

博士論文（要約）

老化に伴うラット脳内の性ステロイド合成系と受容体の変化

棟朝 亜理紗

目次

第1章 序論	1
1-1 記憶力の老化による低下	1
1-1-1 海馬：記憶・学習の中枢	1
1-1-2 神経シナプスでの神経細胞間情報伝達	1
1-1-3 記憶・学習の素過程と神経シナプスの構造変化	2
1-1-4 老化による記憶力の低下	3
1-2 老化による記憶力の低下と男性・女性ホルモン	3
1-2-1 男性・女性（ステロイド）ホルモン	3
1-2-2 男性・女性ホルモンが記憶力に及ぼす作用	4
1-2-3 老化に伴う記憶力の低下に対する男性・女性ホルモンの回復効果	5
1-3 海馬自身が合成する男性・女性ホルモン（局所合成系）	5
1-3-1 海馬自身が合成する男性・女性ホルモンとその作用	5
1-3-2 男性・女性ホルモン合成酵素	6
1-3-3 男性・女性ホルモン受容体	9
1-3-4 老化に伴う脳内男性・女性ホルモン合成の変化についての先行研究	11
1-4 研究目的	11
第2章 実験手法	12
2-1 実験動物	12
2-2 質量分析を用いた海馬の男性・女性ホルモン濃度測定	12
2-2-1 質量分析に用いた試薬の組成	12
2-2-2 男性・女性ホルモン測定に用いる試料（海馬、血漿）の調製	14
2-2-3 海馬からの男性・女性ホルモン抽出	14
2-2-4 順相 HPLC によるステロイド分離	15
2-2-5 質量分析 LC-MS/MS	15
2-2-6 男性・女性（ステロイド）ホルモンの誘導體化と LC 部への導入	15
2-2-7 LC-MS/MS ポンププログラム	16
2-2-8 男性・女性（ステロイド）ホルモン誘導體のイオン化と検出	16
2-2-9 検出真度（accuracy）と定量限界（limit of quantitation）	17
2-2-10 抽出効率の計算	17
2-2-11 男性・女性ホルモン濃度の算出法	17
2-3 RT-PCR 法	18
2-3-1 RNA 抽出および電気泳動に用いた試薬	18
2-3-2 total RNA 抽出	18
2-3-3 逆転写反応	19

2-3-4 プライマーの設計	20
2-3-5 PCR 反応	21
2-3-6 電気泳動.....	22
2-3-7 PCR 産物の精製と配列確認	22
2-3-8 増幅曲線の作成.....	23
2-3-9 mRNA 発現量解析方法	23
2-3-10 異なる合成酵素および受容体の mRNA 発現量比較方法	24
2-4 抗体染色法	25
2-4-1 一次抗体.....	25
2-4-2 二次抗体.....	26
2-4-3 脳切片スライス作成	26
2-4-4 海馬スライスの抗体染色	27
2-5 精巢のヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)	27
2-6 統計解析	28
第 3 章 実験結果	29
第 4 章 考察	30
第 5 章 結論	31
引用文献	32

略語

a.a.	amino acid (アミノ酸)
ADione	androstendione (アンドロステンジオン)
ADiol	androstenediol (アンドロステンジオール)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AR	androgen receptor (アンドロゲン受容体)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor (脳由来神経栄養因子)
bp	base pair (塩基対)
CA	cornu ammonis (アンモン角)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (相補デオキシリボ核酸)
Cyp	cytochrome
dATP	deoxyadenosine triphosphate (デオキシアデノシン三リン酸)
DDW	double distilled water (二次蒸留水)
DG	dentate gyrus (歯状回)
DHEA	dehydroepiandrosterone (デヒドロエピアンドロステロン)
DHT	dihydrotestosterone (ジヒドロテストステロン)
DNA	deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
DNase	deoxyribonuclease (デオキシリボヌクレアーゼ)
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate (デオキシリボヌクレオシド三リン酸)
E1	estrone (エストロン)
E2	estradiol (エストラジオール)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
ER	estrogen receptor (エストロゲン受容体)
ESI	electro spray ionization (エレクトロスプレーイオン化法)
EtBr	ethidium bromide (臭化エチジウムブロマイド)
EtOH	ethanol (エタノール)
GABA	γ -aminobutyric acid (γ -アミノ酪酸)
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド3リン酸脱 水素酵素)
GnRH	gonadotropin releasing hormone (性腺刺激ホルモン放出ホルモン)
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィ)
hsp	heat shock protein (熱ショックタンパク質)
HSD	hydroxysteroid dehydrogenase (水酸化ステロイド脱水素酵素)

LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry (液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計)
LOQ	limit of limit of quantification (検出限界)
LTD	long-term depression (長期抑圧)
LTP	long-term potentiation (長期増強)
M-MLV	moloney murine leukemia virus (モロニーマウス白血病ウイルス)
mRNA	messenger RNA
NMDA	N-methyl D-aspartate
P450	cytochrome pigment-450 (シトクロム P450)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PFBz	pentafluorobenzyl (ペンタフルオロベンジル)
PR	progesterone receptor (プロゲステロン受容体)
PREG	pregnenolone (プレグネノロン)
PROG	progesterone (プロゲステロン)
PSD-95	postsynaptic density 95
RNA	ribonucleic acid (リボ核酸)
RNase	ribonuclease (RNA 分解酵素)
RSD	relative standard deviation (相対標準偏差)
RT	reverse transcription (逆転写)
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)
SEM	standard error of the mean (平均値の標準誤差)
SDN-POA	sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (視索前野性的二型核)
SIRT1	silent information regulator 1
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TAE	Tris/Acetic acid/EDTA buffer (トリス-酢酸-EDTA 緩衝液)
T	testosterone (テストステロン)
Tris	trishydroxymethylaminomethane (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)

第1章 序論

1-1 記憶力の老化による低下

1-1-1 海馬：記憶・学習の中枢

記憶・学習の中枢である海馬は側頭葉内側部にある大脳皮質の一部であり、大脳辺縁系原皮質に属している（図 1-1A）。ここを切除すると、新規の物事の記憶・学習ができなくなることから、記憶・学習の中枢であるとされている(Scoville and Milner, 1957, Albasser et al., 2012)。

海馬を長軸方向に対して垂直な断面で切断すると、神経細胞が層状に並んだ構造が観察される（図 1-1B, C）。海馬体は、海馬台・アンモン角（CA: cornu ammonis）・歯状回（DG: dentate gyrus）から構成され、神経細胞が集積した明瞭な層構造を持つ。アンモン角は主に錐体細胞とグリア細胞から構成され、特に小錐体細胞領域を CA1、大錐体神経細胞領域を CA2, 3, 4 と呼ぶ。一方、DG は主に顆粒神経細胞と呼ばれる球形の細胞体を持つ神経細胞で構成されている。海馬内の主要な情報処理の経路は内嗅野第二層からの貫通線維(perforant path)→DG(顆粒細胞)→顆粒細胞軸索(苔状繊維: mossy fiber)の CA3 への投射→CA3 錐体神経細胞軸索（シャーフアー側枝: Schaffer collateral）の CA1 への投射→海馬台・外側中隔核・内嗅野第四層である（図 1-1B）。

明瞭な構造を持つ海馬では、げっ歯類を用いてその機能に関する研究が進んでいる。CA1 領域は空間記憶(O'Keefe and Dostrovsky, 1971)、CA3 領域は連想記憶(Lisman, 1999)、DG は外界情報のパターンの分離(Nakashiba et al., 2012)に関わっている。

1-1-2 神経シナプスでの神経細胞間情報伝達

海馬 CA1 領域の錐体細胞は、網状分子層、放射状層、錐体細胞層、上昇層と海馬白板の領域にわたって樹状突起（dendrite）を伸ばしている（図 1-2A）。CA1 領域の錐体細胞には、40-50 本の樹状突起がある。その樹状突起には、微小な突起（直径 1 μm 弱程度）が存在しており、樹状突起スパイン（dendritic spine）と呼ばれる（図 1-2B 矢印）。スパインは、別の神経細胞の軸索終末との間でシナプスとよばれる構造を形成する（図 1-2C）。軸索終末をシナプス前部、スパインをシナプス後部と呼び、軸索終末を伸ばす側の神経細胞を前細胞、スパイン側の神経細胞を後細胞と呼ぶ。

神経細胞間の情報伝達は、前細胞と後細胞をつなぐシナプスで行われる（図 1-2C）。海馬の興奮性シナプスでは、前細胞で生じた電気信号（アクションポテンシャル）が軸索終末に達すると、軸索終末から神経伝達物質（グルタミン酸）がスパインに向かって放出される（図 1-2C）。神経スパイン上には、グルタミン酸受容体である AMPA

(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 型受容体、NMDA (N-methyl D-aspartate) 型受容体などが存在する(Eric Kandel, 2012)。グルタミン酸が神経スパイン上にある AMPA 型受容体に結合すると、受容体が開口して細胞外から Na^+ イオンが流入してシナプス後部の膜電位が変化し脱分極する。後細胞が受け取る脱分極の合計が十分な大きさに達すると、後細胞の軸索でもアクションポテンシャルが生じ、次の神経細胞へと情報が伝わる。これが、神経細胞間での情報伝達の様式である。この、通常の情報伝達においては、ひとつのシナプスにおける脱分極の大きさが十分ではないので、NMDA 型受容体はほとんど開口しない。

1-1-3 記憶・学習の素過程と神経シナプスの構造変化

次に、記憶・学習の際に神経シナプスで起こっている現象について述べる。記憶・学習は神経シナプスの伝達効率の上昇ととらえることができる。すなわち、神経シナプス後部(スパイン)が同一発のアクションポテンシャルを受け取った時に、以前よりも大きな脱分極が生じ、その状態が長期間持続すれば、そのシナプスを通じた情報伝達が起こりやすくなった(つまり、新しい情報処理の回路を獲得した)と言える。

電気生理学的手法を用いた研究において、海馬内の神経シナプスに高頻度電気刺激を加えると、神経シナプスの伝達効率が上昇し、刺激後長時間(数時間~数日以上)この変化が持続する長期増強(LTP: long-term potentiation)が生じる(Bliss and Lomo, 1973)。高頻度電気刺激の際には、神経スパインでは、通常よりも大きな脱分極が生じ、AMPA 型受容体だけではなく NMDA 型受容体も開口する。開口した NMDA 型受容体から膜内に Ca^{2+} が流入し、Cam Kinase II の活性化などを介して、AMPA 型受容体がリン酸化される。リン酸化された AMPA 型受容体は、細胞質から神経スパイン上の膜へと輸送され、神経スパイン上に存在する AMPA 型受容体の数が増える。その結果、同一発のアクションポテンシャルを受け取った時に、以前よりも大きな脱分極が生じることとなる。これが記憶の書き込みに対応する神経シナプス内の現象と考えられる。

LTP とは逆に、低頻度刺激を加えると神経シナプスの伝達効率が減少し、刺激後長時間この変化が持続する長期抑圧(LTD: long-term depression)が生じる(Dudek and Bear, 1992)。LTP, LTD のように神経シナプスの伝達効率に変化する現象をシナプス可塑性と呼び、シナプス可塑性は記憶・学習の素過程であると考えられている。

シナプス可塑性とスパインの構造変化は密接に関連している。記憶・学習に伴い、スパインは数を増やし、その頭部も大きくなる(Moser et al., 1994, Moser et al., 1997, O'Malley et al., 2000)。スパインの膜直下には、シナプス後肥厚部(PSD; postsynaptic density)と呼ばれる構造が存在し、電子顕微鏡で観察した際には暗い像として観察される。ここには、PSD-95 と呼ばれるタンパク質を初めとする足場タンパク質が高密度で存在しており、グルタミン酸受容体はここに挿入されている。神経スパインが大きいほど、PSD は広くなり(Harris and Stevens, 1989, Sorra and Harris, 2000)、そこに存

在する AMPA 型受容体の数も多くなる(Shinohara et al., 2008)。すなわち、頭部の大きな神経スパインほど、一発のアクションポテンシャルを受け取った時に生じる脱分極が大きく、情報伝達効率が高いと言える。これらのことから、スパインの数や大きさは記憶力のよい指標と言える。

1-1-4 老化による記憶力の低下

老化にともない記憶力は低下する。特に、海馬は加齢に対して最も脆弱な部位であり、げっ歯類においても海馬 CA1 領域が関与する空間学習能力、CA3 領域が関与するエピソード記憶である文脈学習および恐怖条件付け学習が老化とともに低下する(Barnes, 1987, Ward et al., 1999, Rosenzweig and Barnes, 2003, Veng et al., 2003, Burke and Barnes, Bizon et al., 2009)。電気生理学的な応答性においても、若年ラットと老齢ラットの脳では大きな違いがあり、海馬の DG と CA3 領域での長期増強 LTP の減衰は、若年ラットよりも老齢ラットの方が早い(Barnes, 1979, Dieguez and Barea-Rodriguez, 2004)。

このような記憶力の低下は、神経細胞の減少により引き起こされると考えられてきた。しかし、これは誤っていることが判明してきた。近年の精密な評価法 (Stereology を用いた方法) では、アルツハイマー病やパーキンソン病などの疾患を伴わず、正常に老化した場合には、海馬や大脳皮質の神経細胞数は減少しないことが明らかとなってきた (West et al., 1994, Rapp and Gallagher, 1996, Rasmussen et al., 1996, Morrison and Hof, 1997, Calhoun et al., 1998, Merrill et al., 2001, Morrison and Hof, 2002, West et al., 2004, Burke and Barnes, 2006, Kelly et al., 2006)。

また、正常老化においては、樹状突起の長さも変わらない (Rapp and Gallagher, 1996)。川戸研究室の先行研究により、老齢 (24 ヶ月齢) オスラットは若齢 (3 ヶ月齢) に比べて、神経スパイン密度が減少し、頭部直径も小さいことがわかっている (平櫛絢子, 2014, 東京大学修士論文)。従って、正常老化による記憶力低下は、細胞や樹状突起よりも微細なレベル、すなわち、シナプスレベルの劣化によるものとわかる。

しかし、正常老化した動物は、アルツハイマー病を初めとする疾患のモデル動物に比べると、飼育と入手が困難であるため、正常老化のメカニズムは、病的老化に比べると研究が進んでいないのが現状である。そのため、正常老化において、何がこのシナプスの減少を引き起こすのか、その原因は解明されていない。

1-2 老化による記憶力の低下と男性・女性ホルモン

1-2-1 男性・女性 (ステロイド) ホルモン

ステロイドはシクロペンタフェナントレン炭素骨格を基本構造として持つ化合物の総称である。ステロイド化合物は自然界に広く存在しており、そのうち生体内分泌物質

(ホルモン)として働くものをステロイドホルモンと呼ぶ。哺乳類において、ステロイドホルモンは生体の恒常性の維持に関わっている。その機能からステロイドホルモンは、生殖機能に関与する性ステロイドホルモンとストレス応答に関与するストレスステロイドホルモンとに大別されている。

本研究で着目する男性・女性(ステロイド)ホルモンには、男性ホルモン(アンドロゲン)、女性ホルモン(エストロゲン)、黄体ホルモン(ゲスターゲン)などがある。男性ホルモンには、テストステロン(T; testosterone)やジヒドロテストステロン(DHT; dihydrotestosterone)などがある。女性ホルモンには、エストラジオール(E2; 17 β -estradiol)などがある。黄体ホルモンとしては、プロゲステロン(PROG; progesterone)などが知られている。これらのステロイドホルモンは、全てコレステロールを合成の起点としており、コレステロールの側鎖の切断や修飾によって合成される(合成経路を図 1-3 に示した)。精巣では男性ホルモン T、卵巣では女性ホルモン E2 が主に合成される。

1-2-2 男性・女性ホルモンが記憶力に及ぼす作用

男性・女性ホルモンは、記憶力を変化させることが知られている。この作用は遅い作用(数時間~日単位)と急性作用(数分~1,2時間程度)に大別される。遅い作用は主に新規の遺伝子転写を伴う作用であり、急性作用は細胞(特に神経シナプス)内のリン酸化カスケードを駆動する作用である。

遅い作用については、例えば、卵巣を摘出するとメスラット海馬内の CA1 領域の樹状突起スパイン(後シナプス)の密度(Gould et al., 1990, Woolley and Schwartzkroin, 1998)、およびスパイン-シナプスの数(Leranth et al., 2002, Leranth et al., 2004, MacLusky et al., 2005)が減少する。さらに、卵巣摘出後のスパイン密度の減少とともに、記憶力が低下する(Wallace et al., 2005)。

卵巣摘出した動物に女性ホルモン E2 を皮下投与で補充すると、新規物体探索テストなどの海馬依存的な記憶課題のスコアが回復する(Luine et al., 2003, Sandstrom and Williams, 2004, Sinopoli et al., 2006)。また、神経スパインの密度、および、神経スパイン-シナプスの数も回復する(Hao et al., 2003) (Woolley and McEwen, 1993, Tang et al., 2004, MacLusky et al., 2005)。

また、男性ホルモンについても同様の効果が報告されている。3ヶ月齢のオスラットにおいて、海馬内のスパイン-シナプス数、あるいはスパイン数は去勢をすることにより、通常約 50%に減少するが、男性ホルモン T や DHT を皮下投与で補充すると回復する(図 1-4) (Leranth et al., 2003, 平櫛絢子, 2014)。

上記の遅い作用に加えて、近年、性ステロイドホルモンには急性作用があることが明らかになってきた(Ogiue-Ikeda et al., 2008, Mukai et al., 2010, 畑中悠佑, 2010)。若齢(3ヶ月齢)オスラットの海馬スライスに男性ホルモン T、DHT、または、女性ホル

モン E2 を加えて 2 時間インキュベーションすると、海馬 CA1 領域のスパイン密度が 20-40%増加する(Mukai et al., 2007, Mukai et al., 2011, Hatanaka et al., 2014)。電気生理学的手法を用いた実験では、女性ホルモン E2 を 30 分作用させると、LTP の増強率, LTD の抑圧率を急性的に増強する(Mukai et al., 2007, Hasegawa et al., 2015)。

以上のことから、性ステロイドホルモンは、記憶・学習に影響を与える重要な因子であることがわかる。

1-2-3 老化に伴う記憶力の低下に対する男性・女性ホルモンの回復効果

女性は老化により閉経をすると血中の女性ホルモン（エストロゲン）濃度が大きく減少する。それとともに、認知機能の低下も観察される。閉経直後の女性に対して女性ホルモンの補充を行うと認知機能の改善が見られる(Morrison et al., 2006)。また、更年期に伴う女性ホルモン濃度の急激な減少は、シナプスにおける NMDA 受容体の発現および局在状態を変化させ、これが認知機能の低下を引き起こしているのではないかと示唆されている(Adams et al., 2001, Adams et al., 2004)。

一方、男性では老化をすると男性ホルモンの一種である T 濃度が加齢とともに低下する。しかし、老齢の男性に男性ホルモン補充を行った場合の認知機能改善に関する研究は行われていない。オスの老齢ラット（22 ヶ月齢）に T を補充すると、作業記憶の改善が見られる(Bimonte-Nelson et al., 2003)。このように、動物実験のレベルでは、老化に伴う認知機能の低下に対して、男性ホルモンが効果を発揮することはわかっているが、女性ホルモンと認知機能の関係における研究に比べると歴史が浅く、作用機構や分子メカニズムなど、不明な点が非常に多い。

1-3 海馬自身が合成する男性・女性ホルモン（局所合成系）

1-3-1 海馬自身が合成する男性・女性ホルモンとその作用

従来、男性・女性ホルモンの記憶力への影響を研究する場合、男性ホルモンは精巣で、女性ホルモンは卵巣で合成され、血流を通じて、海馬に作用するものだと考えられてきた。この描像では、海馬は性ホルモンの単なる標的器官に過ぎない。しかし、川戸研究室の 3 ヶ月齢（若齢）オスラットを用いた研究により、海馬を初めとする脳内に独自の男性・女性ホルモン合成系が存在することが明らかとなった(Kimoto et al., 2001, Kawato et al., 2002, Hojo et al., 2004, Kimoto et al., 2010)。

これら男性・女性ホルモン合成酵素および受容体は、グルタミン酸神経細胞に多く発現している（図 1-5）(Hojo et al., 2004, Mukai et al., 2007, Hojo et al., 2009)。また、局所合成することにより、オスラット海馬内では、女性ホルモン E2 が血中の 800 倍、男性ホルモン DHT が血中の 10 倍という高濃度で存在する(Hojo et al., 2009)。

海馬自身が合成する性ホルモンは、血中からの性ホルモン供給を断ち切った状態でも効果を発揮する。例えば、ラットに低強度の運動を 2 週間行わせると、海馬 DG において新生する神経細胞の数が増える。これは海馬自身が合成する男性ホルモン DHT の量

が増加することで引き起こされるが、精巣を摘出して血中からの男性ホルモン T, DHT (T は DHT の前駆体) 供給をなくしてもこの現象が起こる(Okamoto et al., 2012)。すなわち、海馬自身でコレステロールから DHT に至る合成を行って、神経細胞を新生している。また、ラット海馬スライスに女性ホルモン合成酵素 P450arom の阻害剤を 30 分作用させると、LTP が抑制される(Tanaka and Sokabe, 2012)。

これらのことから、性ホルモンが海馬に作用する場合、血中の寄与よりも海馬自身の合成した性ホルモンの寄与の方が大きいと考えられる。

1-3-2 男性・女性ホルモン合成酵素

この節では、海馬における男性ホルモン T, DHT、および、女性ホルモン E2 を合成する経路の各ステップにおける合成酵素について詳述する。

男性・女性ホルモンの合成に関わる酵素群は、シトクロム P450 (cytochrome P450) 酵素群、水酸化ステロイド脱水素酵素 (HSD; hydroxysteroid dehydrogenase) 群、ステロイド還元酵素 (steroid reductase) 群に大別される。

海馬内において T, DHT、E2 は、以下に述べる代謝経路(1)-(6) を経て合成される。この代謝経路の番号は図 1-3 の代謝経路図に示した番号を示す。

1-3-2-1 代謝経路(1): 合成酵素 P450scc (*Cyp11a1*)、代謝産物: コレステロールから PREG

P450scc (遺伝子名: *Cyp11a1*) は、コレステロールの側鎖を切断し、プレグネノロン (PREG) に変換をする酵素である。脳では P450 scc の mRNA 量が末梢内分泌器官の約 1/10000 以下と非常に低いとされてきたことから、この初期段階の活性の検出は困難であり、世界中の研究室が、「脳内ではステロイド合成は行われていない」と考える原因になっていた。P450scc 遺伝子は、9 個のエクソンから構成されている。コード領域は、第 1 エクソンから第 9 エクソンであり、526a.a.長のタンパク質をコードしている。

1-3-2-2 代謝経路(2): 合成酵素 3 β -HSD I (*3 β -HSD I*)、代謝産物: PREG から PROG

3 β -HSD は、PREG から PROG を合成する酵素である。ステロイドホルモンは、ステロイド骨格 A 環が芳香化されているか、3 位にケト基を持つステロイドである。これらのステロイドホルモンがコレステロールから合成されるためには、3 位水酸基の脱水素化および Δ^5 異性体化が必要であり、この反応を 3 β -HSD が行っている。3 β -HSD 遺伝子は、4 個のエクソンから構成されている。コード領域は第 2 エクソンから第 4 エクソンであり、373a.a.のタンパク質をコードしている。ラットの 3 β -HSD は、4 種類のタイプ (I、II、III、IV) が同定されている、ただし、成獣オスラットの海馬では 3 β -HSD I (遺伝子名: *3 β -HSD I*) のみが確認されている(Kimoto et al., 2010)。それゆえ、本研究では *3 β -HSD I* を解析した。

1-3-2-3 代謝経路(3) : 合成酵素 P450(17 α) (*Cyp17a1*)、代謝産物 : PROG から ADione

ステロイドホルモン合成経路には、ストレス (ステロイド) ホルモン合成経路と男性・女性 (ステロイド) ホルモン合成経路が存在する。男性・女性ホルモンは炭素 19 のステロイド化合物で C17-C20 の間の炭素結合が切断されている。この C17-C20 位の切断を C17 位の水酸化を介して行う酵素が P450 (17 α)である。この反応は不可逆反応であるため、P450(17 α)は男性・女性ホルモン合成経路への分岐点を担っている。P450(17 α) (遺伝子名: *Cyp17a1*) は、PREG からデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) または PROG からアンドロステンジオン (ADione) へと変換をする酵素である。P450(17 α)は、8 個のエクソンから構成されている。コード領域は第 1 エクソンから第 8 エクソンであり、507a.a.長のタンパク質がコードされている。

1-3-2-4 代謝経路(4) : 合成酵素 17 β -HSD 1 (*Hsd17b1*)と 17 β -HSD 3 (*Hsd17b3*)、代謝産物 : ADione から男性ホルモン T

17 β -HSD は 17 β -水酸基の脱水素化または 17 位ケト基の還元化を行う酵素である。一般的に男性・女性ホルモンとも 17 β 水酸化体が 17 ケト体よりも受容体に対する親和性および活性が強い。それゆえ、17 β 位水酸化体である男性ホルモンのテストステロン、女性ホルモン E2 は活性の強い (活性型の) 性ステロイドであり、17 ケト体である男性ホルモンの ADione、女性ホルモンのエストロン (E1) は活性の弱い (不活性型の) 性ステロイドである。17 β -HSD は活性型と不活性型の性ステロイドホルモン間の変換を行う酵素であり、前受容体レベルの性ステロイドホルモン活性の調節を行っている。このことから、17 β -HSD は性ステロイドホルモンの活性調節を行う面で非常に重要な酵素である。

ラットの 17 β -HSD は 8 種類のサブタイプが存在することが知られている (Kimoto et al., 2010)。主に、type1, 3, 7 は、17 位水酸化反応を担っており、不活性型の性ステロイドホルモンを活性型に変換する。逆に、type2, 4, 8, 10, 11 は、17 位ケト化反応を担っており、活性型性ステロイドホルモンを不活性型に変換している。本研究では、これら 8 種類のサブタイプの中で、特に重要な活性型の性ステロイドホルモン合成酵素で T および E2 の合成を行う 17 β -HSD の type1, 3 に着目をして発現量解析を行った。

17 β -HSD 1 (遺伝子名: *Hsd17b1*) は、DHEA からアンドロステジオール (ADiol; androstenediol、ADione から男性ホルモンである T、E1 から女性ホルモンである E2 を合成する酵素である。エストロンの 17 位のケト基を還元し、 β 配位水酸基に変換することで女性ホルモンの活性型を合成する。ヒトの 17 β -HSD 1 は、E1 から E2 への変換が主であるが、げっ歯類の 17 β -HSD 1 には活性の弱い男性ホルモンである ADione を活性の強い男性ホルモンである T に変換する酵素活性も持っている (Puranen et al, 1997)。末梢組織では、主に卵巣に高発現している。17 β -HSD 1 は海馬内の T 合成に関与していることから、老化にともなう T 産生を調べる上で重要な酵素である。

17 β -HSD 1 遺伝子は、6 個のエクソンから構成され、コード領域は第 1 エクソンから第 6 エクソンにおよび 344 a.a.長のタンパク質をコードしている。

17 β -HSD 3 (遺伝子名: *Hsd17b3*) は、DHEA から ADiol の合成、ADione から男性ホルモンである T、そして E1 から女性ホルモンである E2 を合成する酵素である。末梢組織では主に、精巣に高発現をしており、他の 17 β -HSD サブタイプと比較して ADione→T の変換活性が強い。ラットの *Hsd17b 3* は、11 個のエクソンから構成されている。コード領域は、第 1 エクソンから第 11 エクソンであり、306a.a.長のタンパク質をコードしている。

1-3-2-5 代謝経路(5) : 合成酵素 5 α -reductase 1 (*Srd5a1*) と 5 α -reductase 2 (*Srd5a2*)、代謝産物 : 男性ホルモン T からより強力な男性ホルモン DHT

5 α -reductase は、T をより強力な男性ホルモンである DHT に変換する。5 α -reductase の存在は、男性ホルモン作用をより増大させることを意味している。5 α -reductase には、type1 と type2 の 2 種類のサブタイプが存在する。5 α -reductase 1 はテストステロンに対する親和性や活性は低いが発現量が多いという特徴がある。一方で、5 α -reductase 2 に関しては、発現量は type1 に比べて少ないが T に対する親和性や活性が高いという特徴がある (Normington and Russell, 1992、Mahendroo and Russell, 1999)。

5 α -reductase 1 (遺伝子名: *Srd5a1*) は、5 個のエクソンから構成されており、第 1 エクソンから第 2 エクソンにあり、255 a.a.長のタンパク質をコードしている。

5 α -reductase 2 (遺伝子名: *Srd5a2*) は、第 1 エクソンから第 2 エクソンにあり、254 アミノ酸.長のタンパク質をコードしている。5 α -reductase1 との相動性は低くアミノ酸レベルで約 42%である。

1-3-2-6 代謝経路(6) : 合成酵素 P450arom (*Cyp19a1*)、代謝産物 : 男性ホルモン T から女性ホルモン E2

P450arom (遺伝子名: *Cyp19a1*) は、ADione から E1 の合成、またはテストステロンから E2 の合成を行う酵素である。ラットの海馬内では、主に T から E2 の合成を行っている。ステロイドの A 環の芳香化を行い、末梢組織では卵巣に高発現している。*Cyp19a1* は、10 個のエクソンから構成され、コード領域は第 2 エクソンから第 10 エクソンにあり、508a.a.長のタンパク質をコードしている。また、非コード領域である第 1 エクソンは複数個存在することが知られている。それぞれが異なるプロモーターに制御され、組織・時期特異的な発現や制御を担っている(Yamada-Mouri et al., 1996、Young and McPhaul, 1998)。さらに、脳では大脳皮質型 P450arom 遺伝子が発現しており、第 4 イントロンから転写が始まる産物が存在している(Yamada-Mouri et al., 1997)。現在のところ、この産物がタンパク質に翻訳されるか、翻訳産物が女性ホルモン合成活性を持つかは不明である。しかし、全長型と大脳皮質型 P450arom の量比か

ら、大脳皮質型の発現量と女性ホルモン合成活性には相関がなく、全長型の P450arom の発現量と相関があることが分かっている。

1-3-3 男性・女性ホルモン受容体

前節で述べた代謝経路を経て合成された男性ホルモン、女性ホルモンはそれぞれの受容体に結合して作用を発揮する。この節では、海馬における男性ホルモン受容体 (AR; androgen receptor)、および、女性ホルモン受容体 (ER; estrogen receptor) について詳述する。

性ステロイドホルモン受容体には、アンドロゲン受容体 (AR; androgen receptor)、エストロゲン受容体 (ER; estrogen receptor)、プロゲステロン受容体 (PR; progesterone receptor) がある。末梢組織において主に、AR は精巣、ER は卵巣、PR は子宮に高発現している。AR、ER、PR は、いずれもリガンドの結合によって活性化される細胞質・核内受容体である。リガンド非存在下の時、受容体タンパク質はいくつかのシャペロン分子 heat shock protein (hsp) 90、hsp70、hsp40 などと複合体を形成している。この受容体とシャペロン分子の相互作用は、ステロイドホルモンが受容体に結合をするために必須である。

リガンドが受容体と結合をすると、受容体タンパク質は立体構造変化を起こし、シャペロン分子から解離し、二量体化する。二量体になった後、核内へ移行し、DNA 上の標的遺伝子のプロモーター領域にある応答配列に結合する。その後、転写共役因子複合体を形成して、標的遺伝子の転写を行い、神経シナプス形成に必要な PSD-95 や NMDA 受容体などのタンパク質を合成する。一方で、近年では、細胞質近傍でシグナル伝達分子と相互作用し、リガンド依存的に急性的なシグナル伝達経路を活性化することも明らかになっている (Tabori et al., 2005, Tsurugizawa et al., 2005, Mukai et al., 2007, Spencer et al., 2008, Mukai et al., 2010)。実際、神経細胞においても川戸研究室などの解析から神経情報伝達の間であるスパインの膜近傍に AR、ER、PR が局在することと、プロテインキナーゼを活性化させることによりシナプスが増加したり、長期増強 (LTP; long-term potentiation) が生じ神経細胞間のシナプスでの伝達効率が上昇したりすることが判明している。

1-3-3-1 作用経路(A) : 男性ホルモン T または DHT → 受容体 AR (*Ar*)

哺乳類において、男性ホルモン受容体である AR (遺伝子名: *Ar*) は 1 種類存在する。AR は男性ホルモンである T と DHT をリガンドとする受容体である。ラットの *Ar* は、8 個のエクソンから構成されている。コード領域は第 1 エクソンから第 8 エクソンであり、902 アミノ酸 (a.a.; amino acid) 長のタンパク質をコードしている。リガンドとしては主に男性ホルモンである T と DHT がある。T および DHT は、アンドロゲン受容体を介して様々な作用を発揮する。DHT は、T よりも解離速度が遅いため、T よりも約 3 倍強い男性ホルモンとしての活性を持つ。

