

CREST 追跡調査で 内分泌かく乱分野で 川戸チームが第一位に選ばれた

研究課題：「脳ニューロステロイド作用をかく乱する環境ホルモン」

研究代表者：川戸 佳 （所属）東京大学大学院総合文化研究科 教授

3-1-1 研究期間中における状況

(1) 本研究開始の頃の状況(背景)¹⁾

川戸らは、記憶学習の中枢である脳の海馬を研究の中心に据えて、神経伝達に対する女性ホルモンの作用と、環境ホルモンのかく乱作用を研究対象にした。その点で、生殖への影響を解析している他の多くの内分泌かく乱研究チームと目的・対象を異にしていた。

従来の神経内分泌学の常識では、ステロイドホルモンは性腺や副腎皮質で合成されて、血流に乗って標的である脳（特に性中枢である視床下部など）に到達して作用する、というふうに理解されてきた。これに対して、彼らはこれまでの研究結果から、(A) 記憶を司る海馬では、独自にチトクロム P450 系が脳ニューロステロイドとして女性・男性ホルモンを合成している可能性がある、(B) 女性ホルモンは神経伝達や神経シナプス回路の配線を 1 時間ほど急性的に変動させる可能性がある、ことを示す複数のデータをつかんでいたため、これを厳密に証明しようと考えた。そして(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用にかく乱を与える、と考えた。この当時世界的に、グループの数は少ないが、ステロイドホルモンの急性的で non-genomic な作用の研究と、膜上のステロイド受容体探索の機運が盛り上がり国際会議も発足していたが、彼らの試みは、これを更に難しい高次脳機能と結びつけるという、野心的な構想であった。性腺から脳に到達するステロイドの生殖作用や、核のエストロゲン受容体を介した genomic な作用の研究の蓄積に比べれば、信頼でき利用できる報告の数は極めて少なく、成功確率の低い研究と思われたようである。

(2) 主な狙いと研究成果

CREST期間中の研究内容については、終了後も発展研究が進んでおり、以下、脳内のエストロゲン合成、その受容体、脳でのエストロゲン作用の3点に分けて概説した。

1) 脳でのエストロゲン合成

CRESTにおいて川戸らは、放射性ステロイド基質をラットの海馬スライスに添加して代謝解析を行った。この結果、世界で初めて、コレステロール→プレグネノロン→デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) →アンドロステンジオール→テストステロン→エストラジオールに到る、海馬における女性ホルモン合成経路を発見した^{2,3,4)}。更に、テストステロン→ジヒドロテストステロン→ $3\alpha, 5\alpha$ -アンドロスタンジオールという男性ホルモンの代謝経路も存在した⁵⁾。性ホルモン合成活性は、雌雄の海馬に顕著な差はなく、海馬のような高次脳機能を司る器官では、性差は少ないことを窺わせた。

また、免疫抗体染色の結果、性ホルモン合成に関わるチトクロムP450などの酵素蛋白質は、CA1-CA3領域の錐体神経細胞とDG領域の顆粒神経細胞に局在していた^{2,6)}。これは、性ステロイ

ドが記憶を貯蔵する神経シナプスで局所的に合成されることを示す重要な成果である。

2) 脳のエストロゲン受容体

脳の神経細胞は性ホルモンを自前で合成しているので、ここに、エストロゲン受容体が存在することは論理的に予想できた。川戸らは、数十分以内で起こる早い記憶学習に影響を及ぼす女性ホルモンの作用部位は、神経膜か神経シナプスに存在するであろうエストロゲン受容体だと予測した。海馬の神経はエストロジェンの作用を大きく受けるが、ラット海馬の神経細胞にエストロゲン受容体が存在するという明確な証明は、当時まだ世界的にもなく、数少ないインターニューロンにかろうじてエストロゲン受容体 $ER\alpha$ の抗体反応が認められるという報告が多かった。川戸らは、記憶機能において中心的役割を果たす、数の多いグルタミン酸神経細胞での存在を解析するため研究を始め、それまで世界中で使用されてきた著名な $ER\alpha$ の抗体（例えば MC-20抗血清）は、不純抗体を多く含む抗血清として使用されており、海馬・大脳皮質・小脳など $ER\alpha$ が極めて少ない部位で染色すると、 $ER\alpha$ とうまく反応せず、未同定の蛋白質に結合してしまうという事実を見いだした。従ってそれまでに発表されてきた多くの論文は、海馬スライスの組織染色、免疫電子顕微鏡観察、単離した培養神経細胞などで、 $ER\alpha$ の分布に関し深刻な間違いを含んでいる。この難問題は、本CREST研究領域の小南グループが $ER\alpha$ の新しい高純度精製抗体RC-19 を作製することで解決できた。

RC-19 抗体を用いると、 $ER\alpha$ が海馬神経シナプス膜分画や核内に存在することが示され、電子顕微鏡による免疫金抗体染色の解析を行って、錐体神経細胞と顆粒神経細胞のシナプス前部・後部と核に $ER\alpha$ が確かに局在していることを発見した。

3) 脳でのエストロゲン作用（電気生理とスパイン解析）

神経シナプスでの $ER\alpha$ 受容体の存在が確定したので、神経シナプス伝達・記憶学習の環境ホルモンによるかく乱は、このシナプス局在 $ER\alpha$ に、環境ホルモンのビスフェノールA (BPA) やジエチルスチルベストロール(DES) などが作用する結果起こると想定して、電気生理やスパイン解析を行った。ところで、環境ホルモンは体に入った後、脳に移行する。ラットやサルに注入したBPA は、30分から1時間程度で脳血液関門を越えて脳内に移行することが、本CREST研究領域の井口らの研究で確認されている。

電気生理解析は、女性ホルモンや環境ホルモンの記憶学習に対する急性効果（30分～1時間の効果）を測定する方法としては、最も高感度である。ラット海馬スライスを用いて、CA1, CA3, DG の3領域で同時にNMDA 刺激による長期抑圧LTD を多電極電気生理で測定したところ、エストロジェン、DES, BPA などは、低濃度でLTD を促進した(7,8)。このLTD 促進効果は $ER\alpha$ のアゴニストPPT でも同様に得られたが、 $ER\beta$ のアゴニストDPN では抑制されたので、おそらく $ER\alpha$ を介した効果であろう。このように、環境ホルモンがナノモルの低濃度でシナプス伝達をかく乱する効果がはっきりと観測された。

環境ホルモンの影響を感度よく調べる、もうひとつの方法として、神経スパイン（シナプス後部）の密度と形態を解析する方法がある。電気生理では、シナプスを形成する活性型の神経スパインしか測定できないが、この形態解析法では、シナプスを形成しない神経スパインも含んだ全てのスパインが解析できる。海馬スライス中の単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションし、個々のスパインを可視化する。その結果海馬スライスにエストロジェン

ールを2時間作用させるだけで、CA1 領域で全スパイン密度が増加し、特にthin スパインが選択的に増加することを発見した9, 10, 11, 12, 13, 14)。エストラジオール、DES、BPAは低濃度で非常によく似たスパイン増加効果を示した15)。更なる解析結果から、ER α アゴニストのPPTがエストラジオールと同じようなスパイン増加効果を示すことから、これらの作用はER α を介して行われていることを確認した。

一方、ラット新生仔の小脳神経細胞の発達解析を行い、エストラジオール、OP 及び BPA は共に、プルキンエ神経細胞突起の発達を促進させ、また、スパインの数も増加させることが明らかになった。これ等の神経成長促進は、タモキシフェンを加えておくと阻害されたので、エストロゲン受容体を介した作用であると考えられる 16)。

4) まとめ

研究成果を具体的に挙げると、次のようになる。

- 1) 海馬の脳ニューロステロイド合成活性と、環境ホルモンによるかく乱の解析
- 2) 海馬ニューロステロイド合成酵素系の神経局在の同定
- 3) エストロゲン受容体の神経シナプス局在の同定
- 4) 電気生理による海馬長期抑圧に対する影響で環境ホルモンの急性効果を解析
- 5) スパイン密度・形態変化による海馬神経細胞での急性効果の解析

以上得られた結果を、わかりやすく説明した図を以下に示す(図1)。「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、Steroidogenic acute regulatory protein(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、長期抑制を促進したり、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」ともいふべきものである。このエストロゲン作用を、環境ホルモンである BPA, DES, NP (多分OP も)などがさまざまにかく乱する15)。

