

# 学位論文

海馬内ニューロステロイドによる神経シナプス作用の解析  
(Analysis of synaptic modulation by hippocampal neurosteroids)

平成 26 年 12 月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科

物理学専攻

長谷川 賢卓

## Abstract

海馬は記憶と密接に関わっており、海馬スライスを用いた電気生理学的実験において、強い刺激であるテタヌス刺激やシータバースト刺激 (TBS: theta burst stimulation) を与えることにより、記憶の書き込み現象である長期増強 (LTP: Long-term potentiation) が誘導される。また、女性ホルモン (E2: Estradiol) は、投与してから 1 時間以内に記憶学習能を向上させることが、行動学実験により示されている。さらに、海馬自身には E2 (約 8 nM) を合成する能力があり、海馬シナプスには女性ホルモン受容体 (ER: Estrogen receptor) が存在する。以上から海馬で合成された E2 は海馬自身に作用して記憶学習能を変化させていることが示唆される。しかし、12 週齢成獣オスラット海馬スライスに E2 を短時間作用後、テタヌス刺激や TBS を用いて LTP を誘導しても、E2 によるさらなる LTP の増強は観測できないことが先行研究から示された。一方、12 週齢成獣オスラット海馬スライスに E2 を短時間作用し、それ自身では LTP を誘導できない弱い刺激である weak-TBS で刺激すると、E2 により LTP (E2-LTP) が引き起こされることが報告された。したがって、海馬で合成される E2 は神経シナプスへの弱い刺激に対して急性に効果を発揮し、E2-LTP を誘導することで記憶学習に重要な役割を担っている可能性がある。しかし、まだ E2-LTP の信号伝達系はわかっておらず、E2 と記憶学習の関係を理解するために E2-LTP 成立の信号伝達系を調べることは意義がある。そこで、本研究では E2 の急性効果による E2-LTP 成立の信号伝達系を示すことを目的に電気生理学的実験を行った。

12 週齢成獣オスラット海馬スライスに 10 nM E2 と阻害剤などを同時に 30 分間作用後、海馬スライスに weak-TBS を与えて E2-LTP を誘導することで次の結果を得た。(1) 女性ホルモン受容体  $ER\alpha$  /  $ER\beta$  が関与すること、(2) リン酸化酵素である MAPK (mitogen-activated protein kinase)、PKA (protein kinase A)、PKC (protein kinase C)、CaMK II ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II) が関与すること、(3) NMDA 型グルタミン酸受容体のサブユニット NR2B が関与することを示した。以上の結果と先行研究から、E2-LTP 成立における信号伝達系は、 $E2 \rightarrow ER\alpha / ER\beta \rightarrow MAPK$ 、PKA、PKC の活性化  $\rightarrow$  NMDA 受容体の活性化  $\rightarrow$  後シナプス内への  $Ca^{2+}$  流入量の増加  $\rightarrow$  CaMK II 活性化  $\rightarrow$  E2-LTP 成立という信号伝達系が示唆される。

先行研究により、海馬では女性ホルモン (E2) だけでなく、男性ホルモン (DHT: Dihydrotestosterone、約 7 nM) もまた合成されていることが示されている。よって、生体の海馬内において、女性ホルモンと男性ホルモンが同時に存在し、相互作用していることが考えられる。しかし、この両者の相互作用については調べられていない。したが

って、E2 と DHT を同時に作用させたときの急性効果の解析と、その信号伝達系の解明を目的として電気生理学的実験を行った。

12 週齢成獣オスラット海馬スライスに E2 と DHT をそれぞれ 10 nM の濃度で 30 分間作用後、海馬スライスに weak-TBS を与えることで次の結果を得た。DHT は E2-LTP 成立を阻害することを示した。一方、10 nM E2 と 3 nM DHT のように DHT の濃度が低い場合や、30 nM E2 と 10 nM DHT のように E2 の濃度が高い場合において、DHT により E2-LTP は阻害されないことも示した。続いて、DHT の E2-LTP 成立阻害の信号伝達系を調べるために、男性ホルモン受容体 (AR: Androgen receptor) のアンタゴニストと脱リン酸化酵素 Calcineurin の阻害剤を用いて実験した。その結果、AR と Calcineurin が DHT の E2-LTP 成立阻害に関与することが示された。以上の結果と Calcineurin が NMDA 受容体の脱感作を引き起こすことが報告されていることから、DHT の E2-LTP 成立阻害の信号伝達系は、DHT → AR → Calcineurin → NMDA 受容体の活性化阻害 → E2-LTP 成立阻害という信号伝達系が示唆される。

以上より本研究では、E2 の急性効果により E2-LTP が成立するための信号伝達系を示唆した。また、DHT が E2-LTP を抑制することを示し、その信号伝達系を示唆した。本研究と先行研究の結果から実際の生体内の海馬は、以下の状態であることが推測される。先行研究から海馬内の E2 と DHT の存在量は、E2 が 8 nM、DHT が 7 nM である。この結果を単純に解釈すると、海馬内では E2-LTP は常に成立しないことになる。しかし、この E2 と DHT の濃度は、海馬全体で平均したときの測定値である。また、先行研究では、E2 は NMDA 受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入により神経活動依存的に急速に合成される。このことから、1 つのシナプスに着目した場合、局所的には、神経活動依存的に E2 と DHT の濃度比は急激に変化する可能性がある。ゆえに、常に DHT により E2-LTP は抑制されているわけではなく、シナプス近傍においては、神経活動依存的に  $\text{E2} / \text{DHT} \gg 1$  となり、E2-LTP が成立していると考えられる。

今回の研究で得られた E2 の急性的な E2-LTP 成立の信号伝達系は、E2 の急性的な記憶学習に対する効果のメカニズム解明に貢献することが期待される。また、E2 は弱い刺激により E2-LTP を成立させるが、E2 と DHT が同じ濃度るとき、E2-LTP は成立しない。このメカニズムとして、E2 と DHT が NMDA 受容体を介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入量を制御していることが示唆された。細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  の過剰な流入は神経細胞死を引き起こすため、DHT には E2 による神経細胞の過剰な興奮を抑えることで神経細胞を守っている可能性がある。このように本研究の結果は、海馬内における E2 と DHT の相互作用による神経活動の変化の理解に貢献すると考えられる。

## Abstract

Estradiol (E2) is endogenously synthesized in the hippocampus. E2 supported LTP-induction (Long-term potentiation) (E2-LTP) upon weak-TBS (theta burst stimulation) in 12 weeks adult male rat hippocampal CA1 region. I investigated the mechanisms of E2 assisted LTP-induction. I used kinase inhibitors in order to examine the involvement of kinases in mechanism of LTP induction in the presence of E2. Androgen (T: testosterone, DHT: dihydrotestosterone) is also locally synthesized in rat hippocampus as E2. I suppose that E2-signaling may interact with signaling of T and DHT within synapses in the hippocampus. I investigated whether androgen affects E2-LTP, and the mechanisms of androgen effects on E2-LTP.

In this study, I used 12 weeks adult male rats. The hippocampal slices were incubated with 10 nM E2 together with inhibitors or agonists. I used kinase inhibitors for PKA, PKC, MAPK and CaMK II. I used agonists for estrogen receptors ( $ER\alpha$  and  $ER\beta$ ), and an antagonist for NMDA receptor subunit NR2B. After these incubations, slices were stimulated with weak-TBS. And then I observed E2-LTP induction. I found that PKA, PKC, MAPK were working in the downstream of  $ER\alpha$  /  $ER\beta$ . These kinases may activate NMDA receptors, leading to the increase  $Ca^{2+}$  influx through NMDA receptors and CaMK II activation. In order to examine androgen effects, I incubated androgen (10 nM T or 10 nM DHT) with 10 nM E2 for 30min, and then I applied weak-TBS stimulation. E2-LTP was blocked by the presence of 10 nM T and 10 nM DHT. I found that the presence of an antagonist of AR (androgen receptor) and an inhibitor of calcineurin (phosphatase) suppressed E2-LTP. Therefore, DHT may activate calcineurin through AR and then blocked E2-LTP.

In conclusion, hippocampal-derived E2 and androgen may play as essential neurotrophic factors, which modulate LTP.



## 目次

略語表 .....	8
第 1 章 序論 .....	10
1-1 海馬と長期増強 .....	10
1-1-1 海馬と記憶 .....	10
1-1-2 長期増強 (LTP: long-term potentiation) .....	11
1-1-3 海馬スライス標本と電気生理学的測定 .....	11
1-1-4 LTP 誘導刺激 .....	12
1-1-5 LTP の分子メカニズム .....	12
1-1-6 短期シナプス可塑性 .....	14
1-2 脳とニューロステロイド .....	15
1-2-1 ニューロステロイド (女性ホルモン、男性ホルモン) の海馬内合成 .....	15
1-2-2 海馬グルタミン酸神経細胞内の女性ホルモン受容体と男性ホルモン受容体 .....	16
1-2-3 記憶学習効率に対する女性ホルモンと男性ホルモンの効果 .....	17
1-2-4 女性ホルモンと男性ホルモンが海馬神経活動に及ぼす長期効果 .....	18
1-2-5 女性ホルモンと男性ホルモンが海馬神経活動に及ぼす急性効果 .....	19
1-3 本研究の目的 .....	21
第 2 章 実験方法 .....	23
2-1 実験動物 .....	23
2-2 試薬 .....	23
2-3 電気生理学的測定 .....	23
2-3-1 人工脳脊髄液 (ACSF: artificial cerebrospinal fluid) .....	24
2-3-2 急性海馬スライス作製法 .....	24
2-3-3 薬剤作用方法 .....	25
2-3-4 測定装置 .....	25
2-3-5 細胞外記録法による興奮性シナプス後電位測定 .....	26
2-3-6 LTP の誘導と測定 .....	29
2-3-7 Paired pulse facilitation (PPF) の測定 .....	29
2-3-8 統計解析 .....	29

第 3 章	結果 .....	31
3-1	E2-LTP 成立への女性ホルモン受容体 (ER $\alpha$ / ER $\beta$ ) の関与 .....	31
3-1-1	ER $\alpha$ / ER $\beta$ のアンタゴニストは E2-LTP の成立を阻害する .....	31
3-1-2	ER $\alpha$ アゴニストは weak-LTP を増強する .....	32
3-1-3	ER $\beta$ アゴニストは weak-LTP を増強する .....	32
3-2	リン酸化酵素と NMDA 受容体からなる E2-LTP 信号伝達系の解析 .....	32
3-2-1	ERK / MAPK, PKA, PKC の阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する .....	33
3-2-2	NR2B 阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する .....	34
3-2-3	CaMKII の阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する .....	35
3-3	海馬における男性ホルモンの E2-LTP に対する急性抑制効果の解析 ....	35
3-3-1	男性ホルモン T は E2-LTP を抑制する .....	35
3-3-2	男性ホルモン DHT は E2-LTP を抑制する .....	36
3-3-3	E2 と DHT の相互作用はお互いの濃度比に依存する .....	36
3-4	E2-LTP に対する抑制効果への男性ホルモン受容体 (AR) の関与 .....	37
3-4-1	AR アンタゴニストは DHT による E2-LTP 抑制効果を阻害する .....	37
3-5	E2-LTP 抑制効果への脱リン酸化酵素 Calcineurin の関与 .....	38
3-5-1	Calcineurin の阻害剤は DHT による E2-LTP 抑制効果を阻害する .....	38
3-6	E2 の作用時間と濃度変化による weak-LTP への影響 .....	38
3-6-1	E2-LTP と full-LTP との比較 .....	38
3-6-2	E2-LTP における E2 の作用時間依存性 .....	39
3-6-3	E2-LTP における E2 の作用濃度依存性 .....	39
3-7	E2-LTP の成立への mGluR1 の関与 .....	40
3-7-1	mGluR1 のアンタゴニストは E2-LTP の成立を阻害しない .....	40
第 4 章	考察 .....	41
4-1	海馬 CA1 領域における E2-LTP 成立の信号伝達系 .....	41
4-1-1	E2 は女性ホルモン受容体 (ER $\alpha$ / ER $\beta$ ) を介して下流のリン酸化酵素を駆動する .....	41
4-1-2	E2 は PKA, PKC を駆動する .....	42
4-1-3	E2 は ERK / MAPK, NR2B を駆動する .....	42
4-1-4	E2 は CaMKII を駆動する .....	42
4-1-5	E2 は mGluR1 を駆動しない .....	43
4-1-6	E2-LTP 成立のメカニズム .....	43

4-2 海馬 CA1 領域における DHT による E2-LTP 抑制効果の信号伝達系 .....	44
4-2-1 DHT は AR を介して下流の酵素を駆動する .....	44
4-2-2 DHT は脱リン酸化酵素 Calcineurin を駆動する .....	45
4-2-3 DHT の急性効果による E2-LTP 抑制のメカニズム .....	45
4-3 その他の E2 と DHT の伝達系が E2-LTP 成立・抑制に関与している可能性 .....	45
4-3-1 E2 と DHT による前シナプス制御により E2-LTP 成立・抑制が制御されている可能性は低い .....	46
4-3-2 E2 と DHT がグリア細胞に作用している可能性は低い .....	46
4-3-3 DHT の代謝物関与による E2-LTP 抑制の可能性は低い .....	46
4-4 海馬での女性ホルモンと男性ホルモンの合成と作用 .....	47
4-5 結論 .....	48
References .....	49
謝辞 .....	61

## 略語表

歯状回 (DG: dentate gyrus)

アンモン角 (CA: cornu ammonis)

高頻度刺激 (HFS: high-frequency stimulation)

低頻度刺激 (LFS: low frequency stimulation)

長期増強 (LTP: long-term potentiation)

長期抑圧 (LTD: long-term depression)

興奮性シナプス後電位 (EPSP: excitatory postsynaptic potential)

集合興奮性シナプス後電位 (fEPSP : field excitatory postsynaptic potential)

シナプス後肥厚 (PSD: postsynaptic density)

シータバースト刺激 (TBS: theta-burst stimulation)

プレグネノロン (PREG: pregnenolone)

プロゲステロン (PROG: progesterone)

デハイドロエピアンドロステロン (DHEA: dehydroepiandrosterone)

アンドロステンジオール (ADiol: androstendiol)

テストステロン (T: testosterone)

エストラジオール (E2: estradiol)

ジヒドロテストステロン (DHT: dihydrotestosterone)

女性ホルモン受容体 (ER: estrogen receptor)

男性ホルモン受容体 (AR: androgen receptor)

NMDA: *N*-methyl-D-aspartic acid

AMPA: alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

CaMK II :  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II

PKC: protein kinase C

PKA: protein kinase A

MAPK: mitogen-activated protein kinase

PP1: protein phosphatase 1

CREB: cAMP response element binding protein

Calcineurin: calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin、PP2B

I-1: Inhibitor-1

PPR: paired pulse ratio

PPF: paired pulse facilitation

PPD: paired pulse depression

PI3K: phosphoinositol 3-kinase

ERK: extracellular signal-regulated kinase)

PPT: propyl prazole triol

MED 64 システム: multi-electrode array system)

DDW: double distilled water

ERE: estrogen response element

# 第 1 章 序論

## 1-1 海馬と長期増強

### 1-1-1 海馬と記憶

海馬は側頭葉内側部に位置し、折れ曲がった細長い形をしている。脳の左右に 1 つずつ存在し、脳弓により繋がっている (Fig. 1-1)。また、海馬は長軸に対して垂直に切ると、どの断面も神経細胞が並んだ層状構造をしている。海馬は解剖学的、組織学的に明確な特徴を持ち、歯状回 (DG: dentate gyrus)、アンモン角 (CA1-CA3: cornu ammonis) に分けられる。歯状回には顆粒細胞、アンモン角には錐体細胞という興奮性の神経細胞が存在し、層状に配列している。アンモン角は錐体細胞の特徴から CA1、CA2、CA3 に分類される。海馬の層状構造は、歯状回では、(1) 分子層 (stratum moleculare)、(2) 顆粒細胞層 (stratum granulosum)、(3) 多形細胞層 (stratum multiforme) の 3 層に分けられる。また、アンモン角では、(1) 白板 (alveus)、(2) 上昇層 (stratum oriens)、(3) 錐体細胞層 (pyramidal cell layer)、(4) 放射状層 (stratum radiatum)、(5) 網状分子層 (stratum lacunosum- moleculare) の 5 層に分けられる (Fig. 1-1)。CA3 では錐体細胞層と放射状層の間に透明層 (stratum lucidum) と呼ばれる層が存在し、ここに歯状回からの苔状線維 (mossy fiber) が投射する。このように、海馬は長軸方向のどの断面に対しても同じ層状構造を持つので、この層状構造が記憶回路の形成に重要な役割を担うと考えられてきた。

海馬内での主要な情報伝達経路は、次のようになっている。海馬外の嗅内皮質第 2 層から歯状回の分子層に存在する顆粒細胞の樹状突起に貫通線維 (perforant pathway) が入力した後、顆粒細胞の細胞体から出た軸索である苔状線維 (mossy fiber) が、歯状回の多形細胞層を通り、CA3 の透明層内にある樹状突起に入力する。そして、CA3 よりシャーファー側枝 (schaffer collateral) と呼ばれる軸索が、CA1 の放射状層に存在する錐体細胞の樹状突起に入力する。さらに、CA1 を出た軸索は再び海馬外へと進み、内嗅皮質の第 4、5、6 層のいずれかに入力する。すなわち、内嗅野 → (貫通線維) → 顆粒細胞 → (苔状線維) → CA3 錐体細胞 → (シャーファー側枝) → CA1 錐体細胞 → 内嗅野と一巡する主要な経路を作る。この他にも反対側海馬との間に交連性投射が行われており、中隔、扁桃核、視床とも線維連絡を行っている (Fig. 1-1)。

記憶は陳述記憶と非陳述記憶に分類でき、陳述記憶の形成に側頭葉が重要な役割を担っていることが知られている。陳述記憶の形成に側頭葉が重要であることは、H.M. の症例から明らかになった。H.M. は手術により、側頭葉内側部を切除したことで、海馬やその他の部位の多くを失った結果、以前の記憶を思い出せなくなる逆行性健忘症と新しい

ことが覚えられなくなる重度の前向き健忘症を発症した (Scoville and Milner, 1957)。海馬を失うことでこのような記憶障害が生じたことから、陳述記憶の形成には海馬が重要とする証拠となった。また、海馬で作られた記憶は睡眠中に整理され、大脳皮質の側頭葉に送られて「長期記憶」として貯えられることが報告されていることから (Wilson and McNaughton, 1994, Nakashiba et al., 2009)、海馬は記憶の形成に重要な役割を担うことがわかる。

以上から、海馬は解剖学的に記憶形成に適した構造を持ち、主要な経路を通じて情報を伝達すると考えられる。また、H.M.の症例などから、海馬と記憶は密接に関わっていると考えられている。

### 1-1-2 長期増強 (LTP: long-term potentiation)

長期増強 (LTP: long-term potentiation) はシナプス可塑性の 1 つであり、シナプスの情報伝達効率が数時間から数日程度増強される現象である。

1949 年、Donald Hebb は、シナプス伝達効率が長期的に変化することで、記憶が作られるという仮説を唱えた (Hebb, 1949)。以降、この現象を見つけるために多くの研究がなされてきた。1973 年、Bliss と Lomo により、初めて高等動物でシナプス伝達効率が長期にわたり変化する現象が起こると報告された (Bliss and Lomo, 1973)。彼らは麻酔下のウサギを用いて、in vivo で、海馬の歯状回の貫通線維に高頻度刺激 (HFS: high-frequency stimulation) を与えた。その結果、顆粒細胞層のシナプス伝達効率が増強し、長時間持続することを示した。この現象が後に LTP と呼ばれるようになった。したがって、海馬で記憶の書き込み過程である LTP が存在することが示され、海馬と LTP に大きな注目が集まった。

LTP と反対の向きにシナプス可塑性が起こる現象である、長期抑圧 (LTD; long-term depression) も知られている。これは、シナプス伝達効率が、ある一定期間減少する現象である。LTD もまた、LTP と同様に記憶のメカニズムにおいて重要な役割を果たすと考えられており、注目されている。

### 1-1-3 海馬スライス標本と電気生理学的測定

1975 年、脳から取り出した海馬をスライス状にして、神経細胞に電気刺激を in vitro で与えても、シナプスの反応を記録できることが報告された。また、高頻度刺激のように強い刺激を海馬スライス標本に与えると LTP を誘導できることが示されて、LTP はシナプス後電位の増大であることが示された (Schwartzkroin and Wester, 1975)。したがって、in vivo の海馬を用いなくても、海馬スライス標本を用いて、興奮性シナプス後電

位 (EPSP: excitatory postsynaptic potential) の変化を測定すれば、LTP を調べることができるようになり、海馬スライス標本は LTP の研究を大きく前進させた。

#### 1-1-4 LTP 誘導刺激

LTPを誘導する高頻度刺激には複数の種類がある。代表的なものとしてテタヌス刺激 (tetanic stimulation) とシータバースト刺激 (TBS: theta-burst stimulation) がある。テタヌス刺激は、100 Hzの刺激を1秒間与える刺激であり、海馬LTP研究において、初期から使用され、今日においてもLTP誘導刺激として多用されている。一方、TBSは、1バースト (200 msの間に、100 Hzで1パルスの刺激を数回) × 10回の条件で使用されている。また、LTPの増強率はバースト数の増加に応じて増加し、10バーストで飽和する (Larson et al., 1986)。ちなみに、TBSは、 $\theta$ リズム (4 ~ 7 Hz) を模して実験的に作られた刺激であり、 $\theta$ リズムは学習や記憶形成に関与することが示唆されている。 $\theta$ リズムは、中隔野から海馬に投射するコリン作動性ニューロンとGABA作動性ニューロンとの相互作用により生じる4 ~ 7 Hzの海馬特有のリズムである (Konopacki and Golebiewski, 1993)。行動実験において、ラットの中隔野の破壊により海馬の $\theta$ リズムが消失すると、空間記憶ができなくなることが報告されている (Winson, 1978)。また、ラットが探索行動や学習をするときに海馬で $\theta$ リズムが現れることも知られている (Hill, 1978, Buzsaki et al., 1989, Buzsaki, 2002)。したがって、TBSを用いてLTPの誘導を行うことに生理的意義があると考えられている。

#### 1-1-5 LTP の分子メカニズム

LTP には複数の種類があるが、中でも海馬 CA3 領域から海馬 CA1 領域へ投射しているシャーフター側枝からの入力による、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型グルタミン酸受容体依存性の LTP (以下、LTP とは NMDA 受容体依存性の LTP を指す) が有名である。通常、神経細胞に1発の電気刺激を与えると、前シナプスからグルタミン酸が放出され、後シナプスの alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合する。その結果、AMPA 受容体が開き、 $\text{Na}^+$ が細胞外から細胞内に流入することで脱分極が生じる (Fig. 1-2)。この時、NMDA 受容体は  $\text{Mg}^{2+}$ によってブロックされているため、イオンを通さない。一方で、LTP が生じる際は、神経細胞に高頻度刺激を与えるため、前シナプスから大量のグルタミン酸が放出される。その結果、後シナプスの NMDA 受容体の  $\text{Mg}^{2+}$ ブロックが外れるほど大きな脱分極が生じ、細胞外液 ( $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 2 mM 程度) から NMDA 受容体を通して、高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$ が一時的に細胞内に流入する (10  $\mu\text{M}$  程度) (Neveu and Zucker, 1996, Yang et al.,



1999, Sabatini et al., 2002, Higley and Sabatini, 2012)。この一時的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇 (Lynch et al., 1983, Malenka et al., 1988) によって、CaMK II ( $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulin-dependent protein kinase II) や、PKC (protein kinase C)、PKA (protein kinase A)、MAPK (mitogen-activated protein kinase) などの各種リン酸化酵素が活性化する (Bliss and Collingridge, 1993, Malenka and Nicoll, 1999, Sweatt, 2001, Lynch, 2004, Malenka and Bear, 2004, Salter and Kalia, 2004, Luscher and Malenka, 2012)。CaMK II は後シナプスに高濃度で存在していることが分かっている (Lisman, 1989, Lisman et al., 2002, Lisman et al., 2012)。LTP の初期の段階において、活性化された CaMK II は AMPA 受容体のリン酸化を引き起こし (Derkach et al., 1999)、AMPA 受容体から細胞内への  $\text{Na}^+$  イオン流入量が増加する (Benke et al., 1998)。さらに、活性化した CaMK II は AMPA 受容体を PSD (postsynaptic density) へ挿入することも分かっている (Ehlers, 2000)。また、CaMK II と同様に、PKC は AMPA 受容体のリン酸化を引き起こす (Mammen et al., 1997, Lee et al., 2000, Boehm et al., 2006)。一方、PKA は阻害タンパク質-1 (I-1) をリン酸化し、リン酸化された I-1 が PP1 (protein phosphatase 1) の活性化を阻害する。よって、I-1 が PP1 による CaMK II の脱リン酸化を防ぐため、CaMK II の自己リン酸化が長く続く (Blitzer et al., 1998, Soderling and Derkach, 2000)。したがって、各種リン酸化酵素の働きにより、シナプス応答の伝達効率の上昇が数時間程続き、LTP が成立する。次に、伝達効率上昇の維持は、スパインの増大や (Matsuzaki et al., 2004, Harvey and Svoboda, 2007, Holtmaat and Svoboda, 2009, Kasai et al., 2010)、PSD の増加 (Toni et al., 2001)、新しいシナプスの形成に必要なタンパク質の合成などにより引き起こされる。ちなみに、タンパク質の合成は、PKA や CaMKIV、PKM- $\zeta$ 、MAPK により、樹状突起上で局所的に誘導されることや、CREB (cAMP response element binding protein) により、核での転写・翻訳を経て起こるとされている (Bliss et al., 2006, Pastalkova et al., 2006, Sacktor, 2008, Luscher and Malenka, 2012)。このように、シナプス応答の伝達効率上昇が維持されることで、LTP が数日程度続く。

行動学実験を用いた研究からも、LTP に重要な NMDA 受容体や CaMK II と、記憶学習との関連が報告されている。例えば、空間記憶能力をテストする Morris water maze を用いた研究では、NMDA 受容体の阻害剤を使うことで、学習に障害が出ることが報告されている (Morris, 1984, Morris et al., 1986)。また、海馬 CA1 領域に局限して NMDA 受容体の遺伝的欠損をさせたマウスを用いた研究では、LTP、LTD、記憶学習能力に障害がみられることが報告されている (Tsien et al., 1996a, Tsien et al., 1996b)。さらに、一時記憶 (短期記憶) の形成には、海馬 CA1 領域の NMDA 受容体が必要なが報告されている (Huerta et al., 2000)。また、NMDA 受容体のサブユニット NR2B を過剰に発現

したマウスは、高い記憶学習能力を示すことも報告されている (Tang et al., 1999, Tang et al., 2001)。そして、CaMK II  $\alpha$  のノックアウトマウスを用いた研究では、海馬 LTP と記憶学習の両方に障害がみられることが報告されている (Silva et al., 1992a, Silva et al., 1992b)。したがって、海馬 CA1 領域において行われる記憶学習には、NMDA 受容体や CaMK II が重要な役割を担っていることや、海馬 CA1 領域が空間記憶に関わっているといえる。

近年、実際の学習により LTP が引き起こされることが示されている。Inhibitory avoidance task をラットに行わせたとき、in vivo で AMPA 受容体のリン酸化と AMPA 受容体数の増加、EPSP の増強が生じること、さらに、増強した EPSP は HFS を与えてもさらに増強しないことが報告された (Whitlock et al., 2006)。また、上記と同様にラットに Inhibitory avoidance task を行わせると、30 分から 1 時間程度で、AMPA 受容体から細胞内へのイオン流入量が増加することが報告されている (Mitsushima et al., 2011)。したがって、行動学実験でラットが記憶学習を行うと、LTP が誘導されることが示された。

NMDA 受容体依存性の LTD 誘導には、脱リン酸化酵素 Calcineurin (calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin, PP2B) と、PP1 が関与することが知られている (Lisman, 1989)。具体的には、Calcineurin が I-1 の脱リン酸化を引き起こすことで、PP1 の活性が高まる。そして、PP1 が CaMK II の脱リン酸化を引き起こすことで LTD が生じると報告されている (Soderling and Derkach, 2000)。

以上から、LTP の誘導には、リン酸化酵素や NMDA 受容体が重要な役割を持ち、LTD の誘導には、脱リン酸化酵素と、LTP と同様に NMDA 受容体が重要な役割を担っていることがわかる。

#### 1-1-6 短期シナプス可塑性

入力線維を短時間の、ある一定間隔 (約 20 ms ~ 200 ms) で 2 回刺激すると、第 1 刺激に対するシナプス応答とは異なる、第 2 刺激に対する応答が観測される。このように短期的な応答に対してもシナプス可塑性が見られ、この現象を短期シナプス可塑性という。第 2 刺激の応答の大きさを第 1 刺激の応答の大きさを割った値を PPR (paired pulse ratio) とし、PPR > 1 となる応答を PPF (paired pulse facilitation)、PPR < 1 となる応答を PPD (paired pulse depression) という。海馬 CA1、CA3 領域では PPF、海馬 DG 領域では内側貫通線維で PPD、外側貫通線維で PPF が観測されることが報告されている (Rush et al., 2001)。また、短期シナプス可塑性は、前シナプスからの神経伝達物質の放出量の変化として説明できると考えられている (Dobrunz and Stevens, 1997)。第 1 刺激による放出量が少ないほど PPF が高くなり、第 1 刺激による放出量が多いほど PPF が低くなる。

なぜなら、第 1 刺激後、前シナプス終末内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が第 2 刺激時まで残存しているため、残存している  $\text{Ca}^{2+}$  と第 2 刺激時に前シナプス終末内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が加算されるからである。実際、残存  $\text{Ca}^{2+}$  量と PPF には相関があることが示されている (Wu and Saggau, 1994)。このように、LTP 誘導刺激の前後で PPF の割合 (PPF ratio) が変化した場合、前シナプスからの神経伝達物質の放出量に影響を与えていることが示唆される。そのため、薬理作用が前シナプスあるいは、後シナプスのどちらに依存しているかを示す指標と考えられている (Zucker, 1989, Manabe et al., 1993, Dobrunz and Stevens, 1997)。したがって、短期シナプス可塑性は前シナプスからの寄与を測る電気生理学的な 1 つの指標として考えられている。

## 1-2 脳とニューロステロイド

川戸研究室の先行研究より、オスとメスの両方の海馬内でステロイドホルモンである女性ホルモン (E2: estradiol) と男性ホルモン (T: testosterone, DHT: dihydrotestosterone) が合成されることが示された (Hojo et al., 2009, Kato et al., 2013)。このように脳内で合成されるステロイドホルモンをニューロステロイドという。

### 1-2-1 ニューロステロイド (女性ホルモン、男性ホルモン) の海馬内合成

一般的に、女性・男性ホルモンを含むステロイドホルモンは、末梢の性腺 (卵巣・精巣) で作られて、血流で脳に運ばれ脳内で作用すると考えられてきた。しかし、近年、性腺で合成されるステロイドホルモンではなく、脳内で合成されるステロイドホルモンをニューロステロイドと呼び、ニューロステロイドが脳内で直接作用すると考えられている。1980 年代に、脳内の PREG (pregnenolone)、PROG (progesterone)、DHEA (dehydroepiandrosterone) 濃度が血中と比べ非常に高いことや (Corpechot et al., 1981, Baulieu and Robel, 1998)、末梢での性ホルモン合成器官である副腎や精巣を摘出しても、その濃度が下がらないことが示され (Corpechot et al., 1981, Robel et al., 1987)、脳内でステロイドホルモンが合成されていることが示唆された。また、川戸研究室の先行研究から、ステロイドホルモンの合成に関わる P450 (17 $\alpha$ ) がグルタミン酸神経細胞に発現していることや (Kawato et al., 2002, Hojo et al., 2004)、女性・男性ホルモン合成に関わる一連の酵素群 (17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase など) が、全て海馬で発現していることが示された (Ishii et al., 2007, Kimoto et al., 2010)。さらに、免疫組織染色と放射性標識した基質ステロイドを用いた代謝実験から、女性・男性ホルモン合成酵素群が、海馬神経細胞内に局在していることや、女性・男性ホルモン合成活性を持つことが報告されている (Hojo et al., 2004)。以上の報告により、オスラット海馬には Fig. 1-3 に示すような、

コレステロールから女性・男性ホルモンに至るニューロステロイド合成系が存在することが示された。

女性ホルモン (E2) と男性ホルモン (T, DHT) の海馬内での合成などについて、それぞれで異なる特徴をもつことが示されている。オスラット海馬内の E2 濃度は 8.4 nM であり、血中の 800 倍と非常に高濃度であることから、海馬内 E2 は血中由来ではなく、海馬における局所合成の寄与が大きいことが示されている (Hojo et al., 2009)。一方で、T の海馬内濃度は血中とほぼ変わらず 16.9 nM であり、DHT の海馬内濃度は血中の約 7 倍の 6.6 nM である。よって、T と DHT の海馬内での合成は E2 よりも少ないことが示されている (Hojo et al., 2009)。また、前述の E2 や DHT は、T から変換されることによって合成される。In vitro の系において、T から E2 への変換は、T から DHT への変換よりも遅く、変換される量も少ないことが示されている。さらに、E2 は代謝される速度が遅いことや、DHT は代謝物である 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol へ急速に変換されることが示されている (Hojo et al., 2004, Hojo et al., 2008)。したがって、女性ホルモンと男性ホルモンでは、合成や T からの変換、そして、代謝に関して異なる特徴を持つことがわかる。

### 1-2-2 海馬グルタミン酸神経細胞内の女性ホルモン受容体と男性ホルモン受容体

E2 の受容体は女性ホルモン受容体 (ER: estrogen receptor) であり、ER のサブタイプは ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の 2 種類存在する。川戸研究室の先行研究により、ER $\alpha$  が海馬 CA1, CA3, DG 領域のグルタミン酸神経細胞層に沿って発現することや、グリア細胞と介在神経細胞での発現は少ないことが示された (Mukai et al., 2007)。一方、ER $\beta$  の場合、現在は脳組織の ER $\beta$  に対する抗体は存在するが、特異性の高い抗体は存在しないため、脳内での局在について、はっきりとした結論が得られていない。しかし、免疫組織染色の結果から、ER $\beta$  もグルタミン酸神経細胞に発現しているという説が有力とされている (Milner et al., 2005)。

ER $\alpha$  と ER $\beta$  は、E2 の結合により 2 量体を形成し、核へ移行して遺伝子転写を制御する受容体として広く知られている。しかし、近年において、海馬で E2 が ER $\alpha$  あるいは ER $\beta$  に結合後、核へ移行せず、リン酸化酵素を駆動している可能性が示された (Mukai et al., 2007)。また、細胞膜に存在し、E2 が結合後、核へ移行せずにリン酸化酵素を駆動する G タンパク質共役型受容体 GPR30 (G-protein coupled receptor 30) など、ER $\alpha$  / ER $\beta$  の他に E2 に対する新規の受容体も報告されている。しかし、未だ新規の受容体の存在に確証は得られていない (Brailoiu et al., 2007, Mukai et al., 2010)。したがって、現在のところ、30 分から数時間程度で効果を発揮する E2 の急性効果は、海馬において、神経シ

ナプス内に存在する ER $\alpha$  と ER $\beta$  に E2 が結合し、リン酸化酵素を駆動することによって生じる可能性が高いと考えられる。

T と DHT の受容体は、男性ホルモン受容体 (AR: androgen receptor) である。AR は海馬グルタミン酸神経細胞に存在し、発現量は CA1>CA3>>DG であることが報告されている (Tabori et al., 2005)。また、AR も ER と同様に核に移行後、転写を制御する受容体として広く知られているが、近年では、核に移行せずにリン酸化酵素や脱リン酸化酵素を駆動する可能性が示されている (Foradori et al., 2008, Hatanaka et al., 2009, Hatanaka et al., 2014)。したがって、T と DHT の急性効果は、神経シナプス内に存在する AR に T と DHT が結合し、核に移行することなく、リン酸化酵素や脱リン酸化酵素を駆動することによって生じる可能性が高いと考えられる。

### 1-2-3 記憶学習効率に対する女性ホルモンと男性ホルモンの効果

女性ホルモンは記憶学習能力を向上させることが、ラットを用いた行動学実験の結果から示唆されている。

卵巣除去後のメスラットに Morris water maze による学習課題を行うと、卵巣除去のみを行ったメスラットに比べて、卵巣除去後に E2 を腹腔内に投与したメスラットの方が、投与 1 日後の学習効率が高いことが報告された。これは、E2 が記憶学習効率を上昇させることを示唆している。さらに、同じグループがオス・メスの海馬に直接 E2 を注入して実験を行ったところ、1 日後の学習効率がオス・メスの両方で上昇したという報告がある (Packard et al., 1996, Packard, 1998)。この結果は、E2 が海馬に作用して記憶学習効率に好影響をもたらすことを示唆している。女性ホルモンによる空間記憶学習効率の上昇については、メスラットにおいて他にも多くの報告がある (Fader et al., 1998, Gibbs et al., 1998, Daniel et al., 1999, Gibbs, 1999)。一方で、成獣メスラットでは E2 の空間記憶学習効率の上昇効果はないという報告もある。Markham らは、老齢メスラットでは女性ホルモン投与により空間記憶学習効率が上昇するが、成獣メスラットでは上昇しないと報告している (Markham et al., 2002)。オスについての報告はほとんどなく、上記の Packard らの報告 (Packard et al., 1996, Packard, 1998) と、老齢オスマウスに E2 を投与すると Morris water maze の学習効率が上昇するという報告のみである (Frye et al., 2005)。また、ヒトの女性更年期障害などに対する女性ホルモン補充療法が知られている。これは更年期に減少した女性ホルモンを補うために、外部から女性ホルモンを補充する治療法である。女性ホルモン補充療法は、副次的な効果として、更年期に低下した記憶力を回復することが報告されている (Phillips and Sherwin, 1992, Kampen and Sherwin, 1994)。また、最近の研究において、卵巣摘出したマウスに ER $\alpha$  のアゴニスト

を投与し、40 分以内に記憶学習テストを行うと、テストの成績が向上することが示された。これにより、ER $\alpha$  を介した E2 の急性的な効果は、in vitro の系だけでなく、行動学実験でも生じることが示された (Phan et al., 2011)。以上から、女性ホルモンにより記憶学習効率が高まっている可能性は高い。また、行動学実験において、E2 の投与後 24 時間程度で効果が現れる長期効果だけでなく、数十分から数時間程度で効果が現れる急性効果も存在することがわかってきた。

男性ホルモンの効果に関する記憶学習を調べた研究はいくつかある。例えば、55 日齢のオスラットに Inhibitory avoidance test と Morris water maze task を行った実験がある。この実験では、ラットに対してテストの直前直後でそれぞれ AR のアンタゴニストである Flutamide を海馬内に直接投与すると、両方の学習課題に対して学習効率が低くなると報告されている。一方、学習の 2 時間後にのみ Flutamide を海馬内に直接投与すると学習効率に影響を及ぼさなかったと報告している。したがって、記憶の書き込み過程および、定着に AR が関与していることが示された (Edinger and Frye, 2007b)。また、55 日齢の GDX (精巣摘出) ラットの海馬内に T と DHT を直接投与すると Inhibitory avoidance test において学習課題に対するパフォーマンスが上昇したという報告がある (Edinger and Frye, 2007a)。しかし、イランのグループは、約 8 週齢 GDX オスラットに対して、Inhibitory avoidance test を行った場合、学習効率に影響が無いことを報告している。また、学習課題の直前直後で、海馬内に T を直接投与すると記憶学習のパフォーマンスが落ちることが報告されており、T には記憶学習効率を下げる効果があることが示された (Naghdi and Asadollahi, 2004, Harooni et al., 2008)。したがって、行動学実験において、男性ホルモンによる記憶学習への効果は、記憶学習に効果があるという報告と記憶学習に効果がないという報告があり、詳しくわかっていない。

#### 1-2-4 女性ホルモンと男性ホルモンが海馬神経活動に及ぼす長期効果

E2 の作用後、24 時間程度で神経細胞に影響を及ぼす長期効果があることが知られており、神経細胞死に対する神経保護作用や、スパイン密度の増加、LTP の増強などが報告されている。長期効果の作用経路は、E2 が ER に結合し、核に移行した後、新しいタンパク質の合成が行われることで、様々な効果を発揮するという作用経路である。例えば、神経保護作用について、以下の報告がある。酸化ストレスによる海馬神経細胞死に対して、E2 が神経細胞を保護することが報告されている (Behl et al., 1995)。また、神経細胞死に対して、E2 が ER を介して、MAPK や phosphoinositol 3-kinase (PI3K) / Akt を駆動することで、神経細胞が保護されることが示されている (Zhang et al., 2001, Mize et al., 2003)。一方、スパインのシナプス可塑性については、メスラットにおいて卵巣除

去 7 日後に海馬 CA1 領域の全スパイン密度が減少する。しかし、卵巣除去 3 日後から 7 日後まで E2 を皮下注射し続けると、卵巣除去から 7 日後でも全スパイン密度が変化しないことが示された (Woolley et al., 1990)。また、培養神経細胞に E2 を作用させると、24 時間後に全スパイン密度が増加することが示されている (Murphy and Segal, 1996)。LTP については、卵巣除去後のメスラットに、E2 を腹腔内投与してから 2 日後、in vivo の状態で高頻度刺激を与えると海馬 CA1 領域の LTP が増強する (Cordoba Montoya and Carrer, 1997)。同様に、メスラットの卵巣除去後、2 回 E2 を皮下注射してから 24 時間後に急性海馬スライスを作成し、海馬 CA1 領域で LTP を誘導すると、E2 を投与しない場合に比べて LTP がさらに増強する。この増強に NMDA 受容体のサブユニット NR2B が関与することが報告されている (Smith and McMahon, 2006, Smith et al., 2009)。さらに、E2 の長期的な作用により、NR2B を含む NMDA 受容体由来のイオン流入量が増加することが報告されている (Smith and McMahon, 2006, Smith et al., 2009, Xu et al., 2011, Vedder et al., 2013)。このように、シナプス可塑性に及ぼす E2 の長期効果については多くの研究がある。

T と DHT も、E2 と同様の古典的な作用経路により長期効果を発揮する (Foradori et al., 2008)。しかし、海馬での LTP に及ぼす影響についてはほとんど研究されていない。

#### 1-2-5 女性ホルモンと男性ホルモンが海馬神経活動に及ぼす急性効果

近年の研究から、E2 には、数十分から数時間程度で効果が現れる急性効果もあることが明らかになってきた (Woolley, 2007)。川戸研究室の先行研究から、12 週齢成獣オスラットの急性海馬スライスに 1 nM E2 を 2 時間作用させると、海馬 CA1 領域のスパイン密度が増加する (Mukai et al., 2007, Hojo et al., 2008)。また LTD 誘導前 30 分から 1 ~ 10 nM の E2 を灌流作用させたとき、LTD が増強される (Mukai et al., 2006, Mukai et al., 2007, Ogiue-Ikeda et al., 2008)。

LTP に関する報告において、2 ~ 4 週齢ラットの急性海馬スライスに E2 を灌流作用させることで、集合興奮性シナプス後電位 (fEPSP : field excitatory postsynaptic potential) の値が上昇し、その結果テタヌス刺激により誘導される LTP が増強することが報告されている (Foy et al., 1999, Bi et al., 2000, Kramar et al., 2009)。しかし、12 週齢成獣オスラット海馬スライスに対して、1 ~ 10 nM E2 を 30 分間作用させた場合、E2 による fEPSP の増加や、強い刺激であるテタヌス刺激や TBS により誘導された LTP のさらなる増強は示されなかった (Ito et al., 1999, Ogiue-Ikeda et al., 2008, 新堂, 2010, Ooishi et al., 2012)。したがって、E2 の LTP に対する急性作用は週齢において大きく異なることが示唆される。

12 週齢成獣オスラット海馬スライスに対して、TBS のパルス数を減らして弱い TBS とした場合、この弱い TBS で刺激しても LTP は誘導されない。しかし、E2 を 10 nM の濃度で 30 分間作用させて、弱い TBS を海馬スライスに与えると、強い刺激で誘導した LTP と同程度の増強率を示す LTP (E2-LTP) が成立することが示された (新堂, 2010)。したがって、12 週齢成獣オスラット海馬において、それ自身では LTP を成立させない弱い TBS を用いた場合、E2 により LTP が誘導されることがわかった。

E2 の急性効果の信号伝達系に関しては、以下のような先行研究がある。12 週齢成獣オスラット海馬において、ステロイドであるコルチコステロンは LTP を抑制するが、E2 を同時に作用させると、抑制された LTP を回復させることが報告されている。上記の E2 による回復効果の信号伝達系は NMDA 受容体由来 fEPSP の測定から示された。すなわち、E2 が ER を介して ERK (extracellular signal-regulated kinase) / MAPK を駆動させ、NMDA 受容体のサブユニット NR2B を制御する (Ooishi et al., 2012)。また、その他にも E2 が ER の下流のリン酸化酵素や受容体 (ERK / MAPK, PI3K, CaMK II, NR2B) を活性化させるという報告がある (Dominguez et al., 2007, Logan et al., 2011)。よって、急性効果における E2 とリン酸化酵素や NMDA 受容体との関連を示す報告は多くあるが、E2-LTP 成立に関わる E2 の伝達経路はよくわかっていない。

近年、メスラット海馬において、E2 が ER $\alpha$  を介して、その下流に存在する代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 1 (mGluR1) に作用することが示唆されている。また、メスラット由来海馬培養神経細胞に E2 を作用させると、ERK / MAPK を介した cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) のリン酸化が生じることが報告されている (Boulware and Mermelstein, 2005, 2009)。一方、オスラット由来海馬培養神経細胞に対しては、E2 の効果が観測されないことを報告している (Boulware and Mermelstein, 2005, 2009)。したがって、オスとメスで異なる信号伝達系が存在することを示唆している。

去勢後のラットに T や DHT を作用させると、海馬 CA1 領域において、LTP が生じないことが報告されている (Harley et al., 2000, Hebbard et al., 2003)。また、オスラット海馬 CA3 領域において、去勢していない場合、LTP が誘導されないことが示されている。しかし、去勢したラットでは、LTP が誘導されると報告している。さらに、去勢したラットの海馬スライスに DHT を作用させると、LTP が誘導されないことも示されている (Skucas et al., 2013)。したがって、男性ホルモンは脳内で、LTP を抑える効果を発揮していることが示唆される。

最近の研究から、E2 合成酵素である cytochrome P450aromatase (P450arom) の阻害剤を海馬スライスに灌流で作用させることで、海馬 CA1 領域において、LTP が減少することや (Grassi et al., 2011)、PREG 合成酵素 cytochrome P450scc (P450scc) 阻害剤を作用



させることで fEPSP の値が減少し、海馬 DG 領域の LTP も阻害されることが報告されている (Tanaka and Sokabe, 2012)。海馬 CA1 領域で、海馬スライスに対して、AR と ER の阻害剤をそれぞれ灌流し、LFS (low frequency stimulation) により LTD を誘導したとき、LTD では AR の関与が示唆された。一方、HFS により LTP を誘導したとき、LTP では ER の関与が示唆された。HFS により LTP を誘導した際、AR と ER を同時に阻害したときは、ER の単独阻害時と、何も阻害していないときの中間の LTP 増強率となった。これは、DHT の効果が LTP にも関与していることを示唆している (Pettorossi et al., 2013)。上記の研究は、すべて E2 や DHT を直接作用させずにシナプス可塑性を測定している。つまり、局所合成されたニューロステロイド (E2, T, DHT など) が速やかに神経シナプス可塑性に影響することや、局所合成されたニューロステロイドが海馬内で重要な役割を担うことを示唆している。そして、これらの研究報告は、海馬内ニューロステロイド合成が神経活動により引き起こされるという川戸研究室の先行研究による報告を支持するものである (Hojo et al., 2004, Hojo et al., 2009, Kimoto et al., 2010)。

以上から、E2 の急性効果は週齢に依存しており、12 週齢成獣オスラット海馬では、強い刺激であるテタヌス刺激や TBS を海馬に与えても、LTP に影響を及ぼさなかった。しかし、E2 を作用後、弱い TBS を海馬に与えると、LTP (E2-LTP) が成立する現象が示された。このことから、12 週齢成獣オスラット海馬において、脳内での弱い刺激に対して、E2 により E2-LTP が成立する現象が起こることが示唆される。しかし、E2 とリン酸化酵素や NMDA 受容体との関係を示す報告はあるが、E2-LTP 成立に関する信号伝達系は未だよくかわっていない。また、局所合成された E2 が LTP 成立に海馬内で重要な役割を担うことが示唆されている。一方、男性ホルモンは LTP に関する報告例が少ないため、男性ホルモンの作用効果についてはよくわかっていない。しかし、去勢ラットを用いた実験結果から男性ホルモンが脳内で LTP の抑制に関与していることが示唆される。

### 1-3 本研究の目的

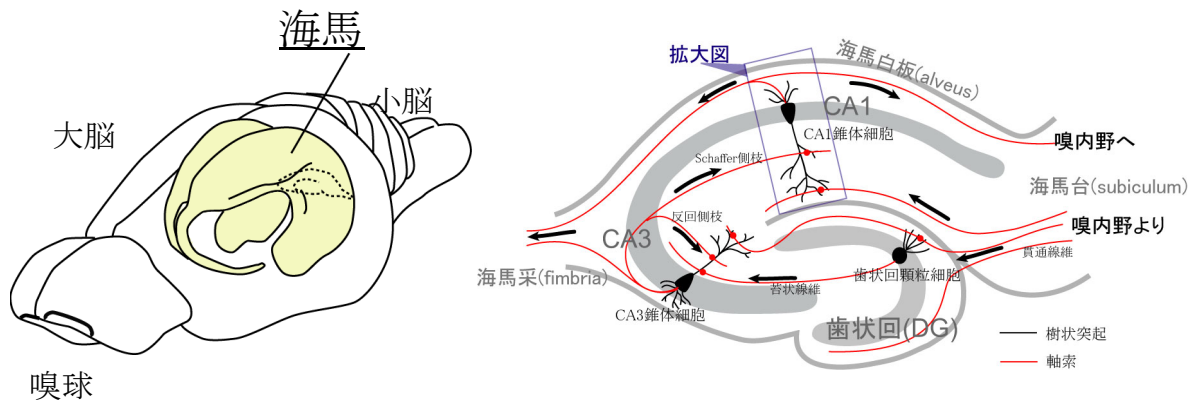
本研究では、2 つの目的に従い実験を行った。

**目的 1:** 女性ホルモン (E2) は、作用後 1 時間以内で記憶学習能を急性的に変化させる。また、先行研究から海馬において、E2 (約 8 nM) が合成されることや、神経シナプス内に女性ホルモン受容体 (ER) が存在することが報告されている。以上から海馬で合成された E2 が海馬自身に急性的に作用して記憶学習能を変化させていると考えられる。また、12 週齢成獣オスラット海馬スライスに、弱い刺激である weak-TBS を与えると LTP は

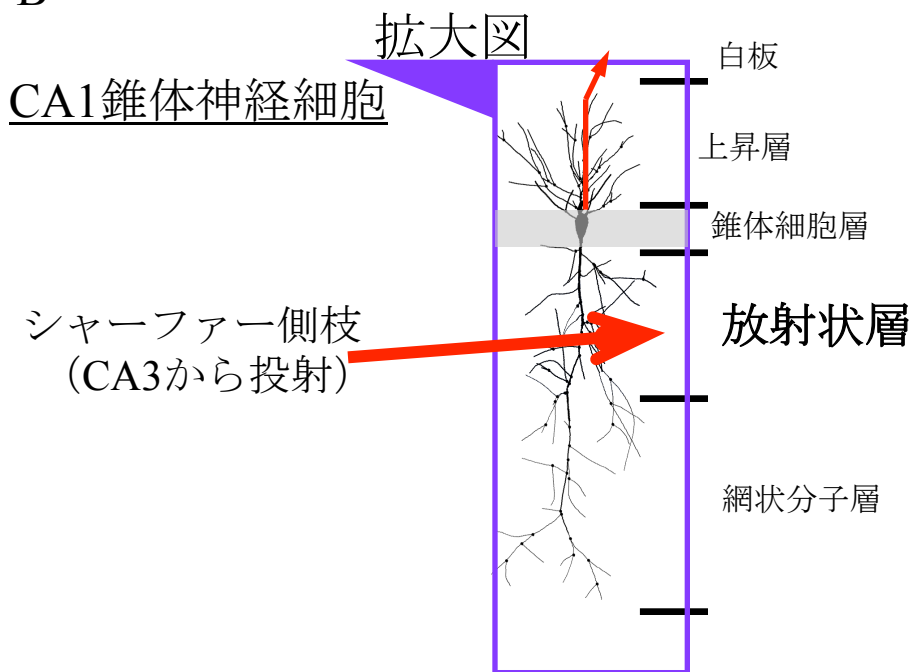
誘導されないが、E2 を短時間作用させた後に、weak-TBS を与えると LTP (E2-LTP) が生じることが報告された。したがって、海馬で合成される E2 は、それ自身では LTP を誘導しないような神経シナプスへの弱い刺激に対して急性的に効果を発揮し、E2-LTP を誘導することで、記憶学習に重要な役割を担っている可能性がある。しかし、E2-LTP 成立のための信号伝達系はよくわかっていない。そこで、E2 の急性効果の信号伝達系を調べることは、E2 と記憶学習の関係を理解するために意義がある。したがって、E2 の急性効果により E2-LTP が成立するための信号伝達系解明を目的に実験を行った。具体的には、女性ホルモン受容体 ( $ER\alpha$  /  $ER\beta$ ) と LTP に重要とされているリン酸化酵素 (ERK / MAPK, PKA, PKC, CaMK II) および NMDA 受容体のサブユニット NR2B に着目し、その阻害剤とアンタゴニストを用いて電気生理学的実験を行い、E2-LTP 成立の信号伝達系を調べた。

**目的 2:** 先行研究から、ラットの海馬内において女性ホルモン (E2) と男性ホルモン (DHT) が同時に存在していることが報告されている。そのため、ラットの脳内では E2 と DHT が相互作用している可能性がある。しかし、この両者の相互作用については未だよくわかっていないため、生体内での神経活動における E2 と DHT の役割を理解するために E2 と DHT の相互作用を調べることは意義がある。したがって、E2 と DHT を同時に作用させたときの急性効果の解析と、その信号伝達系解明を目的に実験を行った。具体的には、まず、12 週齢成獣オスラット海馬スライスに E2 と DHT を同時に作用させた後、海馬スライスに weak-TBS を与えたとき、LTP が成立するかどうかを電気生理学的実験により調べた。次に、DHT が E2-LTP を抑制したことを踏まえて、男性ホルモン受容体 (AR) のアンタゴニストと、脱リン酸化酵素 (Calcineurin) の阻害剤を用いて、DHT が E2-LTP を抑制する信号伝達系を電気生理学的実験により調べた。

A



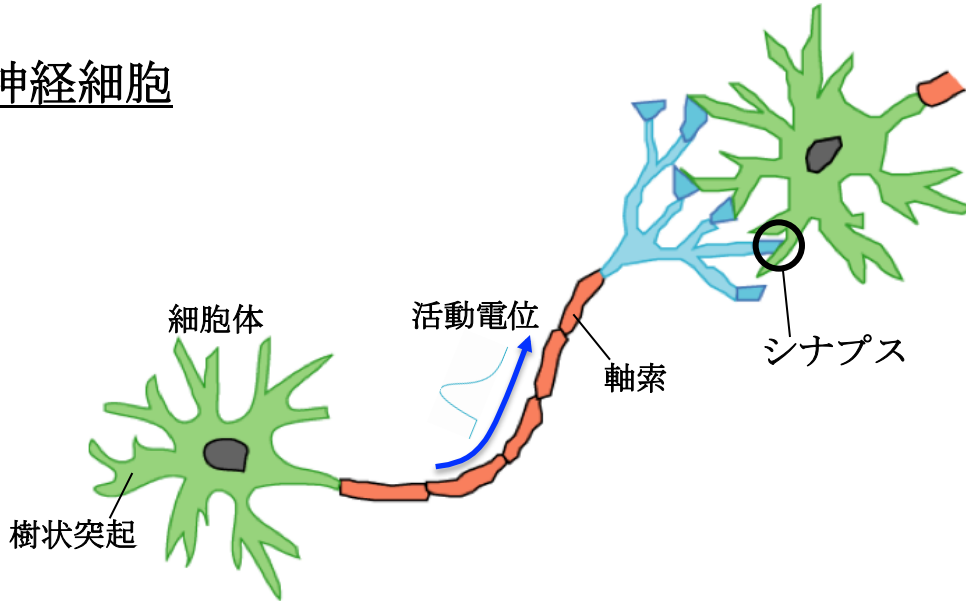
B



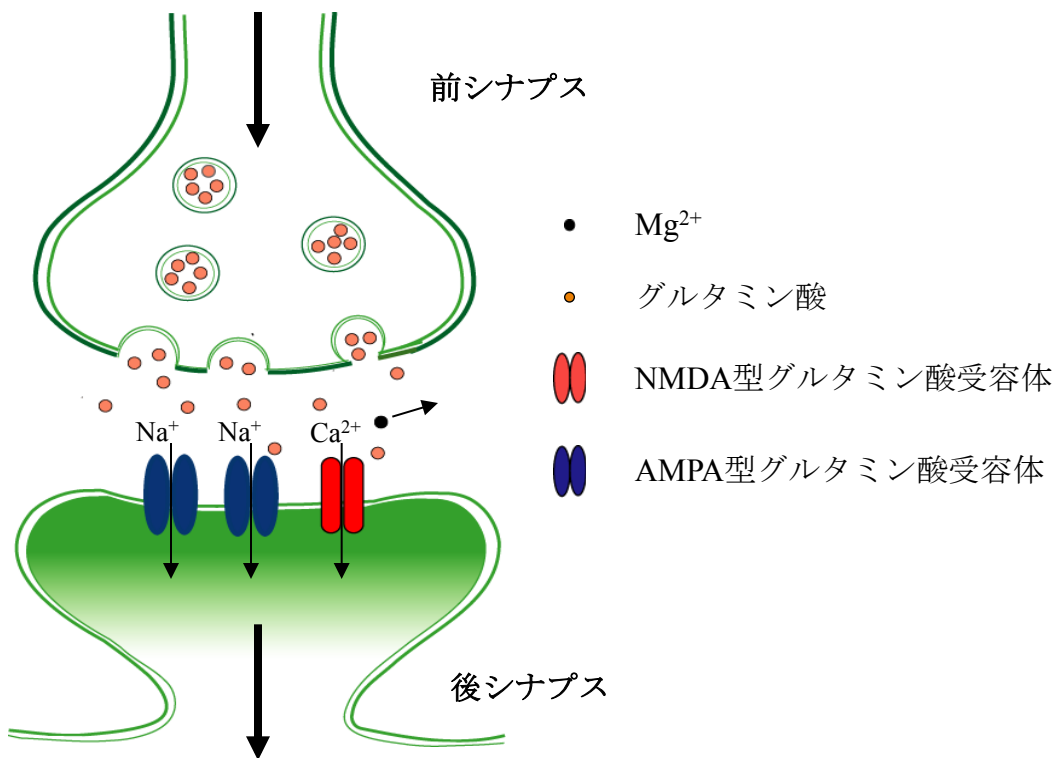
**Fig. 1-1 ラット全脳および海馬内部構造**

- A. ラット全脳および海馬の内部構造。ラット全脳の構造及び脳における海馬の位置を示した。ラット海馬は大脳の内側に位置し、その形状は細長く曲がっている。長軸に対して垂直に切ると常に同じ層状構造をしている。海馬は主にアンモン角 (CA1 - CA3)、歯状回 (DG) からなる。神経細胞層 (灰色部分) は、アンモン角では錐体細胞、歯状回では顆粒細胞により構成されている。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 → (シャーファ側枝) → CA1と続く。
- B. 海馬CA1領域の錐体細胞。海馬CA1領域の層構造は、上昇層 (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領域の神経細胞の軸索であるシャーファ側枝は、主に海馬CA1領域の放射状層に投射する。

## A 神経細胞

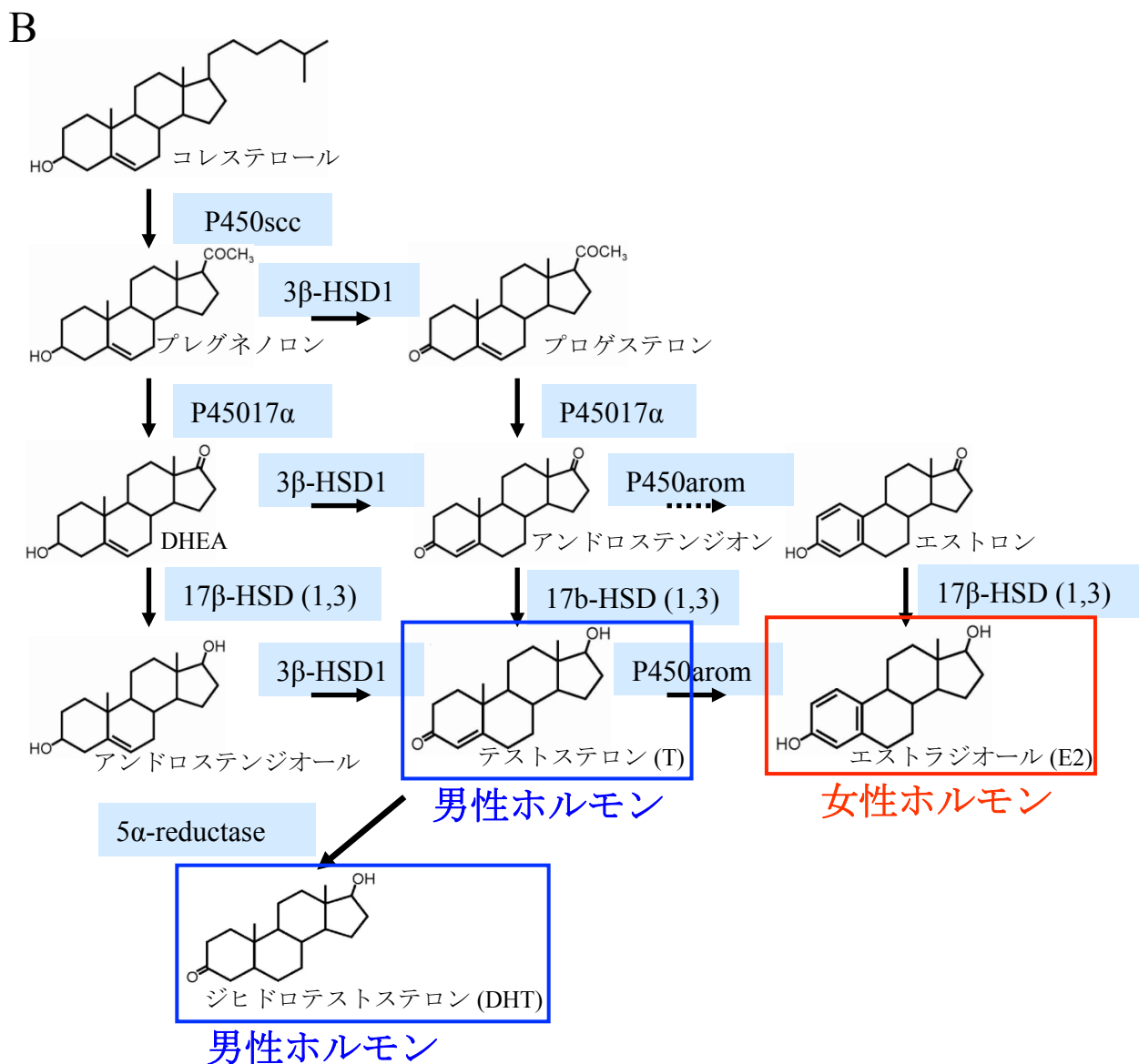
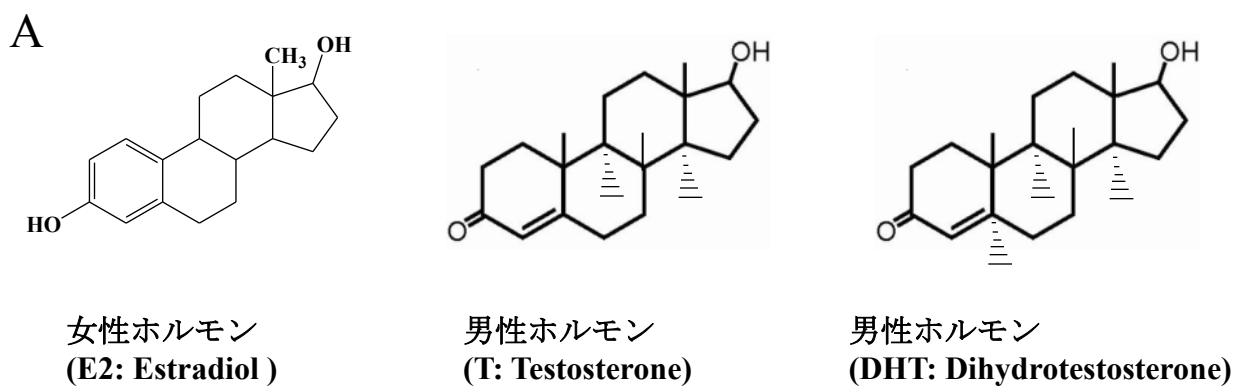


## B シナプス



**Fig. 1-2 神経細胞とシナプス伝達**

- A. 神経細胞の模式図。神経細胞から伸びる軸索は、標的となる神経細胞とシナプスを形成する。このとき、軸索末端が前シナプス、標的神経細胞の樹状突起上にあるスパインが後シナプスとなり、前シナプスから後シナプスへと情報が伝わる。
- B. シナプス伝達の模式図。シナプスでは、前シナプスから神経伝達物質のグルタミン酸が放出され、後シナプスに存在するグルタミン酸受容体に結合することにより、受容体を通じて後シナプス内へイオンが流入する。AMPA型グルタミン酸受容体は、主に  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  を、NMDA型グルタミン酸受容体は、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  の他に  $\text{Ca}^{2+}$  を透過する。NMDA型受容体は、通常  $\text{Mg}^{2+}$  によってブロックされており、イオンがほとんど透過しないが、膜電位が脱分極して閾値を越えると、 $\text{Mg}^{2+}$  ブロックが外れ、イオンが透過するようになる。



**Fig. 1-3** オス海馬での女性ホルモンと男性ホルモンの合成経路

A. 女性ホルモン (E2) および男性ホルモン (T、DHT) の構造式。

B. オス海馬でのニューロステロイド (女性ホルモンと男性ホルモン) の合成経路。  
一連の合成酵素 (チトクロムP450など) により、様々なステロイドが合成される。  
赤枠は女性ホルモン (E2)、青枠は男性ホルモン (T、DHT) を示す。

## 第 2 章 実験方法

### 2-1 実験動物

実験には Wistar ラット (12 週齢オス、埼玉実験動物供給所、東京実験動物供給所) を使用した。本実験では、性周期変動が神経可塑性に及ぼす影響を除くため、オスラットを使用した。これはメスラット海馬の LTP の大きさが、性周期変動に伴い変化するためである (Bi et al., 2001)。

動物は学内の飼育施設に移送後、12 時間の明暗周期 (明: 午前 8 時 ~ 午後 8 時) において 22 ~ 23°C の温度管理下で数日間の馴化後使用した。飼料と飲料水は自由に摂取させた。本研究での実験動物の扱いは、東京大学動物実験委員会による許可のもと、東京大学動物実験実施マニュアルを遵守した。

### 2-2 試薬

Agar、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、D(+)-glucose、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、KCl、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、propyl prazole triol (PPT)、U0126、 $17\beta$ -estradiol、Dihydrotestosterone、Hydroxiflutamide、KN-93 は和光純薬品工業 (JAPAN) から購入した。ICI182,780、Ro25-6981、Cyclosporine A は Sigma-Aldrich Japan から購入した。YM202074 は Abcam (UK) から購入した。H89 は Biomol (USA) から購入した。Chelerythrine は Calbiochem (USA) から購入した。WAY200070 はコスモ・バイオ株式会社 (JAPAN) から購入した。

### 2-3 電気生理学的測定

本研究では、川戸研究室が科学技術振興調整費プロジェクトにおいてアルファメッドサイエンティフィック株式会社と共同で開発したカスタムメイド MED 64 システム (custom multi-electrode array system) を用いて、電気生理学的実験を行った (Mukai et al., 2007, Ogiue-Ikeda et al., 2008)。

### 2-3-1 人工脳脊髄液 (ACSF: artificial cerebrospinal fluid)

本研究で用いた ACSF の組成は以下の通りである。

試薬名	濃度 [mM]
NaCl	124
KCl	5
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> ·2H <sub>2</sub> O	2
NaHCO <sub>3</sub>	22
D(+)-glucose	10

ACSF は、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>、D(+)-glucose を 2 次蒸留水に溶解させた後、カルシウム化合物の析出を防ぐため、木下式ガラスボールフィルター (木下理化工業、東京都) を用い、混合ガス (O<sub>2</sub> 95% / CO<sub>2</sub> 5%) を飽和するまで通気させた。その後、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O を溶解させて作製した。

### 2-3-2 急性海馬スライス作製法

本研究で用いたスライスは、アルファメッドサイエンティフィック株式会社の「MED 急性スライス実験解説」に基づき、小脳と、前頭葉の 1/3 を取り除いた全脳急性スライスとした。

ジエチルエーテルを 15 分程気化させた麻酔瓶にラットを入れ、深麻酔後、速やかに断頭した。本研究で用いるラットは、日内変動の影響を除くために、麻酔、断頭は全て午前 9～10 時の間に行った。断頭後、脳虚血による損傷を防ぐため 90 秒以内に脳を取り出し、予め氷冷し、混合ガス (O<sub>2</sub> 95% / CO<sub>2</sub> 5%) を通気させておいた ACSF (スライス作製中、ACSF は常に混合ガス (O<sub>2</sub> 95% / CO<sub>2</sub> 5%) を通気させている。以下同様) 中に入れ、約 2 分間静置した。静置後、脳を ACSF で浸した濾紙 (氷上のシャーレ上に濾紙を置き冷却してある) 上に乗せ、メスで小脳と前頭葉の 1/3 を切断し取り除いた。次に、前頭葉切断面を下に脳を立て、脳底部両側を水平から 15°～20°の角度で切り取り、さらに正中線に沿って右脳と左脳を切り離した。分離後の脳は ACSF で約 2 分間氷冷した。氷冷後、乾燥した濾紙上に脳底部が下になるように静置し余分な水分を取り除いた後、脳底部がビブラトーム (SUPER MICRO SLICER ZERO 1、堂阪イーエム、京都府) の

固定台上に、前頭葉切断面が寒天 (Agar 8%、寒天の高さは 7~10 mm にした) に張付くように設置した。固定台をビブラトームに設置し、ACSF を固定台内に入れ、厚さ 300  $\mu$ m のスライスを作製した。その後、切断による損傷を回復させるため、ACSF が入った容器内にスライスを浸し、室温 (25°C 程度) で 30 分間静置した。その後、ACSF の水位を減らして、スライスの上面とほぼ同じ水位になるように ACSF の液面を調整し、スライスを 1 時間半以上静置させた (Fig. 2-1)。

### 2-3-3 薬剤作用方法

本研究では、E2 や阻害薬をスライスへ作用させる方法として灌流法 (LTP 誘導のおよそ 20 ~ 30 分前から薬剤を作用させる方法) ではなく、『インキュベーション法』 (Hasegawa et al., 2014) および、『循環法』と称する方法を用いた (Fig. 2-2) (Fig. 2-3)。以下手順を示す。

- ① ACSF が入った容器内にスライスを浸し、室温 (25°C 程度) で 30 分間静置した。その後、ACSF の水位を減らして、スライスの上面とほぼ同じ水位になるように ACSF の液面を調整し、スライスを 1 時間半以上静置させた。
- ② 薬剤 (E2、阻害剤の組み合わせ) を加えた ACSF が入っている別の容器に、上記①の容器からスライスを移し、ACSF の水位を減らして、スライスの上面とほぼ同じ水位になるように ACSF の液面を調整した。その状態で 30 分間静置 (インキュベーション) した。上記のように薬剤を作用させる方法が 『インキュベーション法』である (Fig. 2-2)。
- ③ 上記②の容器からスライスを測定装置に移し、測定した。測定中は薬剤を加えず ACSF のみをスライスへ灌流した。ただし、CaMK II 阻害剤 KN-93 を用いた実験では、『循環法』を用いた。循環法は、KN-93 と ACSF を入れた容器からスライスへ灌流させ、再び元の容器へ戻る循環の形式により薬剤作用を行う方法である (Fig. 2-3)。

### 2-3-4 測定装置

本研究における電気生理学的測定には、川戸研究室で開発したカスタム多電極プローブと MED64 システム (アルファメッドサイエンティフィック株式会社、大阪府) を用いた。これは多電極計測装置で、多電極プローブ、プローブコネクタ、刺激増幅器、及びデータ記録解析器からなる (Fig. 2-4)。これらはすべて科学技術振興調整費『環境ホルモン記憶学習攪乱の新型多電極計測』により川戸研究室が開発したシステムである。以下、各部分の説明を行う。



カスタム多電極プローブ (MED-P5001A) は、ガラス製のディッシュに白金黒製の記録電極を 64 個配置したものであり、電極配置はラット海馬の計測に最適化されている。白金黒電極は低インピーダンス ( $< 22 \text{ k}\Omega$ ) であり、低ノイズ測定が可能である (Oka et al., 1999)。電極サイズは  $50 \mu\text{m}$  で、隣り合う電極間の距離がすべて  $150 \mu\text{m}$  と等しく密な状態で CA1、CA3、DG 領域に沿って集中配置されており、3 領域の同時測定が容易となっている。疎水性である多電極表面の親水性を増すために、新しい多電極プローブは、使用前に 1 %ポリエチレンイミン溶液に浸して 24 時間以上静置することで、多電極表面をコーティングした。本研究では、ホウ酸バッファ (25 mM) にポリエチレンイミンを溶解し、コーティング液とした。コーティング後のプローブは、2 次蒸留水 (DDW: double distilled water) で十分にコーティング液を洗い流し、ACSF で共洗いを行ってから測定に用いた。使用後のプローブは、付着したスライスやタンパク質を十分に DDW で洗い流した後、プローブ内を DDW で満たし、冷蔵庫で保管した。

プローブコネクタは、多電極プローブからの信号を刺激増幅器に伝える。刺激増幅器は、コネクタからの信号に Low cut 1Hz、High cut 1kHz のフィルターを通して信号を増幅し、A/D 変換を行った後に、解析用 PC にデータを送る役割を持つ。また、刺激増幅器において、刺激電極端子と入力端子をつなげることにより 64 個の電極から刺激部位を最大 4 箇所まで選択することが可能である。電極刺激の強度、振動数、パルス数などの刺激パターンはデータ記録解析器に組み込んだソフトで設定した。

データ記録解析器では、実験の実行とリアルタイム解析を行った。本システムでは MED64 誘発応答記録ソフトウェア (MED64 Recorder For Evoked Response) により、64 チャンネルのうち、上記の刺激増幅器でつないだ任意の 4 点の刺激部位からの刺激による応答信号である EPSP をリアルタイムで解析表示できる。またリアルタイムでの解析は 4 チャンネルに限られるが (本研究では 1 チャンネルのみ使用)、データ自体は 64 チャンネルすべて保存されているため、測定終了後にすべてのチャンネルについて解析することができる (Fig. 2-4)。

### 2-3-5 細胞外記録法による興奮性シナプス後電位測定

2-3-2 の手順で作製した全脳スライスを、ACSF 中から多電極プローブ上へ移し、スライスと電極面を密着させるため、上からナイロンメッシュを被せた。その後、多電極プローブを、 $31^{\circ}\text{C}$  で保温している箱中にあるプローブコネクタに装着した。次に、スライスの海馬 CA1 領域にプローブの電極位置を合わせ、U 字型の白金線に数本のナイロン線を張ったスライス押さえを、ナイロンメッシュの上からスライスに乗せて、スライスの位置を固定した。その後、ACSF 注入用ポート (インレットチューブ) および、

ACSF 吸出用ポート (アウトレットチューブ)、酸素供給用ポートが付いたキャップを多電極プローブの上から被せ、混合ガス ( $O_2$  95% /  $CO_2$  5%) を通気した ACSF を 2 ml / min の速度で灌流した。灌流した ACSF は、温度コントローラーにより 33°C に保たれており、多電極内の ACSF はスライス表面と同程度の水位となるように調整した。そして、ACSF 注入ポートおよび ACSF 吸出ポートは、アースで接地した。一方、酸素供給用のポートは、2 次蒸留水 (DDW) を経由することで、湿気を含んだ混合ガス ( $O_2$  95% /  $CO_2$  5%) が通気できるようになっている (Fig. 2-5)。

上記の全脳スライスとプローブの設置後、測定ソフト (MED64 誘発応答記録ソフトウェア) を立ち上げ、海馬 CA1 領域の刺激電極 24 点のうちから最良の刺激点と測定点を探した。刺激点は 24 点あるうちの 1 点であり、測定点は刺激点に対して左隣の 1 点である (Fig. 2-5)。最良の刺激点と測定点は、海馬 CA1 領域においてシャーファー側枝の投射がある放射状層上にある点となるように決めた。

本研究では、細胞外記録法により、海馬 CA3 からの投射 (シャーファー側枝) がある海馬 CA1 領域の放射状層で、興奮性シナプス後電位 (EPSP) の集合電位である fEPSP を測定した。細胞外記録法では、細胞膜電位や  $Na^+$  イオン電流そのものは測定していない。後シナプス内へ  $Na^+$  イオンが流入するとき、この  $Na^+$  イオン電流に伴って細胞外に電位変化が生じる。細胞外記録法では、この電位変化が記録電極に伝わり、記録電極と基準電極との電位差が fEPSP として測定される。具体的には、テスト刺激を与えると、シャーファー側枝の軸索末端 (前シナプス) からグルタミン酸が放出される。放出されたグルタミン酸は後シナプス上の AMPA 受容体に結合する。その結果、後シナプス内へ AMPA 受容体を介して  $Na^+$  イオンが流入する。この  $Na^+$  イオン流入により、後シナプス内で脱分極が生じる。また、後シナプス内へ  $Na^+$  イオンが流入するときに、細胞外で生じる電位変化が記録電極へ伝わる。このときに生じた記録電極と基準電極の電位差を測定している (Fig. 2-6)。細胞外電位変化を測定装置で測定すると、電気刺激に伴うアーチファクトから数ミリ秒遅れて、前シナプス内への  $Ca^{2+}$  イオン流入による細胞外電位変化である presynaptic fiber volley が観察される。次に、前シナプスによる細胞外電位変化に続いて、後シナプス内への  $Na^+$  イオン流入による細胞外電位変化である fEPSP が記録される (Fig. 2-7)。したがって、細胞外記録法において fEPSP は、後シナプス内への  $Na^+$  イオン流入に伴い発生する細胞外での電位変化が記録電極に伝わり、記録電極と基準電極の電位差として計測される。

1 つのシナプスにおいて、軸索末端からグルタミン酸が放出されて、 $Na^+$  イオンが後シナプス内へ流入することにより、後シナプス内で +30mV 程度の脱分極が生じたとき、細胞外記録法でこの現象を計測しても 30mV の大きさの電位変化は計測されない。細胞

外記録法で実際に記録される電位変化は、およそ数百  $\mu\text{V}$  となる。以下に理由を説明する。ある樹状突起上のシナプス 1 個 (シナプス  $i$  とする) に流れる  $\text{Na}^+$  イオン電流を  $I(i)$  とする。刺激電極からの刺激によりこのシナプス  $i$  が静止膜電位から  $+30\text{mV}$  脱分極したとすると、このときにシナプス  $i$  内に流入した  $\text{Na}^+$  イオン電流は、 $I(i) \approx 1\text{pA}$  と見積もれる。なぜなら、シナプスを直径  $1\mu\text{m}$  の球型のコンデンサーと仮定すると、 $30\text{mV}$  の電位差を作るには約  $1 \times 10^{-15} [\text{C}]$  の  $\text{Na}^+$  イオンがシナプス内に流入しなければならない (細胞膜の厚さ  $\approx 1\text{nm}$ , 誘電率  $\epsilon \approx 10^{-11} [\text{F/m}]$  とした)。また、シナプス内に流入する  $\text{Na}^+$  イオンの数は、 $1 \times 10^{-15} [\text{C}] / e [\text{C}] \approx 6000$  (ただし、 $e = 1.6 \times 10^{-19} [\text{C}]$ : 電気素量) であるから、約 6000 個の  $\text{Na}^+$  イオンがシナプス内に流入することになる。ここで、MED システムで記録した信号波形 (fEPSP) から、この  $\text{Na}^+$  イオンの流入には約  $1\text{msec}$  かかるので、このシナプス  $i$  に流入した電流は、 $I(i) \approx 1 \times 10^{-15} [\text{C}] / 1 [\text{msec}] \approx 1\text{pA}$  となる。次に、シナプス  $i$  から細胞外記録電極までの距離を  $r(i)$  とすると、シナプス  $i$  由来の  $\text{Na}^+$  イオン電流が記録電極につくる電位  $V(i)$  は、 $V(i) = (R/4\pi) (I(i)/r(i))$  と表せる。よって、記録電極に生じる電位  $V$  は、各シナプス  $i$  による  $V(i)$  の総和であるため、 $V = \sum_{i=1} V(i) = (R/4\pi) \sum_{i=1} I(i)/r(i)$  となる (ただし、 $R$  は生体組織の抵抗率であり、 $2 \sim 3\Omega\text{m}$  となる)。MED システムでは、記録電極表面付近の各シナプスで生じる  $\text{Na}^+$  イオン電流による細胞外での電位変化が記録電極表面に伝わることで電位変化を記録する。よって、記録電極表面付近の  $\text{Na}^+$  イオン電流からの寄与が最も大きいので  $r(i) \approx 10\mu\text{m}$  とすると、シナプスの数は、(電極から半径  $10\mu\text{m}$  の半球の体積) / (直径  $1\mu\text{m}$  のシナプスの体積) で見積もれるので、電極表面付近のシナプス数はおよそ数千個となる。したがって、記録電極に生じる電位  $V$  は、 $V \approx 1000V(i) \approx 100\mu\text{V}$  となり、これは MED システムで計測される値と同じオーダーとなる。(ただし、この計算において、数千個のシナプスはすべて電極から  $10\mu\text{m}$  の距離にあると仮定している。実際には、半径  $10\mu\text{m}$  以内のシナプスを作る  $V(i)$  の総和を計算するので、 $V$  はここで計算した値よりも大きくなり、通常の測定時と同等の値となる)。よって、数十  $\text{mV}$  程度の脱分極が起こるシナプス内への  $\text{Na}^+$  イオン電流を、細胞外記録法を用いて計測すると数百  $\mu\text{V}$  程度の電位変化として計測される。

本研究では、fEPSP の下降相の slope を解析した。slope の値は、fEPSP の最小値と最大値の 10% と 90% の点を結んだ直線の傾きである (Fig. 2-7)。また、テスト刺激には  $0.1\text{ms}$  の 2 相性パルス電流を用い、45 秒間隔で刺激した。スライスをプローブへ移した後、45 秒ごとに 1 発のテスト刺激をスライスに与え、fEPSP が安定するまで待った。fEPSP の安定後、LTP の測定に用いるテスト刺激強度を次のように決定した。テスト刺激強度を弱い ( $10\mu\text{A}$ ) 方から徐々に強めていき、その都度測定された fEPSP の peak amplitude を記録し、fEPSP の傾きの上昇相にスパイク (population spike) が入り始めた時を最大

値として、入力応答曲線 (Input-Output curve) を描いた。そして、その半値 (50 %) となるような刺激強度を LTP の測定に用いるテスト刺激強度とした (およそ 15  $\mu$ A ~ 50  $\mu$ A の範囲の刺激強度を用いた) (Fig. 2-8)。刺激強度を決めた後、LTP の測定を行った。

### 2-3-6 LTP の誘導と測定

本研究では、海馬 CA1 領域の長期増強 (LTP) を引き起こすための高頻度刺激として、TBS を用いた。full-TBS は、1 バースト (1 バースト: 200 ms の間に、100 Hz で 5 回刺激)  $\times$  10 回、weak-TBS は、1 バースト  $\times$  3 回と定義する (Fig. 2-9)。また、これらにより誘導した LTP をそれぞれ full-LTP、weak-LTP とした (新堂, 2010, Hasegawa et al., 2014)。

LTP の誘導は、45 秒ごとに 1 回のテスト刺激を海馬に与え、ベースラインの安定を 20 分以上確認後、full-TBS あるいは、weak-TBS により LTP をそれぞれ誘導した (Fig. 2-10)。

薬剤を何も作用させていないスライスに対し、weak-TBS で誘導した LTP を weak-LTP (Control) とした。また、薬剤を何も作用させていないスライスに対し、full-TBS で誘導した LTP を full-LTP とした。

1 匹のラットに対して 2~4 枚のスライスを実験に用いた。測定する際は、1 枚を Control 測定用に使用し、その他を薬理作用測定用に使用した。

### 2-3-7 Paired pulse facilitation (PPF) の測定

paired pulse 刺激とは、入力線維を短い時間間隔で 2 回刺激する刺激のことである。海馬 CA1 領域では paired pulse 刺激を与えた場合、paired pulse ratio (PPR) として paired pulse facilitation (PPF) が見られる (Fig. 2-11)。LTP 誘導刺激の前後で PPF の割合 (PPF ratio) が変化した場合、前シナプスからの神経伝達物質の放出量に影響を与えていることを表す。そのため、薬理作用が前シナプスあるいは、後シナプスのどちらに依存しているかを示す指標と考えられている (Zucker, 1989, Manabe et al., 1993, Dobrunz and Stevens, 1997)。本研究では、第 1 刺激と第 2 刺激の間隔を 50 ms、100 ms、200 ms とした。また、LTP 測定時に、LTP 誘導刺激を与える前の 20 分間、LTP 誘導刺激後の 60~70 分の 10 分間にそれぞれ 2 回ずつ paired pulse 刺激を与えた。これら 2 回の PPF ratio の平均をとり、それぞれの区間の PPF ratio の値とした。ただし、paired pulse 刺激により、ベースラインに影響を与えないようにするため、各々の刺激は間隔をあけて行った。

### 2-3-8 統計解析

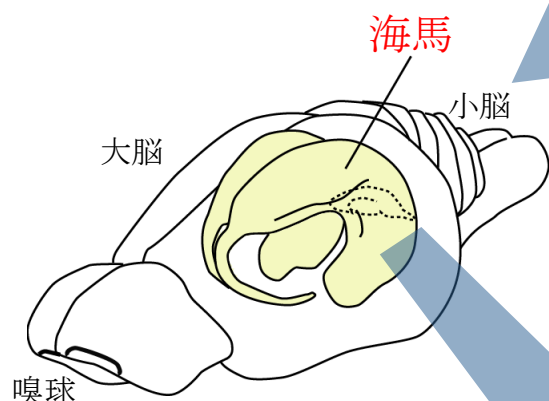
1 元配置分散分析 (one-way ANOVA) を用い、各実験条件間で Control または E2 の

LTP 増強率におけるばらつきの有無をそれぞれで確認した。また、LTP 増強率の比較に関しては、one-way ANOVA を行った際に、有意差が認められたときは post-hoc Tukey-Kramer の多重比較検定法を用いた。2 元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行った際に、交互作用が認められれば、下位検定 (単純主効果検定) を行った。3 元配置分散分析 (three-way ANOVA) を行った際に、2 次の交互作用が認められた場合は、単純交互作用を調べた。さらに、単純交互作用が認められた場合は、下位検定 (単純・単純主効果検定) を行った。なお本研究において、どの実験にどの統計解析を用いたかについては、結果の章に詳しく書かれている。また、各条件における PPF ratio の比較に関しては、対応のある t 検定法 (paired t-test) を用いた。有意水準はすべて 5% とし、データはすべて平均値 (mean)  $\pm$  標準誤差 (SEM) で表記した。サンプル数 n は測定したスライス数を示す。

①ラット頭部から全脳を取り出し氷冷した。



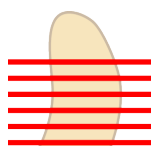
Wistar rat ♂ (12 Weeks)



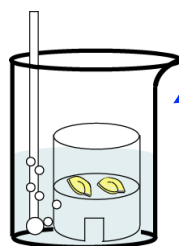
②ビブラトームで厚さ300 $\mu$ mのスライスを作製した。



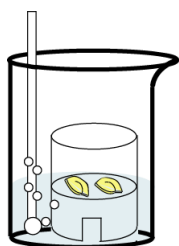
③酸素を通気しながら室温(25 $^{\circ}$ C)で、海馬スライスを30分間サブマージ状態で静置した。その後、液面をインターフェイス状態にし、1時間半以上静置させた。



海馬スライス切片  
(300 $\mu$ m厚)



サブマージ状態



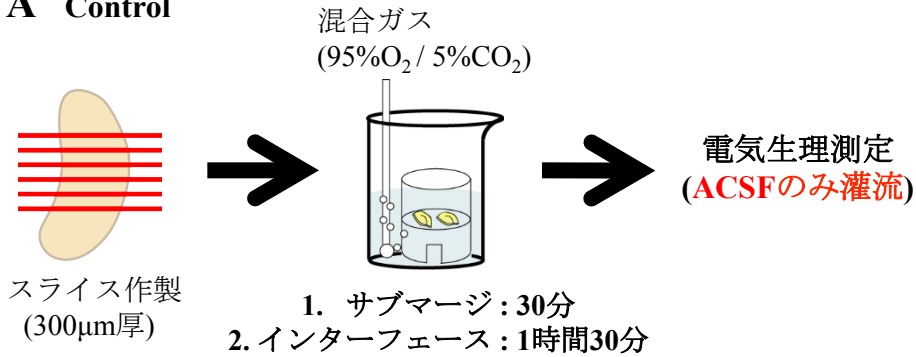
インターフェイス状態

薬剤作用・  
測定へ

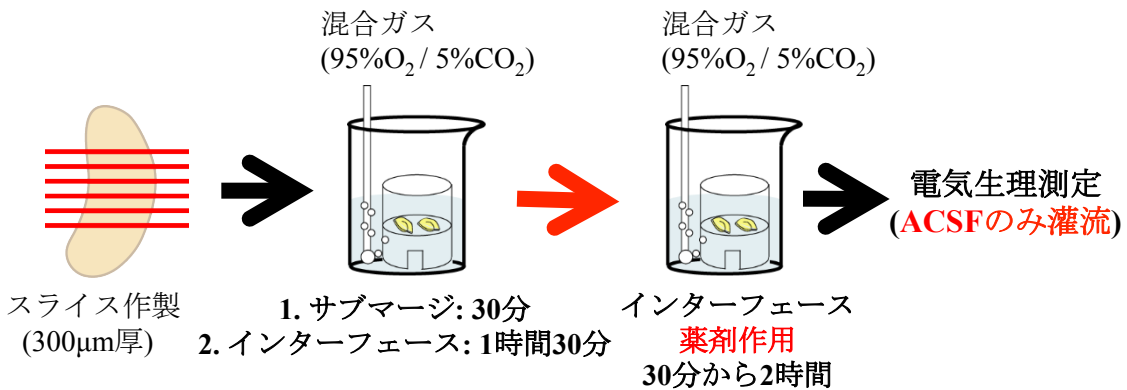
## Fig. 2-1 海馬急性スライスの作製 (概要)

スライス作製の手順。①12週齢オスラットを深麻酔後、素早く断頭して全脳を取り出した。取り出した全脳はACSF中で氷冷した。②全脳をスライス作製用に解剖したのち、ビブラトームを用いて厚さ300  $\mu$ mのスライスにした。③作製したスライスをACSF中に浸した状態(サブマージ状態)で30分間ダメージを回復させた後、ACSFを減らして、スライス表面と同程度の水位となった状態(インターフェイス状態)で、1時間半以上静置した。

## A Control



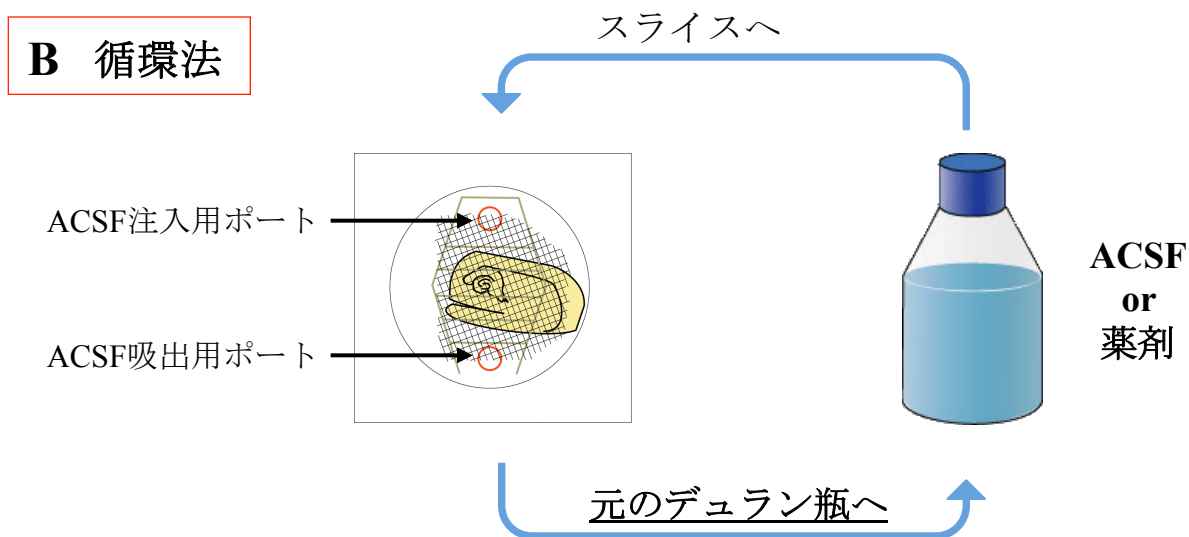
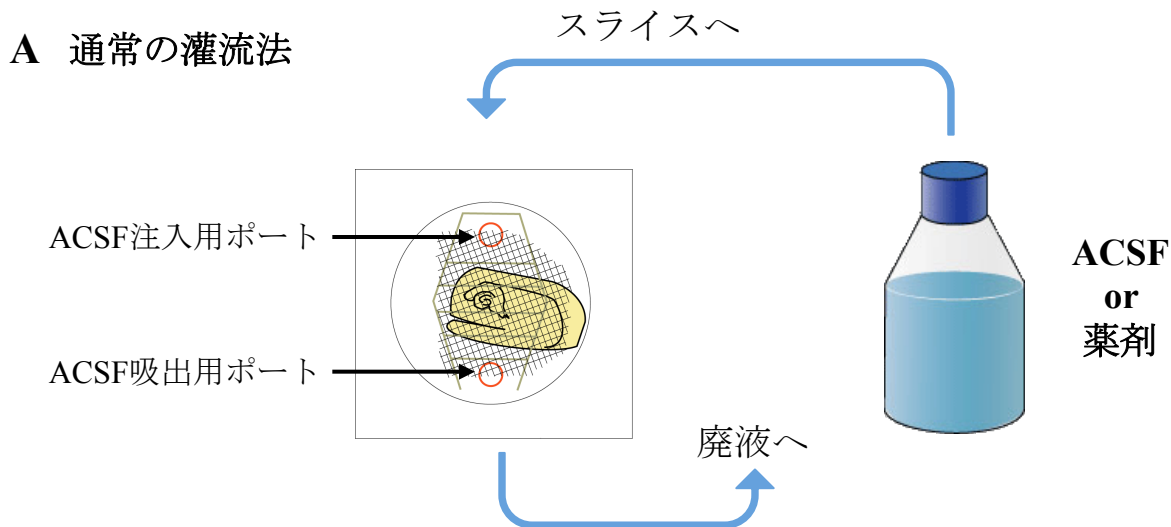
## B 薬剤 (E2、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤の組み合わせ) 作用



## Fig. 2-2 インキュベーション法

インキュベーション法における手順。

- A. スライス作製後、ACSFの入ったチャンバーに移し、2時間以上 (1. サブマージ (ACSF中にスライスが浸った状態): 30分 → 2. インターフェース (ACSFの水位を減らして、ACSF表面と同程度の水位となった状態): 1時間半以上) 静置した。その後、測定装置へスライスを移し、測定を行った。測定中はACSFのみを灌流している。
- B. 薬剤 (E2、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤の組み合わせ) は、以下の条件を用いて作用させた。スライス作製後、ACSFの入ったチャンバーに移し、2時間以上 (1. サブマージ: 30分 → 2. インターフェース: 1時間半以上) 静置した。その後、薬剤 (E2、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤の組み合わせ) を加えたACSFが入っている別のチャンバーにスライスを移し、容器内のACSFを調整してサブマージ状態からインターフェース状態にした。その状態で作用条件により30分から2時間静置 (インキュベーション) した。作用後、測定装置へスライスを移し、測定を行った。ただし、測定中はACSFのみを灌流している。



**Fig. 2-3 循環法**

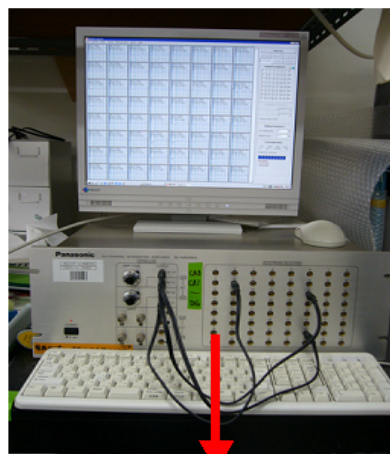
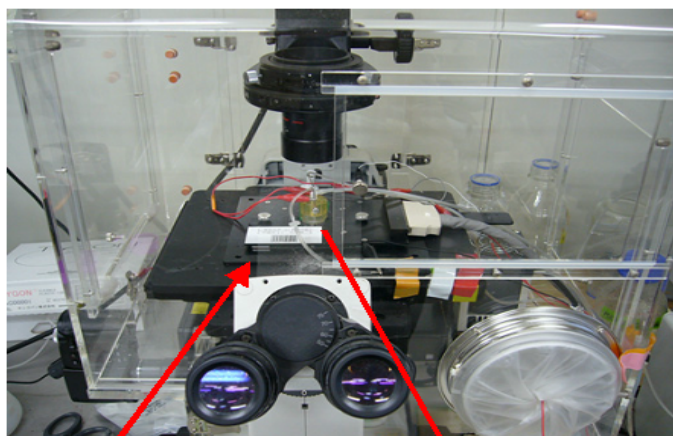
通常の灌流法と循環法の違い。

- A. 通常の灌流法: デュラン瓶に入ったACSFまたは薬剤を加えたACSFを、チューブを通してACSF注入用ポートまで灌流し、スライスまで到達させる。その後、ACSF救出用ポートから吸い出し、廃液となる。
- B. 循環法: デュラン瓶に入ったACSFまたは薬剤を加えたACSFを、チューブを通してACSF注入用ポートまで灌流し、スライスまで到達させる。その後、ACSF救出用ポートから吸い出し、元のデュラン瓶へと灌流する。以後、測定終了まで循環させる。



A

## 多電極計測装置

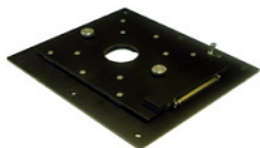


多電極刺激増幅器

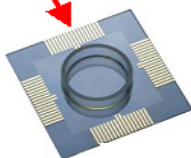


多電極データ記録解析器

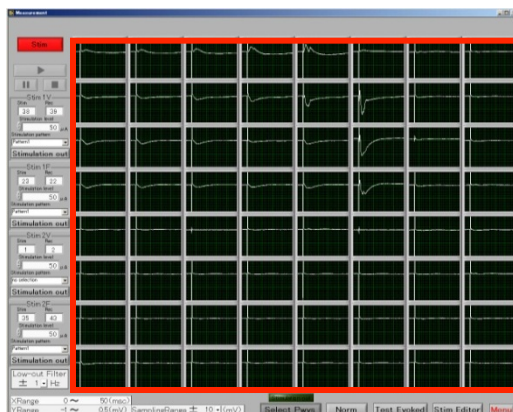
多電極プローブコネクタ



カスタム多電極プローブ



B

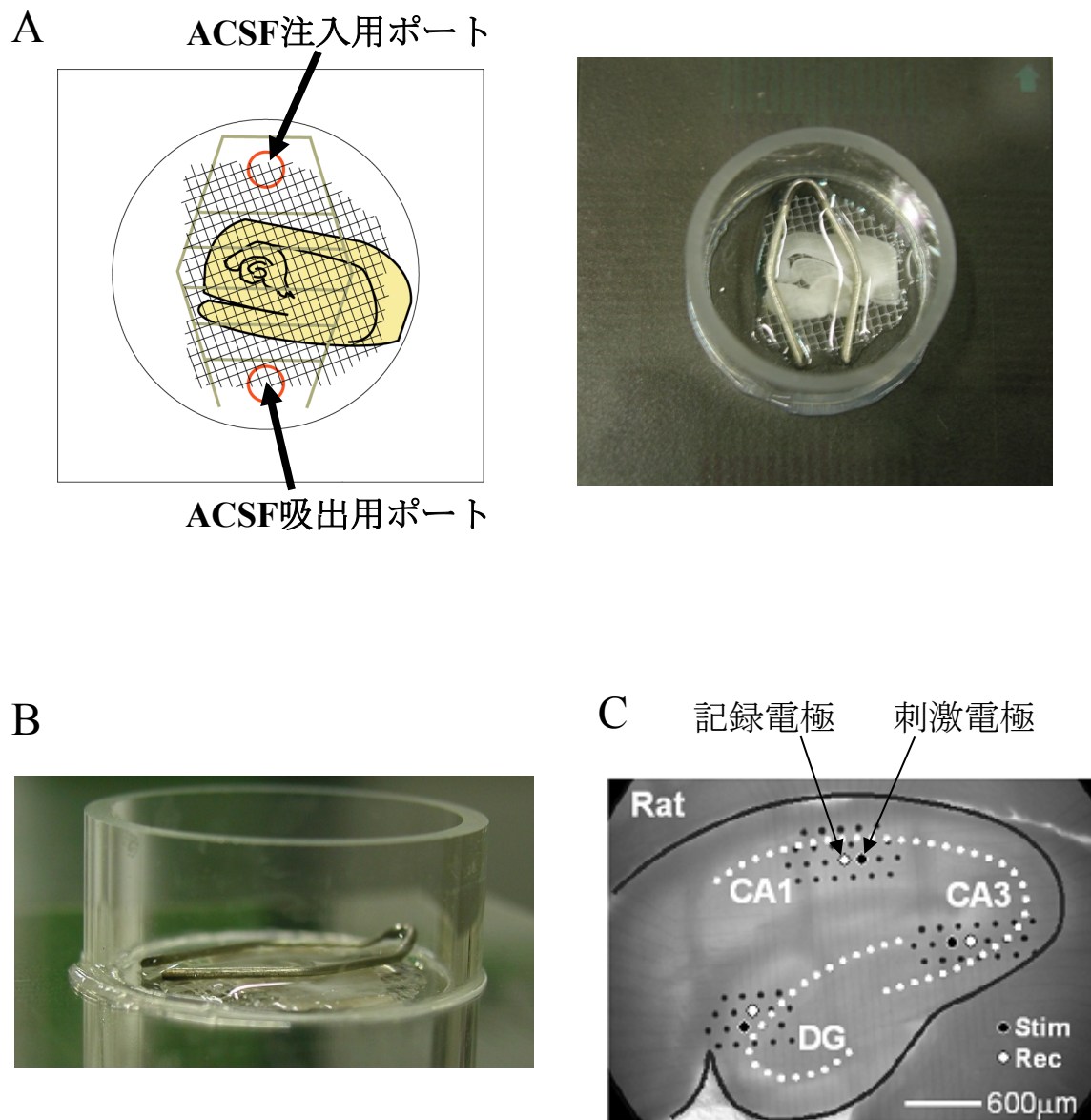


64  
点の  
同時  
測定  
が  
可能

MED64 誘発応答記録ソフトウェアの画面

## Fig. 2-4 MED 64 システム (multi-electrode array system)

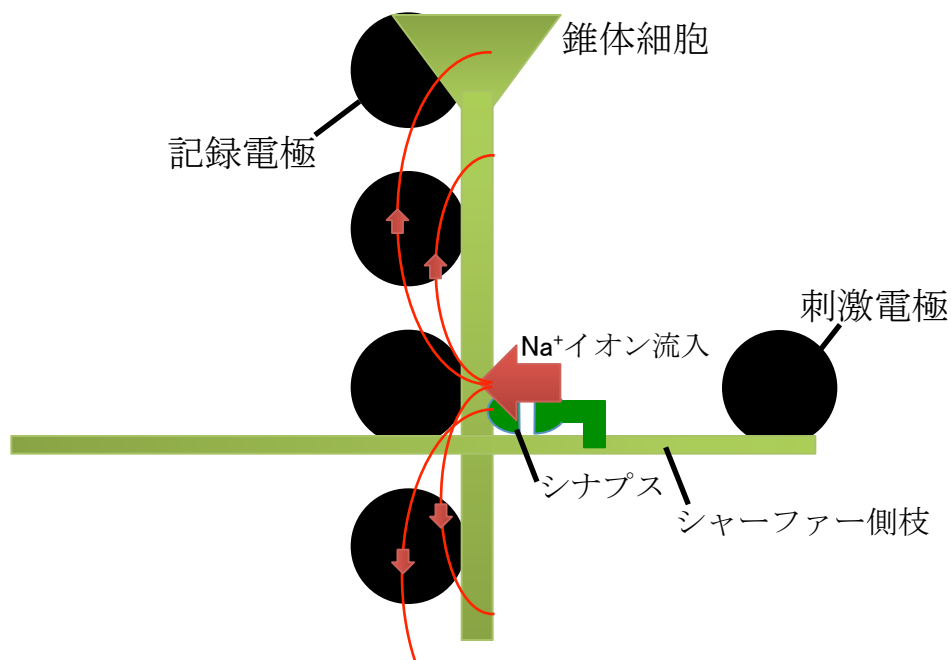
- A. 多電極計測装置。カスタム多電極プローブ、プローブコネクタ、刺激増幅器、及びデータ記録解析器からなる。
- B. MED 64 誘発応答記録ソフトウェア (MED 64 Recorder For Evoked Response)。電極刺激の強度、振動数、パルス数などの刺激パターンを決定することができ、実験時にリアルタイムで解析ができる。



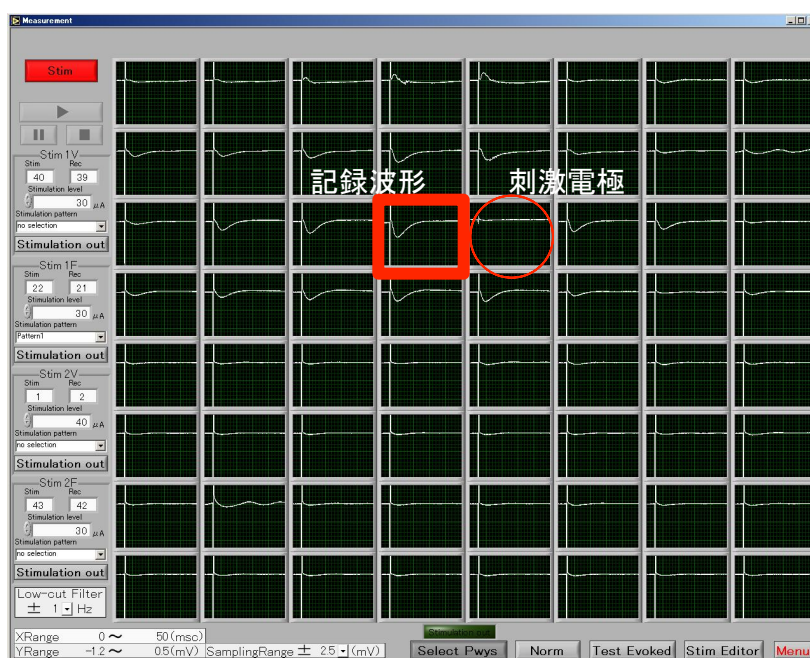
**Fig. 2-5 カスタム多電極プローブに対する海馬の配置**

- A. 多電極プローブ内の海馬、メッシュ、スライス押さえ、ACSF注入用ポート、ACSF吸出用ポートの配置。
- B. 実験時の配置の様子。ACSFの液面はスライスと同程度の水位となるよう調整しており、実験中は2 ml / minで絶えずACSFを灌流している。
- C. 多電極プローブの刺激点と測定点。海馬CA1領域の 24 点のうちから、最良の刺激点を 1 点選択し、その刺激点に対する左隣の1 点を測定点とした。

A

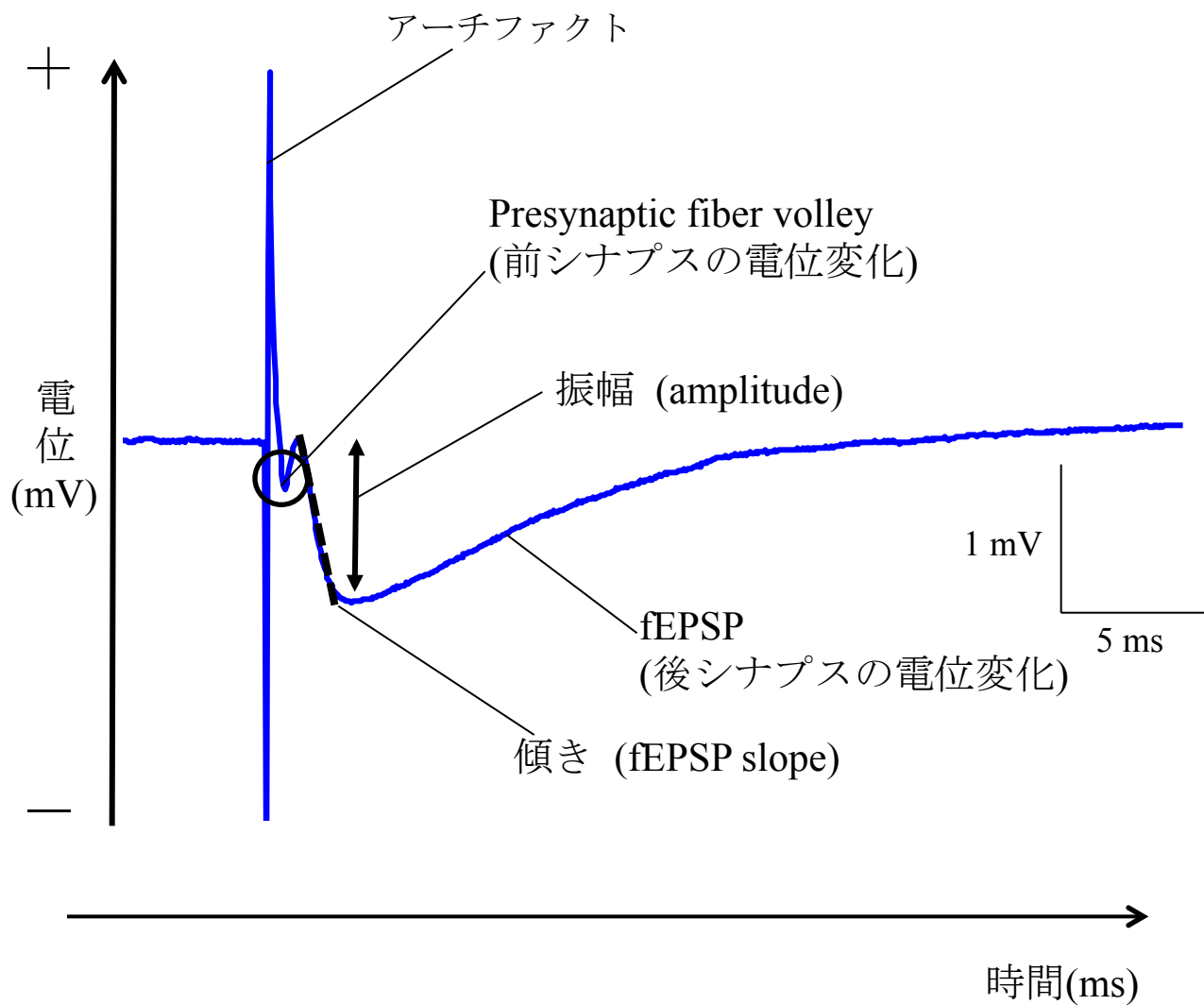


B



**Fig. 2-6 測定原理 (細胞外記録法)**

- A. 細胞外記録法測定原理の模式図。細胞外記録法では、細胞膜電位や $\text{Na}^+$ イオン電流そのものは測定していない。刺激電極からのテスト刺激により、シャーフアー側枝の軸索末端 (前シナプス) からグルタミン酸が放出される。このことで、後シナプス内へAMPA受容体を通じて $\text{Na}^+$ イオンが流入し、後シナプス内で脱分極が生じる。また、後シナプス内へ $\text{Na}^+$ イオンが流入するときに細胞外に生じた電位変化が記録電極へ伝わる。このことで生じた記録電極と基準電極の電位差がfEPSP (記録波形) として測定される。
- B. MEDで測定した際の記録波形。実験では、刺激電極の左隣の記録電極で計測される波形を記録する。

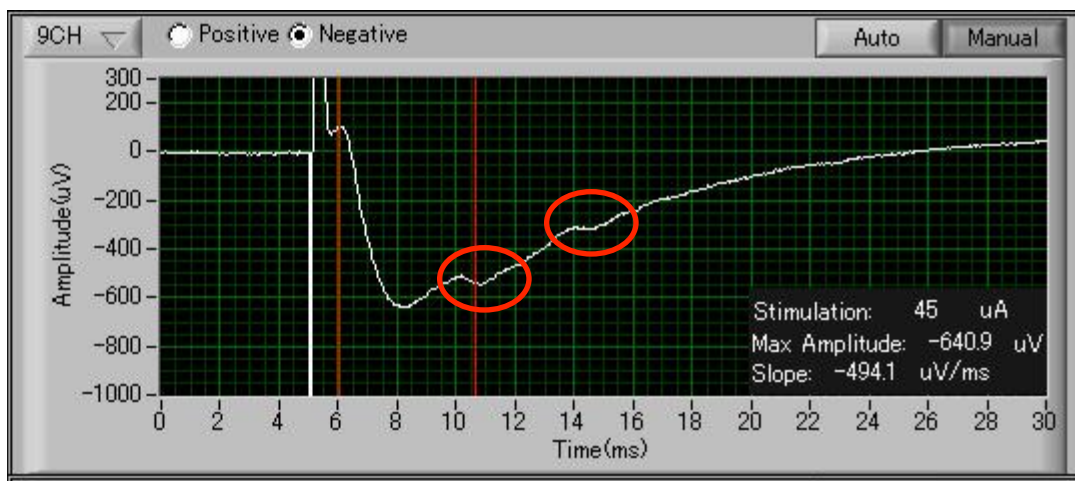


**Fig. 2-7 fEPSP (field excitatory postsynaptic potential)**

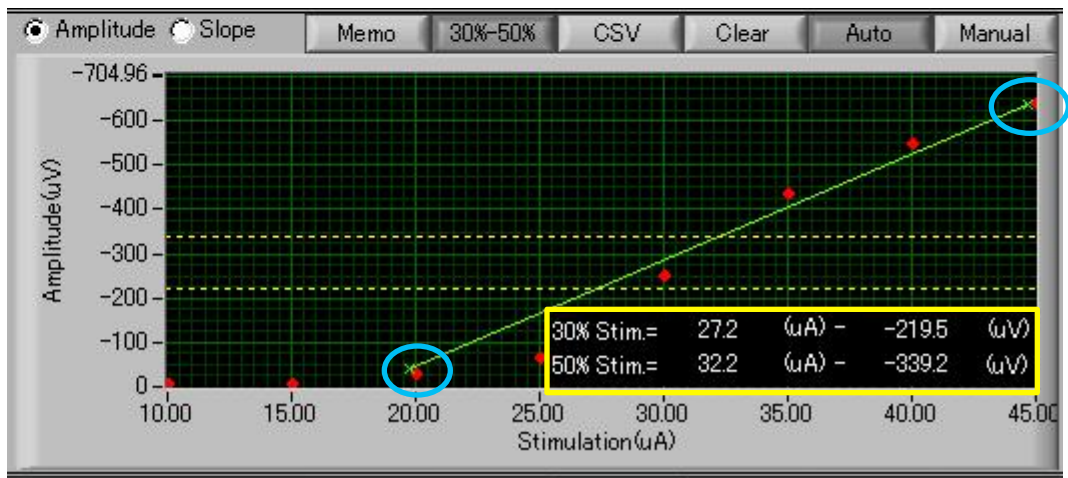
テスト刺激に対する集合興奮性シナプス後電位 (fEPSP) の波形。  
アーチファクトから数ミリ秒遅れて、presynaptic fiber volley (前シナプスにおける細胞外電位変化) が計測され、それに続いてfEPSP (後シナプスにおける細胞外電位変化) が計測される。本研究では、fEPSP slope (後シナプスの細胞外電位変化の最初の傾き) を解析した。



A



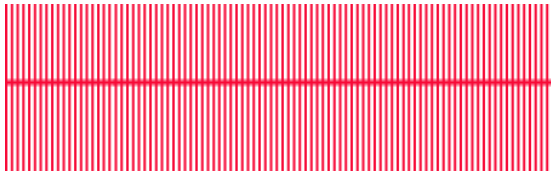
B



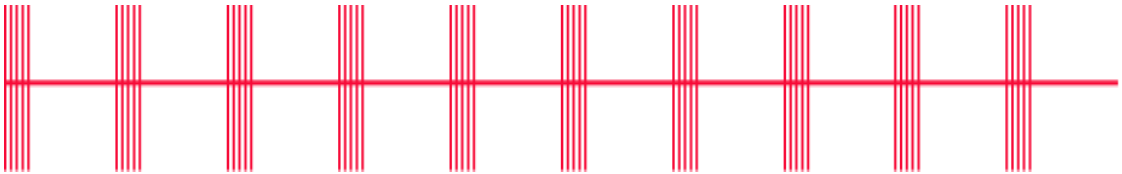
**Fig. 2-8 テスト刺激強度の決定方法**

- A. テスト刺激に対するfEPSPの外形。上図は、テスト刺激が45 mAの際のfEPSPの外形を示している。10～16 msにかけて、スパイク (population spike) が入っているのが分かる (赤線で囲まれた部分)。テスト刺激強度を上げていき、fEPSPにスパイクが入った時点をテスト刺激強度の最大値とした。
- B. 入力応答曲線 (input-output curve)。テスト刺激を出力していくと、その都度fEPSPのAmplitude (μV) が測定され記録されていく (上図赤点部分)。Aで記したように、fEPSPの外形にスパイクが入った時点のテスト刺激強度を最大値とした。入力応答曲線の最小値 (左側の青線で囲まれた部分の赤点) と、最大値を結んだ直線からMAX Amplitudeの半値が割り出され、表示される (黄線で囲まれた部分)。以上から、刺激強度が決定される (上図の場合、テスト刺激は50 % Stim. = 32.2 (mA) となる)。

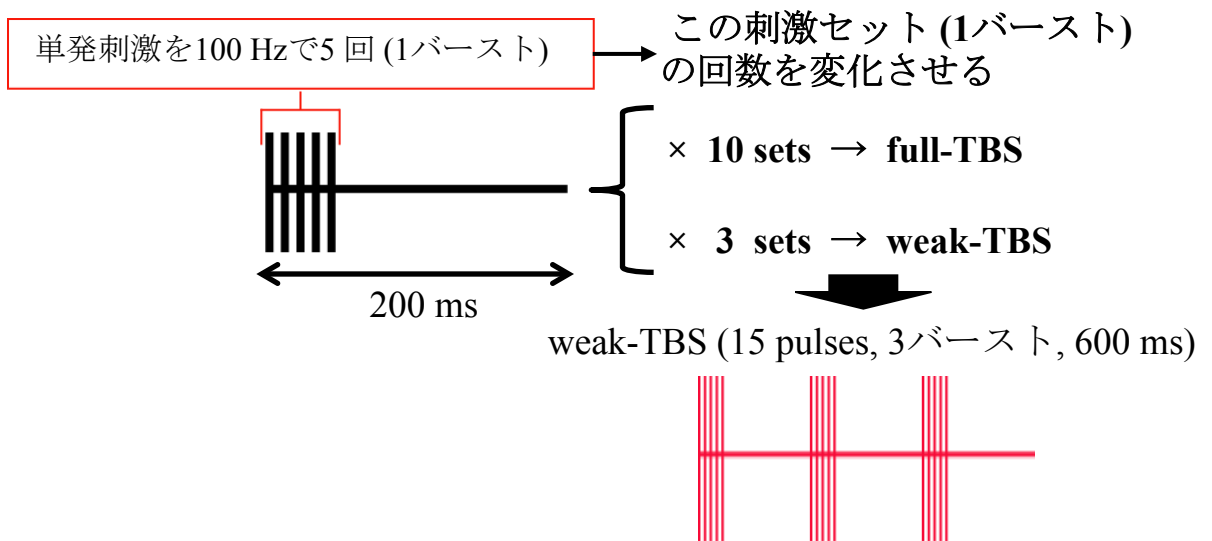
## A テタヌス刺激 (100 Hz, 1 s)



## シータバースト刺激 (full-TBS (50 pulses, 10バースト, 2 s))



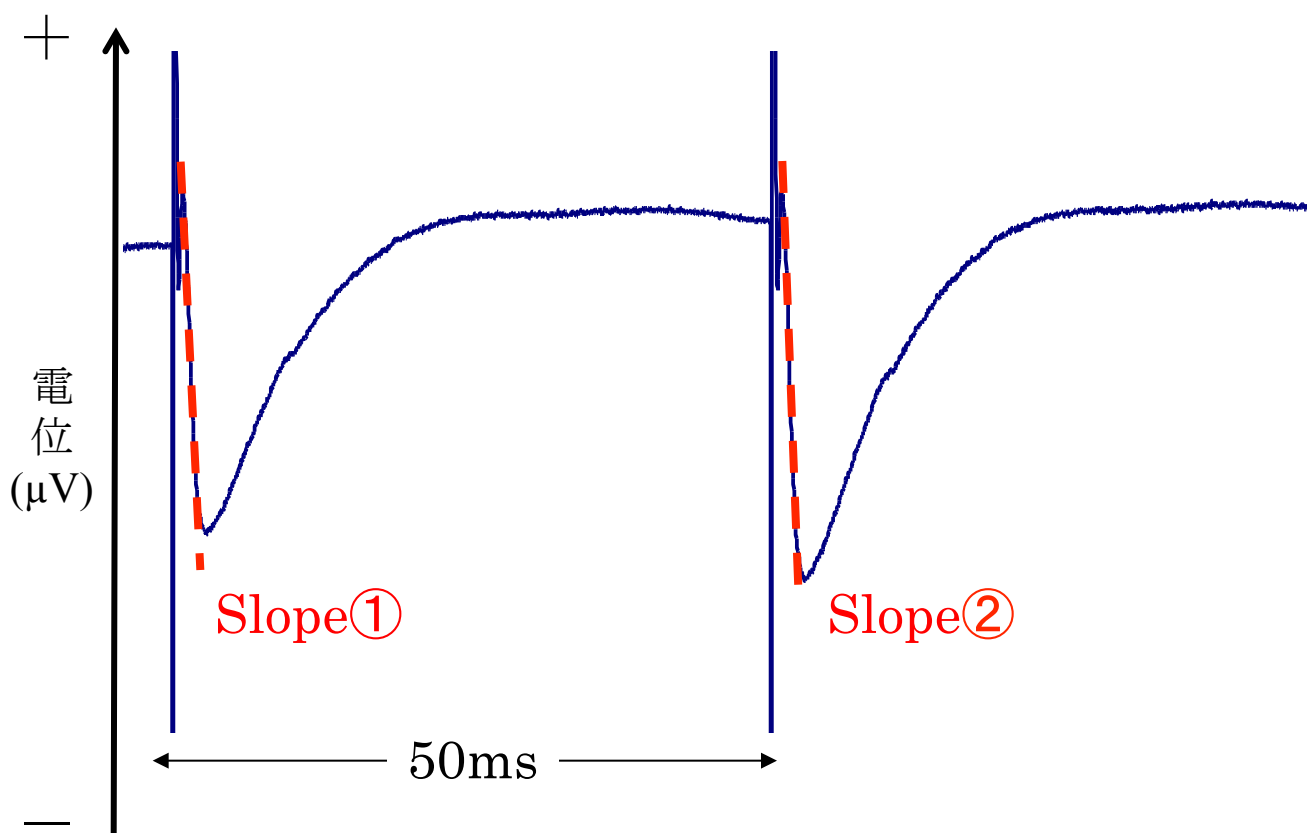
## B



**Fig. 2-9 LTP誘導刺激**

- A. LTP誘導刺激のプロトコル (高頻度刺激: HFS)。 テタヌス刺激 (100 Hz, 1 s) とシータバースト刺激 (TBS: 100 Hzで5 pulsesを1セット (1バースト)、 5 Hzで1セットを繰り返す) の刺激プロトコル。
- B. weak-TBSの刺激プロトコル。 100 Hz, 5 pulseの刺激を1セット (1バースト)として、 3セット繰り返したものをweak-TBSと定義する。





PPF ratio

$$\frac{\text{Slope②}}{\text{Slope①}} > 1$$

**Fig. 2-11 PPF (paired pulse facilitation)**

PPF (paired pulse facilitation) の波形と定義。図は海馬CA1領域を 50 ms間隔で 2 回刺激 (paired pulse stimulation) した時の波形である。第2刺激に対するfEPSP slope値 / 第1刺激に対するfEPSP slope値を、PPR (paired pulse ratio) といい、PPRが 1 より大きい場合をPPFという。



## 第 3 章 結果

本研究では full-LTP 誘導のために、full-TBS (10 バースト) を、weak-LTP 誘導のために weak-TBS (3 バースト) をそれぞれ用いて実験を行った。LTP の測定では、LTP を誘導する前の 20 分間の fEPSP slope の平均値を 100% に規格化してプロットした。また、fEPSP slope の値の時間変化は、full-TBS もしくは weak-TBS により刺激した時刻を  $t = 0$  とした。 $t < 0$ 、 $t > 0$  の各領域の fEPSP の値を 3 点間で平均してプロットした。また、LTP 測定における  $t = -20 \sim 0$ 、 $60 \sim 70$  分の間のそれぞれの区間で PPF ratio を 2 回ずつ測定した。

測定の際は、ACSF を  $2 \text{ ml/min}$  で灌流し続けた。さらに、2 次蒸留水 (DDW) により湿気を含ませた混合ガス ( $\text{O}_2 95\% / \text{CO}_2 5\%$ ) を  $200 \sim 300 \text{ ml/min}$  で通気した。

本実験では、 $n$  はスライス数を示す。また、測定はすべて 12 週齢成獣オスラットから取り出した海馬スライス CA1 領域で行った。

LTP の増強率は、以下のように定義する。

$$\text{増強率}(\%) = \frac{\text{t} = 51 \sim 60 \text{ 分間の fEPSP slope の平均値}}{\text{t} = -9 \sim 0 \text{ 分間の fEPSP slope の平均値}} \times 100$$

### 3-1 E2-LTP 成立への女性ホルモン受容体 ( $\text{ER}\alpha / \text{ER}\beta$ ) の関与

E2-LTP の成立に関わる信号伝達系を調べるために、weak-TBS を用いて実験を行った。

序論の 1-2-2 で述べたように、先行研究から、 $\text{ER}\alpha$  は神経シナプスに存在することや、E2 は神経シナプスに存在する  $\text{ER}\alpha$  と  $\text{ER}\beta$  を受容体として急性的な効果を発揮することが報告されている (Mukai et al., 2007, Kramar et al., 2009, Ooishi et al., 2012, Tanaka and Sokabe, 2013)。したがって、これらの報告に基づき、E2-LTP の成立に女性ホルモン受容体の関与があると考えて実験を行った。

#### 3-1-1 $\text{ER}\alpha / \text{ER}\beta$ のアンタゴニストは E2-LTP の成立を阻害する

E2 単独および同時に  $100 \text{ nM}$  ICI182,780 ( $\text{ER}\alpha / \text{ER}\beta$  アンタゴニスト) (Mukai et al., 2007) を 30 分間作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は E2 を作用させない場合は  $115 \pm 3\%$  (Control,  $n = 10$ )、 $120 \pm 2\%$  (ICI,  $n = 5$ ) であった。E2 を作用させたとき

は、 $138 \pm 5 \%$  (E2\_30min,  $n = 10$ )、 $117 \pm 4 \%$  (E2 + ICI,  $n = 8$ ) となり、これら 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 とアンタゴニストとの間に交互作用が認められた ( $F(1, 29) = 10.61$ ,  $p < 0.005$ )。結果、E2 と Control (下位検定 (単純主効果検定)、 $F(1, 29) = 16.54$ ,  $p < 0.001$ )、E2 と E2+ICI (単純主効果検定、 $F(1, 29) = 13.60$ ,  $p < 0.001$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、ICI182,780 は E2-LTP の成立を阻害した (Fig. 3-1)。

ICI182,780 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-1)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、アンタゴニスト単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-1-2 ER $\alpha$ アゴニストは weak-LTP を増強する

PPT が weak-LTP に及ぼす影響を測定した。100 nM PPT (ER $\alpha$  アゴニスト) (Ooishi et al., 2012) をスライスに 30 分間作用させた後、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は、 $130 \pm 5 \%$  (PPT,  $n = 8$ ) となり、Control、E2 を含めた 3 群間で one-way ANOVA を行ったところ、有意差が認められた ( $F(2, 25) = 8.79$ ,  $p < 0.05$ )。結果、Control と PPT (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )、Control と E2 (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、ER $\alpha$  アゴニストは weak-LTP を増強した (Fig. 3-2)。

PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-1-3 ER $\beta$ アゴニストは weak-LTP を増強する

WAY200070 が weak-LTP に及ぼす影響を測定した。100 nM WAY200070 (ER $\beta$  アゴニスト) (Kramar et al., 2009) をスライスに 30 分間作用させた後、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は、 $133 \pm 7 \%$  (WAY,  $n = 8$ ) となった。Control, E2 を含めた 3 群間で one-way ANOVA を行ったところ、有意差が認められた ( $F(2, 25) = 6.84$ ,  $p < 0.05$ )。結果、Control と WAY (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )、Control と E2 (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、ER $\beta$  アゴニストは weak-LTP を増強した (Fig. 3-2)。

PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、前シナプスからの寄与の可能性は低い。

## 3-2 リン酸化酵素と NMDA 受容体からなる E2-LTP 信号伝達系の解析

ER $\alpha$  / ER $\beta$  の下流の信号伝達系について調べた。テタヌス刺激や full-TBS などの強い刺激で誘導される LTP において、ERK / MAPK, PKC, PKA, CaMK II などの関与がよく知

られている (Malenka and Bear, 2004, Luscher and Malenka, 2012)。また、E2 の作用効果とリン酸化酵素との関連性を示す報告は多数ある (Dominguez et al., 2007, Mukai et al., 2007, Logan et al., 2011, Ooishi et al., 2012)。そこで、リン酸化酵素である ERK / MAPK, PKA, PKC, CaMKII および NMDA 受容体サブユニット NR2B が E2-LTP 成立に関わると考え、これらの阻害剤を用いて実験を行った。

### 3-2-1 ERK / MAPK, PKA, PKC の阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する

海馬 CA1 領域における NMDA 受容体に依存する LTP で、LTP 成立に重要な酵素として、ERK / MAPK, PKA, PKC が知られている (Malenka and Bear, 2004, Luscher and Malenka, 2012)。また、これらリン酸化酵素に対して、PKA & PKC → ERK / MAPK → LTP 成立という信号伝達系が提案されている (Sweatt, 1999, 2001)。さらに、E2 の急性的なシナプス可塑性の変化において、ERK / MAPK が関与することや (Mukai et al., 2007, Ooishi et al., 2012)、E2 により ERK / MAPK のリン酸化が生じることが示されている (Dominguez et al., 2007, Logan et al., 2011)。したがって、本研究では、E2-LTP の成立に ERK / MAPK, PKA, PKC が関与すると考え、これらリン酸化酵素の阻害剤を用いて調べた。

ERK / MAPK 阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する: E2 と同時に 10  $\mu$ M U0126 (ERK / MAPK 阻害剤) (Favata et al., 1998, Ooishi et al., 2012) を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $115 \pm 5 \%$  (E2 + U, n = 8)、 $115 \pm 4 \%$  (U, n = 5) となり、Control, E2 を含めた 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 と阻害剤の間で交互作用が認められた ( $F(1, 29) = 6.97, p < 0.05$ )。結果、E2 と E2+U (単純主効果検定、 $F(1, 29) = 14.77, p < 0.001$ )、E2 と Control (単純主効果検定、 $F(1, 29) = 14.48, p < 0.001$ )、の間にそれぞれ有意差が認められた。したがって、U0126 は E2-LTP の成立を阻害した (Fig. 3-3)。

U0126 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-3)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、阻害剤単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

PKA 阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する: E2 と同時に 10  $\mu$ M H89 (PKA 阻害剤) (Chijiwa et al., 1990) を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $119 \pm 4 \%$  (E2 + H89, n = 8)、 $114 \pm 5 \%$  (H89, n = 5) となり、Control, E2 を含めた 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 と阻害剤の間で交互作用が認められた ( $F(1, 29) = 4.40, p < 0.05$ )。結果、E2 と E2 + H89 (単純主効果検定、 $F(1, 29) = 10.18, p < 0.005$ )、E2 と Control (単純主効

果検定、 $F(1,29) = 14.89, p < 0.001$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、H89 は E2-LTP の成立を阻害した (Fig. 3-4)。

H89 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-4)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、阻害剤単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

PKC 阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する: E2 と同時に  $10 \mu\text{M}$  chelerythrine (PKC 阻害剤) (Herbert et al., 1990) を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $114 \pm 3 \%$  (E2 + chel,  $n = 8$ )、 $123 \pm 3 \%$  (chel,  $n = 5$ ) となった。Control, E2 を含めた 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 と阻害剤の間で交互作用が認められた ( $F(1, 29) = 16.58, p < 0.001$ )。結果、E2 と E2+Chel (単純主効果検定、 $F(1,29) = 19.42, p < 0.001$ )、E2 と Control (単純主効果検定、 $F(1,29) = 17.47, p < 0.001$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、chelerythrine は E2-LTP の成立を阻害した (Fig. 3-5)。

Chelerythrine 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-5)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、阻害剤単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-2-2 NR2B 阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する

川戸研究室の先行研究より、E2 の急性効果に NMDA 受容体のサブユニット NR2B の関与が報告されている (Ooishi et al., 2012)。また、E2 の作用により ERK / MAPK を介して NR2B のリン酸化が起こるという報告がある (Dominguez et al., 2007)。さらに、本研究 3-2-1 の結果から、E2 が ERK / MAPK を介して E2-LTP を成立させることが示唆された。以上から、本研究において、E2-LTP の成立に NR2B が関与すると考え、アンタゴニストを用いて調べた。

E2 と同時に  $1 \mu\text{M}$  Ro25-6981 (NR2B アンタゴニスト) (Fischer et al., 1997) を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $118 \pm 7 \%$  (E2 + Ro,  $n = 8$ )、 $122 \pm 3 \%$  (Ro,  $n = 5$ ) となった。Control, E2 を含めた 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 と阻害剤の間で交互作用が認められた ( $F(1, 29) = 7.58, p < 0.05$ )。結果は、E2 と E2+Ro (単純主効果検定、 $F(1,29) = 8.76, p < 0.01$ )、E2 と Control (単純主効果検定、 $F(1,29) = 10.86, p < 0.005$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、Ro25-6981 は E2-LTP の成立を阻害した (Fig. 3-6)。

Ro25-6981 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-6)。また、

PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、阻害剤単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-2-3 CaMK II の阻害剤は E2-LTP の成立を阻害する

海馬 CA1 領域における NMDA 受容体依存性の LTP において、CaMK II が重要であることが知られている (Lisman et al., 2002)。本研究 3-2-2 の結果から、E2-LTP 成立に NR2B が関与していることが示唆された。また、E2-LTP 成立に NR2B 由来の  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の変化が関与していることが考えられる。この  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の変化が  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の CaMK II の活性化に影響を与えている可能性がある。ゆえに、本研究において、E2-LTP の成立における CaMK II の関与を、阻害剤を用いて調べた。

E2 をインキュベーション法により 30 分作用させた後、多電極チャンバーに移したスライスに、20  $\mu\text{M}$  KN-93 (CaMK II 阻害剤) (Ehrlich and Malinow, 2004) 入りの ACSF を灌流しながら、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $120 \pm 4\%$  (E2 + KN,  $n = 8$ )、 $118 \pm 5\%$  (KN,  $n = 6$ ) となった。Control, E2 を含めた 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 と阻害剤の間で交互作用が認められた ( $F(1, 30) = 6.58$ ,  $p < 0.05$ )。結果、E2 と E2+KN (単純主効果検定、 $F(1,30) = 10.38$ ,  $p < 0.05$ )、E2 と Control (単純主効果検定、 $F(1,30) = 15.94$ ,  $p < 0.001$ )、の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、KN-93 は E2-LTP の成立を阻害した (Fig. 3-7)。

KN-93 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-7)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、阻害剤単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-3 海馬における男性ホルモンの E2-LTP に対する急性抑制効果の解析

女性ホルモンだけでなく、男性ホルモン (T, DHT) も、海馬で合成されることが報告されている (Hojo et al., 2009)。しかし、脳内での女性ホルモンと男性ホルモンによる相互作用はよくわかっていない。したがって、本研究では E2 と男性ホルモンの weak-LTP に対する相互作用を調べることにした。

#### 3-3-1 男性ホルモン T は E2-LTP を抑制する

10 nM E2 と同時に 10 nM T を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率はそれぞれ、 $121 \pm 5\%$  (T,  $n = 9$ )、 $123 \pm 3\%$  (E2 + T,  $n = 8$ ) となり、Control, E2 を含めた 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 と T の間で交互作用が認められた ( $F(1, 33) = 7.24$ ,

$p < 0.05$ )。結果は、E2 と E2+T (単純主効果検定、 $F(1,33) = 7.53$ ,  $p < 0.01$ )、E2 と Control (単純主効果検定、 $F(1,33) = 16.69$ ,  $p < 0.001$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、T は E2-LTP の成立を抑制した (Fig. 3-8)。

T 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-8)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、T 単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-3-2 男性ホルモン DHT は E2-LTP を抑制する

10 nM E2 と同時に 10 nM DHT を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率はそれぞれ、 $116 \pm 3 \%$  (DHT,  $n = 10$ )、 $115 \pm 3 \%$  (E2 + DHT,  $n = 9$ ) となり、Control、E2 を含めた 4 群間で two-way ANOVA を行ったところ、E2 と DHT の間で交互作用が認められた ( $F(1, 35) = 13.57$ ,  $p < 0.001$ )。結果、E2 と E2+DHT (単純主効果検定、 $F(1,35) = 24.60$ ,  $p < 0.001$ )、E2 と Control (単純主効果検定、 $F(1,35) = 23.17$ ,  $p < 0.001$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、DHT は E2-LTP を抑制した (Fig. 3-9)。

DHT 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-9)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、DHT 単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-3-3 E2 と DHT の相互作用はお互いの濃度比に依存する

最近の研究から、局所合成された E2 が速やかにシナプス可塑性を変化させる可能性が示唆された (Grassi et al., 2011)。また、川戸研究室の先行研究からも、NMDA 刺激により海馬が急速な性ホルモン合成活性を持つことが示されている (Hojo et al., 2004)。このことから、海馬シナプス近傍では、E2 と DHT の濃度比が急激に変化する可能性がある。したがって、E2 と DHT 濃度比が変動したときの相互作用を調べることにした。

30 nM E2、10 nM DHT の条件で作用: E2 と同時に DHT を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $135 \pm 6 \%$  (30 nM E2 + 10 nM DHT,  $n = 5$ ) となり、10 nM E2, 10 nM E2 + 10 nM DHT を含めた 3 群間で one-way ANOVA を行ったところ、有意差が認められた ( $F(2, 21) = 9.30$ ,  $p < 0.05$ )。結果、10nM E2 + 10 nM DHT と 10 nM E2、10 nM E2 + 10 nM DHT と 30 nM E2 + 10 nM DHT の間でそれぞれ有意差が認められた (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。したがって、E2 の濃度が DHT の濃度に対して 3 倍高いとき、E2-LTP は DHT に抑制されなかった (Fig. 3-10)。

PPF ratio の値に、有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。しかし、

30 nM E2 + 10 nM DHT においては、第 1 刺激と第 2 刺激の間隔を 50 ms とした PPF ratio の値に、有意差が認められた (post-hoc paired t-test,  $p < 0.05$ )。一方、第 1 刺激と第 2 刺激の間隔を 100 ms、200ms とした場合における PPF ratio の値を調べたところ、有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、前シナプスからの寄与の可能性は低い。

10 nM E2、3 nM DHT の条件で作用: E2 と同時に DHT を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $130 \pm 3 \%$  (10 nM E2 + 3 nM DHT,  $n = 6$ ) となり、それぞれに対して 10 nM E2、10 nM E2 + 10 nM DHT を含めた 3 群間で one-way ANOVA を行ったところ、それぞれ有意差が認められた ( $F(2, 22) = 10.08$ ,  $p < 0.05$ )。結果、10 nM E2 + 10 nM DHT と 10 nM E2、10 nM E2 + 10 nM DHT と 10 nM E2 + 3 nM DHT の間でそれぞれ有意差が認められた (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。したがって、DHT の濃度が E2 の濃度に対して 3 分の 1 のとき、E2-LTP は DHT に抑制されなかった (Fig. 3-10)。

PPF ratio の値に、有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-4 E2-LTP に対する抑制効果への男性ホルモン受容体 (AR) の関与

本研究結果 3-3-1、3-3-2 から、T, DHT が E2 の weak-LTP に対する増強効果を抑制することを示した。また、T, DHT は AR (男性ホルモン受容体) を介して神経系に作用することが報告されている (Hatanaka et al., 2014)。さらに、DHT は T よりも AR に対する高い活性を示すことも知られている (Grino et al., 1990)。よって、本研究ではより活性の高い DHT を用いた。また、DHT が AR を介して E2-LTP を抑制すると考え、アンタゴニストを用いて調べた。

#### 3-4-1 AR アンタゴニストは DHT による E2-LTP 抑制効果を阻害する

10 nM E2 と同時に 10 nM DHT, 1  $\mu$ M Hydroxyflutamide (HF) (AR アンタゴニスト) (Hatanaka et al., 2009) を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率はそれぞれ、 $143 \pm 9 \%$  (E2 + DHT + HF,  $n = 8$ )、 $132 \pm 3 \%$  (E2 + HF,  $n = 6$ )、 $115 \pm 4 \%$  (DHT + HF,  $n = 6$ )、 $117 \pm 4 \%$  (HF,  $n = 6$ ) となった。Control, E2, DHT, E2+DHT を含めた 8 群間で three-way ANOVA を行ったところ、E2 と DHT、阻害剤の 3 つの間で交互作用が認められた ( $F(1, 57) = 8.18$ ,  $p < 0.01$ )。結果、E2+HF と HF (下位検定 (単純・単純主効果検定)、 $F(1, 57) = 4.65$ ,  $p < 0.05$ )、E2 と Control (下位検定、 $F(1, 57) = 11.45$ ,  $p < 0.005$ )、E2 と E2+DHT (下位検定、 $F(1, 57) = 12.15$ ,  $p < 0.001$ )、E2+DHT+HF と DHT+HF (下位検定、 $F(1, 57) = 17.77$ ,  $p < 0.001$ )

の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、HF は DHT の E2-LTP に対する抑制効果を阻害した (Fig. 3-11)。

HF は、HF 単独での作用や、E2, DHT に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-11)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、アンタゴニスト単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-5 E2-LTP 抑制効果への脱リン酸化酵素 Calcineurin の関与

本研究結果 3-3-2 から、DHT が E2-LTP を抑制することを示した。また、LTD のメカニズムとして、脱リン酸化酵素の Calcineurin の関与が示唆されている (Lisman, 1989)。したがって、DHT による E2-LTP の抑制は Calcineurin を介した信号伝達系であると考え、阻害剤を用いて調べた。

#### 3-5-1 Calcineurin の阻害剤は DHT による E2-LTP 抑制効果を阻害する

10 nM E2 と同時に 10 nM DHT, 10  $\mu$ M Cyclosporine A (CsA) (Wiederrecht et al., 1993) を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $140 \pm 10 \%$  (E2 + DHT + CsA,  $n = 6$ )、 $130 \pm 3 \%$  (E2 + CsA,  $n = 6$ )、 $114 \pm 5 \%$  (DHT + CsA,  $n = 6$ )、 $116 \pm 4 \%$  (CsA,  $n = 6$ ) となり、Control, E2, DHT, E2+DHT を含めた 8 群間で three-way ANOVA を行ったところ、E2 と DHT、阻害剤の 3 つの間で交互作用が認められた ( $F(1, 55) = 7.24$ ,  $p < 0.01$ )。結果、E2+CsA と CsA (下位検定、 $F(1, 55) = 5.39$ ,  $p < 0.05$ )、E2 と Control (下位検定、 $F(1, 55) = 12.39$ ,  $p < 0.001$ )、E2 と E2+DHT (下位検定、 $F(1, 55) = 13.16$ ,  $p < 0.001$ )、E2+DHT+CsA と DHT+CsA (下位検定、 $F(1, 55) = 15.16$ ,  $p < 0.001$ ) の間でそれぞれ有意差が認められた。したがって、CsA は DHT の E2-LTP に対する抑制効果を阻害した (Fig. 3-12)。

CsA は、CsA 単独での作用や、E2, DHT に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 3-12)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、阻害剤単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-6 E2 の作用時間と濃度変化による weak-LTP への影響

本研究では 2-3-3 に記述したインキュベーション法で E2 を短時間作用させることで、LTP の成立について調べた。また、E2 の作用時間、濃度変化による weak-LTP への影響についても調べた。

#### 3-6-1 E2-LTP と full-LTP との比較

full-LTP と E2-LTP の増強率を比較した。10 nM E2 をスライスに 30 分間作用させた



後、weak-TBS で刺激した。ただし、E2 を作用させない場合は weak-TBS あるいは full-TBS で刺激した。LTP 増強率は、E2 を作用させない場合は  $115 \pm 3 \%$  (weak-TBS (Control),  $n = 10$ )、 $141 \pm 4 \%$  (full-TBS,  $n = 6$ ) であった。E2 を作用させた場合は、 $138 \pm 5 \%$  (10 nM E2\_30min,  $n = 10$ ) となった。以上の 3 群間で one-way ANOVA を行ったところ、有意差が認められた ( $F(2, 23) = 13.99, p < 0.05$ )。結果、10 nM E2\_30min と weak-TBS、full-TBS と weak-TBS の間でそれぞれ有意差が認められた (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。したがって、インキュベーション法により E2 を短時間作用させたときも、灌流で作用させたとき (新堂, 2010) と同様に、E2-LTP が成立することと、E2-LTP の大きさと full-LTP の大きさが同程度であることがわかった (Fig. 3-13)。

PPF ratio の値に、有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-6-2 E2-LTP における E2 の作用時間依存性

E2-LTP における E2 の作用時間依存性を解析した。10 nM E2 をスライスに作用させる時間を 15、30、45 分、2 時間作用と変化させ、それぞれの条件に対して、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は、 $124 \pm 1 \%$  (10 nM E2\_15min,  $n = 5$ )、 $138 \pm 5 \%$  (10 nM E2\_30min,  $n = 10$ )、 $128 \pm 3 \%$  (10 nM E2\_45min,  $n = 5$ )、 $120 \pm 2 \%$  (10 nM E2\_2h,  $n = 9$ ) となった。以上に、E2 を作用していない Control を加えた 5 群間で one-way ANOVA を行ったところ、有意差が認められた ( $F(4, 34) = 8.47, p < 0.05$ )。結果、10 nM E2\_30min と Control、10 nM E2\_30min と 10 nM E2\_2h の間でそれぞれ有意差が認められた (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。したがって、E2 の効果は、E2 を 30 分間作用させたときに最大となった (Fig. 3-14)。

PPF ratio の値に、有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。しかし、10 nM E2\_45min においては、第 1 刺激と第 2 刺激の間隔を 50 ms とした PPF ratio の値に、有意差が認められた (post-hoc paired t-test,  $p < 0.05$ )。一方、第 1 刺激と第 2 刺激の間隔を 100 ms、200ms とした場合における PPF ratio の値を調べたところ、有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、前シナプスからの寄与の可能性は低い。

### 3-6-3 E2-LTP における E2 の作用濃度依存性

E2-LTP における E2 の濃度依存性を解析した。0.1 nM E2, 1 nM E2, 10 nM E2, 30 nM E2 をそれぞれスライスに 30 分作用させた後、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は、 $126 \pm 5 \%$  (0.1 nM E2\_30min,  $n = 5$ )、 $125 \pm 4 \%$  (1 nM E2\_30min,  $n = 5$ )、 $136 \pm 4 \%$  (30 nM

E2\_30min, n = 5) となり、Control、10 nM E2\_30min を含めた 5 群間で one-way ANOVA を行ったところ、有意差が認められた ( $F(4, 30) = 6.08, p < 0.05$ )。結果、10 nM E2\_30min と Control、30nM E2\_30min と Control の間でそれぞれ有意差が認められた (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )。したがって、E2 の効果は E2 を 10nM 作用させたときに最大となった (Fig. 3-14)。

PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。しかし、30 nM E2\_30min においては、第 1 刺激と第 2 刺激の間隔を 50 ms とした PPF ratio の値に、有意差が認められた (post-hoc paired t-test,  $p < 0.05$ )。一方、第 1 刺激と第 2 刺激の間隔を 100 ms、200ms とした場合における PPF ratio の値を調べたところ、100 ms でも有意差が認められた (post-hoc paired t-test,  $p < 0.05$ )。しかし、200 ms では有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、前シナプスからの寄与の可能性は低い。

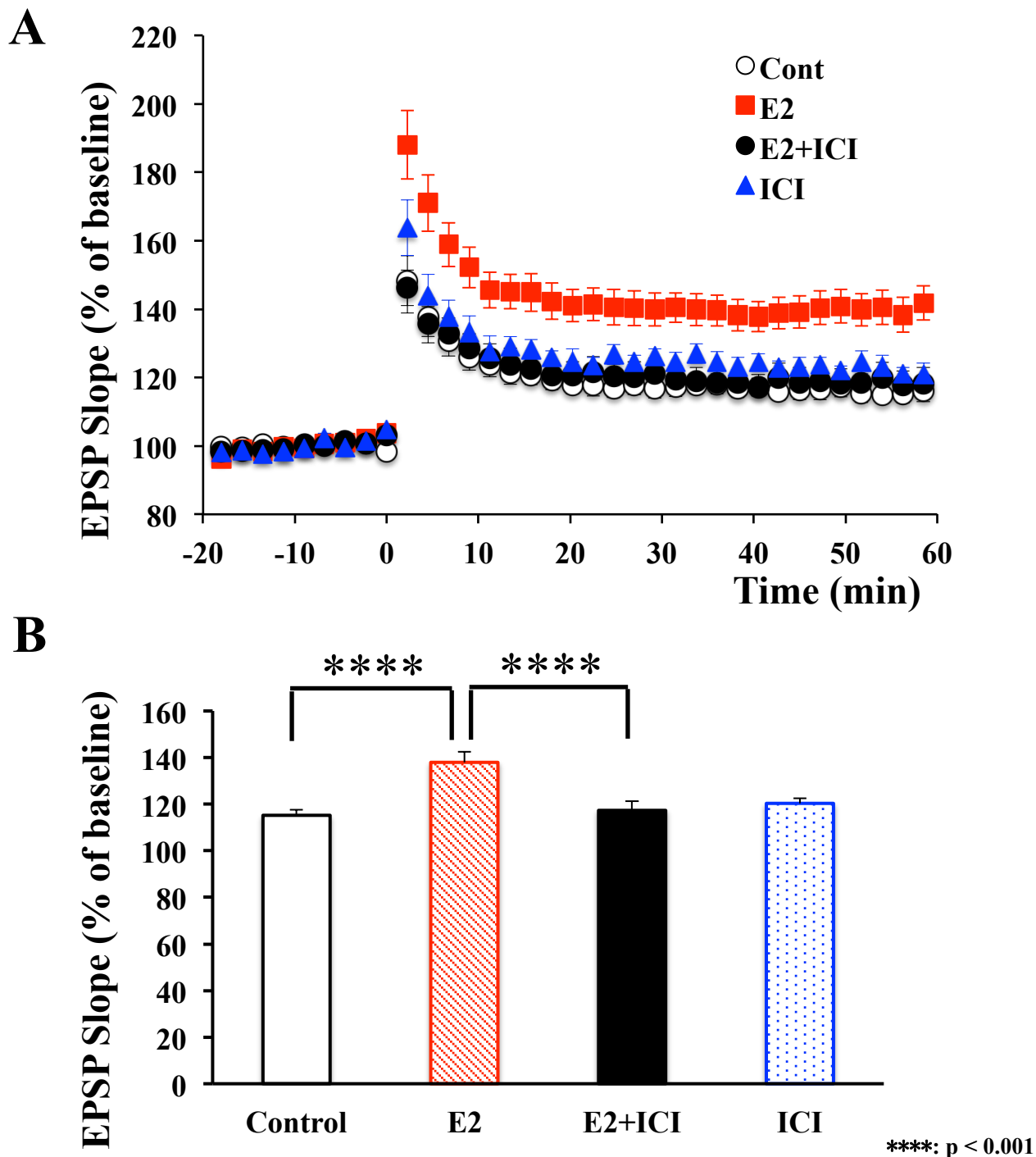
### 3-7 E2-LTP の成立への mGluR1 の関与

Mermelstein らにより、メスのラット海馬では、ER $\alpha$  下流に mGluR1a が存在し、ERK / MAPK を介して CREB のリン酸化が起こることが示唆されている (Boulware and Mermelstein, 2005, 2009)。一方で、本研究の E2 の weak-LTP 増強効果に、3-1-2 の結果からは ER $\alpha$  が、3-2-1 の結果からは ERK / MAPK の関与が示唆されている。以上から、本研究では、オスラットでも E2-LTP 成立に同様の信号伝達系が存在する可能性があるため、阻害剤を用いて調べた。

#### 3-7-1 mGluR1 のアンタゴニストは E2-LTP の成立を阻害しない

10 nM E2 と同時に 4  $\mu$ M YM202074 (mGluR1 アンタゴニスト) (Nebieridze et al., 2012) を作用させ、weak-TBS で刺激した。LTP 増強率は  $130 \pm 4 \%$  (E2 + YM, n = 8)、 $117 \pm 3 \%$  (YM, n = 5) となり、Control、E2 を含めた 4 群間で one-way ANOVA を行ったところ、有意差が認められた ( $F(3, 29) = 8.09, p < 0.05$ )。結果、Control と E2 + YM (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )、Control と E2 (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )、E2 と YM202074 との間に有意差が認められた (post-hoc Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3-15)。

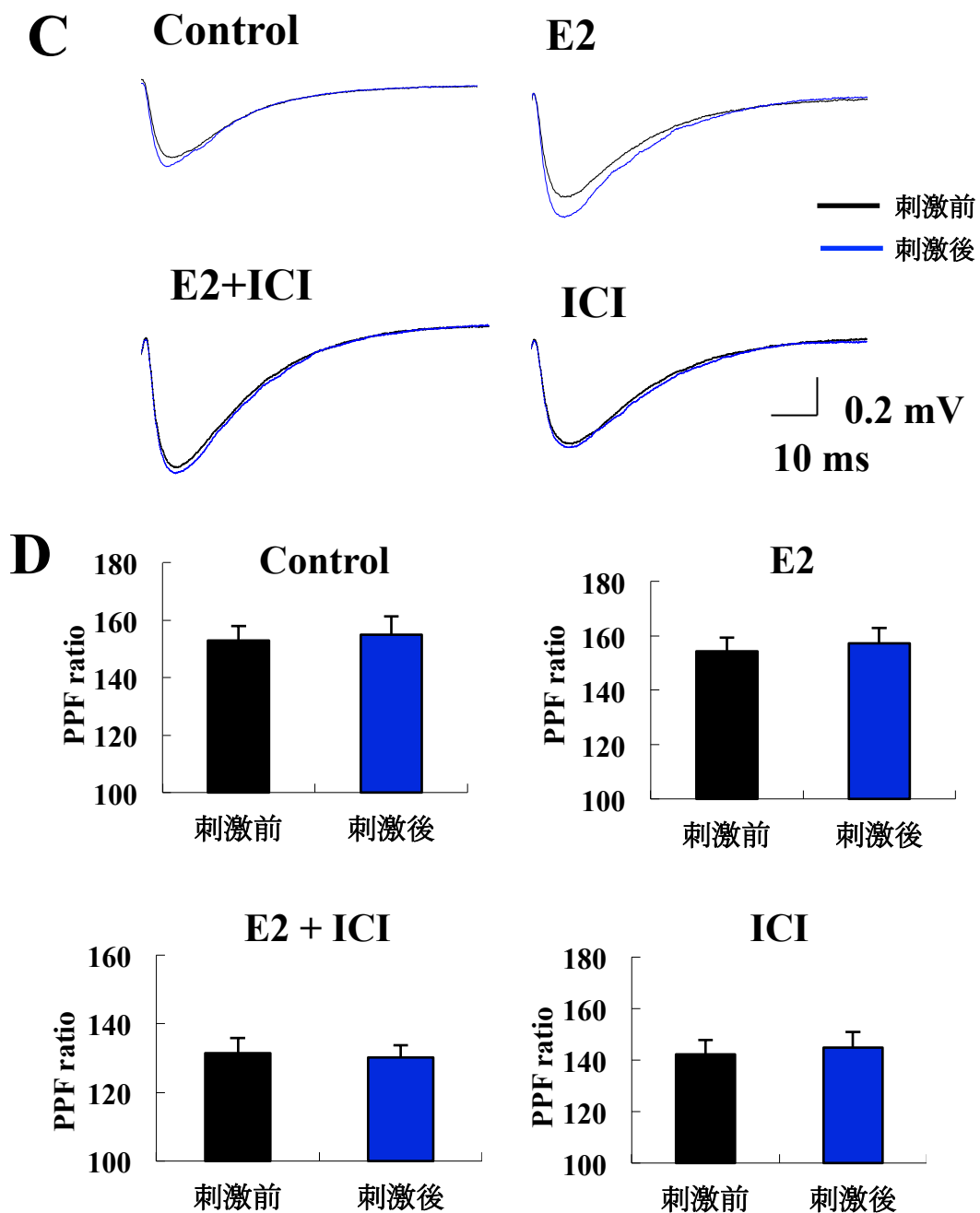
YM202074 単独では、Control に対して有意な影響を及ぼさなかった (post-hoc Tukey-Kramer,  $p > 0.05$ ) (Fig. 3-15)。また、PPF ratio の値に有意差は認められなかった (post-hoc paired t-test,  $p > 0.05$ )。したがって、アンタゴニスト単独の効果や前シナプスからの寄与の可能性は低い。



**Fig. 3-1 女性ホルモン受容体ER ( $ER\alpha$  /  $ER\beta$ ) の  
アンタゴニスト (ICI) はE2-LTPを阻害する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。海馬スライスに薬剤を30分間作用させた。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 100 nM ICI182,780 (E2 + ICI, n = 8)、100 nM ICI182,780 (ICI, n = 5) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

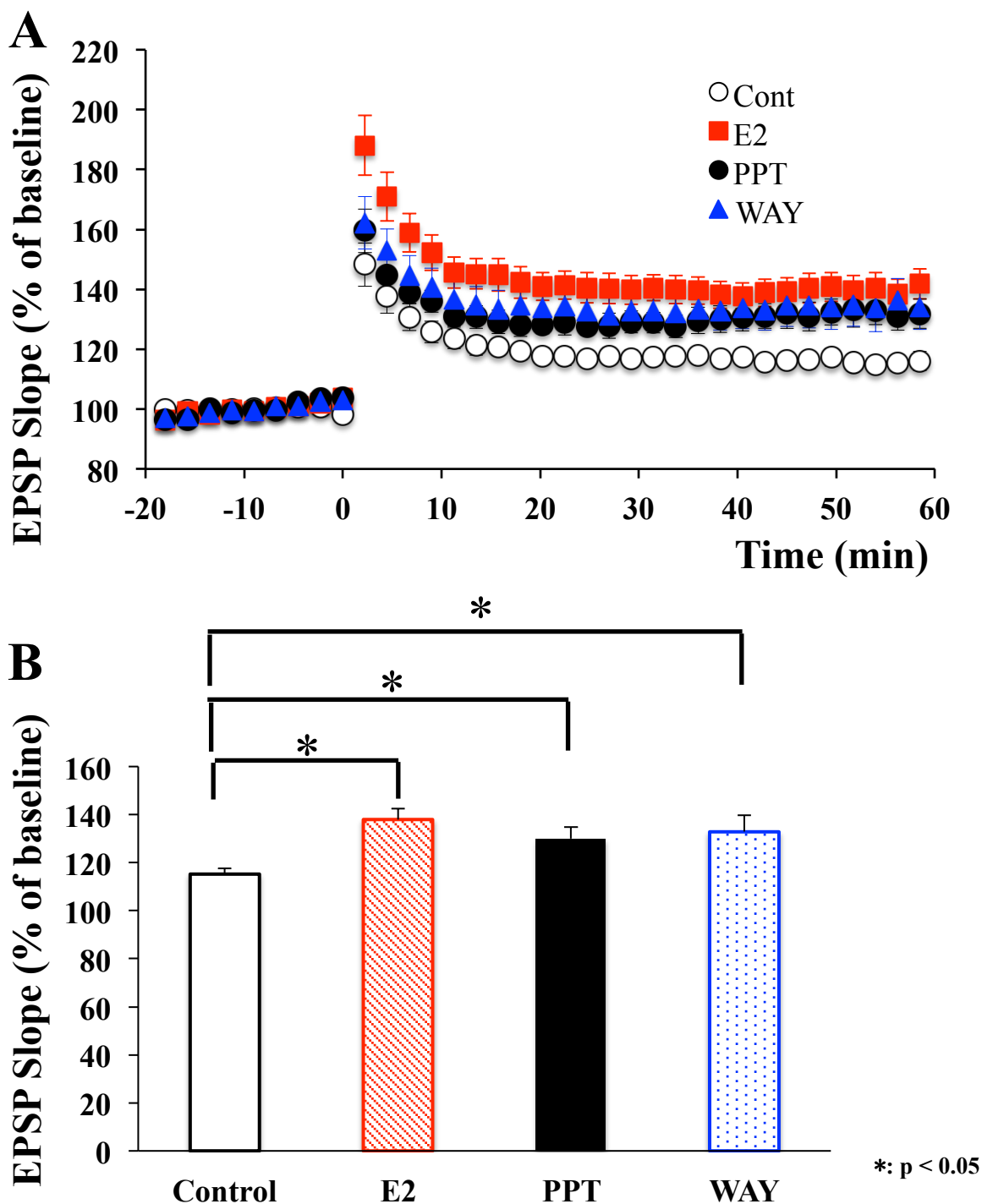
統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-1 続き**

- C. fEPSPの外形。E2や阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 100 nM ICI182,780 (E2 + ICI)、100 nM ICI182,780 (ICI)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件は、それぞれControl、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 100 nM ICI182,780 (E2 + ICI)、100 nM ICI182,780 (ICI)である。

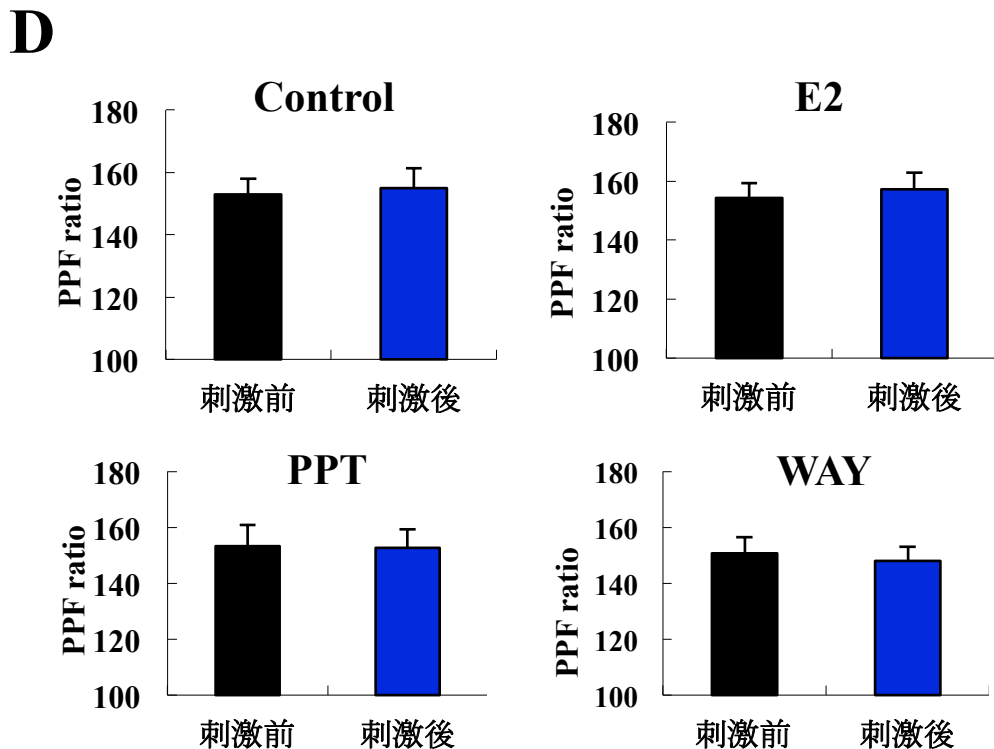
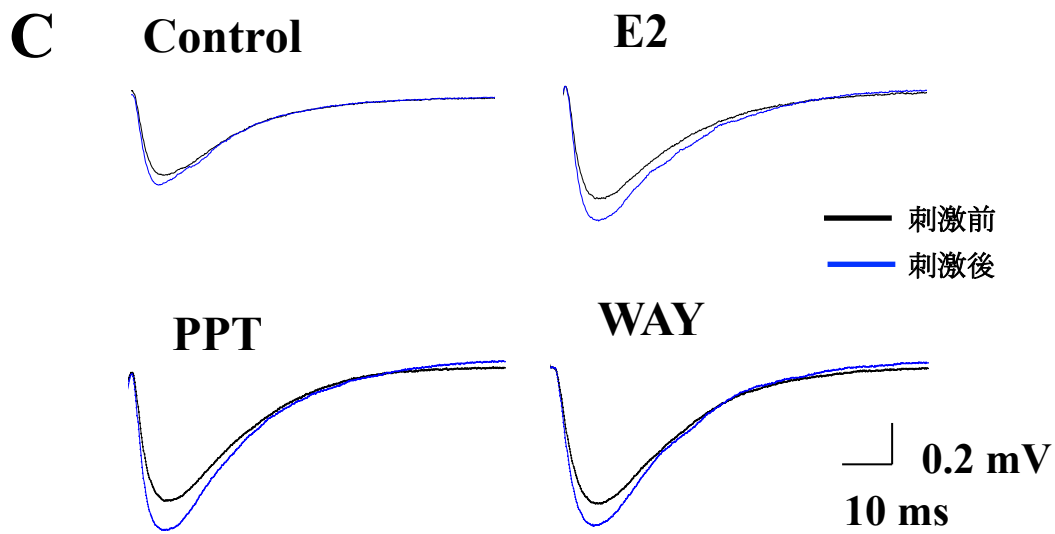
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-2  $ER\alpha$ のアゴニスト (PPT),  $ER\beta$ のアゴニスト (WAY) はそれぞれweak-LTPを増強する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、100 nM PPT (PPT, n = 8)、100 nM WAY200070 (WAY, n = 8) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

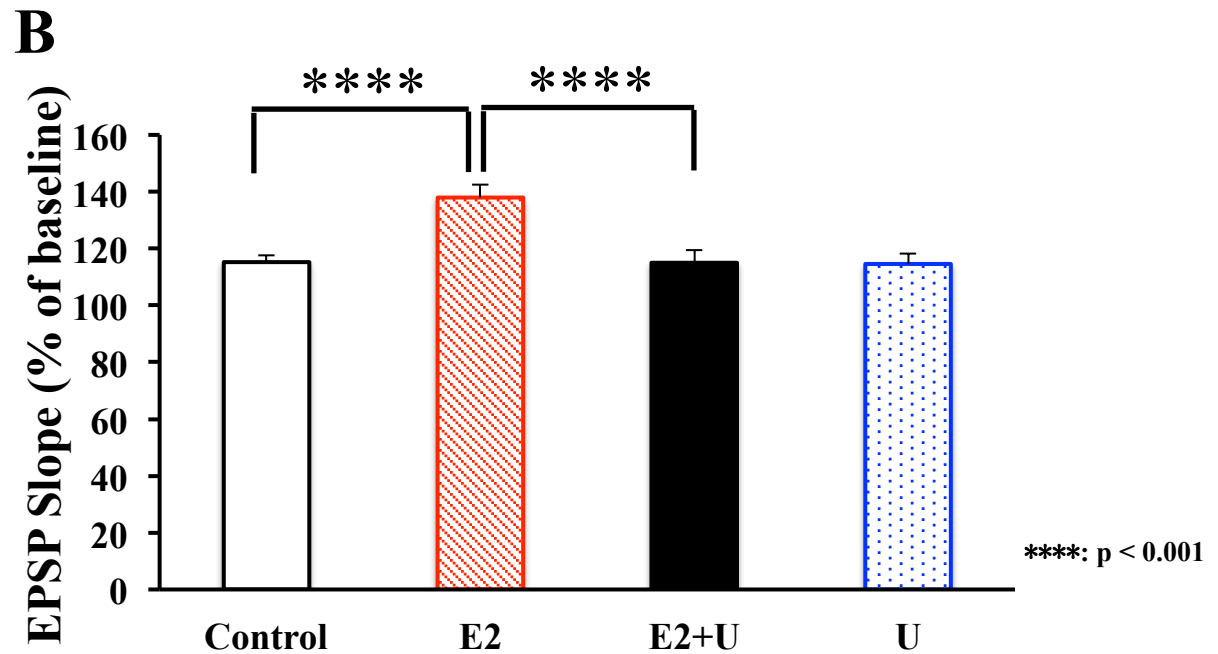
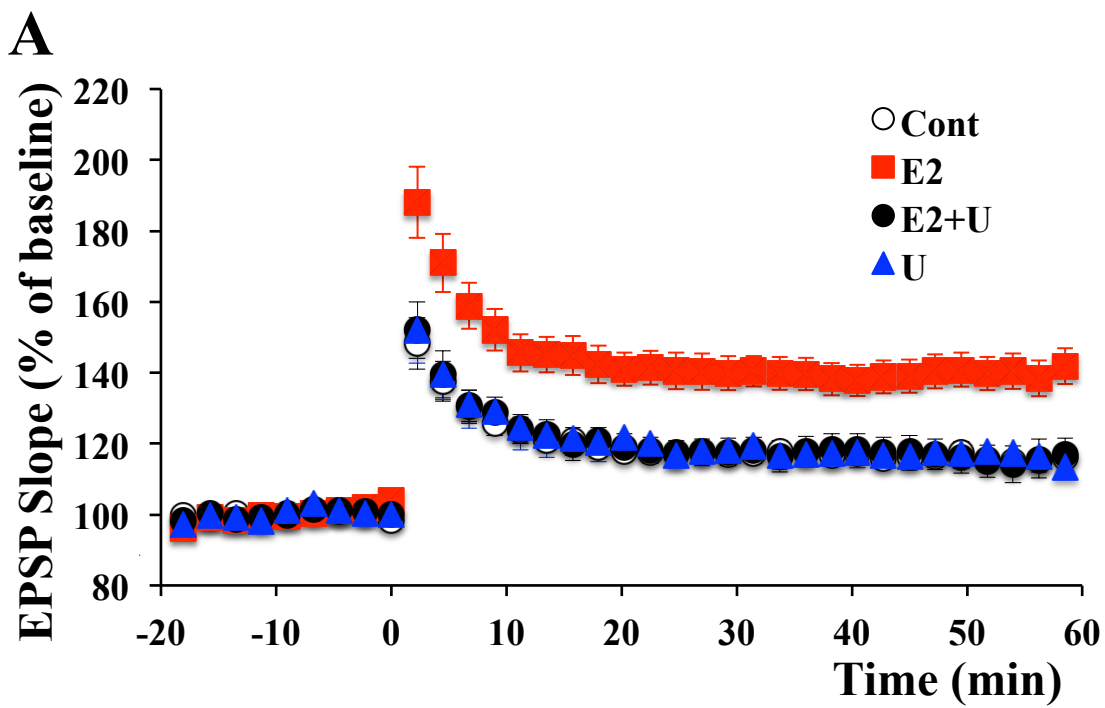
統計解析は、one-way ANOVAを行った後、Tukey-Kramerの多重比較検定を行った。P < 0.05を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-2 続き**

- C. fEPSPの外形。E2やアゴニストを30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、100 nM PPT (PPT)、100 nM WAY200070 (WAY)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、100 nM PPT (PPT)、100 nM WAY200070 (WAY)である。

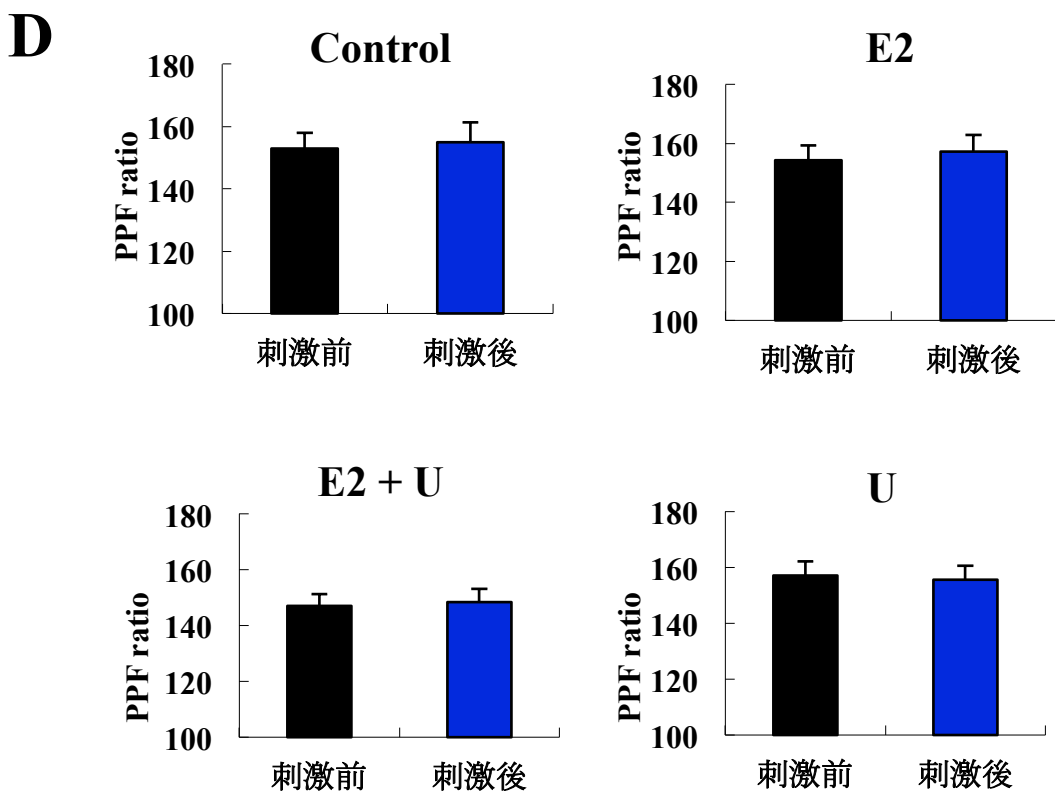
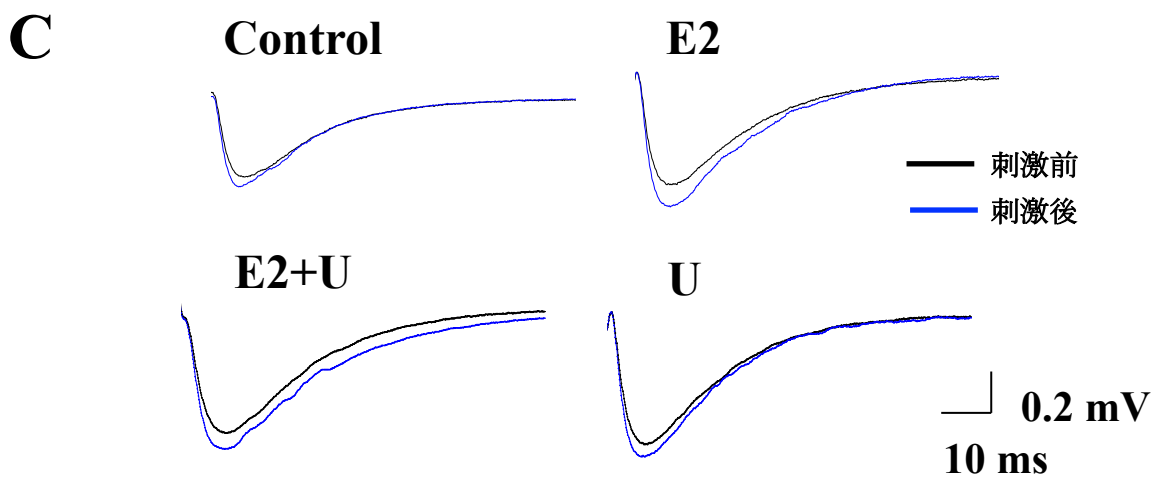
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-3 ERK/ MAPK阻害剤 (U) はE2-LTPの成立を阻害する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M U0126 (E2 + U, n = 8)、10  $\mu$ M U0126 (U, n = 5) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



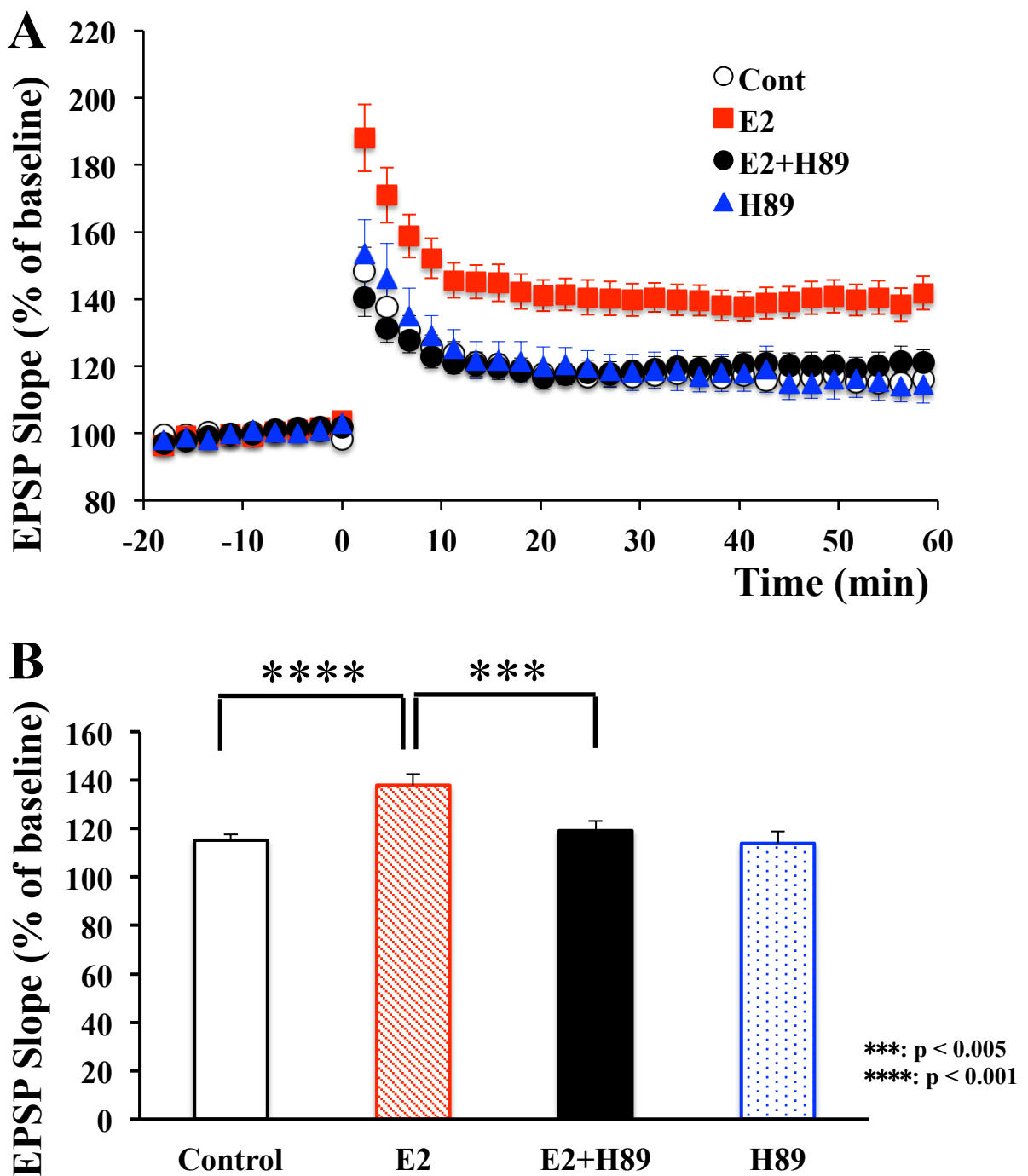
**Fig. 3-3 続き**

C. fEPSPの外形。E2や阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10nM E2 + 10  $\mu$ M U0126 (E2 + U)、10  $\mu$ M U0126 (U) のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。

D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M U0126 (E2 + U)、10  $\mu$ M U0126 (U) である。

統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

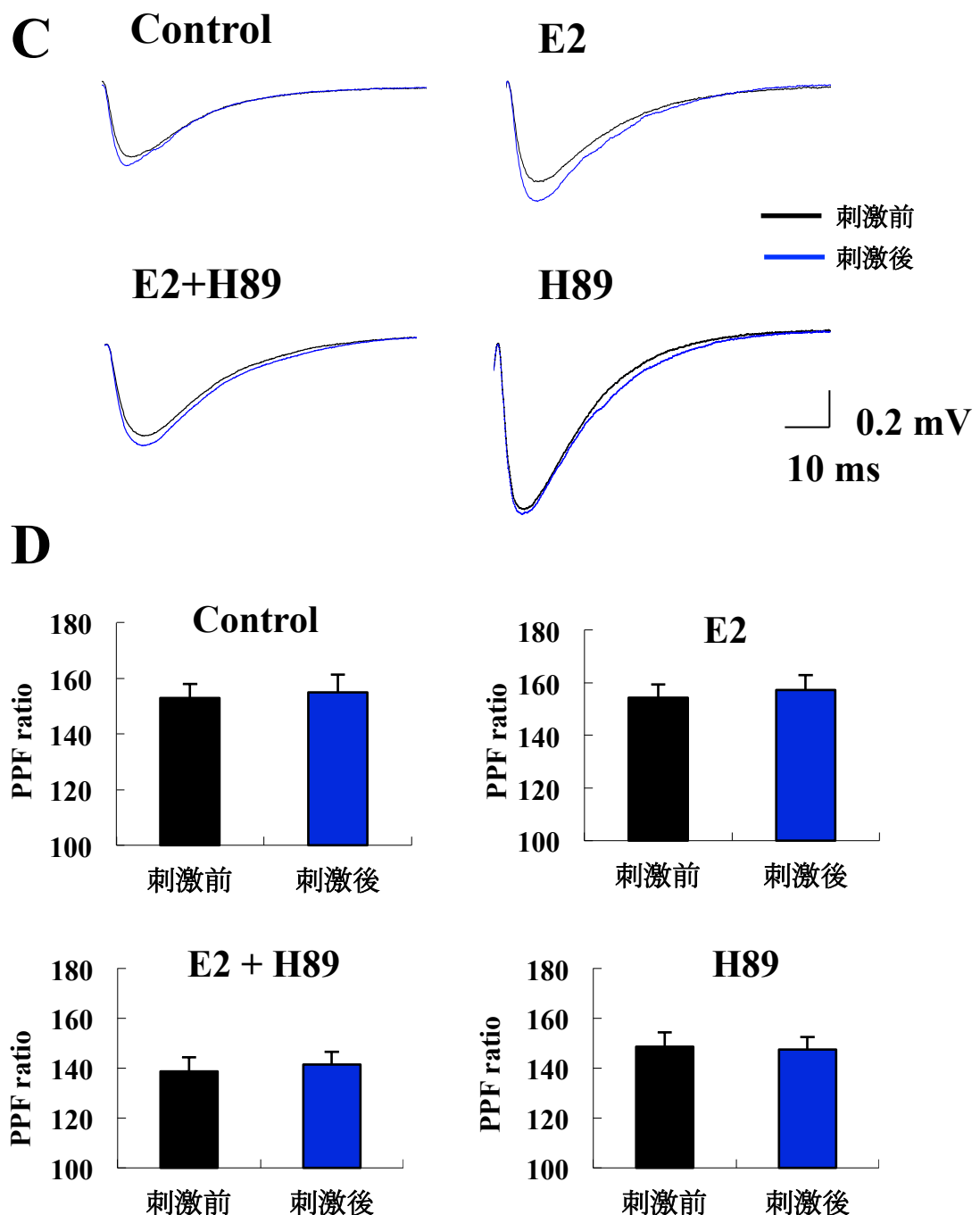




**Fig. 3-4 PKA阻害剤 (H89) はE2-LTPの成立を阻害する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M H89 (E2 + H89, n = 8)、10  $\mu$ M H89 (H89, n = 5) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

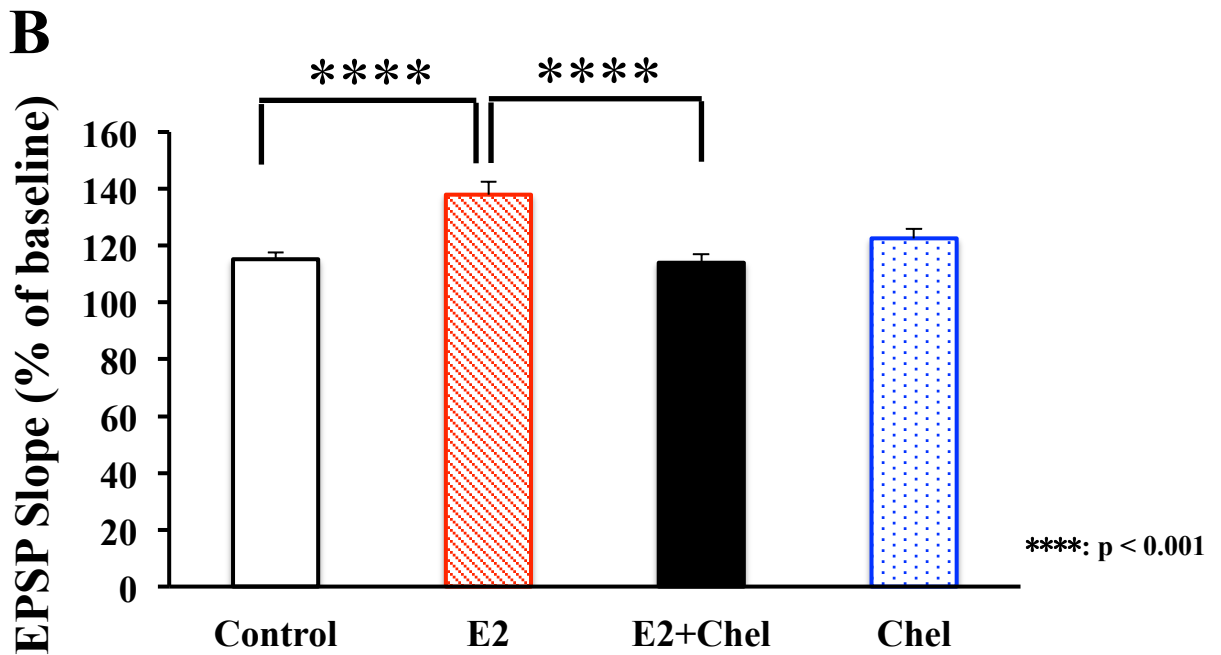
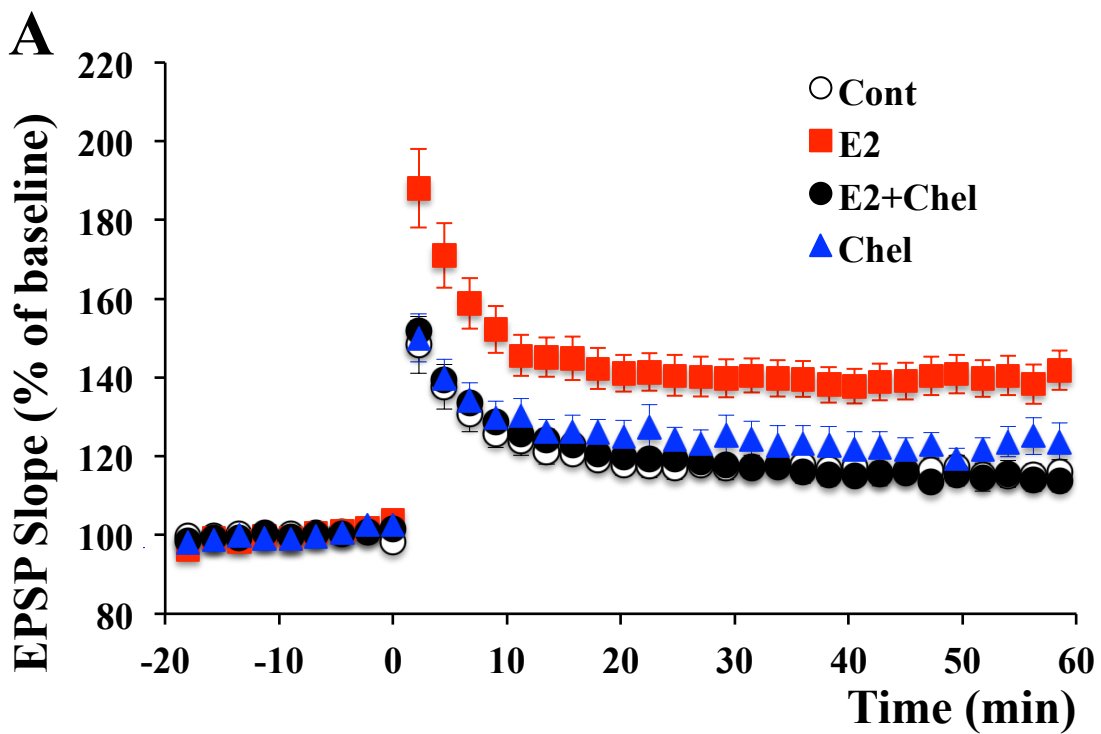
統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*\*\*は $p < 0.005$ 、\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-4 続き**

- C. fEPSPの外形。E2や阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10nM E2 + 10  $\mu$ M H89 (E2 + H89)、10  $\mu$ M H89 (H89)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M H89 (E2 + H89)、10  $\mu$ M H89 (H89)である。

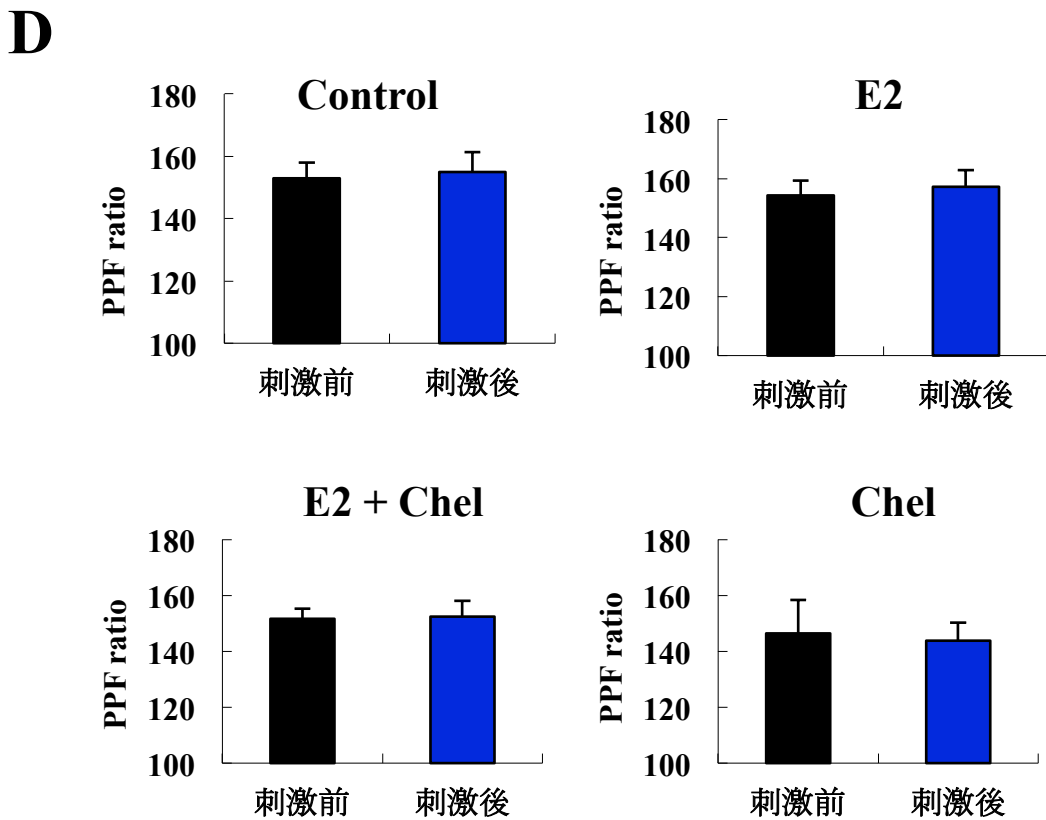
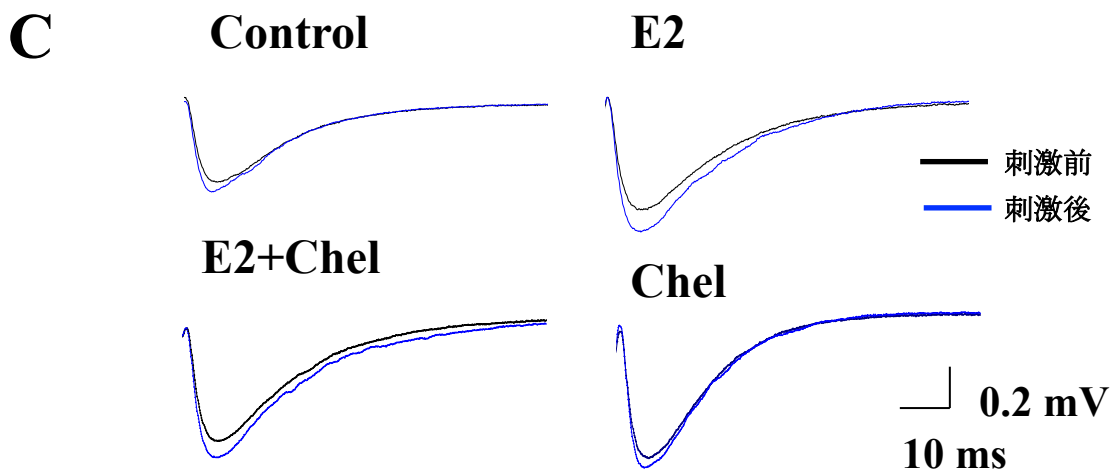
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-5 PKC阻害剤 (Chel) はE2-LTPの成立を阻害する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20~0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M chelerythrine (E2 + Chel, n = 8)、10  $\mu$ M chelerythrine (Chel, n = 5) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

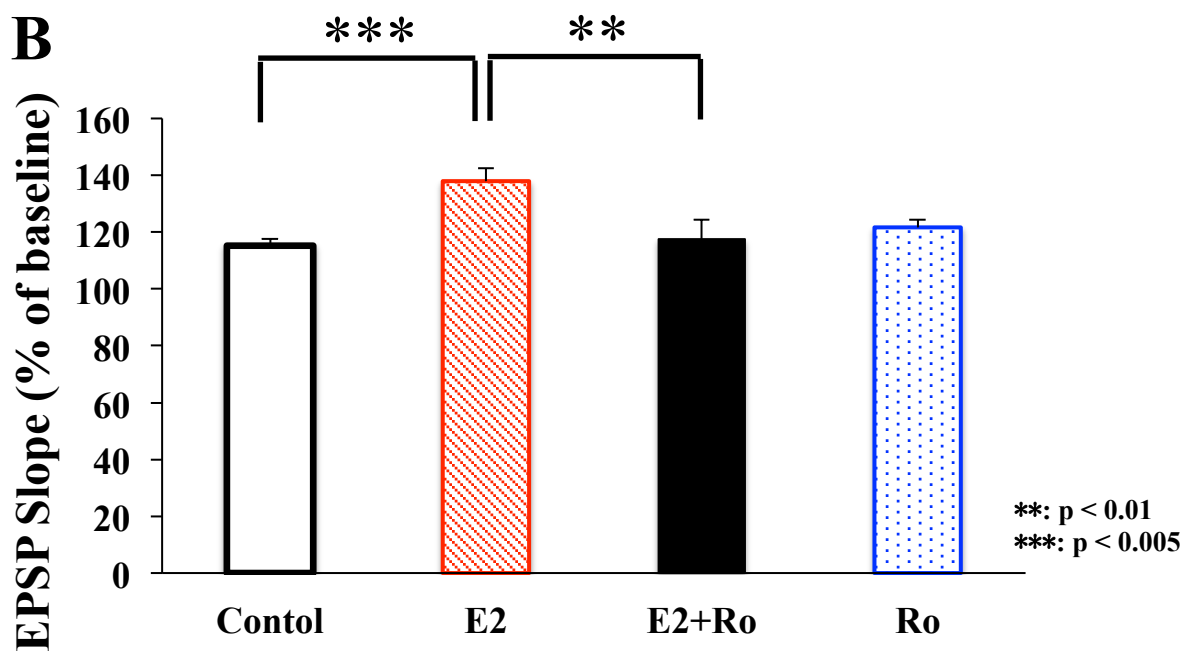
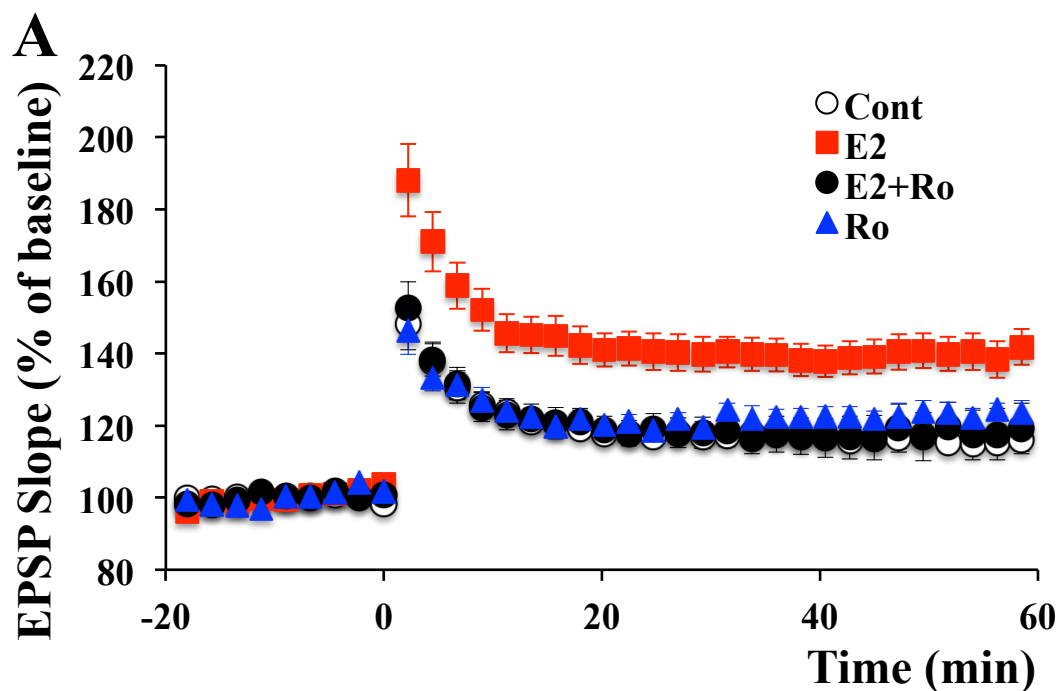
統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-5 続き**

- C. fEPSPの外形。E2や阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10nM E2 + 10  $\mu$ M chelerythrine (E2 + Chel)、10  $\mu$ M chelerythrine (Chel)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M chelerythrine (E2 + Chel)、10  $\mu$ M chelerythrine (Chel)である。

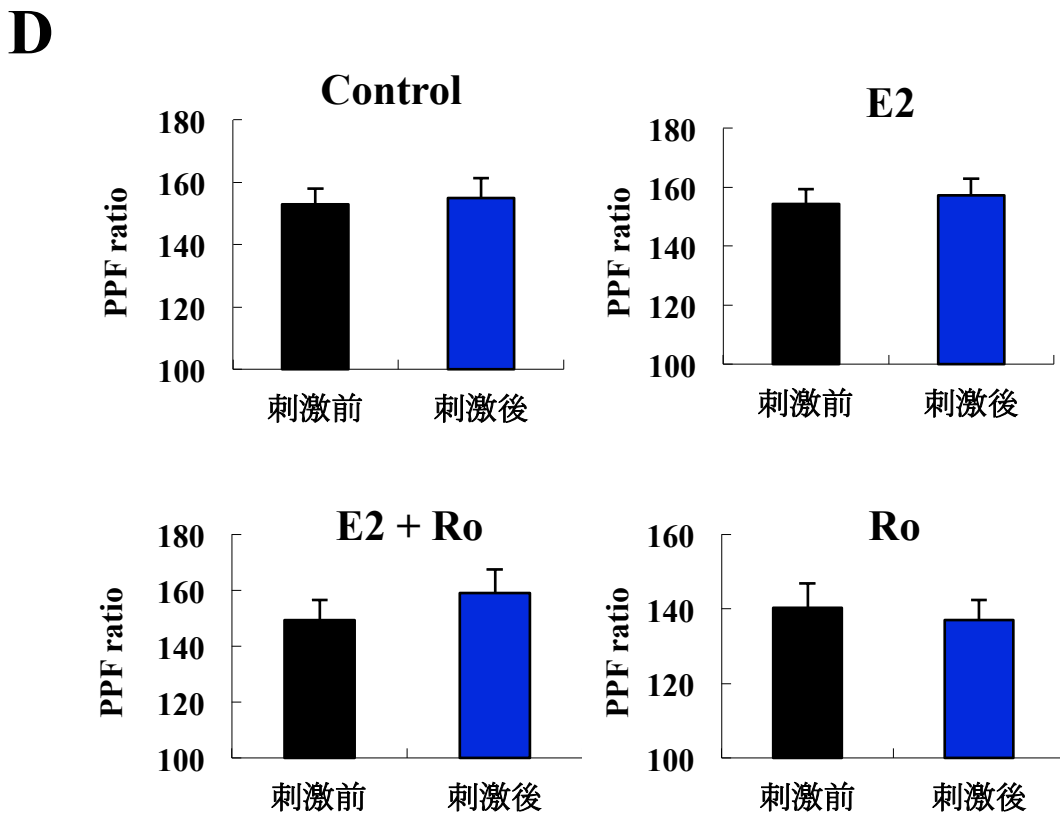
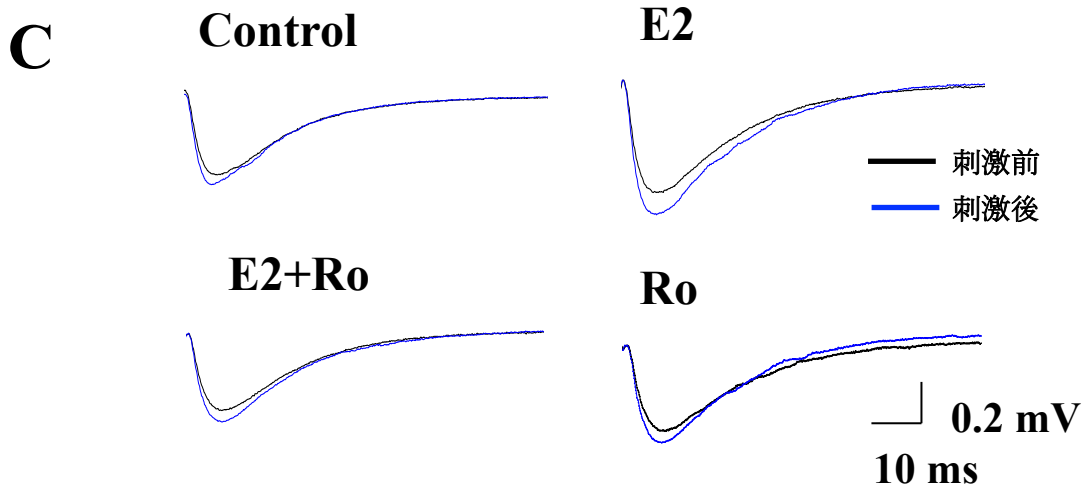
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行なった。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-6 NMDA受容体サブユニットNR2B阻害剤 (Ro) はE2-LTPの成立を阻害する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 1  $\mu$ M Ro25-6981 (E2 + Ro, n = 8)、1  $\mu$ M Ro (Ro, n = 5) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

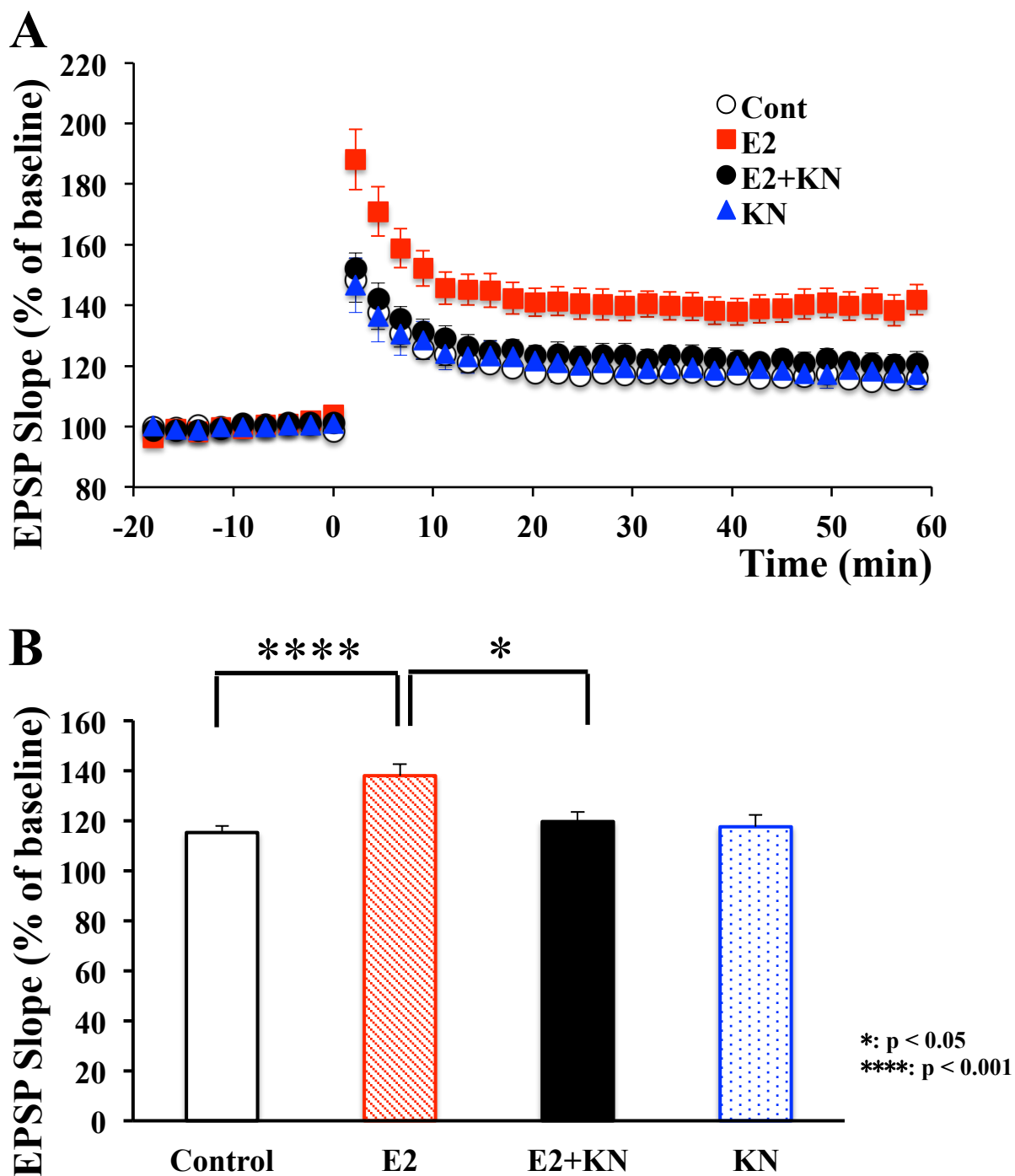
統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*\*は $p < 0.01$ 、\*\*\*は $p < 0.005$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-6 続き**

- C. fEPSPの外形。E2や阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10nM E2 + 1  $\mu$ M Ro25-6981 (E2 + Ro)、1  $\mu$ M Ro25-6981 (Ro)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 1  $\mu$ M Ro25-6981 (E2 + Ro)、1  $\mu$ M Ro25-6981 (Ro)である。

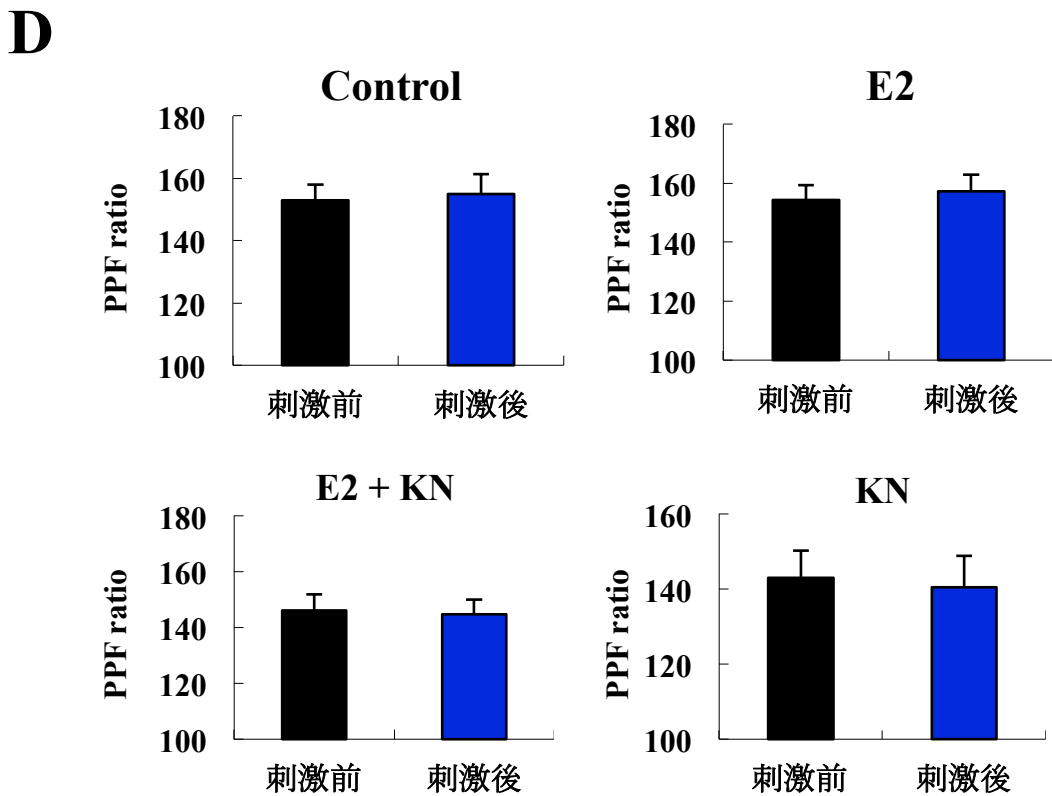
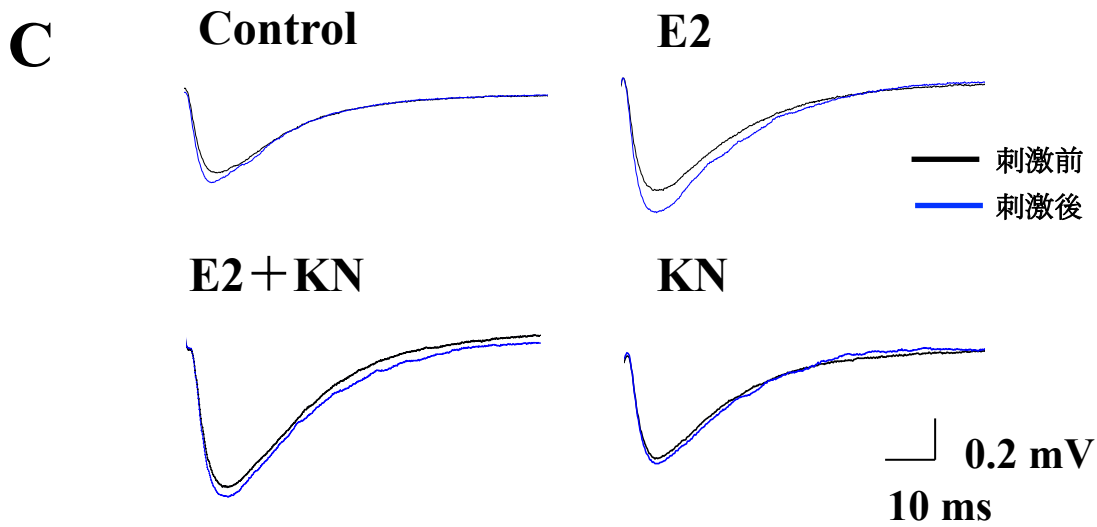
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-7 CaMKIIの阻害剤 (KN) はE2-LTPの成立を阻害する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20~0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 20  $\mu$ M KN-93 (E2 + KN, n = 8)、20  $\mu$ M KN-93 (KN, n = 6) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 、\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

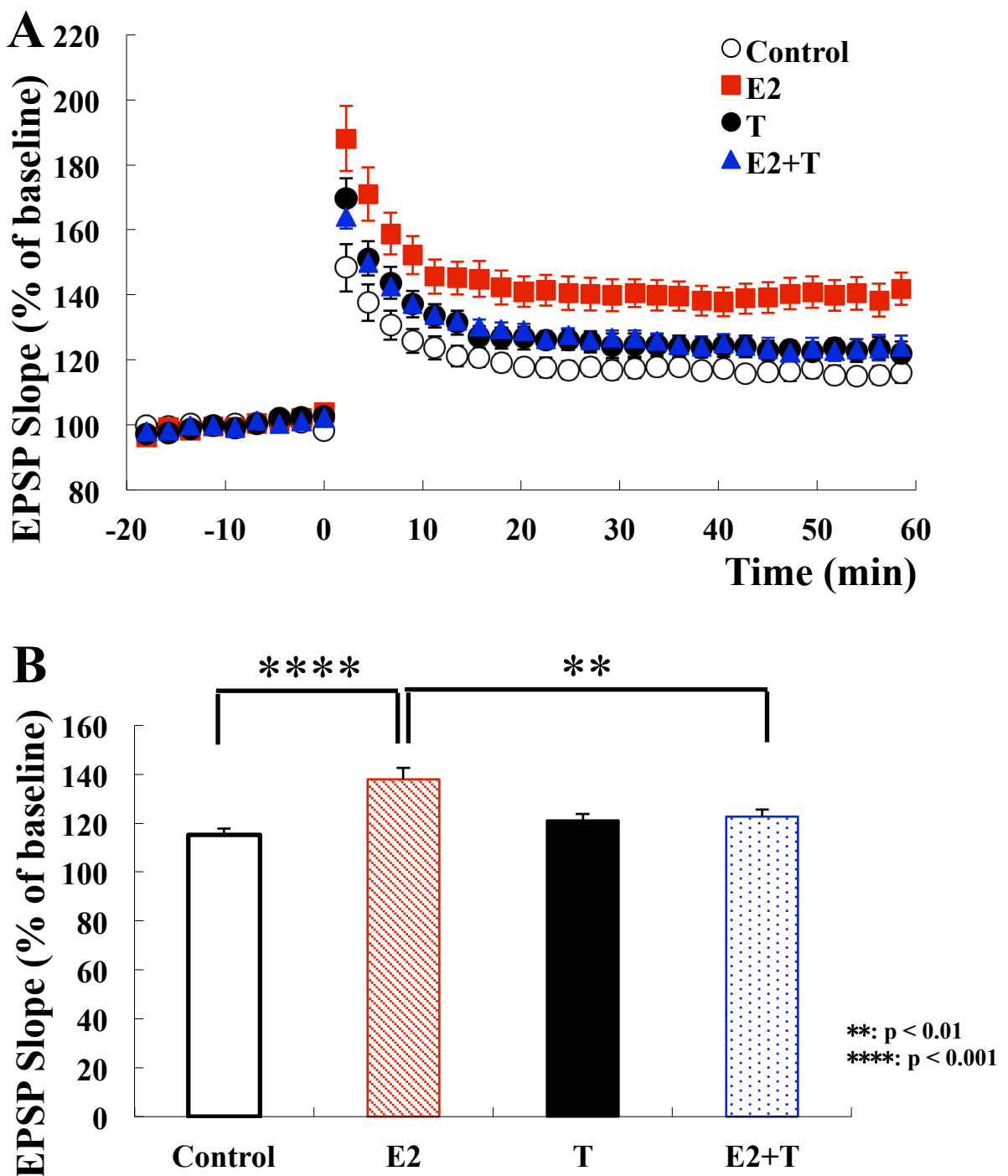


**Fig. 3-7 続き**

- C. fEPSPの外形。E2や阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10nM E2 + 20  $\mu$ M KN-93 (E2 + KN)、20  $\mu$ M KN-93 (KN)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ 、 $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 20  $\mu$ M KN-93 (E2 + KN)、20  $\mu$ M KN-93 (KN)である。

統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行なった。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

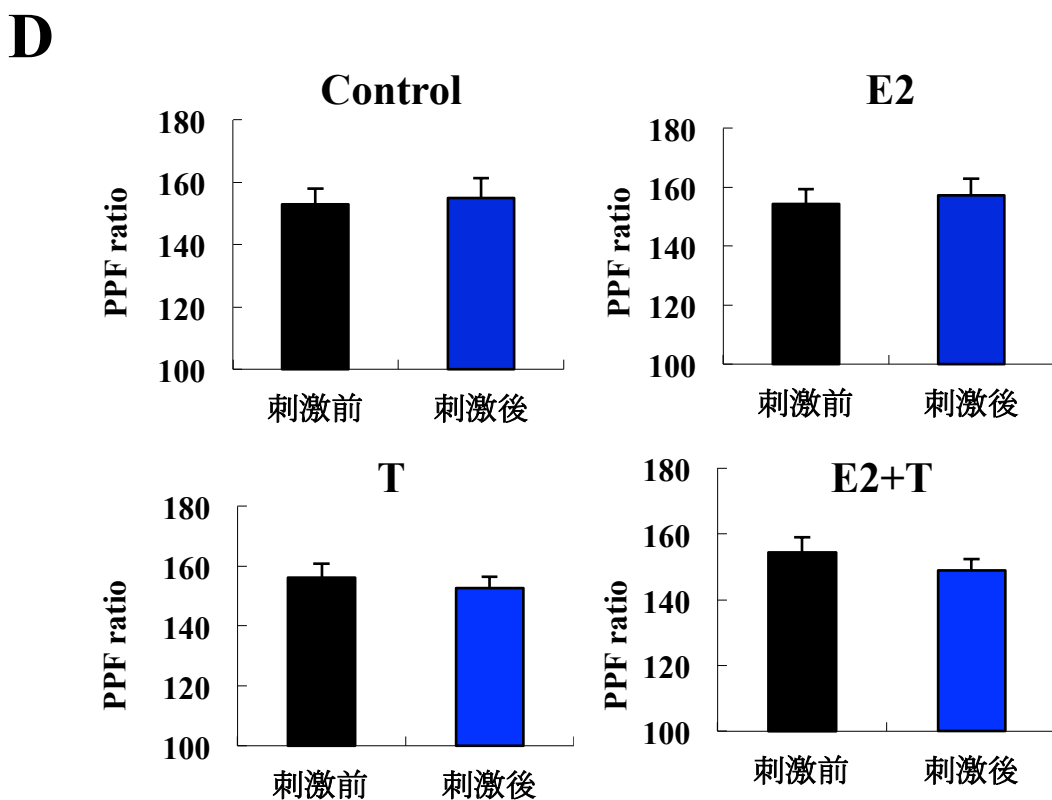
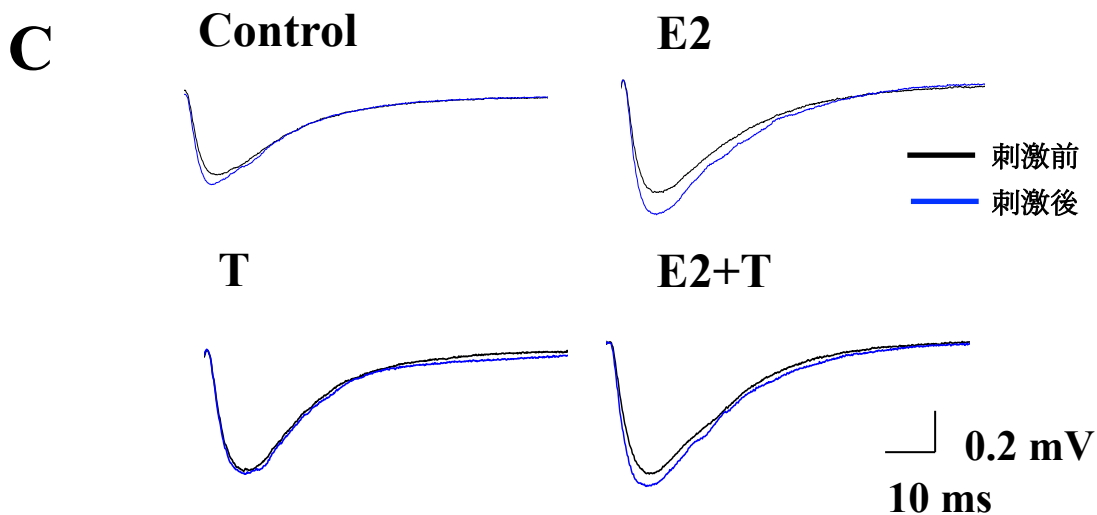




**Fig. 3-8 男性ホルモンTはE2-LTPを抑制する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM T (T, n = 9)、10 nM E2 + 10 nM T (E2 + T, n = 8) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

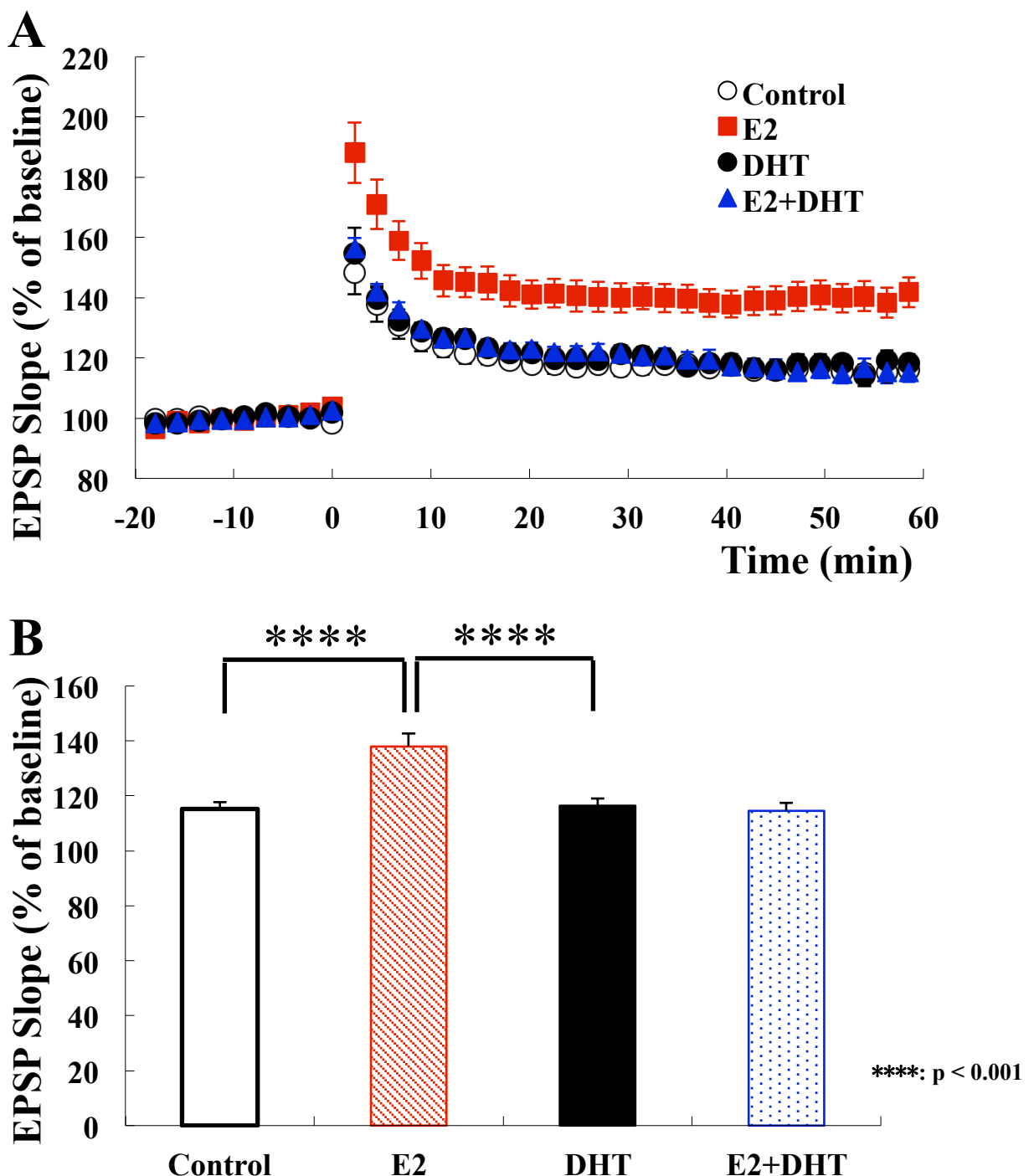
統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*\*は $p < 0.01$ 、\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-8 続き**

- C. fEPSPの外形。E2やT、阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10 nM T (T)、10nM E2 + 10 nM T (E2 + T)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM T (T)、10nM E2 + 10 nM T (E2 + T)である。

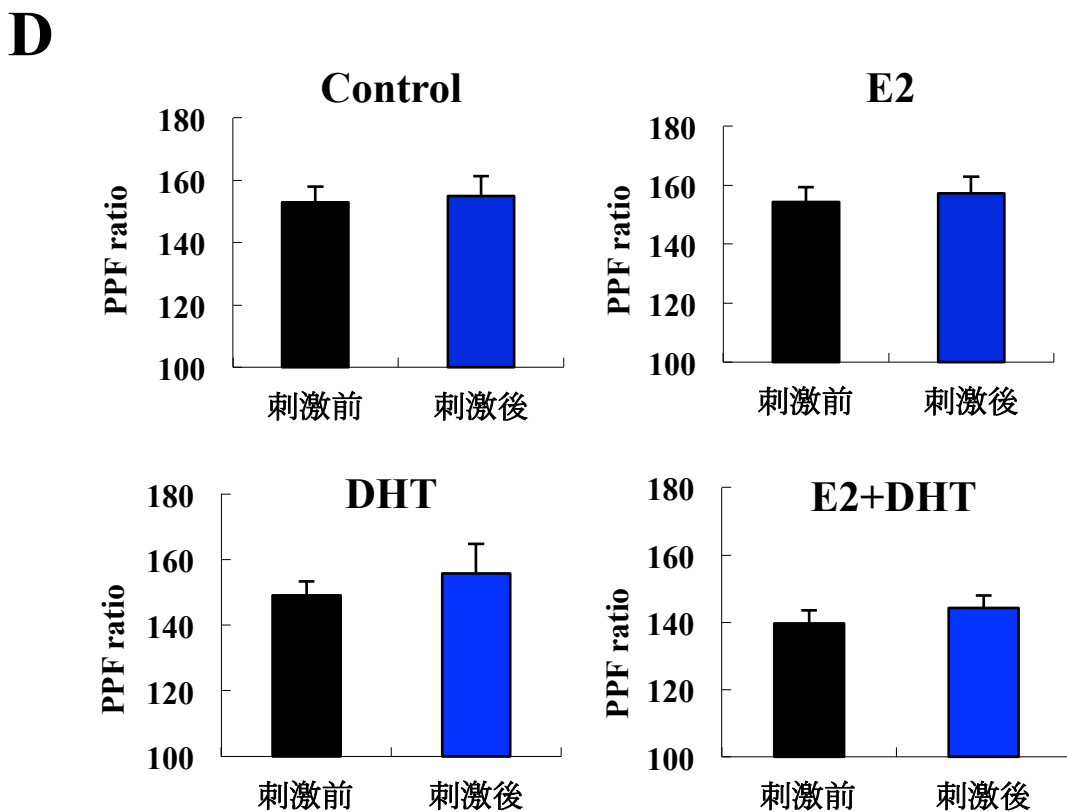
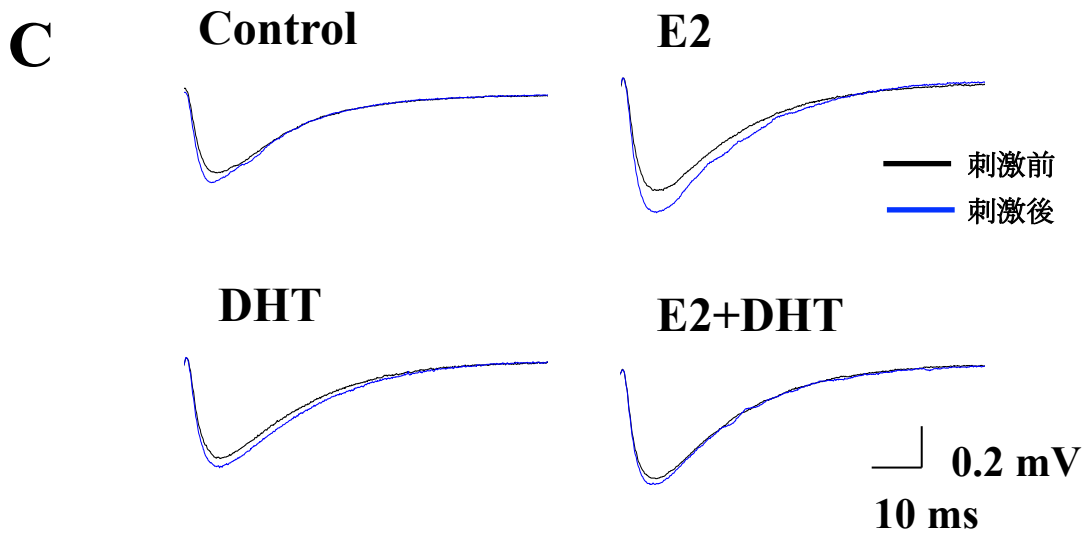
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-9 男性ホルモンDHTはE2-LTPを抑制する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM DHT (DHT, n = 10)、10 nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT, n = 9) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

統計解析は、two-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い、差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

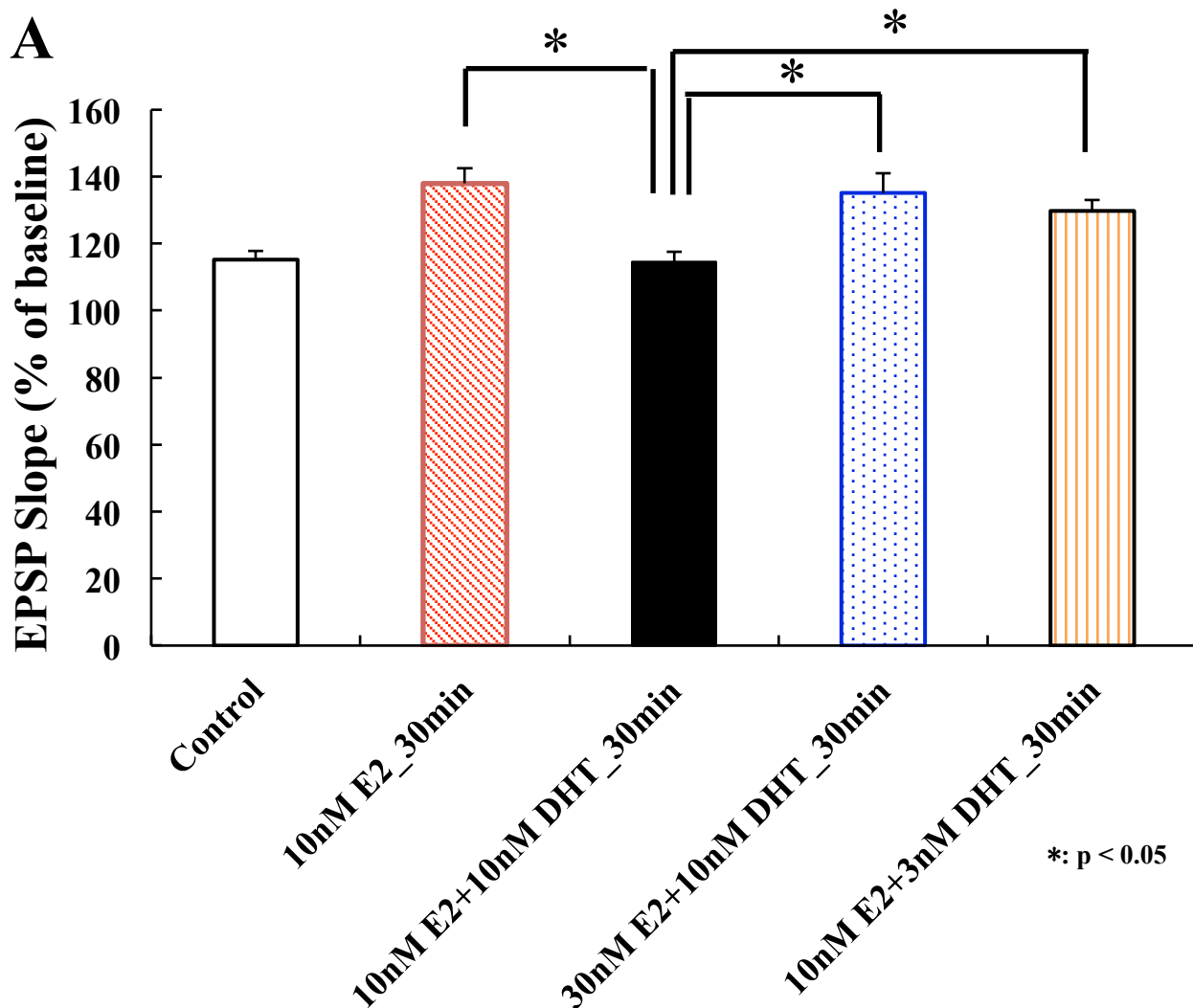


**Fig. 3-9 続き**

C. fEPSPの外形。E2やDHT、阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10 nM DHT (DHT)、10nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。

D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM DHT (DHT)、10nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT)である。

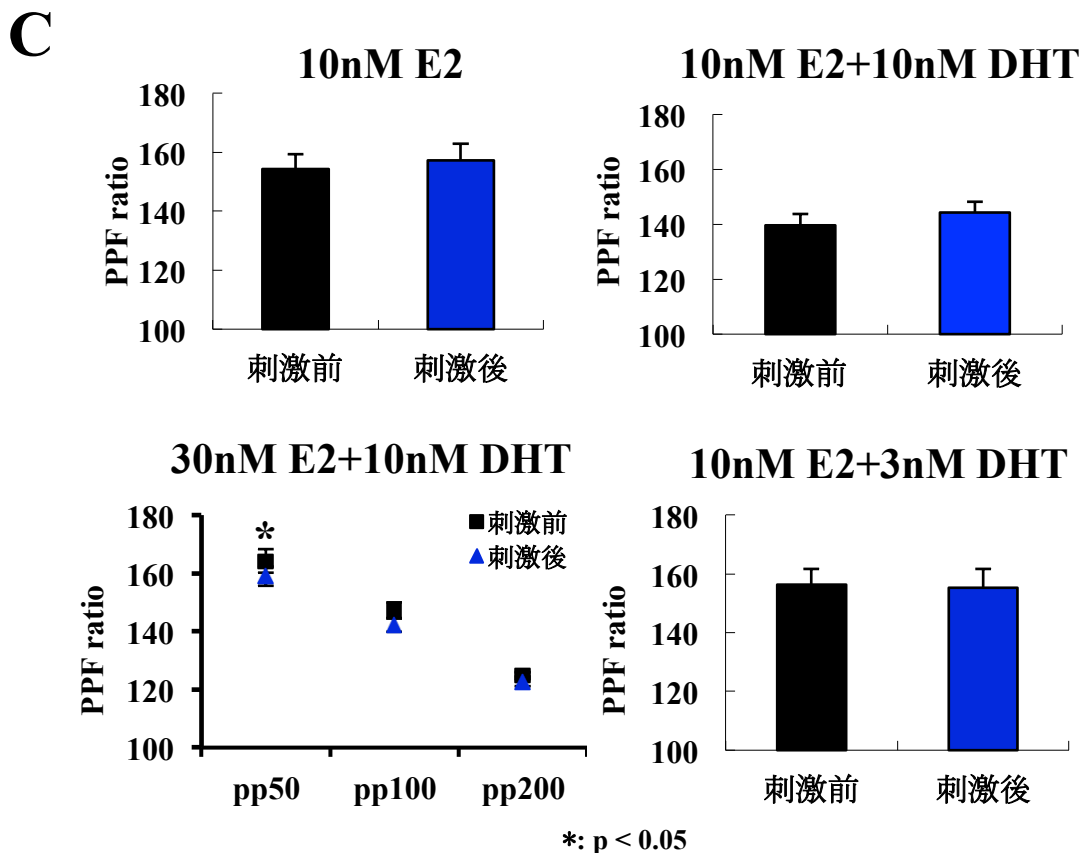
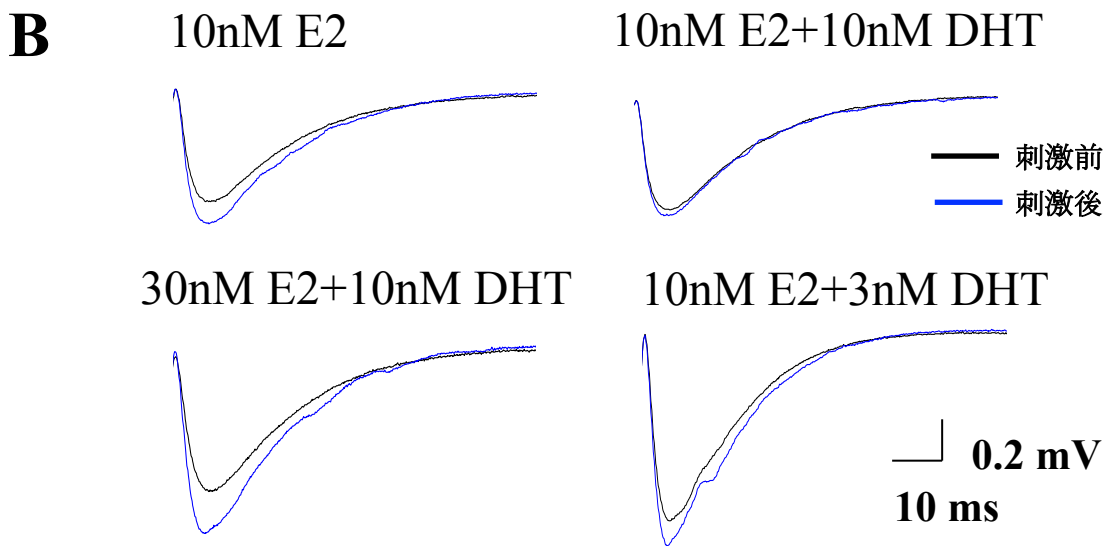
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-10 E2とDHTの相互作用はお互いの濃度比に依存する**

A. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 10 nM DHT (10nME2 + 10nMDHT, n = 9)、30 nM E2 + 10 nM DHT (30nM E2 + 10nM DHT, n = 5)、10 nM E2 + 3 nM DHT (10nM E2 + 3nM DHT, n = 6) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

統計解析は、one-way ANOVAを行った後、Tukey-Kramerの多重比較検定を行った。P < 0.05を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

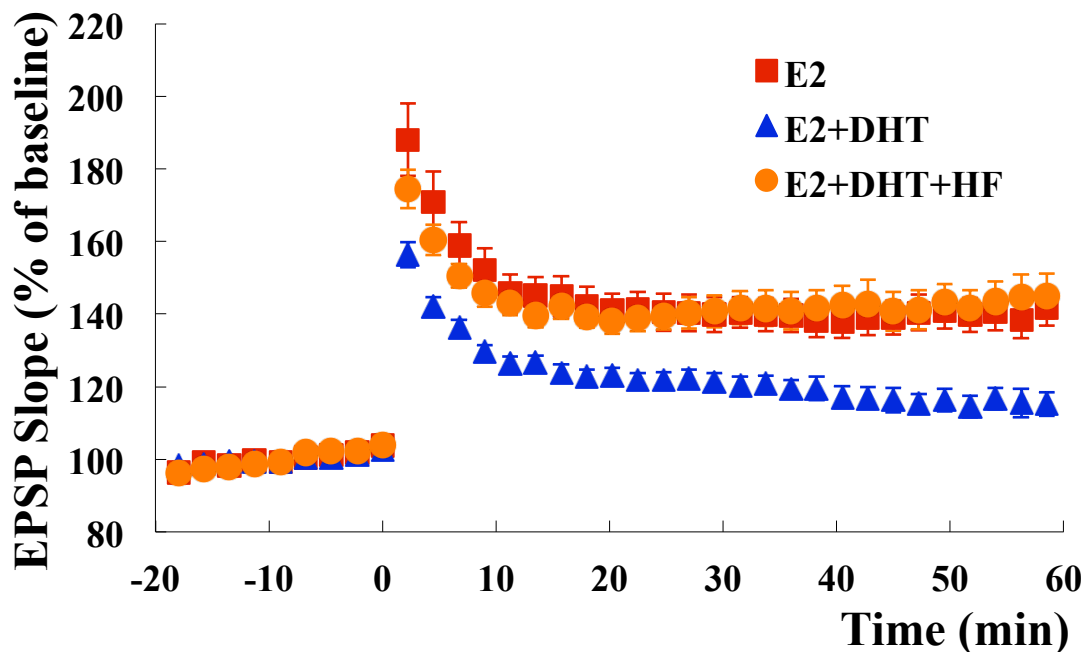


**Fig. 3-10 続き**

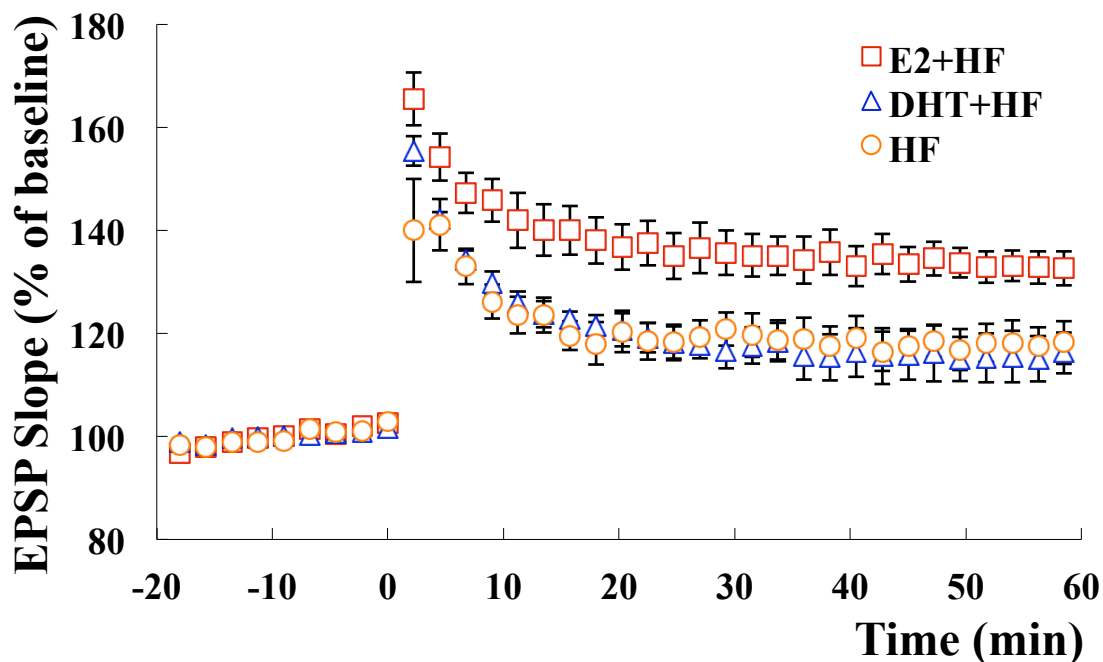
- B. fEPSPの外形。E2やDHT、阻害剤を30分間スライスに作用させた。10 nM E2 (10nM E2)、10 nM E2 + 10 nM DHT (10nM E2+10nM DHT)、30 nM E2 + 10 nM DHT (30nM E2+10nM DHT)、10 nM E2 + 3 nM DHT (10nM E2+3nM DHT) のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- C. PPF ratioの比較。50ms、100ms、200ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ 、 $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、10 nM E2 (10nM E2)、10 nM E2 + 10 nM DHT (10nM E2+10nM DHT)、30 nM E2 + 10 nM DHT (30nM E2+10nM DHT)、10 nM E2 + 3 nM DHT (10nM E2+3nM DHT) である。

統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。 $P < 0.05$ を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

# A1

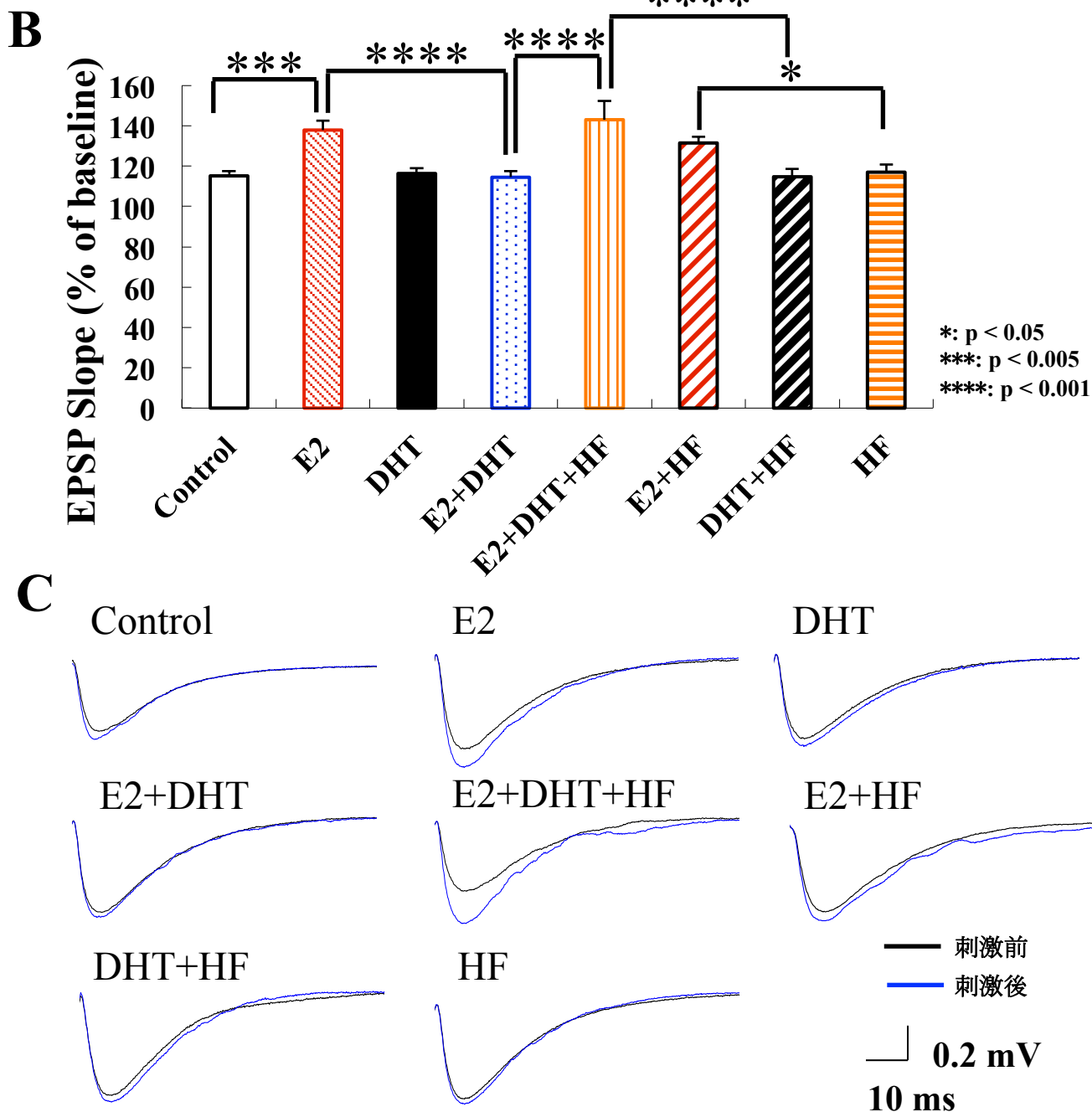


# A2



**Fig. 3-11 男性ホルモン受容体ARアンタゴニスト (HF) は DHTによるE2-LTP抑制効果を阻害する**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20~0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。Hydroxyflutamide (HF) は男性ホルモン受容体ARのアンタゴニストである。



**Fig. 3-11 続き**

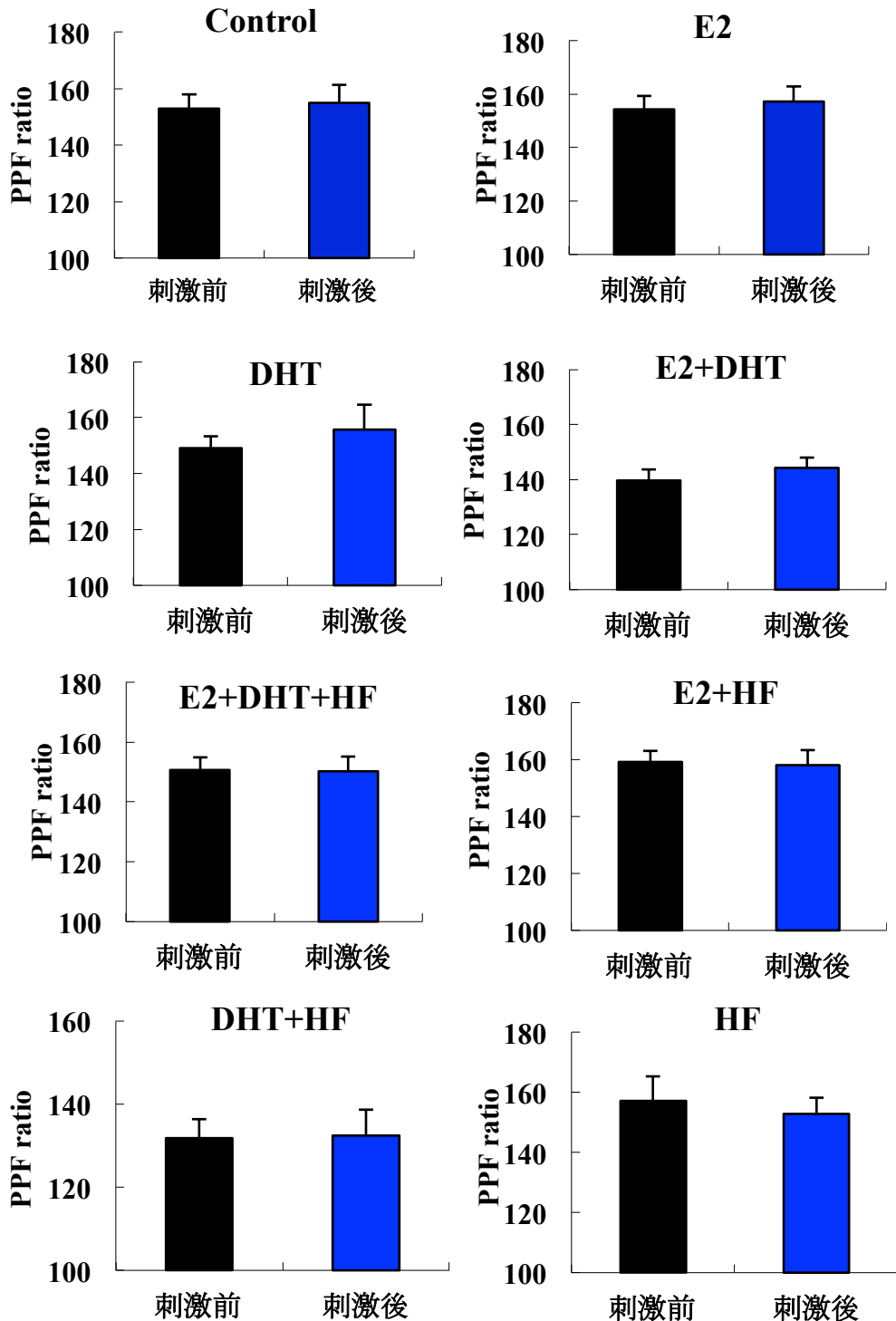
B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM DHT (DHT, n = 10)、10 nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT, n = 9)、10 nM E2 + 10 nM DHT + 1  $\mu$ M Hydroxyflutamide (E2 + DHT + HF, n = 8)、10 nM E2 + 1  $\mu$ M HF (E2 + HF, n = 6)、10 nM DHT + 1  $\mu$ M HF (DHT + HF, n = 6)、1  $\mu$ M HF (HF, n = 6) をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。

C. fEPSPの外形。E2やDHT、アンタゴニストを30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10 nM DHT (DHT)、10nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT)、10 nM E2 + 10 nM DHT + 1  $\mu$ M Hydroxyflutamide (E2 + DHT + HF)、10 nM E2 + 1  $\mu$ M HF (E2 + HF)、10 nM DHT + 1  $\mu$ M HF (DHT + HF)、1  $\mu$ M HF (HF) のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線がt = -2 ~ 0、青線がt = 58 ~ 60の平均波形である。

統計解析は、three-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 、\*\*\*は $p < 0.005$ 、\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**D**

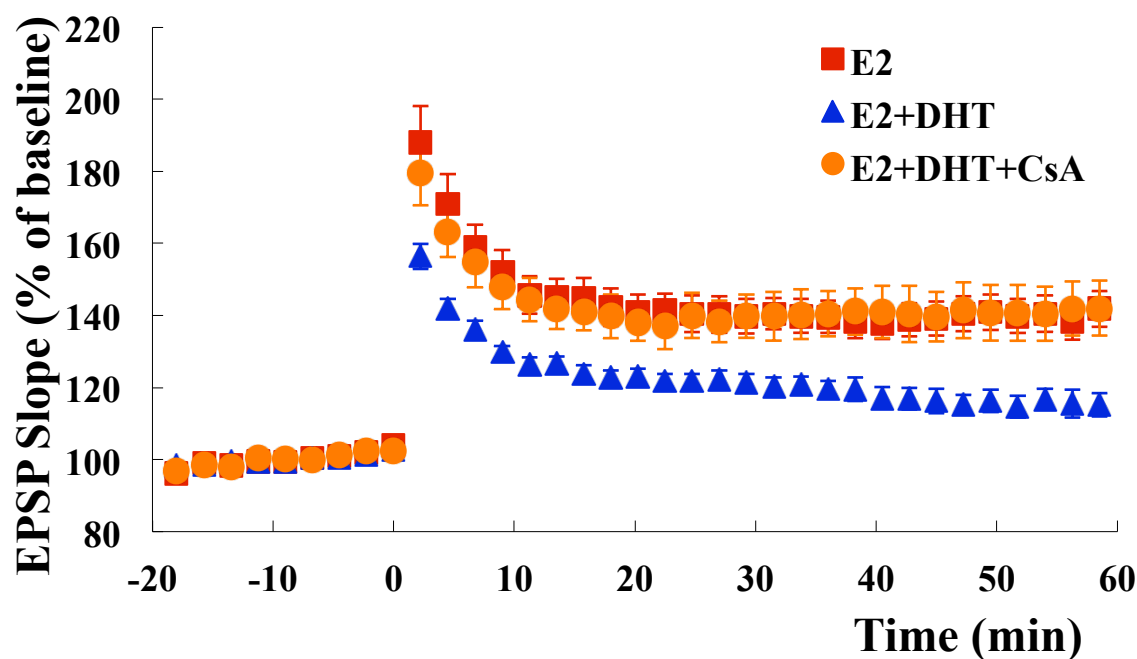


**Fig. 3-11 続き**

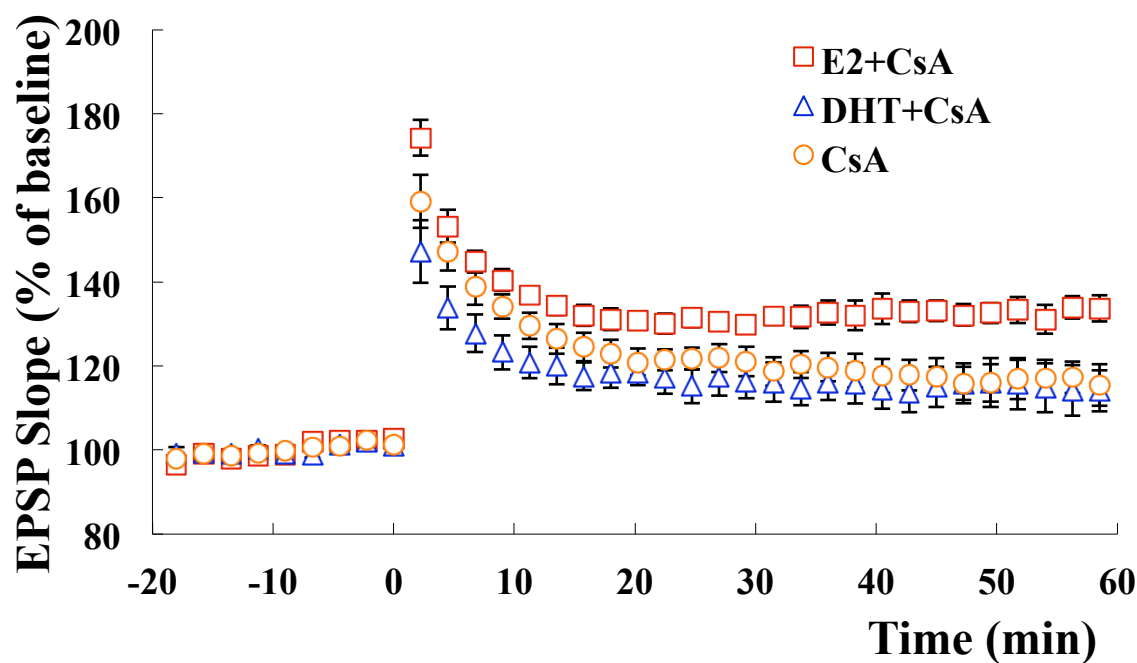
D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM DHT (DHT)、10nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT)、10 nM E2 + 10 nM DHT + 1  $\mu$ M Hydroxyflutamide (E2 + DHT + HF)、10 nM E2 + 1  $\mu$ M HF (E2 + HF)、10 nM DHT + 1  $\mu$ M HF (DHT + HF)、1  $\mu$ M HF (HF) である。

統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

# A1

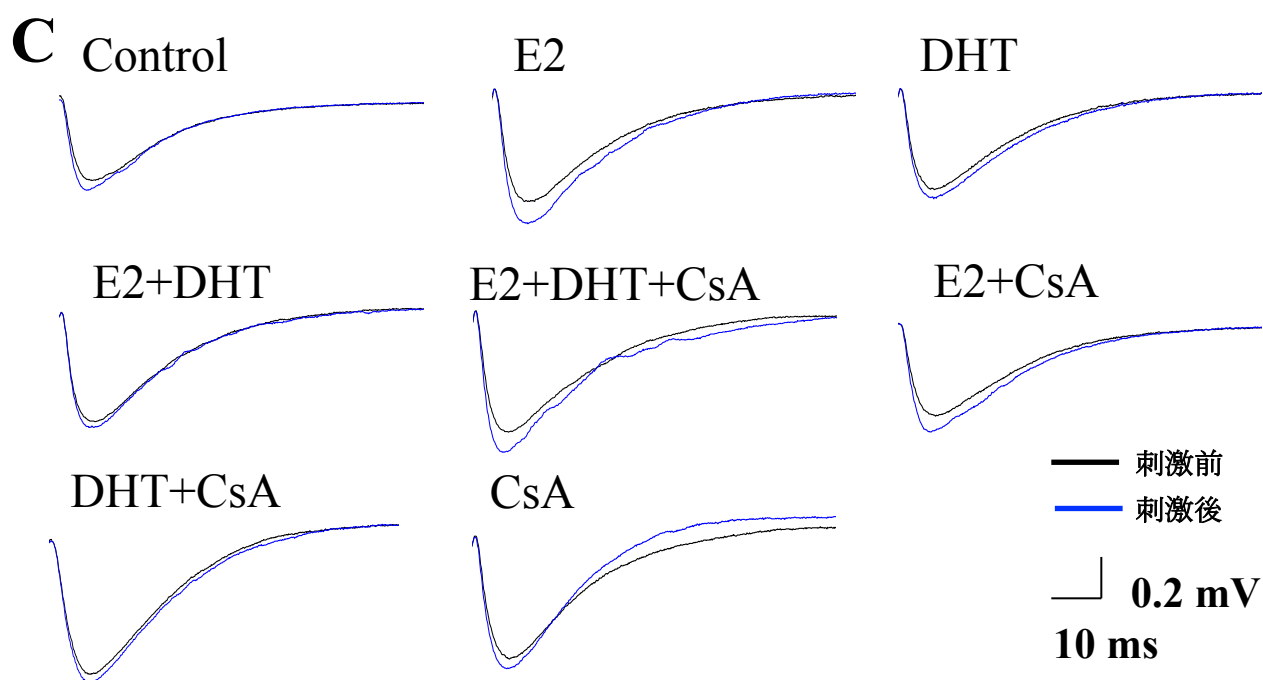
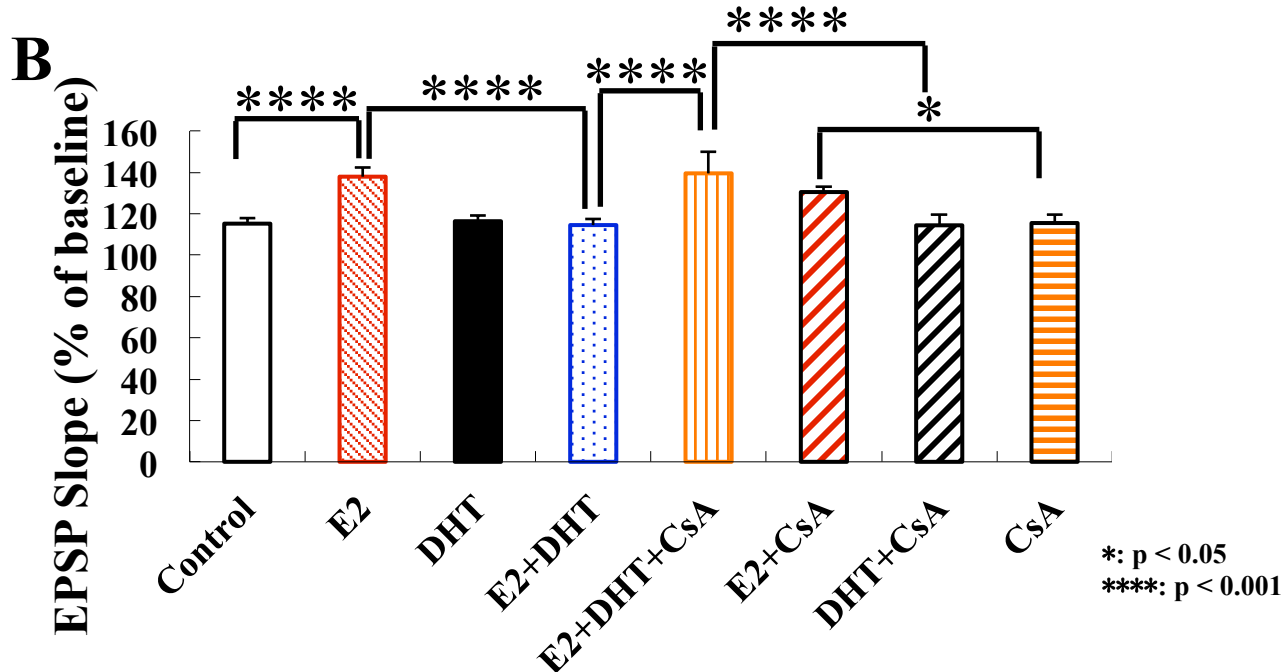


# A2



**Fig. 3-12 Calcineurinの阻害剤 (CsA) はDHTによるE2-LTP抑制効果を阻害する**

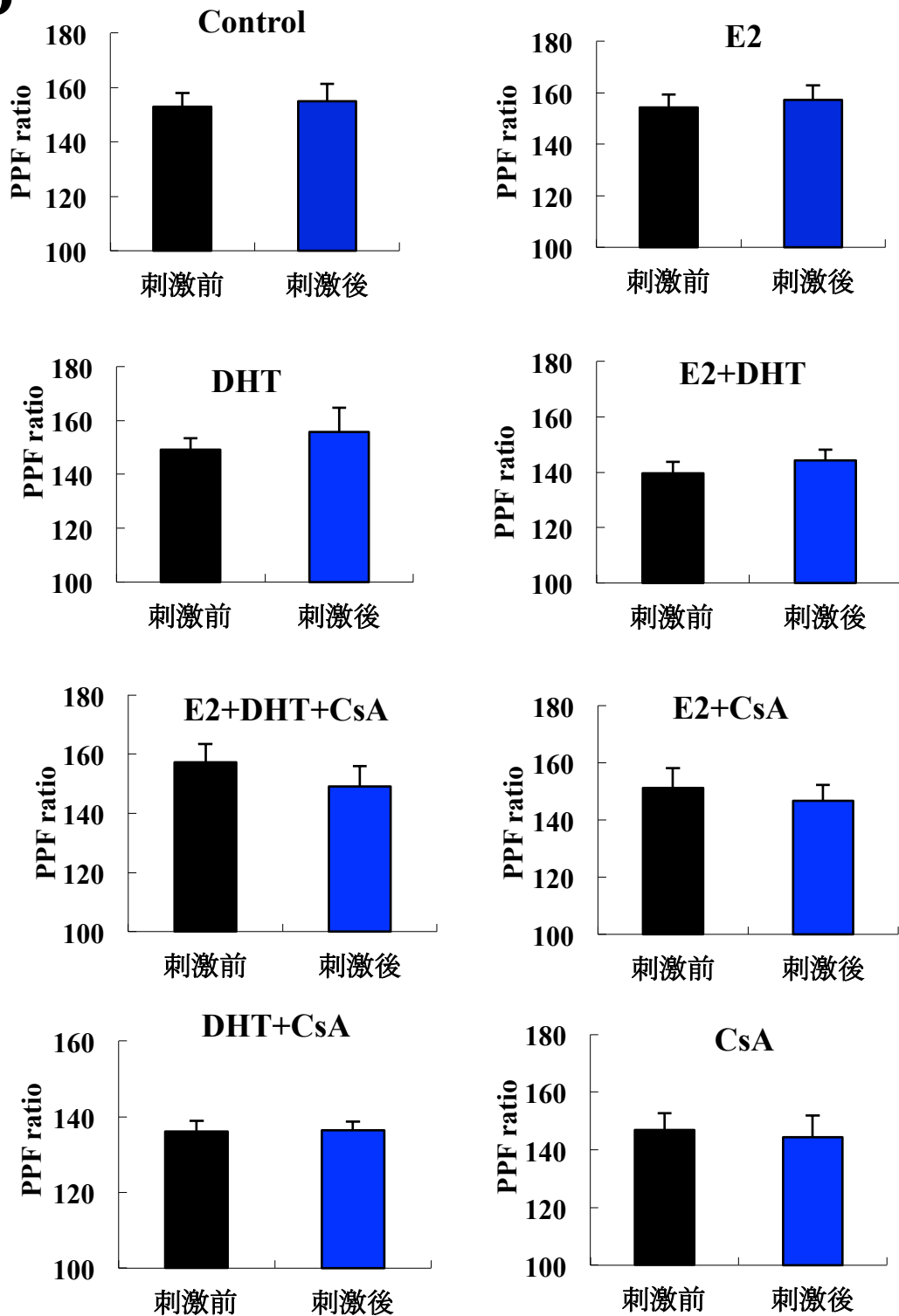
- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20~0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導し、その時刻をt = 0とした。



**Fig. 3-12 続き**

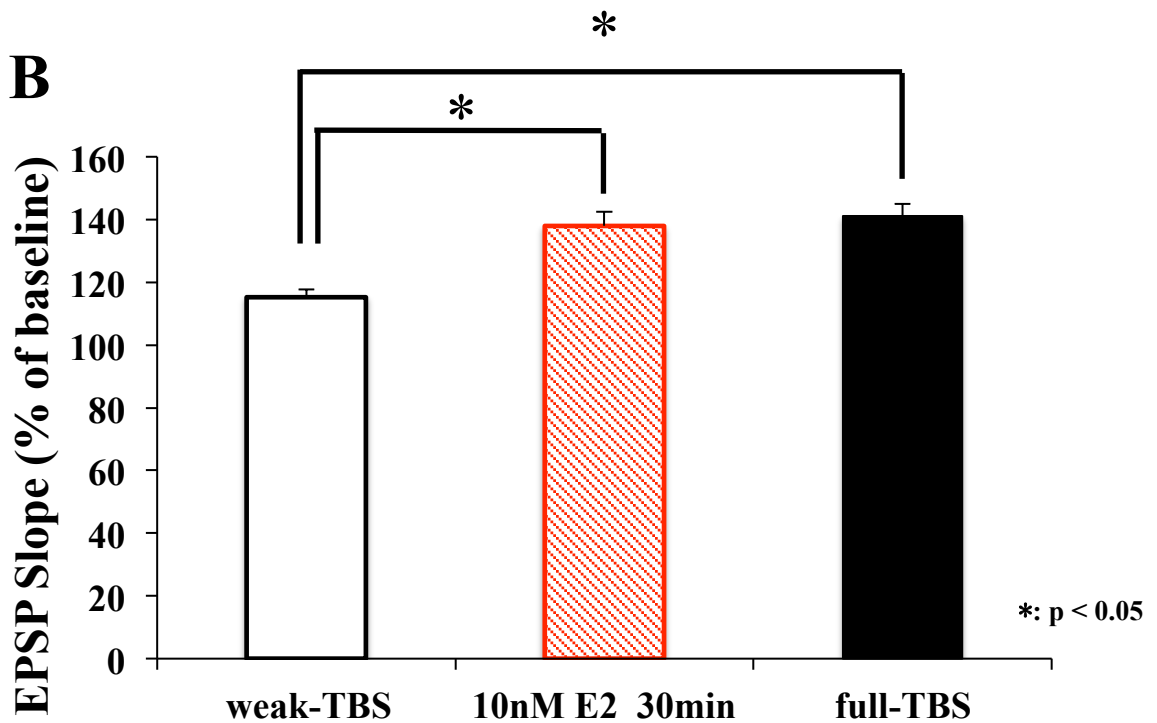
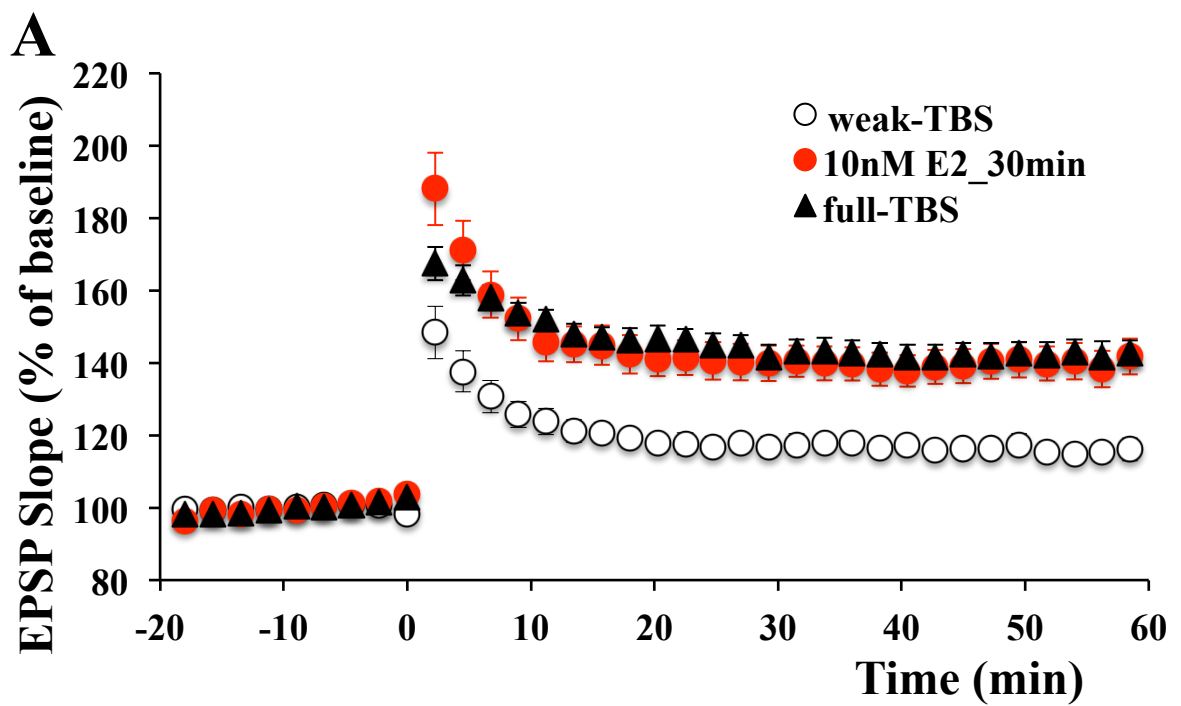
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM DHT (DHT, n = 10)、10 nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT, n = 9)、10 nM E2 + 10 nM DHT + 10  $\mu$ M Cyclosporine A (E2 + DHT + CsA, n = 6)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M CsA (E2 + CsA, n = 6)、10 nM DHT + 10  $\mu$ M CsA (DHT + CsA, n = 6)、10  $\mu$ M CsA (CsA, n = 6)をそれぞれ作用させたスライスのLTP増強率を表す。
- C. fEPSPの外形。E2やDHT、阻害剤を30分間スライスに作用させた。Control、10 nM E2 (E2)、10 nM DHT (DHT)、10 nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT)、10 nM E2 + 10 nM DHT + 10  $\mu$ M Cyclosporine A (E2 + DHT + CsA)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M CsA (E2 + CsA)、10 nM DHT + 10  $\mu$ M CsA (DHT + CsA)、10  $\mu$ M CsA (CsA)のそれぞれの条件にLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線がt = -2 ~ 0、青線がt = 58 ~ 60の平均波形である。

統計解析は、three-way ANOVAを行い、各実験条件間における交互作用の有無を確認した。交互作用のある実験条件間に対しては、下位検定を行い差があるか調べた。P < 0.05を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 、\*\*\*\*は $p < 0.001$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

**D****Fig. 3-12 続き**

D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$ の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、Control、10 nM E2 (E2)、10 nM DHT (DHT)、10nM E2 + 10 nM DHT (E2 + DHT)、10 nM E2 + 10 nM DHT + 10  $\mu$ M Cyclosporine A (E2 + DHT + CsA)、10 nM E2 + 10  $\mu$ M CsA (E2 + CsA)、10 nM DHT + 10  $\mu$ M CsA (DHT + CsA)、10  $\mu$ M CsA (CsA)である。

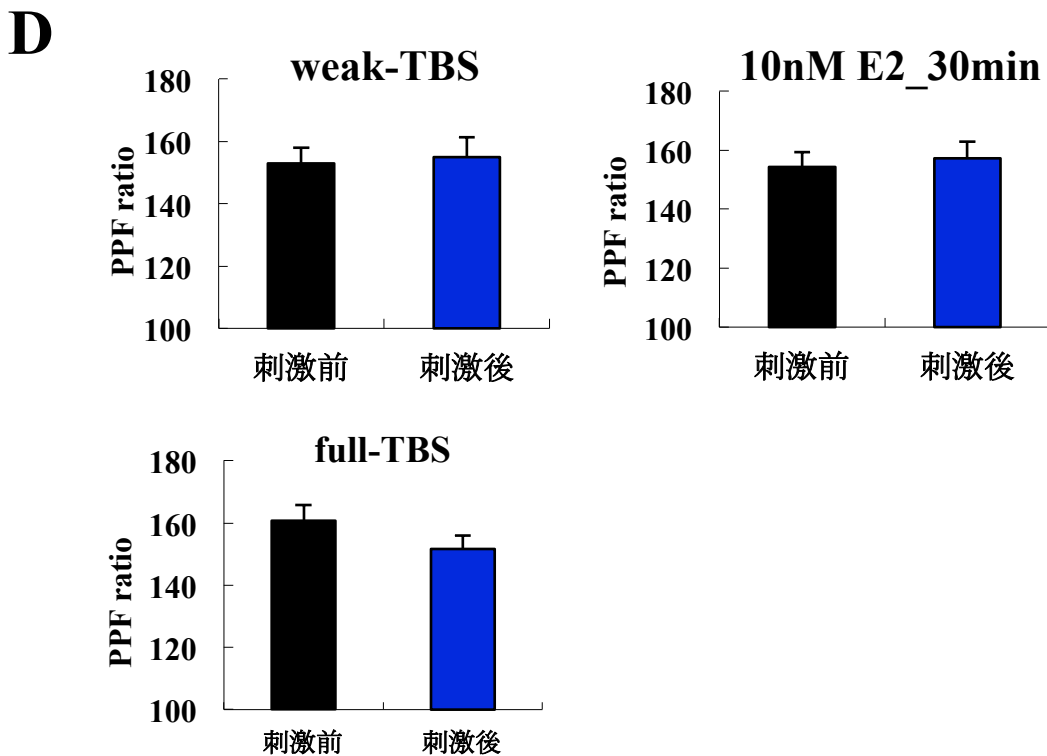
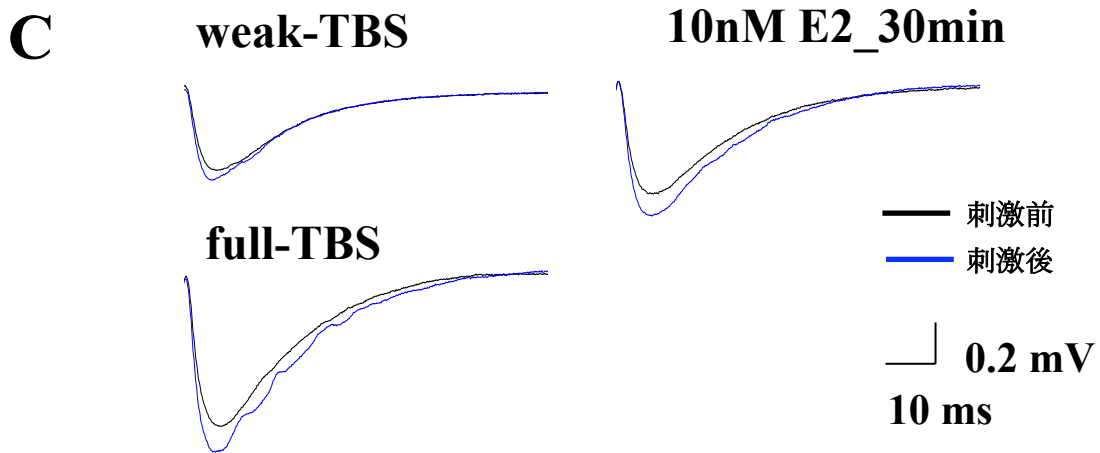
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。P < 0.05を有意水準とした。\*はp < 0.05。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-13 E2-LTPとfull-LTPとの比較**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20 ~ 0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてweak-LTPを誘導し、その時刻をt = 0とした。full-LTPはfull-TBSを与えて誘導した。
- B. LTPの増強率比較。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (weak-TBS, n = 10)、10 nM E2\_30min (10nM E2\_30min, n = 10)、薬剤なし (full-TBS, n = 6) をそれぞれ作用させたスライスを表す。

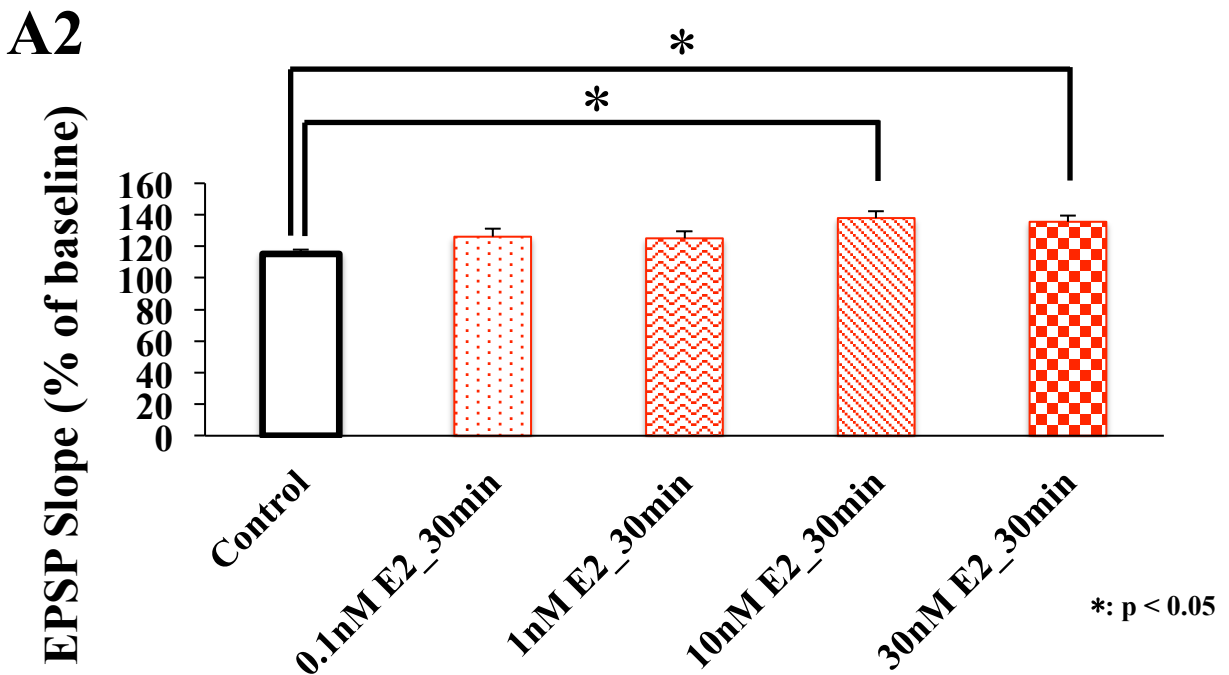
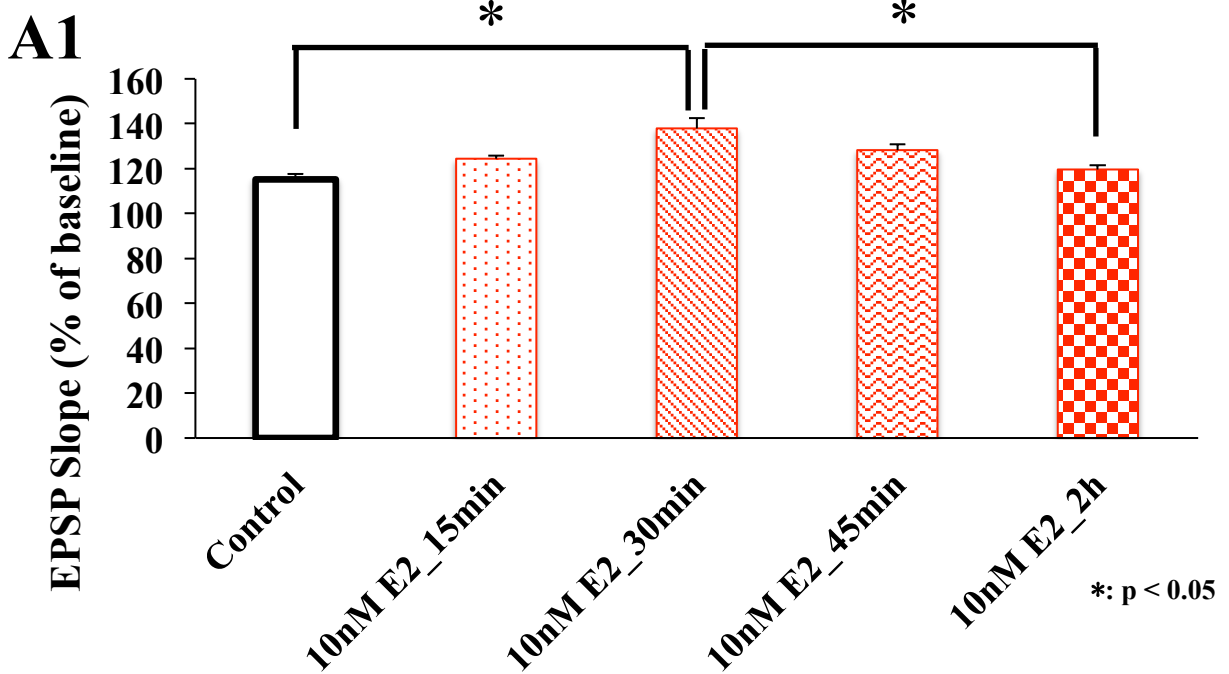
統計解析は、one-way ANOVAを行った後、Tukey-Kramerの多重比較検定を行った。P < 0.05を有意水準とした。\*はp < 0.05。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-13 続き**

- C. fEPSPの外形。E2を30分間スライスに作用させた。薬剤なし (weak-TBS,  $n = 10$ )、10 nM E2 (E2,  $n = 10$ )、薬剤なし (full-TBS,  $n = 6$ ) のそれぞれにLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$  の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、薬剤なし (weak-TBS)、10 nM E2\_30min (10nM E2\_30min)、薬剤なし (full-TBS) である。

統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。 $P < 0.05$ を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数 $n$ はスライス数。

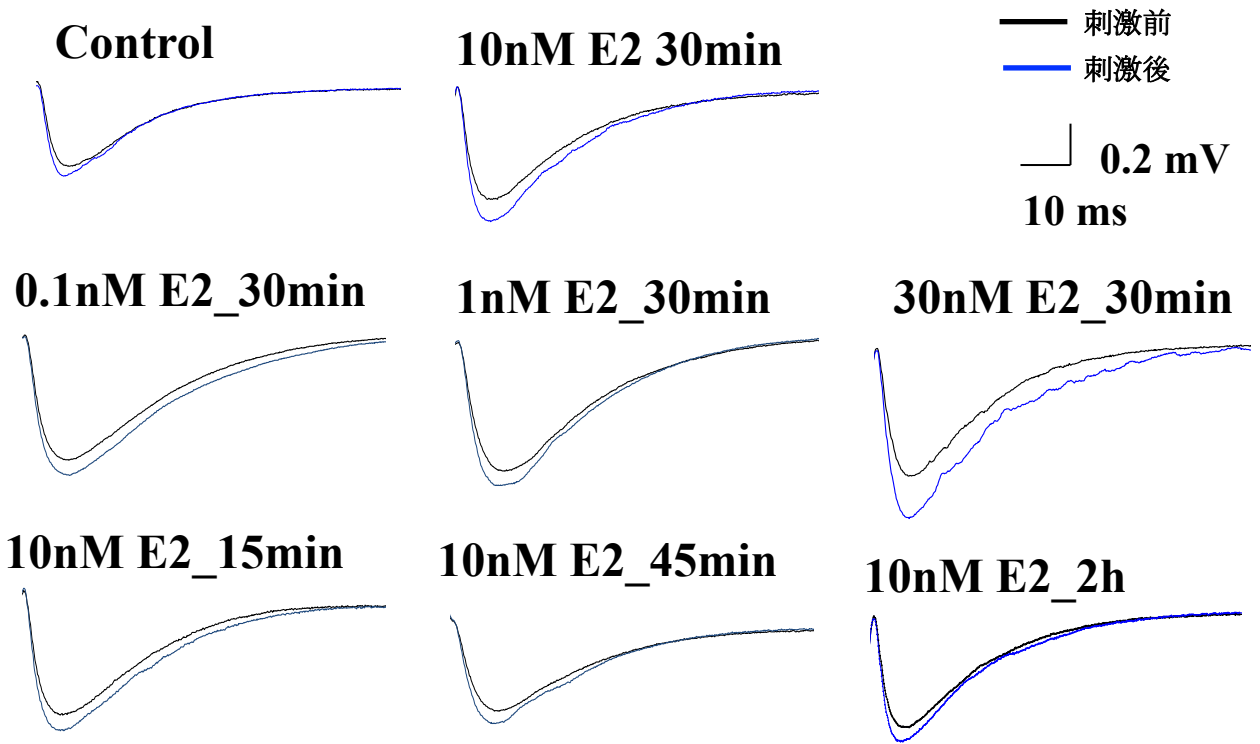


**Fig. 3-14 E2の作用時間、濃度変化によるweak-LTPへの影響**

- A1. LTPの増強率比較 (作用時間依存性)。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2\_15min (10 nM E2\_15min, n = 5)、10 nM E2\_30min (10 nM E2\_30min, n = 10)、10 nM E2\_45min (10 nM E2\_45min, n = 5)、10 nM E2\_2h (10 nM E2\_2h, n = 9) の条件でそれぞれ作用させたスライスを表す。
- A2. LTPの増強率比較 (濃度依存性)。t = -9 ~ 0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51 ~ 60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、0.1 nM E2\_30min (0.1 nM E2\_30min, n = 5)、1 nM E2\_30min (1 nM E2\_30min, n = 5)、10 nM E2\_30min (10 nM E2\_30min, n = 10)、30 nM E2\_30min (30 nM E2\_30min, n = 5) の条件でそれぞれ作用させたスライスを表す。

統計解析は、one-way ANOVAを行った後、Tukey-Kramerの多重比較検定を行った。P < 0.05を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 。エラーバーは、平均値 ± 標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

**B**



**Fig. 3-14 続き**

B. fEPSPの外形。薬剤なし (Control)、10 nM E2\_15min (10 nM E2\_15min)、10 nM E2\_30min (10 nM E2\_30min)、10 nM E2\_45min (10 nM E2\_45min)、10 nM E2\_2h (10 nM E2\_2h)、0.1 nM E2\_30min (0.1 nM E2\_30min)、1 nM E2\_30min (1 nM E2\_30min)、30 nM E2\_30min (30 nM E2\_30min) のそれぞれにLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。



C

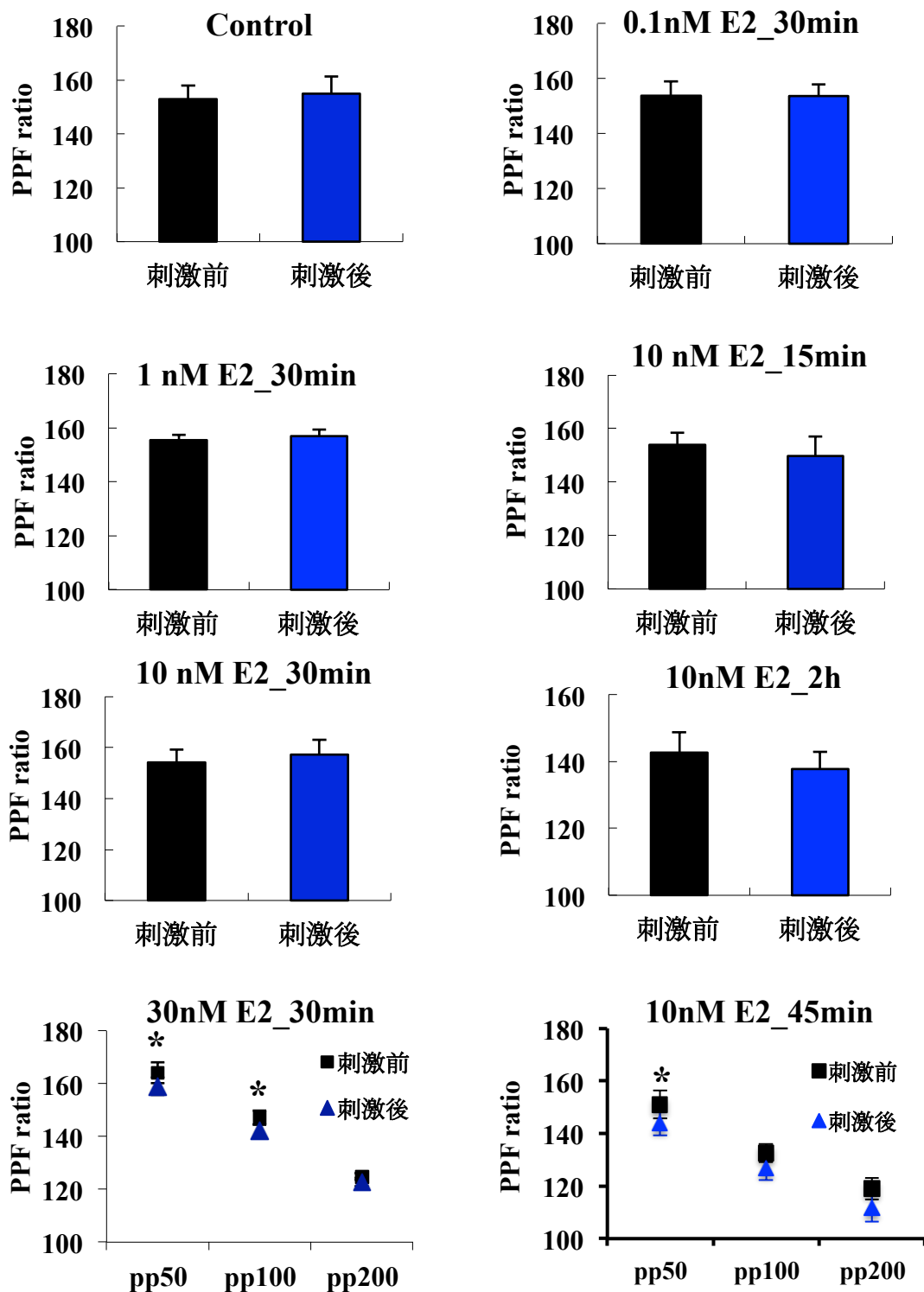
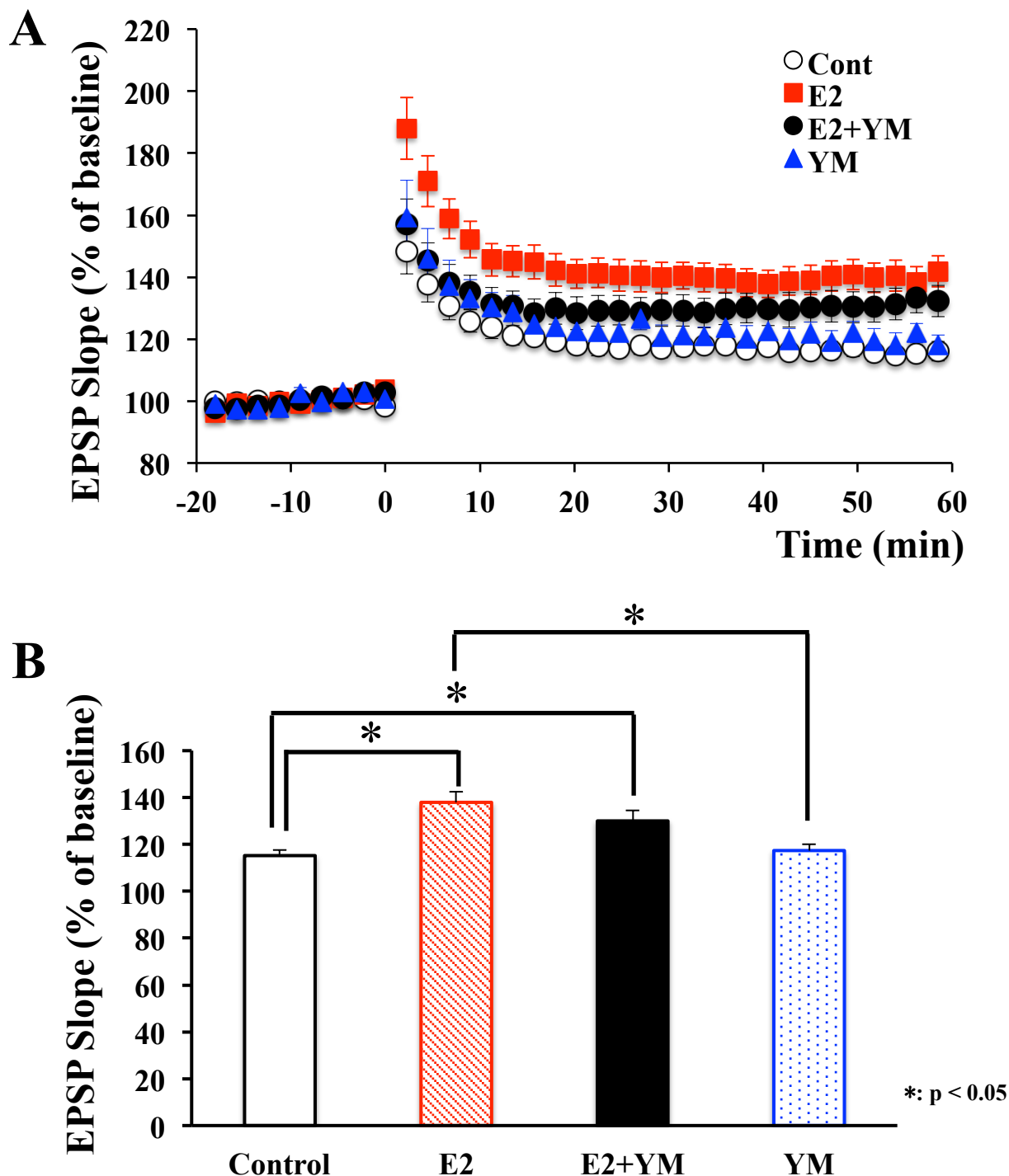
\*:  $p < 0.05$ 

Fig. 3-14 続き

C. PPF ratioの比較。50ms、100ms、200ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$  の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、薬剤なし (Control)、10 nM E2\_15min (10 nM E2\_15min)、10 nM E2\_30min (10 nM E2\_30min)、10 nM E2\_45min (10 nM E2\_45min)、10 nM E2\_2h (10 nM E2\_2h)、0.1 nM E2\_30min (0.1 nM E2\_30min)、1 nM E2\_30min (1 nM E2\_30min)、30 nM E2\_30min (30 nM E2\_30min) である。

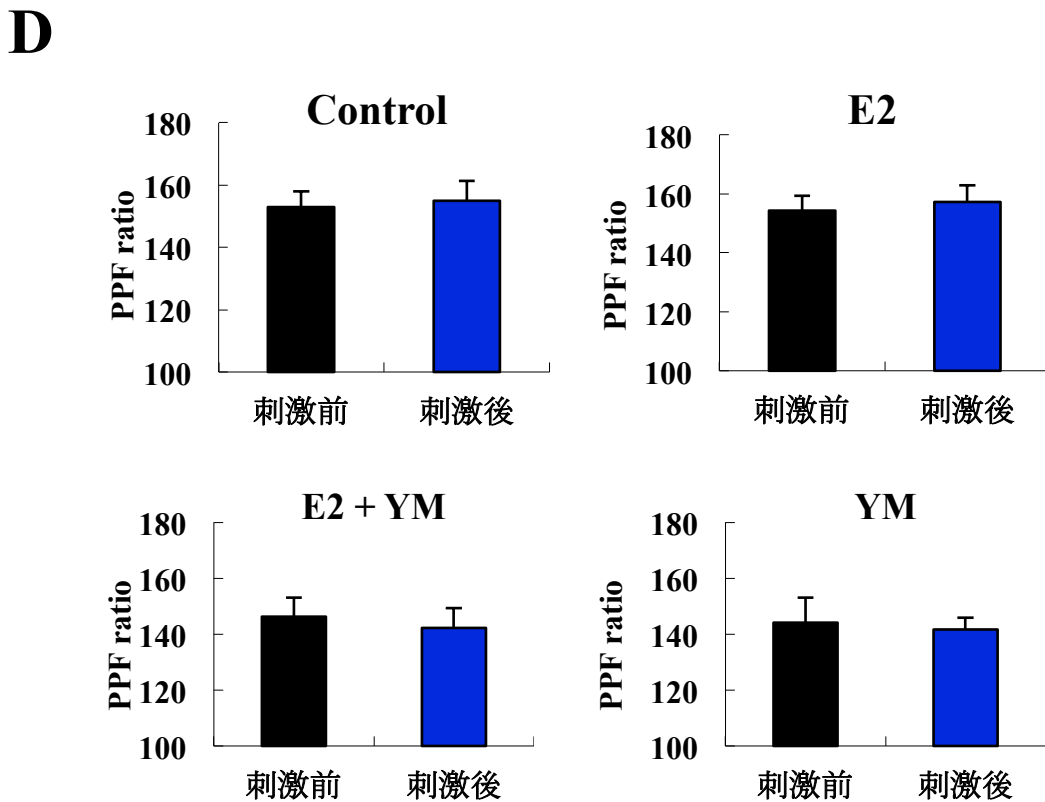
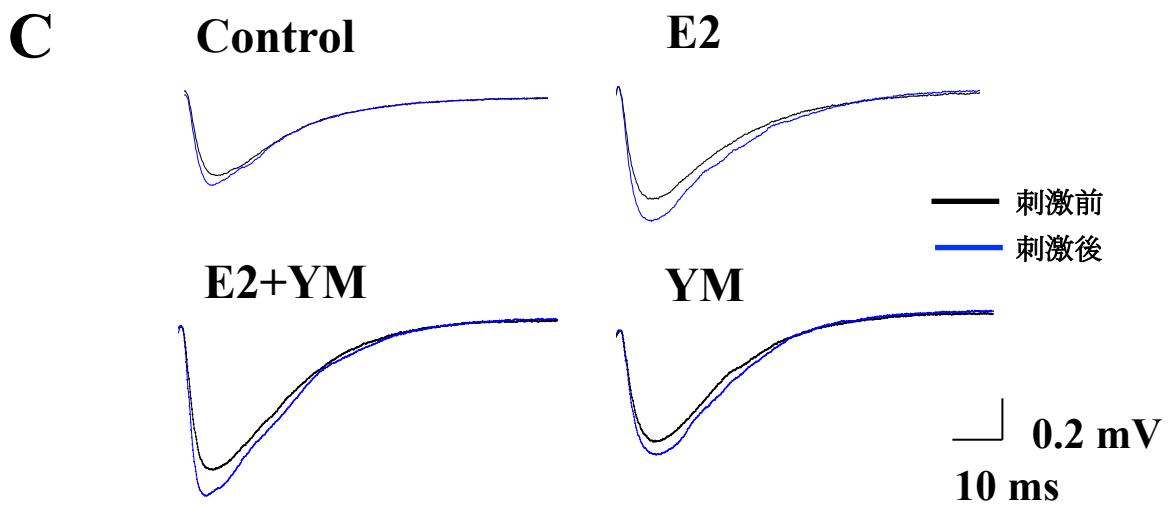
統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行った。 $P < 0.05$ を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-15 mGluR1のアンタゴニスト (YM) はE2-LTPの成立を阻害しない**

- A. fEPSP slopeの時間変化。t = -20~0 におけるfEPSP slopeをbaselineとし、baselineを100%として規格化したfEPSP slopeの時間変化を示す。weak-TBSを与えてLTPを誘導した時刻をt = 0とした。
- B. LTPの増強率比較。t = -9~0の9分間のfEPSP slopeの平均値を100%としたときの、t = 51~60の9分間のfEPSP slopeの平均値をLTP増強率とした。左から、薬剤なし (Control, n = 10)、10 nM E2 (E2, n = 10)、10 nM E2 + 4  $\mu$ M YM202074 (E2+YM, n = 8)、4  $\mu$ M YM202074 (YM, n = 5) をそれぞれ作用させたスライスを表す。

統計解析は、one-way ANOVAを行った後、Tukey-Kramerの多重比較検定を行った。P < 0.05を有意水準とした。\*は $p < 0.05$ 。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。



**Fig. 3-15 続き**

- C. fEPSPの外形。E2やアンタゴニストを30分間スライスに作用させた。薬理作用なし (Control)、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 4  $\mu$ M YM202074 (E2+YM)、4  $\mu$ M YM202074 (YM) のそれぞれにLTP誘導刺激を与える前後のfEPSPの外形を表す。黒線が $t = -2 \sim 0$ 、青線が $t = 58 \sim 60$ の平均波形である。
- D. PPF ratioの比較。50ms間隔で2発刺激を与えた時の、2発目のfEPSP slope / 1発目のfEPSP slopeがPPF ratioである。PPF ratioは、 $t = -20 \sim 0$ ,  $60 \sim 70$  の間のそれぞれの区間で2回ずつ測定した。これら2回のPPF ratioの平均をとり、それぞれの区間のPPF ratio値とした。作用条件はそれぞれ、薬理作用なし (Control)、10 nM E2 (E2)、10 nM E2 + 4  $\mu$ M YM202074 (E2+YM)、4  $\mu$ M YM202074 (YM) である。

統計解析は、対応のあるt検定法 (paired t-test) を行なった。P < 0.05を有意水準とした。エラーバーは、平均値  $\pm$  標準誤差とした。サンプル数nはスライス数。

## 第 4 章 考察

本研究では、海馬 CA1 領域において、女性ホルモン (E2) の急性効果による E2-LTP 成立の信号伝達系と、女性ホルモンと男性ホルモン (T, DHT) を同時に作用させたときの急性効果の解析とその信号伝達系を調べた。

### 4-1 海馬 CA1 領域における E2-LTP 成立の信号伝達系

本研究では、E2-LTP 成立の信号伝達に関わるリン酸化酵素、受容体を特定した (Fig. 3-1 ~ 3-7)。

#### 4-1-1 E2 は女性ホルモン受容体 ( $ER\alpha$ / $ER\beta$ ) を介して下流のリン酸化酵素を駆動する

本研究により、E2 の weak-LTP に対する増強効果に  $ER\alpha$  /  $ER\beta$  が関与していることが示唆された (Fig. 3-1、3-2)。

E2 は小型で、疎水性のステロイド骨格を持つが、親水性の水酸基も持つため、細胞膜を直接通過でき、細胞内の受容体に到達することができる。また、川戸研究室の先行研究により、海馬 CA1、CA3、DG 領域に存在する神経細胞のシナプス内のシナプス後肥厚 (PSD: postsynaptic density) に  $ER\alpha$  が発現していることが報告された (Mukai et al., 2007)。さらに、 $ER\beta$  は、未だ確証は得られていないが、錐体細胞に発現しているという説が有力となっている (Milner et al., 2005)。ゆえに、本研究結果における E2 の作用は細胞膜を通過して細胞内の ER に結合していることが考えられる。

E2 には長期効果と急性効果が存在し、 $ER\alpha$  /  $ER\beta$  の働きが全く異なる。長期効果では、E2 が核内の  $ER\alpha$  /  $ER\beta$  に結合し、二量体を形成することで標的 DNA 上の estrogen response element (ERE) に結合し、そして、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。これは、24 時間から数日を経て効果を及ぼすことが知られている (Tsai and O'Malley, 1994, Beato et al., 1996, Charlier et al., 2010)。一方、急性効果では、神経シナプスに存在する E2 が  $ER\alpha$  /  $ER\beta$  に結合し、ERK / MAPK などのリン酸化酵素を駆動して神経シナプスに数十分から数時間程度で効果を及ぼしていると考えられている (Mukai et al., 2007, Ooishi et al., 2012)。したがって、本研究による E2 の weak-LTP 増強効果は、30 分間のインキュベーションという短時間の E2 作用に加え、作用後 1 ~ 2 時間で効果が現れていることから、急性効果であると考えられる。

本研究結果から、ER のアゴニスト (PPT、WAY200070) を作用させても、weak-LTP の増強が生じることが示された。このことから、E2 は海馬 CA1 領域のシナプスにあ

る ER $\alpha$  / ER $\beta$  に結合することで、急性的に weak-LTP を増強すると考えられる。

以上より、E2 は神経シナプス内の ER $\alpha$  / ER $\beta$  を介して急性的に E2-LTP を成立させていると考えられる。

#### 4-1-2 E2 は PKA, PKC を駆動する

本研究により、E2 の weak-LTP 増強効果において、PKA, PKC が関与することが示唆された (Fig. 3-4, 3-5)。

海馬 CA1 領域における NMDA 型グルタミン酸受容体に依存する LTP に対し、PKA & PKC  $\rightarrow$  ERK / MAPK  $\rightarrow$  LTP 成立という信号伝達系が提案されている (Sweatt, 1999, 2001)。本研究の結果も上記の信号伝達系と矛盾しない。したがって、E2 が PKA, PKC を活性化することで、E2-LTP が成立していると考えられる。

#### 4-1-3 E2 は ERK / MAPK, NR2B を駆動する

本研究により、E2 の weak-LTP 増強効果において、ERK / MAPK, NR2B が関与することが示唆された (Fig. 3-3, 3-6)。

川戸研究室の先行研究から、コルチコステロンによる NMDA 受容体由来 fEPSP の抑制に対し、E2 が急性的に ERK / MAPK を駆動して回復させることや、この回復に NR2B が関与することが示されている (Ooishi et al., 2012)。これは、E2 の効果に ERK / MAPK と NR2B が関与することを示した本研究結果に一致している。また、全脳 synaptoneurosome に、E2 を 30min 作用させると、ERK / MAPK のリン酸化が最大になることと、NR2B のリン酸化が起こることが western blotting を用いて示されている (Dominguez et al., 2007)。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と、E2 を作用させたときに NR2B のリン酸化が ERK / MAPK の阻害剤により阻害されることが示されている (Dominguez et al., 2007)。これは、本研究で示した 10 nM E2 を 30 分間作用させることで E2 の作用効果が最大になるという結果と、E2 の weak-LTP 増強効果に ERK / MAPK, NR2B が関与するという結果に一致している。したがって、E2 が ER に結合して、その下流の ERK / MAPK を活性化し、活性化された ERK / MAPK が NMDA 受容体に働きかけることで、E2-LTP が成立していると考えられる。

#### 4-1-4 E2 は CaMK II を駆動する

本研究により、E2 の weak-LTP に対する増強効果に CaMK II が関与することが示唆された (Fig. 3-7)。

海馬 CA1 領域の NMDA 受容体に依存する LTP の成立に、CaMK II の活性化が重要で

あることや (Lynch et al., 1983, Lisman et al., 2002, Lynch, 2004, Malenka and Bear, 2004, Luscher and Malenka, 2012)、NMDA 受容体から、数  $\mu\text{M}$  ~ 10  $\mu\text{M}$  以上の高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  が流入することで (Malenka et al., 1988, Yang et al., 1999, Sabatini et al., 2002, Higley and Sabatini, 2012)、CaMK II の活性化を引き起こすことが知られている (Lisman, 1989)。また、本研究結果から、E2-LTP 成立にも NMDA 受容体のサブユニット NR2B や CaMK II の関与が示された。よって、通常の LTP 成立と同様に NMDA 受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入により、CaMK II が活性化することで E2-LTP が成立することが示唆される。

TBS のバースト数と LTP 増強率に相関があることが報告されている (Larson et al., 1986, 新堂, 2010)。上記の相関関係は、TBS による  $\text{Ca}^{2+}$  流入量と CaMK II の活性化の程度の違いにより説明できる。したがって、E2 の weak-LTP 増強効果は  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の増加とそれによる CaMK II の活性化で説明できると考えられる。なぜなら、本研究結果より、E2 を作用させていないときは、weak-TBS で誘導される weak-LTP に CaMK II は関与していない。しかし、E2 を作用させたときは、weak-TBS で誘導される E2-LTP に CaMK II が関与する。つまり、E2 を作用させたとき、weak-TBS を与えると NMDA 受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が増加し、CaMK II の活性化が引き起こされると推測できる。

以上から、NMDA 受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の増加により CaMK II が活性化することで E2-LTP が成立したと考えられる。

#### 4-1-5 E2 は mGluR1 を駆動しない

本研究により、E2-LTP 成立に mGluR1 は関与しないことが示唆された (Fig. 3-15)。

Boulware らの研究により、メスラット由来海馬培養細胞に E2 を作用させると ER $\alpha$ , mGluR1a を介して、ERK / MAPK を活性化し、記憶タンパク質として知られる cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) のリン酸化を促進することが報告された。しかし、オスラット由来海馬培養神経細胞に対しては、E2 の効果が観測されないことも報告されており (Boulware and Mermelstein, 2005, 2009)、本研究の結果と矛盾しない。したがって、オスラット海馬 CA1 における、E2-LTP 成立に mGluR1 は関与していないと考えられる。

#### 4-1-6 E2-LTP 成立のメカニズム

4-1-1 ~ 4-1-5 の考察より、E2-LTP の信号伝達系のモデルを提唱する (Fig. 4-1)。

12 週齢成獣オスラット海馬 CA1 領域において、E2 を作用しない場合、weak-TBS では後シナプス内に十分な濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  が流入しないため、CaMK II が活性化されないことが考えられる。一方で、E2 を作用させた場合、E2 が PKA, PKC, ERK / MAPK を活性化

し、ERK / MAPK が NR2B のリン酸化を引き起こすことで、NMDA 受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が増加し、CaMK II が活性化されることが予想される。したがって、E2 を作用させることで、 $\text{E2} \rightarrow \text{ER}\alpha / \text{ER}\beta \rightarrow \text{PKA, PKC, ERK / MAPK} \rightarrow \text{NMDA 受容体のリン酸化}$  という信号伝達が生じ、weak-TBS という本来ならば LTP が成立しないような弱い刺激であっても、NMDA 受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が増加し、CaMK II が活性化されることで E2-LTP が成立すると考えられる。ただし、PKA は NMDA 受容体 (NR2A、NR2B 両方とも) からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の制御に関係していることが報告されていることや (Westphal et al., 1999, Skeberdis et al., 2006, Higley and Sabatini, 2012)、PKC は NMDA 受容体 (NR2A、NR2B 両方とも) のイオン流入量を増加させることが報告されている (Liao et al., 2001, Chen and Roche, 2007, Prabhu Ramya et al., 2012)。上記から、NR2B のみがリン酸化されるのではなく、NR2A、NR2B のリン酸化が両方とも引き起こされる伝達経路も考えられる。

## 4-2 海馬 CA1 領域における DHT による E2-LTP 抑制効果の信号伝達系

本研究により、T、DHT が E2-LTP を抑制することを示した (Fig. 3-8、3-9)。

川戸研究室の先行研究から、男性ホルモン (T、DHT) も女性ホルモン (E2) と同様に、海馬で合成されることが示されており、DHT と E2 の濃度はそれぞれ 7 nM と 8 nM 程度であることが報告されている (Hojo et al., 2009)。したがって、本研究結果は生体内でも十分起こりうると考えられる。

### 4-2-1 DHT は AR を介して下流の酵素を駆動する

本研究により、DHT は AR を介して E2-LTP を抑制することが示唆された (Fig. 3-11)。DHT は、E2 と同様に小型で疎水性のステロイド骨格と親水性の水酸基を持つため、細胞膜を直接通過でき、細胞内の受容体に到達することができる。また、AR は海馬神経細胞に発現していることが報告されており (Simerly et al., 1990, Brown et al., 1995)、海馬 CA1 領域においても、主に錐体細胞やスパインに存在することが示されている (Clancy et al., 1992, Kerr et al., 1995, Tabori et al., 2005)。次に、E2 と同様に DHT も長期効果と急性効果が存在することが知られており (Foradori et al., 2008)、川戸研究室の先行研究から、男性ホルモンが急性的に AR を介して海馬 CA1 領域のスパインを増大させることが示されている (Hatanaka et al., 2014)。したがって、本研究により、DHT は 30 分間の作用に加え、作用後 1~2 時間で効果を発揮することから、短期効果であると考えられる。また、DHT の E2-LTP 抑制効果は、DHT が細胞膜を直接通過し、海馬 CA1 領域上のシナプスにある AR に結合することで急性的に発揮されたと考えられる。

#### 4-2-2 DHT は脱リン酸化酵素 Calcineurin を駆動する

本研究により、DHT による E2-LTP の抑制に Calcineurin が関与していると示唆された (Fig. 3-12)。

川戸研究室の先行研究により、海馬における、DHT の急性的な効果に Calcineurin が関与することが示されている (Hatanaka et al., 2009, Hatanaka et al., 2014)。海馬において、男性ホルモンが Calcineurin を駆動するという報告はこの 2 報のみであるが、上記結果は、本研究結果で得たように DHT の信号伝達系に Calcineurin が関わっており、本研究結果と一致している。したがって、DHT は Calcineurin を駆動して E2-LTP を抑制したと考えられる。

#### 4-2-3 DHT の急性効果による E2-LTP 抑制のメカニズム

考察 4-2-1 ~ 4-2-2 より、DHT による急性的な E2-LTP 抑制効果の信号伝達系を提唱する (Fig. 4-2)。

Calcineurin が NMDA 受容体のイオン流入量を減少させることや、Calcineurin が NMDA 受容体のサブユニット NR2A の脱感作を引き起こすことが報告されている (Tong et al., 1995, Raman et al., 1996, Krupp et al., 2002)。したがって、以上の報告から、DHT → AR → Calcineurin → NR2A の脱リン酸化を引き起こし、E2 により生じた NMDA 受容体のリン酸化の効果を打ち消す。このとき、海馬 CA1 領域に weak-TBS を与えると、NMDA 受容体から後シナプス内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が E2 を単独で作用させたときより低下し、CaMK II を活性化させることができない。したがって、DHT により E2-LTP が抑制されることが考えられる (Fig. 4-3)。ただし、Calcineurin は PP1 の活性化を促進するという報告がある (Blitzer et al., 1998, Westphal et al., 1999, Soderling and Derkach, 2000)。また、PP1 は NR2B を脱リン酸化することが報告されている (Farinelli et al., 2012, Prabhu Ramya et al., 2012)。上記から、Calcineurin → PP1 の活性化により、NR2B の脱リン酸化を引き起こす伝達経路も考えられる。

#### 4-3 その他の E2 と DHT の伝達系が E2-LTP 成立・抑制に関与している可能性

E2 と DHT は、前シナプスやグリア細胞に作用することで、E2-LTP 成立・抑制に関与する可能性が考えられる。また、DHT の代謝は早く、DHT の代謝物が E2-LTP 抑制に関与している可能性が考えられる。しかし、これらの可能性は以下に述べる考察から排除できると考える。



#### 4-3-1 E2 と DHT による前シナプス制御により E2-LTP 成立・抑制が制御されている可能性は低い

LTP の測定において、LTP 誘導刺激前後の PPF ratio を比較することで、前シナプス由来 LTP の関与の有無を判別することができることが知られている (Katz and Miledi, 1968, Zucker, 1989, Manabe et al., 1993) (Isaacson and Walmsley, 1995)。本研究では、30nM E2 を 30 分間作用と 10nM E2 を 45 分間作用の条件 (Fig. 3-14) と、30nM E2 と 10nM DHT を 30 分間作用の条件 (Fig. 3-10) において第 1 刺激と第 2 刺激の間隔が 50 ms の場合では有意差があったが、100 ms と 200 ms の場合ではどちらか一方あるいは、両方に有意差はなかった。Smejkalova らの研究によると、卵巣を摘出した 8 週齢のメスラットに E2 を投与すると、E2 が前シナプスからのグルタミン酸放出確率を増加させることで、神経伝達を増強させることが示唆されている (Smejkalova and Woolley, 2010)。しかし、12 週齢成獣オスラットでは、E2 を単独で作用させても、EPSP、LTP、PPF ratio 共に変化がないことが示されており、本研究結果と矛盾しない (新堂, 2010, Ooishi et al., 2012)。したがって、本研究における E2 と DHT の E2-LTP 成立・抑制において、前シナプスの寄与の可能性は低く、後シナプスに由来した神経シナプス可塑性が主要因だと考えられる。

#### 4-3-2 E2 と DHT がグリア細胞に作用している可能性は低い

本研究では、E2 と DHT が、海馬 CA1 領域の錐体細胞のスパインに存在する AR または ER にそれぞれ結合し、下流の酵素を駆動することで NMDA 受容体を介して E2-LTP を成立または抑制すると考えている。しかし、E2 と DHT の作用先としては、海馬グルタミン酸神経細胞の他にグリア細胞も考えられる。

川戸研究室の先行研究から、海馬グルタミン酸神経細胞に比べグリア細胞には ER $\alpha$  がほとんど発現していないことが報告された (Mukai et al., 2007)。一方、AR は海馬 CA1 領域において、主に錐体細胞に存在することが示されている (Clancy et al., 1992, Kerr et al., 1995)。したがって、ER や AR が錐体細胞に主に存在することから、E2 と DHT はグリア細胞ではなく、海馬 CA1 領域の錐体細胞に直接作用している可能性が高いと考えられる。

#### 4-3-3 DHT の代謝物関与による E2-LTP 抑制の可能性は低い

本研究では、急性海馬スライスに DHT を単独で作用させた場合、weak-LTP に対して有意な効果を発揮しなかった。

川戸研究室の先行研究から、DHTの代謝物である3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -androstenediolは、DHTからすぐに代謝されることがわかっている (Hojo et al., 2004, Hojo et al., 2008)。また、3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -androstenediol はGABA<sub>A</sub>受容体を活性化することが知られている (Reddy, 2004, Reddy and Jian, 2010, Pettorossi et al., 2013)。したがって、DHTが3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -androstenediolへ代謝され、3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -androstenediolがGABA<sub>A</sub>受容体を活性化することで、EPSPやLTPを減少させる可能性が考えられる。しかし、本研究結果において、DHTを単独で作用させてもweak-LTPは抑制されないことから、DHTの代謝物がE2-LTPに対して影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

#### 4-4 海馬での女性ホルモンと男性ホルモンの合成と作用

本研究で用いた海馬スライスは、2 時間以上、ACSF 中でリカバリーした後に電気生理学的測定により測定している。そのため、海馬スライス内 E2 濃度は 0.5 nM 程度まで減少していると考えられる (Ooishi et al., 2012)。本研究において、0.1 nM E2, 1 nM E2 を急性海馬スライスに作用させても、weak-LTP 増強効果が無かったのは、残存している 0.5 nM E2 に近い濃度だったことが原因と考えられる。よって、海馬スライス内の E2 濃度 0.5 nM より遥かに高い 10 nM E2 を加えたことにより、weak-LTP 増強効果が現れたと考えられる。

川戸研究室の先行研究から、通常、オスラット海馬内では、約 8 nM の E2 が合成されていることがわかっている (Hojo et al., 2009)。したがって、E2 の存在により、in vivo の海馬内では、弱い刺激でも E2-LTP が成立する状況にあると考えられる。

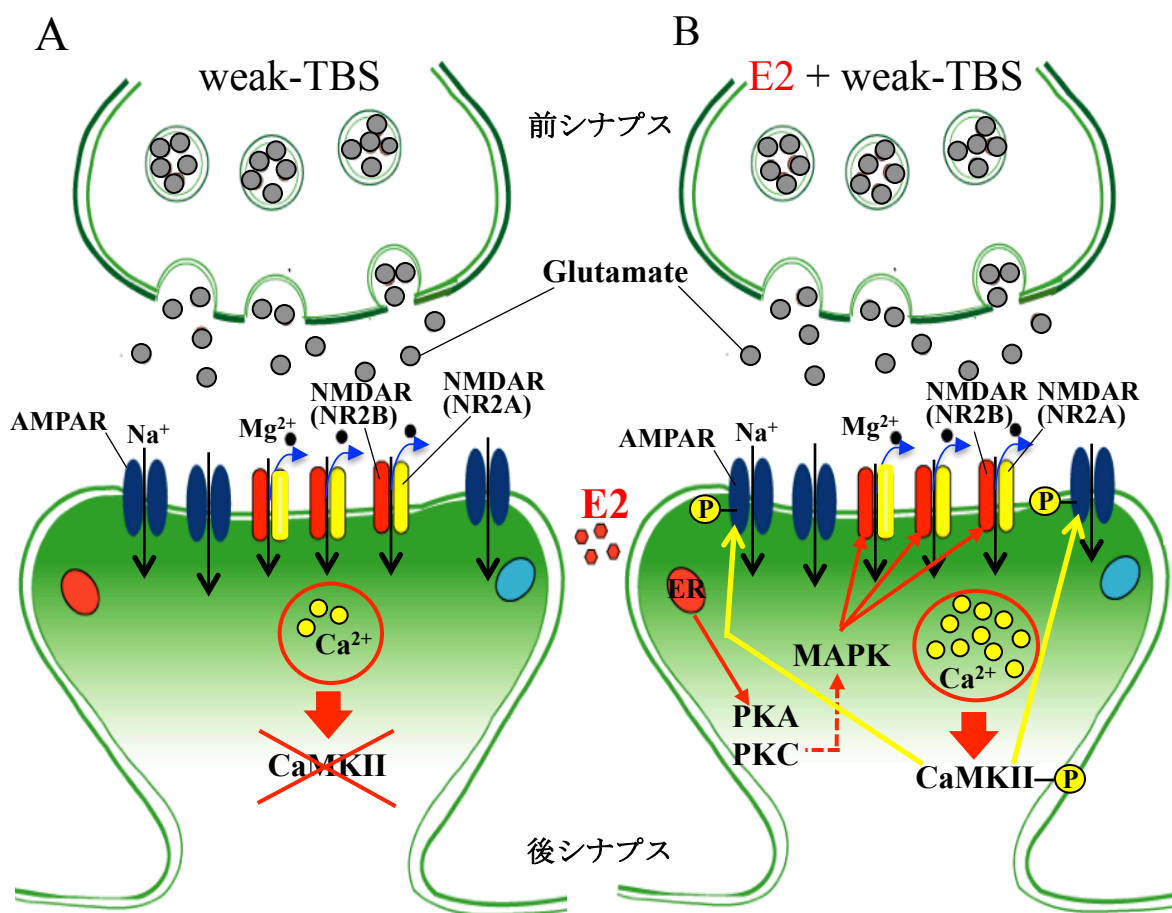
本研究から、10 nM DHT が存在すると 10 nM E2 の効果を阻害するが、DHT を 3 nM まで下げるか、E2 を 30 nM まで上げると DHT の weak-LTP 抑制効果は無くなることが示された。海馬内には DHT が約 7 nM 存在するため、in vivo の海馬内において、E2-LTP は DHT により抑制されることが十分に考えられる。しかし、この濃度は海馬全体で平均したときの測定値である。また、川戸研究室の先行研究から E2 は NMDA 受容体からの Ca<sup>2+</sup>流入により神経活動依存的に急速に合成されることが報告されている (Hojo et al., 2004)。このことから、1 つのシナプスに着目した場合、局所的には、E2 と DHT の濃度比は急激に変化する可能性がある。したがって、シナプス近傍においては、神経活動依存的に E2 / DHT >> 1 となり、E2-LTP が成立していると考えられる。

以上から、脳内では、女性ホルモンと男性ホルモンは、本研究で示したように常に互いに拮抗した効果を示しているわけではなく、神経活動に伴い局所的に E2 と DHT の濃度比が E2-LTP を成立させる状態になることが考えられる。そして、このような状況下で発生した弱い刺激に対して、E2 の効果により E2-LTP が成立することが予想される。

## 4-5 結論

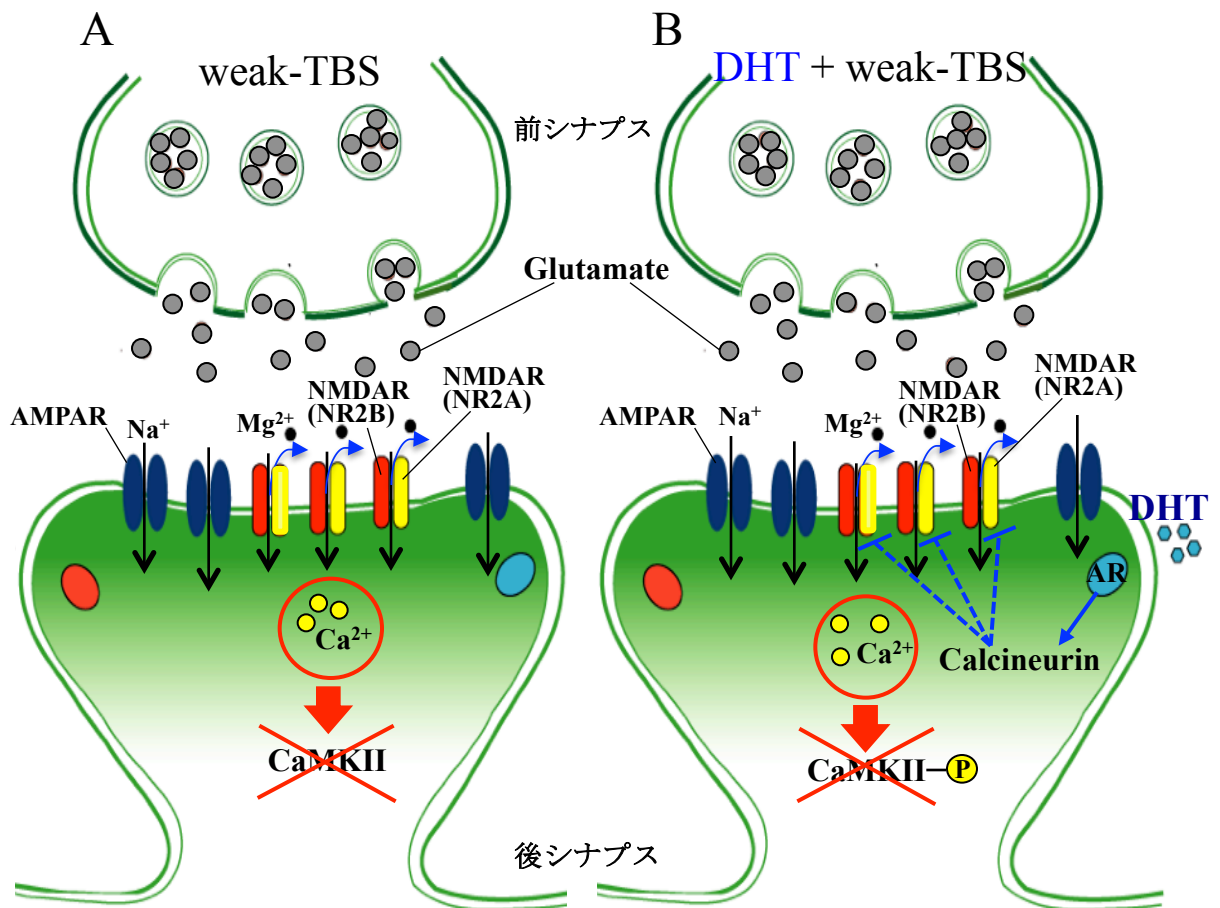
本研究では、12 週齢成獣オスラット海馬 CA1 領域において、女性ホルモン (E2) の急性効果により E2-LTP 成立の信号伝達系が、 $E2 \rightarrow ER\alpha / ER\beta \rightarrow MAPK, PKA, PKC$  の活性化  $\rightarrow$  NMDA 受容体の活性化  $\rightarrow$  後シナプス内への  $Ca^{2+}$  流入量の増加  $\rightarrow$  CaMK II の活性化  $\rightarrow$  E2-LTP 成立となることを提唱した (Fig. 4-1)。また、男性ホルモン (T, DHT) が E2-LTP 成立を抑制することと、DHT による E2-LTP 成立を抑制する際の信号伝達系が、 $DHT \rightarrow AR \rightarrow Calcineurin \rightarrow$  NMDA 受容体の活性化阻害  $\rightarrow$  E2-LTP 成立阻害となることを提唱した (Fig. 4-3)。

今回の研究で得られた E2 の急性的な E2-LTP 成立の信号伝達系は、E2 の急性的な記憶学習に対する効果のメカニズム解明に貢献することが期待される。また、E2 は弱い刺激により E2-LTP を成立させるが、E2 と DHT が同じ濃度るとき、E2-LTP は成立しない。このメカニズムとして、E2 と DHT が NMDA 受容体を介した細胞内への  $Ca^{2+}$  の流入量を制御していることが示唆された。細胞内への  $Ca^{2+}$  の過剰な流入は神経細胞死を引き起こすため、DHT には E2 による神経細胞の過剰な興奮を抑えることで神経細胞を守っている可能性がある。このように、本研究の結果は、海馬内における E2 と DHT の相互作用による神経活動の変化の理解に貢献することが期待される。



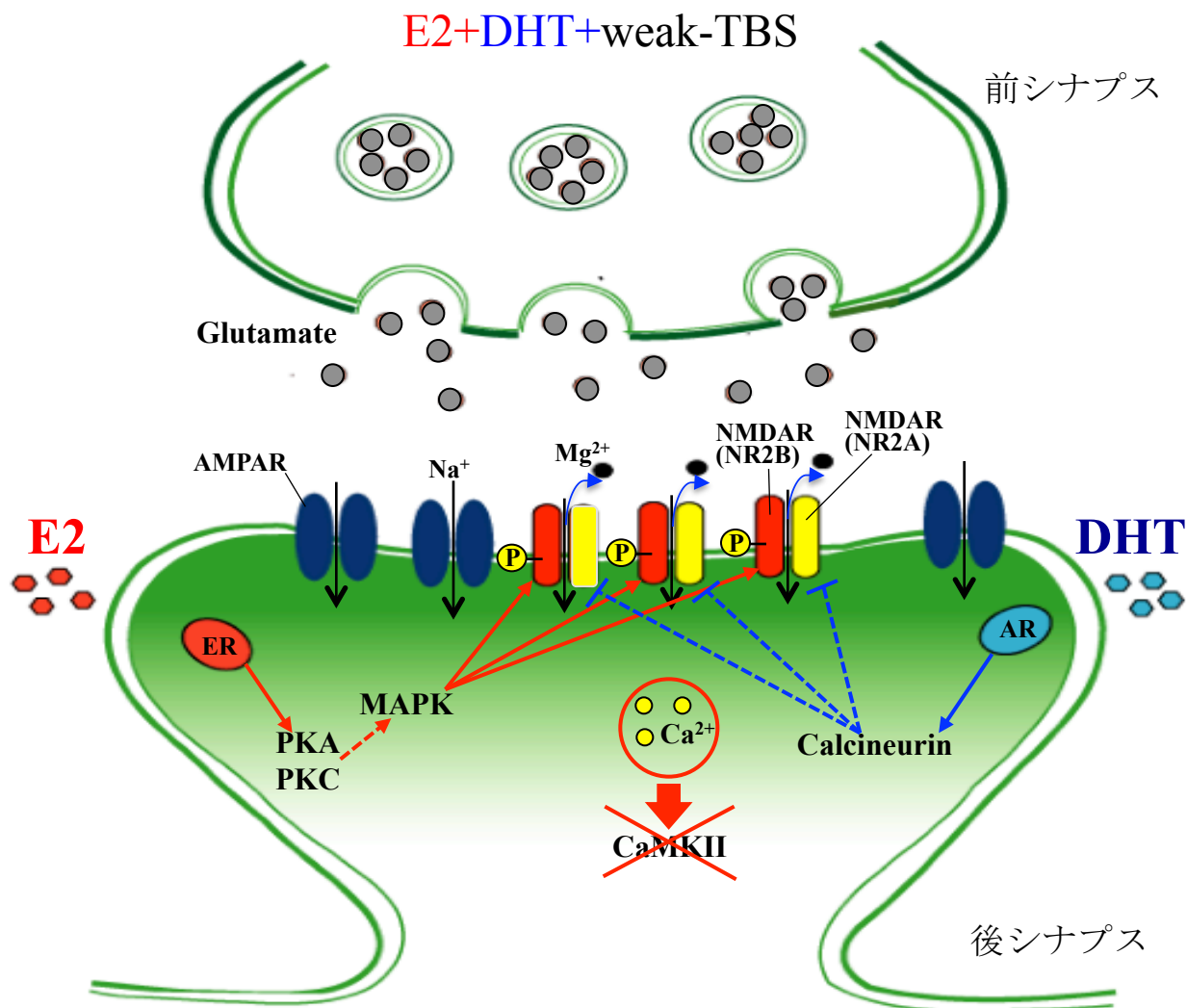
**Fig. 4-1 E2の急性効果のメカニズム**

- A. weak-LTP誘導時のシグナル伝達経路の模式図。weak-TBS → 後シナプス上のAMPA型受容体 (AMPA) を介して細胞内にNa<sup>+</sup> 流入 → 細胞膜の脱分極 → NMDA型受容体 (NMDAR) のMg<sup>2+</sup>ブロックが外れることにより後シナプス内へCa<sup>2+</sup> 流入 → Ca<sup>2+</sup>流入量が少ないのでCaMKIIが活性化されない → weak-LTP。
- B. 本研究結果より推定される、E2によるE2-LTP成立の信号伝達系の模式図。急性海馬スライスに10 nMのE2を30分間作用させることで、E2 → ERα / ERβ → PKA, PKC, ERK / MAPK → NMDA受容体リン酸化という信号伝達が生じる。そこに、weak-TBSを与えてweak-LTPを誘導すると、NMDA受容体を介して通常より多くのCa<sup>2+</sup>が後シナプス内に流入する。その結果、weak-TBSのみでは十分に活性化されなかったCaMK II が活性化し、AMPA型受容体のリン酸化等が生じ、E2-LTPが成立する。



**Fig. 4-2 DHTの急性効果のメカニズム**

- A. weak-LTP誘導時のシグナル伝達経路の模式図。weak-TBS → 後シナプス上のAMPA型受容体 (AMPA) を介して細胞内に  $\text{Na}^+$  流入 → 細胞膜の脱分極 → NMDA型受容体 (NMDAR) の  $\text{Mg}^{2+}$  ブロックが外れることにより後シナプス内へ  $\text{Ca}^{2+}$  流入 →  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が少ないので CaMKII が活性化されない → weak-LTP。
- B. 本研究により推定される、DHTによるE2-LTP抑制の信号伝達系の模式図。急性海馬スライスに10 nMのDHTを30分間作用させることで  $\text{DHT} \rightarrow \text{AR} \rightarrow \text{Calcineurin} \rightarrow \text{NMDA受容体脱リン酸化}$  という信号伝達が生じる。そこに、weak-TBSを与えてweak-LTPを誘導すると、NMDA受容体を介した後シナプス内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量の増大が引き起こされないため、weak-TBSのみを与えたときと同様に、CaMK II が活性化されず、E2-LTPが成立しない。



**Fig. 4-3 急性効果におけるE2とDHTの相互作用**

本研究により推定される急性効果におけるE2とDHTの相互作用の模式図。10 nM E2を30分間作用させることで、E2 → ER $\alpha$  / ER $\beta$  → PKA, PKC, ERK / MAPK → NR2Bのリン酸化という信号伝達が生じる。一方で、10nM DHTを30分間作用させることで、DHT → AR → Calcineurin → NR2A脱リン酸化という信号伝達が生じる。この時、weak-TBSを与えてweak-LTPを誘導すると、E2とDHTにより、NMDA受容体のリン酸化、脱リン酸化が競合する。その結果、E2を単独で作用させた時のようなNMDA受容体を介した後シナプス内へのCa<sup>2+</sup>流入量の変化は起こらず、CaMK II が十分に活性化されないため、E2-LTPが成立しない。

## References

- Baulieu EE, Robel P (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4089-4091.
- Beato M, Chavez S, Truss M (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61:240-251.
- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F (1995) 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 216:473-482.
- Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393:793-797.
- Bi R, Broutman G, Foy MR, Thompson RF, Baudry M (2000) The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3602-3607.
- Bi R, Foy MR, Vouimba RM, Thompson RF, Baudry M (2001) Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13391-13395.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss TV, Collingridge GL, Laroche S (2006) Neuroscience. ZAP and ZIP, a story to forget. *Science* 313:1058-1059.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (1998) Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 280:1940-1942.
- Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R (2006) Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 51:213-225.
- Boulware MI, Mermelstein PG (2005) The influence of estradiol on nervous system function. *Drug News Perspect* 18:631-637.
- Boulware MI, Mermelstein PG (2009) Membrane estrogen receptors activate metabotropic glutamate receptors to influence nervous system physiology. *Steroids* 74:608-613.

- Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ (2007) Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol* 193:311-321.
- Brown TJ, Sharma M, Heisler LE, Karsan N, Walters MJ, MacLusky NJ (1995) In vitro labeling of gonadal steroid hormone receptors in brain tissue sections. *Steroids* 60:726-737.
- Buzsaki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340.
- Buzsaki G, Bickford RG, Ryan LJ, Young S, Prohaska O, Mandel RJ, Gage FH (1989) Multisite recording of brain field potentials and unit activity in freely moving rats. *J Neurosci Methods* 28:209-217.
- Charlier TD, Cornil CA, Ball GF, Balthazart J (2010) Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain. *Biochimica et biophysica acta* 1800:1094-1105.
- Chen BS, Roche KW (2007) Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology* 53:362-368.
- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265:5267-5272.
- Clancy AN, Bonsall RW, Michael RP (1992) Immunohistochemical labeling of androgen receptors in the brain of rat and monkey. *Life Sci* 50:409-417.
- Cordoba Montoya DA, Carrer HF (1997) Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res* 778:430-438.
- Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4704-4707.
- Daniel JM, Roberts SL, Dohanich GP (1999) Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats. *Physiol Behav* 66:11-20.
- Derkach V, Barria A, Soderling TR (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3269-3274.
- Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.



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* 101:232-240.

Edinger KL, Frye CA (2007a) Androgens' effects to enhance learning may be mediated in part through actions at estrogen receptor-beta in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 87:78-85.

Edinger KL, Frye CA (2007b) Androgens' performance-enhancing effects in the inhibitory avoidance and water maze tasks may involve actions at intracellular androgen receptors in the dorsal hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 87:201-208.

Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511-525.

Ehrlich I, Malinow R (2004) Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 24:916-927.

Fader AJ, Hendricson AW, Dohanich GP (1998) Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnestic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiol Learn Mem* 69:225-240.

Farinelli M, Heitz FD, Grewe BF, Tyagarajan SK, Helmchen F, Mansuy IM (2012) Selective regulation of NR2B by protein phosphatase-1 for the control of the NMDA receptor in neuroprotection. *PLoS One* 7:e34047.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273:18623-18632.

Fischer G, Mutel V, Trube G, Malherbe P, Kew JN, Mohacsi E, Heitz MP, Kemp JA (1997) Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1285-1292.

Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ (2008) Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 29:169-181.

Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW (1999) 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81:925-929.

Frye CA, Rhodes ME, Dudek B (2005) Estradiol to aged female or male mice improves

learning in inhibitory avoidance and water maze tasks. *Brain Res* 1036:101-108.

Gibbs RB (1999) Estrogen replacement enhances acquisition of a spatial memory task and reduces deficits associated with hippocampal muscarinic receptor inhibition. *Horm Behav* 36:222-233.

Gibbs RB, Burke AM, Johnson DA (1998) Estrogen replacement attenuates effects of scopolamine and lorazepam on memory acquisition and retention. *Horm Behav* 34:112-125.

Grassi S, Tozzi A, Costa C, Tantucci M, Colcelli E, Scarduzio M, Calabresi P, Pettorossi VE (2011) Neural 17beta-estradiol facilitates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience* 192:67-73.

Grino PB, Griffin JE, Wilson JD (1990) Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126:1165-1172.

Harley CW, Malsbury CW, Squires A, Brown RA (2000) Testosterone decreases CA1 plasticity in vivo in gonadectomized male rats. *Hippocampus* 10:693-697.

Harooni HE, Naghdi N, Sepehri H, Rohani AH (2008) Intra hippocampal injection of testosterone impaired acquisition, consolidation and retrieval of inhibitory avoidance learning and memory in adult male rats. *Behav Brain Res* 188:71-77.

Harvey CD, Svoboda K (2007) Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature* 450:1195-1200.

Hasegawa Y, Mukai H, Asashima M, Hojo Y, Ikeda M, Komatsuzaki Y, Ooishi Y, Kawato S (2014) Acute modulation of synaptic plasticity of pyramidal neurons by activin in adult hippocampus. *Front Neural Circuits* 8:56.

Hatanaka Y, Hojo Y, Mukai H, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kim J, Ikeda M, Hiragushi A, Kimoto T, Kawato S (2014) Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks. *Brain Res Epub ahead of print*.

Hatanaka Y, Mukai H, Mitsuhashi K, Hojo Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Sato R, Kawato S (2009) Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 381:728-732.

Hebb DO (1949) *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. John Wiley & Sons, New York.

Hebbard PC, King RR, Malsbury CW, Harley CW (2003) Two organizational effects of pubertal testosterone in male rats: transient social memory and a shift away from long-term potentiation following a tetanus in hippocampal CA1. *Exp Neurol* 182:470-475.

Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 172:993-999.

Higley MJ, Sabatini BL (2012) Calcium signaling in dendritic spines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005686.

Hill AJ (1978) First occurrence of hippocampal spatial firing in a new environment. *Exp Neurol* 62:282-297.

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:865-870.

Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G, Kominami T, Kimoto T, Honma S, Poirier D, Kawato S (2009) Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* 150:5106-5112.

Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, Kawato S (2008) Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol* 290:31-43.

Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10:647-658.

Huerta PT, Sun LD, Wilson MA, Tonegawa S (2000) Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 25:473-480.

Isaacson JS, Walmsley B (1995) Counting quanta: direct measurements of transmitter release at a central synapse. *Neuron* 15:875-884.

Ishii H, Tsurugizawa T, Ogiue-Ikeda M, Asashima M, Mukai H, Murakami G, Hojo Y, Kimoto T, Kawato S (2007) Local production of sex hormones and their modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscientist* 13:323-334.

Ito K, Skinkle KL, Hicks TP (1999) Age-dependent, steroid-specific effects of oestrogen on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J Physiol* 515 ( Pt 1):209-220.

Kampen DL, Sherwin BB (1994) Estrogen use and verbal memory in healthy postmenopausal women. *Obstetrics and gynecology* 83:979-983.

Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J (2010) Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci* 33:121-129.

Kato A, Hojo Y, Higo S, Komatsuzaki Y, Murakami G, Yoshino H, Uebayashi M, Kawato S (2013) Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of

hippocampal spines. *Front Neural Circuits* 7:149.

Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.

Kawato S, Hojo Y, Kimoto T (2002) Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain. *Methods Enzymol* 357:241-249.

Kerr JE, Allore RJ, Beck SG, Handa RJ (1995) Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology* 136:3213-3221.

Kimoto T, Ishii H, Higo S, Hojo Y, Kawato S (2010) Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus. *Endocrinology* 151:5795-5806.

Konopacki J, Golebiewski H (1993) Theta-like activity in hippocampal formation slices: cholinergic-GABAergic interaction. *Neuroreport* 4:963-966.

Kramar EA, Chen LY, Brandon NJ, Rex CS, Liu F, Gall CM, Lynch G (2009) Cytoskeletal changes underlie estrogen's acute effects on synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci* 29:12982-12993.

Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, Heinemann SF, Westbrook GL (2002) Calcineurin acts via the C-terminus of NR2A to modulate desensitization of NMDA receptors. *Neuropharmacology* 42:593-602.

Larson J, Wong D, Lynch G (1986) Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res* 368:347-350.

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955-959.

Liao GY, Wagner DA, Hsu MH, Leonard JP (2001) Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol* 59:960-964.

Lisman J (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9574-9578.

Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3:175-190.

Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13:169-182.

Logan SM, Sarkar SN, Zhang Z, Simpkins JW (2011) Estrogen-induced signaling attenuates

soluble Abeta peptide-mediated dysfunction of pathways in synaptic plasticity. *Brain Res* 1383:1-12.

Luscher C, Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305:719-721.

Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.

Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.

Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, Nicoll RA (1988) Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242:81-84.

Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.

Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Huganir RL (1997) Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem* 272:32528-32533.

Manabe T, Wyllie DJ, Perkel DJ, Nicoll RA (1993) Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol* 70:1451-1459.

Markham JA, Pych JC, Juraska JM (2002) Ovarian hormone replacement to aged ovariectomized female rats benefits acquisition of the morris water maze. *Horm Behav* 42:284-293.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.

Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE (2005) Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 491:81-95.

Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP, Alves SE (2001) Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* 429:355-371.

Mitsushima D, Ishihara K, Sano A, Kessels HW, Takahashi T (2011) Contextual learning requires synaptic AMPA receptor delivery in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12503-12508.

Mize AL, Shapiro RA, Dorsa DM (2003) Estrogen receptor-mediated neuroprotection from

oxidative stress requires activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 144:306-312.

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.

Mukai H, Kimoto T, Hojo Y, Kawato S, Murakami G, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M (2010) Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochimica et biophysica acta* 1800:1030-1044.

Mukai H, Takata N, Ishii HT, Tanabe N, Hojo Y, Furukawa A, Kimoto T, Kawato S (2006) Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology. *Neuroscience* 138:757-764.

Mukai H, Tsurugizawa T, Murakami G, Kominami S, Ishii H, Ogiue-Ikeda M, Takata N, Tanabe N, Furukawa A, Hojo Y, Ooishi Y, Morrison JH, Janssen WG, Rose JA, Chambon P, Kato S, Izumi S, Yamazaki T, Kimoto T, Kawato S (2007) Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons. *J Neurochem* 100:950-967.

Murphy DD, Segal M (1996) Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16:4059-4068.

Naghdi N, Asadollahi A (2004) Genomic and nongenomic effects of intrahippocampal microinjection of testosterone on long-term memory in male adult rats. *Behav Brain Res* 153:1-6.

Nakashiba T, Buhl DL, McHugh TJ, Tonegawa S (2009) Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. *Neuron* 62:781-787.

Nebieridze N, Zhang XL, Chachua T, Velisek L, Stanton PK, Veliskova J (2012) beta-Estradiol unmasks metabotropic receptor-mediated metaplasticity of NMDA receptor transmission in the female rat dentate gyrus. *Psychoneuroendocrinology* 37:1845-1854.

Neveu D, Zucker RS (1996) Postsynaptic levels of  $[Ca^{2+}]_i$  needed to trigger LTD and LTP. *Neuron* 16:619-629.

Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, Kawato S (2008) Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain Res Rev* 57:363-375.

Oka H, Shimono K, Ogawa R, Sugihara H, Taketani M (1999) A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J Neurosci Methods* 93:61-67.

Ooishi Y, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Hasegawa Y, Shindo T, Morrison JH, Kimoto T, Kawato S (2012) Estradiol rapidly rescues synaptic transmission from corticosterone-induced suppression via synaptic/extranuclear steroid receptors in the hippocampus. *Cereb Cortex* 22:926-936.

Packard MG (1998) Posttraining estrogen and memory modulation. *Horm Behav* 34:126-139.

Packard MG, Kohlmaier JR, Alexander GM (1996) Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behav Neurosci* 110:626-632.

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141-1144.

Pettorossi VE, Di Mauro M, Scarduzio M, Panichi R, Tozzi A, Calabresi P, Grassi S (2013) Modulatory role of androgenic and estrogenic neurosteroids in determining the direction of synaptic plasticity in the CA1 hippocampal region of male rats. *Physiol Rep* 1:e00185.

Phan A, Lancaster KE, Armstrong JN, MacLusky NJ, Choleris E (2011) Rapid effects of estrogen receptor alpha and beta selective agonists on learning and dendritic spines in female mice. *Endocrinology* 152:1492-1502.

Phillips SM, Sherwin BB (1992) Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 17:485-495.

Prabhu Ramya R, Suma Priya S, Mayadevi M, Omkumar RV (2012) Regulation of phosphorylation at Ser(1303) of GluN2B receptor in the postsynaptic density. *Neurochem Int* 61:981-985.

Raman IM, Tong G, Jahr CE (1996) Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16:415-421.

Reddy DS (2004) Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids 3alpha-androstanediol and 17beta-estradiol. *Neuroscience* 129:195-207.

Reddy DS, Jian K (2010) The testosterone-derived neurosteroid androstanediol is a positive allosteric modulator of GABAA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 334:1031-1041.

Robel P, Bourreau E, Corpechot C, Dang DC, Halberg F, Clarke C, Haug M, Schlegel ML, Synguelakis M, Vourch C, et al. (1987) Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain. *J Steroid Biochem* 27:649-655.

Rush AM, Rowan MJ, Anwyl R (2001) Application of N-methyl-D-aspartate induces long-term potentiation in the medial perforant path and long-term depression in the lateral perforant path of the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett* 298:175-178.

Sabatini BL, Oertner TG, Svoboda K (2002) The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines. *Neuron* 33:439-452.

Sacktor TC (2008) PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res* 169:27-40.

Salter MW, Kalia LV (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5:317-328.

Schwartzkroin PA, Wester K (1975) Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. *Brain Res* 89:107-119.

Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.

Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S (1992a) Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:206-211.

Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992b) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:201-206.

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 294:76-95.

Skeberdis VA, Chevalleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadicani SO, Lin Y, Bennett MV, Yuste R, Castillo PE, Zukin RS (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci* 9:501-510.

Skucas VA, Duffy AM, Harte-Hargrove LC, Magagna-Poveda A, Radman T, Chakraborty G, Schroeder CE, MacLusky NJ, Scharfman HE (2013) Testosterone depletion in adult male rats increases mossy fiber transmission, LTP, and sprouting in area CA3 of hippocampus. *J Neurosci* 33:2338-2355.

Smejkalova T, Woolley CS (2010) Estradiol acutely potentiates hippocampal excitatory synaptic transmission through a presynaptic mechanism. *J Neurosci* 30:16137-16148.

Smith CC, McMahon LL (2006) Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci* 26:8517-8522.

Smith CC, Vedder LC, McMahon LL (2009) Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at



hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S130-142.

Soderling TR, Derkach VA (2000) Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23:75-80.

Sweatt JD (1999) Toward a Molecular Explanation for Long-Term Potentiation. *Learning & Memory* 6:399-416.

Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76:1-10.

Tabori NE, Stewart LS, Znamensky V, Romeo RD, Alves SE, McEwen BS, Milner TA (2005) Ultrastructural evidence that androgen receptors are located at extranuclear sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 130:151-163.

Tanaka M, Sokabe M (2012) Continuous de novo synthesis of neurosteroids is required for normal synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 62:2373-2387.

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* 75C:262-273.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41:779-790.

Tong G, Shepherd D, Jahr CE (1995) Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science* 267:1510-1512.

Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Povilaitite P, Parisi L, Muller D (2001) Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J Neurosci* 21:6245-6251.

Tsai MJ, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry* 63:451-486.

Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996a) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87:1317-1326.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996b) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338.

Vedder LC, Smith CC, Flannigan AE, McMahon LL (2013) Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors.

Hippocampus 23:108-115.

Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, Sheng M, Scott JD (1999) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* 285:93-96.

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-1097.

Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N (1993) The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Annals of the New York Academy of Sciences* 696:9-19.

Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265:676-679.

Winson J (1978) Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201:160-163.

Woolley CS (2007) Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annual review of pharmacology and toxicology* 47:657-680.

Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10:4035-4039.

Wu LG, Saggau P (1994) Presynaptic calcium is increased during normal synaptic transmission and paired-pulse facilitation, but not in long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* 14:645-654.

Xu X, Li T, Luo Q, Hong X, Xie L, Tian D (2011) Bisphenol-A rapidly enhanced passive avoidance memory and phosphorylation of NMDA receptor subunits in hippocampus of young rats. *Toxicology and applied pharmacology* 255:221-228.

Yang SN, Tang YG, Zucker RS (1999) Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic  $[Ca^{2+}]_i$  elevation. *J Neurophysiol* 81:781-787.

Zhang L, Rubinow DR, Xiang G, Li BS, Chang YH, Maric D, Barker JL, Ma W (2001) Estrogen protects against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. *Neuroreport* 12:1919-1923.

Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13-31.

新堂 徒夢 (2010) 女性ホルモンによる海馬神経シナプス伝達制御の電気生理学的解析. 東京大学大学院 総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系 修士論文.

## 謝辞

指導教官の川戸教授には、5年間という長い間、大変お世話になりました。研究の歴史や目的、実験中に生じた課題などに対していつも熱心にご指導いただきました。時には、厳しく、しかし、いつも優しく見守っていただき誠に深く感謝申し上げます。助教の木本博士、ポスドクの北條博士には、研究室の歴史や実験で生じた課題や疑問点などについて熱心にご指導いただきました。お二方のご指導のおかげで、研究の発展につながるアイデアを見出すことや、研究の盲点などに気づくことができ、研究を深く理解することや発展させることが出来ました。誠に感謝しております。また、北條博士には論文執筆にあたり最後までご指導いただき誠に深く感謝申し上げます。川戸研究室のOBの方々には、電気生理学実験の基礎や大学院での研究生活の過ごし方などをご指導いただきました。また、公私ともに支えていただき大変感謝しております。この場をお借りして感謝申し上げます。

本論文作成に至ることができたのは、川戸研究室の皆様のあたたかな支えのおかげです。皆様にはこの場をお借りして深く御礼申し上げます。誠にありがとうございました。