

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370064

研究課題名（和文） 海馬の記憶シナプス可塑性の脳内ステロイドホルモンによる制御

研究課題名（英文） Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity by Brain Steroid Hormones

研究代表者 川戸 佳（KAWATO SUGURU）

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：50169736

研究成果の概要（和文）：

成獣ラットの脳の海馬において、女性ホルモンや男性ホルモンのみならず、コルチコステロン（ストレスステロイド）も独自に合成されることを発見した。質量分析で測定した女性・男性ホルモンは、海馬の方が血中の濃度よりかなり高かったため、海馬の女性ホルモンと男性ホルモンの方が、神経シナプスに及ぼす影響は大きいことが推測できた。海馬コルチコステロンは副腎の影響を排除するため副腎摘出ラットで測定した。海馬の神経シナプスをこれら性ステロイドやコルチコステロンがモジュレーションする様子を神経スパイン可視化解析と電気生理で解析した。1-10 nM の女性ホルモンや男性ホルモンは、双方ともに2時間で急性的にスパインを増加させることを見出した。この現象がシナプスに存在する受容体 ER α や AR を介して、MAPK, PKA, PKC などの蛋白キナーゼ系を駆動して起こること、を発見した。コルチコステロンは1時間程度でシナプスの長期増強を抑制するが、1 nM の女性ホルモンがこの抑制を無くして正常状態に戻す力を持つことを見出した。シナプスに存在する受容体 GR や ER α を介して MAPK などが働いていることがわかった。以上の結果を総合すると、脳海馬において女性ホルモン・男性ホルモンやストレスステロイドが合成され、これらが ER α や GR などの受容体を介して蛋白キナーゼ系を駆動し急性的に神経シナプス可塑性を制御することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated (1) hippocampal synthesis of estrogen, androgen, corticosterone, and (2) rapid synaptic modulation by these brain steroids. <Synthesis> We showed expression as well as neuronal/synaptic localization of essential enzymes (mRNA and protein) in the adult male rat hippocampus. Mass-spectrometric analysis demonstrated that exact levels of estradiol (E2), testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) were 8 nM, 18 nM and 7 nM, respectively, which were much higher than their levels in plasma. Male hippocampal levels of E2, and T were higher than those of female. Corticosterone level was 7 nM which was determined in the hippocampus of adrenalectomized rats. <Synaptic Modulation> Estradiol (E2)-induced rapid modulation (within 2 h) was demonstrated by analysis of spinogenesis and long-term potentiation (LTP) of adult male rat hippocampal slices. LTP analysis showed that 1 nM estradiol perfusion completely rescued the 1 μ M corticosterone-induced suppression of LTP. Synaptically localized ER α and GR are involved in these rapid effects. Analysis of dendritic spines was performed for single pyramidal neurons in

the hippocampal slices. The density of spines and their head diameters were obtained by mathematical and automated software Spiso-3D which identifies spines by calculating geometrical parameters. E2 at 1 nM rapidly increased the density of spines via pathways of synaptic ER α →PKA and PKC→ MAPK→ actin polymerization→ new spine. Both T and DHT also increased the density of spines. MAPK, PKA and PKC were also involved in these spinogenesis processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・生物物理学

キーワード： 脳神経系の情報処理、神経内分泌学

1. 研究開始当初の背景

これまでの神経内分泌学は伝統的に「視床下部→脳下垂体→性腺+副腎」軸で全てを説明しようとしてきた。内分泌器官から血液に乗って性ホルモン・ストレスホルモンが脳に到達し、神経作用を示す機構が信じられてきた。ところが、2002年から2008年までの一連の川戸研の先行研究により、この常識が覆されて、海馬などの高次脳機能を司る部位が自分自身で脳ステロイドホルモンを合成し働いていることがわかってきた。

2. 研究の目的

海馬が合成する男性・女性ステロイドホルモンを質量分析で定量的に解析し、血流から流入する性ステロイドと比較して、どちらが濃度が高いかを判定する。海馬がコルチコステロン（ストレスホルモン）も合成することを見出す。男性・女性ステロイドホルモンが海馬の神経シナプスに急性的に作用する分子機序を解析する。特にスパイン（=シナプス後部）の増減を制御する様子や、神経伝達効率を変動させる様子を解析する。

