

総説

海馬が合成する神経ステロイドの記憶学習モジュレーション

川戸 佳 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

Functions of the hippocampus is dependent on brain-derived-neurosteroids. Because estrogen is synthesized locally in the hippocampus, as well as supplied from the ovary, its functions are attracting much attention. Hippocampal sex-steroids modulate memory-related synaptic plasticity not only slowly but also rapidly. Slow actions of estradiol (E2) occur via nuclear receptors (ER α), while rapid E2 actions occur via synapse-localized ER α . Elevation or decrease of the E2 concentration changes rapidly the density and morphology of spines. Kinase networks are involved downstream of ER α . The long-term depression is modulated rapidly by changes of E2 level. The E2 level is much higher than that in blood circulation. Hippocampus-derived sex-steroids play a major role in modulation of synaptic plasticity.

brain steroid / neurosteroid / estrogen / hippocampus / synapse

1. はじめに

記憶学習を担うシナプス可塑性は脳機能の中でもさかんに研究されている。しかし、精神状態や加齢・環境による学習効率の変化など重要な未解決問題は多い。われわれが研究してきた情報伝達物質としての神経ステロイドが脳神経に及ぼす作用は、これらの疑問に切り込むものである。

従来、神経内分泌学では脳神経に作用するステロイドホルモンは精巣・卵巣などで合成され、血流によって供給されるものと信じられてきた。ペプチドホルモンが脳でも脳以外の体でも合成されるのと比べると、不思議な話であった。しかし近年、女性ホルモン (E2 エストラジオール) をはじめとするさまざまな神経ステロイドが合成されていることが、われわれの研究などにより明らかになってきた。脳内の濃度は血中から来る濃度よりずっと多く、驚いたことに E2 は雄の脳の方が雌の脳より多く合成する。血中とは正反対である。

E2 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。この作用はシナプスのステロイド受容体とキナーゼ群によって担われている。更年期になると、雄も雌も E2 が減少し、記憶機能が低下しアルツハイマー病も発生する。今回最新の知見に基づき、海馬における神経ステロイドの合成と記憶の神経伝達にかかわる作用を解説する。

2. 女性・男性ホルモンの海馬神経シナプス作用

更年期過ぎの女性にはアルツハイマー病や痴呆が多発するので、E2 を送り込み海馬の記憶能力を活性化ホルモン補充療法が広く行われている。この効果の理由を解明するためあって E2 の作用研究は活発である。ホルモン作用機構としてよく研究されているのは、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もの (長期作用; 神経保護やシナプス増加) である。海馬ではこの他に、遺伝子の転写を介さずに短時間 (2 時間程度) で効果が現れる短期作用がある。われわれは E2 が長期抑圧を強化する短期作用を発見した (図 1)。

長期抑圧は誤ったシナプス記憶を消す作用であり、この作用がないと、全体として正しい記憶を形成できない。最初は大雑把に記憶するが、半分程度は誤った記憶で、その後反復して正しい記憶に修正しているのが常である。長期抑圧ができないようにすると神経行動テストの成績が悪くなる。海馬スライスでは 1-10 nM の E2 を灌流しておく、長期抑圧が強化された^{5),7)}。

一方、記憶を書き込む長期増強の研究では、海馬スライスに E2 を 30 分灌流させても、長期増強には E2 の影響はないことがわかった⁷⁾。

E2 は、神経スパイン (棘突起: シナプス後部) の密

Modulation of Learning and Memory by Neurosteroids in the Hippocampus

Suguru KAWATO

Dep. of Biophysics and Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, Univ. of Tokyo

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^{5),7)}。スパインはシナプス前部と一緒に記憶を蓄える最小部位シナプスを構成する。神経に蛍光色素を注入して個々のスパインを可視化し、E2の作用を検討した。海馬スライスにE2を作用させると、CA1ではスパイン密度が増加する^{5),7)} (図2)。

