

審査の結果の要旨

氏名 池田 隆光

エストロゲンは「女性ホルモン」として知られており、内分泌系において重要な役割を担っている。しかし、その合成酵素や受容体が記憶を担う海馬などの神経細胞に雌雄共に発現している事が知られており、「女性ホルモン」以外の役割があると考えられる。エストロゲンの受容体は海馬体において抑制性神経細胞にも発現していることが知られている。抑制性神経細胞は情報を処理する際に活動することが個体レベルの実験で示されていることから、抑制性神経伝達がこの正確な活動のタイミングを通じて情報処理機構に関与していると示唆されている。また、抑制性神経細胞の機能の失調と種々の疾患の関連も示唆されており、抑制性神経細胞の機能の調節メカニズム、機能調節因子を明らかにすることは生理学的にも病理学的にも重要であると思われる。エストロゲンの作用を検討した報告は既にあるが、全て外因性に与えたものの作用であり、脳内で合成されたエストロゲンの作用は検討されていない。

本研究では、抑制性神経細胞の機能調節因子として、エストロゲンに着目し、培養神経細胞および個体動物レベルで内因性エストロゲンの作用解明を目的とした。

### 1. 海馬培養神経細胞におけるエストロゲンの役割

培養海馬神経細胞に、エストロゲンの合成酵素(アロマターゼ)阻害薬 letrozole、fadrozole を適用し、抑制性神経伝達物質 GABA の合成酵素、GAD65、レベルを免疫染色で測定した。letrozole および fadrozole はともに GAD65 レベルを低下させ、エストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  の阻害薬 ICI 182780、tamoxifen も同様の作用を示した。また、定量的 PCR により、GAD65 mRNA レベルも低下していることを明らかにした。以上の点から培養神経細胞の合成するエストロゲンは抑制性神経伝達機能を制御することが考えられ、その作用はエストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  を介することを明らかにした。

修士課程において BDNF が GAD65 の発現を調節する事を明らかにしているので、BDNF とエストロゲンの関係に着目した。エストロゲンにより BDNF の発現が誘導されることが既に報告されている。エストロゲンによる GAD65 発現量調節が BDNF を介したものであるか検討を行った。培養神経細胞に対し ICI182780、BDNF をそれぞれ単独処置した群とそれらを共処置した群について検討を行った。すると GAD65 発現量は ICI182780 単独処置群に比べて有意に上昇したものの、BDNF 単独処置群に対しては有意に低かった。また、BDNF の受容体の阻害薬 K252a および ICI182780 を単独、共処置を行った。いずれの薬物も単独で有意に GAD65 発現量を低下させたものの、一方の阻害薬が他方の阻害薬の作用をマスクすることはなかった。これらのことから、エストロゲンによる GAD65 量の調節に BDNF は関与しない、もしくは BDNF の寄与は小さいものと思われる。

### 2. 雄性ラットの脳におけるエストロゲン

次に雄性ラットの脳内におけるエストロゲンに着目をした。一般に「女性ホルモン」として知られているのは  $17\beta$ -エストラジオールであるが、LC/MS/MS を用いた検討によりマウスの脳においては  $17\alpha$ -エ

ストラジオールが存在すると報告されている。市販の抗体は全て交差性を示してしまうことから、これまでに ELISA や RIA などの方法により行われてきた研究は不正確である可能性がある。そこでガスクロマトグラフィー・マススペクトラムを用いて  $17\alpha$ -エストラジオールと  $17\beta$ -エストラジオールを別々に定量することのできる系を確立した。雄性ラットより海馬を摘出し、抽出を行った後に誘導体化試薬を加え、定量的に解析した(内部標準物質としては重水素体を用いた)。

$17\alpha$ -エストラジオールの作用については不明であるために、培養神経細胞を用いて検討を行った。培養海馬神経細胞に対し letrozole、 $17\alpha$ -エストラジオールおよび  $17\beta$ -エストラジオールを適用したところ、Letrozole 処置群に対し、letrozole、 $17\alpha$ -エストラジオールもしくは  $17\beta$ -エストラジオールを共添加した群では GAD65 シグナルが有意に上昇していた。また、いずれの濃度においても  $17\alpha$ -エストラジオールと  $17\beta$ -エストラジオールの作用に有意な差はなかった。すなわち、 $17\alpha$ -エストラジオールは  $17\beta$ -エストラジオールと同程度の作用を持っており、抑制性シナプス調節に関与しうる事を初めて明らかにした。

### 3. 雄性ラットの脳内で合成されるエストロゲンの役割

実際に脳内で合成されるエストロゲンの役割に着目した。letrozole を脳室内に投与することにより、末梢組織由来のエストロゲンと中枢神経系由来のエストロゲンを区別した。Letrozole により、脳内の  $17\alpha$ -エストラジオールの量が有意に低下していることを確認した。次に、Letrozole を脳室内に投与したラットの海馬 CA1 野では、GAD65 のレベルが有意に低下していた。次に、letrozole 脳室内投与を行い、ラットの行動解析を行った。その結果、オープンフィールド試験にて letrozole (i.c.v.) 群では中心部にいる時間が有意に低下していた。また  $17\alpha$ -エストラジオールの共投与によりその作用は消失した。なお体重や、移動距離、リアリングの回数には有意な差は認められなかった。他の試験についても検討を行ったが、高架式十字迷路や強制水泳試験では対照群との違いは検出されなかった。

本研究において培養神経細胞および雄性ラットを用いた検討から、(1)培養神経細胞、雄性ラット海馬においてエストロジェンの合成能低下にともない GAD65 レベルは減少すること、(2)雄性ラット海馬に主に存在するエストロゲンは  $17\alpha$ -エストラジオールであること、(3)脳内におけるエストロジェンの合成能低下にともなって雄性ラットは不安様行動を示し、この作用は  $17\alpha$ -エストラジオールの共投与により抑制されること、を明らかにした。以上のことから  $17\alpha$ -estradiol は脳内で合成され、機能的に抑制性神経細胞に働く新規の神経伝達調節因子であると考えられた。このように、本研究はエストロジェンの脳機能に対する作用を明らかにしたものであり、博士(薬学)の学位授与に値するものと判断した。