

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657098

研究課題名（和文）記憶中枢の海馬で♀と♂の性差を分子論的に明らかにする

研究課題名（英文）Molecular analysis of sex difference in the hippocampus, a center for learning and memory

研究代表者

川戸佳（KAWATO SUGURU）

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：50169736

研究成果の概要（和文）：記憶・学習中枢である海馬の性差解明を目的とし、雌は性周期毎に解析した。(1) 海馬内の性ステロイド濃度には明確な性差があった。海馬の女性ホルモンは、雄が、性周期変動をする雌より高かった。海馬の男性ホルモンも雄の濃度が高かった。しかし、雌で性周期変動をしなかった。(2) 性ステロイド合成酵素と受容体の mRNA 発現は、驚くべきことに性差も性周期に伴う変動も見られなかった。(3) 雌海馬神経スパインは性周期に伴って変動した。スパイン密度の変動は Pro→Est↓→D1↑→D2↓→Pro↑のように増大・減少を繰り返し、性差が存在した。雌では海馬内性ステロイドとスパイン密度の変動が一致していた。

研究成果の概要（英文）：The goal of the current study is elucidation of sex difference in the hippocampus, a center for learning and memory. (1) Concentration of sex hormones in the hippocampus exhibited clear sex difference. Hippocampal concentration of estradiol (E2), the most potent estrogen, was higher in male than that in female. Hippocampal E2 fluctuated across the estrous cycle. The concentration of hippocampal testosterone (T) was higher in male than female, which did not fluctuate. (2) Surprisingly, the expression level of the steroidogenic enzymes and receptors in the hippocampus exhibited neither sex difference nor fluctuation across the estrous cycle.

(3) The density of dendritic spines in female hippocampus fluctuated across the estrous cycle. The total spine density showed the maximum at Pro and D1, and the minimum at Est and D2 whereas the total spine density in male was as high as that in female at Pro or D1. The fluctuating pattern of spine density corresponded to that of hippocampal concentration of sex steroids. Taken together, there is clear sex difference in the hippocampus-synthesized sex hormones which play a crucial role in regulating the density of dendritic spines

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：海馬の性差、神経ステロイド、脳ステロイドの性差、記憶の性差、シナプスの性差

1. 研究開始当初の背景

従来、神経の数に明確な性差がある生殖中

枢（視床下部）と異なり、記憶中枢の海馬など脳の高次脳機能にはほとんど性差がない

といわれている。しかし、空間学習では♂の方が♀より成績が良い・シナプス長期増強は♂の方が♀より大きいなどの海馬機能の性差は報告されている。しかしこの差が何に起因しているのかは説明できない、というのが世界の常識である。

これまでの定説では、血中の男性・女性ホルモンの性差が原因だとしていた。男性・女性ホルモンは、記憶学習の中核である海馬に強く作用することが知られているが、これらの性ホルモンは精巣・卵巣で合成され血流に乗って脳に運ばれ作用するものが全てだと信じられてきた。

一方、我々は脳でも性ホルモンが合成されるべきであると信じて、2000年以降の一連の研究で、♂成獣(3ヶ月齢)で性ホルモンの海馬内での合成をついに証明した。海馬神経系自身がコレステロールから、男性ホルモンであるテストステロン(T)とジヒドロテストステロン(DHT)を、女性ホルモンであるプロゲステロン(PROG)やエストラジオール(E2)を合成していた(Hojo et al., 2004, PNAS)。更に海馬の方が血中より性ホルモン濃度がずっと高いことも見出し(Hojo et al., 2009, Endocrinology)、これは海馬の性ホルモンこそが主役であることを示している。

この雄で得られた結果から、海馬の性差の原因は、血中のホルモンよりも、むしろ、海馬自身が合成する性ホルモンにあると予想される。しかし、脳内のホルモン濃度を精度よく決定できる技術がこれまでなかったために、この重要な問題の研究が進んでこなかった。

2. 研究の目的

本研究では早海馬での性ホルモン合成を明らかにする。♀は Proestrus(卵胞期)→ Estrus(排卵期)→ Diestrus1(黄体期 1)→ Diestrus2(黄体期 2)の順に四日の性周期をもち、血中の性ホルモンもこれに伴い変動する。本研究では早の海馬で、体の性周期に対応して、女性ホルモン PROG, E2, E1 (E1=エストロン)と男性ホルモン T が変動するかどうか解析する。性ホルモン合成酵素 [P450(17 α), 17 β -HSD, 3 β -HSD, P450arom] の mRNA 発現量が性周期に対応して変動するかどうか解析する。女性ホルモン受容体 [ER α (E2 受容体), ER β (E2 受容体), PR(PROG 受容体)] や男性ホルモン受容体 AR の mRNA 発現量の変動も解析する。これらの測定から、もし早海馬に性周期のような変動があるとすれば、これは♂とは決定的に異なることの証拠になる。もちろん♂♀の海馬での性ホルモン濃度や mRNA 発現量の比較も行う。これ等のことから、♂♀の海馬の性差を決定する要因は何かを導き出す。

