

論文の内容の要旨

性ホルモンによる海馬神経シナプス制御の解析

加藤 麻紗実

【背景と目的】

海馬における男性・女性ホルモンの合成と作用の研究は活発に行なわれている。例えば、女性ホルモンであるエストラジオール (E2) や、男性ホルモンであるジヒドロテストステロン (DHT) が、神経細胞の樹状突起上に存在するスパイン (シナプス後部) の密度を急性的に増やし、スパイン頭部の変化を引き起こすことが発見されている。前述のように、性ホルモンが海馬神経スパインの制御に重要な役割を担うことは明らかとなっているが、その分子機構としては遺伝子転写を介した長期効果 (1~2 日かかる) に関わる研究が多かった。しかし、近年の川戸グループの先行研究から、性ホルモンがスパインを 2 時間程度で急性的に制御することが明らかとなってきた。この急性制御は、遺伝子転写を介さず、リン酸化酵素の働きによって成り立つと予想される。具体的には、スパインの形成に関わるアクチン脱重合を引き起こす *cofilin* を不活性化する *LIMK* と、スパインの形成に重要なアクチン重合を制御する *cortactin* を活性化する *ERK/MAPK* に着目した。さらに、性ホルモンの受容体(プロゲステロン受容体: *PR*、エストロゲン受容体: *ER α* 、アンドロゲン受容体: *AR*) にも着目した。特に、女性ホルモンであるプロゲステロン (*PROG*) のシグナル経路については未だ解明されていない部分が多い。

そこで本研究では、オスラットの海馬スライスを作成し、リン酸化酵素である *LIMK*, *ERK/MAPK* の阻害剤を用いて、性ホルモンによる神経スパイン急性制御の詳細なメカニズムの解析を行うことを目的とした。また、性ホルモン受容体のアンタゴニストを用いて、

神経スパイン制御における受容体の解析も行なった。

次に、メスラットの性周期と海馬のスパイン密度変動の関係にも着目した。メスには、Proestrus (P)、Estrus (E)、Diestrus 1 (D1)、Diestrus 2 (D2) という4ステージから成る性周期が存在する。各ステージは1日ごとに変化し、4日周期で繰り返される。性周期に伴って、海馬では神経スパイン密度が周期的変動を示すことが知られているが、過去にはD1とD2を区別して解析した報告はない。また、このスパイン密度変動は、E2やPROGの血中での濃度変動に起因すると考えられてきたが、海馬におけるE2やPROG濃度は測定されていなかったため、性周期に伴うスパイン密度変動の実際の制御機構については未解明である。

そこで本研究では、メスの海馬内における神経スパイン密度及び性ホルモン濃度を測定し、性周期の各ステージで両者に密接な関係があるかどうかを調べることを目的とした。また、メス海馬内における性ホルモン合成酵素及び受容体のmRNA発現量には、性周期の各ステージで増減がないかどうかも調べた。

【結果と考察】

本研究の(1)(2)では12週齢のオスラット、(3)(4)では12週齢のメスラットを用いた。

(1) 性ホルモンによる、リン酸化酵素を介したスパイン制御のシグナル経路解析

オスラットの生きた急性海馬スライスを作成し、PROG、E2及びDHTを2時間作用させた結果、海馬CA1領域の全スパイン密度が増加した。ここで、スパインの制御に重要な役割を果たしていると考えられるリン酸化酵素(LIMK, ERK/MAPK)に着目し、その阻害剤を性ホルモンと共に作用させると、PROG, E2, DHTによるスパイン密度の増加効果が抑制された。この結果から、PROG, E2, DHTによるスパイン密度の増加は、LIMKやERK/MAPKを活性化することによって生じると考えられる。今回着目したLIMKは、スパインの形成に関わるアクチン脱重合を引き起こすタンパク質(cofilin)を不活性化するリン酸化酵素であり、ERK/MAPKは、スパインの形成に重要なアクチン重合を制御するタンパク質(cortactin)を活性化するリン酸化酵素である。

本研究では2時間という短い時間でスパイン密度が増加したこと、更にLIMKやERK/MAPKの阻害剤によってスパイン密度の増加が抑制されたことから、性ホルモンによる急性的なスパイン密度の変化は、リン酸化酵素を介したnon-genomic経路で制御されているということが明らかとなった。

さらに、スパインを頭部直径ごとに3つのサブクラス(small-headスパイン、middle-headスパイン、large-headスパイン)に分類して解析を行なった。スパインは、頭部直径が大きいほどAMPA型グルタミン酸受容体の数が多いため、記憶力が高いといえる。解析の結果、それぞれの性ホルモンによるスパイン密度の増やし方には特徴があることが明らかとなった。さらに、全スパイン密度の解析と同様に、3分類の解析でもリン酸化酵素(LIMK, ERK/MAPK)の関与があるという結論が得られた。

本研究において、スパインを頭部直径サイズごとに分類して解析したことで、全スパイン密度の解析だけでは知ることのできない重要な変化を明らかにすることができた。

PROG, E2, DHT は、一見同じようにスパイン密度を増加させているように見えるが、実際には異なるサイズのスパイン密度を増加させており、阻害剤によるスパイン増加効果の抑制にも明確な違いがあることを見出した。

(2) スパイン内の性ホルモン受容体を介した、スパイン密度制御メカニズムの解明

性ホルモンの核内受容体 (PR, ER α , AR) のアンタゴニストを作用させると、PROG, E2, DHT によるスパイン密度の増加効果が抑制された。この結果は、全スパイン密度と頭部直径ごとに分類したスパイン密度の解析の双方で得られた。この結果から、PROG は PR、E2 は ER α 、DHT は AR を介して、スパイン密度を増加させることが明らかとなった。

PR, ER α , AR は、タンパク質としては核内受容体と同じであるが、本研究においてはこれらの受容体が2時間以内の早い作用を担うため、核へ移行することはなくスパイン内に存在して、下流のリン酸化酵素を活性化することにより作用していると考えられる。実際に、金抗体を用いた電子顕微鏡による観測によって、スパイン内に PR (Waters et al., 2008; Katherine L et al., 2010), ER α (Mukai et al., 2007), AR (Tabori et al., 2005) が存在することが見出されている。さらに、スパインを含むシナプス後肥厚 (PSD: postsynaptic density) 分画を用いたウエスタンブロットによる先行研究によっても、海馬 CA1 領域における神経スパインに ER α (Mukai et al., 2007) と AR (Hatanala et al., 2015) が発現していることが明らかとなっている。

(3) 性周期に伴うメス海馬のスパイン密度の変動と、海馬の性ホルモン濃度の変動

各性周期ステージのメスを灌流固定し、海馬 CA1 領域のスパイン密度を解析した。その結果、スパイン密度は、Proestrus で高い → Estrus で低い → Diestrus1 で高い → Diestrus2 で低い、というように性周期に伴って変動することが分かった。これまで、メスの性周期に伴う海馬のスパイン密度及び頭部変化に関する多くの研究が行われてきたが (Woolley et al., 1990, Shors et al., 2001)、その解析方法は、性周期を P、E、Diestrus という3つのステージに分けたものであった。本研究では Diestrus を D1、D2 の2ステージに分けてスパイン密度解析を行なったことで、性周期に伴うスパイン密度の正しい周期的な変動を見出すことができた。

さらに、各性周期ステージのメス海馬から性ホルモンを抽出し、質量分析法を用いて定量を行った。その結果、PROG と E2 の海馬内濃度は性周期によって変動することが明らかとなった。E2 は海馬内の濃度が血中に比べて遥かに高い (10~100 倍) ことから、海馬で合成される E2 が支配的であることがわかった。一方、海馬内の PROG は血中の2倍程度で存在しているため、主に海馬で合成されるものが支配的であるが、海馬内の性周期に伴う PROG 変動を引き起こす要因としては、血中から供給される PROG 変動が寄与していると考えられる。

海馬内の女性ホルモン濃度の変動とスパイン密度の変動を比較すると、PROG 濃度のピーク (D1) と E2 濃度のピーク (P) が、スパイン密度の高いステージ (D1, P) と一致

していた。このことは、海馬内の PROG や E2 が性周期に伴うスパイン密度変動を制御していることを示唆する。

(4) メス海馬の性ホルモン合成酵素及び受容体の mRNA の発現解析

メスの海馬を用いて性ホルモン合成に関わる酵素の mRNA 発現量を解析した結果、オスと同様にメスの海馬にも全ての合成酵素が発現していた。さらに、性周期のステージごとに酵素の発現量を比較したところ、どのステージにおいても発現量が変動しないことが明らかとなった。この結果から、メスの海馬内における性ホルモン合成能は、性周期によらず常に一定だと考えられる。

また、プロゲステロン受容体 (PR)、エストロゲン受容体 (ER α , ER β)、アンドロゲン受容体 (AR) もメスの海馬内に発現していたが、性周期に伴う発現量の変動は見られなかった。海馬神経のスパインが性周期に伴って変化する要因として、性ホルモン受容体の発現量の変動も考えられたが、この結果からその可能性は否定された。

本研究の結果と、世界の他の研究室の報告を合わせて考えると、性周期ごとに変化する海馬内の女性ホルモン濃度が、LIMK、ERK/MAPK、Akt などのリン酸化酵素の活性度合いを変化させることによって、性周期に伴うスパイン密度の変動が制御されていると考えられる。