

論文要旨

男性ホルモンによる海馬神経スパインの増加機構の解析

畑中 悠佑

【研究背景・目的】

海馬は記憶の中枢であり、記憶は神経シナプ스에蓄えられる。シナプスの後部であるスパインは 0.2-0.8 μm の頭部直径を持つきのこ状の突起であり、神経細胞の樹状突起上に多数存在する。神経細胞には一万個以上のスパインが存在しており、頭部直径の大きいスパインほど安定で、シナプス伝達効率が高いことが知られている。一方、男性ホルモンは海馬で情動や認知機能を調節している。そのため、老化に伴う男性ホルモンの減少による記憶・学習能の低下やアルツハイマー病などの発症は、高齢化が進む現代で深刻な社会問題となっている。雄ラットを去勢すると不安行動が増大し、この不安行動は男性ホルモンを数日間投与することで減弱するため、男性ホルモンには抗不安作用があることがわかっている。さらに、男性ホルモン受容体アンタゴニストを海馬に投与することで、この抗不安作用が消失することから、男性ホルモンの抗不安作用を担うのは海馬であることがわかっている。男性ホルモンは血中よりも海馬のほうが高濃度で存在しており、その濃度は海馬でジヒドロテストステロン(DHT)が 7 nM、テストステロン(T)が 17 nM であることが川戸研究室の先行研究で明らかにされている。そのため、海馬機能に対する男性ホルモンの役割は大きいと考えられるが、男性ホルモンが実際にスパインにどのように作用し、形態を制御して、最終的に海馬機能を調節しているかということに関してはほとんど解明されていない。

従来までの男性ホルモンとシナプスの研究では、投与して2日後に現れる遅い効果を調べていた。これは、精巣摘出したラットに 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という非常に高濃度の男性ホルモンを皮下注射し、シナプス数の増加を電子顕微鏡で調べたものである。ここでは男性ホルモンは、核内受容体に結合し、遺伝子発

現を介してその効果が発現されており、実際に観察されていたのはそこで合成されたタンパク質の作用であった。また、これらの研究では生体に男性ホルモンを投与しているため、大脳皮質下から海馬に投射するコリン・セロトニン神経を介した海馬グルタミン酸神経への男性ホルモンの間接的効果も含まれていた。したがって、男性ホルモンがスパインをどのように直接的に制御するかは依然としてわかっていない。さらに、スパインの形態そのものが非常に複雑で、その分布が密な領域では詳しい研究が行われてこなかった。

本研究では、男性ホルモンが海馬機能を調節する際のメカニズムを明らかにするために、スパイン形態に及ぼす男性ホルモンの急性作用を解析した。摘出した直後の海馬に男性ホルモンを加えることで、海馬のグルタミン酸神経それ自体に作用する男性ホルモン効果を調べた。12週齢雄ラットから摘出した海馬スライスにDHTやTを2時間作用させた。このとき男性ホルモンと同時にリン酸化酵素の選択的阻害剤を作用させることで、男性ホルモン効果の発揮に必要なリン酸化酵素を調べた。これらのスライスの錐体神経細胞に蛍光色素 Lucifer Yellow を注入することでスパインを可視化し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて断層撮影した。このデータを川戸研究室で独自に開発したプログラム“*Spiso-3D*”により解析することで、光の波長と同程度のスパインを正しく検出し頭部の構造を調べた。このプログラムにより作業を自動化することで、何万という膨大な数のスパインを解析し、信頼に足る量のデータを得ることができた。さらに、単純にスパイン全体の密度を調べるだけでなく、スパイン頭部直径に応じて small-head spine (< 0.4 μm)、middle-head spine (0.4-0.5 μm)、large-head spine (> 0.5 μm) にスパインを分類して各々の密度を調べることで、同じ男性ホルモンであるDHTとTでも、その効果の差異について詳細に解析した。また、男性ホルモン受容体(AR)と下流のリン酸化酵素を中心としたシグナル伝達経路を、海馬 CA1 および CA3 領域にて解析することで、海馬での男性ホルモンのより詳細な作用機序を解析した。CA1は空間記憶、CA3は連合記憶を司っているとされる領域であり、これらの領域のスパインに直接男性ホルモンが作用することで、海馬機能を制御するのではないかと考え、両者に焦点を当てた。さらに、CA1・CA3 間での男性ホルモンの作用および作用機序の差にどのような違いがあるかについても調べた。

【研究結果・考察】

男性ホルモンであるジヒドロテストステロン(DHT)とテストステロン(T)は 10 nM、2 時間で、海馬 CA1 全スパイン密度をそれぞれ 0.97 spines/ μm から 1.28、1.32 spines/ μm に増加させた(ともに約 1.3 倍)。CA3においてもDHTとTはソーン(CA3でのシナプス後部の呼び名)の密度をともに 2.2 thorns/ μm から 3.2 thorns/ μm に増加させた(ともに約 1.5 倍)。特に CA1 において、DHT は middle-head spine と large-head spine を、T は逆に small-head spine を増やしていた。スパインを直径に応じて分類することで、全スパイン密度では検出できない効果の差についても解析することが可能になり、同じ男性ホルモンでもその作用に違いがあることを発見した。

従来、AR は核内受容体であり転写因子として遺伝子転写を制御すると考えられていたが、近年の電子顕微鏡法による研究から、その海馬神経細胞内での局在は核や細胞体のみならず、スパイン、軸索及び軸索終末にも確認されている。本研究では、ウェスタン・ブロッティングにより、海馬のシナプス

後膜にある postsynaptic density に AR が局在していることを発見した。さらに、AR アンタゴニストの投与により、男性ホルモンのスパイン増加効果が完全に消失した。したがって、男性ホルモンのスパイン増加作用は、スパインに局在する AR を介した急速なシグナル伝達経路を活性化していることがわかった。

このときのシグナル伝達分子を調べるため、リン酸化酵素の網羅的な阻害実験を行った。MAPK のスーパーファミリーである Erk MAPK と p38 MAPK について阻害実験を行った結果、DHT と T によるスパイン密度の増加には Erk MAPK と p38 MAPK の両方が必須であることがわかった。さらに、PKC や脱リン酸化酵素の calcineurin などともまたこのときのスパイン増加に関わっていることを発見した。一方、PI3K を阻害しても男性ホルモンによるスパインの増加には影響はなかった。興味深いことに、男性ホルモンの短期作用の情報伝達に関わらないこの PI3K は、女性ホルモンでは活性化されてその急性効果を担っていることが知られている。したがって、短期作用における男性ホルモンの細胞内情報伝達経路は女性ホルモンのそれとはまったく異なるメカニズムであることがわかった。また、海馬の領域間でのシグナル伝達経路の違いも明らかになった。PKA は CA1 における男性ホルモンのシグナル伝達に関与していたが CA3 では関与していなかった。逆に、CaMKII は CA3 では働くが、CA1 では働いていなかった。神経細胞において、男性ホルモンによる多数のリン酸化酵素の活性化を伴うシグナルカスケードを明らかにした研究は本研究が初めてである(図)。リン酸化酵素を一つでも阻害しただけで男性ホルモンによるスパイン密度の増加が完全に抑制されたことから、最終的な形態変化のターゲットと考えられるコータチンなどのアクチン結合タンパク質に複数のリン酸化部位があるため、それらが適切にリン酸化されないとスパインの形態変化が起こらないことが示唆される。また、CA3 でのソーン構造の変化のメカニズムについて詳しく調べた研究は皆無であり、本研究で CA3 ソーンの変動とそのメカニズムを明らかにすることで、多くが未解明であった CA3 領域での情報伝達過程について貴重な知見を得ることができた。

男性ホルモンのほかに女性ホルモンも、記憶学習を担う脳の可塑性に影響を及ぼすことが知られている。ところが、女性ホルモンは CA1 ではスパインを男性ホルモンと同程度に増加させるが、CA3 では男性ホルモンとは逆にソーンを減少させることが川戸研究室の先行研究で明らかにされている。CA3 においては、男性ホルモンと女性ホルモンがまったく逆の効果を及ぼすのである。このように、男性ホルモンと女性ホルモンの効果の差を明らかにすることができたのも、本研究の成果の一つである。

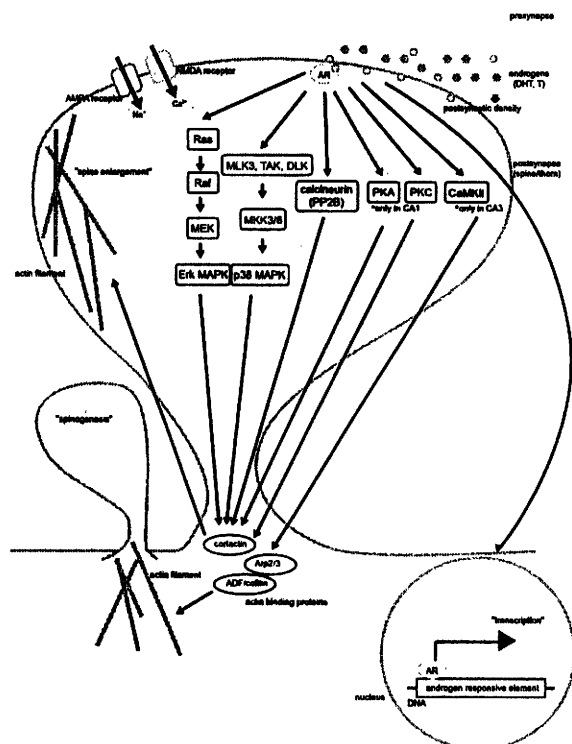


図 男性ホルモンによるスパイン増加のシグナル伝達経路