

論文内容の要旨

論文題目 Female hormone changes the density and morphology of spines of hippocampal neurons
女性ホルモンは海馬神経細胞のスパイン密度・形態を変化させる

氏 名 釣木澤 朋和

ここ 20 年間に女性の更年期障害に対する補助療法として、エストロゲン補充療法が登場し、女性ホルモン(エストラジオール)の記憶・認知機能への寄与に注目が集められている。最近になって男性の脳内でも女性ホルモンが合成される事が川戸研究室により発見され、女性ホルモンによる男性の脳への寄与も注目されつつある。

海馬神経細胞樹状突起には棘状の微小な(直径 1 μ m 弱)突起が存在している。これらの突起をスパイン(spine)と呼ぶ。スパインは形態学的特長から、mushroom(大きい頭部を持つ)、thin(小さい頭部を持ち、細長い)、filopodium(首が無く、ひょろ長い)、stubby(首が無く、短い)の 4 種類に大別される。CA3 透明層では、スパインとは異なる、複数の頭部(thorn)を持ち、密集している thorny excrescence(complex spine)という特殊なスパインが存在している。神経前細胞からの軸索終末と後細胞のスパインがシナプス結合を形成しており、神経細胞はこのシナプス結合を介して情報を伝達しており、記憶がシナプスに貯蔵される。

エストラジオールとスパインとの関係は 1990 年初頭に最初に発見された。雌ラットでは、卵巣除去手術により血中の女性ホルモン濃度を低下させると、2 週間後の海馬 CA1 領域の樹状突起スパイン数が半分程度に減少していた。さらに、卵巣除去手術後、定期的に女性ホルモンを血中投与し続けているとスパイン数が正常ラットの状態まで回復することから、女性ホルモンがスパインの維持に関与していることが考えられる。また、雌ラットの性周期に応じて CA1 領域の全スパイン密度が変動し、発情期後期(estrus)の全スパイン密度は、血中エストラジオール濃度の高い発情前期(proestus)に

比べて約30%低かった。CA3 上行層及び網状分子層ではやはり変化がなかった。これらのことから、卵巣で合成されたエストラジオールが、CA1 神経細胞スパインの密度を調節している可能性が示唆された。しかし、血中エストラジオール濃度変化により、海馬以外の部位にも影響を与えることが考えられ、エストラジオールが海馬に直接作用しているのかどうかはこの研究手法(卵巣除去+エストラジオール血中投与)では分からない。実際に、エストラジオールが中脳縫線核から海馬へ投射しているセロトニン神経細胞に作用して、セロトニン放出を抑制させることにより、CA1 へのグルタミン酸作動性神経細胞のスパインを増加させるという報告がある。また、コリン作動性神経細胞に作用することで海馬 CA1 領域の神経細胞スパインを制御しているという報告もある。

雌ラットではエストラジオールによるスパインへの影響について多くの報告があるが、雄についてはなかった。これまでエストラジオールは末梢で合成されて脳へ移動するものと考えられていた為である。しかし雄ラットでも、エストラジオールが海馬内で合成されることが川戸研究室により明らかになった。現在ではコレステロールからエストラジオールまでの代謝経路について明らかにされつつある。さらに、川戸研究室で、海馬を NMDA 刺激すると 30 分後には海馬でエストラジオールが合成されることが発見され、合成酵素が主に神経細胞に局在していることから、エストラジオールが海馬神経細胞で合成されることが示唆されている。従って、雄ラットの脳内で合成されたエストラジオールが直接海馬神経細胞に作用している可能性が考えられる。雄ラットの海馬でエストラジオールの直接の効果を測定する必要がある。

エストラジオールの長期的な作用は、数日かけて作用するものであり、スパインについては、長期的な作用しか報告がない。従って、エストラジオールの急性的な作用について調べる必要がある。

本研究では、12 週齢の雄ラットから急性スライスを作成し、エストラジオールによる海馬 CA1、CA3 領域における神経細胞スパイン・thorn への急性的な作用があることを示した。さらに、エストロゲン受容体には $ER\alpha$ と $ER\beta$ の2種類があることが知られているが、CA1、CA3 領域でともに $ER\alpha$ に作用することでスパイン及び thorn に影響を及ぼしていることを明らかにした。これまで CA1 についての作用については多くの報告があるが、CA3 についてはまったく報告がなかった。従って、本研究で得られた結果は、初めて CA3 領域で thorn に対してエストラジオールの効果を示したことになる。また、CA1、CA3 で、エストラジオールによる 2 時間という早い効果についてはスパイン・thorn に関してはこれまで報告が無かった。この点についても初めての発見である。海馬への直接の作用という点については、これまで培養スライス又は培養細胞でエストラジオールの直接的な効果を測定した報告がある。しかし、培養細胞は胎児・又は新生児の脳からしか培養することが出来ないため、成獣の脳を測定することが出来なかった。本研究で用いた急性スライスは、成獣からでも作成することが出来るため、成獣の脳への影響を調べることが可能である。本研究で急性スライスを用いて、成獣の海馬

