

論文内容の要旨

論文題目 カルシウム信号によるステロイドホルモン合成制御に関する研究

氏名 木本 哲也

ステロイドホルモンは、主に副腎皮質や精巣の細胞で産生される。特に副腎皮質束状層細胞は、肝糖新生促進、炎症抑制などの作用をもつステロイドホルモン(糖質コルチコイド)を産生することにより、生体の恒常性維持とストレス防御を担っている。束状層細胞のステロイドホルモン産生は、下垂体前葉より分泌され血流によって副腎に供給される副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)によって促進される。ACTH はペプチドホルモンであり細胞膜を通過できないので、ACTH のもたらす細胞外ステロイド産生亢進信号は、束状層細胞の細胞膜に存在する特異的な受容体を介して細胞内のセカンドメッセンジャー系を駆動することによって細胞内に伝達されるものと考えられる。これまで ACTH に対するセカンドメッセンジャーは cAMP であると信じられてきたが、生理濃度(1-10 pM)の ACTH で副腎皮質細胞を刺激すると、cAMP の増加を伴わずステロイドホルモン産生が亢進する。よって、生理濃度の ACTH に対するセカンドメッセンジャーは cAMP ではないと考えられ、その正体はこれまで不明のままであった。細胞外のカルシウムを除去すると、束状層細胞において生理濃度の ACTH がもたらすステロイド産生亢進作用は消失する。よって、カルシウムは生理濃度の ACTH によるステロイドホルモン産生亢進において重要な役割を果たすものと考えられる。しかし、カルシウム感受性蛍光色素を用いた束状層細胞内のカルシウム濃度変動(カルシウム信号)測定において、これまで ACTH の投与に対するカルシウム信号の発生は観察されてこなかった。そのため、カルシウム信号は ACTH に対するセカンドメッセンジャーとみなされずカルシウムの役割は不明のままであった。

そこで本研究は、まず従来束状層細胞のカルシウム信号観察に用いられてきた方法により、本当に束状層細胞のカルシウム信号測定が可能なのか否かを検討することから開始した。その結果、従来の方法ではステロイドホルモンを産生する細胞のカルシウム信号計測は不可能であることを見出した。更に、束状層ステロイドホルモン産生細胞のカルシウム信号測定を可能とし、これにより、生理濃度の ACTH が束状層ステロイドホルモン産生細胞でセカンドメッセ

ンジャーとしてのカルシウム信号を発生させることを発見した。本論文では、以上の研究で得られた知見を報告し、カルシウム信号のステロイドホルモン産生制御における役割を議論する。

更に本研究では、脳海馬のニューロステロイド合成について検討した。ニューロステロイドは脳で合成されるステロイドであり、記憶学習の効率を制御する。しかし、空間記憶学習の中核である海馬においては、ニューロステロイドの作用様式を理解する上で重要なステロイドの合成部位が明らかにされていなかった。よって本研究では、まずステロイド合成酵素の海馬での分布を検討した。また、これまでほとんど明らかにされていなかったニューロステロイドの合成制御機構について検討し、神経伝達物質受容体を介したカルシウム流入によってニューロステロイドの産生が亢進することを発見した。本論文では、以上の海馬における研究で得られた知見をも報告し、脳独自のステロイド合成制御様式に関して議論する。

本論文ではまず、これまでの副腎皮質束状層細胞内カルシウム信号測定に際して用いられてきた方法によってカルシウム信号計測が可能か否かを検討した結果を報告する。細胞内へのカルシウム感受性蛍光色素の導入は、細胞外にカルシウム感受性蛍光色素のアセトキシメチルエステル体 (AM 体) を添加することによって行った。細胞質に導入された AM 体色素は、エステラーゼによって AM 部が切断されることによりカルシウムとの結合能を回復し、カルシウム依存性に蛍光が変化する状態となる。これにより、細胞内カルシウム信号を蛍光信号の時間変化として計測できるようになる。色素の細胞内への取り込み促進のため、これまでプルロニック F-127 が色素導入補助剤として広く用いられてきた。しかし、プルロニック F-127 (0.02%) とカルシウム感受性蛍光色素 calcium green-1 の AM 体

