

# 海馬でのテストステロン産生

## Hippocampal production of testosterone

Suguru Kawato 川戸 佳

(順天堂大学大学院医学研究科泌尿器外科学)

E-mail : kawato@bio.c.u-tokyo.ac.jp

### Key Words

- 海馬
- テストステロン
- 局所合成
- 神経
- 記憶

### Summary

Local production of testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) and estradiol (E2) in the hippocampus may be a very important factor, when we consider the effects of T replacement therapy on andropausal disorders, dementia or Alzheimer's disease. T, DHT and E2 are synthesized by cytochrome P450s in hippocampal glutamatergic neurons, and these sex-hormones act rapidly to modulate neuronal synaptic plasticity. In pathway of steroidogenesis, cholesterol is converted to DHEA, T and finally to DHT and E2. Significant expression of mRNA for steroid synthesizing enzymes [P450scc, P450 (17 $\alpha$ ), P450arom, 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD and 5 $\alpha$ -reductase] is demonstrated. Although their mRNA levels in the hippocampus are 1/200-1/500 of those in the testis, these enzymes can produce sufficient level of T and E2, within a small volume of the hippocampus.

Because the T level in the hippocampus is higher than that in blood plasma, hippocampal T may play a major role in modulation of hippocampal memory formation, in addition to gonadal T which reaches the brain via the blood circulation. Localization of androgen receptor AR in glutamatergic neurons of the CA1 hippocampal region implies that T may modulate spatial memory.



著者プロフィール  
川戸 佳

順天堂大学大学院医学研究科泌尿器外科学客員教授

1974年 京都大学理学部物理学卒業

1979年 東京大学理学系研究科物理学専攻博士課程修了

1984年 東京大学助教授

1994年 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻教授

2015年 東京大学定年退職

2015年 順天堂大学大学院医学研究科泌尿器外科学客員教授

専門は、脳科学と男性医学。海馬が合成する男性・女性ホルモンの記憶増強作用とアンチエイジング作用。

### 2000年以前の風景

長年にわたり、ステロイドホルモンは脳内で合成されることはなく、男性・女性ホルモンは血流に乗って脳血管を越えて脳内に侵入し作用する

という概念が当たり前であった。1990年代後半に分子生物学が発展して微量の mRNA が測定できるようになって、脳内に多くのシトクロム P450 の mRNA が存在することが国際会議で発表されたが、卵巣、精巣、副腎皮

質、肝臓の1/100以下であるという報告ばかりで、あまりの低濃度に、ほとんどのP450生化学者は脳での働きは重要性がないものだと考え、研究から撤退していった。このようなネガティブな雰囲気の中でも、1980年代から脳でステロイド合成の研究をしていた開拓者はいて、それはP450研究者ではなく、代謝研究を主にしていたパリの国立保健医学研究機構 (INSERM) のBaulieu教授であった(1989年にラスカー賞を受賞)。1999年の奈良でのステロイドホルモン国際会議で飲んだとき、奥さんが「ところで、あなた何でニューロステロイドって名前をつけたの?」と聞くと、「いやー、スウェーデンの国際会議で隣のセッションがニューロペプチドという名前だったので、ニューロステロイドって名前をつけたんだよ」「あらーそんな簡単な理由?」ということだった。

2000年以前には、末梢グリア細胞でプロゲステロン (PROG) の合成を止めると神経のミエリン生成が止まった、という論文が出たり、グリア細胞でステロイド合成酵素の mRNA の発現が報告され、ステロイド合成があるのではないか、という論文が出たり、この頃は培養が簡単なグリア細胞を用いて多くの研究がなされた。ところが、神経は細胞培養できないし、培養しても増殖しないので、蛋白、mRNA、ステロイドの測定値が低く、合成酵素はないと思われていた。

Baulieu教授は、脳全体ではプレグネノロン (PREG) やプロゲステロン (PROG) までがニューロステロイド

であって、その下流のステロイド合成系は脳にはない、つまり、どんな実験からもP450 (17 $\alpha$ ) は存在しないし、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) やテストステロン (T) も合成されないという論文を繰り返し書いていた<sup>1)2)</sup>。したがって、“DHEAより下流の性ステロイドは卵巣、精巣のみで合成され、血中をめぐり、脳に到達して作用する”というのが長く続く常識であった。精巣摘出を行うと2日以内に脳内のTは大きく減少するというのも大きな根拠とされていた。我々は2000年以降に、HPLC精製と質量分析LC/MS/MSを組み合わせて検出感度を100~1,000倍上げること、脳内合成されるTをとらえることができるようになったのだが<sup>3)</sup>、以前のラジオイムノアッセイや質量分析 (MSのみ) の技術ではゼロになってしまうほどに減少したのは無理もない話ではあった。

