

博士論文

ラット海馬エストロジオール合成調節の  
分子機構

平成 21 年 3 月 1 日

広島大学大学院総合科学研究科 総合科学専攻

宗綱 栄二

第1章 序論.....	5
1-1. ステロイドホルモンの生合成.....	5
1-2. ステロイドホルモン生合成の調節機構.....	7
1-3. ステロイドホルモンの生理作用.....	9
1-4. ステロイドホルモンの脳に対する影響.....	11
1-5. ニューロステロイド.....	12
1-6. ニューロステロイドの生理作用.....	14
1-7. ニューロステロイドとしてのエストラジオール.....	15
1-8. 海馬エストラジオール合成経路.....	16
1-9. 研究の目的と概要.....	17
第2章 海馬スライスのエストラジオール合成に対する 外因性、内因性物質の影響 – <i>in vitro</i> 実験.....	19
2-1. 有機スズによる影響.....	19
2-1-1. 緒言.....	19
2-1-2. 実験方法.....	21
2-1-3. 結果.....	36
2-1-4. 考察.....	43
2-2. レチノイン酸による影響.....	45
2-2-1. 緒言.....	45
2-2-2. 実験方法.....	46
2-2-3. 結果.....	54
2-2-4. 考察.....	61
2-3. 甲状腺ホルモン、cAMP、グルココルチコイドによる影響.....	63
2-3-1. 緒言.....	63
2-3-2. 方法.....	66
2-3-3. 結果.....	67
2-3-4. 考察.....	70
2-4. 第2章の総括.....	71
第3章 海馬エストラジオール合成に対する飼育環境の影響 – <i>in vivo</i> 実験.....	74
3-1. 緒言.....	74
3-2. 実験方法.....	75
3-3. 結果.....	77
3-4. 考察.....	81
第4章 総合考察.....	82
謝辞.....	85
引用文献.....	86

## 要旨

ステロイドホルモンは主に末梢内分泌腺（副腎、性腺など）において合成され、血流を通じて標的器官に作用する。ステロイドの重要な標的器官の1つとして脳があり、その機能に様々な影響を与える。性ステロイドホルモンは胎仔、新生仔のオス哺乳類の脳に作用し、脳を不可逆的に男性化する。また成熟後の脳に対しても女性ホルモンの一種であるエストラジオールはスパイン形成、軸索の伸張などを誘導し、神経保護効果もある。

一方、成熟ラットの脳内にいくつかのステロイドホルモンが血中よりも高い濃度で存在し、末梢内分泌腺を除去しても脳内濃度は減少しないことが、1981年に Corpéchet らによって見出された。その後、脳内でのステロイドホルモン合成酵素の存在も確認され、脳はステロイド合成器官であることが明らかになった。脳で合成されるステロイドは末梢内分泌腺で合成されるステロイドホルモンと区別して、ニューロステロイドと命名された。ニューロステロイドはさまざまな生理作用をもつので、その生合成は何らかの調節を受けていると推定される。しかしその調節機構はほとんど分かっていない。

ニューロステロイド合成の盛んな脳内部位に海馬がある。海馬ではニューロステロイドとしてエストラジオールを合成していることが明らかになり、その作用が注目されている。海馬で合成されるエストラジオールは神経新生、スパイン形成などの現象と密接に関わり、記憶や学習などの脳の高次機能に影響を与える。海馬のエストラジオール合成の調節機構についてはほとんど未解明である。

本研究は海馬のエストラジオール合成の調節機構を解明するために、まずラット海馬のスライスを用い、環境汚染物質やビタミン A 誘導體などを作用させてエストラジオール合成に対する影響を解析し、活性化の分子機構を検討した。続いてラットを異なる条件で飼育し、生育環境が海馬エストラジオール合成に与える影響を解析した。

### ・有機スズによる海馬スライスのエストラジオール合成の攪乱

まず、ニューロステロイドに影響を与える外来物質の候補として、有機スズ化合物を作用させた。トリブチルスズやジブチルスズはウシ副腎皮質のステロイドホルモン合成を強く阻害することが知られている。また、トリブチルスズは脂溶性であるため脳内に蓄積しやすく、野生動物の脳から高濃度で検出されていて、実際に脳機能に影響を及ぼしている可能性がある。そこで海馬エストラジオール合成に対するトリブチルスズ、およびジブチルスズの影響を解析した。

実験には *de novo* のエストラジオール合成を解析するために、海馬スライス培養を用いた。海馬エストラジオール合成酵素の発現量は極めて少ないため、その活性を定量することは困難である。そこでまず検出感度の高い real-time RT-PCR により海馬エストラジオール合成系酵素 mRNA を定量し、その変動を解析した。その後、スライスと培地中のエストラジオールを RIA で定量し、実際の合成量変化を解析した。

実験に用いた 10 日齢オスラットの海馬スライスのエストラジオール合成は培養時間と共に減少する。よって本実験では培養 2・3 日目のスライスを用いて解析を行った。スライスに 0.01 - 1  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズを 48 時間作用させたところ、毒性濃度以下の 0.1  $\mu\text{M}$  トリブチルスズにより P450(17 $\alpha$ )、P450arom の mRNA 量が約 2 倍に増加した。他のステロイド合成酵素の mRNA 量は変化しなかった。この条件で処理したスライスのエストラジオール合成活性は約 2 倍に亢進していた。トリブチルスズは毒物であり、副腎ではステロイドホルモン合成を阻害する。しかしこの毒物が細胞毒性のみられる 1 / 10 の濃度で海馬のエストラジオール合成を活性化したことは意外であった。一方ジブチルスズは、細胞毒性のみられない 0.1  $\mu\text{M}$  の濃度で P450arom の mRNA 量のみを約 2 倍に増加させたが、海馬のエストラジオール量には影響しなかった。トリブチルスズは高いアフィニティーで retinoid X receptor (RXR) に結合すること

が知られている。そこで、次に RXR のリガンドであるレチノイン酸の影響を調べた。

#### ・海馬スライスのエストラジオール合成に対するレチノイン酸の影響

レチノイン酸はビタミン A 誘導体であり、いくつかの立体異性体が存在する。all-*trans*-レチノイン酸は retinoic acid receptor (RAR) に結合し、9-*cis*-レチノイン酸は RAR と RXR に結合して生理作用を発揮する。ここではレチノイン酸が海馬エストラジオール合成に与える影響を解析した。

ラット海馬のスライスに 0.01–10  $\mu\text{M}$  の 9-*cis* または all-*trans*-レチノイン酸を 48 時間作用させた。real-time RT-PCR により海馬エストラジオール合成系酵素の mRNA を定量したところ、9-*cis*-レチノイン酸を作用させた場合には P450(17 $\alpha$ ) と P450arom mRNA 量が増加した。特に P450(17 $\alpha$ ) mRNA は 9-*cis*-レチノイン酸に感受性が高く、1  $\mu\text{M}$  レチノイン酸処理により、4 倍近くまで増加した。その他のエストラジオール合成系酵素 mRNA 量は変化しなかった。all-*trans*-レチノイン酸による mRNA 量変化は観察されなかった。次に P450(17 $\alpha$ ) タンパク質をウェスタンブロッティングにより定量したところ、1  $\mu\text{M}$  9-*cis*-レチノイン酸処理により 1.7 倍に増加していた。スライスと培地中のエストラジオール、テストステロンをそれぞれ RIA、EIA で定量したところ 9-*cis*-レチノイン酸によってテストステロン、エストラジオール合成が 2–3 倍に増加していた。エストラジオールは RIA に加えて LC-MS/MS によっても定量を行い、その変動を確認した。

本実験では海馬スライスによるエストラジオール合成が 9-*cis*-レチノイン酸で活性化されることを示した。そしてその活性化機構は P450(17 $\alpha$ ) の転写の活性化によって P450(17 $\alpha$ ) タンパク質量が増加したためであると示唆された。転写の活性化は all-*trans*-レチノイン酸では観察されなかったため、この効果は 9-*cis*-レチノイン酸のみが結合する RXR を介したものであろう。この実験は 10 日齢ラットの海馬スライスを用いて行ったが、RXR やステロイド合成酵素の mRNA は成体ラットの海馬にも同程度存在する。よって RXR を介したエストラジオール合成の活性化機構は成体の海馬でも機能している可能性が高い。

#### ・海馬エストラジオール合成系に対する甲状腺ホルモン、cAMP、グルココルチコイドの影響

甲状腺ホルモンは、性ステロイドやレチノイドと同様、脳の発達に必須のホルモンである。幼齢期に甲状腺ホルモンが欠乏すると樹状突起の形態に異常が観察されたり、神経突起の伸張が阻害される。また、成熟後の脳に対しても神経新生に影響を与える。そこで、活性型甲状腺ホルモンであるトリヨードチロニン(0.001–1  $\mu\text{M}$ ) を海馬スライスに 48 時間作用させた。生理的なトリヨードチロニン血中濃度範囲 (0.001–0.01  $\mu\text{M}$ ) では海馬エストラジオール合成系酵素の mRNA 量は変化せず、1  $\mu\text{M}$  で P450arom mRNA が減少した。

cAMP は末梢内分泌腺におけるステロイドホルモン合成活性化時の主要なセカンドメッセンジャーである。海馬スライスに cAMP 誘導体 (ジブチリル cAMP) を作用させたところ、3 $\beta$ -HSD、P450arom mRNA 量が約 2 倍に増加し、P450(17 $\alpha$ ) mRNA は最大で 15 倍に増加した。これは、ニューロン内の cAMP 濃度を増加させる刺激が、ニューロステロイド合成を活性化する可能性を示唆している。

コルチコステロンは神経細胞死を引き起こしたり、アポトーシスを誘導するグルココルチコイドである。海馬スライスに 0.1–5  $\mu\text{M}$  のコルチコステロンを作用させたところ、3–5  $\mu\text{M}$  のコルチコステロンにより P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量が約 5 倍に増加した。コルチコステロンにより海馬エストラジオール合成が亢進される可能性が示唆された。

### ・海馬エストラジオール合成に対する社会的孤独環境の影響

他個体との接触がない社会的孤独環境で幼少期から飼育されたラットは、脳に様々な影響が現れる。最近、社会的孤独環境で飼育されたラットの海馬でニューロステロイド合成酵素である 5 $\alpha$ -reductase や 3 $\alpha$ -HSD の mRNA 量が減少することが報告された。そこで、ラットを社会的孤独環境で飼育し、海馬エストラジオール合成に対する影響を解析した。実験では 1 ケージにつき 1 匹で飼育する社会的孤独環境群と 2 匹ずつ飼育する 2 匹飼育群に分け、28 日齢から 2 ヶ月間飼育した。飼育後、各ラットから海馬を摘出し、エストラジオール合成系酵素 mRNA 量の変動を real-time RT-PCR で解析し、海馬エストラジオールを EIA で定量した。社会的孤独環境は StAR、P450(17 $\alpha$ ) の mRNA 量を約 2 倍に、P450arom mRNA 量を 8 倍に増加させた。またこのとき海馬のエストラジオール量も約 1.5 倍に増加していた。さらに、本実験では各個体のエストラジオール合成系酵素 mRNA 量とエストラジオール量との相関を解析した。その結果、エストラジオール量と StAR、P450arom mRNA 量との間に有意な相関がみられた。よって社会的孤独環境が *de novo* の海馬エストラジオール合成を亢進させることが示唆された。

### ・まとめ

本研究では *in vitro*、*in vivo* の実験系を用いてラット海馬エストラジオール合成調節の分子機構について解析した。得られた主な知見は以下のとおりである。

1. スライス培養という単純化した系により、P450(17 $\alpha$ ) という新たなエストラジオール合成の調節部位を見出した。
2. その P450(17 $\alpha$ ) の転写が、9-*cis*-レチノイン酸やトリブチルスズといった RXR アゴニストによって活性化されること、また、コルチコステロンやジブチリル cAMP によっても活性化されることを見出した。
3. ラットを社会的孤独環境で飼育することにより、海馬エストラジオール合成が活性化されるといふ新たな知見を得た。これは *in vivo* で海馬エストラジオール合成を変動させた初めての実験であると思われる。さらに、ニューロステロイド研究におけるラットの飼育環境の重要性も明らかにした。

脳でのニューロステロイド合成は未知の部分が非常に多い。本研究により海馬エストラジオール合成の新たな調節部位とその調節因子を明らかにすることができ、また飼育環境による影響も見出した。この成果はニューロステロイド合成調節の分子機構の全容解明に多少なりとも貢献するであろう。

# 第1章

## 序論

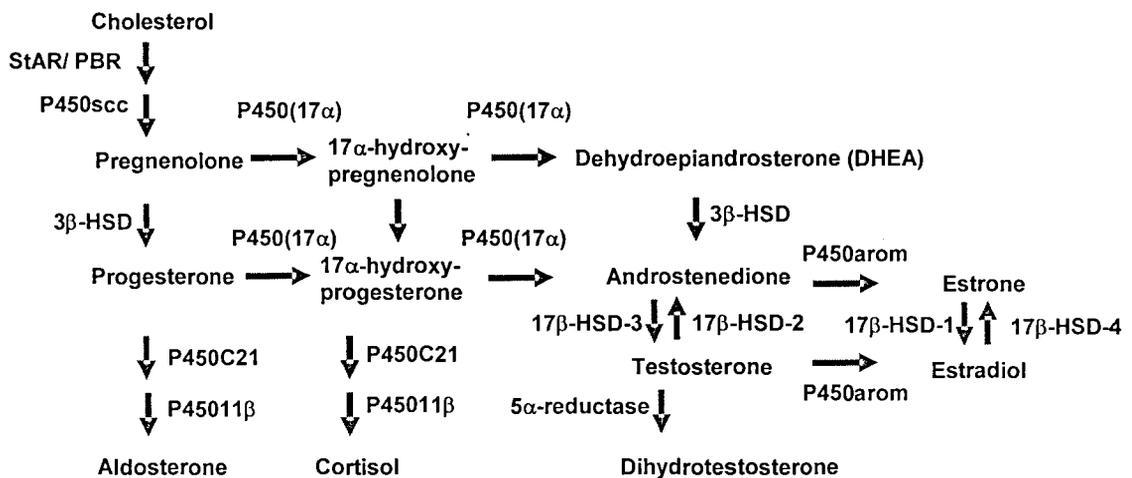
本章ではまず、この論文の主要テーマであるステロイドホルモンの生合成調節機構について詳しく述べ、その後にステロイドホルモンの生理作用について記述する。後半では、脳で合成されるステロイド（ニューロステロイド）について概説する。その中でも脳内で非常に重要な役割を担うエストラジオールの生理作用について概観し、本研究の目的を述べる。

### 1-1. ステロイドホルモンの生合成

ステロイドホルモンは内的要因及び外部からの刺激などの外的要因に対応して主に副腎皮質・性腺など末梢内分泌腺から分泌され、血流により標的器官に達した後、様々な生理作用を発現する。ステロイドホルモンはその生理作用と構造からアンドロゲン（男性ホルモン）、エストロゲン（女性ホルモン）、プロゲステロン、グルココルチコイド（糖質コルチコイド）、ミネラルコルチコイド（鉱質コルチコイド）に分類される。性腺からはアンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロンが、副腎皮質からはグルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、アンドロゲンが主に分泌される。

ホルモン合成の第一段階は細胞内の遊離コレステロールがステロイド産生急性調節タンパク質 (steroidogenic acute regulatory protein: StAR) や末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (peripheral-type benzodiazepine receptor: PBR) などを通じてミトコンドリア内膜に運ばれることである [1, 2]。ステロイドホルモンはミトコンドリア内膜に達したコレステロールを様々な酵素が代謝することで合成される。Fig. 1-1 にステロイドホルモン合成経路を示す。これらの酵素はチトクロム P450 と水酸化ステロイド脱水素酵素 (hydroxysteroid dehydrogenase: HSD)、還元酵素 (reductase) に分類される。コレステロールはミトコンドリアに局在するコレステロール側鎖切断酵素 (CYP11A1, P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme: P450<sub>scc</sub>) が触媒する酵素反応の結果、プレグネノロンへと変換され [3]、その後、小胞体に存在する数種類の酵素により代謝される。3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4-isomerase (3 $\beta$ -HSD) はプレグネノロンをプロゲステロンへと変換する酵素活性を持つ [4]。チトクロム P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/ c17,20-lyase (CYP17, P450(17 $\alpha$ )) は2段階の酵素反応を触媒する [5, 6]。最初の段階はプレグネノロンとプロゲステロンを基質とし、17 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロン、17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンを合成する水酸化反応である (Fig. 1-1)。次に、これらのステロイドは P450(17 $\alpha$ ) のリアーゼ活性によりそれぞれデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) とアンドロステンジオンへと変換される。3 $\beta$ -HSD は17 $\alpha$ -ヒドロキシプレグネノロンと DHEA をそれぞれ17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン、アンドロステンジオンへと変換する活性も持つ。精巣のライディヒ細胞では、アンドロステンジオンが17 $\beta$ -水酸化ステロイド脱水素酵素 (17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: 17 $\beta$ -HSD) type 3 (17 $\beta$ -HSD-3) の作用で強力なアンドロゲンであるテストステロンへと変換され、これが主に分泌される [7]。卵巣ではさらにチトクロム P450<sub>arom</sub> (CYP19, P450<sub>arom</sub>) も作用し、性周期に応じて女性ホルモンであるエストロゲン (エストラジオール、エストロン) が合成される [8, 9]。また、アンドロステンジオンから P450<sub>arom</sub> によりエストロンが合成され、17 $\beta$ -HSD type 1 (17 $\beta$ -HSD-1) によりエストラジオールが合成される経路もある [10]。エストロゲン合成は主に卵胞、黄体で盛んに行われている [8, 9]。プロゲステロンも女性ホルモンであり、P450<sub>scc</sub> と 3 $\beta$ -HSD の作用によってやはり性周期に応じて分泌される。プロゲステロンは主に黄体から分泌される [4]。

副腎皮質では 3 $\beta$ -HSD により合成されたプロゲステロンは小胞体のチトクロム P450c21 (P450c21)やミトコンドリアの酵素のチトクロム P45011 $\beta$  (P45011 $\beta$ )によって代謝され、グルココルチコイドのコルチコステロンやミネラルコルチコイドのアルドステロンへと変換される [4]。ラットのようなげっ歯類の副腎には P450(17 $\alpha$ )がないため、これらが主な副腎皮質ホルモンである。ヒトなどでは、副腎皮質にも P450(17 $\alpha$ )が存在し、プレグネノロンは DHEA に、プロゲステロンは 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンやアンドロステンジオンへと代謝される。そのうち 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンは P450c21、P45011 $\beta$ により強力なグルココルチコイドであるコルチゾルへと変換される。副腎性アンドロゲン、アンドロステンジオンと DHEA であるが、ヒトでは DHEA が大量に分泌され、女性の血中アンドロゲンは大部分が副腎皮質から分泌された DHEA である。よってヒト副腎では P450(17 $\alpha$ )のリアーゼ反応の有無がグルココルチコイド(コルチゾル)とアンドロゲン(DHEA、アンドロステンジオン)合成の分岐点となる。



**Fig. 1-1 Pathway of steroidogenesis**

Arrow indicates the specific step mediated by each enzymes and protein.

## 1-2. ステロイドホルモン生合成の調節機構

ステロイドホルモンは、全身の標的器官において様々な生理作用を発現するので、欠乏しても過剰であっても全身の機能に重篤な障害が生じる。そのため、その生合成は精緻に調節されている [4]。

精巣ライディヒ細胞では、最も強力なアンドロゲンであるテストステロンが合成される。テストステロンの生合成は、下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) や濾胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone; FSH) によって調節されている [11]。また、精巣のテストステロン合成は、ビタミン A が不足すると低下し、ビタミン A 誘導体であるレチノイン酸で活性化される [12]。

女性ホルモン的一种であるエストロゲンはエストラジオール、エストロンで代表されるが、卵巣におけるこれらの生合成はアンドロゲンと同様、LH や FSH で調節されている [13]。また、レチノイン酸でも影響される [14, 15]。女性ホルモンの一種であるプロゲステロンは主に卵巣の黄体で合成されるので、性周期のうち、黄体の活性の高い時期に分泌されることが知られている。

副腎皮質ホルモンのうち、グルココルチコイドのコルチゾルやコルチコステロンの生合成は副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotropic hormone: ACTH) により調節される [16]。

これら性ホルモンやグルココルチコイドの生合成は、視床下部—下垂体—生殖腺系または視床下部—下垂体—副腎皮質系の活動を介して脳の支配下にある [17, 18]。

視床下部にはアンドロゲンレセプターが存在し、血中テストステロン濃度が高すぎると視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone: GnRH) の分泌が低下して下垂体からの LH、FSH 分泌が減少し、精巣でのステロイドホルモン合成を低下させて血中アンドロゲン濃度を適値に保つ [19]。グルココルチコイドも同様に、視床下部のグルココルチコイドレセプターを介して、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの下垂体に対する分泌を抑制して血中 ACTH 濃度を低下させるネガティブフィードバック制御系が機能し、血中濃度を適正に維持している [20]。

女性では、脳内の性周期に連動して視床下部 GnRH の分泌が変動し、さらに視床下部のエストロゲンレセプターを介したポジティブフィードバックとネガティブフィードバックの複雑な組み合わせで、血中エストラジオール濃度が周期的に変動し、排卵や月経、黄体の形成が周期的に起こる [21]。

副腎皮質が分泌する強力なミネラルコルチコイドであるアルドステロンの生合成は、腎臓の血流減少に伴うレニン—アンギオテンシン系の活性により亢進する [22]。

精巣、卵巣や副腎皮質ではこれらの刺激ホルモンやアンギオテンシンの作用により、細胞内でセカンドメッセンジャーである環状 AMP (cyclic AMP: cAMP) や  $Ca^{2+}$ 、エイコサノイドの濃度が高まり、ステロイドホルモン合成が活性化される [23, 24]。その活性化機序には、短期効果と長期効果がある。

短期効果とは、刺激後数分以内に起こるステロイドホルモン生合成の活性化であり、その実態は StAR タンパク質の活性化である [25]。性腺や副腎皮質が刺激されると、直ちに StAR タンパク質のリン酸化、翻訳の活性化、転写の活性化が起こり、細胞内の遊離コレステロールが PBR などを介してミトコンドリア内膜に運ばれる (Fig. 1-1) [1, 26]。このホルモン合成の最初のステップが、これらの臓器におけるステロイド合成の律速段階をなす [27]。ミトコンドリア内膜に達したコレステロールは、大量に存在する様々な酵素によって直ちに代謝され、ステロイドホルモンへと変換される。この活性化は、刺激を除くと数分以内に終了する、一過性のものである。なお、胎盤には StAR

タンパク質が存在しないが大量のエストラジオールを合成するので、StAR タンパク質はすべてのステロイドホルモン合成に必須ではないようである [28]。

長期効果は、細胞を長期間刺激すると、刺激後十数時間後に生じるステロイドホルモン合成酵素の転写の活性化である。細胞内の cAMP や  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増加すると、Adrenal 4 binding protein / steroidogenic factor-1 (Ad4BP / SF-1) という転写因子の活性化により、多くのステロイドホルモン合成酵素の転写が同時に促進される [29]。mRNA 量の増加に伴い、酵素タンパク質量、酵素活性が増大し、ステロイドホルモンの合成量が増加する [30, 31]。転写の活性化は刺激後 3-24 時間後に始まり、通常の転写活性化よりかなり遅い。

