

論文の内容の要旨

論文題目 海馬における新規ステロイドホルモン合成系の研究

氏名 肥後 心平

神経内分泌学では精巣・卵巣や副腎で合成されたステロイドホルモンが血流を通じて脳に運ばれて作用するものであると考えられていた。しかし最近になり、成獣オスラットをもちいた川戸研究室の研究結果により、これらのステロイドが末梢の内分泌器官だけでなく、記憶中枢の海馬でも独自に合成されていることが明らかになってきている。特に成獣オスラット脳内の性ステロイド合成系に関しては、その存在と重要性が疑いのないものとなりつつある。

成獣オスラットにおける脳内性ステロイド合成系の存在が明らかになった現在、

- (1) ストレス応答や糖の新生などの作用を持つとされる、副腎皮質系ステロイド（コルチコステロン）の脳内合成系は存在するか。その活性、合成酵素群の発現、産物の脳内濃度はどうなっているのか。
- (2) 脳発達段階の脳内性ステロイド合成系はどうなっているのか。発達期の脳内ステロイド合成活性は成獣の活性と比べどの程度であるか。

という上記の2点が重要かつ未解決な問題として存在している。

(1)副腎皮質ステロイドの海馬内合成系

コルチコステロン（CORT）はステロイドホルモンの一つであり、末梢の合成器官である副腎から放出され、血流を通じて脳を含む標的器官に達し作用する。また CORT はストレス応答時に血中濃度が急激に上昇することが知られており、そのストレスとの密接な関係からストレスステロイドとも呼ばれる。CORT は神経系においても生理作用を持ち、記憶・学習の中枢である海馬において神経伝達効率の変化などを引き起こすことが報告されている。過去のストレスに関連する病理学的な研究から、海馬は脳で最もストレスに対し脆弱な部位であること、またストレスが海馬の機能に与える障害が CORT により仲介されていることが分かっている。これらの理由より、CORT が海馬に与える生理作用や、CORT が記憶・学習の効率に与える影響などが盛んに研究されている。

海馬に対する CORT の作用も、上述のように末梢の合成器官である副腎から放出された CORT が血流を介して海馬に達し効果を及ぼすものであるという考え方が常識であった。しかし CORT 以外の性ステロイドが脳において合成されている事実が明らかになり、CORT も性ス

テロイドと同様に脳で新規合成されているという可能性も検討されるようになってきた。そこで本研究では、過去の実験報告がほとんどない、海馬における CORT 合成系の存在とその特徴を明らかにすることを目標とした。

CORT の合成は、シトクロム P450(c21), P450(2D4), P450(11 β), 11 β -HSD の酵素群によって触媒される。P450(c21) はプロゲステロン (PROG) \rightarrow デオキシコルチコステロン (DOC) の反応を触媒する酵素であるが、脳内では発現していないと思われる。P450(11 β) は DOC \rightarrow CORT の反応を触媒する酵素であるが、脳内の発現に関するしつかりとした報告は乏しい。CORT は 11 β -HSD により不活性なステロイドである 11-dehydro-CORT に変換される。また、最近になり薬物代謝を担う P450(2D4) が P450(c21) と同様の PROG を基質とした DOC 合成能を持つことが報告されている。これらの酵素の海馬における発現と活性を知ることが、脳における CORT 合成系の存在の証明には必須である。

目標を達成するため、RT-PCR を用いて CORT の合成酵素群の mRNA 発現を調べた。その結果、P450(c21), P450(2D4), P450(11 β 1), P450(11 β 2), 11 β -HSD1, 11 β -HSD2 の mRNA は全てラットの海馬をはじめとする脳各部位で発現していることが明らかになった。

ラット脳海馬での P450(c21) mRNA の発現は本研究によりはじめて発見されたものである。この発見は、プライマーを Gibbs 自由エネルギーの計算により熱力学的に最適化し、検出感度を大幅に改善したため可能となった。P450(c21) は活性型とスプライスバリエントの不活性型があるが、脳では活性型がほとんどであった。また海馬をはじめとする脳各部位では、11-dehydro-CORT を CORT に変換する 11 β -HSD1 が、逆反応を触媒する 11 β -HSD2 よりも高発現していて、一旦合成した CORT は不活性化されないようになっていた。

