

ニューロステロイドと記憶

川戸 佳

Summary

記憶中枢の海馬のグルタミン酸神経は、独自に女性ホルモンであるエストラジオール(E₂)や男性ホルモン(テストステロン(testosterone; T), ジヒドロテストステロン(dihydrotestosterone; DHT))を合成している。海馬内での濃度は血中濃度より高く、海馬で合成されるE₂, Tは主役である。記憶を形成する神経シナプスは、このE₂, T, DHTの神経モジュレーション作用により、シナプス数や記憶の長期増強が1時間以内という短い時間内で制御されている。古典的な内分泌機構ではない地産地消型の神経分泌で、その作用はnon-genomic機構に特色があり、「シナプス後部にある男性・女性ホルモン受容体→蛋白質キナーゼ→アクチン重合→スパイン増加、あるいは蛋白質キナーゼ→グルタミン酸受容体リン酸化」という信号系を動かす。これらの研究成果は、ホルモン補充療法による記憶力の回復、認知症を改善する療法の分子基盤となる。

Key words

ニューロステロイド
海馬●記憶
エストラジオール(E₂)

Suguru Kawato

順天堂大学大学院医学研究科泌尿器外科学客員教授／
帝京大学薬学部認知神経科学講座特任教授

はじめに

脳が合成するニューロステロイド(男性・女性ホルモンが代表的)の作用の研究は大きく進展している。最近相次いで企画された special issue の編集まえがきには「10年前と比べるとエストラジオールの作用研究の進歩により、神経シナプスのモジュレーターであるという新しい概念を生んだ」と明確に述べられている¹⁾⁻³⁾。2016年には米国国立衛生研究所(National Institutes of Health; NIH)の neuroscience 部門に性差・性ホルモンの科目が独立してグラントを配布できるようになり、2017年には特集本も出版される予定である。

海馬での作用

女性ホルモン補充療法が、更年期以降の女性の記憶・認知機能の劣化(アルツハイマー病など)の改善に有効であることは、世界中で1,000万人にもものぼる対象者の治療によって明らかになり、この分子機構を説明するために膨大な研究が行われてきた。2005年以降、“Brain and Estrogen”や“Estrogen and Cognition”という題名をつけた特別号が有名なジャーナルからたびたび出版されている¹⁾⁻⁸⁾。

記憶中枢である海馬において、エストラジオール(E₂)による神経シナプスのモジュレーション作用が記憶能力を改善する。このようなE₂の神経作用はメスのラット・マウスの海馬だけでなくオ

スの海馬でもよく研究されている。オスでは海馬内でいったんテストステロン(testosterone; T)がE₂に変換されて作用するので、E₂作用が研究されている。2005年ごろまでは、E₂がシナプスなどの神経回路を変化させるためには、12~28時間の長い時間を必要とする古典的経路(genomic process)だけが考えられてきた。それは「女性ホルモン受容体(エストロゲン受容体:estrogen receptor; ER)や男性ホルモン受容体(アンドロゲン受容体:androgen receptor; AR)が細胞質に存在し、E₂がERに、T、ジヒドロテストステロン(dihydrotestosterone; DHT)がARに結合する→ホルモン+受容体複合体は核内に移動→遺伝子転写と蛋白質合成が起こる→シナプスが変化する」という経路である。これに対してわれわれは1~2時間で速く作用する、「神経シナプスに局在する受容体ERやARにE₂やTが結合する→下流の蛋白質キナーゼを活性化させる→神経シナプスが増加したり、シナプスの長期増強が起こったりする」という経路(non-genomic process)が働いていることを示した^{9)~11)}。