3. 研究の方法

海馬内のステロイド濃度を質量分析法で調べる。脳スライスの単一神経に蛍光色素インジェクションを行って共焦点像を解析して神経スパイン（シナプス後細胞）の密度や形態を解析する。多電極電気生理による長期抑圧と長期増強の測定を行い、神経伝達

効率を調べる。主に雄のラットを用いる。

4. 研究成果

（作用研究1：女性ホルモンによるスパインの増減）1個の神経にも数万個以上のスパインが存在するので、スパイン画像の2次微分係数を用いたアルゴリズムを使用した、世界的に全く新しい数理自動解析プログラム Spiso-3D を開発し、スパインの大量解析を行った (Mukai et al., 2011, cerebral Cortex)。1 nM エストラジオール（女性ホルモン）を海馬 CA1, DG 領域に2時間作用させると、急性的に神経スパインが増加した。small-head (0.2-0.4 μ m), middle-head (0.4-0.5 μ m), large-head (0.5-1.0 μ m) と分類すると、特に small-head スパインが増加した。選択的阻害剤を用いることで、スパイン増加が MAPK, PKA, PKC, PI3K 系で駆動されているという、信号伝達系もわかった。このスパイン増加作用は、エストラジオール補充療法による Alzheimer 型認知症（神経シナプスの減少）の改善機構の分子論的な根拠を与えるものである。エストラジオールは脳由来の神経スパインの成長因子であることがわかった。

（作用研究2：男性ホルモンによるスパインの増減）男性ホルモンであるテストステロンとジヒドロテストステロン(DHT) 10nM を海馬 CA1, CA3 領域に2時間作用させると、急性的に神経スパインが増加した。DHT は

large-head スパインを増加させたが、テストステロンは small-head スパインを増加させた。このように同じ男性ホルモンでも、作用に差があることを発見した。選択的阻害剤を用いることで、スパイン増加が MAPK, PKA, PKC 系で駆動されているという、信号伝達系もわかった。男性ホルモンは脳由来の神経スパインの成長因子であることがわかった。

(作用研究3: ストレスホルモンによるスパインの増減) コルチコステロン 10, 100, 200, 500, 1000 nM を海馬 CA1 領域に1時間作用させると、急性的に神経スパインが増加した。濃度が低い 10, 100, 200 nM では small-head, middle-head スパインを増加させた。濃度の高い 500, 1000nM では large-head スパインを増加させた。このように同じコルチコステロンでも、濃度依存的に作用に差があることを発見した。更に、このスパイン増加作用は、選択的阻害剤を用いることで、スパイン増加が MAPK, PKA, PKC 系で駆動されているという、信号伝達系もわかった。ストレスとは呼べない非常に濃度の低い 10, 100nM でコルチコステロンの作用を見つけたのは、Spiso-3D による、スパイン頭部直径の分布の詳細解析のおかげである。

(作用研究4: コルチコステロンによるシナプス伝達抑制をエストラジオールが救う) コルチコステロンは1時間程度でシナプスの長期増強 LTP を抑制するが、1 nM の女性ホルモンがこの抑制を無くして正常状態に戻してしまうことを発見した。シナプスに存在する受容体 GR や ER α を介した MAPK などが関与していることもわかった。この作用は古典的グルココルチコイド受容体 (GR) アンタゴニスト RU486 によって阻害されたことから、GR を介したものである。さらに、この CORT によって抑制された LTP は、エストラジオールを同時投与することによって回復した。エストラジオールの作用は MAPK 経路を介していることも阻害剤を添加することでわかった。これ等の早い作用を行うのは、シナプスに局在する GR や ER α であることを、電子顕微鏡による金抗体染色で見出した。

(合成研究1: 性ステロイド) 海馬のグルタミン酸神経には、性ステロイド合成系として、コレステロール→プレグネノロン→DHEA→テストステロン→DHT、及びテストステロン→エストラジオールを合成する酵素があることを、これまでの抗体染色と mRNA 解析で明らかにしてきた。今回は、picolinoyl 誘導体化を用いた、高感度の質量分析法を開発し、テストステロン(T), DHT, エストラジオール(E2) の濃度を、雄の海馬内と

