

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26430006

研究課題名(和文) 海馬が合成する脳ステロイドは神経シナプスでの記憶学習の強力なモジュレータ

研究課題名(英文) Hippocampus-synthesized brain steroids are strong modulators of 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) 4,100,000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 を海馬スライスに2時間作用させてグルタミン酸神経のスパインが増加した。その分子機構は「性ホルモンが神経スパイン内に存在する各々の古典的受容体に結合 → LIMKや MAPK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。電気生理実験からE2が長期増強を成立させるnon-genomic経路を発見した。

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 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 “binding of sex-steroids to their classic steroid receptors in spines → phosphorylation of kinases such as LIMK and MAPK → phosphorylation of cofilin and cortactin → actin polymerization → spine increase”. From electrophysiological investigations, nongenomic pathway of E2-induced long-term potentiation was also found.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：神経内分泌学 脳ステロイド 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→プレグネノロン→プロゲステロン(PROG).....→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[エストラジオール(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、男性・女性ホルモンの神経作用研究は過去 10 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明の期待が世界的に高まってきた。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以外の、non-genomic な新しい経路が働いていることを解明する努力が多くの研究室で続いてきた。

2. 研究の目的

(1) T, DHT, E2, PROG が急性的に神経スパイン (=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き、kinase ネットワークを駆動する信号伝達系を明らかにする。

(2) E2, DHT が急性的にシナプス長期増強 LTP を制御する仕組みが、「E2 のシナプス受容体 kinase NMDA 受容体活性化 LTP 成立するか?」DHT と E2 の相互作用で LTP はどうなるか? という信号伝達経路など、実時間で制御している分子機構を解明する。

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方法や、多電極電気生理によ

る長期増強 LTP の測定を行い、シナプス受容体 + kinase 信号伝達系を同定した。(1) 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。(2) 海馬スライスに対して、電気刺激の場所や計測場所をうまく選べる多電極電気生理法を用いて、長期増強 LTP の測定を行った。E2 と DHT の灌流と同時に、選択的タンパク質キナーゼ阻害剤を一緒に還流することで、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。電気刺激は弱いシータバースト法(weak-TBS)を用いた。weak-TBS のみでは LTP は成立しないが、ここに E2 を還流

すると LTP (E2-LTP)が成立する、という条件を設定した。

4 . 研究成果

(1) 海馬スライスの CA1 領域 (空間記憶にかかわる) のグルタミン酸神経において、E2, PROG, T, DHT のスパイン増加作用の分子メカニズムを特定した。

(1A) 強い女性ホルモンである E2 (1 nM) の 2 時間の短期作用を調べて、「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 などのタンパク質キナーゼのリン酸化 → 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」であることを発見した。ここで LIMK は LIM kinase であり、MAPK Erk/MAP kinase のことである。LIMK のリン酸化は cofilin (アクチン制御蛋白) のリン酸化を引き起こす。MAPK のリン酸化は cortactin (アクチン制御蛋白) のリン酸化を引き起こす。この他に PKA, PKC, p38MAPK, PI3K などの kinase の関与も見出した。

(1B) 女性ホルモンの一種である PROG (100 nM) の 2 時間短期作用を調べて、「PROG が神経スパイン内にある PROG 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。

(1C) 海馬スライスでの男性ホルモン 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 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。この他に PKA, PKC, p38MAPK などの kinase の関与も見出した。E2 と異なり PI3K は関与していな

かった。T と DHT を比べると、DHT の方が太いスパインを増加させた。

(1D) スパイン内の膜に結合した古典的受容体 (ER, PR, AR) を介していること、(1E) 以上のような男性・女性ホルモンの神経スパイン作用を比較して、その全てが (シナプス可塑性に関与することが知られている) LIMK, MAPK などのリン酸化酵素を稼働させて、スパイン増加を引き起こすという、non-genomic 作用の一般的な仕組みを解明したといえる。

以上の仕事は、Brain Research (2015) の招待論文として Special Issue "Brain and Memory" に掲載された (Impact Factor は 8 程度と高い)。Hormones and Behavior (2015) の Special Issue "Estradiol and Cognition"にも掲載された。

(2) 多電極電気生理法を海馬スライス CA1 領域に適用してシナプス伝達を測定した。

(2A) 弱いシータバースト (weak-TBS) のみでは LTP は成立しないが、ここに E2 (10 nM) を還流すると LTP (E2-LTP) が成立する、という条件を設定した。女性ホルモン受容体 ERalpha が関与していることが、アゴニスト PPT を還流して LTP が成立することで見出した。また E2 の灌流と同時にアンタゴニスト ICI を還流すると LTP は成立しなかった。