神経シナプスの可視化解析

記憶の仕組みを研究するために、グルタミン酸神経シナプスを可視化して調べる方法がある。E₂は、神経スパイン(spine, 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。スパインはシナプス前部と一緒にあって記憶を形成するシナプスを構成する。神経に蛍光色素を注入して共焦点顕微鏡で3次元画像を撮影してスパインを可視化し、E₂の作用を検討したところ、海馬スライスに1 nM E₂を2時間作用させると、空間認知を司るCA1部位でスパイン密度が増加する⁹⁾¹²⁾(図1)。スパイン頭部の直径は0.2~1.0μmの分布をもつが、特に小型スパイン(0.2~0.4μm)の増加が目立つ。この頭部

直径の解析は、われわれがバイオフィォーマティクスプロジェクトで開発したスパインの数理解析プログラム Spiso-3D で可能になった¹²⁾。このスパイン作用の non-genomic 信号系は、「E₂がスパイン内の受容体 ER α に結合→蛋白キナーゼ群(MAPK, PKA, PKC, PI3K, LIMK)の活性化→アクチンを制御する蛋白質のリン酸化→アクチンの重合を引き起こして→スパインが増加する」ことがキナーゼの阻害薬を添加する実験から明らかになった(図1)⁶⁾¹⁰⁾。

速い作用を生み出すシナプスのエストロゲン受容体

2003年時点では、海馬でのE₂受容体の検出は核受容体ER α に関してすらも困難を極めていて、ER α は海馬にはほとんど存在しないという報告が多かった。一方、速い作用を発生できる膜上のエストロゲン受容体を見出そうとして、世界で大型プロジェクトが進んでいたが、脳ではER α やER β ではない新しい受容体が発見できていなかった。われわれは新しい可能性として、ER α 自身が海馬の神経細胞や神経シナプスにも局在しているのではないかと考えて調べた。海馬試料でER α に結合する信頼できる市販の抗ER α 抗体は全く存在しなかった。そこで、広島大学大学院の小南、山崎らがER α のC末端19ペプチドに対する抗体RC-19を作製し精製したものをを使うと、海馬でER α の57kDaバンドが検出された。このRC-19を持参し、ニューヨークのMt.Sinai医科大学のMorrison研究室において金コロイド免疫電子顕微鏡解析を行った。その結果、ER α が海馬のグルタミン酸神経に発現していること、細胞体や核のみならず、神経シナプス後部(スパイン)・前部にもER α が局在していることを発見した⁹⁾。Levinらの一連の研究から、ER α 自身の一部がパルミチン化されて膜に結合

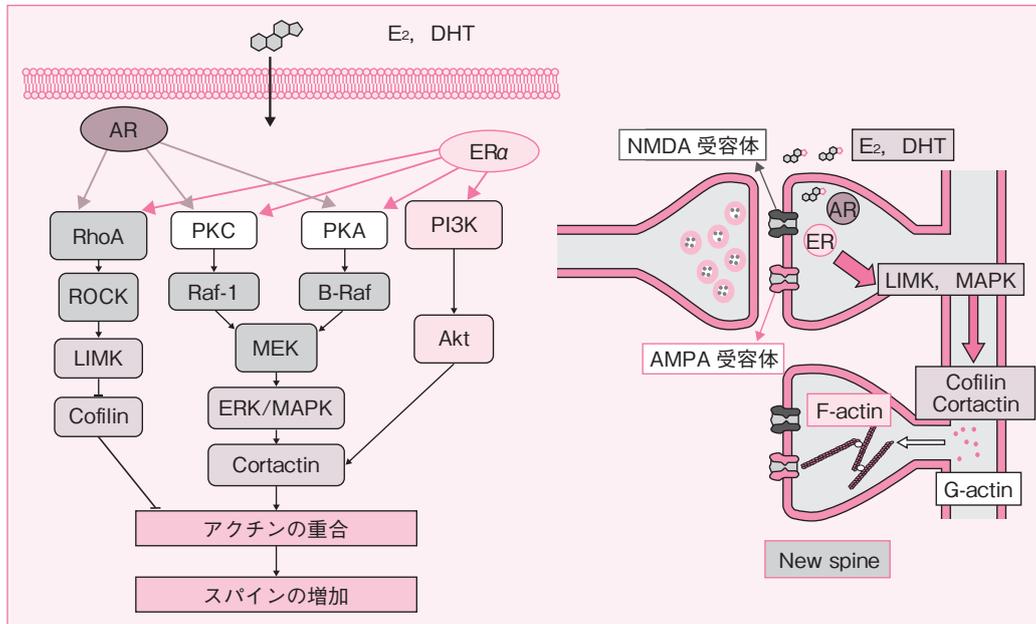


図1 E₂とDHT がスパインを増やすときの蛋白キナーゼを介したnon-genomicな信号系
 海馬スライスにE₂やDHTを作用させると、2時間でグルタミン酸神経のスパイン(樹状突起から突き出しているトゲ)密度が~1.3倍ほどに増加する。E₂、DHTと一緒に蛋白質キナーゼの阻害薬を入れておくと、このスパイン増加作用が抑えられることから信号系がわかる。
 LIMK：LIMドメインキナーゼ、Erk MAPK：マイトジェン活性化蛋白質キナーゼ、PKA：蛋白質キナーゼA、PKC：蛋白質キナーゼC、PI3K：ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ

して存在することがわかり、この膜結合型 ER α が速い情報伝達を担っている可能性が高い¹³⁾¹⁴⁾。

フランスの Chambon 氏から ER α ノックアウトマウス、ER β ノックアウトマウスをいただき、ER α をノックアウトすると E₂ を加えてもスパインが増加しないことがわかった¹⁵⁾。一方、ER β のノックアウトではスパイン増加は止まらなかった。これは ER α が重要であることを意味している。当時 Korach 氏らが作製した実験に供していた、ER α をネオマイシン誘導性に欠損させる ER α ノックアウトマウスでは、N 末端の欠けた活性 ER α が残存するために E₂ 作用が残っており、完全なノックアウトマウスではないので、未発見のエストロゲン受容体を想定する論文は根拠がないと判明した。

膜上の新規エストロゲン受容体を見つける競争からは、GPR30 受容体が見出された。しかし、実験してみると E₂ の結合が非常に低く、E₂ 作用がうまく検出されない(石井, 私信)、本当の膜上 E₂ 受容体とはいきれないだろう。GPR30 はアゴニスト G-1 の刺激で Jun キナーゼ(JNK)を活性化して海馬空間記憶を強化するが、E₂ 刺激では GPR30 を経由せず、ER α 、ER β を経路して MAPK を活性化する信号系であり、両者は大きく異なることもわかってきた¹⁶⁾。

神経シナプスの長期増強(LTP)

E₂ が存在すると、海馬においてグルタミン酸神経のシナプスの長期増強(long-term potentiation ;

LTP)を弱い刺激条件でも成立させられることが、電気生理学的実験によってわかった。LTPは記憶の書き込み現象である。結論はE₂によるLTP成立支援における信号伝達系は、「E₂がスパインERα/ERβに結合→蛋白キナーゼ(MAPK, PKA, PKC)の活性化によるN-メチル-D-アスパラギン酸(N-methyl-D-aspartic acid; NMDA)受容体のリン酸化→Ca²⁺流入量の増加→CaMK IIが活性化→弱い刺激でもE₂-LTPが成立」というものである(図2)¹⁰⁾。

イタリアのPettorossi研究室では阻害薬レトゾールで海馬スライスのP450aromをわずか20分阻害してE₂産生を止めただけでLTPが小さくなることを見出した¹⁷⁾¹⁸⁾。われわれもこれを確かめたが、わずか20分、TからのE₂合成を止めただけでLTPが阻害されるということは、スライスでの局所E₂合成がLTPの誘導に有効であることを示した点で画期的である。ほかのグループはみな外からE₂を灌流などで加えて急性効果を調べていたので、局所合成のE₂作用を直接測定して

いたとは言い難いからである。

海馬での性ホルモン合成

ここまで論じてきた性ホルモン作用は、精巣・卵巣が合成するTやE₂が血流に乗り脳に流入して作用する、いわゆる内分泌作用ではなく、脳の神経自身が合成してその近傍の細胞で働く作用だと捉えるべきである。つまり局所合成→局所作用である。なぜならば、この15年間で、記憶中枢の海馬が独自にT, DHT, E₂を合成していることが確かめられたためである(オス・メス両方とも)¹⁹⁾²⁰⁾。海馬内での男性・女性ホルモン濃度を測定すると、血中をめぐっているTやE₂濃度より高いことがわかり²⁰⁾²¹⁾、海馬合成のT, E₂は脇役ではなく主役であることがわかった。³H標識ステロイドの海馬スライス中での代謝を測定する研究の結果から、海馬(ラットとマウス)での神経中のステロイドの合成経路は、コレステロール→プレグネノロン(pregnenolone; PREG)

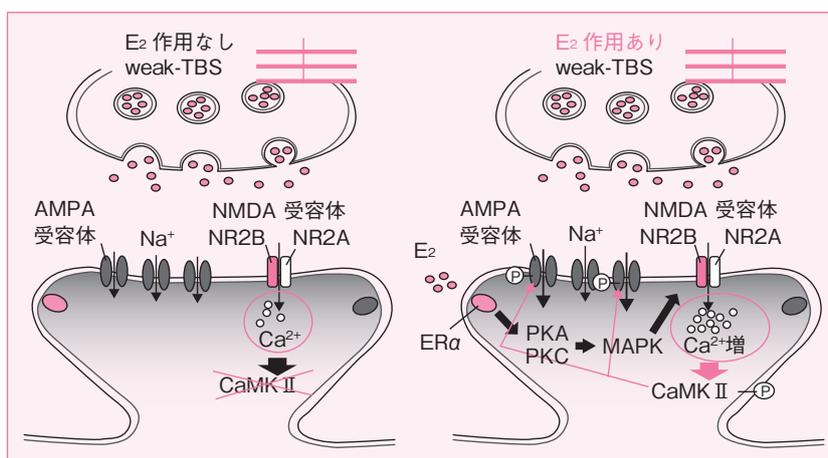


図2 弱いシータバースト(weak-TBS)刺激でも、E₂の作用で神経シナプスでの記憶書き込みLTPが成立する機構(右)をE₂作用がないとき(左)と比較。AMPA受容体とNMDA受容体はグルタミン酸受容体。CaMK II (calcium-calmodulin dependent protein kinase II)はCa濃度が高くなると受容体をリン酸化する機能をもつ。

(P450sccが合成)→ DHEA(P450(17 α)が合成)
 → T(17 β -HSDが合成)と変換されたのち→ DHT
 (5 α -reductaseが合成)か E₂(P450aromが合成)
 である。この経路を証明するうえで最も難題で
 あったのは、P450(17 α)が mRNA でも蛋白質で
 も脳には存在しないという数多くの論文報告を覆
 して、P450(17 α)と DHEA, T, E₂合成を発見
 することであった。この分野の開拓者であるフ
 ランスの Baulieu 氏が、PREG やプロゲステロン
 (progesterone; PROG)までがニューロステロイ
 ドであって、その先のステロイド合成系は脳に
 は存在しない、つまり、どんな実験からも P450
 (17 α)は存在しないし、DHEA や T も合成され
 ないという論文を『Proceedings of the National
 Academy of Sciences』誌などで繰り返し執筆し
 ており、これが大きな壁であった²²⁾⁻²⁴⁾。「DHEA
 よりも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」
 というのがドグマであった。精巣摘出を行うと 2
 日以内に確かに脳内の T は、従来の技術では検
 出できない程度にまで大きく減少する。しかし、
 検出感度を 100~1,000 倍上げると、脳内合成され
 る T を捉えることができる¹⁹⁾。