(calcium green-1/AM, 3 μ M) を含む培地中でウシ副腎皮質束状層細胞を 10 分間インキュベートし、洗浄後ビデオ蛍光顕微イメージングシステムを用いて蛍光観察したところ、自家蛍光より強い蛍光を発する細胞は全体の約 2.3% に過ぎないことが明らかとなった。イオノマイシンを投与して細胞質カルシウム濃度を上昇させると、自家蛍光より大きな蛍光を発した細胞では蛍光強度上昇が見られたが、その他の細胞では蛍光強度上昇は観察されなかった。これは、細胞質カルシウム濃度上昇を蛍光信号として計測可能な細胞がごく一部に留まることを意味している。calcium green-1/AM 負荷後に自家蛍光より強い蛍光を呈した細胞では、

45 μ M ATP による刺激に対しカルシウム信号が観察された。AM 体色素の負荷によりカルシウム信号の蛍光測定が可能な細胞と可能でない細胞の違いを検討するため、ステロイドホルモン合成酵素 (チトクロム P450_{scc} など)、脂肪顆粒などの分布を、カルシウム信号を確認した細胞において観察した。その結果、ATP 刺激に対してカルシウム信号を発した細胞は P450_{scc} などを持たず脂肪顆粒も少ない細胞、すなわちステロイドホルモンを産生しない細胞であることが明らかとなった。また、AM 体色素負荷後に自家蛍光レベルの蛍光を呈した細胞は、ステロイドホルモン合成酵素をもち、かつ多量の脂肪顆粒を含んでいたことから、ステロイドホルモン合成細胞であると判別された。

本論文では更に、プルロニック F-127 の代わりに微量のトリトン X-100、またはクレモフォア EL を用いることにより、束状層ステロイドホルモン産生細胞においてもカルシウム信号の計測が可能となることを見出したので、これを報告する。これは、calcium green-1/AM を 0.01% のトリトン X-100、または 0.03% のクレモフォア EL の存在下で負荷した束状層ステロイドホルモン産生細胞において、イオノマイシン投与によって蛍光上昇が観察されることによって確認された。これにより、束状層ステロイドホルモン産生細胞でのカルシウム信号の計測が可能となり、ACTH 刺激によってカルシウム信号が発することが発見された。

1 pM ACTH で束状層ステロイドホルモン産生細胞を刺激すると、カルシウムオシレーション、カルシウム濃度の階段状の上昇、階段状上昇とオシレーションの混合型、の3パターン of カルシウム信号が観察された。カルシウム信号を発する細胞の割合は、ACTH の濃度に対してシグモイド状の依存性を示し、プレグネロン産生の ACTH 濃度に対する依存性を示す曲線と、10 pM 以下でよい平行性を示した。副腎皮質細胞において ACTH 受容体に結合し、cAMP を増加させずにステロイドホルモン産生を増加させる *o*-ニトロフェニルスルフェニル ACTH (NPS-ACTH) で束状層ステロイドホルモン産生細胞を刺激した際にも ACTH 刺激の場合と同様のカルシウム信号が観察されたことから、束状層ステロイドホルモン産生細胞では cAMP の増加によらずカルシウム信号が発生することが確認された。NPS-ACTH に対しても、カルシウム信号を発する細胞の割合は NPS-ACTH 濃度に対しシグモイド状の依存性を示し、これはプレグネロン産生の NPS-ACTH 濃度に対する依存性を示す曲線と、1 nM 以下でよい平行性を示した。束状層ステロイドホルモン産生細胞におけるカルシウムオシレーションは、EGTA によって細胞外カルシウムをキレートすると消失した。また、カルシウムオシレーションはタブシガルギンによっても消失したことから、カルシウムオシレーションの発生・維持には細胞外からのカルシウム流入と細胞内カルシウムプールの両方が関与しているものと考えられる。ニカルジピンによって電位依存性カルシウムチャネルを阻害すると、1 pM ACTH の投与に対してカルシウム信号の発生は観察されたものの、カルシウム信号の後期相(刺激直後のカルシウムスパイクに引き続く平坦相)が刺激前より高く維持される細胞の割合が顕著に減少した。ニカルジピンは 1 pM ACTH によるステロイドホルモン産生を顕著に抑制するので、カルシウム信号の後期相が高く維持されることは、ステロイドホルモン産生促進に重要であろうと考えられる。1 nM 以下の NPS-ACTH による刺激に対しても同様の結果が得られた。以上より、生理濃度の ACTH、または 1 nM 以下の NPS-ACTH のステロイドホルモン産生促進作用を媒介するセカンドメッセンジャーは、カルシウム信号であると思われる。