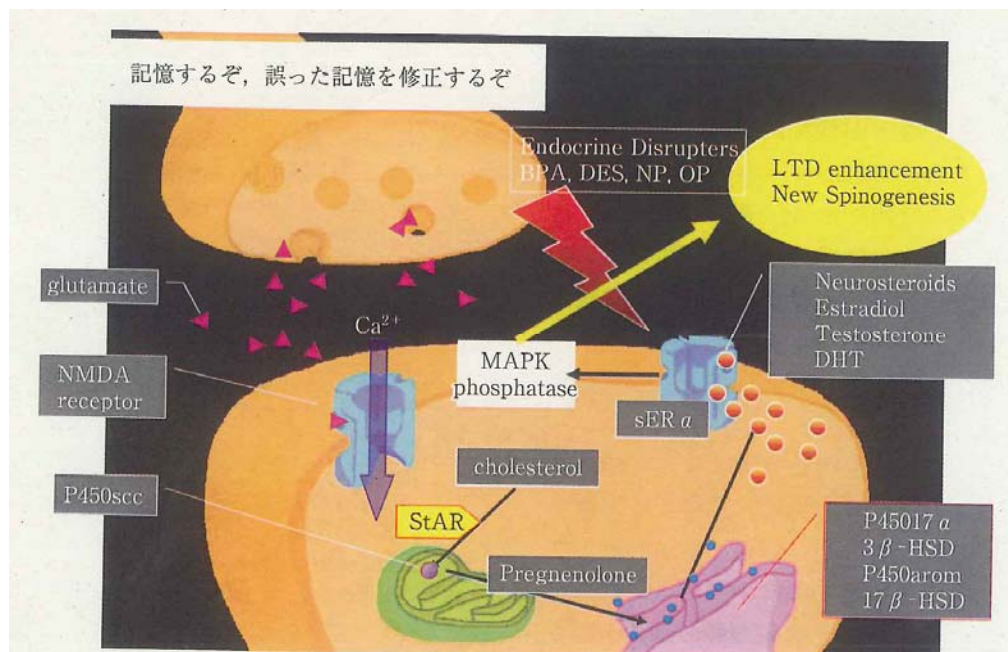


図1 海馬での女性ホルモンの合成と海馬神経伝達制御の機構¹⁾

3-1-2 研究終了後の基礎研究としての継続・発展状況

川戸は、CREST 研究が終了した 2005 年度以降も引き続き、脳での精神現象を担う高次情報変換を、生物物理学と分子細胞生物学の立場から解明する研究を行っており、神経情報伝達に伴う電気信号、Ca²⁺信号、ニューロステロイド信号など、情報の受信・変換・発信メカニズムを解析している。謂わば、電気生理イメージング・顕微光CTなどの計測法を縦軸、生物物理学・分子細胞生物学を横軸として研究を進めていると言えよう。川戸によれば、脳は論理的と言うよりも感情的なコンピュータであり、脳海馬の記憶学習は、神経伝達物質のニューロステロイドが制御する感情・精神に強く依存している。

前述のように、ステロイドホルモンは脳内では合成されず、精巣や卵巣、副腎皮質で合成されたものが血流に乗って脳に運ばれ、それが作用しているということが神経内分泌学における過去の定説であったが、川戸らの CREST 研究の成果はこれを覆した点で画期的であった(3, 4, 12, 13, 14)。

脳ニューロステロイドは、海馬の神経細胞に局在するチトクローム P450 の存在下に合成され、シナプスで局所的に作用し神経伝達物質として働いている。すなわち、同じホルモンが部位によって役割を全く異にしていることが特徴的である。

CREST では、エストロゲンの合成経路が脳内にあること、海馬神経シナプスにその受容体 ER α が局在していることを見出し、エストロゲン作用と環境ホルモンによるかく乱作用について明らかにした¹⁾。この研究は、CREST 終了後も継承され、1) エストラジオールなど女性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用、とくに記憶学習のモジュレーション(13, 14, 16, 17, 18, 19)、また、2) テストステロンなど男性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用、とくに記憶機能への影響(20, 21)、について研究が続けられた。

1) 女性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用

更年期のアルツハイマー病など認知症の治療法として、ホルモン補充療法でエストラジオール (E2) を投与すると海馬の記憶能力を活性化できることが臨床的に知られており、海馬での E2 の作用はよく研究されている。

雄ラット海馬スライスに E2 を作用させると、スパイン密度が増加する。この作用を媒介する情報伝達については、ER α と MAPK, PKA, PKC などの蛋白キナーゼ群が働いていることが明らかになった。女性ホルモン補充療法で E2 を投与すると、海馬におけるスパイン密度が増加して記憶能力の活性化につながると説明される。

2) 男性ホルモンの海馬神経シナプスへの作用(20,21)

テストステロン (T) やジヒドロテストステロン (DHT) など男性ホルモンの記憶作用の研究は少なく、高次脳機能での作用はよくわかっていない。川戸らは神経に蛍光色素を注入することで、個々のスパインの密度や形態を共焦点顕微鏡の 3D 画像で可視化し、男性ホルモンの作用を検討した。DHT を雄ラット海馬スライスに作用させると、グルタミン酸神経のスパイン密度が増加し、これはアンドロゲン受容体 AR を介して駆動することを明らかにし

た。さらに、AR の下流の作用経路には、MAPK、PKA、PKC などの蛋白キナーゼ群が働いていることも明らかにした。スパインは記憶を蓄える素子なので、DHT や T が記憶力を短時間で高めると考えられる。

また、男性の更年期や加齢により、脳内の T や DHT の低下でスパイン数が減少して記憶機能が低下し、認知症とくにアルツハイマー病が発症するものと考えられる。男性患者に対してはテストステロン補充療法が考えられるが、現在のところ、女性ホルモン補充療法ほど一般化していない。

ほかに川戸らは、現在、以下のようなことをめざしている 22)。

- 1) 海馬でのニューロステロイド合成酵素と受容体からなるネットワークの遺伝子解析。
- 2) 遺伝子工学・蛋白質工学などによって受容体や蛋白質を発現した人工脳細胞を用いての上記研究。
- 3) 脳型コンピュータのアルゴリズムを見つけるべく、神経シナプス 3 次元配線の自動解析法の開発。

記憶学習中枢の海馬で合成される脳ニューロステロイドは全く新しいモジュレータであり、シナプス受容体に働き、記憶・学習機能を変動させモジュレートする。川戸らは現在、多電極電気生理とデジタル蛍光顕微システムを用いて、単一神経・シナプスや神経ネットワークの交信機構を解析している。

高次脳機能においては、女性・男性ホルモンは性ホルモンではなく（雄の脳も女性ホルモンを合成する）、ニューロステロイドの代表格であり、神経モジュレータ・神経成長因子として働き、精神現象を規定していることが明らかになった。

これらは抑うつ症やアルツハイマー病の治療効果があり、また、ストレスステロイドは精神抑うつ症の要因である。更に、アクチビン（性ホルモンだが、脳でも作られる）や環境ホルモンとくに合成女性ホルモンが、急性的に海馬の記憶学習を変動させることを見出し、その分子機構を解析している。このように、現在の発展状況は CREST の研究成果をさらに深化させた結果であり、川戸らは、かねてより神経内分泌学を革新しようと、「神経シナプス分泌学」を提唱してきた。

3-1-3 研究成果から生み出された科学技術的な効果・効用および波及効果

(1) 科学・技術の進歩に貢献する成果

CREST 終了後に継続的に別のファンドを受けた代表的な発展事例として、計測分野での次の 2 つが挙げられる。海馬における脳ニューロステロイドの合成経路発見 (CREST) 以降、川戸らの研究は、定量性を上げた計測・解析手法を駆使した神経シナプスの作用機構解明や記憶学習のモジュレーションのほうに指向している。

- 1) 「脳スライス中で可視化した神経シナプスの自動解析」（科学技術振興機構・バイオインフォマティクス推進事業）7, 13, 14, 15, 23, 24)