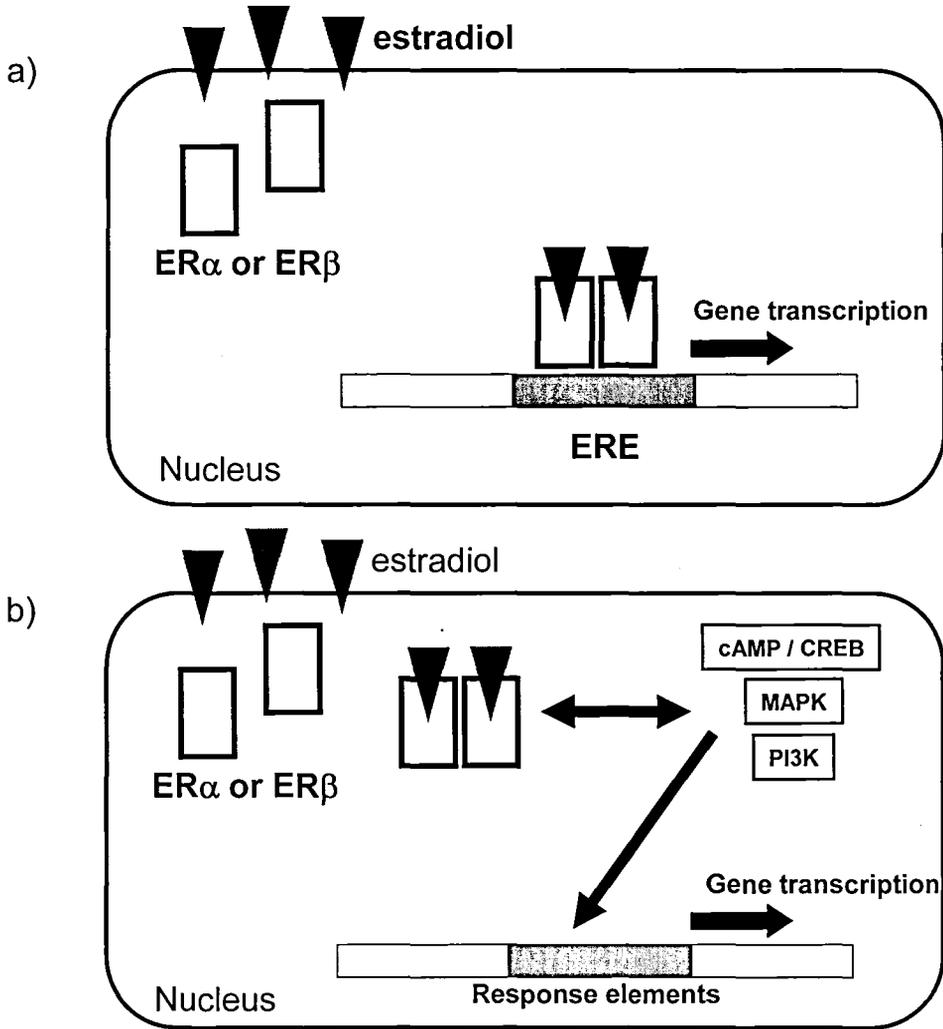
### 1-3. ステロイドホルモンの生理作用

末梢内分泌腺で合成されたステロイドホルモンには様々な生理活性がある。アンドロゲンは男性ホルモンの総称で、代表的なものとしてテストステロンがある。このホルモンは前立腺の発達や機能、精子形成に深く関わる [32]。また、胎児期、乳児期の性分化でも重要である [33, 34]。女性ホルモンの一種であるエストロゲンの代表的なものにはエストラジオール、エストロンがある。これらのステロイドは女性の生殖機能や性周期、乳腺の発達・維持に関わることが知られている。近年、エストラジオールが生殖機能以外にも重要な役割を担っていることが報告されている。例えば、心臓疾患の発症とエストラジオールは密接に関わっている [35]。女性ホルモンの一種であるプロゲステロンは子宮や卵巣において、卵母細胞の放出や着床の促進に関わり、妊娠を持続させるのに欠かせないステロイドホルモンである [36]。またプロゲステロンの広く知られる作用として基礎体温の上昇が挙げられる。副腎皮質ホルモンのうち、ヒトで最も活性の高いグルココルチコイドはコルチゾルである。副腎から放出されたコルチゾルは血中グルコース濃度を上昇させ、全身の糖代謝を亢進させる [37, 38]。また、コルチゾルはストレスにより身体の受けるダメージを緩和する作用がありストレスステロイドとしても知られている。ミネラルコルチコイドで重要なのはアルドステロンである。アルドステロンは血中のナトリウムイオンとカリウムイオンのバランスを制御し、その濃度が高まると体液量と血圧が上昇する [22]。

これらのステロイドホルモンは、受容体に結合してその生理作用を発現する。ステロイドホルモンレセプターにはアンドロゲンレセプター、エストロゲンレセプター (ER)、プロゲステロンレセプター、グルココルチコイドレセプター (GR)、ミネラルコルチコイドレセプターがある。ステロイドホルモンレセプターは核内レセプターに分類され、各々の構造は類似性が高い [39]。レセプターに結合したステロイドホルモンは、多くの場合、遺伝子発現を調節する (genomic action)。しかし、最近では、遺伝子発現に影響を与えず作用を発揮する non-genomic action も多く報告されている [40]。ここではよく研究されているエストラジオールを例にとり、ステロイドホルモンの genomic action と non-genomic action について概観する (Fig. 1-2)。

エストラジオールが作用するには次のようなステップを経る [39]。ステップ 1) エストラジオールが細胞膜を通過して核内に入り、ER と結合する。ER には $\alpha$ 、 $\beta$ の2つの isoform が知られている。ステップ 2) エストラジオール-ER 複合体が形成される。ステップ 3) 活性化された ER は二量体を形成し、エストロゲン応答配列 (estrogen response element; ERE) とよばれる特定の DNA 配列を認識し、結合する。通常、ERE は特定の遺伝子の上流にある。ステップ 4) ER は転写因子として特定の遺伝子の転写を調節し、その結果そのタンパク質量が変化する。このように、エストラジオールが作用するには遺伝子発現に関わるため、効果が現れるまでに数時間-数日間かかる (genomic action)。しかし、non-genomic action は数秒-数分でその効果が現れる。例えば、エストラジオールは細胞内カルシウム濃度を数秒で変化させる [41]。また数分で、細胞増殖などに関わる MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase: MAPK) の活性調節や [42]、アポトーシスとの関わりがある PI3 キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase: PI3K) や転写因子である cAMP 応答配列結合蛋白 (cAMP-response element binding protein: CREB) の活性にも影響を及ぼす (Fig. 1-2) [43, 44]。このような早い反応は ER が直接、各タンパク質と相互作用することで行われていると考えられている [45]。また、エストラジオールにウシ血清アルブミンを結合させ、細胞内に入ることが不可能にしたエストラジオールでもこれらの効果が観察されるため、細胞膜表面にステロイドと反応するタンパク質が存在することも示唆されており、実際に、エストラジオールの non-genomic な作用は膜に存在する ER が仲介するという報告もある [46]。このようにステロ

イドホルモンは各々のレセプターを介して遅い反応だけでなく早い反応も誘導する。アルドステロンやグルココルチコイドでも同様の報告があり、non-genomic な作用を持つと推定されている [47, 48]。



**Fig. 1-2 Action mechanism of estradiol**

a) The classical mode of action of estrogen receptors (ERs) involves binding of the ligand to the cytoplasmic receptor, translocation to the nucleus and binding to estrogen response elements (EREs) in gene promoters, ultimately leading to the induction of gene transcription. b) In addition to this genomic mode of action, ERs might interact directly with various intracellular signalling pathways, including the CREB, MAPK and PI3K pathways, thereby affecting indirectly the transcription of several other target genes.

#### 1-4. ステロイドホルモンの脳に対する影響

ステロイドホルモンは脂溶性であるため、血液-脳関門を容易に通過し脳に作用する。また、脳内にはステロイドホルモンレセプターが多く発現しており、ステロイドホルモンは脳に様々な影響を及ぼす [49]。例えば、前頭皮質の神経細胞は過度のストレスにより副腎から放出される大量のコルチゾルにより、その体積は減少する [50]。同様に、コルチコステロンをラットに投与すると、海馬神経細胞の退縮が観察され、海馬の体積は減少する [51]。

性ホルモンの脳への影響も広く研究されている。その効果は、胎児、新生児期の脳の性分化、発達に作用する効果と、成熟後の脳の機能の維持、記憶や学習などの高次機能の促進に関与する効果に大別される。

胎児期、新生児期のいわゆる周産期には、男児や哺乳類のオスでは精巣からテストステロンが分泌され、それが生殖器と脳の雄性化を引き起こす。生殖器にはテストステロンが直接作用するが [34]、げっ歯類ではテストステロンが脳内の P450arom によってエストロゲンに変換され、そのエストロゲンが脳の雄性化を引き起こす [52]。脳にはその重量、視床下部性的二型核、青斑核に解剖学的な性差があり、これは周産期の高感受性期に性ステロイドの作用で不可逆的に生じて一生変化しない [53]。女性や哺乳類のメスにのみ見られる性周期、成熟後の生殖行動の雌雄差もこの時期に確定する [53]。

一方、成熟後の脳に対するエストラジオールの影響力も非常に高い [54]。例えば、エストラジオールを培養神経細胞に作用させると、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) といった記憶・学習機能に関わると考えられるタンパク質の発現が誘導される [55]。海馬培養神経細胞を用いた実験では、エストラジオールが  $\gamma$ -アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid: GABA) の合成を減少させ、細胞の興奮性を増加させることでスパイン形成を調節することが明らかになっている [56]。また、エストラジオールがアルツハイマー病の予防に深く関連していることが明らかとなり [57]、その神経保護作用が注目されている。Chowen らは培養神経細胞を用いた実験で、血清飢餓による細胞死がエストラジオールにより減少することを報告している [58]。同様に酸化ストレスやカイニン酸、興奮毒性などの有害な刺激による神経細胞死をエストラジオールは防ぐ [59, 60]。

従来これらのステロイドホルモンは末梢内分泌腺で合成され、血流によって脳に到達し作用すると考えられていた。しかし近年、脳はステロイドホルモンの標的となるだけでなく、脳自体がステロイドホルモンを合成することが明らかになってきた [61]。

## 1-5. ニューロステロイド

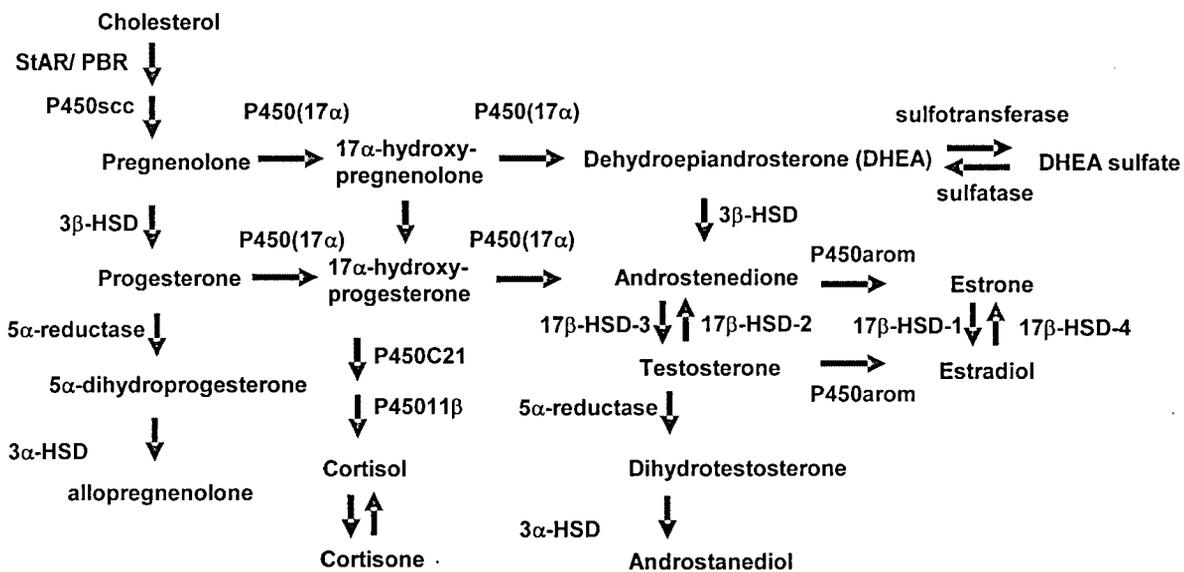
Corpéchet らは、成体ラットの脳内でステロイドホルモン的一种である DHEA が、血中よりも高い濃度で存在することを見出し、さらに、副腎摘出後も DHEA の血中濃度は下がるが、脳内濃度は変化しないことを発見した [62]。プレグネノロン、プロゲステロンについても同様の発見があった [63]。このことから彼等は末梢とは別に脳内で独自にこれらのステロイドが合成されるのではないかという仮説を提唱した [62]。また脳内で合成されるステロイドを末梢内分泌腺が合成する従来の“古典的”ステロイドと区別して、ニューロステロイドと命名した。しかし、脳内のステロイド合成の証明は非常に難航し、新生仔脳から初代培養したグリア細胞や神経細胞でのニューロステロイドの合成は 18 年後に報告された [64]。

Kimoto らは、成体ラットの海馬神経細胞で全てのステロイドホルモンの前駆体であるプレグネノロンが合成されることを報告し [65]、哺乳類の成体の脳内でステロイドが合成されることを初めて示した。現在では海馬など多くの脳領域で末梢内分泌腺と同様、StAR、PBR、 $3\beta$ -HSD、P450arom、P450(17 $\alpha$ )、17 $\beta$ -HSD、 $3\alpha$ -HSD、 $5\alpha$ -reductase などのニューロステロイド合成酵素の発現が明らかになっている [61] (Table1-I、Fig.1-3)。

Table1-I Regional synthesis of steroidogenic enzymes in the brain [61].

	Cortex	Hippocampus	Olfactory bulb	Cerebellum	Thalamus
<b>StAR</b>	+	+	+	+	+
<b>P450scc</b>	++	+	+	+++	+++
<b>P45011<math>\beta</math></b>	+++	+++		+	+
<b>P450(17<math>\alpha</math>)</b>	++	++		+	+
<b>P450arom</b>	+	+			
<b><math>3\beta</math>-HSD</b>	+	+	+	++	++
<b>17<math>\beta</math>-HSD</b>	+	+		+	+
<b>11<math>\beta</math>-HSD</b>	+	+		+	+
<b><math>5\alpha</math>-reductase</b>	+	+	+	+	+
<b><math>3\alpha</math>-HSD</b>	+	+	++	+	+

Expression of the corresponding enzyme in the corresponding brain region; (+/++/+++)  
indicates the level of expression of the enzyme in the region.

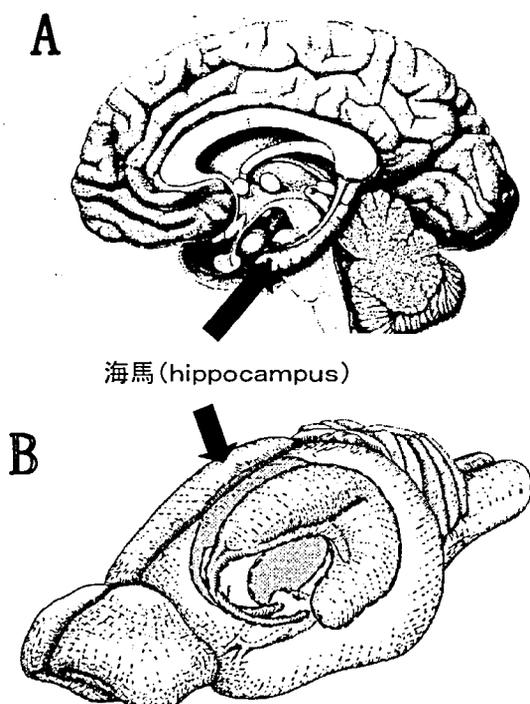


**Fig. 1-3 Pathway of neurosteroidogenesis**

Arrow indicates the specific step mediated by each enzymes and protein [61].

## 1-6. ニューロステロイドの生理作用

ニューロステロイドには様々な生理作用がある。その1つとして神経伝達の調節が挙げられる。ニューロステロイドである硫酸プレグネノロンは、GABAレセプターのネガティブモジュレーターであり [66]、同時に *N*-メチル-*D*-アスパラギン酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate: NMDA)レセプターのポジティブモジュレーターでもあるため神経伝達に影響を及ぼしていると考えられている [67]。同様に、Puia らはニューロステロイドの一種であるアロプレグナノロンが GABAレセプターの開放性を高め、神経伝達の調節を行うことを報告している [68]。また神経新生を誘導する作用もある [69]。さらに、Gonzalez らはプロゲステロンがミエリン鞘の形成を調節することを明らかにした [70]。また DHEA やその硫酸塩をげっ歯類胎仔脳皮質に作用させると、神経突起が成長する [71]。また、ニューロステロイドは記憶・学習といった高次脳機能にも影響している。記憶・学習では海馬がその中枢的な役割を担っている (Fig. 1-4)。ラット海馬に硫酸プレグネノロンを直接投与すると、電気ショックからの逃避行動の頻度で記憶・学習能力を計測する受動的回避試験の成績が向上する [72]。このように、様々なニューロステロイドが脳機能に対し重要な働きをしている。その中で近年注目されているものとしてエストラジオールがある [73]。



**Fig. 1-4 Hippocampus**

The hippocampus is a part of the forebrain, located in the medial temporal lobe. A : human hippocampus in sagittal plane, B : hippocampus in rat brain

## 1-7. ニューロステロイドとしてのエストラジオール

従来、エストラジオールなどの性ホルモンは脳内で *de novo* の合成はされないと考えられていた。その理由はエストラジオール合成系酵素である P450(17 $\alpha$ )が脳内で検出されなかったことにある [74, 75]。そのため性ホルモンは血流を介し脳に達した後に生理作用を発現すると考えられていた [76]。しかし、Hojoらは海馬でエストラジオールが合成されることを証明し、エストラジオールがニューロステロイドであることや、オスラット海馬エストラジオール濃度は血中濃度の約 6 倍であることを示した [77]。また、Kretzら、Prange-Kielらも海馬スライス、海馬分散培養細胞を用いた実験で、海馬がエストラジオールを合成することやその合成が P450arom 阻害剤により阻害されることを報告している [78, 79]。

海馬培養細胞に P450arom 阻害剤を作用させると、スピノフィリンやシナプトフィジンといったシナプスに特異的に発現するタンパク質の発現が減少する。この阻害剤の作用で、スパイン、スパインシナプス数も減少する [78]。この結果は、海馬で合成されるエストラジオールがシナプスやスパイン数に影響することを示している。また、Mukaiらは海馬由来のエストラジオールが長期増強を誘導することを報告している [80]。培養海馬神経細胞を用いた実験により、このステロイドが神経新生や軸索の伸張に関わることも証明された [81, 82]。エストラジオールは血中からも供給される。しかし、シナプス形成の亢進は血中レベルのエストラジオールでは観察されないことから海馬由来のエストラジオールによる効果だと考えられている [78, 81, 82]。海馬で合成されるエストラジオールはシナプスで局所的に合成され高濃度で存在すると考えられる。なぜならばエストラジオール合成酵素である P450(17 $\alpha$ )や P450arom はシナプスで発現しているからである [73]。さらに、Mukaiらは ER $\alpha$ がシナプス後部肥厚で発現していることを報告している [83]。このことはシナプスで局所的に合成されるエストラジオールがシナプスに存在する ER $\alpha$ を介して海馬機能に影響を与えていることを示唆し、その作用形式を ‘synaptocrine’ と呼ぶことを提唱した [84]。

海馬神経細胞由来のエストラジオールは興奮毒性による細胞死とアポトーシスを防ぐ神経保護作用がある [82, 85]。また、P450arom ノックアウトマウスの海馬に神経毒を投与すると、野生型のマウスに比べ細胞死が多く観察される [86]。

以上の実験結果は海馬で合成されたエストラジオールが海馬機能を維持するために欠かせない物質であることを示している。

## 1-8. 海馬エストラジオール合成経路

海馬でエストラジオールは末梢内分泌腺と同様、コレステロールを基質とし、P450などのステロイドホルモン合成酵素による多段階の反応によって合成される [73, 87] (Fig. 1-3)。海馬エストラジオールに関する研究では、合成調節に関する報告は未だ少ない。これまでに報告されているのは、メスラット海馬培養細胞に生理的な濃度 (10nM) の GnRH を 8 日間作用させると海馬エストラジオール合成が亢進することである [88]。また、オスラット海馬スライスに NMDA を作用させると、30 分でエストラジオール合成の亢進が観察される [77]。

## 1-9. 研究の目的と概要

海馬はエストラジオールの合成器官であり、しかもエストラジオールは海馬で大きな生理作用をもつ。よって、その生合成は生理的に調節されていると推定できる。例えば何らかの因子によって生合成が増減するとか、合成量を一定に保つような調節機構が存在するといった場合が考えられる。メスラットでは、その合成が適当な濃度の GnRH で活性化される可能性が示されたが [88]、オスでの変動因子、調節因子はほとんど知られていない。また活性調節の分子メカニズムはまったく分かっていない。

本研究は海馬のエストラジオール合成の調節機構の全貌解明のために、その調節部位、調節因子、関連するシグナル伝達系などについての知見を得ることを目的とした。

まずラット海馬のエストラジオール合成活性が外来物質で変動するかどうかを確認し、エストラジオール合成の調節部位や関連するシグナル伝達系について解析を行った。

海馬のエストラジオールは、脳内で合成されたものと血中由来のものが混在する。そこで、脳内での合成量だけを測定するために、海馬スライス培養を用いた実験系を構築した。

外来物質としては、環境汚染物質のトリブチルスズ、ジブチルスズを用いた。両物質は末梢内分泌腺のステロイドホルモン合成を大きくかく乱する。またこれらは脂溶性であるため脳内に蓄積しやすく、野生動物の脳から高濃度で検出されていて、実際に脳機能に影響を及ぼしている可能性が高い。また、トリブチルスズはレチノイン酸レセプターの一つであるレチノイド X レセプター (retinoid X receptor: RXR) に、ジブチルスズはペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (peroxisome proliferator-activated receptor: PPAR) と強く結合することが報告されている [89, 90]。

海馬でのニューロステロイド合成活性は、副腎皮質などの 1 / 1000 程度であり [73]、その合成活性の定量には大量のラットが必要である。そこでまず、様々な条件で処理した少量の海馬スライスを用い、検出感度が高くサンプルの必要量の少ない real-time RT-PCR 法でエストラジオール合成酵素の mRNA 量を測定して、ニューロステロイド合成が変動する条件を調べた。その結果、細胞毒性が見られる 1 / 10 の濃度である 0.1  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズにより、P450(17 $\alpha$ )や P450arom の mRNA 量が増加することを見出した。この条件で処理した海馬スライスのエストラジオール合成活性を RIA で測定したところ、エストラジオール合成活性の増加が観察された。0.1  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズはウシ副腎皮質細胞のステロイドホルモン合成を強く阻害したが、ラット海馬では、ニューロステロイド合成を活性化した。この活性化の分子メカニズムは、StAR タンパク質の発現亢進ではなく、P450(17 $\alpha$ )や P450arom の転写の活性化によるものであり、その転写は RXR を介したメカニズムであると推定された。

次に、トリブチルスズの実験結果を受けてレチノイン酸の効果を検討した。

レチノイン酸はビタミン A 誘導体であり、いくつかの立体異性体が存在する。all-*trans*-レチノイン酸はレチノイン酸レセプター (retinoic acid receptor: RAR) に結合し、9-*cis*-レチノイン酸は RAR と RXR に結合して生理作用を発揮する [91, 92]。

ラット海馬のスライスに 9-*cis* または all-*trans*-レチノイン酸を作用させたところ、9-*cis*-レチノイン酸を作用させた場合にのみ P450(17 $\alpha$ ) と P450arom mRNA 量の増加が見られた。その他のエストラジオール合成系酵素 mRNA 量は変化しなかった。次に P450(17 $\alpha$ ) タンパク質量をウェスタンブロッティングにより定量したところ、1  $\mu\text{M}$  9-*cis*-レチノイン酸処理により 1.7 倍に増加していた。スライスと培地中のエストラジオール、テストステロンをそれぞれ RIA、EIA で定量したところ、9-*cis*-レチノイン酸処理によってエストラジオール、テストステロン合成が 2-3 倍に増加していた。

本実験では海馬スライスによるエストラジオール合成が 9-*cis*-レチノイン酸で活性化されること、そしてその活性化機構は P450(17 $\alpha$ ) の転写の活性化によって P450(17 $\alpha$ )

タンパク質量が増加したためであることが示唆された。転写の活性化は *all-trans*-レチノイン酸では観察されなかったため、この効果は *9-cis*-レチノイン酸のみが結合する RXR を介したものであろう。

以上のように、スライスを用いた *in vitro* の実験によって、RXR リガンドが海馬エストラジオール合成を活性化すること、その作用機序が、P450(17 $\alpha$ )および P450arom の転写の活性化であることが明らかになった。

海馬スライスに cAMP 誘導体 (ジブチリル cAMP) またはコルチコステロンを作用させたところ、ニューロステロイド合成酵素の中でも特に、P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量の増加が観察された。脳内でも末梢内分泌腺と同様、cAMP 濃度の増加による慢性効果が存在する可能性がある。また、細胞毒性のあるコルチコステロンによっても海馬エストラジオール合成が促進する可能性が示唆された。また甲状腺ホルモンを海馬スライスに作用させたが、生理的な血中濃度範囲 ( $10^{-9}$ – $10^{-8}$  M) ではステロイド合成酵素 mRNA 量に有意な影響はみられなかった。

次に、生育環境が海馬のステロイド合成に与える影響を、ラット個体をもちいた *in vivo* の実験で解析した。

他個体との接触がない社会的孤独環境で幼少期から飼育されたげっ歯類は、ニューロステロイド合成に影響が現れるという報告がある [93]。そこで、ラットを社会的孤独環境で飼育し、海馬エストラジオール合成に対する影響を解析した。実験では 1 ケージにつき 1 匹で飼育する社会的孤独環境群と 2 匹ずつ飼育する 2 匹飼育群に分け、28 日齢から 2 ヶ月間飼育したところ、社会的孤独環境群では StAR、P450(17 $\alpha$ ) の mRNA 量が 2 匹飼育群の約 2 倍に、P450arom mRNA 量は 8 倍に増加した。このとき海馬のエストラジオール量も約 1.3 倍に増加していた。個々のラットのエストラジオール量と StAR、P450arom mRNA 量との相関を解析したところ、有意な正の相関がみられた。

この実験の結果、生育環境が海馬のエストラジオール合成に影響を与えること、そしてその作用機序には P450(17 $\alpha$ ) および P450arom の転写の活性化が関与していることが明らかになった。また社会的孤独環境によるエストラジオール合成の活性化は、StAR タンパク質の発現も関与している可能性がある。

