

脊椎動物の免疫器官におけるステロイドホルモンの生合成とその生理作用の解析

Expression and localization of steroidogenic enzymes in vertebrate immune organs.

プロジェクト代表者：小林哲也（理工学研究科・准教授）

Tetsuya KOBAYASHI (Graduate School of Science and Engineering, Associate Professor)

1 序論

ステロイドホルモンは生殖腺や副腎といった内分泌器官で主に産生されるホルモンと考えられてきた。しかしながら、近年、中枢神経系である脳においても産生されていることが明らかとなった。この脳内で合成されるステロイドホルモンはニューロステロイドと呼ばれ、記憶・学習や行動の制御に関わると考えられている (Tsutsui K *et al.*, 2003)。

一方、ファブリキウス嚢はB細胞の分化・増殖に必要な鳥類に固有な一次リンパ器官で、胚期に総排泄腔の背側の腸管が膨らんで形成される。この嚢は、主に皮質及び髄質構造を持つ多くのリンパ濾胞から構成されるが、このリンパ濾胞は、濾胞関連性上皮と呼ばれる貧食能のある特殊な上皮と接して外界からの抗原刺激を受けることで、ファブリキウス嚢内でB細胞の成熟が進むものと考えられている (Cooper MD *et al.*, 1972)。

申請者は最近、ファブリキウス嚢内にステロイドホルモンの一種であるテストステロンが存在することを明らかにした。この事実は、免疫系においてもステロイドホルモンが合成されている可能性を示唆する。そこで本研究では、ステロイドホルモンが免疫器官においても合成されていることを示すことで、同ホルモンが内分泌系 - 神経系 - 免疫系内で広く合成される普遍的な液性因子であることを検証することを目的とした。

2 材料と方法

材料：6週齢の雄のニホンウズラ、及び、胚からファブリキウス嚢を摘出し液体窒素で凍結させ、実験に用いるまで - 80 °C で保存した。また、10週齢の雄マウスの虫垂も摘出し、同様に保存した。

mRNAの発現：ファブリキウス嚢から抽出したRNAと、既知のステロイドホルモン合成酵素の塩基配列を参考に作成したプライマーを用いて、各種のステロイドホルモン合成酵素の遺伝子の発現をRT-PCR法により検討した。PCR産物はシーケンス解析を行ない塩基配列を決定した。さらに、ステロイドホルモンに対する受容体遺伝子の発現も同様に検討した。加えて、マウス虫垂から抽出したRNAを用いて、ステロイドホルモンの合成酵素と受容体の遺伝子発現についても同様に検討した。

免疫組織化学：mRNAの発現が確認された酵素のうち、P450sccとP450aromについては予想アミノ酸配列からペプチド断片を合成し、ヘモシアニンに結合後、ウサギに免疫することで抗血清を作成した。目的の抗体をアフィニティー精製した後、蛍光抗体法を用いて、ファブリキウス嚢におけるP450sccとP450aromのタンパク質レベルでの発現を検討した。

3 結果と考察

ステロイドホルモン合成酵素 (P450scc、3 β -HSD、P450c17、17 β -HSD及びP450arom) の遺伝子レベルの発現について検討した。RT-PCR法及びPCR産物のシーケンス解析を行なった結

果、上記5種類の酵素遺伝子のmRNA発現が確認された。成体のウズラのファブリキウス嚢内には常在細菌が存在するため、この常在細菌がステロイドホルモンの合成に関与している可能性も否定できない。そこで、常在細菌が存在していない胚期のファブリキウス嚢を用いて同様な検討を行ったところ、先と同様に各酵素遺伝子のmRNAの発現が確認された。したがって、ファブリキウス嚢では胚期からステロイドホルモン合成酵素のmRNAが発現していることが明らかである。

続いて、ステロイドホルモンの合成において律速段階を触媒するP450sccと、最終段階を触媒するP450aromについてタンパク質レベルでの発現について検討した。このため、両酵素に対する抗ペプチド抗体の作成を行った。この抗体を用いて、5~6週齢のファブリキウス嚢の組織切片の蛍光抗体染色を行なった結果、ファブリキウス嚢内にP450scc及びP450aromの陽性反応が検出された。また、これら酵素と濾胞樹状細胞のマーカーとして知られるS-100タンパク質の抗体を用いて蛍光二重染色法を行ったところ、同一細胞内に両者の陽性反応が認められ、酵素を発現している細胞の一部は濾胞樹状細胞であることが明らかとなった。

さらに、ファブリキウス嚢内ではステロイドホルモンに対する受容体のmRNAの発現も確認された。したがって、鳥類の免疫器官であるファブリキウス嚢では、ステロイドホルモン合成酵素によりコレステロールからステロイドホルモンが合成され、オートクライン・パラクライン機構で受容体に作用して、ファブリキウス嚢自身の機能を調節しているものと考えられる。特に、濾胞樹状細胞はB細胞の選択に関わるとされていることから、ファブリキウス嚢内で合成されるステロイドホルモンは抗体の産生に関わっているものと推測される。

ファブリキウス嚢は腸管付属リンパ組織 (GALT) の一種で、ヒツジの回腸パイエル板やウサギやヒトの虫垂といったGALTと構造的・機能的に相同であるとする報告がみられる (Joseph F *et al.*, 2000; Yasuda M *et al.*, 2002)。そこで哺乳類であるマウスの虫垂を用いて同様の検討を行ったところ、ステロイドホルモンの合成酵素と受容体のmRNAの発現が確認された。したがって、ステロイドホルモンは、副腎、生殖腺、脳で産生されるホルモンとこれまで考えられてきたが、本研究によって、内分泌系 - 神経系 - 免疫系内で広く合成される普遍的な液性因子であると捉えなおすことで、同ホルモンの多様な生理作用を理解することが可能になるものと考えられる。

4 参考文献

- Cooper MD, Lawton AR, Kincade PW. 1972. A two-stage model for development of antibody-producing cells. Clin. Exp. Immunol. 11, 143-149.
- Dasso FJ, Obiakor H, Bach H, Anderson AO, Mage RG. 2000. A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. Dev Comp Immunol. 24(8), 797-814.
- Tsutsui K, Sakamoto H, Ukena K. 2003. Biosynthesis and action of neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron. J Steroid Biochem Mol Biol. 85(2-5), 3113-3121.
- Yasuda M, Tanaka S, Arakawa H, Taura Y, Yokomizo Y, Ekino S. 2002. A comparative study of gut-associated lymphoid tissue in calf and chicken. Anat Rec. 266(4), 207-217.