

# 博士論文

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

# 目次

略語一覧 .....	5
第 1 章 序論 .....	9
1-1. 海馬 .....	9
1-2. 神経細胞の樹状突起スパイン(シナプス後部).....	10
1-3. 男性・女性ステロイドホルモン .....	10
1-4. 男性・女性ホルモン受容体 .....	11
1-4-1. プログステロン受容体 (PR).....	12
1-4-2. $\alpha$ 型エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ).....	12
1-4-3. $\beta$ 型エストロゲン受容体 (ER $\beta$ ) .....	13
1-4-4. アンドロゲン受容体 (AR).....	13
1-5. 性ステロイドホルモン合成系 .....	13
1-6. 性ステロイドホルモンの海馬内合成.....	15
1-7. 性ステロイドホルモンの脳神経系への作用 .....	15
1-8. コルチコステロン(CORT).....	17
1-9. 海馬におけるコルチコステロン(CORT)の作用 .....	17
1-10. メスの性周期と性ホルモンの関係 .....	18
1-11. 研究目的 .....	19
第 2 章 実験方法 .....	25
2-1. 実験動物 .....	25
2-2. 試薬 .....	25
2-3. 調製試薬 .....	26
2-3-1. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-): phosphate buffered saline)の組成 .....	26
2-3-2. 人工脳脊髄液(ACSF : artificial cerebrospinal fluid)の組成 .....	26
2-3-3. 固定液(PFA: パラホルムアルデヒド溶液)の組成 .....	27
2-3-4. 海馬支持用寒天の組成 .....	27
2-3-5. Lucifer Yellow 染色液の組成 .....	27
2-3-6. 水難性試薬の組成 .....	27
2-3-7. 質量分析に用いた試薬の組成 .....	27
2-3-7-1. 性ホルモン抽出 .....	28
2-3-7-2. HPLC .....	28
2-3-7-3. 質量分析(LC-MS/MS) .....	28

2-3-8. 核酸の精製・電気泳動に用いた試薬の組成 .....	28
2-3-8-1. total RNA 抽出 .....	29
2-3-8-2. 逆転写 .....	29
2-3-8-3. PCR .....	29
2-3-8-4. 電気泳動 .....	29
2-4. 海馬神経スパイン形態イメージングと解析 .....	30
2-4-1. 単離した海馬スライス(急性海馬スライス)の作成と薬理刺激 .....	30
2-4-2. 灌流固定及び全脳スライスの作製 .....	30
2-4-3. 神経細胞への蛍光色素注入 .....	31
2-4-4. 通常型の共焦点レーザー顕微鏡(PASCAL)による断層撮影 .....	31
2-4-5. デコンボリューション処理 .....	32
2-4-6. 超解像共焦点顕微鏡による断層撮影 .....	32
2-4-7. Spiso-3D によるスパイン検出とスパイン密度・頭部形態の解析 .....	33
2-5. 質量分析による海馬内の性ホルモン濃度測定方法 .....	33
2-5-1. 海馬試料及び血漿試料の調製 .....	34
2-5-2. 性ホルモンの抽出 .....	34
2-5-3. 順相 HPLC による性ホルモンの精製 .....	34
2-5-4. LC-MS/MS を用いた質量分析 .....	35
2-5-4-1. LC-MS/MS ポンププログラム .....	36
2-5-4-2. 性ホルモンのイオン化と検出 .....	36
2-5-4-3. 検出精度と定量限界 .....	36
2-5-5. 抽出効率の計算 .....	37
2-5-6. 性ホルモン濃度の算出法 .....	37
2-6. RT-PCR を用いた mRNA 発現解析の実験方法 .....	37
2-6-1. total RNA の抽出 .....	38
2-6-2. エタノール沈殿 .....	38
2-6-3. 逆転写反応 .....	38
2-6-4. PCR .....	38
2-6-5. 電気泳動 .....	39
2-6-6. プライマーの設計 .....	39
2-7. 統計解析 .....	40
第3章 実験結果 .....	61
3-1. 女性ホルモンによる神経スパイン密度変化と形態変化 .....	61

3-1-1. プログステロン(PROG)による海馬神経スパインへの影響 .....	62
3-1-1-1. PROG 作用による全スパイン密度とスパイン頭部直径の解析 .....	62
3-1-1-2. LIMK の阻害剤(LIMKi)による PROG 効果の抑制 .....	62
3-1-1-3. ERK/MAPK の阻害剤(U0126)による PROG 効果の抑制 .....	63
3-1-1-4. プログステロン受容体(PR)のアンタゴニスト(RU486)による PROG 効果の抑制 .....	63
3-1-2. エストラジオール(E2)による海馬神経スパインへの影響 .....	64
3-1-2-1. E2 作用による全スパイン密度とスパイン頭部直径の解析 .....	64
3-1-2-2. LIMK の阻害剤(LIMKi)による E2 効果の抑制 .....	65
3-1-2-3. ERK/MAPK の阻害剤(U0126)による E2 効果の抑制 .....	65
3-1-2-4. エストロゲン受容体(ER $\alpha$ ,ER $\beta$ ) のアンタゴニスト(ICI)による E2 効果の抑制 .....	66
3-2. 男性ホルモンによる神経スパイン密度変化と形態変化 .....	66
3-2-1. ジヒドロテストステロン(DHT)による海馬神経スパインへの影響 .....	66
3-2-1-1. DHT 作用による全スパイン密度とスパイン頭部直径の解析 .....	66
3-2-1-2. LIMK の阻害剤(LIMKi)による DHT 効果の抑制 .....	67
3-2-1-3. ERK/MAPK の阻害剤(U0126)による DHT 効果の抑制 .....	67
3-2-1-4. アンドロゲン受容体(AR)のアンタゴニスト(HF)による DHT 効果の 抑制 .....	68
3-3. コルチコステロン(CORT)による神経スパイン密度の変化 .....	68
3-3-1. CORT とリン酸化酵素の阻害剤による神経スパインへの影響 .....	69
3-3-2. グルココルチコイド受容体(GR) のアンタゴニスト(RU486)による CORT 効果の抑制 .....	69
3-4. 阻害剤のみによるスパイン密度への影響 .....	70
3-5. メスの性周期と海馬神経スパイン密度の変動 .....	70
3-6. 質量分析法による性ホルモン濃度の測定 .....	71
3-6-1. プログステロン (PROG) 濃度の測定 .....	71
3-6-2. エストラジオール (E2) 濃度の測定 .....	72
3-7. メスの性周期と海馬内性ホルモン合成酵素及び受容体の mRNA 発現量解 析 .....	72
3-7-1. <i>Hsd17b1</i> 、 <i>Hsd17b3</i> (17 $\beta$ -HSD の遺伝子) の発現解析 .....	73
3-7-2. <i>Cyp19a1</i> (P450arom の遺伝子) の発現解析 .....	73
3-7-3. <i>Pgr</i> (PR の遺伝子)の発現解析 .....	73



3-7-4. <i>Esr1</i> 、 <i>Esr2</i> (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ の遺伝子) の発現解析 .....	74
3-7-5. <i>Ar</i> (AR の遺伝子) の発現解析 .....	75
第 4 章 考察 .....	101
4-1. 結果のまとめと本研究の意義 .....	101
4-2. リン酸化酵素系シグナルを介したオス海馬スパインの制御 .....	104
4-3. 海馬の神経スパインで働く性ホルモンの受容体 .....	107
4-4. 性ホルモンがスパインに及ぼす長期効果 .....	109
4-5. 海馬神経スパインにおける CORT 短期効果のシグナル伝達経路 .....	109
4-6. メス海馬の女性ホルモン濃度変化とスパイン密度の関係 .....	110
4-7. メス海馬における性ホルモンの局所合成 .....	111
4-8. メス海馬内の性ホルモン合成酵素及び受容体の定量 .....	112
4-9. メス海馬内の女性ホルモン濃度変動と海馬機能の関連 .....	112
引用文献 .....	118
謝辞 .....	128

## 略語一覧

17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -水酸化ステロイド脱水素酵素)
a.a.	amino acid (アミノ酸)
ACSF	artificial cerebrospinal fluid (人工脳脊髄液)
ACTH	adrenocorticotrophic hormone (副腎皮質刺激ホルモン)
ADione	androstenedione (アンドロステンジオン)
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AR	androgen receptor (アンドロゲン受容体)
ARC	arcuate nucleus (弓状核)
AVPV	anteroventral periventricular nucleus (前腹側室周囲核)
BNST	bed nuclei of stria terminalis (分界条床核)
bp	base pair (塩基対)
CA	cornu ammonis (アンモン角)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (環状アデノシンーリン酸)
CBG	corticosteroid-binding globulin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (相補デオキシリボ核酸)
CIA	chloroform-isoamyl alcohol (クロロホルム-イソアミルアルコール)
CORT	corticosterone (コルチコステロン)
cpm	count per minute
CRE	cAMP response element (cAMP 応答配列)
CREB	cAMP response element binding protein (cAMP 応答配列結合蛋白質)
CRH	corticotropin-releasing hormone (副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン)
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)
DMSO	dimethyl sulfoxide

E1	estrone (エストロン)
E2	17 $\beta$ -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)
ERE	estrogen response element (エストロゲン応答配列)
ERK	extracellular-regulated kinase MAPK
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)
EtOH	ethanol (エタノール)
FSH	follicle stimulating hormone (卵胞刺激ホルモン)
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid ( $\gamma$ -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)
GR	glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPA 系	hypothalamic-pituitary-adrenal axis (視床下部－下垂体－副腎の反応系列)
HPG 軸	hypothalamo-pituitary-gonadal axis (視床下部-下垂体-性腺軸)
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
hsp	heat shock protein (熱ショック蛋白質)
HSD	hydroxysteroid dehydrogenase (水酸化ステロイド脱水素酵素)
JNK	c-jun N-terminal kinase
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)
LH	luteinizing hormone (黄体形成ホルモン)
LTD	long-term depression (長期抑圧)
LTP	long-term potentiation (長期増強)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-MLV	moloney murine leukemia virus (モロニーマウス白血病ウイルス)
mRNA	messenger ribonucleic acid
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartate
NGF	nerve growth factor

OVX	ovariectomy (卵巣摘出)
P450	cytochrome pigment-450 (シトクロム P450)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PCI	phenol-chloroform-isoamyl alcohol (フェノール・クロロホルム・イソ アミルアルコール)
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PEG	polyethylene glycol (ポリエチレングリコール)
PFA	paraformaldehyde
PFBz	pentafluorobenzyl (ペンタフルオロベンジル)
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
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)
PVN	paraventricular nucleus (室傍核)
RI	radio isotope (放射性同位体)
RNA	ribonucleic acid (リボ核酸)
RNase	ribonuclease (RNA 分解酵素)
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)
RU-486	RU-38486, mifepristone
SDN-POA	sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (視索前野性的二型核)
SDS	sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
SEM	standard error of the mean (平均値の標準誤差)
SHBG	sex hormone-binding globulin
SL	stratum lucidum (透明層)
SO	stratum oriens (上行層)
SR	stratum radiatum (放射状層)
SSC	standard saline citrate (標準クエン酸含有生理食塩水)
StAR	steroidogenic acute regulatory protein(ステロイド産生急性調節蛋白質)
T	testosterone (テストステロン)
TAE	Tris/Acetic acid/EDTA buffer (トリス-酢酸-EDTA 緩衝液)

TERP1	truncated estrogen receptor product 1
TH-PROG	3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroprogesterone, Allopregnanolone (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -テトラヒドロキシプロゲステロン、アロプレグナノロン)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)
TrkB	Neural receptor protein-tyrosine kinase

# 第 1 章 序論

## 1-1. 海馬

海馬は脳に左右 1 対で存在するカシューナッツ状の部位であり、大脳辺縁系原皮質に属する。海馬体は海馬台、アンモン角 (CA: cornu ammonis)、歯状回 (DG: dentate gyrus) からなり、神経細胞が集積した明瞭な層構造を持っている。アンモン角は大小の錐体神経細胞からなり、小錐体細胞領域を CA1、大錐体細胞領域を CA2 - 3 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 (図 1-1)。

CA1 における錐体細胞層より内側の領域は、細胞体から伸びた樹状突起が非常に密に分布しており、放射状層 (SR: Stratum Radiatum) と呼ばれている。放射状層よりもさらに内側の部分は、網状分子層 (SM: Stratum Lacunosum Moleculare)、さらに、錐体細胞層よりも外側の領域は、上昇層 (SO: Stratum Orientis) と呼ばれる (図 1-2)。

CA1・CA3・DG それぞれの領域の興奮性神経細胞は、相互に特徴的な投射構造でネットワークを作っている (図 1-2)。DG に分布する顆粒細胞は、主として内嗅皮質 (EC: Entorhinal Cortex) の神経細胞から入力を受けているが、さらに DG の顆粒細胞から CA3 の錐体細胞へは苔状繊維 (MF: Mossy Fiber) と呼ばれる特徴的な投射が存在し、DG-CA3 間で多くの神経細胞同士が接続されている。CA3 の錐体細胞から CA1 の錐体細胞への投射経路は、特にシェーファー側枝 (Sch: Schaffer Collateral) と呼ばれており、主要な投射先である CA1 放射状層には非常に多くの興奮性シナプスが形成されている。

海馬は記憶・学習の中枢としての機能について多く研究されており、特に CA1 領域は空間記憶 (O'Keefe and Dostrovsky, 1971) に、CA3 領域は連想記憶に関わるとされている (Lisman, 1999)。これらの領域では、神経シナプス結合の可塑性を示すものとして、長期増強 (LTP: long-term potentiation、記憶の形成) や長期抑圧 (LTD: long-term depression、記憶の修正) と呼ばれる現象が観測され、これらが記憶の素過程であると考えられている。シナプスにおける LTP などの神経伝達修飾過程は、海馬における記憶・学習に直接反映されると考えられている (McHugh et al., 1996)。

ラットの海馬における雌雄差について、これまで解剖学的な差異はないとする見方が一般的であったが、最近では新生仔期にはオスの方がメスより CA1 領域が 10~16 %程度大きい (Isgor and Sengelaub, 1998, Nunez et al., 2003)、DG 領域ではメスの方が樹状突起の枝分かれが多い (Juraska, 1990) などの報告がある。更に CA1 領域では青年期になっても性差が残っているとする報告 (Markham et al., 2005) もある。いずれの報告でも、成獣になる頃には性差はなくなるとしている。ラットだけでなく、ヒトの場合も海馬の大きさに性差がある

とされている (Neufang et al., 2009)。

## 1-2. 神経細胞の樹状突起スパイン(シナプス後部)

錐体細胞の樹状突起には「樹状突起スパイン (dendritic spine)」と呼ばれる多数の棘状の構造が見られる (図 1-3)。スパインは、神経細胞間の接合において前神経細胞とシナプス結合を形成する後シナプス構造であり、記憶を蓄える部位として着目されている (Harris and Stevens, 1989)。スパインには AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 型受容体や、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 型受容体などのグルタミン酸受容体が発現しており、主としてグルタミン酸作動性の興奮性神経入力の場合として機能している (Kasai et al., 2002) (図 1-3)。

海馬錐体細胞の樹状突起スパインの数や形態の変化は、海馬が司る記憶・学習能力の制御に深く関わっている (Leuner and Shors, 2004)。特に、海馬 CA1 放射状層におけるスパインの構造変化は非常に重要であり、海馬における記憶の素過程と考えられている LTP との間に密接な関わりがある (Engert and Bonhoeffer, 1999)。LTP は、シナプス前部とシナプス後部 (スパイン) で構成される神経シナプスで生じる記憶の書き込み現象である。まず、神経軸索に電気信号が伝わると、海馬の興奮性シナプスではシナプス前部から神経伝達物質であるグルタミン酸が放出される。このグルタミン酸が、樹状突起上にあるスパイン (シナプス後部) の表面に存在するグルタミン酸受容体 (AMPA 型受容体) に結合することによって、 $\text{Na}^+$ がスパイン内に流入し、膜電位が変化して膜の脱分極が起こる。すると、NMDA 型受容体から Mg ブロックが外れてスパイン内に  $\text{Ca}^{2+}$ が流入し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇して CaMKII が活性化されることによって、記憶の書き込み (LTP) が成立する (Hasegawa et al., 2015)。

また、様々な学習タスクを課したラットの海馬スパインの数や形態が、学習に応じて変化することも知られている (Knafo et al., 2004; Leuner et al., 2003; Moser et al., 1994)。さらに、精神遅滞やアルツハイマー病の症例では、大脳皮質のスパインの数と形態に顕著な異常が見られる (Ferrer and Gullotta, 1990; Irwin et al., 2000)。これらの知見は、記憶・学習・認知といった脳の高次機能が、ダイナミックに変化するスパインの構造とその機能により制御されていることを示唆している。

## 1-3. 男性・女性ステロイドホルモン

ステロイドは、シクロペンタノ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。哺乳類ではステロイドホルモンは生体の恒常性の維持に関わっており、その機能から性ステロイドホルモンとストレスステロイドホルモンとに大別される。主に性ホルモンは生殖機能に、ストレスホルモンはストレス応答に関わることが知られている。

本研究で着目している性ホルモンには、女性ホルモン（エストロゲン: エストラジオール (E2: estradiol)) や、黄体ホルモン（ゲスターゲン: プロゲステロン (PROG: progesterone)) 及び男性ホルモン（アンドロゲン: テストステロン (T: testosterone)、ジヒドロテストステロン (DHT: dihydrotestosterone)）がある。これらのステロイドホルモンは、コレステロールを基質として、その側鎖の切断や修飾によって合成される。男性ホルモンは主に精巣で、女性ホルモンは卵巣で合成され、これらは血流に乗って標的器官に運ばれて作用する。

脳への物質輸送は血液脳関門を介した選択的なものであるが、過去の研究からラットでは血液中のステロイドホルモンのうち、PROG、E2、DHT、T は、血液脳関門を透過できることが解かっている。これらのステロイドホルモンは、成獣ラットの血中ではそのほとんどが SHBG (Sex hormone-binding globulin) と結合した状態であるが、血液脳関門を介して脳内に入っていくことが可能である (Pardridge and Mietus, 1979)。その後、megalin 受容体を介して細胞内にエンドサイトーシスされることによってフリーの状態になり、作用する。こうした事実から、末梢組織で合成された性ステロイドホルモンは、血流によって脳に運ばれて作用すると考えられている。

しかし川戸グループの先行研究により、オスラットの脳には独自の性ホルモン合成系が存在し、その局所合成によって血中よりはるかに高い濃度の女性ホルモンが存在することが明らかとなった (Hojo et al., 2009; Kimoto et al., 2010)。脳が独自に作り出す性ホルモンは、性ホルモンの脳神経系への作用を考える上で、大変重要である。

#### 1-4. 男性・女性ホルモン受容体

古典的な性ホルモン受容体は、核内受容体ファミリーに属する。その構造は N 末端側から A/B、C (DNA 結合ドメイン)、D (hinge ドメイン)、E (リガンド結合ドメイン)、F 領域と区分されている。特に蛋白質の中央に位置する C 領域 (DNA 結合ドメイン) は、DNA 結合に必要なモチーフである Zn フィンガーモチーフを持つ。性ホルモン受容体には、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)、アンドロゲン受容体 (AR: androgen receptor) があり、ER は卵巣に、PR は子宮に、AR は精巣・精囊などに多く発現している。



それらはどれも細胞質・核内受容体であり、リガンドの結合によって活性化する。リガンドの非存在下では、受容体蛋白質は幾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。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するために必須である。

リガンドが結合すると、受容体蛋白質は立体構造変化を起こしてシャペロン分子から解離し、二量体化する。その後、核内に移行して 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し、転写共役因子複合体を形成して標的遺伝子の転写を調節する。ところが近年になり、川戸グループの研究も含めて、ER、PR、AR は神経シナプスにも存在し、蛋白キナーゼを活性化することによってシナプスを増加させたり、シナプス長期増強を成立させるなど、早い信号伝達においても活躍していることが次々と見出されている (Tabori et al., 2005, Tsurugizawa et al., 2005, Mukai et al., 2007, Spencer et al., 2008, Mukai et al., 2010)

#### 1-4-1. プロゲステロン受容体 (PR)

PR (遺伝子: *Pgr*) は PROG をリガンドとする受容体で、核内受容体の一つである。PR には、PR-A、PR-B 及びそれらのスプライスバリエント、7 回膜貫通ドメイン型 (7TM $\text{PR}\beta$ ) がある。PR-B は完全長型のアイソフォームで、PR-A は N 末端が不完全なアイソフォームである。PR は古典的な遺伝子発現制御を行う一方で、細胞膜から始まり最終的に転写因子を活性化するシグナル経路も動かす (Nilsen and Brinton, 2003)。これら PR の生殖に関する機能は非常に良く研究されてきたが、PROG の神経保護作用や神経栄養作用を媒介する受容体としての機能については、未だ明らかになっていない。PR-A、PR-B はラットの海馬、視床下部、大脳皮質、小脳を含む脳全体に広く分布しており、どの神経系の細胞でも発現している。

#### 1-4-2. $\alpha$ 型エストロゲン受容体 ( $\text{ER}\alpha$ )

$\text{ER}\alpha$  (遺伝子: *Esr1*) は、哺乳類において 2 種存在する古典的なエストロゲン受容体サブタイプの 1 種である。E2 は、エストロゲン受容体を介して様々な作用を発揮する。

川戸グループが新規に作成した特異性の高い精製抗体 (C 末端 19 アミノ酸の抗体 ; RC-19) を用いた高感度免疫組織解析によって、CA1-CA3 錐体神経細胞や DG の顆粒神経細胞に  $\text{ER}\alpha$  が発現しており (Mukai et al., 2007)、 $\text{ER}\alpha$  は脳内の性ホルモン合成系と共局在していることが判明した。そのため、脳ステロイドとして合成される E2 は、神経細胞で合成されて局所的に自己・近接に分泌され、作用していることが示唆される。近年の川戸グループの研究により、 $\text{ER}\alpha$  が海馬神経細胞の樹状突起のスパイン (シナプス後部) でも発見され

た(Mukai et al., 2007)。また、ER $\alpha$  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)。

川戸グループの 2007 年の発表以前は、*in situ* hybridization 法や免疫組織染色法の解析から、ER $\alpha$  は海馬の hilus やインターニューロンのみに発現しており、CA1-CA3 錐体神経細胞や DG の顆粒神経細胞には見られないとされてきた (Weiland et al., 1997, Orikasa et al., 2000)。

### 1-4-3. $\beta$ 型エストロゲン受容体 (ER $\beta$ )

ER $\beta$  (遺伝子: *Esr2*) は、ER $\alpha$  とは異なる遺伝子の産物だが、互いに高い類似性を持つ。共通のリガンドである E2 とは同程度の親和性で結合するが、細胞、プロモーター依存的に異なる転写活性を持つ。選択的スプライシングによって生じる二つのアイソフォームがあり、それらは ER $\beta$ 1、ER $\beta$ 2 として知られている。

*Esr2* は海馬に発現しており、視床下部や大脳皮質にも発現がある (Ishii et al., 2007, Mukai et al., 2007)。海馬では、*Esr2* の発現は *Esr1* の約 1/8 である。

ER $\alpha$ 、ER $\beta$  は、ホモ二量体またはヘテロ二量体を形成して、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*、*Esr2* の発現量とその存在比、アイソフォームの存在や、それらの組織内局在で異なると考えられる。よって、脳内で ER の存在量、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、その活性が異なることを示唆するものと考えられる。

### 1-4-4. アンドロゲン受容体 (AR)

AR (遺伝子: *Ar*) は哺乳動物では 1 種存在し、主にアンドロゲンである T と DHT をリガンドとする受容体である。T、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 より解離速度が遅いため、T よりもおおよそ 4 倍程度強い男性ホルモン活性を示す。近年の川戸グループの研究により、AR が海馬神経細胞の樹状突起スパイン (シナプス後部) でも発見され、AR が T、DHT による急性的なスパイン密度の増加に関わっていることが明らかとなってきた (Hatanaka et al., 2015)。

AR は海馬と視床下部で発現が多く、大脳皮質・視床にも相当量の発現がある。

## 1-5. 性ステロイドホルモン合成系

性ステロイドホルモン合成に関わる酵素は、主にチトクロム P450 (cytochrome P450) 酵素、水酸化ステロイド脱水素酵素 (HSD: hydroxysteroid dehydrogenase)、ステロイド還元酵素 (steroid reductase) に大別される。

P450(17 $\alpha$ ) (遺伝子: *Cyp17a1*) は、プレグネノロン (PREG: pregnenolone) をデヒドロエピアンドロステロン (DHEA: dehydroepiandrosterone) に変換する酵素である。末梢組織では主に精巣に高発現している。脳内では、視床下部と小脳に多く発現している。図 1-4 に示した性ステロイドホルモン合成系の中では、PREG から DHEA への変換の他に、PROG からアンドロステンジオン (ADione: androstenedione) を合成する反応を担う。P450(17 $\alpha$ ) は、PROG からストレスステロイド合成系と性ステロイド合成系へ分かれる分岐点に位置する酵素であり、性ステロイドホルモン合成において重要な役割を担っている。

P450arom (遺伝子: *Cyp19a1*) は、ステロイド骨格の A 環を芳香化する酵素であり、末梢組織では卵巣に高発現している。性ステロイドホルモン合成系の中では、T から E2、ADione からエストロン (E1: estrone) を合成する反応を担っており、女性ホルモンである E2 の合成に欠かすことのできない重要な酵素である。

17 $\beta$ -HSD は、主に T を合成する酵素である。17 $\beta$  位水酸基の脱水素化、または 17 位ケト基の還元を行う。性ステロイドホルモン合成系の中では、ADione と T、E1 と E2 などの相互変換に関わっている。一般的に男性ホルモン・女性ホルモンとも 17 $\beta$  位水酸化体が 17 位ケト体よりも受容体に対する親和性および活性が強い。すなわち、17 $\beta$  位水酸化体である T と E2 は活性型の性ホルモンであり、17 位ケト体である ADione と E1 は不活性型の性ホルモンである。このことから、17 $\beta$ -HSD は性ステロイドホルモンの活性を調節するという面で重要な酵素であると言える。

ラットにおいて、17 $\beta$ -HSD は現在 14 種類のサブタイプが存在することが知られている。17 $\beta$ -HSD1、3、5、7、12 は主に 17 $\beta$  水酸化反応を担っており、17 $\beta$ -HSD2、4、6 (9 と同じものである)、8、10、11、14 は 17 位ケト化反応を担っている。17 $\beta$ -HSD13 は、17 $\beta$ -HSD11 と高い相同性を持つことがわかっているが、ステロイドとの反応については未だ詳しく調べられていない。この中で特に活性の強い酵素が 17 $\beta$ -HSD1、2、3 であり、川戸グループの先行研究により、オスラットの海馬では 2 が少なく 1、3 が多く発現していることが明らかとなっている (Kimoto et al., 2010)。このことから、海馬における性ステロイドホルモン合成に必要な酵素として、17 $\beta$ -HSD1、3 の二つが特に重要であると考えられる。

17 $\beta$ -HSD1 (遺伝子: *Hsd17b1*) の遺伝子は、末梢組織では主に卵巣に高発現している。また、17 $\beta$ -HSD3 (遺伝子: *Hsd17b3*) の遺伝子は、末梢組織では主に精巣に高発現している。

5 $\alpha$ -reductase は、T をより強力な男性ホルモンである DHT へと変換する重要な酵素である。5 $\alpha$ -reductase には、5 $\alpha$ -reductase1 及び 5 $\alpha$ -reductase2 の 2 種類のサブタイプが存在することが知られている。5 $\alpha$ -reductase1 は T に対する親和性や活性は弱い。一方、5 $\alpha$ -reductase2 は T に対する活性は非常に強いが、発現量は 5 $\alpha$ -reductase1 に比べて少ない。この 2 つのタイプ間の相同性は低く、アミノ酸レベルで 42%程度である。

5 $\alpha$ -reductase1 (遺伝子: *Srd5a1*) の遺伝子は、末梢では主に肝臓に多く発現しており、5 $\alpha$ -reductase2 (遺伝子: *Srd5a2*) の遺伝子は、主に雄性生殖器に多く発現している。

さらに、性ステロイドホルモンの材料となるコレステロールをミトコンドリア内膜に輸送する蛋白質であるStAR (遺伝子: *Star*)は、末梢では主に副腎に多く発現している。

## 1-6. 性ステロイドホルモンの海馬内合成

従来、性ホルモンは卵巣や精巣といった末梢組織で合成され、血流によって脳に運ばれて作用するという考え方が一般的であった。しかし 1980 年代に、血中濃度よりも脳内の PREG、PROG、DHEA 濃度の方が圧倒的に高いこと (Corpechot et al., 1981, Baulieu and Robel, 1998) や、これらの濃度が副腎や精巣といった性ホルモン合成器官を摘出しても維持されること (Corpechot et al., 1981, Robel et al., 1987) が発見された。これらの発見に基づいて、脳内においても性ホルモンが合成されているという説が提唱された。

しかし長い間、DHEA や ADione の合成に必要な P450(17 $\alpha$ ) を成獣の脳で検出できなかったために、胎仔期を除く成獣の脳では性ホルモンの合成はできないとされてきた (Robel and Baulieu, 1991)。川戸グループでは、成獣オスラットにおける、①RT-PCR を用いた性ホルモン合成酵素 mRNA の発現解析、②免疫化学組織染色を用いた性ホルモン合成酵素蛋白質の局在解析、③海馬スライスに RI 標識したステロイドを基質として加えてインキュベーションし、基質ステロイドの代謝を測定する性ホルモン合成能の解析、④海馬に存在する性ホルモンの濃度測定 を行い、海馬内での性ホルモン合成系を明らかにした (Kimoto et al., 2001, Kawato et al., 2002, Hojo et al., 2004) (図 1-4)。

成獣オスラットの海馬内では、E2 が血中の 800 倍の濃度で存在するように (Hojo et al., 2009)、性ホルモンが血中と比べて海馬内において非常に高い濃度で存在するのは、こうした海馬における局所合成の寄与によるものと考えられる。このように、性ホルモンの海馬内合成は、性ホルモンの海馬に対する作用を考える上で、非常に重要な要素である。

## 1-7. 性ステロイドホルモンの脳神経系への作用

脳内に存在し生理活性を持つステロイドはニューロステロイドと呼ばれ、性ホルモンもその中の一つである。これまで、脳神経系に対する性ホルモンの作用については、生殖行動に関係する脳の性分化に関して多くの研究が行われてきた。

ラットの脳における性分化のメカニズムとしては、現在のところ aromatization hypothesis (Naftolin et al., 1975) が支持されている。この仮説では、脳の雄性化が女性ホルモンである

E2 によって引き起こされると考えられている。オスにおいては、生後数時間で精巣から大量の T が分泌されて血流を介して脳に到達し (Rhoda et al., 1984)、P450arom の働きによって E2 に変換されて脳内で作用することにより、脳の雄性化が起こる。一方メスでは、出生直後には卵巣が未成熟であるため、血中に性ホルモンが分泌されない。母体由来の E2 は、産期の母ラット血中に多量に含まれる  $\alpha$ -fetoprotein によって隔離され、血液脳関門を透過できないことから、胎児期のオス仔・メス仔ともに母体由来の E2 は脳内へ移行しない。母体は当然メスなので、T の供給は極めて少ない。よって、メス仔の脳内には E2 も E2 の基質である T も供給されないため、脳は雄性化せず雌性脳を保つと考えられている。

脳の発生期における E2 の作用によって生じる代表的な脳の性差は、視床下部の視索前野性の二型核 (SDN-POA: sexually dimorphic nucleus of the preoptic area) である。オスでは E2 によって神経細胞のアポトーシスが抑制されるため、オスの方がメスよりも SDN-POA が 5 ～7 倍大きくなると報告されている (Gorski et al., 1978, Davis et al., 1996)。生殖中枢である視床下部におけるこのような顕著な差によって、交尾行動の性差が生じると考えられている。

その他、中枢神経系において PROG は、認知、気分、炎症、ミトコンドリアの機能、神経新生、髄鞘形成、神経保護などの非生殖機能を多く持つことが示されている。その作用標的は、視床下部、海馬、皮質を含む様々な領域である。

E2 は、認知や神経保護 (グルタミン酸興奮毒性、アミロイド  $\beta$ 、酸化ストレスなどの傷害に対する保護) などの脳における非生殖機能を制御する。

こうした中で近年では、海馬神経細胞への性ホルモンの作用が注目されており、その具体的な効果が明らかとなってきた。卵巣を摘出すると、海馬 CA1 領域の樹状突起スパイン (シナプス後部) の密度 (Gould et al., 1990, Woolley and Schwartzkroin, 1998) 及びシナプスの数 (Leranth et al., 2002, Leranth et al., 2004, MacLusky et al., 2005) が減少する。また、卵巣摘出後のスパイン密度減少に伴い、記憶・学習能も減退する (Wallace et al., 2005) ことが報告されている。

川戸グループの先行研究により、E2 の神経細胞に対する急性効果が明らかとなった。その研究によると、E2 は海馬 CA1 領域の神経細胞樹状突起スパインの密度を急性的に増加させ、電気生理学的には LTD の抑圧率を急性的に増強する (Mukai et al., 2007)。

過去の多くの研究から、海馬のスパイン密度と学習の密接な関係が示されている (Moser et al., 1994, Moser et al., 1997, O'Malley et al., 2000)。また、LTD は記憶の素過程の一つとして知られており、これらを総合すると性ホルモンは、海馬神経細胞のスパイン密度を増やしたり、シナプス可塑性を調節したりすることによって、記憶・学習能に影響を与える重要な因子であると言える。

## 1-8. コルチコステロン(CORT)

生体がストレスにさらされると、その刺激が視床下部室傍核 (paraventricular nucleus) へと伝わり、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH: corticotropin-releasing hormone) が分泌される。CRH は下垂体門脈を経由して下垂体に到達し、下垂体から血中への副腎皮質刺激ホルモン (ACTH: adrenocorticotrophic hormone) の分泌を促進する。この ACTH が副腎皮質を刺激することにより、コルチコステロン (CORT: corticosterone) の産生が増加する。この視床下部－下垂体－副腎の反応系列は、HPA 系 (HPA axis: hypothalamic-pituitary-adrenal axis) と呼ばれている (Herman et al., 2003)。ストレス刺激によって HPA 系が活性化されると、CORT (ラットやマウスなど齧歯類では CORT、ヒトやサルではコルチゾール) の血中濃度が上昇するため、CORT はストレスホルモンとして知られている (Reichstein et al., 1936)。

CORT は、肝臓での糖新生を促すことで血糖値を上昇させたり、組織の炎症を抑制することによって、ストレス応答を制御して生体の恒常性維持を助ける (Selye, 1936)。CORT はステロイドホルモンであり (図 1-4)、そのほとんどが corticosteroid-binding globulin (CBG) に結合して血流を介して全身に運ばれる。CORT は、抹消組織に影響するだけでなく、脳血液関門を越えて脳内へと到達することができる。海馬には CORT の核内受容体 (glucocorticoid receptor : GR) が多く存在しており (Van Eekelen et al., 1988)、CORT 濃度上昇を感知して視床下部を沈静化し、ACTH 分泌を抑えてストレスホルモンの放出を正常に戻す働きをする (Jacobson and Sapolsky, 1991; Sapolsky et al., 1984)。そのフィードバック作用により、ストレスを受けてから約 2 時間後には CORT の血中濃度はストレスを受ける前のレベルまで戻る (Droste et al., 2008)。

## 1-9. 海馬におけるコルチコステロン(CORT)の作用

脳内における CORT 受容体は、特に海馬に多く分布しており (Van Eekelen et al., 1988; McEwen et al., 1968)、CORT は GR に結合する (Joëls and de Kloet, 1994; de Kloet et al., 1998)。GR は、他のステロイド受容体と同様に核内で転写因子として働き、対応する遺伝子転写を調節して細胞機能の変化をもたらす (Gronemeyer et al., 2004)。また、GR は CORT と比較的低い親和性 ( $K_d$  値: 5 nM) を持ち、ストレスにさらされた後のような高い CORT レベル時に多く活性化する。

CORT が海馬で受容体と結合することが報告されて以来、神経細胞形態や記憶・学習能力への影響が研究されてきた。CORT の投与や身体的・心理社会的ストレスを長期間 (3–4 週間) 与え続けると、海馬 CA1 および CA3 錐体細胞の樹状突起の萎縮や分岐の減少、スパインの減少がみられることが報告されている (Gourley et al., 2013; Magariños et al., 1996;

Watanabe et al., 1992; Woolley et al., 1990)。また、長期間 (1–8 週間) の CORT 投与や身体的・心理社会的ストレスにより、海馬依存的な空間学習能力が抑制される (Conrad et al., 1996; Krugers et al., 1997; Luine et al., 1993)。さらに、記憶の素過程と考えられている LTP も、長期間の CORT への曝露によって抑制される (Alfarez et al., 2003; Pavlides et al., 1996)。

以上のような、CORT による海馬への長期作用が報告されてきた一方で、近年、短期間 (～数時間) の CORT の作用も明らかになってきている。例えば、海馬依存的な記憶・学習課題の直前にストレス刺激を与えると学習が阻害されるが、課題最中のストレス刺激や CORT の投与によって、学習が促進されることが報告されている (Akirav et al., 2004; Diamond et al., 2006; Joëls et al., 2012; Schwabe et al., 2012)。さらに、数十分の身体的なストレス刺激を与えてから約 3 時間後に、海馬 CA1 領域における LTP が増大し (Spyrka et al., 2011)、24 時間後には海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起スパインが増加するという報告もある (Shors et al., 2001)。

また、川戸グループではさらに、単離した海馬スライスに 1  $\mu$ M の CORT を直接作用させると、1 時間という短時間で CA1 錐体細胞のスパイン、および CA3 錐体細胞のソーン (密集したシナプス後部構造) が増加することを明らかにしている (Komatsuzaki et al., 2012; Yoshiya et al., 2013)。

## 1-10. メスの性周期と性ホルモンの関係

メスラットは、proestrus (発情前期・卵胞期)、estrus (発情期・排卵期)、diestrus 1 (休止期 1・黄体期 1)、diestrus 2 (休止期 2・黄体期 2) という 4 つのステージから成る性周期を持っている。各性周期ステージは 1 日ごとに変化し、4 日で周期が 1 周する。性周期の制御は、視床下部-下垂体-性腺軸 (HPG 軸) によって行われている。

性周期に伴い、子宮では子宮内膜の肥厚と排卵が起こるが、血中ではこれらを制御するホルモンの濃度変動が起こる。以下に性周期における血中のホルモン動態の概要を述べる。

- (1) Diestrus 2～Proestrus の前期に E2 分泌の第 1 のピークがある。これは Proestrus の後期に起こる、卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone : FSH) の第 1 サージによって発育した第一卵胞群由来のものである。第一卵胞群は Diestrus 2 に発育のピークを迎え、その後退行するため E2 濃度は一度低下する。
- (2) Proestrus の中期～後期に E2 の第 2 のピークがある。これは Estrus の前期に起こる、FSH の第 2 サージによって発育した第二卵胞群由来のものである。この E2 濃度の上昇により、視床下部で性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone : GnRH) のパルス分泌が増え、下垂体からの黄体形成ホルモン (luteinizing hormone : LH) 分泌が急激に上昇する (LH サージ)。

- (3) Proestrus 後期の LH サージは、第 2 卵巣群の排卵と PROG の合成、FSH の第 1 サージを誘起する (新しい第一卵胞群が形成され始める)。このとき、一過的に合成された PROG は LH 分泌の抑制を行う。
- (4) Estrus の前期には、排卵によって成熟卵胞が消失することによって、E2 とインヒビンの分泌が急激に減少する。インヒビン分泌の低下により、インヒビンによる抑制を受けていた FSH の第 2 サージが起こる (新しい第二卵胞群が形成され始める)。
- (5) 排卵後の Diestrus 1, Diestrus 2 では、黄体が形成され PROG の産生が起こるが、その濃度はすぐに低下する。これは黄体細胞に 20 $\alpha$ -水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ (20 $\alpha$ -HSD) が発現し、PROG を生理活性のない 20 $\alpha$ -ジヒドロprogesterone に異化するためである。

メスラットは、性周期に伴って膣上皮細胞や子宮上皮細胞の形態や膣内の分泌物 (膣スメア) が鋭敏に変化する。そのため、膣スメアを観察することによって、容易に性周期の判定ができる。膣スメアの細胞像は、Proestrus では、大型円形の有核細胞が多く、有核細胞と角質化細胞が混ざっている。Estrus では、扁平で無核の角質化細胞がほとんどで、有核細胞や白血球は見られない。Diestrus 1 ではリンパ球、有核細胞が混在した細胞像を示す。Diestrus 1 に対し、Diestrus 2 ではリンパ球が主要な細胞種となる (図 2-4)。

## 1-11. 研究目的

本研究では、以下の 2 つのテーマの解明を研究目的とした。

### A：男性・女性ホルモンが、海馬神経細胞の樹状突起スパイン密度を急性的に増加させる分子メカニズムの解析

本研究では、海馬の女性ホルモン (progesterone: PROG、estra-1,3,5-triol: E2) 及び男性ホルモン (ジヒドロtestosterone: DHT) に焦点を当て、性ホルモンによる海馬神経スパイン (シナプス後部) の密度制御に関わる分子機構解明を目的とした。これまで、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たが、その制御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) のみに焦点が当てられてきた。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急性的に増加させることが明らかとなってきた (Mukai et al., 2010; Hatanaka et al., 2015; Hasegawa et al., 2015)。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し、リン酸化酵素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明を行った。

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** をリン酸化して不活性化させる **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** をリン酸化して活性化させる **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 $\alpha$** 、アンドロゲン受容体 : **AR**) にも着目して実験を行った。特に、**E2** と同様に神経に作用する女性ホルモンである **PROG** の受容体 (**PR**) の動態や、下流で働くメカニズムの詳細については、未だ解明されていない部分が多い。以上を踏まえて、以下の研究を行った。

- (1) リン酸化酵素 (**LIMK**, **ERK/MAPK**) の阻害剤を用いて、性ホルモンによる急性的な神経スパイン密度制御の分子メカニズム解明を行なった。
- (2) 性ホルモン受容体 (**PR**, **ER $\alpha$** , **AR**) のアンタゴニストを用いて、性ホルモンによる急性的な神経スパイン密度制御の分子メカニズム解明を行なった。

#### B : メスラットの性周期に伴う海馬の神経スパイン密度変動と海馬内の性ホルモン濃度変動、及び性ホルモン合成酵素と受容体発現量との相関の解析

メスラットの生殖器官には4ステージから成る性周期が存在し、約4日周期で繰り返される。性周期に伴って、脳では神経スパインが周期的変動を示すことが知られているが、性周期をきちんと4つのステージに分けて解析した報告はない。また上記の変動は、女性ホルモンである **E2** や **PROG** の血中濃度の変動に起因すると考えられているが、海馬における **E2** や **PROG** 濃度と、その周期的変動は測定されておらず、スパイン密度の制御機構については未解明である。そのため、性周期に伴う海馬機能の変動を説明するためには、メスラットの海馬内性ホルモン濃度を各性周期ステージで実測する必要がある。また、海馬の性ホルモン合成系やその受容体が性周期に伴って変動するか否かも重要である。以上を踏まえて、以下の研究を行った。

- (3) メスラット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には、性周期の各ステージで増減があるのかどうかを調べた。
- (4) メスラットの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を調べた。

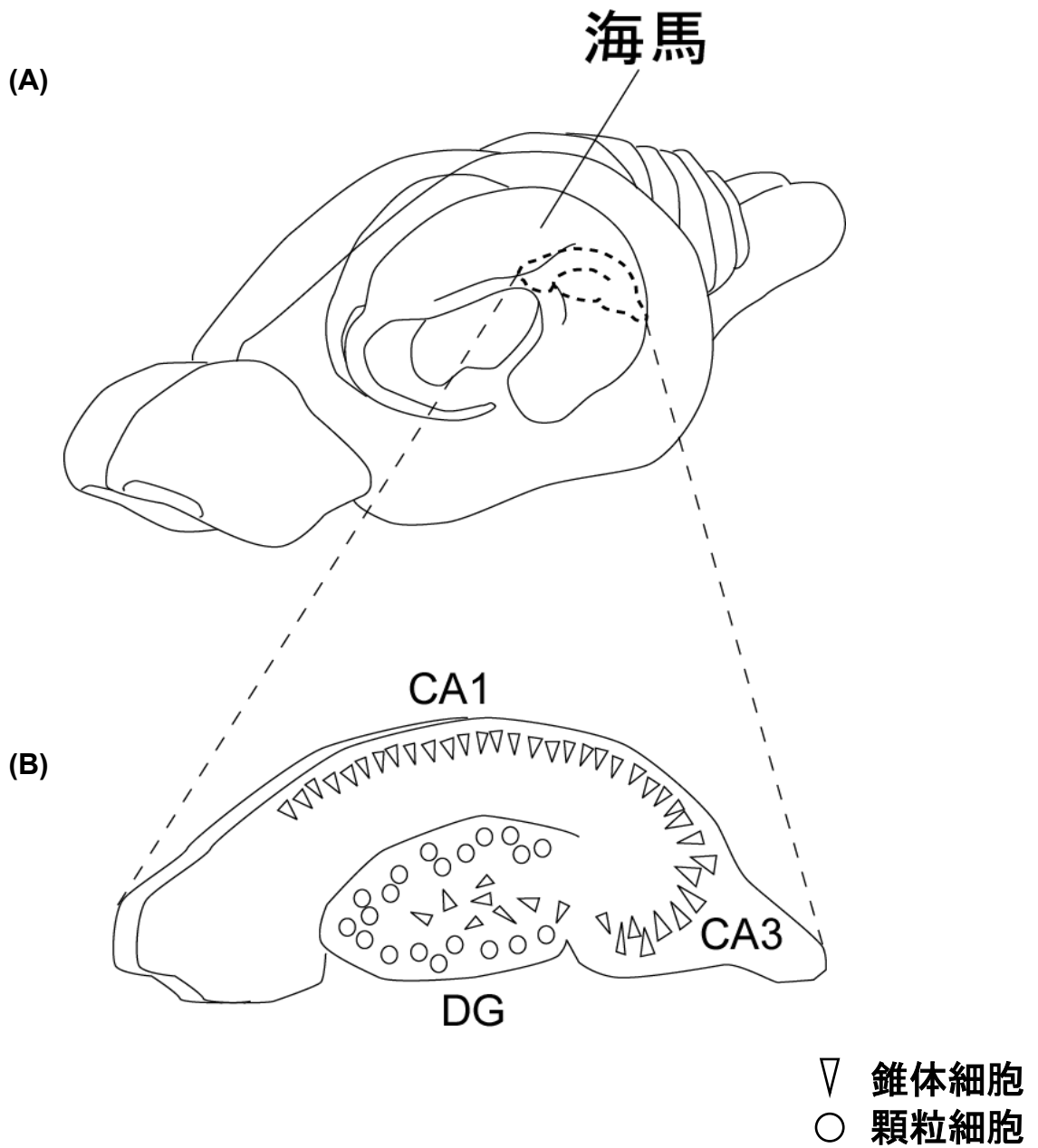


図1-1. 海馬の位置と断面図

(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を示した。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している。

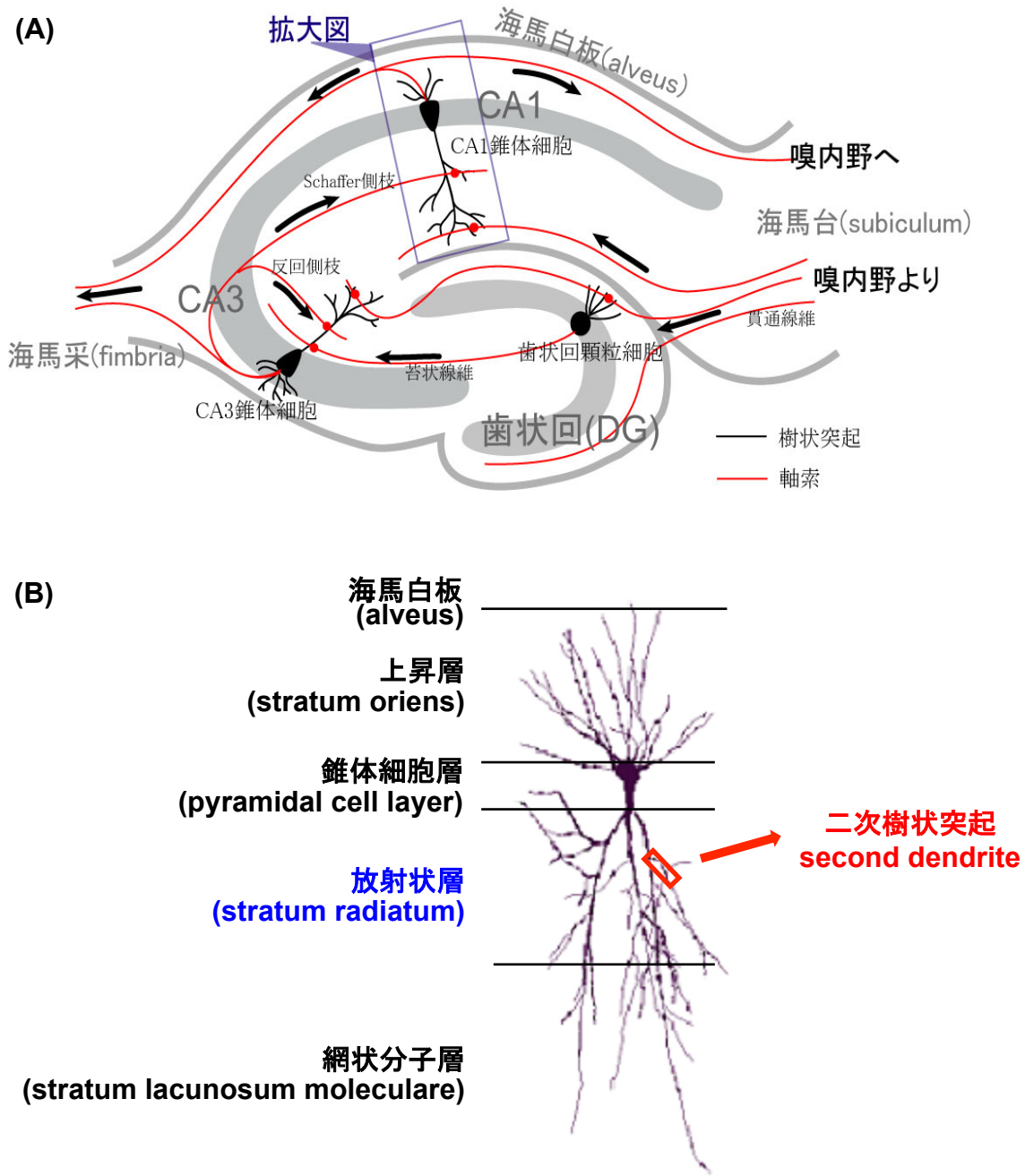


図1-2. 海馬の内部構造及びCA1領域の錐体細胞

(A) 海馬を長軸に対して垂直に切った断面図。海馬はアンモン角 (CA1-CA3)、歯状回 (DG) から成り、神経細胞が幅の狭い層状に並んでいる (灰色の帯部分)。アンモン角では錐体細胞が、歯状回では顆粒細胞が神経細胞層を構成している。海馬内の主要な神経回路は、嗅内野皮質から伸びる貫通線維がDGに投射し、DG → (苔状線維) → CA3 → (シャーパー側枝) → CA1となっている。

(B) CA1領域の錐体細胞 (グルタミン酸神経) の拡大図。CA1領域に分布する錐体細胞の層構造は、上行層 (Stratum Oriens)、錐体細胞層 (Pyramidal cell layer)、放射状層 (Stratum Radiatum)、網状分子層 (Stratum lacunosum moleculare) に分けられる。CA3からCA1の放射状層にシャーパー側枝が投射している。単一の神経細胞には40本ほどの樹状突起が存在しており、本研究では二次分岐した樹状突起のスパインを観察した (赤で囲んだ部分)。この部位が、性ホルモンに最も敏感に応答する。

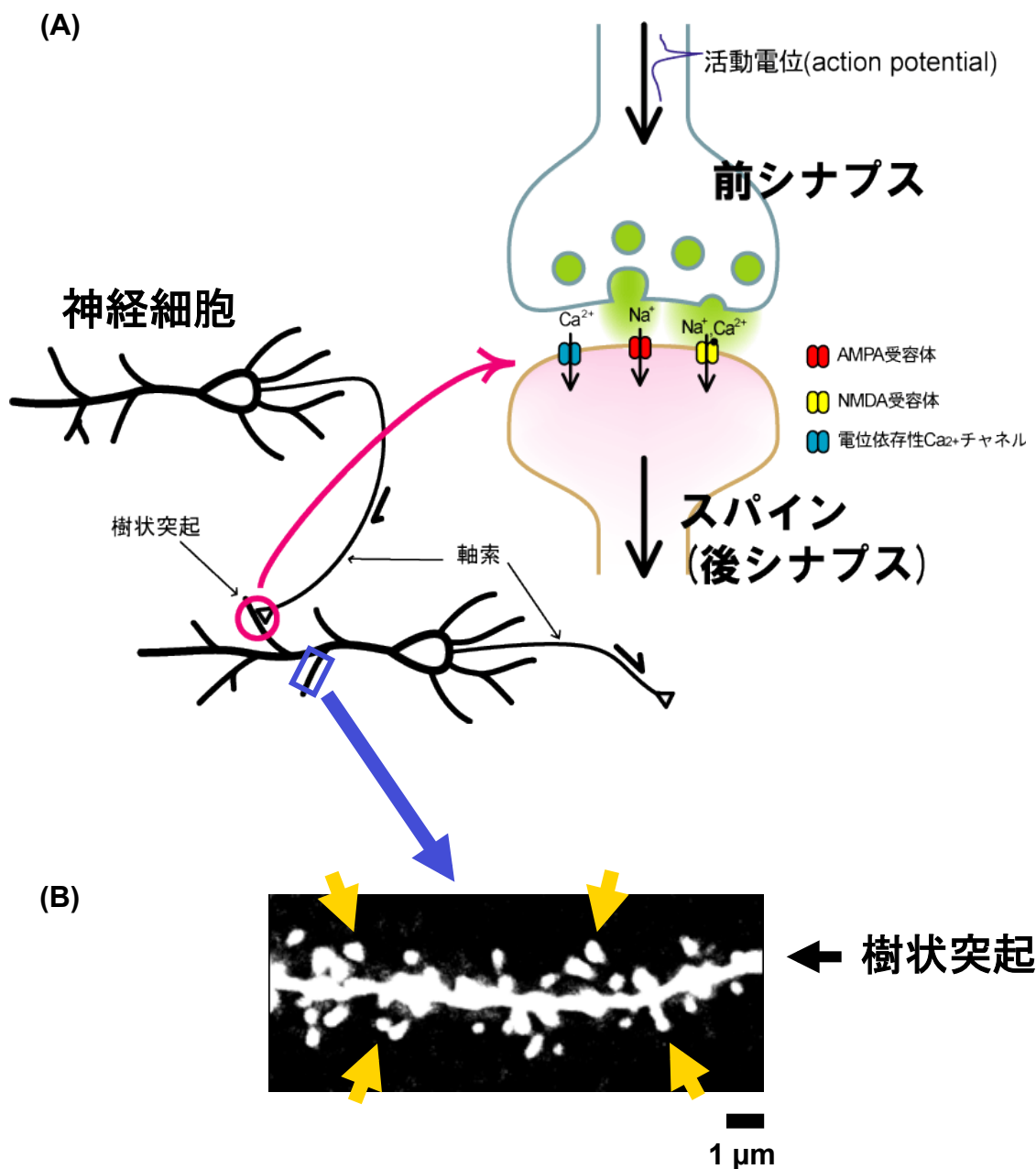


図1-3. シナプスとスパイン

(A) 神経細胞シナプスの模式図。神経細胞同士は、シナプス結合を介して情報を伝達している (左)。スパインは、前神経細胞とシナプス結合を形成する際の、後シナプス構造である (右)。スパインには、NMDA型受容体やAMPA型受容体などのグルタミン酸受容体が発現しており、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。

(B) 共焦点顕微鏡で撮影した樹状突起スパインの画像。黄色の矢印はスパインを示している。

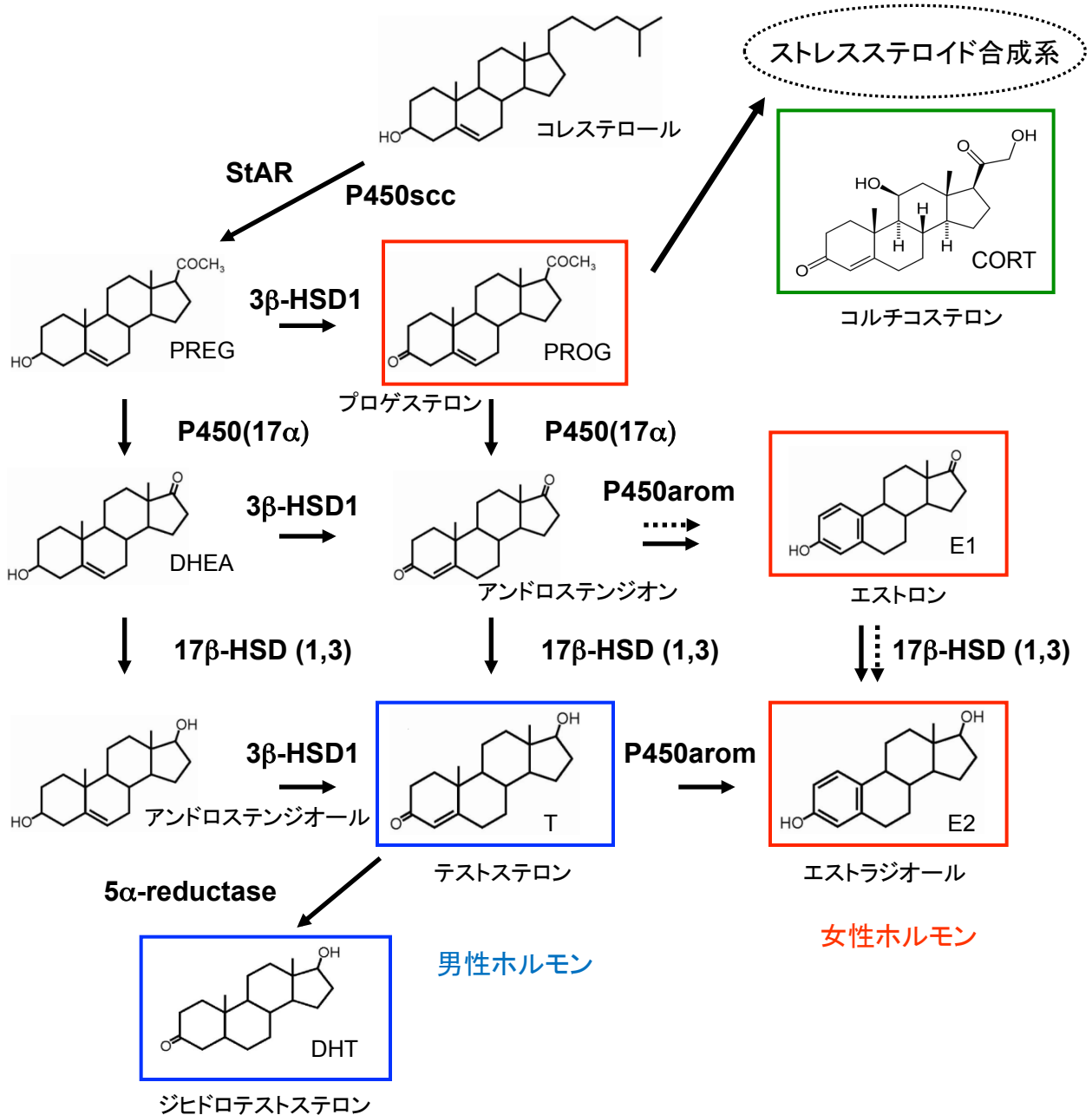


図1-4. ラットの海馬における性ステロイドホルモン合成系

成獣ラットの海馬における性ステロイドホルモン合成経路。各ステロイドの間に、反応を触媒する酵素を示した。青い四角で囲んだステロイドは男性ホルモン、赤い四角で囲んだステロイドは女性ホルモンである。RT-PCRにより、これらの性ホルモン合成酵素のmRNAが海馬に発現していることが明らかになった。また、 $^3\text{H}$ 標識した基質ステロイドを用いて行った代謝実験により、これらの酵素群の酵素活性も確認された。エストラジオール (E2) がオスの海馬で血中より遥かに高い濃度で存在するのは、上図のように性ステロイド合成系が海馬に存在していることによるものであると考えられる。成獣オスラットの場合、海馬におけるE1は非常に少ないため、E1を介してE2を合成する経路 (点線矢印) は主要ではないと考えられる。メスの場合は実線で示した。

## 第2章 実験方法

### 2-1. 実験動物

実験動物には Wistar ラットを用いた。オスラットは、12 週齢の個体を使用した。メスについては、使用する個体の性周期を調べるために 10 週齢から飼育を始め、2 週間程度性周期の判定を続けて性周期の安定している個体を用いた。使用時の週齢は 12～13 週齢である。これらの実験動物は、すべて東京実験動物供給所(株) から購入した。

実験動物は室温 25℃、明暗周期を 12 時間（午前 8 時照明点灯、午後 8 時消灯）の状態で飼育した。餌として固形ペレットを与え、実験動物が餌・水ともに自由に得られる飼育環境にした。実験動物は午前 9 時 30 分から 10 時の間に使用し、使用の際はイソフルラン麻酔下で断頭を行った。

本研究における動物を使ったすべての実験は、東京大学が定める施設動物実験規則に基づいて行った。

### 2-2. 試薬

NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, D(+)-glucose, Paraformaldehyde, Agar Powder, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), LiCl, Actinomycin D, Cycloheximide, 17β-estradiol, Dihydrotestosterone は和光純薬工業から購入した。EDTA-4Na は同仁化学研究所から購入した。Lucifer Yellow, Corticosterone (CORT), ICI182,780, RU-486, U0126 は Sigma-Aldrich から購入した。LIM Kinase Inhibitor は Calbiochem から購入した。Isoflurane は、ファイザー株式会社から購入した。2-melcapt ethanol (生化学用)、2-propanol、2-propanol (HPLC 用)、8-hydroxyquinoline、acetic acid、acetic acid (HPLC 用)、acetonitrile (HPLC 用)、ammonium formate (HPLC 用)、ampicillin (生化学用)、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O、CH<sub>3</sub>COOK、CH<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O、chloroform、D-glucose、ethanol、ethidium bromide、ethyl acetate(HPLC 用)、glycerol、HCl、isoamyl alcohol、methanol (HPLC 用)、NaOH、n-hexane (HPLC 用)、phenol (核酸抽出用)、SDS (生化学用)、sodium citrate dihydrate、Tris は和光純薬から購入した。picolinic acid は東京化成工業から購入した。[1,2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]estradiol は林純薬から購入した。testosterone-d<sub>3</sub>、progesterone-d<sub>4</sub> は CDN Isotope inc.から購入した。[1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-testosterone、[1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-progesterone は Perkin Elmer から購入した。EDTA · 2Na · 2H<sub>2</sub>O、EDTA · 4Na · 4H<sub>2</sub>O、HEPES は同仁化学製品から購入した。BSA、diethylpyrocarbonate、Ficoll 400、Polyethylene Glycol 8000、RNase A、salmon sperm DNA、progesterone は Sigma から購入した。Agarose S

はニッポンジーンから購入した。10 X buffer for Blend Taq、10 X buffer for KOD -Plus- ver2、Blend Taq、dNTP mixture 2.5 mM each、dNTPs 2 mM each、KOD -Plus-、MgSO<sub>4</sub> 25mM は TOYOBO から購入した。10X PCR buffer、DNA Ligation Kit <Mighty Mix>、Proteinase K、RNase H、TaKaRa Taq は TaKaRa Bio から購入した。100bp DNA Ladder、5 X Reaction buffer、DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment、M-MLV Reverse Transcriptase RNase H (-) (point mutant)、Oligo-(Stromstedt and Waterman)15 primer、RNasin Ribonuclease Inhibitor、SV Total RNA Isolation System は Promega から購入した。

本研究で使用した各種阻害剤の構造式を、図 2-1 に示した。

## 2-3. 調製試薬

本研究で用いた調製試薬の組成を以下に示す。

### 2-3-1. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-): phosphate buffered saline)の組成

二次蒸留水 (DDW) に、以下のような組成になるように試薬を加えて調製した。

試薬名	濃度 [mM]
NaCl	137
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8.10
KCl	2.68
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.48
EDTA-4Na	0.442

※pH は室温で 7.3 に合わせた。

### 2-3-2. 人工脳脊髄液(ACSF : artificial cerebrospinal fluid)の組成

ACSF の組成は以下の通りである。

試薬名	濃度 [mM]
NaCl	124
KCl	5.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.25
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
CaCl <sub>2</sub>	2.0

NaHCO <sub>3</sub>	22
D(+)-glucose	10

ACSF 調製では、カルシウムの析出を防ぐために、まず NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> を DDW に溶かし、木下式ガラスボールフィルタ (木下ガラス, 日本)を用いて 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>混合ガスを飽和するまで通気した後、CaCl<sub>2</sub>と D(+)-glucose を加えた。pH は 7.4 に調整した。ACSF は実験に使用するまで 4 °C で保存した。

### 2-3-3. 固定液(PFA: パラホルムアルデヒド溶液)の組成

湯浴により 55 °C に保ちながら、Paraformaldehyde を質量パーセント濃度 3.5%または 4% で PBS(-)に溶解することで作成した (図 2-2 (A))。作成した固定液は、劣化を防ぐために長期保存はせず、必要時に調製した。

### 2-3-4. 海馬支持用寒天の組成

ACSF に質量パーセント濃度 8%で Agar Powder を入れ、電子レンジで沸騰させ溶解した後自然冷却して固めた。

### 2-3-5. Lucifer Yellow 染色液の組成

本研究では、神経細胞を可視化するための蛍光色素として、質量パーセント濃度 4% Lucifer Yellow (図 2-2 (B), (C)) 水溶液を用いた。Lucifer Yellow は、通常 2–5%で神経細胞の形態観測に十分な蛍光が得られる (Hanani, 2012)。

### 2-3-6. 水難性試薬の組成

PROG, E2, DHT, T, CORT, RU-486 などの水に難溶性の試薬類は、使用する濃度の 1000 倍で DMSO に溶かした後、DMSO 濃度が 0.1%以下になるように ACSF に希釈して使用した。

### 2-3-7. 質量分析に用いた試薬の組成

海馬からの性ホルモン抽出と、各性ホルモンの分離、濃度測定に使用した試薬の組成を示す。



### 2-3-7-1. 性ホルモン抽出

- ・ buffer A (pH = 7.2)

組成	濃度 (mM)	組成	濃度 (mM)
NaCl	136.6	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.34
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.6	KCl	5.36
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.6	D-Glucose	22.2
NaHCO <sub>3</sub>	1	HEPES	5

※ pH 7.2 に調製して、95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> 混合ガスでバブリングを行い、酸素を飽和させた。

- ・ 性ホルモンの有機溶媒抽出液 (ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 3)

- ・ C<sub>18</sub> カラム溶出用溶液

①メタノール : DDW = 0 : 100

②メタノール : DDW = 40 : 60

③メタノール : DDW = 85 : 15

④メタノール : DDW = 100 : 0

### 2-3-7-2. HPLC

- ・ 溶離液 1 (ヘキサン : イソプロパノール : 酢酸 = 100 : 0 : 1)
- ・ 溶離液 2 (ヘキサン : イソプロパノール : 酢酸 = 80 : 20 : 1)
- ・ サンプラー溶液 (ヘキサン : イソプロパノール : 酢酸 = 98 : 2 : 1)

※ これらは全て調製後 30 分間のソニケーションによる脱気処理を行った。

### 2-3-7-3. 質量分析(LC-MS/MS)

- ・ 溶離液 A (0.1 % formic acid)
- ・ 溶離液 B (アセトニトリル : メタノール = 50 : 50)

### 2-3-8. 核酸の精製・電気泳動に用いた試薬の組成

海馬からの核酸の精製から検出までに用いた試薬の組成を示す。

#### 2-3-8-1. total RNA 抽出

- SV Total RNA Isolation System (Promega)
- 99.5 % Et-OH (RNase free)
- 80 % Et-OH (RNase free)
- 3 M sodium acetate (RNase free)
- DEPC 処理水

#### 2-3-8-2. 逆転写

- M-MLV Reverse Transcriptase RNase H (-) (point mutant) (Promega)
- 5 X Reaction buffer (Promega)

組成	濃度 (mM)
Tris-HCl (pH8.3)	250
KCl	375
MgCl <sub>2</sub>	15
DTT	50

- dNTP mixture 2.5 mM each (TOYOBO)
- Oligo-(Stromstedt and Waterman)<sub>15</sub> primer (Promega)
- RNasin Rebonuclease Inhibitor (Promega)
- RNase H

#### 2-3-8-3. PCR

- Blend Taq (TOYOBO)
- 10 X buffer for Blend Taq (TOYOBO)
- dNTPs 2 mM each (TOYOBO)

#### 2-3-8-4. 電気泳動

- TAE buffer

組成	濃度 (mM)
Tris	40
Acetic acid	40
EDTA	1

- Blue/Orange loading dye, 6 X (Promega)

組成	濃度
Orange G	0.4 %
bromophenol blue	0.03 %
xylene cyanol FF	0.03 %
Ficoll 400	15 %
Tris-HCl ( pH7.5 )	10 mM
EDTA ( pH8.0 )	50 mM

- 100 bp DNA ladder Marker (Promega)

## 2-4. 海馬神経スパイン形態イメージングと解析

### 2-4-1. 単離した海馬スライス(急性海馬スライス)の作成と薬理刺激

以下の操作では、ACSF は 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> で常に通気しておき、酸素が飽和状態になるようにした。12 週齢オスラットをイソフルラン麻酔下で断頭し、頭蓋を正中から速やか (1 分以内) に切開して全脳を摘出し、4 °C の ACSF で数分間氷冷した (図 2-3 (A))。その後、海馬を取り出して支持用寒天に接着させ、氷冷しながらビブラトームによって厚さ 400 μm の海馬スライスを作成した (図 2-3 (B))。作成した海馬スライスは 25 °C で酸素を十分通気している ACSF の入ったチャンバーに静かに移し、2 時間インキュベーションすることで、代謝活性を回復させた (図 2-3 (C))。

リカバリー後、DMSO に溶かしておいた性ホルモンや各種阻害剤を実験条件に合わせて各チャンバーに加え、25 °C でインキュベーションした (図 2-3 (D))。インキュベーション終了後、4 %パラホルムアルデヒド溶液 に 4 °C で 12 時間程度浸透して海馬スライスを固定した (図 2-3 (E))。固定が完了したスライスは PBS(-)で洗浄し、4 °C で PBS(-)中に保存した。

### 2-4-2. 灌流固定及び全脳スライスの作製

メスラットの性周期の判定は、毎朝 10 時に膣スメアを採取し、ギムザ染色したものを顕微鏡観察することで行った (図 2-4)。性周期を決定した 12 週齢メスラットをイソフルランで麻酔した後、心臓を介して PBS(-)を前灌流して完全に脱血し、3.5%パラホルムアルデヒド溶液を 200 mL 灌流して組織を固定した (図 2-5 (A))。溶液は全て氷上で 4 °C に冷やしながら用いた。その後、頭蓋を正中から切開して全脳を摘出し、3.5%パラホルムアルデヒド

溶液に 4 °C で 12 時間浸漬することによって後固定した (図 2-5 (B))。後固定した全脳を 8% 寒天で支持し、ビブラトーム (DTK-3000; 堂坂イーエム, 日本) を用いて厚さ 400  $\mu$ m の全脳スライスを作成した (図 2-5 (C))。作成したスライスは 4 °C で PBS (-) 中に保存した。

### 2-4-3. 神経細胞への蛍光色素注入

固定したスライスのグルタミン酸神経細胞に、図 2-6 (A) に示すような装置を用いて蛍光色素 Lucifer Yellow を注入した。使用した顕微鏡は、正立位相差蛍光顕微鏡 (Eclipse FN600E; Nikon, 日本) である。色素注入用の微小ガラスピペットは、外径 1.5 mm, 内径 1.1 mm のフィラメント入りガラス管 (B150-110-10; Sutter Instrument, USA) をキャピラリープラー (P-87; Sutter Instrument, USA) で加熱しながら引くことによって作成した。ガラスピペットの先端径は約 1  $\mu$ m である。ガラスピペットへの 4% Lucifer Yellow 水溶液の充填には、バックフィリング法を用いた。ガラスピペット先端に色素が十分に溜まったら、カテラン針を用いて 100 mM LiCl 水溶液を充填し、銀線電極がピペット内の液面に浸るようにヘッドステージに固定した。固定したガラスピペットは、水圧式マイクロマニピュレータ (MHW-3; ナリシゲ, 日本) で操作した。

PBS(-)で満たした顕微鏡のステージにスライスを固定し、40 $\times$ 水浸対物レンズ(開口数 0.8)で観察しながら CA1 領域の神経細胞層に焦点を合わせた(図 2-6 (B))。この間の光源はハロゲンランプであり、顕微鏡に接続した CCD カメラ (C2400-77; 浜松ホトニクス, 日本) を介したビデオモニター (SONY, 日本) への出力映像を観察した。ガラスピペットの先端をスライス上に位置させた後、光源を水銀ランプに切り替え、蛍光観察 (excitation: 450–490 nm, DM: 505 nm, emission: 520 nm) 下で標的となる海馬グルタミン酸神経細胞の放射状層領域にある一次樹状突起にガラスピペットを刺入した (図 2-6 (C))。ガラスピペット先端が刺入された状態で Axopatch 200B (Axon Instruments, USA) を用いて最大 10 nA の直流電流を 3 分間程度流すことにより、Lucifer Yellow 水溶液を樹状突起先端までむらなく流し込み、スパインを可視化した (Huang et al., 2005)。染色した隣り合う細胞の樹状突起が重ならないように、間隔を空けて色素注入を行い、1 スライスあたり 5–10 個の神経細胞を染色した (図 2-6 (D))。染色後のスライスは 4 °C で PBS(-) 中に保存した。

### 2-4-4. 通常型の共焦点レーザー顕微鏡(PASCAL)による断層撮影

上述の方法により色素注入を行った全脳スライスまたは海馬スライスを、ピンホールの後方に 1 個の検出器を配置している通常型の共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5Pascal; Carl Zeiss, Germany) で観察・撮影した (図 2-7 (A))。水銀ランプを光源に用いて 63 $\times$ 水浸対物レンズ(開口数 1.2) で蛍光観察しながら、CA1 領域のグルタミン酸神経細胞の樹状突起を視野の中央

に移動させ、Ar-Kr レーザーに切り替えて 3 倍ズームで断層撮影を行った。試料の励起には Ar-Kr レーザーの 458 nm 線を用い、蛍光用フィルターにより波長 505 nm 以上の蛍光のみを選択的に取得した。XY 平面の分解能は 0.26  $\mu\text{m}$  である。

分解能の計算には、以下の式を用いた。

$$\text{分解能} = \frac{0.61 \times \lambda}{\text{開口数 (NA)}} \quad \lambda = \text{蛍光波長 (505nm)}, \text{NA} = 1.2$$

励起波長および吸収フィルターの波長は、Lucifer Yellow の励起・蛍光波長特性 (図 2-2 (C)) から決定した。

撮影部位は、先端樹状突起の 2 次分岐樹状突起であり、細胞体からの距離が 150–250  $\mu\text{m}$  の範囲にあるものとした (図 1-2 (B))。この範囲は、CA1 領域の放射状層が確実に含まれる範囲である (Harris et al., 1992)。1 画像の中に樹状突起の全長が 40–50  $\mu\text{m}$  程度含まれるように画像取得範囲を決め、1 枚画像を取得するごとにフォーカス位置を 0.45  $\mu\text{m}$  ずつ下げて連続した 20–30 枚の断層画像を取得した (図 2-7 (B))。

#### 2-4-5. デコンボリューション処理

通常型の共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像データには、光の多重散乱による光学的なボケが写し込まれているため、市販のソフトウェア (AutoDeblur; AutoQuant, US) を用いてソフト的に Point Spread Function を仮定し、デコンボリューション処理を行った (図 2-8)。デコンボリューションとは、劣化画像復元手法の一つである。並進対称な線形光学系において、観測像が真の蛍光分布と点拡がり関数 (point spread function) とのコンボリューション積になることを利用し、これを逆算することにより真の蛍光分布を推定する方法である。AutoDeblur では、Point Spread Function をブラインドデコンボリューション法により算出している (Holmes, 1992)。

#### 2-4-6. 超解像共焦点顕微鏡による断層撮影

上述の通常型の共焦点レーザー顕微鏡 PASCAL は 9 年間使用していたので、2016 年になってから故障を何度も繰り返していた。そのため、PROG による神経スパインへの効果を測定する際には、超解像型の共焦点レーザー顕微鏡 (LSM880; Carl Zeiss, Germany) を用いた観察・撮影に移行した。この超解像共焦点レーザー顕微鏡は、Airy Scan と称して、ピンホールの後方に 32 個の検出器をハチの巣状に配置して撮影することにより、Point Spread Function も実測定することができる。その後、測定した Point Spread Function を用いて Prossesing というデコンボリューションを行って、最終画像を得る。通常型の共焦点レー

ザー顕微鏡 PASCAL で得た control スライスのスパイン画像と、超解像共焦点レーザー顕微鏡 LSM880 で得た control スライスのスパイン画像を比較すると、超解像で撮影した画像の方が S/N 比は 4-8 倍ほど良く、分解能は x-y-z の各方向に 1.7 倍ほど良いとされている。

#### 2-4-7. Spiso-3D によるスパイン検出とスパイン密度・頭部形態の解析

取得した画像データのスパイン密度を、数理解析ソフト Spiso-3D を用いて解析した。Spiso-3D は、科学技術振興機構バイオインフォマティクスプロジェクト「神経シナプス自動解析」において川戸グループが開発した (USA 特許取得済)、数理解算に基づいた解析ソフトである (Mukai et al., 2011)。Spiso-3D のアルゴリズムを、図 2-9 から図 2-11 に示した。

このソフトウェアは、神経細胞の 3 次元画像に基づいて神経細胞の形態解析を自動的に行うことが出来る。自動解析結果の中の誤りは、全て手動で修正した。Spiso-3D を用いた解析の様子は、図 2-12 に示した。

全スパイン密度は、単位樹状突起長あたりのスパイン数 (スパインの個数/樹状突起の長さ[spines/ $\mu\text{m}$ ]) で定義した (図 2-13 (A))。また、頭部形態を比較するため、頭部直径の大きさに応じてスパインを以下のように 3 種類のサブクラスに分類し、それぞれのスパイン密度を算出した (図 2-13 (B), (C))。

1. Small-head スパイン (頭部直径 : 0.2–0.4  $\mu\text{m}$ )
2. Middle-head スパイン (頭部直径 : 0.4–0.5  $\mu\text{m}$ )
3. Large-head スパイン (頭部直径 : 0.5–1.0  $\mu\text{m}$ )

先行研究から、スパインの頭部直径が大きいほど、GluR1 サブユニットを含む AMPA 型グルタミン酸受容体の発現量が多いということが明らかとなっている (Shinohara et al., 2008)。一方で、NR2B サブユニットを含む NMDA 型グルタミン酸受容体の発現量は、スパインの頭部直径によらず一定であることも報告されている (Shinohara et al., 2008)。AMPA 型受容体の発現量の違いによって、スパインのシグナル伝達効率に差があることから、スパインの頭部直径と記憶能力には、密接な関係があると言える (図 2-14)。

#### 2-5. 質量分析による海馬内の性ホルモン濃度測定方法

海馬内と血中の性ホルモン濃度を、質量分析法を用いて測定した。その流れを図 2-15 に示した。

### 2-5-1. 海馬試料及び血漿試料の調製

性ホルモン濃度測定には、オス、各性周期ステージ (卵胞期 : Proestrus、排卵期 : Estrus、黄体期 1 : Diestrus 1、黄体期 2 : Diestrus 2) のメスを用いた。

同個体由来の血漿と海馬を採取し、(1) 血漿と (2) 海馬から抽出・精製した各性ホルモンを質量分析の試料とした。性周期を判定したメスラットをイソフルラン麻酔下で断頭し、(1) 首から血液を採取した (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 (1,900 x g、4℃、10 分間) して上清の血漿を試験管に分取し、-30℃で保存した。血液の採取と並行して (2) 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスで十分にバブリングした buffer A (4℃) 中で海馬の摘出を行い、単離した左右 1 対の海馬湿重量を測定した。

### 2-5-2. 性ホルモンの抽出

海馬 1 対あたり 4mL の buffer A を加え、さらに性ホルモン抽出過程での性ホルモンの損失を補正するために必要な抽出効率を算出するため、定量する性ホルモンを <sup>3</sup>H 標識したものをマーカーとして 20,000 cpm 分加えた。テフロンホモジナイザーを用いて氷冷しながら穏やかにホモジナイズし、ホモジネートの 2 倍量の性ホルモン抽出液 (ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 3 の混合溶液) を加えて 10 分間攪拌した後、遠心分離 (2,500 x g、室温、10 分間) を行い、有機層に溶出した性ホルモンを回収した。性ホルモンの抽出操作は、各試料につき 3 回ずつ行い、一つにまとめた。溶媒を完全に蒸発させ、C<sub>18</sub> カラム溶出用溶液 (メタノール : DDW = 40 : 60) 1 mL に再溶し、C<sub>18</sub> Amprep minicolumns (Amersham) を用いて以下の手順により脂質等の夾雑物を除いた。

<u>カラムの前処理</u>	メタノール	5 mL をカラムに通す
	DDW	5 mL をカラムに通す
	メタノール : DDW = 40 : 60	5 mL をカラムに通す
<u>抽出液の導入</u>	性ホルモン抽出液	1 mL をカラムに導入する
<u>性ホルモンの溶出</u>	メタノール : DDW = 40 : 60	5 mL で溶出する
	メタノール : DDW = 85 : 15	5 mL で溶出する

C<sub>18</sub> カラムによる精製後、再度溶媒を飛ばしてからエタノール 1 mL に性ホルモンを溶解した。

### 2-5-3. 順相 HPLC による性ホルモンの精製

HPLC 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 2-16)。固定相にはシリカゲルが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 2-17)。

遠心式濃縮機 (VC-96N (TAITEC)) を用いて抽出した性ホルモン溶液の溶媒を完全に蒸発させた。これに HPLC のサンプラー溶液 (ヘキサン : イソプロパノール : 酢酸 = 98 : 2 : 1) を 200  $\mu$ L 加えて、性ホルモンをボルテックスにより溶解した。これらの性ホルモン溶液を 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、各性ホルモンに分画した。フラクションコレクターを用いて、あらかじめマーカートを流して特定した各性ホルモンの溶出時間から、前後 3~4 分程度の画分を集めた。

一部の性ホルモンは、MS 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誘導体化を行った。各性ホルモン (誘導体) の構造と、LC-MS/MS の衝突部における開裂パターン・ $m/z$  値変化を図 3-13 に示した。

E2 の誘導体化の方法は以下の通りである。まず順相 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、5%の pentafluorobenzyl bromide / acetonitrile (KOH / ethanol 溶媒) と 55°C、1 時間の条件で反応させた。その後、溶媒を蒸発させ 100  $\mu$ L の picolinoic acid 溶液 (2% picolinoic acid、2% 2-dimethylaminopyridine、1% 2-methyl-6-nitrobenzoic acid、溶媒は tetrahydrofuran) と 20  $\mu$ L の triethylamine とともに室温で 30 分間反応させた。反応生成物は 1% 酢酸に溶かし、Bond Elute C<sub>18</sub> 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。

#### 2-5-4. LC-MS/MS を用いた質量分析

質量分析には liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) システムを用いた。装置の概略図を図 2-18 に示す。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 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-C<sub>18</sub> column (3×150 mm, 3  $\mu$ m, (Imtakt Japan)) を用い、オートサンプラーには HTC PAL (CTC Analytics) を用いた。ここで、試料をインジェクシ



ヨンした時間を  $t=0$ 、試料が検出された時間を  $t=t_1$  とし、 $t_1$  を保持時間と呼ぶ。

#### 2-5-4-1. 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 (図 2-17)。

(例) 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

#### 2-5-4-2. 性ホルモンのイオン化と検出

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。性ホルモンの定量には 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て通過する (例えば、E2 誘導体なら  $m/z = 558$ )。ここで、 $m/z$  の  $m$  は質量、 $z$  は性ホルモン誘導体の電荷を意味する。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。今回測定した性ホルモンの  $m/z$  transition は、PROG が 315 → 97、E2-3-PFBz-17-picolinoyl が 558 → 339 であった。なお、同位体標識した性ホルモンの誘導体を用いて  $m/z$  transition を測定することによって、溶出時間の校正を行った。

溶出時間の校正と同様に、RI 標識された性ホルモンを用いて、誘導体化、精製、MS/MS 検出の後における各性ホルモンの検出効率を求めた。それぞれの効率は、PROG が  $71 \pm 6\%$ 、E2 が  $89 \pm 8\%$  であった。

#### 2-5-4-3. 検出精度と定量限界

各性ホルモンの検出精度と定量限界を表 1 にまとめた。検出精度は標準サンプルを決まった量で流し、それに対して実際に検出できた量の割合から求めた。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を求めた。

### 2-5-5. 抽出効率の計算

正確な濃度の算出のため、性ホルモン抽出過程における性ホルモンの分解・損失を考慮し、抽出効率の算出を行った。海馬をホモジナイズする前に、 $^3\text{H}$  標識した目的の性ホルモン 20000 cpm を加えた。HPLC による分離で集めたフラクション中に含まれる  $^3\text{H}$  のカウント数を、液体シンチレーションカウンタ (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いて抽出効率を求めた結果、抽出効率は 40～50%程度であった。

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

### 2-5-6. 性ホルモン濃度の算出法

質量分析によって得られたデータから、図 2-15 に示した方法で各性ホルモン濃度を算出した。

## 2-6. RT-PCR を用いた mRNA 発現解析の実験方法

RT-PCR を用いて mRNA 発現解析を行った (図 2-19)。解析には、オスラット及び各性周期ステージ (卵胞期 : Proestrus、排卵期 : Estrus、黄体期 1 : Diestrus 1、黄体期 2 : Diestrus 2) のメスラットの海馬を用いて、各々につき 4 個体 (個体ごとに左右 1 対の海馬を混合) から得た 4 試料を使用した。各試料につき最低 2 回の RT-PCR を行った。各標的遺伝子について PCR 産物の増幅解析を行い、PCR 産物の指数増幅期にサイクル数を固定して PCR を行った。PCR 産物の定量は、いずれも電気泳動した PCR 産物を EtBr 染色し、検出したバンドの輝度を計測して行った。各標的遺伝子の実験結果には、PCR サイクル数を横軸、PCR 産物の EtBr 染色により得られたバンドの輝度を対数目盛の縦軸にプロットした片対数グラフと、実験に使用した試料名を横軸、PCR 産物の EtBr 染色により得られたバンドの輝度を縦軸にプロットしたグラフを示した。PCR 産物の増幅解析には、最低 4 つの異なる海馬試料を用い、その結果を Mean  $\pm$  SEM で示した。その際、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH を内部標準として用いて較正した。RT-PCR に用いたプライマー配列と PCR 条件を表 2-1 と表 2-2 に示した。これらのプライマーについては、各プライマーを用いて増幅した PCR 産物が標的遺伝子配列と一致することを、シーケンシングによって確認した。以下、各実験操作について詳しく述べる。

### 2-6-1. total RNA の抽出

氷冷した 4℃の PBS(-) (phosphate-buffered saline (-)) 中にて、ラットの全脳から摘出した海馬を液体窒素で急速凍結した後、すぐに RNA 抽出を行なった。total RNA の抽出には、SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いた。total RNA の濃度及び純度を、DDW を希釈溶媒に用いて、波長 260 nm 及び 280 nm での吸光度測定により定量した。純度は  $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$  が 1.6 以上のものを使用した。

### 2-6-2. エタノール沈殿

RNA 溶液の 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウムを加えてよく振り混ぜ、2.5 倍量の 99.5% EtOH を加えた後、手で激しく振って攪拌した。-20℃で 20 分間静置した後、12,000 x g、4℃で 20 分間遠心した。遠心分離後、上清を捨て 70% EtOH を加えて軽く振り混ぜ、12,000 x g、4℃で 5 分間遠心した。上清をマイクロピペットで完全に除去し、風乾した後、TE buffer 又は DDW に溶解した。

### 2-6-3. 逆転写反応

逆転写反応液は 1 試料あたり 25  $\mu\text{L}$  で、組成は 5  $\mu\text{g}$  total RNA、1x Reaction Buffer (50 mM Tris-HCl pH8.3、75 mM KCl、3 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10 mM DTT)、0.5 mM dNTP mixture (TOYOBO)、1  $\mu\text{g}$  Oligo-(dT)<sub>15</sub> primer (Promega)、20 Units RNase inhibitor (Promega)、200 Units M-MLV RTase RNase H (-) (point mutant) (Promega) であった。

反応液の調製は、まず total RNA と Oligo-(dT)<sub>15</sub> primer の混合溶液を 7℃で 5 分間加熱して氷上で冷却した後、上記の組成で 25  $\mu\text{L}$  に調製した。逆転写反応は 42℃で 1 時間行い、75℃で 15 分加熱し反応を終了させた。逆転写反応後の溶液に、液量が 50  $\mu\text{L}$  になるように 10 Units RNase H (TaKaRa Bio) を加え、37℃で 30 分間反応させた。反応後の cDNA 溶液 (濃度は total RNA 量換算で 100 ng /  $\mu\text{L}$ ) は、-30℃で保存した。

### 2-6-4. PCR

PCR 反応液は 1 試料あたり 25  $\mu\text{L}$  で、組成は 100 ng cDNA (total RNA 量換算)、1x buffer for Blend Taq (TOYOBO)、0.2 mM dNTP mixture (TOYOBO)、0.2  $\mu\text{M}$  forward primer、0.2  $\mu\text{M}$  reverse primer、1.25 Units Blend Taq (TOYOBO) であった。PCR は 3 ステップで行い、その増幅プロトコルは 94℃、5 分 (変性)  $\rightarrow$  [94℃、30 秒 (変性)  $\rightarrow$  T<sub>a</sub> (58~68)℃、20 秒 (アニーリング)  $\rightarrow$  72℃、30 秒 (伸長)] x サイクル数  $\rightarrow$  72℃、7 分 (伸長) であった。標的名、プライマー配列、サイクル数、アニーリング温度 (T<sub>a</sub>) などの条件は表 2-1 と表 2-2 に示した。

## 2-6-5. 電気泳動

PCR 増幅産物を、2%アガロースゲルを用いて 0.5 x TAE buffer 中で電気泳動した。各試料について 5  $\mu$ L PCR 溶液と 1  $\mu$ L 6 x Loading Dye を混合して泳動用溶液を調製し、ゲルの各レーンにアプライした。PCR 産物サイズの指標として、3  $\mu$ L 100bp DNA Ladder (Promega) を同時に泳動した。

泳動後のゲルを 0.5  $\mu$ g / mL の EtBr / 0.5 x TAE buffer 中で 1 時間静置し、染色した。染色したゲルを UV 照射にて観察し、Printgraph (ATTO) で画像データを取得、bmp 形式で保存した。取得した画像データをもとに、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。

## 2-6-6. プライマーの設計

RT-PCR の検出感度向上のために、以下の方針で特異性と増幅効率を両立させるプライマーの設計を行った (図 2-20)。プライマーが相補鎖と結合した際の安定性の評価には、最隣接熱力学計算法 (最隣接の核酸配列の影響を考慮し、DNA 二本鎖の相互作用の強さ・安定性を求める方法 (Breslauer et al., 1986, SantaLucia, 1998)) によって算出したギブスの自由エネルギー $\Delta G$  を用いた。

### [プライマー設計の方針]

- (1) プライマー全体の  $\Delta G_{\text{(全体)}}$  は、鋳型全体で計算した  $\Delta G$  の平均値  $\Delta G_0$  より低く (安定性が高く) なるように設計する。例えば、20 塩基のオリゴヌクレオチドを鋳型 DNA の端から端まであらゆる配列を考えて、20 塩基全体の  $\Delta G_{\text{(全体)}}$  を求めて平均する。これを  $\Delta G_0$  ( $= -40 \text{ kcal / mol}$  程度) として、 $\Delta G_{\text{(全体)}}$  が  $\Delta G_0$  より低くなる配列を見つけてくる。
- (2) プライマーの 3'末端側 5 塩基の  $\Delta G_{\text{(5 塩基)}}$  が高くなる (安定性が低くなる) ように設計する ( $\Delta G_{\text{(5 塩基)}} = -9 \text{ kcal / mol}$  程度が望ましい)。これは、プライマーの 3'末端側がそのプライマーの特異性を左右するため、あえて相補鎖との結合が不安定な配列を選ぶことで、非特異的な増幅を防ぐ目的がある。
- (3) プライマーの 5'末端側の  $\Delta G$  は、プライマー内の平均  $\Delta G$  よりも低く (安定性が高く) なるように設計する。これにより、高い増幅効率を備えたプライマーとなるようにする。

上記の方針をもとに、プライマー設計ソフト PrimerSelect (DNASTAR inc.) を用いてプライマーの設計を行った。プライマーはいくつかの候補を作り、それぞれの PCR 産

物量・サブバンドの有無を調べた上で、最も特異性が高く、増幅効率の良いものを選んだ。更にシーケンシングを行い、PCR 増幅産物と標的配列との相同性を確かめた。

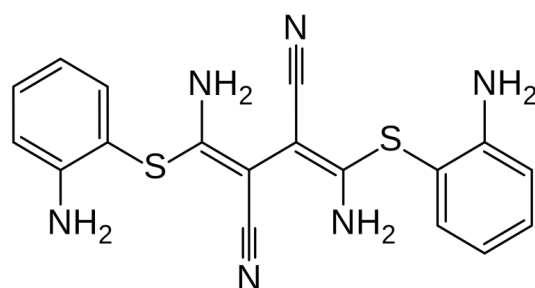
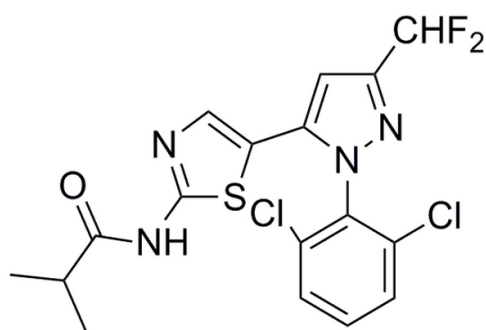
## 2-7. 統計解析

スパイン解析においては、サンプル数  $n$  は樹状突起の数とし、データは平均値  $\pm$  標準誤差 (SEM: standard error of the mean) で表記した。2 群間の比較には、F 検定を行い、等分散性が認められるものにはスチューデントの  $t$  検定を、等分散性が認められないものにはウェルチの  $t$  検定を用いて検定した。3 群以上の多群間比較の際には一元配置の分散分析 (one-way ANOVA) を行い、有意差 ( $p < 0.05$ ) が存在した場合のみ post-hoc test として Tukey-Kramer の多重比較検定法を用いて検定した。有意水準は  $* p < 0.05$ ,  $** p < 0.01$  とした。

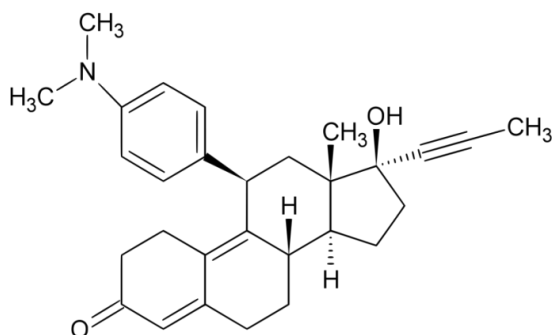
性ホルモン合成酵素 mRNA の発現量比較では、one-way ANOVA を行った後、post-hoc テストとして Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。有意水準は  $* p < 0.05$  とした。

オスラットとメスラットの各性周期ステージの性ホルモン濃度の比較では、ANOVA を行った後、post-hoc テストとしてオスラットを対照群とした Dunnett 法による多重比較検定を行った。

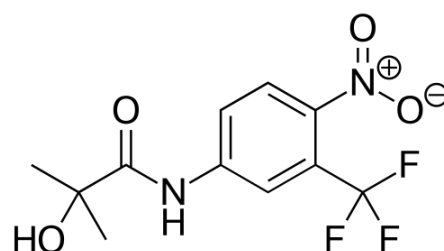
(A) **LIMK inhibitor** (B) **U0126**



(C) **RU486**



(D) **Hydroxy Flutamide**



(E) **ICI**

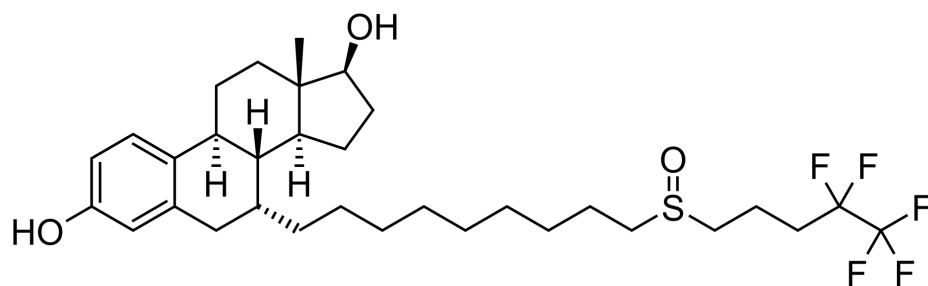


図2-1. 本研究で使用した阻害剤の構造式

(A) LIMK inhibitor の構造式。LIMK の ATP 結合部位に作用して、ATP 競合的に活性化を阻害する。

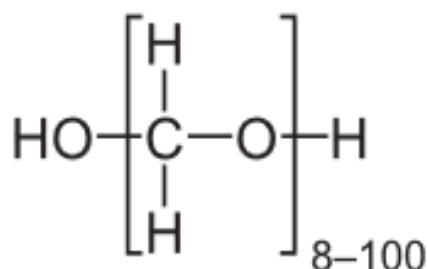
(B) U0126 の構造式。不活性型の MAPK に結合して活性化を阻害する。

(C) RU-486 の構造式。プロゲステロン受容体 (PR)、及びグルココルチコイド受容体 (GR) のアンタゴニスト。

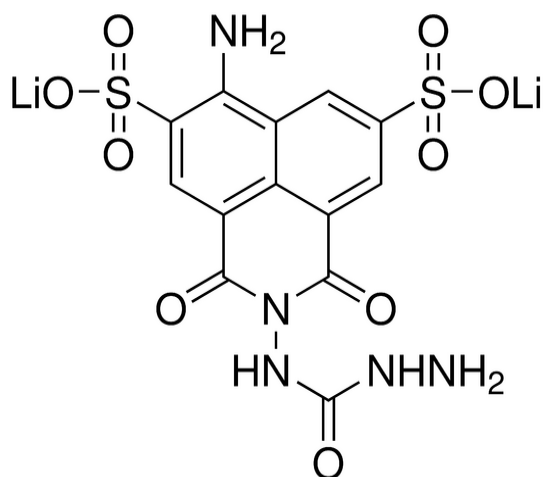
(D) Hydroxy Flutamide の構造式。アンドロゲン受容体 (AR) のアンタゴニストである。

(E) ICI の構造式。エストロゲン受容体 (ERα) のアンタゴニストである。

(A) Paraformaldehyde



(B) Lucifer Yellow



(C) Lucifer Yellowのスペクトル

励起スペクトル 蛍光スペクトル

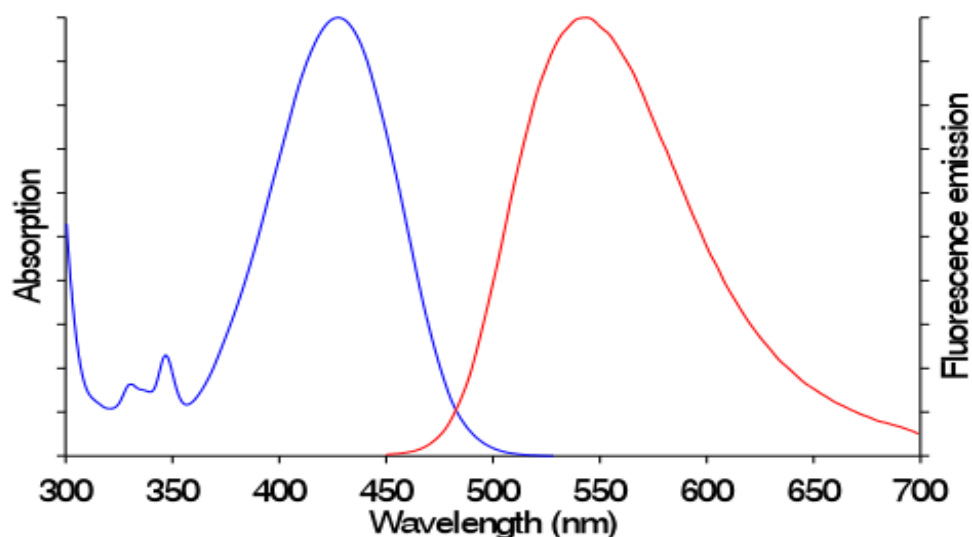


図2-2. パラホルムアルデヒド及び Lucifer Yellow の構造式とスペクトル

(A) パラホルムアルデヒドの構造式。タンパク質の間で架橋を形成することで、組織を固定することができる。

(B) 樹状突起スパインを可視化するために用いた蛍光色素である Lucifer Yellow の構造式。負の電荷を持つため、直流電流を流すことで拡散を加速することができる。

(C) Lucifer Yellow の励起スペクトルは 428nm にピークを持ち、蛍光スペクトルは 536nm にピークを持つ。本研究では、波長 458nm のレーザー (Ar-Krレーザー) で励起し、505 nm 以上の蛍光を取得した。

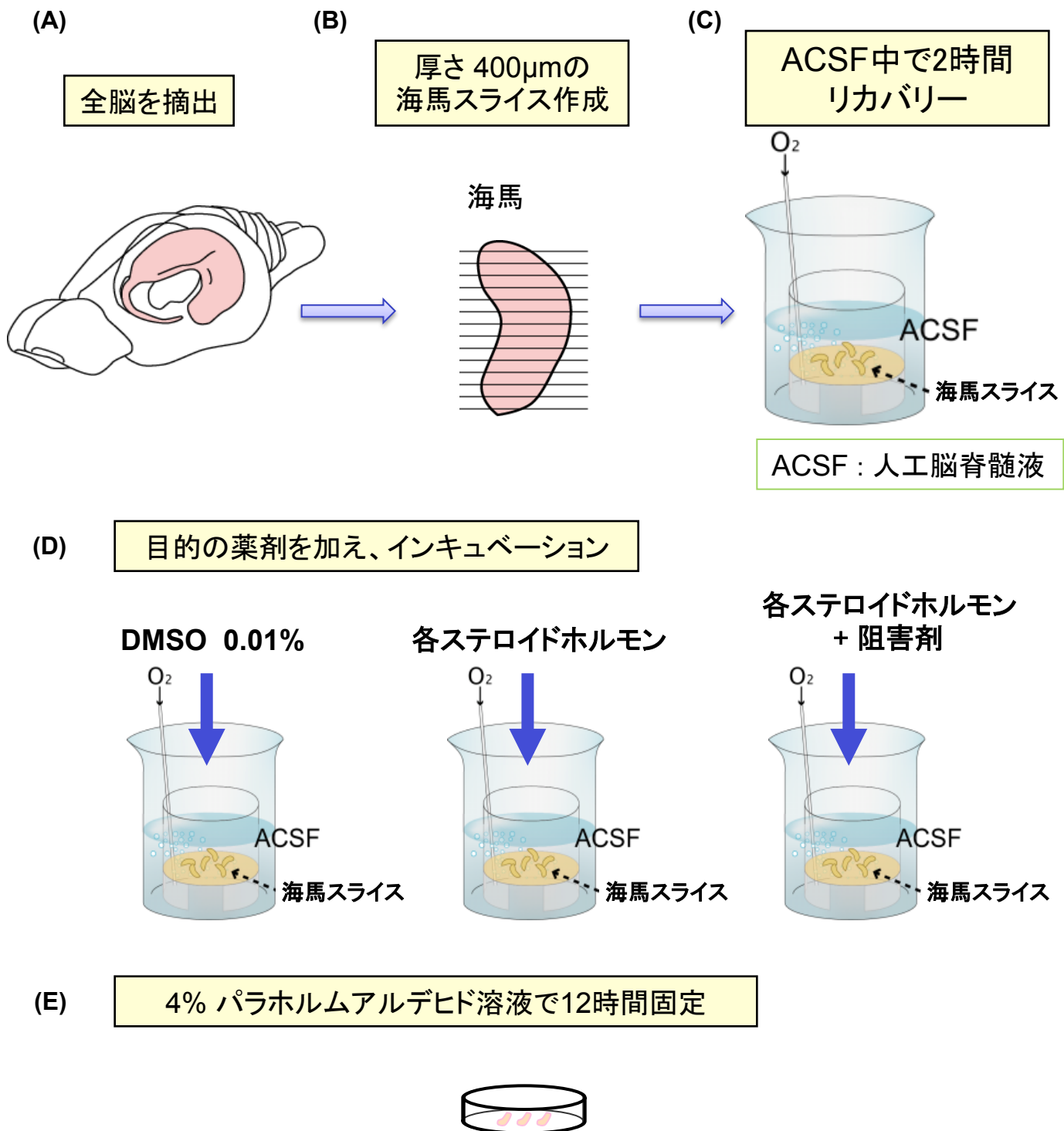
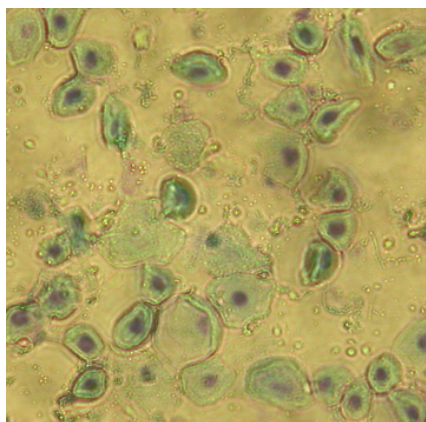


図2-3. 生きた急性海馬スライスの作製及び薬理刺激

- (A) ラットを断頭して全脳を取り出し、4℃のACSF中で数分間氷冷した。
- (B) 海馬を取り出し、ビブラトームを用いて厚さ 400  $\mu$ m の海馬スライスを作成した。
- (C) 海馬スライスを、十分通気 (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) している ACSF の入ったチャンバーに移し、2時間リカバリーをすることにより、神経スパインを回復させた。
- (D) リカバリー後、実験条件に合わせて各種ステロイドホルモンや阻害剤を加えて薬理刺激を行い、25℃でインキュベーションした。
- (E) 薬理刺激後、4% パラホルムアルデヒド溶液に4℃で12時間浸漬して、スライスを固定した。固定完了後、PBS(-) で洗浄して PBS(-) 中に4℃で保存した。

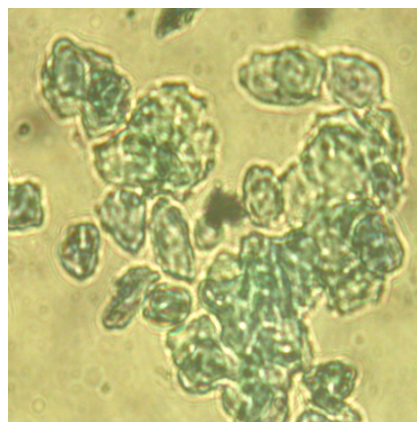


### Proestrus (卵胞期)



有核細胞が多い

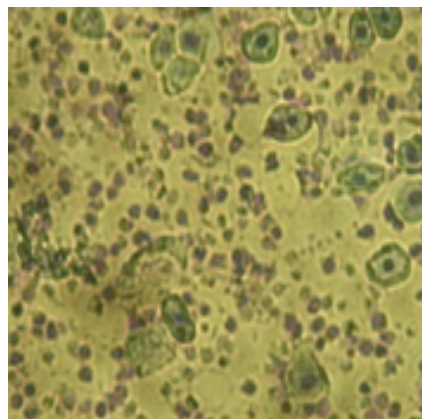
### Estrus (排卵期)



ほとんどが角化した細胞

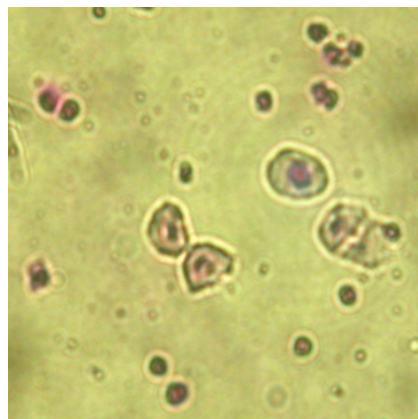
4日周期

### Diestrus2 (黄体期2)



リンパ球が多い

### Diestrus1 (黄体期1)



有核細胞、リンパ球が  
混在

## 図2-4. メスラットの性周期

性周期の判定には、膣スメア法を用いた。ラットでは性周期に伴う血中 E2 濃度の変化に伴い、膣や子宮の上皮形態や分泌物が鋭敏に変化するため、膣スメア (剥離した細胞を含む膣内の分泌物) の観察により、容易に性周期が判定できる。写真は、各性周期ステージにおける膣スメアをギムザ染色して顕微鏡観察したものである。Proestrus ではやや大型の有核細胞が多く、Estrus では角質化細胞 (核のない扁平化した細胞) が多い。また、Diestrus ではリンパ球が多く観察されるのが特徴である。本研究で用いた Wistar ラットでは、性周期が 4日 で回帰する。

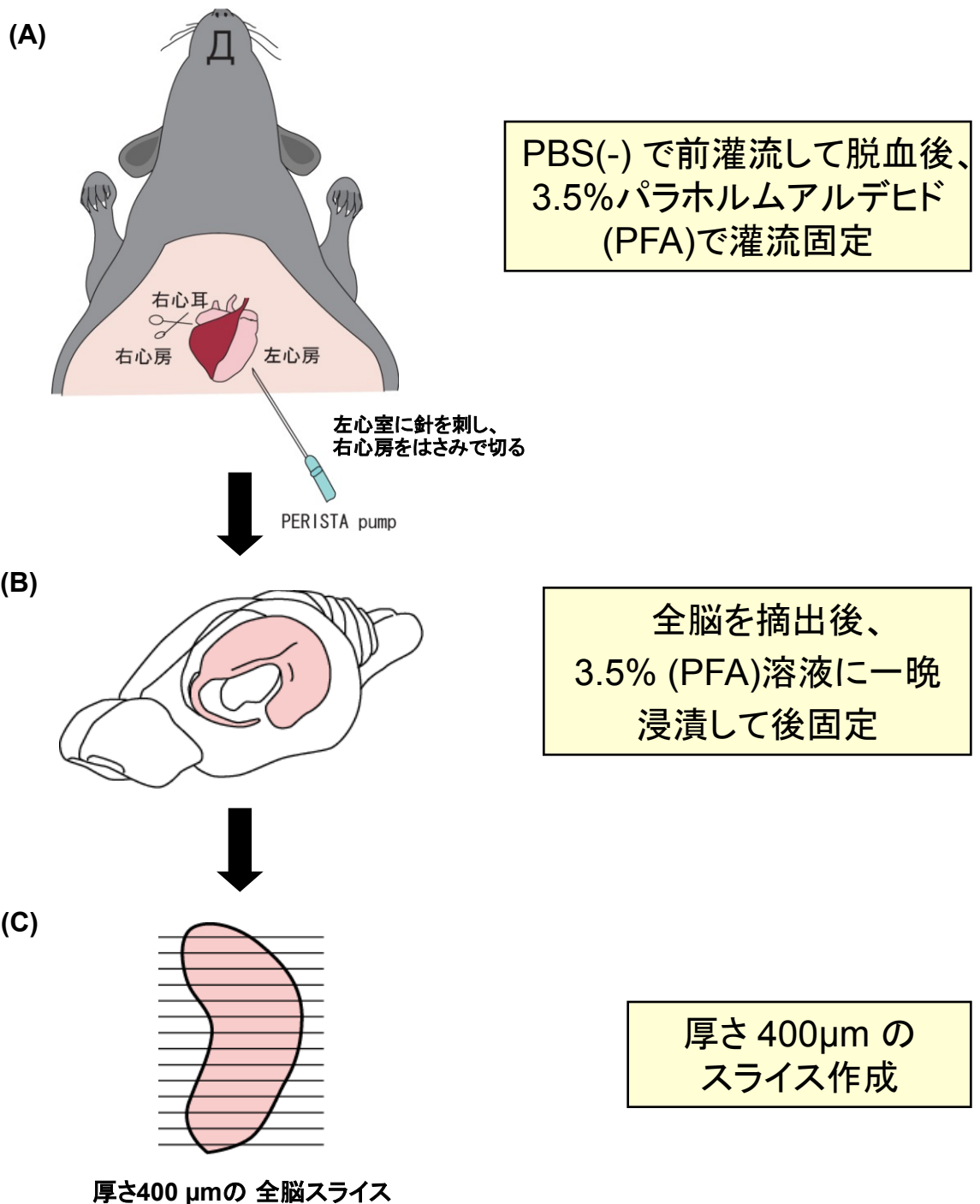
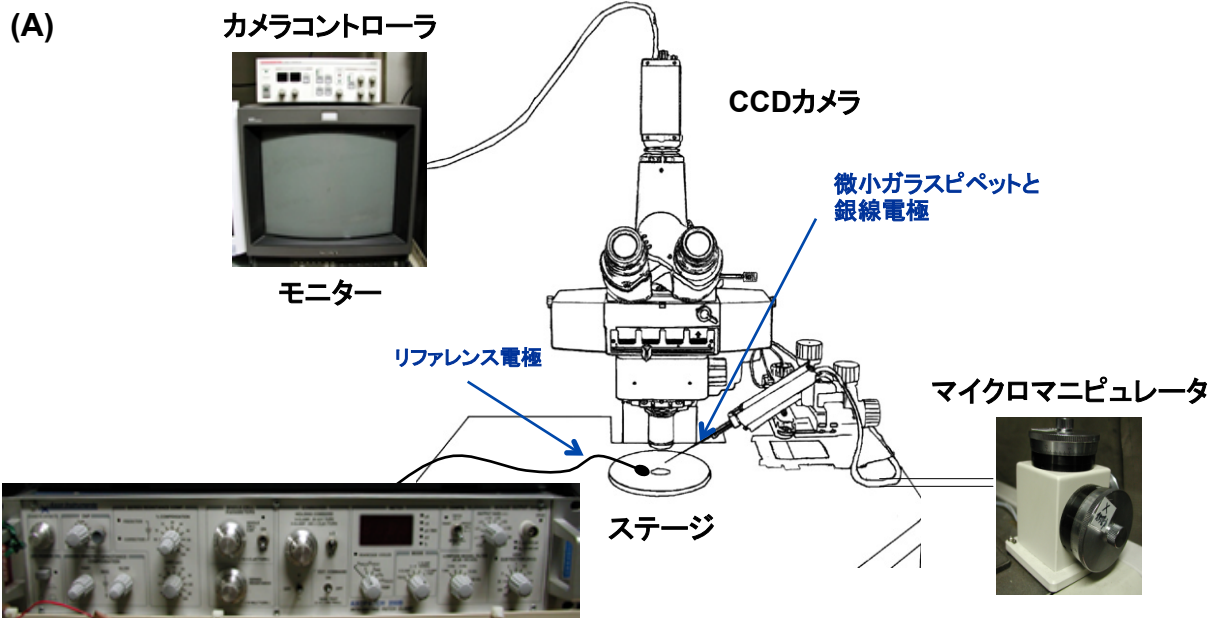


図2-5. 灌流固定と全脳スライスの作成

(A) ラットをイソフルランで麻酔した後、経心的に灌流固定を行った。PBS(-) を前灌流して完全に脱血した後、3.5% パラホルムアルデヒド溶液を 200mL 灌流し、組織を固定した。

(B) 固定後に全脳を摘出し、3.5% パラホルムアルデヒド溶液に 4℃で12時間浸漬することによって後固定した。

(C) ビブラトーム用いて、後固定した全脳を厚さ400 $\mu$ m の切片にした。作成したスライスは、4℃で PBS(-) 中に保存した。



AxoPatch  
(10 nA, 15 min)

電流 (10nA) を流しながら  
インジェクションすることで  
樹上突起の末端まで  
色素を届けることができる

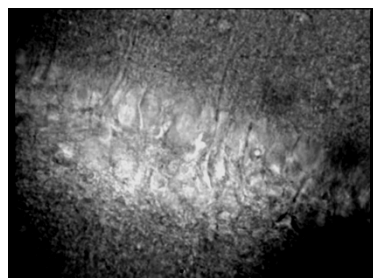


ハロゲンランプ

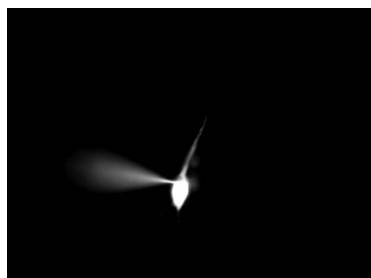


水銀ランプ

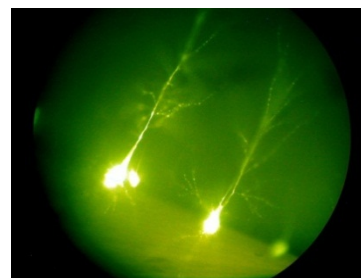
(B)



(C)



(D)



## 図2-6. カレントインジェクション装置

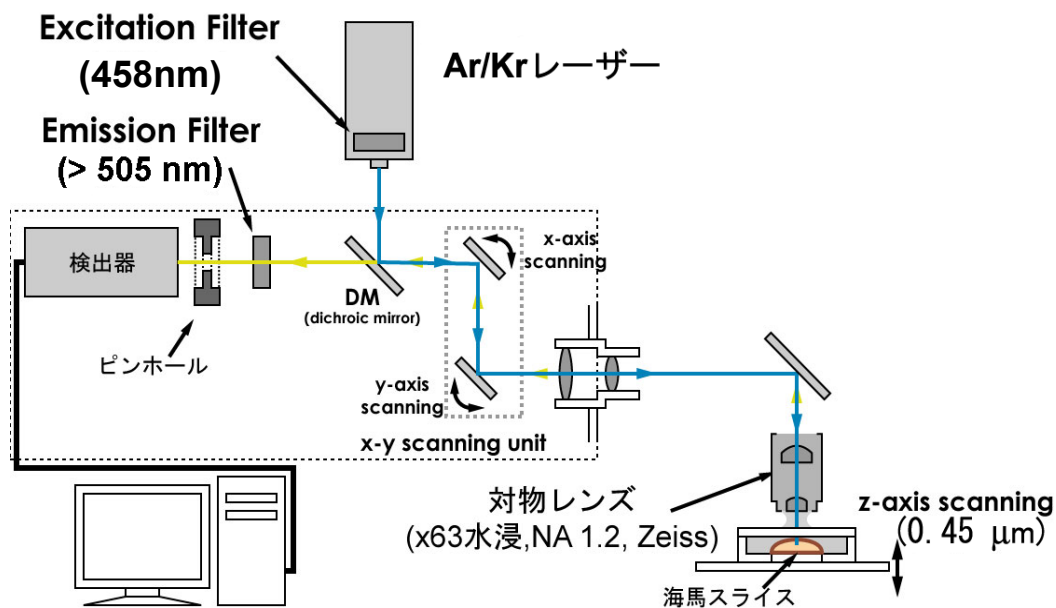
(A) 海馬神経細胞に蛍光色素を注入する装置の概略図。ガラスピペット先端に Lucifer Yellow を充填し、銀線電極に設置した。マイクロマニピュレータで電極を操作しながら、中央ステージ上のスライスの神経細胞にガラスピペットを刺入した。AxoPatch を用いて最大 10nA の直流電流を3分間程度流すことにより、蛍光色素を神経細胞へ注入した。

(B) ハロゲンランプを光源とした位相差顕微鏡像。映像はビデオモニターに出力し、海馬CA1の神経細胞層に焦点を合わせる際に用いた。

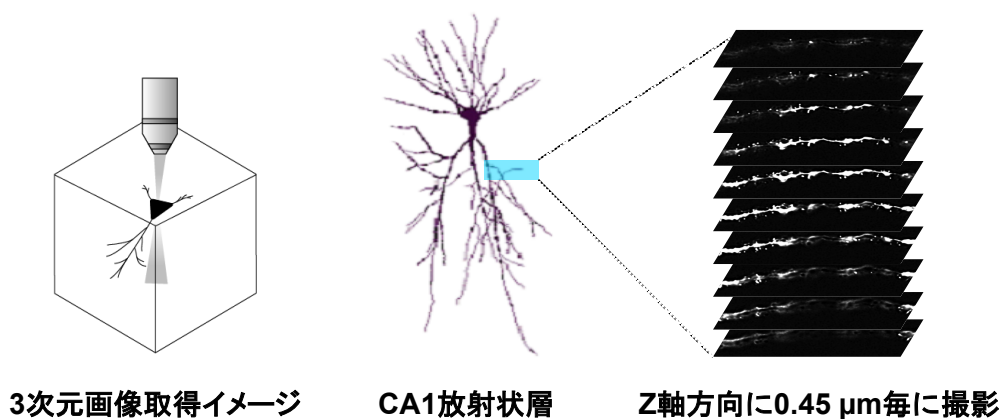
(C) 水銀ランプを光源とした蛍光顕微鏡像。グルタミン酸神経細胞の1つに電極が刺入され、電流によって蛍光色素が細胞内に入り始めている様子。

(D) 色素注入が完了した際の、隣り合う海馬CA1領域グルタミン酸神経細胞。

(A)



(B)



## 図2-7. 通常型共焦点レーザー顕微鏡システム

(A) 本研究で使用した共焦点レーザー顕微鏡システムの模式図。63×水浸対物レンズ（開口数1.2）で蛍光観察し、Ar/Krレーザーの 458 nm 線で励起して 505 nm 以上の蛍光を取得した。

(B) 断層撮影の模式図。海馬CA1領域に分布する錐体神経細胞の放射状層の2次分岐樹状突起を、Z軸方向に 0.45 μm ごとに撮影した。

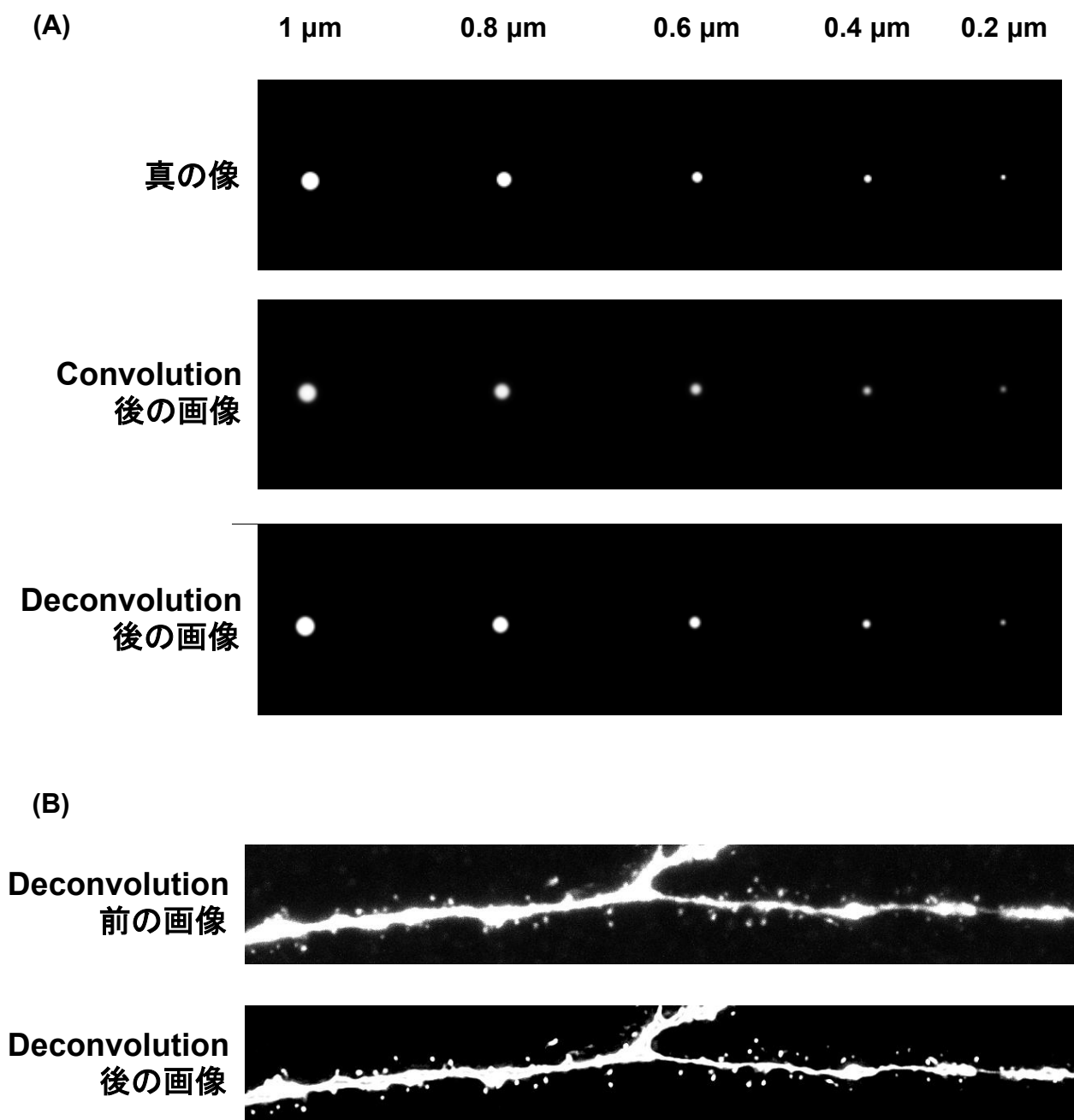


図2-8. デコンボリューション処理

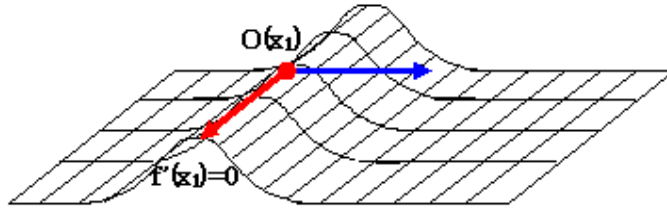
(A) 共焦点顕微鏡を用いて取得した画像データは、真の像と点拡がり関数 (point spread function) とのコンボリューション積になる。AutoDeblur では、これを逆算することでデコンボリューション処理を行い、真の蛍光分布を算出・推定している。

(B) デコンボリューション処理前と後の樹状突起画像。デコンボリューション処理によって画像のぼやけが除かれ、背景との境界が明瞭になっている。

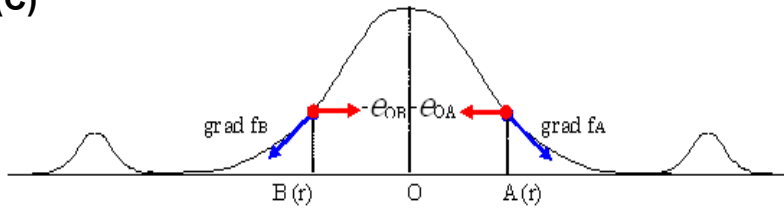
$$(A) \quad I(x+\varepsilon v) = I(x) + \varepsilon \text{grad} I \cdot v + \frac{1}{2} \varepsilon^2 v^t H v + \dots$$

$$H = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 I}{\partial x \partial y} \\ \frac{\partial^2 I}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 I}{\partial y^2} \end{pmatrix} \quad \text{diag } H = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 \\ 0 & \lambda_2 \end{pmatrix}$$

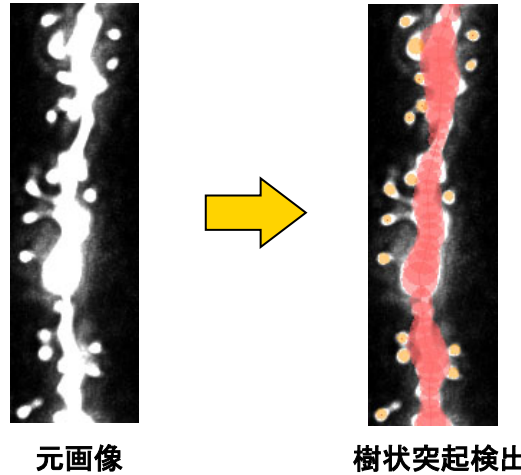
(B)



(C)



(D)



元画像

樹状突起検出

## 図2-9. Spiso-3D のアルゴリズム (1/3)

(A) 画像は、空間の各点に輝度を対応付ける写像である。輝度関数  $I(x)$  を Taylor 展開して現れる2次の微分係数ヘステンソル (Hessian tensor :  $H$ ) は、局所的な曲率を表す。空間の各点で  $H$  を求めて対角化し、その固有値を  $\lambda_1, \lambda_2$  とする。

(B) 樹状突起中心線の検出。樹状突起の尾根上の点  $O(x_1)$  は、尾根方向では  $f'(x_1) = 0$  であり、かつ尾根方向の  $H$  の固有ベクトルに対する固有値は  $\lambda_1 = 0$ 、その法線方向の固有ベクトルに対する固有値  $\lambda_2$  は、最小値  $-\lambda_{\max}$  をとる (傾き 0 で最大の極値)。

(C) 樹状突起幅の検出。樹状突起の尾根上の点  $O(x_1)$  から両側に等距離の点  $A, B$  を決める。 $OA, OB$  方向の単位ベクトル  $e_{OA}, e_{OB}$  に対する各々の境界度の積  $(-e_{OA} \cdot \text{grad } f_A) \cdot (-e_{OB} \cdot \text{grad } f_B) = \tau(r)$  の極大値を求める。極大値は図中勾配の変曲点で得られ、これが端点となる。

(D) 樹状突起を全画像から差し引いた後、固有値  $\lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0$  である点 (閉じた曲面) にスパイン頭部が存在する。



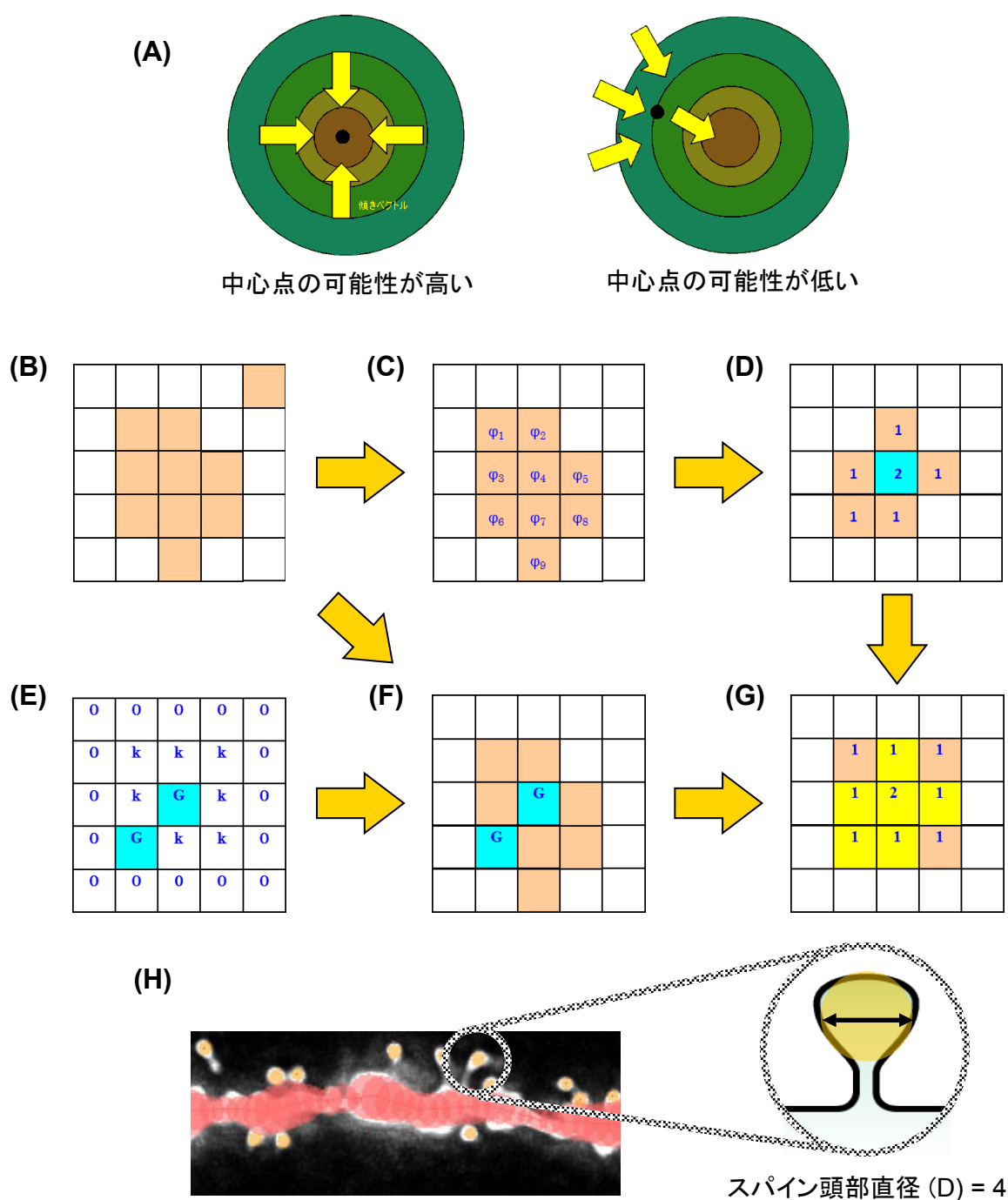
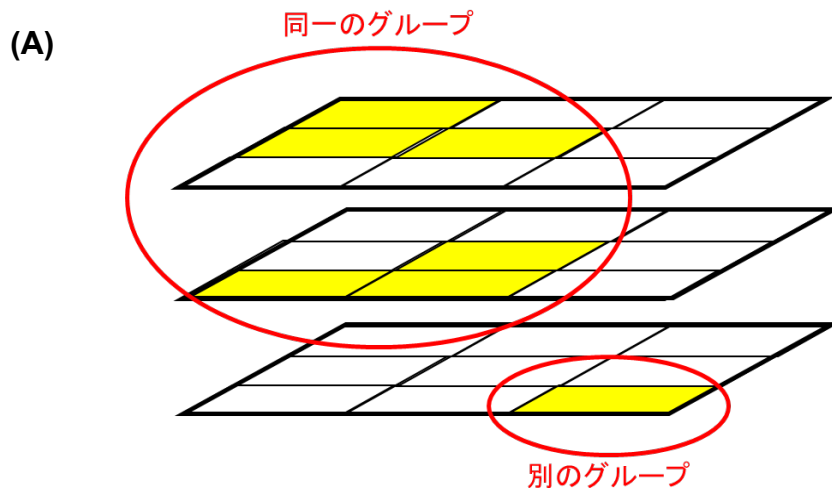


図2-10. Spiso-3D のアルゴリズム (2/3)

- (A) 勾配ベクトル  $\text{grad } f_A$  の向かい合い度 (内積)  $\varphi_A = (\text{grad } I_{A+1}) \cdot (\text{grad } I_{A-1})$  を利用する。スパイン中心点では  $\varphi_A$  が負になる。
- (B) 白い 픽セルは  $\text{grad } I = 0$ 。橙色の 픽セルは  $\|\text{grad } I_A\| > 0$ 。
- (C)  $\lambda_1$  と  $\lambda_2$  が共に負の 픽セルを含む島について、向かい合い度を計算する。4つの向かい合い度のうち、1つでも負となればスパイン中心候補として残す。
- (D) 島の外に到達するまでに経路する最小の 픽セル数で数値化する。最大の数値をもつ 픽セルをスパインの中心とする。
- (E)  $\lambda_1$  と  $\lambda_2$  が共に負の 픽セルについて  $\lambda_1 \lambda_2 > S$  (閾値) となるような 픽セルを G とする。
- (F) G を含むような橙色 픽セル領域をスパインと定義する。
- (G) (D) と同様に距離を数値化し、(D) で求めたスパイン中心の持つ数値をスパインの半径とする。
- (H) 計算されたスパイン直径  $D=4$  の円がスパイン上に表示される。



(B)

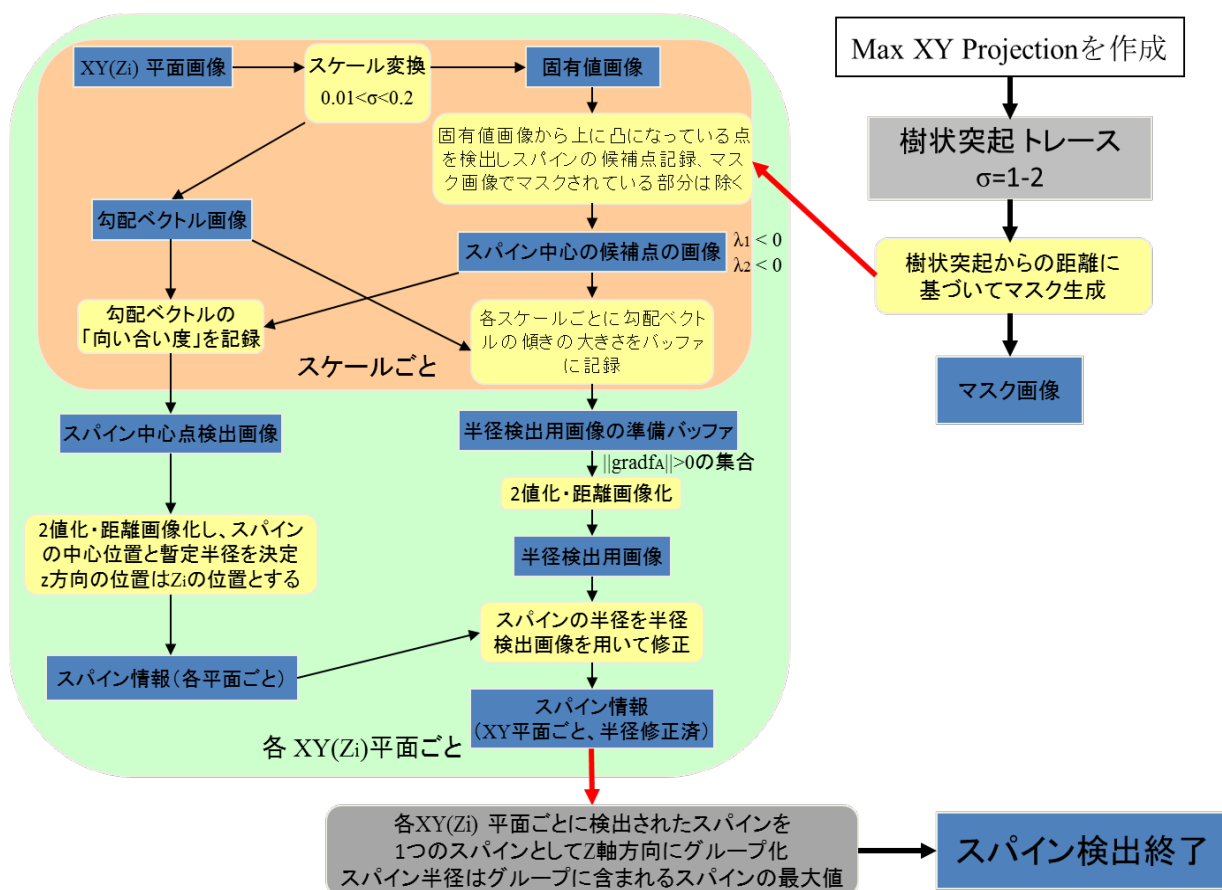


図2-11. Spiso-3D のアルゴリズム (3/3)

(A) Z方向に隣り合う面の間で、スパイン領域が5%以上重なるものを同一のスパインとしてグループ化する。中心位置は  $\sigma = \frac{\sum r_i x_i}{\sum r_i}$  とする。頭部直径は  $D = \max(D_1, D_2, \dots, D_n)$  とする。

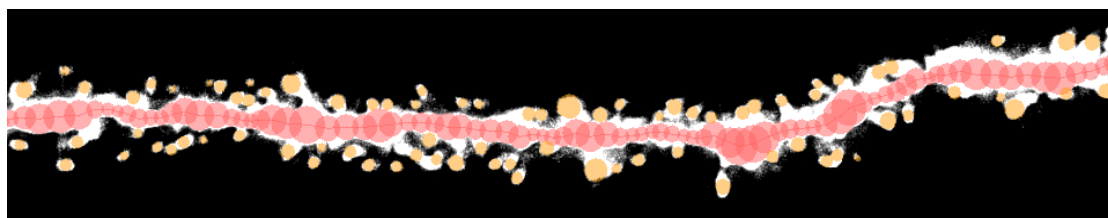
(B) Spiso-3Dの自動解析全ダイアグラム。



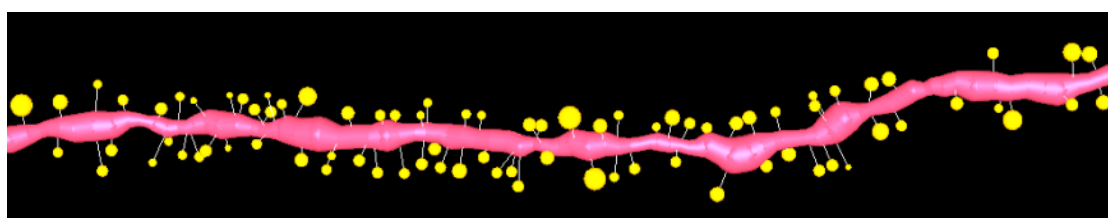
(A) 共焦点顕微鏡から取得し、XY平面に投射した画像



(B) 樹状突起とスパインを検出した画像



(C) 検出結果を3Dモデル化した画像



5  $\mu\text{m}$

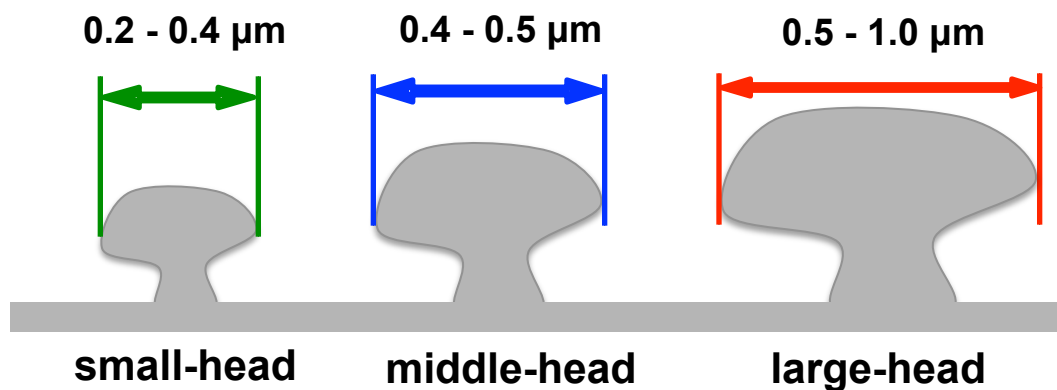
図2-12. Spiso-3D を用いたスパイン解析画像

- (A) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得し、XY平面に最大の輝度を投射した画像。  
(B) Spiso-3Dを用いて、樹状突起とスパインを検出した画像。赤色は樹状突起、橙色はスパインの頭部を示す。  
(C) 検出結果を3Dモデル化した画像。360°回転可能であり、MAX-XY 画像では判別困難なスパインの検知に用いる。

(A)

$$\text{全スパイン密度 [spines/}\mu\text{m]} = \frac{\text{全スパインの数 [spines]}}{\text{樹状突起の長さ [\mu\text{m}]}}$$

(B)



(C)

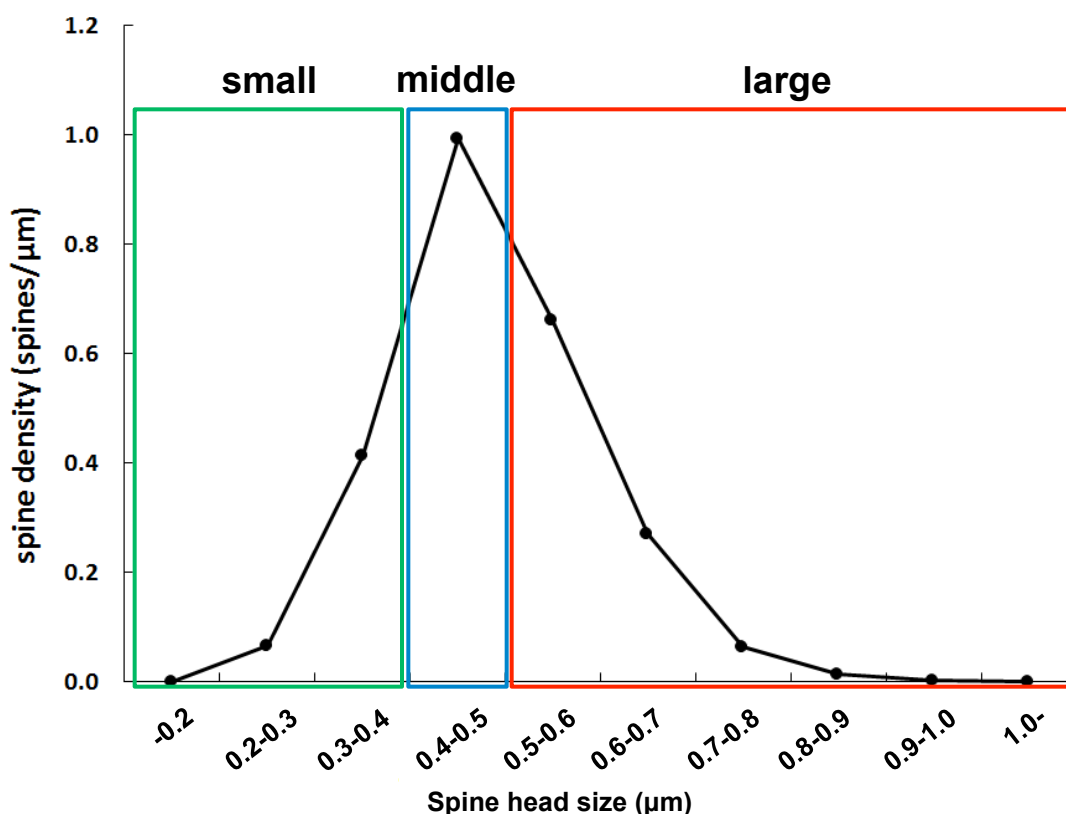
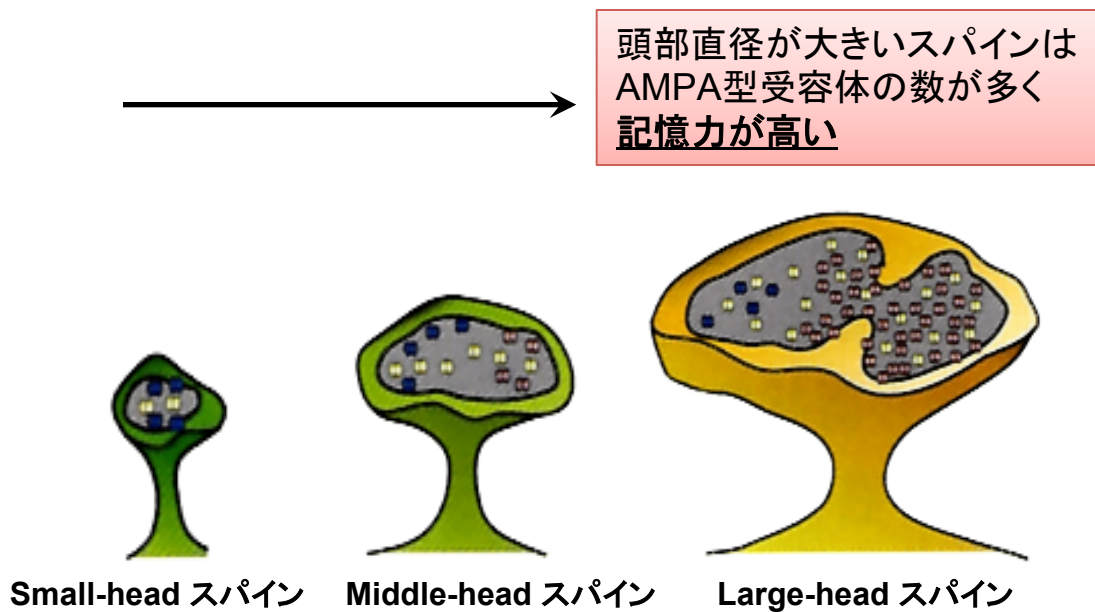


図2-13. スパイン密度の算出法と頭部直径による3サブクラスへの分類

(A) 全スパイン密度は、単位樹状突起長あたりのスパイン数で定義している。

(B) 頭部直径によるスパイン分類の模式図。スパイン形態に関しては、頭部直径のサイズによって small-headスパイン、middle-headスパイン、large-headスパインの3種類のサブクラスに分類した。

(C) 頭部直径に基づいて分類したスパイン密度の分布図。単位樹状突起長あたりの、各サイズ範囲内に含まれる頭部直径を持つスパイン数 (スパイン密度) をプロットした。3種類のサブクラスに分類することで、各条件間での頭部形態の変化を検知することが可能となった。



- NR2B       サブユニット数はスパインの直径に関係なく一定
- GluR1       サブユニット密度はスパインが大きくなると増大
- NR2A, NR1, GluR2, GluR3       サブユニット密度はスパインの直径に関係なく一定

NMDA型受容体のサブユニット: NR2B, NR2A, NR1,  
AMPA型受容体のサブユニット: GluR1, GluR2, GluR3

(Shinohara et al., 2008)

## 図2-14. スパインの頭部直径と、AMPA型グルタミン酸受容体密度の関係

先行研究から、スパインの頭部直径が大きいほど、GluR1 サブユニットを含む AMPA 受容体の発現量が多いことが明らかとなっている (Shinohara et al., 2008)。一方で、NR2B サブユニットを含む NMDA 受容体の発現量は、スパインの頭部直径によらず一定であることも報告されている (Shinohara et al., 2008)。AMPA受容体の発現量の違いによってスパインのシグナル伝達効率に差があることから、スパインの頭部直径と記憶能力には、密接な関係があると言える。

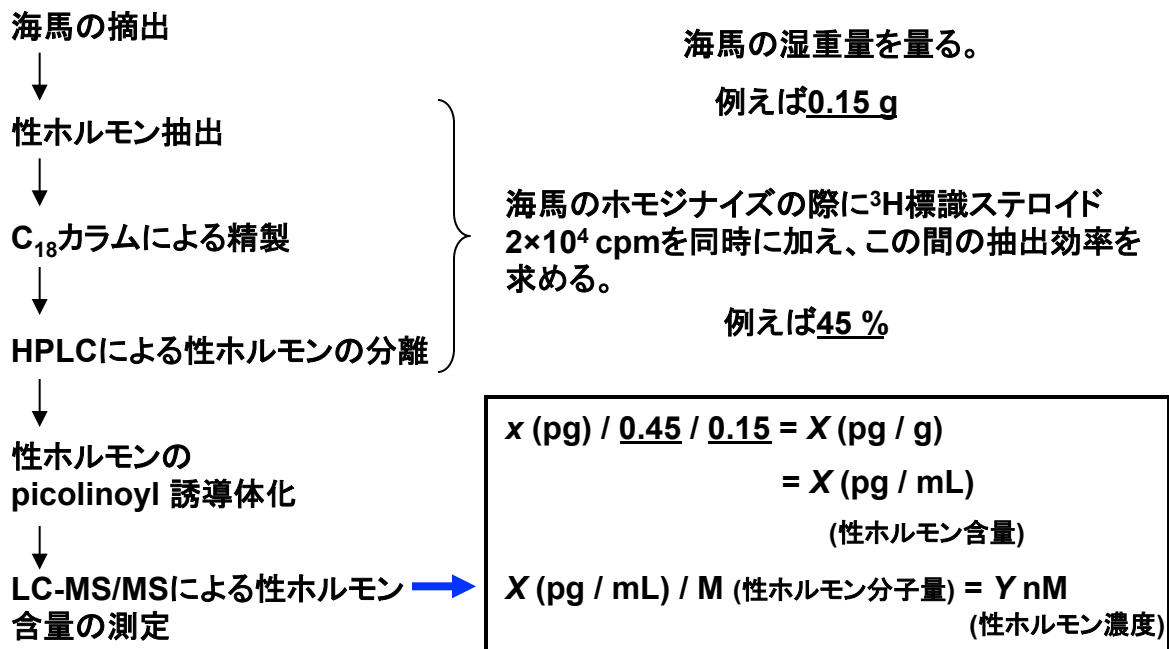


図2-15. 質量分析のプロトコル図

海馬は抽出後、湿重量を量りホモジナイズした。この時、<sup>3</sup>H標識ステロイドを 2×10<sup>4</sup> cpm 入れ、HPLC による分離後にカウント数を測ることで、性ホルモンの抽出効率を求めた。抽出した各性ホルモンを HPLC で分離し、LC-MS/MS のサンプルとした。一部の性ホルモンに関しては、MS 導入時のイオン化効率を上げるため、誘導体化を行った。

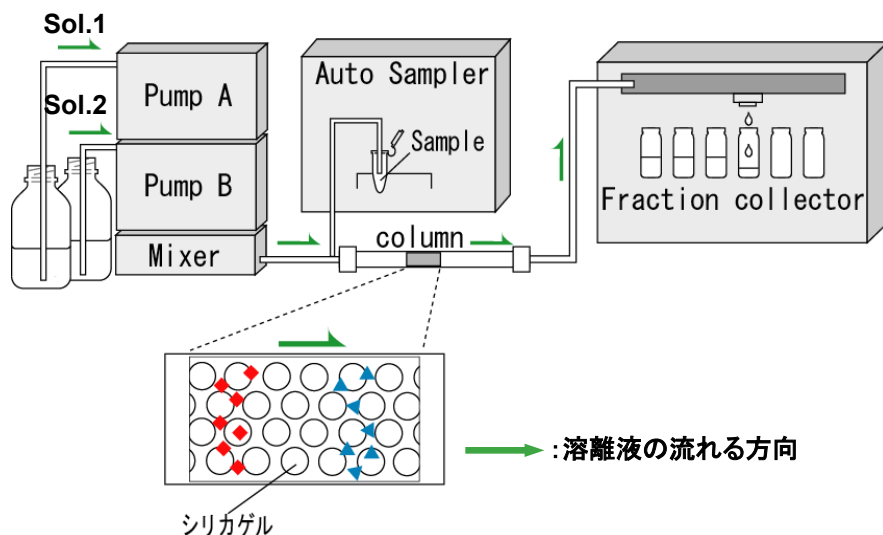


図2-16. HPLCの装置概略

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1 (Sol.1) と、Pump B から送られる親水性の高い溶離液2 (Sol.2) とが、Mixer において 図2-17 に示した比率に従って混合されて、カラムを通る。カラムには親水性のシリカカラムを用いた。サンプル内の各性ホルモンは、固定相 (シリカカラム) と液相 (溶離液) との親和性の差によって、異なる溶出時間で溶出される。

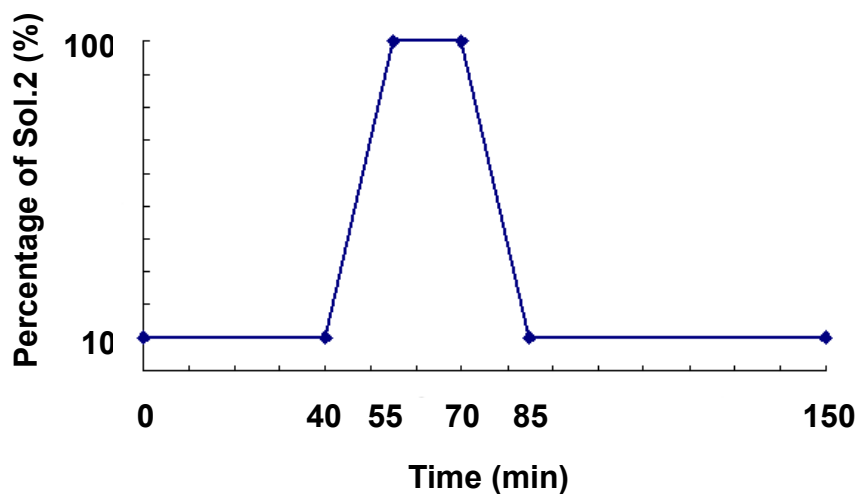


図2-17. HPLC の送液プログラム

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

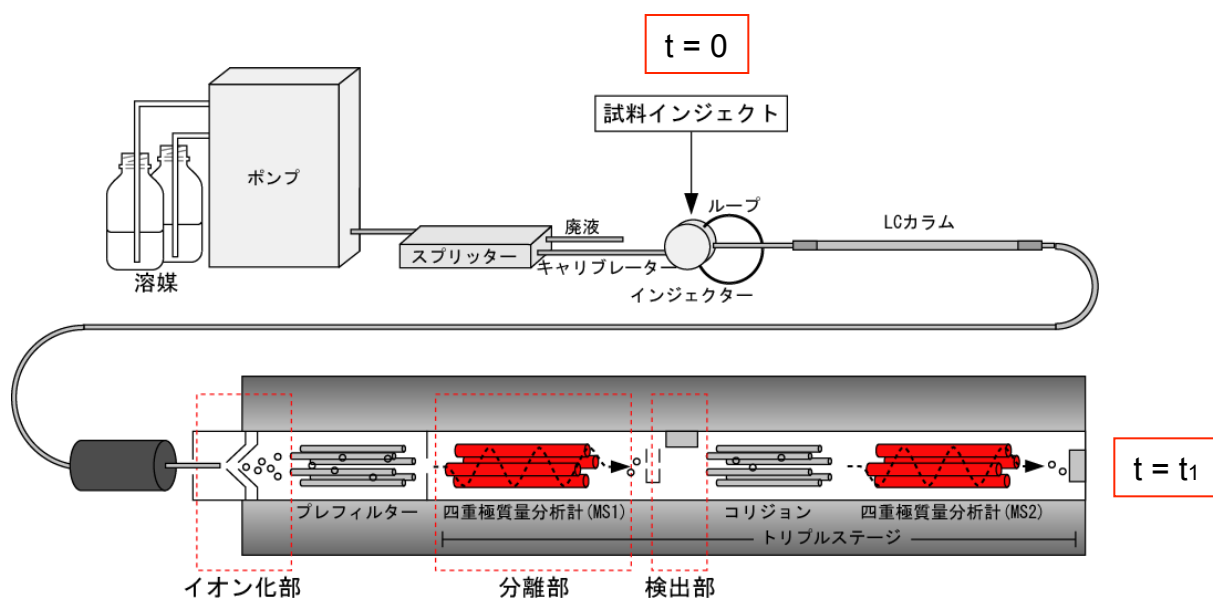


図2-18. LC-MS/MS 実験装置の概略図

LC-MS/MS 実験装置の概略図。まず LC 部で分離されたサンプルは、ESI 法によりイオン化されて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。

ここで、試料をインジェクションした時間を  $t=0$ 、試料が検出された時間を  $t=t_1$  とし、 $t_1$  を保持時間と呼ぶ。

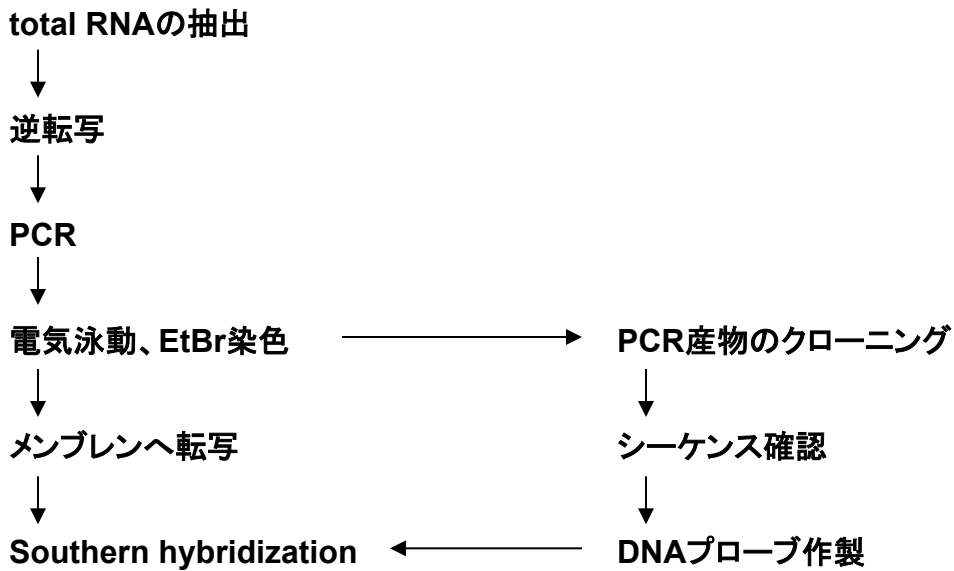


図2-19. RT-PCRのプロトコル

total RNAの抽出後、Oligo dT primer を用いた逆転写により、cDNAを作製した。表2-1、表2-2に示した条件でPCRを行い、アガロースゲル電気泳動を行った。その後、EtBr染色を行い、UV照射による輝度を撮影することで定量を行った。全ての遺伝子についてPCR産物のシーケンシングとサザンブロッティングを行い、標的遺伝子との相同性を確認した。

### 最隣接熱力学計算法

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 $\Delta G$ を評価

#### P450(17a) forward プライマー

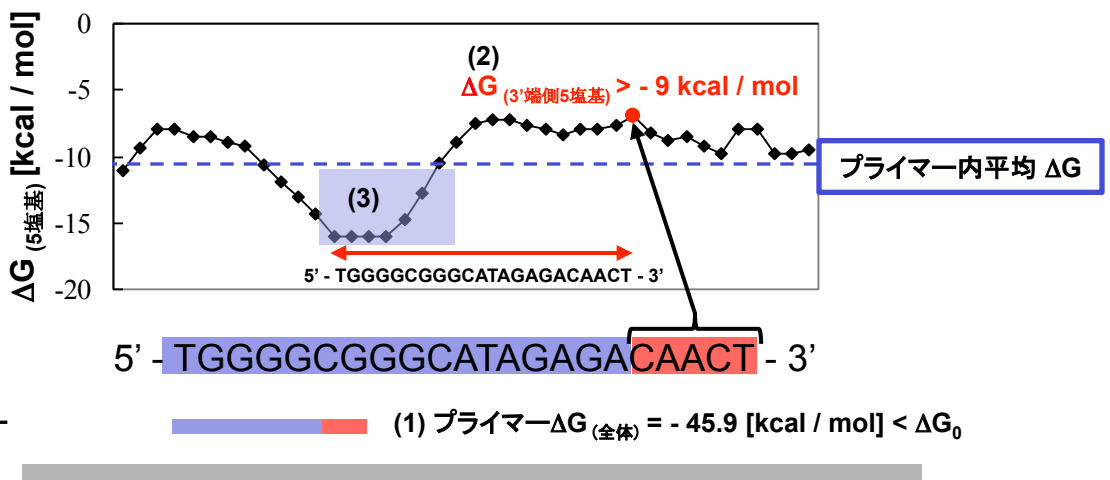


図2-20. プライマーの設計法

設計の方針は、(1) プライマー全体の $\Delta G$  (全体) は、鋳型全体で計算した $\Delta G$ の平均値 $\Delta G_{(0)}$ より低くなるように設計する (2) プライマーの3'末端側5塩基の $\Delta G$  (5塩基) が高くなるように設計する ( $\Delta G$  (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 $\Delta G$  は、プライマー内の平均 $\Delta G$  よりも低くなるように設計する以上の三つである。

表1：LC-MS/MSの検出精度と検出限界

	Spike (pg)	Intraassay Accuracy (%) (n <sup>a</sup> = 5)	RSD <sup>b</sup> (%)	Interassay Accuracy (%) (n <sup>a</sup> = 3)	RSD (%)	LOQ <sup>c</sup> (pg / 0.1g)
<b>17β-E2</b>	0.3	94.4	6.4	93.3	8.9	
	5	97.6	3.4	95.9	6.2	0.3
	20	100.3	2.7	101.2	1.9	
<b>T</b>	1	108.8	3	96.1	3.2	
	10	94.4	2.8	98.7	3.3	1
	100	100.2	1.1	101.6	2.5	
<b>PROG</b>	2	107.1	5.2	104.4	5.1	
	10	105.6	3.7	959.9	4.1	2
	100	102.3	1.8	96.1	1.2	
<b>ADione</b>	2	92.8	3.3	105.6	6.6	
	10	96	3.3	103.7	3.1	2
	100	100.4	2.1	102.6	1.9	
<b>E1</b>	1	16.1	4.6	98.7	3.6	
	10	105.2	3.7	101.1	3	1
	100	99.1	2.1	99.2	2.8	

海馬サンプルの調製と並行して、組織の入っていないバツファーだけのサンプルを用意し、同様の抽出・精製作業を行った。これに外部からE2やその他の性ホルモンを0.1、0.3、1、2、5、10、20、100 pg の量で加え、LC-MS/MS による濃度測定を行った。Accuracyは、性ホルモンを入れた量に対する検出量の%で表している。

<sup>a</sup> それぞれの条件についてintraassayを5回、interassayを3回行った。

<sup>b</sup> RSD : relative standard deviation

<sup>c</sup> LOQ : limit of quantification、pg / 0.1gで表示した。これは本研究に用いた成獣ラットの海馬の重さが0.1 g程度であることから、示した数値が一匹分の海馬から測定できる性ホルモン量の下限を表すような表示方法を用いている。

表2-1. 発現解析に用いたプライマー配列とPCR条件

Gene	Direction	Sequence	Primer Length	Product Length (bp)	T <sub>a</sub> (°C)	PCR cycles
P450(17α)	forward	5'-TGGGGCGGCATAGAGACAACT-3'	22-mer	477	62	36
	reverse	5'-AGCAAGGCCGTGAAGACAAAGAGC-3'	24-mer			
P450arom	forward	5'-CTGATCATGGCCTCCTCCTG-3'	21-mer	276	58	34
	reverse	5'-CCCACGCTTGCTGCCGAATCT-3'	21-mer			
17β-HSD type1	forward	5'-ACTCCGGCGGTGTGCTGGTGA-3'	21-mer	517	65	33
	reverse	5'-GGCGTGTCTGGATCCCTGAAACTT-3'	25-mer			
17β-HSD type3	forward	5'-CTCCCCAACCTGCTCCCAAGTCATTT-3'	26-mer	408	65	34
	reverse	5'-AGCAAGGCAGCCACAGGTTTCAGC-3'	24-mer			
5α-reductase 1	forward	5'-ACCGCGTCCTGCTGGCTATGTTT-3'	23-mer	318	63	25
	reverse	5'-GGCCTCCCCTGGGTATCTTGTATCC-3'	25-mer			
5α-reductase 2	forward	5'-AGGTGGCTTGTTTACGTATGCTCTCTG-3'	26-mer	453	57	32
	reverse	5'-GGCCTCTGTGAAGCTCCAAAAG-3'	22-mer			
StAR	forward	5'-CTGGTGGGGCCCCGAGACTT-3'	20-mer	360	60	32
	reverse	5'-CAATGGCGTGCAGGTAGATGTGGT-3'	24-mer			

本研究でRT-PCRに用いた各プライマーの配列と、PCRの条件を示した。T<sub>a</sub> (°C) は、プライマーのアニーリング温度を表している。  
PCRサイクルは、PCR産物量の増幅解析を行った上で、指数増幅期に設定した。(bp : base pair)



表2-2. 発現解析に用いたプライマー配列とPCR条件

Gene	Direction	Sequence	Primer Length	Product Length (bp)	Ta (°C)	PCR cycles
ERα	forward	5'-GCCGGCTGCGCAAGTGTTACG-3'	21-mer	467	68	30
	reverse	5'-GGAGCGCCAGACCAGACCAATCA-3'	23-mer			
ERβ	forward	5'-GCAAAACCAGGAGGCAGAAAGTAGC-3'	24-mer	591	58	30
	reverse	5'-AAGTGGGCAAGGAGACAGAAAGTAAGTA-3'	28-mer			
PR	forward	5'-TGAATGAGCAGAGGATGAAGGAGTTG-3'	26-mer	353	60	25
	reverse	5'-CAGTGCCCGGATTGGATG-3'	19-mer			
AR	forward	5'-CAACTTTCGGCTCGCTCTGTC-3'	21-mer	536	56	26
	reverse	5'-TCTGGGTGGGAAGTAATAGTCG-3'	23-mer			
BDNF	forward	5'-AGGGGCATAGACAAAAGGCACTG-3'	23-mer	403	59	23
	reverse	5'-AACGGCAACAACCACAAACATTAT-3'	24-mer			
GAPDH	forward	5'-TATGACTCTACCCACGGCAAGTTCAA-3'	26-mer	830	60	19
	reverse	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCATATTCAT-3'	28-mer			

本研究でRT-PCRに用いた各プライマーの配列と、PCRの条件を示した。T<sub>a</sub> (°C) は、プライマーのアニーリング温度を表している。

PCRサイクルは、PCR産物量の増幅解析を行った上で、指数増幅期に設定した。(bp : base pair)

## 第3章 実験結果

本研究では、以下の2つのテーマに関して研究を行なった。

A：男性・女性ホルモンが、海馬神経細胞の樹状突起スパイン密度を急性的に増加させる  
分子メカニズムの解析

B：メスラットの性周期に伴う海馬の神経スパイン密度変動と海馬内の性ホルモン濃度  
変動、及び性ホルモン合成酵素と受容体発現量との相関の解析

3-1 から 3-4 では A について、3-5 から 3-7 では B について述べる。

また、A の実験には3ヶ月齢のオスラットを使用し、B の実験には、3ヶ月齢のメスラットを使用した。

### A

3-1 から 3-4 の実験では、女性ホルモン、男性ホルモン及びストレスホルモンが、海馬 CA1 領域のグルタミン酸神経細胞の樹状突起スパインに与える影響を調べた。本研究では、放射状層にある2次分岐樹状突起スパインに着目した。また本研究では、女性ホルモンであるプロゲステロン(PROG)と、エストラジオール(E2)、男性ホルモンであるジヒドロテストステロン(DHT)を使用した。さらに、性ホルモンによるスパインへの作用の比較対象として、ストレスホルモンであるコルチコステロン(CORT)も使用した。Aでは、生きた急性海馬スライスにホルモンを作用させるという実験系を用いた。この系では、阻害剤を用いることによって、スパイン密度を変化させるホルモン下流の分子カスケードを詳細に解析することが可能となる。具体的には、リン酸化酵素である LIMK、ERK/MAPK 及び各性ホルモンの受容体、グルココルチコイド受容体に着目して実験を行った。

また、第2章で説明したように、記憶機能がスパインの頭部直径に強く依存していることから、海馬神経スパインの頭部解析も行った。具体的には、スパインの頭部直径に基づいて、small-head スパイン (頭部直径：0.2-0.4  $\mu\text{m}$ )、middle-head スパイン (頭部直径：0.4-0.5  $\mu\text{m}$ )、large-head スパイン (頭部直径：0.5-1.0  $\mu\text{m}$ ) の3種類のサブクラスに分類して解析を行なった。

### 3-1. 女性ホルモンによる神経スパイン密度変化と形態変化

女性ホルモン (PROG 及び E2) が、生きた海馬 CA1 領域の神経スパイン (シナプス後部) に及ぼす影響と、そのメカニズムの解明を行った。

### 3-1-1. プロゲステロン(PROG)による海馬神経スパインへの影響

プロゲステロン (Progesteron : PROG) は、代表的な女性ホルモンの 1 種である。

#### 3-1-1-1. PROG 作用による全スパイン密度とスパイン頭部直径の解析

PROG が海馬 CA1 領域のグルタミン酸神経スパインに及ぼす急性効果を調べるため、生きた海馬スライスを ACSF 中で 2 時間インキュベートした対照群と、100nM の PROG を 2 時間作用させた作用群を作成し、スパイン密度を比較した。今回作用させた 100nM PROG は、実際に測定した海馬内の PROG 濃度の最高値に対応する。その結果、対照群の全スパイン密度 ( $0.95 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) に比べ、PROG 作用群の全スパイン密度は  $1.22 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した (図 3-1 (A),(B)、図 3-2 (B))。

さらに詳しい解析を行うため、スパインの頭部直径に基づいて small-head スパイン、middle-head スパイン、large-head スパインの 3 種類のサブクラスに分類して解析を行った。その結果、small-head スパインの密度は、対照群では  $0.56 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$  であったのに対し、PROG 作用群では  $0.80 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した。さらに、middle-head スパインの密度も、対照群では  $0.24 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  であったのに対し、PROG 作用群では  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した。一方、large-head スパインの密度は、対照群が  $0.17 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ 、PROG 作用群が  $0.13 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  であり、ほぼ同程度だった (図 3-3 (A),(B))。

以上の結果から、PROG を作用させることによって、海馬 CA1 領域の全スパイン密度が増加し、特に small-head スパインと middle-head スパイン密度が増加することが明らかとなった (図 3-1 (A),(B)、図 3-2 (B)、図 3-3 (A),(B))。

#### 3-1-1-2. LIMK の阻害剤(LIMKi)による PROG 効果の抑制

次に、PROG によるスパイン密度増加効果が生じるメカニズムを解明するため、スパイン形成に重要な役割を担っていると考えられるリン酸化酵素である LIMK に着目して実験を行った。LIMK は、スパイン形成に重要なアクチンの脱重合を制御する cofilin をリン酸化する酵素である (Yang et al., 1998; Clancy et al., 1992)。

PROG を作用させる 30 分前から 10 $\mu\text{M}$  の LIMK 阻害剤 (LIMKi) を単体で作用させ、さらに PROG を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、PROG 作用群 ( $1.22 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $0.93 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $0.95 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-1 (A),(B),(C)、図 3-2 (B))。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、middle-head スパインは  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.24 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  へと大きく減少した。一方、small-head スパインは  $0.80 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.66 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$ 、large-head スパインは  $0.13 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$

から  $0.11 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  へと、少し減少が見られた (図 3-3 (A),(B))。

以上の結果から、LIMKi は PROG による全スパイン密度の急性的な増加効果を阻害することがわかった。さらに、LIMKi によって PROG による meddle-head スパイン密度の増加が抑制されることもわかった (図 3-1 (A),(B),(C)、図 3-2 (B)、図 3-3 (A),(B))。

このとき、LIMKi を単体で作用させた場合には、スパイン密度に影響はなかった (図 3-2 (A))。

### 3-1-1-3. ERK/MAPK の阻害剤(U0126)による PROG 効果の抑制

LIMK と同様に、スパイン形成に重要な役割を担っていると考えられるリン酸化酵素である ERK/MAPK にも着目して実験を行った。ERK/MAPK は、スパイン形成に重要なアクチンの重合を制御する cortactin をリン酸化する酵素である (MacQueen et al., 2003; Martinez-Quiles et al., 2004)。PROG を作用させる 30 分前から  $25\mu\text{M}$  の ERK/MAPK 阻害剤 (U0126) を単体で作用させ、さらに PROG を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、PROG 作用群 ( $1.22 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $0.91 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $0.95 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-1 (A),(B),(D)、図 3-2 (B))。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、small-head スパインは  $0.80 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.55 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$  へと減少した。さらに、meddle-head スパインも  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.23 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  へと減少した。一方、large-head スパインは  $0.13 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.16 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  へと、有意な差は無かった (図 3-3 (A),(B))。

以上の結果から、U0126 も PROG による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。さらに、U0126 によって PROG による small-head スパイン密度と、middle-head スパイン密度の増加が抑制されることもわかった (図 3-1 (A),(B),(D)、図 3-2 (B)、図 3-3 (A),(B))。

このとき、U0126 を単体で作用させた場合には、スパイン密度に影響はなかった (図 3-2 (A))。

### 3-1-1-4. プロゲステロン受容体(PR)のアンタゴニスト(RU486)による PROG 効果の抑制

以上の実験で示した PROG による急性的な海馬 CA1 領域のスパイン密度増加は、プロゲステロン受容体 (PR) を介しているかどうかを調べるため、PR のアンタゴニストである RU486 を用いて実験を行った。PROG を作用させる 30 分前から  $10\mu\text{M}$  の RU486 を単体で作用させ、さらに PROG を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、

PROG 作用群 ( $1.22 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) から、 $0.93 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $0.95 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-1 (A),(B),(E)、図 3-2 (B))。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、small-head スパインは  $0.80 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.56 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  へと減少した。さらに、middle-head スパインも  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.24 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  へと減少した。一方、large-head スパインは  $0.13 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.18 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  へと、大きな変化はなかった (図 3-3 (A),(B))。

以上の結果から、RU486 は PROG による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。つまり、PROG による急性的なスパイン密度増加効果は、PR を介していることが明らかとなった。さらに、RU486 によって PROG による small-head スパイン密度と、middle-head スパイン密度の増加が抑制されることもわかった (図 3-1 (A),(B),(E)、図 3-2 (B)、図 3-3 (A),(B))。

このとき、RU486 を単体で作用させた場合には、スパイン密度に影響はなかった (図 3-2 (A))。

### 3-1-2. エストラジオール(E2)による海馬神経スパインへの影響

エストラジオール (Estradiol : E2) は、T や E1 から P450arom によって合成される女性ホルモンである。

#### 3-1-2-1. E2 作用による全スパイン密度とスパイン頭部直径の解析

E2 が海馬 CA1 領域のグルタミン酸神経スパインに及ぼす急性効果を調べるため、生きた海馬スライスを ACSF 中で 2 時間インキュベートした対照群と、1nM の E2 を 2 時間作用させた作用群を作成し、スパイン密度を比較した。その結果、対照群の全スパイン密度 ( $1.04 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ) に比べ、E2 作用群の全スパイン密度は  $1.34 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した (図 3-4 (A),(B)、図 3-5)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、small-head スパインの密度は、対照群では  $0.53 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  であったのに対し、E2 作用群では  $0.75 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  と大きく増加した。一方、middle-head スパインの密度は、対照群が  $0.35 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ 、E2 作用群が  $0.40 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  と大きな差はなく、large-head スパインの密度も、対照群が  $0.16 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ 、E2 作用群が  $0.19 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  であり、ほぼ同程度だった (図 3-6 (A),(B))。

以上の結果から、E2 を作用させることによって、海馬 CA1 領域の全スパイン密度が増加し、特に small-head スパイン密度が増加することが明らかとなった (図 3-4 (A),(B)、図 3-5、

図 3-6 (A),(B))。

### 3-1-2-2. LIMK の阻害剤(LIMKi)による E2 効果の抑制

次に、E2 によるスパイン密度増加効果が生じるメカニズムを解明するため、リン酸化酵素 (LIMK) に着目して PROG と同様に実験を行った。

E2 を作用させる 30 分前から  $10\mu\text{M}$  の LIMK 阻害剤 (LIMKi) を単体で作用させ、さらに E2 を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、E2 作用群 ( $1.34 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $0.99 \pm 0.08$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $1.04 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-4 (A),(B),(C)、図 3-5)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、small-head スパインは  $0.75 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.54 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$  へと大きく減少した。さらに、large-head スパインも  $0.19 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.07 \pm 0.01$  spines/ $\mu\text{m}$  へと大きく減少した。一方、middle-head スパインは  $0.40 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.38 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  と、ほとんど変化は無かった (図 3-6 (A),(B))。

以上の結果から、LIMKi は E2 による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。さらに、LIMKi によって E2 による small-head スパイン密度の増加が抑制されることと、large-head スパインが減少することもわかった (図 3-4 (A),(B),(C)、図 3-5、図 3-6 (A),(B))。

### 3-1-2-3. ERK/MAPK の阻害剤(U0126)による E2 効果の抑制

さらに、ERK/MAPK にも着目して実験を行った。E2 を作用させる 30 分前から  $25\mu\text{M}$  の ERK/MAPK 阻害剤 (U0126) を単体で作用させ、さらに E2 を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、E2 作用群 ( $1.34 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $1.08 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $1.04 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-4 (A),(B),(D)、図 3-5)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、small-head スパインは  $0.75 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.56 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$  へと大きく減少した。一方、middle-head スパインは  $0.40 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.38 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ 、large-head スパインは  $0.19 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.14 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  へと、ほとんど変化は無かった (図 3-6 (A),(B))。

以上の結果から、U0126 は E2 による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。さらに、U0126 によって E2 による small-head スパイン密度の増加が抑制されることもわかった (図 3-4 (A),(B),(D)、図 3-5、図 3-6 (A),(B))。

#### 3-1-2-4. エストロゲン受容体(ER $\alpha$ ,ER $\beta$ ) のアンタゴニスト(ICI)による E2 効果の抑制

以上の実験で示した E2 による急性的な海馬 CA1 領域のスパイン密度増加は、エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) を介しているかどうかを調べるため、ER のアンタゴニストである ICI を用いて実験を行った。E2 を作用させる 30 分前から 1 $\mu$ M の ICI を単体で作用させ、さらに E2 を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、E2 作用群 (1.34  $\pm$  0.04 spines/ $\mu$ m) と比較して、1.03  $\pm$  0.03 spines/ $\mu$ m まで減少し、対照群の全スパイン密度 (1.04  $\pm$  0.03 spines/ $\mu$ m) と同程度になった (図 3-4 (A),(B),(E)、図 3-5)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、small-head スパインは 0.75  $\pm$  0.05 spines/ $\mu$ m から 0.55  $\pm$  0.03 spines/ $\mu$ m へと大きく減少した。さらに、large-head スパインは 0.19  $\pm$  0.02 spines/ $\mu$ m から 0.11  $\pm$  0.01 spines/ $\mu$ m へと減少した。一方、middle-head スパインは 0.40  $\pm$  0.04 spines/ $\mu$ m から 0.37  $\pm$  0.02 spines/ $\mu$ m へと、ほとんど変化はなかった (図 3-6 (A),(B))。

以上の結果から、ICI は E2 による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。つまり、E2 による急性的なスパイン密度増加効果は、ER を介していることが明らかとなった。さらに、ICI によって E2 による small-head スパイン密度の増加が抑制されること、large-head スパインの密度も減少することがわかった (図 3-4 (A),(B),(E)、図 3-5、図 3-6 (A),(B))。

このとき、ICI を単体で作用させた場合には、スパイン密度に影響はなかった (図 3-2 (A))。

### 3-2. 男性ホルモンによる神経スパイン密度変化と形態変化

男性ホルモン (DHT) が、海馬 CA1 領域の神経スパイン (シナプス後部) に及ぼす影響と、そのメカニズムの解明を行った。

#### 3-2-1. ジヒドロテストステロン(DHT)による海馬神経スパインへの影響

ジヒドロテストステロン (Dihydrotestosterone : DHT) は、テストステロンから 5 $\alpha$ -reductase によって生成される強い男性ホルモンである。

##### 3-2-1-1. DHT 作用による全スパイン密度とスパイン頭部直径の解析

DHT が海馬 CA1 領域のグルタミン酸神経スパインに及ぼす急性効果を調べるため、生きた海馬スライスを ACSF 中で 2 時間インキュベートした対照群と、10nM の DHT を 2 時間

作用させた作用群を作成し、スパイン密度を比較した。その結果、対照群の全スパイン密度 ( $0.97 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ) に比べ、DHT 作用群の全スパイン密度は  $1.28 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した (図 3-7 (A),(B)、図 3-8)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、middle-head スパインの密度は、対照群が  $0.33 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ 、DHT 作用群が  $0.45 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した。さらに、large-head スパインの密度も、対照群では  $0.25 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  であったのに対し、DHT 作用群では  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した。一方、small-head スパインの密度は、対照群が  $0.41 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$ 、DHT 作用群が  $0.42 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  であり、大きな差は無かった (図 3-9 (A),(B))。

以上の結果から、DHT を作用させることによって、海馬 CA1 領域の全スパイン密度が増加し、特に middle-head スパインと large-head スパインの密度が増加することが明らかとなった (図 3-7 (A),(B)、図 3-8、図 3-9 (A),(B))。

### 3-2-1-2. LIMK の阻害剤(LIMKi)による DHT 効果の抑制

次に、DHT によるスパイン密度増加効果が生じるメカニズムを解明するため、リン酸化酵素 (LIMK) に着目して実験を行った。

DHT を作用させる 30 分前から  $10\mu\text{M}$  の LIMK 阻害剤 (LIMKi) を単体で作用させ、さらに DHT を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、DHT 作用群 ( $1.28 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $0.96 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $0.97 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-7 (A),(B),(C)、図 3-8)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、large-head スパインは  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.06 \pm 0.01$  spines/ $\mu\text{m}$  と大きく減少した。一方、small-head スパインは  $0.42 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.50 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$ 、middle-head スパインは  $0.45 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.40 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  と、有意な差は無かった (図 3-9 (A),(B))。

以上の結果から、LIMKi は DHT による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。さらに、LIMKi によって DHT による large-head スパイン密度の増加が抑制されることも明らかとなった (図 3-7 (A),(B),(C)、図 3-8、図 3-9 (A),(B))。

### 3-2-1-3. ERK/MAPK の阻害剤(U0126)による DHT 効果の抑制

さらに、ERK/MAPK にも着目して実験を行った。DHT を作用させる 30 分前から  $25\mu\text{M}$  の ERK/MAPK 阻害剤 (U0126) を単体で作用させ、さらに DHT を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、DHT 作用群 ( $1.28 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $0.98 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $0.97 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度にな



った (図 3-7 (A),(B),(D)、図 3-8)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、middle-head スパインは  $0.45 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.31 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  と減少した。さらに、large-head スパイも  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.23 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  と減少した。一方、small-head スパインは  $0.42 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.47 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  と、有意な差は無かった (図 3-9 (A),(B))。

以上の結果から、U0126 は DHT による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。さらに、U0126 によって DHT による middle-head スパイン及び large-head スパイン密度の増加が抑制されることも明らかとなった (図 3-7 (A),(B),(D)、図 3-8、図 3-9 (A),(B))。

#### 3-2-1-4. アンドロゲン受容体(AR)のアンタゴニスト(HF)による DHT 効果の抑制

以上の実験で示した DHT による急性的な海馬 CA1 領域のスパイン密度増加は、アンドロゲン受容体 (AR) を介しているかどうかを調べるため、AR のアンタゴニストである Hydroxyflutamide (HF) を用いて実験を行った。DHT を作用させる 30 分前から  $1\mu\text{M}$  の HF を単体で作用させ、さらに DHT を加えて 2 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、DHT 作用群 ( $1.28 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $0.99 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $0.97 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-7 (A),(B),(E)、図 3-8)。

さらに、スパインの頭部直径ごとに密度を比較したところ、middle-head スパインは  $0.45 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.33 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  と減少した。さらに、large-head スパイも  $0.37 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.17 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$  と減少した。一方、small-head スパインは  $0.42 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  から  $0.49 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  と、有意な差は無かった (図 3-9 (A),(B))。

以上の結果から、HF は DHT による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。つまり、DHT による急性的なスパイン密度増加効果は、AR を介していることが明らかとなった。さらに、HF によって DHT による middle-head スパイン及び large-head スパイン密度の増加が抑制されることも明らかとなった (図 3-7 (A),(B),(E)、図 3-8、図 3-9 (A),(B))。

このとき、HF を単体で作用させた場合には、スパイン密度に影響はなかった (図 3-2 (A))。

### 3-3. コルチコステロン(CORT)による神経スパイン密度の変化

性ホルモンの比較対象として、性ホルモン以外のステロイドホルモンが海馬 CA1 領域の

グルタミン酸作動性神経スパインを制御する機構を、コルチコステロン(Corticosterone : CORT) を用いて調べた。本研究では、低濃度 (30nM) の CORT を海馬スライスに作用させた。ここで、30nM の CORT は、ラットの覚醒時の脳内濃度と同程度である。

### 3-3-1. CORT とリン酸化酵素の阻害剤による神経スパインへの影響

生きた海馬スライスを ACSF 中で 2 時間インキュベートした対照群と、30nM の CORT を 1 時間作用させた作用群を作成し、スパイン密度を比較した。その結果、対照群の全スパイン密度 ( $1.15 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ ) に比べ、CORT 作用群の全スパイン密度は  $1.40 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$  と増加した (図 3-10 (A),(B)、図 3-11)。以上の結果から、CORT は海馬 CA1 領域のグルタミン酸神経の全スパイン密度を増加させることがわかった。

次に、CORT によるスパイン密度増加効果が生じるメカニズムを解明するため、リン酸化酵素 (LIMK) に着目して性ホルモンと同様に実験を行った。

CORT を作用させる 30 分前から  $10\mu\text{M}$  の LIMK 阻害剤 (LIMKi) を単体で作用させ、さらに CORT を加えて 1 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、CORT 作用群 ( $1.40 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $1.10 \pm 0.03$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $1.15 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-10 (A),(B),(C)、図 3-11)。

さらに、ERK/MAPK にも着目して実験を行った。CORT を作用させる 30 分前から  $25\mu\text{M}$  の ERK/MAPK 阻害剤 (U0126) を単体で作用させ、さらに CORT を加えて 1 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、CORT 作用群 ( $1.40 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $1.16 \pm 0.04$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減少し、対照群の全スパイン密度 ( $1.15 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-10 (A),(B),(D)、図 3-11)。

以上の結果から、CORT は海馬 CA1 領域のグルタミン酸神経の全スパイン密度を増加させることがわかった。さらに、LIMKi 及び U0126 を作用させることによって、CORT によるスパイン密度の増加効果が抑制されることが明らかとなった (図 3-10 (A),(B),(C),(D)、図 3-11)。

### 3-3-2. グルココルチコイド受容体(GR) のアンタゴニスト(RU486)による CORT 効果の抑制

以上の実験で示した低濃度 CORT による急性的な海馬 CA1 領域のスパイン密度増加は、グルココルチコイド受容体 (GR) を介しているかどうかを調べるため、GR のアンタゴニストである RU486 を用いて実験を行った。CORT を作用させる 30 分前から  $10\mu\text{M}$  の RU486 を単体で作用させ、さらに CORT を加えて 1 時間インキュベートした。その結果、全スパイン密度は、CORT 作用群 ( $1.40 \pm 0.05$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と比較して、 $1.17 \pm 0.06$  spines/ $\mu\text{m}$  まで減

少し、対照群の全スパイン密度 ( $1.15 \pm 0.02$  spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度になった (図 3-10 (A),(B),(E)、図 3-11)。

以上の結果から、RU486 は CORT による全スパイン密度の急性的な増加効果を完全に阻害することがわかった。つまり、CORT による急性的なスパイン密度増加効果は、GR を介していることが明らかとなった。

### 3-4. 阻害剤のみによるスパイン密度への影響

上記で使用した阻害剤が、単体では海馬 CA1 領域のスパイン密度に影響を与えないことを明らかにするため、阻害剤 (LIMKi, U0126, RU486, ICI, HF) のみを 2 時間作用させた実験を行った。その結果は各節で既に記述したが、どの阻害剤のみを作用させても、スパイン密度はほとんど変化しなかった (図 3-2 (A))。以上の結果から、阻害剤のみではスパイン密度に影響を与えないことを明らかにした。

## B

3-5 から 3-7 の実験では、メスラットの性周期に伴う海馬の神経スパイン密度変動と海馬内の性ホルモン濃度変動、及び性ホルモン合成酵素と受容体発現量との相関の解析について述べる。

### 3-5. メスの性周期と海馬神経スパイン密度の変動

成獣メスラットは、卵胞期 (Proestrus : P)、排卵期 (Estrus : E)、黄体期 1 (Diestrus1 : D1)、黄体期 2 (Diestrus2 : D2) という 4 つのステージから成る性周期を持っており、約 4 日で周期が 1 周する。先行研究でも、性周期に伴って海馬機能が変化することが報告されているが、黄体期 (Diestrus) を D として一つにまとめて調べられており、これを D1, D2 に分けて性周期を正確に 4 つのステージに分けて行った実験はほとんど報告されていない。そこで本研究では、成獣メスラットを用いて、各性周期ステージで灌流固定を行い、海馬 CA1 領域におけるグルタミン酸神経細胞のスパイン密度を測定して性周期に伴うスパイン密度の変動を調べた。この節では、個体を灌流固定する実験系を用いた。灌流固定をすることによって、海馬内スパインの状態を生前に近い状態で固定して解析することが可能となるため、海馬内のスパイン密度を各性周期ステージ間で比較するのに適している。

その結果、全スパイン密度は、P では  $2.33$  spines/ $\mu\text{m}$  であったのに対し、E では  $2.04$

spines/ $\mu\text{m}$  と減少、D 1 で再び 2.33 spines/ $\mu\text{m}$  と増加し、D2 では 2.04 spines/ $\mu\text{m}$  と減少するというように、周期的に変動した。このとき、P と D1 におけるスパイン密度は、オスのスパイン密度 (2.36 spines/ $\mu\text{m}$ ) と同程度であった (図 3-12 (A),(B))。

### 3-6. 質量分析法による性ホルモン濃度の測定

さらに、質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて、各性周期ステージのメスラットについて、海馬内と血中 (血漿中) の女性ホルモン濃度 (PROG、E2) の測定を行った。そして、(1) 性周期による影響、(2) オスとメスの性差、という 2 つの観点から結果をまとめた。また、オスラットのデータは、北條らの先行研究により得られた値を使用した (Hojo et al., 2009)。

#### 3-6-1. プロゲステロン (PROG) 濃度の測定

PROG はイオン化しやすいため、誘導体化を行わなくても測定することができた。親イオンの  $m/z$  値は 315、フラグメント化した娘イオンの  $m/z$  値は 97.2 であった (図 3-13(A))。  $m/z$  値に基づく親イオンの分離、娘イオンの分離・検出を行い、図 3-14 のマスキロマトグラムを得た。得られた結果から、「2-4. LC-MS/MS による海馬内性ステロイド濃度測定の実験操作」で述べた方法を用いて計算した PROG 濃度は、海馬内では Proestrus :  $55.7 \pm 6.8 \text{ nM}$  ( $n = 4$ )、Estrus :  $40.7 \pm 7.8 \text{ nM}$  ( $n = 4$ )、Diestrus 1 :  $87.0 \pm 8.1 \text{ nM}$  ( $n = 3$ )、Diestrus 2 :  $48.0 \pm 6.2 \text{ nM}$  ( $n = 4$ ) であった。一方、血中では Proestrus :  $20.5 \pm 2.6 \text{ nM}$  ( $n = 4$ )、Estrus :  $16.7 \pm 2.3 \text{ nM}$  ( $n = 4$ )、Diestrus 1 :  $51.6 \pm 17.9 \text{ nM}$  ( $n = 3$ )、Diestrus 2 :  $24.1 \pm 7.3 \text{ nM}$  ( $n = 4$ ) であった。

これらを (Hojo et al., 2009) から得られたオスのデータも入れてまとめたものが図 3-15 である。どの群においても、メスの海馬内濃度は血中の 2 倍程度である。

(1) 性周期の影響という観点から海馬内・血中の PROG 濃度を比較すると、海馬内・血中ともに性周期に伴う明確な変動が見られ、二つの変動には相関があった。特に Estrus から Diestrus 1 にかけての濃度上昇、Diestrus 1 から Diestrus 2 にかけての濃度低下といった変動の位相が似ていた。しかし、海馬内の PROG は血中の 2 倍程度の濃度で存在している。そのため、海馬内の PROG 量は、主に海馬で合成されてい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の PROG の寄与が考えられる。

(2) オスとの比較では、海馬内・血中ともにメスの方がオスよりも高い濃度を示した。

### 3-6-2. エストラジオール (E2) 濃度の測定

E2 は、picolinoyl 誘導体化と pentafluorobenzyl (PFBz) 誘導体化を行い、E2-3-PFBz-17-picolinoyl とした。picolinoyl 誘導体化は、Picolinoyl 化によって誘導電荷を与え、質量分析器の中を飛びやすいようにするためのものである。また、PFBz は Electron Ion Spray で気化効率を上げるための操作である。親イオンの  $m/z$  値は 558、フラグメント化した娘イオンの  $m/z$  値は 339 であった (図 3-13(B))。  $m/z$  値に基づく親イオンの分離、娘イオンの分離・検出を行い、図 3-16 のマスキロマトグラムを得た。得られた結果から計算した E2 濃度は、海馬内では Proestrus :  $4.3 \pm 1.0$  nM ( $n = 6$ )、Estrus :  $1.0 \pm 0.4$  nM ( $n = 4$ )、Diestrus 1 :  $0.51 \pm 0.05$  nM ( $n = 3$ )、Diestrus 2 :  $0.7 \pm 0.1$  nM ( $n = 4$ ) であった。一方、血中では Proestrus :  $0.111 \pm 0.008$  nM ( $n = 6$ )、Estrus :  $0.017 \pm 0.005$  nM ( $n = 6$ )、Diestrus 1 :  $0.009 \pm 0.001$  nM ( $n = 5$ )、Diestrus 2 :  $0.029 \pm 0.005$  nM ( $n = 6$ ) であった。

これらを (Hojo et al., 2009) から得られたオスのデータも入れてまとめたものが図 3-17 である。海馬内濃度は血中濃度の 10~100 倍程度という非常に高い濃度であった。

- (1) 性周期の影響という観点から海馬内・血中の E2 濃度を比較すると、海馬内・血中ともに性周期に伴う大きな濃度変動が見られた。具体的には、Proestrus から Estrus にかけての大きな濃度減少、Diestrus 2 から Proestrus の大きな濃度上昇が見られた。但し、海馬の E2 濃度は血中の 100 倍程度であるため、血中の E2 濃度変動が海馬の E2 濃度変動を引き起こすわけではないということがはっきりとわかった。
- (2) オスとの比較をすると、E2 は女性ホルモンであるにも関わらず、海馬内ではオスの方がメスよりも 2~8 倍高い濃度を示した。

### 3-7. メスの性周期と海馬内性ホルモン合成酵素及び受容体の mRNA 発現量解析

RT-PCR を用いて、各性周期ステージ (P, E, D1, D2) のメスラットの海馬における性ホルモン合成酵素の発現解析を行った。解析を行った性ホルモン合成酵素は、StAR、P450(17 $\alpha$ )、17 $\beta$ -HSD type1、17 $\beta$ -HSD type 3、P450arom、5 $\alpha$ -reductase1、5 $\alpha$ -reductase2 であるが、ここでは代表的な合成酵素である 17 $\beta$ -HSD type1、17 $\beta$ -HSD type 3、P450arom のみを記述する。また、プロゲステロン受容体 (PR)、エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ )、アンドロゲン受容体 (AR) についても発現解析を行った。

### 3-7-1. *Hsd17b1*、*Hsd17b3* (17 $\beta$ -HSD の遺伝子) の発現解析

17 $\beta$ -HSD type1,3 は、DHEA からアンドロステジオール (ADione) への変換や、ADione からテストステロン (T) への変換、更にエストロン (E1) からエストラジオール (E2) への変換を担う酵素である。

*Hsd17b1* の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、PCR 産物は 28~34 サイクル間で指数増幅し 36 サイクルから飽和状態に達した。よって、PCR は指数増幅期の 33 サイクルで行った (図 3-19 (A))。

12 週齢メスラットの海馬における *Hsd17b1* 発現量を、各性周期ステージで比較した。mRNA 発現量の比較には、メスラットの海馬と、12 週齢オスラットの海馬を用いた。その結果、メスラットの各性周期ステージにおける *Hsd17b1* 発現量には有意な差はなかった (図 3-19 (B),(C))。オスにおいても、海馬内の *Hsd17b1* の発現量にメスとの差異はなかった。

*Hsd17b3* の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、PCR 産物は 28~34 サイクル間で指数増幅し 36 サイクルから飽和状態に達した。よって、PCR は指数増幅期の 34 サイクルで行った (図 3-20 (A))。*Hsd17b1* と同様の比較を行った結果、*Hsd17b3* の発現量に各性周期ステージに有意な差はなかった (図 3-20 (B),(C))。オスにおいても、海馬内の *Hsd17b3* の発現量にメスとの差異はなかった。これらの結果から、性周期に関わらず、海馬内には一定の *Hsd17b1*、*Hsd17b3* が発現していることがわかった。

### 3-7-2. *Cyp19a1* (P450arom の遺伝子) の発現解析

P450arom は、テストステロン (T) をエストラジオール (E2) に変換する酵素であり、E2 合成において最も重要な酵素である。

*Cyp19a1* の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、28~34 サイクル間で指数増幅し、36 サイクルから飽和状態に達した。よって、半定量 PCR は指数増幅期の 34 サイクルで行った (図 3-21 (A))。

12 週齢メスラットの海馬における *Cyp19a1* 発現量を、各性周期ステージで比較した。mRNA 発現量の比較には、メスラットの海馬と、12 週齢オスラットの海馬を用いた。その結果、メスラットの各性周期ステージにおける *Cyp19a1* 発現量には、有意な差はなかった (図 3-21 (B),(C))。オスにおいても、海馬内の *Cyp19a1* の発現量にメスとの差異はなかった。

メスとオスの海馬内 E2 濃度は大きく異なるにも関わらず、*Cyp19a1* の mRNA の発現量には性差がなかったことは、大変驚くべき結果である。

### 3-7-3. *Pgr* (PR の遺伝子) の発現解析

プロゲステロン受容体 (PR) は、PROG をリガンドとする受容体で、PR-A、PR-B の 2 種

類が存在している。発現解析には、両者の共通部位をはさむように設計したプライマーを用いた。

*Pgr* の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、ER に比べて増幅曲線の立ち上がり早く、22～26 サイクル間で指数増幅し、28 サイクルから飽和状態に達した。よって、PCR は指数増幅期の 25 サイクルで行った (図 3-22 (A))。

12 週齢メスラットの海馬における *Pgr* 発現量を各性周期ステージで比較した。mRNA 発現量の比較には、メスラットの海馬と、12 週齢オスラットの海馬を用いた。その結果、メスラットの各性周期ステージにおいて *Pgr* 発現量には有意な差はなかった (図 3-22 (B),(C))。また、*Pgr* の発現量には性差もなかった。*Pgr* 発現量は変動しなかったため、血中及び海馬内の PROG 濃度の変動とは一致しない。そのため、PROG の作用に与える影響は、*Pgr* の発現量よりも PROG 濃度の変動の方が大きいことが予想される。

### 3-7-4. *Esr1*、*Esr2* (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ の遺伝子) の発現解析

エストロゲン受容体 (ER) は、E2 をリガンドとする受容体で  $\alpha$  型 (ER $\alpha$ )、 $\beta$  型 (ER $\beta$ ) の 2 種類が存在する。

ER $\alpha$  遺伝子(*Esr1*)の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、26～30 サイクル間で指数増幅し、32 サイクルから飽和状態に達した。よって、PCR は指数増幅期の 30 サイクルで行った (図 3-23 (A))。

12 週齢メスラットの海馬における *Esr1* 発現量を各性周期ステージで比較した。mRNA 発現量の比較には、メスラットの海馬と、12 週齢オスラットの海馬を用いた。その結果、メスラットの各性周期ステージにおける *Esr1* 発現量には有意な差はなかった (図 3-23 (B),(C))。オスにおいても、海馬内の *Esr1* 発現量にメスとの差異はなかった。

ER $\beta$  は、ER $\alpha$  と同様に E2 をリガンドとする受容体である。ER $\beta$  も海馬の神経細胞に発現しており、E2 の作用を媒介する。ER $\beta$  には選択的スプライシングによって生じる二つのアイソフォームがあり、それらは ER $\beta$ 1、ER $\beta$ 2 として知られている。発現解析には、両者の共通部位をはさむように設計したプライマーを用いた。

ER $\beta$  遺伝子 (*Esr2*) の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、26～30 サイクル間で指数増幅し、32 サイクルから飽和状態に達した。よって、PCR は指数増幅期の 30 サイクルで行った (図 3-24 (A))。

12 週齢メスラットの海馬における *Esr2* 発現量を各性周期ステージで比較した。mRNA 発現量の比較には、メスラットの海馬と、12 週齢オスラットの海馬を用いた。その結果、*Esr2* 発現量は D1 で減少する傾向が見られたが、各性周期ステージにおいて有意な差はなかった (図 3-24 (B),(C))。オスにおいても、海馬内の *Esr2* 発現量にメスとの差異はなかった。

### 3-7-5. *Ar* (AR の遺伝子)の発現解析

アンドロゲン受容体 (AR) は、T、DHT をリガンドとする受容体である。

*Ar* の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、24～28 サイクル間で指数増幅し、30 サイクルから飽和状態に達した。よって、PCR は指数増幅期の 26 サイクルで行った (図 3-25 (A))。12 週齢メスラットの海馬における *Ar* 発現量を、各性周期ステージで比較した。mRNA 発現量の比較には、メスラットの海馬と、12 週齢オスラットの海馬を用いた。その結果、性周期各ステージにおいて *Ar* の発現量に有意な差はなかった (図 3-25 (B),(C))。オスにおいても、海馬内の *Ar* 発現量にメスとの差異はなかった。男性ホルモンの作用標的分子である AR の mRNA 発現量に性差が無かったことは、非常に驚くべき発見である。



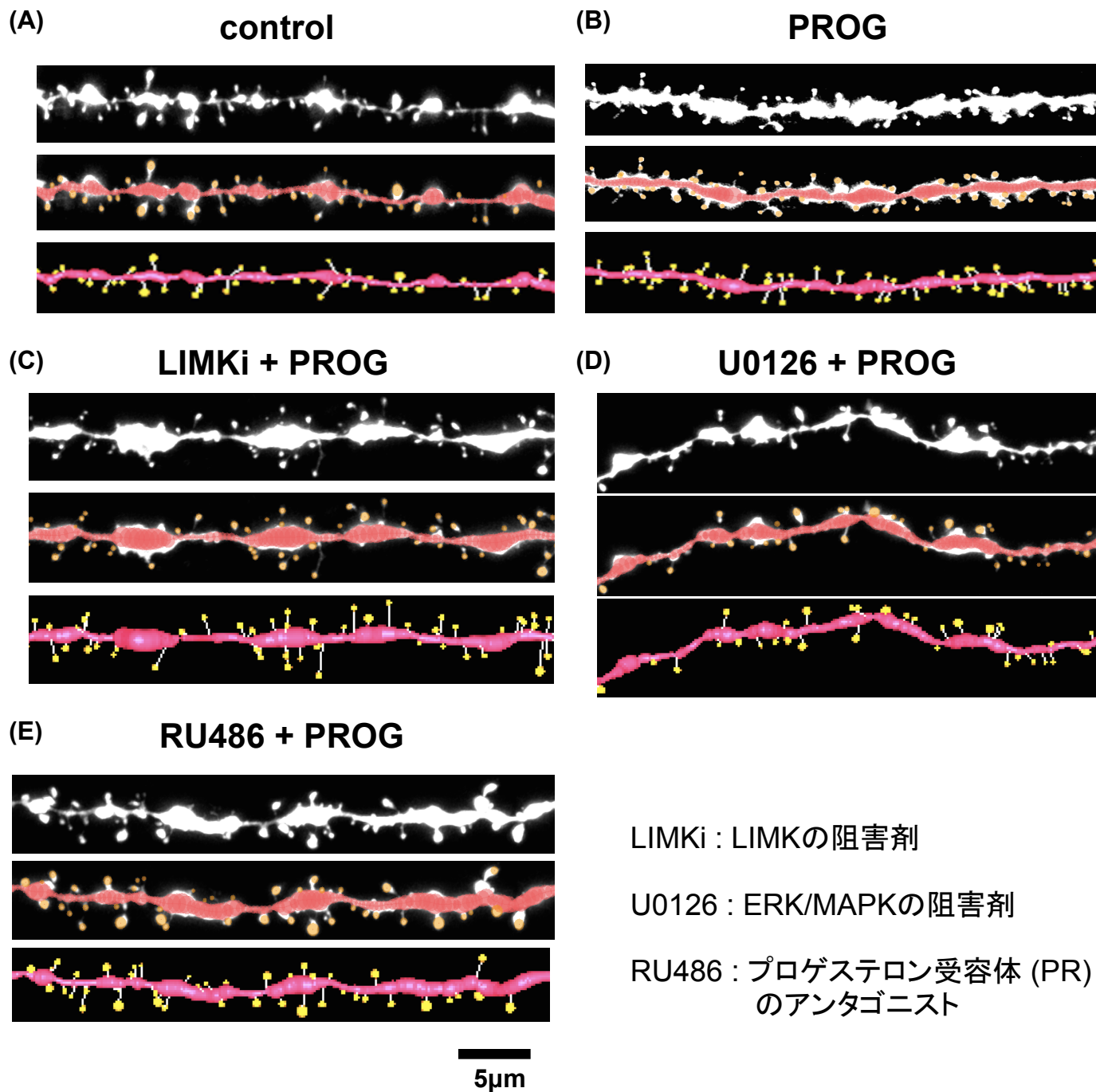


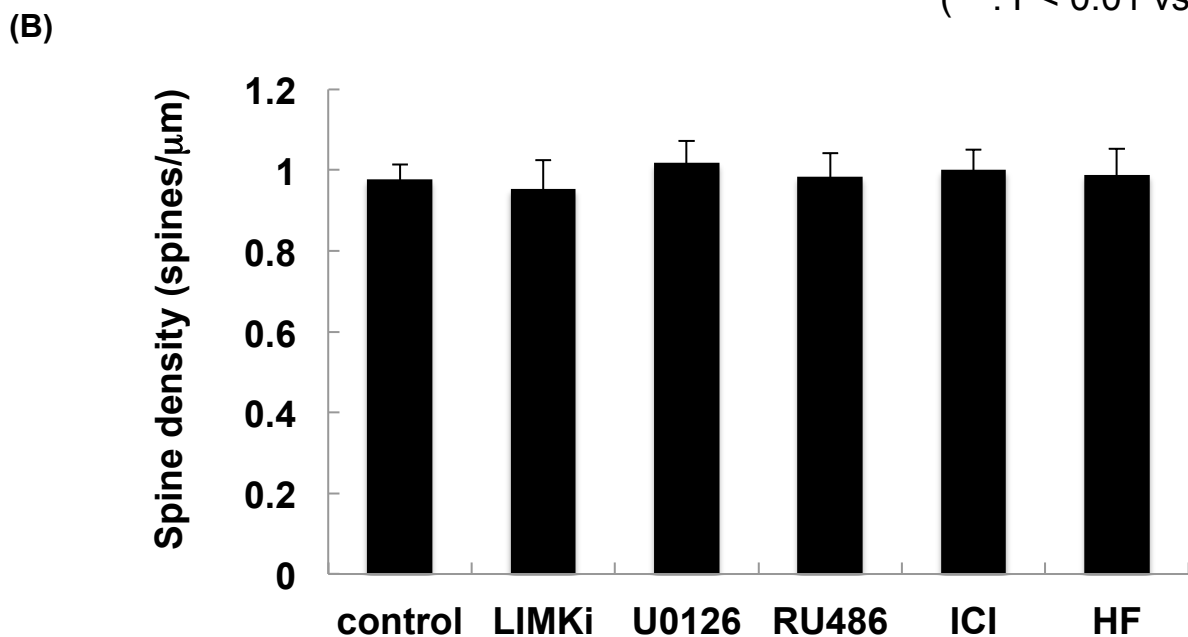
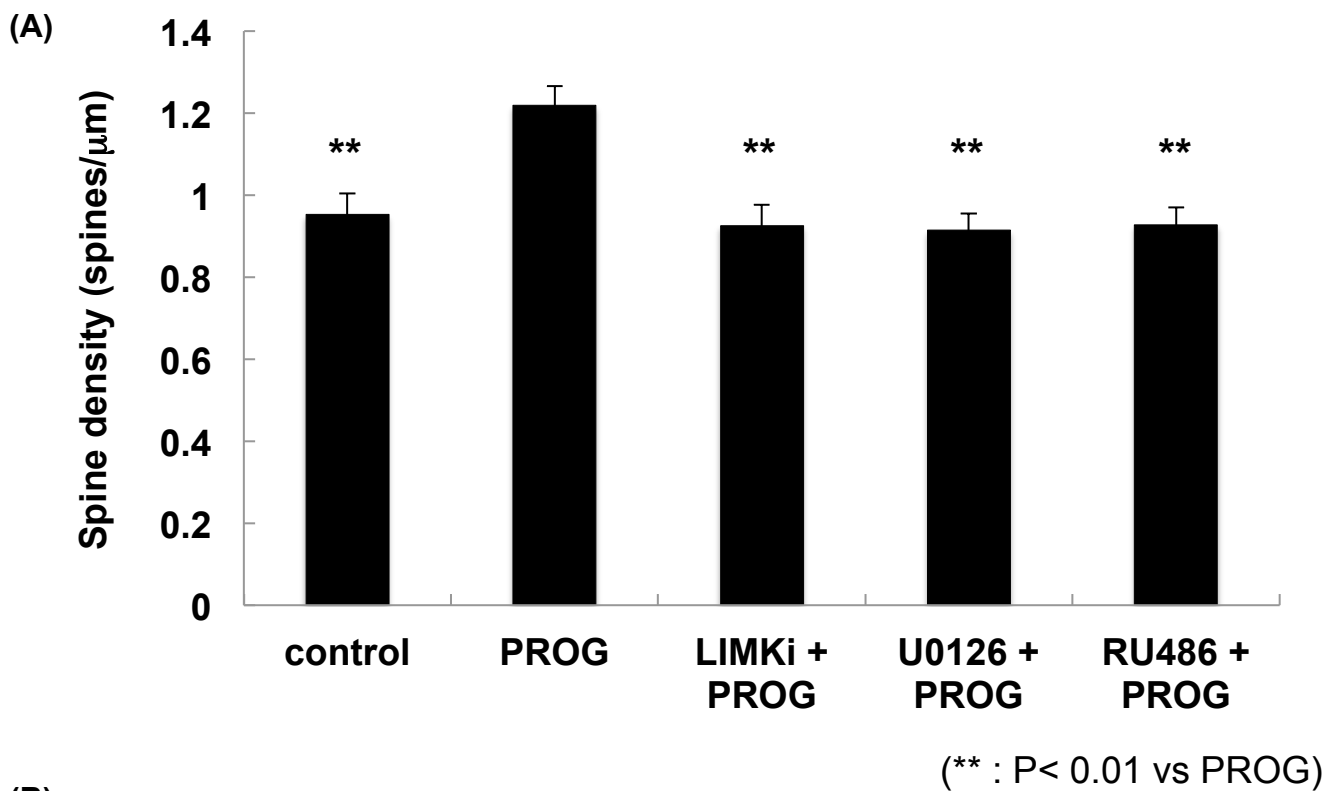
図3-1. プログステロン (PROG) と阻害剤によるスパインの密度変化 (1/2)

各パネル上段：海馬CA1領域の錐体神経細胞の樹状突起を、蛍光色素 (LuciferYellow) で可視化し、超解像共焦点レーザー顕微鏡で断層撮影した画像をXY平面に投射した画像。

各パネル中段：数理解析ソフトSpiso-3Dを用いて上段の断層画像から樹状突起とスパインを検出した画像。(赤：樹状突起、橙：スパイン)

各パネル下段：中段の解析で検出した樹状突起とスパインを、3次元に再構成して表示した画像。(赤：樹状突起、黄：スパイン)

(A) 対照群 (B) PROGを2時間作用させたPROG作用群 (C) LIMK の阻害剤 (LIMKi) を30分作用させた後、PROGを2時間作用させた群 (D) ERK/MAPK の阻害剤 (U0126) を30分作用させた後、PROGを2時間作用させた群 (E) プログステロン受容体 (PR) のアンタゴニスト (RU486) を30分作用させた後、PROGを2時間作用させた群



### 図3-2. PROGと阻害剤による全スパイン密度変化 (2/2)

(A) 海馬スライスにPROG単体、またはPROGと阻害剤を共に作用させた際の全スパイン密度。PROGはスパイン密度を増加させた。さらに、PROGによるスパイン密度増加効果は、阻害剤によって抑制された。

LIMKi : LIMKの阻害剤、U0126 : ERK/MAPKの阻害剤、RU486 : PRのアンタゴニスト

(B) 海馬スライスに阻害剤のみを2時間作用させた際の全スパイン密度。

阻害剤のみでは、スパイン密度に影響を与えなかった。

ラット数 : 3、スライス数 : 6、神経細胞数 : 12、樹状突起数 (n) : 23、スパイン数 : 1000-1400

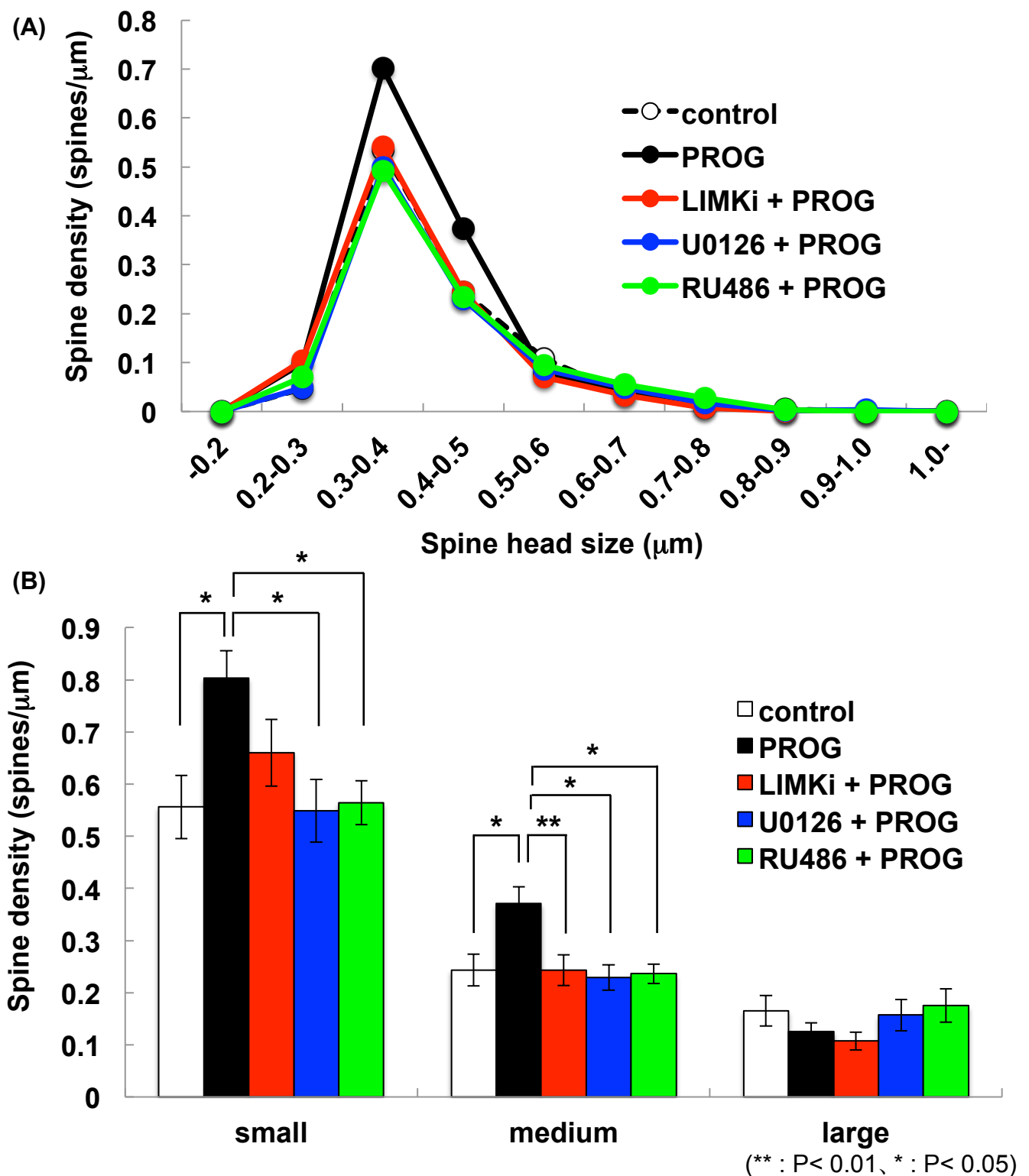


図3-3. PROGと阻害剤によるスパイン頭部直径ごとの密度変化

(A) 海馬スライスにPROG単体、またはPROGと阻害剤を共に作用させた際のスパイン密度を、頭部直径ごとに表した分布。

LIMKi : LIMKの阻害剤、U0126 : ERK/MAPKの阻害剤、RU486 : PRのアンタゴニスト

(B) スパイン密度を、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) に分類した際の密度のグラフ。

PROGはsmall-headスパインとmiddle-headスパインの密度を増加させた。この増加は、阻害剤によって抑制された。

ラット数 : 3、スライス数 : 6、神経細胞数 : 12、樹状突起数 (n) : 23、スパイン数 : 1000-1400

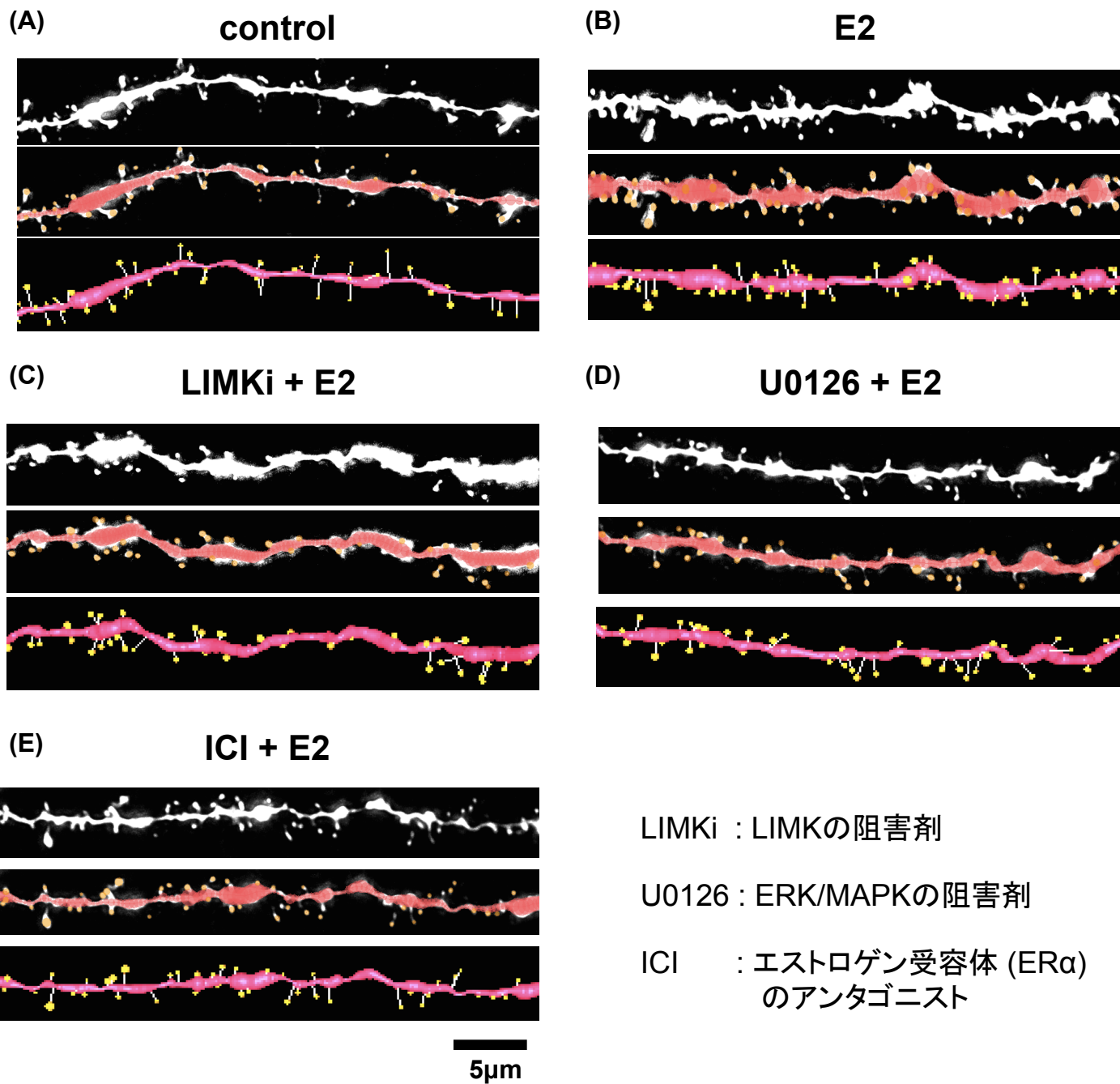


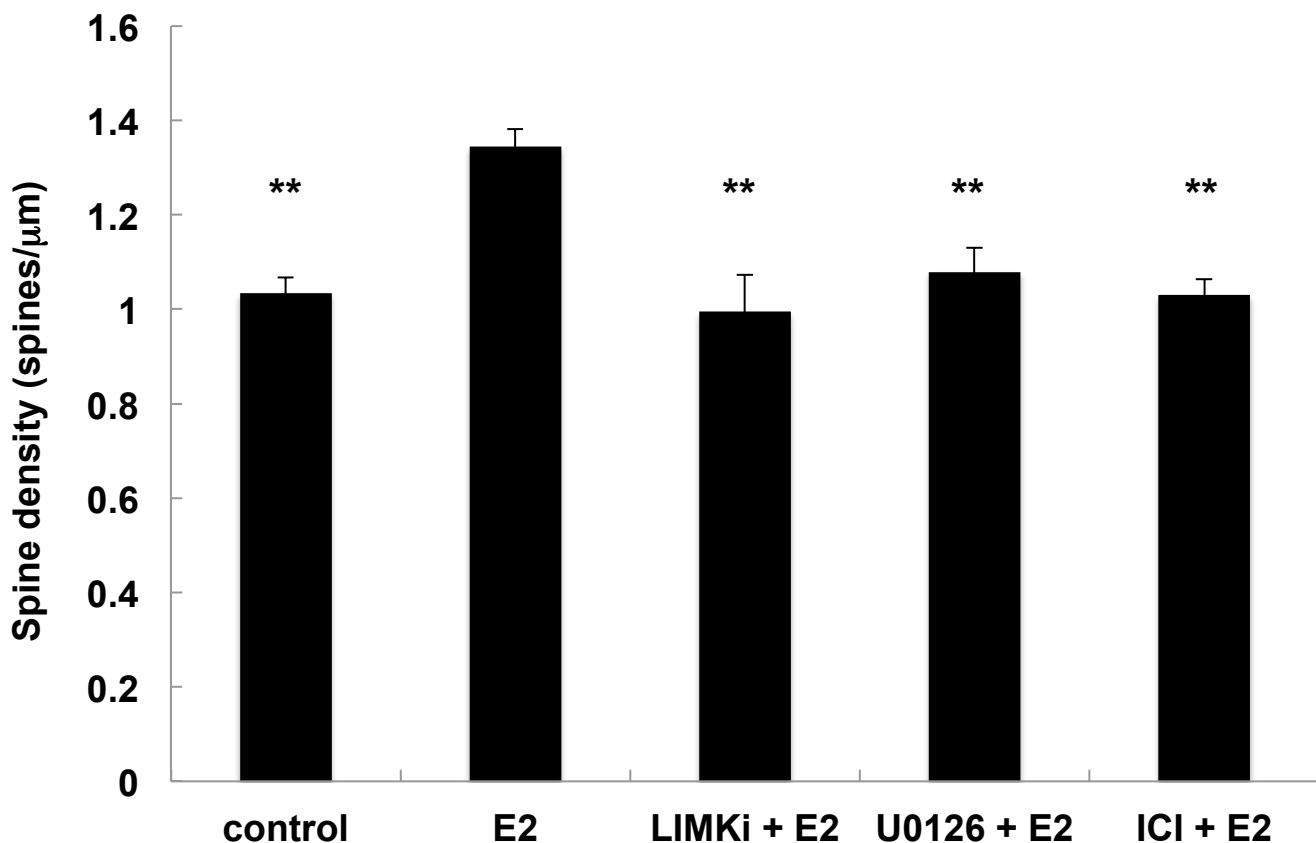
図3-4. エストラジオール (E2) と阻害剤によるスパインの密度変化 (1/2)

各パネル上段：海馬CA1領域の錐体神経細胞の樹状突起を、蛍光色素 (LuciferYellow) で可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で断層撮影した画像をXY平面に投射した画像。

各パネル中段：数理解析ソフトSpiso-3Dを用いて上段の断層画像から樹状突起とスパインを検出した画像。(赤：樹状突起、橙：スパイン)

各パネル下段：中段の解析で検出した樹状突起とスパインを、3次元に再構成して表示した画像。(赤：樹状突起、黄：スパイン)

(A) 対照群 (B) E2を2時間作用させたE2作用群 (C) LIMKの阻害剤 (LIMKi) を30分作用させた後、E2を2時間作用させた群 (D) ERK/MAPKの阻害剤 (U0126) を30分作用させた後、E2を2時間作用させた群 (E) エストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) のアンタゴニスト (ICI) を30分作用させた後、E2を2時間作用させた群



(\*\* : P< 0.01 vs E2)

図3-5. E2と阻害剤による全スパイン密度変化 (2/2)

海馬スライスにE2単体、またはE2と阻害剤を共に作用させた際の全スパイン密度。E2はスパイン密度を増加させた。さらに、E2によるスパイン密度増加効果は、阻害剤によって抑制された。

LIMKi : LIMKの阻害剤、U0126 : ERK/MAPKの阻害剤、ICI : ERαのアンタゴニスト  
ラット数 : 3、スライス数 : 7、神経細胞数 : 14、樹状突起数 (n) : 28、スパイン数 : 1400-2000

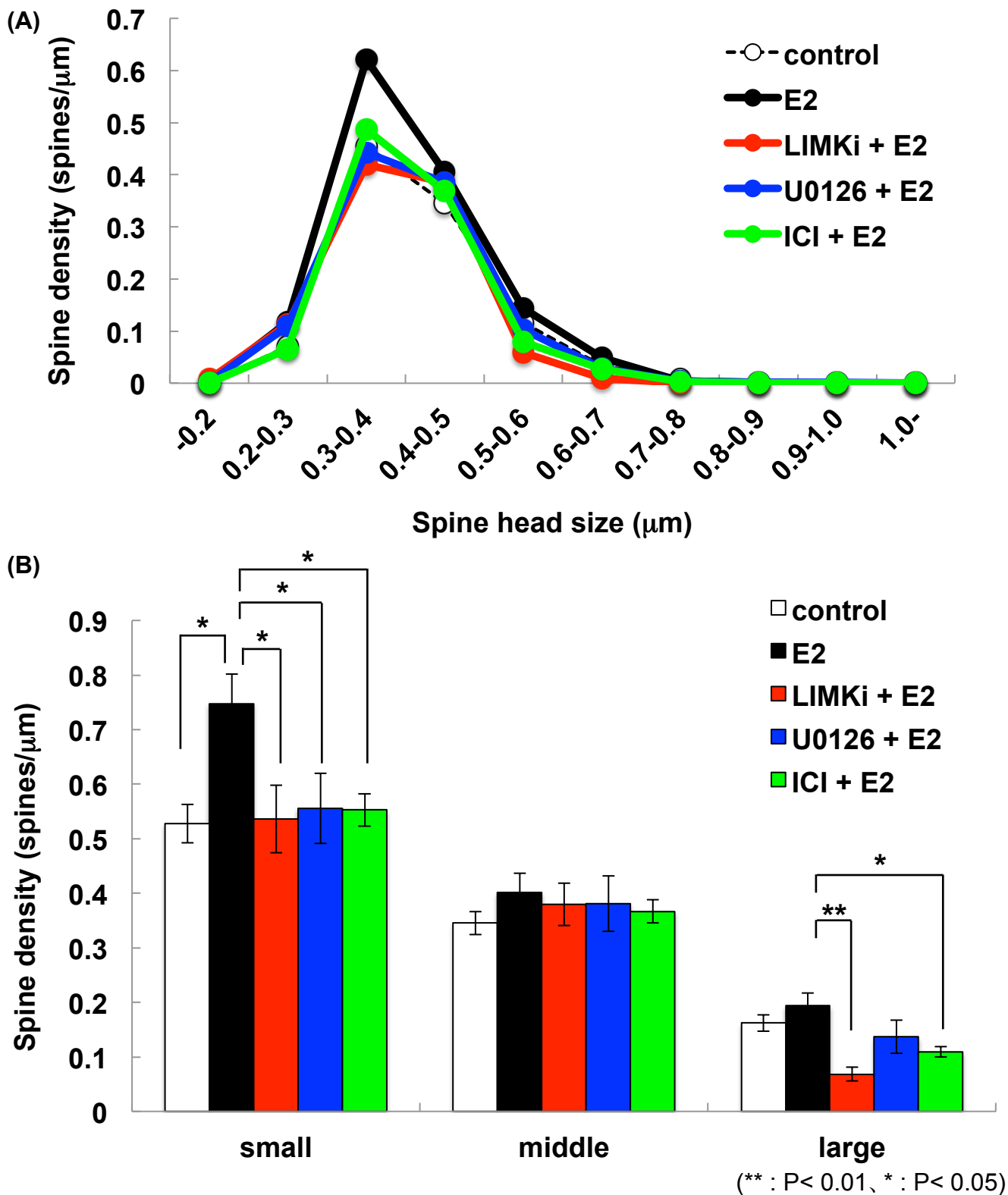


図3-6. E2と阻害剤によるスパイン頭部直径ごとの密度変化

(A) 海馬スライスにE2単体、またはE2と阻害剤を共に作用させた際のスパイン密度を、頭部直径ごとに表した分布。

LIMKi : LIMKの阻害剤、U0126 : ERK/MAPKの阻害剤、ICI : ERのアンタゴニスト

(B) スパイン密度を、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) に分類した際の密度のグラフ。

E2はsmall-headスパイン密度を増加させた。この増加は、阻害剤によって抑制された。

ラット数 : 3、スライス数 : 7、神経細胞数 : 14、樹状突起数 (n) : 28、スパイン数 : 1400-2000

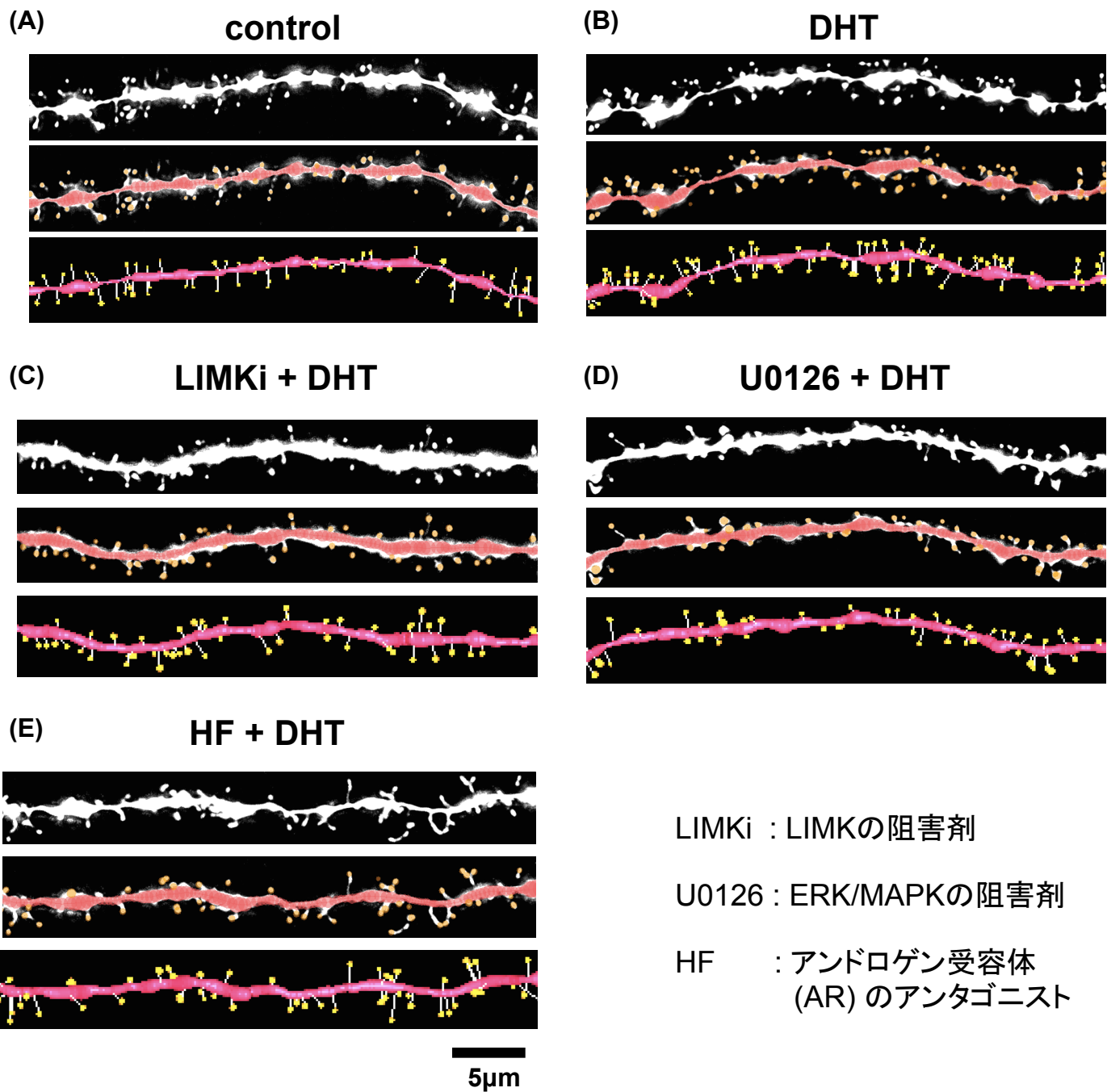


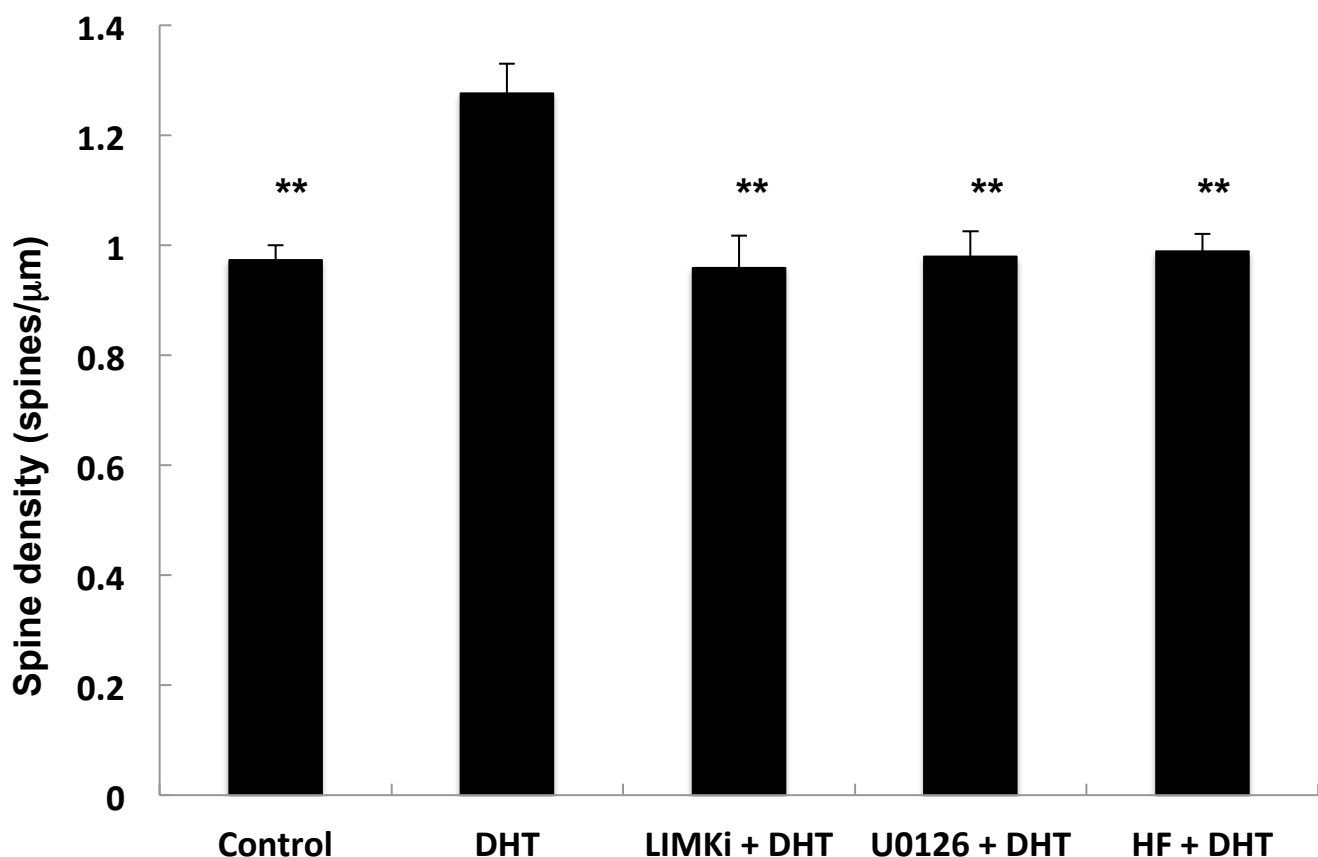
図3-7. ジヒドロテストステロン (DHT) と阻害剤によるスパインの密度変化(1/2)

各パネル上段：海馬CA1領域の錐体神経細胞の樹状突起を、蛍光色素 (LuciferYellow) で可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で断層撮影した画像をXY平面に投射した画像。

各パネル中段：数理解析ソフトSpiso-3Dを用いて上段の断層画像から樹状突起とスパインを検出した画像。(赤：樹状突起、橙：スパイン)

各パネル下段：中段の解析で検出した樹状突起とスパインを、3次元に再構成して表示した画像。(赤：樹状突起、黄：スパイン)

(A) 対照群 (B) DHTを2時間作用させたDHT作用群 (C) LIMKの阻害剤 (LIMKi) を30分作用させた後、DHTを2時間作用させた群 (D) ERK/MAPKの阻害剤 (U0126) を30分作用させた後、DHTを2時間作用させた群 (E) アンドロゲン受容体 (AR) のアンタゴニスト (HF) を30分作用させた後、DHTを2時間作用させた群



(\*\* : P< 0.01 vs DHT)

図3-8. DHTと阻害剤による全スパイン密度変化 (2/2)

海馬スライスにDHT単体、またはDHTと阻害剤を共に作用させた際の全スパイン密度。DHTはスパイン密度を増加させた。さらに、DHTによるスパイン密度増加効果は、阻害剤によって抑制された。

LIMKi : LIMKの阻害剤、U0126 : ERK/MAPKの阻害剤、HF : ARのアンタゴニスト  
ラット数 : 3、スライス数 : 8、神経細胞数 : 16、樹状突起数 (n) : 32、スパイン数 : 1700-2000



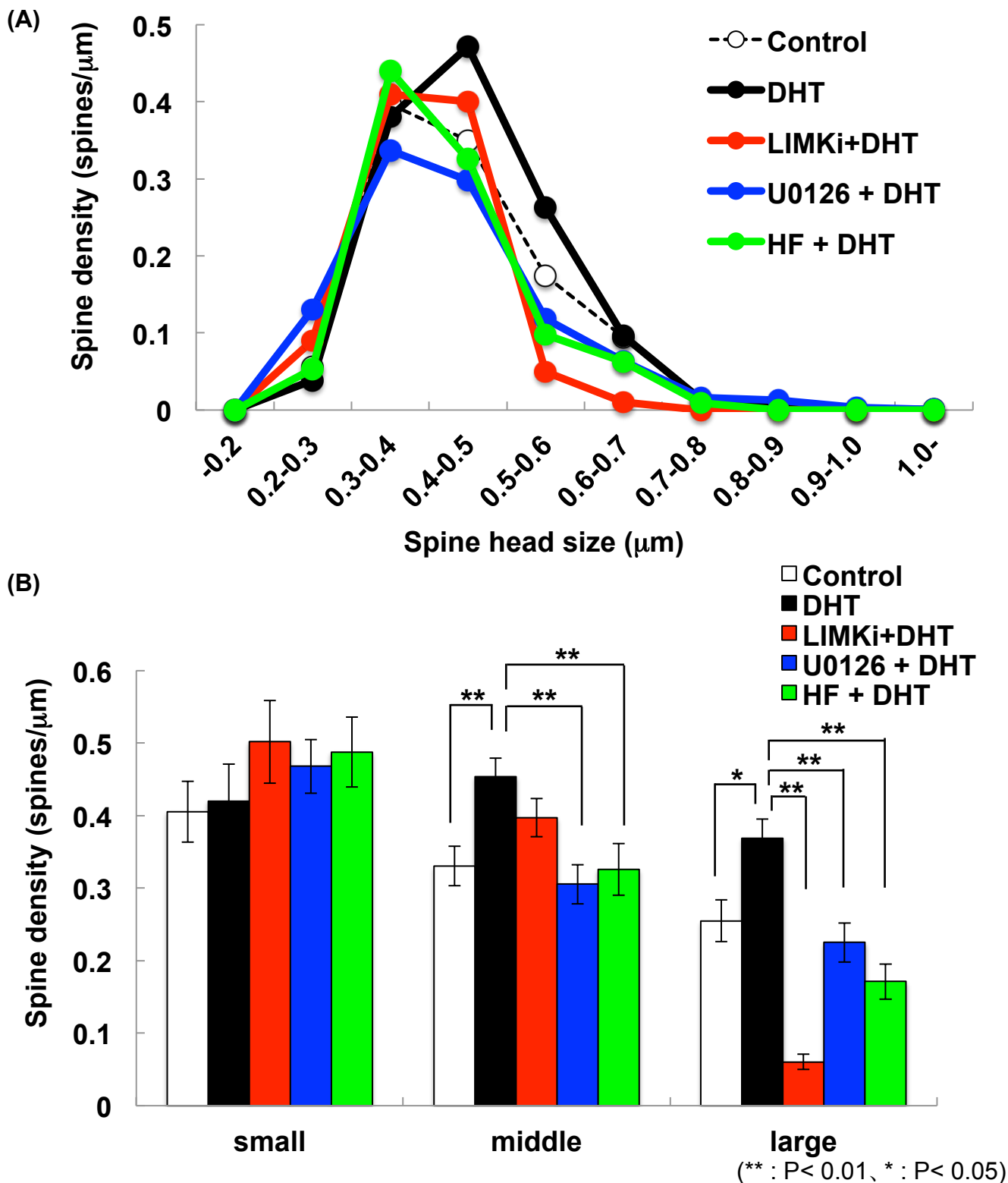


図3-9. DHTと阻害剤によるスパイン頭部直径ごとの密度変化

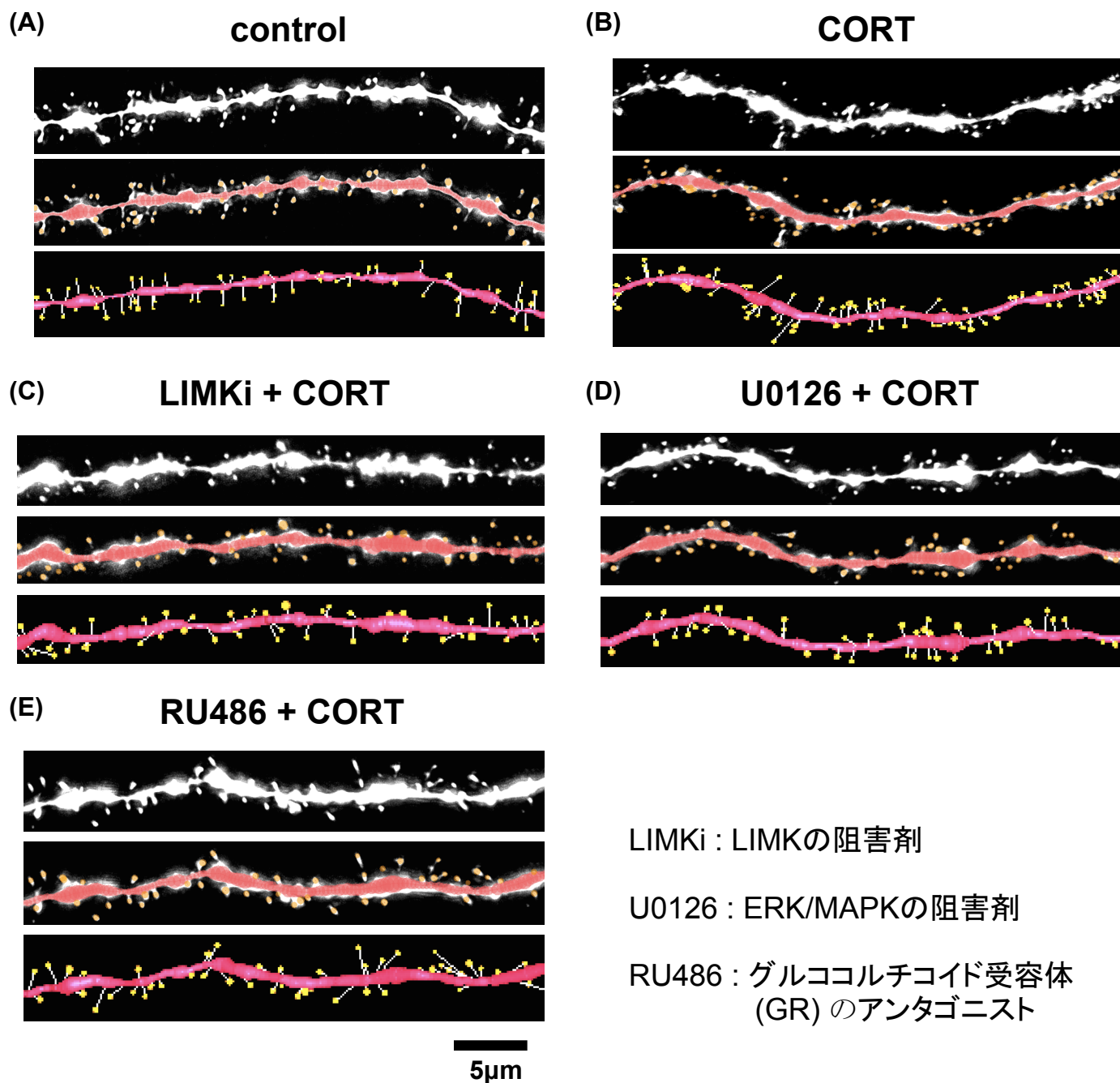
(A) 海馬スライスにDHT単体、またはDHTと阻害剤を共に作用させた際のスパイン密度を、頭部直径ごとに表した分布。

LIMKi : LIMKの阻害剤、U0126 : ERK/MAPKの阻害剤、HF : ARのアンタゴニスト

(B) スパイン密度を、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) に分類した際の密度のグラフ。

DHTはmiddle-headスパインとlarge-head-headスパイン密度を増加させた。この増加は、阻害剤によって抑制された。

ラット数 : 3、スライス数 : 8、神経細胞数 : 16、樹状突起数 (n) : 32、スパイン数 : 1700-2000



**図3-10. コルチコステロン (CORT) と阻害剤によるスパインの密度変化 (1/2)**

各パネル上段：海馬CA1領域の錐体神経細胞の樹状突起を、蛍光色素 (LuciferYellow) で可視化し、共焦点レーザー顕微鏡で断層撮影した画像をXY平面に投射した画像。

各パネル中段：数理解析ソフトSpiso-3Dを用いて上段の断層画像から樹状突起とスパインを検出した画像。(赤：樹状突起、橙：スパイン)

各パネル下段：中段の解析で検出した樹状突起とスパインを、3次元に再構成して表示した画像。(赤：樹状突起、黄：スパイン)

(A) 対照群 (B) CORT を2時間作用させたCORT作用群 (C) LIMK の阻害剤 (LIMKi) を30分作用させた後、CORT を2時間作用させた群 (D) ERK/MAPK の阻害剤 (U0126) を30分作用させた後、CORT を2時間作用させた群 (E) グルココルチコイド受容体 (GR) のアンタゴニスト (RU486) を30分作用させた後、CORT を2時間作用させた群

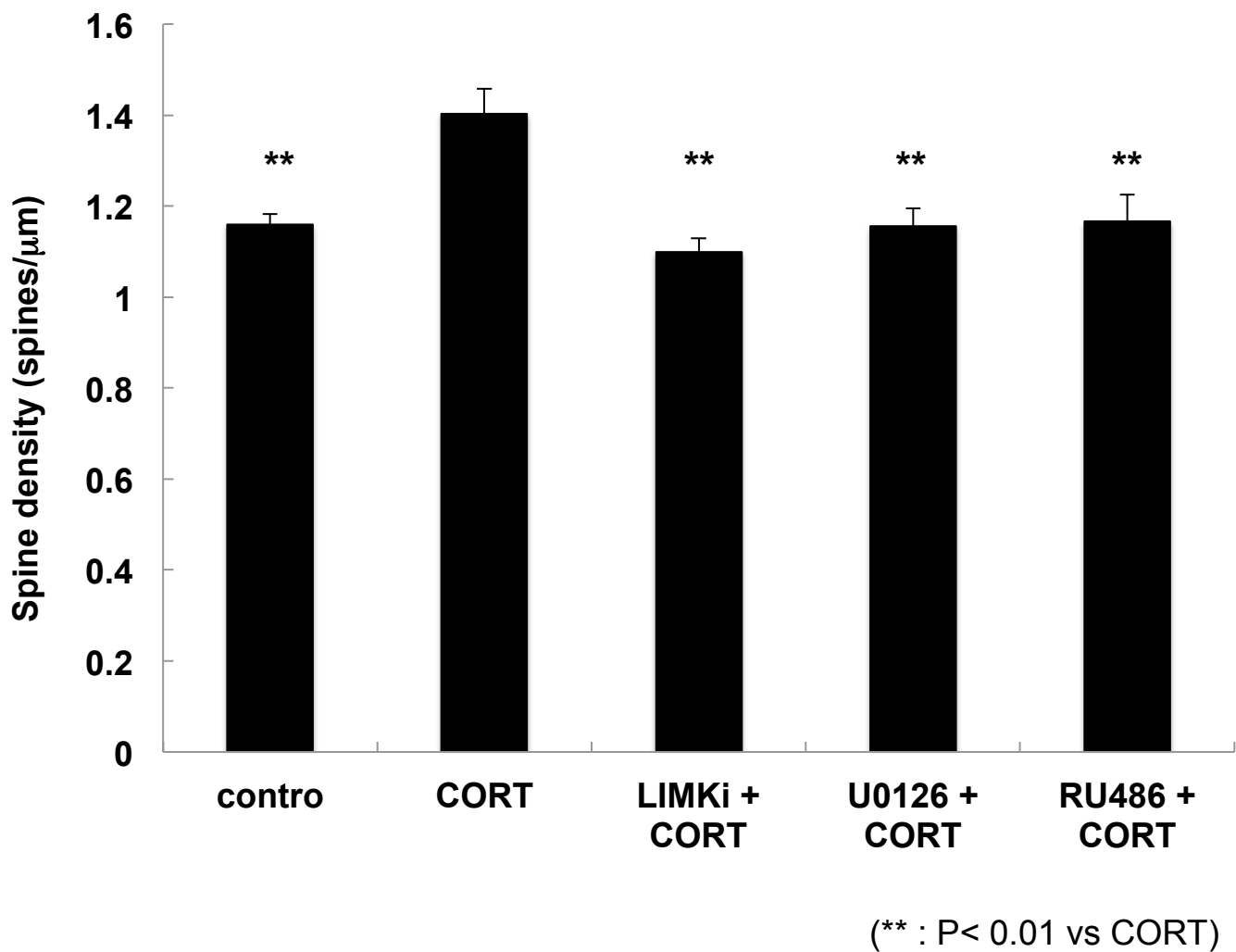
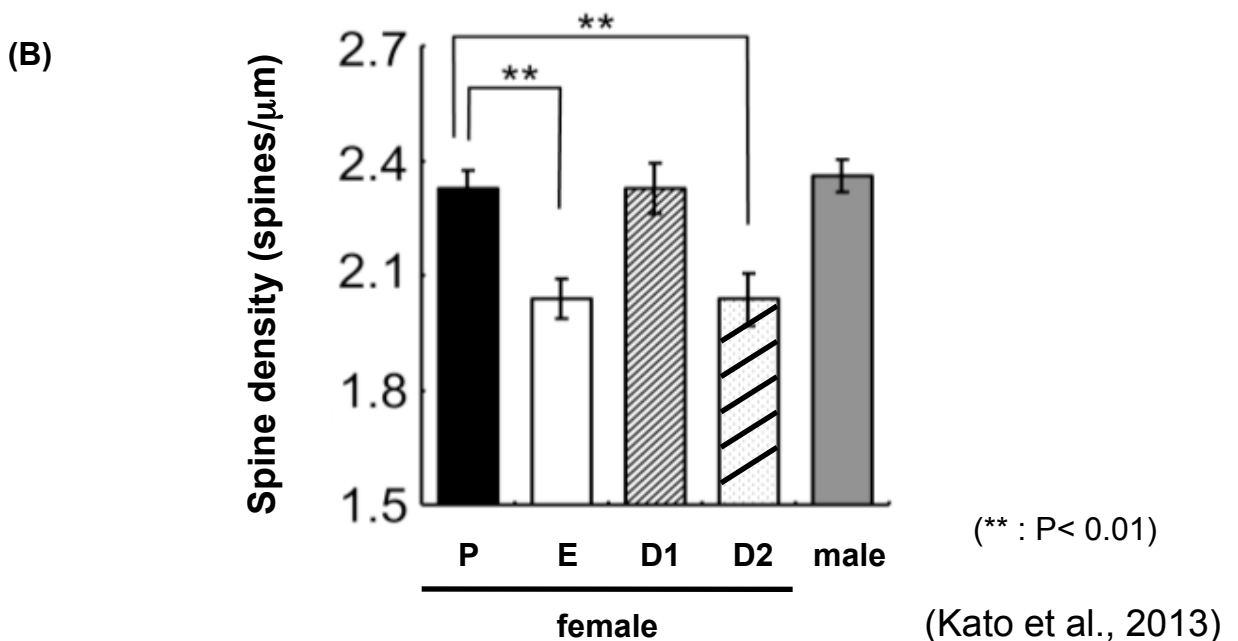
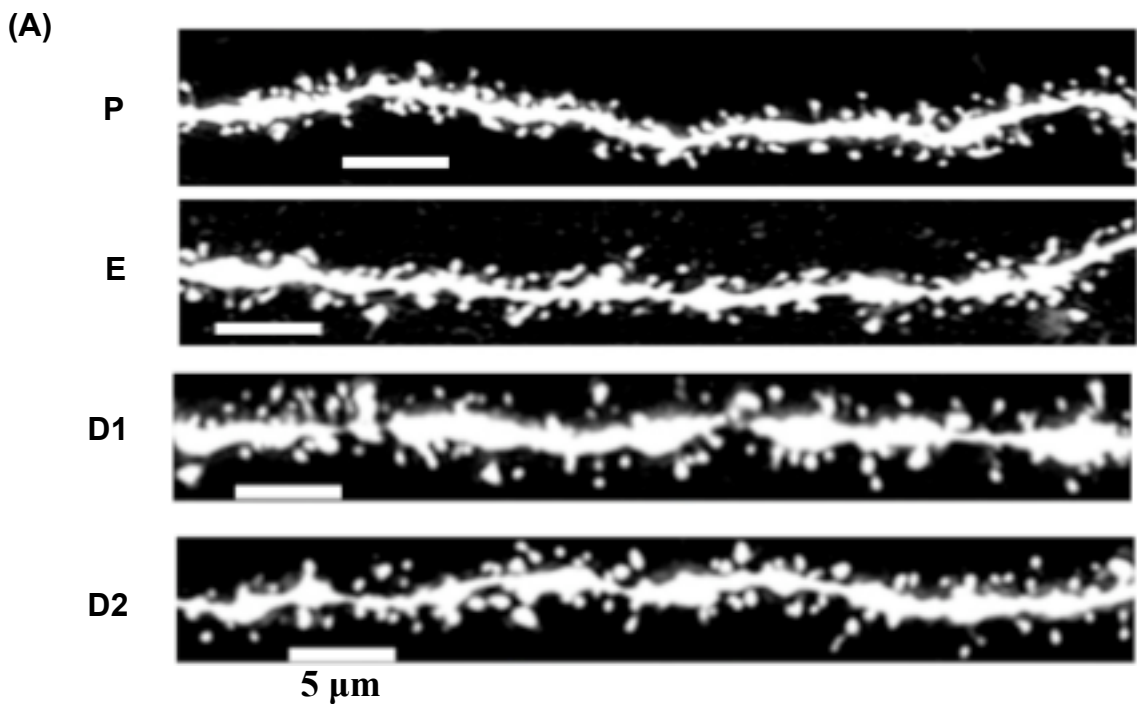


図3-11. CORTと阻害剤による全スパイン密度変化 (2/2)

海馬スライスに CORT 単体、または CORT と阻害剤を共に作用させた際の全スパイン密度。CORT はスパイン密度を増加させた。さらに、CORT によるスパイン密度増加効果は、阻害剤によって抑制された。

LIMKi : LIMK の阻害剤、U0126 : ERK/MAPK の阻害剤、RU486 : GR のアンタゴニスト  
ラット数 : 3、スライス数 : 7、神経細胞数 : 16、樹状突起数 (n) : 35、スパイン数 : 1800-2100



### 図3-12. メスラットの性周期に伴う海馬CA1領域の全スパイン密度変動

(A) 各性周期ステージにおけるメス海馬CA1グルタミン酸神経細胞の樹状突起スパインをLucifer Yellowで蛍光標識し、共焦点顕微鏡で断層撮影した画像をXY平面に投射した画像。

(B) 各性周期ステージにおけるメス海馬CA1グルタミン酸神経細胞のスパイン密度の変動。PからEにかけてスパイン密度が減少し、D1でスパイン密度が再び増加、D2で減少、そしてPで増加というように、周期的に変動した。(\*\* :  $p < 0.01$ )

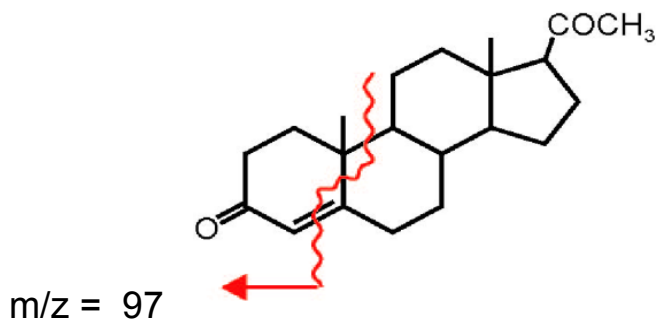
P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2

ラット数 : 3、スライス数 : 6、神経細胞数 : 12、樹状突起数 (n) : 24、スパイン数 : 3000-4000

(A)

PROG

$m/z = 315$



(B)

E2-3-PFBz-17-picolinoyl

$m/z = 558$

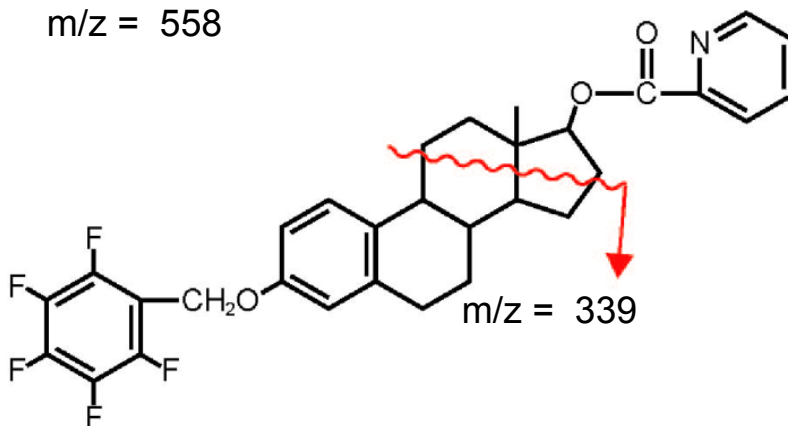


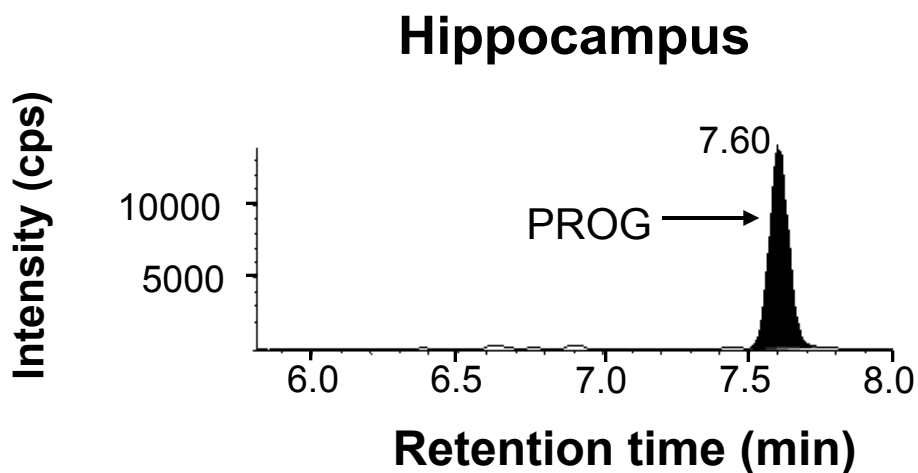
図3-13. 女性ホルモン(誘導体)の開裂パターンと $m/z$ 値変化

(A) PROGの構造式と $m/z$ 値。

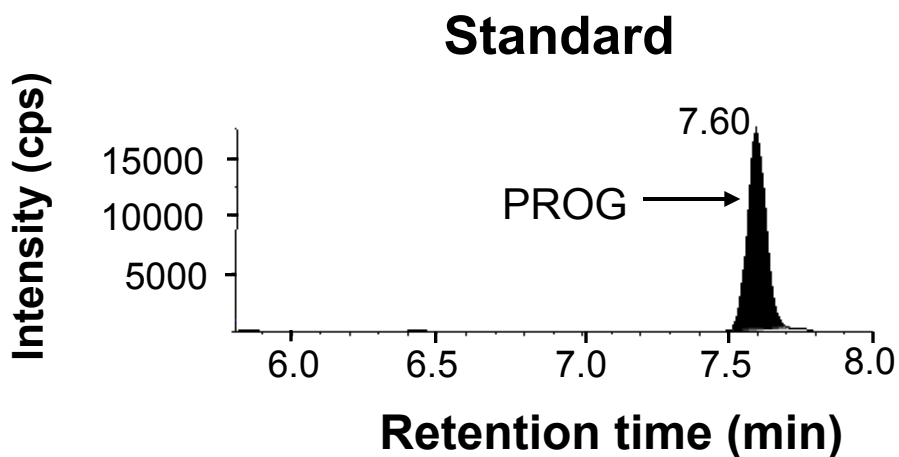
開裂箇所を波線で、フラグメントイオン部分を矢印で示した。

(B) E2の誘導体 (estradiol-3-pentafluorobenzyl-17-picolinoyl) の構造式と $m/z$ 値。

(A)



(B)



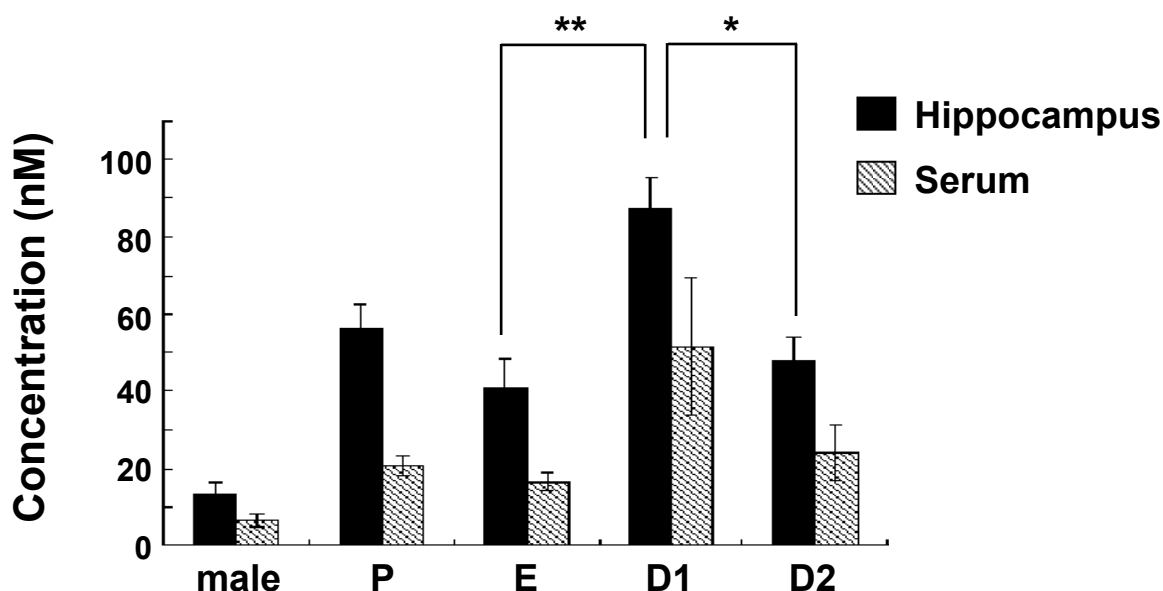
**図3-14. プログステロン (PROG) のマスククロマトグラム**

LC-MS/MSにおけるPROGの代表的なマスククロマトグラム。マスククロマトグラムは、特定の $m/z$ 値を持つ物質のみを測定し、その保持時間(分)を横軸、測定された物質の量(カウント数/秒)を縦軸にプロットしたものである。黒く塗られたピークがPROGを表している。

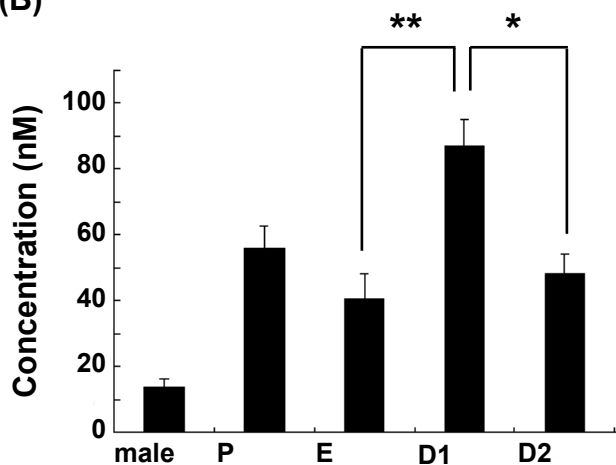
(A) 海馬サンプルのマスククロマトグラム。保持時間7.60分にPROGのピークが観測され、標準品のピークの保持時間と一致した。

(B) 標準品のマスククロマトグラム。

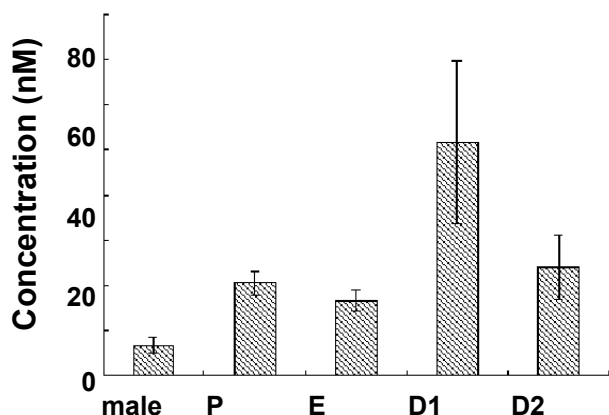
(A)



(B)



(C)



(\*\* :  $P < 0.01$ , \* :  $P < 0.05$ )

### 図3-15. プロゲステロン (PROG) の海馬内・血中濃度比較

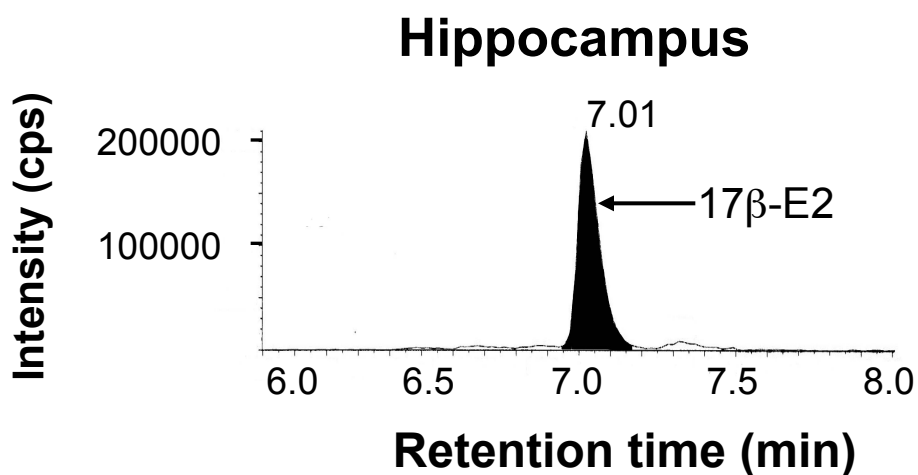
(A) LC-MS/MSを用いて、各性周期ステージで測定した海馬内と血中のPROG濃度 ( $n = 3 \sim 5$ )。オスやメスの全ての性周期ステージにおいて、海馬内のPROG濃度が血中よりも2倍程度高かった。海馬内・血中ともに性周期に伴う明確な濃度変動が見られ、2つの変動は相関を示した。また、オスよりもメスの方が高い濃度を示した。

(B) 海馬内のPROG濃度。EからD1にかけて増加し、D1からD2にかけて減少した。

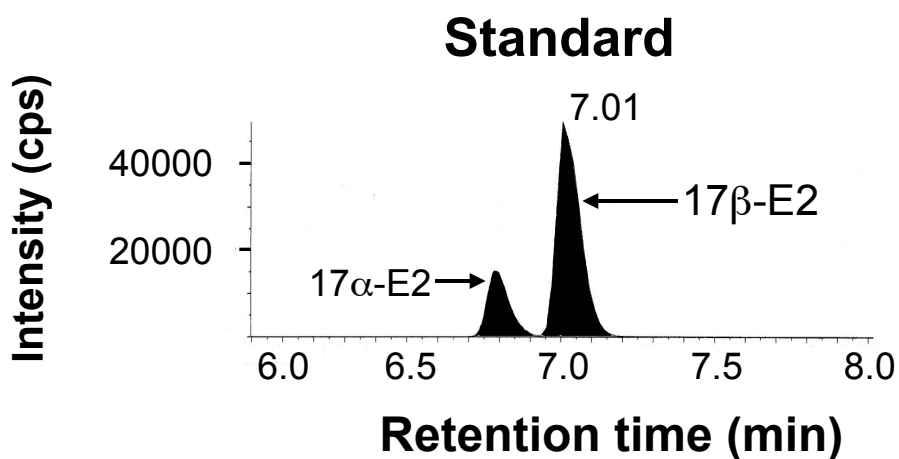
(C) 血中のPROG濃度。D1で最も高い濃度を示した。(\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ )

P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2

(A)



(B)



**図3-16. エストラジオール (E2) のマスキロマトグラム**

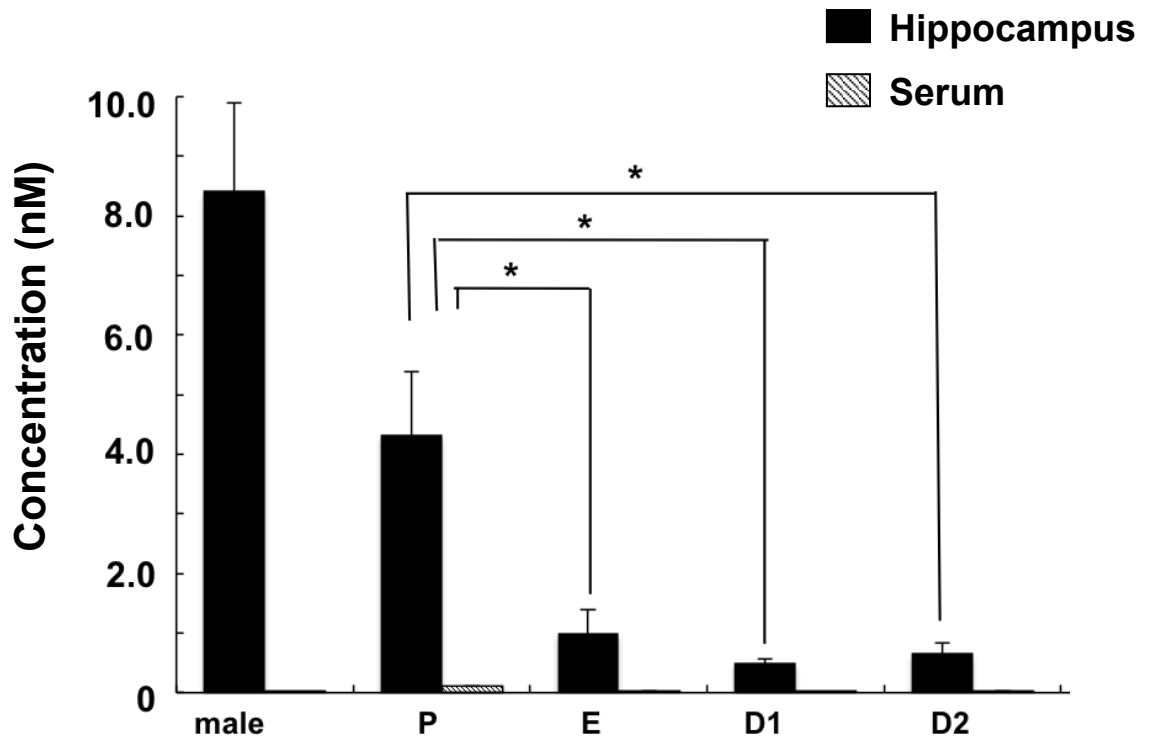
LC-MS/MSにおけるE2の代表的なマスキロマトグラム。黒く塗られたピークがE2を表している。

(A) 海馬サンプルのマスキロマトグラム。保持時間7.01分にE2のピークが観測され、標準品のピークの保持時間と一致した。

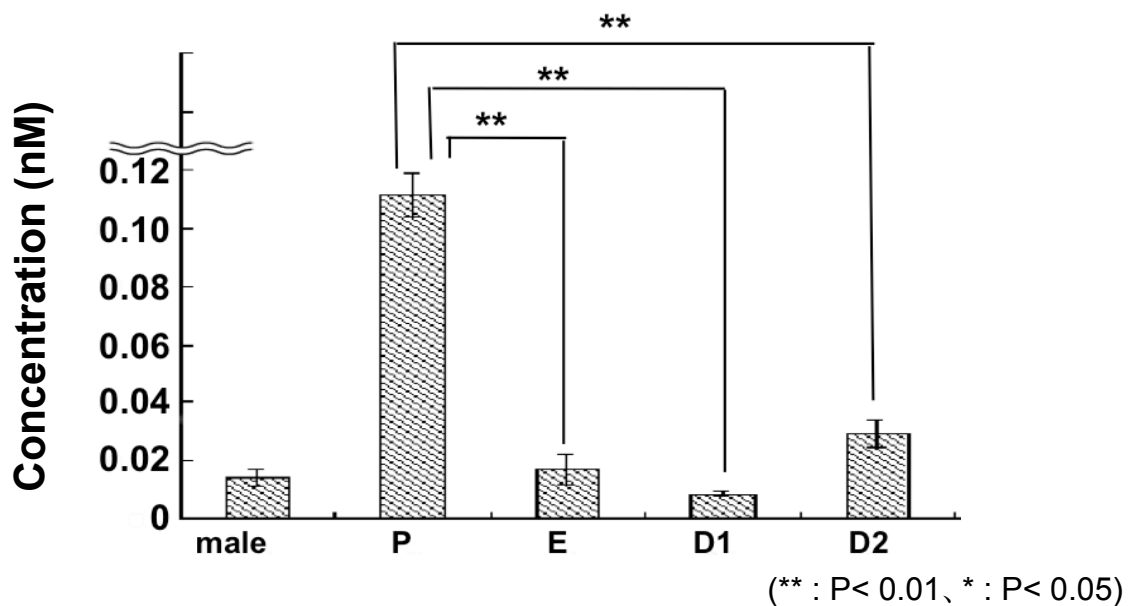
(B) 標準品のマスキロマトグラム。



(A)



(B)

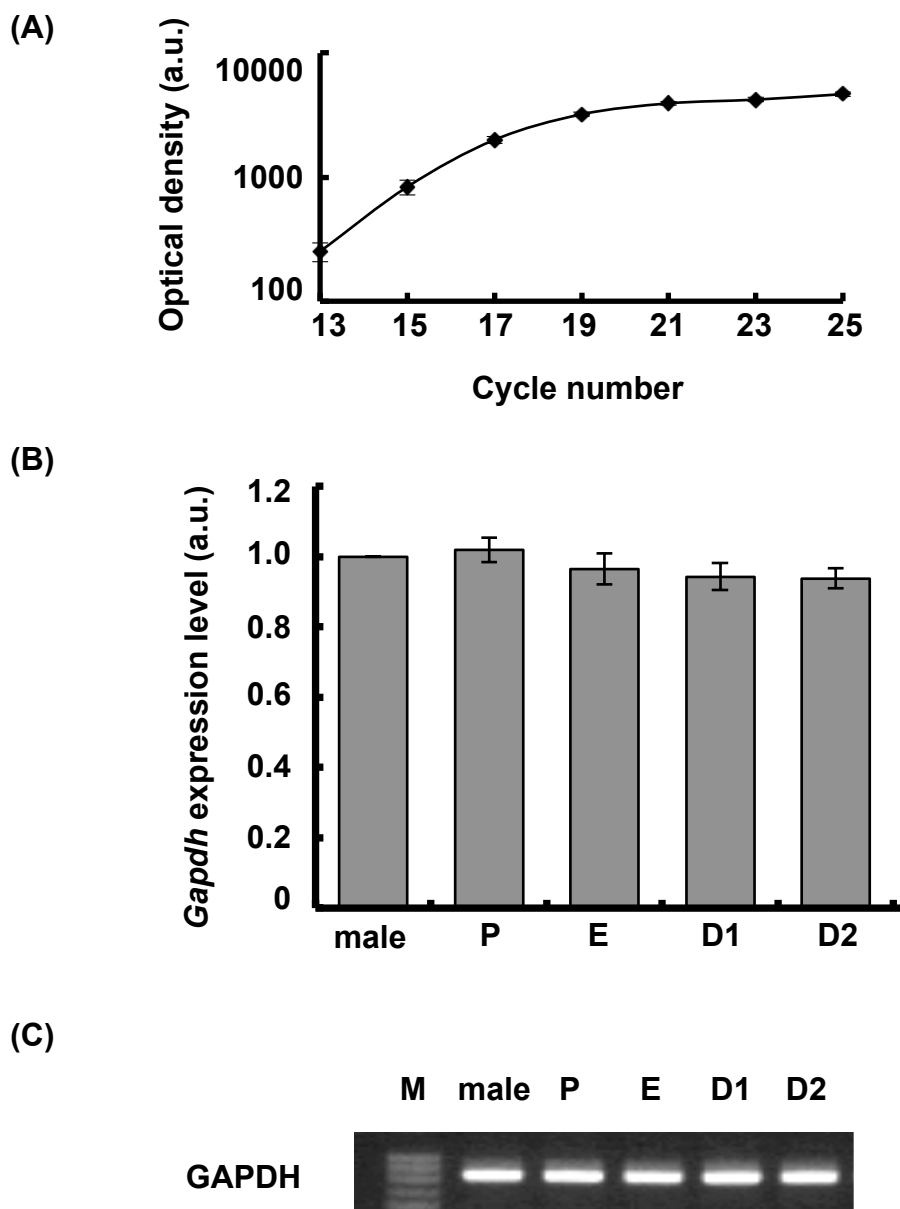
(\*\* :  $P < 0.01$ , \* :  $P < 0.05$ )

### 図3-17. エストラジオール (E2) の海馬内・血中濃度比較

(A) LC-MS/MSを用いて、各性周期ステージで測定した海馬内と血中のE2濃度 ( $n = 3 \sim 6$ )。海馬内のE2は、血中の10~100倍程度という非常に高い濃度で存在していた。海馬内・血中ともに、性周期に伴う大きな濃度変動が見られた。具体的には、PからEにかけての大きく減少し、D2からPにかけて大きく上昇した。オスとの比較をすると、オスの方がメスよりも海馬内E2濃度が高かった。

(B) 血中のE2濃度。性周期に伴う大きな濃度変動が見られ、PからEにかけての大きく減少し、D2からPにかけて大きな増加が見られた。 (\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ )

P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2



**図3-18. 海馬内 *Gapdh* 発現量の比較**

GAPDHのmRNAの発現解析結果。

(A) PCR産物量の増幅プロット図。13～21サイクルまで指数増幅し、23サイクルから飽和状態に達した。

(B) GAPDHのmRNAの発現解析結果。mean  $\pm$  SEMで表示している。各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2

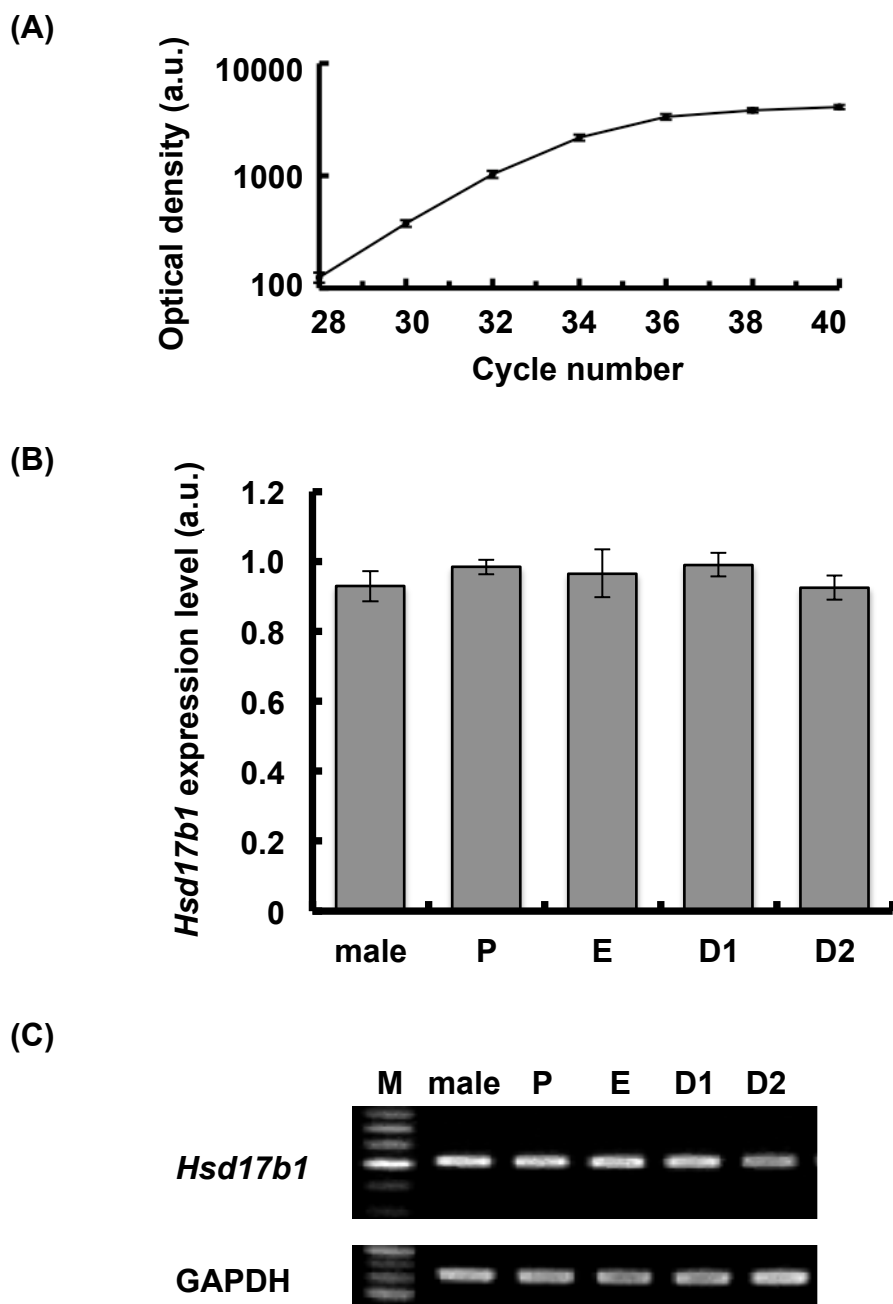


図3-19. 海馬内 *Hsd17b1* 発現量の比較

17 $\beta$ -HSD1のmRNAの発現解析結果。

(A) PCR産物量の増幅プロット図。28ー34サイクルまで指数増幅し、36サイクルから飽和状態に達した。

(B) 17 $\beta$ -HSD1のmRNAの発現解析の結果。mean  $\pm$  SEMで表示している。各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2

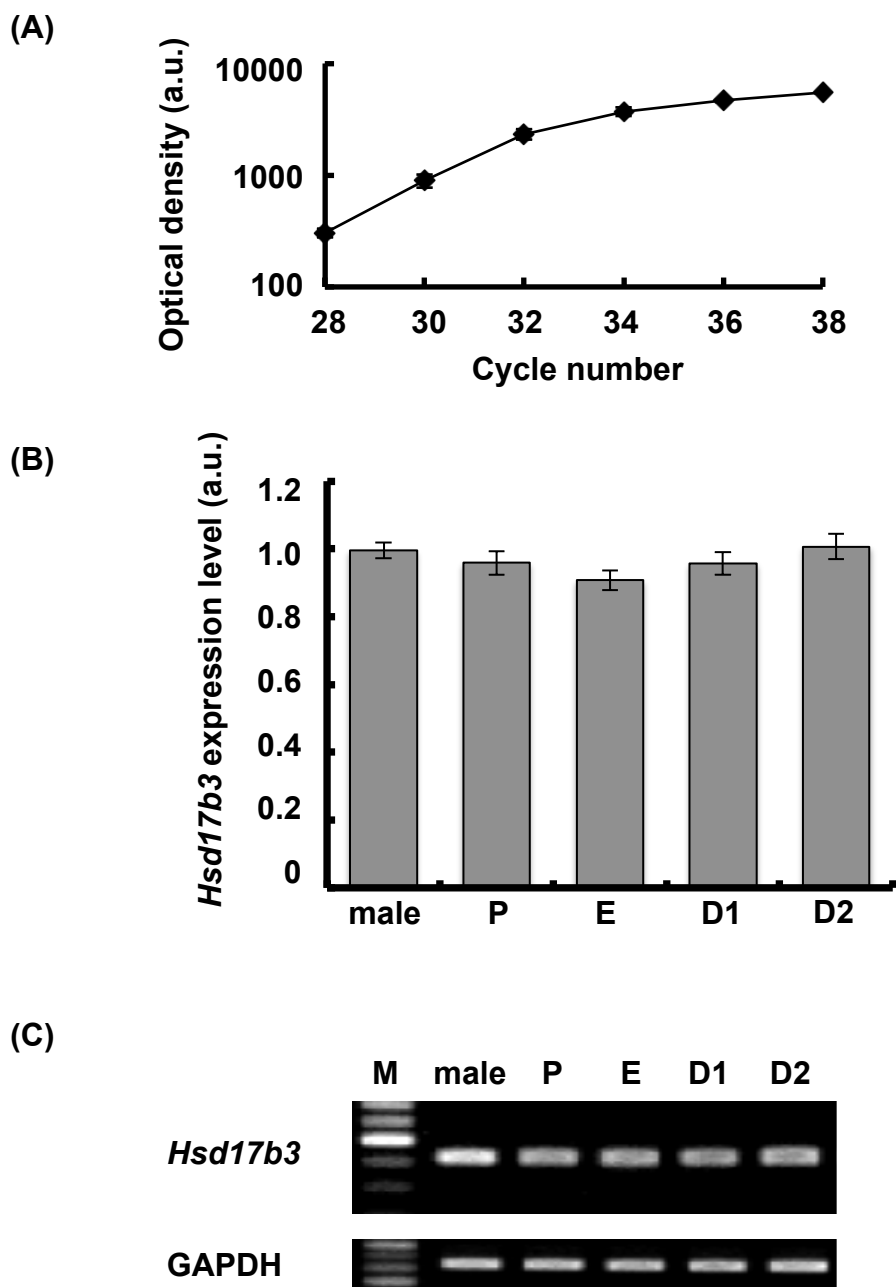


図3-20. 海馬内 *Hsd17b3* 発現量の比較

17 $\beta$ -HSD3のmRNAの発現解析結果。

(A) PCR産物量の増幅プロット図。28～34サイクルまで指数増幅し、36サイクルから飽和状態に達した。

(B) 17 $\beta$ -HSD3のmRNAの発現解析結果。mean  $\pm$  SEMで表示している。各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2

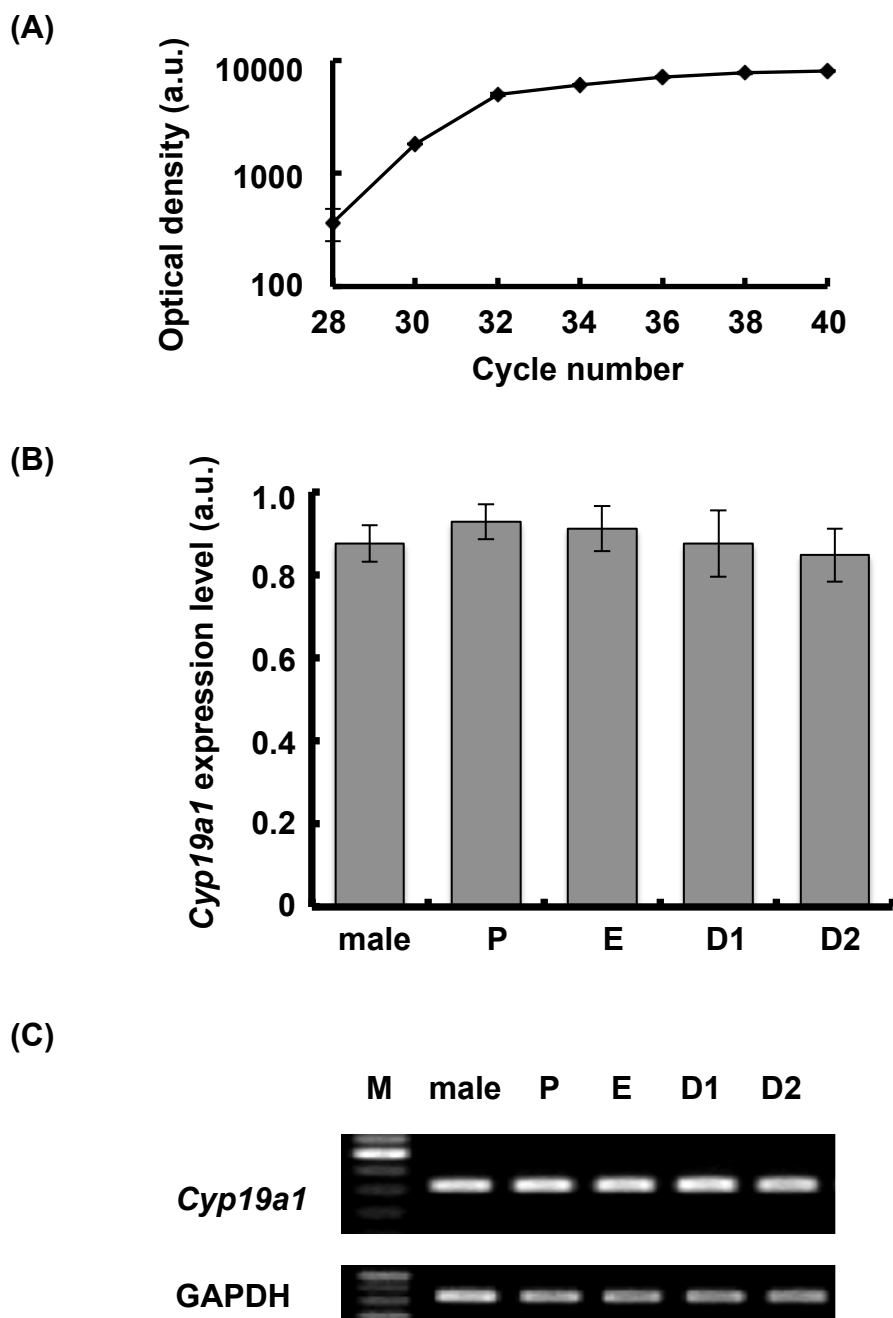


図3-21. 海馬内 *Cyp19a1* 発現量の比較

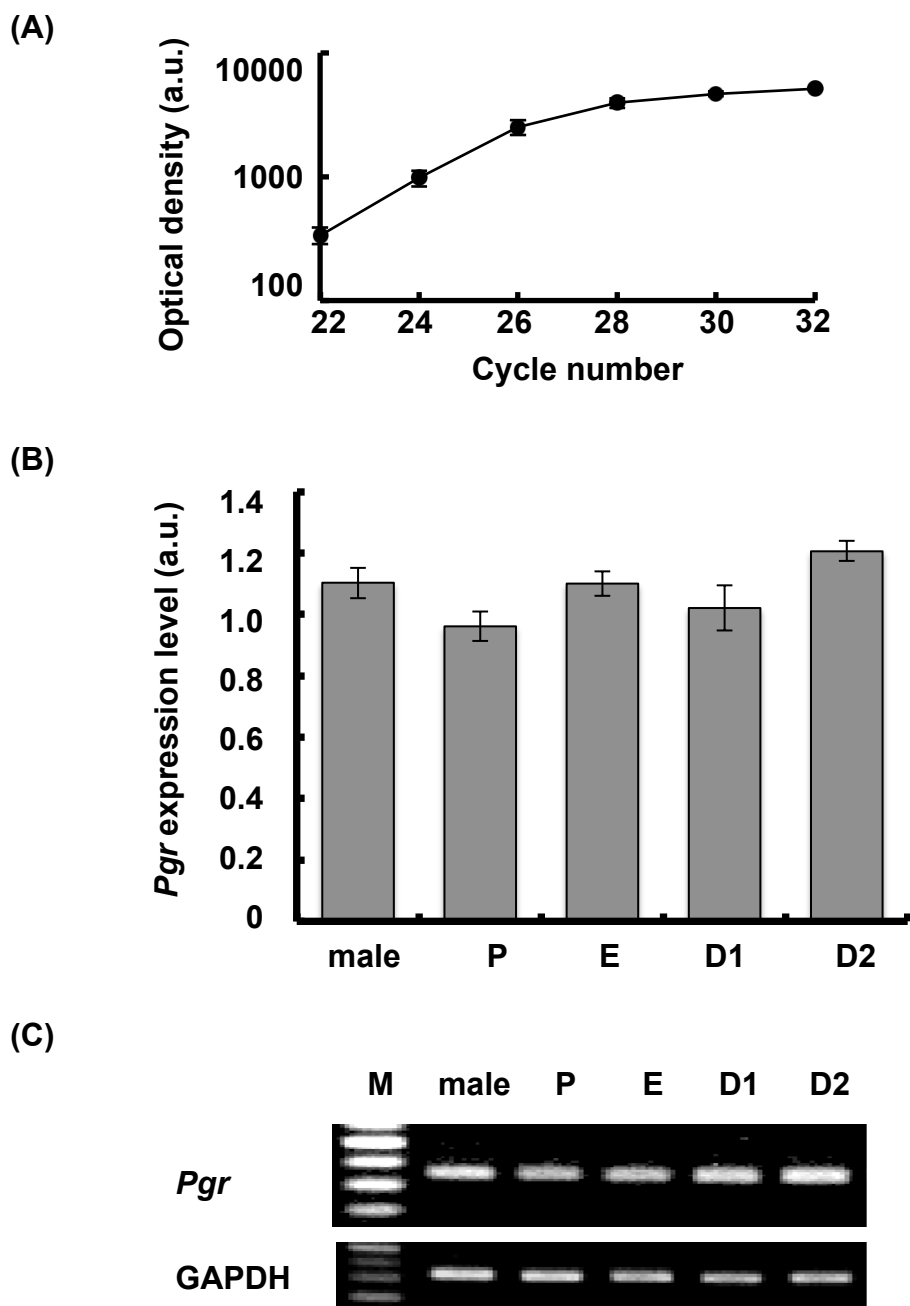
P450(arom) のmRNAの発現解析結果。

(A) PCR産物量の増幅プロット図。28～34サイクルまで指数増幅し、36サイクルから飽和状態に達した。

(B) P450(arom) のmRNAの発現解析結果。mean  $\pm$  SEMで表示している。各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2



### 図3-22. 海馬内 *Pgr* 発現量の比較

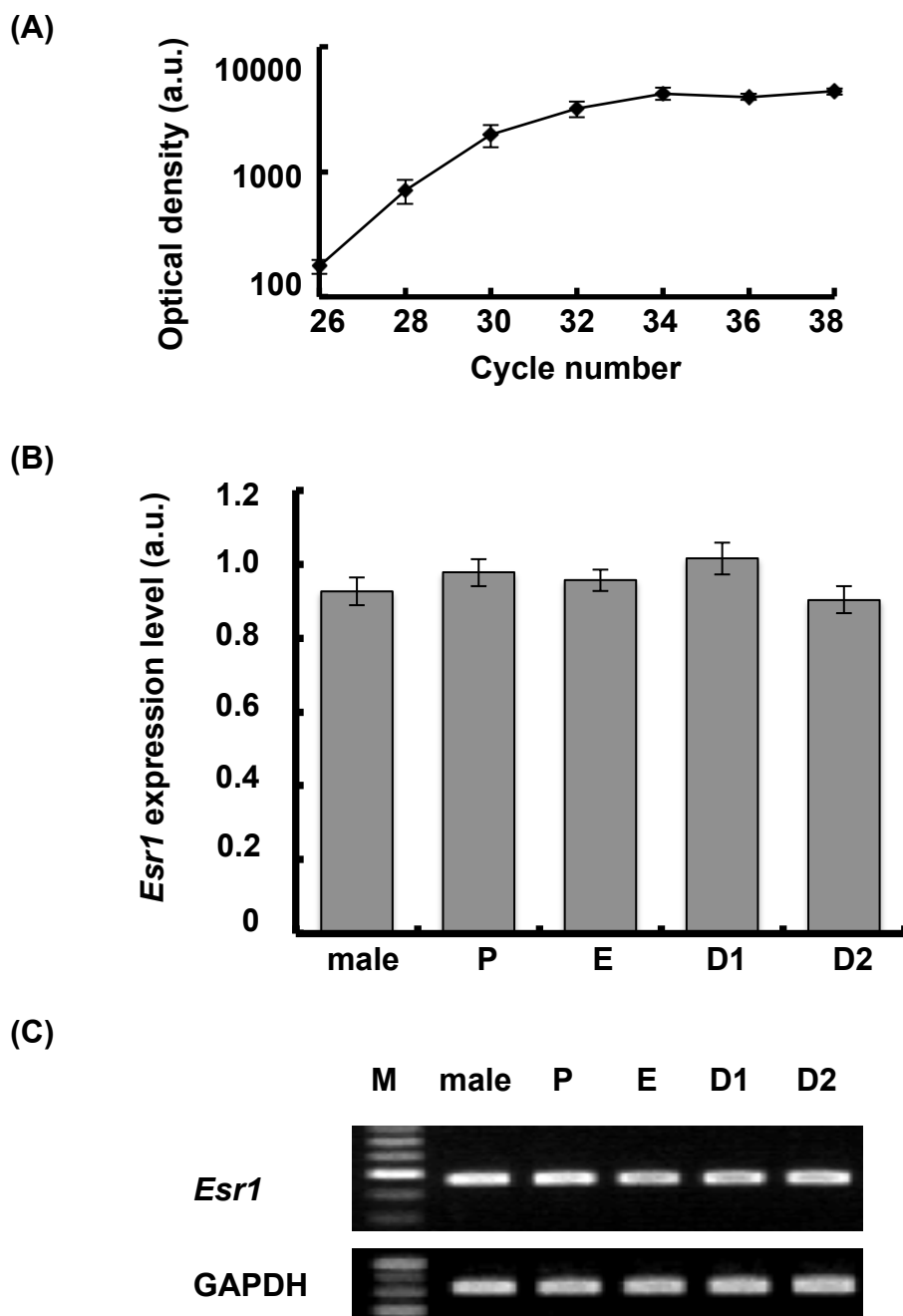
PRのmRNAの発現解析結果。

(A) PCR産物量の増幅プロット図。22～26サイクルまで指数増幅し、28サイクルから飽和状態に達した。

(B) PRのmRNAの発現解析結果。mean ± SEMで示した。各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2



### 図3-23. 海馬内 *Esr1* 発現量の比較

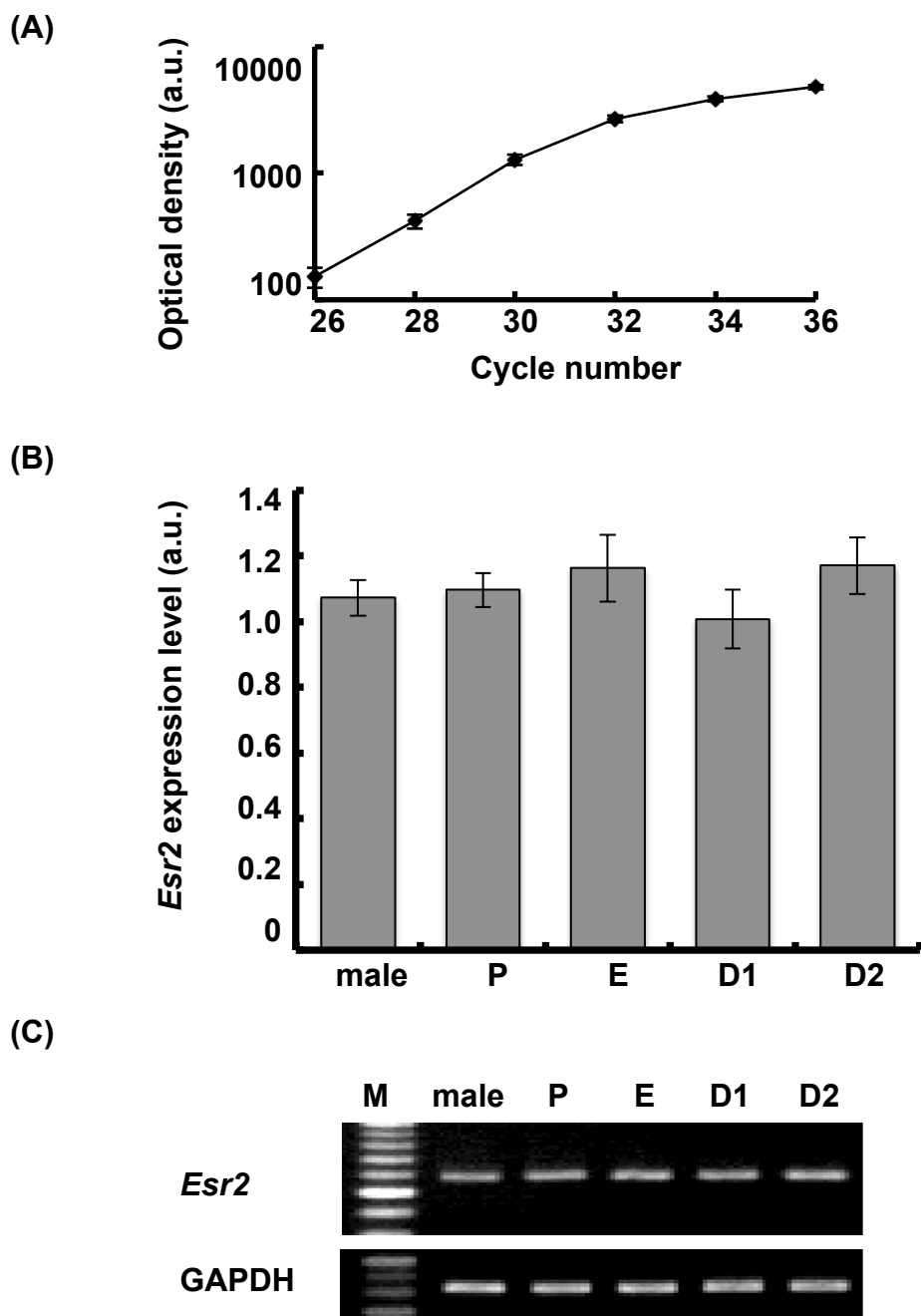
ER $\alpha$ のmRNAの発現解析結果。

(A) PCR産物量の増幅プロット図。26～30サイクルまで指数増幅し、32サイクルから飽和状態に達した。

(B) ER $\alpha$ のmRNAの発現解析結果。mean  $\pm$  SEMで表示している。各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2



### 図3-24. 海馬内 *Esr2* 発現量の比較

ER $\beta$ のmRNAの発現解析結果。

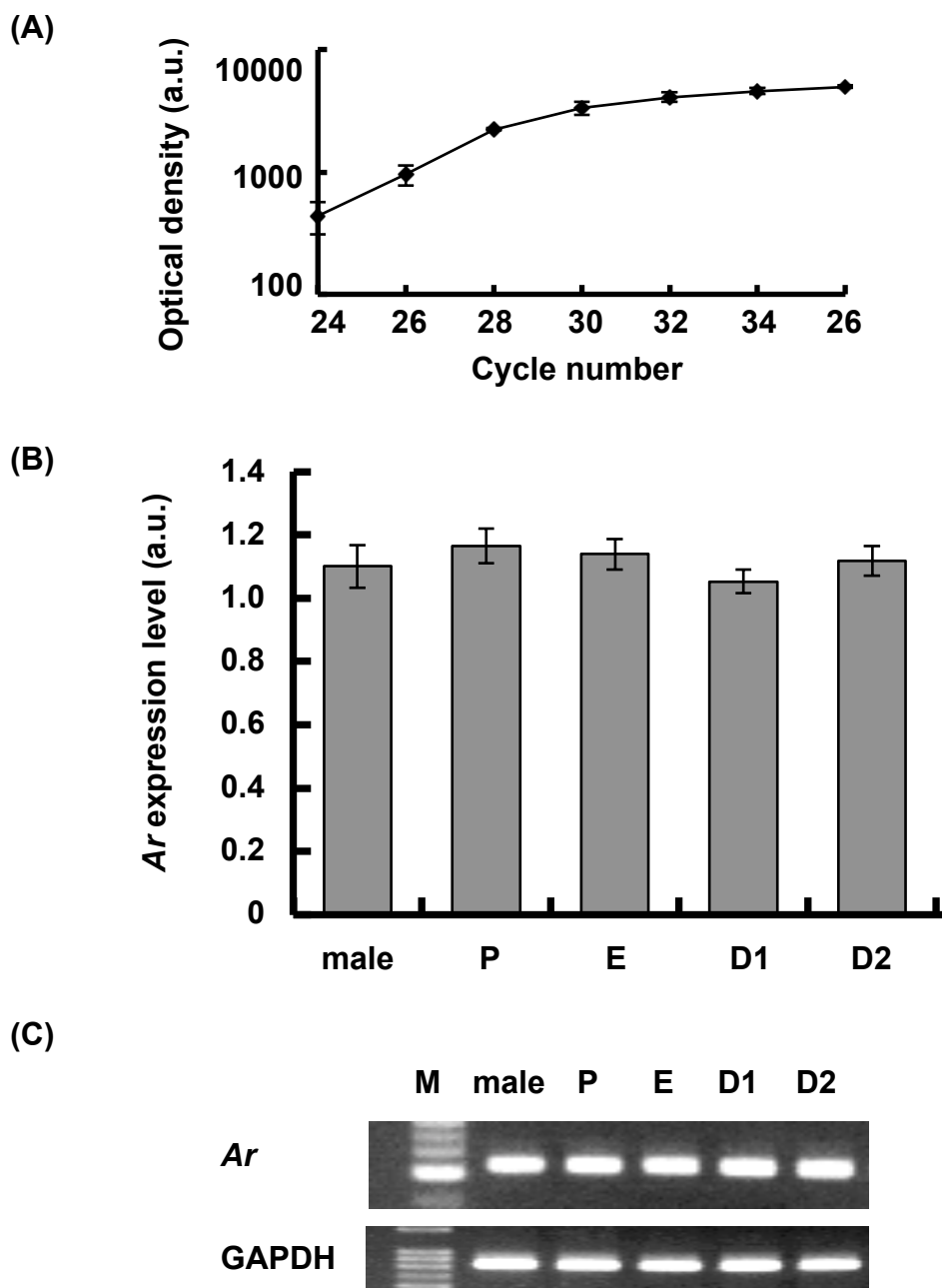
(A) PCR産物量の増幅プロット図。26～30サイクルまで指数増幅し、32サイクルから飽和状態に達した。

(B) ER $\beta$ のmRNAの発現解析結果。mean  $\pm$  SEMで示した各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2





### 図3-25. 海馬内 *Ar* 発現量の比較

ARのmRNAの発現解析結果。

(A) PCR産物量の増幅プロット図。24～28サイクルまで指数増幅し、30サイクルから飽和状態に達した。

(B) ARのmRNAの発現解析結果。mean  $\pm$  SEMで示した。各性周期ステージにおける発現量に有意な差は無く、オスとの性差も見られなかった。

(C) PCR産物の代表的な電気泳動画像。

M: marker、P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2

## 第4章 考察

### 4-1. 結果のまとめと本研究の意義

本研究では、オスラットの生きた海馬スライスを用いて、神経スパインの可視化解析を行い、性ホルモンによるスパイン密度の制御の解明に迫った。さらに、メスラットの性周期と海馬神経スパインの周期的な変動の解析、及び海馬内の性ホルモン濃度測定、海馬内の性ホルモン合成酵素及び性ホルモン受容体の mRNA 発現解析を行なった。その結果のまとめと意義を論じる。

#### A 性ホルモンによるオスの海馬神経スパインへの短期効果

(1-1) 生きた急性海馬スライスに、プロゲステロン (PROG)、エストラジオール (E2) 及びジヒドロテストステロン (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。

これまで、E2, DHT によるスパイン密度の制御は、遺伝子転写を介した遅い経路 (12-14 時間かかる) が多く研究されてきた。しかし、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。

ここで、本研究で用いた海馬スライスは、ACSF 中で2時間インキュベートしている間に、ほとんどの性ホルモンが洗い流され、約 0.5nM まで減少している。したがって、本研究では性ホルモンが枯渇した状態の海馬スライスに、外から性ホルモンを作用させることによって、生理条件下に近い濃度に回復させて、スパイン密度の解析を行なったと言える。

(1-2) 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) に分類して解析した。その結果、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。

具体的には、PROG は small-head スパインと middle-head スパインの密度を増加させた。そのうち、small-head スパイン密度の増加は、U0126 (ERK/MAPK の阻害剤) によって抑制され、middle-head スパイン密度の増加は、LIMKi (LIMK の阻害剤) と、U0126 によって抑制された。

E2 は small-head スパイン密度を大きく増加させた。そして、small-head スパイン密度の増加は、LIMKi と U0126 によって抑制された。さらに、LIMKi を作用させた場合には、large-head スパインの密度が大きく減少することも明らかとなった。

DHT は、middle-head スパインと large-head スパインの密度を増加させた。そのうち、middle-head スパイン密度の増加は、U0126 によって抑制され、large-head スパイン密度の増加は、LIMKi と U0126 によって抑制された。このとき、LIMKi を作用させた際には、large-head スパインの密度が大きく減少した。

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によって、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) 性ホルモンの核内受容体 (PR, ER $\alpha$ , 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 $\alpha$ 、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 $\alpha$ , AR は、タンパク質としては核内受容体と同じであるが、本研究ではこれらの受容体が2時間以内の早い作用を担うため、核へ移行することで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 (Mitterling et al., 2010; Waters et al., 2008)、ER $\alpha$  (Mukai et al., 2007)、AR (Tabori et al., 2005) が存在することが確認されている。さらに、スパインを含むシナプス後肥厚 (PSD: postsynaptic density) 分画を用いたウェスタンブロットによる先行研究からも、海馬 CA1 領域における神経スパインに ER $\alpha$  (Mukai et al., 2007) と AR (Hatanaka et al., 2015) が発現していることが明らかとなっている。

近年、早い反応を担うであろうとされている膜上受容体の存在が注目され、性ホルモンの新規の受容体として研究されてきた。しかし、本研究では PR, ER $\alpha$ , AR のアンタゴニスト

によって、性ホルモンによるスパイン密度の増加を完全に押さえることができた。つまり、これらの受容体の一部は核に移行することなく、シナプスの膜上受容体として働いていることがわかった。

さらに、スパインを頭部直径ごとに3分類して (small-head スパイン、middle-head スパイン、large-head スパイン) 解析した結果からも、全スパイン密度の解析と同様に、PR, ER $\alpha$ , AR の関与があるという結論が得られた。

以上の結果から予想されるスパイン密度制御のシグナル伝達経路のモデルを図 4-1 に示した。さらに、急性的なスパイン新生のモデル図を図 4-2 に示した。

## B メスの性周期と海馬のスパイン密度変動

(1-1) メスラットの各性周期ステージにおいて、海馬 CA1 領域のグルタミン酸神経スパイン密度を解析した結果、周期的に全スパイン密度が変動した。具体的には、卵胞期(Proestrus : P)では 2.33 spines/ $\mu\text{m}$ 、排卵期 (Estrus : E) では 2.04 spines/ $\mu\text{m}$  へと減少、黄体期 1 (Diestrus1 : D1) では再び 2.33 spines/ $\mu\text{m}$  へと増加し、黄体期 2 (Diestrus2 : D2) では 2.04 spines/ $\mu\text{m}$  へと減少した。

これまで、メスの性周期に伴う海馬のスパイン密度及び機能変化に関する多くの研究が行われてきたが (Shors et al., 2001; Woolley et al., 1990)、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り、diestrus を D1、D2 と区別した解析はなかった。そのため、スパイン密度は P で最高値、E で最低値、diestrus は P と E の中間になるという結論になっていた。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 E2 と PROG の濃度変化と対応する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。

(1-2) 海馬内における女性ホルモン (PROG、E2) 濃度を測定した結果、性周期に伴う変動が見られた。海馬内の PROG は、血中 PROG の濃度変動と相関を示すことから、この変動には血中から供給される PROG の寄与があると考えられる。しかし、海馬内の PROG は血中の2倍程度の濃度で存在している。そのため、海馬内の PROG 量は、主に海馬で合成されているものが支配的であるが、海馬内の性周期に伴う PROG 振動を引き起こす要因としては、血中から供給される PROG 振動が寄与していると考えられる。さらに、海馬内の E2 濃度も変動し、血中 E2 濃度の変動と相関を示した。しかし、海馬内の E2 は血中の10~100倍という非常に高い濃度で存在しているため、性周期に伴う海馬内の E2 濃度変動は、血中から供給される E2 の寄与はないと考えられる。従来は、海馬内の E2 濃度が測定できなか

ったため、性周期に伴う海馬神経スパイン密度の変動は、性周期に伴う血中の性ホルモン濃度の変動が原因で引き起こされると考えられてきた。本研究は、性周期に伴う血中の女性ホルモン濃度変動と海馬内の濃度変動が異なることを初めて明らかにした非常に重要なものである。

(2) RT-PCR を用いた mRNA の解析の結果、メスラットの海馬内における女性ホルモン合成酵素 (*Hsd17b1*, *Hsd17b3*, *Cyp19a1*)、及び女性ホルモン受容体 (*Esr1*, *Esr2*, *Pgr*) には、性周期に伴う発現量の変動はなかった。上述のように、海馬の女性ホルモン濃度は性周期に伴って変動するにも関わらず、海馬における性ホルモン合成酵素の発現量は変動しなかった。この結果は、海馬内の性ホルモン合成能と作用系の能力は、性周期に関わらず常に一定に保たれていることを示唆する (図 4-3)。卵巣における性ホルモン合成系の発現量は、性周期を作り出すように変動するが、海馬では全く変動しないという事実は非常に興味深い結果である。図 4-3 に示すように、性周期に伴う海馬の PROG、E2 濃度の変動は、海馬の変動しない PROG、E2 合成能の上に、血中由来の性周期に伴って変動する PROG が上乗せされたものであると解釈できる。実際に、PROG から E2 が合成されるまでに代謝される性ホルモン (アンドロステンジオン : ADione, エストロン : E1) の濃度も測定したところ、濃度の位相が変わっていく様子が見えた (図 4-4)。つまり、性周期ごとに変化する血中由来の PROG 濃度変動をきっかけとして、海馬自身が持つ性ホルモン代謝能によって、E2 の周期的な濃度変動を作り出すと考えられる。

## 4-2. リン酸化酵素系シグナルを介したオス海馬スパインの制御

本研究で使用した性ホルモン (PROG, E2, DHT) は、まず初めにシナプス受容体 (PR, ER, AR) に結合して受容体を活性化し、次にこれらの受容体の下流にあるリン酸化酵素 (PKA, PKC, LIMK, ERK/MAPK) を活性化することによって、スパイン密度の増加が起これと予想される。なぜなら、リン酸化酵素には PROG, E2, DHT の結合部位が存在しないためである。以下では、本研究で明らかにした性ホルモンの急性的なスパイン制御機構として、LIMK 及び ERK/MAPK について重点的に考察する。

### LIMK カスケード

上記のリン酸化酵素のうち、LIMK は E2 でリン酸化レベルが上昇して、活性化することが McEwen group の培養細胞を用いた研究によって明らかとなっている (Yuen et al., 2011)。

LIMK 経路の上流に関しては、海馬 CA1 神経シナプスにおいて  $\text{RhoA} \rightarrow \text{ROCK} \rightarrow \text{LIMK}$

という経路が存在することが示唆されている (Pilpel and Segal, 2004; Shi et al., 2009)。また、LIMK は p38 MAPK によってもリン酸化されることが示唆されている (Kobayashi et al., 2006)。

一方、LIMK 経路の下流に関しては、アクチンの脱重合を制御するタンパク質 (cofilin) をリン酸化することが報告されている (Yang et al., 1998; Clancy et al., 1992)。cofilin はアクチンの分岐部に作用し、アクチン骨格の脱重合を担っているが (Bernstein and Bamburg, 2010)、リン酸化によりその働きが抑制される。結果として、cofilin のリン酸化はアクチン重合を促すことになり、スパイン新生を促進する (Calabrese et al., 2014)。実際に、E2 は神経スパインにおいて、RhoA → ROCK → LIMK → cofilin という経路を介して、フィラメント状のアクチンとアクチン重合を増やすという報告がある (Kramar et al., 2009)。また、LIMK と cofilin は、E2 によるアクチンの再構成に関わり、スパイン新生を引き起こすという報告もある (Aizawa et al., 2001; Clancy et al., 1992; Liston et al., 2013)。さらに、コルチコステロンは、LIMK と cofilin の両方をリン酸化し、スパイン新生を引き起こすことが知られている (Liston et al., 2013)。

## **ERK/MAPK カスケード**

一方、ERK/MAPK は、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、神経スパインに発現していることが確認されている (Hojo et al., 2008; Mukai et al., 2007; Mukai et al., 2010)。

また、2000 年代の初期から、性ホルモンによって ERK/MAPK のリン酸化レベルが上昇し、活性化されることが色々な研究室から報告されてきた。例えば、E2 による ERK/MAPK のリン酸化が、若年齢ラットの海馬 (Kim et al., 2002) や、新生仔マウスの大脳皮質 (Toran-Allerand et al., 2002) で起こることが報告されている。また、E2 の急性効果には、ERK/MAPK が関与することも報告されている (Dominguez et al., 2007; Mukai et al., 2007; Logan et al., 2011; Ooishi et al., 2012)。Dominguez et al., 2007 の報告によると、12 週齢オスラットの全脳から採取した synaptoneurosome に 10nM E2 を 30 分間作用させると、ERK/MAPK のリン酸化レベルが最大になることをウエスタンブロットで示している。さらに、ER のアゴニストにより、ERK/MAPK のリン酸化が生じることも示されている (Dominguez et al., 2007)。

一方、DHT は AR を介して ERK/MAPK を急性的にリン酸化することが様々な組織で報告されている (Fix et al., 2004; Gatson et al., 2006)。さらに、DHT が海馬初代培養神経細胞の Rsk1 (ribosomal S6 kinase 1) や Bab をリン酸化して、1 時間以内に ERK/MAPK をリン酸化することによって、アミロイド β による細胞死から神経細胞を保護するという報告もある

(Nguyen et al., 2005)。

ERK/MAPK 経路の上流に関しては、LTP による先行研究から海馬 CA1 領域において PKC → Raf1 → ERK/MAPK、または PKA → B-Raf → ERK/MAPK という経路が存在し、シナプス結合強度の調整に関わっていることが示唆されている (Roberson et al., 1999)。また、E2 と DHT を用いた研究により、PKA や PKC の阻害剤によって E2, DHT によるスパイン密度の増加が抑制されることが報告されている。このことから、ERK/MAPK の上流に PKA や PKC が存在することが示唆される (Hasegawa et al., 2015; Hatanaka et al., 2015)。

ERK/MAPK の下流に関しては、アクチン調節タンパク質である cortactin をリン酸化し活性化することが知られている (MacQueen et al., 2003; Martinez-Quiles et al., 2004)。活性化された cortactin は、アクチン関連タンパク質 (Arp) 複合体と共同してアクチン骨格の分岐・重合を促す (Weaver et al., 2001) ことにより、スパイン新生を促進する (Hering and Sheng, 2003)。

これら先行研究と本研究の結果をまとめると、海馬において (1) E2, DHT などの性ホルモンが RhoA → ROCK → LIMK の経路を活性化する。(2) 活性化した LIMK が cofilin をリン酸化し、cofilin を不活性化する。(3) cofilin が不活性化された結果、アクチンの重合が促進されてスパインが新たに形成されるというメカニズムが示唆される。

さらに、海馬において (4) E2, DHT などの性ホルモンが PKC → Raf1 → ERK/MAPK、または PKA → B-Raf → ERK/MAPK の経路を活性化し、スパイン内の ERK/MAPK をリン酸化する。(5) リン酸化されて活性化した ERK/MAPK が cortactin をリン酸化して活性化する。(6) 活性化した cortactin が Arp 複合体と共同してアクチン骨格の分岐・重合を促進し、スパインの新生を引き起こす、というメカニズムが、LIMK 経路と並行して生じることが示唆される (図 4-1, 図 4-2)。

## その他のカスケード

性ホルモンの作用経路としては、遺伝子転写を介する経路がよく知られているが、本研究で明らかにした、性ホルモンの急性的なスパイン制御機構は、これまでの性ホルモン作用経路とは全く異なる、遺伝子転写を介さない経路である。

2000 年以前の研究では、生後 7 日のラット海馬の培養スライスに E2 を作用させ、4～8 日後にスパイン密度が増加することを明らかにした研究が行なわれていたが、当時はまだ E2 によるスパイン密度の制御にリン酸化酵素が関わっているとは考えられていなかった (Pozzo-Miller et al., 1999)。本研究の結果は、性ホルモンの新しい作用経路としてリン酸化酵素のカスケードを特定し、それが急性的なスパイン密度の制御に関与していることを明ら

かにした点で大きな意義がある。

ここまで、E2 と DHT が動かす共通のリン酸化酵素経路について記述してきたが、両者には異なる経路も存在する。E2 は  $ER\alpha \rightarrow PI3K \rightarrow Akt \rightarrow cortactin$  の経路も動かすが (Hasegawa et al., 2015)、DHT  $\rightarrow AR$  の系では PI3K は働かないことが分かっている (Hatanaka et al., 2015)(図 4-1)。ER $\alpha \rightarrow PI3K$  の経路は、Akt をリン酸化することによって神経保護作用を発揮することも示されている (Garcia-Segura et al., 2007; Jover-Mengual et al., 2010)。

### 4-3. 海馬の神経スパインで働く性ホルモンの受容体

本研究により、性ホルモン (PROG, E2, DHT) によるスパイン密度増加には、核内受容体と同じタンパク質であり、スパインに存在する PR, ER $\alpha$ , AR が関与していることが明らかとなった (図 3-2, 図 3-5, 図 3-8)。

PR は、PR 抗体と silver-enhanced pre-embedded 法を用いた電子顕微鏡による解析の結果から、核や細胞質のみならず、海馬のスパイン内にも存在することが発見されている (Mitterling et al., 2010; Waters et al., 2008)。ER $\alpha$  は、ER $\alpha$  抗体と post-embedded gold particle 法を用いた電子顕微鏡による解析や、シナプス後肥厚 (PSD: postsynaptic density) 分画を用いたウェスタンブロットによる研究によって、海馬 CA1 領域における神経スパインに ER $\alpha$  が発現していることが発見された (Mukai et al., 2007)。さらに AR も、AR 抗体と silver-enhanced pre-embedded 法を用いた電子顕微鏡による観察の結果から、スパインに存在していると報告されている (Tabori et al., 2005)。これらの報告は、本研究で用いた核内受容体のアンタゴニストが、性ホルモンによるスパイン増加効果を阻害したことを裏付ける証拠と言える。

E2 による急性効果では、ER $\alpha$  以外に ER $\beta$  が関与するという報告が電気生理の長期増強 LTP 実験からは複数なされている (Kramar et al., 2009, Ooishi et al., 2012, Tanaka and Sokabe, 2013)。また、ER $\beta$  も ER $\alpha$  と同様に神経スパインに存在することも報告されている (Herrick et al., 2006)。しかし、スパイン密度を測定した先行研究では、ER $\beta$  のアゴニスト (DPN) を作用させてもスパイン密度が増加しなかった (Mukai et al., 2007; Murakami et al., 2006)。さらに ER $\alpha$ KO マウス (ER $\beta$  のみが発現している) を用いた実験では、E2 を作用させてもスパイン密度が増加しなかった (Murakami et al., 2015)。これらの結果から、スパイン密度の制御においては、ER $\beta$  は関与しないと言える。

さらに近年、性ホルモンによる急性的な制御を担うとされている新たな受容体として、膜上受容体が注目を集めており、研究が盛んに行なわれている。例えば、PROG の膜上受容



体と言われている mPR (progesterone membrane receptors) や、PGMRC1 (progesterone membrane receptor component 1) などの存在が、生殖器官や脳で発見されている (Falkenstein et al., 1996; Falkenstein et al., 1998; Gerdes et al., 1998)。mPR に関しては、mPR $\alpha$  と mPR $\beta$  という 2 種のサブタイプの存在は明らかとなっているが、その下流のシグナル伝達経路はほとんど明らかになっておらず (Mani and Oyola, 2012; Thomas and Pang, 2012)、正式な受容体として働いているという報告はまだ無い。

また、E2 の膜上受容体と言われている GPR30 (G-protein-Coupled Receptor 30) は、GPER (G-protein-Coupled Estrogen Receptor) とも呼ばれているが、海馬や前頭葉の神経細胞膜に多く存在することが報告されている (Akama et al., 2013; Almey et al., 2014)。しかし、メスマウスの海馬において、E2 を作用させると ER が PI3K, ERK/MAPK, Akt のリン酸化酵素シグナル経路を活性化するのに対して、GPR30 はアゴニストである G1 を作用させると JNK (Jun Kinase) などの異なるリン酸化酵素シグナル経路を介して、記憶の増強を行なうことが報告されている (Kim et al., 2016)。Kim et al., 2016 の研究によると、E2 による記憶の増強効果は、GPR30 のアンタゴニストを作用させても阻害されないことが明らかとなっている。この結果は、スパイン密度の制御には GPR30 が関わらないことを支持する。

さらに、男性ホルモン受容体に関しては、核内受容体(AR)とは異なる DHT の作用先として、nonAR の存在も示唆されてきた(Foradori et al., 2008)。nonAR は、AR のアンタゴニスト (Fultamamide) を作用させても、DHT による急性効果が抑制されないことから、存在が提唱された (Foradori et al., 2008)。また、電子顕微鏡で海馬 CA1 領域のシナプスを形成したスパイン (スパイン-シナプス) を観測する解析では、Fultamide によって DHT によるスパイン-シナプス増加の効果が阻害されないため nonAR が関与している可能性が示唆されている (Hajszan et al., 2008; MacLusky et al., 2006)。しかし、この研究において、Fultamide のみを用いた場合にも、スパイン-シナプス密度が増加するので、このスパイン-シナプスは、我々が観察しているスパインとは異なる別のものではないかと疑っている。さらに、nonAR に関する研究は 15 年に渡って行なわれてきたにも関わらず、未だに遺伝子もタンパク質も同定されていない (Hatanaka et al., 2015)。従って nonA は存在しないという説も多い。

本研究では、AR に特異的なアンタゴニスト (Hydroxi-Fultamide : HF) によって、スパイン密度の増加が抑制された。このことから、DHT によるスパイン密度の急性的な制御には、AR が働いていると考えられる。

以上の議論のように、性ホルモンの受容体としては、従来から知られているものの他に様々な分子が特定、提唱されている。しかし、本研究における性ホルモンの急性スパイン増加に関して、これらの分子が関与している可能性は低いと考えられる。

#### 4-4. 性ホルモンがスパインに及ぼす長期効果

従来、性ホルモンによるスパイン密度の制御は、遺伝子転写を介した長期的なものが一般的だと考えられて来た。性ホルモンによる長期効果と急性効果では、受容体の働きが全く異なる。例えば E2 の長期効果では、E2 が核内に存在する ER $\alpha$  / ER $\beta$  に結合し、二量体を形成する。その後、標的となる DNA 上にある estrogen response element (ERE) に結合して遺伝子発現を制御し、神経シナプスタンパク質の合成を促進する。この作用は、24 時間から数日後に効果が現れることが知られている (Tsai and O'Malley, 1994, Beato et al., 1996, Charlier et al., 2010)。また、AR の場合も DHT の結合後に二量体化し、核内に移行して転写因子として働くことで、タンパク質の発現を調節しているとされてきた。従ってこの信号系は、本研究で得られた 2 時間の急性効果の発現には寄与できない。

#### 4-5. 海馬神経スパインにおける CORT 短期効果のシグナル伝達経路

本研究では、性ホルモン (PROG, E2, DHT) の比較対象として、低濃度 (30nM) コルチコステロン (CORT) を用いた実験も行なった。CORT は、性ホルモンと同じステロイドホルモンの一種である。驚くべきことに、CORT の下流でも、リン酸化酵素である LIMK や ERK/MAPK のシグナル経路が働き、スパイン密度の制御を行なっていることが明らかとなった。この結果は、ステロイドホルモンが駆動する短期効果が、リン酸化酵素シグナル経路を介するという一般性を示した重要な結果である。

近年、短期間 (～数時間) の CORT の作用が明らかになってきている。海馬依存的な記憶・学習課題の直前にストレス刺激を与えると学習が阻害されるが、一方で課題最中のストレス刺激や CORT の投与は学習を促進することが報告されている (Akirav et al., 2004; Diamond et al., 2006; Joëls et al., 2012; Schwabe et al., 2012)。また、数十分の身体的なストレス刺激を与えて約 3 時間後に海馬 CA1 領域における LTP が増大し (Spirka et al., 2011)、24 時間後には海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起スパインが増加することも報告されている (Shors et al., 2001)。川戸グループではさらに、1  $\mu$ M の CORT を単離した海馬スライスに作用させると、1 時間という短時間で CA1 錐体細胞のスパイン密度、および CA3 錐体細胞のソーン (密集したシナプス後部構造) が増加することを明らかにしている (Komatsuzaki et al., 2012; Yoshiya et al., 2013)。

本研究以外にも、synaptic GR が性ホルモンと同様のリン酸化酵素経路を介して作用することが報告されている。例えば、扁桃体基底外側部および前頭前皮質において、synaptic GR

が PKA を介して急性的 (~1 時間) に作用することが分かっている (Barsegyan et al., 2010; Roozendaal et al., 2002)。また、視床下部スライスを用いた実験によって  $\text{Ca}^{2+}$  と phospholipase C を介した GR の作用経路が示されている (Liu and Chen, 1995)。さらに、synaptic GR が G タンパク質と共同して働くという報告が複数存在しており (Groeneweg et al., 2012; Orchinik et al., 1992)、海馬 CA1 領域において、CORT が G タンパク質を介して PKC を活性化し、作用するという報告もある (French-Mullen, 1995)。GR による急性的な ERK/MAPK のリン酸化 (~15 分) や LIMK のリン酸化 (~20 分)、さらにリン酸化された LIMK が cofilin をリン酸化することが、海馬スライスや海馬神経初代培養細胞を用いた実験で確認されている (Jafari et al., 2012; Liston et al., 2013)。

#### 4-6. メス海馬の女性ホルモン濃度変化とスパイン密度の関係

これまで、性周期に伴うスパイン密度の変化は広く研究されてきた (Gould et al., 1990; Woolley and McEwen, 1992) が、いつも Diestrus1 (D1) と Diestrus2 (D2) を混合して Diestrus (D) として測定されてきた。本研究では、世界で初めて D1 と D2 を分離して、性周期を 4 つのステージ (P, E, D1, D2) に分けて解析を行なった。その結果、D1 と D2 では海馬のスパイン密度が大きく異なることを発見した (Kato et al., 2013)。このような性周期に伴うスパイン密度変動は、リン酸化酵素の活性の変化によって引き起こされるという研究報告が多く存在する。具体的には、ERK/MAPK, Akt, LIMK のリン酸化の度合いは P で最も高く、E では最も低くなると報告されている。さらに、D1 と D2 を混合した D というステージでは、Akt のリン酸化のレベルが高まり、LIMK のリン酸化レベルは、E と同程度だと報告されている (Bi et al., 2001; Spencer et al., 2008; Znamensky et al., 2003)。しかし、これらの研究は全て Diestrus を 1 つにまとめているため、D1 と D2 に分離してリン酸化の解析を行なう必要がある。また一方で、性周期に伴う海馬のタンパク質発現量が変化するという研究は、未だに報告されていないため、大きな変動は無いと考えられる。

さらに本研究の結果から、海馬内の PROG や E2 の周期的な濃度変化に起因するスパイン密度変化があることを見出した。具体的には、海馬内 PROG 濃度の変動とスパイン密度の変動を比較すると、PROG 濃度が D1 でピーク (90nM) を示すのに合わせて、スパイン密度もピークを示す。また、海馬内 E2 濃度の変動とスパイン密度の変動を比較すると、E2 濃度が P (4.3nM) から E (1.0nM) にかけて減少するのと同様に、スパイン密度も P から E にかけて大きく減少する。このことは、PROG や E2 が性周期に伴うスパイン密度変化を制御していることを示唆する。前述の性周期に伴うリン酸化酵素の活性変化に関する報告と、本研究の結果を合わせて考えると、性周期に伴うスパイン密度変化は、PROG や E2 の濃度変

化によってリン酸化酵素の活性化度合いが変化することによって制御されていると考えられる。

#### 4-7. メス海馬における性ホルモンの局所合成

成獣オスラットの場合、PROG が血中で 6.8nM、海馬内で 14.6nM (血中の約 2 倍)、E2 血中で 0.014nM、海馬内で 8.4nM (血中の約 800 倍)、DHT が血中で 0.63nM、海馬内で 6.6nM (血中の約 10 倍) で存在するように、性ホルモンが海馬内において非常に高い濃度で存在することが明らかとなっている (Hojo et al., 2009)。この濃度差は、前述の海馬における局所合成の寄与によるものだと考えられる。このように、性ホルモンの海馬内合成は、性ホルモンの海馬に対する作用を考える上で、非常に重要な要素である。

本研究では、熱力学的に設計したプライマーを用いて、成獣メスラットの海馬内にも女性ホルモン合成系 (*Star*, *Hsd17b1*, *Hsd17b3*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*) が存在することを RT-PCR によって初めて示した。従来、メスにおける E2 合成経路は、PROG → ADione → E1 → E2 のみであると世界中で考えられてきた。しかし、本研究でメスの海馬内にもオスと同様に女性ホルモン合成に必要な全ての酵素がオスと同程度発現していることが明らかとなった。さらに、メスラット海馬に発現している性ホルモン合成酵素は、性周期のどのステージにおいても発現量が変化しないことが明らかとなった。一方、末梢組織である卵巣では、T から E2 を合成する P450arom (*Cyp19a*) の発現量が diestrus 2 で最も高く proestrus、estrus、diestrus 1 にかけて徐々に減少し、その後 diestrus 1 から diestrus 2 で急激に増加する (Lephart et al., 1992)。そして P450arom の酵素活性は、mRNA の発現変動に対して性周期ステージ 1 日分遅れて変動し proestrus で最も高くなり、その後減少していくというサイクルを繰り返すという報告もある。海馬内の性ホルモン濃度は、血中と同様に性周期依存的に変動するにも関わらず、卵巣とは異なり性ホルモン合成酵素とその受容体の発現量が性周期に伴って変化しなかったことは、大変驚くべき結果である。

本研究により、メスの海馬内における女性ホルモン合成酵素 (*Hsd17b1*, *Hsd17b3*, *Cyp19a1*)、及び女性ホルモン受容体 (*Esr1*, *Esr2*, *Pgr*) の発現量は、オスと全く同じであることが明らかとなった。それではなぜ、メスの海馬内の E2 濃度 (0.5~4nM) は、オスの海馬内 (8nM) の 1/8 程度と遥かに低いのだろうか。この要因の一つとして、血中から海馬内に供給される T の濃度差が考えられる。T は、E2 の材料となる男性ホルモンであり、オスの場合、精巣由来の T が、メスの卵巣由来の T の濃度と比べて 100-1000 倍もある。そのため、オスでは血中から海馬内に供給される T の濃度が高く、海馬内での E2 合成に対する寄

与が非常に大きいためだと考えられる。

このような低い E2 濃度で、なぜメスはオスと同程度のスパイン密度を維持できるのだろうか。現段階では、この問いに対する答えを出すことはできないが、考えられる一つの答えとして、メスとオスでは異なる信号系が働いてアクチン重合を制御している可能性がある。実際に、メスの場合、ER $\alpha$  が mGluR (metabolic glutamate receptor) と結合していて  $\rightarrow$  G タンパク  $\rightarrow$  CREB タンパク  $\rightarrow$  アクチン重合という信号系を動かしている可能性を示した報告がある (Mermelstein et al., 1996)。また、PROG 濃度に関してはメスの海馬内の方がオスよりも高い。

#### 4-8. メス海馬内の性ホルモン合成酵素及び受容体の定量

本研究で解析対象とした酵素や受容体の海馬での発現量は、精巣・卵巣・副腎などの論文で発表されている末梢組織と比較した場合、1/200  $\sim$  1/5000 と非常に低いため、世界の他のグループが末梢組織に対して使用しているプライマーをそのまま使用しても、検出感が低すぎて定量解析が出来ない。そのため、プライマーの設計を行って特異性と増幅効果を向上させている (Kimoto et al., 2010) (図 2-20)。プライマーが相補鎖と結合した際の安定性の評価には、最隣接熱力学計算法 (最隣接の核酸配列の影響を考慮し、DNA 二本鎖の相互作用の強さ・安定性を求める方法 (Breslauer et al., 1986, SantaLucia, 1998)) によって算出したギブスの自由エネルギー $\Delta G$  を用いた。

全ての遺伝子について PCR 産物量の増幅解析を行い、各 PCR サイクルの PCR 産物量をプロットした。半定量発現解析の際は、サイクル数を PCR 産物の指数増幅期に固定して半定量 PCR を行った。mRNA 発現はメスの各性周期ステージ、オスの間で比較した。各標的遺伝子の mRNA の発現は、内部標準遺伝子の *Gapdh* で規格化した値を用いて解析した。*Gapdh* の発現量は、性周期で全く変動せず、性差もなかったため、この規格化方法を用いた (図 3-18)。また、PCR による増幅産物の配列と標的遺伝子配列の同一性は、DNA シーケンシングを読んで確認した。

#### 4-9. メス海馬内の女性ホルモン濃度変動と海馬機能の関連

これまで、性周期に伴ってスパインの密度及び形態の変化と記憶学習能力の変化が起こるという報告や (Szymczak et al., 2006, Spencer et al., 2008)、性周期に伴う海馬神経細胞の電気生理学的性質の変化 (Warren et al., 1995, Good et al., 1999, Scharfman et al., 2003)、海馬依存的な記憶・学習能力の変化 (Frye, 1995, Berry et al., 1997, Warren and Juraska, 1997) につい

て、多くの研究が行われてきた。

例えば、海馬 CA1 領域の神経細胞をゴルジ染色により可視化し、神経細胞の樹状突起スパインの密度を計測すると、性周期によりスパイン密度が変動する (Woolley et al., 1990, Shors et al., 2001)。また、卵巣摘出 (OVX) ラットを用いて皮下注射で E2 や PROG を投与した時のスパイン密度を調べると、E2 投与群が OVX と比べて高いスパイン密度を示し、E2 + PROG 投与群は更に高い密度になることが報告された。E2 + PROG 投与群は、Proestrus で血中の E2 と PROG の濃度が上昇することを模した群であり、先の研究結果が血中の性ホルモン濃度の変動によることを示した結果となった (Gould et al., 1990, Woolley et al., 1990)。

海馬神経細胞の電気生理学的性質に関しては、Proestrus の午後において長期増強 (LTP) の増強率が Diestrus に比べて高く (Warren et al., 1995)、Proestrus では長期抑圧 (LTD) の抑圧率が減少する (Good et al., 1999) ことが *in vivo* 解析で示された。

さらに、行動実験からも海馬依存的な記憶・学習能について、性周期依存的な変動が調べられている。海馬依存的な学習課題としては、空間認知課題であるモリス水迷路を用いるのが一般的な手法である。OVX ラットに E2 と PROG を投与してモリス水迷路課題をさせると、Proestrus を模した条件 (E2 投与の効果でスパイン密度が上昇した状態で、課題直前に PROG を投与する) で、空間記憶の保持時間が延びるという結果が示されている (Sandstrom and Williams, 2001)。しかし、同じモリス水迷路を用いた研究で、Estrus で Diestrus に比べて学習効率が悪いという報告 (Frye, 1995) もあれば、Estrus で Proestrus よりも成績が良くなったという報告 (Warren and Juraska, 1997) もある。一方、Proestrus と Estrus で成績に差がないという結果も出ており (Berry et al., 1997)、性周期が記憶・学習に影響するかどうかという点でも一致した見解は得られていない。

従来は、これらの現象は性周期に伴う血中の E2 濃度の変動に起因するものであると何の証拠もなく結論付けられてきた。しかし、海馬内には E2 が血中の 100 倍という非常に高い濃度で存在しているため、海馬内の性周期に伴う E2 濃度変動は、血中の E2 濃度変動によって引き起こされるわけではないということが本研究で明らかとなった。つまり、海馬内の E2 は海馬内で合成されるものが主であるといえる。この結果は、従来の考え方を覆す非常に重要な発見である。

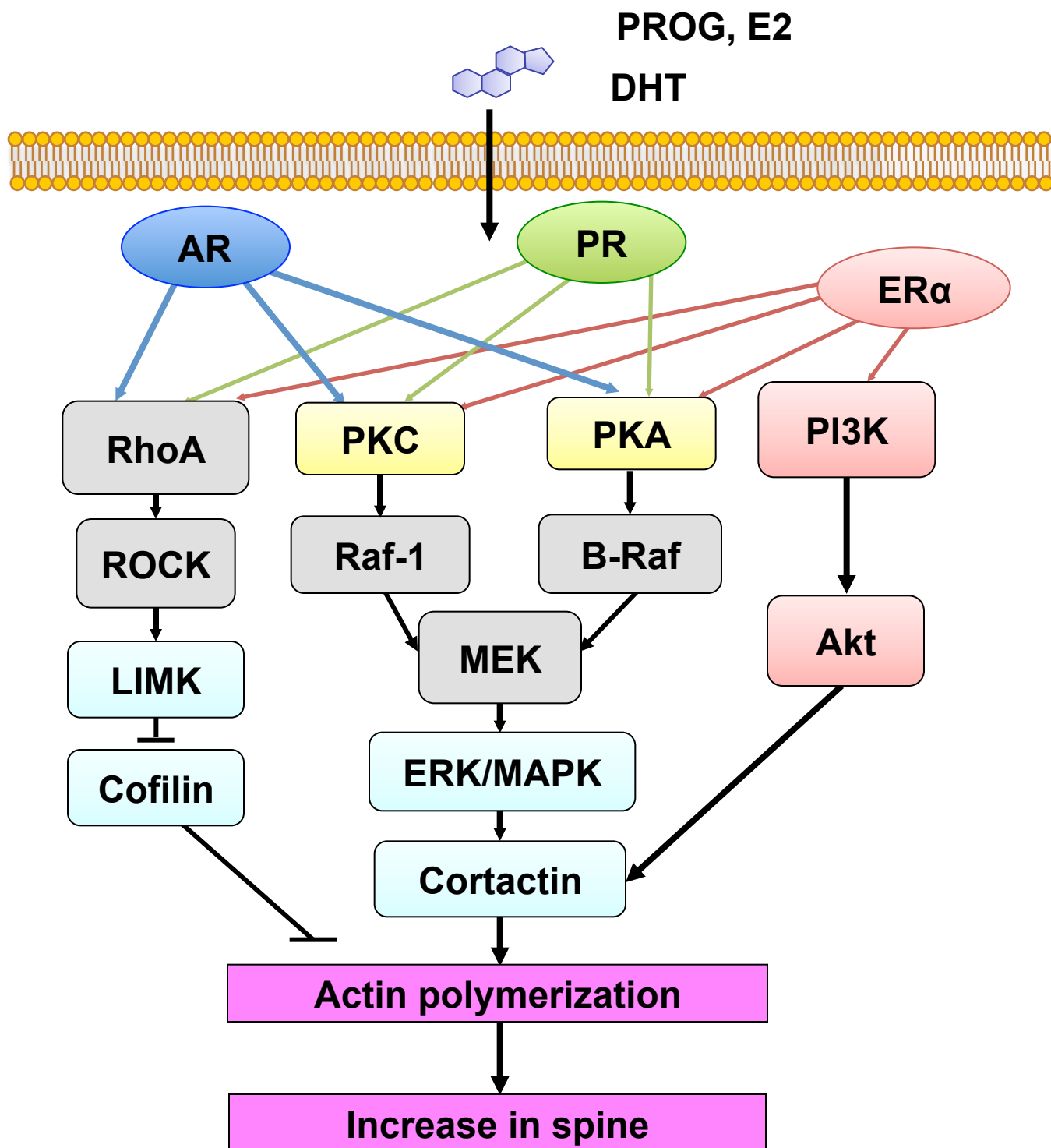


図4-1. 性ホルモンによるスパイン密度制御のシグナル伝達経路モデル図

性ホルモンは、細胞膜を透過してスパイン内に入り込み、シナプス受容体に結合する。その結果、受容体がスパイン内に存在する様々なリン酸化酵素を活性化する。そして、LIMKがアクチン脱重合を制御するCofilinをリン酸化することで不活性化させ、ERK/MAPKがアクチン重合を促進するCortactinをリン酸化して活性化させることによって、アクチン重合が促進され、新たなスパインが形成されることが考えられる。

## New spine formation (~2 h)

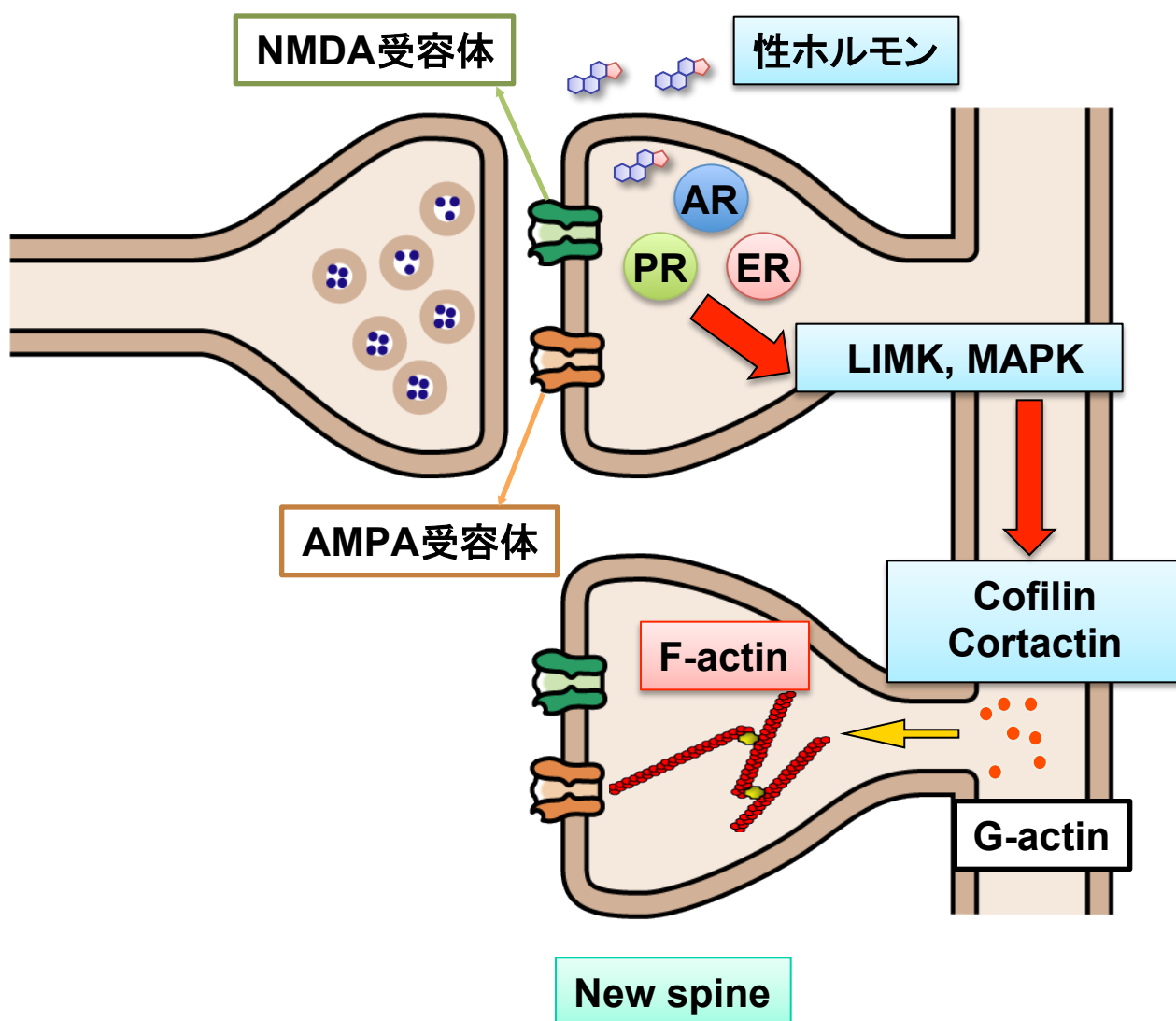
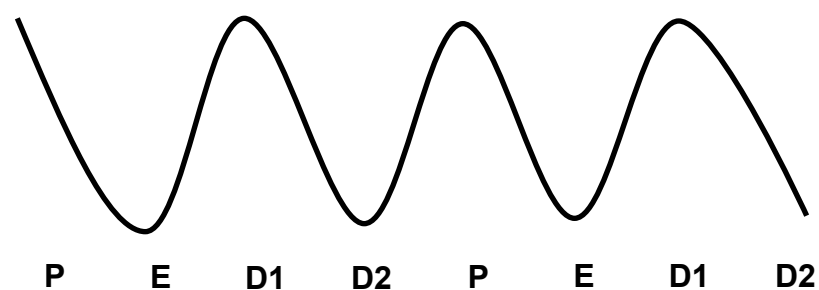


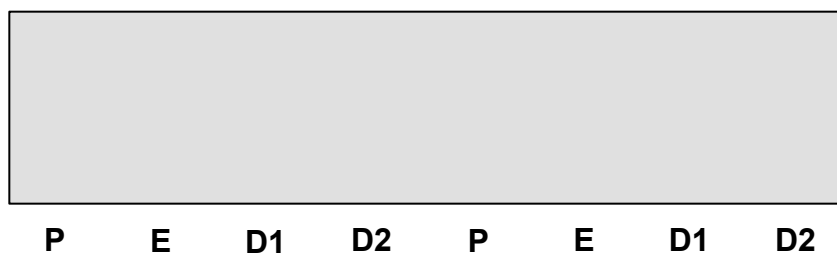
図4-2. 性ホルモンによる急性的なスパイン新生のモデル図

スパイン内部の様子を表した模式図。スパイン内部に入り込んだ性ホルモンは、スパイン内に存在する受容体(シナプス受容体)に結合する。その結果、スパイン内に存在する様々なリン酸化酵素が活性化され、最終的に LIMK が Cofilin を不活性化、ERK/MAPK が Cortactin を活性化させることによって、アクチン重合が促進される。アクチン重合が促進されることで F-actin が増加し、樹状突起上に新たなスパインが形成されると予想される。

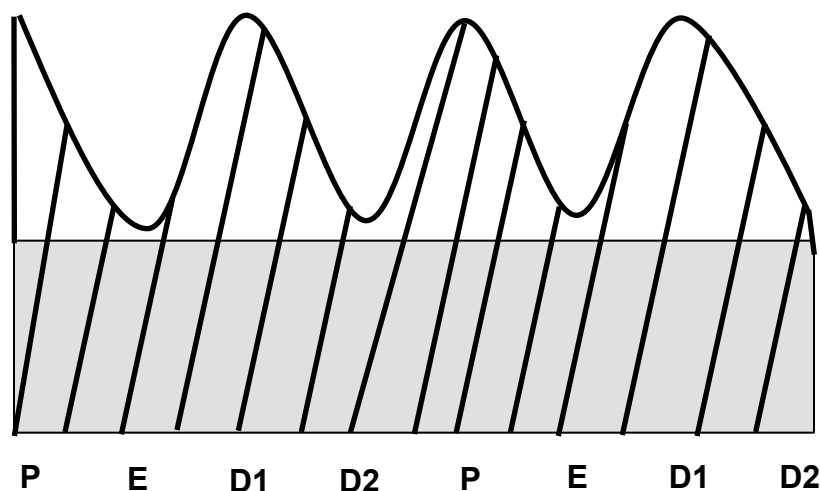




性周期ごとに変化する  
血中の性ホルモン濃度  
(主にPROG)



性周期ごとに変化しない  
海馬の性ホルモン合成能

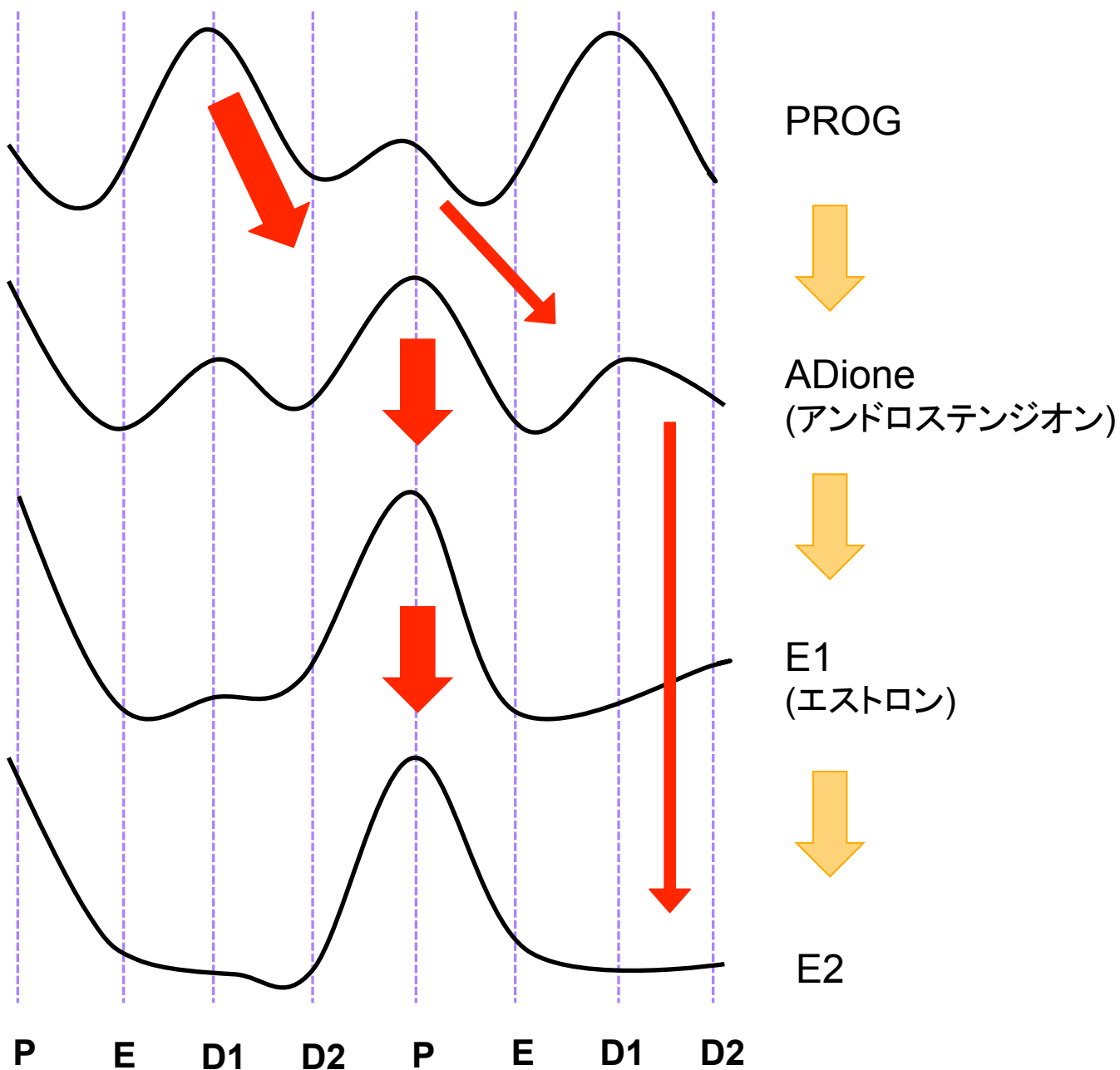


性周期ごとに変化する  
海馬内の性ホルモン濃度

図4-3. メスラットの海馬における性ホルモン濃度変動の要因

メスラットの血中における性ホルモン (主にPROG) 濃度は、性周期依存的に変動するが、海馬内の性ホルモン合成酵素発現量は変動しない。このことから、海馬内での性ホルモン合成能は常に一定であると考えられる。よって、海馬内の性ホルモン濃度の変動は、血中から供給されるPROG濃度の変動によって生じることを示唆するものである。

P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2



海馬内PROGの振動は下流に受け継がれるが、振動の形や位相はずれていく

#### 図4-4. メスラットの海馬における性ホルモン濃度変動の位相のずれ

メスラットの海馬内における性ホルモン (PROG, ADione (アンドロステンジオン), E1 (エストロン)) 濃度を測定した結果、性周期依存的に濃度が変動した。さらに、この濃度変動の位相は性ホルモンごとに異なることもわかった。このことから、海馬内に流入する血中のPROG濃度が、性周期ごとに周期的に変化することをきっかけとして、海馬内の性ホルモン代謝によって、周期的に変動する下流の性ホルモン濃度変動が生まれ、最終的にE2濃度の周期的な変動が生じると考えられる。

P: proestrus、E: estrus、D1: diestrus 1、D2: diestrus 2

## 引用文献

- Aizawa, H., et al., 2001. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci.* 4, 367-73.
- Akama, K.T., et al., 2013. Post-synaptic density-95 (PSD-95) binding capacity of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30), an estrogen receptor that can be identified in hippocampal dendritic spines. *J Biol Chem.* 288, 6438-50.
- Almey, A., et al., 2014. Medial prefrontal cortical estradiol rapidly alters memory system bias in female rats: ultrastructural analysis reveals membrane-associated estrogen receptors as potential mediators. *Endocrinology.* 155, 4422-32.
- Baulieu, E.E., Robel, P., 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 4089-91.
- Beato, M., Chavez, S., Truss, M., 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids.* 61, 240-51.
- Berry, B., McMahan, R., Gallagher, M., 1997. Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behav Neurosci.* 111, 267-74.
- Bi, R., et al., 2001. Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 13391-5.
- Breslauer, K.J., et al., 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 3746-50.
- Charlier, T.D., et al., 2010. Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain. *Biochim Biophys Acta.* 1800, 1094-105.
- Clancy, A.N., Bonsall, R.W., Michael, R.P., 1992. Immunohistochemical labeling of androgen receptors in the brain of rat and monkey. *Life Sci.* 50, 409-17.

- Corpechot, C., et al., 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78, 4704-7.
- Davis, E.C., Popper, P., Gorski, R.A., 1996. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res.* 734, 10-8.
- Dominguez, R., Liu, R., Baudry, M., 2007. 17-Beta-estradiol-mediated activation of extracellular-signal regulated kinase, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-Akt and N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation in cortical synaptoneurosomes. *J Neurochem.* 101, 232-40.
- Falkenstein, E., et al., 1996. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 229, 86-9.
- Falkenstein, E., et al., 1998. Localization of a putative progesterone membrane binding protein in porcine hepatocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 44, 571-8.
- Fix, C., et al., 2004. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 10919-24.
- Foradori, C.D., Weiser, M.J., Handa, R.J., 2008. Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol.* 29, 169-81.
- Friend, K.E., Ang, L.W., Shupnik, M.A., 1995. Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 4367-71.
- Frye, C.A., 1995. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol Behav.* 57, 5-14.
- Garcia-Segura, L.M., et al., 2007. Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. *Psychoneuroendocrinology.* 32 Suppl 1, S57-61.
- Gatson, J.W., Kaur, P., Singh, M., 2006. Dihydrotestosterone differentially modulates the mitogen-activated protein kinase and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathways through the nuclear and novel membrane androgen receptor in C6 cells. *Endocrinology.* 147,

2028-34.

- Gerdes, D., et al., 1998. Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol Chem.* 379, 907-11.
- Good, M., Day, M., Muir, J.L., 1999. Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci.* 11, 4476-80.
- Gorski, R.A., et al., 1978. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148, 333-46.
- Gould, E., et al., 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10, 1286-91.
- Hajszan, T., MacLusky, N.J., Leranth, C., 2008. Role of androgens and the androgen receptor in remodeling of spine synapses in limbic brain areas. *Horm Behav.* 53, 638-46.
- Hasegawa, Y., et al., 2015. Estradiol rapidly modulates synaptic plasticity of hippocampal neurons: Involvement of kinase networks. *Brain Res.* 1621, 147-61.
- Hatanaka, Y., et al., 2015. Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res.* 1621, 121-32.
- Herrick, S.P., et al., 2006. Extranuclear estrogen receptor beta immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. *Brain Res.* 1121, 46-58.
- Hojo, Y., et al., 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 865-70.
- Hojo, Y., et al., 2008. Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol.* 290, 31-43.
- Hojo, Y., et al., 2009. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology.* 150, 5106-12.
- Isgor, C., Sengelaub, D.R., 1998. Prenatal gonadal steroids affect adult spatial behavior, CA1 and CA3 pyramidal cell morphology in rats. *Horm Behav.* 34, 183-98.

- Ishii, H., et al., 2007. Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscientist*. 13, 323-34.
- Jover-Mengual, T., et al., 2010. Acute estradiol protects CA1 neurons from ischemia-induced apoptotic cell death via the PI3K/Akt pathway. *Brain Res*. 1321, 1-12.
- Juraska, J.M., 1990. Gender differences in the dendritic tree of granule neurons in the hippocampal dentate gyrus of weaning age rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 53, 291-4.
- Kato, A., et al., 2013. Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Front Neural Circuits*. 7, 149.
- Kawato, S., Hojo, Y., Kimoto, T., 2002. Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain. *Methods Enzymol*. 357, 241-9.
- Kim, J., et al., 2016. 17beta-Estradiol and Agonism of G-protein-Coupled Estrogen Receptor Enhance Hippocampal Memory via Different Cell-Signaling Mechanisms. *J Neurosci*. 36, 3309-21.
- Kim, J.S., et al., 2002. Enhancement of rat hippocampal long-term potentiation by 17 beta-estradiol involves mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent components. *Neurosci Lett*. 332, 65-9.
- Kimoto, T., et al., 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, 3578-89.
- Kimoto, T., et al., 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, 5795-806.
- Kobayashi, M., et al., 2006. MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *Embo J*. 25, 713-26.
- Komatsuzaki, Y., et al., 2012. Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus.

- PLoS One. 7, e34124.
- Kramar, E.A., et al., 2009. Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci.* 29, 12982-93.
- Lephart, E.D., et al., 1992. Inverse relationship between ovarian aromatase cytochrome P450 and 5 alpha-reductase enzyme activities and mRNA levels during the estrous cycle in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 42, 439-47.
- Leranth, C., Shanabrough, M., Redmond, D.E., Jr., 2002. Gonadal hormones are responsible for maintaining the integrity of spine synapses in the CA1 hippocampal subfield of female nonhuman primates. *J Comp Neurol.* 447, 34-42.
- Leranth, C., Hajszan, T., MacLusky, N.J., 2004. Androgens increase spine synapse density in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *J Neurosci.* 24, 495-9.
- Lisman, J.E., 1999. Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron.* 22, 233-42.
- Liston, C., et al., 2013. Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nat Neurosci.* 16, 698-705.
- Logan, S.M., et al., 2011. Estrogen-induced signaling attenuates soluble Abeta peptide-mediated dysfunction of pathways in synaptic plasticity. *Brain Res.* 1383, 1-12.
- MacLusky, N.J., et al., 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, 287-93.
- MacLusky, N.J., et al., 2006. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience.* 138, 957-65.
- Mani, S.K., Oyola, M.G., 2012. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3, 7.
- Markham, J.A., et al., 2005. Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 of hippocampus. *Hippocampus.* 15, 97-103.

- Mermelstein, P.G., Becker, J.B., Surmeier, D.J., 1996. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci.* 16, 595-604.
- Mitterling, K.L., et al., 2010. Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol.* 518, 2729-43.
- Moser, M.B., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 12673-5.
- Moser, M.B., et al., 1997. Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *J Comp Neurol.* 380, 373-81.
- Mukai, H., et al., 2007. Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem.* 100, 950-67.
- Mukai, H., et al., 2010. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta.* 1800, 1030-44.
- Murakami, G., et al., 2006. Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 351, 553-8.
- Murakami, G., et al., 2015. Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res.* 1621, 133-46.
- Naftolin, F., et al., 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res.* 31, 295-319.
- Neufang, S., et al., 2009. Sex differences and the impact of steroid hormones on the developing human brain. *Cereb Cortex.* 19, 464-73.
- Nguyen, T.V., Yao, M., Pike, C.J., 2005. Androgens activate mitogen-activated protein kinase signaling: role in neuroprotection. *J Neurochem.* 94, 1639-51.
- Nilsen, J., Brinton, R.D., 2003. Divergent impact of progesterone and



- medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 10506-11.
- Nunez, J.L., Alt, J.J., McCarthy, M.M., 2003. A novel model for prenatal brain damage. II. Long-term deficits in hippocampal cell number and hippocampal-dependent behavior following neonatal GABAA receptor activation. *Exp Neurol.* 181, 270-80.
- 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, 171-5.
- O'Malley, A., et al., 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, 229-32.
- Ooishi, Y., et al., 2012. Estradiol rapidly rescues synaptic transmission from corticosterone-induced suppression via synaptic/extranuclear steroid receptors in the hippocampus. *Cereb Cortex.* 22, 926-36.
- Orikasa, C., et al., 2000. Estrogen receptor alpha, but not beta, is expressed in the interneurons of the hippocampus in prepubertal rats: an in situ hybridization study. *Brain Res Dev Brain Res.* 120, 245-54.
- Pardridge, W.M., Mietus, L.J., 1979. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest.* 64, 145-54.
- Pozzo-Miller, L.D., Inoue, T., Murphy, D.D., 1999. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca<sup>2+</sup> transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 81, 1404-11.
- Resnick, E.M., et al., 2000. Truncated estrogen receptor product-1 suppresses estrogen receptor transactivation by dimerization with estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 275, 7158-66.
- Rhoda, J., Corbier, P., Roffi, J., 1984. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 beta-estradiol. *Endocrinology.* 114, 1754-60.
- Robel, P., et al., 1987. Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in

- rat and monkey brain. *J Steroid Biochem.* 27, 649-55.
- Robel, P., Baulieu, E.E., 1991. [Neurosteroids: a new function of the brain?]. *Rev Prat.* 41, 1378-82.
- Sandstrom, N.J., Williams, C.L., 2001. Memory retention is modulated by acute estradiol and progesterone replacement. *Behav Neurosci.* 115, 384-93.
- SantaLucia, J., Jr., 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 1460-5.
- Scharfman, H.E., et al., 2003. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 23, 11641-52.
- Shinohara, Y., et al., 2008. Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 19498-503.
- Shors, T.J., Chua, C., Falduto, J., 2001. Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *J Neurosci.* 21, 6292-7.
- Spencer, J.L., et al., 2008. Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. *Neuroscience.* 155, 1106-19.
- Stromstedt, M., Waterman, M.R., 1995. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 34, 75-88.
- Szymczak, S., et al., 2006. Increased estrogen receptor beta expression correlates with decreased spine formation in the rat hippocampus. *Hippocampus.* 16, 453-63.
- Tabori, N.E., et al., 2005. Ultrastructural evidence that androgen receptors are located at extranuclear sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience.* 130, 151-63.
- Tanaka, M., Sokabe, M., 2013. Bidirectional modulatory effect of 17beta-estradiol on NMDA receptors via ERalpha and ERbeta in the dentate gyrus of juvenile male rats. *Neuropharmacology.* 75, 262-73.

- Thomas, P., Pang, Y., 2012. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology*. 96, 162-71.
- Toran-Allerand, C.D., et al., 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci*. 22, 8391-401.
- Tsai, M.J., O'Malley, B.W., 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*. 63, 451-86.
- Tsurugizawa, T., et al., 2005. Estrogen induces rapid decrease in dendritic thorns of CA3 pyramidal neurons in adult male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*. 337, 1345-52.
- Wallace, L.S., et al., 2005. Comparison between 60 matched pairs of postmenopausal black and white women: analysis of risk factors related to bone mineral density. *Maturitas*. 52, 356-63.
- Warren, S.G., et al., 1995. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res*. 703, 26-30.
- Warren, S.G., Juraska, J.M., 1997. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci*. 111, 259-66.
- Waters, E.M., et al., 2008. Ultrastructural localization of extranuclear progesterin receptors in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 511, 34-46.
- Weiland, N.G., et al., 1997. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol*. 388, 603-12.
- Woolley, C.S., et al., 1990. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*. 10, 4035-9.
- Woolley, C.S., McEwen, B.S., 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*. 12, 2549-54.
- Woolley, C.S., Schwartzkroin, P.A., 1998. Hormonal effects on the brain.

- Epilepsia. 39 Suppl 8, S2-8.
- Yoshiya, M., et al., 2013. Corticosterone rapidly increases thorns of CA3 neurons via synaptic/extranuclear glucocorticoid receptor in rat hippocampus. *Frontiers in Neural Circuits*. 7.
- Yuen, G.S., McEwen, B.S., Akama, K.T., 2011. LIM kinase mediates estrogen action on the actin depolymerization factor Cofilin. *Brain Res.* 1379, 44-52.
- Znamensky, V., et al., 2003. Estrogen levels regulate the subcellular distribution of phosphorylated Akt in hippocampal CA1 dendrites. *J Neurosci*. 23, 2340-7.
- 大石博士論文, 2007. 海馬におけるニューロステロイドのシナプス作用の解析.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方にご協力を頂きました。若杉准教授には、本研究を行うにあたり、方針や考え方などにおいてご意見や助言をくださり、丁寧にご指導を頂きましたことに深く感謝いたします。また、川戸教授、北條博士 (埼玉医科大学 助教授)、木本助教授には、実験・研究の基本的な考え方から実験の手技まで、丁寧なアドバイスをいただき、ご指導下さったことに謹んで感謝いたします。その他、研究生生活を通して支えてくださった多くの方々に感謝致します。本研究を通して学んだことを活かし、今後も精進して参りたいと思います。誠にありがとうございました。