

論文審査の結果の要旨

氏名 大石 悠貴

記憶中枢の海馬は、脳内のステロイドによって機能が調節されている。海馬機能はストレス付加によって大きく抑圧されると言われてきた。一方女性ホルモンは神経可塑性を制御し神経保護効果があることがわかってきた。本研究では短時間で引き起こされる海馬のストレス症状が果たして女性ホルモンで救済されるのか否かという問いに対する答えを求めることを目的とした。

我々がストレスを受けると、視床下部-脳下垂体-副腎皮質軸(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis)の応答により、副腎皮質で作られるストレスステロイドであるコルチコステロイドの血中濃度が数分で 100 nM 程度から1 μ M 程度にまで増えて、血流に乗り脳血液関門を通り脳に到達し、脳機能障害や鬱病など悪影響を及ぼすと考えられている。特に海馬はコルチコステロイドの受容体であるグルココルチコイド・レセプター (GR)が脳の中でも多く発現していることから、ストレスの最大の標的である。ストレスが記憶学習に及ぼす影響とそのメカニズムの解明は脳科学研究のトピックの一つとなっている。最近では1時間程度の短時間のストレスによる記憶学習への影響に言及する報告が出てきて、コルチコステロイドが急性的に海馬の記憶メカニズムに影響することが示唆されている。

一方、代表的な女性ホルモンであるエストラジオール (E2)は脳神経系において神経保護効果を示し、また神経栄養因子であることが知られている。アルツハイマー病の原因とされているアミロイド β による神経細胞死を保護するなど神経保護因子として働く。またエストロゲン補充療法を受けている女性患者に対し記憶テストを行なうと、E2の補充をやめると成績が悪くなり、補充を再開すると回復するという臨床結果があることから記憶学習に好影響を及ぼすことも明らかとなっている。

しかしこの作用はコルチコステロイド同様、卵巣等の末梢器官で合成された E2 が血流に乗って脳神経系に達するという描像であった。ところが近年の川戸研究室の研究で、ラットの海馬神経が E2 を合成していることがわかってきた。脳内のステロイドの作用には「急性作用」という1時間程度で現れる早い作用がある。川戸研究室の荻上等は E2 が海馬の長期抑圧 (Long-term depression : LTD)を急性的に強化させることを見出した。本研究では E2 が、急性ストレスによる記憶学習への影響に対し保護作用を発揮するかどうかに関心を当てた。海馬では記憶学習の素過程として長期増強現象(Long-term potentiation : LTP)というシナプス可塑性がある。電気生理学的測定法により LTP に対する高濃度コルチコステロイドの急性効果とその作用メカニズ

ム、そして高濃度コルチコステロイドに対するエストラジオールの急性的保護作用を検証した。

コルチコステロンはげっ歯類のコルチコステロイドである。ラット海馬スライスにおいて、コルチコステロン (CORT) 1 μM を 30 分灌流し 100 Hz で 1 秒のテタヌス刺激をかけ LTP を誘発させると、CA1 領域において fEPSP (細胞外興奮性シナプス後電位) で見た LTP 増強率が 134% \rightarrow 121%と急性的に抑制されることがわかった。この効果がグルココルチコイド受容体 (GR) を介したものであることを発見した。これは GR のアゴニストである 100 nM DEX でも同様の LTP 抑制効果があり、さらに 1 μM CORT の LTP 抑制効果が GR 阻害剤である RU486 で完全に阻害されてしまうからである。細胞体や核だけに存在すると思われていた GR が、神経シナプスにも存在していて、シナプス伝達を短期的に抑制したわけである。

更に、GR の下流のメカニズムを解析するために、NMDA 型グルタミン酸受容体由来のイオン流入 (NMDA-R fEPSP) のみを測定するために、AMPA 受容体の阻害剤 CNQX を添加し、0.1 mM Mg^{2+} という条件で測定した。1 μM CORT を加えると、NMDA-R fEPSP が 87%程度に抑制されるが、この抑制は calcineurin の阻害剤である cyclosporin A (CsA) により解消された。従って 1 μM CORT の LTP 抑制作用はタンパク脱リン酸化酵素である calcineurin を駆動したものであることがわかった。

一方 CORT の急性ストレス作用に対し、1 nM E2 を同時に流すと、1 μM CORT による LTP 抑制を 121% \rightarrow 134%と急性的に阻止することを発見した。E2 の作用部位と考えられるエストロゲン受容体 (ER) の二つのサブタイプ ER α と ER β について調べた。100 nM の PPT (ER α のアゴニスト) によっても、DPN (ER β のアゴニスト) によっても、121% \rightarrow 132%と、CORT による LTP 抑制が阻止されたので、E2 は ER α 、ER β 双方を介して CORT による LTP 抑制を急性的に阻止することが示された。更に ER α と ER β の下流の信号伝達も解析した。NMDA-R fEPSP で見て、CORT による NMDA 型グルタミン酸受容体のイオン流入抑制を、E2 が ERK/MAPK 経路を駆動して阻止することを、ERK/MAPK の阻害剤である U0126 による阻害実験によって見出した。

海馬が E2 の合成能を持つことは川戸研究室の北条等による先行研究で証明されていたが、実際の E2 濃度は厳密にはわかっていなかった。Radio Immuno Assay 法による分析で海馬の E2 は 0.6 nM と求められていたが、実は測定精度が悪く定性的な意味しかなかった。本研究では雄ラットの海馬を取り出して HPLC で E2 の画分を抽出し LC-MS/MS による質量分析を行なうことで、取り出した直後の海馬内に 8.4 nM の E2 が存在していることを明らかにした。ところが、電気生理実験では、脳スライスをステロイドの無い ACSF で 2 時間インキュベーションしその後 1 - 2 時間程度灌流しながら実験する。このよ

うな実験系において海馬スライスに存在する E2 の濃度を決定しなければならない。本研究では、ACSF で 2 時間インキュベーションした場合、海馬スライスでは E2 が 0.48 nM に減少していることがわかった。これにより、なぜ低濃度 1 nM の E2 を外から加えた時に、LTP や NMDA-R fEPSP において効果ははっきり出るかという理由がはじめて明らかとなった。通常の電気生理実験などでは、本当の海馬とは全く異なるステロイドホルモンの状態で各種の実験を行っていることになり、実験の解釈上大きな問題を含んでいることが明らかとなった。

一方、エーテルによる麻酔で与えた急性ストレス時の海馬内の CORT 濃度を測定すると 430 nM という結果を得た。血中の濃度は 1400 nM であった。海馬スライスを ACSF で 2 時間インキュベーションした場合 CORT が 1.9 nM となり、エーテルストレス時に測定した 430 nM に比べ非常に減少していることがわかった。本研究ではこの状態に 1000 nM の CORT を投与して実験したことになる。

このように本研究では、CORT による急性ストレスが記憶抑制効果を示す分子メカニズムと、この抑制効果を E2 が解消する働きをする分子メカニズムを解明した。従来はステロイドの作用は核内の遺伝子発現を介した長期作用しかないと言われていたが、本研究では NMDA 受容体に 20 分程度で作用する急性効果を実証することで、海馬において CORT や E2 という代表的ステロイドが短時間で作用する新たなメカニズムを示した。これらの結果は脳生物物理学において、非常に有意義な貢献をしたものと認められる。

なお、本論文は、川戸佳、北條泰嗣、肥後心平との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験及び解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、審査員一同、論文提出者大石悠貴は東京大学博士(理学)の学位を受けるに十分な資格があり、学位を授与できると認める。