

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「内分泌かく乱物質」  
研究課題  
「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」

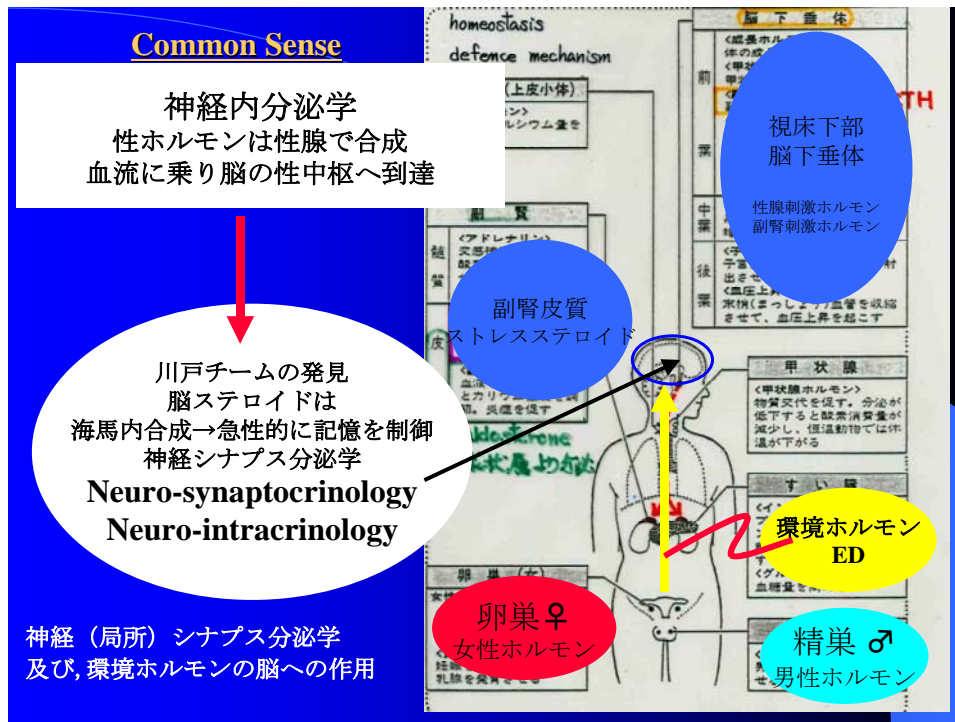
## 研究終了報告書

研究期間 平成12年11月～平成17年10月

研究代表者：川戸 佳  
(東京大学大学院総合文化研究科、 教授)

## 1 研究実施の概要

記憶学習の中枢である大脳の海馬を中心にすえて、神経伝達に対する女性ホルモンの作用と、環境ホルモンの攪乱作用を研究してきた。従来の神経内分泌学の常識では、ステロイドホルモンは性腺や副腎皮質で合成されて、血流に乗って標的である脳（特に性中枢である視床下部など）に到達して作用する、というふうに信じられてきた。これに対して我々は新しい展開として、(A) 記憶を司る海馬は独自にチトクロム P450 系が女性・男性ホルモンを合成し、(B) これらは神経伝達や神経シナプス回路の配線を1時間ほどで急性的に変動させる、ことなどを明らかにした。(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用に攪乱を与えると考え、研究を推進した。神経シナプス分泌学という概念をうちたてた。



### 【脳でのエストロゲン合成】

成獣♂♀海馬が女性ホルモンを合成している機構を調べる為に、放射性ステロイド基質を成獣12週齢ラットの海馬スライスに添加して代謝解析を行った。代謝産物は、有機溶媒で抽出後、HPLCを用いて分離し解析した。この結果我々は世界で初めて、コレステロール→プレグネノロン→DHEA→アンドロステジオール→テストステロン→エストラジオールに到る、女性ホルモン合成経路を発見した。更に、テストステロン→ジヒドロテストステロン→ $3\alpha,5\alpha$ -アンドロスタンジオールという男性ホルモンの代謝経路も存在した。♂海馬内に存在する脳ステロイドの濃度は、LC/MS/MSを用いて質量分析で決定した。この結果、テストステロン 17 nM, エストラジオール 1-4 nM というように海馬内の濃度が求まった。精巣摘出ラットでも海馬内のテストステロンやエストラジオールの濃度はそれほど変動しなかったため、血中からのステロイドの寄与は少ない。また以上の性ホルモン合成活性は、♂と♀の海馬に顕著な差が小さく、♂も女性ホルモンを合成し、♀も男性ホルモンを合成する。海馬のような高次脳機能を司る器官では、♂♀の差は少ないのかもしれない。

女性・男性ホルモン合成を行う酵素系は、各蛋白質の抗体組織染色や Western Blot による同定を行なった。StAR, チトクロム P450<sub>scc</sub>, チトクロム P450(17 $\alpha$ ), チトクロム P450<sub>arom</sub>

## 公開資料

などの酵素蛋白はCA1,CA3領域の錐体神経細胞とDG領域の顆粒神経細胞に局在していた。分子量は末梢の蛋白と同一であった。更に抗体の存在しない5 $\alpha$ -reductase, 17 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -HSDなどは、RT-PCRによる酵素のmRNAの同定を行ってその存在を見つけた。これ等の酵素の存在量は副腎皮質や精巣の500分の一程度と、予想どおり低かった。しかし体の内分泌器官と異なり、海馬では同一の神経内やごく近傍で局所的に働けば良いことを考えると、500分の一の量でも十分であると思われる。内分泌器官のようにステロイドを血液中に放出して標的細胞に到達させるという、内分泌機能を行う必要はないからである。

更に、中心的なステロイド合成酵素P450(17 $\alpha$ ), P450aromを、電子顕微鏡を用いて金コロイド免疫抗体染色像を観察することで調べた結果、CA1,CA3の錐体神経細胞とDGの顆粒神経細胞のシナプス部分に存在していることを発見した。これは、性ステロイドが記憶を貯蔵する神経シナプスで局所的に合成されることを鮮明に示している、重要な発見である。

### 【脳のエストロゲン受容体】

脳の神経細胞が性ホルモンを自前で合成しているので、ここに、エストロゲン受容体が存在することは論理的に予測できる。数十分以内で起こる早い記憶学習に影響を及ぼす女性ホルモンの作用部位は、神経膜か神経シナプスに存在するエストロゲン受容体であると予測して、研究を行った。海馬の神経はエストラジオールの作用を大きく受けるが、未だ世界的に、成獣ラットで海馬の神経細胞においてエストロゲン受容体が存在するという明確な証明がなかった。数少ないインターニューロンにかろうじてER $\alpha$ の抗体反応が認められるという報告が多い。これは視床下部や扁桃体などのように内分泌を司り、エストロゲン核受容体ER $\alpha$ が豊富に存在する神経細胞群と、記憶学習など高次機能をつかさどる海馬の神経細胞との大きな差だと思われてもいた。我々は、記憶機能において中心的役割を果たす、数の多いグルタミン酸神経細胞での存在を解析するため、苦難の研究を続けた。その結果、これまで世界中で使用されてきた著名なER $\alpha$ の抗体(例えばMC-20抗血清)は、不純抗体を多く含む抗血清として使用されており、卵巣や脳視床下部で染色すると67kDaのER $\alpha$ に反応するが、海馬・大脳皮質・小脳などのER $\alpha$ が極めて少ない部位では、ER $\alpha$ とうまく反応せず、未同定の蛋白に結合してしまうという事実を、Western BlotやER $\alpha$ KOマウスを用いて発見した。従ってこれまでに発表されている多くの論文は、海馬スライスの組織染色、免疫電子顕微鏡観察、単離した培養神経細胞などで、ER $\alpha$ の分布に関して深刻な間違いを含んでいる。この難問題に対して、エストロゲン受容体ER $\alpha$ の新しい高純度精製抗体RC-19を新たに作成することで(小南グループ、広島大学)、問題を解決できた。RC-19抗体を用いると、正しいエストロゲン受容体ER $\alpha$ が海馬神経シナプス膜分画や核内に存在することが示された。ER $\alpha$ はCA1-CA3の錐体神経細胞とDGの顆粒神経細胞に分布することが示された。電子顕微鏡による免疫金抗体染色の解析を行って、錐体神経細胞と顆粒神経細胞のシナプス前部・後部と核にER $\alpha$ が確かに局在していることを発見した。これは、エストラジオールと環境ホルモンが作用する受容体が神経シナプスに存在することを鮮明に示している。一方ER $\alpha$ のmRNAは、ラット成獣に於いて海馬に発現していて、新生児の半分くらいの十分な量が存在した。

### 【脳でのエストロゲン作用】

以上の結果、神経シナプスでのER $\alpha$ 受容体の存在が確定したので、神経シナプス伝達・記憶学習の環境ホルモンによる攪乱は、このシナプス局在ER $\alpha$ に環境ホルモンのビスフェノールA(BPA)やジエチルスチルベストロール(DES)などが作用する結果起こると想定して、電気生理やスパイン解析を行った。ところで、環境ホルモンは、体から入って、脳に移行する。ラットやサルに注入したBPAは、30分から1時間程度で脳血液関門を越えて脳内に移行することが、CREST内分泌の井口チームの研究などで確認されているからである。環境ホルモンの脳への到達時間は、体内の各臓器への到達時間とさして違いが無いようであり、到達する量も体内の臓器に比べて同じか数分の一程度であるらしい。脳内に入った環境ホルモンは、薬物代謝酵素が極めて少ないため、代謝されにくいと考えられ

る。これ等の結果から、我々人や哺乳動物の脳に、環境ホルモンが到達して作用することは現実に起こっていると考えてよいだろう。

電気生理解析は、女性ホルモンや環境ホルモンの記憶学習に対する急性効果（30分-1時間の効果）を測定する方法としては、最も高感度である。成獣ラット海馬スライスを用いて、CA1, CA3, DGの3領域で同時にNMDA刺激による長期抑圧LTDを多電極電気生理で測定した。エストラジオール, DES, BPAなどの急性効果を解析したところ、これらは、1-100 nMという低濃度でLTDを促進した。このLTD促進効果はER $\alpha$ のアゴニストPPTでも同様に得られたが、ER $\beta$ のアゴニストDPNでは抑制されたので、多分ER $\alpha$ を介した効果であろう。このように、環境ホルモンがナノモルの低濃度でシナプス伝達を攪乱する効果ははっきりと観測された。この結果は、過去に色々な測定系で発表されている「核受容体ER $\alpha$ を介する遺伝子発現作用効果で比較すると、エストラジオール1 nM程度と同じ影響を及ぼすには、BPAは1000-10000 nM程度も必要であり、BPAの女性ホルモン様作用は1万倍も弱い」、という報告とは非常に異なる。BPAは膜に効果的に溶け込むので、脳神経細胞のシナプス膜に急性的に作用する際には、体細胞での遺伝子転写を介する場合より作用効果が大きく、攪乱効果が格段に強いとも推測される。一方、ノニルフェノール(NP)はLTDを抑制し、トリブチルスズ(TBT)はLTDには何も目立った影響は与えなかった。このように環境ホルモンの種類によって、大きな差が得られ、LTD解析法は環境ホルモンの効果判定に大変有用であることを示せた。

環境ホルモンの影響を感度よく調べる、もう一つの方法として、神経スパイン（シナプス後部）の密度と形態を解析した。電気生理では、シナプスを形成する活性型の神経スパインしか測定できないが、この形態解析法では、シナプスを形成しない神経スパインも含んだ全てのスパインが解析できる。成獣海馬スライス中の単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして、個々のスパインを可視化する。その結果海馬スライスにエストラジオールを2時間作用させるだけで、CA1領域で全スパイン密度が増加し、特にthinスパインが選択的に増加することを発見した。エストラジオール, DES, BPA共に1-100 nMという低濃度で非常に良く似たスパイン増加効果を示した。更なる解析結果から、ER $\alpha$ アゴニストのPPTがエストラジオールと同じようなスパイン増加効果を示すことから、これらの作用はER $\alpha$ を介して行われていることを確認した。MAP Kinase, NMDA受容体をブロックするとこのエストラジオール効果は消失することなど、薬理的に情報伝達経路を解析した。ここで発見した、非常に早いスパイン変動は、業界の常識を覆す全く新しいものである。記憶場所の候補であるスパインが増加することは、環境ホルモンが外来性の神経成長因子として働くことを示している。

一方、ラット新生児の小脳神経細胞の発達解析を行い、プルキンエ神経細胞の発達に及ぼす、エストラジオール, OP, BPAの作用を解析した。これらを、数日間に渡り小脳の周りの脳脊髄液に注入し作用させた後、カルビンジン抗体で組織染色し、プルキンエ細胞の樹状突起の成長を解析したところ、エストラジオール, OP及びBPAは共に、プルキンエ神経細胞突起の発達を促進させることがわかった。電子顕微鏡解析により、スパインの数も増加させることがわかった。これ等の神経成長促進は、タモキシフェンを加えておくと阻害されたので、エストロゲン受容体を介した作用であることがわかった。

更にTBTに関しては海馬の女性ホルモン合成酵素mRNAに及ぼす影響も調べた。ラット新生児の培養海馬スライスをTBTで48時間処理すると、特に100 nMという低濃度でP450(17 $\alpha$ ), P450aromのmRNA量が選択的に約2倍に増加した。一方StAR, P450scc, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD, ER $\alpha$ のmRNA量は変化しなかった。つまりTBTは低濃度では海馬のエストラジオール合成活性を上昇させるのではないかという、攪乱効果が示唆された。

## 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

我々のチームは、生殖への影響を解析している他の多くの内分泌かく乱研究チームと目的を異にして、記憶学習の中枢である大脳の海馬で、神経伝達に対する女性ホルモンの作用を明らかにして、環境ホルモンがこの神経伝達を攪乱するかどうかに的を絞って研究することにした。従来の神経内分泌学の常識では、ステロイドホルモンは性腺や副腎皮質で合成されて、血流に乗って標的である脳に到達して作用する、というふうに理解されてきた。これに対して我々はこれまでの独自の研究結果から、(A) 記憶を司る海馬では独自にチトクロム P450 系が脳ニューロステロイドとして女性・男性ホルモンを合成している可能性がある、(B) 女性ホルモンは神経伝達や神経シナプス回路の配線を 1 時間ほどで急性的に変動させる可能性がある、ことを示す複数のデータを、つかんでいたもので、これを厳密に証明しようと考えた。そして(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用に攪乱を与えると考え、研究を開始した。この当時世界的に、グループの数は少ないが、ステロイドホルモンの急性的で non-genomic な作用の研究と、膜上のステロイド受容体探索の機運が盛り上がり国際会議も発足していたが、これを更に難しい高次脳機能と結びつけるという、野心的な構想であった。性腺から脳に到達するステロイドの生殖作用や、核のエストロゲン受容体を介した genomic な作用の研究の蓄積に比べれば、信頼できて利用できる報告の数は極めて少なく、周りからは、三振かホームランかという、成功確率の低い研究に思われたようである。このようなプロジェクト構想を支える既存の研究室は数少なかったもので、川戸グループを中心に小南・筒井グループという限られたグループで集中的に研究を行い、後半は川戸グループに一元化して、確かな成果を出すような体制をとった。

第一は合成研究であり、予備的なデータが集まっていたこともあり、海馬（川戸グループ）や小脳（筒井グループ）などで、独自のニューロステロイド合成経路を証明することに、集中した。小南グループはステロイド合成酵素の抗体作成やステロイド代謝酵素の解析を担当した。この結果、合成研究は 3 年以内でコレステロール→プレグネノロン→DHEA→テストステロン→エストラジオール系の合成と、それに関与する酵素群を確認し、更には、神経シナプスに P450(17 $\alpha$ ), P450arom が局在するということが発見して、神経シナプス分泌学という新しい概念を提唱するまでになった。

第二は作用研究で、海馬の神経シナプス膜にエストロゲン受容体が存在し、この受容体を經由して急性効果を発揮することを解析する、という方針を取ったが、当時受容体の候補など何もわからなかったもので、数年かかる予定で、プロゲステロンなど他の膜受容体探しも含めて、予備実験から始める方針を取った。まずは、過去のデータが比較的そろっていた電気生理解析やカルシウムイメージング解析に集中し、エストロゲンが海馬の長期抑圧 LTD や長期増強 LTP に本当に効いているのかを、徹底的に調べたが、再現性のあるデータを得るのは非常に困難であった。確かな効果が確認できなくて、また過去の発表論文は誤りを含んでいて信頼できないということがわかり、良い実験法を模索するという状況が 3 年間は続いた。エストロゲンや環境ホルモンが海馬の LTD を促進すること、更に LTP には効果が無いことを、確信できるようになったのは、やっとプロジェクトの 4 年目からである。新しい作用検出方法として準備していたシナプス・スパインの画像解析がやっと 4 年目から順調に進むようになり、最近 2 年間はエストロゲンや環境ホルモンが海馬の神経スパインを急性的に新生させる効果がきれいに見えるようになった。

海馬のグルタミン酸神経細胞にエストロゲンの核受容体を検出するという神経生化学研究は、難行を極めた。ER $\alpha$ , ER $\beta$  と異なる全く新しい受容体を探すという作業にも力を入れたが、これは最後までうまく行かなかった。エストロゲン受容体 ER $\alpha$  と部分的に類似だが、かなり異なる新しい 62kDa の ER-X 受容体を見つけたと喜んだこともあったが、これは全く異なる蛋白質であることが後に判明した。市販の抗体では実験の必要量がまかなえない