血中で比較した。この3種類の性ステロイド全てにおいて、海馬内濃度(T=18 nM, DHT= 7 nM, E2=8 nM)が血中濃度より高いことを見出した。これは、血中からの性ホルモンよりも海馬が作る性ホルモンの方が、神経活動を制御する主役であることを意味するものである。雄の海馬内のエストラジオールは雌より7倍も多く、神経シナプス可塑性に大きな作用を及ぼしている。

(合成研究2: コルチコステロン) 過去20年以上誰も成功しなかったが、我々の努力で、コルチコステロンも(副腎皮質とは独立に)海馬のグルタミン酸神経が合成する、ことを証明できた。副腎皮質を摘出したラットの海馬で、質量分析により、約10 nM のコルチコステロンが存在することを発見したのである。また代謝実験で、「プレグネノロン→プロゲステロン→デオキシコルチコステロン(DOC)→コルチコステロン(CORT)経路」での合成を見出した。mRNA 解析と抗体染色を用いて、合成酵素「 β -HSD, P450(C21), P450(2D4), P450(11 β)」が海馬神経に存在することを見出した。特に世界的に脳には絶対存在しないと言われてきた P450(C21) (DOC 合成酵素) が神経に極少量存在することを、プライマーの設計を改善することで、発見した。高感度の免疫抗体電子顕微鏡でも P450(C21) がシナプスやミクロソームにあることを同定した。CORT 合成酵素の P450(11 β) もグルタミン酸神経のシナプスやミクロソームにあることを発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

2009年

Hojo Y., Higo S., Ishii H., Ooishi Y., Mukai H., Murakami G., Kominami T., Kimoto T., Honma S., Poirier D., and Kawato S. "Comparison between Hippocampus-Synthesized and Circulation-Derived Sex Steroids in the Hippocampus" *Endocrinology* (2009) 150, 5106-5112

Munetsuna E., Hattori M., Komatsu S., Sakimoto Y., Ishida A., Sakata S., Hojo Y., Kawato S., and Yamazaki T. "Social isolation stimulates hippocampal estradiol synthesis" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009) 379, 480-484

2010年

Mukai H., Kimoto T., Hojo Y., Kawato S., Murakami G., Higo S., Hatanaka Y., and Ogiue-Ikeda M. "Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus" *Special Issue in Biochim. Biophys. Acta* (2010) 1800, 1030-1044

Kimoto T., Ishii H., Higo S., Hojo Y., and Kawato S. "Semicomprehensive Analysis of the Postnatal Age-Related Changes in the mRNA Expression of Sex Steroidogenic Enzymes and Sex Steroid Receptors in the Male Rat Hippocampus" *Endocrinology* (2010) 151, 5795-5806

2011 年

Mukai H., Hatanaka Y., Mitsuhashi K., Hojo Y., Komatsuzaki Y., Sato R., Murakami G., Kimoto T., and Kawato S. "Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis" *Cerebral Cortex* (2011) 21:2704-11

Higo S., Hojo Y., Ishii H., Komatsuzaki Y., Ooishi Y., Murakami G., Mukai H., Yamazaki T., Nakahara D., Anna B, Kimoto T., and Kawato S. "Endogenous Synthesis of Corticosteroids in the Hippocampus" *PLoS ONE* (2011) 6:e21631

Hojo Y, Higo S, Kawato S., Hatanaka Y, Ooishi Y, Murakami G, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, and Kimoto T. "Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity" *Front Neuroendocrine Science* (2011) Vol 2, Article 43

Barron A, Hojo Y, Muka H, Higo S, Ooishi Y, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Murakami G, Kimoto T, Kawato S "Regulation of synaptic plasticity by hippocampus synthesised estradiol." *Horm Mol Biol Clin Invest* (2011) 7, 361-375

2012

Ooishi Y., Mukai H., Hojo Y., Murakami G., Hasegawa Y., Shindo T., Morrison JH., Kimoto T., and Kawato S. "Estradiol Rapidly Rescues Synaptic Transmission from Corticosterone-induced Suppression via

Synaptic/Extranuclear Steroid Receptors in the Hippocampus" *Cerebral Cortex* (2012) 22, 926-936

Komatsuzaki Y, Hatanaka Y, Murakami G, Mukai H, Hojo Y, Saito M, Kimoto T, Kawato S. "Corticosterone Induces Rapid Spinogenesis via Synaptic Glucocorticoid Receptors and Kinase Networks in Hippocampus" *PLoS ONE* (2012) 7: e34124

