

海馬における性ホルモン合成と 記憶学習モジュレーション

川戸 佳 木本 哲也

性ホルモンは脳神経の機能に対し様々な作用を及ぼす。従来、神経内分泌学では脳神経に作用する性ホルモンは精巣・卵巣などの性腺で合成され、血流によって供給されるものと考えられてきた。一方で、海馬のニューロステロイド産生の機構は最近までほとんど解明されていなかったが、われわれの研究などにより女性ホルモン(エストラジオール)をはじめとする様々なニューロステロイドが合成されていることが証明された。さらに、エストラジオールは海馬の記憶学習に関与する神経シナプス伝達を急性的にモジュレートしていることを解明しつつある。本稿では、最新の知見に基づき、海馬における性ホルモンの合成とその神経伝達に係る急性作用、および擬似女性ホルモンである環境ホルモンの作用を解説する。

I. 海馬における男性・女性ホルモンの合成

脳での性ホルモン生合成の第一段階は、シトクロム P450scc によるコレステロールからプレグネノロンの合成である。われわれは免疫抗体染色法を用いて、ラット海馬において P450scc や steroidogenic acute regulatory protein (StAR) が錐体神経細胞および顆粒神経細胞に局在していることを発見した¹⁻³⁾。海馬神経細胞でのプレグネノロン合成は、NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) の活性化による神経細胞へのカルシウム流入によって促進されることも示した。これは、ニューロステロイドの合成が神経活動依存的に制御されていることを示すものである。

さらにわれわれは、神経細胞に対して顕著な作用を及ぼす女性ホルモン(エストラジオール)の海馬での合成を調べた^{2,4,5)}。本研究まで、特に成体の脳にはエストラジオール合成の中間体であるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)を合成する酵素である P450(17 α)が存在しないとされていたが⁶⁾、われわれは免疫抗体染色法、ウエスタンブロット法、RT-PCR 法を用いて、12 週齢オスラットの海馬神経細胞に P450(17 α)が存在することを示すことに成功した。他にも、エストラジオール合成に必要な 17 β -水酸化ステロイド脱水素酵素(17 β -HSD), 3 β -HSD, P450arom などのステロイド合成酵素系も海馬神経細胞に存在していた⁷⁾。また、これらの酵素の放射性標識された基質を海馬スライスとインキュベートして代謝させ、生成物を HPLC で精製して計測することで、酵素活性を検出するとともに、エストラジオール合成経路の決定にも成功した。さらに高感度質量分析 LC/MS/MS によって海馬中での性ホルモンの濃度を測定した。その結果、12 週齢オスラットの海馬での濃度は、テストステロン約 17 nM, ジヒドロテストステロン約 1 nM, エストラジオール約 4 nM であった。

以上の計測の結果、ラット海馬の神経細胞で、「コレステロール→プレグネノロン→DHEA→テストステロン(男性ホルモン)→17 β -エストラジオール」のような経路で多様な性ホルモンが合成されていることが明らかとなった(図 1 A)。ラット精巣においては代謝経路は「DHEA→アンドロ

Hippocampal synthesis of sex hormones and the modulation of memory by them

Suguru Kawato, Tetsuya Kimoto: 東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻(〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1)

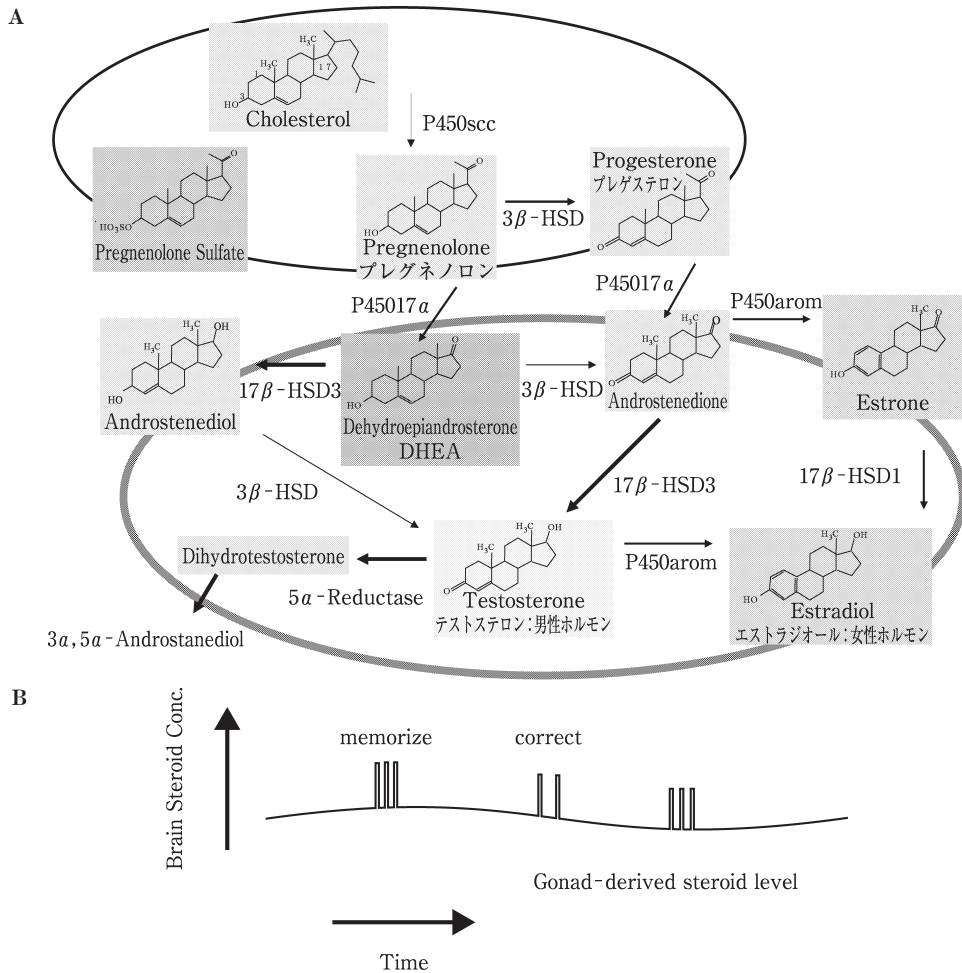


図 1 A. 海馬神経細胞での性ホルモンの合成経路と分子構造, および代謝に関与する酵素。われわれが実証したのはシトクロム P450 (17 α) 以降の経路。太い矢印は代謝が速く, 細い矢印は代謝が遅い。海馬は精巣+卵巣型で♂♀に差がない。B. 脳ステロイドと末梢内分泌器官のステロイド合成の時間的違い。末梢ステロイドは 24 時間中合成され, 比較的長い時間をかけて変動するのにに対し(図のベースライン), 脳では神経活動に同期して短時間のうちにパルス的にステロイド濃度が高まる。

ステンジオン→テストステロン」であり, 海馬における合成経路はこれとは異なっている。海馬の女性ホルモン合成において注目すべきは, 精巣・卵巣の場合と大きく異なりオスとメスの間で顕著な差が見られず, オスの脳でも女性ホルモンが, そしてメスの脳でも男性ホルモンが合成される点である。これは, 精巣・卵巣の性ステロイドは文字通り生殖機能の調節を担っているが, 脳ニューロステロイドは性によらない神経伝達過程などの制御を行っていることを反映しているのではないかと考えている。海馬エストラジオールの合成は NMDA 受容体を介する神経細胞への Ca^{2+} 流入

によって促進されるので, エストラジオールは神経活動依存的に合成されるものと思われる。(図 1 B)

さらに, P450(17 α)と P450arom は CA1-CA3 の錐体神経細胞と歯状回(DG)の顆粒神経細胞の小胞体に存在するのみならず, シナプス構造内にも存在することが免疫電子顕微鏡観察によって明らかとなった^{5,7)}。シナプス前部ではこれらの酵素は主に小胞状構造に局在し, シナプス後部では PSD(postsynaptic density)とスパイン内膜系に局在していた。これは即ち, 女性ホルモンがシナプスにおいても局所的に合成されていることを強

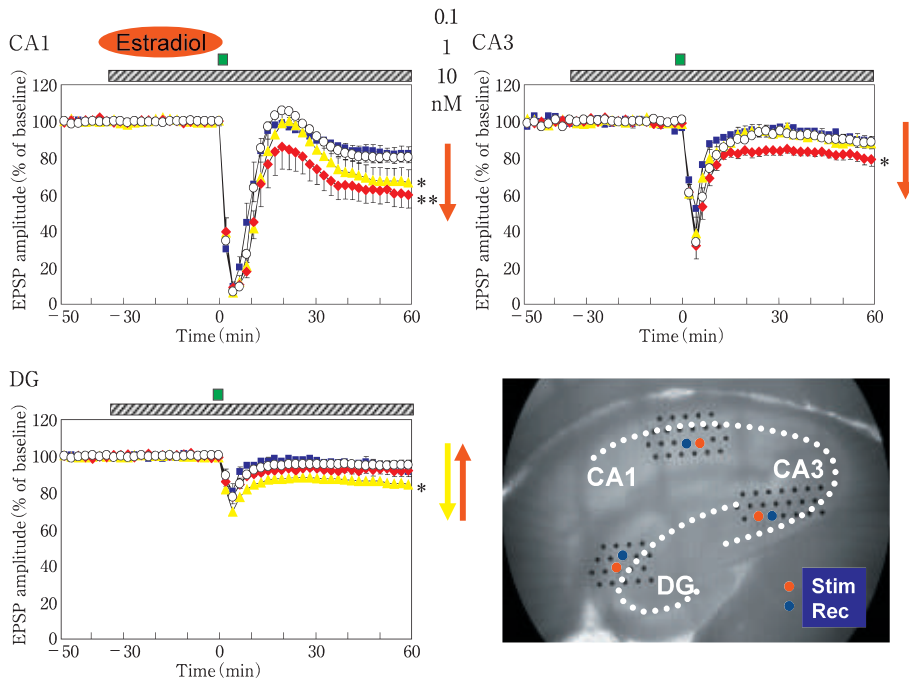


図 2 女性ホルモンによる長期抑圧 LTD の強化

30 μ M NMDA 3 分間処理によって海馬スライスの CA1, CA3, DG 神経細胞において誘導される LTD は、エストラジオールを投与すると短時間 (30 分以内) のうちに強化される。

く示唆する。われわれは、エストラジオールは記憶形成の素過程と考えられる神経シナプス伝達効率を短時間のうちに制御することから(次節参照), シナプス部位で合成されているのではないかと考えてきたが(シナプス分泌学; synaptocrinology), 一連の研究からその仮説を証明することができた。海馬におけるエストラジオールの合成については、われわれ以外には Rune のグループが、培養海馬スライス(発達期の海馬)において海馬のエストロゲン産生が P450arom の阻害剤で 24~48 時間後に低下することから合成能を報告している⁸⁾。

II. 女性ホルモンの海馬神経伝達への作用

エストラジオールの作用は、ホルモン作用として常識である核に移行するエストロゲン受容体を介し遺伝子転写の制御によって数時間~数日かけて機能を発現する(長期作用; 神経保護や神経成長を担う)もの他に、遺伝子転写を介さずに極めて短時間(0.5~2 時間程度)のうちに効果があらわれる「急性作用・短期作用」がある。女性ホル

モンの短期作用については、これまで主にシナプス伝達の長期増強(long-term potentiation; LTP)に対する効果の研究がなされてきた。オスラットの海馬スライスにエストラジオールを 30 分程作用させ、100 Hz, 1 秒のテタヌ刺激を行って長期増強の電気生理測定を行う実験では、たまにテタヌ刺激前にエストラジオールの灌流直後に EPSP が 20% 程度上昇することによりベースラインの上昇が起こる^{9,10)}。これをもってエストラジオールは LTP を増強するといわれてきた。しかし、テタヌ刺激後だけを比べると、エストラジオールの有無で有意な差はない。また、エストラジオールによる EPSP ベースラインの上昇は、腕のよい研究者が行うと 100 回に 1 回程度しか起こらないものだったので、LTP 自体にはエストラジオールの効果はないと思われる。

そこでわれわれは、エストラジオールの本当の作用を明らかにするため、これまであまり研究されてこなかった長期抑圧(long-term depression; LTD)への急性作用を検討した。1-10 nM のエストラジオールは NMDA の灌流によって誘

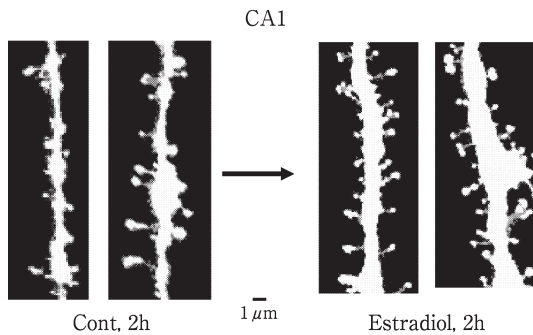


図3 女性ホルモンによるスパイン新生と形態の制御
海馬スライスにエストラジオールを投与すると、2時間という短時間でCA1の錐体神経細胞においてスパイン密度が増加するが、thinタイプスパインの増加が著しい。

導される LTD を有意に強化することが明らかとなった¹¹⁾(図2)。LTD強化はCA1で一番顕著であり、CA3とDGでは効果が小さかった。 α 型エストロゲン受容体($ER\alpha$)のアゴニストであるPPTによってもエストラジオールと同様の効果が得られた。一方、 β 型エストロゲン受容体($ER\beta$)のアゴニストであるDPNによってLTDは逆に抑制された。

われわれは近年、CRESTプロジェクトや振興調整費プロジェクトを遂行し「環境ホルモンの海馬記憶学習のかく乱」を明らかにすべく研究し、LTDが環境ホルモン作用に非常に鋭敏であることを発見した¹²⁾。環境ホルモンであるビスフェノールA(BPA:10-100 nM)、DES(1-10 nM)もこの低濃度で共にLTDを強化した。BPA、DESの作用は $ER\alpha$ を介して行われていると思われる。これに対しノニルフェノール(NP)はLTDを阻害したので、 $ER\beta$ 型作用のように見える。以上の結果より、LTDに対する影響を調べることで、環境ホルモン間の差異を明瞭に判定することができることが示された。CRESTや環境省のプロジェクト研究などによって、BPAを始めとする内分泌かく乱物質は幸いにして哺乳類の生殖機能などに対しては現状の環境濃度では直ちに有意な悪影響を及ぼすものではないことがわかってきているが、これは肝臓で速やかに解毒されるからである。一方、脳では薬物代謝酵素が極めて少ないため環境ホルモンが代謝されにくく、神経機能に影響

を及ぼす可能性があるのではないかと考えている。

女性ホルモンは、神経スパイン(シナプス後部)の密度を変化させることによって、海馬の神経可塑性を制御している^{13,14)}。われわれは神経細胞に蛍光色素(lucifer yellow)をマイクロインジェクションすることで、個々のスパイン(シナプス後部、樹状突起上の棘構造)の形態を可視化し、エストラジオールの作用を検討した。オスラットより調製した海馬スライスにエストラジオールを投与すると、CA1ではスパイン密度が増加し、スパインのタイプ(mushroom, thin, stubby, filopodium)のうち、頭部が比較的小さく、首の長いthinスパインが選択的に増加することが明らかとなった¹⁵⁻¹⁷⁾(図3)。エストラジオール投与の効果は海馬の領域によって異なり、CA3ではスパインに類似したthornの密度を顕著に減少させることが明らかとなった¹⁸⁾。以上の作用について、1-10 nM エストラジオール、1-10 nM DES、10-100 nM BPA に対して非常によく似た効果が認められた。作用を媒介する情報伝達経路については、MAPキナーゼ(阻害剤はPD98059)、NMDA受容体(阻害剤はMK-801)を阻害すると、上記のエストラジオール効果が消失することなどから、MAPキナーゼ経路が働いており、スパイン内に Ca^{2+} が必要であることが示された。PPTはエストラジオールと同じスパイン増加効果を示すのに対しDNPはほとんど効果がないことから、エストラジオールやBPA、DESの作用は $ER\alpha$ を介しているものと考えられる。これまで女性ホルモンがスパイン形態などの細胞構造を変化させるためには12-24時間以上のかかなり長い時間が必要と考えられてきたが、われわれの研究で発見した非常に早いスパイン変動は、この常識を覆す全く新しいものである。記憶形成に不可欠とされるスパインの増加は、女性ホルモンのみならず環境ホルモンが外来性の神経成長因子として機能し得ることを示しており、全く新しい概念である。

次にわれわれは、エストラジオールの作用を媒介する $ER\alpha$ の局在を調べるため、新規精製抗体RC-19を用いて金コロイド標識免疫電子顕微鏡解析を行った。その結果、海馬の錐体神経細胞お

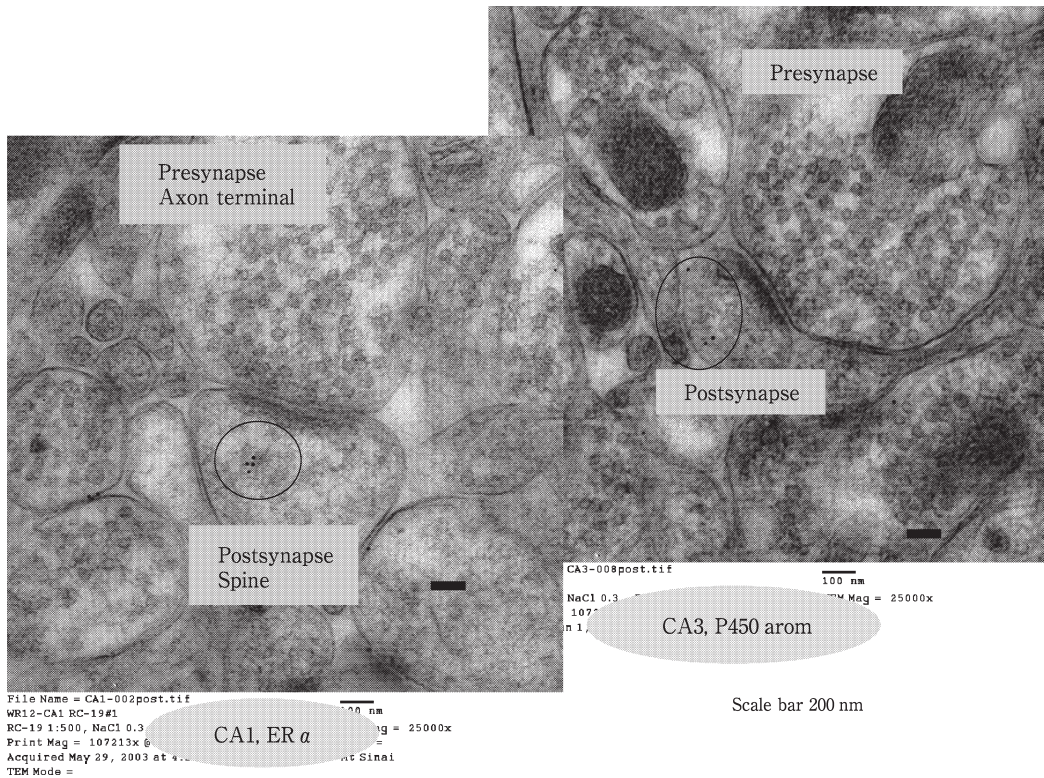


図 4 神経シナプスにおける sERα の局在

海馬 CA1 神経細胞のシナプスにおける sERα の局在。金抗体免疫電子顕微鏡解析によって、シナプス後部の PSD などに sERα の存在が確認された。P450arom もシナプスに存在しており、局所合成→局所作用の synaptocrinology を示唆する。

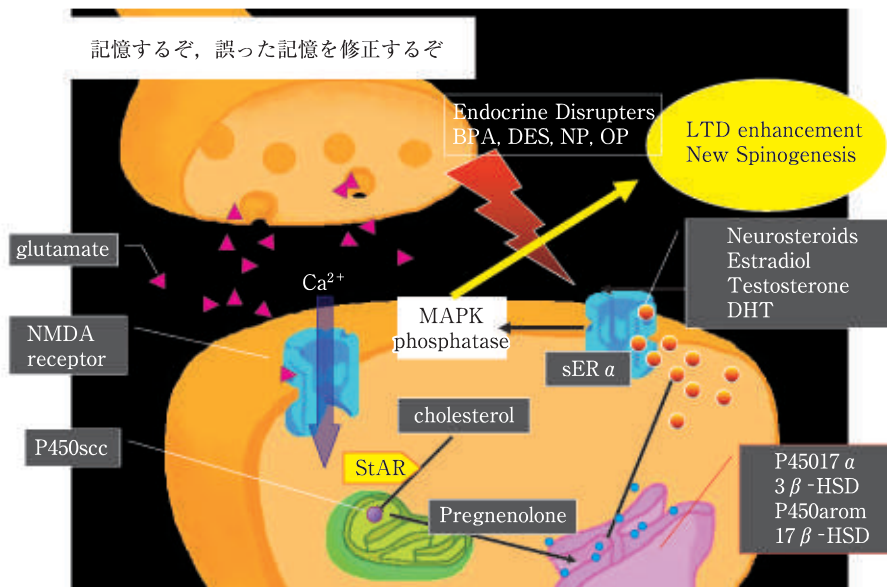


図 5 海馬での女性ホルモンの合成と海馬神経伝達制御の機構(シナプス分泌学 synaptocrinology)

エストラジオールは、神経シナプスに存在するシトクロム P450 などの酵素により局所的に合成される。合成された後、同じ神経のシナプスに存在する膜上受容体 sERα を介して、ERK MAP キナーゼなどを活性化し、スパイン新生や長期抑圧の強化などの急性的なモジュレーションをひき起こしている。もちろん、従来型の核受容体 ERα を介する遅い genomic 作用もある。

よび顆粒神経細胞(グルタミン酸作動性神経細胞)のシナプス前部・後部と核に sER α が確かに局在していることを発見した¹¹⁾(図4)。これは、エストラジオールと環境ホルモンが作用する受容体が神経シナプスに存在することを示している画期的な発見である。密度勾配遠心で精製した細胞画分に対してウエスタンブロットを行い、同一の ER α (67 kDa)が海馬神経シナプス膜分画(特に PSD 画分)と核および細胞質(nER α)に存在することが示されたことによっても、シナプス sER α の存在が裏づけられた。さらに免疫沈降で精製した 67 kDa の蛋白質を質量分析して ER α の特長のあるペプチドが得られた¹¹⁾。

以上を、わかりやすく説明する図を以下に示す(図5)。「記憶するぞ」と努力すると、大量の Ca²⁺ がスパイン(シナプス後部)に流入して、StAR を駆動して脳ニューロステロイドの合成が始まる。「誤った記憶を修正したい」と努力すると、少量の Ca²⁺ がスパインに流入する。これも脳ニューロステロイドの合成を促進する。合成されたエストラジオールなどは、シナプス膜にある受容体に作用して、LTD を強化したり、スパインの新生を引き起こす。同じ神経で合成されて作用するので、「神経シナプス分泌機構」ともいうべきものである。このエストロゲン作用を、環境ホルモンである BPA, DES, NP などが様々に攪乱する。もちろん細胞体内でも合成は起こっているし、核のエストロゲン受容体を經由した遺伝子転写作用も引き起こされるが、これは時間が 12-24 時間と長くかかる作用であり、発現する現象も、本研究で観測したものとはずいぶん異なるであろう。

おわりに

海馬では性ホルモンを含む多様なニューロステロイドが合成されており、海馬の関与する記憶学習における効率を制御しているものと思われる。特に海馬のような高次認知機能中枢では、性ホルモンは体での作用のように生殖機能の制御を行うのが主要な役割ではなく、記憶学習・神経成長の増進という全く異なる機能を持っていることから、われわれはこれを第四世代の新しい神経作用物質であり、新規の脳由来神経成長因子であると

提唱している。また、ニューロステロイドの合成系や作用部位がシナプス部位というきわめて微小な領域に局在していることから、従来の大域的な神経内分泌学と異なる「神経シナプス分泌学」という概念でニューロステロイドの働きを理解すべきものと考えている。

これには、ステロイドホルモンのシナプス膜上受容体の同定という難しい作業が必要である。閉経後の女性に多発するアルツハイマー病に対するエストロゲン補充療法によって記憶学習能が顕著に改善されることなどから、ヒトの記憶学習の形成においても女性ホルモンは重要な役割を果たしていると考えられる。現在われわれは本稿で触れなかった男性ホルモンの短期作用の研究を推進している。また、ストレスステロイドはうつ病発症の重要な因子であることなど、脳でのニューロステロイドの働きに対する注目はますます増している。

●文 献

- 1) Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y et al : *Endocrinology* **142** : 3578-3589, 2001
- 2) Kawato S, Hojo Y, Kimoto T : *Methods Enzymol* **357** : 241-249, 2002
- 3) Kawato S, Yamada M, Kimoto T : *Adv Biophys* **37** : 1-48, 2003
- 4) Shibuya K, Takata N, Hojo Y et al : *Biochim Biophys Acta* **1619** : 301-316, 2003
- 5) Hojo Y, Hattori T, Enami T et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **101** : 865-870, 2004
- 6) Baulieu EE, Robel P : *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 4089-4091, 1998
- 7) Murakami G, Tanabe N, Ishii H et al : *Drug Metab Rev* **38** : 353-369, 2006
- 8) Kretz O, Fester L, Wehrenberg U et al : *J Neurosci* **24** : 5913-5921, 2004
- 9) Foy MR, Xu J, Xie X et al : *J Neurophysiol* **81** : 925-929, 1999
- 10) Bi R, Broutman G, Foy MR et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 3602-3607, 2000
- 11) Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G et al : *J Neurochem* (in press)
- 12) Kawato S : *Environ Sci* **11** : 1-14, 2004
- 13) Woolley CS, McEwen BS : *J Neurosci* **12** : 2549-2554, 1992
- 14) McEwen B : *Recent Prog Horm Res* **57** : 357-384, 2002
- 15) Mukai H, Takata N, Ishii HT et al : *Neuroscience* **138** : 757-764, 2006
- 16) Mukai H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M et

al : *Neuroendocrinology* (in press)
17) Murakami G, Tsurugizawa T, Hatanaka Y et
al : *Biochem Biophys Res Commun* **351** : 553-
558, 2006

18) Tsurugizawa T, Mukai H, Tanabe N et al :
Biochem Biophys Res Commun **337** : 1345-1352,
2005
