

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：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700369

研究課題名（和文）急性ストレスの分子メカニズムを海馬神経スパインを可視化して解明する

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of acute stress by visualization of dendritic spines in the hippocampus.

研究代表者

北條泰嗣（HOJO YASUSHI）

東京大学・総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：20536875

研究成果の概要（和文）：

(1) 一時間程度の急性ストレスによるスパイン増加の分子メカニズムは、コルチコステロン（CORT）→シナプスに局在する GR→Erk MAPK, PKA, PKC, PI3K→アクチン重合→スパイン増加・頭部肥大 であることを解明した。これは、CORT の慢性ストレス作用、CORT→GR→核移行→遺伝子転写→タンパク合成という経路とは全く異なる。

(2) 副腎摘出ラットを用いて、海馬自身が合成する CORT の定量に成功し、質量分析から 7 nM という値を得た。この低濃度の CORT は、ストレス抑圧とは異なり、神経栄養因子の機能を持つ。

研究成果の概要（英文）：

(1) We revealed that the molecular mechanism of spinogenesis induced by acute stress is “CORT→GR→Erk MAPK, PKA, PKC, PI3K→actin polymerization or rearrangement → spinogenesis and enlargement of spine head diameter”, which is completely different from chronic stress effect with gene transcription.

(2) We determined the concentration of hippocampus-synthesized CORT as 7 nM by using adrenalectomized rats and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Surprisingly, low dose CORT (~10 nM) induced spinogenesis, suggesting that low dose CORT may have a neurotrophic effect whereas high dose CORT (~1 μM) under stressful condition has deleterious effects.

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	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：海馬、記憶学習、急性ストレス、シナプス、スパイン、ストレスホルモン、コルチコステロン

1. 研究開始当初の背景

長期間（3週間以上）にわたる慢性的なストレスは、神経細胞の委縮や樹状突起の分岐を減らすなど、神経系にダメージを及ぼす。このような症状は、うつ病などに対応すると考えられている。また、その分子メカニズムは「ストレスホルモン(corticosterone:CORT)

→ 受容体 (glucocorticoid receptor: GR) → 核移行 → 遺伝子転写制御」とよくわかっている。これに対して、一時間程度の急性ストレスでは、樹状突起の分岐の減少などの劇的な変化は起こらない。もっと微細なシナプスの構造変化が起こっていると思われるのだが、シナプスの観察が困難なため研究が進ん

でこなかった。急性ストレスの影響を調べるためにラット海馬に 1 μ M CORT (急性ストレス時の血中濃度に対応)を1時間作用させると、神経スパインが増加し、その頭部が大きくなるという驚くべき現象を私は発見した。頭部の大きなスパインは情報伝達効率が高いので、これは、急性ストレスで神経活動が上昇しうることを示唆する。しかし、どのような分子メカニズムでこの現象が起こるのかは全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、急性ストレスによるスパインの増加現象の分子メカニズムを明らかにすることを第一の目的とした。慢性ストレスとは逆に、急性ストレスはスパインの数を増やして神経活動を上昇させるので、全く異なる分子カスケードが関与していると予想される。本研究では、遺伝子転写を伴わないリン酸化酵素のカスケードが、急性ストレスによるスパイン増加を引き起こしているかと予想した。

また、我々の一連の研究により、内分泌学の常識が変更され、海馬などの高次脳機能部位でも自分で女性・男性ホルモンを合成し、それが神経に作用している経路がわかってきた。このことを踏まえてストレスホルモンも、スパイン増加の部位である海馬自身で合成されていると予想される。海馬においてストレスホルモン CORT の合成系が存在することと、海馬自身の合成する CORT 濃度の正確な測定を第二の目的とした。

3. 研究の方法

スパイン解析では、急性海馬スライス (400 μ m 厚) を調製後、人工脳脊髄液中で CORT や kinase の阻害剤を1時間作用させてから PFA 固定し、単一神経に 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。

↑スパイン頭部直径で分類して解析

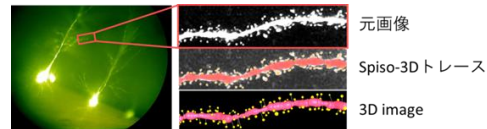
海馬の合成するステロイドホルモンの定量では、海馬に含まれる大量の夾雑物 (主として脂質) を除去するために、我々が海馬の性ホルモン定量で確立した新しい抽出法:

「有機溶媒抽出→C18 カラム→順相の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)」と、特異的検出が可能で pg オーダーの検出感度をもつ誘導体化・LC-MS/MS を用いて濃度決定した (Hojo et al., 2009 Endocrinology)。また、性ホルモンと異なり、ストレスホル

モンは、麻酔や全脳を取り出す際にかかるストレスで副腎から大量に放出されるので、海馬自身が合成したものとの区別がつかない。そのため、定量には副腎摘出したラットを用いた。

4. 研究成果

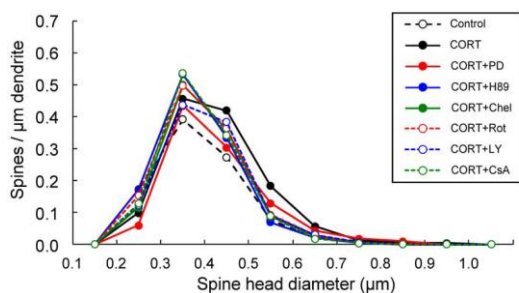
(1) 急性ストレスによるスパイン増加・肥大の分子メカニズム: まず、免疫電子顕微鏡で CORT の受容体 GR がシナプスに局在する



ことを明らかにした。スパイン可視解析において、GR を阻害すると CORT のスパイン増加・肥大効果は阻害されたので、急性ストレスはシナプスに局在する GR を介してスパインを増加・肥大させる。kinase の阻害剤実験により、GR の下流では ERK MAPkinase, PKA, PKC, PI3K のリン酸化酵素が駆動されて頭部の大きな large-head spine (直径: 0.5-1.0 μ m) が増加することがわかった。このスパイン増加・肥大は、遺伝子転写を伴わない過程であった。以上より、CORT→シナプス GR→Erk MAPK, PKA, PKC, PI3K→スパイン増加・頭部肥大の分子メカニズムを明らかにした (Komatsuzaki et al., 2012 PLoS ONE)。CORT の慢性ストレス作用、CORT→GR→核移行→遺伝子転写→タンパク合成という経路とは全く異なる新しい分子カスケードを見出したことは大きな意義がある。これらはスパイン頭部直径が計算できる、数理的解析ソフト Spiso-3D を用いて、世界で初めて可能となったものである (Mukai et al., 2011 Cerebral Cortex)。これまでの太いスパイン (mushroom)・細いスパイン (thin) という定性的な分類ではわからなかった kinase 毎の作用の差を定量的に比較する方法の確立は、本研究の急性ストレス作用の分子的解明のみならず、多くのシナプス作用を解明するのに役立つと期待される。

(2) 海馬自身が合成するストレスホルモン: コレステロールから CORT を合成する酵素系 (P450_{scc}, 3 β -HSD, P450_{c21}, P450_{11 β}) が全て神経細胞の細胞体とシナプスに存在することを、RT-PCR, in situ hybridization, 免疫組織染色を用いて証明した。これらの合成酵素は、細胞体だけでは

なく、シナプスにも局在することを免疫電子顕微鏡で明らかにした。性ホルモンと同様に CORT もシナプスで合成されて、その場で作用しうること示した点で本研究の結果は意義深い。新しい抽出法と LC-MS/MS を用いた定量法で、海馬自身が CORT を合成することを証明した。副腎摘出ラットを用いて、血中からの CORT 供給を断ち切った状態で、海馬自身が合成する CORT 濃度を 7 nM と決定した。また、脳脊髄液中の CORT は circadian rhythm を示し、明期で 3 nM、暗期で 30 nM であった(Hojo et al., 2011 Front Neuroendocrin. Sci; Higo et al., 2011 PLoS ONE)。意外なことに、この濃度領域 (10 nM) の CORT を急性海馬スライスに投与するとスパインを増加させることがわかった。CORT はストレスホルモンのとしての側面ばかりに注目が集まり、その作用の実験は、主に 100 nM よりも高いストレス時の濃度に設定されることが多く、それよりも低濃度の CORT の生理作用はほとんど着目されることがなかった。本研究により、10 nM 程度の CORT は、スパインを増やす神経栄養因子としての作用を持つことが示唆され、低濃度領域で日内変動を示すことがわかった。本研究は、このような低濃度領域の CORT の新しい作用を解明する端緒となるものである。



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 10 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.

②Okamoto 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

③Komatsuzaki 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

④Tanabe 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

⑤Hojo 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

⑥Barron 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

⑦Ooishi 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

⑧Higo 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

⑨Ooishi 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

⑩Mukai H, Hatanaka Y, Mitsuhashi 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

〔学会発表〕(計 14 件)

①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)

②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)

③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)

④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)

⑤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)

⑥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)

⑦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)

⑧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)

⑨ 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)

⑩Uebayashi 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)

⑪Mukai 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.
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)

⑫ 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 月 16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

⑬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 年
18 日, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス (兵
庫県、姫路市)

⑭ 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 年
18 日, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス (兵
庫県、姫路市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北條泰嗣 (HOJO YASUSHI)

東京大学・総合文化研究科・特任研究員
研究者番号 : 20536875

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :