

## 嗅球の神経ステロイド

## Neurosteroids in the Rat Olfactory Bulb

清蔭 恵美<sup>a</sup>, 樋田 一徳<sup>a</sup>, 山本登志子<sup>b</sup>, 石村 和敬<sup>c</sup>

Emi Kiyokage, Kazunori Toida, Toshiko Yamamoto and Kazunori Ishimura

<sup>a</sup>川崎医科大学解剖学<sup>b</sup>岡山県立大学保健福祉学部栄養学科<sup>c</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部顕微解剖学分野

**要旨** 副腎・性腺などの末梢器官とは独立して中枢神経系で *de novo* 合成されるステロイド物質は神経ステロイドと呼ばれ、神経機能の調整と維持に関わっていると考えられているが、その存在意義は未だ十分明らかになっていない。このため我々は神経ステロイドを合成する酵素に着目し、その局在を解析している。本稿ではステロイド合成酵素のうち testosterone や progesterone を還元する酵素である 5 $\alpha$ -reductase の嗅球における局在についての解析結果を紹介し、神経ステロイドの存在意義を合成酵素の点から考えてみたい。

**キーワード**：神経ステロイド, 5 $\alpha$ -reductase, グリア, 嗅球

## 1. はじめに

ステロイドホルモンは主に性腺・副腎皮質などの内分泌器官で産生され、血流を介して標的組織に作用し、生体機能に著明な影響を及ぼす。ところが20年程前から末梢器官とは独立して神経組織においてもステロイドが *de novo* 生合成されることがわかり、“神経ステロイド”<sup>1)</sup>と命名された。その後の研究で、特に海馬、小脳、大脳皮質などにおけるステロイド合成酵素の存在が注目されている<sup>2)</sup>。しかし、神経ステロイドの存在と作用機序の詳細は依然として推測の域を出ない。これは(1)神経ステロイドの存在様式が脳領域によって異なること、(2)ステロイドの産生細胞がニューロンかグリアか確定されていないこと、(3)ステロイドが多種類の酵素によって多段階的に合成されること、(4)ステロイドが作用する受容体の存在様式と局在に十分な確証が得られていないこと、などに起因する。このため、神経ステロイドの理解には、合成酵素と受容体の組織・細胞レベルの局在と発現動態の探求が不可欠であると考えられる。本稿ではこれまでの筆者らの解析例を紹介しながら、ステロイド合成酵素の局在とその役割について考えてみたい。

## 2. 神経系におけるステロイド生合成

現在までにわかっている神経系のステロイド生合成経路を図1に示す<sup>2)</sup>。まず cholesterol から cholesterol side-chain

cleavage enzyme (P450scc) によって pregnenolone が生合成される。次いで 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) により progesterone になり、ここから二つの代謝経路に分かれる。ひとつは GABA<sub>A</sub> 受容体の調節物質である 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroprogesterone (THP) を生合成する経路で、5 $\alpha$ -reductase によって 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone (5 $\alpha$ -DHP) が合成され、更に 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD) により THP が合成される。もうひとつの経路では androstenedione から 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) により testosterone へ、さらに aromatase (P450arom) により estradiol へと段階的に生合成される。また testosterone は、5 $\alpha$ -reductase によってより強いアンドロゲン作用をもつ 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (5 $\alpha$ -DHT) に変換される。

3. ラット嗅球での 5 $\alpha$ -reductase の局在解析

上述のように、5 $\alpha$ -reductase は、生理活性の高いステロイドの合成酵素として重要であり、またマウス脳での 5 $\alpha$ -reductase と 3 $\alpha$ -HSD mRNA は共に嗅球で最も著しい発現がみられたことから<sup>3)</sup>、我々は特に神経ステロイドの合成の意義を知るためのモデルとして、5 $\alpha$ -reductase の嗅球内での詳細な局在の解析を行った。

5 $\alpha$ -reductase には type 1 と type 2 の二つのアイソフォームがあるが、主に脳で発現する 5 $\alpha$ -reductase type 1 についての局在解析を行った<sup>4)</sup>。RT-PCR 法の結果、異なる週齢、性腺及び下垂体摘出ラットでも性差なく、またマウスでも同様の発現が確認され、5 $\alpha$ -reductase は内分泌生殖系の影響を受けず嗅球内で恒常的に発現することが示された。また薄層クロマトグラフィー法において嗅球での 5 $\alpha$ -reductase の酵素活性

<sup>a</sup> 〒701-0192 倉敷市松島577

TEL: (+81) 86-462-1111 ext. 26420; FAX: (+81) 86-462-1199

E-mail: ekiyokage@med.kawasaki-m.ac.jp

2009年6月2日受付

も確認された<sup>5)</sup>.

次に、5 $\alpha$ -reductase type1 に対する特異的抗体を用いてその局在を検討した。5 $\alpha$ -reductase 免疫陽性細胞 (5 $\alpha$ -reductase(+)細胞) は免疫反応の強度の違いはあるものの嗅球全層に見られた (図 2a, b)。最も強い免疫反応性は嗅神経細胞層に見られ、細長く嗅神経軸索束に沿って見られた (図 2b)。また糸球体層では傍糸球体領域に 5 $\alpha$ -reductase(+) 細胞が見られ

た (図 2b)。外網状層及び顆粒細胞層では全般に分布しており、近傍の血管周囲に突起を伸ばす細胞 (図 2c) と有髄線維に突起を伸ばす細胞 (図 2d) の 2 種類の細胞が見られたが、投射ニューロン (僧帽細胞) にはほとんど免疫反応性はなかった (図 2b)。

次にこれらの細胞を同定するために更に蛍光多重染色を行った。嗅神経細胞に特異的な抗 olfactory marker protein 抗

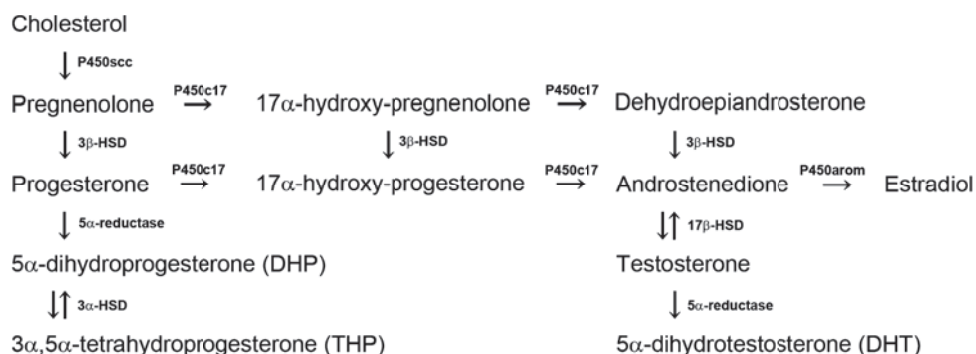


図 1 神経系におけるステロイドの生合成経路

P450scc; cholesterol side chain cleavage enzyme, 3 $\beta$ -HSD; 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, P450c17; 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-C20-lyase, 17 $\beta$ -HSD; 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, P450arom; aromatase, 3 $\alpha$ -HSD; 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase.