海馬中での性ホルモンの濃度は、ステロイドの
 有機溶媒抽出後、高速液体クロマトグラフィー
 (high performance liquid chromatography ;
 HPLC)で分画したステロイドを、質量分析 LC/
 MS/MS を行い、厳密に測定することに成功し
 た²¹⁾。その結果、成獣オスラットの海馬での濃度
 は、T(17nM)、DHT(7nM)、E₂(8nM)であっ
 た。ここで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 は血中の DHT(0.6nM)より 10 倍多いこと
 がわかった。面白いことに、メスでは海馬の E₂

(1nM)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つ
 た。また海馬の 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。

合成酵素の P450(17 α)と P450arom は神経細
 胞のミクロソームのみならず、スパイン内やシナ
 プス後肥厚(postsynaptic density ; PSD)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¹⁹⁾。これは、E₂がシナプスにおいても
 局所的に合成されていること(シナプス分泌)を示
 唆し、E₂が神経シナプス伝達を短時間のうちに
 も制御可能であることを支持する。

振り返ると、脳内の多くの P450 や 3 β -HSD な
 どの mRNA や蛋白質量は精巣・卵巣や副腎皮質の
 200分の 1~5,000 分の 1 であるということが海馬
 内合成の研究を極端に難しくしていた。しかし、
 合成にかかわる酵素の発現量が低いのは当然であ
 る。なぜなら神経細胞は小さく、海馬の体積は
 0.1mL 程度で血管体積 20mL の 200分の 1 程度で
 ある。海馬は全身にステロイドを配達する内分泌
 器官でなく、海馬では地産地消なのでこれで十分
 なはずである。

メスの海馬内の性周期と スパイン増減振動

メスの海馬で、性周期に同期してスパイン密度
 が振動することは、McEwen 研究室が見出し、
 『Principles of Neural Science』誌にも図が載っ
 ている有名な現象である。彼らは血中からくる
 E₂、PROG の濃度振動に誘導されると説明してい
 たが、われわれの測定によるとメス海馬の E₂は
 血中の約 30~100 倍もあるので²⁰⁾、この説明は破
 綻している。海馬での PROG、E₂振動は海馬自
 身が作り出す性周期であり、これに同期してスパ
 イン密度は、卵胞期(P)で高く、排卵期(E)で低

