

論文の内容の要旨

論文題目

脳内で合成される 17α -エストラジオールの 抑制性シナプスへの作用

氏名

池田 隆光

【序論】

エストロゲンは「女性ホルモン」として知られており、内分泌系において重要な役割を担っている。しかし、その合成酵素や受容体が記憶を担う海馬などの神経細胞に雌雄共に発現している事が知られており、「女性ホルモン」以外の役割があると考えられる。

エストロゲンの受容体は海馬体において抑制性神経細胞にも発現していることが知られている。抑制性神経細胞は情報を処理する際に活動することが個体レベルの実験で示されていることから、抑制性神経伝達がこの正確な活動のタイミングを通じて情報処理機構に関与していると示唆されている。また、抑制性神経細胞の機能の失調と種々の疾患の関連も示唆されており、抑制性神経細胞の機能の調節メカニズム、機能調節因子を明らかにすることは生理学的にも病理学的にも重要であると思われる。

筆者は修士課程において脳由来神経栄養因子(Brain-Derived Neurotrophic Factor: BDNF)および BDNF のヒトに存在する一アミノ酸変異体 BDNF_{V66M} により GAD65 (GABA 合成酵素: GAD の isoform)量の増大が局所的に起こることを明らかにした。そして、さらなる抑制性神経細胞の機能調節因子として、エストロゲンに着目をした。外因性のエストロゲンは抑制性の神経伝達に作用することが示唆されている。しかし、その作用は GAD65 を減少させる方向に働くという報告もあれば GAD65 を上昇させるという報告もある。一定の見解が得られない理由としてこれらの研究が外からエストロゲンを加えているという点が考えられた。外因性のエストロゲンを大過剰量に加えることにより受容体のダウンレギュレーションが引き起こされることが知られており、外因性のエストロゲ

ンの作用は実際に生体内で合成されるであろう、内在性のエストロゲンの作用を反映していない可能性がある。しかし、脳でのエストロゲン合成に着目した研究はほとんどなく、また既存のアロマトラーゼノックアウトマウスは全て全身性であることから脳内で合成されているエストロゲンの役割は全く分かっていないと言っても過言ではない。

以上の点から、実際に脳内で合成されていると思われるエストロゲンの役割については重要であるにも関わらずほとんど知見が無い。本研究では他の組織の影響を受けない培養神経細胞および個体動物レベルでエストロゲンの合成を中枢神経系のみで抑制するという手法を用いて神経細胞により合成されるエストロゲンの抑制性神経終末に対する作用を解明することを目的とし、検討を行った。

【本論】

(1) 海馬培養神経細胞におけるエストロゲンの役割

修士課程において BDNF という蛋白質およびヒトに存在する一アミノ酸変異体 BDNF_{V66M} が抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素、GAD65 の発現を調節する事を明らかにした。また、エストロゲンと BDNF は共通の効果を持つ現象も報告されている事から、抑制性神経細胞に対するエストロゲンの役割について検討を行った。

培養 7 日目の海馬神経細胞に対し、エストロゲンの合成酵素(アロマトラーゼ)阻害剤 letrozole、fadrozole を適用した。そして培養 9 日目に固定し、GAD65 に対する特異的のモノクローナル抗体(GAD6)で免疫染色を行った(図 1A)。そして、その蛍光強度を測定したところ、letrozole 投与群(図 1B)、fadrozole 投与群(図 1C)のいずれにおいても GAD65 蛍光強度の低下が観察された。次にエストロゲン受容体 α 、 β の阻害薬 ICI 182780 (図 2A)、tamoxifen (図 2B)を適用したところ、同様の作用が見られた。また定量的PCRを行い、GAD65 mRNAレベル

の低下を明らかにした(図 2C)。以上の点から培養神経細胞の合成するエストロゲンは抑制性神

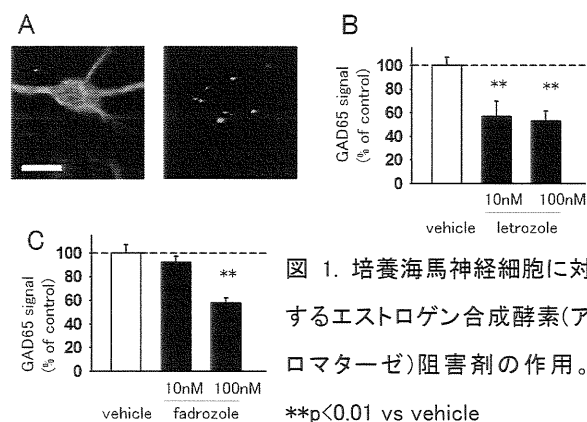


図 1. 培養海馬神経細胞に対するエストロゲン合成酵素(アロマトラーゼ)阻害剤の作用。
**p<0.01 vs vehicle

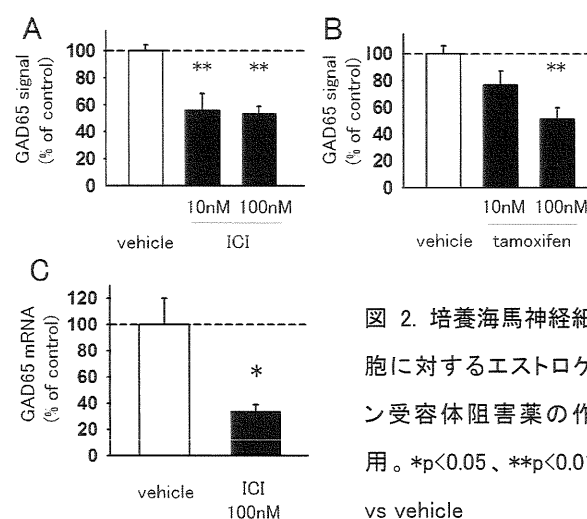


図 2. 培養海馬神経細胞に対するエストロゲン受容体阻害薬の作用。
*p<0.05、**p<0.01 vs vehicle

経伝達機能を制御することが考えられた。また、その作用はエストロゲン受容体 α 、 β の活性を必要とすることを明らかにした。以上の点から神経細胞により合成されるエストロゲンがエストロゲン受容体 α 、 β を介して GAD65 発現量の維持に与与する可能性が考えられた。

次に BDNF とエストロゲンの関係に着目した。エストロゲンにより BDNF の発現が誘導されることが報告されており、エストロゲンによる GAD65 発現量調節

は BDNF を介したものであるか検討を行った。培養神経細胞に対し ICI182780、BDNF をそれぞれ単独処置した群とそれらを共処置した群について検討を行った。すると GAD65 発現量は ICI182780 単独処置群に比べて有意に上昇したものの、BDNF 単独処置群に対しては有意に低かった。また、BDNF の受容体の阻害薬 K252a および ICI182780 を単独、共処置を行った。するといずれの薬物も単独で有意に GAD65 発現量を低下させたものの、共処置群では薬物単独処置群に対し、さらに有意に低下していた(図 3)。このことから、エストロゲンによる GAD65 量の調節に BDNF は関与しない、もしくは BDNF の寄与は小さいものと思われる。

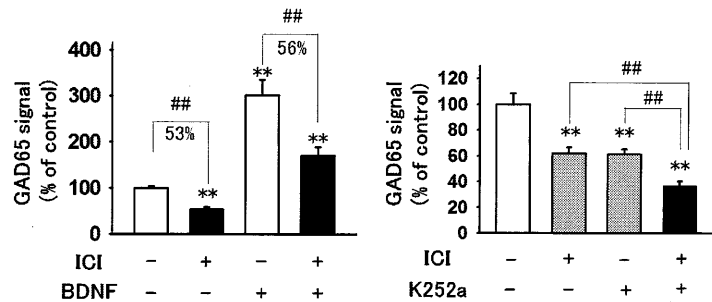


図 3. (A) ICI182780、BDNF の作用 (B) ICI182780 および K252a の作用。** $p < 0.01$ vs vehicle, ## $p < 0.01$ between indicated groups

(2) 雄性ラットの脳におけるエストロゲン

次に雄性ラットの脳内におけるエストロゲンに着目をした。一般に「女性ホルモン」として知られているのは 17β -エストラジオールであるが、LC/MS/MS を用いた検討によりマウスの脳においては 17α -エストラジオールが存在すると報告されている。市販の抗体は全て交差性を示してしまうことから、これまでに ELISA や RIA などの方法により行われてきた研究は不正確である可能性がある。そこでガスクロマトグラフィー・マススペクトラムを用いて 17α -エストラジオールと 17β -エストラジオールを別々に定量することのできる系を確立した。雄性ラットより海馬を摘出し、抽出を行った後に誘導体化試薬を加え、定量的に解析した(内部標準物

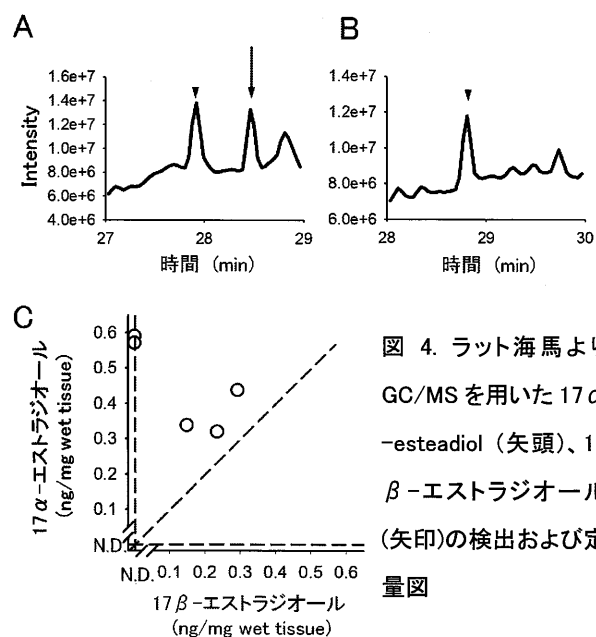


図 4. ラット海馬より GC/MS を用いた 17α -estradiol (矢頭)、 17β -エストラジオール (矢印) の検出および定量図

質としては重水素体を用いた)。計 5 匹の雄性ラットの海馬体について検討を行ったところ、3 匹より図 4A に代表されるようなチャートが得られた。矢頭のピークが標準 17α -エストラジオールの、矢印のピークが標準 17β -エストラジオールのピークの保持時間が一致した。一方 2 匹からは図 4 に代表されるようなチャートを得、標準 17α -エストラジオールのピークに保持時間が一致するピークは得られたが、標準 17β -エストラジオールの保持時間に一致するピークは得られなかった。重水素体を用いた内部標準法により定量を行ったところ、図 4C を得た。全ての個体において 17α -エストラジオールは 17β -エストラジオールはよりも多かった。

17α -エストラジオールが実際に機能的に抑制性神経細胞に働くのかという点については不明であるために、培養神経細胞を用いて検討を行った。培養 7 日目の海馬神経細胞に対し letrozole、 17α -エストラジオールおよび 17β -エストラジオールを適用し、培養 9 日目に解析を行ったところ、図 5 を得た。Letrozole 処置群に対し、letrozole、 17α -エストラジオールもしくは 17β -エストラジオールを共添加した群では GAD65 シグナルが有意に上昇していた。また、いずれの濃度においても 17α -エストラジオールと 17β -エストラジオールの作用に有意な差はなかった。すなわち、 17α -エストラジオールは 17β -エストラジオールと同程度の作用を持っており、抑制性シナプス調節に関与している事を初めて明らかにした。