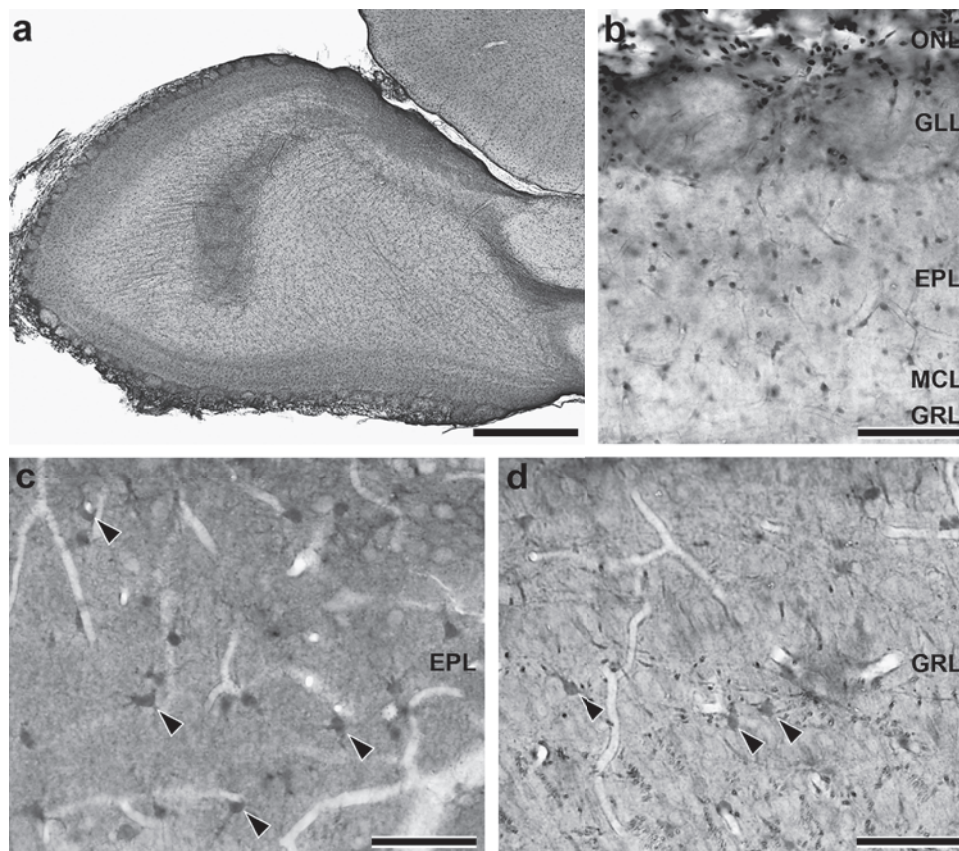


図 2 ラット嗅球における 5 $\alpha$ -reductase の免疫組織化学

a; 嗅球全体像を示す傍矢状断面像。b; 嗅球の層構造と 5 $\alpha$ -reductase 免疫陽性細胞の分布。様々な免疫反応性を示す 5 $\alpha$ -reductase 陽性細胞が全層に見られる。ONL; 嗅神経細胞層, GLL; 糸球体層, EPL; 外網状層, MCL; 僧帽細胞層, GRL; 顆粒細胞層。c; 外網状層の拡大像。d; 顆粒細胞層の拡大像。鏃は 5 $\alpha$ -reductase 免疫陽性細胞を示す。Scale bars; 1 mm (a), 100  $\mu$ m (b), 50  $\mu$ m (c, d)。

体とニューロンマーカーの抗 protein gene product 9.5 抗体を用いて染色したが 5 $\alpha$ -reductase との共存関係はなかった<sup>5)</sup>. 次にグリアマーカーである抗 S-100 $\beta$  抗体 (アストロサイト) と抗 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) 抗体 (オリゴデンドロサイト) を用いて蛍光多重染色を行ったところ, ほとんど全ての 5 $\alpha$ -reductase(+) 細胞は S-100 $\beta$  と CNPase のどちらかを発現していた (図 3a, b).

5 $\alpha$ -reductase 免疫反応性が最も強い嗅神経細胞層には 2 種類のグリアが存在する. 一つはアストロサイト, もう一つは olfactory ensheathing cells (OECs) である<sup>6)</sup>. 嗅上皮にある嗅細胞の軸索は嗅球表層にある特定の糸球体へと集束している. この嗅細胞は生後もニューロン新生を続け, 新生した嗅細胞軸索は同じ標的糸球体へと投射し, 古いニューロンと置き換わるが, OECs はこの軸索の誘導に関わっているという<sup>7)</sup>. OECs はアストロサイトのマーカーである S-100 $\beta$  の他に neuropeptide-Y (NPY) の免疫反応性を示すと報告されているが<sup>8)</sup>, 5 $\alpha$ -reductase は嗅神経細胞層でほとんどの S-100 $\beta$  と共存関係があること, 全ての 5 $\alpha$ -reductase(+)/S-100 $\beta$ (+) 細胞が glial fibrillary acidic protein (GFAP) を発現

しないこと (図 3c), 抗 NPY 抗体を用いて三重染色を行った結果, 5 $\alpha$ -reductase(+)/S-100 $\beta$ (+)/NPY(+) 細胞が多く観察され (図 3d), それらは嗅細胞軸索束に沿って存在していた (図 3e), などの知見から, 5 $\alpha$ -reductase は嗅神経細胞層においてアストロサイトだけではなく OECs にも局在することが明らかになった.

次に嗅球各層での 5 $\alpha$ -reductase と S-100 $\beta$  及び CNPase 陽性細胞間での共存関係を検討した. 単位体積あたり 5 $\alpha$ -reductase(+) 細胞が最も多いのは嗅神経細胞層, 次いで糸球体層, 顆粒層, 外網状層の順になる. 嗅神経細胞層の 5 $\alpha$ -reductase(+) 細胞のうち 91.6% が S-100 $\beta$ (+), 8.4% は 5 $\alpha$ -reductase(+) のみで, CNPase との共存は見られなかった. S-100 $\beta$  との共存率は糸球体層 84.9%, 外網状層 89.7%, 顆粒層 52.3% で, CNPase との共存率は糸球体層 9.6%, 外網状層 8.2%, 顆粒層 35.6% を示し, 各層での 5 $\alpha$ -reductase と S-100 $\beta$  との共存率は CNPase よりも高いが, 顆粒層では CNPase と最も高い共存関係を示した<sup>5)</sup>. このように 5 $\alpha$ -reductase は嗅球全層のグリアに局在することから, 嗅球の基本的神経回路の維持のため, 特にニューロンとグリア間