以上のように海馬エストラジオール合成はトリブチルスズ、レチノイン酸といった薬物や、社会的孤独環境のような飼育条件によって活性化された。トリブチルスズやレチノイン酸の作用からは RXR を介して海馬エストラジオール合成が活性化されるという新たな知見が得られた。また、いずれの場合も活性化の機構として、P450(17 $\alpha$ ) の転写の活性化が関与していることが明らかになった。

## 第2章 海馬スライスのエストラジオール合成に対する 外因性、内因性物質の影響－*in vitro* 実験

### 2-1. 有機スズによる影響

ニューロステロイド合成の調節機構を解析するために、まず人工の化学物質によってステロイド合成が変化することを調べ、さらにその作用機序を解析することにした。この研究では、その化学物質としてトリブチルスズ、ジブチルスズを用いた。

トリブチルスズは低濃度で副腎皮質や胎盤、精巣などのステロイドホルモン合成をかく乱する作用があり、また血液－脳関門を容易に通過し、脳に蓄積される。実際、汚染された野生動物の体内のトリブチルスズ含量を測定すると、脳への蓄積量が最も多い。ヒトでも汚染が確認されており、脳への影響が懸念される環境汚染物質のひとつである。

#### 2-1-1. 緒言

有機スズ化合物は工業的に触媒として使用されているほか、特にトリブチルスズは船舶、魚網への貝や藻の付着を防ぐ防汚剤として、また木材防腐剤、消毒剤、パルプ、製糸工場等での殺菌剤としても使用されてきた。船底塗料としての使用は有機スズ化合物の海水中への溶出と魚介類に対する毒性が注目され始めた1980年代より各国で規制が設けられ、日本でも既に使用が禁止されているが、アジアを中心とする発展途上国では今でも使用されている。多くの港湾では未だに底土などから高濃度のトリブチルスズが付近の水域で検出されている[94, 95]。

有機スズ化合物は脂溶性が高いため生物濃縮が起こりやすく、実験室における軟体動物や魚類による研究で、トリブチルスズについて7000までの生物濃縮係数が、また野外研究ではそれ以上の高値が報告されている。海水中の有機スズは海底に溜まりやすく、貝類ではしばしば高濃度で検出されており、特に軟体動物は感受性が高く、カキで奇形や生息数の減少が報告されている[96]。その他にも腹足類メスに雄生殖器が発生する現象も広く観察されており、生殖障害と個体数減少を引き起こす[97]。有機スズによる汚染は多くの動物、特に海生生物において報告されており[98]、カナダ近海で採取された軟体動物からはトリブチルスズ233 ng / gが検出されている[99]。また、日本近海に生息する海生哺乳類（イシイルカ）の脳からも比較的高濃度のトリブチルスズ(350 ng / g wet wt.)が検出されている[100]。

有機スズ化合物はまた、主に魚介類といった人間の食料、飲料水への混入も認められ、これらは工業排水からの寄与や包装ビニール類、水道管パイプからの溶出であるという[101]。ヒトにおける一日最大摂取量は0.25 mg / kg body weightであると提唱されている[101]。Kannanらはミシガン州在住のヒトから血液を採取し、有機スズ類の血中濃度を測定している[102]。それによると、総ブチルスズ化合物血中濃度の平均は21 ng / ml、最大で101 ng / mlであった。この最大量は海生哺乳類の水準に匹敵するものである。トリブチルスズは環境中においては紫外線による光分解を受けて分解されるほか、生体においては微生物による分解、及び高等生物の肝臓で代謝を受け、脱ブチル体であるジブチルスズ、続いてモノブチルスズへと変換される[103]。環境中に比べ生体中の

モノブチルスズ、ジブチルスズの割合が高いのはトリブチルスズの代謝により生成した結果であると思われる。このように工業的な有機スズ化合物の使用、それによる環境中への流出は人体の健康を考える上で関心を集めてきている。

有機スズの毒性を生化学的に明らかにする試みも多くなされている。Cookeらはトリブチルスズがヒト P450arom 活性を基質競合的に阻害することを報告している [104]。同様に、ヒト絨毛細胞株のミクロソーム分画を用いた同様の実験でも P450arom 活性はトリブチルスズにより阻害される [105]。しかし、いずれの実験においても、その作用濃度は数  $\mu\text{M}$ –数十  $\mu\text{M}$  であり、通常の動物細胞は完全に死滅する濃度である。しかし、一方で極微量のトリブチルスズによる影響も報告されている。Yamazakiらは環境濃度以下 (0.01  $\mu\text{M}$ ) のトリブチルスズがウシ副腎ステロイド合成を抑制することを報告している [106]。さらに、ヒト絨毛細胞を用いた実験でも 0.01  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズが P450arom 発現誘導に関与していることが明らかになっている [89]。

これらのことから環境中に存在する有機スズによってもニューロステロイド合成が影響されることは十分考えられる。前述の様に、海馬はエストラジオールを合成する。海馬由来のエストラジオールはスパイン形成、神経新生などに関わる非常に重要な物質である [78, 82]。もし、海馬エストラジオール合成が有機スズにより影響されるならば、海馬機能も影響されることが懸念される。よって、本実験では外因性物質として有機スズを作用させ、海馬エストラジオール合成に対する影響を解析した。

前述の様に、海馬のエストラジオールは脳内で合成されたものと血中由来のものが混在する。本研究はラット海馬が合成するエストラジオールに焦点を当てているので、血中からのステロイド供給を回避できる実験系を用いねばならない。また、海馬で神経細胞は一様に分布しているのではなく、CA1–3、歯状回といったある特定の部位に局在し、互いに神経ネットワークを構築する [107]。より生体内に近い状態で実験を行うためには、この神経ネットワークを保持せねばならない。これらの理由からラット海馬スライス培養を用いエストラジオール合成の研究を行った。また、幼齢ラット海馬に比べ、成体ラット海馬は非常に脆弱で、スライス作成段階で細胞が弱ってしまい培養には適さない。よって本研究では海馬スライス培養が可能で、比較的多くのスライスが作成できる 10 日齢ラットを用いた。

## 2-1-2. 実験方法

### ラットの自家繁殖法

8週齢の Wistar rat のオスとメスを清水実験動物から購入した。オスとメスを1匹ずつ同じケージに1週間入れ、メイティングさせた。メイティング終了後、オスとメスは別々のケージに入れた。交尾後3週間ほどで仔ラットが10匹前後生まれる。仔ラットの性別は肛門性腺間距離を比較することで区別した。出産したメスは次のメイティングまで1ヶ月間休養をとらせた。本実験は広島大学動物実験委員会の許可を得て行った。

### ラットからの海馬摘出法

#### 【実験器具】

##### ○解剖用具

解剖用はさみ×1、メスの柄×2(+刃)、ピンセット×4、先を直角に曲げたマイクロスパーテル、バット

##### ○ハンクス溶液 (HBSS); Sigma

#### 【実験方法】

10日齢のラットをピンセットでつかみ、解剖用はさみで首を切り落とし、頭皮を取り去った。頭蓋を正中に沿って切り、その頭蓋をピンセットでつまんで左右に広げ、脳をマイクロスパーテルで掻き出し、冷却し、HBSSの入ったシャーレの中に入れた。正中面で脳を半切した。一本のピンセットで脳幹と小脳のついた組織を軽く持ち上げ (Fig.2-1-1, A)、もう一方のピンセットで後頭部後端を軽く押さえ、脳幹を持ち上げると白い海馬采が三ヶ月状に見える (B)。これにメスで直角に切り込みを入れた (C, D)。この状態になると海馬は反転させることができる。上手く反転しない時はピンセットの先で、反転の邪魔になる組織を切った (E, F)。海馬が反転したら、海馬と脳をつなげている脳組織をメスで切断し、海馬を単離した (G)。海馬についている余分な組織をできるだけ残さないように取った (H)。

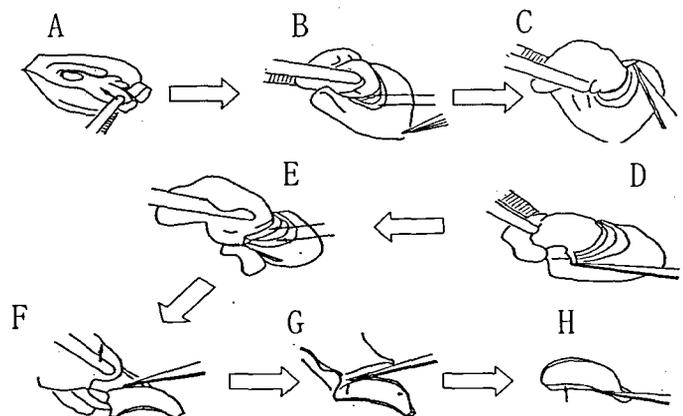


Fig. 2-1-1 海馬摘出法

## ラット海馬スライス培養法

### 【実験器具】

- フィルター (小); Gelman Science 4612 Super acrodisc 25 0.2  $\mu\text{m}$
- フィルター (大); MILLIPORE SVGSB 1010 STERIVE - GS 0.22  $\mu\text{m}$
- マイクロスライサー; DOSAKA EM
- 混合ガスボンベ ( $\text{O}_2$ 、95 %  $\text{CO}_2$ 、5 %); 中村酸素
- 培養プレート (マルチプレート 6F MS-80060); SUMILON
- 恒温槽; EYELA NTS-120; Tokyo Rikakikai
- オートクレーブ; TOMY HIGH PRESSURE STEAMSTER IL/ZER BS-305
- 培養プレートインサート (MILLICELL BIOPORE PICM ORG 50); Millipore
- 先端を切ったパスツールピペット
- アロンアルファ
- プラスチックシャーレ
- 寒天の型
- 保冷剤 (シャーレを押し付けて冷凍し、型を付けておく)
- ろ紙

### 【試薬】

- ポリ-L-オルニチン溶液; Sigma
- ウマ血清; GIBCO BRL
- 結晶ペニシリン G カリウム明治、硫酸ストレプトマイシン、カナマイシン硫酸塩; 明治製菓
- 寒天末 (ゲル化温度 30–31  $^{\circ}\text{C}$ ); nacalai tesque
- Minimum Essential Medium (MEM); Sigma
- ハンクス溶液 (HBSS); Sigma

### 【培地等の調製】

#### ○MEM (–)

MEM 12.1 g、 $\text{NaHCO}_3$  2.2 g を滅菌水で 1 L にメスアップした後、フィルター (大) でろ過滅菌した。

#### ○無血清培地

試薬	加える量	終濃度
MEM(–)	150 ml	75 %
HBSS	50 ml	25 %
カナマイシン	25 $\mu\text{g}$	0.125 $\mu\text{g} / \text{ml}$
ストレプトマイシン	50 mg	0.25 mg / ml
ペニシリン	50000 Unit	250 unit / ml

使用前、培地に L-グルタミンを加えた。

L-グルタミン 0.0292 mg を HBSS 2 ml に溶解後、フィルター (小) を用いてろ過滅菌しながら培地 200 ml の入っているビンに加えた。

#### ○血清入り培地

以下の試薬を混合後、フィルター (大) でろ過滅菌した。

試薬	加える量	終濃度
ウマ血清	50 ml	25 %
MEM (-)	100 ml	50 %
HBSS	50 ml	25 %
カナマイシン	25 $\mu$ l	0.125 $\mu$ g / ml
ストレプトマイシン	50 mg	0.25 mg / ml
ペニシリン	50000 Unit	250 unit / ml

使用前、上記のように培地に L-グルタミンを加えた。

#### ○寒天溶液

寒天末 1.5 g と HBSS 50 ml をフラスコに取り、電子レンジで加熱して寒天を溶かした。その後は恒温槽で 47 °C に保温した。

#### 【実験方法】

##### (オルニチンコート)

スライス作成前日にポリ-L-オルニチン溶液 200  $\mu$ l を培養プレートにセットしたミリセル培養プレートインサートに入れ、CO<sub>2</sub> インキュベーターの中でオーバーナイトでコーティングした。

##### (スライス作成)

スライス作成当日に、ミリセル培養プレートインサート上のポリ-L-オルニチン溶液をピペットマンで吸い取った。さらに、ミリセル培養プレートインサートに HBSS を入れ、ピペットマンで吸い取ることで、ポリ-L-オルニチン溶液を洗い流した。

その後、HBSS を氷冷しながら 30 分以上 95 % O<sub>2</sub>、5 % CO<sub>2</sub> の混合ガスでバブリングし、酸素を飽和させた。保冷剤上で冷却したシャーレの中に HBSS を入れ、摘出した海馬を入れた。寒天の型に溶けた寒天を流し込み、海馬を埋め、氷水で冷やして固めた。型から寒天を出して、剃刀でその形を直方体に整えた。マイクロスライサーのチャンバーに寒天をアロンアルファで固定し、HBSS を少し入れた。チャンバーをスライサーにセットし、寒天の上面まで HBSS を注いだ。スライサーの刃をその液面まで降ろした。刃を forward 方向に動かして寒天ごと海馬を切り、切り終わったら reverse 方向に刃を戻し、スライサーのダイヤルを回して刃を 300  $\mu$ m 降ろし、また寒天ごと海馬を切った。これを何度も繰り返してスライスを作成していった。その際、海馬に付着した寒天を除きながら行った。スライスを先端を切ったパストツールピペットで吸い取り、オルニチンコートしたミリセル培養プレートインサート上に乗せた。ミリセル培養プレートインサート上の余分な HBSS を吸い取った。培養プレートには予め 1.1 ml の血清入り培地を入れておき、その上にスライスの乗ったミリセル培養プレートインサートを置い

た。その後 CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C、5 % CO<sub>2</sub>) に入れて培養を開始した。

ラット海馬スライス、培地からのエストラジオール抽出・精製法

#### 【実験器具】

- セルスクレイパー; IWAKI
- 先鈍ピンセット
- アシストチューブ (2 ml)
- ジルコニアボール (直径 5 mm)
- C18 カラム; Amersham Octadecyl C18 minicolumns
- 5 ml ガラスシリンジ
- 振揺型細胞破碎機; TOMY Microsmash
- ミックスター; TAITEC A-14
- 卓上遠心機; KUBOTA5010
- マイクロ遠心機; TOMY MR-150
- シンチレーションカウンター; ALOKA LSC-6100

#### 【準備試薬】

- 溶出用 NaCl 溶液; 100 ml  
NaCl 5.844 g を 100 ml のミリ Q 水に溶解した (終濃度 150 mM)
- RIA 緩衝液 (pH7.0-7.2); 2 L  
0.1 M リン酸ナトリウム、0.15 M NaCl、0.2 % (W / V) NaN<sub>3</sub>、1 % (W / V) ゼラチン (蒸留水 500 ml を 50 °C 以上に加熱し、ゼラチン 2 g を加えて完全に溶かした。NaHPO<sub>4</sub> 17.3 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 12.1 g、NaCl 17.5 g、NaN<sub>3</sub> 0.4 g を加えて全量 2 L にした。pH を 7.0-7.2 に合わせた。)
- (<sup>3</sup>H)<sub>6</sub>-エストラジオールストック溶液 (およそ 5000 cpm / 100 μl); 1 ml  
5 μl の [2, 4, 6, 7, 16, 17-<sup>3</sup>H]-estradiol 原液 (GE Healthcare) を瓶の底に入れ、ドラフトチャンバーで空気を噴きつけトルエンを飛ばし、ホルモン測定用エタノールを 1 ml 加えた。これを冷凍庫に保管した。
- メタノール (ホルモン測定用); nacalai tesque  
ミリ Q 水で 40 %、80 %メタノールを調製した。

#### 【実験方法】

溶出用 NaCl 溶液はあらかじめ氷冷しておいた。海馬スライスを培養した後、ミリセル培養プレートインサートをピンセットでつかみ、ピペットマンで培地を吸い取り、遠心用チューブに移した。ミリセル培養プレートインサートの表面と裏についている培地も吸い取った。ミリセル培養プレートインサート上のスライスをセルスクレイパーでかき集め、100 μl の溶出用 NaCl 溶液を加え、チップの先を切ったピペットマンで細胞を残さないように吸い取り、別の遠心用チューブに移した。4-6well 分を 1 本のチューブに回収した。1 プレート回収したら、細胞を回収した遠心用チューブの中の上清を、細胞回収時に用いた先を切ったチップを付けたピペットマンで吸い取り、回収し終えた

ミリセル培養プレートインサート上にもう一度加え、セルスクレイパーでミリセル培養プレートインサート表面上に残った海馬スライスをもう一度かき集め、細胞を回収した遠心用チューブにうつしとった。細胞を回収し終えたチューブ内の液量は、溶出用 NaCl 溶液でおよそ 1.1 ml に調整し、microsmash でホモジナイズした (4800 rpm、30 sec)。海馬スライスが完全にホモジナイズされたら蓋つき試験管 (15 ml) に 1 ml ずつとり、回収率測定のために、 $(^3\text{H})_6$ -エストラジオールを 20  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。残りはタンパク定量に用いた。また回収した培地は分液漏斗ずつとり、回収率測定のために、 $(^3\text{H})_6$ -エストラジオールを 20  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。

スライスサンプルの入った蓋つき試験管 (15 ml) にサンプルの 4 倍容のヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 3 を加え、ミックスタワー (TAITEC A-14) で 30 min 振とうした後、メタノール 500  $\mu\text{l}$  を加えてから遠心分離 (KUBOTA5010、2500 rpm、25 min) し、液体窒素で水層を凍らせて有機層のみを試験管に移した。温水につけながら空気を吹き付け抽出物を乾固させた後、100 %メタノール 400  $\mu\text{l}$  を加えて攪拌し、懸濁液をエッペンドルフチューブにうつしとった。そこに 600  $\mu\text{l}$  のミリ Q 水を加えてメタノール濃度を 40 % とし、遠心分離 (TOMY MR-150 15000 rpm、5 min) した。

培地サンプルは分液漏斗を用いて抽出操作を行った。分液漏斗に培地サンプルとその 4 倍容のヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 3 を加え、激しく振蕩し (3 min)、有機層を三角フラスコ (100 ml) に回収した。同様の操作をもう一度繰り返した。その後、温水につけながら空気を吹き付け抽出物を乾固した。乾固した三角フラスコにクロロホルム (3 ml) を加え残査を溶解し、試験管に移した。この操作は 3 回繰り返し、残査をできる限り回収した。その後、温水につけながら空気を吹き付け抽出物を乾固した。

5 ml のガラスシリンジを用いて C18 カラムを 1 ml の 100 %メタノールで 2 回洗い、1 ml のミリ Q 水で 2 回、さらに 1 ml の 40 %メタノールで 2 回洗ってカラムを活性化した。

活性化したカラムに抽出物 (40 %メタノール溶液) をピペットマンでロードし、ガラスシリンジで空気を注入して完全にカラムに吸い込ませ、すぐに 2 ml の 40 %メタノールをカラムに通して洗浄し、洗浄液を試験管に回収した。続けて 3 ml の 80 %メタノールをガラスシリンジでカラムに通してステロイドを溶出した。溶出液は別の試験管に回収し、さらに続けて 2 ml の 100 %メタノールをカラムに通し洗浄し、洗浄液を別の試験管に回収した。回収した溶出液と洗浄液をそれぞれ温水につけて、空気を吹き付けて完全に溶媒を蒸発させた。40 %メタノール洗浄液、100 %メタノール洗浄液を乾固した試験管には 200  $\mu\text{l}$  の 100 %メタノールを加え、1 ml のシンチレーションカクテル入りのエッペンドルフチューブに移し、放射能を測定した (ALOKA LSC-6100)。

80 %メタノール溶出物を乾固した試験管に RIA 緩衝液を加えて溶出物を溶解した。

## 放射性免疫測定法 (radio immuno assay: RIA)によるエストラジオールの定量法

### 【実験器具】

- マルチディスペンサー; NICHIRYO
- ガラスチューブ (110×75 mm)
- 卓上遠心機; KUBOTA5010
- 液体シンチレーションカウンター; ALOKA LSC-6100

### 【準備試薬】

- RIA 緩衝液 (pH7.0-7.2); 2 L  
組成はラット海馬スライス、培地からのエストラジオール抽出・精製法の【準備試薬】参照。
- エストラジオール標準溶液  
17 $\beta$ -estradiol; Sigma  
エストラジオールをマイクロ天秤で数 mg 精標した。エタノールに溶解させ 10 mM にし、それを 10  $\mu$ l とって 990  $\mu$ l のホルモン測定用エタノールを加え終濃度 0.1 mM エストラジオールのエタノール溶液を調製した (エストラジオールストック溶液)。エストラジオールストック溶液を RIA 緩衝液で 1 / 10000 に希釈して 10 nM にし、それをさらに RIA 緩衝液で希釈して 1. 0.005 pmol / 200  $\mu$ l, 2. 0.01 pmol / 200  $\mu$ l, 3. 0.02 pmol / 200  $\mu$ l, 4. 0.05 pmol / 200  $\mu$ l, 5. 0.1 pmol / 200  $\mu$ l, 6. 0.2 pmol / 200  $\mu$ l, 7. 0.5 pmol / 200  $\mu$ l をそれぞれ 2 ml ずつ調製した。希釈液は保存できないので、用事調製した。
- チャーコール懸濁液; 500 ml  
Dextran T-70; Pharmacia  
NoritA; nacalai tesque  
Dextran T-70 0.625 g を RIA 緩衝液 1 L に溶解し、NoritA 6.25 g を加え、20 min ロータリーシェーカーで攪拌した (スターラーを使ってはいけない)。
- (<sup>3</sup>H)<sub>6</sub>-エストラジオールストック溶液 (およそ 5000 cpm / 100  $\mu$ l); 3 ml
- 抗エストラジオール抗体  
RIA 緩衝液で 1 / 5000 に希釈した。
- シンチレーションカクテル; 液体シンチレーション用特製試薬 Clear-sol I ; nacalai tesque

### 【実験方法】

ガラスチューブに番号を記入し、下表のように RIA 緩衝液、エストラジオール標準溶液、サンプルを入れたのち、マルチディスペンサーを用いて(<sup>3</sup>H)<sub>6</sub>-エストラジオール、抗エストラジオール抗体を加え、vortex mixer で攪拌した。なお、サンプルは希釈を 3 段階で変えてそれぞれを測定した (サンプル溶液 200  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 100  $\mu$ l +RIA 緩衝液 0, 50, 100  $\mu$ l など)。

No.1~18:エストラジオール標準溶液 (表では標準液と示す)、No.19~:サンプル

No.1,2	RIA 緩衝液 300 $\mu$ l	$+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
3,4	RIA 緩衝液 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
5,6	標準液 1 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
7,8	標準液 2 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
9,10	標準液 3 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
11,12	標準液 4 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
13,14	標準液 5 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
15,16	標準液 6 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
17,18	標準液 7 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)
19 ~	サンプル 200 $\mu$ l	+Anti-serum 100 $\mu$ l $+(^3\text{H})_6$ -エストラジオール 100 $\mu$ l (約 5000 cpm)

冷蔵庫中でオーバーナイトでインキュベートした後、すべてのチューブにマルチディスペンサーを用いてチャーコール懸濁液を 100  $\mu$ l ずつ加えて攪拌し、冷蔵庫で 4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min インキュベートした。卓上遠心機で遠心分離 (KUBOTA5010、2500 rpm、10 min) し、上清をシンチレーションカクテル 1 ml の入った 2 ml エッペンドルフチューブに移し、よく攪拌して放射能を測定した (ALOKA LSC-6100)。エストラジオールの回収率は、サンプル溶液のうち 300  $\mu$ l を、シンチレーションカクテル 1 ml の入ったエッペンドルフチューブに入れて測定した放射活性と、先にとっておいた 20  $\mu$ l の  $(^3\text{H})_6$ -エストラジオールに 280  $\mu$ l の RIA 緩衝液とシンチレーションカクテル 1 ml を加えて測定することで算出した (ALOKA LSC-6100)。

## ラット海馬スライスの細胞死の Propidium Iodide (PI)による定量法

### 【実験器具】

- エッペンドルフチューブ (1.5 ml)
- 培養ディッシュ ( $\phi 35 \times 14$ mm); スミロン MS-10350
- 落射蛍光顕微鏡仕様のアキシオバード 135; カールツァイス
- 対物レンズ; ZEISS Plan-NEOFLUAR  $5 \times 0.15$
- 蛍光用リフレクタスライダ (BP 365 / FT 395/LP 397)

### 【実験試薬】

- Propidium Iodide solution (PI); Sigma  
1 mg / ml PI solution 10  $\mu$ l をミリ Q 水 4.94  $\mu$ l に加え、1 mM に希釈した。
- L-グルタミン酸; nacalai tesque  
1 L のミリ Q 水に L-グルタミン酸を加え、5 M NaOH を加え pH を 7 前後に調整しながら溶解させ 1 M にした。

### 【実験方法】

スライス培養を 35 mm ディッシュ上で行なった。スライス作成から 21 時間後、1 mM PI を 2.2  $\mu$ l ずつ培地に加え終濃度 2  $\mu$ M にして 3 時間インキュベートし、下記の方法で蛍光顕微鏡像を撮影した (バックグラウンドの撮影)。その後、培地を無血清培地へ交換しスライスにトリブチルスズ (0.01–1  $\mu$ M) と 2.2  $\mu$ l の 1 mM PI を同時添加し、48 時間後に蛍光顕微鏡像を撮影した。その後、培地に 1 M L-グルタミン酸 55  $\mu$ l 加え (終濃度 50 mM)、24 時間インキュベートし海馬スライス中の細胞を死滅させ蛍光顕微鏡像を撮影した。

蛍光顕微鏡での撮影には、 $5 \times 0.15$  の対物レンズを使用した。まず水銀ランプの電源を入れた。ラット海馬スライスを 35 mm ディッシュごと蛍光顕微鏡のステージにのせ、ハロゲンランプを用いて、スライスにピントを合わせた。このとき、スライダをシャッタのポジションにしておいた。その後、ハロゲンランプを消し、スライダを引いて蛍光光路を開けた。ダメージを受けた細胞が赤く光っていることを確認し、光路分割ロッドをひき画像をデジタルカメラ経由でコンピューターに取り込ませて撮影した。撮影した画像は、画像処理ソフト「Image J」を用いて、死細胞から発せられる赤色蛍光を数値化し、無処理スライスに対するトリブチルスズ処理スライスの死細胞の割合を算出した。

## ラット新鮮海馬の total RNA 抽出法及び cDNA 合成法

### 【実験器具】

- 振揺型細胞破碎機; TOMY Microsmash
- 遠心機; TOMY MR150
- アシストチューブ (2 ml)
- ジルコニアボール (直径 5 mm)
- 逆転写装置; ASTEC プログラムテンプコントロール PC-707
- 微量分光光度計 (Nanodrop); Thermo SCIENTIFIC

### 【準備試薬】

- RNeasy Protect Mini Kit; Qiagen
  - Buffer RLT
  - Buffer RW1
  - Buffer RPE
  - Total RNA 抽出用カラム
- DNase I (RNase-free); TAKARA
  - DNase I
  - 10×RNase-free DNase buffer
- PCI 溶液
  - フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1 になるように調製した。
- 10mM dNTPs; TOYOBO
- ReverTra Ace; TOYOBO
  - ReverTra Ace
  - 5×ReverTra Ace 緩衝液
- Random primer; TOYOBO

### 【実験方法】

#### ・ total RNA 抽出

抽出した新鮮海馬を、600  $\mu$ l の Buffer RLT と共に 2 ml のエッペンドルフチューブ、または 2 ml のアシストチューブ内に回収した。2 ml エッペンドルフチューブに回収した場合は、ポリトロンを用い、目盛り 5 で 30 sec のホモジナイズを行った。ポリトロンのブレードは 1 サンプル毎に Buffer RLT で洗った。アシストチューブに回収した場合は、前もってチューブ内にジルコニアボールを 1 個入れておき Microsmash で 4800 rpm、30 sec 処理を行い、海馬をホモジナイズした。タンパク定量用として 600  $\mu$ l のホモジネートから 30  $\mu$ l を別のチューブに移した。ホモジネートを 15000 rpm、20  $^{\circ}$ C で 3 min 遠心分離後、上清を新しいチューブに移した。上清と同量 (600  $\mu$ l) の 70 % エタノール (20  $^{\circ}$ C) を加え、ピペットマンで混合した。この 1200  $\mu$ l のサンプルを 2 回に分けて (600  $\mu$ l ずつ) 2 ml チューブにセッティングした total RNA 抽出用カラムにアプライし、15000 rpm、20  $^{\circ}$ C で 15 sec 遠心分離後、フロースルーは捨てた。次に 350  $\mu$ l の Buffer RW1 を total RNA 抽出用カラムにアプライし、15000 rpm、20  $^{\circ}$ C で 15 sec 遠心分離後、フロースルーは捨てた。再度、350  $\mu$ l の Buffer RW1 を total RNA 抽出

用カラムにアプライし、15000 rpm、20 °Cで15 sec 遠心分離後、フロースルーを捨てた。そして、500 µl の Buffer RPE を total RNA 抽出用カラムにアプライし、15000 rpm、20 °Cで2 min 遠心分離後、フロースルーは捨てた。total RNA 抽出用カラムを新しいチューブにセットし、15000 rpm、20 °Cで1 min 遠心分離し、完全に total RNA 抽出用カラムのメンブレンを乾燥させた。total RNA 抽出用カラムを新しいチューブにセットし、RNase-free 処理水 50 µl をメンブレンに直接添加し 10 min インキュベートし、その後 15000 rpm、20 °Cで1 min 遠心分離した。もう一度、total RNA 抽出用カラムに RNase-free 処理水 50 µl をアプライし、15000 rpm、20 °Cで1 min 遠心分離し、total RNA サンプルを得た (total volume 100 µl)。

・ DNase 処理

100 µl total RNA サンプルに DNase 2 µl、RNase-free DNase buffer 5 µl を加え、DNase 処理 (37 °C 40 min)を行った。DNase 処理した total RNA サンプル (100 µl) に PCI 溶液を 100 µl 入れ、激しく攪拌した。15000 rpm、15 sec 遠心分離し、水層を 100 µl 回収した。フェノール層にもう一度 100 µl RNase-free 水を入れ、攪拌後 15000 rpm、15 sec で遠心分離して、100 µl の水層を回収した (total 200 µl)。水層に、3 M CH<sub>3</sub>COONa 20 µl、100 % エタノール 500 µl を加えた後、5 min 放置した。その後、15000 rpm で 20 min 遠心分離した。遠心分離後、上清を捨てその後 1 ml の 70 % エタノールを加え、攪拌し 15000 rpm で 2 min 遠心分離した。上清を捨て乾燥させ、30 µl の RNase-free 水を加え total RNA サンプルとした。

微量分光光度計 (Nanodrop)を用いて、サンプル 1.2 µl から濃度を求めた。また、RNA の純度は OD260 / OD280 が 1.8 以上であることで確認した。

・ 逆転写反応

total RNA、サンプルの吸光度から濃度を計算し 5 µg 分の total RNA サンプルをとり、RNase-free 水を加えて体積が 12.5 µl となるようにした (RNA 溶液)。以下のように試薬を調製し逆転写反応を行った。逆転写反応はアニーリング (30 °C、10 min)、酵素反応 (42 °C、60 min)、変性 (99 °C、5min)の条件で行った。

	必要量	終濃度
RNA溶液	12.5 µl	-
10 mM dNTPS	2 µl	1 nmol / µl
5×ReverTra Ace 緩衝液	4 µl	-
Random primer	0.5 µl	25 pmol / µl
ReverTra Ace	1 µl	100 unit / µl

## Real-time PCR による mRNA 絶対量の測定

### 【実験器具】

- Light Cycler; Roche
- Light Cycler capillary; Roche
- Mupid-21; コスモバイオ
- PC-707; ASTEC

### 【準備試薬】

- Freeze'N Squeeze DNA Gel Extration Spin Column; Bio-Rad
- SYBR Green Real-time PCR Master Mix; TOYOBO
- KOD-Plus; TOYOBO

### 【実験方法】

#### ・ PCR プライマー

universal probelibrary (<http://www.universalprobelibrary.com>)で PCR プライマーを設計し、Operon Biotechnologies に注文した。

#### ・ 定量用標準 cDNA 断片の作成

PCR により定量する対象の mRNA と相補的な cDNA 断片を増幅させた (KOD-Plus; TOYOBO)。P450scc、P450(17 $\alpha$ )定量用標準 cDNA 断片はそれぞれ、ラット副腎、卵巣から抽出した total RNA をテンプレートに用いた。その他の酵素に関してはラット海馬の total RNA をテンプレートに用いて定量用標準 cDNA 断片を作成した。PCR 後のサンプルを電気泳動し (Mupid-21; コスモバイオ)、目的のバンドが含まれる部分のゲルを剃刀で切り出し、Freeze'N Squeeze DNA Gel Extration Spin Column を用いて目的の cDNA 断片を精製した。精製した cDNA 溶液の吸光度と目的の cDNA 断片のモル吸光係数から、精製した cDNA 溶液 1  $\mu$ l あたりに目的の cDNA 断片が何分子存在するかを計算した。モル吸光係数は、各 PCR 産物を構成するヌクレオチド残基のモル吸光係数の総和である。この値をそれぞれの溶液のモル濃度で割ることでモル吸光係数を求めた。この値から目的の cDNA 断片が 1  $\mu$ l 当たり 1、10、100、1000、10000、100000 分子入っている標準溶液を作成した。PCR 産物は BigDye terminator v1.1 cycle sequencing kit (ABI)を用いて ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)でシークエンスし目的の配列が正確に増幅されているかを確認した。

• real-time PCR

各酵素 cDNA 標準溶液を real-time PCR して Threshold Cycle (Ct)を求め、標準曲線を描いた。Ct とは real-time PCR によって増幅される蛍光が検出され始める PCR サイクル数を示す。標準曲線から各酵素 cDNA の real-time PCR の 1 サイクル当たりの増幅効率を求めることができる。P450(17 $\alpha$ ) cDNA の PCR 効率は 1.7 倍であったが、他の酵素 cDNA は 1.95–2.05 倍であった。

10 日齢 オスラットの海馬から抽出した total RNA を逆転写し、cDNA を合成した。海馬 cDNA と、各酵素 cDNA 標準溶液を real-time PCR し、各酵素 cDNA の標準曲線から反応溶液中に何分子の目的となる mRNA があるかを算出した。また、1 mg タンパク質あたりの total RNA 量を求めた。この値から海馬にエストラジオール合成系酵素 mRNA の mg タンパク質あたりの分子数を算出した。

以下に本実験で行った real-time PCR 条件と使用したプライマーの配列を示す。

Gene	primer sequence (forward)	primer sequence (reverse)	length (bp)	annealing temperature (°C)	annealing time (sec)	elongation time (sec)
G3PDH	5'-AACGACCGCTTCATTGACCTC-3'	5'-CCTTGACTGTGCGGTGAAC-3'	83	55	5	15
SIAR	5'-GCAAAAGCGGTGCATCAG-3'	5'-GGCGAACTCTATCTGGTCT-3'	172	55	5	15
P450osc	5'-TATTCGGCTTGGCCTTGGAG-3'	5'-CACGATCTCCTCAAACATCC-3'	74	66	10	20
3β-HSD	5'-AGGCCTGTGTCCAAGTAGTGT-3'	5'-CTCGGCCATCTTTTGTGTAT-3'	161	60	10	8
P450(17α)	5'-CATCCCCACAAGGCTAAC-3'	5'-TGTGTCTTGGGGACAGTAAA-3'	61	62	10	20
17β-HSD-1	5'-CTGAATTGGGATGGTCTGC-3'	5'-GGCTACATAGTGAACCTTGTCT-3'	133	58	20	10
17β-HSD-3	5'-CTGACTTGGACAACACCAT-3'	5'-CTGTCAACAGTGGAAACCG-3'	159	55	20	10
17β-HSD-4	5'-GACGCCTCAAGGATGTTGG-3'	5'-AGCCGTTCTTCAGTCAAT-3'	117	55	20	10
P450arom	5'-ATCGGAAGAATGCACAGG-3'	5'-AGTGTAAACAGGACAACTTT-3'	170	66	10	20
Ad4BP / SF-1	5'-GAGGGTTGGCATGACTT-3'	5'-GCTCGGATGTCTCTGAGCA-3'	156	55	10	15
ERα	5'-GCACATTCCTACAAACCTACT-3'	5'-AGTCATAAGGACATGGTAAA-3'	129	59	10	20
ERβ	5'-CGCTTCGAGGGTACAAAGT-3'	5'-ACCAAGGCAGCCCTAAGA-3'	189	59	10	20

各プライマーは forward と reverse を等量ずつ混合し、RNase-free 水で 5 μM に希釈した。各々の酵素、タンパク mRNA の real-time PCR は以下のよう に 試薬を調製 した。

Gene	Master Mix (μl)	primer (μl)	RNase-free water (μl)	template (ng)
G3PDH	5	1	3	100
SIAR	5	1	3	100
P450osc	10	4	0	600
3β-HSD	5	2	0	300
P450(17α)	10	4	0	600
17β-HSD-1	5	2	1	200
17β-HSD-3	5	1	3	100
17β-HSD-4	5	1	3	100
P450arom	5	2	0	300
Ad4BP / SF-1	5	1	3	100
ERα	5	1	2	200
ERβ	5	1	2	200

Master mix: SYBR Green Real-time PCR Master Mix

## 海馬スライスの有機スズ処理法

### 【準備試薬】

○Tri-n-butyltin Chloride (TBT); 東京化成

○Di-n-butyltin Dichloride (DBT); 東京化成

ホルモン測定用エタノールで1 M 溶液を作成し、それをエタノールで希釈して10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1 mM、10 mM のTBT、DBTストック溶液を調製した。

### 【実験方法】

ラット海馬スライスの培養を開始して24時間経過後、培地を無血清培地に交換した。その際、有機スズのエタノール溶液を無血清培地の1/1000量(1.1  $\mu$ l)加え、よく混合した。無処理スライスの培地にはホルモン測定用エタノールを1.1  $\mu$ l加えた。有機スズ処理は48時間行った。

## 海馬スライスからの total RNA 抽出、cDNA 合成、mRNA 定量法

### 【実験方法】

海馬スライスにトリブチルスズを48時間作用させた後、先鈍ピンセットでミリセル培養プレートインサートをつかみ、表面と裏についている培地をピペットマンで吸い取った。ミリセル培養プレートインサート上のスライスをセルスクレイパーでかき集め、Buffer RLT 300  $\mu$ l を添加して、チップの先を切ったピペットマンで細胞を残さないように吸い取り、2 ml のエッペンドルフチューブ、または2 ml のアシストチューブ内に回収した。再度 Buffer RLT 300  $\mu$ l を添加して同様の操作を行い、total 600  $\mu$ l とした。2 ml エッペンドルフチューブに回収した場合は、ポリトロンを用い、目盛り5 (30 sec) のホモジナイズを1回行った。ポリトロンのブレードは1サンプル毎に Buffer RLT で洗った。アシストチューブに回収した場合は、前もってチューブ内にジルコニアボールを1個入れておき、Microsmash で4800 rpm、30 sec 処理を行った。

ホモジネートは、ラット新鮮海馬の total RNA 抽出法及び cDNA 合成法と同じ方法で処理し、mRNA 量を定量した。

## タンパク質定量法 (BCA 法)

real-time PCR 用サンプル、エストラジオール抽出用サンプルのタンパク定量は BCA 法により行った。

### 【実験器具】

- マイクロプレート; SUMILON
- 電動ピペット; RAININ edp2
- マイクロプレートリーダー; TOSOH MPRA4

### 【準備試薬】

- BCA タンパク質定量試薬 A 液・B 液; PIERCE
- 0.1 % SDS 溶液
- 1 M NaOH
- ウシ血清アルブミン標準溶液 (BSA 標準溶液) (2 mg / ml); PIERCE

### 【実験方法】

ミリセル培養プレートインサート上で培養した海馬スライスを溶出用 NaCl 溶液中でホモジネートし、SDS・NaCl 混合溶液 (0.1 % SDS : 1 M NaOH = 1 : 1) で 10 倍に希釈し、タンパク定量のサンプルとした。マイクロプレートの各 well に、タンパク定量用サンプルを 5、10、15、20  $\mu\text{l}$  ずつ、SDS・NaCl 混合溶液を 15、10、5、0  $\mu\text{l}$  ずつ、蒸留水を 10  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。ウシ血清アルブミン標準溶液 (BSA 標準溶液) を 0、2、4、6、8、10  $\mu\text{l}$  ずつ、蒸留水を 10、8、6、4、2、0  $\mu\text{l}$  ずつ、SDS・NaCl 混合溶液を 20  $\mu\text{l}$  ずつ加えて、各 well の全量が 30  $\mu\text{l}$  になるようにした。BCA 試薬 A 液と B 液を 50 : 1 で混合し、全ての well に 200  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。このマイクロプレートを 60  $^{\circ}\text{C}$  で 30 min 加熱して発色させ、マイクロプレートリーダー (TOSOH MPRA4) で吸光度 (550–600nm) を測定した。BSA 標準溶液の検量線から各サンプルのタンパク質濃度を求めた。

### 2-1-3. 結果

#### 海馬スライス培養におけるエストラジオール合成活性の経時変化

ラット海馬の *de novo* のエストラジオール合成活性を解析するため、海馬スライスを無血清培地で培養した。

海馬スライスは培養開始から 2-3 週間後にニューロン間の相互作用が回復する [108]。そのため、スライスを用いた多くの研究は 2-3 週間前培養を行った後のスライスを使用している。しかし、ニューロステロイド合成活性の測定に最適な培養期間は検討されていない。そこで、スライスエストラジオール合成活性の培養期間依存性を検討した。

10-12 日齢のラットから作成した海馬スライスを用い、最初の 24 時間は血清入り培地で培養し、その後無血清培地で 11 日間培養した。培養開始から、1-2、4-5、7-8、10-11 日の無血清培地を回収し、エストラジオールを RIA で定量した。48 時間の培養中に培地に放出されたエストラジオール量は 1-2 日が最も多く、その後は徐々に減少していく (Fig. 2-1-2)。この結果から、海馬エストラジオール合成活性は培養期間が短いほど活性が高いことが明らかになった。

作成直後のスライスを無血清培地で培養すると生存率が極端に悪化する。そこで最初の 24 時間は血清入り培地で培養し、その後無血清培地で培養することとした。

今後の実験では、培養開始から 24 時間、血清入り培地で前培養した後に無血清培地に交換し、直ちに実験に用いることとした。

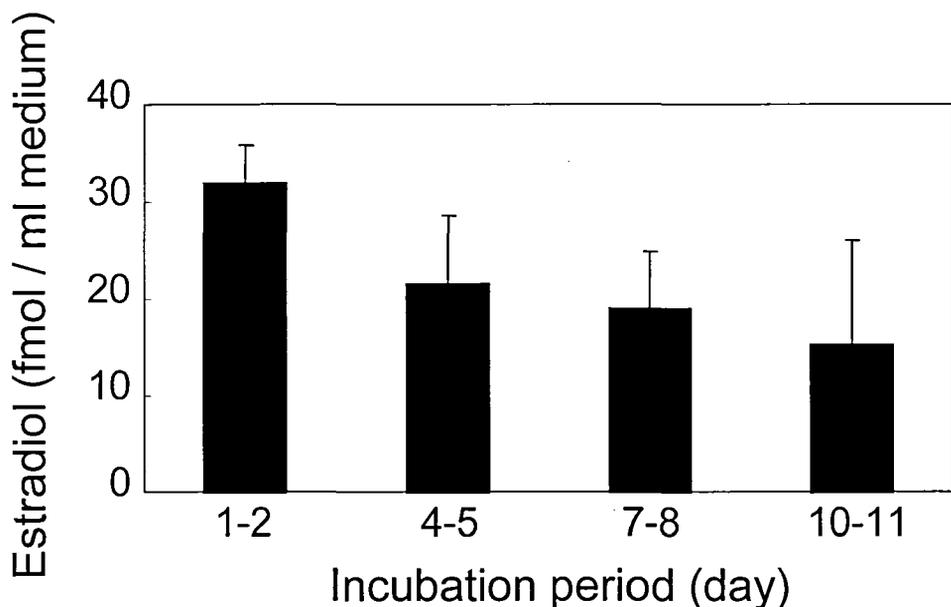


Fig. 2-1-2 Estradiol content in cultured medium of hippocampal slices.

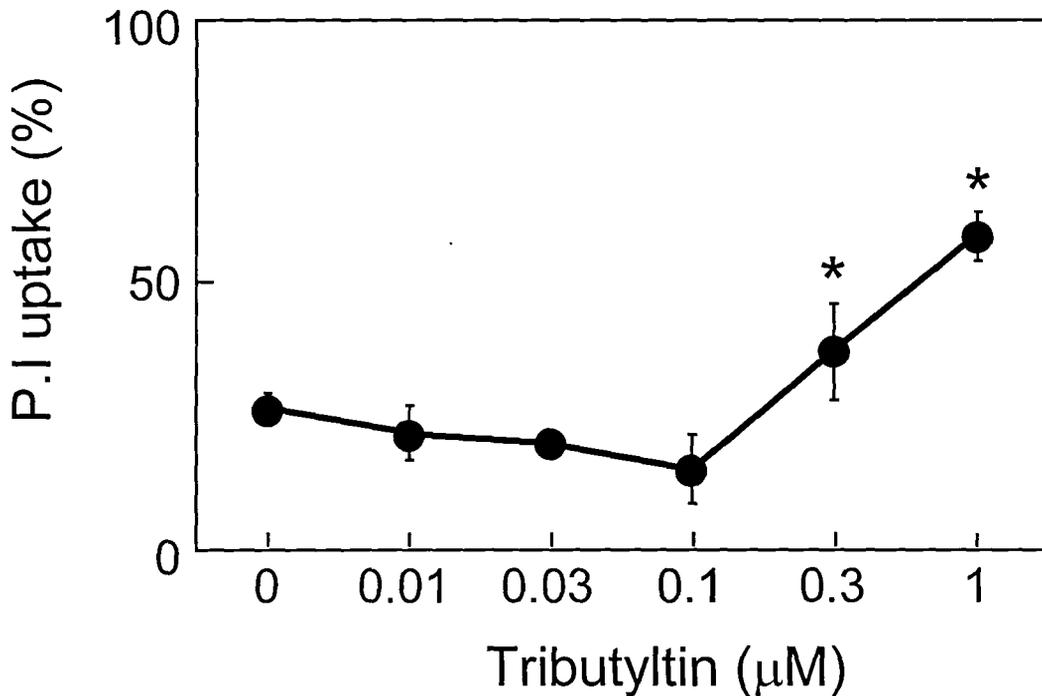
Hippocampal slices were pre-cultured with serum-containing medium 24 hours, then cultured with serum-free medium. The medium was changed daily, and medium of 1 and 2, 4 and 5, 7 and 8, 10 and 11 days were combined. Estradiol content of the combined medium was determined by RIA. The error bars indicate the S.D.

## 海馬スライスに対するトリブチルスズの毒性の検討

トリブチルスズは強い細胞毒性を持つことが報告されている。そこでラット海馬に対して細胞毒性が見られるトリブチルスズ濃度を測定した。

スライスの培地にトリブチルスズ (0.01–1  $\mu\text{M}$ )と PI を同時に添加し、PI の細胞への取り込みを測定することでトリブチルスズの細胞毒性を検討した。

PI はダメージを受けた細胞膜を通過し、細胞内で核酸と結合すると赤い蛍光を発する。海馬スライスをトリブチルスズの無い状態で 48 時間培養すると、約 20%の細胞が PI により染色された。この PI の取り込みは、48 時間培養時に 0.3–1  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズを添加した場合に有意に増加した。この結果からトリブチルスズによる細胞毒性は 0.3–1  $\mu\text{M}$  で現れることが明らかになった。0.3  $\mu\text{M}$  以下の濃度 (0.01–0.1  $\mu\text{M}$ )では細胞生存率に影響は見られなかった。



**Fig. 2-1-3 Relative damage of the hippocampal cells after incubation with various concentrations of tributyltin.**

Hippocampal slices were incubated with or without various concentrations of tributyltin for 48 hours. Cell damage was assessed by monitoring the P.I uptake. PI uptake is expressed as a percentage of total uptake after the slices were exposed to glutamate (50 mM) for 24 hours. The values are means of four separate experiments. The error bars indicate the S.D. Significant difference between the cell damage in treated slices and that in non-treated slices: \*,  $p < 0.05$ .

