

神経ステロイド及び内分泌かく乱物質の

新規非ゲノム性分子標的の研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 溝田 香緒里

[目的]

脳内糖質コルチコイド (CORT)の慢性的な濃度上昇と脳神経細胞の萎縮は、うつ病発症原因としてそれぞれ示唆されている。CORTはゲノム性の核内受容体や非ゲノム性の細胞膜受容体を介して精神神経に作用するとされるが、脳神経系で合成される神経ステロイドが、細胞骨格重合を介して神経突起形態を制御する微小管関連タンパク質 (MAP2)に作用して、非ゲノム的に神経形態を制御することが報告されている。

本研究では、ステロイド、シグマ受容体作動薬、内分泌かく乱物質 (EDCs)による精神神経作用に、MAP2を介した神経形態制御が関与するという仮説の検証を行った。また、肥満細胞の神経ステロイド、EDCsの非ゲノム性分子標的の性格付けを併せて行った。

[実験方法]

胎生 17 日胚ラット海馬初代培養神経細胞を用いて、樹状突起伸展、スパイン形成測定のために、各マーカーの MAP2、PSD95 の抗体染色を行った。また、樹状突起内微小管や、スパイン内アクチン重合の力学的解析のために、GFP-tubulin、actin 各遺伝子を導入した神経細胞で光退色後蛍光回復実験を行った。また、試験管内微小管、アクチン再構成実験、及び、水晶発振子質量分析法を行い、*in vitro* の細胞骨格重合の力学的解析、及び、結合解析をそれぞれ行った。

[結果と考察]

第一章 ストレス応答神経ステロイドによる MAP2 を分子標的とするシナプス後神経の形態可塑制御

1. 神経ステロイドのプレグネノロン (PREG)は、MAP2 に結合して tubulin 重合と樹状突起伸展を促進した一方、CORT は阻害した。
2. どのステロイドも、仮想ステロイド結合部位 (Steroid Binding Pocket; SBP) を除した変異型 MAP2C に結合せず、tubulin 重合を制御しなかった。
3. PREG がアクチン重合と成熟型スパイン形成を促進した一方、CORT は阻害した。

よって、PREG が MAP2C の SBP に結合して、促進作用を示し、PROG が拮抗、CORT が阻害作用を示す可能性を見出した。

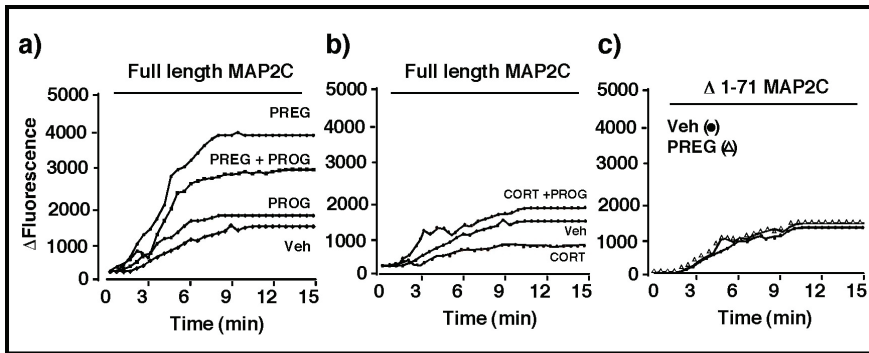


Fig. 1. 神経ステロイドによる MAP2C-tubulin 重合制御 a-b) PREG の促進作用と CORT の阻害作用、PROG による拮抗作用 c) 変異型 MAP2C (Δ 1-71 MAP2C)による PREG の無効化

第二章 シグマ受容体作動薬による MAP2 を分子標的とするシナプス後神経の形態可塑制御

1. シグマ受容体作動薬の SA4503 は MAP2 に結合して tubulin 重合と樹状突起伸展を促進したが、PROG やシグマ受容体作動薬の NE-100 で拮抗された。
2. SA4503 は 変異型 MAP2C-tubulin 重合を促進しなかった。
3. SA4503 はアクチン重合と成熟型スパイン形成を促進したが、NE-100 で拮抗された。