3. 研究の方法

雌ラットは膣スメア法により性周期を判定して、4つの性周期ステージに分けて実験し、性周期変動があるか否か、性差はあるか否かを以下の項目について解析した。また、卵巣摘出(OVX)を行い、血中からの性ホルモンの寄与をなくした場合の解析も行った。

(1) 海馬の性ホルモン濃度の定量：あすか製薬メディカル社本間取締役グループとの共同研究で5年間かかって確立した超高感度で厳密な分析システムを用いて、「C18 カラムによる粗生成→順相 HPLC 精製→ピコリノイル誘導体化→逆相 HPLC 分離と MS/MS 質量分析」を行って、海馬の E2, PROG, E1, T を測定した。

(2) 海馬組織から mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、性ホルモン合成酵素 [P450(17 α), 17 β -HSD, 3 β -HSD, P450arom]、および、女性ホルモン受容体 [ER α (E2 受容体), ER β (E2 受容体), PR(PROG 受容体)] の発現量の性周期変動・性差を解析した。海馬組織に含まれるこれらの mRNA は、卵巣などの生殖器官に比べると数百～数千分の一と微量なため、熱力学的な計算から特異性の高いプライマーを設計して検出に用いた。

(3) シナプスの性差と性周期変動の解析：各性周期ステージの雌ラットと雄ラットを PFA で灌流固定した後、海馬スライス(400 μ m 厚)を調製した。スライス内の単一神経細胞に Lucifer-Yellow 蛍光色素のインジェクションを行って樹状突起スパインを可視化し、共焦点顕微鏡で3次元像を取得後に解析した。この際、我々が開発した数理的スパイン解析プログラム Spiso-3D (JST, Bioinformatics project) を使用した。これにより、100 nm 刻みでスパインの直径の分布を明らかにすることが可能となった。

4. 研究成果

(1) 海馬の性ホルモンの性差と性周期変動：

(A) PROG：海馬の PROG は、雄(14 nM)に対して、雌(40–90 nM)と雌のほうが高かった。性周期に伴う変動も示し、D1 で最大値を取り、Pro で小さなピークがある。この変動パターンは血中とほぼ同じであった。PROG では、海馬は血中のほぼ2倍の濃度であり、「海馬の PROG = 性周期変動する血中 PROG + 海馬自身で合成する PROG (ほぼ一定)」と表せる。OVXにより25 nMまで低下した。

(B) E2, E1：女性ホルモン E2 は、雄(8.4 nM)が雌(0.5–4.3 nM)より高かった。雌の海馬では、E2 は Pro で最大値 4.3 nM、D1 で最低値 0.5 nM であった。E2 の前駆体 E1 は Pro で最大値 0.45 nM、Est と D1 で最低値 0.05 nM であった。雄では E1 はほと

んど存在しない。E2 と E1 の変動は血中の変動パターンと似ているが、海馬の濃度が圧倒的に高かった(E2 は血中の 40—100 倍)ので、E2 は海馬で合成されて性周期変動を起こしている。OVX により、海馬 E2, E1 はそれぞれ、0.7 nM, 0.025 nM まで低下したが、正常時の血中 E2 より高い濃度である。

(C) T : 海馬の男性ホルモン T は、雄は 17 nM で雌は 1-2 nM であり雄の濃度が高かった。T は雌で性周期変動をしなかった。

(2) ステロイド合成酵素・受容体の発現解析 :

海馬の性ホルモンが明確な性差と性周期変動を示したのに対して、性ホルモン合成酵素 [P450(17 α), 17 β -HSD, 3 β -HSD, P450arom]、および、女性ホルモン受容体 [ER α (E2 受容体), ER β (E2 受容体), PR(PROG 受容体)]の発現量は、驚くべきことに、性差も性周期変動も示さなかった。OVX の影響もなかった。

海馬のステロイド合成能は性別・性周期ステージに依存せず、ほぼ一定とみなせる。従って性周期に伴う海馬 E2 の変動は、血中の変動する PROG を基質として海馬内で生成されたものと考えられる。

(3) スパインの性差と性周期変動 :