## 公開資料

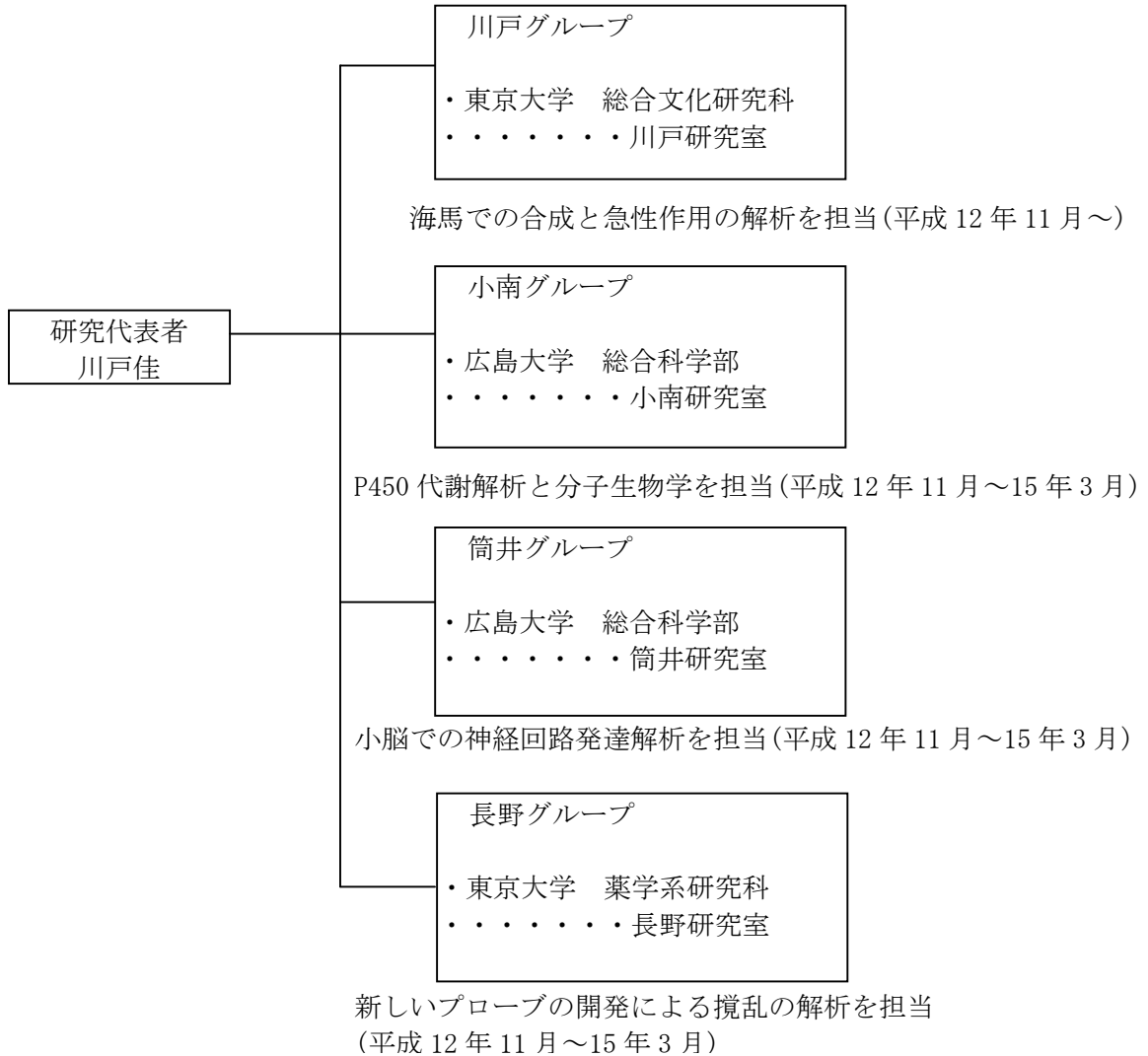
ために、小南グループが独自に作成した RC-19 という ER $\alpha$  の精製抗体を使用するにいたって、事態は急展開し、最後には 67kDa の ER $\alpha$  が海馬神経シナプスに局在するという予想外のことが判明した。これは核に存在する ER $\alpha$  と蛋白的に同一のものであった。BPA, DES の作用対象は ER $\alpha$  であると思われる。

小脳においては、プルキンエ神経の新生児期の発達を指標とすることで、エストロゲンや環境ホルモンの作用の研究を進めて、樹状突起やスパインに対する成長の促進効果を genomic 作用として捕らえることが出来た。これらは、新生児期に環境ホルモンが作用すると、単なる毒性効果ではなく成長促進というかく乱効果が起きる、ことを示す良い研究となった。更にこの過程はエストロゲン受容体を介したものであることを示すことも出来た。プルキンエ神経の樹状突起やスパインは、微細構造であるにもかかわらず、カルビンジン抗体でかなりきれいに染色されたことが、この研究が成功した要因である。一方、海馬神経の樹状突起やスパインを染色する抗体は存在しないので、単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして画像解析するという、大掛かりな方法の開発が必要であった。

また、平成 15 年度から、小南グループ及び筒井グループの独立グループ制をやめて、川戸グループ内で同じ目標で一体的に研究することで、より一層の研究の効率化と進展を図った。また長野グループは海馬の NO 合成酵素の検出プローブ作成を行ったが、NO 合成酵素はプロジェクトの主方向ではなくなったので、平成 15 年度から同グループを解消した。このように、携わった研究者にとっても、困難で忙しいプロジェクトであったが、研究方向は正しいという楽観的な信念があったので、プロジェクトは空中分解せず、目的を完遂できた。

# 公開資料

## (2)実施体制



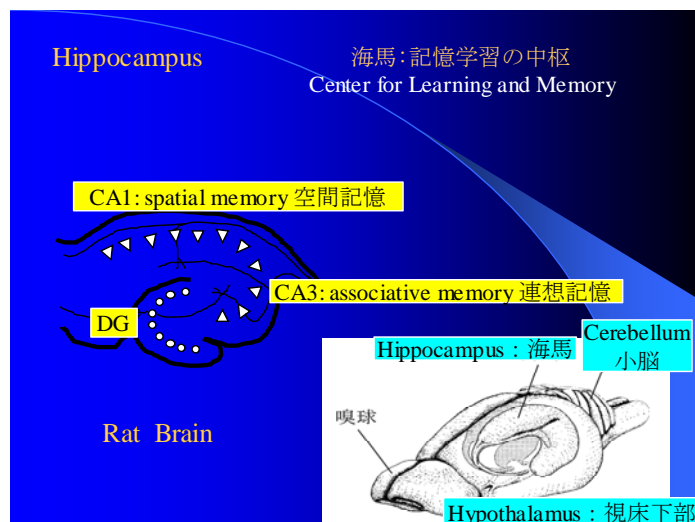
## 3 研究実施内容及び成果

### 3.1 海馬での合成と急性作用解析グループ（東京大学 川戸グループ）

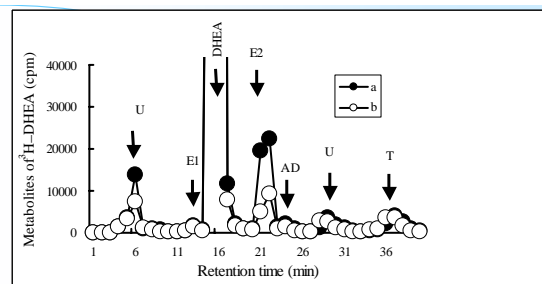
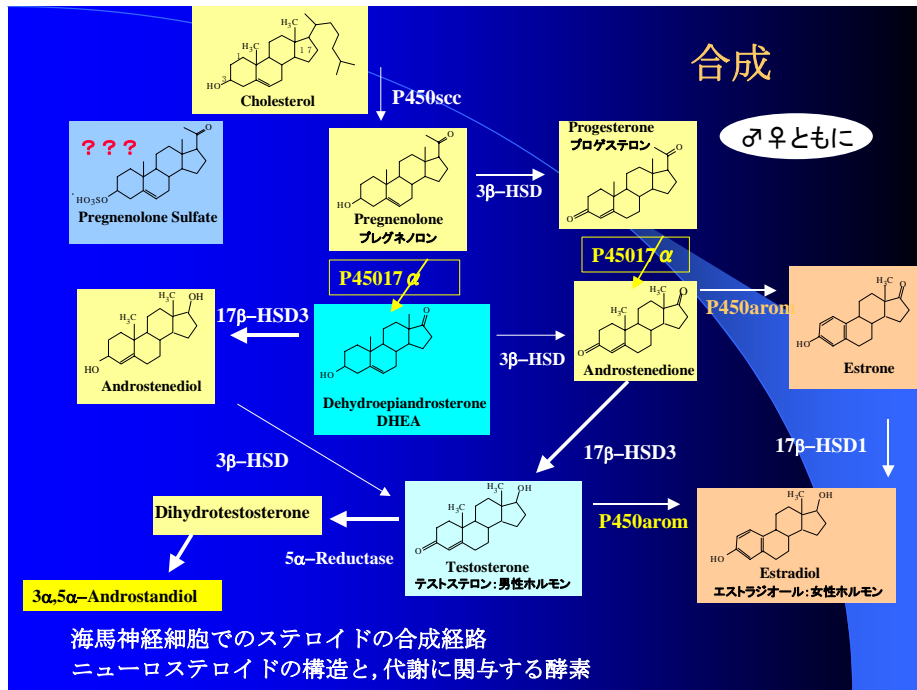
#### (1)研究実施内容及び成果

#### 1) 海馬の脳ニューロステロイド合成活性と、環境ホルモンによる攪乱解析

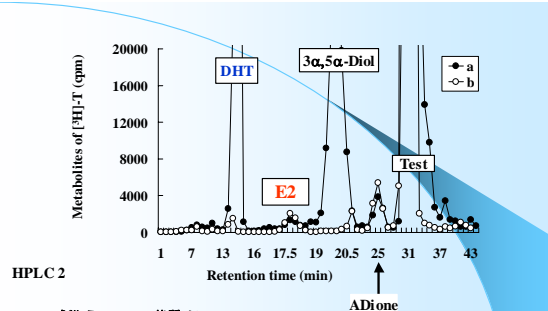
海馬ニューロステロイド合成系が女性ホルモンを合成している機構を調べる為に、成獣ラット脳より取り出した海馬スライスに、放射性ステロイド基質を添加して代謝解析を行った。5時間インキュベーションしたのち、代謝産物は、有機溶媒で抽出後、HPLCを用いて分離し解析した。コレステロール→[P450sc]→プレグネノロン→[P450(17 $\alpha$ )]→デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)→[17 $\beta$ -HSD(type 1,3)]→アンドロステンジオール→[3 $\beta$ -HSD(type 1,2)]（もしくは DHEA→[3 $\beta$ -HSD]→アンドロステンジオン→[17 $\beta$ -HSD]）→テストステロン→[P450arom]→エストラジオールという女性ホルモン合成経路を発見した。更に、テストステロン→[5 $\alpha$ -reductase]→ジヒドロテストステロン→[3 $\alpha$ -oxidoreductase]→3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -アンドロスタンジオール、という男性ホルモンの代謝経路を発見した。ここで [P450arom]などは触媒する酵素を表している。男性ホルモンの代謝経路はかなり早く働き、ジヒドロテストステロンは早く不活性化されるが、一方エストラジオールは不活性化されずに、安定に存在した。絶対濃度を測定するために、感度の低いRIA測定をやめて、感度の高いLC/MS/MSを用いて質量分析を行った。DHEA 0.3 nM, テストステロン 17 nM, ジヒドロテストステロン 約 0.1 nM, エストラジオール 4 nM というように海馬内の濃度が厳密に決定できた。血中からのステロイドの寄与を差し引く為に、♂ラットで精巣摘出を行い測定したが、テストステロンなどの血中濃度は顕著に低下したが、海馬内の濃度はそれほど変動しなかった。以上の性ホルモン合成活性には雄と雌の海馬に顕著な差がない。すなわち、雄も女性ホルモンを合成し、雌も男性ホルモンを合成する。海馬のような高次脳機能を司る器官では、雄雌の差は少ないのかもしれない。以上の結果はこの分野の長年の懸案を解決した重要な結果であり、半分以上の仕事は Proc.Natl.Acad. Sci (Hojo et al., 2004) を始め一流紙に掲載された(Kimoto et al., 2001; Kawato et al., 2002; Shibuya et al., 2003; Kawato et al., 2003; Kawato 2004; Mukai et al., 2005)。残り半分は論文投稿準備中である。





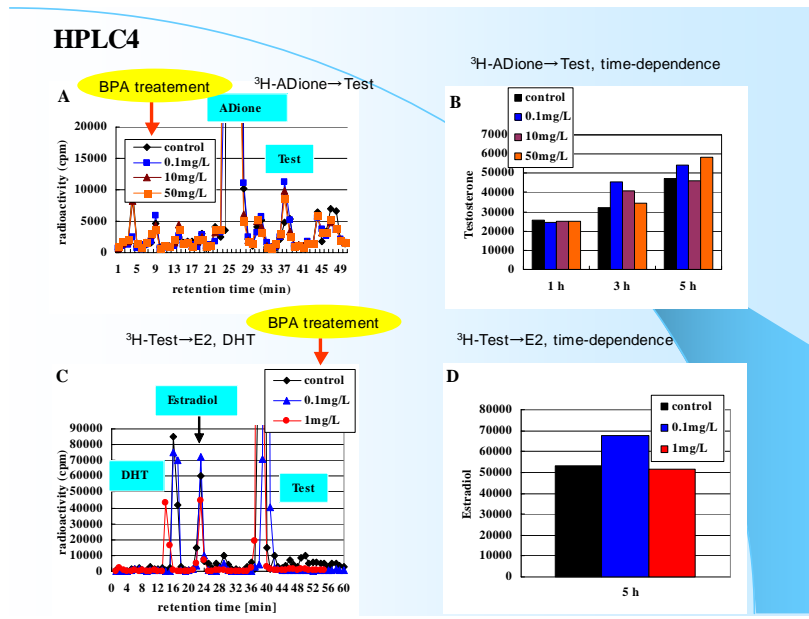


HPLC 1  
海馬スライスでは女性ホルモン合成 成獣♂  
基質を<sup>3</sup>H-DHEAとした時の代謝物。E2 (エストラジオール),  
AD (アンドロステンジオン), T (テストステロン),  
線aは<sup>3</sup>H-DHEAのみ、線bはP450arom阻害剤(adrozoole)存在下



HPLC 2  
成獣♂ 12w 基質は<sup>3</sup>H-Test  
男性ホルモン合成と消滅は早い、  
Finasterideで阻害  
女性ホルモン合成は遅い  
DHT (ジヒドロテストステロン), 3α,5α-Diol (androstenediol)

堤チームとの共同研究で、環境ホルモンによるステロイド合成の攪乱を解析した (Kawato 2004)。妊娠 11 日目から BPA を暴露した母ラットから生まれた仔ラットを用いて、神経発達が攪乱されたであろう海馬内での性ステロイド合成が、変動するかどうかを解析した。母親に与える BPA を 0.1,1,10,50 mg/L と変化させて、4 週齢の仔ラットの海馬で測定したところ、最も低濃度 0.1mg BPA 投与が一番効果が顕著であり、アンドロステンジオン (ADione)→テストステロン(Test)、テストステロン→エストラジオールの合成能が増加していた。

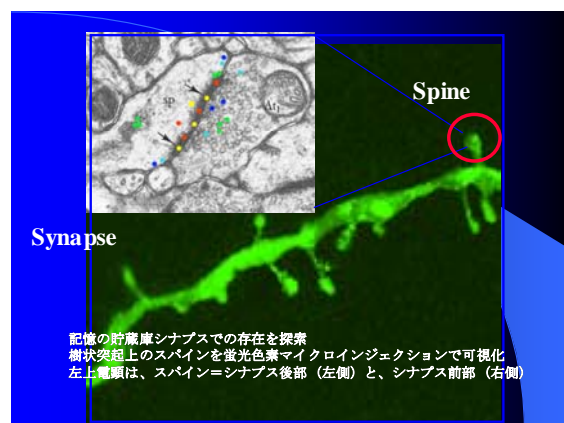
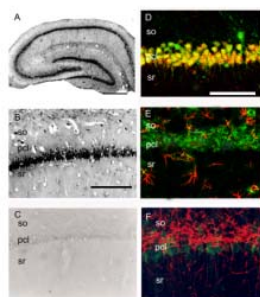


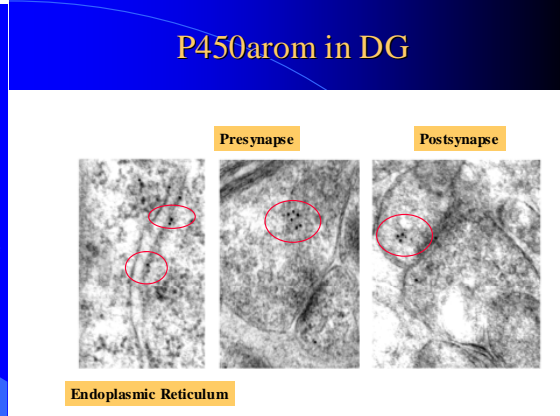
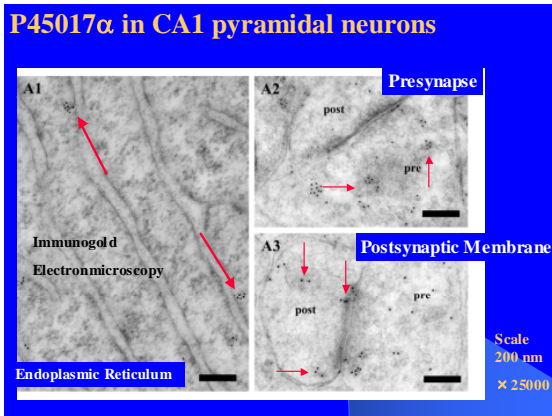
## 2) 海馬ニューロステロイド合成酵素系の神経局在の同定

ニューロステロイド酵素系の各蛋白質の抗体組織染色や Western Blot による同定を行った。StAR, チトクロム P450<sub>scc</sub>, チトクロム P450(17 $\alpha$ ), チトクロム P450<sub>arom</sub> などの酵素蛋白は CA1-CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞に局在していた。グリア細胞にはこれら蛋白質は少なかった。更に、合成酵素 P450(17 $\alpha$ ), P450<sub>arom</sub> が神経細胞のどの部分にあるのかを、電子顕微鏡を用いて金コロイド免疫抗体染色像を観察することで調べた結果、CA1-CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞のシナプス部分 (シナプス前部とシナプス後部の両方) に存在していることを発見した。もちろん endoplasmic reticulum にも存在した。これは、性ステロイドが、細胞体のみならず、記憶を貯蔵する神経シナプスでも局所的に合成されることを鮮明に示しているの、重要な発見である。これらの仕事は Proc.Natl.Acad. Sci (Hojo et al., 2004) を始め一流紙に掲載された(Kimoto et al., 2001; Kawato et al., 2002; Shibuya et al., 2003; Kawato et al., 2003; Kawato 2004; Mukai et al., 2005)。

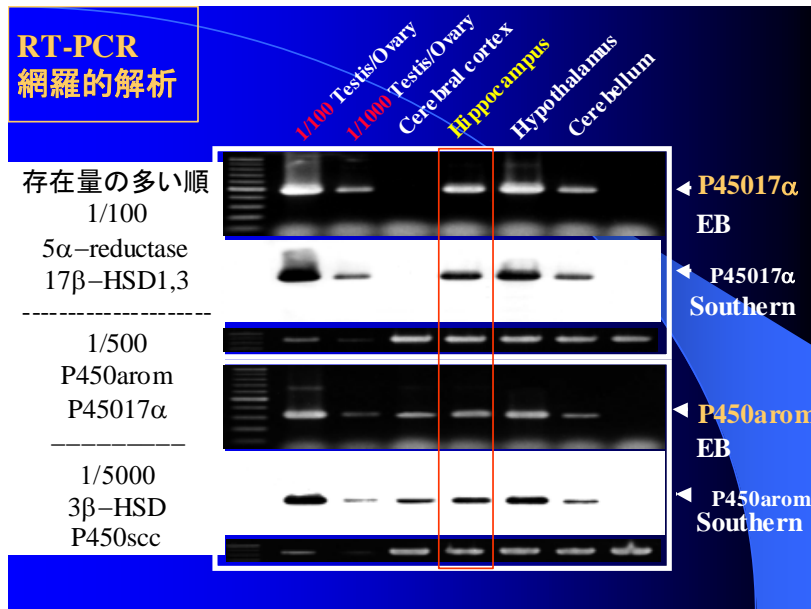
**P45017 $\alpha$**   
**Immunostaining**

A, Whole hippocampus  
B, CA1  
C, preadsorption  
D, 17 $\alpha$  (green)+NeuN  
E, Astroglia (red)  
F, Oligodendroglia (red)  
Oregon-Green 488 & Cy3  
神経細胞に局在





抗体が存在しない 5 $\alpha$ -reductase, 3 $\alpha$ -oxidoreductase, 17 $\beta$ -HSD type 1,3,4, 3 $\beta$ -HSD などに関しては、RT-PCR による酵素の mRNA の同定を網羅的に行った。これらの mRNA の存在量は副腎皮質や精巣の 2/100~1/500~1/5000 の範囲にあり随分少量である。しかし海馬で合成されて海馬内で局所的に働くことを考えると、十分な量であると思われる。



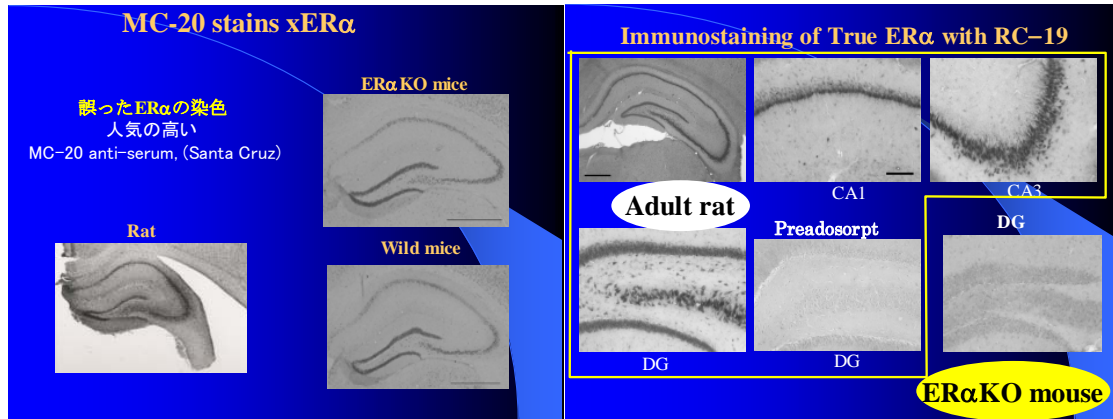
### 3) エストロゲン受容体の神経シナプス局在の同定

海馬の神経はエストロゲンの作用を大きく受けるが、未だ世界的に、海馬の主要なグルタミン酸作動性の神経細胞（錐体細胞や顆粒細胞）にはエストロゲン受容体が存在するという明確な証明がなかった。核内受容体としての ER $\alpha$ すら見つかっていなかった。我々は、世界中で使用されている ER $\alpha$ の著名な抗体とされている MC-20 抗血清は、不純抗体を多く含む抗血清で、卵巣や脳視床下部で染色すると 67 kDa の ER $\alpha$ に反応するが、海馬・大脳皮質・小脳などの ER $\alpha$ が極めて少ない部位では、ER $\alpha$ とうまく反応せず、62 kDa などの未同定の蛋白に結合してしまうことを、Western Blot で発見した。ER $\alpha$ KOマウスを用いた実験でも、MC-20 は62 kDa 蛋白と反応し、海馬の組織染色は Wild マウスとER $\alpha$ KOマウスで差が無いという奇妙な結果が得られた。従ってこれまで発表されている多くの論文は、海馬スライスでの組織染色、免疫電子顕微鏡観察、単離した培養神経細胞の染色に関して深刻な間違いを含んでいる。MC-20 抗血清は卵巣などの内分泌器官では、正しく ER $\alpha$ に反

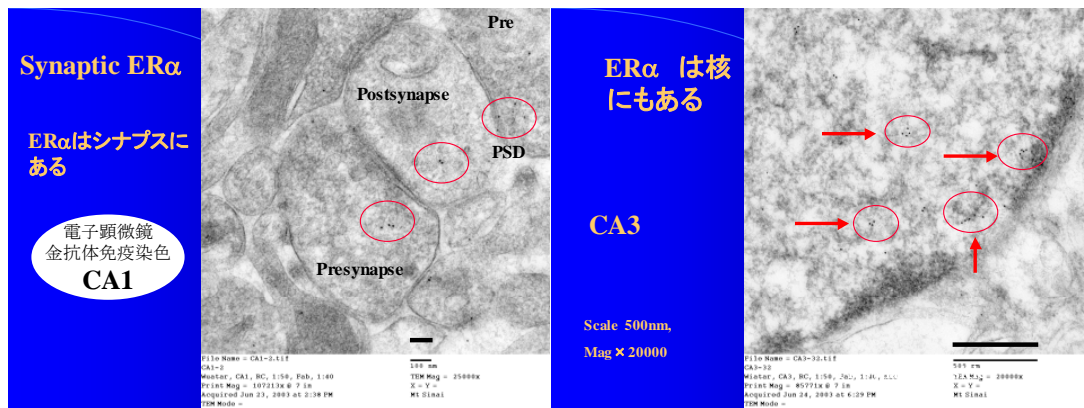
# 公開資料

応るので、このような問題は、ER $\alpha$ が極端に少ない脳に特有の問題だと思われる。

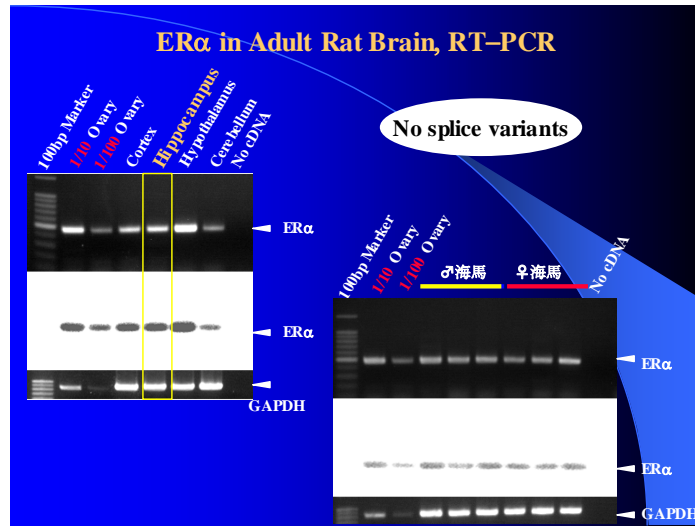
この難問題に対して、エストロゲン受容体 ER $\alpha$ の新しい高純度精製抗体 RC-19 を新たに作成して（小南グループが開発）、問題を解決することが出来た。RC-19 抗体を用いて、海馬スライスの組織染色観察を行い、ER $\alpha$ が CA1-CA3 の錐体神経細胞と DG の顆粒神経細胞に分布することを示した。ER $\alpha$ KOマウスでは RC-19 の抗体反応は確かに無い。グリア細胞は ER $\alpha$ が非常に少ない。



神経シナプスでの ER $\alpha$ の局在を蛋白質サイズの分解能で解析するため、電子顕微鏡による免疫金抗体染色の解析を行い、錐体神経細胞と顆粒神経細胞のシナプス前部・後部に ER $\alpha$ が局在していることを発見した。同じ ER $\alpha$ は核にも確かに存在していた。



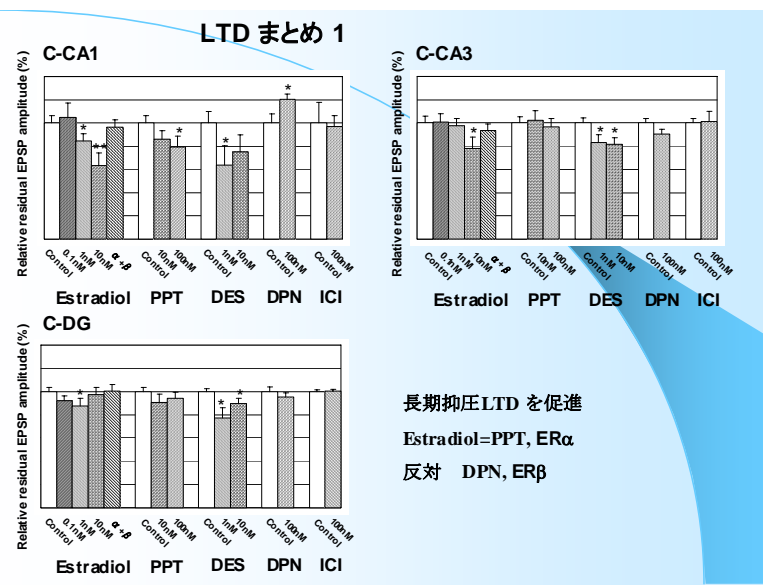
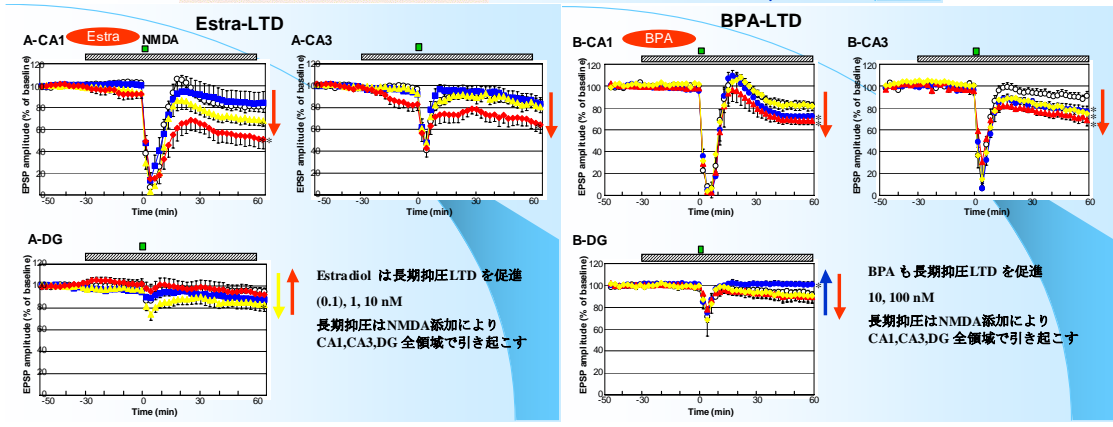
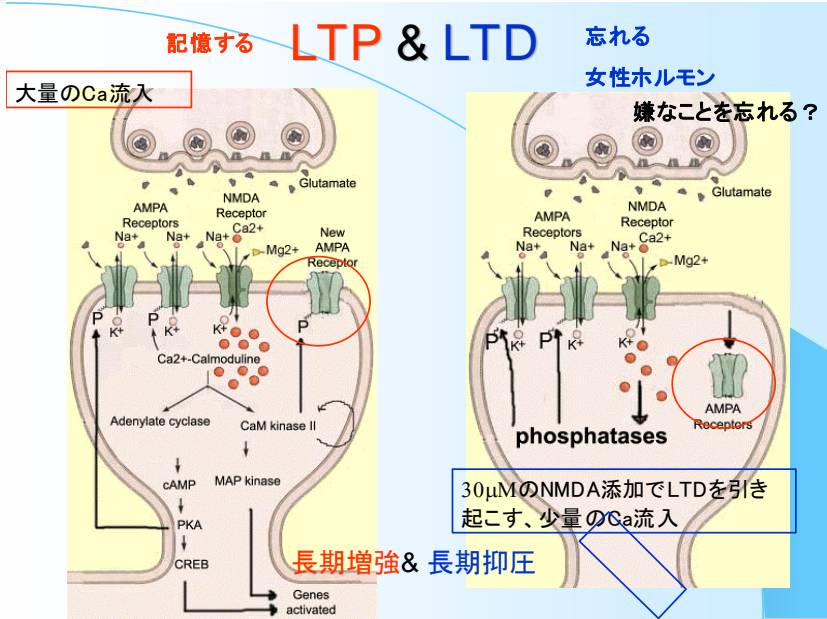
更に、密度勾配遠心で厳密に精製したシナプスや細胞質や核の画分に対して、Western Blot を行うことで、同一のエストロゲン受容体 ER $\alpha$  (67kDa) が海馬神経シナプス膜画分（特に Postsynaptic Density, PSD 画分）と核内及び細胞質に存在することが、きれいに示された。これは、エストラジオールと環境ホルモンが神経シナプスで局所的に作用出来ることを強く示唆している。RT-PCR 解析を行うと、ER $\alpha$ の mRNA は、ラット成獣に於いて海馬に発現していた（4週齢卵巣の約 150 分の 1）。♂♀の性差は特になかった。ER $\alpha$ の mRNA のスプライスバリエーションの探索を、各構成エクソンごとに徹底的に行ったが、全長 mRNA 以外にはスプライスバリエーションは存在しなかった。以上の結果は、長年にわたり謎とされてきた、海馬神経細胞へのエストラジオール作用を解明する大きな一歩となる。神経シナプスでの ER $\alpha$ 受容体の存在が確定することで、神経シナプス伝達・記憶学習の環境ホルモンによる攪乱を分子論的に論じることがはじめて可能になった。これ等の結果をまとめた論文は現在審査中である。著名な国際会議では招待講演などで発表している(Mukai et al., 2004;; Tsurugizawa et al., 2005)。

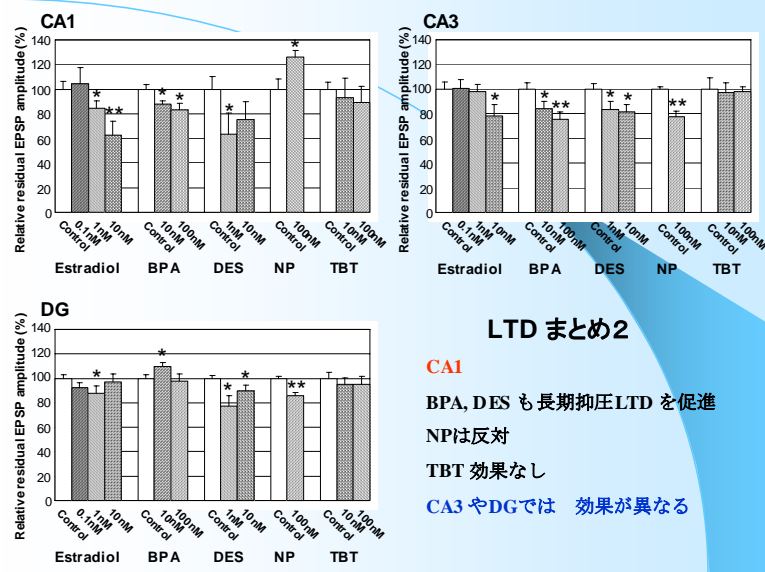


#### 4) 電気生理による海馬長期抑圧に対する影響で環境ホルモンの急性効果を解析

電気生理はニューロステロイドの記憶学習の短期効果を測定する方法としては、最も高感度である。ラット海馬スライスを用いて、NMDA 刺激による CA1,CA3,DG の3領域で同時に長期抑圧 LTD (記憶を忘れる過程) を測定できる多電極法を開発して、17β-エストラジオール, BPA, DES, ノニルフェノール(NP), オクチルフェノール(OP), TBT の急性効果 (30分間の灌流で作用させた効果) を解析した。1-10 nM エストラジオール, 1-10 nM DES, 100 nM BPA は、この低濃度で共に LTD を促進した。但し LTD 促進は CA1 で一番顕著であり、CA3 と DG は効果が小さかった。これらの効果は ERα の阻害剤 17α-エストラジオールで阻害された。以上の実験結果は、環境ホルモンのシナプス伝達への攪乱効果をはっきりと存在することを示している。また、ERα アゴニストの PPT はエストラジオールと同じ LTD 促進効果を示すが、ERβ アゴニストの DNP は正反対の LTD 抑制効果を示すことがわかり、BPA, DES の作用は ERα を介して行われていると思われる。これに対し NP は LTD を阻害したので、ERβ 型作用のように見える。TBT は LTD に全く影響しなかったが、これは RXR 受容体を介した急性作用が無いことを意味しているのかもしれない。このように、LTD に対する影響を調べることで、環境ホルモン間の差異を明瞭に判定することが出来ることが示された。

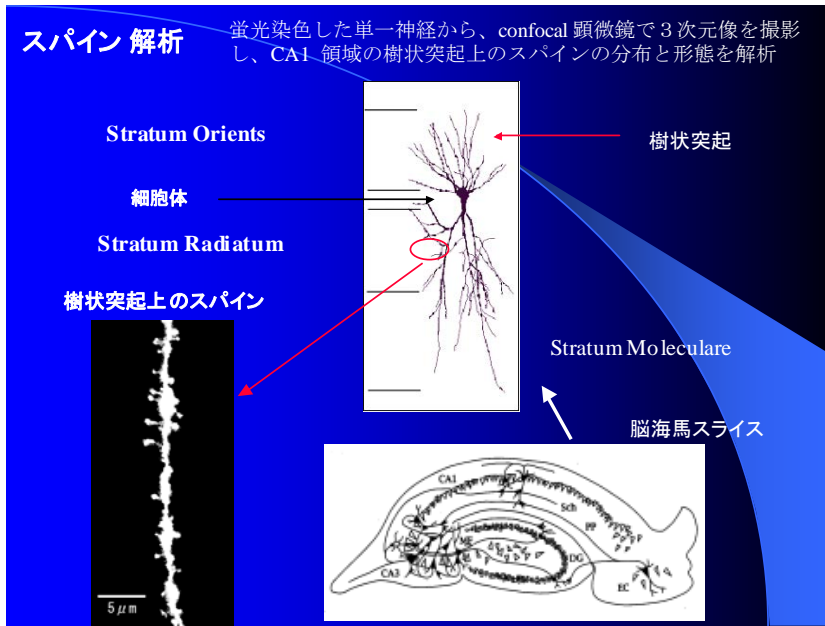
一方、長期増強 LTP (記憶をする過程) に対するエストラジオール, PPT, DPN の効果も測定したが、LTP に対する効果は全く無かった。LTP に対するエストラジオールの効果は世界中で多くの論文が発表されており、且つ、促進と抑制の正反対の結果が発表されているので、慎重に再現性を検討する実験を行った。その過程で LTP に対する効果が出る場面に何度も出くわしたが、最後にはこれは海馬スライスの状況に強く依存するもので、アーチファクトであるという結論に達した。これ等の結果をまとめた論文は現在審査中である。また著名な国際会議で招待講演などで発表している(Kawato and Takata, 2003; Mukai et al., 2004; Tsurugizawa et al., 2005)。



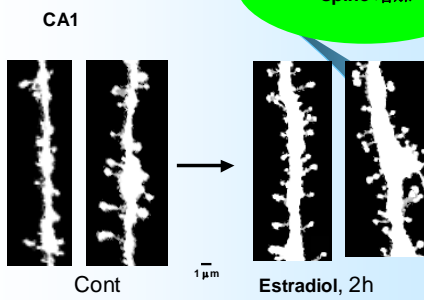


### 5) スパイン密度・形態変化による海馬神経細胞での急性効果の解析

海馬神経のスパイン（シナプス後部）はエストラジオールの作用を大きく受けることがわかった。海馬スライス中の単一神経に蛍光色素をマイクロインジェクションして、CA1, CA3 など個々のスパインを可視化する方法を確立した。海馬スライスにエストラジオールを 120 分作用させるだけで、CA1 のスパイン密度が増加し、形状が変化することを発見した。これはスパインのタイプ（mushroom、thin、stubby、filopodium）のうち、頭部が比較的小さく、首の長い thin スパインが選択的に増加することによる。1 -10 nM エストラジオール、1-10 nM DES、10-100 nM BPA で非常に良く似た効果が認められた。情報伝達経路は解析中であるが、NMDA 受容体（阻害剤は MK-801）、MAP Kinase（阻害剤は PD98059）を阻害すると、このエストラジオール効果は消滅することなどから、スパイン内に Ca が必要で、MAP Kinase 経路が働いていることが示された。また、ER $\alpha$  アゴニストの PPT は 17 $\beta$ -エストラジオールと同じスパイン増加効果を示すが、ER $\beta$  アゴニストの DNP はほとんど効果が無いことから、BPA、DES の作用は ER $\alpha$  を介して行われていることを確認した。一方 CA3 ではエストラジオールはスパイン（CA3 では thorn と呼ぶ）密度を大きく下げることを見出したので、エストラジオールや環境ホルモンの効果は、領域や神経回路の違いで異なることに注意しないといけない。この非常に早いスパイン変動は業界の常識を覆す全く新しいもので、これ等の結果をまとめた論文は発表済のものと現在審査中のものが複数ある (Komatsuzaki et al., 2005; Tsurugizawa et al., 2005)。