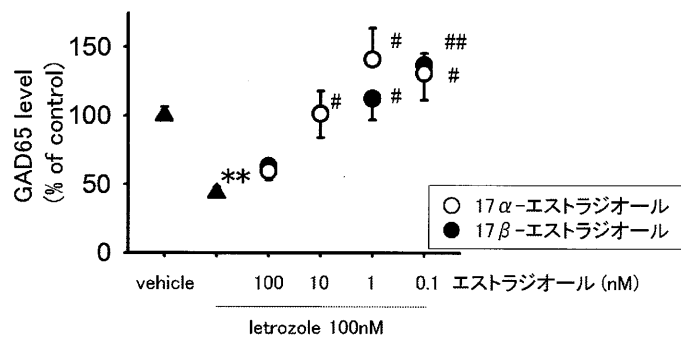


図 5. 培養神経細胞への 17α -エストラジオール、 17β -エストラジオールの作用。** $p < 0.01$ vs vehicle, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs vehicle

(3) 雄性ラットの脳内で合成されるエストロゲンの役割

実際に脳内において合成されるエストロゲンの役割に着目をした。まず letrozole を脳室内に投与することによりエストロゲン合成を抑制することを試みた。Letrozole を脳室に投与することにより、末梢組織由来のエストロゲンと中枢神経系由来のエストロゲンを区別することを可能にした。Letrozole を 24 時間毎に三回脳室内投与し、その効果を確認するために GC/MS で脳内の 17α -エストラジオールの定量を行った。すると、letrozole を投与したラットの海馬体においては 17α -エストラジオールが有意に低下していることを確認した。

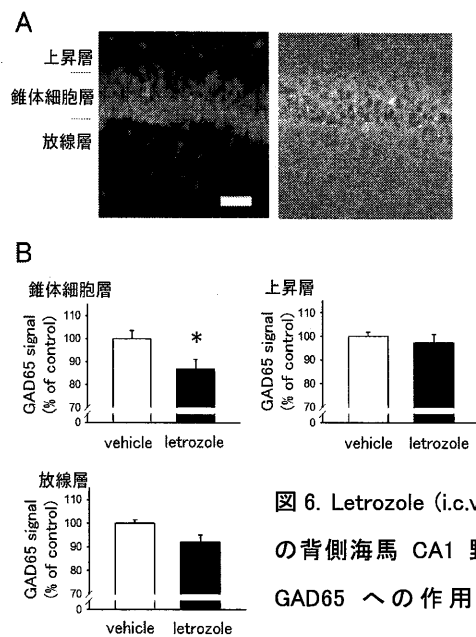


図 6. Letrozole (i.c.v.) の背側海馬 CA1 野 GAD65 への作用。
* $p < 0.05$ vs vehicle

次に letrozole を投与することによる抑制性シナプスの変化について検討を行った。Letrozole を脳室内に投与したラット脳切片を作成し免疫染色法により、図 6 に代表例を示す染色像を得た(背側海馬 CA1 野)。蛍光強度を定量したところ錐体細胞層において GAD65 の蛍光強度は有意に低下していた(図 6)。

次に letrozole 脳室内投与を行い、ラットの行動に変化が起こるか、検討を行った。するとオープンフィールド試験にて letrozole (i.c.v.)群では中心部にいる時間が有意に低下していた。また 17α -エストラジオールの共投与によりその作用は消失した。なお体重や、移動距離、リアリングの回数には有意な差は認められなかった。他の試験についても検討を行ったが、高架式十字迷路や強制水泳試験では差は検出されなかった。

【総括】

本研究において培養神経細胞および雄性ラットを用いた検討から、以下の点を明らかにした。

1. 培養神経細胞、雄性ラット海馬においてエストロジェンの合成能低下にともなって抑制性神経細胞の抑制能を強める GAD65 は減少した。
2. 雄性ラット海馬に主に存在するエストロゲンは 17α -エストラジオールである。
3. 脳内におけるエストロジェンの合成能低下にともなって雄性ラットは不安様行動を示す。また、この表現型は 17α -エストラジオールの共投与により見られなくなる。

以上の点から 17α -estradiol は脳内で合成され、機能的に抑制性神経細胞に働く新規の神経伝達調節因子であると考えられた。