また、CORT 合成酵素群が神経細胞に存在しているかグリア細胞に存在しているかなど、組織学的な特徴を明らかにするため *in situ* hybridization を用いた局在解析を行った。局在解析は P450(2D4), P450(11 β 1) および 5 α -reductase について行った。5 α -reductase は PROG からジヒドロプロゲステロン(DH-PROG), DOC からジヒドロデオキシコルチコステロン(DH-DOC)を合成する酵素である。染色の結果、P450(2D4), P450(11 β 1), 5 α -reductase はすべて海馬のグルタミン酸神経細胞に発現しており、グリア細胞における発現は神経細胞に比べわずかであることが明らかになった。

合成酵素タンパク質の神経細胞における発現・細胞内局在を調べるため、P450(c21), P450(2D4), P450(11 β 1) を対象に金抗体免疫染色法による解析をおこなった。その結果、神経細胞においても末梢と同様に P450(c21) と P450(2D4) が小胞体膜上、P450(11 β 1) ミトコンドリア内膜上に局在していること、加えてこれらの酵素が神経の接合部であるシナプス上にも存在しているということを初めて発見した。

合成酵素の活性も調べるため、海馬を試料として ^3H 標識ステロイドを基質とした代謝実験を行った。 ^3H 標識 PROG を基質とした代謝実験では DOC のピークが観察され、海馬に DOC の合成能があることが明らかになった。また、 ^3H 標識 DOC を基質とした代謝実験でも CORT のピークが観察された。これは海馬に CORT の合成能が確かに存在していることを示唆している。

CORT を基質とした代謝実験では、代謝産物のピークは観察されず、CORT は分解・不活性化されないことが明らかになった。

また、副腎による合成の寄与を除外して海馬のみの CORT 合成能を調べるため、副腎切除ラットの血漿中および海馬内 CORT 濃度および DOC 濃度を、LC-MS/MS 質量分析により測定した。その結果 CORT, DOC とともに血漿中濃度に比べ海馬内濃度が有意に高く、海馬で独自に合成されていることが証明された。副腎切除ラットの海馬における CORT 濃度は 7nM 程度であった。

以上の実験結果より、ラットの海馬において CORT の合成系が確かに存在し、PROG から DOC, さらに DOC から CORT の合成活性が存在することが明らかになった。脳で合成された CORT は 7nM 程度であった。CORT はこの濃度では神経成長・保護作用を示すと思われる。

(2) 生後 10 日齢の発達期の海馬内性ステロイド合成系と成獣における合成系との比較

従来より脳内ステロイド合成系の研究は、脳の性分化の面から発達期で盛んに行われてきた。一方で成獣の脳での性ステロイド合成はまったくないか無視できるほど減衰していると考えられてきたが、近年の川戸研究室の研究から成獣にも脳内性ステロイド合成系があることが判明し、従来から知られていた発達期の合成系との比較研究をおこなう必要が生じてきたといえる。

そこで本研究では、比較的報告も多く性分化の臨界期にもあたる生後 10 日齢 (P10) を発達期の代表として選び、それらの脳内性ステロイド合成系と 12 週齢における合成系を比較した。

発達期と成獣期の性ステロイド合成系を比較するため、海馬内性ステロイド合成酵素群の mRNA 発現解析をおこなった。性ステロイド合成にかかわる酵素は主に P450(17 α), 17 β -HSD, 3 β -HSD, P450arom, 5 α -reductase, および 3 α -HSD が存在する。これらの酵素によってコレステロール \rightarrow pregnenolone \rightarrow DHEA \rightarrow androstenedione \rightarrow testosterone (男性ホルモン) \rightarrow estradiol (女性ホルモン) あるいは testosterone \rightarrow dihydrotestosterone (強い男性ホルモン) \rightarrow androstanediol と合成が進む。

これらの酵素の発現解析をおこなった結果、一部の酵素を除くほぼ全ての酵素において、P10 における mRNA 発現量は 12 週齢に比べて、1.3 - 1.5 倍程度であることが明らかになった。

実際の酵素活性を調べるため、各種の ^3H -標識ステロイドを基質とした代謝実験をおこなったところ、各ステップにおいて、P10 における合成活性は 12 週齢と比べておよそ約 2-7 倍程度であることが明らかになった。

この結果は、発達期から成獣にかけてステロイド合成系の活性が激減する (1/100 位になる) のではないかという、従来の予想より減少が少ないということを明らかにした。すなわち、成獣になっても脳内性ステロイド合成系は消失するわけではなく、活発な性ホルモン合成がおこなわれているということである。