スパイン密度の変動は Pro \rightarrow Est \downarrow \rightarrow D1 \uparrow \rightarrow D2 \downarrow \rightarrow Pro \uparrow のように増大・減少を繰り返した。雄のスパイン密度は雌の Pro と D1 とほぼ同じであった。このように明確な性差が存在した。この変動パターンは血中の E2 変動では説明できない。第一に D1 でのスパイン密度の上昇が説明できない。第二に、Pro でのスパイン密度上昇についても、E2 がスパインに影響を及ぼすには 1 nM 以上の濃度が必要であることがわかっている(Mukai et al., 2007, J Neurochem)。ところが、血中の E2 濃度は最大でも Pro の 0.1 nM にしかならない。これに対して海馬 E2 は Pro で 4.3 nM に達し、それ以外では 1nM を下回る。また、D1 では、PROG が最大となるので、海馬の PROG がスパイン密度の上昇を引き起こしていると考えられる。このように、雌海馬の性ホルモンの性周期変動を用いると、海馬スパインの性周期変動が無理なく説明できる。

本研究は社会的意義も高い。更年期において発生するアルツハイマー病(海馬が発症部位)を、女性ホルモン補充療法で治すことができることが、世界的に 20 万人以上の大規模臨床試験で実証されてきた。この理由を究明する為に、過去 20 年にわたり多くの基礎研究が行われてきたが、雌海馬の生理周期などの状況がわかると、脳への女性ホルモン補充の意味をはっきりと理解できるし、補充すべき女性ホルモン濃度など、現在不明なこと

もわかるようになるかと期待される。

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 12 件)

①Hasegawa Y, Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Kimoto T, Hojo Y, Yamazaki T, Kawato S. Bisphenol A significantly modulates long-term depression in the hippocampus as observed by multielectrode system. Neuroendocrinol. Lett., 査読:有, 34(2), 2013, 129-34.

②Yamazaki T, Yamamoto M, Ishihara Y, Komatsu S, Munetsuna E, Onizaki M, Ishida A, Kawato S, Mukuda T. De novo synthesized estradiol protects against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal slices. PLoS ONE, 査読:有, 8(2), 2013, e55559, 10.1371/journal.pone.0055559.

③Okamoto M, Hojo Y, Inoue K, Matsui T, Kawato S, McEwen B, Soya H. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. PNAS 査読:有, 109, 2012, 13100-13105, 10.1073/pnas.1210023109

④Komatsuzaki 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, 査読:有, 7(4), 2012, e34124, 10.1371/journal.pone.0034124

⑤Tanabe 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, 査読:有, 351, 2012, 317-325, 10.1016/j.mce.2012.01.008

⑥Hojo Y, Higo S, Kawato S, Hatanaka Y, Ooishi Y, Murakami G, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Kimoto T. Hippocampal synthesis of sex steroids and

corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity.

Front Neuroendocrine Sci, 査読: 有, Article 43, 2011, 10.3389/fendo.2011.00043

⑦ 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, 査読: 有, 7(2), 2011, 361-375, 10.1515/hmbci.2011.118

⑧ 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, 査読: 有, 10.1016/j.jsbmb.2011.10.004

⑨ Higo S, Hojo Y, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ooishi Y, Murakami G, Mukai H, Yamazaki T, Nakahara D, Anna B, Kimoto T, Kawato S.

Endogenous Synthesis of Corticosteroids in the Hippocampus.

PLoS ONE, 査読: 有, 6(7), 2011, e21631, 10.1371/journal.pone.0021631

⑩ Ooishi Y, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Hasegawa Y, Shindo T, Morrison JH, Kimoto T, Kawato S

Estradiol Rapidly Rescues Synaptic Transmission from Corticosterone-induced Suppression via Synaptic/Extranuclear Steroid Receptors in the Hippocampus.

Cereb Cortex, 査読: 有, 22(4), 2011, 926-936, 10.1093/cercor/bhr164

⑪ Mukai H, Hatanaka Y, Mitsunashi K, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Sato R, Murakami G, Kimoto T, Kawato S

Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis.

Cereb Cortex, 査読の有無: 有, 21(12), 2011, 2704-2711, 10.1093/cercor/bhr059

⑫ Osanai H, Suzuki A, Komatsuzaki Y, Mukai H, Kawato S, Saito M

The binding site for acute corticosterone effects on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ signals in mouse hippocampal slices.

J. Biophys. Chem., 査読の有無: 有, 2, 2011, 430-433, 10.4236/jbpc.2011.24050

[学会発表] (計 26 件)

(1) 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, New Orleans USA, 2012

(2) 李香蓮, 芳野日南子, 木本哲也, 粟生修司, 川戸佳

ビスフェノール A の周生期曝露は成獣雄雌の海馬神経シナプスを変動させる

日本内分泌攪乱化学物質学会 第15回研究発表会, 2012年12月19日, 東京大学山上会館 (東京都、文京区)

(3) 木本 哲也, 若林 正彦, 川戸 佳

海馬での年齢依存的な性ホルモン受容体・合成酵素遺伝子の発現変動解析

第50回日本生物物理学会年会, 2012年09月24日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、名古屋市)

