

## 論文の内容の要旨

論文題名      グルココルチコイドの脳機能保護作用に関する研究  
氏名            松脇 貴志

哺乳類では一般にストレスに暴露された場合、視床下部-下垂体-副腎軸 (hypothalamus-pituitary-adrenal axis: HPA 軸) が活性化し、副腎皮質からのグルココルチコイド分泌が亢進する。ストレスは生体の恒常性を乱そうとする刺激とも換言されるが、ストレス条件下での恒常性の維持、ひいては生命の維持には代謝調節作用などを有するグルココルチコイドが必須の役割を果たしており、副腎摘出などにより体内でグルココルチコイドが作用しない場合にはストレス不耐性となる。一方で、高レベルのグルココルチコイドは神経細胞における細胞死の誘起や視床下部の生殖制御機能の抑制など、中枢神経系に対してネガティブな作用をもつことが数多く報告されている。しかし、筆者らの研究室では、感染ストレスの仲介物質として生殖機能を抑制することが知られている腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) - $\alpha$  をラットに投与した場合、HPA 軸の活性化の阻害により生殖機能の抑制がむしろ増強されるということが見出された。このことは、従来の考えとは逆に、ストレス時のグルココルチコイドは中枢神経系に対して保護的な作用をもつ可能性を提起している。そこで本研究においては、各種ストレス条件下におけるグルココルチコイドの脳の生殖制御機能や神経細胞の生存に対する作用とその機序を解析し、グルココルチコイドの中枢作用の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

哺乳類の生殖機能は視床下部-下垂体-性腺軸によって制御されているため、本研究では

下垂体から放出される黄体形成ホルモン (lutening hormone: LH) を生殖機能の指標として解析した。LH の分泌様式には排卵を誘起する雌特有のサージ状分泌と、それ以外の性腺機能維持に働くパルス状分泌の2種類が存在する。第一章においては、TNF- $\alpha$ 投与時の雌ラットの LH 分泌に対する副腎摘出およびコルチコステロン (corticosterone: CS、げっ歯類における主要なグルココルチコイド活性物質) の補充投与の効果を検討した。その結果、TNF- $\alpha$ の投与により無処置ラットの LH パルスはほとんど影響を受けなかったが、副腎摘出ラットでは LH パルスが有意に抑制された。この抑制はストレス負荷1時間前に CS を投与することで完全に阻害され、LH パルスは維持された。次に雌ラットの発情前期午後に見られる LH サージに対する TNF- $\alpha$  の効果を検討したところ、抑制が副腎摘出で増強され CS の補充投与で阻害されるという、パルスの場合と同様の結果が得られた。また、神経細胞興奮の指標である Fos タンパク質の発現を免疫染色により観察したところ、視床下部の室傍核や視索上核において、TNF- $\alpha$ 投与による免疫陽性細胞数の増加が副腎摘出によって増強され、CS 補充によって抑制された。これらの神経核には副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンやバソプレッシンなどの LH 分泌を抑制する働きをもつ神経ペプチドを産生する神経細胞が多数存在している。グルココルチコイドはストレス条件下でこれらの神経細胞の興奮を抑制し、パルス状およびサージ状の両 LH 分泌を維持していることが示唆された。

第二章では、前章で確認されたグルココルチコイドの生殖機能保護作用のストレス特異性の検討と、その作用機序の解明を目的とした。ストレス刺激としては感染・飢餓・拘束の3種類を用いた。感染ストレスとしてグラム陰性菌の膜成分であるリポ多糖を、飢餓ストレスとしてはグルコースの競合利用阻害剤である2-デオキシグルコースをそれぞれ投与した。拘束ストレスとしてはラットの四肢を板上で1時間緊縛した。その結果、3種類のストレス条件全てにおいて、LH パルス、サージともにストレス条件下での分泌抑制の副腎摘出による増強と、CS 補充による緩和が見られた。このことから、グルココルチコイドは各種ストレス刺激に共通した生殖機能維持作用をもつ事が明らかとなった。そこで次に、その作用機序を明らかにするため、感染ストレス時に脳内で産生され LH パルス抑制効果を持つことが知られているプロスタグランジン類 (prostaglandins: PGs) に着目し、ストレス条件下の副腎摘出ラットに PGs の合成阻害剤であるインドメタシンを投与した。その結果、インドメタシンは全てのストレス条件下で CS と同等の LH パルス維持作用を示した。さらに、免疫染色によって脳内でのシクロオ

キシゲナーゼ 2 (cyclooxygenase 2: COX2、PGs 合成酵素) の発現を検討したところ、脳内の広範囲において全てのストレス条件下で COX2 免疫陽性細胞数の副腎摘出による増加と、CS 補充による減少が確認された。以上の結果から、PGs が各種の急性ストレス刺激に共通の脳内ストレス仲介物質として生殖機能を抑制すること、またグルココルチコイドはこの PGs 合成を阻害することでストレス条件下での生殖機能を維持することが示唆された。