大脳スライス中の単一神経細胞の樹状突起に存在する個々のスパイン（シナプス後部）を、

蛍光色素を注入して可視化すると、ホルモンや薬物の作用を受けて、1時間程度で急性的に数や形態が変動する様子が高感度で観察できる。このスパインの増加・減少や変形を数学的演算を用いて自動的に解析できるソフトウェアを世界で初めて開発することを目指した。川戸らは、前述のように CREST を中心とした研究で、スパインが、①ストレスホルモンで変化する 23)、②脳内で合成される女性ホルモン（神経成長因子）やアクチビン（性ホルモン）で新生する 25)、③環境ホルモンでも新生する 15)、④これらのスパイン変化は MAP キナーゼ系を介した経路で駆動されている、などの新しい現象を見いだした。しかし、これらの研究に用いる顕微神経可視化解析手法は、熟練研究者の目で1個1個確認する手作業であり、単一神経細胞に関しても完了するまでに数日はかかる。この難点を、自動・高速解析法の開発によって解決しようとした。神経樹状突起の分岐、スパイン位置、及び複雑なスパイン形態を特定し、3次元の共焦点顕微画像から自動的に高速解析できる、新規なアルゴリズムを持つ画期的なソフトウェアを開発した 24)。これにより、コルチコステロイド増加によるストレス起因のうつ病・パニック的記憶障害、性ホルモン低下による更年期型うつ病、またアルツハイマー病の女性ホルモン補充療法による改善法など、現代社会で緊急の課題に対し、創薬のための新規解析法を提供することができよう。

2) 「環境ホルモン記憶学習かく乱のテーラーメイド多電極計測」（文科省・科学技術振興調整費・産学官連携プロジェクト）7, 13, 14, 15, 26, 27)

環境ホルモンや脳女性ホルモンの記憶学習効果研究に大きな実績のある川戸（代表者）と、多電極神経計測 MED64 を開発し脳神経の記憶学習を計測しているアルファメッドサイエンス社とが連携して、環境ホルモン（擬似女性ホルモン）による記憶学習のかく乱につき、異なる脳部位や動物種に対応したテーラーメイド多電極計測法を開発するプロジェクトである。

海馬や大脳皮質が主な標的である環境ホルモンの記憶学習かく乱は、脳女性ホルモンの神経作用（長期増強・長期抑制のモジュレーション）をかく乱することによって起こる。

川戸らは、環境ホルモン（擬似女性ホルモン）が哺乳類の海馬で記憶学習に急性的にはっきりしたかく乱を与えることを発見し、その分子メカニズムの解析に業績を挙げている。本共同研究では、脳スライスの神経配列に個別に対応した多電極配列をフォトリソグラフィ技術で作成することにより、動物種や脳の部位に個別に対応し、微弱な環境ホルモンの影響を記憶学習（長期増強）計測で検出する世界標準法を確立しようとしている。それを用いて、ビスフェノール A・DES・ダイオキシンを始めとして 70 種以上に及ぶ環境ホルモンの脳記憶学習へのかく乱をスクリーニングしている 7, 13, 14, 15)。

(2) 人材育成からみた参加研究者の活動状況

CREST 当時はポスドクだった高橋泰城は、北海道大学文学研究科の准教授に就任した。現在は行動経済学的手法と神経生物学的手法を組み合わせた神経経済学を展開している。

また、CREST 当時は助教授として小南グループの一員として ER α の高純度精製抗体 RC-19 を作製し、海馬のステロイド合成酵素の遺伝子発現の変動を解析した山崎岳は、現在、広島大学総合科学研究科教授として、環境化学物質の神経作用の分子生物学的解析で活躍している。

CREST 当時、広島大学総合科学研究科教授で、小脳でのステロイドホルモンの合成を見出す

など先駆的な業績をあげた筒井和義は、現在、早稲田大学教育・総合科学学術院の教授に就任し、この分野の指導的立場にある。

さらに、CREST 当時ポスドクとして、海馬でのシナプス膜に女性ホルモン受容体が発現していることを発見・同定した向井秀夫は、現在、日本大学文理学部物理生命システム科学科の助教、同じくポスドクだった北條泰嗣は、現在、東京大学大学院総合文化研究科の特任研究員、博士課程大学院生だった石井寛高は、現在、日本医科大学第一生理学講座の助教に就任している。

3-1-4 研究成果から生み出された社会的、経済的な効果・効用および波及効果

(1) 医療・福祉に繋がる芽

以上の発展状況から、従来の神経内分泌学の枠内に入らない、神経シナプス分泌学という新しい方法論が起ち上がったと言える。この方法論によって、「(A) 記憶を司る海馬は独自にチトクロムP450系が女性・男性ホルモンを合成し、(B) エストラジオールは、神経シナプス膜上に局在するエストロゲン受容体ER α などに作用し、神経伝達や神経シナプス回路の配線を1時間ほどで急性的に変動させる。(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用に、1時間ほどでかく乱を与える。」という現象が、無理なく説明できる。