## 海馬エストロジオール合成系酵素 mRNA 絶対量の解析

まず海馬エストロジオール合成系酵素 mRNA が本実験で用いる 10 日齢ラット海馬で発現しているかを確認した。

10 日齢ラット海馬におけるエストロジオール合成系酵素 (StAR、P450<sub>scc</sub>、P450(17 $\alpha$ )、3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD-3、P450<sub>arom</sub>)の mRNA の絶対量を real-time RT-PCR を用いて解析した。これら酵素、タンパク質の mg タンパク質当たりの絶対量を Fig. 2-1-4 に示す。解析した全ての mRNA が海馬で発現していることが確認された。また、17 $\beta$ -HSD-1、-4 の mRNA 量も解析した。これらはそれぞれエストロジオールからエストロンを合成する反応 (17 $\beta$ -HSD-1)とその逆反応 (17 $\beta$ -HSD-4)を触媒する酵素である。P450<sub>scc</sub>、P450 (17 $\alpha$ )、3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD-1 の mRNA 絶対量は mg タンパク質あたり  $10^5$  分子以下であった。

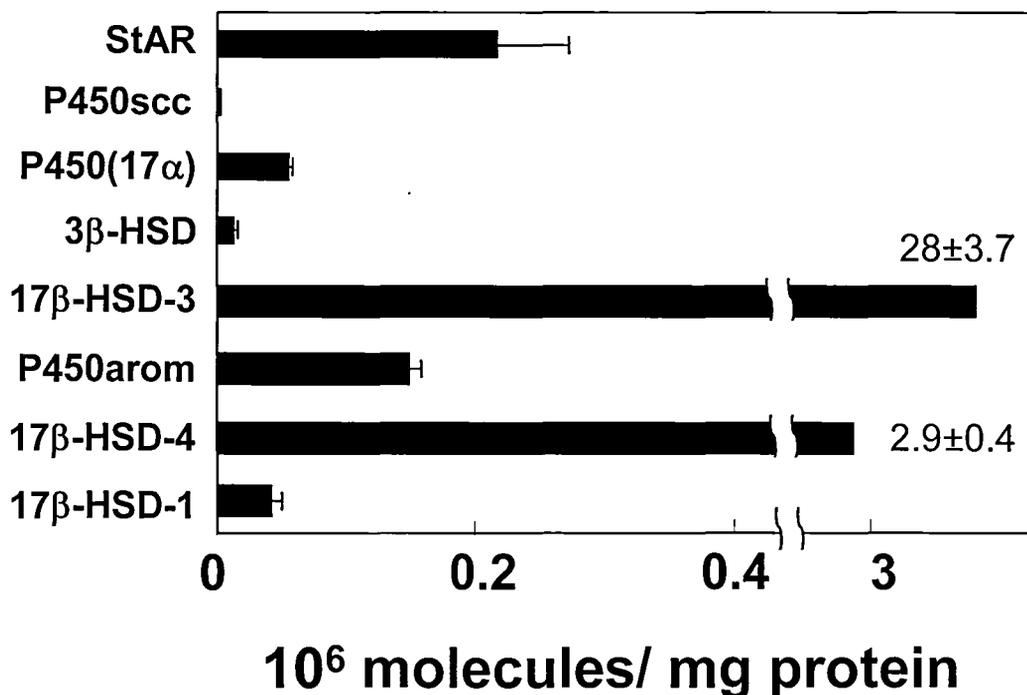


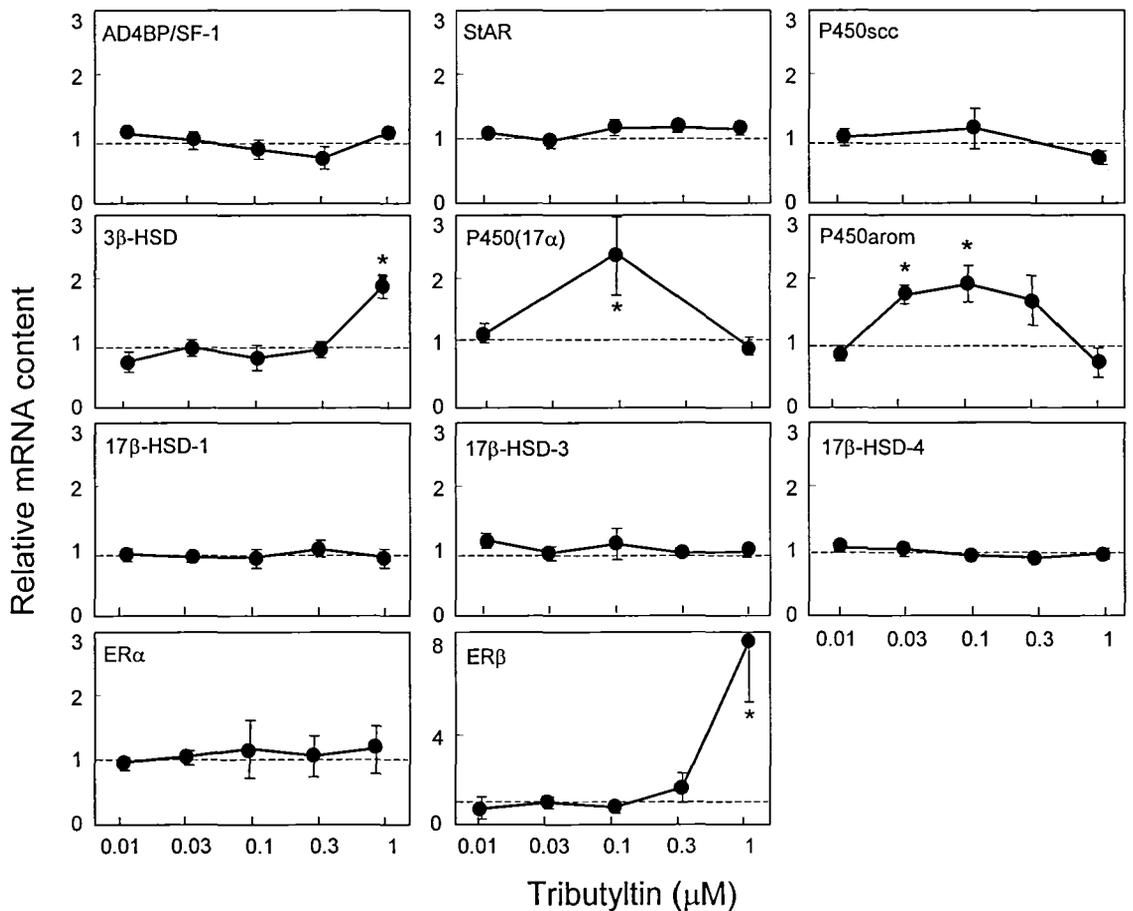
Fig. 2-1-4 Amounts of mRNA for StAR protein and steroidogenic enzymes in hippocampus of 10-day-old rat.

The mRNA contents in freshly isolated rat hippocampus are given as molecules per mg proteins. The error bars indicate the S.D. (n=3).

## 海馬エストラジオール合成系酵素 mRNA 量に対するトリブチルスズの影響

無処理スライスに対するトリブチルスズ処理スライス中の海馬エストラジオール合成系酵素、タンパク質 mRNA の相対量を real-time RT-PCR を用いて調べた。また、末梢ステロイド合成器官でステロイド合成分子の転写を促進する Ad4BP / SF-1 mRNA 量変化も解析した (Fig. 2-1-5)。

0.1  $\mu\text{M}$  トリブチルスズ処理により P450(17 $\alpha$ )と P450arom の mRNA 量は約 2 倍に増加した (Fig. 2-1-5)。しかし 1  $\mu\text{M}$  トリブチルスズ処理では顕著な影響はみられなかった。また ER $\beta$  の mRNA 量は 1  $\mu\text{M}$  トリブチルスズ処理により約 8 倍に増加した。その他の酵素、タンパク質 mRNA 量には 0.01–1  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズによる影響はみられなかった。



**Fig. 2-1-5** Relative amounts of mRNA for steroidogenic enzymes and estrogen receptors after incubated with tributyltin.

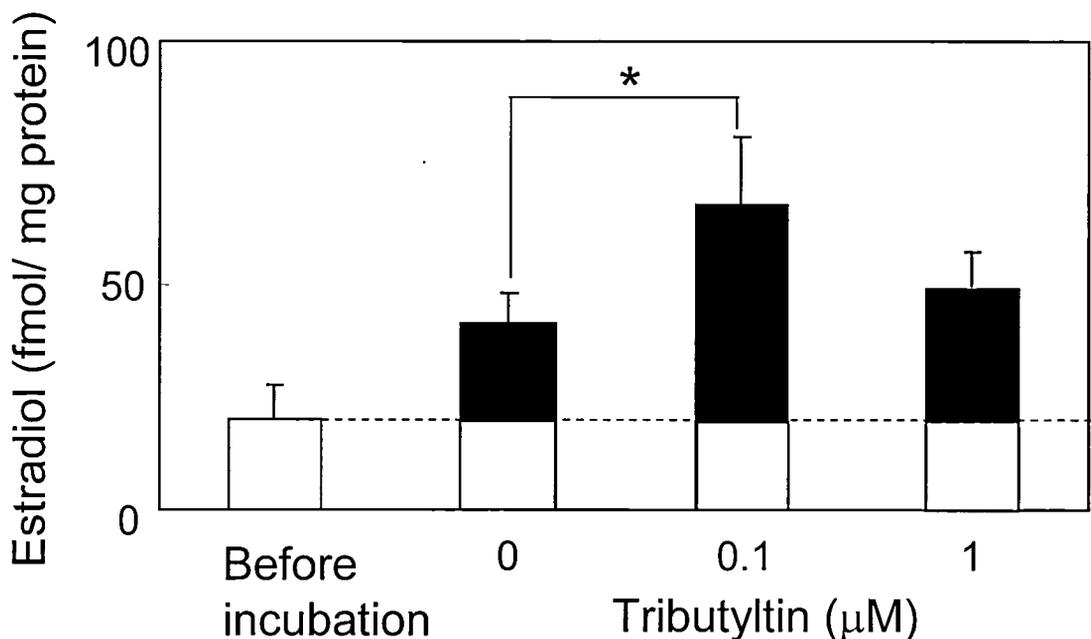
Slices were incubated with 0.01 to 1  $\mu\text{M}$  tributyltin 48 hours, and the mRNA contents for StAR, steroidogenic enzymes and estrogen receptors were determined. Values are given as relative to those of the slices cultured without tributyltin. The error bars indicate the S.D. (n=4). Significant difference between the amount of mRNA in cultured slices with and without tributyltin: \*,  $p < 0.05$ .

## 海馬スライスのエストラジオール合成に対するトリブチルスズの影響

エストラジオール合成系酵素である P450(17 $\alpha$ )、P450arom の mRNA 量を増加させる条件で海馬スライスをトリブチルスズ処理し、海馬スライス中のエストラジオール合成に対する影響を解析した。

血清入り培地で前培養した直後のスライス中には 19.0 $\pm$ 7.1 fmol / mg protein のエストラジオールが検出された (Fig. 2-1-6)。無血清培地で 48 時間培養後のスライス及び培地中のエストラジオール量は 39.7 $\pm$ 6.8 fmol / mg protein に増加した。この増加分は、48 時間培養中に海馬スライスが *de novo* で合成したエストラジオール量を示している。この合成量は Fig. 2-1-6 の破線の上側で示される。

スライスを 0.1  $\mu$ M のトリブチルスズの存在下で 48 時間培養すると、スライス及び培地中のエストラジオール量は 65.1 $\pm$ 14.4 fmol / mg protein となり、トリブチルスズ無しで 48 時間培養したスライスと比べると有意に増加していた。1  $\mu$ M トリブチルスズ処理後のエストラジオール量は 54.8 $\pm$ 9.6 fmol / mg protein となり有意な増加は認められなかった。



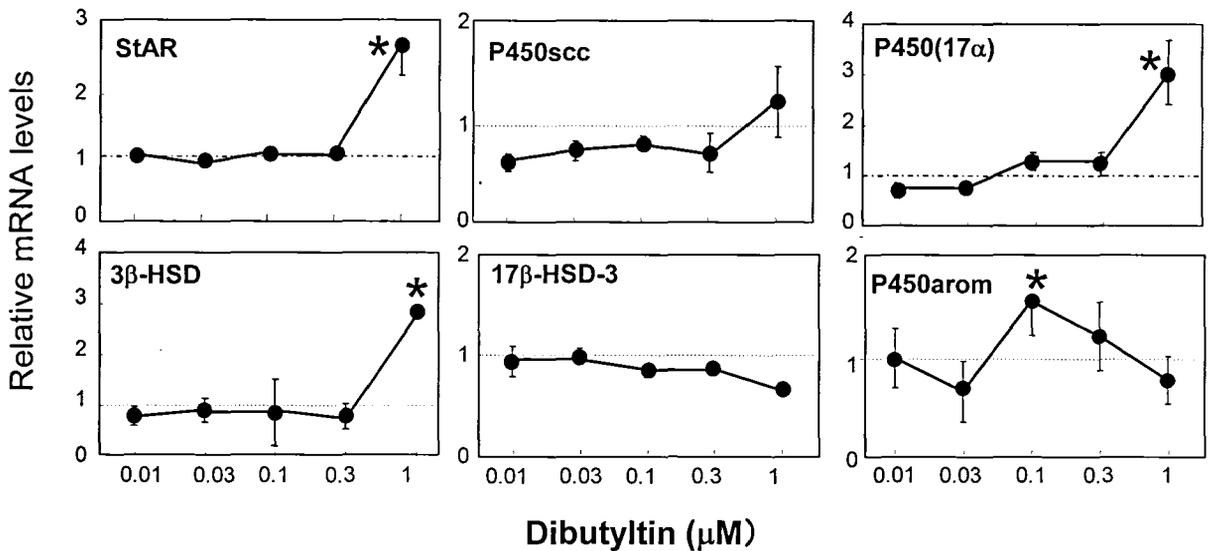
**Fig. 2-1-6 Estradiol contents in cultured hippocampal slices before and after incubation.**

Estradiol was extracted from hippocampal slices after 24-hour pre-culture in serum-containing medium (before incubation), and extracted from the slices and medium after another 48-hour incubation in serum-free medium containing 0, 0.1 or 1  $\mu$ M tributyltin (after incubation). The error bars indicate the S.D. (n=5). Significant difference between the estradiol content: \*,  $p < 0.05$ .

## 海馬エストロジオール合成系酵素 mRNA 量に対するジブチルスズの影響

Yamazaki らはウシ副腎細胞を用いた実験で、ジブチルスズによってもステロイド合成系酵素 mRNA 発現が阻害されることを報告している [106]。そこで、ジブチルスズによる海馬エストロジオール合成系酵素 mRNA 量の変化を調べた。Fig. 2-1-7 に無処理スライスに対する 0.01–1  $\mu\text{M}$  ジブチルスズ処理スライス中の各酵素、タンパク質 mRNA 量を示す。

1  $\mu\text{M}$  ジブチルスズ処理により StAR、P450(17 $\alpha$ )と 3 $\beta$ -HSD の mRNA 量が約 3 倍に増加した (Fig. 2-1-7)。0.1  $\mu\text{M}$  ジブチルスズ処理では P450arom mRNA 量が約 2 倍に増加した。P450scc、17 $\beta$ -HSD-3 の mRNA 量には本実験で用いた 0.01–1  $\mu\text{M}$  ジブチルスズでは影響はみられなかった。



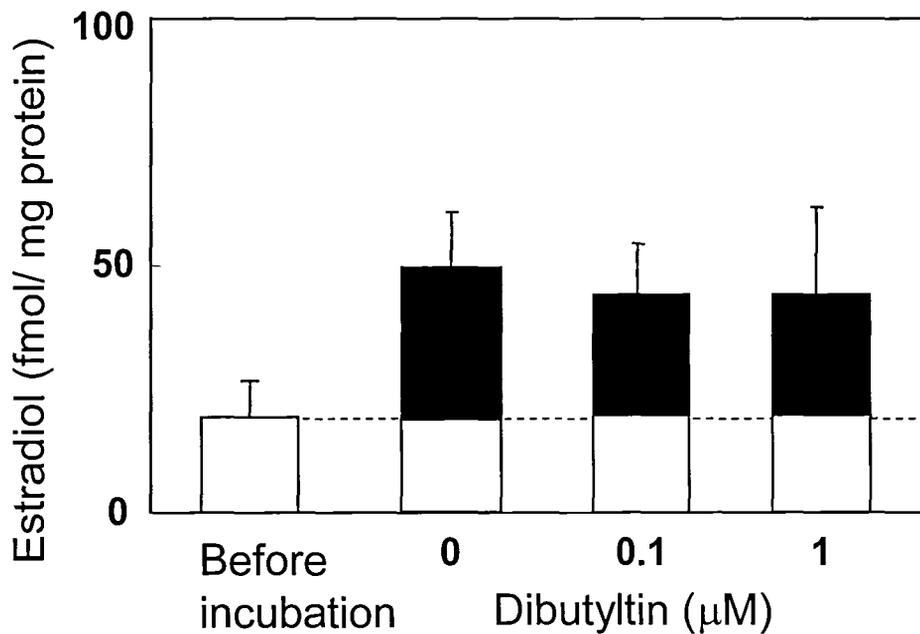
**Fig. 2-1-7** Relative amounts of mRNA for steroidogenic enzymes after incubated with dibutyltin.

Slices were incubated with 0.01 to 1  $\mu\text{M}$  dibutyltin 48 hours, and the mRNA contents were determined. Values are given as relative to those of the slices cultured without dibutyltin. The error bars indicate the S.D. (n=3). Significant difference between the amount of mRNA in cultured slices with and without dibutyltin: \*,  $p < 0.05$ .

## 海馬スライスのエストラジオール合成に対するジブチルスズの影響

10日齢ラット海馬スライスのエストラジオール合成能に対するジブチルスズの影響を解析した。血清入り培地で前培養後のスライス中には  $19.0 \pm 7.1$  fmol / mg protein のエストラジオールが検出された (Fig. 2-1-8)。無血清培地で48時間培養後のスライス及び培地中のエストラジオール量は  $48.7 \pm 11.1$  fmol / mg protein に増加した。この増加分は、48時間培養中に海馬スライスが *de novo* で合成したエストラジオール量を示している。

スライスを  $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$  のジブチルスズの存在下で48時間培養すると  $42.2 \pm 10.2$ 、 $42.9 \pm 17.9$  fmol / mg protein となり、エストラジオール量に有意な変化は認められなかった。



**Fig. 2-1-8. Estradiol contents in cultured hippocampal slices before and after incubation.**

Estradiol was extracted from hippocampal slices after 24-hour pre-culture in serum-containing medium (before incubation), and extracted from the slices and medium after another 48-hour incubation in serum-free medium containing 0, 0.1 or 1  $\mu\text{M}$  dibutyltin (after incubation). The error bars indicate the S.D. (n=3).

#### 2-1-4. 考察

この実験では、細胞毒性が現れない濃度である 0.1  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズで海馬スライスを処理すると、スライスのエストラジオール合成が亢進することを示した。このとき、P450(17 $\alpha$ )と P450arom の mRNA 量も増加していた。おそらくトリブチルスズはこれら P450 の転写を促進しエストラジオール合成を亢進させたと考えられる。しかし、1  $\mu\text{M}$  トリブチルスズで処理した海馬スライスのエストラジオール合成は亢進されなかった。1  $\mu\text{M}$  トリブチルスズ処理により海馬の細胞は約 60 % が死滅するためエストラジオール合成が亢進されないと考えられる。一方、0.1  $\mu\text{M}$  ジブチルスズで海馬スライスを処理すると P450arom mRNA 量が約 2 倍に増加した。また、1  $\mu\text{M}$  処理では StAR、P450(17 $\alpha$ )、3 $\beta$ -HSD mRNA 量の増加が観察されたが、どちらの条件でも海馬エストラジオール合成の亢進はみられなかった。1  $\mu\text{M}$  ジブチルスズで処理した場合は、トリブチルスズ同様細胞の多くは死滅していると考えられる。そのため、エストラジオール合成の亢進が観察されなかったのであろう。0.1  $\mu\text{M}$  ジブチルスズ処理では P450arom mRNA 量は増加したが、海馬エストラジオール量は増加しなかった。P450arom mRNA 量の増加は必ずしもエストラジオール合成量増加にはつながらないようである。

海馬ステロイド合成はどの酵素により調節されているかは未だ明らかではない。一方、末梢内分泌腺においては StAR がステロイド合成の律速段階であり、調節部位である [27]。ウシ副腎皮質細胞における StAR の mRNA 量は P450(17 $\alpha$ ) の 1/20 と、ステロイド合成系酵素類の中で最少量である [106]。また、副腎培養細胞に ACTH を作用させると、StAR の転写活性は著しく上昇し、StAR mRNA 量の増加とともにステロイド合成が亢進する。しかし、ラット海馬では StAR mRNA 量は P450(17 $\alpha$ ) の約 3 倍と、刺激の無い状態でも比較的少量に存在する。トリブチルスズは StAR mRNA 量を増加させず、P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量を増加させ、エストラジオール合成を亢進させた。海馬エストラジオール合成における StAR は調節部位でないのかもしれない。

トリブチルスズ 125 ppm をラットに経口投与すると血中エストラジオール濃度が減少するという報告がある [109]。また高濃度のトリブチルスズ (6  $\mu\text{M}$ ) は P450arom 活性を阻害する [105]。また、ウシ副腎初代培養細胞にトリブチルスズやジブチルスズを毒性濃度以下の 0.01  $\mu\text{M}$  でそれぞれ作用させると、P450(17 $\alpha$ ) や P45011 $\beta$  などの発現が抑制されステロイドホルモン合成は強く阻害された [106]。一方、Nakanishi らは 0.01  $\mu\text{M}$  のトリブチルスズがヒト絨毛細胞株の P450arom 活性とその mRNA の発現を上昇させることを報告している [89]。本実験でも同様にトリブチルスズはその毒性を発現する濃度以下である 0.1  $\mu\text{M}$  で、P450arom の転写を活性化させた。これはヒト絨毛細胞株を用いた実験結果と一致する。

トリブチルスズに汚染された野生動物において、トリブチルスズは脳で比較的高濃度で検出される [98, 100]。トリブチルスズは脳内で P450(17 $\alpha$ ) や P450arom などの転写に影響を与えることで脳機能に影響を与えるのかもしれない。海馬で合成されるエストラジオールはスパイン形成など海馬機能にとって重要な現象に関わる。低濃度のトリブチルスズは海馬におけるスパイン形成を促進する可能性がある。

Nakanishi らはトリブチルスズがヒト絨毛細胞株の P450arom 活性とその mRNA の発現を上昇させる際に RXR のアゴニストとして作用することを報告している [89]。しかしラット海馬では PPAR アゴニストであるジブチルスズによっても P450arom mRNA 量の増加が観察された。P450arom は組織特異的なプロモーターにより、転写調節が行われており、脳での転写調節は胎盤での調節とは異なる [110]。ラット海馬では PPAR によっても P450arom の転写調節が行われているのかもしれない。

次の実験では、RXR アゴニストである 9-*cis*-レチノイン酸を海馬スライスに作用させ、ニューロステロイド合成に対する影響を解析した。

## 2-2 レチノイン酸による影響

この節では海馬エストラジオール合成に与える内因性物質の影響について述べる。前節で述べたように、RXR アゴニストであるトリブチルスズは海馬エストラジオール合成を亢進させた。そこで RXR の内因性アゴニストであるレチノイン酸を海馬に作用させエストラジオール合成に対する影響を調べた。

### 2-2-1. 緒言

ビタミン A 誘導体であるレチノイドは視覚、生殖、細胞分化、骨の発達など多くの器官における生理的過程に関与する。レチノイドはまた細胞の増殖に不可欠な物質で、欠乏すると角膜、皮膚、粘膜などの乾燥、角質化などの症状がみられる。必要以上に採りすぎると、悪心、嘔吐、嗜眠などの症状が現れ、慢性では発育停止、脱毛、貧血などが起こる。また、胎児の発生にもレチノイドは深く関わる。

レチノイン酸はレチノイドに変換され、特異的レセプターに結合した後生理作用が現れる。レチノイン酸のレセプターには RAR と RXR が存在し、それぞれ 3 つのアイソフォームがある (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) [91, 92, 111]。これらは核内レセプターであり、リガンドが結合するとホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成し標的遺伝子の転写を調節する [112]。特に RXR は RAR だけでなく、甲状腺ホルモンレセプター (thyroid hormone receptor: TR) やビタミン D レセプター (vitamin D receptor: VDR) など様々な核内レセプターとヘテロダイマーを形成し作用する [111]。

レチノイン酸は、神経系の発達に対しても重要な働きをしている。レチノイン酸は神経前駆細胞に作用し胎児の後脳、網膜、嗅覚系、延髄の発生を調節する [113]。また、神経細胞の細胞骨格を変化させ、スパイン形成を誘導する [114]。RAR、RXR の発現は海馬でも確認されている [114]。また成体ラット海馬における神経新生にも影響を与えることが報告されている [115]。さらに、レチノイン酸は空間記憶能力にも影響を及ぼす。レチノイン酸を欠乏させたラットの空間記憶能力は低下し [116]、一方でレチノイン酸投与により空間記憶能力は上昇する [115, 116]。RAR $\beta$ あるいは RXR $\beta$ / $\gamma$ ノックアウトマウスでは長期増強が誘導されず、そのため空間記憶能力が低下することが報告されている [117]。Shinozaki らはレチノイン酸に神経保護作用があることを報告し、酸素やグルコースが不足することにより誘導される細胞死を防ぐことを示した [118]。またレチノイン酸はシナプシンや神経成長因子といった神経伝達に重要なタンパク質の発現量を増加させ、スパイン形成を促進する [114]。このように、レチノイン酸は空間記憶能力、神経保護、スパイン形成に深く関わる。

精巣のテストステロン合成は、ビタミン A が不足すると低下し、ビタミン A 誘導体であるレチノイン酸で活性化される [12]。また、卵巣エストラジオール合成もレチノイン酸により影響される [15]。このように末梢内分泌腺の性ホルモン合成はレチノイン酸により調節される。しかし、海馬エストラジオール合成がレチノイン酸により影響されるとい報告はない。海馬エストラジオール合成に関わる酵素、タンパク質は全て神経細胞に局在している [77]。同様に RAR、RXR も海馬神経細胞で発現している [119]。よって、レチノイン酸は性腺で性ホルモン合成に影響を与えるように、海馬エストラジオール合成も調節している可能性がある。ラット海馬スライスを用いてこの可能性を追求した。

## 2-2-2. 実験方法

### 海馬スライスの 9-*cis*、all-*trans* レチノイン酸処理

#### 【準備試薬】

○9-*cis*-retinoic acid; Sigma

○all-*trans*-retinoic acid; Sigma

レチノイン酸の分注は暗所で行った。また、窒素を満たした袋の中で分注することで酸素による分解を防いだ。DMSO で 10 mM ストック溶液を作成し、実験の都度ホルモン測定用エタノールで希釈し実験に使用した。

#### 【実験方法】

ラット海馬スライス作成法は第 2 章ラット海馬スライス培養法で示した。24 時間前培養を行い、無血清培地に交換した。その際、レチノイン酸のエタノール溶液を無血清培地の 1 / 1000 (1.1  $\mu$ l)量添加しよく混合した。無処理スライスの培地にはホルモン測定用エタノールを 1.1  $\mu$ l 加えた。レチノイン酸によるスライスの処理は 48 時間行った。レチノイン酸は培地中で不安定だと考えられるため、12 時間おきに培地を交換し、その都度レチノイン酸を新たに添加した。