近年、川戸研究室の研究により、AR が海馬内の神経細胞の樹状突起にあるスパイン（後シナプス）にあることが判明した(Hatanaka et al., 2014)。また、AR が T、DHT による急性的なスパイン増加に関与していることも明らかとなってきた(Mukai et al., 2011, Hatanaka et al., 2014)。

1-3-3-2 作用経路(B) : 女性ホルモン E2 → 受容体 ER α (*Esr1*)または ER β (*Esr2*)

ER α (遺伝子名: *Esr1*) は、哺乳類で 2 種類知られる女性ホルモン受容体の一つである。ER α は、女性ホルモンである E2 をリガンドとしている受容体である。ラットの *Esr1* は、8 個のエクソンから構成されている。コード領域は第 1 エクソンから第 8 エクソンであり、600a.a.長のタンパク質をコードしている。ER α にはスプライスバリエントが存在し、ラットでは第 1 エクソンが欠損した 46 kDa のものと、第 4 エクソンが欠損している (TERP1; truncated estrogen receptor product 1) ものが知られている。TERP1 はリガンド結合し二量体化はするが、DNA 結合能が失われているため、遺伝子転写の調節はできない (Friend et al, 1995、Resnick et al, 2000)。

従来、*in situ* hybridization 法や免疫組織染色法の解析から、ER α は海馬の hilus やインターニューロンにのみ発現し、CA1-3 領域錐体神経細胞や DG の顆粒神経細胞には局在しないと考えられてきた(Weiland et al., 1997, Orikasa et al., 2000)。しかし、これらの研究で用いた抗体やプローブの質が正しく吟味されていなかったために、結果の信頼性に対する疑問を否定しえなかった。そこで、川戸研究室では、特異性の高い精製抗体 (RC-19; C 末端 19 アミノ酸抗体に対する抗体) の作成に成功し、これを用いた高感度免疫組織染色解析と免疫沈降・質量分析解析により、CA1-3 領域の錐体神経細胞や DG 領域の顆粒神経細胞に ER α が発現していることを発見し、ER α が脳内の性ステロイドホルモン合成系と共局在していることを明らかにした(Ishii et al., 2007, Mukai et al., 2007)。これにより、脳内の神経細胞でも E2 は局所合成され、その E2 が自己・近接に分泌され、性ステロイドホルモンとしてではなく、神経栄養因子として働いていることが示唆された。さらに、同抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察によって、ER α が海馬の神経細胞における樹状突起のスパイン（シナプス後部）にあることも判明した。また、ER α が E2 による急性的なスパイン新生に関わっていることも明らかとなってきた(Mukai et al., 2007, Kimoto et al., 2010)。

ER β (遺伝子名: *Esr2*) は、哺乳類で 2 種類知られている女性ホルモン受容体の一つであり、女性ホルモン E2 をリガンドとしている受容体である。*Esr2* は、8 個のエクソンから構成されている。コード領域は第 1 エクソンから第 8 エクソンであり、485a.a.長のタンパク質をコードしている。

ER α とは、DNA 結合領域とリガンド結合領域は類似しているため、高い類似性を持つ。しかし、ER α と ER β では N 末端の転写調節領域が異なるため、細胞およびプロモーター依存的に異なる作用様式となっている。また、ER β は選択的スプライシングにより、いくつかのアイソフォームが存在する。それらは、ER β 1、ER β 2 として知られ

ている。これらはホモ・ヘテロダイマーを形成するため、ER β はタイプ・アイソフォームの組み合わせにより多様な調節機構を保持している特徴がある。

ER α および ER β は、ホモ二量体またはヘテロ二量体を形成し、その作用を発揮する。その作用活性は、サブユニットの組み合わせによって大きく異なるため、細胞内の *Esr1* および *Esr2* の発現量とその発現量比、アイソフォームの存在やそれらの組織内局在に応じて異なると考えられる。よって、脳内での ER 存在量、サブタイプやアイソフォームの存在比が異なることは、脳内の各部位でエストロゲンの作用やその活性が異なっていることを意味する。

1-3-4 老化に伴う脳内男性・女性ホルモン合成の変化についての先行研究

以上に述べたように、性ホルモンの減少は、老化に伴う記憶力低下を引き起こす重要な因子である。また、性ホルモンには精巣や卵巣由来だけではなく、海馬自身が局所的に合成するものが含まれ、後者の寄与が大きいことが推測できる。したがって、老化に伴う記憶力低下の原因解明のためには、海馬自身の性ホルモン合成系が、老化に伴ってどのように変化していくのかを解析する必要がある。

しかし、海馬に限らず、脳内の性ホルモン合成系やその受容体が老化に伴ってどのように変化していくかを研究した報告は少ない。現時点で報告されているのは、コレステロール輸送タンパク質 StAR (steroidogenic acute regulatory protein)、男性ホルモン受容体 AR や女性ホルモン受容体 ER β など、断片的な情報のみであり (Sierra et al., 2003, Wu et al., 2009, Yamaguchi and Yuri, 2012)、老齢の海馬における性ホルモン合成系の全容の解明には至っていない。

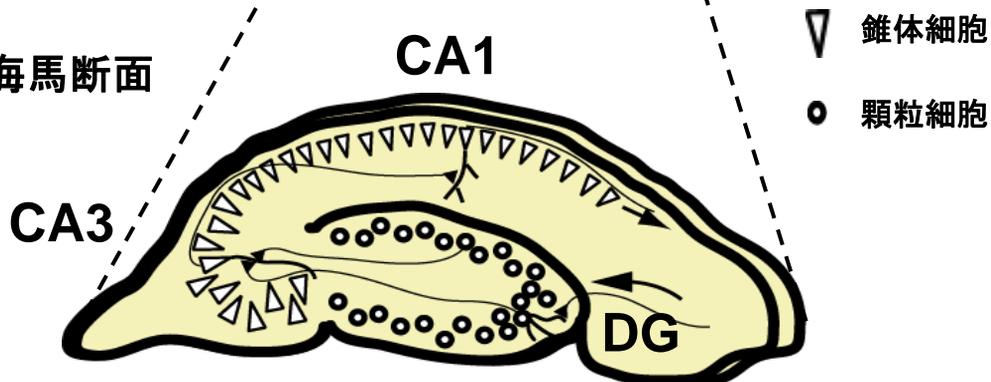
1-4 研究目的

論文共著者より公開の同意が得られていないため、公開できません。

(A) ラットの脳の模式図



(B) 海馬断面



(C) 海馬スライス

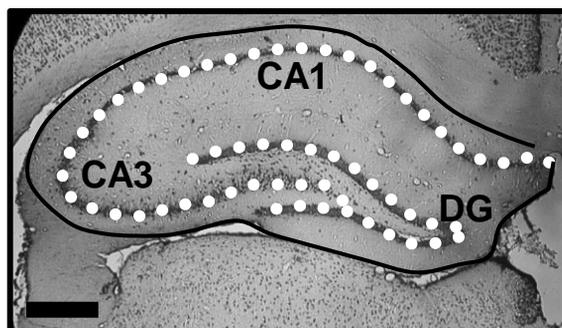


図1-1 海馬の位置と断面図

(A) ラットの全脳における海馬の位置を示した。海馬は大脳辺縁系に属し、左右一対存在する。

(B) 海馬の長軸方向断面図の模式図。CA (アンモン角) 領域には錐体神経細胞、DG (歯状回) には、顆粒神経細胞の細胞体が層を形成する。

(C) オスラット3ヶ月齢の海馬スライスをNeuN抗体を用いて染色した。NeuN抗体は分化した神経細胞核を特異的に反応する。神経細胞層は白い点腺のように並んでいる。

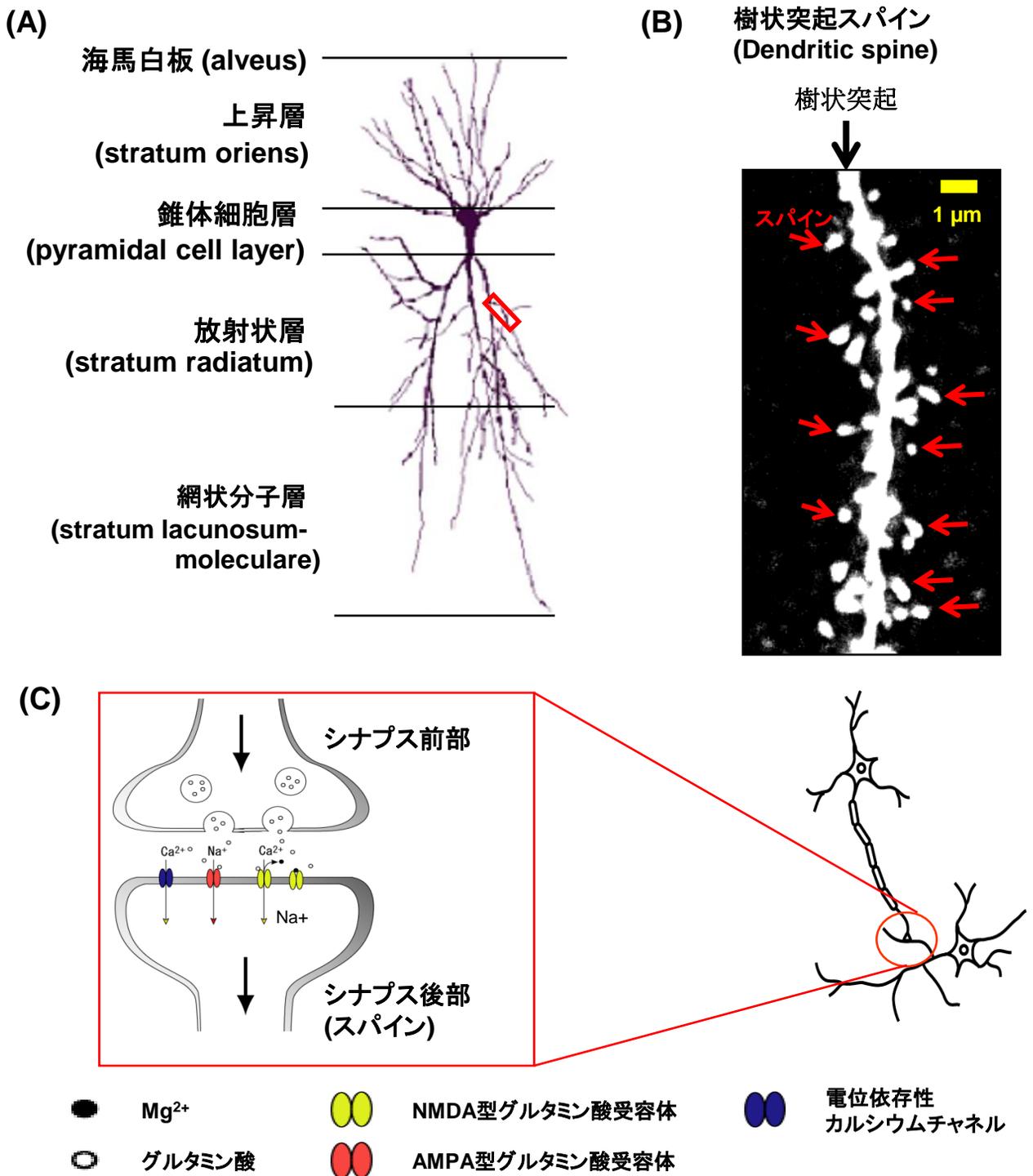


図1-2 海馬CA1錐体神経細胞と神経シナプス後部（スパイン）

(A) CA1領域の錐体神経細胞構造と各部位の名称。

(B) 共焦点顕微鏡で撮影された放射状層の第2分岐樹状突起上のスパイン。赤矢印がスパインを指している。

(C) 神経細胞シナプスの構造。スパインは神経細胞間の結合において、前神経細胞とシナプス結合を形成した後シナプス構造であり、記憶を蓄える部位である。スパインにはNMDA型受容やAMPA型受容体などのグルタミン酸受容体が発現しており、主にグルタミン酸性の興奮性刺激の入力の場合として機能している。

男性ホルモン合成系

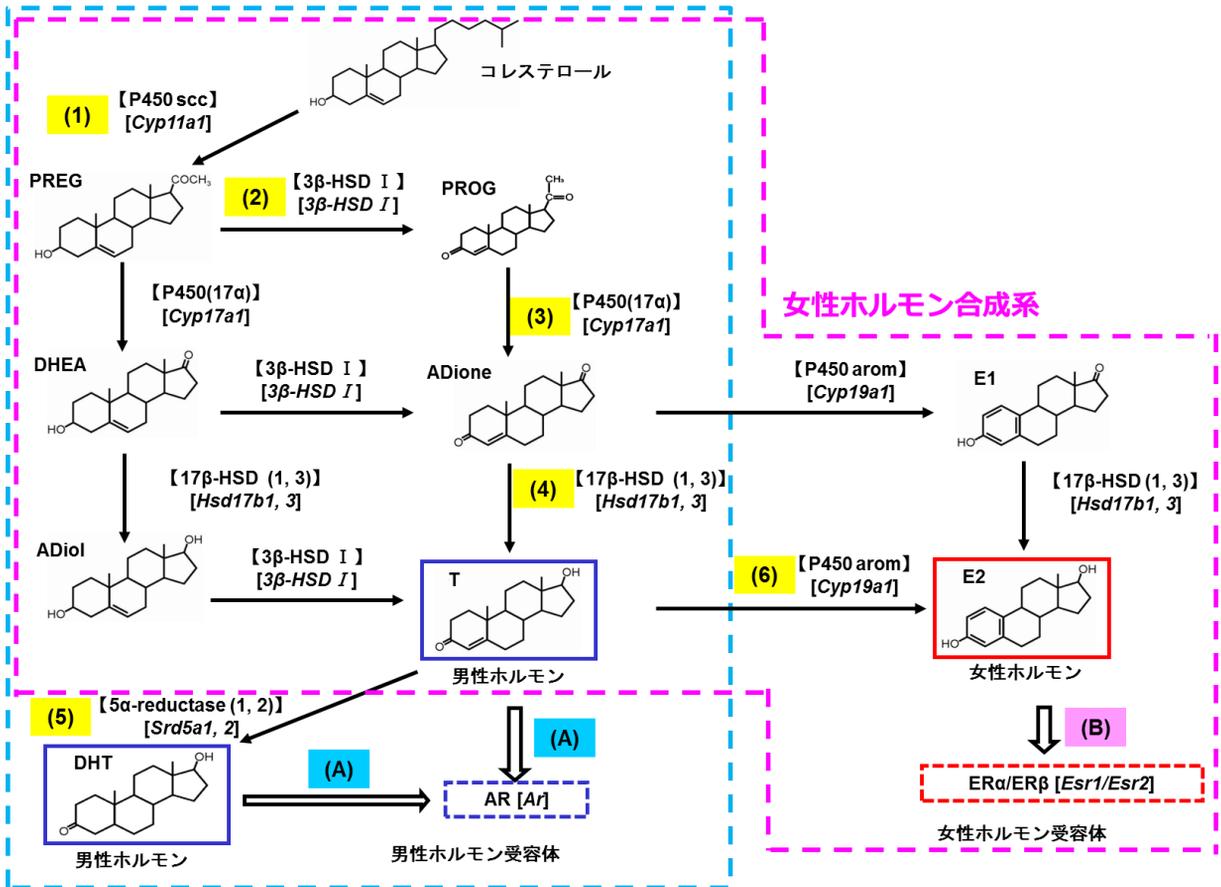


図1-3 成獣オスラットの海馬における男性・女性（ステロイド）ホルモン合成系

成獣オスラットの海馬における男性・女性ホルモン合成経路の模式図。男性ホルモン（T、DHT）、女性ホルモン（E2）は、上記の代謝経路（1）－（6）を経て、コレステロールから合成される。また、合成された男性ホルモン（T、DHT）は作用経路（A）で男性ホルモン受容体に、女性ホルモン（E2）は作用経路（A）で男性ホルモン受容体に、それぞれ結合して効果を発揮する。点線の枠内は、男性ホルモン合成系（水色）、女性ホルモン合成系（ピンク）を意味する。代謝経路（1）－（4）は男性・女性ホルモン合成系に共通する合成酵素である。

各ステロイドの間の【 】内は反応を触媒する酵素、[]内は遺伝子名、→合成酵素反応、⇒はホルモンの受容体への結合を意味する。

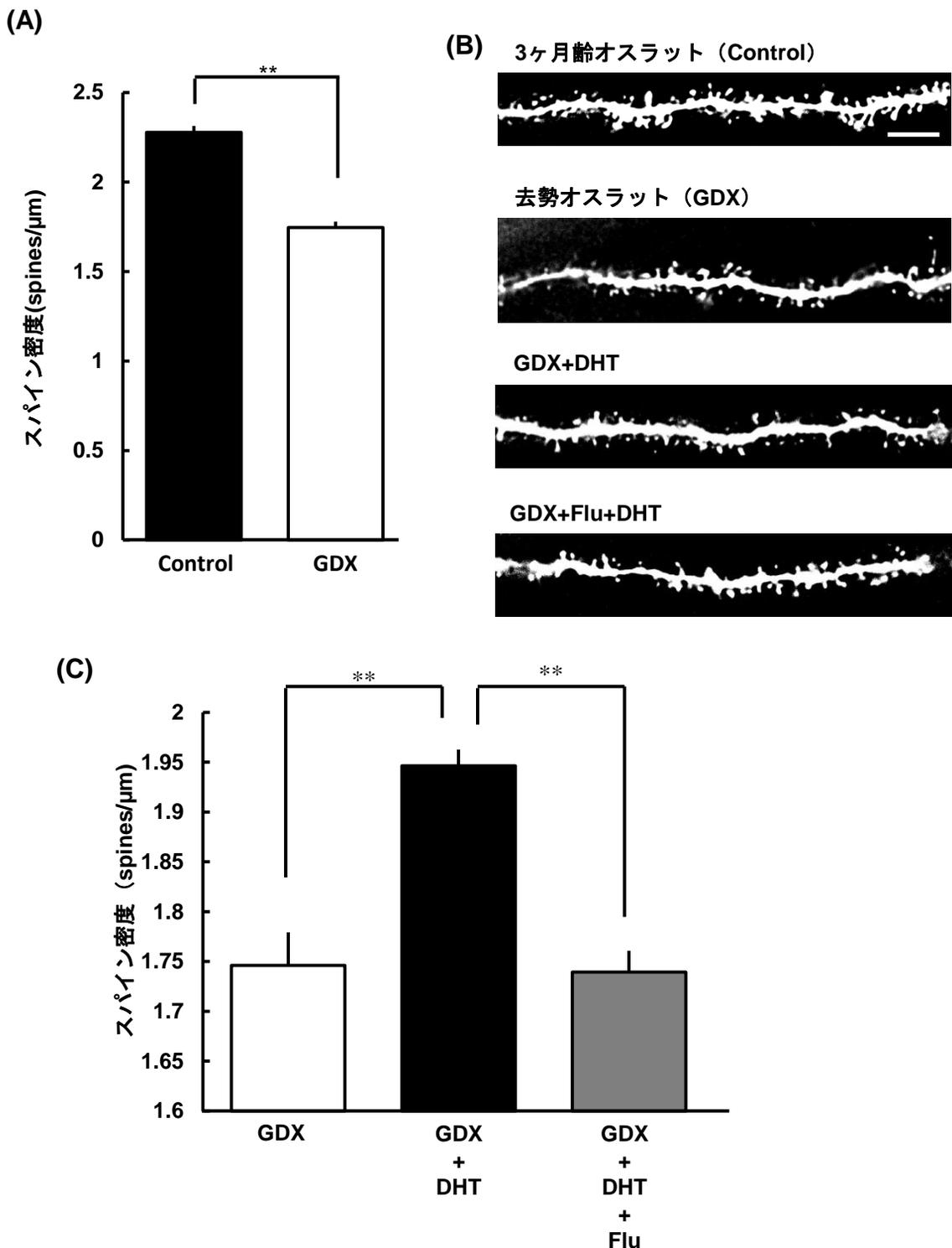


図 1-4 海馬の神経シナプス後部 (スパイン) 密度の維持には、男性ホルモンが重要である (平櫛, 2014、東京大学修士論文)

(A) 3ヶ月齢のオスラットを去勢すると海馬CA1領域のスパイン密度は約75%になる。

(B) 3ヶ月齢オスラット (Control)、精巣摘出ラット (GDX) GDXにDHT補充したラット (GDX+DHT)、DHTと男性ホルモン受容体 (AR) 阻害剤Fluを投与したラット (GDX+DHT+Flu) の代表的な樹状突起の共焦点顕微鏡画像。

(C) GDXラットにDHT補充をするとスパイン密度が約85%まで回復する。AR阻害剤Fluを投与するとDHTの効果が阻害されスパイン密度は回復しない。

Flu; flutamide (AR阻害剤)。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 、Scale bar: 5 μm 。

性ステロイド合成酵素は神経細胞にある (Hojo *et al*, 2004)

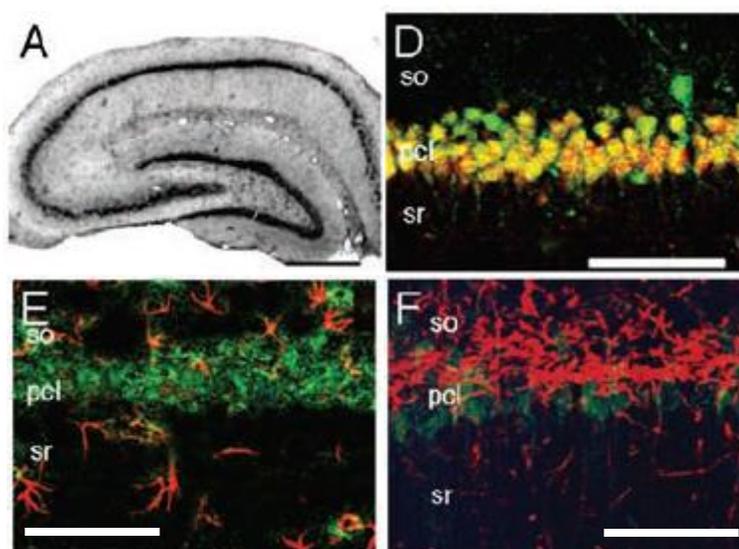


図 1-5 男性・女性ホルモン合成酵素は海馬のグルタミン酸神経に局在する (Hojo *et al*, 2004)

PREGからADioneを合成する酵素P450(17 α) (*Cyp17a1*のタンパク質) (図1-3: 代謝経路 (3)) の抗体染色を行い、海馬内におけるP450(17 α)の局在を調べたものである。P450(17 α)は海馬内のグルタミン酸神経に局在しており、グリア細胞には局在していないことが確認できる。

(左上) P450(17 α)で染色したもの。スケールバー800 μ m。

(右上) P450(17 α)[緑]、NeuN[赤]。神経細胞にP450(17 α)が発現しているのが確認できる[黄]。

(左下) P450(17 α)[緑]、GFAP (glial fibrillary acidic protein) [赤]。スケールバー120 μ m。

(右下) P450(17 α)[緑]、MBP (myelin basic protein) [赤]。スケールバー120 μ m。

下段の2枚の写真より、グリア細胞であるアストログリア (GFAP染色)、オリゴデンドロサイト (MBP) には、P450(17 α)が共局在していないのが確認できる。3ヶ月齢のオスラットではP450(17 α)が、グリア細胞ではなく、神経細胞に発現している。

第2章 実験手法

2-1 実験動物

本研究では3ヶ月齢、12ヶ月齢、24ヶ月齢のWistar系オスラットを使用した。3ヶ月齢は埼玉実験動物供給所または東京実験動物供給所から購入した。12ヶ月齢と24ヶ月齢は、都立老人総合研究所老化機構研究部（現在：順天堂大学大学院医学研究科加齢制御医学講座 白澤卓二教授、千葉大学大学院医学研究院先先進加齢医学寄付講座 清水孝彦准教授）との共同研究を行い調達した。

全てのラットは購入および調達後、室温21～25℃、明暗周期12時間（明期：8時～20時）の環境で飼育した。飼育中、ラットには固形資料と水道水を自由摂取できる環境で与えた。また、購入および調達後は搬送に対するストレスの影響をなくすためと、飼育環境の差による影響を排除するために、1週間以上飼育してから屠殺した。屠殺法は、ジエチルエーテル麻酔下で断頭であり、日内変動の影響を排除するために10時～11時の間に行った。

2-2 質量分析を用いた海馬の男性・女性ホルモン濃度測定

海馬内と血中の男性・女性（ステロイド）ホルモン濃度を、質量分析法 LC-MS/MS（liquid chromatography-tandem mass spectrometry）を用いて測定した（図2-1）。海馬における質量分析のプロトコルの概略は、図2-2に示した。定量した男性・女性ホルモンは、男性ホルモンであるテストステロン（T; testosterone）とジヒドロテストステロン（DHT; dihydrotestosterone）、および女性ホルモンであるエストラジオール（E2; 17β-estradiol）の3つである。

2-2-1 質量分析に用いた試薬の組成

buffer A (pH 7.2)

136.6 mM NaCl

2.5 mM CaCl₂ · 2H₂O

0.6 mM MgCl₂ · 6H₂O

0.6 mM MgSO₄ · 7H₂O

1 mM NaHCO₃

0.34 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O

0.44 mM KH₂PO₄

5.36 mM KCl

22.2 mM D-glucose

5 mM HEPES

pH 7.2 に調製し、95% O₂ / 5% CO₂ 混合ガスでバブリングを行い、酸素を飽和させた。

ステロイド抽出溶媒

2 vol. n-hexane

3 vol. ethyl acetate

C18 カラム溶出用溶液

1) DDW

2) 40 vol. methanol、60 vol. DDW

3) 85 vol. methanol、15 vol. DDW

4) methanol

HPLC 溶離液 1

100 vol. n-hexane

1 vol. acetic acid

HPLC 溶離液 2

80 vol. n-hexane

20 vol. 2-propanol

1 vol. acetic acid

HPLC サンプラー溶媒

98 vol. n-hexane

2 vol. 2-propanol

1 vol. acetic acid

HPLC 溶離液 1、HPLC 溶離液 2、HPLC サンプラー溶媒は調製後 30 分間のソニケーションによる脱気処理を行った。

LC-MS/MS 溶離液 A

0.1% formic acid

LC-MS/MS 溶離液 B

1 vol. acetonitrile

1 vol. methanol

2-2-2 男性・女性ホルモン測定に用いる試料（海馬、血漿）の調製

3、12、24 ヶ月齢のオスラットから血漿と海馬を採取し、(1) 血漿と (2) 海馬から抽出および精製した各（ステロイド）ホルモンを質量分析の試料とした。

(1) 血漿の採取：ジエチルエーテル麻醉下で断頭した直後のラットから体幹血を採取した（血液の凝固を防ぐため EDTA を少量加えた）。採取した血液を遠心（ $\sim 300 \times g$ 、 4°C 、10 分間）して、上清の血漿を試験管に分取し -30°C で保存した。

(2) 海馬の採取：血液の採取と並行し、同個体から海馬も採取した。95% O_2 / 5% CO_2 混合ガスで十分にバブリングした buffer A 中で海馬の摘出を行った。単離した海馬左右 1 対の湿重量を量り、4 mL の buffer A を入れた試験管に移した。この後のステロイド抽出過程におけるステロイドの分解・損失を考慮し、抽出効率を算出するために ^3H 標識したステロイド ($^3\text{H-T}$ 、 $^3\text{H-DHT}$ 、 $^3\text{H-E}_2$) を 20,000 cpm 加えた。

2-2-3 海馬からの男性・女性ホルモン抽出

採取した海馬組織は、氷上にてテフロンホモジナイザーを用いて穏やかにホモジナイズした。海馬ホモジネートの 2 倍量のステロイド抽出液（ヘキサン：酢酸エチル = 2：3 の混合溶液）を加え 10 分間攪拌した後、遠心分離（ $\sim 80 \times g$ 、室温、10 分間）し、有機層に溶出したステロイドを回収した。男性・女性（ステロイド）ホルモンの抽出操作は、各試料 3 回行い一つにまとめた。溶媒を完全に蒸発させ、 C_{18} カラム溶出用溶液（メタノール：DDW = 40：60）1 mL に溶かした。得られたステロイド抽出液から C_{18} Amprep minicolumns (Amersham) を用いて、以下の手順により夾雑物を除いた。

(1) カラムの前処理

- | | |
|-------------------------|---------------|
| (1-1) メタノール | 5 mL をカラムに通す。 |
| (1-2) DDW | 5 mL をカラムに通す。 |
| (1-3) メタノール：DDW = 40：60 | 5 mL をカラムに通す。 |

(2) 抽出液の導入

海馬から調製した（ステロイド）ホルモン抽出液 1 mL をカラムに導入する。

(3) ステロイドの溶出

- | | |
|------------------------------------|--------------------|
| (3-1) メタノール：DDW = 40：60 | 5 mL で溶出し、溶出液を集める。 |
| (3-2) メタノール：DDW = 85：15 | 5 mL で溶出し、溶出液を集める。 |
| (3-3) (3-1) と (3-2) を合わせて一つの試料とする。 | |

C_{18} カラム精製後、(3-3) の溶媒を蒸発させ、エタノール 1 mL に（ステロイド）ホルモンを溶解した。

2-2-4 順相 HPLC によるステロイド分離

高速液体クロマトグラフィー (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) は、固定相 (カラム) に対する親和性の差によって物質の溶出時間が異なることを利用して物質の分離を行う方法である (図 2-3)。固定相にはシリカゲルの充填された順相シリカゲルカラム (0.46 x 15 cm, Cosmosil 5SL (Nacalai Tesque Inc.)) を、移動相にはヘキサン、イソプロパノール、酢酸の混合液を用いた。カラム内を通過する物質のうち、シリカゲルと親和性の高い (極性の高い) 物質ほどカラム内に長くトラップされる。移動相 (溶離液 1 と 2 の混合液) の溶液組成をプログラムに従って変えることで、分離能を保ちつつ全体の溶出時間を短くする工夫を行った (図 2-4)。

遠心式濃縮機 (VC-96N [TAITEC]) を用いて、前節で調製したステロイド溶液の溶媒 (エタノール) を完全に蒸発させた。これにヘキサン : イソプロパノール : 酢酸 = 98 : 2 : 1) を 200 μ L 加えてステロイドをボルテックスにより溶解した。これを HPLC 導入サンプルとした。その HPLC 導入サンプルを、HPLC システム (オートサンプラー : AS-2055、ミキサー : MX-2080-32、ポンプ : PU-2080 [日本分光]、フラクションコレクター : FC-202 (Gilson)) に導入し、各 (ステロイド) ホルモン画分 (T 画分、DHT 画分、E2 画分) に分画した。T、DHT、E2 の溶出時間は、あらかじめ、 ^3H -T、 ^3H -DHT、 ^3H -E2 のみからなるマーカーサンプルを HPLC に導入して特定した。この溶出時間から前後 3~4 分程度を各ステロイド画分とした。

2-2-5 質量分析 LC-MS/MS

質量分析には liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) システムを用いた (図 2-1)。LC 部が Agilent 1100 (Agilent Technologies)、MS 部が API-5000 (Applied Biosystems) であり、MS 部でのイオン化法は正イオン ESI (electro spray ionization) 法を用いた。また、分析計本体は二段階の分析 (MS/MS) が可能なトリプルステージ四重極型質量分析計である。第一のステージが親イオンの分離分析部、第二のステージがフラグメント生成用の衝突部、第三のステージがフラグメント化した娘イオンの分離分析部となっている。LC 部のカラムには Cadenza CD-C₁₈ column (3×150 mm、3 μ m、Imtakt Japan) を使い、オートサンプラーに HTC PAL (CTC Analytics) を用いた。

2-2-6 男性・女性 (ステロイド) ホルモンの誘導体化と LC 部への導入

本研究では MS (mass spectrometry) 導入時のイオン化効率を高め、検出感度を向上するために (ステロイド) ホルモンの誘導体化を行った。男性・女性 (ステロイド) ホルモン (誘導体) の構造と、LC-MS/MS の衝突部における開裂パターン・ m/z 値変化は、図 3-1B (T)、図 3-2B (DHT)、図 3-3B (E2) に示した。

E2 の誘導体化の方法は以下の通りである。まず HPLC で精製した E2 フラクションの溶媒をエバポレーターで蒸発させ、2.5% pentafluorobenzyl bromide/acetonitrile と

0.8% KOH/ethanol を 2:1 の割合で混合した反応試薬を 150 μ L 加え、53°C で 1 時間反応させた。溶媒を蒸発させた後、50 μ L の picolinic acid 懸濁液（最終濃度がそれぞれ 4% picolinic acid, 4% 4-dimethylaminopyridine, 2% 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride となるように、溶媒の tetrahydrofuran anhydrous に懸濁する。）と 20 μ L の triethylamine を試料に加え、室温で 30 分間反応させた。反応生成物は 1% 酢酸に溶かし、Bond Elute C₁₈ column (Varian) を用いて精製した。これを乾燥させ、溶離液に溶かして LC 導入のサンプルとした。

T と DHT の誘導体化の方法は以下の通りである。HPLC で精製したフラクションの溶媒を蒸発させ、上述した 50 μ L の picolinic acid 懸濁液と 20 μ L の triethylamine とともに、室温で 30 分間反応させた。反応生成物は 80% acetonitrile に溶かし、Bond Elute C₁₈ column を用いて精製した。これを乾燥させ、溶離液に溶かして LC 導入のサンプルとした。

2-2-7 LC-MS/MS ポンププログラム

溶離液 A と溶離液 B を以下のようなプログラムに従って混合し送液した。溶離液の流速は 0.4 mL/min であった。

E2 のプログラム

0.00~4.00 分	溶離液 A：溶離液 B = 40：60 → 5：95 (線形勾配変化)
4.00~6.00 分	溶離液 A：溶離液 B = 5：95 → 0：100 (線形勾配変化)
6.00~7.50 分	溶離液 A：溶離液 B = 0：100
7.50~7.55 分	溶離液 A：溶離液 B = 0：100 → 40：60
7.55~9.00 分	溶離液 A：溶離液 B = 40：60

T、DHT のプログラム

0.00~4.00 分	溶離液 A：溶離液 B = 30：70 → 0：100 (線形勾配変化)
4.00~7.00 分	溶離液 A：溶離液 B = 0：100
7.00~7.05 分	溶離液 A：溶離液 B = 0：100 → 30：70
7.05~10.00 分	溶離液 A：溶離液 B = 30：70

2-2-8 男性・女性 (ステロイド) ホルモン誘導体のイオン化と検出

LC で分画された誘導体のイオン化条件は、イオンスプレー電圧: 5 kV、ターボガス温度: 600°C、噴霧ガス: 45 psi (picolinoyl 誘導体)、ターボガス: 55 psi (picolinoyl 誘導体)、分離電位: 90 V (E2-picolinoyl)、80 V (T-picolinoyl)、衝突ガス (Q2 衝突器): 窒素であった。安定同位体標識したステロイド誘導体を用いて m/z transition を測定することで溶出時間の校正を行った。m/z transition は、T-d₃-picolinoyl-ester が 397 → 256、DHT-d₃-picolinoyl-ester が 399 → 206、E2-¹³C₄-PFBz-17-picolinoyl (PFBz:

pentafluorobenzyl) が 562 → 343、であった。検出部では、T-17-picolinoyl-ester で 394 → 253、DHT-17-picolinoyl-ester で 396 → 203、E2-3-PFBz-17-picolinoyl-ester で 558 → 339、の m/z transition を測定した。ここで m/z の、m は質量、z は (ステロイド) ホルモン誘導体の電荷を意味する。

ステロイドの定量には multiple reaction monitoring 法を用いた。この方法では、第 1 質量分析計で親イオンが選択され通過する (例えば、E2 誘導体なら m/z = 558)。次にコリジョンにおいて窒素ガスとの衝突により誘導体が開裂し、断片化した娘イオン (E2 誘導体なら m/z = 339) が第 2 質量分析計で検出される。

溶出時間の校正と同様に安定同位体標識ステロイドを用いて、誘導体化、精製、MS/MS 検出の後における各 (ステロイド) ホルモンの検出の効率を求めた。効率は、T が 75±4%、DHT が 73±5%、E2 が 89±8%、であった。

2-2-9 検出真度 (accuracy) と定量限界 (limit of quantitation)

各ステロイドの検出真度と定量限界を表 2-1 にまとめた。検出真度は決まった量の標準サンプルを LC-MS/MS に導入し、それに対して実際に検出できた量の割合で求めた。また定量限界は決まった量の標準サンプルを流して検量線を引き、検出した信号強度と濃度の関係が線形になる下限と定めた。

2-2-10 抽出効率の計算

もとの組織に含まれていた男性・女性ホルモン濃度を求めるためには、(ステロイド) ホルモン抽出過程におけるステロイドの分解・損失を考慮し、抽出効率を計算しなければならない。抽出効率の測定のために、海馬をホモジナイズする前に、³H 標識した目的のステロイド 20000 cpm を加えた (2-2-2 参照)。HPLC による分離で集めたフラクション中に含まれる、³H のカウント数を液体シンチレーションカウンター (LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter (BECKMAN COULTER)) を用いて測定した。測定結果から以下の式に基づき抽出効率を求めた結果、抽出効率は T、DHT、E2 どれも 40~50%程度であった。

$$\text{抽出効率 (\%)} = \frac{\text{フラクション中のトリチウム (cpm)}}{20000(\text{cpm})} \times 100$$

2-2-11 男性・女性ホルモン濃度の算出法

質量分析により得られたデータから、図 2-2 に示した方法で男性・女性ホルモン濃度を算出した。

2-3 RT-PCR 法

RT-PCR 法のプロトコルの概略は図 2-5 に示した。mRNA 発現量解析は、全て 4 匹のラットから定量した。

2-3-1 RNA 抽出および電気泳動に用いた試薬

Ringar 液 (pH 7.4、290 mOsm)

25 mM NaCl

25 mM KCl

25 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O

100 mM CaCl₂ · 2H₂O

100 mM MgSO₄ · 7H₂O

10 mM Glucose

22.02 mM NaHCO₃

10 mM HEPES

TAE Buffer (Tris / acetate / EDTA)

40 mM Tris

40 mM acetic acid

1 mM EDTA (pH 8.0)

2% アガロースゲル

2% Agarose S

0.5 × TAE Buffer

2-3-2 total RNA 抽出

3、12、24 ヶ月齢オスラットをジエチルエーテル麻酔下で断頭し、0~4°Cに冷やした Ringar 液中で、すばやく全脳を取り出した後、大脳皮質、海馬、視床下部、小脳に分けた。ホモジェナイズを素早く行い RNA 分解を避けるため、眼科バサミで細かく組織を切り刻んだ後、ただちに液体窒素で急速凍結し、total RNA 抽出を行うまで-80°Cに保存した。total RNA 抽出効率を最大にするため 1 カラムあたりの組織重量を 60 mg 以下にした。

Total RNA 抽出は、SV Total RNA Isolation System (プロメガ) を用いて行った。-80°Cで保存し、凍っている組織へ SV RNA Lysis Buffer (+β-メルカプトエタノール) を 350 μL 入れ、素早くホモジェナイズした。total RNA 抽出作業は、常温で行った。この溶解液は SV RNA Lysis Buffer 1 mL に対して、5%β-メルカプトエタノール 20 μL を加えたものである。その後、SV RNA Dilution Buffer を加えて 70°Cで 5 分間インキ

ュベーションした。そこへクロロホルム 20 μL を加えて、ボルテックスを用いて、しっかりと混合した後、遠心 (15,000G、20 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分) し、カラムでは取り除けないタンパク質と脂質の除去を行った。上清に 99.5%エタノールを 200 μL を加えて混合した後、キットの付属品であるカラムチューブへ移し、遠心 (15,000G、20 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分) を行い、核酸以外の物質を除去した。この核酸溶液に SV RNA Wash Solution を 600 μL 加えて遠心 (15,000G、20 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分) して洗浄後、DNase Incubation Mix を 50 μL を加えて 15 分間反応させ、ゲノム DNA を分解した。DNase Stop Solution を 200 μL 加えて 1 分間反応させ DNA 分解反応を止めた。分解した DNA 分子を除去するため、Wash Solution を 600 μL 加えて遠心 (15,000G、20 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分) した。もう一度、Wash Solution を 300 μL 加えて遠心 (15,000G、20 $^{\circ}\text{C}$ 、2 分) し、total RNA 回収用のチューブへカラムを移動し、Nuclease-Free Waer を 200 μL を加えて遠心 (15,000G、20 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分) total RNA を回収した。

この total RNA サンプルを濃縮するため、以下の作業を行った。濃縮作業は、氷上で行った。total RNA サンプルの 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.4)、2.5 倍量の 99.5%エタノールを加えて、ボルテックスでしっかりと混合した後、核酸を析出させるため 1 時間 (-20 $^{\circ}\text{C}$) 静置した。その後、RNA を精製するため、80%エタノールを 1 mL 加えて遠心 (15,000G、4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分) し、上清を除去後、もう一度遠心 (15,000G、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分) した。沈殿物に Nuclease-Free Water を 60 μL (大脳皮質、海馬、小脳試料) または 30 μL (視床下部試料) 加えて、1 時間 (4 $^{\circ}\text{C}$) 静置し、RNA を溶解させ、逆転写反応を行うまで -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

2-3-3 逆転写反応

逆転写反応を行う直前に total RNA 濃度および純度は波長 260 nm および 280 nm での吸光度測定により total RNA 濃度および純度を定量した。260 nm の吸光度 $A_{260\text{ nm}}$ は RNA による吸光、280 nm の吸光度 $A_{280\text{ nm}}$ はタンパク質による吸光を反映する。それゆえ、 $A_{260\text{ nm}}$ と $A_{280\text{ nm}}$ の比、 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ を RNA の純度の指標とし、 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ が 1.8 以上のものを本研究の試料として使用した。

cDNA を作成するための逆転写反応には、oligo(dT)プライマーを用いた。逆転写反応試薬液は 1 試料あたり液量 25 μL に調節した。逆転写反応試薬液の組成は、total RNA 10 μg 、1 x RT buffer (東洋紡)、1 mM dNTP mixture (東洋紡)、1 μg oligo(dT)₁₅ (プロメガ)、20 U RNasin Plus (プロメガ)、100 U RTase (東洋紡) とした。反応液調製の際は、まず total RNA と Oligo(dT)₁₅ の混合液を 70 $^{\circ}\text{C}$ (5 分間) で反応させ、氷上 (4 $^{\circ}\text{C}$) で 1 分間冷却した後、上記の組成に調製した。逆転写反応は 42 $^{\circ}\text{C}$ (60 分) で行い、その後 15 分間 (75 $^{\circ}\text{C}$) 加熱し、反応を終了させた。

逆転写反応後、100 ng/ μL cDNA サンプル (total RNA 換算) の最終濃度が 100 ng/ μL となるように、2~4 U RNase H (タカラバイオ) を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ (30 分) で反応させ

て、PCR 反応を行うまで -20°C で保存した。

2-3-4 プライマーの設計

RT-PCR 発現解析では、発現の検出の際にプライマーの良し悪しにより結果が左右される。そのため、RT-PCR 発現解析には、プライマーの設計は非常に重要なポイントとなってくる。一般的に DNA ポリメラーゼは、プライマーの 5'側にミスマッチが存在していても 3'側で 2 本鎖が形成されていれば、そこをポリメラーゼ認識し、伸長反応を行ってしまう。そのため、プライマーの 3'側の配列は PCR 伸長反応の特異性を決定する上で非常に重要である。

従来のプライマー設計法では、3'側を配列特異的にすることと、プライマー内の相補鎖の形成や 2 次構造形成 (プライマーダイマーなど) を防ぐことなどに注意を払っている。従来の PCR 実験法の成書に掲載されているプライマー設計法では、それらがとても強調されて書かれている。しかし、実際の RT-PCR 反応中ではプライマーは雑多な cDNA のプールの中から相互作用を介して、特異的な鋳型を選び出す必要がある。この相互作用の強さおよび安定性はギブスの自由エネルギーという形で物理化学的なパラメーターに還元できる。そのため、プライマー配列から鋳型とプライマーの相互作用の強さおよび安定性を予測できれば (物理化学的なパラメーターを計算できれば)、プライマー設計に役立てることができると考えられる。

オリゴヌクレオチド DNA が相補鎖を形成した時の相互作用の強さおよび安定性の予測法には、再隣接の核酸配列の影響を考慮した再隣接熱力学法が存在し、これを用いた予測値と実際の観測値は非常に良い一致を見せることが知られている (Breslauer, 1986, SantaLucia, 1998)。そのため、本研究では、プライマー設計の過程で、プライマーと鋳型の相補鎖が形成された時の相互作用の強さおよび安定性を考慮するため、その計算法に再隣接熱力学法を用いた (図 2-6)。

RT-PCR による発現量解析に用いるプライマー設計では、RT-PCR の検出感度が高くなる場所にプライマーを設計することと、プライマーと標的配列が完全にマッチすることの 2 点が重要である。まず、検出感度を高めることは、プライマーと標的間の相互作用に伴うギブスの自由エネルギー ΔG を低くし、相互作用を安定にすることで可能になる。これは、 ΔG が安定な時には低い値を持つと定義しているためである。

一方で、ギブスの自由エネルギー ΔG を小さくする戦略は GC 含有率が高い部位にプライマーを設計することに繋がり、結果として特異性の低下を招くことになる。それゆえ、 ΔG が低すぎる場所に設計をしたプライマーは非特異的な増幅を引き起こすため発現解析には使用できない。実際の RT-PCR を用いた発現解析では、雑多な cDNA プールの中から標的を特異的に増幅させる必要があるため、特異性の高さも求められる。これらのことから、プライマー設計にあたってはプライマーと鋳型間の相互作用にともなうギブスの自由エネルギー ΔG を適当な指標付近に合わせる事が重要である。

本研究では、高い特異性と高増幅効率能を兼ね備えたプライマーの設計を行い、実験に使用した。プライマーの設計には、Primer Select [DNASTAR inc.]というソフトを用いた。本研究では、再隣接熱力学計算法を用いて、プライマーと相補鎖の安定性を評価することで、高い特異性と高増幅効率能を兼ね備えたプライマーの設計を実現化させた。再隣接熱力学計算法とは、再隣接の核酸配列の影響を考慮し求められたギブスの自由エネルギー ΔG を用いて、二本鎖 DNA の相互作用の強さおよび安定性を求める方法である(Breslauer et al., 1986, SantaLucia, 1998)。プライマー設計の際には、プライマーと標的 cDNA の相互作用に伴うギブスの自由エネルギー ΔG を鑄型全体で計算し、その平均値 (ΔG_0) を指標として用いた (およそ 20 塩基長のプライマーの場合には、 $\Delta G_0 = -40$ kcal/mol 程度となる)。プライマー設計の際には、3 つの特徴を持つように設計し、高増幅効率および高い特異性を持ったプライマーを作成した (図 2-6)。

① $\Delta G_{全体} < \Delta G_0$ として、鑄型とプライマー間の結合安定性を高める

使用するプライマー全体のギブスの自由エネルギー ΔG 全体が、その指標となる ΔG_0 よりも低く (安定性が高く) なるようにし、鑄型とプライマー間の結合安定性を高める。

②3'側の 5 塩基で特異性を決定

3'側の 5 塩基が標的 cDNA と相互作用した時の自由エネルギー $\Delta G_{5塩基}$ は、高めになるところに設計する。これは、経験的に $\Delta G_{5塩基} = \text{約} -9$ kcal/mol に設計すると良いとされている。

③プライマーの 5'側で増幅効率・ポリメラーゼ認識効率を決定

5'側の相互作用にともなうギブスの自由エネルギー ΔG は、 ΔG_0 よりも低くなるように設計する。①と②の条件を満たすと $\Delta G_{全体}$ は適切なところに落ち着き、結果的に③の条件を満たされる。ただし、③の条件を満たすことも重要なことである。

2-3-5 PCR 反応

PCR 反応液は 1 試料あたり液量を 25 μ L に調製した。PCR 反応液の組成は、100 ng cDNA (total RNA 換算)、1 x Buffer for Blend Taq (東洋紡)、0.2 mM dNTP mixture (東洋紡)、0.2 μ M forward primer、0.2 μ M reverse primer、0.625 U Blend Taq (東洋紡)、1 x Blend Taq Buffer (東洋紡) とした。PCR 反応は、3 step PCR で行い、変性ステップ (95°C、5 分) → [変性ステップ (95°C、30 秒) → アニーリングステップ (57 ~ 68°C、20 秒) → 伸長ステップ (72°C、30 秒)] x サイクル数 → 伸長ステップ (72°C、5 分) で行った。アニーリングステップの温度、定量解析を行ったサイクル数、cDNA が指数増幅しているサイクル数は表 2-2 に示す。

2-3-6 電気泳動

PCR 増幅産物を 0.5 x TAE Buffer 中で 2%アガロースゲル (アガロース S、ニッポンジーン) を用いて電気泳動した。1 レーンあたり泳動用サンプルを 6 μ L (PCR 産物を 5 μ L、6 x loading dye (東洋紡) を 1 μ L) 添加した。PCR 産物の大きさを確認するため、100 bp DNA Ladder Marker (東洋紡) を同時に泳動した。1 μ g/mL 臭化エチジウムブロマイド (EtBr) /0.5 x TAE Buffer 中で 1~1.5 時間静置し、DNA を染色した。画像ゲルを UV 照射にて、観察し、Printgraph (ATTO) で画像データを取得し、bmp 形式で保存した。取得した画像を画像解析ソフト Image J を用いて、PCR 産物のバンドの輝度を算出し、PCR 増幅産物の量を見積もった (図 2-7)。

電気泳動を行う際は、必ず 1 レーンに毎回同じ 3 ヶ月齢の海馬サンプルから行った PCR 産物を一緒に流し、それを 1 とすることで異なるゲル間の補正を行った。

2-3-7 PCR 産物の精製と配列確認

電気泳動後、PCR 産物をアガロースゲルより切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて DNA を精製した。

その DNA を pGEM-T-Easy vectors (Promega) に Ligation hight Ver. 2 (東洋紡) を用いて組み込み、TA クローニングを行った (図 2-8)。ライゲーション液の組成は、Ligation high Ver.2 (5 μ L)、pGEM-T Easy Vector (10 ng)、PCR 産物 (4 μ L) とし、ライゲーション反応を 8 時間 (16 $^{\circ}$ C) で行った。ライゲーション反応後のプラスミド溶液を用いて、大腸菌を形質転換した。ライゲーション液 (2 μ L) を大腸菌である XL-1Blue Subcloning Grade Competent Cell (20 μ L, *hsdR17*, *supE44*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *relA1*, *lac/F'* [*proAB⁺*, *lac I^q*, *lacZ* Δ M15:: Tn10(*tet^r*)]、Agilent Technologies) に加え、4 $^{\circ}$ C (30 分) に静置し、42 $^{\circ}$ C (1 分) でヒートショックを与えた。5 分ほど氷上で冷やした後、SOC 培地 (200 μ L, Promega) を加えて 1 時間 (37 $^{\circ}$ C) 振とう培養した。これを全量と 100 mM イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (100 μ L, 和光純薬)、X-gal (1 mg, 和光純薬) をアンピシリン (100 μ g/mL) 含有 Luria-Bertani (LB) 寒天培地 (Difco LB AGAR, MILLER, Becton, Dickinson and Company) にまき、37 $^{\circ}$ C で大腸菌を培養した。遺伝子が挿入されたプラスミドを保持する白色コロニーをチップでつつき、アンピシリン (100 μ g/mL) を含んだ液体 LB 培地 (2 mL, Difco LB Broth, Miller, Becton, Dickinson and Company) に入れ、12-16 時間 (37 $^{\circ}$ C) 攪拌しながらインキュベートした。その後、Wizard Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega) を用いて大腸菌よりプラスミド DNA を精製した。

シーケンス反応液は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、20 μ L に調製した。シーケンス反応液の組成は、1 x Buffer

for Big Dye (Applied Biosystems)、3.2 pmole T7 または Sp6 primer、450–900 ng プラスミド DNA、1 x Big Dye (Applied Biosystems) とした。シークエンス反応は、3 step PCR で行い、変性ステップ (96°C、1 分) →[変性ステップ (96°C、10 秒) →アニーリングステップ (50°C、5 秒) →伸長ステップ (60°C、4 分)] x 30 サイクル、で行った。シークエンス反応後は、精製を行った。3 M 酢酸ナトリウム溶液 10 µL、TE Buffer 80 µL、99.5% EtOH 250 µL、シークエンス反応液 20 µL を混合し、遠心 (15,000 x g、20°C、20 分) した。沈殿物に 70% EtOH 1 mL を加えて、遠心 (15,000 x g、20°C、5 分) し、乾燥させた。ただし、乾燥させすぎると DNA 配列が読めなくなってしまうため、乾燥させすぎないように注意した。純度の高いホルムアルデヒド 21-23 µL を加えて、75°C (5 分) 加熱した。そして、sequence 用のプレートにセットし、シークエンス反応により付けた DNA の蛍光シグナルを ABI PRISM 310 または ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzers (Applied Biosystems) を用いて検出・解析し、DNA 配列を決定した。

シークエンス反応に用いた T7 および Sp6 プライマーは下記の通りである。

T7 primer

5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

Sp6 primer

5'- CTATTTAGGTGACACTATAG -3'

2-3-8 増幅曲線の作成

PCR 反応では、サイクル数を徐々に増加させていくと PCR 産物が指数関数的に増加し、その後、産物は飽和相に達する。それゆえ、(半) 定量的な解析を行う場合、PCR 産物が指数関数的に増加する相と飽和相を区別し、産物が指数増幅する相にある条件下で PCR を行う必要がある。3 ヶ月齢のオスラットの海馬サンプル (n=4) を用いて、ターゲット遺伝子ごとに増幅曲線を作成した。増幅曲線は、各サイクル数で得られた PCR 産物をアガロースゲル上で電気泳動にて分離し、EtBr 染色を行い、横軸に PCR サイクル数、縦軸に産物の蛍光輝度を取り、片対数グラフにプロットすることで作成した。輝度の算出方法は次の 2-3-9 で述べる。直線近似があてはまるサイクル数の範囲を指数増幅の相とし、この中から定量解析を行うサイクル数を選んだ。各ターゲット遺伝子の指数増幅しているサイクル数、定量解析を行ったサイクル数は表 2-2 にまとめた。

2-3-9 mRNA 発現量解析方法

PCR を行ったサンプルをアガロースゲル上で電気泳動にて分離し、EtBr 染色を行い、UV 照射にて EtBr の蛍光を観察後、Printgraph (ATTO) で画像データを取得および bmp 形式で保存した。画像解析ソフト ImageJ を用いて、PCR 産物のバンドの輝度を算出した。輝度の算出方法は図 2-7 に示した (図 2-7)。PCR は各ターゲット遺伝子に

対して同じラットから 2 回 PCR を行い (duplicate)、その 2 回の輝度の平均値をそのラットのターゲット遺伝子の輝度値とした。この操作を異なるラット 4 匹で行い平均値を求めた。その平均値をターゲット遺伝子の輝度の平均値とした。その後、男性・女性ホルモン合成酵素および受容体などの値を *Gapdh* で規格化し、3 ヶ月齢の海馬を 100% としたグラフを作成した。

2-3-10 異なる合成酵素および受容体の mRNA 発現量比較方法

合成酵素および受容体の mRNA 発現量を調べる際には、酵素・受容体ごとに異なるプライマーを使用している。そのため、各プライマーの増幅効率や PCR 産物の長さ、サイクル数が異なるため、PCR 産物を電気泳動した時の蛍光輝度を単純に比較することはできない。異なる合成酵素および受容体の発現量を比較するためには、蛍光輝度、各プライマーの増幅効率、PCR 産物の長さ、サイクル数を考慮して、蛍光輝度の値を補正しなければならない。この補正方法は Kimoto *et al.*, 2010 に従った。その方法の詳細を以下に示す。

24 ヶ月齢の大脳皮質 (CC) における AR(*Ar*)と 3 ヶ月齢の海馬 (Hi) における P450arom (*Cyp19a1*) の mRNA 発現量を比較する場合を例にとり説明する。ある遺伝子 *g* の mRNA 分子が組織 *i* (単位重量当たり) に存在する個数を N_{g_i} とすると、求めたい mRNA 発現量の比は

$$N_{Ar_{CC}} / N_{Cyp19a1_{Hi}} \quad (1)$$

で与えられる。いま、 N_{g_i} 個の mRNA 分子から n_{g_i} 個の cDNA 分子が逆転写され、同じサンプル由来の各遺伝子の逆転写効率は一定であると仮定すると、

$$n_{Ar_{CC}} / N_{Ar_{CC}} = n_{Gapdh_{CC}} / N_{Gapdh_{CC}} \quad (2)$$

$$n_{Cyp19a1_{Hi}} / N_{Cyp19a1_{Hi}} = n_{Gapdh_{Hi}} / N_{Gapdh_{Hi}} \quad (3)$$

という関係が成り立つ。ここで、*Gapdh* はハウスキーピング遺伝子であり、その mRNA 発現量が一定であるとみなせるので、

$$N_{Gapdh_{Hi}} = N_{Gapdh_{CC}} \quad (4)$$

である。式(2), (3), (4)を用いると、求める mRNA 発現量の比 (1) は、

$$N_{Ar_{CC}} / N_{Cyp19a1_{Hi}} = (n_{Ar_{CC}} / n_{Gapdh_{CC}}) / (n_{Cyp19a1_{Hi}} / n_{Gapdh_{Hi}}) \quad (5)$$

と、cDNA 分子の個数の式に変形できる。

(5)式で cDNA 分子の個数の式を得たが、直接測定できる量は、EtBr 染色した PCR 産物のバンドが発する蛍光輝度 (*I* とする) なので、蛍光輝度 *I* と cDNA 分子の数 *n* の間の関係式を求めなければならない。

増幅曲線の作成の所で述べたように、PCR で産物が指数増幅している相においては、cDNA 分子数 *n* は、 $n \times (1+e)^c$ に増幅される。ここで、*c* は PCR のサイクル数、*e* は PCR 反応の増幅効率 (1 サイクルの反応で何倍に増幅されるかの指標) である。*e* は増

幅曲線の片対数グラフから、指数増幅している相に対して直線をフィッティングして求める。

バンドの輝度 I は、DNA 塩基対間に挿入（インターカレート）される EtBr 分子の数に比例する。すなわち、PCR 産物の個数、および PCR 産物の塩基対の長さ（ L とする）の双方に比例するので、

$$I = A \times n \times L \times (1+e)^c \quad (6)$$

と書ける。ここで、 A は比例係数である。

例えば、大脳皮質の Ar の場合、指数増幅する範囲（サイクル数 24 から 30）の増幅曲線に直線をフィッティングして求めた e は $e^{Ar_{CC}} = 1.0850$ ($I = 0.87 \times 2.0850^c$, $R^2 = 0.9037$) であり、解析に用いるサイクル数は $c^{Ar_{CC}} = 26$ と選んだ。

同様にして、大脳皮質の $Gapdh$ に対して、増幅曲線から e を求めると、 $e^{Gapdh_{CC}} = 0.9310$ ($I = 17.53 \times 1.9310^c$, $R^2 = 0.9295$)、解析に用いるサイクル数 $c^{Gapdh_{CC}} = 18$ ととれる。これらを用いて、

$$\begin{aligned} n^{Ar_{CC}} / n^{Gapdh_{CC}} \\ = (I^{Ar_{CC}} / I^{Gapdh_{CC}}) \times (L^{Gapdh_{CC}} / L^{Ar_{CC}}) \times (1+0.9310)^{18} / (1+1.0850)^{26} \end{aligned} \quad (7)$$

と、バンドの輝度データから cDNA 分子の個数の比が計算できる ($L^{Ar_{CC}} = 536$ bp, $L^{Gapdh_{CC}} = 830$ bp)。(7)を得たのと同様の手続きで、増幅曲線から $n^{Cyp19a1_{Hi}} / n^{Gapdh_{Hi}}$ の値を計算し、これらの値を(5)に代入すれば、求めたい mRNA 発現量の比、すなわち、24 ヶ月齢の大脳皮質 (CC) における AR (Ar) と 3 ヶ月齢の海馬における P450arom ($Cyp19a1$) の mRNA 発現量の比が計算できる。

以上の議論は、本研究で用いた任意の組織・月齢・遺伝子に対して適用できるので、異なるステロイド合成酵素や受容体の発現量を比較することができる。本研究では、3 ヶ月齢における海馬の P450arom の値を 100%とした。本研究で解析に用いた各遺伝子のサイクル数 c 、PCR 産物の長さ L などの値は表 2-2 に示した。

2-4 抗体染色法

2-4-1 一次抗体

一次抗体のメーカーまたは入手先および希釈倍率、反応時間は次の通りである。

P450scc

P450scc の染色を行う際には一次抗体として、P450scc aa421-441 antiserum (mouse と bovin の共通配列、rabbit polyclonal)を使用した。この抗体は、Chemicon より購入した。希釈倍率は 1:1000 として、24 時間 (4°C) 反応させた。

P450(17α)

P450(17a)の染色を行う際には一次抗体として、anti guniea pig P450(17a) IgG antibody (rabbit polyclonal)を使用した。この抗体は、小南教授(広島大学)から頂いた(Shinzawa et al., 1988)。希釈倍率は、1:1000 として、24 時間 (4°C) 反応させた。

P450arom

P450arom の染色を行う際には一次抗体として、anti human P450arom IgG antibody (rabbit polyclonal)を使用した。この抗体は、原田教授(藤田保健衛生大)から頂いた(Jakab et al., 1993)。

希釈倍率は、1:1000 として、24 時間 (4°C) 反応させた。

AR

AR の染色を行う際には一次抗体として、anti-androgen receptor (PG-21, rabbit immuoaffinity purified IgG)を使用した。この抗体は、Miilipore から購入した。希釈倍率は、1:5000 として、48 時間 (4°C) 反応させた。

ER α

ER α の染色を行う際には一次抗体として、anti-androgen receptor (PG-21, rabbit immuoaffinity purified IgG)を使用した。この抗体は、CREST プロジェクトの一環として小南教授(広島大学)らと共同で作成した(Mukai et al., 2007, 村上元, 2007)。希釈倍率は、1:1000 として、48 時間 (4°C) 反応させた。

2-4-2 二次抗体

Biotylated anti-rabbit IgG、normal goat serum, normal horse serum は Vecstain ABC kit に付属の物を用いた。二次抗体の希釈倍率は、1:200 として、30 分 (室温) 反応させた。

2-4-3 脳切片スライス作成

オスラットをエチルエーテル中で深麻酔をかけた。その後胸部を開き、ペリスタポンプを用いて心臓から PBS を血管内に送り込んだ (灌流)。灌流は全て 4°C の条件で行った。ラット体内の血液が PBS に置き換わった時点で、灌流液を PBS から 4%パラホルムアルデヒド溶液に切り替え、約 20 分間灌流固定を行った。その後、4°C で 24 時間、後固定した(postfixation)。後固定脳の凍結による組織破壊を防ぐため、30%ショ糖を含む PBS 溶液に沈むまで 4°C で静置した (cryoprotection; 凍結保護)。凍結保護処理した脳の海馬を含む領域(bregma -2.56 mm から-4.30 mm : Paxinos 著(1998) The Rat Brain 4th edition)を、冠状断(coronal)になるように水性包埋液 (O.C.T. compound:

SAKURA, JAPAN) を用いて包埋した後、液体窒素で冷やしたイソペンタンに浸して急速凍結した (-60°C以下にならないように注意した)。凍結・包埋した脳組織は-20°Cで1時間以上休ませ、使用時にクライオスタット(CM1510; Leica, Germany)を用いて、-20°Cにおいて20 µmの厚さに切断し全脳スライスを作成した。作成したスライスはPBS、4°Cで保存した。

2-4-4 海馬スライスの抗体染色

全脳切片の中から背側海馬を含む切片を選び、過酸化水素-メタノール溶液 (0.3% H₂O₂, in absolute methanol)に30分間浸し、切片内の内因性ペルオキシダーゼを失活させた。切片をPBSで洗浄した後、非特異的な抗体結合を防ぐためにブロッキング溶液 (5% normal goat serum, 3% skimmed milk, 0.05% Triton-X100 in absolute PBS) 中に移し、室温で2時間振盪した。

スライスをPBSで洗浄した後、一次抗体溶液にスライスを浸して4°Cで24-48時間抗原抗体反応を行った。一次抗体は3% skimmed milk, 0.5% Triton-X100を含むPBSで希釈した。抗原抗体反応後、切片を0.05% Tween20を含むPBS(以降PBST)に浸し、5分間の洗浄を3回行った。

次に、二次抗体液に切片を浸し、室温で30分間二次抗体反応を行った。二次抗体は、0.5% skimmed milk, 0.5% Triton-X100を含むPBSで希釈した。

一次抗体がRabbit IgGの場合は、goat anti-Rabbit IgG antibody (1:200), 1.5% goat serumとした。

二次抗体反応後、切片をPBSTで5分間の洗浄を3回行った。その後、アビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体液 (1:100) に切片を移し、室温で30分以上ビオチン・アビジン反応を行った。アビジン・西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体液はVecstain ABCキットに従って調製した。ビオチン・アビジン反応後PBSTで5分間3回洗浄した。

その後、切片を発色液 (0.05% diaminobenzidine (DAB), 0.01% H₂O₂, 0.3% ammonium nickel sulfate を含む Tris-HCl buffer (pH7.2))に浸し、DAB染色を10~20分を行った。発色させた切片はエタノール希釈列 (20%, 40%, 80%, 100%)に順に浸した後、キシレンを15分間かけて浸透させ、キシレン系封入剤 (エンテランニュー) を用いて封入した。乾燥後、光学顕微鏡で観察した。

2-5 精巢のヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色)

灌流固定を行った後、精巢のパラフィン切片を作製した。パラフィン切片を剥離防止コートのスライドガラスに張り、EtOHの希釈系列を用いて脱パラフィンを行った。マイヤーのヘマトキシリン溶液で10分ほど染色した後、DDWでよく洗った。その後、エオジン溶液で5分ほど染色し、DDWで洗った。脱水を目的としてEtOHの希釈列に浸した後、キシレンを15分間かけて浸透させ、キシレン系封入剤を用いて封入した。乾燥後、光学顕微鏡下で写真を撮影した。

2-6 統計解析

性ステロイドホルモン合成酵素および受容体の月齢間比較、24 ヶ月齢の部位間比較、および性ステロイド濃度の月齢間比較では、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、有意差が存在した場合 ($p < 0.05$)、one-way ANOVA を行い、*post-hoc* 検定として、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。また、性ステロイド濃度の海馬と血中の 2 群間の比較には、t 検定を行った。いずれも、有意水準は $p < 0.05$ とした。

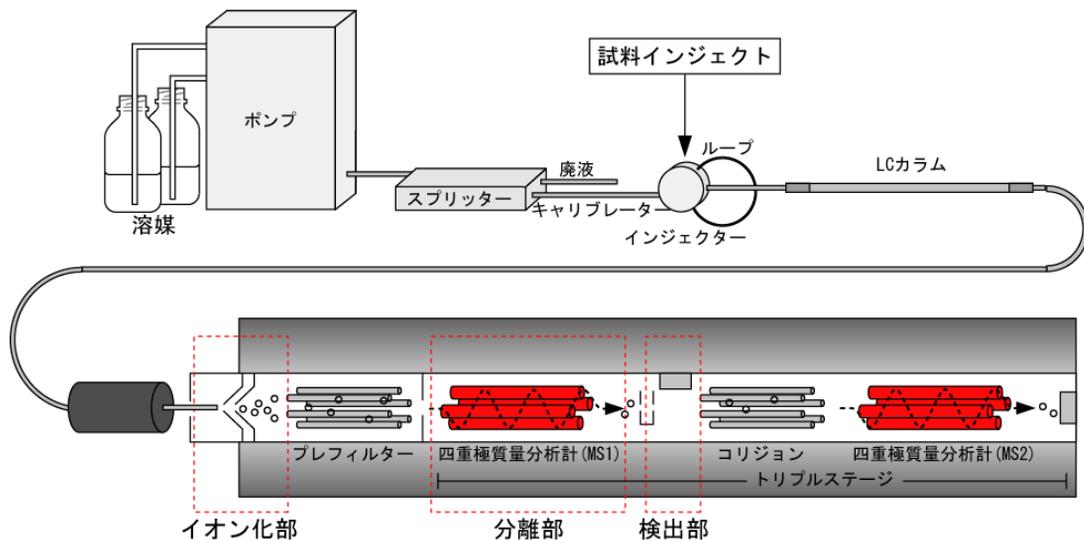


図2-1 LC-MS/MS実験装置の概略図

逆相LC部で分離されたサンプルは、ESI法によりイオン化されトリプルステージ質量分析部に送られる。第1質量分析計 (MS1) で特定のm/z値を持つ親イオンのみを通過させ、さらにコリジョンにおいて生成されたフラグメントイオンの検出を第2質量分析計 (MS2) で行う。性ステロイドは、MS導入時のイオン化効率を上げて、検出効率を格段に高めるため、picolinoyl化などの誘導体化を行うことが、非常に重要である。

海馬の抽出

↓
ステロイド抽出

↓
C₁₈カラムによる精製

↓
HPLCによるステロイドの分離

↓
ステロイドの誘導体化

↓
LC-MS/MSによるステロイド
含量の測定

海馬の湿重量を量る。

例えば0.15 g

海馬のホモジナイズの際に³H標識ステロイド
2 × 10⁴ cpmを同時に入れ、この間の抽出効率
を求める。

例えば45 %

$$x \text{ (pg)} / 0.45 / 0.15 = X \text{ (pg / g)}$$

$$= X \text{ (pg / mL)}$$

(ステロイド含量)

$$X \text{ (pg / mL)} / M \text{ (ステロイド分子量)} = Y \text{ nM}$$

(ステロイド濃度)

図2-2 質量分析のプロトコル図

海馬は抽出後、湿重量を量りホモジナイズする。この時³H標識ステロイド2 × 10⁴ cpm入れ、HPLCによる分離後にカウントを測ることで、ステロイドの抽出効率を求めた。抽出したステロイドをHPLCで分離しLC-MS/MSのサンプルとした。一部のステロイドに関しては、MS導入時のイオン化効率を上げるため、誘導体化を行っている。xは、LC-MS/MS終了時に、サンプルで検出されたステロイドの値。ここから抽出効率による補正を行い、海馬に含まれていたステロイド量X、および濃度Yを計算する。

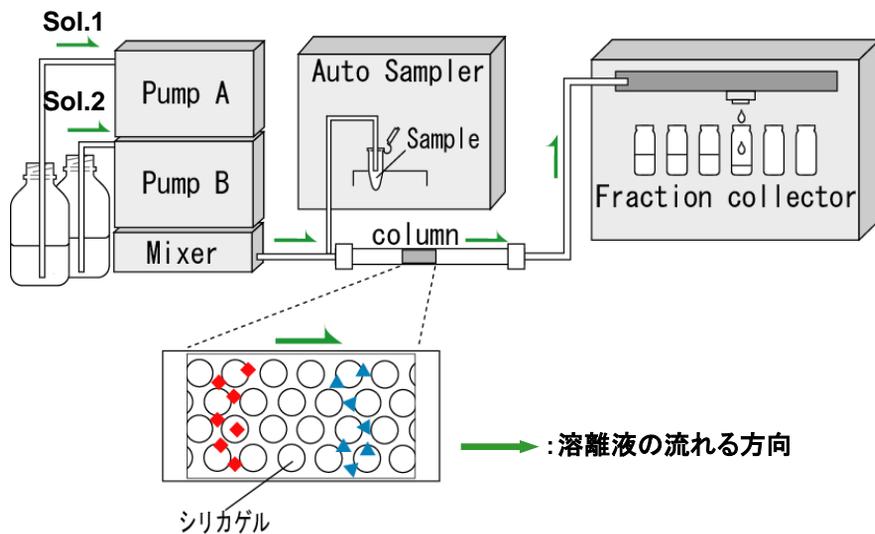


図2-3 HPLCの装置の概略図

HPLCの装置の概略図。Pump Aから送られる疎水性の高い溶離液Sol.1と、Pump Bから送られる親水性の高い溶離液Sol.2とが、Mixerにおいて図2-6に示した比率に従い混合され、カラムを通る。カラムは親水性のシリカカラムを用いている。サンプル内のステロイドは固相（シリカカラム）と液相（溶離液）との親和性の差によって、異なる溶出時間で抽出される。

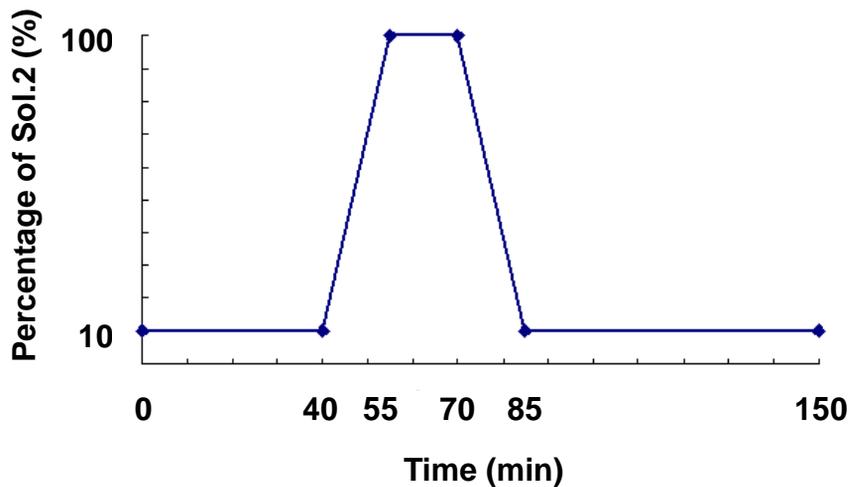


図2-4 HPLCの送液プログラム

本研究で用いたHPLCの送液プログラム。溶離液Sol.1と溶離液Sol.2の混合液中のSol.2の割合を示したグラフ。

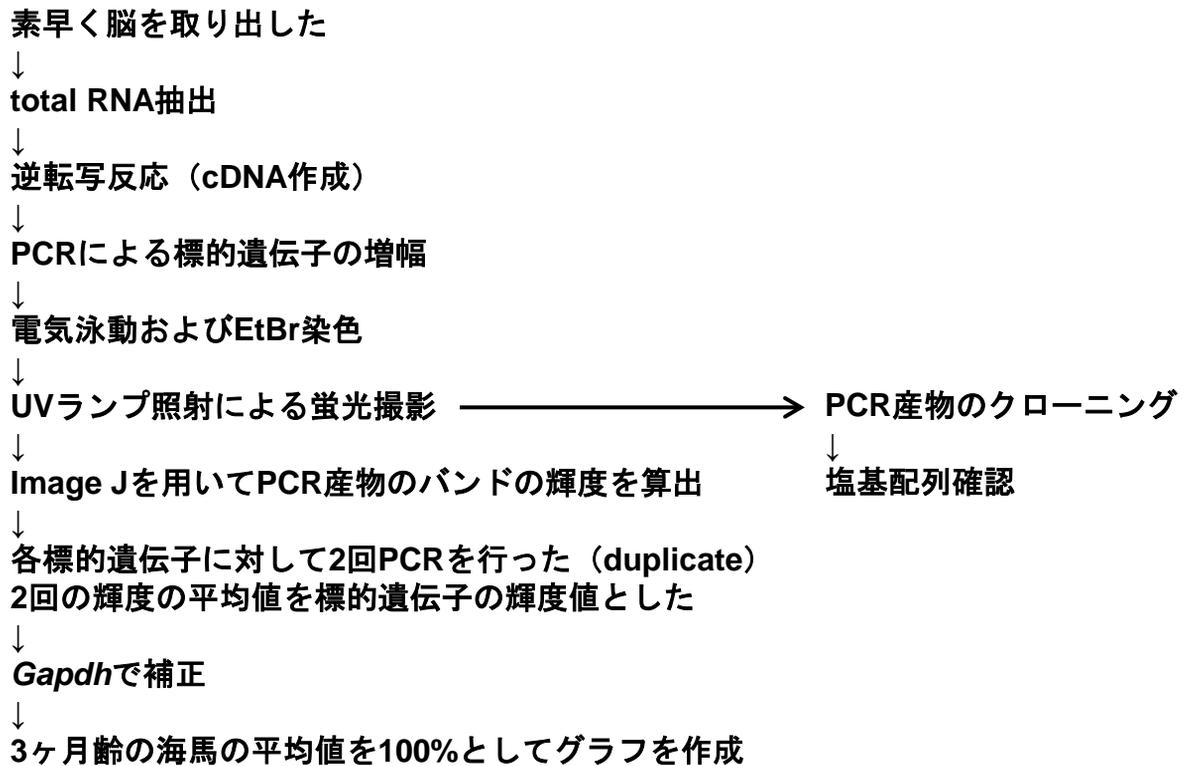


図2-5 RT-PCR法のプロトコル図

素早く取り出した脳サンプルよりtotal RNA抽出を行った後、Oligo dT primerを用いて逆転写反応を行い、cDNAを作成した。その後、表2-1に示したprimerとPCR条件を用いて、PCRを行った。PCR終了後はアガロース電気泳動を行い、EtBr染色した。そのゲルをUV照射による蛍光を撮影し、DNA増幅産物を定量した。全ての遺伝子についてPCR産物のシーケンス解析を行い、標的遺伝子との相同性を確認した。

(A) プライマー設計の指針

プライマー・標的間の相互作用にともなうギブスの自由エネルギー(ΔG)を評価する

5'末端: 増幅効率・ポリメラーゼ認識効率を決定

ΔG 低い \rightarrow 増幅効率高い

ΔG 高い \rightarrow 増幅効率低い

3'末端: 特異性を決定

ΔG 低い \rightarrow 非特異的な増幅が起こりやすい

ΔG 高い \rightarrow 非特異的な増幅な起こりにくい

標的

(B) 再隣接熱力学法

プライマーと標的配列との相互作用におけるギブス自由エネルギー ΔG を評価

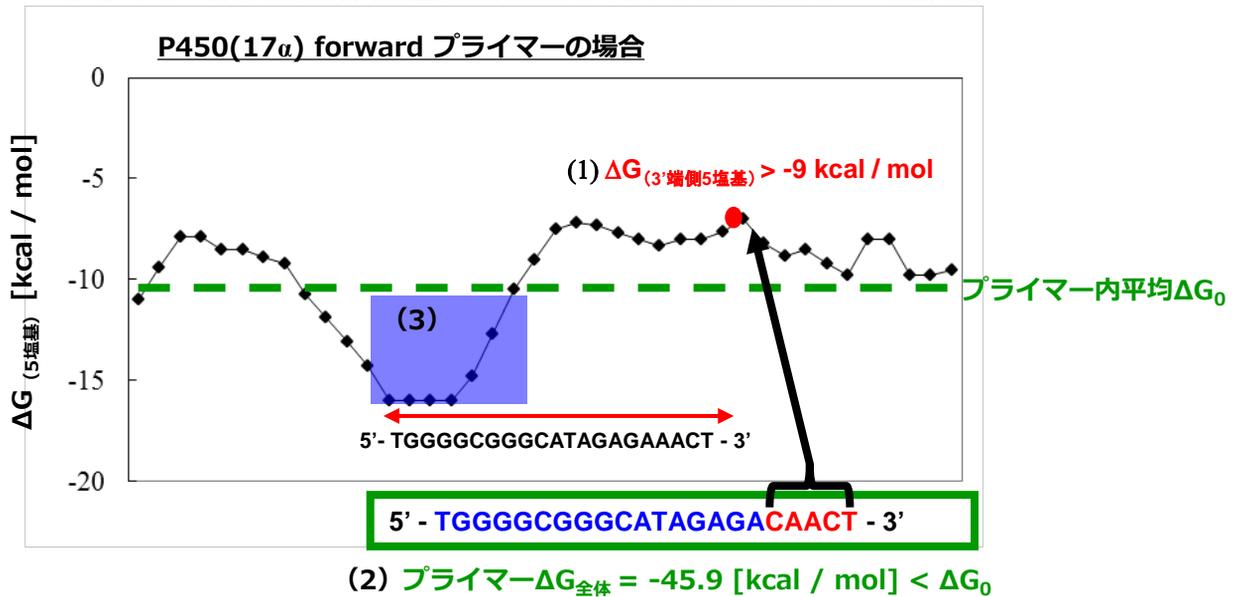


図2-6 プライマーの設計法

(A) プライマー設計の指針。5'側が増幅効率・ポリメラーゼ認識効率を決定し、3'側が特性を決定する。
(B) P450(17 α)のForwardプライマーを例にした ΔG 評価。赤矢印はP450(17 α)検出用プライマーにあたる。これら再隣接熱力学法はBreslauerらの数値を用いた(Breslauer *et al*, 1986)

設計の重要ポイントは、下記の3つである。

- (1) 使用するプライマー全体の $\Delta G_{(全体)}$ は、鋳型全体で計算した ΔG の平均値 ΔG_0 より低くする
- (2) プライマーの3'末端側5塩基の $\Delta G_{5塩基}$ を高くする($\Delta G_{(5塩基)} = -9$ kcal / mol 程度かそれより大きいものが望ましい)
- (3) プライマーの5'末端側の ΔG はプライマー内の平均 ΔG_0 よりも低くする

Image Jを用いた輝度の算出方法

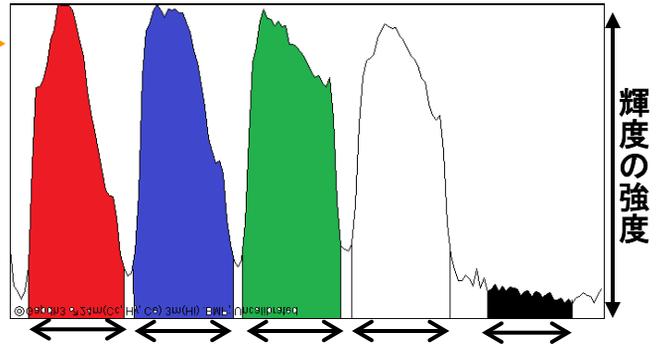
(A) PCR産物を電気泳動し、UV照射で蛍光を撮影した電気泳動像

マーカー
大脳皮質
視床下部
小脳
海馬



(B) Image Jから得られた(A)のヒストグラム

- 24ヶ月齢 大脳皮質
- 24ヶ月齢 視床下部
- 24ヶ月齢 小脳
- 3ヶ月齢 海馬※1
- バックグラウンド※2



・ PCR産物を泳動するゲルの穴の大きさは同じ・
輝度測定でも同じ幅を選択

- ※1 必ず電気泳動の際には、1レーンに毎回同じ3ヶ月齢海馬からPCRを行ったPCR産物を一緒に流し、それを1とすることで異なるゲル間の補正を行った。
- ※2 それぞれの輝度からバックグラウンドを引いた値が標的遺伝子の輝度

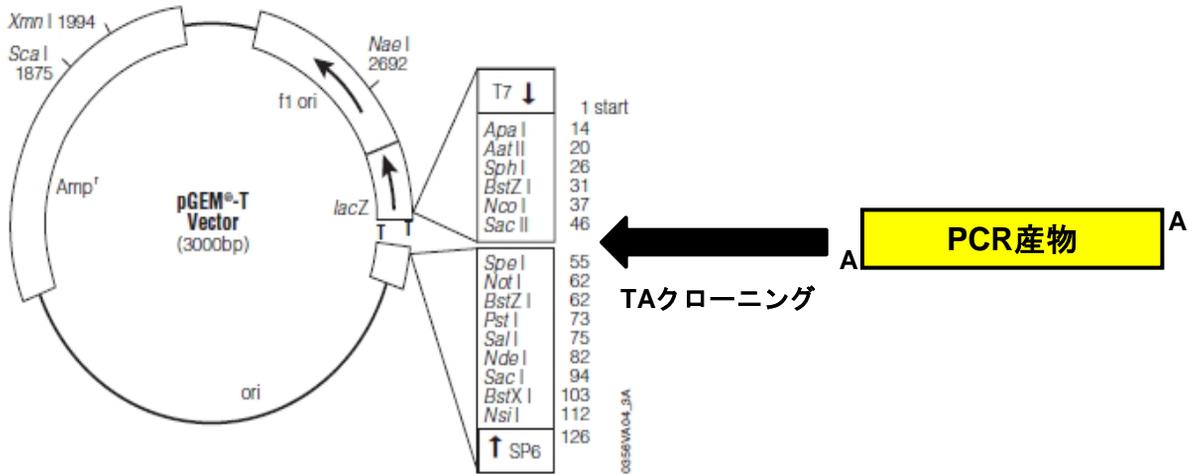
図2-7 画像解析ソフトImage Jによる輝度の算出方法

24ヶ月齢における大脳皮質、視床下部、小脳の*Gapdh*を定量した際の (A) 電気泳動像および (B) Image Jから得られたヒストグラム。

(A) PCR産物の電気泳動像。オレンジで囲まれた部分を選択し、Image Jで (B) のヒストグラムを作成した。

(B) Image Jから得られた (A) のヒストグラム。縦軸は輝度の強度を意味している。各バンド内の輝度を積分して、色がついた部分の面積を求め、各PCR産物の輝度値とした。

(A) pGEM-T Easy ベクターのプラスミドマップ



(B) pGEM-T Easy ベクターのクローニングサイトの配列

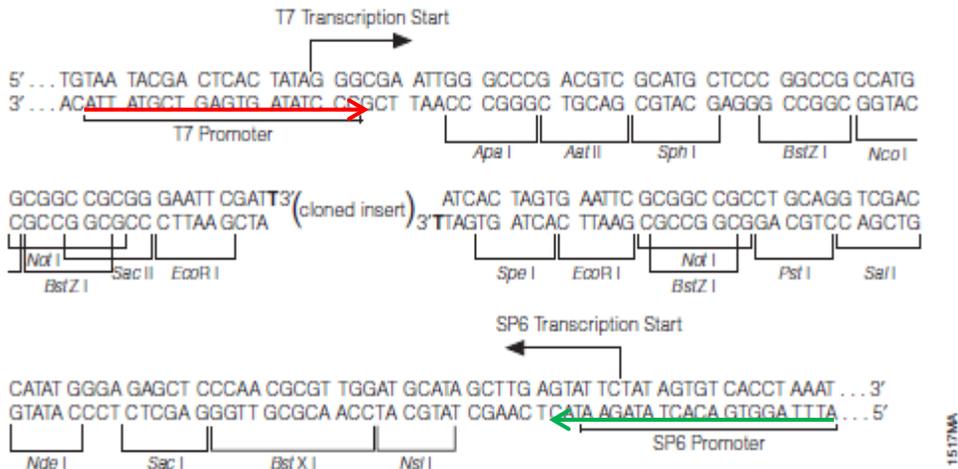


図2-8 pGEM-T EasyベクターとTAクローニングの模式図

(A) pGEM-T Easyベクターのプラスミドマップ。EcoRVにより、切断されたクローニングサイトT部位が突出しているため、A部位が突出したPCR産物をライゲーションさせることができる。これにより、PCR産物をクローニングする。

(B) pGEM-T EasyベクターのT7とSp6 promoter、およびクローニングサイトの配列。pGEM-T EasyベクターのT7とSp6 promoterおよび、クローニングサイト付近の核酸配列を示している。

第3章 実験結果

論文共著者より公開の同意が得られていないため、本文と図を公開することができません。

第4章 考察

論文共著者より公開の同意が得られていないため、本文と図を公開することができません。

第5章 結論

論文共著者より公開の同意が得られていないため、本文を公開することができません。

引用文献

- Adams MM, Fink SE, Janssen WG, Shah RA, Morrison JH (2004) Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 474:419-426.
- Adams MM, Shah RA, Janssen WG, Morrison JH (2001) Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8071-8076.
- Albasser MM, Amin E, Lin TC, Iordanova MD, Aggleton JP (2012) Evidence that the rat hippocampus has contrasting roles in object recognition memory and object recency memory. *Behavioral neuroscience* 126:659-669.
- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:74-104.
- Barnes CA (1987) Neurological and behavioral investigations of memory failure in aging animals. *Int J Neurol* 21-22:130-136.
- Bimonte-Nelson HA, Singleton RS, Nelson ME, Eckman CB, Barber J, Scott TY, Granholm AC (2003) Testosterone, but not nonaromatizable dihydrotestosterone, improves working memory and alters nerve growth factor levels in aged male rats. *Experimental neurology* 181:301-312.
- Bizon JL, LaSarge CL, Montgomery KS, McDermott AN, Setlow B, Griffith WH (2009) Spatial reference and working memory across the lifespan of male Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging* 30:646-655.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology* 232:331-356.
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Marky LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:3746-3750.
- Burke SN, Barnes CA (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30-40.
- Calhoun ME, Kurth D, Phinney AL, Long JM, Hengemihle J, Mouton PR, Ingram DK, Jucker M (1998) Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging* 19:599-606.
- Dieguez D, Jr., Barea-Rodriguez EJ (2004) Aging impairs the late phase of long-term potentiation at the medial perforant path-CA3 synapse in awake rats. *Synapse*

52:53-61.

- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:4363-4367.
- Eric Kandel JS, Thomas Jessell, Steven Siegelbaum, A.J. Hudspeth (2012) *Principles of Neural Science*.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS (1990) Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci* 10:1286-1291.
- Hao J, Janssen WG, Tang Y, Roberts JA, McKay H, Lasley B, Allen PB, Greengard P, Rapp PR, Kordower JH, Hof PR, Morrison JH (2003) Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *The Journal of comparative neurology* 465:540-550.
- Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9:2982-2997.
- Hasegawa Y, Hojo Y, Kojima H, Ikeda M, Hotta K, Sato R, Ooishi Y, Yoshiya M, Chung BC, Yamazaki T, Kawato S (2015) Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks. *Brain Res*.
- Hatanaka Y, Hojo Y, Mukai H, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kim J, Ikeda M, Hiragushi A, Kimoto T, Kawato S (2014) Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res* in press.
- Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:865-870.
- Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, Kominami T, Kimoto T, Honma S, Poirier D, Kawato S (2009) Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* 150:5106-5112.
- Ishii H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Asashima M, Mukai H, Murakami G, Hojo Y, Kimoto T, Kawato S (2007) Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 13:323-334.
- Jakab RL, Horvath TL, Leranth C, Harada N, Naftolin F (1993) Aromatase immunoreactivity in the rat brain: gonadectomy-sensitive hypothalamic neurons

- and an unresponsive "limbic ring" of the lateral septum-bed nucleus-amygdala complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:481-498.
- Kawato S, Hojo Y, Kimoto T (2002) Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain. *Methods in enzymology* 357:241-249.
- Kelly KM, Nadon NL, Morrison JH, Thibault O, Barnes CA, Blalock EM (2006) The neurobiology of aging. *Epilepsy Res* 68 Suppl 1:S5-20.
- Kimoto T, Ishii H, Higo S, Hojo Y, Kawato S (2010) Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus. *Endocrinology* 151:5795-5806.
- Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura H, Hojo Y, Takata N, Kawato S (2001) Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology* 142:3578-3589.
- Leranth C, Hajszan T, MacLusky NJ (2004) Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *J Neurosci* 24:495-499.
- Leranth C, Petnehazy O, MacLusky NJ (2003) Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci* 23:1588-1592.
- Leranth C, Shanabrough M, Redmond DE, Jr. (2002) Gonadal hormones are responsible for maintaining the integrity of spine synapses in the CA1 hippocampal subfield of female nonhuman primates. *The Journal of comparative neurology* 447:34-42.
- Lisman JE (1999) Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* 22:233-242.
- Luine VN, Jacome LF, Maclusky NJ (2003) Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. *Endocrinology* 144:2836-2844.
- MacLusky NJ, Luine VN, Hajszan T, Leranth C (2005) The 17alpha and 17beta isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology* 146:287-293.
- Merrill DA, Chiba AA, Tuszyński MH (2001) Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *The Journal of comparative neurology* 438:445-456.
- Morrison JH, Brinton RD, Schmidt PJ, Gore AC (2006) Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *J Neurosci* 26:10332-10348.
- Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278:412-419.

- Morrison JH, Hof PR (2002) Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 136:467-486.
- Moser MB, Trommald M, Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12673-12675.
- Moser MB, Trommald M, Egeland T, Andersen P (1997) Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *The Journal of comparative neurology* 380:373-381.
- Mukai H, Hatanaka Y, Mitsuhashi K, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Sato R, Murakami G, Kimoto T, Kawato S (2011) Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis. *Cereb Cortex* 21:2704-2711.
- Mukai H, Kimoto T, Hojo Y, Kawato S, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M (2010) Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochimica et biophysica acta* 1800:1030-1044.
- Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007) Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *Journal of neurochemistry* 100:950-967.
- Nakashiba T, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, McHugh TJ, Rodriguez Barrera V, Chittajallu R, Iwamoto KS, McBain CJ, Fanselow MS, Tonegawa S (2012) Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149:188-201.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, Regan CM (2000) Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neuroscience* 99:229-232.
- Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, Kawato S (2008) Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain research reviews* 57:363-375.
- Orikasa C, McEwen BS, Hayashi H, Sakuma Y, Hayashi S (2000) Estrogen receptor alpha, but not beta, is expressed in the interneurons of the hippocampus in prepubertal

- rats: an in situ hybridization study. *Brain research Developmental brain research* 120:245-254.
- Rapp PR, Gallagher M (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen JC, Zimmer J, West MJ (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging* 17:143-147.
- Rosenzweig ES, Barnes CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69:143-179.
- Sandstrom NJ, Williams CL (2004) Spatial memory retention is enhanced by acute and continuous estradiol replacement. *Hormones and behavior* 45:128-135.
- SantaLucia J, Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:1460-1465.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20:11-21.
- Shinohara Y, Hirase H, Watanabe M, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R (2008) Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:19498-19503.
- Shinzawa K, Ishibashi S, Murakoshi M, Watanabe K, Kominami S, Kawahara A, Takemori S (1988) Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P-450s (P-450(17)alpha,lyase and P-450C21) and steroidogenic activities in guinea-pig adrenal cortex. *The Journal of endocrinology* 119:191-200.
- Sierra A, Lavaque E, Perez-Martin M, Azcoitia I, Hales DB, Garcia-Segura LM (2003) Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur J Neurosci* 18:1458-1467.
- Sinopoli KJ, Floresco SB, Galea LA (2006) Systemic and local administration of estradiol into the prefrontal cortex or hippocampus differentially alters working memory. *Neurobiology of learning and memory* 86:293-304.
- Sorra KE, Harris KM (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10:501-511.
- Spencer JL, Waters EM, Milner TA, McEwen BS (2008) Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice.

- Neuroscience 155:1106-1119.
- Tabori NE, Stewart LS, Znamensky V, Romeo RD, Alves SE, McEwen BS, Milner TA (2005) Ultrastructural evidence that androgen receptors are located at extranuclear sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 130:151-163.
- Tanaka M, Sokabe M (2012) Continuous de novo synthesis of neurosteroids is required for normal synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 62:2373-2387.
- Tang Y, Janssen WG, Hao J, Roberts JA, McKay H, Lasley B, Allen PB, Greengard P, Rapp PR, Kordower JH, Hof PR, Morrison JH (2004) Estrogen replacement increases spinophilin-immunoreactive spine number in the prefrontal cortex of female rhesus monkeys. *Cereb Cortex* 14:215-223.
- Tsurugizawa T, Mukai H, Tanabe N, Murakami G, Hojo Y, Kominami S, Mitsuhashi K, Komatsuzaki Y, Morrison JH, Janssen WG, Kimoto T, Kawato S (2005) Estrogen induces rapid decrease in dendritic thorns of CA3 pyramidal neurons in adult male rat hippocampus. *Biochemical and biophysical research communications* 337:1345-1352.
- Veng LM, Granholm AC, Rose GM (2003) Age-related sex differences in spatial learning and basal forebrain cholinergic neurons in F344 rats. *Physiol Behav* 80:27-36.
- Wallace LS, Ballard JE, Holiday DB, Wells HE (2005) Comparison between 60 matched pairs of postmenopausal black and white women: analysis of risk factors related to bone mineral density. *Maturitas* 52:356-363.
- Ward MT, Oler JA, Markus EJ (1999) Hippocampal dysfunction during aging I: deficits in memory consolidation. *Neurobiol Aging* 20:363-372.
- Weiland NG, Orikasa C, Hayashi S, McEwen BS (1997) Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *The Journal of comparative neurology* 388:603-612.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344:769-772.
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004) Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:1205-1212.
- Woolley CS, McEwen BS (1993) Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of comparative neurology* 336:293-306.
- Woolley CS, Schwartzkroin PA (1998) Hormonal effects on the brain. *Epilepsia* 39 Suppl 8:S2-8.
- Wu D, Lin G, Gore AC (2009) Age-related changes in hypothalamic androgen receptor and

- estrogen receptor alpha in male rats. *The Journal of comparative neurology* 512:688-701.
- Yamada-Mouri N, Hirata S, Kato J (1996) Existence and expression of the untranslated first exon of aromatase mRNA in the rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58:163-166.
- Yamada-Mouri N, Hirata S, Kato J, Hoshi K (1997) Expression and distribution of cortical type aromatase mRNA variant in the adult rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60:325-329.
- Yamaguchi N, Yuri K (2012) Changes in oestrogen receptor-beta mRNA expression in male rat brain with age. *Journal of neuroendocrinology* 24:310-318.
- Young M, McPhaul MJ (1998) A steroidogenic factor-1-binding site and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like elements are required for the activity of the rat aromatase promoter in rat Leydig tumor cell lines. *Endocrinology* 139:5082-5093.
- 村上元 (2007) 海馬神経におけるエストロゲン受容体の解析. 東京大学総合文化研究科広域科学専攻博士論文.
- 畑中悠佑 (2010) 男性ホルモンによる海馬神経スパインの増加機構の解析. 東京大学総合文化研究科広域科学専攻博士論文.
- 平櫛絢子 (2014) 海馬神経スパインの変化における加齢と性ホルモン補充の効果. 東京大学総合文化研究科広域科学専攻修士論文.

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教員である川戸佳教授には、研究の設定や内容の議論などの指導をして頂きました。心より感謝申し上げます。

本研究は、都立老人総合研究所老化機構研究部（現在：順天堂大学大学院医学研究科加齢制御医学講座 白澤卓二教授、千葉大学大学院医学研究院先加齢医学講座 清水孝彦准教授）、日本医科大学大学院医学研究科解剖学講座（小澤一史教授、肥後心平助教、松本恵介研究技術員）との共同研究により行うことができました。御礼申し上げます。

研究室の北條泰嗣博士、木本哲也助教には、実験や論文執筆などを指導して頂きました。分子生物解析や抗体染色などで、修士の吉田広太郎、若林正彦、酒井英子の諸氏や Anna Barron 博士の協力を得ました。御礼申し上げます。