

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06526

研究課題名(和文)海馬が合成する脳ステロイドによる記憶神経シナプスの早いモジュレーション機構

研究課題名(英文)Hippocampus-synthesized brain steroids rapidly modulate neuronal synapses and memory

研究代表者

川戸 佳 (Kawato, Suguru)

順天堂大学・医学部・客員教授

研究者番号：50169736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：海馬スライスの神経シナプスを超解像共焦点顕微鏡で画像解析することで、性ホルモンによる神経スパインの急性的でnon-genomicな増加の解析を行った。男性ホルモンT, DHT及び女性ホルモンE2, PROGをスライスに2時間作用させるとグルタミン酸神経のスパインが増加した。分子機構は「性ホルモンが神経スパイン内に存在する各々の膜上受容体AR, ER, PRに結合 → LIMK, MAPK, PKA, PKCなどの蛋白キナーゼのリン酸化 → cofilin やcortactinのリン酸化 → アクチン重合 → スパインが増加する」経路であることを発見した。CA1領域に加えDG領域でも調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳ステロイドの神経シナプスのモジュレータとしての研究は大進展している。我々の別の研究などと合わせて、海馬が自前で性ホルモンを局所合成して、その近傍の神経シナプスの急性的な増加作用を引き起こすという地産地消の概念が生まれた。これらのnon-genomic作用とステロイドのgenomicな古典的な作用は共存している。最近、膜受容体のみを欠損させnon-genomic作用のみを止めるマウスもできて、急性と慢性作用の違いや両者の相乗作用が必要であることもわかってきた。non-genomic作用は、世界の学会や論文でステロイドの基本的な作用として認識されて、欠かせない作用として評価されるようになった。

研究成果の概要(英文)：Sex-steroids rapidly and non-genomically modulated the dendritic spines in the rat hippocampus. We analyzed the molecular mechanisms of these modulations by using 3-dimensional super-resolution confocal microscopic imaging of neuronal synapses. Upon application of male hormones (T and DHT) and female hormones (E2, PROG) for 2 h, the density of dendritic spines were significantly increased. The signal pathways of these modulations were as follows: “binding of sex-steroids to their membrane steroid receptors AR, ER, PR in spines → phosphorylation of kinases such as LIMK, MAPK, PKA, PKC → phosphorylation of cofilin and cortactin → actin polymerization → spine increase”. These networks are working not only in CA1 region (spatial memory) but also in DG region (adult neurogenesis).

研究分野：神経内分泌学

キーワード：神経内分泌学 神経ステロイド 海馬 シナプス 記憶

## 1. 研究開始当初の背景

記憶中枢の海馬が自前で「コレステロール→プレグネロン→プロゲステロン→.....→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)]→女性ホルモン[エストロジオール(E2)] (雄雌で似た経路)」と合成を行っていることが明らかになったこともあり (Hojo et al., 2004)、男性・女性ホルモンの神経作用研究は過去 20 年間に着実に進展してきている。そして、記憶にかかわる神経シナプス可塑性を 1~2 時間の短時間で制御する分子機構の解析が世界中で進んできた。受容体の核移行→シナプス蛋白合成という 6 時間以上かかる古典的な経路とは別の、non-genomic な新しい経路が働いていることを証明する実験事実が多く、多くの研究室で集積されてきた。

## 2. 研究の目的

海馬において、男性ホルモン(T, DHT) と女性ホルモン(E2, PROG) が急性的で non-genomic に神経スパイン (=シナプス後部) の密度を増加させる神経成長因子として働いており、これが LIMK, MAPK をはじめとする kinase ネットワークを駆動する信号伝達系であることの全体像を明らかにする。特に (T, DHT) と (E2, PROG) の間の作用の違いを見出す。またこれ等の性ステロイドホルモンの急性作用を担う膜受容体の実体を明らかにする。これらのことから新しい神経ステロイド学を発展させる。

## 3. 研究の方法

ステロイドホルモン作用に非常に感度が良い、神経スパイン (後シナプス) の密度や形態を解析する測定を行い、シナプス受容体+kinase 信号伝達系を同定した。ラットから新鮮な海馬を取り出してスライスを作成する。このスライスと男性・女性ホルモンを人工脳脊髄液中で 2 時間インキュベーションするとスパインが増加する。この時に選択的タンパク質キナーゼ阻害剤を一緒に加えてインキュベーションすることで、スパインの増加が抑制されるかどうかで特定のタンパク質キナーゼが関与しているかどうかを判定することが出来る。また受容体の選択的阻害剤を一緒に加えてインキュベーションすることで、受容体の種類も特定できる。

神経シナプスを共焦点顕微鏡で 3 次元像を解析することで、性ホルモンによる神経スパインの急性 non-genomic な増減の解析を行った。通常の共焦点顕微鏡から進んで、超解像共焦点顕微鏡も用いて、スパインの輝度を 4 倍程度に上げて解像度を上げることが出来た。画像を撮るスピードも 5 倍程度に上げることで、蛍光退色を大きく防ぐことが出来た。スパインの 3 次元解析は Spiso-3D という数理解析ソフトを用いて行い、スパインの数だけでなく、その頭部直径を同定することで、記憶能力の高い large-head スパインと記憶能力の低い small-head スパイン、その中間の middle-head スパインを区別して解析できた。Spiso-3D は川戸研が科学技術振興機構のプロジェクトで開発したものであり、世界的に高く評価されている。

## 4. 研究成果

## 〈実験による成果〉

海馬スライスの神経シナプスを、超解像共焦点顕微鏡の3次元像から 数理解析ソフト Spiso-3D で解析し、性ホルモンによる神経スパインの急性的でnon-genomicな増減・制御の解析を行った。

(1) 海馬CA1の pyramidal neuron に対する研究結果で、テストステロン(T)、ジヒドロテストステロン(DHT) とエストラジオール(E2) は、全て、それぞれのシナプス受容体ARやER の下流にある、蛋白キナーゼ LIMK, MAPK, PKA, PKCなどを活性化していることが分かった。海馬スライスでの T (10 nM), DHT (10 nM) の2時間短期作用を調べて、「神経スパイン内にある男性ホルモン受容体ARへの結合 → LIMK, MAPK, PKA, PKC, Src kinase のリン酸化 →アクチン制御蛋白 (cofilinや cortactin) のリン酸化 → アクチン重合 → スパインが増加する」経路を発見した。以前から調べているE2 (1, 10 nM) の2時間短期作用では、「神経スパイン内にある女性ホルモン受容体ERへの結合 → LIMK, MAPK, PKA, PKC, Src kinase, PI3K のリン酸化 →アクチン制御蛋白 (cofilinや cortactin) のリン酸化 → アクチン重合 → スパインが増加する」経路をすでに見出している。

意外なことに、この経路で働いている kinase の種類としては、男性ホルモン(T, DHT)と女性ホルモン(E2)の差はあまりなかったのだが、例外として T, DHT 作用では、PI3Kが関与していないが、E2 作用ではPI3Kが関与していた。またDHT 作用では、大きな頭部のlarge-head スパインを増加させたが、それと異なり、E2作用では、small-head スパインが増加した。

(2) 早いnon-genomic 作用を担う膜上受容体 の分子の実体は30年以上もの長い間不明であった。ステロイドホルモンの慢性的な作用 (genomic 作用)を担う核受容体 AR (androgen receptor), ER (estrogen receptor) とは全く異なる新しい mAR, mER 受容体が存在するとして、多くの研究がなされてきた。しかしながら、mAR, mER の遺伝子の同定はいまだに成功していない。我々は、non-genomic 作用が AR, ER の阻害剤 (Flutamide, Tamoxifen, ICI) で止まること、また、non-genomic 作用が AR, ER のアゴニストやアンタゴニストに敏感に反応することを見出したことなどから、神経シナプスに存在する sAR, sER の存在を提唱してきた。金抗体電子顕微鏡解析からも sAR, sER が観測された (Mukai et al., 2007)。近年、AR, ERに palmitoyl group が結合してAR, ER が細胞膜に結合することが明らかにされてきて (Levin & Hammes, 2015, Nature. Rev.)、これが sAR, sER の実体であることがわかってきた。

(3) 蛋白キナーゼをこんなに多種類に渡って活性化するのか不思議であったので、他の有名な神経伝達物質に関しても蛋白キナーゼの活性化を調べた。海馬スライスCA1の神経に、cGMP分解酵素であるPDE5の阻害剤を作用させて、cGMP濃度を上昇させる系を調べた。PDE5阻害剤を作用させると2時間でシナプスが増加した。ところがこの信号系では LIMK, MAPK, PKA, PKCが全く働いておらず、cGMPは PKG のみを動かしていることが判明した。これは意外な結果だが、これによって、性ステロイドが多くの蛋白キナーゼを活性化するのは、かなり特別な仕組みであることがわかった。

(4) 女性ホルモンの一種であるプロゲステロン(PROG) に関しても、2時間短期作用を調べて、「PROG が神経スパイン内にある PROG の膜受容体 PR に結合 → LIMK, MAPK などのリ

ン酸化 →cofilin や cortactin のリン酸化→ アクチン重合→ スパインが増加する」経路が働いていることを発見した。

(5) 海馬で神経新生が起こる歯状回(DG) granule neuron に対して、男性・女性ホルモンがシナプスを増加させるかどうかは、CA1 pyramidal neuron に比べて非常に研究が少ない。DG では AR の発現がないという抗体染色結果と mRNA 発現結果があるので、DHT の効果は無いと考えても不思議ではないが、実は DHT で granule neuron のシナプスが増加した。これは AR が細胞体にはないが、神経シナプスには存在しているという新しい発見である。

(6) 神経シナプスの数理解析ソフト Spiso-3D は JST バイオ・インフォマティクス・プロジェクト(2007)で東大・川戸研で作成したものだが、川戸研の Home Page からダウンロードできるようにしてある。かなり人気があり、国内 15 大学・研究所、外国 10 大学程度の研究室が使用中である。

#### <国際共同研究と国際交流>

2017 年度から企画したイタリアとの電気生理学の共同研究として、Perugia Univ. の Prof. Tozzi, Prof. Pettorossi グループと一緒に書いた論文が *Frontier Neuroscience* に掲載された。グルタミン酸神経の 1 細胞内で E2 が長期増強 LTP を成立させ、DHT が LTP を抑制するという素晴らしい結果を証明できた。女性ホルモンと男性ホルモンが正反対の効果を示した。

2018 年には有名な北米神経学会大会に、米国の複数の教授と一緒に集団ポスターセッションを開催して、この分野の先端の問題を研究指導者が直接に議論できて大変有用であった。

この分野の教授等に勧められて、複数の Review Paper を執筆して、「記憶中枢の海馬が合成する男性・女性ホルモンの non-genomic な神経シナプス制御の研究」の進展を論文化した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 川戸 佳	4. 巻 13
2. 論文標題 中枢におけるテストステロンの産生と生理作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 泌尿器科	6. 最初と最後の頁 374-381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato A, Murakami G, Hojo Y, Horie S and Kawato S	4. 巻 1
2. 論文標題 Rapid effects of estradiol on dendritic spines and synaptic plasticity in the male and female hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oxford Univ. Press, ISBN: 9780190645908	6. 最初と最後の頁 38-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oso/9780190645908.003.0004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Gen, Kawato Suguru	4. 巻 144
2. 論文標題 Co-immunoprecipitation Methods to Identify Associated Proteins with Estrogen Receptor at Postsynaptic Density in Brain Tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuromethods	6. 最初と最後の頁 9-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8985-0_2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tozzi A, Durante V, Manca P, Di Mauro M, Blasi J, Grassi S, Calabresi P, Kawato S, Pettorossi VE	4. 巻 13
2. 論文標題 Bidirectional Synaptic Plasticity Is Driven by Sex Neurosteroids Targeting Estrogen and Androgen Receptors in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Cell Neuroscience	6. 最初と最後の頁 Article 534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00534. eCollection 2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitamura A, Hojo Y, Ikeda M, Karakawa S, Kuwahara T, Kim J, Soma M, Kawato S and Tsurugizawa T	4. 巻 29
2. 論文標題 Ingested D-aspartate facilitates the functional connectivity and modifies dendritic spine morphology in rat hippocampus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 2499-2508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhy120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川戸 佳	4. 巻 73
2. 論文標題 男性ホルモンと海馬認知機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床泌尿器科	6. 最初と最後の頁 44-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hojo Y and Kawato S	4. 巻 9
2. 論文標題 Neurosteroids in adult hippocampus of male and female rodents: biosynthesis and actions of sex steroids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 Article 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2018.00183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Soma M, Kim J, Kato A and Kawato S	4. 巻 12
2. 論文標題 Src kinase dependent rapid non-genomic modulation of hippocampal spinogenesis induced by androgen and estrogen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 Article 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2018.00282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ide H, Lu Y, Noguchi T, Muto S, Okada H, Kawato S and Horie S	4. 巻 109
2. 論文標題 Modulation of AKR1C2 by Curcumin Decreases Testosterone Production in Prostate Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1230-1238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川戸 佳	4. 巻 26
2. 論文標題 海馬を中心とした神経内分泌と抗加齢	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 腎泌尿器疾患予防医学研究会誌	6. 最初と最後の頁 10-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kawato S, Soma M and Ogiue-Ikeda M
2. 発表標題 Hippocampus-synthesized estrogen and androgen modulate dendritic spines and LTP in non-genomic manner
3. 学会等名 International Meeting of Steroids and Nervous System (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相馬ミカ、池田真理、川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川戸佳、相馬ミカ、池田真理、斎藤稔
2. 発表標題 海馬で合成される男性・女性ホルモンやストレスホルモンによる記憶シナプスの早い non-genomic な制御
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相馬ミカ、池田真理、川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川戸佳
2. 発表標題 男女で記憶中枢・海馬はどう異なるか？性ホルモンの立場から
3. 学会等名 第12回 性差医学・医療学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawato S
2. 発表標題 Hippocampus-synthesized estrogen and androgen modulate dendritic spines and LTP in non-genomic manner
3. 学会等名 6th International Symposium on Bioimaging（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬ミカ、池田真理、川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬ミカ、池田真理、川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬ミカ、池田真理、川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川戸佳
2. 発表標題 海馬を中心とした神経内分泌と抗加齢
3. 学会等名 泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬ミカ 川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第18回抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬ミカ 川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第18回Men's Health医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬ミカ 川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第41回神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬ミカ 川戸佳
2. 発表標題 海馬で合成される男性・女性ホルモンやストレスホルモンによる記憶シナプスのnon-genomicな制御
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬ミカ 川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第45回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M Soma, M Ikeda, S Kawato
2. 発表標題 Non-genomic modulation of synapses by hippocampus-synthesized androgen, estrogen and stress steroids
3. 学会等名 北米神経科学会 (Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬ミカ 川戸佳
2. 発表標題 脳海馬が合成する男性・女性ホルモンによる膜受容体を介した記憶シナプスの急性的制御
3. 学会等名 第27回海馬と高次脳機能学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://kawato-glia.sakura.ne.jp">http://kawato-glia.sakura.ne.jp</a> 川戸研究室HP
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------