よって、SA4503 が MAP2C の SBP に結合して促進作用を示し、NE-100 が拮抗作用を示す可能性を見出した。

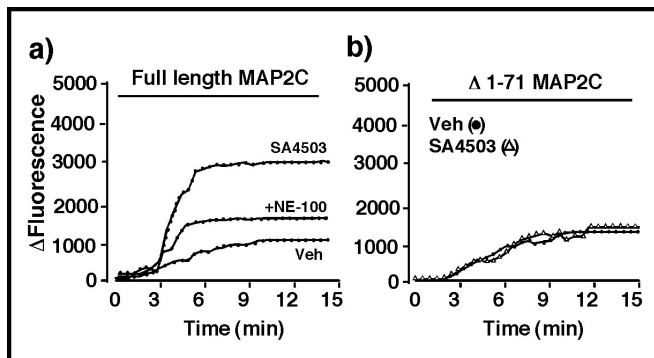


Fig. 2. シグマ受容体作動薬による MAP2C-tubulin 重合制御 a) SA4503 の促進作用と NE-100 による拮抗作用 b) 変異型 MAP2C による SA4503 の無効化

第三章 EDCs による MAP2 を標的にした微小管動態と神経突起伸展制御

1. EDCs のペンタクロルフェノール (PCP)は、MAP2 に結合して tubulin 重合と樹状突起伸展を促進したが、PROG で拮抗された。EDCs のビスフェノール A (BPA)は、PREG の作用を拮抗した。
2. PCP は、変異型 MAP2C-tubulin 重合を促進しなかった。

よって、PCP が MAP2C の SBP に結合して促進作用を示し、BPA が拮抗作用を示す可能性を見出した。

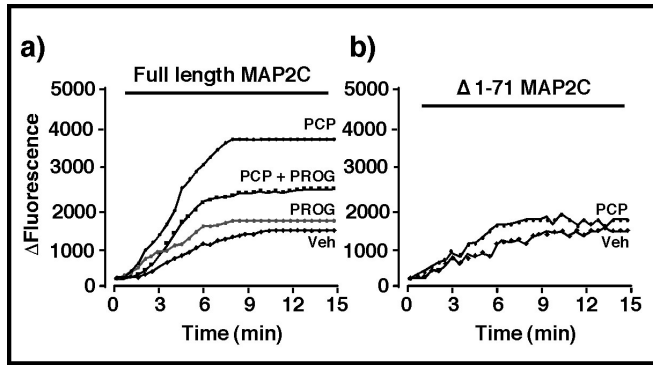


Fig. 3. EDCsによるMAP2C-tubulin重合制御 a) PCPの促進作用とPROGによる拮抗作用 b) 変異型MAP2CによるPCPの無効化

第四章 ラット肥満細胞株 (RBL-2H3 細胞)における神経ステロイド、EDCsによるG_{q/11}タンパク質連関型神経ステロイド受容体を介した脱顆粒応答制御

1. 肥満細胞での神経ステロイドのデヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体 (DHEAS)による脱顆粒応答は、G_{q/11}阻害で拮抗された。また、アトラジン (ATZ)以外のEDCsはDHEASの作用を拮抗したが、ATZはDHEAS同様に作用した。
2. マウス個体でのDHEASによる侵害性応答や血管透過性の亢進は、抗ヒスタミン薬やEDCsで拮抗された。ATZはDHEAS同様に作用した。

よって、神経ステロイド、EDCsがG_{q/11}タンパク質連関型受容体を介して脱顆粒応答を制御する可能性が示された。

[結論]

本研究では、ステロイドがMAP2のSBPに結合して、細胞骨格重合を介して神経形態の制御をする可能性を見出した。MAP2を介する神経形態制御機構は、既存のうつ病治療のモノアミン補充療法とは別の、新たな治療戦略として期待される。

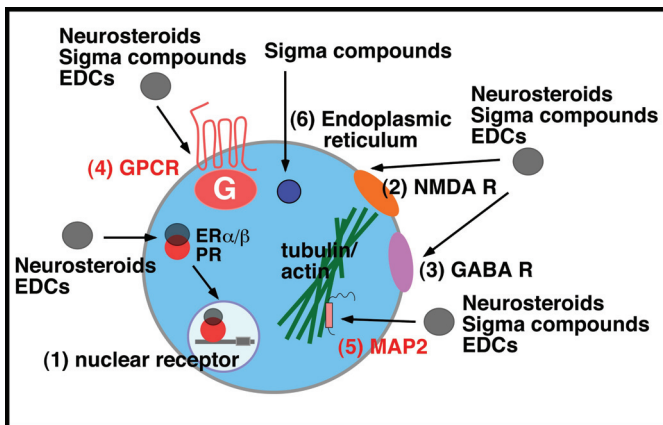


Fig. 4. 各薬物の作用点モデル 1) 核内受容体 2-3) NMDA, GABA 各受容体 4) Gタンパク質連関型受容体 5) MAP2 6) 小胞体

- 1) Neuroreport, Oct; 8;19(15):1529-33 (2008)
- 2) British Journal of Pharmacology, Jun; 145(4):545-50 (2005)
- 3) Toxicological Sciences, Apr; 90(2):362-8 (2006)