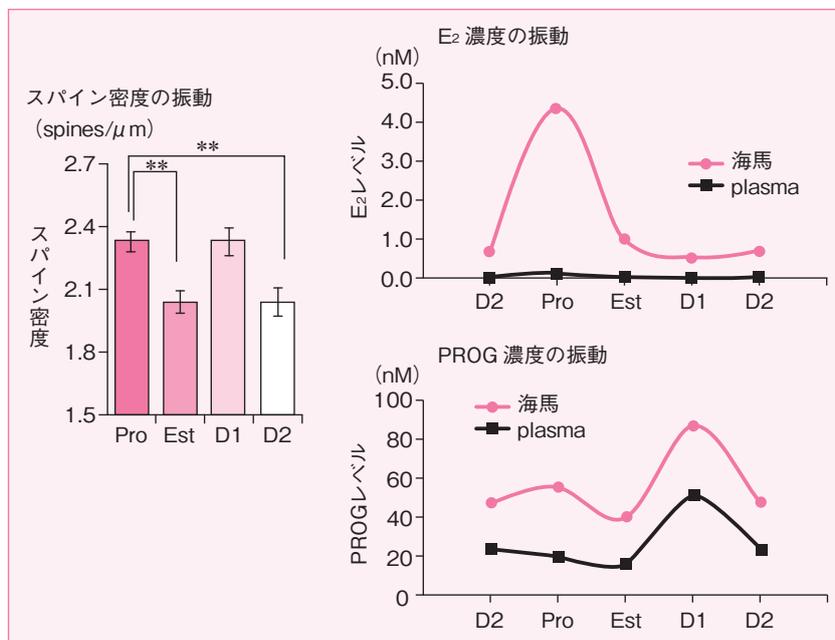


図3 メス海馬でのスパイン密度の振動と性ホルモン振動の対応
 ラットでは性周期は卵胞期(Pro)→排卵期(Est)→黄体期(D1)→黄体期(D2)と4日でまわる。海馬中のE₂、PROG濃度は血中plasmaより高く、このピークとスパイン密度ピークが一致する。LIMK、MAPK、Akt kinaseが活性化されてスパイン密度が変化する。
 **: p<0.01

下し、黄体期(D1)で上昇し、黄体期(D2)で低下し、Pで上昇する、というように増減振動を示した(図3)²⁰⁾。これがメスで記憶能力(感情に依存する記憶能力)の性周期振動を引き起こすメカニズムであると考えている。

本誌は産婦人科系の雑誌なので、男性ホルモンの作用関係の詳細は除いた。興味のある方は、川戸研究室ウェブサイト(<http://kawato-glia.sakura.ne.jp>)に総説などが掲示してあるので読んでいただきたい。

おわりに

男性ホルモンDHTやTを海馬神経スパインに2時間作用させると、やはり急激にスパイン密度が増加し、「T、DHTがスパイン内の受容体ARに結合→蛋白キナーゼ群(LIMK、MAPK、PKA、PKC)が活性化→アクチン制御蛋白質のリン酸化を引き起こし→アクチンの重合が起き→スパインが増加する」という作用経路がわかった¹¹⁾。

文献

- 1) Luine V, Frankfurt M. Introduction to the Special Issue Estradiol and Cognition: Molecules to Mind. *Horm Behav.* 2015; **74**: 1-3.
- 2) Lynch G, Baudry M. Brain and memory: Old arguments and new perspectives. *Brain Res.* 2015; **1621**: 1-4.
- 3) Coen CW. 60 YEARS OF NEUROENDOCRI-

- NOLOGY : Celebrating the brain's other output-input system and the monograph that defined neuroendocrinology. *J Endocrinol.* 2015 ; **226** : E3-6.
- 4) Casadesus G. Special issue on estrogen actions in the brain. *Biochim Biophys Acta.* 2010 ; **1800** : 1029.
 - 5) Mukai H, Kimoto T, Hojo Y, et al. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta.* 2010 ; **1800** : 1030-44.
 - 6) Hojo Y, Munetomo A, Mukai H, et al. Estradiol rapidly modulates spinogenesis in hippocampal dentate gyrus : Involvement of kinase networks. *Horm Behav.* 2015 ; **74** : 149-56.
 - 7) 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.
 - 8) Hojo Y, Murakami G, Mukai H, et al. Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 ; **290** : 31-43.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) Levin ER, Hammes SR. Nuclear receptors outside the nucleus : extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 ; **17** : 783-97.
 - 14) Pedram A, Razandi M, Sainson RC, et al. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007 ; **282** : 22278-88.
 - 15) Murakami G, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, et al. Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res.* 2015 ; **1621** : 133-46.
 - 16) Kim J, Szinte JS, Boulware MI, et al. 17beta-Estradiol and Agonism of G-protein-Coupled Estrogen Receptor Enhance Hippocampal Memory via Different Cell-Signaling Mechanisms. *J Neurosci.* 2016 ; **36** : 3309-21.
 - 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) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) Baulieu EE. Neurosteroids : of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res.* 1997 ; **52** : 1-32.
 - 23) Baulieu EE, Robel P. Dehydroepiandrosterone

(DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 ; **95** : 4089-91.

24) Le Goascogne C, Sananès N, Gouézou M, et al.

Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain. J Reprod Fertil. 1991 ; **93** : 609-22.