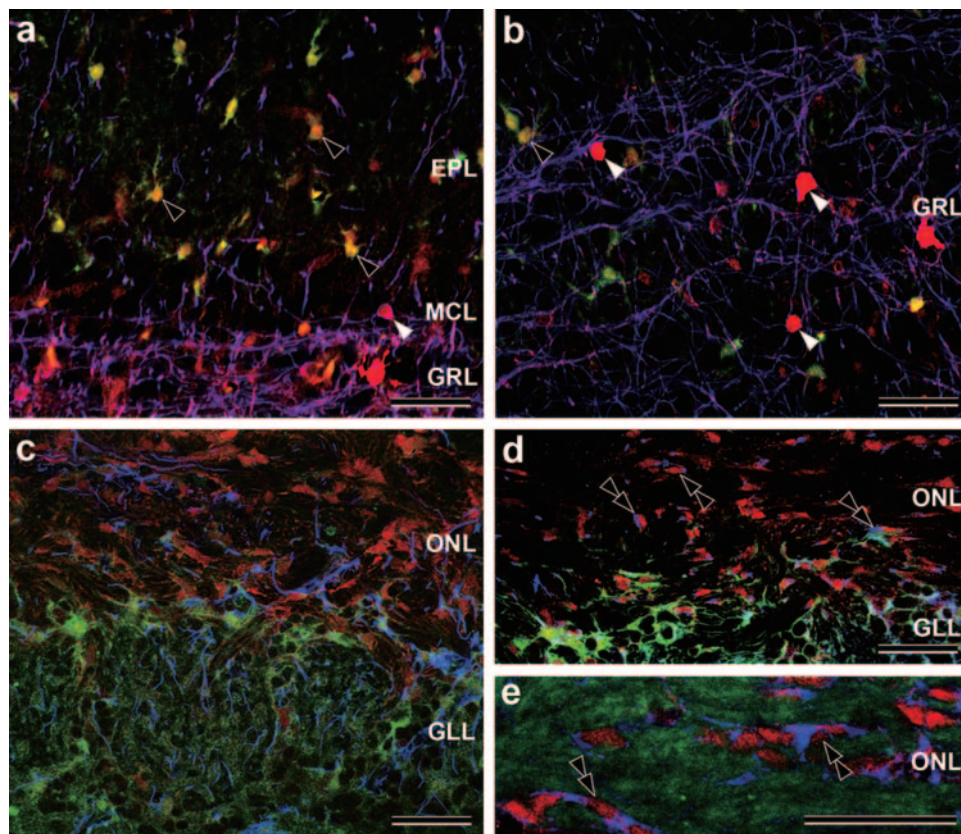


図 3 多重蛍光染色によるラット嗅球における 5 $\alpha$ -reductase の局在

a, b; 5 $\alpha$ -reductase (赤), S-100 $\beta$  (緑), 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase, 青) との蛍光三重染色. すべての S-100 $\beta$  陽性細胞 (鏃) とすべての CNPase 陽性細胞 (白鏃) は 5 $\alpha$ -reductase を発現している. c; 5 $\alpha$ -reductase (赤), S-100 $\beta$  (緑), glial fibrillary acidic protein (GFAP, 青) との蛍光三重染色. GFAP を発現していない 5 $\alpha$ -reductase も見られる. d; 嗅神経細胞層と糸球体層での 5 $\alpha$ -reductase (赤), S-100 $\beta$  (緑), neuropeptide-Y (NPY, 青) の蛍光三重染色. NPY 免疫反応性は S-100 $\beta$  及び 5 $\alpha$ -reductase の両方を発現している (二重鏃). e; 5 $\alpha$ -reductase (赤), olfactory marker protein (緑), NPY (青) の蛍光三重染色. 二重鏃は 5 $\alpha$ -reductase と NPY の両方を発現した olfactory ensheathing cells を示す. Scale bars; 50  $\mu$ m (a-e).

の機能的な相互作用の調節に関わっているのかもしれない。また、これまでの我々の研究では特に顕著な性差は認められず、性分化や性差よりも根源的な神経系の機能調節にステロイドが関わっており、そのステロイドは神経系各領域に特異的に発現していると推測される。

#### 4. 神経ステロイドの機能

神経ステロイドはグリアだけではなく、小脳プルキンエ細胞や海馬、大脳皮質の錐体細胞においても生合成され、発達、分化及び機能発現、神経組織の損傷反応の調節をしていると考えられている。主要なステロイドの働きとして、progesteroneには外傷性脳障害後の神経再生促進の作用<sup>9)</sup>、さらにその代謝産物であるTHPでは神経新生促進作用が考えられており、その例としてNiemann-Pick病type Cモデルマウスの延命、小脳プルキンエ細胞・顆粒細胞の保護やコレステロール及びガングリオシドの蓄積を減らす作用などがあげられている<sup>10)</sup>。またestradiolとtestosteroneには共にニューロン保護作用があり、なかでもestradiolは黒質のドーパミンニューロンの神経保護因子として知られる<sup>11)</sup>。

Progesterone, DHP, THPはグリアの発達に関わっていると考えられており、DHPは分化したオリゴデンドロサイトで、THPはオリゴデンドロサイトの前駆細胞で主に生合成される<sup>12)</sup>。更にprogesteroneとTHPはmyelin basic proteinの発現を促し、髄鞘形成に関わっている<sup>13)</sup>。これらのことから、嗅球のオリゴデンドロサイトの5 $\alpha$ -reductaseは髄鞘形成とその維持に関わることが示唆される。

OECsは無髄の嗅細胞軸索束を取り囲み、その形態は末梢のシュワン細胞と似ている。またOECsは様々な神経成長因子を発現し、機能的にもシュワン細胞に類似している。OECsは嗅球内では髄鞘を形成しないが、神経細胞再生、脊髄損傷の機能回復を促し、髄鞘形成能も併せ持つ<sup>14,15)</sup>。主にグリアに局在するS-100 $\beta$ は神経栄養因子としても知られ、アストロサイトもまた軸索伸長やニューロンの保護、損傷ニューロンの再生に関わると考えられている。ほとんど全てのOECsはS-100 $\beta$ を発現することから、OECsの5 $\alpha$ -reductaseは嗅細胞軸索の成長とその保護に関わっているのかもしれない。