次に本論文では、ラット脳の海馬におけるニューロステロイドの合成系について検討した結果を報告する。12 週齢のオスウィスターラットの海馬におけるステロイド合成酵素群(チトクロム P450_{scc}、NADPH-アドレノドキシ還元酵素、アドレノドキシ)、及びステロイド合成急性調節蛋白質(StAR)の分布を、それぞれに特異的な抗体を用いた免疫組織化学染色法により検討した。その結果、これらステロイド合成に必須の酵素・蛋白質が、海馬の神経細胞に局在し

ていることを発見した。これまでニューロステロイドの合成を担うのは主にグリア細胞であると信じられてきたが、海馬においては神経細胞がニューロステロイド合成の主要な担い手であることが本研究によって明らかとなった。免疫染色に用いた抗体を使用して、12 週齢のオスウィスターラットの海馬より調製したミトコンドリア試料に対してウエスタンブロッティングを行った結果、P450scc および NADPH-アドレノドキシシン還元酵素に対しては約 54 kDa の位置に単一のバンドが観察され、アドレノドキシシンに対しては 12 kDa 付近に単一のバンドが観察された。これらのバンドは、全て陽性対照(ウシ副腎皮質より精製した精製抗原、ラット精巢のミトコンドリア、あるいは小脳ミトコンドリア)に対して観察されたものと同じ位置に観察されたことから、免疫染色において用いた抗体の特異性が確認された。陰性対照としてのラット肺より調製したミトコンドリアにおいては、いずれの抗体に対してもバンドは検出されなかった。一方、StAR のウエスタンブロットにおいては、副腎皮質およびラット精巢のミトコンドリアに対して 30 kDa 付近に濃いバンドが観察されたのに対し、海馬ミトコンドリアに対しては 37 kDa 付近にバンドが観察され、30 kDa 付近のバンドはごく薄いものだった。

海馬神経細胞にニューロステロイド合成系の存在が確認されたので、次に本研究では海馬のニューロステロイド合成制御機構に関する検討を行った。12 週齢オスウィスターラットの海馬組織を $100 \mu\text{M}$ の N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)で刺激すると、プレグネノロン濃度の増加が引き起こされた。NMDA によるプレグネノロン産生は、刺激開始後 15 分で確認できた。海馬組織のプレグネノロン濃度は、投与した NMDA 濃度の増加に応じてシグモイド状に増加した。NMDA を投与しなかった海馬組織においては、プレグネノロン濃度の有意な増加は見られなかった。NMDA のプレグネノロン産生促進作用における EC_{50} は約 $45 \mu\text{M}$ であった。この NMDA 投与によるプレグネノロン産生は、NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDA 受容体)の特異的非競合阻害剤である MK-801 ($50 \mu\text{M}$)、または競合阻害剤である AP5 ($110 \mu\text{M}$) によってほぼ完全に抑制された。さらに、NMDA 投与による海馬のプレグネノロン濃度増加は細胞外液のカルシウムを EGTA によってキレートした際にもほぼ完全に抑制されたことから、海馬のプレグネノロン産生は NMDA 受容体を介して流入するカルシウムによって促進されるものと考えられる。NMDA 刺激によるプレグネノロン濃度増加は P450scc の特異的阻害剤であるアミノグルテチミドによってほぼ完全に抑制されたので、海馬のプレグネノロン合成は確かに P450scc によってなされているものと確認された。NMDA 刺激をおこなった海馬からミトコンドリアを調製して StAR に対するウエスタンブロット解析を行った結果、 $100 \mu\text{M}$ NMDA で 30 分刺激した海馬では、37 kDa の StAR が減少し、ほぼそれに相当する量の 30 kDa StAR が増加した。StAR は P450scc への基質コレステロール供給を担いステロイド合成速度を制御すると考えられる。NMDA 刺激による StAR の存在状態の変化はプレグネノロン濃度増加とよく一致するので、NMDA 刺激によって StAR が活性化されミトコンドリア内膜にコレステロールを供給したことを反映しているものと思われる。