### 海馬での神経ステロイドの合成

我々も悪戦苦闘していたが、2000年頃になってようやく成果が出てきた。海馬スライスを使用することで、シトクロムP450<sub>scc</sub>, P450 (17 $\alpha$ ), P450<sub>arom</sub>が、ラット海馬のグルタミン酸神経に局在していることを抗体染色で発見した。グリアでの発現は非常に少なかったのが意外だった<sup>3)4)</sup>。Western blotでも単一のバンドとして確認できた。

この後すぐに、ニューヨークのMt.

Sinai大学に飛んで行って電子顕微鏡の金抗体法で調べると、神経の細胞体のミクロソームやミトコンドリアに発現しているだけでなく、予想外に (実は期待して探したのだが) 神経シナプスにも発現していることがわかった。神経シナプスでTやエストラジオール (E2) が合成されていれば、記憶形成に直接関与している可能性が高いので、非常にうれしかった。

その他の多くの合成酵素 (17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase など) はよい抗体がないので、mRNAで検出した (図1)。これらの合成酵素の発現量は精巣や卵巣に比べて大変低く、1/200~1/500くらいであった。同じように抗体染色で、海馬スライスにエストロゲン受容体ER $\alpha$ , ER $\beta$ とアンドロゲン受容体 (AR) の神経発現 (シナプスにも発現) を見出した<sup>5)</sup>。これらの発現量も精巣や卵巣に比べて大変低い。

合成酵素は本当に働いている。<sup>3</sup>H-標識した酵素の基質を海馬スライスとインキュベートして代謝生成物をHPLCで精製して計測を行い、T, ジヒドロテストステロン (DHT), E2などの合成経路を決定した。“コレステロール→PREG (P450<sub>scc</sub>が関与)→PROG (3 $\beta$ -HSDが関与)→DHEA (P450 (17 $\alpha$ )が関与)→T (17 $\beta$ -HSDが関与)→DHT (5 $\alpha$ -reductaseが関与), さらにT→E2 (P450<sub>arom</sub>が関与)”という、精巣と卵巣を合わせたような合成経路が見出された<sup>3)6)</sup>。オスとメスに大きな差はない (ステロイド合成の流れ図は他稿にも出てくる



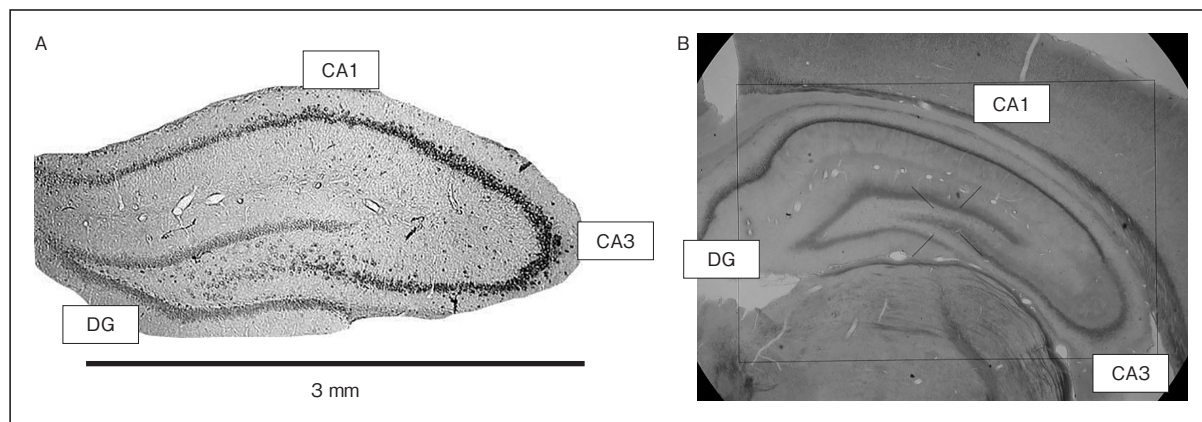


図 1. 海馬のグルタミン酸神経に5α-reductase (DHT 合成酵素) と AR が発現している

A : 5α-reductase は mRNA の in situ hybridization で検出。CA1, CA3, DG 領域に分布<sup>20)</sup>。

B : AR は抗体組織染色 (畑中, 2009, 東京大学博士論文)。AR は CA1 に多く, CA3, DG には少ない。Scale は海馬スライスの左右直径約 3 mm で, 細胞体・核での発現がわかる。

と思われるので割愛する)。

海馬中での性ホルモンの濃度を正確に測定するために、ステロイドをピコリノイル誘導体化し、高感度質量分析 LC/MS/MS にかけることによって最終的に成功した (旧 帝国臓器製薬株式会社・現 あすか製薬株式会社の本間取締役との共同開発)。その結果、成獣オスラットの海馬での濃度は、平均すると T 17nM, DHT 7 nM, E2 8 nM であった<sup>7)</sup>。血漿濃度は T 14nM, DHT 0.6nM, E2 0.01nM であった。血中濃度はこの半分くらいである (血漿は血液の半分くらいなため)。さらに、血中から海馬に入ってくる T の寄与を除くために、精巣摘出したラットの実験を行って比較した結果、T からの DHT の合成経路では、海馬内の T の 8 割は血中から供給され、2 割は海馬内で合成されることがわかった。一方、海馬の DHT は血中より 10 倍多いこともわかった。面白い

ことに、メスでは海馬の E2 (1 nM) は血中 (0.1~0.01nM) より 10 倍以上も高く、メスでも血中から海馬に入る E2 の寄与は非常に低く、海馬内合成が主であることがわかった。メスの E2, T, DHT はオスの 1/10 くらいである<sup>8)</sup>。海馬の T, DHT, E2 はフリーステロイドだが、血中のものうち 98% は SHBG (sex-steroid binding globulin) やアルブミンに結合している (必ずしも不活性体ではないが) ことにも注意すべきであろう。

常識に反して、E2 はオスのほうがメスより 8 倍も多く、性腺や血中での常識とは反対であったのだが、これは面白い。女子学生に「僕の脳のほうが君の脳よりずっと女性ホルモンが多いんだよ」と言うと、変な顔をする。女子学生は、脳は E2 だけで充満していると思っている。男子学生は、脳は T だけで充満していると思っている。「だから欲望に満ちているのでは

ないですか?」と言ったりするが、欲望は視床下部の話。実は、T は海馬に注入すると抗不安作用を示し、そのせいか海馬はやる気の中樞だとされている。さて、誕生直後には、オス海馬では精巣からきた T → E2 へ変換 → オスの神経回路形成という現象が起こっているはずで、E2 は多く、一方、メスでは卵巣はできていなくて、海馬 E2 は少ないはずである (ヒトではこの T シャワー現象は子宮にいるときに起こる)。この E の濃度差が成獣になっても維持されていると考えると推測できる。しかし、海馬における E2 の合成について、多くの論文を発表しているドイツ Hamburg 大学の Rune 教授 (女史) は最近、メス海馬では E2 産生があるが、オス海馬では E2 産生がないという不思議な結果を展開していて、我々と対立している<sup>9)</sup>。彼女らの測定法が下手なのだと思っているが、どちらが正しいかは乞うご期待である。だ

が、これまで日本の複数の研究室はオスの海馬でE2産生を見出しているの<sup>10)</sup>、我々に分があるとみている。

オスでもメスでも、海馬での濃度は血中よりもずっと高かったが、これは内分泌学を学んだ人には不思議であり、なぜだろう?と思うのが普通である。mRNA, Western blot, 抗体染色の解析などから、合成酵素の発現は精巣、卵巣などと比べて1/200~1/500と大変低かったので、ホルモン濃度も血中よりもずっと低いだらうと思うのが自然であり、みんなそう思っていた。しかし、よく考えると必ずしもそうではない。なぜなら、神経細胞は小さく、海馬の体積は0.1mL程度で血管の体積20mLの1/200程度だからである。海馬は全身にステロイドを配送する内分泌器官ではないはずで、海馬では地産地消で使うとすれば、ごく少量の酵素で十分な濃度を維持できるのではないかと考えられるからである。

### 運動で海馬の男性ホルモンDHTが合成できる

男性ホルモンに関しては、面白いことに、若いラットに適度な運動を2週間させると、「海馬の男性ホルモンDHT合成が増加し、受容体ARを介して歯状回DGの神経新生が増える」ことを見出した<sup>11)</sup>(The New York Timesに紹介記事掲載)。精巣摘出したラットでも同様のDHT増加と神経新生増加の効果がある。これは海馬合成の男性ホルモンが神経効果を示す新しい展開である。運動では海馬E2は

増えないし、ERα阻害薬での抑制効果もない。性ホルモン補充療法でなくても、運動すれば記憶力がよくなることは、老人の認知症予防には朗報になるであろう。

### 他の脳部位での合成

我々は、神経内分泌学でよく使われる生殖中枢の視床下部ではなく、記憶中枢の海馬を使用してきたが、その理由は、単純に記憶の研究がやりたかったからだだが、これが神経ステロイド合成を特定するのに適していた。神経内分泌学で多用される視床下部は、脳血液関門が緩く、実験結果の解釈において血中からくるT, E2, DHEAの影響が排除できないので、局所合成の実験には向いていないのである。しかし、視床下部でも合成酵素の発現はかなり多く、海馬の2倍くらいあり重要なのだが、このE2, Tが何をやっているかはいまだに不明である。また、小脳では生誕後の発達期のプルキンエ細胞にはPROG, E2合成系があるという研究があるが<sup>12)</sup>、成獣や老化ラットを調べたところ、小脳ではほぼP450aromがなくなるので、男性ホルモンT, DHTは合成するが、E2合成能はほぼないと思われる<sup>13)</sup>。大脳皮質でも成獣以降にはP450aromは非常に少ない。一方、海馬と視床下部では成獣以降でもP450aromはしっかりとあるので、男性ホルモンや女性ホルモンに対する依存型は異なる。

### 局所合成されたテストステロンは神経シナプスと記憶に作用する

精巣からくるT, DHTのゆっくりとした作用と異なり、局所合成されたT, DHTは急性的にシナプスに作用するのが役割ではないか。神経シナプス可視化の実験では、TやDHTを神経スパイン(=シナプス後部)に2時間作用させると、急性的にスパイン密度が増加した<sup>14)-16)</sup>。“T, DHTがスパイン内の受容体ARに結合する→LIMK, MAPKなどのキナーゼが活性化する→アクチン制御タンパク質のリン酸化を引き起こす→アクチンの重合が起きる結果、スパインが増加する”という作用経路がわかってきた。ARはその発現がCA1>>CA3~DGとCA1に発現が偏っているため、T, DHTは空間認知機能に関与している可能性が大きい。電気生理実験では、海馬スライスのP450aromをわずか20分阻害してT→E2産生を止めただけで、長期増強LTPが小さくなるということが見出された<sup>17)-19)</sup>。これは、局所E2合成が効くことを示した点で画期的である。ところが、DHT, TはE2と反対にLTPを抑える方向に働くということがわかってきた<sup>18)19)</sup>。T, DHTはE2による過剰興奮性を抑えているのであろうか?

以上の話をまとめて、男性・女性ホルモンの局所合成と作用のモデルを図2に示す。



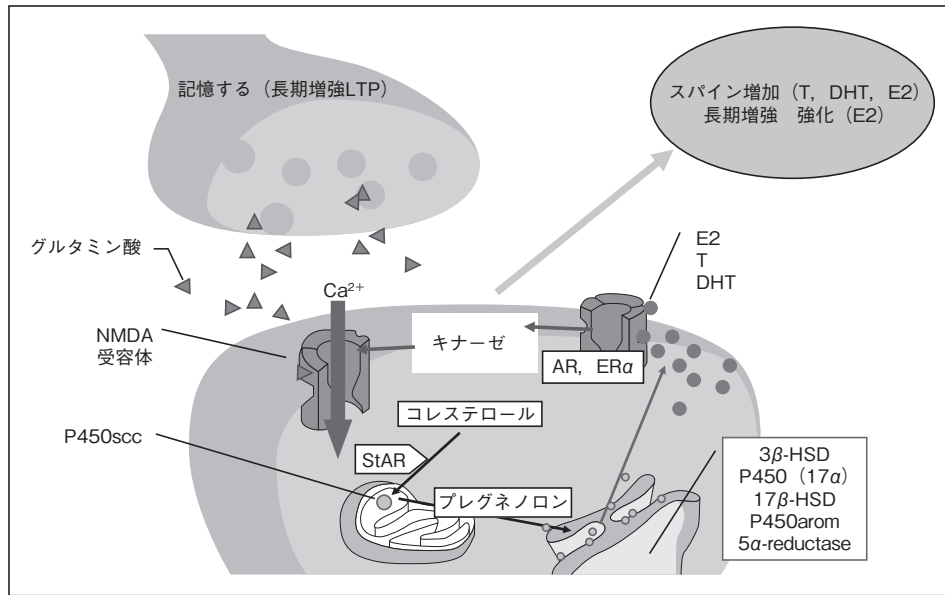


図2. 海馬グルタミン酸神経のシナプスでのT, DHT, E2の合成と、神経シナプス伝達の速いモジュレーションの機構

ここではP450などの合成酵素やAR, ERは神経スパイン内にあるものを描いているが、もちろん細胞体にもあり、両方で合成と作用が起こっている。神経で合成→作用の地産地消が起こるので神経分泌 (neurocrine) ともいえるし、シナプスでも起こるのでシナプス分泌 (synaptocrine) ともいえる。脳のステロイド合成は、神経活動に依存して速く起こるパルスの合成である。E2合成を20分止める (P450aromを阻害) だけでE2作用もすぐ止まる。一方、血中から脳にくるT, DHT, E2は時間変化がサーカディアンリズムに依存していて、ゆっくりと変動し、基盤ステロイド濃度を保っている。

## 加齢と神経シナプスとホルモン補充

現在、記憶のアンチエイジングは世界の大関心事である。1995年までは、老化すると脳の神経細胞は死んでゆくと論文に書いてあった。ところが1995年以降は、正常老化の場合、海馬の神経細胞は死なず委縮もしないということが立証された。そうすると、正常老化ではどうやって記憶力が低下するのだろうか？ 我々は最近、ラットでは正常な加齢により海馬内のTやE2が低下し、スパイン数が減少し、シナプスも減少するので、記憶機能が低下する

というデータを得ている。更年期や加齢で記憶機能が低下し、男性ホルモン補充療法 (注射、塗り薬) でTを送り込むと、海馬の記憶能力を活性化できそうであり、女性ホルモン補充療法でのE2の作用と同じように、神経スパイン密度の回復効果が起こると予想している。一方、正常老化ではないアルツハイマー病マウスの海馬では、18ヵ月を超えると加齢とともに神経細胞が死んで数が低下し、スパイン密度も急激に減少することが報告されているので、神経細胞死が起こる前にホルモン補充を行うことが重要だと思われる。ちなみに、2014年に80歳でエ

ベレスト登頂に成功した三浦雄一郎さんは、T注射でトレーニングをやる気が回復したという話をしている (直接対話で聞いた)、かなり年をとっていても補充療法は効くのかもかもしれない。

### ●文献

- 1) Baulieu EE. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. Recent Prog Horm Res. 1997; 52: 1-32.
- 2) Baulieu EE, Robel P. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive

- neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95**: 4089-91.
- 3) Hojo Y, Hattori TA, Enami T, et al. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; **101**: 865-70.
- 4) Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, et al. Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology*. 2001; **142**: 3578-89.
- 5) Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, et al. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem*. 2007; **100**: 950-67.
- 6) Hojo Y, Higo S, Kawato S, et al. Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011; **2**: 43.
- 7) Hojo Y, Higo S, Ishii H, et al. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology*. 2009; **150**: 5106-12.
- 8) Kato A, Hojo Y, Higo S, et al. Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front Neural Circuits*. 2013; **7**: 149.
- 9) Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, et al. Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci*. 2012; **32**: 8116-26.
- 10) Munetsuna E, Hojo Y, Hattori M, et al. Retinoic acid stimulates 17beta-estradiol and testosterone synthesis in rat hippocampal slice cultures. *Endocrinology*. 2009; **150**: 4260-9.
- 11) Okamoto M, Hojo Y, Inoue K, et al. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; **109**: 13100-5.
- 12) Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci*. 2001; **21**: 6221-32.
- 13) Kimoto T, Ishii H, Higo S, et al. Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus. *Endocrinology*. 2010; **151**: 5795-806.
- 14) Hatanaka Y, Mukai H, Mitsuhashi K, et al. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; **381**: 728-32.
- 15) Mukai H, Hatanaka Y, Mitsuhashi K, et al. Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis. *Cereb Cortex*. 2011; **21**: 2704-11.
- 16) Hatanaka Y, Hojo Y, Mukai H, et al. Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res*. 2015; **1621**: 121-32.
- 17) Grassi S, Tozzi A, Costa C, et al. Neural 17beta-estradiol facilitates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience*. 2011; **192**: 67-73.
- 18) Pettorossi VE, Di Mauro M, Scarduzio M, et al. Modulatory role of androgenic and estrogenic neurosteroids in determining the direction of synaptic plasticity in the CA1 hippocampal region of male rats. *Physiol Rep*. 2013; **1**: e00185.
- 19) Hasegawa Y, Hojo Y, Kojima H, et al. Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks. *Brain Res*. 2015; **1621**: 147-61.
- 20) Higo S, Hojo Y, Ishii H, et al. Endogenous synthesis of corticosteroids in the hippocampus. *PLoS One*. 2011; **6**: e21631.