

海馬を中心とした 神経内分泌と抗加齢

川戸 佳

順天堂大学大学院 医学研究科 泌尿器外科学
帝京大学 薬学部 認知神経科学講座

はじめに

男性・女性ホルモンの脳の記憶への作用を考える。受容体である Androgen Receptor (AR) や Estrogen Receptor (ER) は記憶中枢の海馬のグルタミン酸神経に発現している。このことから、加齢に伴う男性・女性ホルモンの減少は海馬の記憶能力の低下を引き起こす原因になることが示唆される。さらに、海馬は自前で男性・女性ホルモンを合成しているので、精巣の合成する男性ホルモンが減少する高齢者でも、脳海馬を活性化して男性ホルモン合成を上げることで、認知症を食い止めることができるのではないかと考え研究を推進している。性ホルモンと記憶作用に関する研究では、女性ホルモン [エストラジオール (E2)] の作用が男性ホルモン [テストステロン (T) とジヒドロテストステロン (DHT)] の作用よりずっと先を行っている。女性ホルモン補充が更年期過ぎの女性の記憶力低下の回復などに効いて、アンチエイジング効果がある、というのは、世界で1,000万人もの対象者に治療して、よくわかってきた事柄であり、この分子機構を神経科学的に説明するために膨大な研究が積み重ねられてきた。「Estrogen and Cognition」というような題名をつけた特別号が有名なジャーナルから2000年以降度々出版されている。2016年には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年には特集本の編集も進んでいる。

2010年以降は記憶中枢の海馬内でE2による神経シナプスのモジュレーション作用で記憶が改善するということが確立してきた。このモジュレーション作用は一日程度かかる慢性作用のほかに、1時間程度の早い作用が注目されている。このようなE2の神経作用はメスラットの海馬だけでなくオスの海馬でも同じくらい研究されている。オスでは海馬内で一旦TがE2に変換されて作用する、という解釈が主流なので、E2作用が研究されているわけである。

しかし、オスなら男性ホルモンのTやDHTもそのまま作用するはずであり、最近、男性ホルモンTやDHTの直接作用の研究も増えてきた。米国ではアンチエイジングとしてT補充を行っている人が500万人もいるらしいので、その作用の分子機構の解明は大変重要である。ただ、海馬においては、DHTによる神経シナプスのモジュレーション作用は抗不安作用を改善することがわかっているが、認知機能の改善効果はしっかりとわかっていない。

1. 性ホルモンの海馬での神経シナプスへの早い作用

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「古典的な女性ホルモン受容体 (ER) や古典的な男性ホルモン受容体 (AR) が細胞質に存在し、[E2がERに、T、DHTがARに結合すると→ホルモン+受容体複合体は核内に移動し→遺伝子転写とタンパク質合成が起こり→神経シナプスが変化する]という経路である。これに対して我々は1～2時間で早く作用する、「神経シナプスに局在する受容体ERやARにE2やTやDHTが結合する→下流のタンパク質キナーゼを活性化し→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 (Mukai et al 2007) (Hasegawa et al 2015, Hatanaka et al 2015)。

これらの記憶書き込み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やT、DHTは、神経スパイン (シナプス後部、spine) 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記憶を形成するシナプスを構成する。海馬スライス中のCA1領域のグルタミン酸神経のシナプスに蛍光色素を注入し、超解像共焦点顕微鏡で3次元可視化して調べる方法を用いると、T、DHTやE2を2時間作用させた場合、この3種類はすべてが神経スパイン (=シナプス後部) の密度を増加させることがわかった (図1) (Mukai et al 2007) (Hasegawa et al 2015, Hatanaka et al 2015)。古典的な男性ホルモン受容体 (Androgen Receptor, AR) は、記憶中枢の海馬のグルタミン酸神経のうち、空間記憶を司るCA1領域に特に多く発現をしている。このスパイン増加作用を引き起こす信号系は、「シナプスに存在するARやER α (女性ホルモン受容体) →蛋白キナーゼ (LIM kinase, MAPK, PKA, PKC, PI3K) →アクチン制御蛋白 (cofilin, cortactin) のリン酸化→アクチン重合→スパイン増加」である (図1) (Hasegawa et al 2015, Hatanaka et al 2015)。これまでE2 (T→E2も含む) がスパインなどの神経回路を変化させるためには24時間くらいの長い時間を必要として、「核受容体ER→遺伝子転写→蛋白合成→シナプス・スパイン増加」という経路が主体だと考えられてきたが、我々の発見した非常に早いシナプス変動は2時間程度で効果を発揮する、新しい仕組みである (図1)。

シナプスの受容体の実体は何か? AR、ER α 、ER β などは、核に移行する核内受容体とされてきたが、我々はこれらの一部が (核に移行することなく) 神経スパイン内に存在して働くことを見出したことになる (Mukai et al 2007) (Hasegawa et al 2015, Hatanaka et al 2015)。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きわめていて、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、早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は発見できていなかった。我々は広島大の小南・山崎教授らと共にER α のC末端19ペプチドに対する抗体RC-19を作製し精製したのを使い、ニューヨークのMorrison研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 (Mukai et al 2007)。膜上の新規エストロゲン受容体を見つける競争からは、G蛋白共役型のGPR30受容体が見出された。しかし、最近の論文では、E2では駆動されないこと

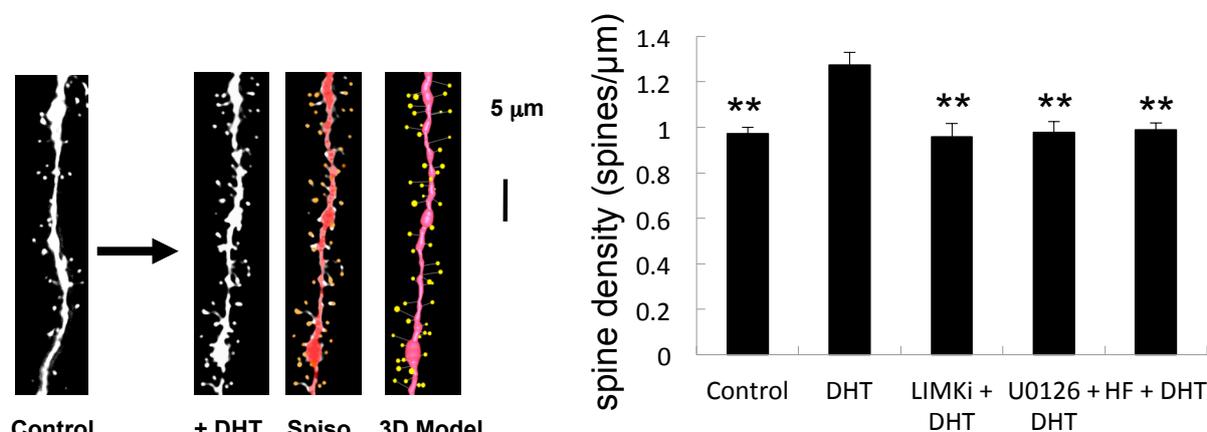


図1 (左) DHTの作用による樹状突起上のスパイン増加。海馬スライス (controlでDHT<0.5 nM) に10 nMのDHTを作用させると、2時間でグルタミン酸神経のスパイン密度が1.3倍ほど増加する画像 (+DHT)。Spiso解析ソフトで3次元画像を解析したもの (Spiso)、3DModelも示す。Tの作用もDHTと似ている。(右) 全スパイン密度の変化。LIMKi (KIMkinase阻害剤) + DHT、U0126 (MAPkinase阻害剤) + DHT、HF (AR阻害剤) + DHTのように阻害剤を加えると、DHTの効果が抑制される。一つの神経には樹状突起上に存在する小さな棘 (スパイン) が1 μ m当たり1個、神経全体では合計1万程度もある。神経の記憶は、このスパインという部分に貯蔵される。

が多く、本当の膜上E2受容体とはいい切れないだろう。アンドロゲン受容体も海馬のグルタミン酸神経に発現していて、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ARが局在していることがMilnerグループによって金コロイド免疫電子顕微鏡解析によって見いだされた(Tabori et al 2005)。しかし市販の抗血清を使用しているため、染色像にはAR以外の蛋白も含まれている問題がある。このスパインの中のAR、ER α が膜に結合しているかどうかに関しては、Levinグループの一連の仕事によって、ER α 、ARの一部がパルミチン化されて細胞膜に結合することが証明されたので、これがスパインで見出された膜受容体の存在型だと思われる(Levin & Hammes 2016)。

2. E2があると神経シナプスの長期増強(LTP)が成立しやすくなる

海馬にE2が存在すると、E2無しの場合ではグルタミン酸神経のシナプスで長期増強(long-term potentiation : LTP)が成立しないような弱い刺激でも、LTPが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。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ER α /ER β に結合し→蛋白キナーゼ(MAPK, PKA, PKC)の活性化によるNMDA受容体のリン酸化→Ca²⁺流入量の増加→弱い電気刺激でもCaMKIIが活性化し→E2-LTPが成立」というものである(図2)(Hasegawa et al 2015)。

イタリアのPettorossi研では阻害剤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(Grassi et al 2011, Pettorossi et al 2013)。我々もこれを確かめたが、わずか20分の間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。他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いえないからである。一方DHTを多く加えると、E2-LTPが成立しないことも見出したが、これはE2によるシナプス過興奮を抑えてシナプスを保護しているのではないかと考えられる。

3. 海馬での性ホルモンの合成の意義

我々は脳でのT、DHTやE2の局所合成の研究にも力を注いできたが、そこからは、通常の内分泌作用とは異なる、いろいろなことがわかってきた。記憶中枢の海馬は独自にT、

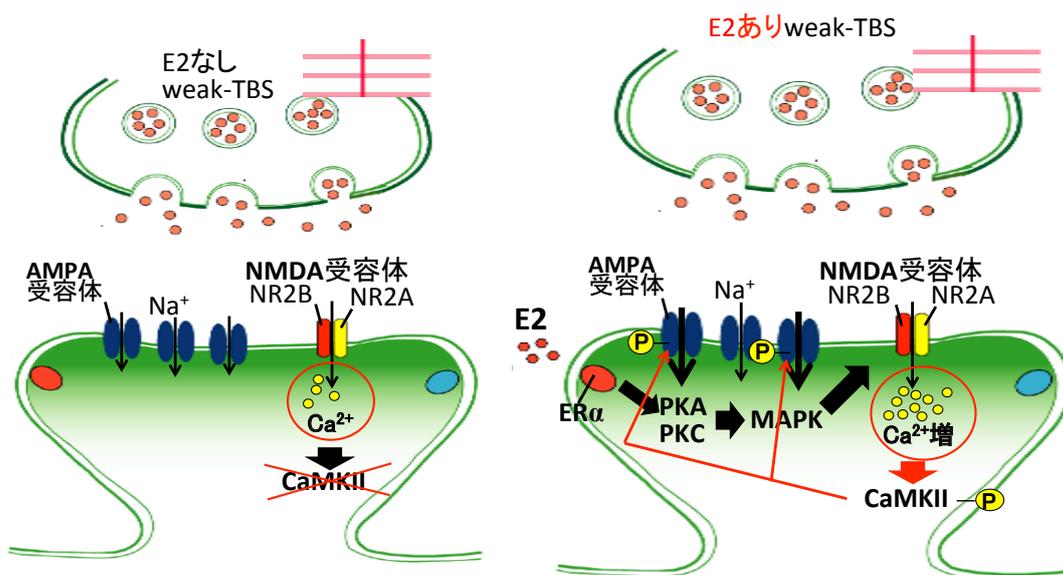


図2 弱いシータバースト(weak-TBS、右の赤い横線の束)刺激でも、E2の作用があると神経シナプスでの記憶書き込みLTPが成立する機構(右)を、E2がなくてLTPが成立しない場合(左)と比較した。雄海馬内でE2はTから変換されて濃度は高い。weak-TBS刺激は実際の海馬内で起こる刺激強度に近いと考えられる。AMPA受容体とNMDA受容体はグルタミン酸受容体。CaMKIIはcalcium-calmodulin dependent protein kinase IIでCa濃度が高くなると受容体をリン酸化する機能を持つ。

DHT、E2を合成している（オスメスの両方とも）(Hojo et al 2004)。海馬内での濃度を測定すると、血中のT、DHTやE2濃度より高いので、海馬のT、E2は主役だと思われる。海馬の記憶形成を行う神経シナプスは、局所合成されたT、DHTとE2の神経モジュレータ作用により、シナプス数や機能の低下が起こらないように調節されている。

海馬中には、コレステロール→プレゲネロン→DHEA or プロゲステロン→T→DHT、あるいはT→E2という、精巣と卵巣を合わせたような合成経路が神経で見出された(図3)。詳しくいうと、海馬スライスには、シトクロムP450scc、P450(17 α)、P450aromや、StAR、17 β -HSD、3 β -HSD、5 α -reductaseなどの合成酵素が、グルタミン酸神経に発現していた(Hojo et al 2004)。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正確に測定すると、成獣オスラットの海馬での濃度は、T (17 nM)、DHT (7 nM)、E2 (8 nM)と決定できた(Hojo et al 2009)。これらの濃度は血中よりも高かったのだが、なぜだろう？確かにmRNA、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1/200～1/5,000と大変低いのだが、しかし神経細胞は小さく、海馬の体積は0.1 mL程度で血管の体積20 mLの1/200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はないので、海馬では地産地消で使うとすれば、少量の酵素で十分であると説明できる(図3)。

一方、精巣が合成するTが脳に流入して働く、いわゆる内分泌作用も当然起こっている。特にオスの場合海馬内のTの約80%は血中から流入する(約20%は海馬内で合成)(Hojo et al 2009)。血中から流入するTはSHBG (sex-hormone binding globulin) に結合した状態で血中を運ばれ、脳血液関門を越えて脳内に入り、神経細胞膜に存在する megalin というSHBG受容体により、神経細胞内にエンドサイトシスで取り込まれるだろう。その後、細胞内でSHBGから離脱しFree Tとなり、またDHTにも変換されて作用するだろう。海馬に外から加えたTはE2になるよりも優先的にDHTになることを見出したが、これは興味深い。さらに面白いのは、ラットを去勢して精巣からのT、DHTを無くした場合、海馬内のTは20%へ減少し、DHTはほぼなくなるが、驚いたことにE2は減少せずに何週間もそのままである。つまり海馬内では優先的にE2が合成されている。このE2のおかげで、去勢でスパイン密度は75%程度には下がるのだが、それ以下にはならない。

4. 適度な運動による男性ホルモン合成

最近、ラットに適度な軽い運動を2週間させると、海馬のDHTが増加して→受容体AR

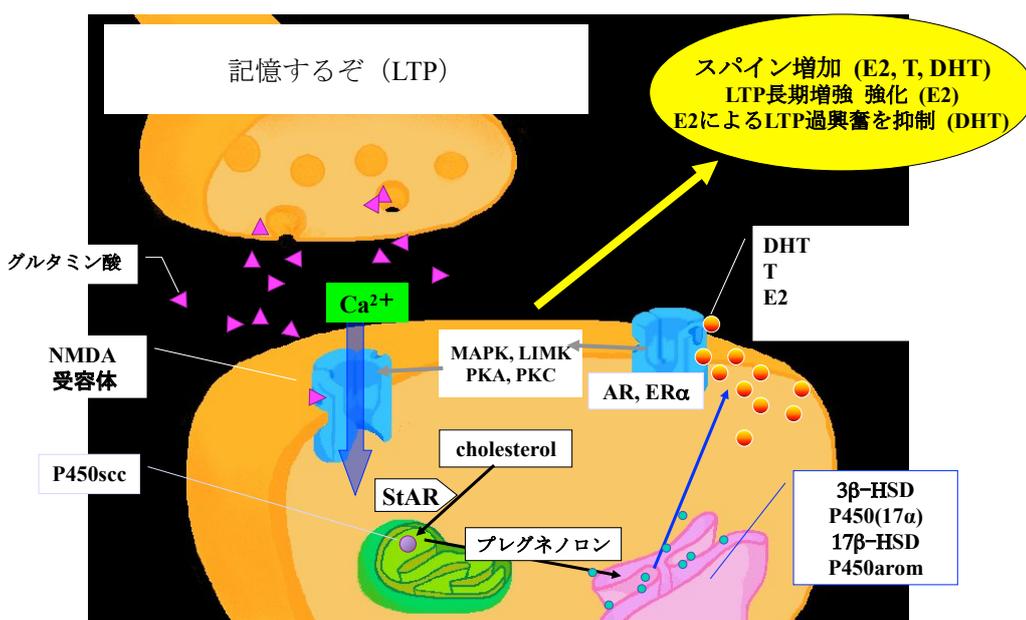


図3 モデル図：性ホルモンE2、DHT、Tの神経スパインでの合成と作用
2時間程度の早い作用。スパインに存在するAR、ER受容体→蛋白キナーゼ (MAPK、LIMK、PKA、PKC) →スパインが増加したり、長期増強LTPが強化される。DHTはE2によるLTPの過興奮を抑制したりもする。DHT、E2は神経のスパインと細胞体で合成されて→早い作用が起こる。

を介してDGでの神経新生が増えることを見出した (Okamoto et al 2012)。精巣を摘出したラットでも運動で同じ効果がある。これはホルモン補充に頼らなくとも、運動すれば記憶力が良くなることを意味している。

5. 老化による変化

ラットでは老化により海馬内のT、DHTやE2濃度は大きく減少することがわかった。血中ではTやE2濃度の老化による低下はわかっていたが、海馬内での測定は難しくできていなかった。この性ホルモンの海馬での減少は記憶能力の低下に一役買っているはずである。しかし、海馬内には、よく知られた神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神経成長因子 (neurogrowth factor, NGF) などがある。神経科学的には、これらが神経シナプスや神経回路を維持している主役だと思われている。驚いたことにBDNFやNGFは海馬の老化によって全く減少しない。したがって強力な神経栄養因子であるTやE2の低下が海馬記憶力の老化の主な原因だと言って良いのではないか。

よく調べてみると、24か月の老齢ラットの脳でも、T、DHT、E2の合成酵素の量は若いころの70～80%程度にしか低下しない (Munetomo et al 2015)。一方、24か月の精巣ではこれらの合成酵素が激減してしまうので、海馬が頑張れば、記憶力はかなり維持できるのではないか？つまり脳の認知症は、海馬の頑張りで防げるだろう。

6. ヒトの場合

ヒトのことを考えると、脳の男性ホルモンだけで何ができるのだろうか？→答えは東ローマ帝国 (キリスト教国で1000年も続いた) や中国で力をふるった宦官が示しているのではないか。東ローマ帝国では3人もの教皇をはじめ多くの高級官僚が宦官であった。家族を作らず政敵にならないので重用された。中国では史記を書いた司馬遷、紙を発明した蔡倫、など多くの成功者もいる。宦官は、精巣の男性ホルモンが無くとも、脳の男性ホルモンが発揮する知力で偉業を成し遂げ政治を動かさせたわけである。

病院泌尿器の更年期外来で血中のfree Tが少なくなったLOH患者の皆さんの空間認知機能をテストすると、結果は低下しており、これをT補充療法で回復するかどうかを診断している。早期認知症を回復させる良い手段になるのではないかと期待している。

References

- 1) Hasegawa Y, Hojo Y, Kojima H, Ikeda M, Hotta K, et al. 2015. Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks. *Brain Res* **1621**: 147-61.
- 2) Hatanaka Y, Hojo Y, Mukai H, Murakami G, Komatsuzaki Y, et al. 2015. Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res* **1621**: 121-32.
- 3) Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, et al. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 865-70.
- 4) Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, et al. 2009. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* **150**: 5106-12.
- 5) Levin ER, Hammes SR. 2016. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**: 783-97.
- 6) Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, et al. 2007. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* **100**: 950-67.
- 7) Munetomo A, Hojo Y, Higo S, Kato A, Yoshida K, et al. 2015. Aging-induced changes in sex-steroidogenic enzymes and sex-steroid receptors in the cortex, hypothalamus and cerebellum. *J Physiol Sci* **65**: 253-63.
- 8) Okamoto M, Hojo Y, Inoue K, Matsui T, Kawato S, et al. 2012. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13100-5.