スパイン頭部直径は0.2-1.0 μmの分布をもつが、特に小型スパイン (0.2-0.4 μm) の増加が目立つ。この作用を媒介する情報伝達は、E2→受容体ERα→MAPK, PKA, PKC, PI3Kなどのキナーゼ群となっていることがわかった。キナーゼはアクチンの重合/脱重合を制御するタンパク質のリン酸化を行い、その結果スパインが増加すると考えている。これまでE2がスパインなどの神経回路を変化させるためには12時間以上の長い時間が必要と考えられてきたが、われわれの発見した非常に早いスパイン変動は、この常識を覆すものである。

更年期などの加齢により海馬内のE2が低下するとスパイン数が減少して、シナプスも減少するので、記憶機能は低下するはずである。ホルモン補充療法でE2を送り込むと海馬の記憶能力を活性化できる理由は、このスパイン密度回復効果にあると解釈できる。われわれは、E2の作用部位エストロゲン受容体ERαの局在を調べるため精製抗体RC-19を作成し (広島大・小南教授)、金コロイド免疫電子顕微鏡解析を

行った。その結果、海馬のグルタミン酸神経のシナプス後部 (スパイン)・前部と核にERαが確かに局在していることを発見した (図3)⁵⁾。われわれの研究以前には、ERαは抑制性のGABA神経にごくわずか存在するという結果が常識だった。

一方、男性ホルモンのテストステロン (T) やジヒドロテストステロン (DHT) の記憶作用研究は、E2と比べるとずっと少なく、高次脳機能でのT, DHTの作用はよくわかっていない。これは男性の更年期が女性の更年期に比べて研究されていないことにもよる。海馬への注入で、脳ではTやDHTには抗不安作用 (勇敢にする作用) がある。さて、DHTを海馬神経スパインに2時間作用させると、急性的にCA1でスパイン密度が増加した⁸⁾。E2効果と似ているが、PI3Kを駆動しない点と、大型スパイン (0.5-1.0 μm) が増加する点がE2とは異なる。TとDHTの作用は似ているがDHTのほうがTより作用力が強い。男性

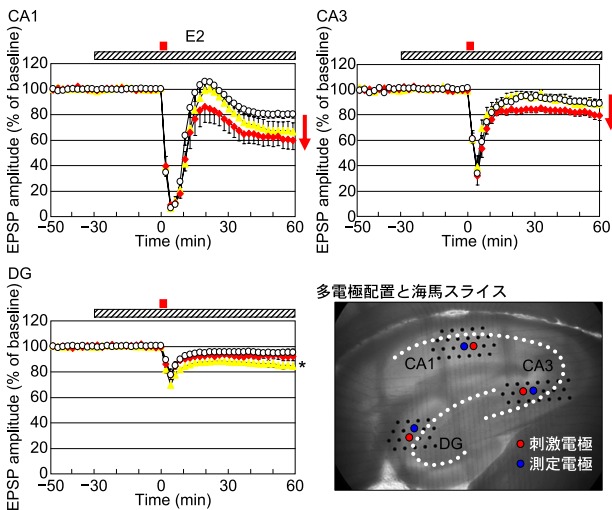


図1 E2による長期抑圧の強化。海馬スライスのCA1, CA3, DG領域のグルタミン酸神経系 (図5参照) は、NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) の3分間刺激 (図上部の小四角) により、1 μM Ca²⁺がスパインに流入し長期抑圧が誘導される (縦軸の興奮性シナプス後電位が減少)。斜線横棒で示すようにE2を灌流しておくとも長期抑圧が強化される。グラフのE2濃度は上から0 nM, 1 nM 黄色, 10 nM 赤色。長期抑圧の強化はCA1でいちばん顕著である。(電子ジャーナルではカラー)