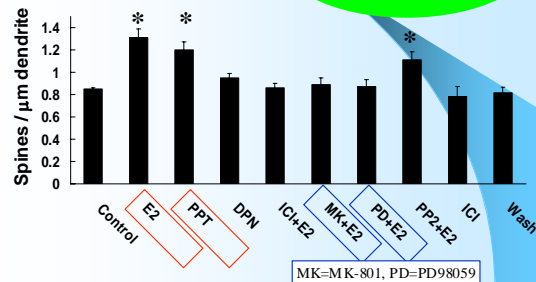


E2スパイン1



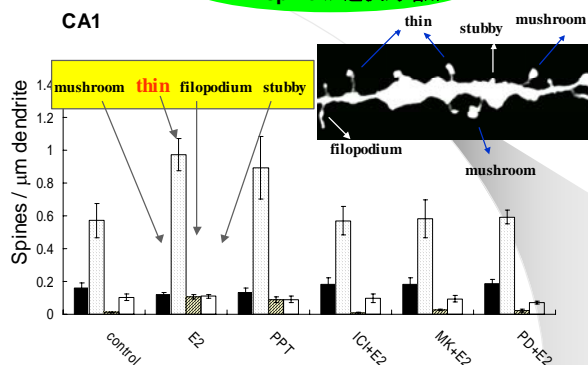
2時間 Estradiol 作用 spine 増加

E2スパイン2

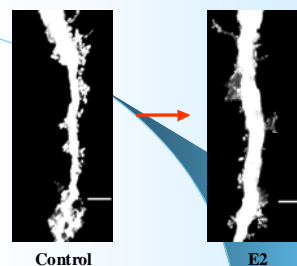


2時間 Estradiol 作用 spine 増加1.5倍

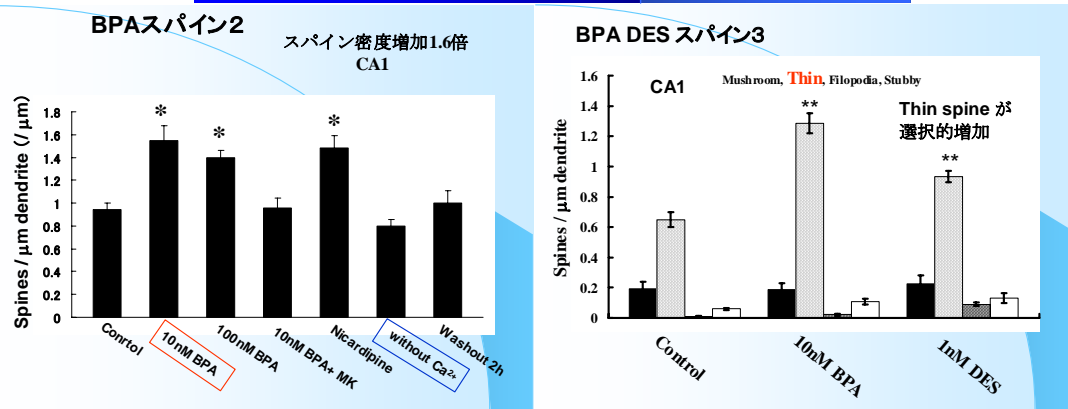
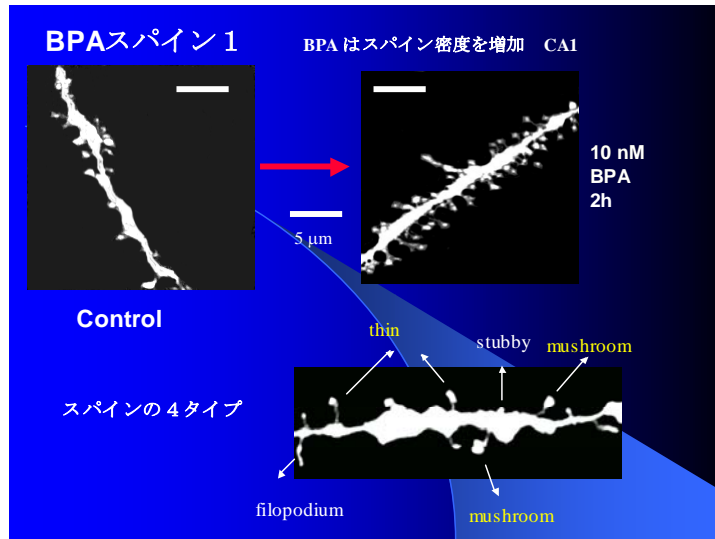
E2スパイン3



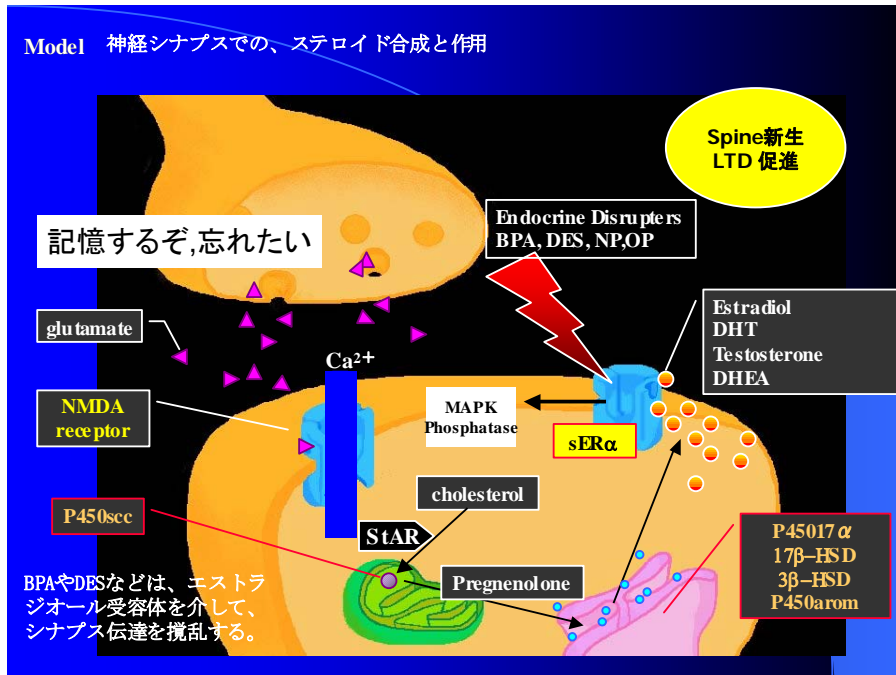
E2スパイン4







以上得られた結果を、わかりやすく説明する図を以下に示す。「記憶するぞ」と努力すると、大量のCaがスパイン(シナプス後部)に流入して、StARを駆動して脳ニューロステロイドの合成が始まる。「忘れたい」と努力すると、少量のCaがスパインに流入する。これも脳ニューロステロイドの合成を促進する。合成されたエストラジオールなどは、シナプス膜にある受容体に作用して、長期抑制を促進したり、スパインの新生を引き起こす。同じ神経で合成されて→作用するので、神経シナプス分泌機構である。このエストロゲン作用を、環境ホルモンであるBPA, DES, NP(多分OPも)がさまざまに攪乱する。もちろん細胞体内でも合成は起こっているし、核のエストロゲン受容体を経由した遺伝子転写作用も引き起こされるが、これは時間が12-24時間と、長くかかる作用であり、発現する現象も、本研究で観測したものとはずいぶん異なるであろう。



(2)研究成果の今後期待される効果

以上の研究結果から、従来の神経内分泌学の枠内に入らない、神経シナプス分泌学という新しい方法論が立ち上がった。この方法論によって、「(A) 記憶を司る海馬は独自にチトクロム P450 系が女性・男性ホルモンを合成し、(B) エストロジオールは、神経シナプス膜上に局在するエストロゲン受容体 ERαなどの作用し、神経伝達や神経シナプス回路の配線を1時間ほどで急性的に変動させる。(C) 環境ホルモンはこのような女性ホルモン作用に、1時間ほどで攪乱を与える。」というような現象が、無理なく説明できる。今後、脳神経が合成する男性ホルモンの作用も、神経シナプス分泌学的に、解明しようとしている。また、エストロゲン受容体の下流の信号伝達系に関する研究も活発に展開されていくであろう。実際、エストロジオールや環境ホルモンの引き起こす急性的なリン酸化カスケードを含む急性効果は、体の内分泌細胞や血管内皮細胞においても引き起こされることなど、梅澤チームや海外の研究グループによって、活発に研究報告がなされており、今後このような分子メカニズムの深い解析が進んでゆくはずである。脳が合成する性ホルモンは、新しい神経成長因子のスーパーファミリーであり、現在 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) しか考えていない脳の神経栄養因子分野の研究を、革新するであろう。また、神経シナプスに存在するステロイド受容体はなにも ERαに限られてはいなくて、今後多くのシナプスに存在するステロイド受容体 (ERβ, AR など) が発見されて、ステロイド信号伝達の研究が、「核受容体と転写作用」という伝統的な研究から脱して、一大発展が起こると予想される。我々は、その先頭に立ってゆきたいものである。社会的に見ると本研究は、疑わしい環境化学物質が、脳の機能を攪乱するかどうかの判定を行う方法論を提供出来た他に、「女性ホルモン摂取によるアルツハイマー型痴呆の治療 (ホルモン補充療法) で、どうして海馬の記憶活性が改善するのか」、「うつ病の患者が女性ホルモン補充療法で、うつ状態が改善するのはなぜか」などの疑問に、神経科学的に分子メカニズムで答えることが出来る可能性が出てきたと考えられる。また、この研究過程で海外出願も含めて複数の特許を申請することが出来て、成果の社会的還元も行いつつある。

## 3. 2 P450 代謝解析と分子生物学 (広島大学 小南グループ) (1)研究実施内容及び成果

本グループは、環境ホルモン（主に有機スズ化合物）が脳内女性ホルモン合成に関与する酵素に及ぼす影響の解析を行った。環境ホルモン物質が女性ホルモンの生理作用を攪乱する場合、いくつかの攪乱メカニズムが考えられる。例えば女性ホルモン受容体に環境ホルモン物質が結合し、アゴニスト、またはアンタゴニストとしてその作用を攪乱する場合がある。一方、別のメカニズムとして、環境ホルモン物質が女性ホルモンの生合成を阻害、または活性化してその生理作用を攪乱する場合があります。我々はこちらの攪乱メカニズムに着目し、環境ホルモンによる脳内の女性ホルモン生合成の攪乱作用の解析を行った。脳は女性ホルモンであるエストロゲンをニューロステロイドとして合成するが、その合成活性は低く、環境ホルモンによる生合成の攪乱作用を定量的に測定するのは容易ではない。副腎皮質では、脳内でニューロステロイドを合成している酵素と同じ分子種がステロイドホルモンを合成しており、しかも活性が高く、容易にその変化を測定できる。そこでまず副腎皮質の培養細胞を用いてステロイド合成に影響を与える環境ホルモン物質とその作用メカニズムを明らかにし、ついでその物質による脳のエストロゲン合成への影響を解析した。また、脳内でのエストロゲンの作用対象の一つである一酸化窒素合成酵素に対する環境ホルモン物質の影響も調べた。

### 1) 環境ホルモン物質による副腎皮質ステロイドホルモン生合成の攪乱機構

副腎皮質が分泌する主要ホルモンであるコルチゾルの生合成を阻害する環境ホルモン物質を検索した。ウシの副腎皮質細胞の初代培養を使用した。日本国内で環境濃度が比較的高いと推定された環境ホルモン物質を、培養細胞に様々な濃度で添加して24時間作用させた。培地を交換し、同じ濃度の環境ホルモン物質と共に1nM ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）を添加してさらに24時間培養した。すなわち環境ホルモン物質を計48時間作用させたことになる。培地に分泌されたコルチゾルをHPLCで定量した。コルチゾル分泌を50%阻害した環境ホルモン物質の濃度を表1にまとめた。この表には、水棲の野生動物体内で検出されたこれらの物質の濃度も示してある。野生生物の体内に存在する濃度以下でステロイド合成を阻害したのは、フェニトロチオン、トリブチルスズ (TBT)、トリフェニルスズ、ジブチルスズ、ノニルフェノールであった (Derbalah, AS et al., *Geochem. J.*, 2004)。これらの物質のうち、TBTは血液脳関門を容易に通過して脳内に蓄積する傾向が強く、さらに日本人の体内からかなりの濃度が検出されている。TBTは海産の巻貝にインポセックスを引き起こす環境ホルモン物質であり、高濃度のTBTは哺乳類の培養細胞にアポトーシスを引き起こし、免疫系などに影響を与える。しかし、細胞毒性が出ない範囲の低濃度のTBTがステロイドホルモン合成に与える影響は良くわかっていない。よってこの研究ではTBTの作用機構を詳しく調べた。表1にウシ副腎皮質のコルチゾル合成を50%阻害する環境ホルモン物質の濃度(IC<sub>50</sub>)と、野生生物の体内で検出されたそれらの物質の濃度を比較した。

Chemicals	IC <sub>50</sub> (μM) (±SD)	Concentrations in wild animals (mol/kg wet wt)
<i>p,p'</i> -DDD	15 ± 4	0.0004-0.06
1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane dimethoate	12 ± 3	0.003-0.09
phenitrothion	32 ± 6	<0.001
di(2-ethylhexyl)adipate	30 ± 5	235
di(2-ethylhexyl)phtalate	82 ± 9	0.02-0.3
bisphenol A	110 ± 15	0.4-2.9
4-nonylphenol	12 ± 3	0.07-0.9
tri-n-butyltin chloride (TBT)	1.0 ± 0.2	0.7-6
tri-n-phenyltin chloride	0.03 ± 0.01	0.1-11
di-n-butyltin dichloride	0.03 ± 0.018	0.01-0.5
mono-n-butyltin trichloride	0.03 ± 0.012	0.1-23
	90 ± 30	0.1-11

コルチゾル合成が阻害されたということは、ステロイドホルモン合成に関与する酵素の活性が低下したと考えられる。酵素活性低下のメカニズムとして、TBT が酵素に結合し、直接阻害する機構も考えられる。そこで新鮮副腎からミトコンドリアと小胞体を調製し、TBT の存在下でステロイド合成系の酵素である P450 や 3β-HSD の活性を測定した。これらの酵素活性は 10 μM 以上の TBT によって強く阻害された。しかしこの濃度の TBT が存在すると、細胞毒性によって培養細胞は死滅する。ステロイドホルモン合成は nM レベルの TBT で阻害されることから、TBT による培養細胞のステロイド合成阻害機構は、酵素活性の直接阻害ではない。次に、ウシ副腎の培養細胞に 1–1000 nM TBT を作用させ、細胞内のステロイド合成酵素の酵素活性、酵素量、その mRNA 量を調べた。酵素活性は、生成したステロイドを HPLC で定量して求め、酵素量はウエスタンブロッティング、mRNA 量は real-time RT-PCR で定量した。30-100 nM の TBT は副腎において、ステロイド合成酵素のうち P450(17α), P450(C21), P450(11β)の活性を強く阻害した。その活性低下は酵素蛋白質量の減少と良く一致しており、蛋白質の量の変化(図1)はその mRNA 量の変化(図2)と一致していた。すなわち TBT はウシ副腎の培養細胞において、ステロイド合成酵素のうちの3種の P450 の転写を特異的に阻害し、その結果これらの酵素量と活性が減少して副腎皮質ステロイドホルモンの合成を阻害することが明らかとなった(Yamazaki et al., 2005)。

Effect of Tributyltin (100 nM) on Protein Contents

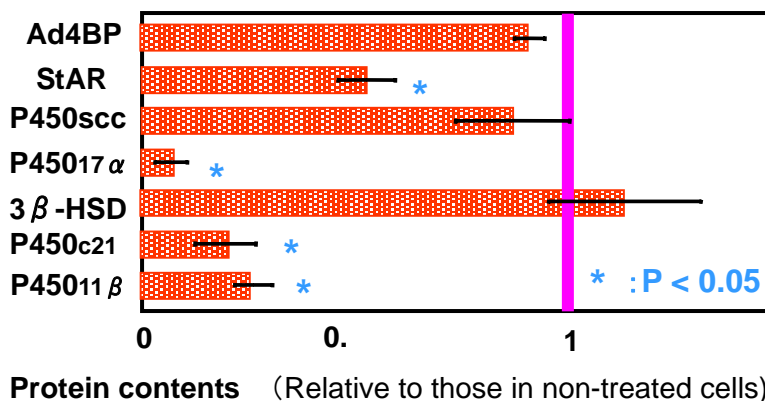


図1 ウシの副腎皮質培養細胞のステロイドホルモン合成酵素量に対する 100 nM TBT の影響 酵素量はウエスタンブロッティングで定量

Effect of Tributyltin (100 nM) on mRNA Contents

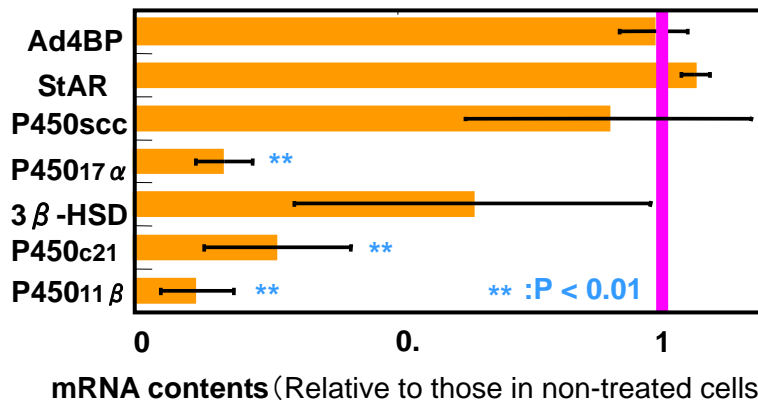


図2 ウシの副腎皮質培養細胞のステロイドホルモン合成酵素 mRNA 量に対する 100 nM TBT の影響。 mRNA 量は real-time RT-PCR で定量した。このように、TBT は野生生物の体内で、ステロイドホルモン合成に関与する一部の酵素の mRNA 量を減少させ、ステロイド合成を攪乱する可能性があることを明らかにした。