アストロサイトに対しステロイドはGFAPの発現に影響する。特にestradiolとその前駆物質であるtestosteroneは、脳組織損傷後のグリオシス反応に対するGFAPの発現と細胞骨格タンパクの発現調節を行い、ニューロンの保護に関わるという<sup>16)</sup>。我々の定量解析の結果、5 $\alpha$ -reductase(+)細胞は嗅球の全層に分布し、そのほとんどがS-100 $\beta$ を発現するアス

トロサイトであったことから、嗅球を構成するニューロンの保護や形成維持に関わることが示唆される。

神経ステロイドはニューロンとグリア双方で生合成され、ニューロンとグリア間の相互作用によって新たな分子シグナルとして働き、この複雑な相互作用を介して神経ステロイドは局所神経回路やその神経機能の恒常的な維持に関わっていると考えられる<sup>2)</sup>。今後、分子レベルから組織レベルの解析のみならず行動レベルでの様々な研究の展開が期待される。

#### 謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費（基盤研究C；16590145, 18590185, 19500295, 20590192）及び自然科学研究機構生理学研究所超高压電子顕微鏡共同利用実験（NIPS-H1250M）の援助によって行われたものである。

#### 文 献

- 1) Baulieu, E.E.: *Biol. Cell.*, 71, 3–10 (1991)
- 2) Panzica, G.C. and Melcangi, R.C.: *Brain Res. Rev.*, 57, 271–276 (2008)
- 3) Dong, E., Matsumoto, K., Uzunova, V., Sugaya, I., Takahata, H., Nomura, H., Watanabe, H., Costa, E. and Guidotti, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2849–2854 (2001)
- 4) Poletti, A., Negri-Cesi, P., Rabuffetti, M., Colciago, A., Celotti, F. and Martini, L.: *Endocrinology*, 139, 2171–2178 (1997)
- 5) Kiyokage, E., Toida, K., Suzuki-Yamamoto, T. and Ishimura, K.: *J. Comp. Neurol.*, 493, 381–395 (2005)
- 6) Graziadei, P.P.C. and Monti-Graziadei, G.A.: *J. Neurocytol.*, 8, 1–18 (1979)
- 7) Ramon-Cueto, A. and Avila, J.: *Brain Res. Bull.*, 46, 175–187 (1998)
- 8) Ubink, R., Halasz, N., Zhang, X., Dagerling, A. and Hokfelt, T.: *Neuroscience*, 60, 709–726 (1994)
- 9) Stein, D.G.: *Brain Res. Rev.*, 57, 385–396 (2008)
- 10) Mellon, S.H., Gong, W. and Schonemann, M.D.: *Brain Res. Rev.*, 57, 409–419 (2008)
- 11) Koppers, E., Ivanova, T., Karolczak, M. and Beyer, C.: *J. Neurocytol.*, 29, 375–385 (2000)
- 12) Gago, N., Akawa, Y., Sananes, N., Guennoun, R., Baulieu, E.E., El-Etr, M. and Schumacher, M.: *Glia*, 36, 295–308 (2001)
- 13) Ghomari, A.M., Ibanez, C., El-Etr, M., Leclerc, P., Eychenne, B., O'Malley, B.W., Baulieu, E.E. and Schumacher, M.: *J. Neurochem.*, 86, 848–859 (2003)
- 14) Li, Y., Field, P.M. and Raisman, G.: *Science*, 277, 2000–2002 (1997)
- 15) Imaizumi, T., Lankford, K.L., Waxman, S.G., Greer, C.A. and Kocsis, J.D.: *J. Neurosci.*, 18, 6176–6185 (1998)
- 16) Garcia-Estrada, J., Del Rio, J.A., Luquin, S., Soriano, E. and Garcia-Segura, L.M.: *Brain Res.*, 628, 271–278 (1993)