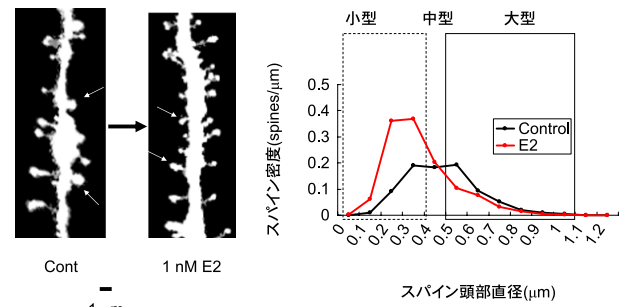


図2 E2によるスパイン増加と頭部形態の変化。海馬スライスに1 nM E2を作用させると、2時間でグルタミン酸神経のスパイン密度が1.4倍増加し、小型スパインの増加が著しい。単一神経には樹状突起が50本程度あり、図で白い棒状の樹状突起に存在するスパイン (矢印) は合計1万程度もある。(電子ジャーナルではカラー)

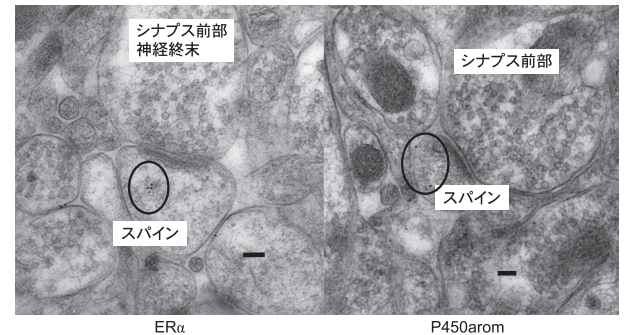


図3 海馬CA1グルタミン酸神経のシナプスにおけるERαとP450aromの局在 (丸で囲んだ)。金抗体免疫電子顕微鏡解析。ERαはスパイン=シナプス後部に発現しているが、細胞質や核にもある。P450aromはスパインに発現しているが、ミクロソームにもある (図4参照)。E2局所合成→局所作用のシナプス分泌機構を示唆する。Scale barは200 nm。

ホルモン受容体としてはシナプスにも核と同じアンドロゲン受容体 (AR) が見だされており, この AR を介して下流のキナーゼ群 (MAPK, PKA, PKC) を駆動しているという結果を得ている。

3. 海馬における男性・女性ホルモンの合成

以上のような海馬での性ホルモンの作用が, 血中から脳に到達した性ホルモンによってなされるのなら, あまり面白味はない。海馬の神経自身が合成した性ホルモンの作用によることを示した所がわれわれの研究のいちばん誇れる部分である。なぜなら脳のほうが血中より性ホルモン濃度が断然高いことを発見したからである。われわれの研究の結果判明した海馬での性ホルモン生合成経路を図 4 に示す。

最も難題であったのは, デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) の合成酵素シトクロム P450 (17 α) が mRNA でもタンパク質でも, 脳には存在しないという多くの論文報告を覆すことであった。脳ステロイド分野の開拓者であり神経ステロイドの名付け親 E. Baulieu 教授 (パリの国立医学衛生学研究機構, 80 歳近いが元気) がどんな実験でも P450 (17 α) は存在しないし DHEA も合成されないという論文を Proc. Natl. Acad. Sci. USA などに繰り返し書いているので, これは大きな壁であった^{1), 4)}。「DHEA の下流の性ステロイドは卵巣・精巣で合成され, 血中をめぐり脳に到達して作用する」というのが学会の常識だったからである。Baulieu などは硫酸プレグネノロンが最も重要な神経ステロイドで^{1), 6)}, これは記憶の活性化に働くという多くの論文を報告していた。世界の大勢もそれを支持していたが, なんと最近, 硫酸プレグネノロンは脳には存在しないと, 発見者自身が報告して大騒動になった⁵⁾。この為 Gustafsson 教授 (この分野の指導者, ノーベル医学生理学賞選考委員長) も, 2005 年の私のセミナーの前置きで, “Neurosteroid is still a somewhat ambiguous field” といっていたくらいである。1990 年代後半の世界の状況は悲惨で, P450, 3 β -HSD などの mRNA は卵巣や副腎皮質の 100 分の 1 以下であるということが示されていて, 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, 研究からは撤退していった。

しかしわれわれはステロイド合成 P450 の専門家であったこともあり, 脳の新しい情報伝達物質候補として解析してみたいと大胆な研究を進めた (1990 年～)。体ではステロイドもペプチドも, 情報伝達物質として勢力を二分しているのに, 脳ではステロイドホルモン

が合成されないとされているのは, 間違いではないかと私は考えていた。10 年間かけて抽出法や測定法の検出感度を 1000 倍上げることで, ようやく脳内ステロイドの実態を捉えることができるようになった。海馬を使用した理由は記憶の研究がやりたかったからだ, これが幸いした。海馬の抗体染色で, P450_{scc}, P450 (17 α), P450_{arom} (図 4 参照) が神経にきれいに局在していることを発見したが^{2), 3)}, 予想に反しグリアには少なかった。

PCR で性ホルモン合成に必要な他の酵素 (17 β -HSD など) をすべて見いだした^{2), 3), 5), 7)}。これらの発現量は, 性腺などと比べて 200 分の 1-5000 分の 1 と大変低かったが, 私はがっかりしなかった。なぜなら神経細胞は小さく, 海馬の体積は 0.1 mL 程度で血管体積 20 mL の 200 分の 1 程度である。全身にステロイドを配達する内分泌機構でなく, 海馬では地産地消なのでこれで十分のはずである。

³H-標識したステロイド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 精製して計測し, E2 合成経路を決定した。

さらに質量分析 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, 成獣オスラットの海馬での濃度は, T 約 17 nM, DHT 約 7 nM, E2 約 8 nM であった。血中より高い。

海馬における合成経路は, 精巣・卵巣の融合型であり, オスとメスの間で顕著な差が見られず, オスの脳でも E2 が, そしてメスの脳でも T, DHT が合成されるという面白い事実が見つかった。精巣・卵巣のような生殖機能の調節を担う部位と異なり, 海馬合成の性

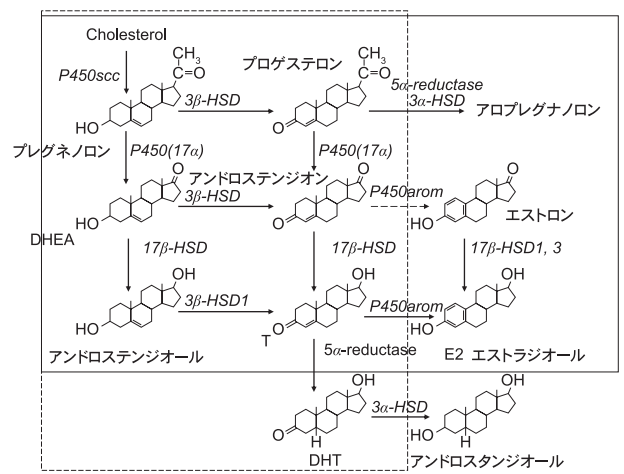


図 4 海馬神経での性ホルモンの合成経路と合成酵素 P450, 3 β -HSD, 17 β -HSD など. オス・メスともに精巣 (点線) + 卵巣 (実線) の融合型である。

ステロイドは性によらない神経伝達・神経可塑性の制御を行っているからではないかと考えている。さらに、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、シナプス後肥厚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)}。これはすなわち、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制御することが理解できる。

海馬におけるE2の合成については、われわれ以外にも、Rune教授(Hamburg大)が発達期の培養海馬スライスを使用して、海馬のE2産生がP450arom阻害剤の添加で24時間後に低下する事実から合成能を報告している⁷⁾。小脳のプルキンエ細胞に合成系があるという早稲田大・筒井の研究もある。しかし2000年以前は、神経ステロイドは神経ではなくグリアで合成されるという論文がほとんどであった。

以上のまとめを図5に示す。神経活動でCa²⁺がスパインに流入して、神経ステロイドの合成が起こる。コレステロールがミトコンドリアやミクロソームに移動し、図4に示した合成が起こる。合成されたE2はスパインにある受容体ER α やキナーゼを経て長期抑圧の強化やスパインの増加を引き起こす。これらは2時間程度で起こる。この他に細胞体では、核エストロゲン受容体を経由した1日かかるような遅い遺伝子転写作用も引き起こされる。

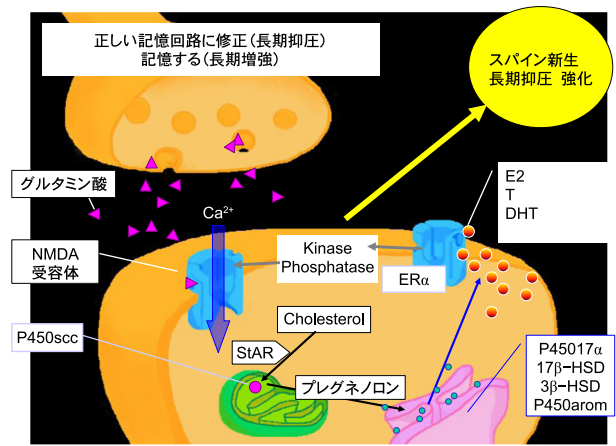


図5 海馬でのE2の合成と神経シナプス伝達のモジュレーションの機構。(電子ジャーナルではカラー)

考えられるので、他の神経栄養因子との比較も重要である。脳由来神経栄養因子BDNFとE2の比較研究は数多い。発生過程の作用で有名なアクチビン(性ホルモンの一種)が、海馬でも合成され、スパインを増加させることなどを見いだしており、これも新しい神経栄養因子である。神経栄養因子として期待されている蜂蜜のローヤルゼリーは、スパイン密度はまったく変化させずに、スパイン頭部を縮小させるという面白い力をもつこともわかってきた。

以上の研究は、向井・釣木澤・荻上・北條・村上・畑中・石井・肥後・大石・小松崎・木本の各博士が中心となって進めたものである。

4. 将来の展望

神経ステロイドの将来重要な研究テーマとして3つを挙げる。第一に、記憶中枢などで男性脳と女性脳には性差があるのでは?という未解決の大問題がある。空間学習や長期増強の大きさなどに確かに差があるが、脳内のE2, T, DHTの差で男性脳と女性脳の差が形成されるのであろうか? 第二に、神経ステロイドの一種であるストレスステロイドが重要な役割を果たす、ストレスの神経作用も重要な分野である。海馬はストレスステロイド受容体が多く、ストレスのセンサーでありかつ標的である。驚くべきことに急性ストレス(1時間のコルチコステロン作用)では海馬で大型スパインが増加することが見いだされた。これは試験や会議の発表などの場合の適度なストレスに相当する。このような場合、神経活動が抑制されず上昇することの説明になるのか。ストレスステロイドは生体時計の最終出力で、起床信号としての研究も発展している。第三に、神経ステロイドは新種の神経栄養因子と

文献

- 1) Le Goascogne, C. *et al.* (1987) *Science* **237**, 1212-1215.
- 2) Kawato, S. *et al.* (2002) *Methods Enzymol.* **357**, 241-249.
- 3) Hojo, Y. *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 865-870.
- 4) Baulieu, E. E., Robel, P. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4089-4091.
- 5) Mukai, H. *et al.* (2007) *J. Neurochem.* **100**, 950-967.
- 6) Liu, S. *et al.* (2003) *Anal. Chem.* **75**, 5835-5846.
- 7) Ishii, H. *et al.* (2007) *The Neuroscientists* **13**, 323-334.
- 8) Mukai, H. *et al.* (2011) *Cerebral Cortex*, in press Web online.



川戸 佳

川戸 佳(かわと すぐる)

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻教授
1974年京都大学理学部物理学科卒, 79年東京大学理学系大学院物理学専攻修了, 同年スイス・チューリッヒ工科大学生化学科助手, 82年科学技術振興機構研究員, 84年東京大学教養学部物理学教室助教授を経て, 92年より現職。

研究内容: 脳生物物理学, 記憶学習, 神経内分泌学
連絡先: 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

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

URL: <http://glia.c.u-tokyo.ac.jp>