(4) 長谷川賢卓, 向井秀夫, 浅島誠, 大石悠貴, 川戸 佳

海馬でのアクチビンによるシナプス可塑性の急性制御

第50回日本生物物理学会年会, 2012年09月24日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、名古屋市)

(5) 北條 泰嗣, 若林 正彦, 吉田 広太郎, 木本 哲也, 川戸 佳

記憶・学習中枢海馬の性差は海馬で合成されるホルモンによるものである

第50回日本生物物理学会年会, 2012年09月24日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、名古屋市)

(6) 小松崎良将, 粕谷昌寿, 北條 泰嗣, 川戸 佳

コルチコステロンは、シナプス局在のGR-kinase系を介して、海馬神経シナプスを増やす

第50回日本生物物理学会年会, 2012年09月24日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、名古屋市)

(7) 向井秀夫, 畑中悠佑, 三橋賢司, 村上元, 北條泰嗣, 川戸 佳

新規なスパイン解析プログラム

第50回日本生物物理学会年会, 2012年09月24日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、名古屋市)

(8)川戸佳, 李香蓮, 北條泰嗣
老化に伴う海馬神経シナプスの密度の減少と記憶の劣化

第50回日本生物物理学会年会, 2012年09月24日, 名古屋大学 東山キャンパス (愛知県、名古屋市)

(9)川戸佳

老化による脳の性ステロイドの減少が海馬神経シナプスを減少させる

第35回日本神経科学大会, 2012年09月19日, 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

(10) 大石悠貴, 向井 秀夫, 渡辺謙, 川戸 佳
音楽のテンポが人の内分泌系に及ぼす効果

第35回日本神経科学大会, 2012年09月19日, 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

(11)Hasegawa Y, Mukai H, Asashima M, Ooishi Y, Kawato S

Acute modulation of synaptic plasticity of pyramidal neurons by activin in adult hippocampus.

第35回日本神経科学大会, 2012年09月20日, 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

(12)北條 泰嗣, 向井 秀夫, 若林 正彦, 吉田 広太郎, 山崎 岳, 木本 哲也, 川戸 佳
ラット海馬シナプスにおけるステロイドの合成とその作用

第35回日本神経科学大会, 2012年09月19日, 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

(13)若林正彦, 北條泰嗣, 肥後心平, 川戸 佳
海馬の神経シナプスを制御する性ステロイド合成と受容体に性差はあるか

第35回日本神経科学大会, 2012年09月19日, 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

(14)小松崎良将, 北條 泰嗣, 畑中悠佑, 向井 秀夫, 村上元, 川戸 佳

コルチコステロンは急性的に海馬のスパイン新生を引き起こす

第35回日本神経科学大会, 2012年09月21日, 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

(15)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

(16)若林正彦, 芳野日南子, 木本哲也, 栗生 修司, 川戸佳

ビスフェノール A の周生期曝露は成獣雄雌

の海馬神経シナプスを変動させる。

第14回 日本内分泌攪乱化学物質学会 第14回研究発表会, 2011年12月2日, 東京大学山上海館 (東京都、文京区)

(17)北條泰嗣, 川戸佳

記憶・学習中枢海馬が合成する男性・女性ホルモンとその作用

第82回 日本動物学会大会, 2011年9月21日, 旭川市大雪クリスタルホール (北海道、旭川市)

(18)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
第49回 日本生物物理学会年会, 2011年9月18日, 兵庫県立大学 (兵庫県、姫路市)

(19)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

第49回 日本生物物理学会年会, 2011年9月18日, 兵庫県立大学 (兵庫県、姫路市)

(20)小野島匠, 手崎碧, 菊池歩, 川戸佳, 太田善浩

シナプス小胞分極におけるミトコンドリアの役割

第49回 日本生物物理学会年会, 2011年9月18日, 兵庫県立大学 (兵庫県、姫路市)

(21)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

第49回 日本生物物理学会年会, 2011年9月18日, 兵庫県立大学 (兵庫県、姫路市)

(22)Hojo Y, Higo S, Mukai H, Harada N, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S

Sex hormone synthesis and synaptocrinology in rat hippocampal synapses.

第34回 日本神経科学大会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

(23)Uebayashi M, Higo S, Hojo Y, Kominami T, Kawato S

Sex differences in the steroidogenic systems in the rat hippocampus.

第34回 日本神経科学大会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

(24)Mukai H, Hatanaka Y, Mitsunashi 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.

第 34 回 日本神経科学大会, 2011 年 9 年 16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

(25)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.

第 34 回 日本神経科学大会, 2011 年 9 年 16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

(26)Kawato S

Novel automatic analysis of the enhance effect by estrogen and androgen on the hippocampus spines.

第 34 回 日本神経科学大会, 2011 年 9 年 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

[その他]

ホームページ等

東京大学川戸研究室

<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・総合文化研究科・教授

研究者番号 : 5 0 1 6 9 7 3 6

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :