

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 長谷川 賢卓

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、 $DHT \rightarrow AR \rightarrow Calcineurin \rightarrow$ NMDA 受容体の活性化阻害 \rightarrow 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 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 が同じ濃度のときは 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と考えられる。