2) トリブチルスズによるラット海馬ニューロステロイド合成系酵素およびエストロゲン受容体 mRNA 量の変動の解析

エストロゲン合成系酵素の mRNA 量に対する TBT の影響及びエストロゲン受容体 $\alpha$ ,  $\beta$ の mRNA 量に対する TBT の影響も調べた。10 日齢ラットの海馬を摘出し、エストロゲン合成系酵素の各 mRNA 量を real-time RT-PCR で定量した (図3)。これらの mRNA 量は副腎の千分の一から 50 万分の一であり、川戸グループの測定結果と一致している。副腎の細胞はそのほとんどが高いステロイドホルモン合成活性を持つので大量の mRNA を発現しているのに対し、海馬でのステロイド合成活性は一部の神経細胞に局在しており、その細胞のニューロステロイド合成活性も高くない。また、測定したニューロステロイド合成系酵素のうち最も発現量が少なかったのは P450(17 $\alpha$ )であった。2 種類のエストロゲン受容体(ER)に関しては、ER $\alpha$ の mRNA 量は ER $\beta$ の約 2 倍であった。

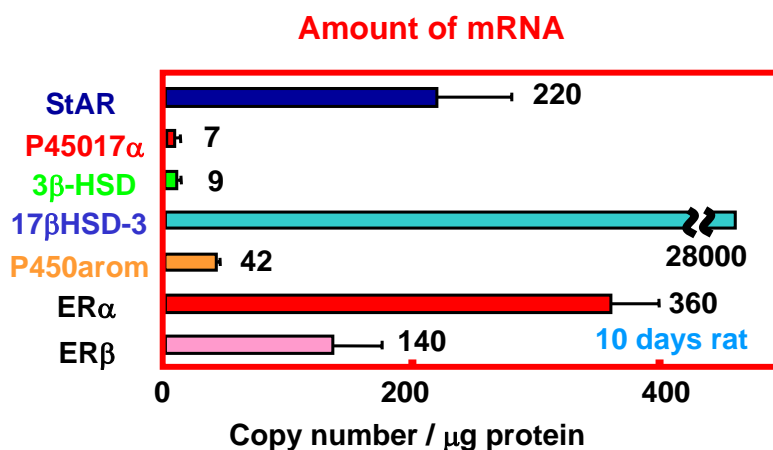


図3 ラット海馬のエストロゲン合成系の酵素とエストロゲン受容体 mRNA

10 日齢ラットの海馬を摘出し、300  $\mu$  m 厚のスライスを調製して組織培養を行った。培養一日後から 48 時間、様々な濃度のトリブチルスズを作用させ、エストロゲン合成系酵素の

## 公開資料

mRNA 量の変化を測定した。その結果、10nM 以下の TBT は各酵素に顕著な影響を示さなかったが、100nM の TBT 処理では P450(17 $\alpha$ ), P450arom の mRNA 量がそれぞれ約 1.5 倍、2 倍に増加した (図 4)。1  $\mu$ M TBT では P450(17 $\alpha$ ) の mRNA 量は激減し、3 $\beta$ -HSD mRNA 量は約 2 倍に増加した (図 5)。3  $\mu$ M 以上の TBT では細胞毒性が見られ、回収された全 RNA 量が顕著に低下した。海馬でのステロイド合成に関与する酵素の活性も、副腎と同様に mRNA 量の変化を追従して変化すると仮定すると、100 nM の TBT は P450(17 $\alpha$ ), と P450arom の活性を増加させ、1  $\mu$ M TBT は P450(17 $\alpha$ ) 活性を消失させると予想される。図 3 に示したように、エストロゲン合成酵素のうち mRNA 量が最も少ないのは P450(17 $\alpha$ ) であり、この酵素がエストロゲン合成反応を律速している可能性が高い。よってこの結果は、100 nM の TBT がエストロゲン合成能力を増強し、1  $\mu$ M の TBT は低下させることを示唆している。

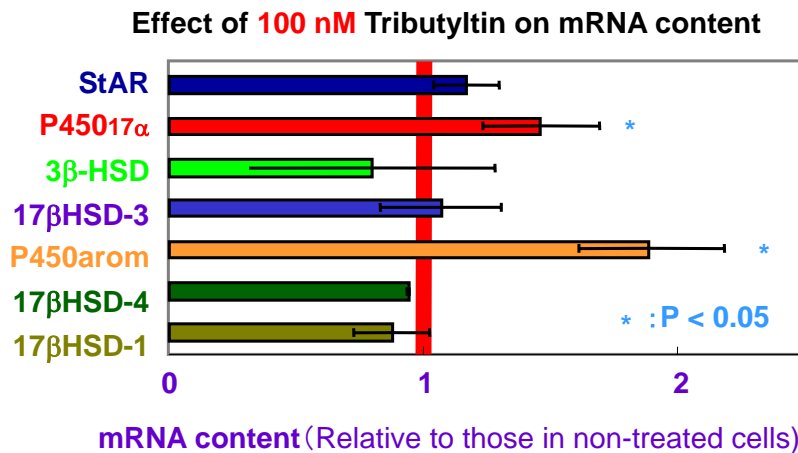


図 4 海馬のエストロゲン合成酵素の mRNA 量に対する TBT (100 nM) の影響。海馬スライスに 48 時間 TBT 存在下で培養し、TBT 処理していない海馬の mRNA 量と比較。縦の赤線は、影響が無い (相対値 1) 場合。

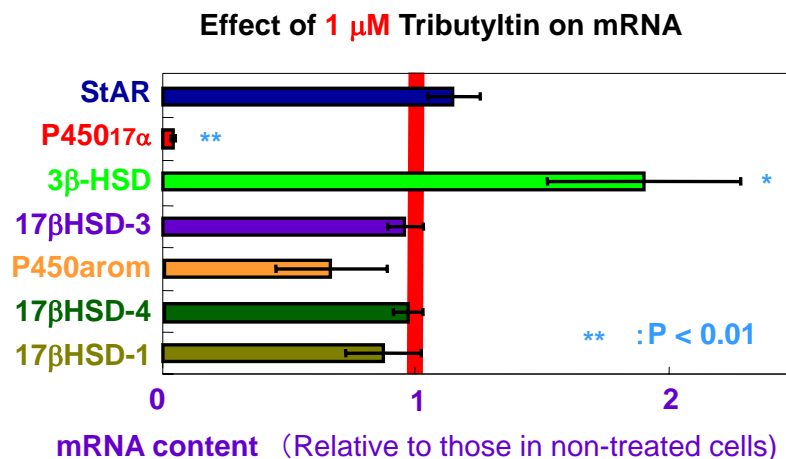


図 5 海馬スライス中のエストロゲン合成酵素 mRNA 量に対する TBT (1  $\mu$ M) の影響。48 時間培養し、TBT 処理と未処理の mRNA 量を比較。縦の赤線は、影響が無い場合。

TBT はレチノイド X 受容体、RXR $\alpha$  に強く結合することが知られている。上記と同じ方法で調製した海馬スライスに、RXR $\alpha$  の生理的リガンドである 9-cis-レチノイン酸を 1 nM - 10  $\mu$ M の濃度で作用させてエストロゲン合成に関与する酵素の mRNA 量を測定した。レチ

ノイン酸は不安定なので 12 時間ごとに 4 回投与して合計 48 時間の処理を行った。その結果、P450(17 $\alpha$ ), P450arom などの mRNA 量はまったく影響されなかった。TBT による影響が 9-cis-レチノイン酸によって再現されなかったことから、TBT の効果は RXR $\alpha$  を介したものではないことが示唆された。

TBT で処理した海馬スライスの ER $\alpha$  と ER $\beta$  の mRNA 量の変動を測定したところ、ER $\alpha$  は TBT で全く影響されなかったが、ER $\beta$  の mRNA は 1  $\mu$ M の TBT 処理により、数倍に増加した (図 6)。同様の増加は 1  $\mu$ M の 9-cis-レチノイン酸処理でも観測された (図 7)。この結果は、ER $\beta$  に対する TBT の影響は RXR $\alpha$  を介した作用であることを示している。

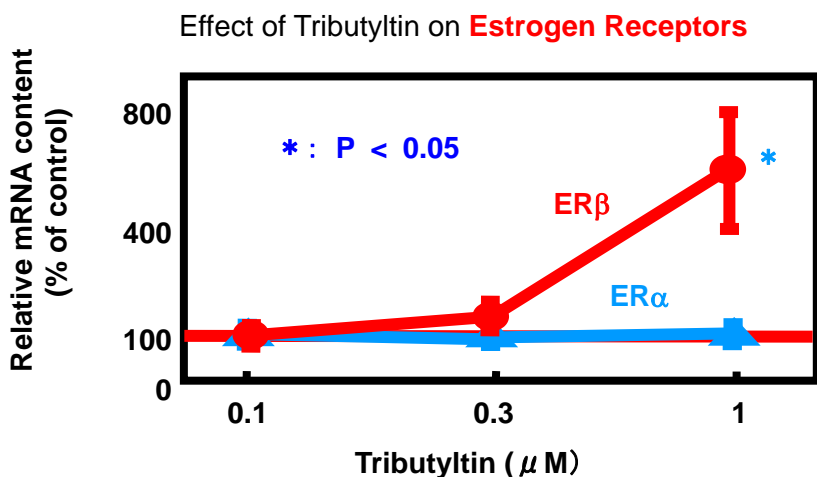


図 6 海馬のエストロゲン受容体 mRNA 量に対する TBT の影響  
海馬スライスを 48 時間、0.1 – 1  $\mu$ M TBT 存在下で培養し、TBT 処理していない海馬の mRNA 量と比較した。横の赤線は、影響が無い (相対値 100%) 場合。

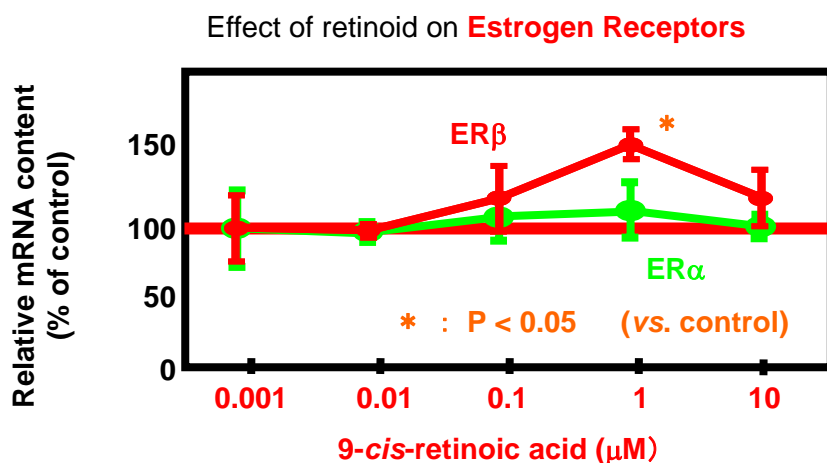


図 7 海馬のエストロゲン受容体 mRNA 量に対する 9-cis レチノイン酸の影響  
海馬スライスを 48 時間、0.1 – 1  $\mu$ M レチノイン酸存在下で培養し、コントロール海馬の mRNA 量と比較。横の赤線は、影響が無い (相対値 100%) 場合。

この研究により、低濃度 100 nM の TBT は海馬のエストロゲン合成活性を活性化し、高濃度では阻害を引き起こす可能性が示唆された。TBT は ER $\alpha$  の mRNA には影響を与えないが、ER $\beta$  mRNA 量を増大させた。この効果は RXR $\alpha$  を介している可能性がある。

### 3) 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 活性に対する環境ホルモン物質の影響

一酸化窒素は脳神経系で記憶、学習過程において重要な役割をはたす。有機スズ化合物が一酸化窒素合成酵素の活性に与える影響を調べた。まず nNOS 活性を阻害する環境汚染物質の探索を行った。100 種類近い化合物の NO 合成活性 に対する影響を調べたところ、有機スズ化合物が顕著な NOS の阻害作用を示すことを見出した。nNOS の活性を半減させる濃度は、TBT とジブチルスズは数十  $\mu\text{M}$  であったがモノブチルスズ(MBT)とトリフェニルスズは数  $\mu\text{M}$  と、より低濃度で阻害を示した。有機スズ化合物は CaM と nNOS の結合を阻害することを見出した (Ohashi et al., 2004)。その阻害機構を検討するため、nNOS 活性阻害の MBT 濃度依存性を調べた (図 8)。 MBT は nNOS に結合すると共に、CaM にも結合することにより nNOS 活性を阻害する。さらに、MBT が CaM と結合することにより、nNOS 以外の CaM 依存性の脳機能に影響をおよぼす恐れがある。

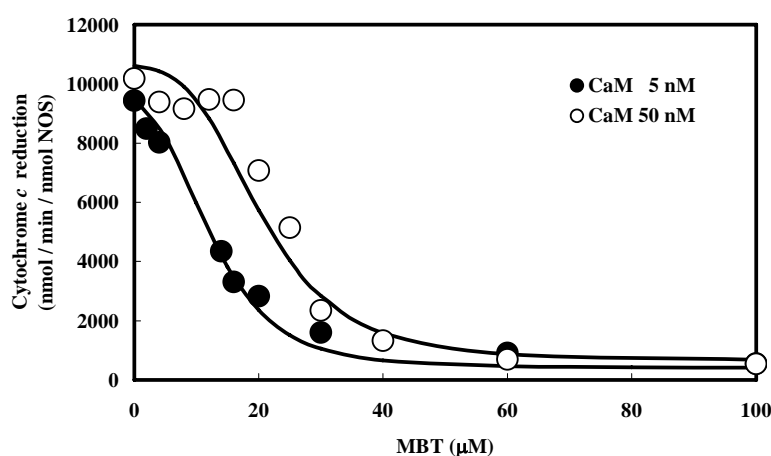


図 8 ラット nNOS のチトクロム c 還元活性に対するモノブチルスズ(MBT)による阻害。反応溶液は 5nM の nNOS と図に示す量の MBT、CaM を含む。

#### (2)研究成果の今後期待される効果

以上の結果から、新生児の脳海馬で TBT は低濃度でステロイド合成酵素やエストラジオール受容体に、毒性効果ではない攪乱効果を及ぼすことがわかったことは、脳発達や記憶学習への環境ホルモンの影響があることを示唆する。また、100nM TBT の作用が、副腎皮質細胞では P450(17 $\alpha$ ,c21,11 $\beta$ ) の mRNA 量を下げるのに、海馬では P450(17 $\alpha$ ,arom) の mRNA 量を上昇させるのは、正反対であり、体に対する作用と脳に対する作用は大きく異なることを示していて、大変興味深い。今後、エストラジオールなどのステロイド合成活性の測定と合わせて、更に記憶学習パラメタ (神経行動、電気生理やシナプス形態)などを測定することで、TBT の作用内容がより深くわかるであろう。



## 3.3 小脳神経回路発達解析グループ（広島大学 筒井グループ）

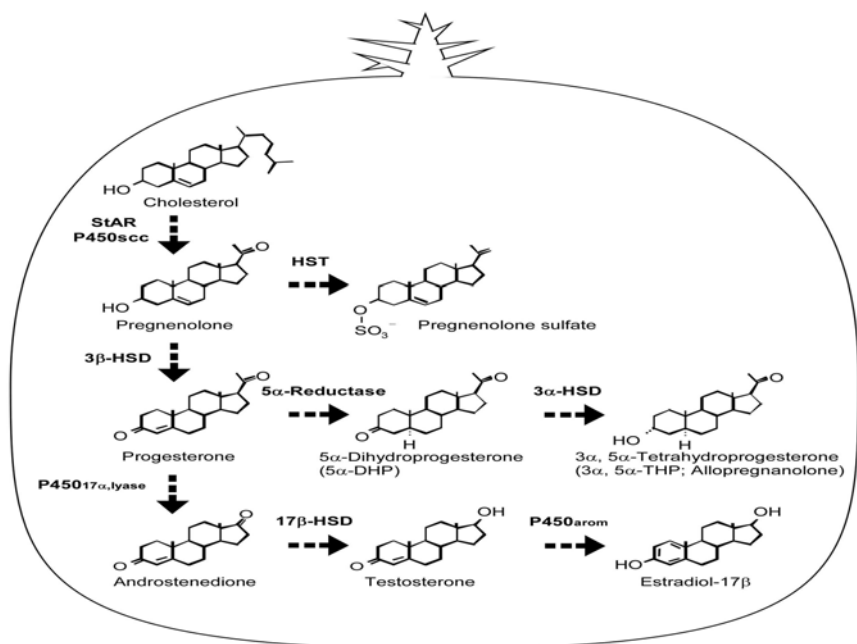
### (1) 研究実施内容及び成果

本グループは、小脳の皮質神経であるプルキンエ細胞に着目して、脳ニューロステロイドの合成と作用を解析した。プルキンエ細胞ではさまざまなニューロステロイドが時期特異的に合成されており、ニューロステロイドの作用を解析する優れた細胞モデルである。小脳皮質が形成される新生期のプルキンエ細胞ではコレステロールからプロゲステロンとエストラジオールが活発に合成される。これらのニューロステロイドは **genomic** 作用により、プルキンエ細胞の樹状突起を伸長させ、さらにスパイン・シナプスの形成を誘導することを解析した。また、新生期以降のプルキンエ細胞が合成するプレグネノロン硫酸エステルには神経回路のシナプス情報伝達を急性的に調節する **non-genomic** 作用があることがわかった。プルキンエ神経細胞は、新生児脳の発達に伴い、生後 25 日間程度に渡り神経細胞突起が大きく成長するので、環境ホルモンの脳発達に対する、遅い **genomic** な影響を解析するのに非常に適している。環境ホルモンの影響をプルキンエ細胞の樹状突起の伸長とシナプス形成に着目して超微形態学的手法により解析した。その結果、環境ホルモンである BPA やオクチルフェノールはプルキンエ細胞に局在するエストロゲン受容体を介した **genomic** 作用により樹状突起などの発達を促進させることを明らかにした。

#### 1) 小脳プルキンエ細胞における脳ニューロステロイド合成

ウズラを用いた免疫組織化学的解析と生化学的解析により、小脳皮質神経であるプルキンエ細胞にチトクロム P450<sub>scc</sub> が存在することを明らかにしたが、これはラットやカエルでも同様であり、プルキンエ細胞が脳の代表的なニューロステロイド合成細胞であることは脊椎動物に一般化される発見である。ラットを用いた **In situ hybridization** 法による解析により、プルキンエ細胞には 3 $\beta$ -HSD も存在していることを見いだした。プルキンエ神経では P450<sub>scc</sub> の発現は生後から成熟期にかけて恒常的に認められるが、3 $\beta$ -HSD の発現は新生期に増加する。生化学的に解析したところ、プルキンエ細胞では生後から成熟期にかけて恒常的にプレグネノロンとその硫酸エステルが合成されるが、新生期にはプレグネノロンからプロゲステロンとその代謝ステロイドであるアロプレグナノロン (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -テトラヒドロプロゲステロン) の合成が高まることなどが明らかになった。また、プルキンエ細胞には P450<sub>arom</sub> が存在しており、新生期のプルキンエ細胞では P450<sub>arom</sub> の発現が高まり、エストラジオールも活発に合成されることを見いだした。プルキンエ細胞には StAR タンパク質、ステロイド硫酸基転移酵素 (HST)、5 $\alpha$ ( $\beta$ )-還元酵素、P450(17 $\alpha$ )、17 $\beta$ -HSD など多くのステロイド合成酵素も存在していた。小脳はコレステロールをもとにプレグネノロンとプレグネノロン硫酸エステルを初めとするさまざまな脳ニューロステロイドを合成していることが明らかになった。これらは論文として発表済みである(Sakamoto et al., 2003a; Tsutsui, 2001; Tsutsui and Mellon, 2005; Tsutsui and Ukena, 2000; Tsutsui et al., 2000, 2003b, 2004,2005a,b)。

**Purkinje neuron**

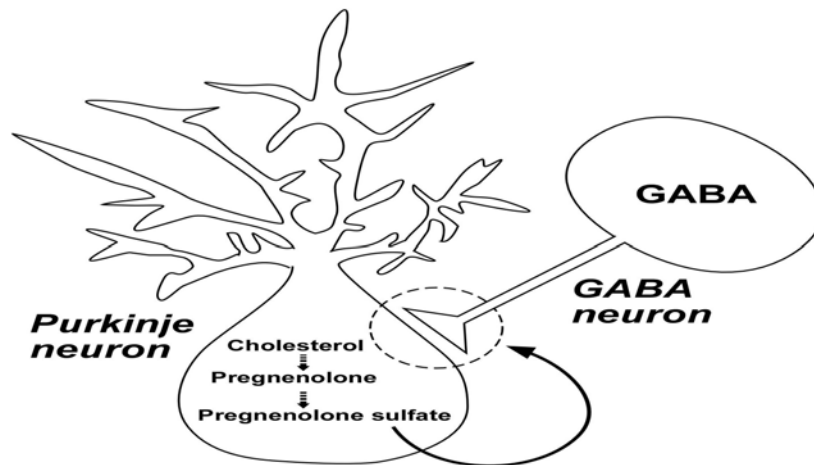


**2) プルキンエ細胞における脳ニューロステロイドのシナプス情報伝達調節作用とシナプス形成誘導作用**

小脳皮質が形成される新生期のプルキンエ細胞では各種のニューロステロイドの合成が高まることがわかったが、これらのニューロステロイドが、プルキンエ細胞の樹状突起の伸長、樹状突起上のスパイン・シナプス（シナプスを形成しているスパインのこと、シナプスを形成していないスパインの方が多）の形成を誘導することを解析した。一方、プレグネノロン硫酸エステルに関しては急性的作用を解析した。

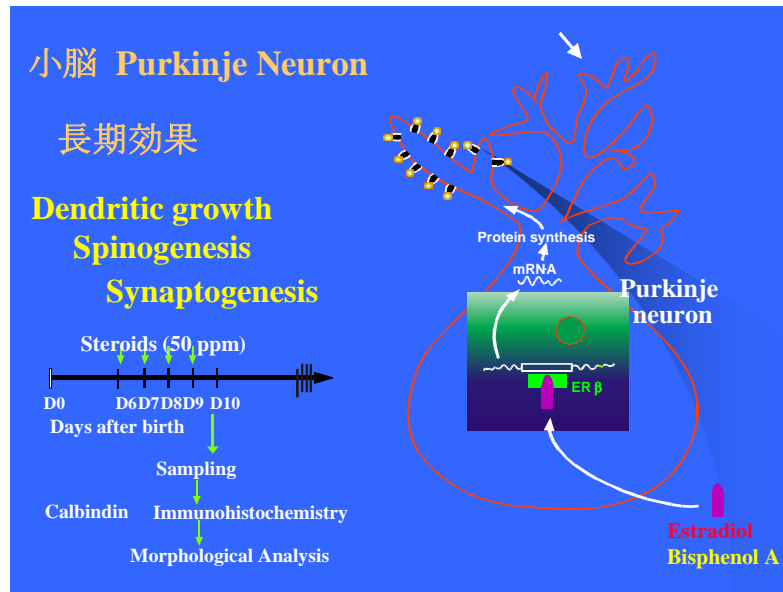
**2A シナプス情報伝達を調節する non-genomic 作用**

プレグネノロン硫酸エステルやプレグネノロンの急性作用をラットの小脳スライスを用い電気生理学的に解析した。パッチクランプ法によりプルキンエ細胞からシナプス電流の発生頻度を調べたところ、プレグネノロン硫酸エステルには抑制性のシナプス電流の発生頻度を増加させる作用があることがわかった。この効果は急性であり、プレグネノロン硫酸エステルの灌流を開始してわずか数分後から検出された。一方、プレグネノロンにはプレグネノロン硫酸エステルのような急性効果は確認されなかった。このように、プレグネノロン硫酸エステルにはシナプス情報伝達を調節する情報伝達調節因子としての作用があり、細胞膜にある受容体を介した non-genomic 作用であると考えられる(Tsutsui, 2001; Tsutsui and Ukena, 2000; Tsutsui et al., 2000, 2003b, 2003c)。



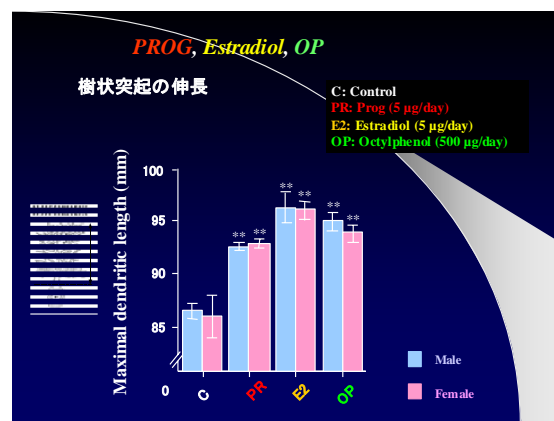
## 2B 神経の発達とシナプス形成を誘導する genomic 作用

小脳の皮質は生後まもない新生期に形成されるが、この時期には神経の発達やシナプス形成が活発になされ、小脳の機能を担うハードウェアである神経回路が構築される。プロゲステロンとエストラジオールに着目して作用を解析した。神経の発達とシナプス形成に着目して、カルビンジン抗体で染色し、DAB 染色による光学顕微鏡観察を行い、更に電子顕微鏡で超微形態学的に解析した。出生直後のラットを用いた *in vitro* と *in vivo* の解析から、プロゲステロンとエストラジオールにはプルキンエ細胞の樹状突起の伸長を導く作用があることが明らかになった(Tsutsui, 2001; Tsutsui and Mellon, 2005; Tsutsui and Ukena, 2000; Tsutsui et al., 2000, 2003b, 2004; Sakamoto et al., 2001a, 2002, 2003a, 2003b; Tsutsui et al. 2001, 2003c)。樹状突起の形態を詳しく解析したところ、プロゲステロンとエストラジオールは樹状突起のスパイン形成とスパイン・シナプス形成を誘導することが見いだされた。プロゲステロン受容体の同定をおこなった結果、プルキンエ細胞の核内にはプロゲステロン受容体 (PR-A と PR-B) が局在しており、プロゲステロンはこれらの PR を介した genomic 作用により、樹状突起の伸長、樹状突起のスパインとスパイン・シナプスの形成を導くことが明らかになった。プルキンエ細胞の膜上にはプロゲステロン受容体候補タンパク質 25-DX も存在することがわかり、このタンパク質を介したプロゲステロン作用の解析も必要である。一方、エストラジオールの作用はタモキシフェンで阻害されたことと、プルキンエ細胞にはエストロゲン受容体 (ERβ) が局在していることが報告されているので、エストラジオールは ERβ を介した genomic 作用により樹状突起の伸長とスパイン・シナプスの形成を誘導していると思われる(Sakamoto et al., 2003a; Tsutsui et al., 2003c)。以上のプロゲステロンとエストラジオールの作用により、新生期には小脳の神経回路が構築されると考えられる。プロゲステロンとエストラジオールは卵巣が合成する性ステロイドとして知られているが、新生期の卵巣ではプロゲステロンとエストラジオールの合成能は低いので、プルキンエ細胞が独自に合成するプロゲステロンとエストラジオールが神経の発達とシナプス形成を誘導するという重要な示唆が得られた。

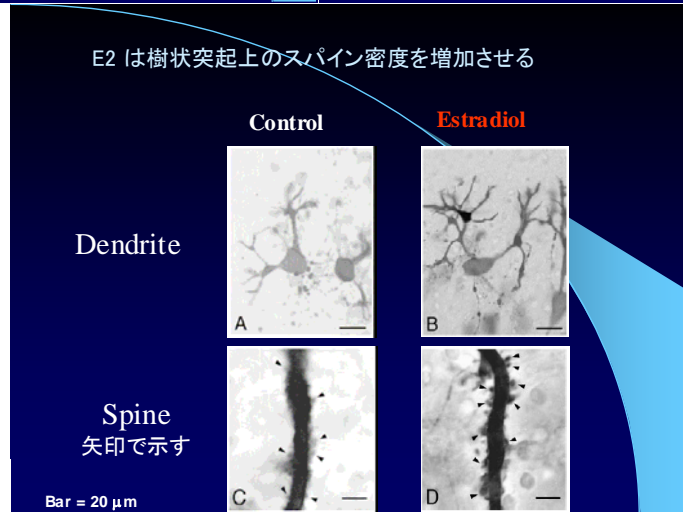
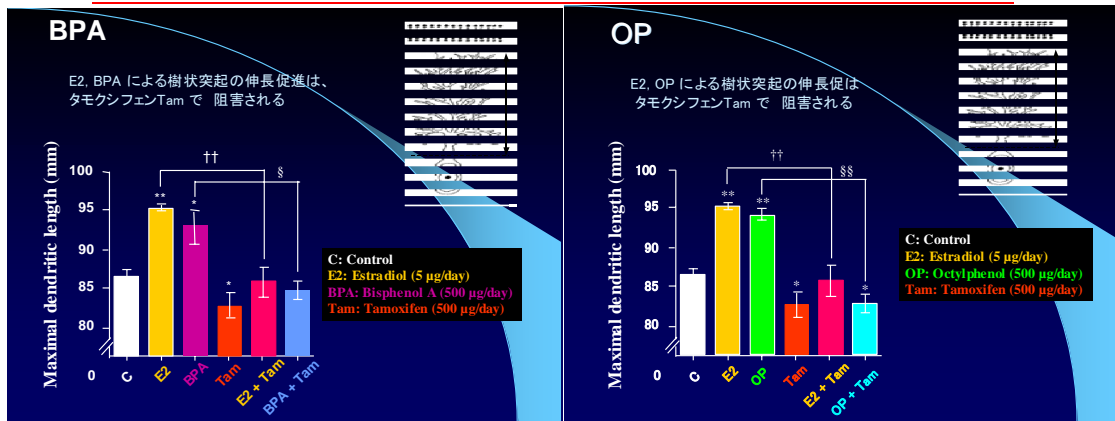
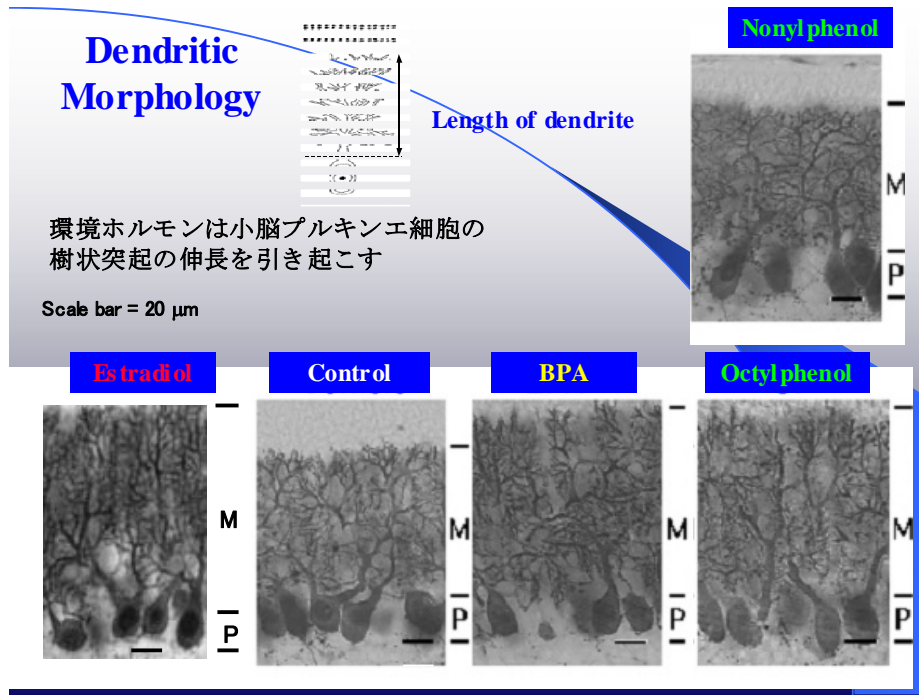


## 2C プルキンエ神経の発達における環境ホルモンの影響

プルキンエ細胞を実験系にして、複数の環境ホルモンの影響をプルキンエ細胞の樹状突起の伸長発達とシナプス形成に着目して超微形態学的手法により解析した。6-9日齢の新生児ラットに、エストラジオール(5 $\mu$ g/25 $\mu$ L/day)と環境ホルモン(500 $\mu$ g/25 $\mu$ L/day)を4日間小脳の周りの脳脊髄液に注入して、その後小脳を取り出して、カルビンジン抗体で染色し、解析した。その結果、BPAとオクチルフェノール(OP)は、エストラジオールと非常に良く似たプルキンエ細胞の樹状突起の発達を促進することがわかった(Shikimi et al., 2004)。これらの樹状突起の発達促進作用はいずれもタモキシフェンで阻害されたので、プルキンエ細胞に局在するエストロゲン受容体を介した genomic 作用によりプルキンエ細胞の発達を促進させたものと思われる。BPAとOPが観測された神経成長を引き起こすには、エストラジオールの100倍の濃度が必要であり、エストラジオールの10倍の濃度では効果が無かった。一方、ノニルフェノール(NP)には神経成長を促進する効果は認められなかった。



# 公開資料



(2)研究成果の今後期待される効果

以上の研究から、環境ホルモンが新生期のプルキンエ細胞の発達を促進することが明らか

## 公開資料

かになった。この結果は、環境ホルモンが新生期の神経回路構築にエストロゲン様の影響を及ぼすことを意味している。小脳の重要な機能の一つは運動学習である。運動学習はブルキンエ細胞を中心とした神経回路の働きで制御されており、環境ホルモンが運動学習に重要な影響を及ぼす可能性も高い。多くの発表論文から判断できるように、小脳の発達期は、性ホルモンの影響が顕著に現れる時期であるので、環境ホルモンの影響も大きいであろう。今後の詳細な解析により、小脳学習機能に影響を及ぼす環境ホルモンの作用機構を明らかに出来るであろう。

### 3.4 新規プローブ開発(東京大学 長野グループ) 平成12年～平成14年 (1)研究実施内容及び成果

海馬のNO合成酵素の蛍光検出プローブ DAF-2, DAR 等の作成を行った。これを用いて、海馬神経の NMDA 刺激や電気刺激による、NO発生を実時間で2次元的にイメージすることに成功した (Takata et al., 2004; Ishii et al., 2005)。更に硫酸プレグネノロンがNO発生を促進することを見出した。しかしその後、NO合成酵素はプロジェクトの主方向ではなくなったので、途中からグループを解消した。

#### (2)研究成果の今後期待される効果

今後、脳スライスに導入できて、リン酸化カスケードなど情報伝達系の解析に役立つプローブを開発できると、効果が大きい。

4 研究参加者

① 川戸グループ (海馬での合成と急性作用を研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
川戸佳	東大 総合文化	教授	グループの統括	H12, 12～
木本哲也	東大 総合文化	助手	代謝解析	H12, 12～
向井秀夫	東大 総合文化	CREST 研究員	膜上受容体探索	H12, 12～
高橋泰城	東大 総合文化	CREST 研究員	スパイン形態解析	H14, 1～H15, 7
北條泰嗣	東大 総合文化	CREST 研究員	代謝解析	H12, 12～
高田則雄	東大 総合文化	CREST 研究員	電気生理解析	H12, 12～H17, 3
池田真理	東大 総合文化	科技振興研究員	電気生理解析	H16, 4～
山田慎	杏林大 医学部	講師	代謝解析	H12, 12～
太田善浩	東京農工大工学	助教授	Ca 信号解析	H12, 12～
渋谷啓介	東大 理学系	大学院生	Ca 信号解析	H12, 12～H15, 3
太田陽一郎	東大 総合文化	大学院生	電気生理解析	H12, 12～H15, 3
山中麻里	東大 総合文化	大学院生	Western blot 解析	H12, 12～H15, 3
小松崎良将	東大 総合文化	大学院生	スパイン形態解析	H13, 4～
安松信明	東大 理学系	大学院生	電気生理解析	H12, 12～
榎並太平	東大 理学系	大学院生	代謝解析	H12, 12～H17, 3
田辺伸聡	東大 総合文化	大学院生	スパイン形態解析	H13, 4～
石井寛高	東大 理学系	大学院生	分子生物学解析	H13, 4～
野澤知則	東大 理学系	大学院生	電気生理解析	H13, 4～
釣木沢朋和	東大 総合文化	大学院生	スパイン形態解析	H16, 4～
鈴木久美子	東大 総合文化	大学院生	代謝解析	H13, 4～H15, 3
村上 元	東大 総合文化	大学院生	Western blot 解析	H14, 1～
川田現	東大 総合文化	大学院生	電気生理解析	H14, 4～H16, 3
渡部昌	東大 理学系	大学院生	代謝解析	H14, 4～H16, 3
園木康大	東大 総合文化	大学院生	代謝解析	H15, 4～
大石悠貴	東大 理学系	大学院生	電気生理解析	H15, 4～
三橋賢司	東大 理学系	大学院生	スパイン形態解析	H15, 4～
中嶋浩平	東大 総合文化	大学院	代謝解析	H16, 4～
中西広典	東大 理学系	大学院生	スパイン形態解析	H16, 4～
酒井貴子	東大 総合文化	研究補助員		H12, 12～H14, 9
山下裕美	東大 総合文化	研究補助員		H13, 7～
漆戸智恵	東大 総合文化	研究補助員	組織染色解析	H16, 9～H17, 7
服部高明	東大 総合文化	共同研究員	代謝解析	H12, 12～
古川愛造	久里浜病院	医師	膜上受容体探索	H12, 12～
小南思郎	広大総合科学	教授	膜上受容体探索	H12, 12～
山崎岳	広大総合科学	助教授	代謝解析	H12, 12～
筒井和義	広大総合科学部	教授	スパイン形態解析	H12, 12～
浮穴和義	広大総合科学部	助手	スパイン形態解析	H12, 12～
大西平	香川医大 医	助教授	代謝解析	H12, 12～H14, 1
岡部雅史	法政大 経済	助教授	組織染色解析	H12, 12～H15, 3

## 公開資料

石浦章一	東大 総合文化	教授	分子生物学解析	H12, 12～
原田信広	藤田保健衛生大	教授	分子生物学解析	H12, 12～
岡本光弘	大阪大 医	教授	膜上受容体探索	H12, 12～
米谷快男児	九工大 情報工学	教授	電気生理解析	H12, 12～
原孝之	中村学園大	助教授	組織染色解析	H12, 12～
植田弘師	長崎大 薬	教授	膜上受容体探索	H12, 12～
中西守	名古屋市立大 薬	教授	組織染色解析	H12, 12～
伊藤憲一	山形大 医	助教授	電気生理解析	H13, 4～H14, 3
舩江良彦	大阪市立大 医	教授	代謝解析	H13, 4～
後藤修	産総研	チームリーダー	膜上受容体探索	H13, 4～H15, 3
河田光博	京都府立医大	教授	組織染色解析	H13, 4～
林 糸眞治	横浜市大 理	教授	組織染色解析	H13, 4～
加藤宏司	山形大 医	教授	電気生理解析	H14, 4～H15, 3
粟生修司	九工大生命体工学	教授	組織染色解析	H14, 4～
舩橋 利也	横浜市大 医	助教授	組織染色解析	H14, 4～H15, 3
三谷芙美子	慶応大 医学部	講師	組織染色解析	H16, 4～
荻島正	九州大 理学部	助教授	代謝解析	H16, 4～

### ② 小南グループ (P450 代謝を研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
小南思郎	広島大学総合科学部	教授	P450 系の代謝活性攪乱解析	H12, 12～
山崎岳	広島大学総合科学部	助教授		H12, 12～

### ③ 筒井グループ (小脳発達を研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
筒井和義	広島大学総合科学部	教授	小脳神経発達とニューロステロイド作用攪乱解析	H12, 12～
浮穴和義	広島大学総合科学部	助手		H12, 12～

### ④ 長野グループ (プローブの開発)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
長野哲雄	東大学薬学系研究科	教授	NO 発光測定の新規プローブの開発	H12, 12～H15, 3
菊地和也	東大学薬学系研究科	助教授		H12, 12～H15, 3



5 成果発表等

(1)論文発表 (国内 10 件、海外 85 件)

1. T. Hattori, K. Watanabe, Y. Uechi, H. Yoshioka, and Y. Ohta: Repetitive transient depolarizations of the inner mitochondrial membrane induced by proton pumping. **Biophys J**, 88, 2340-2349, 2005.
2. T. Higashi, N. Takido, and K. Shimada: Studies on neurosteroids XVII. Analysis of stress-induced changes in neurosteroid levels in rat brains using liquid chromatography-electron capture atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Steroids**, 70, 1-11, 2005.
3. Y. Komatsuzaki, G. Murakami, T. Tsurugizawa, H. Mukai, N. Tanabe, K. Mitsuhashi, M. Kawata, T. Kimoto, Y. Ooishi, and S. Kawato: Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. **Biochem Biophys Res Commun**, 335, 1002-1007, 2005.
4. H. Mukai, N. Takata, H. Ishii, N. Tanabe, Y. Hojo, A. Furukawa, T. Kimoto, and S. Kawato: Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: Synaptocrinology. **Neuroscience**, in the press., 2005.
5. M. Ogiue-Ikeda, S. Kawato, and S. Ueno: Acquisition of ischemic tolerance by repetitive transcranial magnetic stimulation in the rat hippocampus. **Brain Res**, 1037, 7-11, 2005.
6. I. S. Parhar, S. Ogawa, and Y. Sakuma: Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, 2204-2209, 2005.
7. K. Tsutsui, M. Matsunaga, H. Miyabara, and K. Ukena: Neurosteroid biosynthesis in the quail brain. **J Exp Zool**, in the press, 2005a.
8. K. Tsutsui, and S. H. Mellon: Neurosteroids in the brain neuron: Biosynthesis, action and medicinal impact on neurodegenerative disease. **CMC-CNSA**, in the press, 2005.
9. K. Tsutsui, K. Ukena, and H. Sakamoto: Novel cerebellar function: Neurosteroids in the Purkinje neuron and their genomic and non-genomic actions. In: **Handa RJ, Kawata M, Hayashi S, eds. Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action**, CRC Press, pp. 101-119, 2005b.
10. T. Ubuka, G. E. Bentley, K. Ukena, J. C. Wingfield, and K. Tsutsui: Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, 3052-3057, 2005.
11. K. Xiao, Y. Kondo, and Y. Sakuma: Differential regulation of female rat olfactory preference and copulatory pacing by the lateral septum and medial preoptic area. **Neuroendocrinology**, 81, 56-62, 2005.
12. T. Yamazaki, M. Shimodaira, H. Kuwahara, H. Wakatsuki, H. Horiuchi, H. Matsuda, and S. Kominami: Tributyltin disturbs bovine adrenal steroidogenesis by two modes of action. **Steroids**, in the press, 2005.
13. J. Bakker, S. Honda, N. Harada, and J. Balthazart: Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. **Horm Behav**, 46, 1-10, 2004.
14. A. S. Derbalah, H. Wakatuki, T. Yamazaki, and H. Sakugawa: Photodegradation kinetics of fenitrothion in various aqueous media and its effect on steroid hormones biosynthesis. **Geochem J**, 38, 201-212, 2004.
15. Y. Hojo, T. A. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H. T. Ishii, H. Mukai, J. H. Morrison, W. G. Janssen, S. Kominami, *et al.*: Adult male rat hippocampus synthesizes

- estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, 865-870, 2004.
16. M. Inoue, M. H. Rashid, R. Fujita, J. J. Contos, J. Chun, and H. Ueda: Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. **Nat Med**, 10, 712-718, 2004.
  17. S. Kawato: Endocrine disrupters as disrupters of brain function: a neurosteroid viewpoint. **Environ Sci**, 11, 1-14, 2004.
  18. W. Kishimoto, T. Hiroi, M. Shiraishi, M. Osada, S. Imaoka, S. Kominami, T. Igarashi, and Y. Funae: Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. **Endocrinology**, 145, 699-705, 2004.
  19. S. Kumar, N. K. Chaturvedi, M. Nishi, M. Kawata, and R. K. Tyagi: Shuttling components of nuclear import machinery involved in nuclear translocation of steroid receptors exit nucleus via exportin-1/CRM-1\* independent pathway. **Biochim Biophys Acta**, 1691, 73-77, 2004.
  20. M. Matsunaga, K. Okuhara, K. Ukena, and K. Tsutsui: Identification of 3beta,5beta-tetrahydroprogesterone, a progesterone metabolite, and its stimulatory action on preoptic neurons in the avian brain. **Brain Res**, 1007, 160-166, 2004a.
  21. M. Matsunaga, K. Ukena, E. E. Baulieu, and K. Tsutsui: 7alpha-Hydroxypregnenolone acts as a neuronal activator to stimulate locomotor activity of breeding newts by means of the dopaminergic system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, 17282-17287, 2004b.
  22. F. Mitani, T. Ogishima, K. Mukai, R. Hoshino, K. Watanabe, and M. Suematsu: Possible participation of outer mitochondrial membrane cytochrome B5 in steroidogenesis in zona glomerulosa of rat adrenal cortex. **Endocr Res**, 30, 639-644, 2004.
  23. R. Miyatake, A. Furukawa, S. Matsushita, S. Higuchi, and H. Suwaki: Functional polymorphisms in the sigma1 receptor gene associated with alcoholism. **Biol Psychiatry**, 55, 85-90, 2004.
  24. M. Nishi, M. Tanaka, K. Matsuda, M. Sunaguchi, and M. Kawata: Visualization of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescence resonance energy transfer. **J Neurosci**, 24, 4918-4927, 2004.
  25. I. Ochiai, K. Matsuda, M. Nishi, H. Ozawa, and M. Kawata: Imaging analysis of subcellular correlation of androgen receptor and estrogen receptor alpha in single living cells using green fluorescent protein color variants. **Mol Endocrinol**, 18, 26-42, 2004.
  26. K. Ohashi, S. Kominami, T. Yamazaki, S. Ohta, and S. Kitamura: Inhibitory effect of organotin compounds on rat neuronal nitric oxide synthase through interaction with calmodulin. **Biochem Biophys Res Commun**, 324, 178-185, 2004.
  27. B. J. Philips, P. J. Ansell, L. G. Newton, N. Harada, S. Honda, V. K. Ganjam, G. E. Rottinghaus, W. V. Welshons, and D. B. Lubahn: Estrogen receptor-independent catechol estrogen binding activity: protein binding studies in wild-type, Estrogen receptor-alpha KO, and aromatase KO mice tissues. **Biochemistry**, 43, 6698-6708, 2004.
  28. J. Y. Rho, Y. Wada-Kiyama, Y. Onishi, R. Kiyama, and Y. Sakuma: Expressional regulation of neuronal and cancer-related genes by estrogen in adult female rats. **Endocr Res**, 30, 257-267, 2004.
  29. H. Sakamoto, K. Ukena, H. Takemori, M. Okamoto, M. Kawata, and K. Tsutsui: Expression and localization of 25-Dx, a membrane-associated putative progesterone-binding protein, in the developing Purkinje cell. **Neuroscience**, 126, 325-334, 2004.
  30. S. Sato, H. Osanai, T. Monma, T. Harada, A. Hirano, M. Saito, and S. Kawato: Acute effect of corticosterone on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in mouse hippocampal slices. **Biochem Biophys Res Commun**, 321, 510-513, 2004.
  31. R. A. Screaton, M. D. Conkright, Y. Katoh, J. L. Best, G. Canettieri, S. Jeffries, E. Guzman, S. Niessen, J. R. Yates, 3rd, H. Takemori, *et al.*: The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. **Cell**, 119,

- 61-74, 2004.
32. H. Shikimi, H. Sakamoto, Y. Mezaki, K. Ukena, and K. Tsutsui: Dendritic growth in response to environmental estrogens in the developing Purkinje cell in rats. **Neurosci Lett**, 364, 114-118, 2004.
  33. M. Shimizu, Y. Nakano, T. Yamasaki, and H. Tamura: Region- and isoform-specific expression of hydroxysteroid sulfotransferases in rat brain. **J Health Sci**, 50, 689-692, 2004.
  34. K. Tsutsui, H. Sakamoto, H. Shikimi, and K. Ukena: Organizing actions of neurosteroids in the Purkinje neuron. **Neurosci Res**, 49, 273-279, 2004.
  35. N. Araki, T. Hatae, A. Furukawa, and J. A. Swanson: Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fcγ-receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. **J Cell Sci**, 116, 247-257, 2003.
  36. N. Aste, S. Honda, and N. Harada: Forebrain Fos responses to reproductively related chemosensory cues in aromatase knockout mice. **Brain Res Bull**, 60, 191-200, 2003.
  37. M. D. C. Belle, K. Tsutsui, and R. W. Lea: Sex steroid communication in the ring dove brain during courtship. **Can J Physiol Pharmacol**, 81, 359-370, 2003.
  38. T. Chiyo, T. Yamazaki, K. Aoshika, S. Kominami, and Y. Ohta: Corticosterone enhances adrenocorticotropin-induced calcium signals in bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**, 144, 3376-3381, 2003.
  39. Y. Inai, K. Nagai, K. Ukena, T. Oishi, and K. Tsutsui: Seasonal changes in neurosteroid concentrations in the amphibian brain and environmental factors regulating their changes. **Brain Res**, 959, 214-225, 2003.
  40. S. Izumi, H. Kaneko, T. Yamazaki, T. Hirata, and S. Kominami: Membrane topology of guinea pig cytochrome P450 17 alpha revealed by a combination of chemical modifications and mass spectrometry. **Biochemistry**, 42, 14663-14669, 2003.
  41. S. Kawato: [Neurosteroids are 4th generation neuromessengers which are synthesized and enhance/suppress learning and memory in the brain]. **Seikagaku**, 75, 1530-1535, 2003.
  42. S. Kawato, M. Yamada, and T. Kimoto: Brain neurosteroids are 4th generation neuromessengers in the brain: cell biophysical analysis of steroid signal transduction. **Adv Biophys**, 37, 1-48, 2003.
  43. T. Matsumoto, S. Honda, and N. Harada: Alteration in sex-specific behaviors in male mice lacking the aromatase gene. **Neuroendocrinology**, 77, 416-424, 2003.
  44. M. Ogiue-Ikeda, S. Kawato, and S. Ueno: The effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on long-term potentiation in rat hippocampus depends on stimulus intensity. **Brain Res**, 993, 222-226, 2003a.
  45. M. Ogiue-Ikeda, S. Kawato, and S. Ueno: The effect of transcranial magnetic stimulation on long-term potentiation in rat hippocampus. **IEEE Trans Magn**, 39, 3390-3392, 2003b.
  46. C. Patte-Mensah, V. Kappes, M. J. Freund-Mercier, K. Tsutsui, and A. G. Mensah-Nyagan: Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. **J Neurochem**, 86, 1233-1246, 2003.
  47. H. Sakamoto, Y. Mezaki, H. Shikimi, K. Ukena, and K. Tsutsui: Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. **Endocrinology**, 144, 4466-4477, 2003.
  48. M. Sekiguchi, T. Chiyo, M. Kawahara, and Y. Ohta: Effects of progesterone on intracellular Ca<sup>2+</sup> levels of immortalized hypothalamic neurons (GT1-7): Fluorescence Imaging Study. **Bioimages**, 11, 67-73, 2003.
  49. K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima, and T. Nagano: Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **J Biol Chem**, 278, 3170-3175, 2003.

50. K. Shibuya, N. Takata, Y. Hojo, A. Furukawa, N. Yasumatsu, T. Kimoto, T. Enami, K. Suzuki, N. Tanabe, H. Ishii, *et al.*: Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. **Biochim Biophys Acta**, 1619, 301-316, 2003.
51. S. Tomita, H. B. Jiang, T. Ueno, S. Takagi, K. Tohi, S. Maekawa, A. Miyatake, A. Furukawa, F. J. Gonzalez, J. Takeda, *et al.*: T cell-specific disruption of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene causes resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced thymic involution. **J Immunol**, 171, 4113-4120, 2003.
52. K. Tsutsui, M. Matsunaga, and K. Ukena: Review: Biosynthesis and biological actions of neurosteroids in the avian brain. **Avian Poultry Biol Rev**, 14, 63-78, 2003a.
53. K. Tsutsui, H. Sakamoto, and K. Ukena: A novel aspect of the cerebellum: biosynthesis of neurosteroids in the Purkinje cell. **Cerebellum**, 2, 215-222, 2003b.
54. K. Tsutsui, H. Sakamoto, and K. Ukena: Biosynthesis and action of neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 85, 311-321, 2003c.
55. M. M. Adams, S. E. Fink, R. A. Shah, W. G. Janssen, S. Hayashi, T. A. Milner, B. S. McEwen, and J. H. Morrison: Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats. **J Neurosci**, 22, 3608-3614, 2002.
56. T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, and T. Nagano: Improvement and biological applications of fluorescent probes for zinc, ZnAFs. **J Am Chem Soc**, 124, 6555-6562, 2002.
57. S. Kawato, Y. Hojo, and T. Kimoto: Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain. **Methods Enzymol**, 357, 241-249, 2002.
58. M. Matsunaga, K. Ukena, and K. Tsutsui: Androgen biosynthesis in the quail brain. **Brain Res**, 948, 180-185, 2002.
59. S. Nakayama, T. Sakuyama, S. Mitaku, and Y. Ohta: Fluorescence imaging of metabolic responses in single mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, 290, 23-28, 2002.
60. C. Orikasa, Y. Kondo, S. Hayashi, B. S. McEwen, and Y. Sakuma: Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, 3306-3311, 2002.
61. A. Owaki, A. Takamasa, T. Yamazaki, and S. Kominami: Membrane reconstitution of recombinant guinea pig cytochrome P45017alpha and the effects of site-directed mutagenesis on androgen formation. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 81, 255-262, 2002.
62. L. Plumari, C. Viglietti-Panzica, F. Allieri, S. Honda, N. Harada, P. Absil, J. Balthazart, and G. C. Panzica: Changes in the arginine-vasopressin immunoreactive systems in male mice lacking a functional aromatase gene. **J Neuroendocrinol**, 14, 971-978, 2002.
63. H. Sakamoto, K. Ukena, and K. Tsutsui: Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. **Neurosci Lett**, 322, 111-115, 2002.
64. T. Takahashi, T. Kimoto, N. Tanabe, T. A. Hattori, N. Yasumatsu, and S. Kawato: Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons. **J Neurochem**, 83, 1441-1451, 2002.
65. M. Takase, K. Ukena, and K. Tsutsui: Expression and localization of cytochrome P450(11beta,aldo) mRNA in the frog brain. **Brain Res**, 950, 288-296, 2002.
66. N. Takata, K. Shibuya, M. Okabe, T. Nagano, H. Kojima, and S. Kawato: Pregnenolone sulfate acutely enhances NO production in the rat hippocampus: digital fluorescence study using NO reactive dye. **Bioimages**, 10, 1-8, 2002.
67. S. Ueno, M. Tsukamoto, T. Hirano, K. Kikuchi, M. K. Yamada, N. Nishiyama, T. Nagano, N. Matsuki, and Y. Ikegaya: Mossy fiber Zn<sup>2+</sup> spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. **J Cell Biol**, 158, 215-220, 2002.

68. H. Yamada, N. Gohyama, S. Honda, T. Hara, N. Harada, and K. Oguri: Estrogen-dependent regulation of the expression of hepatic Cyp2b and 3a isoforms: assessment using aromatase-deficient mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, 180, 1-10, 2002.
69. S. Kawato, M. Yamada, and T. Kimoto: Neurosteroids are 4th generation neuromessengers: cell biophysics analysis of steroid signal transduction. **Adv Biophys**, 37, 1-30, 2001.
70. T. Kimoto, T. Tsurugizawa, Y. Ohta, J. Makino, H. Tamura, Y. Hojo, N. Takata, and S. Kawato: Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. **Endocrinology**, 142, 3578-3589, 2001.
71. S. Kominami, A. Owaki, T. Iwanaga, H. Tagashira-Ikushiro, and T. Yamazaki: The rate-determining step in P450 C21-catalyzing reactions in a membrane-reconstituted system. **J Biol Chem**, 276, 10753-10758, 2001.
72. R. W. Lea, J. A. Clark, and K. Tsutsui: Changes in central steroid receptor expression, steroid synthesis, and dopaminergic activity related to the reproductive cycle of the ring dove. **Microsc Res Tech**, 55, 12-26, 2001.
73. M. Matsunaga, K. Ukena, and K. Tsutsui: Expression and localization of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/c17,20-lyase in the avian brain. **Brain Res**, 899, 112-122, 2001.
74. T. A. Milner, B. S. McEwen, S. Hayashi, C. J. Li, L. P. Reagan, and S. E. Alves: Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. **J Comp Neurol**, 429, 355-371, 2001.
75. H. Sakamoto, K. Ukena, and K. Tsutsui: Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. **J Neurosci**, 21, 6221-6232, 2001a.
76. H. Sakamoto, K. Ukena, and K. Tsutsui: Activity and localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ Delta5-Delta4-isomerase in the zebrafish central nervous system. **J Comp Neurol**, 439, 291-305, 2001b.
77. T. Tsubota, S. Taki, K. Nakayama, J. I. Mason, S. Kominami, N. Harada, and I. Kita: Immunolocalization of steroidogenic enzymes in the corpus luteum and placenta of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*, during pregnancy. **Reproduction**, 121, 587-594, 2001.
78. K. Tsutsui: Biosynthesis and biological actions of neurosteroids in brain neurons. **Zool Sci**, 18, 1043-1053, 2001.
79. K. Tsutsui, and B. A. Schlinger: Steroidogenesis in the avian brain. (Dawson A, Chaturvedi CM, eds.) **Avian Endocrinology**, Journal of Endocrinology Ltd, pp. 59-77, 2001.
80. K. Tsutsui, K. Ukena, and H. Sakamoto: Novel cerebellar function: Neurosteroids in the Purkinje neuron and their genomic and non-genomic actions. **In Neural Plasticity, Development and Steroid Hormone Action**, (R. J. Handa et al., eds.) CRC Press, pp. 101-119, 2001.
81. T. Ubuka, H. Sakamoto, D. Li, K. Ukena, and K. Tsutsui: Developmental changes in galanin in lumbosacral sympathetic ganglionic neurons innervating the avian uterine oviduct and galanin induction by sex steroids. **J Endocrinol**, 170, 357-368, 2001.
82. M. Yamada, Y. Ohta, G. I. Bachmanova, A. I. Archakov, I. Hatta, and S. Kawato: Effect of microsome-liposome fusion on the rotational mobility of cytochrome P450IIB4 in rabbit liver microsomes. **J Inorg Biochem**, 83, 261-268, 2001.
83. T. Yamazaki, H. Kuwahara, M. Shimodaira, and S. Kominami: Tributyltin perturbs adrenal steroid hormone biosynthesis. **Environ Sci**, 8, 126, 2001.
84. K. Tsutsui, and K. Ukena: Novel cerebellar function: Biosynthesis and actions of neurosteroids in the Purkinje neuron. **Internat J Mol Med**, 6, 218-221, 2000.
85. K. Tsutsui, K. Ukena, M. Usui, H. Sakamoto, and M. Takase: Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. **Neurosci Res**, 36, 261-273, 2000.

86. 筒井和義・坂本浩隆・浮穴和義 「発達期の小脳プルキンエ細胞における 25-Dx の発現-プルキンエ細胞が合成するプロゲステロンの作用機構」 **生体の科学** 56 (特集: 脳の遺伝子-どこでどのように働いているのか) 296-302, 2005
87. 筒井和義 「ステロイドホルモン研究のフロンティア ニューロステロイドの合成と作用」 **化学と生物** 42:681-686, 2004
88. 川戸佳 「ステロイドの常識が変わる: 第4世代の脳の情報伝達物質ニューロステロイド: 海馬が性に関係なく男性・女性ホルモンを合成する」 **生化学** 75(12):1530-1535, 2003
89. 筒井和義 「小脳プルキンエ細胞におけるニューロステロイドの合成と作用」 **ホルモンと臨床** 52 (増刊号: ステロイドホルモン研究の進歩 2003) :103-110, 2003
90. 筒井和義・坂本浩隆・浮穴和義・古川康雄 「ニューロステロイドのシナプス形成誘導作用」 **生体の科学** 54:101-108, 2003
91. 川戸佳、木本哲也、高橋泰城 「記憶学習機能の動的解析手法と求められる技術: 脳ニューロステロイドを中心に」 **バイオサイエンスとインダストリー** 60: 404-407, 2002
92. 川戸佳、向井秀夫 「ニューロステロイドによる海馬神経伝達のもジュレーション」 **医学のあゆみ** 202: 1049 - 1052, 2002
93. 筒井和義 「ニューロンにおけるニューロステロイドの合成と作用」 **比較生理生化学** (比較生理生化学会編) 19:103-110, 2002
94. 川戸佳 「ニューロステロイド: 脳海馬で合成され、記憶学習を活性化したり抑制したりする第4世代の脳の情報伝達物質」 **生物物理学会誌** 41, 290-294, 2001
95. 筒井和義、浮穴和義、坂本浩隆 「神経ステロイドによるシナプス可塑性調節」 特集: 脳のシナプス **Brain Medical** 12:298-306, 2000

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

- ①招待、口頭講演 (国内2件、海外20件)
- ②ポスター発表 (国内6件、海外9件)

①招待、口頭講演

国内学会講演は非常に多数のため、国際学会講演のみを示す

1. S. Kawato, H. Ishii, H. Mukai, Y. Hojo, T. Tsurugizawa, M. Ogiue-Ikeda and T. Kimoto, Brain Cytochrome P450: Local Neurosteroid Synthesis in Hippocampal Neurons Plays an Essential Role in Synaptic Plasticity of Memory, 13th Meeting of International Society for the Study of Xenobiotics, Maui, U.S.A., October,
2. S. Kawato, Local Synthesis and Rapid Action of Brain Estrogens in Adult Rat Hippocampus, Univ. of Texas, Austin, Texas, U.S.A., March, 2005
3. S. Kawato, Rapid Action of Neurosteroids in Rat Hippocampus, Mount Sinai School of Medicine, New York, U.S.A., March, 2005
4. S. Kawato, Synthesis and Rapid Action of Estrogens in Rat Hippocampus, Univ. of Laval, Quebec, Canada, March, 2005
5. T. Tsurugizawa, N. Tanabe, T. Kimoto, Y. Hojo and S. Kawato, Local Synthesis and Rapid Action of Brain Estrogens in Adult Rat Hippocampus: From Neuro-endocrinology to Neuro-synaptocrinology, 3rd International Meeting of STEROIDS AND NERVOUS SYSTEM, Turin, Italy, February 2005
6. S. Kawato, Local Synthesis and Rapid Action of Brain Neurosteroids in Rat Hippocampus, Univ. of Milan, Milan, Italy, October, 2004

7. S. Kawato, Synthesis and Rapid Action of Neurosteroids in the Brain, Univ. of Essex, England, October, 2004
8. S. Kawato, Local Synthesis and Rapid Action of Sex Steroids on Synaptic Plasticity in Hippocampus, The Rockefeller Univ., New York, U.S.A., March,
9. S. Kawato, Action of Estrogens and Xenoestrogens in Hippocampal Neurons, Mount Sinai School of Medicine, New York, U.S.A., March, 2004
10. S. Kawato, Local Synthesis and Rapid Action of Brain Neurosteroids in Rat Brain Hippocampus, Institute de Genetique et de Biologie Moleculaire Cellulaire, CNRA/INSERM/ULP, Strasbourg, France, March, 2004
11. S. Kawato, Local Synthesis of Neurosteroids and Its Rapid Action in Rat Hippocampus, Karolinska Institutet NOVUM, Stockholm, Sweden, March, 2004
12. S. Kawato and N. Takata, Rapid modulation of hippocampal neuronal plasticity by brain estrogen and endocrine disrupters (EDs): an electrophysiological analysis, Network Physiology Symposium, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, U.S.A., November, 2003
13. S. Kawato, Rapid Action and Local Synthesis of Neurosteroids in the Brain Hippocampus: Their Role in Synaptic Transmission and Learning and Memory, 4th East Asian Biophysics Symposium, Taiwan, November, 2003
14. S. Kawato, Local Synthesis and Rapid Action of Estrogens and Corticosteroids in Rat Hippocampus, The Second Military Medical Univ., Shanghai, China, October, 2003
15. S. Kawato, Brain, Memory, Emotion and Sexsteroids, Shanghai Jiao Tong Univ., Shanghai, China, October, 2003
16. S. Kawato, Rapid Synthesis and Action of Neurosteroids in the Brain Hippocampus: Their Role in Synaptic Plasticity, Third International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones, Florence, Italy, September, 2003
17. S. Kawato, Imaging Analysis on Action and Synthesis of Neurosteroids in Brain Hippocampal Neurons, New Development in Radiation Biology (Riken) Wako, Japan, June, 2003
18. S. Kawato, Local Synthesis of Neurosteroids by Cytochrome P450 in the Brain Hippocampus, Mount Sinai School of Medicine, New York, U.S.A., September, 2002
19. S. Kawato, Hippocampal Neurosteroids: such as Female Hormone Modulate Acutely Neuron-neuron Communication, The 5th MEMBRANE RESEARCH FORUM, Nagoya, Japan, August, 2002
20. S. Kawato, Local Synthesis of Neurosteroids in the Hippocampus, The Rockefeller Univ., New York, U.S.A., July, 2002
21. S. Kawato, Metabolism of Neurosteroids by Cytochrome P450 in the Brain Hippocampus, INSERM, Paris, France, September, 2001
22. S. Kawato, Rapid Action and Membrane Receptors of Neurosteroids in the Brain, Univ. of Heidelberg, Germany, September, 2001

②ポスター発表

国際学会のみを示す

23. H. Ishii, Y. Sonoki, A. Furukawa, Y. Hojo, T. Kimoto and S. Kawato, The neuron is a steroid hormone factory. - Biosynthesis of androgen and estrogen from cholesterol in

- the hippocampus, 21st Century COE 2nd International Symposium, Tokyo, Japan, March, 2005
24. H. Mukai, G. Murakami, Y. Hojo and S. Kawato, Expression of synaptic estrogen receptors in hippocampal neurons, 21st Century COE 2nd International Symposium, Tokyo, Japan, March, 2005
  25. N. Takata, M. Ogiue-Ikeda and S. Kawato, Multi-site recording of neuronal activities in the hippocampus, 21st Century COE 2nd International Symposium, Tokyo, Japan, March, 2005
  26. Y. Hojo, T. Enami, K. Nakajima, A. Furukawa, H. Ishii, H. Mukai, J.H. Morrison, W.G.M. Janssen, Ho. Tamura, S. Kominami, N. Harada, T. Kimoto and S. Kawato, Synthesis of brain neurosteroids and localization of P450s in the hippocampal neurons of adult male rats, 3rd International Meeting of STEROIDS AND NERVOUS SYSTEM, Turin, Italy, February 2005
  27. T. Kimoto, G. Murakami, N. Takata, H. Mukai, M. Ogiue-Ikeda, Y. Ooishi, Y. Hojo, S. Kominami, J.H. Morrison, W.G.M. Janssen and S. Kawato, Acute effect of brain neurosteroids on the hippocampal neurons of adult male rats, 3rd International Meeting of STEROIDS AND NERVOUS SYSTEM, Turin, Italy, February 2005
  28. T. Kimoto, Local synthesis and action of estrogen in the hippocampal neurons, The 8th MEMBRANE RESEARCH FORUM, INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NANO-MECHANOBIOLOGY OF SUPRAMOLECULAR COMPLEXES, Nagoya, Japan, November, 2004
  29. H. Mukai, G. Murakami, S. Kominami, J. H. Morrison, W.G.M. Janssen, P. Chambon, S. Kato, S. Kawato, Synaptic localization of estrogen receptor alpha in the hippocampal pyramidal and granule neurons of adult male rat, Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, California, U.S.A., October, 2004
  30. N. Takata, M. Ogiue-Ikeda, Y. Ooishi and S. Kawato, Non-genomic rapid effects of estradiol and a xenoestrogen on rat hippocampal synapses: Multi-electrode dish analysis, Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, California, U.S.A., October, 2004
  31. Y. Hojo, T. Enami, M. Watanabe, T. Kimoto and S. Kawato, Brain Neurosteroids 1: Synthesis in the hippocampal neurons, 21st Century COE 1st International Symposium, Tokyo, Japan, November, 2003
  32. H. Mukai, G. Murakami, H. Ishii, Y. Hojo and S. Kawato, Expression of neurosteroidogenic enzymes and estrogen receptors in hippocampal neurons, 21st Century COE 1st International Symposium, Tokyo, Japan, November, 2003
  33. T. Nozawa, N. Takata, N. Tanabe, T. Tsurugizawa, A. Kawata and S. Kawato, Brain Neurosteroids 2: Rapid action on the learning and memory, 21st Century COE 1st International Symposium, Tokyo, Japan, November, 2003
  34. N. Takata, Y. Hojo, T. Nozawa, H. Mukai and S. Kawato, The role of neurosteroids and xenoestrogens in rat hippocampal synapses, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, U.S.A., November, 2003
  35. N. Takata, T. Harada, M. Okabe and S. Kawato, Imaging analysis of nitric oxide (NO) production in hippocampus induced upon NNDA-, tetanus-stimulation using newly synthesized NO reactive dye, DAR-4M, Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orlando, Florida, U.S.A., November, 2002
  36. S. Kawato, T. Kimoto and Y. Hojo, Synthesis and acute action of neurosteroid in rat hippocampal neurons: NMDA- and Ca<sup>2+</sup>-dependent processes, Society for Neuroscience 31st Annual Meeting, San Diego, California, U.S.A., November, 2001
  37. H. Mukai, N. Takata, S. Uchino and S. Kawato, Effect of neurosteroid,



## 公開資料

pregnenolone sulfate, on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling through NMDA receptors expressed in CHO cells and on NO production in hippocampal slices, Society for Neuroscience 31st Annual Meeting, San Diego, California, U.S.A., November, 2001

38. S. Kawato, Neurosteroids are paracrine messengers in the brain, 12th International Conference on Cytochrome P450, France, September, 2001

### (3)特許出願

#### ①国内出願 (3件)

1. 「内分泌攪乱作用の評価方法」 川戸佳、高田則雄、池田真理  
(平成 16 年 特願 2004-308264)
2. 「化学物質のステロイドホルモン様作用を形態学的手法を用いて検出する方法」  
川戸佳、釣木沢朋和、田辺伸明 (平成 17 年特願 2005-102311)
3. 「抗うつ薬等の電気生理学的スクリーニング」  
川戸佳、大石誠 (平成 17 年特願 2005-114526)

#### ②海外出願 (1件)

1. 「Method for Evaluation of Endocrine Disruptive Action」  
Suguru Kawato, Norio Takata, Mari Ikeda, (Foreign application No. 2004-308264, USA)

その他 件

### (4)受賞等

#### ①受賞

#### ②新聞報道

JST基礎研究最前線 (2004年10月, Vol.7)  
「性ホルモンが脳でも合成されていることを発見」

JSTニュース (2004年3月)  
「脳で女性・男性ホルモンが合成されることを発見—記憶学習の活性化や脳での内分泌かく乱と関連の可能性—」

科学新聞 (2004年1月9日版)  
「脳海馬で女性ホルモン合成—川戸・東大教授ら解明—痴呆症克服に寄与期待」

日経産業新聞 (2003年12月25日版)  
「脳で性ホルモン合成—ラットで東大確認」

日刊工業新聞 (2003年12月15日版)  
「女性・男性ホルモン： 脳海馬で合成—東大など—痴呆改善に期待」

読売新聞 (2003年10月7日版、1面)  
「環境ホルモン「ビスフェノールA」微量でも脳に影響」

# 公開資料

読売新聞 (2003年9月10日版)

「たんぱく質 生命をかたちづくるもの 第Ⅱ部 3-P450 脳で女性ホルモン生成」

日経バイオビジネス (2003年6月号)

「性ホルモンなどのステロイドが記憶・学習に関与していることを解明。神経細胞内のステロイド受容体などを標的にした医薬品を開発。」

(5)その他特記事項



## Basic Research

### 脳で女性・男性ホルモンが合成されることを発見 —記憶学習の活性化や脳での内分泌かく乱と関連の可能性—

戦略的創造研究推進事業「チーム型研究 (CRESTタイプ)」内分分泌(内分泌)研究領域(伊東雄雄・鈴木 雅夫・東京大学名誉教授)の研究チーム「脳ニューロステロイド作用を担う環境ホルモン」の川戸 佳研究代表者(東京大学大学院総合文化研究科教授)らの研究チームは、成人の哺乳類の脳海馬で女性・男性ホルモンが合成されることを、ラットを用いて明らかにした。これら性ホルモンを含むステロイドホルモンは、これまで脳内では合成されず、副腎・副腎皮質で合成されたものが血流に乗って脳に到達し、作用し、認知やストレス応答を制御すると考えられてきた。

本成果は、この神経内分泌学のセントラルドグマを否定するという意味で大きな発見といえる。1月20日発行の米国家科学アカデミー紀要「PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)」に掲載された。川戸教授の研究チームは、成人の哺乳類の脳でもステロイドホルモンが合成されているのではないかと、機能的な研究を進めてきた。その結果、今回、成人の雄ラットの海馬の神経細胞を用い、チトクロムP450酵素を介してコレステロールから女性・男性ホルモンが合成されていることを、蛋白質・遺伝子・合成活性レベルで以下のおおむね実証した。①ステロイドホルモン合成酵素であるチトクロムP45017α、P450aromが海馬の神経細胞から発現している②これらのP450は神経細胞内のシナプス(記憶学習の場)にも局在している③P450蛋白質の分子量や遺伝子による検証で、海馬では副腎-性腺の1/300ぐらいの量が発現し

ている(注:コレステロール>プレゲネロン>DHEA>男性ホルモン>女性ホルモンの順)で合成される場合、女性ホルモン濃度は血中より脳の方が約8倍多く、女性ホルモンは神経が活動する時のみ合成される。

以上の結果から、年単位で関係なく脳内で作用する女性ホルモンは、種-種に問わず神経細胞の活動時に合成されることが明らかにされた。また、この合成は神経活動依存的で記憶学習をすればするほど合成が増み、この過程において他にも多くのシグナル分子(神経伝達物質や男性ホルモン)が合成されていることも分かった。今後は、脳内で合成された女性ホルモンが、神経シナプス伝達やシナプス可塑性に対し、いかに効果を発揮するかについて分子メカニズムの解明が重要な課題となる。これまで女性ホルモンが、海馬の神経活動に大きな効果を持つことも知らず、その受容体が検出できないことが研究者の間で大きな課題となっていた。この点についても川戸教授らは、海馬の神経シナプスに女性ホルモン受容体が存在し、女性ホルモン伝達効率を上昇させることを突き止めた。

ホルモン補充療法は、更年期女性に多く発生するアルツハイマー型痴呆を改善する治療効果があることは臨床的に分かっているが、本研究結果により、この分子機構を説明できる可能性がある。こうした成果は、老化脳に対する記憶学習の改善に関する研究を進展させ、近年、先進国で大きな社会問題となっている高齢化に押し返す手助けとなること大い。

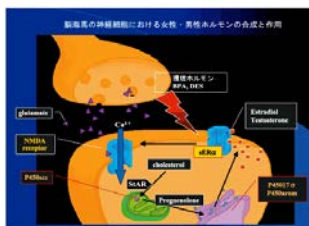


図. 神経シナプスでのニューロステロイドの合成経路

# 公開資料

## 6 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	場所	趣旨	内容	参加人数
2001年8月6,7日	東京都目黒区 東大駒場キャンパス・16号館	川戸チーム研究打ち合わせ、及び、研究発表	「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」に関連する研究発表	40人
2002年7月29,30日	東京都目黒区 東大駒場キャンパス・16号館	川戸チーム研究打ち合わせ、及び、研究発表	「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」に関連する研究発表	40人
2003年6月9日	東京都目黒区 東大駒場キャンパス・16号館	川戸チーム研究打ち合わせ、及び、研究発表	「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」に関連する研究発表	15人
2004年3月8,9日	東京都目黒区 東大駒場キャンパス・16号館	川戸チーム研究打ち合わせ、及び、研究発表	「脳ニューロステロイド作用を攪乱する環境ホルモン」に関連する研究発表	40人

(2)招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

## 7 結び

グループの集合写真



小南グループ



筒井グループ