第三章では、数ある PG サブタイプの中でどの種が LH パルス抑制を引き起こすのかを明らかにするため、各種 PGs の脳室内投与実験を行なった。PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> の 3 種類をそれぞれ脳室内投与した。PGD<sub>2</sub> 投与時にはパルス振幅の有意な増加が、PGE<sub>2</sub> 投与時には LH の一過的な分泌促進が観察され、PGF<sub>2α</sub> は LH パルスに変化をもたらさなかった。次に PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> を同時に投与したところ、LH パルスの有意な抑制が見られた。また、LH サージが起きる発情前期夕方の雌ラット視床下部内における PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> の濃度を測定したところ、PGE<sub>2</sub> は 14 時から 16 時にかけて有意ではないものの増加傾向が見られ、PGF<sub>2α</sub> は 18 時で有意に増加していた。さらに、発情前期の 14 時から 16 時にかけての時間帯にインドメタシンを皮下もしくは脳室内に投与されたラットでは、いずれの場合も LH サージが完全に抑制された。前章で明らかにされたストレス時に脳内で生成されて LH パルスを抑制する PGs は PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> であり、これらが同時に作用した際にのみ抑制作用を示すことが示唆された。さらに、PGs はこのようにストレス時の LH 分泌を抑制する一方で、LH サージの形成に不可欠であるという二面性をもつことも示唆された。サージの形成については、まず PGE<sub>2</sub> がサージを誘起し、遅れて生成される PGF<sub>2α</sub> が PGE<sub>2</sub> と共に働くことで LH の分泌を抑制してサージを収束に向かわせるという機序が考えられた。

第二章で試みた 3 種のストレス刺激のうち、拘束ストレスは脳内 PGs の増加を促す一方で、運動機能制御に重要な役割を果たしている中脳黒質のドーパミン (DA) ニューロンを傷害することが報告されている。そこで第四章では、拘束ストレスが中脳黒質の DA ニューロンおよび運動機能に与える影響と、それらに対するグルココルチコイドの作用を検討した。中脳黒質 DA ニューロンの損傷およびそれによる運動失調はパーキンソン病の主徴としてもよく知られており、本研究においても運動機能の評価にはパーキンソン病モデル動物の評価系として汎用されている Pole test を用いた。実験には無処置もしくは副腎摘出を施した C57BL/6J 雄マウスを用いた。2 時間の拘束を中 1 日挟んで 2 回負荷し、初回の負荷前、2 回目の負荷翌日と 1

週間後の計3回 Pole test を行った。無ストレス条件下では無処置群と副腎摘出群との間に運動機能の差は見られなかったが、拘束ストレスにより副腎摘出群では無処置群に比べてより重篤な運動機能の低下が観察された。副腎摘出群に拘束開始と同時に CS あるいはインドメタシンを投与すると、運動機能の低下が起こらなかった。さらに、最後の Pole test 翌日に採取した脳の中脳黒質について、DA ニューロンの指標としてチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH) の免疫染色を行なった。その結果、拘束非負荷群の無処置および副腎摘出マウスの間には TH 免疫陽性細胞数に有意な差は見られなかった。一方、拘束ストレスは無処置マウスに対しては TH 免疫陽性細胞数に有意な影響は及ぼさなかったが、副腎摘出マウスではその顕著な減少をもたらした。拘束ストレスのこのような作用は、CS あるいはインドメタシンの前処置により阻害された。本章の結果から、拘束ストレスは PGs を介して中脳黒質 DA ニューロンを傷害して運動機能を低下させること、またグルココルチコイドはこの DA ニューロンの傷害を阻害することにより拘束ストレスによる運動機能の低下を緩和することが示唆された。

本研究により、様々なストレス刺激は神経性あるいは液性の因子を介して脳の広範な部位で COX2 の発現を誘導し、この COX2 により合成された PGs が多くのストレスに共通するストレス仲介物質となっていることが明らかとなった。PGs は視床下部の LH 分泌に関わる神経機能を抑制することや中脳黒質の DA ニューロンを傷害することにより、生殖機能や運動機能を低下させることが示された。一方で、ストレス刺激により HPA 軸の活性化が起こり、大量に分泌されたグルココルチコイドは COX2 の発現を抑制することにより脳の機能や神経細胞の生存を維持していることが明らかとなった。従来、中枢神経系に対してネガティブな作用をもつと考えられていたグルココルチコイドであるが、その生物学的作用の本質は、ストレス時の脳機能の保護にあると考えられた。