

論文内容の要旨

論文題目 海馬における脳ニューロステロイド合成酵素及び
その受容体の分子生物学的解析
(Molecular biological analysis of enzymes and receptors
for brain neurosteroids in the hippocampus)

氏名 石井 寛高

脳神経系は従来から男性ホルモンや女性ホルモンといった性ステロイドホルモンの標的器官として知られていた。これまでの常識では、これらの性ステロイドが卵巣や精巣といった末梢の性ステロイド合成器官で合成され、血流を介して脳神経系に到達し、作用を引き起こすといった描像であった。一方、20年程前から脳神経系でも pregnenolone (PREG)、progesterone (PROG)、dehydroepiandrosterone (DHEA) といったステロイドが脳神経系の特定の領域に高濃度で存在することから脳でもコレステロールからステロイドホルモンが合成されると予想されていた。この脳神経系で合成されると予想されたステロイドは、現在ではニューロステロイドと呼ばれている。

最近になって PREG、PROG といったステロイドの合成酵素である P450_{scc} や 3 β -HSD などが脳神経系で発現しており、しかも合成活性が実際に測定されたことから、ステロイドホルモン合成経路の上流にあたる産物は脳内で内在性のコレステロールから合成されることが確実となってきた。だが、性ステロイドなどの合成経路下流の産物が脳神経系内でコレステロールから産生されるといった考えは、現在まで否定的にとらえられていた。というのも性ステロイドがコレステロールから合成される場合には PREG が P450(17 α)によ

る酵素反応を介して DHEA が合成される必要があるが、これまでの 20 年間のニューロステロイド研究では P450(17 α)の発現やその酵素活性を証明することが出来なかったため、P450(17 α)は脳神経系にないと考えられていたからである。

しかし、P450(17 α)の代謝産物である DHEA が脳神経系内で高濃度に存在するため、P450(17 α)が脳に存在しないと考えるのは明らかに矛盾していた。そこで、P450(17 α)が実際には脳神経系に存在しているのではないかという信念の基、検出系の高感度化や実験系の改良をはかり、ついに記憶・学習の中枢である脳海馬で P450(17 α)が発現しており、その酵素活性があることを発見した (Hojo et al, 2004; 及び本博士論文の結果)。この成果により、脳神経系内に性ステロイド合成経路が存在することが示唆された。ただ、この P450(17 α)の脳神経系における発見は脳神経系内の性ステロイド合成経路解明の第一歩に過ぎない。実際、性ステロイド合成経路は、合成経路上流の PREG や PROG 合成系とは異なり、多くの酵素が関わっており、非常に複雑である。それゆえ、その解明を行うためにはこれら合成酵素群を統一的・網羅的に解析することが必要であった。そこで、本研究ではこれら性ステロイド合成経路に関わる合成酵素群の分子基盤を解明するため、分子生物学的手法を用いて統一的・網羅的な発現解析及び生化学的手法を用いて酵素活性の解析を行なった。さらに、性ステロイドの作用先である受容体の解析も経路解明に必要であることから、性ステロイド受容体の統一的・網羅的な発現解析も同時に行なった。

性ステロイド合成経路に関わる酵素としては P450(17 α)、17 β -HSD、5 α -reductase、P450arom、3 α -HSD が、受容体としては男性ホルモン受容体 (AR)、女性ホルモン受容体 (ER) が知られている。そして、これらにはいくつかのサブタイプが存在している。本研究ではこれら一連の酵素群・受容体群全てを発現解析の対象とした。発現解析の対象は脳の主に海馬を使用し、発現解析法には高感度な発現解析法である RT-PCR/Southern blotting 法を用いた。そして、生化学的な解析においては海馬における DHEA からのステロイド代謝経路を探るため、DHEA からのステロイド代謝産物を HPLC 法で分離・同定し、実際の合成経路を順に解析していった。

RT-PCR/Southern blotting 法を用いた発現解析から性ステロイド合成経路に関わる酵素群は 17 β -HSD 5、6 及び 5 β -reductase 以外全ての酵素が海馬で発現していた。これらの中で特に酵素活性が強く、男性ホルモン・女性ホルモンの合成に積極的に関与している酵素 (P450(17 α)、17 β -HSD 1, 3、P450arom、5 α -reductase 2) は末梢のステロイド産生臓器と比較して 1/100-1/1000 程度発現していた。末梢のステロイド産生臓器は体中にステロイドホルモンを送り出すが、海馬で合成されるステロイドは局所的に作用すると予想されているため、このオーダーの発現は十分な量である。実際に HPLC 法による解析から男性ホルモンであるテストステロンやジヒドロテストステロン、女性ホルモンであるエストラジ

オールの合成活性が海馬であることが示された。さらに、男性ホルモン・女性ホルモン受容体も海馬に発現していることから、脳内ではコレステロールから性ステロイドが局所的に合成され、その場で自己分泌または近接分泌様に作用することが示唆された。

発現解析の結果からおおよその性ステロイド合成経路の発現量は $P450_{scc} = 3\beta\text{-HSD I} < P450(17\alpha) = P450_{arom} < 17\beta\text{-HSD 3} < 17\beta\text{-HSD 1} = 5\alpha\text{-reductase 2}$ となると判断できた。実際の HPLC 法によるステロイド代謝活性測定から DHEA は、「DHEA アンドロステンジオール (5-androstene-3 β ,17 β -diol) テストステロン エストラジオール」ないしは「DHEA アンドロステンジオール テストステロン ジヒドロテストステロン アンドロスタンジオール (5 α -androstane-3 α ,17 β -diol)」と代謝されていた。すなわち、DHEA はまず、17 β -HSD により代謝された後、3 β -HSD の作用でテストステロンとなり、エストラジオールやジヒドロテストステロンが合成されていた。この HPLC 法による海馬のステロイド代謝活性の結果は酵素発現の結果とよく一致しており、本研究の発現解析と代謝活性解析の妥当性を示すととも海馬における性ステロイド合成経路を世界で初めて実証した画期的な成果である。

また、*in situ hybridization* 法の結果から強力な男性ホルモンを合成する酵素である 5 α -reductase が神経細胞に局在することが明らかとなった。

さらに、海馬の脳ニューロステロイド合成酵素及び受容体の発現量の変動を発達段階を追って解析したところ、幼若期の生後 1-2 週目に高いことが判明した。幼若期においては性ステロイド合成酵素・受容体のみならず、ステロイド合成の律速段階となっている $P450_{scc}$ の発現量が非常に高いことから、幼若期に脳ニューロステロイドが盛んに合成されることが示唆された。特に生後 1-2 週目は神経回路網の構築が盛んな時期であるとともに脳機能の様々な臨界期に相当している。それゆえ、神経回路網の構築や何かしらの脳機能の臨界期にステロイドホルモンが関わっていることが予想された。

本研究は、20 年以上脳内で見つかっていなかった $P450(17\alpha)$ とそれ以降の性ステロイド合成経路の存在を実証したことで、末梢のステロイドホルモン産生器官とは独立に脳がコレステロールから独自に性ステロイドホルモンを合成していることを明らかにした。これは、従来の常識であった「脳神経系においては末梢器官で合成された性ステロイドホルモンが血流に乗って到達し、作用する」という描像に大幅な改変を促すものである。さらに、先行研究と本研究により脳ニューロステロイド合成系と作用先である受容体が神経細胞に局在しており、局所的に合成された脳ニューロステロイドが自己・近隣の神経作用に働きかけ、作用を及ぼしていることが示唆された。

近年の川戸研究室の成果により、これら性ステロイドが神経活動依存的に合成されることを見出している。さらに、性ステロイドが、海馬神経細胞の情報伝達の間として知られるスパインの密度や形態変化を急性的に変化させ、神経情報伝達を調節していることが明らかとなっている。そのうえ、電子顕微鏡を用いた局在の解析から、ステロイドホルモン合

成酵素及び受容体が海馬神経細胞のシナプス近傍に局在していることも判明している。この酵素・受容体の局在及び急性的なステロイド合成と作用は、脳ニューロステロイドが神経伝達を調節する因子として働いていることを示唆している。

それゆえ、脳ニューロステロイドである性ホルモンは、新規の神経伝達調節因子であり、神経の活動を積極的に制御していることが考えられる。また、脳で合成されるステロイドホルモンは、内分泌物質として働く末梢で合成されるステロイドホルモンとは、分泌様式や作用が異なっている、それゆえ、本研究は従来の神経内分泌学の範疇に入るものではなくむしろ、神経局所分泌学という新規分野を開拓するものである。