

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700378

研究課題名(和文) ラット海馬歯状回における内因性神経ステロイドによるシナプス伝達調節機構の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of the modulation of excitatory synaptic transmission by endogenously synthesized neurosteroids.

研究代表者

田中 基樹 (Tanaka, Motoki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90584673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：外因性ステロイドがシナプス伝達の調節を介して動物の記憶や学習を増強することは多くの研究で報告されているが、脳内で生理的に産生された内因性神経ステロイドが同様の機序によってシナプス伝達を調節し、正常な脳機能の維持に寄与しているのかについては議論があった。我々はこれまでラット海馬歯状回において、ステロイド合成阻害薬による神経活動の変化を電気生理学的手法により調べることにより、内因性神経ステロイドは恒常的に興奮性シナプス伝達を増強していることを明らかにした。本研究では、内因性神経ステロイドによる興奮性シナプス伝達調節の作用機序の一部を明らかにすると共に、この作用は加齢によって低下することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Neurosteroids are synthesized de novo in the central nervous system independently of the peripheral endocrine glands and believed to promote learning and memory by modulating synaptic function in the hippocampus. However, as most of the reported studies on the neurosteroid effects were performed exclusively with exogenously applied neurosteroids, little is known to what degree endogenously synthesized neurosteroids contribute to the hippocampal synaptic function. Our latest study showed that endogenously synthesized neurosteroids constitutively potentiate excitatory synaptic transmission in the dentate gyrus of juvenile male hippocampal slices. In this study, we revealed the mechanisms underlying the modulatory actions of endogenous neurosteroids. In addition, we found a decrease in the potentiation of excitatory synaptic transmission by endogenous neurosteroids in aged rats.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：神経ステロイド 興奮性シナプス伝達 海馬歯状回

1. 研究開始当初の背景

ステロイドは副腎や生殖腺といった末梢の器官で産生され、血管を通して標的の組織・細胞に到達しその生理作用を示す。一方で中枢神経系においても、ステロイドは末梢器官とは独立に神経細胞やグリア細胞において産生されている(神経ステロイドと呼ばれる)。神経ステロイドにはpregnenolone (PREG)、dehydroepiandrosterone (DHEA)、DHEA sulfate (DHEAS) を始めとした様々な種類がある。これらの合成は、P450sccによってまずコレステロールからPREGが合成され、引き続き、合成されたステロイド(PREG、DHEA等)を基質として下流のステロイドが合成される(図1)。

先行研究からDHEAS等の神経ステロイドは、それぞれが特徴的なシナプス伝達調節作用を示し、神経伝達物質の放出や興奮性のグルタミン酸受容体、抑制性のGABA受容体の機能を調節することで神経細胞間のシナプス伝達効率を調節していることが明らかにされている。しかし、こうした知見の大半は体外から投与された外因性ステロイドを用いて得られたものであるため、脳内で生理的に産生されている神経ステロイドが同様の機序によってシナプス伝達を調節し、正常な脳機能の維持に寄与しているか否かについては議論が残っていた。

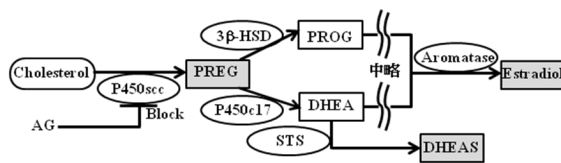


図1 神経ステロイド合成経路の概略

□ : ステロイド
○ : ステロイド合成酵素

我々はラット海馬歯状回のシナプス伝達における内因性神経ステロイドの生理的役割を調べるため、生後3週齢のオスラットから海馬スライスを作製し、その海馬スライスの歯状回から細胞外記録法により興奮性シナプス後電位(EPSP)、またホールセル・パッチクランプ法により興奮性シナプス後電流(EPSC)を記録した。そして全ての神経ステロイドの基質でもある神経ステロイドPREGの合成を、その合成酵素阻害薬であるaminoglutethimide (AG)によって阻害し、興奮性シナプス伝達の指標であるEPSP、EPSCがどのように変化するのかを解析した。その結果、PREGの下流で産生されるDHEASおよびestrogen (E2) がそれぞれ興奮性シナプス伝達を担うAMPA受容体およびNMDA受容体の機能を恒常的に増強している可能性を明らかにした。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、以下の3点を本研究の目的とした。

(1) 我々は内因性のDHEASおよびE2がそれぞれ恒常的にAMPA受容体およびNMDA受容体の機能を調節していることを明らかにしたが、どのような作用機序によってこれら神経ステロイドが受容体機能の調節を行っているのかについては不明であった。そこで内因性DHEAS、およびE2による恒常的な興奮性シナプス伝達調節作用の機序の解明を目指した。

(2) 外因性ステロイドを用いた研究によれば、複数の神経ステロイドは、抑制性シナプス伝達を担うGABAの放出やその受容体の機能を調節することが報告されている。そのため興奮性と同じく、抑制性シナプス伝達も恒常的に神経ステロイドの調節を受けている可能性がある。そこで抑制性シナプス伝達も恒常的に神経ステロイドの調節を受けているか否かについて解析を行った。

(3) 内因性神経ステロイドの生理作用に関するこれまでの我々の解析は、3週齢という比較的若いラットにおいて行っていた。しかしながら先行研究によれば、全ての神経ステロイドの合成に必要な酵素であるP450sccのmRNAレベルは、生後2-3週齢以降急激に低下し、生後12週齢では生後2-3週齢の10%以下にまで落ちていることが報告されている。また神経ステロイドの海馬内の濃度は高齢ラットでは低下していることが報告されている。そのため若齢ラットで観察された内因性神経ステロイドによる興奮性シナプス伝達増強作用は、高齢のラットでは低下していると予想された。そこで高齢オスラットにおけるステロイド合成酵素阻害薬の効果解析し、加齢によってステロイド合成酵素阻害薬の効果に差があるか否かを検証した。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的手法によるシナプス伝達に対する各種試薬の作用の解析

ラット海馬歯状回のシナプス伝達における内因性神経ステロイドの生理的役割を調べるため、生後3週齢から12カ月齢のオスラットから海馬スライスを作製し、その海馬スライスの歯状回から細胞外記録法により興奮性シナプス後電位(EPSP)、またホールセル・パッチクランプ法により興奮性シナプス後電流(EPSC)、さらに抑制性シナプス伝達の指標である抑制性シナプス後電流(IPSC)を記録した。そして神経ステロイド合成酵素阻害薬、あるいは神経ステロイドによりシナプス伝達の指標であるEPSP、EPSC、IPSCがどのように変化するのかを解析した。

(2) 生化学的手法によるAMPA受容体発現量の解析

内因性DHEASによるAMPA受容体調節の作用機序を調べるため、海馬スライスの細胞膜上のAMPA受容体をピオチンによって標識した後、

その海馬のホモジネートを作成した。アビジンビーズによってホモジネートから細胞膜上のタンパク質を分離し、ウェスタンブロッティングによって、sham群、AG投与群、AG+DHEAS投与群における細胞膜上のAMPA受容体の発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) DHEAS による AMPA 受容体機能調節の機序の解明

内因性 DHEAS による AMPA 受容体機能調節は薬剤投与後数分から数十分以内に観察されることから、non-genomic な作用であることが予想された。そこで神経ステロイド合成酵素阻害薬 AG 投与後の細胞膜上に存在する AMPA 受容体の量をウェスタンブロッティングによって解析したところ、膜上に存在する AMPA 受容体の量は AG によって有意に減少し、その減少は DHEAS を共に投与することで防がれた。しかし AMPA 受容体の総量に有意な変化はなかった (図 2)。以上の結果より、内因性 DHEAS はシナプス伝達を担う細胞膜上の AMPA 受容体量の調節を介して興奮性シナプス伝達を調節していることが示唆された。

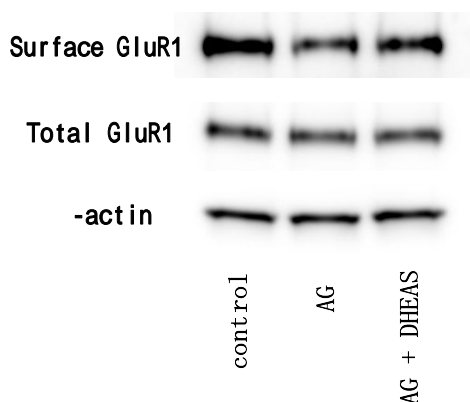


図 2 内因性神経ステロイド合成酵素阻害による細胞膜上の AMPA 受容体量の変化

細胞膜上の AMPA 受容体量は 100 μ M の AG によって低下し、1 nM の DHEAS を共に加えることで、その低下は防がれた (上段)。しかし AMPA 受容体の総量 (中段)、およびタンパク質の総量 (下段) はいずれの試薬でも変化しなかった。

(2) E2 による NMDA 受容体機能調節の機序の解明

NMDA 受容体機能亢進における E2 の直接の作用部位を同定するため、E2 受容体のサブタイプである ER α と ER β 、それぞれのアゴニストの作用を電気生理学的手法により調べた。NMDA 受容体の機能調節については、ホールセル・パッチクランプ記録法により NMDA 受容体チャネルを介した電流のみを測定し、その電流に対する薬剤の効果を調べることで評価した。その結果、ER α のアゴニストである PPT は NMDA 受容体の機能を亢進したが、ER β のアゴニストである DPN

は逆に NMDA 受容体の機能を低下させた (図 3A, 3B)。さらに E2 合成酵素阻害薬 Ietrozole による NMDA 受容体機能低下は PPT 投与によって回復したが、DPN では回復しなかった。興味深いことに、低濃度 E2 (1 nM) は NMDA 受容体の機能を亢進するが、高濃度 E2 (7 nM) は逆にその機能を抑制した (図 3C)。

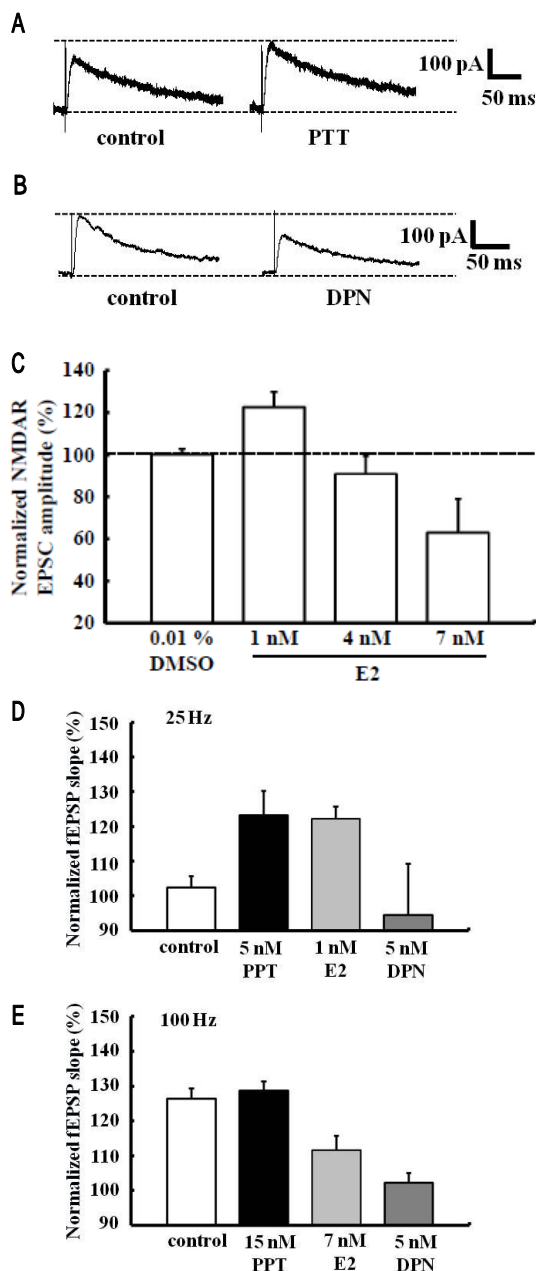


図 3 E2 による NMDA 受容体双方向性調節

ER α アゴニスト PPT (5 nM) は NMDA 受容体依存性の EPSC (NMDAR-EPSCs) の振幅を上昇させた (A)。一方、ER β アゴニスト DPN (5 nM) は逆に NMDAR-EPSCs の振幅を低下させた (B)。E2 は 1 nM では NMDAR-EPSCs の振幅を増加させるが、その増強作用は E2 の濃度を上げると低下し、7 nM では逆に抑制的に作用した (Mean \pm SD, n = 7, C)。未処理 (control) では長期増強が誘導されない比較的弱い高頻度刺激 (25 Hz) において、5 nM PPT ある

いは1 nM E2 で処理された海馬スライスでは、長期増強が誘導された。一方、control でも長期増強が誘導される高頻度刺激(100 Hz)において、7 nM E2 あるいは5 nM DPN で処理された海馬スライスでは長期増強の誘導が阻害された (Mean ± SD, n = 7, D and E)。

NMDA 受容体は、重要な脳機能のひとつである記憶・学習に必須のタンパク質である。海馬スライス標本では、高頻度の電気刺激を与えると高頻度刺激後、興奮性のシナプス伝達は刺激前と比較して増強される。この現象は長期増強と呼ばれ、記憶・学習の実験モデルとされている。そこで長期増強に対する E2 および PPT、DPN の効果を調べた。その結果、1 nM の E2 および 5 nM の PPT は長期増強の誘導を促進し、一方 7 nM の E2 と 5 nM の DPN は長期増強の誘導を阻害した (図 3D、E)。

以上の結果より、生理的に産生されている内在性レベルの E2 は ER を介して NMDA 受容体の機能を亢進し記憶学習の形成を促進するが、過剰な E2 は ER を介して NMDA 受容体の機能を抑制し記憶学習の形成を阻害するという、E2 による NMDA 受容体双方向調節作用を世界で初めて明らかにした。

(3) 抑制性シナプス伝達に対する神経ステロイド合成酵素阻害薬の作用

ラット急性海馬スライス標本の歯状回顆粒細胞に対してホールセル・パッチクランプ記録を行い、自発的な GABA 放出によって生じる miniature IPSC を観察した。その結果ステロイド合成酵素阻害薬 AG によって miniature IPSC の発生頻度は増加したが、その振幅は変化しなかった。miniature IPSC の発生頻度はシナプス前部からの GABA 放出能を反映している。従って本結果は、内因性神経ステロイドがシナプス前部からの GABA 放出を恒常的に抑制していることを示唆している。これは内因性神経ステロイドが、興奮性シナプス伝達においてはシナプス後部(受容体)の機能を調節しているのに対し、抑制性シナプス伝達ではシナプス前部(伝達物質放出)の機能を調節している、という点で興味深い。

(4) 高齢ラットにおける内因性神経ステロイドによる興奮性シナプス伝達増強作用の解析

週齢の異なるラットから作製した急性海馬スライス標本において、AGによって神経ステロイド合成を阻害し、それによるEPSPの変化を細胞外記録法により調べた。若齢(3-4週齢)ラットではAGによってEPSPが20-30%程度低下することを既に報告している。このAGの作用は12週齢、6カ月齢ラットにおいても、若齢と同程度に観察され、12週齢、6カ月齢のラットにおいても4週齢と同様に内因性神経ステロイドは興奮性シナプス伝達を恒常的に増強していることが示唆された。ラットではその

誕生直後を基準とした場合、神経ステロイド合成に必要な酵素(P450scc)のmRNA量は、4週齢では80%程度保持されているが、12週齢では10%程度にまで低下していることが報告されており、本研究結果はこの先行研究の結果と一致しない。この理由として、神経ステロイド合成酵素のmRNA量の週齢差が、必ずしも我々の実験条件におけるその酵素の発現量・活性の週齢差を反映しているとは限らないことが挙げられる。加えて12週齢ラットはヒトでは18歳程度に相当し、加齢により脳機能が著しく低下していると考えられる週齢ではない。そこで、さらに加齢の進んだ12か月齢(ヒトでは45歳程度に相当)のラットにおいて同様の実験を行った。その結果、12カ月齢ラットではAGによってEPSPは10%程度しか低下せず、AGの作用は減弱していた。

本研究結果から、内因性神経ステロイドは比較的若いラット(3週齢から6カ月齢)では興奮性シナプス伝達を恒常的に増強しているが、高齢(12か月齢)ラットでは脳内神経ステロイド合成能の低下によって、その興奮性シナプス伝達増強作用は低下しており、それが記憶学習機能の低下につながっている可能性が示された。

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 1件)

- (1) Bidirectional modulatory effect of 17beta-estradiol on NMDA receptors via ER alpha and ER beta in the dentate gyrus of juvenile male rats. Tanaka M, Sokabe M, Neuropharmacology, 75 巻(頁: 262-273), 2013, 査読有 doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.029.

[学会発表](計 2件)

- (1) Bidirectional modulatory effects of estradiol on NMDA receptors in the dentate gyrus of juvenile male rats. 田中基樹、曾我部正博, 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20日~23日, 国立京都国際会館(京都)
- (2) Normal synaptic functioning requires constitutive production of neurosteroids. 田中基樹、曾我部正博, 第35回日本神経科学大会, 2012年9月18日~21日, 名古屋国際会議場(名古屋)

[その他]

ホームページ等

http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100001569_ja.html?k=%E7%94%B0%E4%B8%AD%E5%9F%BA%E6%A8%B9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 基樹 (TANAKA, Motoki)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 90584673

(2) 研究分担者

なし