神経細胞スパインのエストラジオールによる急性的な変化を測定したことは画期的な意義を持つ。次に、エストラジオールがスパインに影響を及ぼすメカニズムについても調べ、MAP キナーゼが関与していることを初めて発見した。エストラジオールによって駆動するスパイン内での信号伝達系を発見したことは大変意義がある。

本研究では、12 週齢の雄ラットの海馬スライスを用いた。ラットを断頭後海馬を取り出し、ピプラトームを用いて 400 μm の厚さのスライスを作成した。リカバリの為、2~4 時間 25 で人工脳脊髄液(ACSF)でインキュベーションした後、測定用チャンバーにサンプルを移し、薬理刺激を行なった。2 時間 25 でインキュベーションした後、4% パラホルムアルデヒドで組織固定を行った。次に、固定したサンプルの単一神経細胞をカレントインジェクション法を用いて蛍光染色した。蛍光色素として、Lucifer Yellow を用いた。その後、共焦点レーザー顕微鏡により 0.5 μm 毎に 30-40 枚の断層画像を撮影した。デコンボリューション処理により光学的ボケを減らした画像を三次元再構成して、CA1 では各形態のスパイン密度を、CA3 では thorn 密度を測定した。x-y 平面の分解能は 0.18 μm 、z 軸方向の分解能は 0.34 μm である。解析プログラムとして Neurolucida を用いた。

解析の結果、CA1 放射状層では 1nM エストラジオールを 2 時間投与すると全スパイン密度が約 1.5 倍に増加し、各形態では thin、filopodium の密度が選択的に増加した。増加した内訳は、thin が 80%、filopodium が 20%であった。さらに、ER α の選択的アゴニストである PPT によって同様の効果が見られるが、ER β の選択的アゴニストである DPN では見られないことから、エストラジオールは ER α に作用することを示した。川戸研究室では、ER α がグルタミン酸性神経細胞の細胞質、核だけでなく、スパイン内部に主に局在することを免疫組織染色、免疫電顕を用いて示しており、エストラジオールが神経細胞スパインに直接作用していると考えられる。次に、グルタミン酸受容体の寄与について調べたところ、NMDA 型受容体を介した自発的な細胞内へのカルシウムイオンの流入が必要であることを示した。さらに、CA1 で ER α 以降のシグナル伝達経路について調べた。その結果、エストラジオールは MAP キナーゼを駆動することで、thin、filopodium の各スパイン密度を増加させることを示した。

CA3 では、1nM エストラジオールを 2 時間投与すると thorn 密度が 30%程減少することが示された。さらに、ER α の選択的アゴニストである PPT によって同様の効果が見られるが、ER β の選択的アゴニストである DPN では見られないことから、エストラジオールは ER α に作用することを示した。CA3 でも、川戸研究室により、グルタミン酸性神経細胞の thorn に ER α が局在することが示されており、エストラジオールが神経細胞 thorn に直接作用していると考えられる。次に、グルタミン酸受容体の寄与について調べたところ、エストラジオールの効果には AMPA 型グルタミン酸受容体を介した自発的な膜電位変化が必要であることが示された。また、低閾値型膜電位依存性カルシウムチャネルを介した細胞内カルシウムイオンの自発的な変動も、エストラジオールの効果

には必要であることを示した。さらに、CA3 で ER α 以降のシグナル伝達経路について調べた。その結果、エストラジオールは MAP キナーゼを駆動することで、thorn 密度の減少を引き起こしていることを示した。

以上より、本研究において、雄ラットの海馬で、CA1 神経細胞では、エストラジオールが2時間で thin, filopodium の全スパイン密度を増加させ、CA3 神経細胞では、エストラジオールが2時間で thorn 密度を減少させることを発見し、さらにスパイン密度変化に必要な信号伝達経路を解析した。これまで成獣海馬のスパインに関する直接的なエストラジオールの効果については報告は無かったので、本研究で示した結果は世界で初めての発見であり、大変意義のあるものである。