(2B) E2 の灌流と同時に、MAPK 阻害剤と一緒に還流すると weak-TBS 刺激でも E2-LTP は成立しなかった。PKA, PKC の阻害剤の同時灌流でも E2-LTP は成立しなかった。

(2C) E2 と同時に、NMDA 型グルタミン酸受容体の NR2B サブユニットのアンタゴニストを同時灌流すると E2-LTP は成立しなかった。

(2D) E2 と同時に、CaMKII の阻害剤を同時灌流すると E2-LTP は成立しなかった。

(2E) これらを総合すると、「神経スパイン内にある女性ホルモン受容体 ERalpha への E2

の結合 → PKA, PKC のリン酸化
MAPK のリン酸化 → NMDA 受容体のリン酸化 → スパインへの Ca 流入が増し CaMKII の活性化 AMPA 受容体のリン酸化 LTP の成立」という新しい信号経路を発見したことになる。

(2F) E2 の灌流と同時に、男性ホルモン DHT を同時灌流すると、DHT と E2 の濃度が同じだと E2-LTP が抑えられた。E2 が DHT の 3 倍だと E2-LTP は成立したので、DHT の抑制効果の発揮には E2 との濃度比が重要である。脱リン酸化酵素の阻害で DHT の E2-LTP 抑制効果は消失したので、DHT は脱リン酸化酵素を活性化していることがわかった。

(2G) 強いシータバースト full-TBS で刺激すると E2 灌流なしでも LTP が成立する。この条件で E2 を合成する酵素 P450arom を 30 分間阻害すると、LTP が抑制されることを見出した。しかしここに E2 を灌流しておくと、LTP は阻害されない。これはスライス中で 30 分程度の早い E2 合成が起きていることを示しており、驚くべきことである。

以上の仕事は、Brain Research (2015) の招待論文として Special Issue "Brain and Memory" に掲載された。

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 10 件)

Hasegawa Y, Hojo Y, Kojima H, Ikeda M, Hotta K, Sato R, Yoshiya M, Chung BC, Ooishi Y, and Kawato S
Estradiol Rapidly Modulates Synaptic Plasticity of Hippocampal Neurons: Involvement of Kinase Networks
Brain Res, 査読:有 1621, 2015, 147-161, 10.1016/j.brainres.2014.12.056

Hatanaka Y, Hojo Y, Mukai H, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kim J, Ikeda M, Hiragushi A, Kimoto T, and Kawato S
Rapid increase of spines by

dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons
Brain Res, 査読:有 1621, 2015, 121-132, 10.1016/j.brainres.2014.12.011

Murakami G, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Chambon P, Nakajima K, Ooishi Y, Kimoto T and Kawato S
Estrogen Receptor KO Mice Study on Rapid Modulation of Spines and Long-term Depression in the Hippocampus
Brain Res, 査読:有 1621, 2015, 133-146, 10.1016/j.brainres.2014.12.002

Hojo Y, Munetomo A, Mukai H, Ikeda M, Sato R, Hatanaka Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kimoto T and Kawato S
Estradiol Rapidly Modulates Spinogenesis in Hippocampal Dentate Gyrus: Involvement of Kinase Networks
Hormones and Behavior, 査読:有 74, 2015, 149-156, 10.1016/j.yhbeh.2015.06.008

Ikeda M, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Okamoto M, Kato A, Takeda T and Kawato S
Hippocampal spine change along the sleep-wake cycle: corticosterone and kinases
J. Endocrinol, 査読:有 226, 2015, M13-M27, 10.1530/JOE-15-0078

〔学会発表〕(計 16 件)

第 16 回 抗加齢医学会総会 招待講演
川戸佳
発表題目: テストステロンの中枢神経への作用
2016 年 6 月 11 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

第 16 回 Men's Health 医学会 招待講演
川戸佳
脳内における性ホルモン作用、雄と雌の差
2016 年 7 月 9 日 札幌医科大学記念ホール (北海道札幌市)

国際内分泌学会 17th International Congress of Endocrinology 招待講演
Estrogen rapidly modulates spinogenesis in the hippocampus
2016 年 9 月 2 日 北京市・中華人民共和国

生化学会 招待講演 川戸佳
脳海馬が作る男性・女性ホルモンは記憶神経を早く・うまく制御している
2015 年 12 月 4 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

日本抗加齢医学会総会 招待講演 川戸佳

テストステロンは脳海馬の記憶神経を活性化する

2014年6月7日 大阪国際会議場（大阪）

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://kawato-glia.sakura.ne.jp/>

6．研究組織

(1)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

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし