細胞であることを示した初めての報告である。このことから、脳においてはステロイド合成を行

うのは主として神経細胞であることが示唆される。

また、PREG を放射性標識して、これを基質として海馬組織に代謝させて DHEA が合成されることを高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)を用いて証明した。Western blotting、免疫組織染色の結果とこの結果から、DHEA が脳内で合成されていることを証明することができた。次に、放射性標識した DHEA を基質として DHEA の下流のステロイドである性ホルモンの合成を解析した。その結果、アンドロステンジオン(androstenedione, AND)、男性ホルモンであるテストステロン(testosterone, TEST)、女性ホルモンであるエストロン(estrone)およびエストラジオール( $17\beta$ -estradiol, estradiol)もラット海馬において合成されることを証明した。このことから、海馬においては、コレステロールから性ホルモンにいたるステロイド合成経路が完全に存在していることがわかった。

最後にこれらステロイドのうち、PREGS、DHEA、estradiol についてラジオイムノアッセイ法(Radio Immunoassay, RIA)を用いて、海馬におけるステロイド量を定量した。その結果、各ステロイドの海馬における濃度は、PREGS が 28.2nM、DHEA が 1.67nM、estradiol が 0.64nM であった。estradiol については、先行研究で報告されている生理的な活性を持つのに十分な量だけ存在することがわかった。海馬においては、ステロイド合成を行うのは神経細胞であることと、ステロイド合成酵素で染色された部分の面積は海馬全体の 1/10 以下と判定できることから、これらのステロイドの局所濃度は 10 倍程度高いと考えられる。局所濃度を考慮すると、PREGS についても、生理的な作用を持つのに十分な量だけ存在していることがわかった。また、NMDA 刺激によって、PREGS、estradiol のネットの(正味の)合成が行われていることを示した。

このことと、上に述べた NMDA 受容体に対するステロイドの作用を合わせると、海馬において合成されたステロイドは、合成された神経細胞近傍の局所的な神経回路に作用して、脳の情報処理を制御することが示唆される。血流を通じて輸送されたステロイドが作用する内分泌作用に比べて、このようなステロイドの局所的な合成と作用機構は、これまでにステロイド合成器官において研究されてきた、内分泌によるステロイドの作用機構とは全く異なる新しい作用機構を示唆するものである。

以上より、PREGS、DHEA、estradiol というステロイドが海馬神経細胞において局所的に合成されるブレインステロイド(本研究では、脳で合成されたステロイドをブレインステロイドと呼ぶ。)であることを発見した点が、本研究の意義といえる。