Tanabe N, Yoshino H, Kimoto T, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Shimohigashi Y, and Kawato S. "Nanomolar dose of bisphenol A rapidly modulates spinogenesis in adult hippocampal neurons" *Mol Cell Endocrinol.* (2012) 351, 317-25

Ooishi Y, Kawato S., Hojo Y, Hatanaka Y, Higo S, Murakami G, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Kimoto T, Mukai H "Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen" *J Steroid Biochem Mol Biol* (2012) 131, 37-51

[学会発表] (計 37 件)

[国際学会] 6 件

2009 年

S. KAWATO, H. MUKAI, Y. HOJO, Y. HATANAKA, S. HIGO, G. MURAKAMI, Y. OOISHI, T. KIMOTO, T. KOMINAMI "Rapid modulation of spines and LTD/LTP by estrogen and androgen in rat hippocampus: neuro-intracrinology" Society for Neuroscience, Annual Meeting, Chicago USA, Oct, 2009

Hojo Y, Higo S, Mukai H, Murakami G, Kominami S, Harada N, Honma S, Kimoto T, Kawato S "Neurosteroid synthesis and synaptocrinology in the hippocampal synapses" The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Jul. 2009

Mukai, H., Hatanaka, Y., Sato, R., Ooishi, Y., Ogiue-Ikeda, M., Hojo, Y., Kominami, S., Kawato, S "Rapid modulation of synaptic plasticity by hippocampal-derived sex-steroids" The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Jul. 2009

2010年

S. KAWATO, Y. HOJO, S. HIGO, R. SATO, H. MUKAI, G. MURAKAM "Synthesis of estrogen and androgen which rapidly modulate spines and LTD/LTP in the hippocampus" Society for Neuroscience, Annual Meeting, San Diego USA, Nov, 2010

2011年

S. KAWATO, Y. HOJO, Y. OOISHI, S. HIGO, H. MUKAI "Hippocampus-synthesized estrogen and androgen rapidly modulate LTP and dendritic spines" Society for Neuroscience, Annual Meeting, Washington USA, 2011

T. YAMAZAKI, M. YAMAMOTO, S. KOMATSU, M. ONIZAKI, S. KAWATO, T. MUKUDA, A. ISHIDA "Neuroprotective effect of hippocampus-synthesized estradiol against neurotoxicity of methylmercury" Society for Neuroscience, Annual Meeting, Washington USA, 2011

[国内学会] 31件

2009年

川戸佳 脳海馬 P450 による女性・男性ホルモン合成と女性ホルモン補充療法
日本生化学会 2009年10月 神戸

Hatanaka Y, Kimoto T, Kawato S
Androgens rapidly increased hippocampal dendritic spines and thorns via several kinases 日本神経科学会 2009年9月 名古屋

Komatsuzaki Y, Kasuya M, Hojo Y, Kawato S
Effect of corticosterone on dendritic spines in rat hippocampus 日本神経科学会 2009年9月 名古屋

Mukai H, Hatanaka Y, Tsurugizawa T, Asahsima M, Kawato S
Activin increases dendritic spines in the adult hippocampal neurons 日本神経科学会 2009年9月 名古屋

Higo S, Kominami T, Hojo Y, Kimoto T, Kawato S
Comparison of sex steroid synthesis between neonatal and adult rat hippocampus 日本神経科学会 2009年9月 名古屋

Hojo Y, Higo S, Kominami T, Mukai H, Yamazaki T, Harada N, Honma S, Kimoto T, Kawato S Neurosteroid synthesis and synaptocrinology in the hippocampal synapses. 日本神経科学会 2009年9月 名古屋

北條泰嗣、肥後新平、小南俊裕、向井秀夫、山崎岳、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳 「記憶・学習中枢海馬に性差はあるか」 日本生物物理学会年会 2009年10月 徳島

佐藤玲以、畑中悠佑、川戸佳 「女性ホルモンによる海馬神経スパイン制御機構」 日本生物物理学会 2009年10月 徳島

木本哲也、田島嵩大、北條泰嗣、佐藤玲以、川戸佳 「ラット海馬神経シナプス可塑性に対するビスフェノール A の低用量作用」 日本生物物理学会 2009年10月 徳島

畑中悠佑、木本哲也、川戸佳 「男性ホルモンによる海馬 CA1, CA3 スパインの急性的増加とその細胞内情報伝達経路の解析」 日本生物物理学会 2009年10月 徳島

川戸佳、大石悠貴 「女性ホルモンはストレスによる記憶書き込み阻害を回復させる：急性効果」 第47回 日本生物物理学会 2009年10月 徳島

向井秀夫、畑中悠佑、村上元、三橋賢司、川戸佳 「新規な神経スパインの解析手法とその適用」 日本生物物理学会 2009年10月 徳島

小松崎良将、粕谷昌寿、北條泰嗣、川戸佳 「ストレスホルモンが後シナプスに及ぼす急性効果」 日本生物物理学会 2009年10月 徳島

2010年

畑中悠佑、佐藤玲以、木本哲也、川戸佳 「男性ホルモンによる海馬スパインの急性的増加とその細胞内情報伝達経路の解析」 日本神経科学会 2010年9月 神戸

北條泰嗣、肥後心平、向井秀夫、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳 「オスラット海馬シナプスにおける性ホルモンの合成と局所分泌」 日本神経科学会 2010年9月 神戸

Mukai H, Hojo Y, Hatanaka Y, Mitsuhashi K, Asashima M, Kawato S Novel methods

and its applications for analysis of spines in neurons. 日本神経科学会 2010年9月 神戸

Higo S, Uebayashi M, Hojo Y, Kominami T, Kawato S Sex differences in the steroidogenic systems in the rat hippocampus. 日本神経科学会 2010年9月 神戸

Komatsuzaki Y, Kasuya M, Hojo Y, Kawato S Corticosterone induced rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptor and kinases in rat hippocampus 日本神経科学会 2010年9月 神戸

Sato R, Kawato S The acute effect of estrogen on the brain hippocampus 日本神経科学会 2010年9月 神戸

川戸佳 「脳の記憶学習とテストステロン」 Mens Health 学会 2010年11月 東京

Hatanaka Y, Sato S, Kimoto T, Kawato S 「Androgen rapidly increases the density of dendritic spines in the hippocampus via kinase pathways.」日本生物物理学会 2010年9月 仙台

Kimoto T, Sato S, Hatanaka Y, Mukai H, Kawato S 「Modulation of synaptic plasticity by estrogen and androgen in the hippocampus.」日本生物物理学会 2010年9月 仙台

北條泰嗣、肥後新平、小南俊裕、向井秀夫、山崎岳、原田信広、本間誠次郎、木本哲也、川戸佳「記憶・学習中枢海馬に性差はあるかその2」2010年9月 仙台

2011年

Hojo Y, Higo S, Mukai H, Harada N, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S Sex hormone synthesis and synaptocrinology in rat hippocampal synapses. 日本神経科学会 2011年9月 横浜

Kawato S Novel automatic analysis of the enhance effect by estrogen and androgen on the hippocampal spines. 日本神経科学会 2011年9月 横浜

Mukai H, Hatanaka Y, Mitsuhashi K, Hojo Y, Kawato S Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on hippocampal neurons. 日本神経科学会

2011年9月 横浜

Komatsuzaki Y, Hojo Y, Hatanaka Y, Murakami G, Mukai H, Kawato S Corticosterone induced rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptor and kinases in rat hippocampus. 日本神経科学会 2011年9月 横浜

Uebayashi M, Higo S, Hojo Y, Kominami T, Kawato S Sex differences in the steroidogenic systems in the rat hippocampus. 日本神経科学会 2011年9月 横浜

北條泰嗣、肥後心平、上林正修、向井秀夫、木本哲也、川戸佳「記憶・学習中枢海馬に性差はあるか?その3」日本生物物理学会 2011年9月 姫路

長谷川賢卓、川戸佳「オスは脳海馬で合成する女性ホルモンにより記憶力を高める」日本生物物理学会 2011年9月 姫路

芳野日南子、北條泰嗣、鍋嶋美貴、川戸佳「老化に伴う海馬神経シナプスの密度の減少」日本生物物理学会 2011年9月 姫路

〔その他〕
ホームページ等
<http://glia.c.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川戸佳 (KAWATO SUGURU)

東京大学大学院・総合文化研究科・教授

研究者番号： 50169736

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：