今後、脳神経が合成する男性ホルモンの作用も、神経シナプス分泌学的に解明されようとしている。また、エストロゲン受容体の下流のシグナル伝達系に関する研究も活発に展開されていくであろう。実際、エストラジオールや環境ホルモンの引き起こすリン酸化カスケードを含む急性効果は、内分泌細胞や血管内皮細胞においても起こることなどが、本CREST研究領域の梅澤研究代表者²⁸⁾や海外の研究グループによって報告されており、今後このような分子メカニズムの深い解析が進んでゆくはずである。

川戸によれば、脳が合成する性ホルモンは、新しい神経成長因子のスーパーファミリーであり、現在BDNF (brain-derived neurotrophic factor) しか考えていない脳の神経栄養因子分野の研究を革新するだろうと見られている。また、神経シナプスに存在するステロイド受容体はER α に限られてはおらず、今後多くの、シナプスに存在するステロイド受容体が発見されて、ステロイド・シグナル伝達の研究が、「核内受容体と転写作用」という伝統的な研究から脱して、大きく発展すると期待される。

社会的に見ると川戸らの研究は、疑わしい環境化学物質が、脳の機能をかく乱するかどうかの判定を行う方法論を提供できたほかに、「女性ホルモン摂取によるアルツハイマー型認知症の治療（ホルモン補充療法）で、どうして海馬の記憶活性が改善するのか」、「うつ病の患者の女性ホルモン補充療法によってうつ状態が改善するのはなぜか」などの疑問に、神経科学的分子メカニズムで答えることができる可能性が出てきたと考えられる。

(参考文献)

1. CREST研究領域「内分泌かく乱物質」 研究課題「脳ニューロステロイド作用をかく乱する環境ホルモン」研究終了報告書
2. Kimoto, T. *et al.* : *Endocrinology* 2001: 142,3578-3589

3. Kawato,S. *et al.* : Methods Enzymol.2002: 357,241-249
4. Hojo,Y. *et al.* : PNAS 2004: 101,865-870
5. Kawato,S. *et al.* : Adv.Biophys.2003: 37,1-48
6. Murakami,G. *et al.* : Drug Metab.Rev. 2006: 38,353-369
7. Mukai,H. *et al.* : J. Neurochem. 2007: 100, 950-967
8. Kawato,S. *et al.* : Environ Sci.2004: 11,1-14
9. Mukai,H. *et al.* : Neuroscience 2006: 138,757-764
10. Mukai,H. *et al.* : Neuroendocrinology 2006: 84, 255-263
11. Murakami,G. *et al.* : Biochem.Biophys.Res.Commun.2006: 351,553-558
12. 川戸 佳ら:生体の科学 2007: 58,65-71
13. Ishii H.*et al.* The Neuroscientist (2007) 13, 323-334
14. Hojo Y. *et al.*, Mol Cell Endocrinol. (2008) 290, 31-43
15. Ogiue-Ikeda M. *et al.*, Brain Res. Rev.(2008) 57, 363-375
16. Shikimi *et al.* (2004) Neurosci. Lett. 364, 114-118
17. Hojo Y. *et al.*,Endocrinology (2009) 150, 5106-5112
18. Munetsuna E., Endocrinology. (2009) 150, 4260-4269
19. Kimoto *et al.*, Endocrinology (2010) 151, 5795-5806
20. Hatanaka Y. *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. (2009) 381, 728-732
21. 川戸 佳 : 総合臨床 2010: 59,1546-1550
22. <http://glia.c.u-tokyo.ac.jp/research-j.html>
23. Higo S. *et al.* . PLoS One (2011) Web online
24. Mukai H. *et al.* Cerebral Cortex (2011) Web online
25. 川戸 佳 共立出版 (2007) 「生命システムをどう理解するか (浅島誠 編)」第9章
26. Ooishi Y., *et al.* Cerebral Cortex (2011) Web online
27. <http://glia.c.u-tokyo.ac.jp/proj-j.html>
28. CREST研究領域「内分泌かく乱物質」 研究課題「内分泌かく乱化学物質の細胞内標的分子の同定と新しいバイオモニタリング」研究終了報告書