### StAR タンパク質、エストラジオール合成系酵素、RAR、RXR mRNA の定量

2-1-2 ラット新鮮海馬の total RNA 抽出法及び cDNA 合成法、および海馬スライスからの total RNA 抽出、cDNA 合成、mRNA 定量法に則って mRNA を定量した。

なお、ここで新たに用いたプライマーは、

Gene	primer sequence (forward)	primer sequence (reverse)	length (bp)	annealing temperature (°C)	annealing time (sec)	elongation time (sec)
RXR $\alpha$	5'-ACATGCAGATGCACAAGACG-3'	5'-GGGTTTGACAGCCCTTAGA-3'	82	60	10	15
RXR $\beta$	5'-GTTCTTCATGGGTCTCCT-3'	5'-GGAGCGACACTGTGGAGTTAAT-3'	96	60	10	15
RXR $\gamma$	5'-TTGGATGGCTCAAAACCAC-3'	5'-AGGGCTGGGCACATCTCTT-3'	77	60	10	15
RAR $\alpha$	5'-TTGGAAATGGCTCAAAACCAC-3'	5'-AGGGCTGGGCACATCTCTT-3'	67	60	10	15
RAR $\beta$	5'-ATCGATGCCACCTCTCATT-3'	5'-GGGGTCAAGGGTTTCATGTC-3'	68	60	10	15
RAR $\gamma$	5'-CAGTTTCTACCAGGTCCTCA-3'	5'-AGGGCTGGGCACATCTCTT-3'	93	60	10	15
CRBP2	5'-GACGAACACACAAGGCTCTG-3'	5'-CTTGTGCACACACCTGGTCA-3'	73	60	10	15

各プライマーは forward と reverse を等量ずつ混合し、RNase-free 水で 5  $\mu$ M に希釈した。上に示した各レセプター、CRBP2 mRNA の real-time PCR を行う際の試薬調製は 2-1 Real-time PCR による mRNA 絶対量の測定で示した G3PDH の場合と同様である。

## ウェスタンブロットティングによる P450(17 $\alpha$ )の検出

### SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

#### 【実験器具】

- 電気泳動装置; AE-6450 (ATTO CORPORATION)

#### 【準備試薬】

- 12.5 % アクリルアミド溶液; 300 ml  
アクリルアミド (和光純薬工業) 87.6 g、N-N'-メチレンビスアクリルアミド (nacalai tesque) 2.4 g を蒸留水に溶解させた。
- セパレーションゲル緩衝液  
3 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.3 % SDS (w/v)
- スタッキング緩衝液; 250 ml  
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.4 % SDS (w/v)
- ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS); nacalai tesque
- N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED); 和光純薬工業
- SDS 処理液; 100 ml  
50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、20 % グリセロール、5 % SDS (w/v)
- 2-メルカプトエタノール; nacalai tesque
- 電気泳動処理液  
SDS 処理液 : 2-メルカプトエタノール : プロモフェノールブルー = 9 : 1 : 1
- 電気泳動緩衝液  
25 mM Tris-HCl (pH 8.4)、192 mM グリシン

#### 【実験方法】

ポリアクリルアミドゲルは使用する前日に作成準備した (セパレーションゲル; 10%)。ポリアクリルアミドゲル 2 枚当たりの成分を以下に示す。

	セパレーションゲル (10%)	スタッキングゲル (4.5%)
アクリルアミド溶液	7.5 ml	0.9 ml
セパレーション緩衝液	4.5 ml	-
スタッキング緩衝液	-	1.5 ml
蒸留水	6 ml	3.6 ml
APS	適量	
TEDED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

TEMED と APS 以外の各溶液を混合し (脱気は行わなかった)、攪拌した。セパレーションゲル混合液に TEMED と APS を加え静かに攪拌し、ゲル板の上から 3 cm まで流し込んだ。ゲルの上面を乱さないようにシリンジを用いて蒸留水をのせ、室温で放置し固めた。その後、蒸留水を捨て、スタッキングゲル混合液に TEMED と APS を加え、ゲル板に流し込みコームをさした。室温でゲルを固めた。

サンプルは電気泳動処理液と 1:1 で混合した。このサンプル混合液を 3 min 熱湯に浸し熱処理した。ポリアクリルアミドゲルを電気泳動装置にセットし、電気泳動緩衝液を満たした。各 well にサンプルをピペットマンで流し込み電気泳動を行った。泳動後、ゲルはウェスタンブロッティングに用いた。

ブロッティング及び発光検出

#### 【実験器具】

○ブロッティング装置; マリソル

#### 【準備試薬】

○ブロッティング緩衝液; 5 L

25 mM Tris-HCl (pH 8.2)、192 mM グリシン、20 % メタノール

○ブロッティング洗浄液 (TBST)

50 mM Tris-HCl (pH 7.3)、0.9 % NaCl、0.05 % Tween 20

○10 % スキムミルク

○1 次抗体; P450(17 $\alpha$ ) anti-serum

○2 次抗体; Anti-rabbit Ig, biotinylated species-specific whole antibody (from donkey) (Amersham Bioscience)

○発光試薬 (Super Signal WestFemto Trial kit); Thermo SCIENTIFIC

#### 【実験方法】

電気泳動が終了する前に、ブロッティング緩衝液に、メタノールと蒸留水で十分に湿潤させた PVDF 膜 (Hybond-P; Amersham) とろ紙を浸しておいた。電気泳動後、ゲルもブロッティング緩衝液に浸した。ブロッティング装置に湿ったろ紙を 2 枚のせ、その上にゲルを置いた。ゲルの上にさらに 2 枚のろ紙をのせた。電源を定電圧にセットし、1 時間ブロッティングを行った。

ブロッティング後、PVDF 膜を TBST で洗浄した (5 min)。その後、5 % スキムミルクに浸し、2 時間振蕩させた。一次抗体を 5 % スキムミルクで 1000 倍に希釈した。その後、PVDF 膜をプラスチックバックに入れ、一次抗体溶液をその中に加え、シールした。この抗原抗体反応は 4 °C、オーバーナイトで行った。

プラスチックバックから膜を取り出し、TBST で洗浄した (5 min、4 回)。その後、再びプラスチックバックに入れ、5 % スキムミルクで 2000 倍に希釈した二次抗体を加えシールした (60 min)。インキュベート後、膜を TBST で洗浄した (5 min、4 回)。PVDF 膜をラップにのせ、発光試薬をかけて、FAS-1000 (TOYOBO) にセットした。検出されたバンドの発光強度は、Gel-PRO Analyzer (Media Cybernetics) を用いて解析した。

酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA)によるテストステロンの定量

#### 【実験器具】

○マイクロプレートリーダー; TOSOH MPRA4

#### 【準備試薬】

○[1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-テストステロンストック溶液 (およそ 5000 cpm / 100 μl); 3 ml

5 μl の[1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-テストステロン原液 (GE Healthcare)を瓶の底に入れ、ドラフトチャンバーで空気を噴きつけトルエンを飛ばし、ホルモン測定用エタノールを 3 ml 加えた。これを冷凍庫に保管した。

○testosterone EIA kit; Cayman

テストステロンスタンダード

テストステロンアセチルコリンエステラーゼトレーサー

テストステロン抗体

エルマン試薬

EIA 緩衝液

#### 【実験方法】

##### 抽出、精製

テストステロンは、第2章ラット海馬スライス、培地からのエストラジオール抽出・精製法とほぼ同じ手法で抽出、精製した。

##### 相違点は、

- ・ホモジナイズの前に液量を 1.1 ml に調整した後、25 μl の 10 % Tween 20 を加え、氷冷しながらポリトロンでホモジナイズした。
- ・ホモジネート、および血清には、回収率測定のために、(<sup>3</sup>H)<sub>4</sub>-テストステロンを 20 μl ずつ加えた。

C18 カラムからの 80 %メタノール溶出液、40 %メタノール、100 %メタノール洗浄液はそれぞれ温水につけて、空気を吹き付けて完全に蒸発させた。40 %メタノール溶出物、100 %メタノール溶出物を乾固した試験管には 200 μl の 100 %メタノールを加え 1 ml のシンチレーションカクテル入りのエッペンドルフチューブに移し、放射活性を測定した (ALOKA LSC-6100)。

80 %メタノール溶出物を乾固した試験管に EIA 緩衝液を加え、EIA による定量に用いた。

EIA は testosterone EIA kit のマニュアルを参照にして行った。テストステロンスタンダードを 10 倍にミリ Q 水で希釈する (bulk standard : 10 ng / ml)。この bulk standard をさらに 10 倍に EIA 緩衝液で希釈する (standard 1: 1 ng / ml)。standard 1 を 2 倍に EIA 緩衝液で希釈する (standard 2: 0.1 ng / ml)。次に、standard 2 を EIA 緩衝液で 2 倍に希釈する。(standard 3) この作業を繰り返し、standard 8 まで作る (standard 8: 7.8 pg / ml)。

テストステロンアセチルコリンエステラーゼトレーサーのガラス瓶に 6 ml の EIA 緩衝液を加えた。また、テストステロン抗体が入ったガラス瓶に 6 ml の EIA 緩衝液を加

えた。エルマン試薬のガラス瓶に 20 ml のミリ Q 水を入れた。エルマン試薬は作ったその日に使うようにした。上のようにして調製した試薬を用いてテストステロン量を測定した。

#### 測定方法

1. 用意したサンプル、試薬を備え付けのプレートに入れていった。プレートに入れる試薬は次の通りである。

well	EIA buffer	sample/std	tracer	antibody	total
blank	-	-	-	-	0
total activity	-	-	5 $\mu$ l	-	5 $\mu$ l
NSB	100 $\mu$ l	-	50 $\mu$ l	-	150 $\mu$ l
Bo	50 $\mu$ l	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l
std/sample	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l

NSB: non-specific binding Bo: binding maximum

2. 試薬、サンプルを入れた後、攪拌・振蕩機上で反応させる (60 min)。
3. wash buffer で well を 5 回洗う。
4. エルマン試薬を各 well に 200  $\mu$ l ずつ入れる。ここで、total activity の well に エストラジオールアセチルコリンエステラーゼトレーサー 5  $\mu$ l を加える。
5. 暗闇で反応させる (60-90 min)。
6. マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する (412 nm)。

## LC-MS / MS を用いたエストラジオールの質量分析

質量分析は、あすか製薬(株)に外注して行った。以下に概要を記す。

2-1-2 ラット海馬スライス、培地からのエストラジオール抽出・精製法に則って HPLC で分取したエストラジオール画分を、ドライアイスと共に帝国臓器に送付した。

エストラジオールのイオン化効率を高めるために、エストラジオールは誘導体である estradiol-3-pentafluorobenzoy-17-methylpyridinium-ester (E2-PFBz-methylpyridinium) に変換した。エストラジオールサンプルの溶媒を蒸発させ、5 % の pentafluorobenzyl bromide/acetonitrile (水酸化カリウム / エタノール溶媒) と 55 °C、1 時間の条件で反応させた。溶媒を蒸発させた後、200 µl の 2 % の 2-fluoro-1-methylpyridinium-p-toluenesulfonate (溶媒はジクロロメタン) と 30 µl の 10 % triethylamine (溶媒はジクロロメタン) を加え、1 時間 30 分室温で反応させた。反応生成物を 20 % methanol 溶媒に溶かし、Bond Elute C18 column (Varian, USA) で精製し、溶媒を揮発させた。

質量分析には liquid chromatography-mass spectrometry / mass spectrometry (LC-MS / MS) システムを用いた。LC 部が Agilent1100 (Agilent Technologies, USA)、MS 部が API-5000 (Applied Biosystems, USA) であり、MS 部で用いるイオン化法は正イオン ESI (electrospray ionization) 法である。オートサンプラーは HTC PAL (CTC Analytics)、LC-MS の LC 部用のカラムは、Terra MS C<sub>18</sub> column (2.1 mm i.d. × 100 mm, 3.5 µm, Waters) を用いた。また、分析計本体は MS / MS が可能なトリプルステージ四重極型質量分析計である。第一のステージが親イオンの分離分析部、第二のステージがフラグメント生成用の衝突部、第三のステージがフラグメントイオンの分離分析部となっている。

LC-MS / MS 溶離液 A: 0.1 % ギ酸、LC-MS / MS 溶離液 B: アセトニトリル : メタノール = 50 : 50 を調整し、作成した E2-PFBz-methylpyridinium を、LC-MS / MS 溶離液 A : B = 35 : 65 の割合で混ぜた溶離液 20 µl に溶かし、LC-MS / MS の LC 部位に注入した。LC-MS / MS 溶離液 A、B を用いて以下のプログラムで試料を送液した。

0-0.5 min 溶離液 A : 溶離液 B = 35 : 65 → 0 : 100 (線形勾配変化)

0.5-3.0 min 溶離液 A : 溶離液 B = 0 : 100

3.0-6.0 min 溶離液 A : 溶離液 B = 40 : 60

溶離液の流速は 0.4 ml / min であり、1 試料あたり 6 min のプログラムであった。

LC を通過した試料は MS / MS 部位に導入され、イオン化後、*m/z* を測定することで質量を測定した。以下 MS / MS における測定条件を示す。

イオンスプレー電圧; 5 kV

ガス温度; 600 °C

第一ステージ; nebulizer gas 30 psi

第二ステージ; turbo gas 75 psi

第三ステージ; クラスター分離電圧 60 V

窒素ガスを、Q2 collision cell にて collision gas として用いた。この過程でエストラジオール誘導体の *m/z* を測定すると、544 → 339 となった。エストラジオール誘導体の保持時間の測定は安定同位体標識した Estradiol-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>-PFBz-methylpyridinium の *m/z*

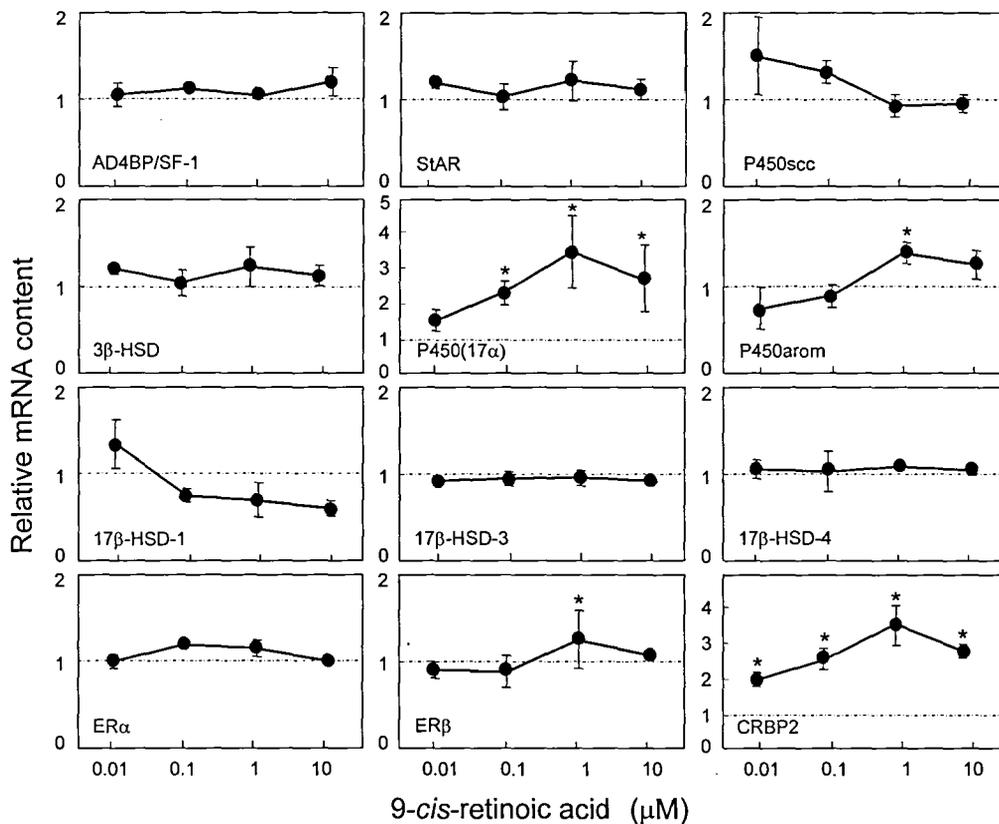
値の変化 (548→343)を測定することで計測した。E2 の測定限界値は海馬組織 1 g あたり 0.1 pg であった。

### 2-2-3. 結果

#### 海馬エストロジオール合成系酵素、ER mRNA 量に対するレチノイン酸の影響

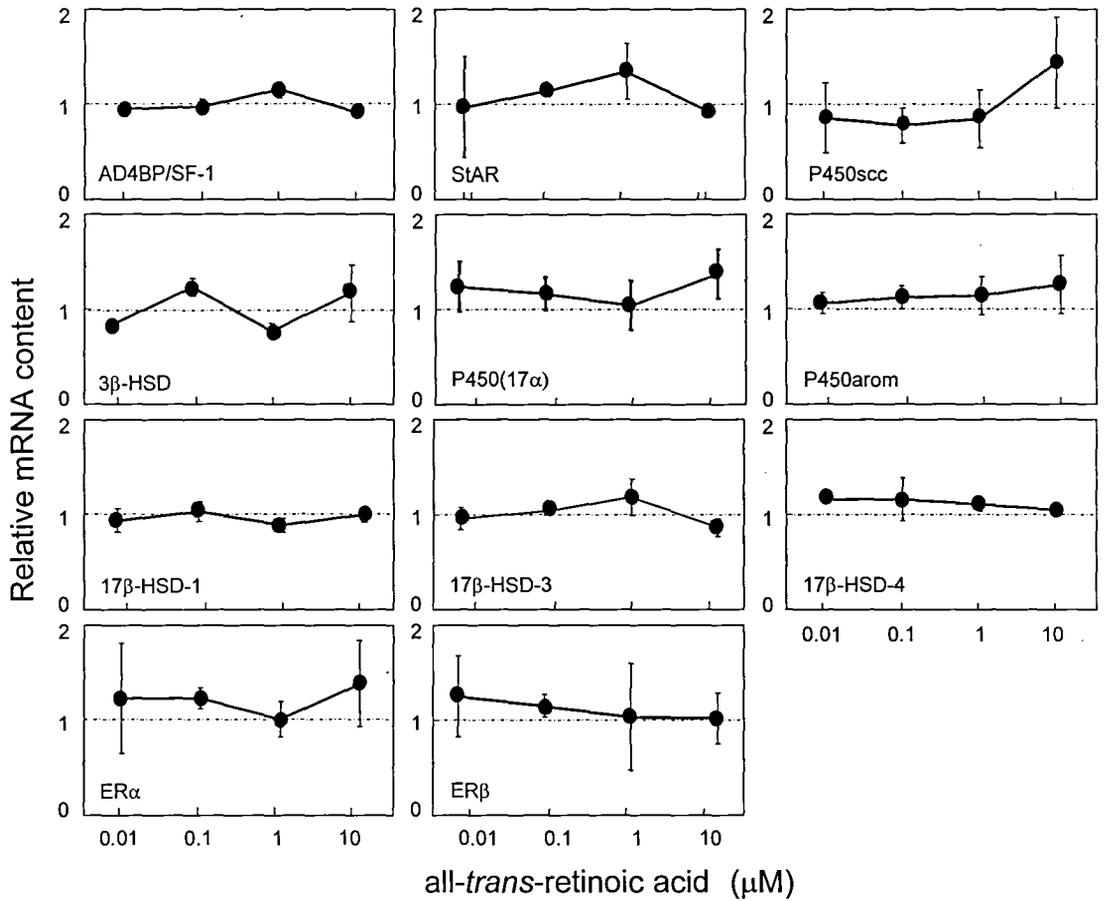
海馬スライスに、9-*cis*-レチノイン酸、all-*trans*-レチノイン酸を作用させ (0.01–10  $\mu\text{M}$ 、48 時間)、海馬エストロジオール合成系酵素、ER の mRNA 量の変化を解析した。Fig. 2-2-1、2-2-2 にそれぞれ 9-*cis*-レチノイン酸、all-*trans*-レチノイン酸による影響を示す。P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量は 0.1–10  $\mu\text{M}$  の 9-*cis*-レチノイン酸処理で有意に増加し、最大の変化は 1  $\mu\text{M}$  の 9-*cis*-レチノイン酸処理による 3 倍の増加であった (Fig. 2-2-1)。また 1  $\mu\text{M}$  の 9-*cis*-レチノイン酸処理により P450arom と ER $\beta$  の mRNA 量はそれぞれ、約 1.5 倍、1.2 倍に増加した (Fig. 2-2-1)。その他の酵素、レセプター mRNA 量 (StAR、3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD-3、17 $\beta$ -HSD-4、17 $\beta$ -HSD-1、ER $\alpha$ 、Ad4BP/SF-1) には顕著な影響は観察されなかった。all-*trans*-レチノイン酸による影響は見られなかった (Fig. 2-2-2)。

このように、RXR アゴニストである 9-*cis*-レチノイン酸がニューロステロイド合成分子、ER $\beta$  の mRNA 量に影響を与えたので、このスライス培養系に RXR シグナル伝達系が機能しているかどうかを解析した。cellular retinoid binding protein type-2 (CRBP2) は、プロモーター部分に RXR 応答配列 (RXR-responsive element: RXRE) を持つ RXR の標的遺伝子である [120, 121]。海馬スライスの CRBP2 mRNA 量は 9-*cis*-レチノイン酸処理により有意に増加したので、この海馬スライス系には RXR 応答系が十分に機能していることが確認された (Fig. 2-2-1)。また CRBP2 mRNA 量に対する 9-*cis*-レチノイン酸濃度依存性は、P450(17 $\alpha$ ) mRNA に対する濃度依存性と、mRNA の増加率、10  $\mu\text{M}$  で増加率が低下する逆 U 字型の形状など大変良く似ているので、P450(17 $\alpha$ ) の発現も CRBP2 と同じ RXR シグナル伝達系で活性化されていると考えて矛盾はない。



**Fig. 2-2-1 Dose dependence of mRNA contents in cultured hippocampal slices on 9-cis-retinoic acid.**

Slices were incubated with or without 0.01 to 10  $\mu$ M of 9-cis-retinoic acid for 48 hours. The amounts of mRNA were determined by real-time RT-PCR. The mRNA contents are given as values relative to those of the non-treated slices. The values are means of four separate experiments. The error bars indicate the S.D. \*,  $p < 0.05$  in the paired statistical comparison with the non-treated slices.

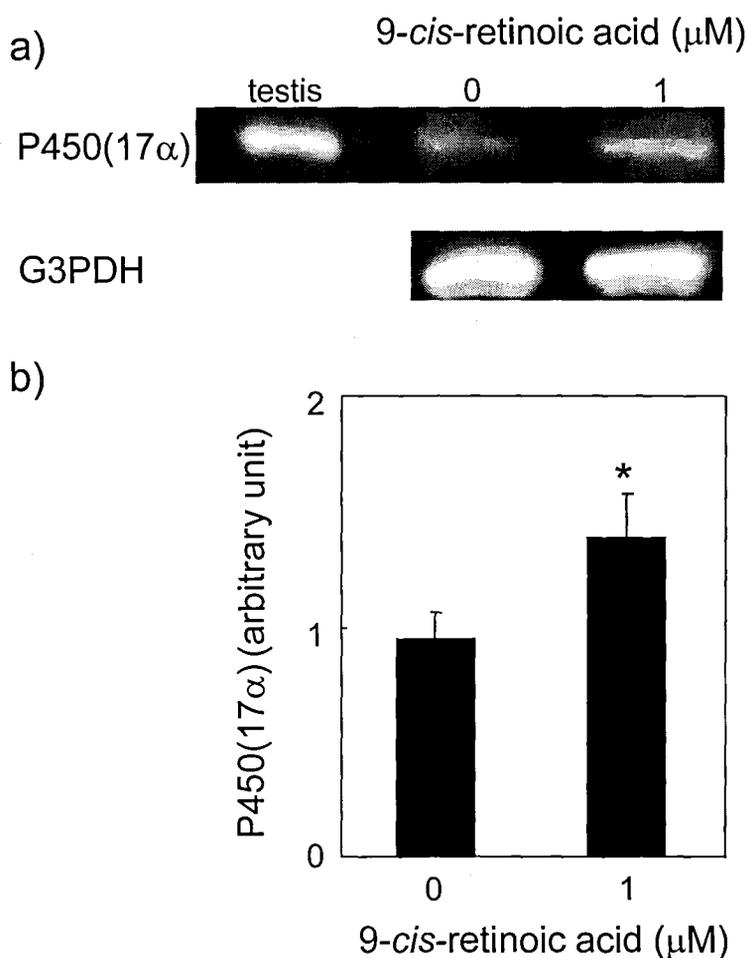


**Fig. 2-2-2 Dose dependence of mRNA contents in cultured hippocampal slices on all-trans-retinoic acid.**

Slices were incubated with or without 0.01 to 10  $\mu\text{M}$  of all-trans-retinoic acid for 48 hours. The amounts of mRNA were determined by real-time RT-PCR. The mRNA contents are given as values relative to those of the non-treated slices. The values are means of four separate experiments. The error bars indicate the S.D.

## P450(17 $\alpha$ )タンパク質量に対する 9-*cis*レチノイン酸の影響

Fig. 2-2-1 で示したように、1  $\mu$ M 9-*cis*レチノイン酸により P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量は 3 倍以上に増加した。そこで P450(17 $\alpha$ )タンパク質量の変化を解析した。海馬スライスのホモジネート (50  $\mu$ g protein)をウェスタンブロッティングしたところ、P450(17 $\alpha$ )に特異的な抗体と反応するバンドが検出され、その分子量は約 58000 で精巣ホモジネートに見られた特異的なバンドと同じ位置にあった。1  $\mu$ M 9-*cis*レチノイン酸で海馬スライス进行处理すると P450(17 $\alpha$ )のバンド強度は約 1.7 倍に増加した (Fig. 2-2-3)。このとき、内部標準として用いたグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: G3PDH)の特異的なバンドの強度は変化しなかった。



**Fig. 2-2-3 Western blotting and protein contents of P450(17 $\alpha$ ) in cultured rat hippocampus.**

Slices were incubated with or without 1  $\mu$ M of 9-*cis*-retinoic acid for 48 hours. The homogenates of cultured slices (50  $\mu$ g protein) and rat testis (2.5  $\mu$ g protein) were subjected to Western blotting analysis against anti-body for P450(17 $\alpha$ ) and G3PDH (a). Bands intensity of P450(17 $\alpha$ ) in the homogenate was digitized and represented as relative intensity (b). \*,  $p < 0.05$  in the paired statistical comparison with the non-treated slices.

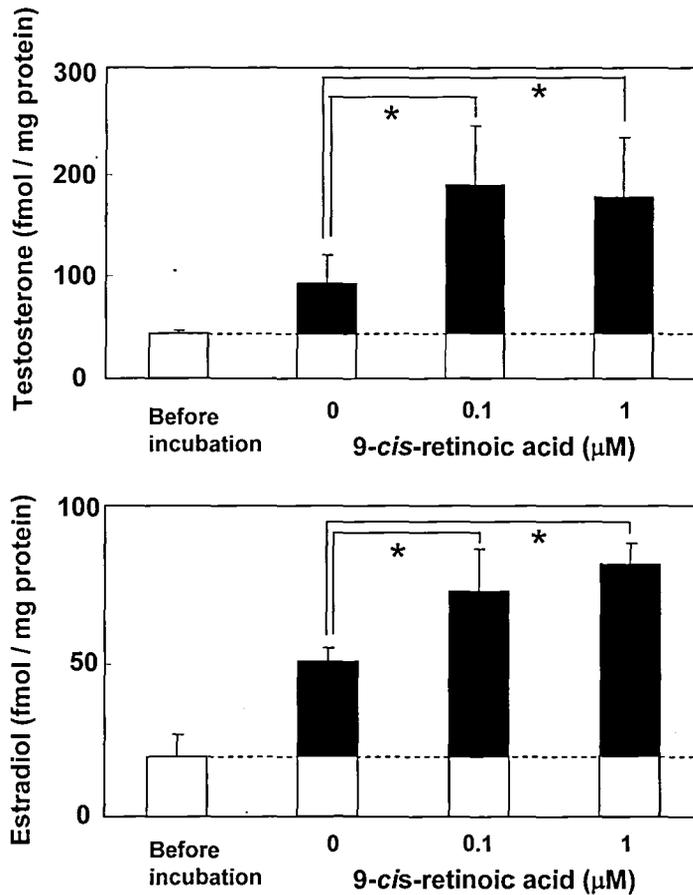
## 9-*cis* レチノイン酸が海馬テストステロン、エストラジオール量に与える影響

24 時間の前培養後の海馬スライスのテストステロン量は  $43.7 \pm 2.9$  fmol / mg protein であった。9-*cis* レチノイン酸無し (無処理スライス)、または 9-*cis* レチノイン酸 0.1、1  $\mu$ M 存在下で海馬スライスを 48 時間培養すると、テストステロン量はそれぞれ、 $92.6 \pm 29$ 、 $190 \pm 60$ 、 $178 \pm 60$  fmol / mg protein となり無処理海馬スライスに対し有意に増加した (Fig. 2-2-4)。棒グラフの黒塗りの部分は 48 時間の培養中に海馬スライスが *de novo* 合成したテストステロン量を示す。無処理スライス、9-*cis* レチノイン酸 0.1、1  $\mu$ M 処理したスライスの *de novo* テストステロン合成量はそれぞれ約 49、146、34 fmol / mg protein であり、0.1  $\mu$ M 9-*cis* レチノイン酸処理により無処理海馬スライスのテストステロン合成の約 3 倍、1  $\mu$ M 処理で約 2 倍に増加した。

また、RIA によりエストラジオールの定量を行った。24 時間の前培養後の海馬エストラジオール量は  $19.0 \pm 7.1$  fmol / mg protein であった。48 時間培養後の無処理スライス、9-*cis* レチノイン酸 0.1、1  $\mu$ M 処理後のスライス・培地のエストラジオール量はそれぞれ、 $51.8 \pm 4.7$ 、 $74.2 \pm 13.6$ 、 $83.1 \pm 6.7$  fmol / mg protein であり、無処理海馬スライスに対し有意に増加した (Fig. 2-2-4)。このグラフで棒グラフの黒塗りの部分は 48 時間の培養中に海馬が *de novo* 合成したエストラジオール量を示す。9-*cis* レチノイン酸 0.1、1  $\mu$ M 処理後の *de novo* エストラジオール合成量はそれぞれ約 55、64 fmol / mg protein であり、無処理海馬スライスの約 32 fmol / mg protein に対し、約 2 倍に増加した。このようにこの実験結果は 9-*cis* レチノイン酸により海馬エストラジオール合成が亢進することを示している。

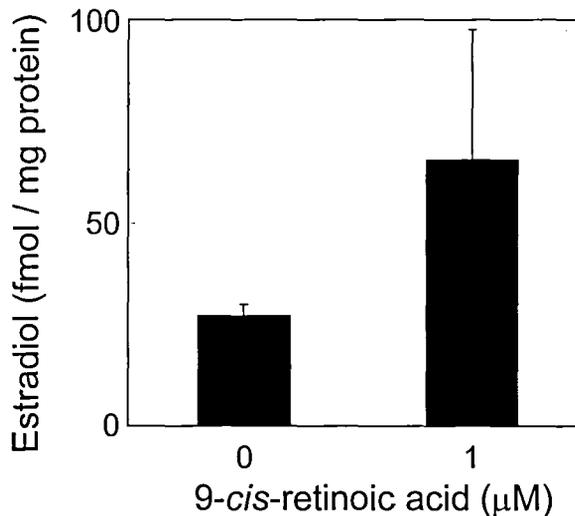
エストラジオールの定量法としては、RIA、EIA など、特異的な抗体を用いた免疫学的手法が一般的である。しかし、これらの手法には共雑物による誤差、類似化合物による誤差等が大きく、生体サンプルに用いるには注意が必要である。実際、同じサンプルをいくつかの免疫学的手法と LC-MS / MS で定量して比較すると、測定値に大きな食い違いが見られる [122]。そこで本実験では RIA に加えて LC-MS / MS によってもエストラジオールの定量を行った。

その結果、無処理スライス中の 48 時間培養後のエストラジオール量は、LC-MS / MS の測定では  $27.2 \pm 2.7$  fmol / mg protein であり、RIA の測定では  $51.8 \pm 4.7$  fmol / mg protein であった。1  $\mu$ M の 9-*cis* レチノイン酸の存在下で 48 時間培養したスライスでは、LC-MS / MS の測定値が  $64.5 \pm 34.5$  fmol / mg protein、RIA の測定値は  $83.1 \pm 6.7$  fmol / mg protein であった (Fig. 2-2-5)。血中エストラジオールを LC-MS / MS と RIA を用いて定量した Nelson らの実験では、LC-MS / MS で定量した方が測定値が高い [122]。一方、本実験結果ではやや低めの値となった。本実験で用いた抗エストラジオール抗体はエストロン、エストリオールとも交差反応するが、定量前に HPLC でこれらの類似ステロイドは分離しており、測定値の食い違いの原因は不明である。しかし、エストラジオール濃度も概ね近い値であり、9-*cis* レチノイン酸処理により海馬のエストラジオール量が約 1.5–2 倍に増加する点でも一致した。RIA での定量値と、LC-MS / MS の定量値が概ね一致したことから、両者での定量に本質的な差異がないことが確認された。



**Fig. 2-2-4 Testosterone and estradiol contents in cultured hippocampal slices.**

Sex steroids were extracted from the slices after the 24-hour pre-culture (before incubation), and slices and medium after the 48-hour incubation with 0, 0.1 or 1 μM 9-cis-retinoic acid. The extracted testosterone and estradiol were quantified by EIA and RIA, respectively. \*,  $p < 0.05$  in the paired statistical comparison with the non-treated slices.



**Fig. 2-2-5 Estradiol contents in cultured hippocampal slices.**

Estradiol were extracted from the slices and medium after the 48-hours incubation with 0 and 1 μM 9-cis-retinoic acid. The extracted estradiol was quantified by LC-MS / MS.

## 10日齢と8週齢ラット海馬の海馬エストラジオール合成系酵素、レチノイドレセプターmRNA量の比較

以上の実験により、9-*cis*-レチノイン酸が10日齢ラット海馬スライスのエストラジオール合成を亢進させることが明らかになった。成体のラット海馬でもエストラジオールは *de novo* で合成される [77]。そこで10日齢ラットと8週齢ラットの海馬におけるニューロステロイド合成酵素、RXR、RARのmRNA量を比較した (Table 2-I)。10日齢ラット海馬のエストラジオール合成系酵素 mRNA量は Fig. 2-1-4 で示したものである。8週齢ラット海馬では、P450scc mRNAは検出できたが、10日齢ラット海馬の半分以下の量であり、正確に定量できなかった。また、17β-HSD-4 mRNA量は10日齢ラット海馬の約1/3であった。その他のニューロステロイド合成酵素類のmRNA量は10日齢ラットと8週齢ラット海馬で有意な差はみられなかった。RXR、RARのmRNAは10日齢、8週齢ラット海馬で同程度の発現が観察された。

Table 2-II  
Transcript level of StAR protein, steroidogenic enzymes, and RXRs in rat hippocampus

mRNA	10-day-old	8-week-old
StAR	220 x10 <sup>3</sup> ± 60 x10 <sup>3</sup>	290 x10 <sup>3</sup> ± 60 x10 <sup>3</sup>
P450scc	110 ± 0.15	1 ± 0.36
P450(17α)	57 x10 <sup>3</sup> ± 1.8 x10 <sup>3</sup>	71 x10 <sup>3</sup> ± 57 x10 <sup>3</sup>
3β-HSD	9.7 x10 <sup>3</sup> ± 3.9 x10 <sup>3</sup>	10 x10 <sup>3</sup> ± 9.7 x10 <sup>3</sup>
17β-HSD-1	49 x10 <sup>3</sup> ± 11 x10 <sup>3</sup>	48 x10 <sup>3</sup> ± 7 x10 <sup>3</sup>
17β-HSD-3	28 x10 <sup>6</sup> ± 3.7 x10 <sup>6</sup>	50 x10 <sup>6</sup> ± 7 x10 <sup>6</sup>
17β-HSD-4	2.9 x10 <sup>6</sup> ± 0.38x10 <sup>6</sup>	9.5 x10 <sup>6</sup> ± 0.59 x10 <sup>6</sup>
P450arom	42 x10 <sup>3</sup> ± 3.1 x10 <sup>3</sup>	69 x10 <sup>3</sup> ± 44 x10 <sup>3</sup>
RXRα	1.2 x10 <sup>6</sup> ± 0.16 x10 <sup>6</sup>	2.7 x10 <sup>6</sup> ± 1.8 x10 <sup>6</sup>
RXRβ	1.9 x10 <sup>6</sup> ± 0.18 x10 <sup>6</sup>	3.4 x10 <sup>6</sup> ± 1.3 x10 <sup>6</sup>
RXRγ	1.1x10 <sup>6</sup> ± 0.16 x10 <sup>6</sup>	1.8 x10 <sup>6</sup> ± 0.65x10 <sup>6</sup>
RARα	1.6 x10 <sup>6</sup> ± 0.99x10 <sup>6</sup>	0.73 x10 <sup>6</sup> ± 0.22x10 <sup>6</sup>
RARβ	0.91 x10 <sup>6</sup> ± 0.12 x10 <sup>6</sup>	1.1 x10 <sup>6</sup> ± 0.13 x10 <sup>6</sup>
RARγ	0.28x10 <sup>6</sup> ± 0.05 x10 <sup>6</sup>	0.62 x10 <sup>6</sup> ± 0.31 x10 <sup>6</sup>

Hippocampi were isolated from 10-day-old and 8-week-old male rats. The amounts of mRNA were determined by real-time RT-PCR. The mRNA contents are given as molecules per mg proteins of the hippocampus. The values are means of three to five separate experiments.

#### 2-2-4. 考察

海馬機能は性ホルモンによって影響されるだけでなく [123]、レチノイドによっても影響を受ける [117]。性ステロイドやレチノイドは、発達過程ではそれぞれ独自に脳に作用し、前者は性分化やニューロンネットワークの構築に、後者は脳全体の発達に必須である [33, 54, 56, 124]。また、これらは共に成熟した脳にも作用する。この場合、両者とも記憶・学習の獲得、スパインやシナプス数の増加など、海馬の能力を維持する過程に関わっている [119, 125, 126, 127]。性ステロイドとレチノイドが成熟した脳で良く似た機能を持つことから、これらのクロストークの存在が推定できる。また海馬では、ニューロステロイド合成酵素である P450(17 $\alpha$ )や P450arom、P450scc のタンパク質、StAR、3 $\beta$ -HSD の mRNA は神経細胞で発現している [73]。同様に、RAR $\alpha$ や RXR $\beta$  の mRNA も神経細胞に局在する [119]。このように、ニューロステロイド合成酵素とレチノイドレセプターが同じ細胞に局在していることを考慮すると、レチノイン酸はニューロステロイド合成になんらかの関わりを持つ可能性がある。事実、末梢では、卵巣のエストラジオール合成はレチノイドにより影響される [15]。この実験では、レチノイン酸が海馬エストラジオール合成に影響を及ぼすことを明らかにした。この研究はニューロステロイド合成とレチノイン酸合成の関係を示した初めての研究である。

1  $\mu$ M 9-*cis*レチノイン酸は P450(17 $\alpha$ )と P450arom の mRNA 量を増加させ、P450(17 $\alpha$ )のタンパク質量も増加させた。これらに伴い、テストステロン、エストラジオール量も約2倍に増加した。他のステロイド合成酵素類の mRNA 量には影響を与えなかった。P450(17 $\alpha$ )はテストステロン、エストラジオールの前駆体である DHEA あるいは、アンドロステンジオンを合成する。よって9-*cis*レチノイン酸によるテストステロンやエストラジオール合成の活性化は P450(17 $\alpha$ )の転写促進によるものだと考えられる。一方、P450arom mRNA 量も1  $\mu$ M 9-*cis*レチノイン酸により僅かだが有意に増加した。P450arom は、テストステロンをエストラジオールに変換する酵素であり、その増加はエストラジオール合成を促進するであろう。しかし P450arom mRNA 量が増加しない0.1  $\mu$ M 9-*cis*レチノイン酸処理でもエストラジオール量は増加している。よって、9-*cis*レチノイン酸による海馬エストラジオール合成量の増加に対する P450arom mRNA 量の増加の寄与は限定的だと思われる。

海馬のスライスでは、9-*cis*レチノイン酸刺激によって P450(17 $\alpha$ )の転写が最も大きく変動した。精巣のライディヒ細胞や卵巣の顆粒膜細胞をレチノイドで刺激した場合でも P450(17 $\alpha$ )の mRNA が最も大きく変動している [15, 128]。本実験では、CRBP2 と P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量の9-*cis*レチノイン酸濃度依存性は互いに非常に類似していた。CRBP2 の遺伝子のプロモーター領域には RXRE が存在し、RXR ホモダイマーあるいはヘテロダイマーが結合して転写が活性化されることが報告されている [120, 121]。また、P450(17 $\alpha$ )の上流にも RXRE が存在すると示唆されている [15]。9-*cis*レチノイン酸は、RXR 以外に RAR にも結合して RAR ホモダイマー、または RAR-RXR のヘテロダイマーを活性化する。しかし RAR のアゴニストである all-*trans*レチノイン酸は P450 の転写を活性化しなかった。以上のことから、9-*cis*レチノイン酸による P450(17 $\alpha$ )の転写活性化には、RXR だけが関与しており、RAR は関与していないと思われる。おそらく RXR のホモダイマー、あるいは RAR 以外との RXR のヘテロダイマーが寄与しているであろう。

第1章で述べたように、現在までに報告されている海馬ニューロステロイド合成調節機構は NMDA を海馬スライスに作用させると、30分程度でプレグネノロン、エストラジオール合成が増加するという急性効果の報告と、メスラット海馬に GnRH を8日間

作用させるとエストラジオール合成が増加するという報告がある [65, 77, 88]。本実験では、RXR を介して海馬エストラジオール合成が調節される可能性を示した。RXR に高い親和性を示すのは 9-*cis*-レチノイン酸である。しかし、9-*cis*-レチノイン酸は従来は体内でレチノールから生じる生理的なりガンドであるとされていたが、分析手法の改良により、生体内からは検出されないことが判明し、生理的意義が疑問視されている [129]。そのため現在では、RXR はオーファンレセプターであるという意見もある。しかし、9-*cis*-レチノイン酸が検出されないのは、必要な部位で局所的に合成されるためか、非常に短時間しか存在しないためであるという可能性も残されており、その場合は、ニューロステロイド合成は 9-*cis*-レチノイン酸で調節されているかもしれない。そうでない場合は、RXR に対する別の生理的アゴニストを想定せねばならない。RXR の生理的アゴニストの候補としては、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸などの不飽和長鎖脂肪酸がある [130]。脳にはドコサヘキサエン酸が比較的多く、海馬でドコサヘキサエン酸が RXR を介して海馬エストラジオール合成を調節している可能性はあるであろう。

## 2-3. 甲状腺ホルモン、cAMP、グルココルチコイドによる影響

本章では海馬エストラジオール合成に与えるレチノイン酸以外の内因性物質として、甲状腺ホルモン、cAMP、グルココルチコイドの影響について述べる。

脳の発達に必須な甲状腺ホルモン、末梢でのステロイドホルモン合成調節の主要なセカンドメッセンジャーであるcAMPや神経細胞死を誘導するグルココルチコイドを海馬スライスに作用させて、ホルモン合成酵素の mRNA 量に対する影響を調べた。

### 2-3-1. 緒言

#### 脳に対する甲状腺ホルモンの作用

甲状腺ホルモンは、性ステロイドやレチノイドと同様、脳の発達に必須のホルモンである [131]。幼齢期に甲状腺ホルモンが欠乏すると樹状突起の形態に異常が観察されたり、神経突起の伸張が阻害される。また、成熟後の脳に対しても神経新生に影響を与える [131]。甲状腺ホルモンには、生理活性の高いトリヨードチロニンと、それにヨウ素が付加したチロキシシンがある。トリヨードチロニンは核内レセプターのTRに結合する。ホルモンの結合したTRはRXRとヘテロダイマーを形成して遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を調節する [132]。

よってこの実験ではトリヨードチロニンを海馬スライスに作用させ、エストラジオール合成に与える影響を解析した。実験ではスライスのエストラジオール合成酵素類の mRNA 量変化を解析した。

#### ステロイド合成における cAMP の役割

1-2 で述べた様に、末梢内分泌腺でのステロイドホルモン合成は下垂体から分泌されるペプチドホルモンなどにより調節される。LH や FSH、ACTH などが、精巣のライディヒ細胞や卵巣、副腎皮質の細胞表面のレセプターに結合すると、特異的な G タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、cAMP の生成が増加する [133]。

末梢内分泌腺における cAMP の増加は、主に 2 種類の細胞内応答を引き起こす。一つは、StAR タンパク質の転写や発現、リン酸化を介して、数分以内にコレステロールのミトコンドリア内膜への運搬を活性化する急性効果である [25]。ミトコンドリア内膜に運搬されたコレステロールは直ちに P450<sub>scc</sub> によってプレグネノロンへと変換されてステロイドホルモンへと代謝される。このミトコンドリア内膜へのコレステロール輸送が、末梢内分泌腺での律速段階であり、急性効果における主な調節部位である [27]。

また、cAMP の増加の結果、各種ステロイド合成酵素の転写が同時に活性化される慢性効果がある。慢性効果の経路の一つでは、cAMP の増加によってプロテインキナーゼ A (protein kinase A: PKA) が活性化され、その結果、Ad4BP / SF-1 が活性化される [134, 135]。その後、P450(17 $\alpha$ ) など多くのステロイドホルモン合成酵素の転写が促進される [29, 134]。もう一つの経路は CREB の活性化である。細胞内 cAMP の増加により活性化された PKA は CREB をリン酸化させ活性化状態にする。活性化された CREB は遺伝子上流に存在する cAMP 応答配列に結合する。その結果ステロイドホルモン合成酵素の転写が活性化される [136, 137, 138]。いずれの経路でも、細胞を刺激後ステロイド合成酵素の mRNA 量の増加には数時間-24 時間のタイムラグがある [26]。

ラット海馬培養神経細胞を用いた実験では、LH を作用させるとプレグネノロン合成が亢進するとの報告がある [139]。LH は、卵巣、精巣では cAMP を増加させステロイドホルモン合成を活性化させるので、海馬神経細胞内の cAMP 量が増加し、プレグネノロン合成が亢進されるのかもしれない。また脳内で cAMP 合成はある種のニューロペプチドにより活性化される。例えば、Palkovits らは血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal polypeptide: VIP) をラット脳に投与すると cAMP 量が増加すると報告している [140]。また、Etgen らも海馬スライスを用いた実験で、VIP を作用させると細胞内 cAMP が増加することを示している [141]。これらのペプチドがニューロステロイド合成細胞の cAMP 濃度を増加させた場合、ニューロステロイド合成も活性化される可能性がある。

よってこの実験では細胞膜透過性のあるジブチリル cAMP を作用させ、エストラジオール合成酵素類の mRNA 量変化を解析した。

### 脳に対するコルチコステロンの影響

ストレスに応答して副腎皮質で合成されるストレスステロイドは、そもそもストレスにより身体の受けるダメージを緩和する作用を持つ。ストレスステロイドの生合成は、ストレス緩和作用として身体が本来有する機能である。しかしストレス過多となり、大過剰のストレスステロイドが合成され血中に放出されると、血液-脳関門を通過して脳神経系へ到達し影響を与える。特に海馬は、げっ歯類のストレスステロイドであるコルチコステロンの最大の標的部位である [142]。

高濃度のストレスステロイドの暴露が神経細胞に損傷を与え、細胞死を誘発するという報告は数多くなされている。スナネズミの前脳が虚血に侵されると海馬 CA1 領域の錐体神経細胞の細胞死が起こるが、前脳が虚血に侵されてから 24 時間後、コルチコステロンの主要な合成器官である副腎を摘出すると細胞死がなくなるという報告がある [143]。副腎を摘出した状態からコルチコステロンを投与すると CA1 錐体神経細胞の損傷が増えることから副腎由来のコルチコステロンが細胞死を引き起こしていることが示唆されている。また、3 週間にわたって 10 mg のコルチコステロンを血中へ注射投与し続けると海馬 CA3 領域の錐体神経細胞の放射状層樹状突起の全長が短縮することが報告されており [144]、副腎皮質から血中に放出された高濃度のコルチコステロンが海馬神経細胞に悪影響を与えることが明らかとなってきた。一方、海馬神経細胞に直接コルチコステロンを作用させる研究も数多くある。例えば、ラットの海馬神経細胞の初代培養細胞と、GR を発現させたマウスの培養神経細胞株である HT22 に神経毒のβ-アミロイドとグルタミン酸を投与して細胞死を誘発させた場合、1 μM コルチコステロン処理によりこれら神経毒に対する神経細胞の脆弱性を増強し、またこの効果が GR のアンタゴニストである RU486 によって阻害されることが報告されている [145]。またラット海馬神経細胞の初代培養細胞に 1 μM のコルチコステロンを投与すると細胞死が誘発されることが報告されている [146]。

このようにコルチコステロンは海馬神経細胞にとって有害な影響を引き起こす。一方でエストラジオールはコルチコステロンによる細胞毒性を抑制する神経保護効果を有する [147]。神経保護効果は海馬で合成されるエストラジオールも有する [82, 85]。例えば脳障害により、P450arom の転写が促進され、酵素活性も増加し [148]、脳内エストラジオール量が増加するという報告がある [149]。海馬はコルチコステロンでダメージを受けると、自身のエストラジオール合成を亢進させるかもしれない。そこでこの実験ではコルチコステロンを海馬スライスに作用させ、エストラジオール合成

系酵素 mRNA 量の変化を解析した。

## 2-3-2. 方法

海馬スライスのトリヨードチロニン、ジブチリル cAMP、コルチコステロン処理

### 【準備試薬】

- 3, 3', 5- Triiodo-L-thyronine; Sigma
  - N<sup>6</sup>,2'-O-dibutryladenosine 3': 5'- cyclic monophosphate; Sigma
  - Corticosterone; Sigma
- DMSO で 10 mM ストック溶液を作成した。

### 【実験方法】

ラット海馬スライス作成法は第 2 章ラット海馬スライス培養法で示した。24 時間前培養を行い、無血清培地に交換した。その際、各物質のエタノール溶液を無血清培地の 1 / 1000 (1.1 μl)量を添加しよく混ぜた。無処理スライスの培地にはホルモン測定用エタノールを 1.1 μl 加えた。各物質によるスライスの処理は 48 時間行った。

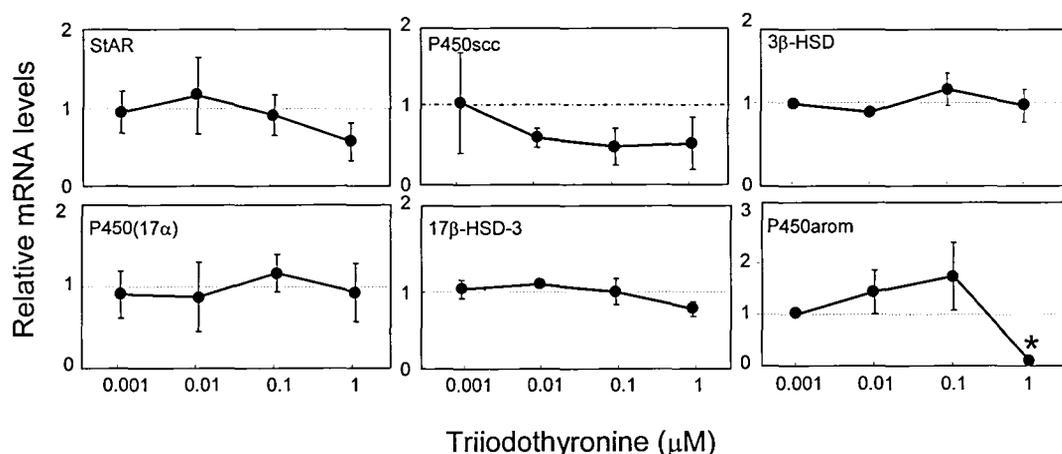
### StAR タンパク質、エストラジオール合成系酵素の mRNA の定量

第 2 章 ラット新鮮海馬の total RNA 抽出法及び cDNA 合成法、スライスからの total RNA 抽出法で mRNA を定量した。

### 2-3-3. 結果

#### 海馬エストラジオール合成系酵素 mRNA 量に対する甲状腺ホルモンの影響

海馬スライスにトリヨードチロニンに作用させ (0.001–1  $\mu\text{M}$ 、48 時間)、海馬エストラジオール合成系酵素の mRNA 量変化を解析した。Fig. 2-3-1 はトリヨードチロニンで処理したスライスの各 mRNA 量が無処理スライスに対する相対値を示す。海馬スライスを 1  $\mu\text{M}$  トリヨードチロニンで処理すると P450arom mRNA 量は 1/20 に減少した。他のエストラジオール合成系酵素 mRNA 量には影響は観察されなかった。

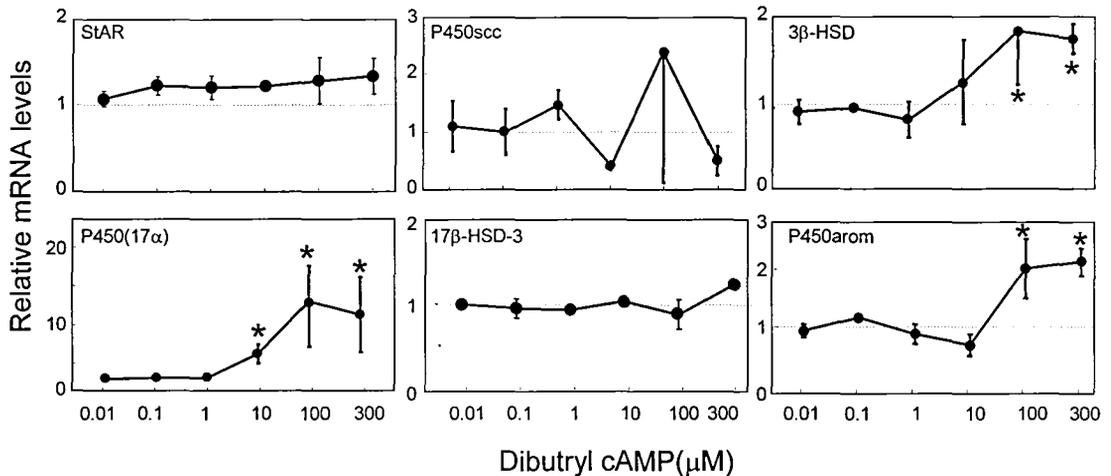


**Fig. 2-3-1 Dose dependence of mRNA contents in cultured hippocampal slices on triiodothyronine.**

Slices were incubated with or without 0.001 to 1  $\mu\text{M}$  of triiodothyronine for 48 hours. The amounts of mRNA were determined by real-time RT-PCR. The mRNA contents are given as values relative to those of the non-treated slices. The error bars indicate the S.D. \*,  $p < 0.05$  in the paired statistical comparison with the non-treated slices.

## 海馬エストラジオール合成系酵素 mRNA 量に対する cAMP の影響

海馬スライス培養中、スライスにジブチリル cAMP を作用させ (0.01–300  $\mu\text{M}$ 、48 時間)、海馬エストラジオール合成系酵素 mRNA 量変化を解析した。Fig. 2-3-2 にジブチリル cAMP の各 mRNA 量に対する影響を無処理スライスに対する相対値で示す。3 $\beta$ -HSD、P450arom mRNA 量は 100–300  $\mu\text{M}$  処理で約 2 倍に増加した。P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量はジブチリル cAMP に対し非常に感受性が高く、100  $\mu\text{M}$  処理で約 15 倍になった。他のエストラジオール合成系酵素 mRNA 量には影響は観察されなかった。

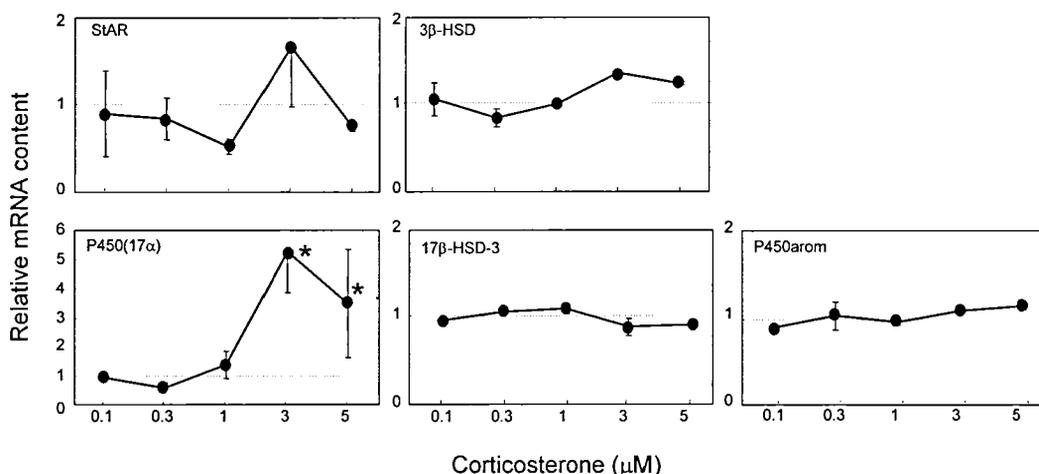


**Fig. 2-3-2 Dose dependence of mRNA contents in cultured hippocampal slices on dibutyl cAMP.**

Slices were incubated with or without 0.01 to 300  $\mu\text{M}$  of dibutryl cAMP for 48 hours. The amounts of mRNA were determined by real-time RT-PCR. The mRNA contents are given as values relative to those of the non-treated slices. The error bars indicate the S.D. \*,  $p < 0.05$  in the paired statistical comparison with the non-treated slices.

## 海馬エストラジオール合成系酵素 mRNA 量に対するコルチコステロンの影響

海馬スライス培養中に、コルチコステロンを作用させ (0.1–5  $\mu\text{M}$ 、48 時間)、海馬エストラジオール合成系酵素 mRNA 量変化を解析した。Fig. 2-3-3 にコルチコステロンで処理したスライスの各 mRNA 量を無処理スライスに対する相対値で示す。P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量は 3  $\mu\text{M}$  処理で約 5 倍に増加した。他のエストラジオール合成系酵素 mRNA 量には影響は観察されなかった。



**Fig. 2-3-3 Dose dependence of mRNA contents in cultured hippocampal slices on corticosterone**

Slices were incubated with or without 0.1 to 5  $\mu\text{M}$  of corticosterone for 48 hours. The amounts of mRNA were determined by real-time RT-PCR. The mRNA contents are given as values relative to those of the non-treated slices. The error bars indicate the S.D. \*,  $p < 0.05$  in the paired statistical comparison with the non-treated slices.

#### 2-3-4. 考察

本実験では、甲状腺ホルモン、cAMP、グルココルチコイドの海馬エストラジオール合成に対する影響を合成系酵素 mRNA 量の変化で解析した。

海馬スライスをトリヨードチロニンで処理した場合、1  $\mu\text{M}$  という高濃度のトリヨードチロニンにより、P450arom mRNA 量が 1 / 20 に減少した。しかし、これより低濃度では、どのエストラジオール合成系酵素 mRNA 量にも影響はみられなかった。生理的な血中トリヨードチロニン濃度は 0.001–0.01  $\mu\text{M}$  である [150]。よって、1  $\mu\text{M}$  のみ見られた影響がラット脳内で生理的な甲状腺ホルモン濃度で起こる可能性は低いと考えられる。

TR がトリヨードチロニンと結合すると、RXR とヘテロダイマーを形成して DNA に作用する。しかしこの TR–RXR ヘテロダイマーは、9-*cis*-レチノイン酸では活性化されない [151]。よって海馬の P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量の発現が 9-*cis*-レチノイン酸で活性化されるがトリヨードチロニンで活性化されないことは、TR–RXR ヘテロダイマーの性質とは矛盾しない。

ジブチリル cAMP は海馬スライス中のエストラジオール合成系酵素のうち、3 $\beta$ -HSD、P450arom、P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量を 2–15 倍に増加させた。副腎皮質などの末梢内分泌腺では、cAMP は CREB や Ad4BP / SF-1 といった転写因子の活性化を介してステロイド合成酵素の転写を促進する [29, 30, 31, 136, 152]。よって、本実験で観察されたステロイド合成酵素の mRNA 量の増加は、CREB や Ad4BP / SF-1 のような転写因子を介したものであるかもしれない。しかし、ジブチリル cAMP による刺激において、海馬と副腎皮質では、P450(17 $\alpha$ )などの転写活性化は一致しているが、StAR、P450scc の活性化という点では一致しない。この差異の理由は現在のところ不明である。

ニューロステロイド合成と cAMP の関係を直接示した報告は現在のところみあたらないが、関連を示唆する報告はいくつかある。例えば、LH はラット海馬培養神経細胞のプレグネロン合成を亢進させる [139]。また培養海馬神経細胞に GnRH を作用させるとエストラジオール合成が亢進される [88]。卵巣、精巣では GnRH、LH 共に細胞内 cAMP を増加させステロイドホルモン合成を活性化させるので、海馬でも同様の機構で神経細胞内 cAMP 量が増加し、ニューロステロイド合成が亢進させる機構が存在するかもしれない。また、VIP などのある種のニューロペプチドも神経細胞に作用し、cAMP 量を増加させる [141]。また、ドーパミンなどの神経伝達物質も cAMP 産生を促進することが知られている [153]。このように、様々な刺激により神経細胞内 cAMP 量は変動するのでニューロペプチドや神経伝達物質は神経細胞内 cAMP 量を変化させることでニューロステロイド合成にも影響を与える可能性がある。

コルチコステロンは 3  $\mu\text{M}$  で海馬エストラジオール合成系酵素のうち、P450(17 $\alpha$ )の転写を促進した。この酵素の mRNA 量の増加は、海馬でのエストラジオール合成を促進させる可能性がある。コルチコステロンペレットを皮下に埋め込むことでコルチコステロン濃度を人為的に高めたラットの海馬では、神経細胞死やアポトーシスが観察される [154]。一方でエストラジオールはコルチコステロンによる細胞毒性を減じる作用をもつ [147]。神経保護作用は海馬で合成されるエストラジオールも有する [82, 85]。コルチコステロンがエストラジオール合成を活性化するのであれば、それは、ダメージを受けた海馬が自身の保護のために *de novo* のエストラジオール合成を促進させることを意味するのかもしれない。

## 2-4. 第 2 章の総括

この章では、海馬スライス培養を用いた実験系を用い、トリブチルスズ、ジブチルスズ、レチノイン酸、トリヨードチロニン、ジブチリル cAMP、コルチコステロンを作用させ、ニューロステロイド合成に対する効果を主に mRNA の定量によって解析した。これらの物質による mRNA 量への影響を、Table 2-II にまとめた。

Table 2-II にあるように、最も多くの物質によって変動したのは P450(17 $\alpha$ )の mRNA であった。また、その変動幅も最も大きかった。次に多く変動したのは P450arom の mRNA であった。3 $\beta$ -HSD の mRNA もジブチリル cAMP 刺激では増加した。他の酵素や Ad4BP / SF-1 の mRNA は今回の実験条件では変動しなかった。特に StAR の mRNA 量が生殖腺や副腎皮質では刺激によって大きく変動するのに対し、海馬スライスでは変化しなかったことは、注目に値する。

一部の実験では海馬スライスのエストラジオール量の変化も測定した。スライスを 0.1  $\mu$ M トリブチルスズと 0.1–1  $\mu$ M 9-*cis*-レチノイン酸で処理すると P450(17 $\alpha$ )の mRNA が増加し、この処理により海馬スライスと培地のエストラジオール量も増加した。48 時間の処理中に増加したエストラジオール量から *de novo* の合成量を見積もると、無処理スライスの合成量の約 2 倍となっていた。9-*cis*-レチノイン酸で処理した場合はテストステロン量も測定した。やはり 48 時間の処理中の *de novo* の合成量は、無処理スライスの 2–3 倍に増加していた。9-*cis*-レチノイン酸処理の場合、P450(17 $\alpha$ )のタンパク質量も 1.7 倍に増加していた。このように、エストラジオールやテストステロン生合成の活性化と P450(17 $\alpha$ )の mRNA、タンパク質量の増加は良く相関していた。ラット海馬の P450(17 $\alpha$ )mRNA の絶対量は、P450scc、3 $\beta$ -HSD について少なく、P450(17 $\alpha$ )の活性が性ホルモンの合成量の調節部位であることは十分に考えられる。

P450arom の mRNA 量は、0.1  $\mu$ M のトリブチルスズや 1  $\mu$ M 9-*cis*-レチノイン酸処理により、エストラジオール合成の亢進と共に増加した。P450arom はテストステロンからエストラジオールを直接合成する活性を持ち、またその mRNA の絶対量も比較的少ないので、エストラジオール合成の調節に関与していると考えても矛盾はない。しかし、海馬スライスをジブチルスズで処理した場合、P450arom の mRNA 量は約 2 倍に増加したが、エストラジオール量は増加しなかった。このときには P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量は変化していない。また、エストラジオール量が増加した 0.1  $\mu$ M 9-*cis*-レチノイン酸処理では、P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量は増加したが、P450arom の mRNA 量は変化しなかった。この結果は、*in vitro* では P450arom mRNA 量の増加だけではエストラジオール合成が活性化されないこと、そして P450arom mRNA 量の増加がエストラジオール合成の活性化に必須ではないことを示している。

3 $\beta$ -HSD の mRNA 量は、海馬スライスを 100–300  $\mu$ M のジブチリル cAMP で刺激した場合には約 2 倍に増加した。しかし、3 $\beta$ -HSD 1 分子が 1 秒間に代謝するステロイド分子数は、P450 類の約 60 倍であり、この酵素がニューロステロイド合成を律速しているとは考えにくい [155]。また 100–300  $\mu$ M のジブチリル cAMP での刺激では、海馬スライスの P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量は 15 倍に増加している。よって、ジブチリル cAMP での刺激時でも性ホルモン合成の主要な調節部位は 3 $\beta$ -HSD ではなく P450(17 $\alpha$ )であると思われる。

以上より、スライスを用いた *in vitro* の実験により、海馬での *de novo* の性ステロイド合成活性の主要な調節部位は、P450(17 $\alpha$ )であると結論した。

P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量は、トリブチルスズ、9-*cis*-レチノイン酸といった RXR アゴニストによって 2–3 倍に増加した。コルチコステロンでは 5 倍に、ジブチリル cAMP によっては 15 倍に増加した。この実験ではコルチコステロンの作用メカニズムは検討していないが、このホルモンは一般には GR を介して作用する。よって、RXR や GR のアゴニストが海馬の性ホルモン合成の活性化因子であることが、この研究成果から推定できる。また、cAMP は多くのホルモンの

主要なセカンドメッセンジャーである。海馬のニューロン内の cAMP 濃度を上昇させる生理活性物質も、海馬の性ホルモン合成の活性化因子となりうるであろう。

RXR は、転写調節因子として特定の遺伝子上流の結合領域に結合する場合、ダイマーとなって結合する。ダイマー形成にあたっては多種類の核内レセプターと結合する。まず、別の RXR 分子と結合してホモダイマーとなりうる。ヘテロダイマーとなる場合、相手のレセプターは permissive と non-permissive の 2 種類に分類される [151]。permissive レセプターとのヘテロダイマーは、相手のレセプターのアゴニストと、9-*cis*-レチノイン酸がそれぞれ単独か協調して転写を活性化する [91]。permissive レセプターには、PPAR、肝臓 X レセプター、そしてファルネソイド X レセプターが知られている [91]。non-permissive レセプターとのヘテロダイマーは、ダイマーの相手のアゴニストによってのみ活性化される。non-permissive レセプターとしては、RAR、TR そして VDR がある。本実験では、PPAR のアゴニストであるジブチルスズも、RAR のアゴニストである all-*trans*-レチノイン酸も、TR のアゴニストであるトリヨードチロニンも海馬の P450(17 $\alpha$ )の mRNA 量を増加させなかった。この結果は、相手が permissive レセプターであろうと non-permissive レセプターであろうと、RXR のヘテロダイマーは作用せず、RXR のホモダイマーのみが作用することを示している可能性がある。

本実験では生後 10 日前後のオスラット海馬スライス培養系を用いることにより、*in vitro* の実験系でニューロステロイド合成酵素類の mRNA 量と性ステロイド合成量の変動を解析した。成体ラットを用いる実験系と比較した場合のスライス実験系の利点は、(1) 無血清培地を用いれば培地からステロイドの供給がなく、また合成されたステロイドが血流によって失われることもないので、*de novo* のステロイド合成量を正確に測定できる。(2) 6 匹前後のラットから、12-18 のスライス培養プレートを調製でき、同時に比較的多数の物質の効果を測定できる。(3) スライス調製時に各個体から得たスライスを混合するので、プレート間のばらつきも実験ごとのばらつきも少なく、実験の再現性が良い。(4) 薬物の投与量などを自由にコントロールできる。欠点は、(a) 海馬などの脳スライスは、胎仔や新生仔期の脳から得た場合のみ培養可能なので、成熟後の脳を用いたデータは得られない。(b) 培養スライスは *in vivo* とは細胞の状態が異なるので、ステロイド合成活性も、刺激に対する応答も生理的状态とは異なる可能性がある。

この実験では、これらの点についても検討した。(a)の点では、10 日齢ラットと 8 週齢の成熟ラットの海馬のステロイド合成系酵素やレセプターの mRNA 量に大きな差異がないことから、少なくともスライスには成熟脳に存在する酵素やレセプターがすでに存在しているとみなすことは出来る。これらの酵素や情報伝達系が成熟脳と同じ機能を果たしているかは、不明である。(b)の点では、ステロイド合成活性がスライスの培養とともに緩やかに減少していることから、摘出 1 日後のスライスは脳内でのニューロステロイド合成活性をかなり維持していると推定できる。刺激への応答については検討の余地がある。

スライス培養系で得られた知見を *in vivo* への応用や、成熟脳の機能の解析に用いるには、この系の利点と欠点、限界をしっかりと考慮して、細心の注意を払う必要がある。

Table 2-II

	mRNA levels			
	StAR	3 $\beta$ -HSD	P450(17 $\alpha$ )	P450arom
<b>tributyltin</b>	-	-	<b>++</b>	<b>+</b>
<b>dibutyltin</b>	-	-	-	<b>+</b>
<b>9-<i>cis</i>-retinoic acid</b>	-	-	<b>++</b>	<b>+</b>
<b>all-<i>trans</i>-retinoic acid</b>	-	-	-	-
<b>triiodothyronine</b>	-	-	-	-
<b>dibutryl cAMP</b>	-	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>
<b>corticosterone</b>	-	-	<b>++</b>	-

The relative increase of mRNA expression in hippocampal slices by various compounds.; (+/+/+/+) indicates the level of mRNA expression induced by indicated compounds; (-) indicates the unchanged mRNA level.

## 第3章

### 海馬エストラジオール合成に対する飼育環境の影響—*in vivo* 実験

本章では他個体との接触がない社会的孤独環境が海馬エストラジオール合成に与える影響を解析した。群居性の動物であるラットにとって社会的孤独環境はストレスとなる。この実験ではラット海馬エストラジオール合成が社会的孤独環境によりどのように変化するかを解析した。

#### 3-1. 緒言

幼少期の経験は中枢神経系の成長、発達に深く影響を与えたと考えられている。他個体との接触がない環境（社会的孤独環境: social isolation）で幼少期から飼育されたラットの行動は、グループで飼育されたラットの行動とは異なり非常に攻撃的である [156]。また、それらを新しい環境に入れると、探索行動や自発活動が著しく増加する。さらに社会的孤独環境下で飼育されたラットは高い不安行動を示すことが明らかになっている [156]。これらのことから社会的孤独環境はラットにとってストレスであり、この環境下で飼育された個体の示す異常な行動は、長期間にわたるストレスによるものだと考えられている [156]。また、この飼育環境が空間記憶能力に著しい影響を及ぼすことから海馬は社会的孤独環境に感受性が高いと考えられている [157]。

最近、ニューロステロイドと社会的孤独環境の関係が報告されるようになった。ニューロステロイドは第1章で述べたように中枢神経系の可塑性や恒常性を保つ上で非常に重要な役割を担っている。Agís-Balboaらは、社会的孤独環境により嗅球で合成されるニューロステロイドであるアロプレグナノロンが減少することを報告している [93]。アロプレグナノロンはGABA<sub>A</sub>レセプターのアロステリックモジュレーターであり、ラットに投与すると抗不安、抗痙攣、鎮静作用が観察される [158]。同様に、Serraらは離乳後から30日間ラットを社会的孤独環境下で飼育すると脳内アロプレグナノロン量がグループで飼育されているラットに比べ25%にまで激減することを報告している [159]。またラット海馬でもアロプレグナノロン合成酵素である5 $\alpha$ -reductaseや3 $\alpha$ -HSDのmRNA量が減少することが明らかになっている [159]。

海馬はニューロステロイドとしてエストラジオールを合成する。海馬で合成されたエストラジオールは、神経保護やスパイン形成などに密接に関わっており、海馬機能を維持する上で欠かせない物質である。しかし、社会的孤独環境との関連は全く検討されていない。

この実験の目的は海馬エストラジオール合成に対する社会的孤独環境の影響を解析することである。この可能性を検討するためにまず、エストラジオール合成系酵素mRNA量に対する社会的孤独環境の影響を検討した。続いて、社会的孤独環境下でラットを飼育後、海馬エストラジオール量を測定した。また本実験では、社会的孤独環境の影響が海馬だけでなく他の脳領域でも観察されるかどうかを検討するために、ニューロステロイド合成能のある嗅球エストラジオール合成系酵素mRNA量変化も解析した。

## 3-2. 実験方法

### ラット飼育条件

2匹の母体から生まれた28日齢のオスラットをランダムに、社会的孤独環境群(9匹)と2匹飼育群(8匹)に分けた。社会的孤独環境群のラットはプラスチックケージ(26.5cm×42cm×18cm)に1匹で飼育した。よって、社会的孤独環境群のラットは他個体と身体的に接触することは不可能である。2匹飼育群のラットは同種のプラスチックケージに2匹で飼育した。週1回、決められた時刻に床敷の交換(クリーンチップSP: CLEA JAPAN, Inc.)、プラスチックケージの洗浄を行った。この際、各ラットの体重を測定した。両条件での飼育は8週間行った。全ての期間を通して、ラットは餌(飼育繁殖固型飼料(CE-2): CLEA JAPAN, Inc.)、水を自由に摂取できた。また8:00-20:00を明期とする12:12の明期-暗期サイクル下でラットを飼育した。本実験は広島大学動物実験委員会の許可を得て行った。

### 脳重量の測定

両条件下での8週間の飼育後、ラットを断頭して速やかに脳を取り出し、全脳の重量を測定した。その後、海馬と嗅球を脳の他部位から切り離し、重量を測定した。

### 海馬と嗅球のステロイド合成酵素 mRNA の定量

各個体から切り出した嗅球と海馬の1/5から、第2章ラット新鮮海馬のtotal RNA抽出法及びcDNA合成法の方法でtotal RNAを抽出し、ステロイド合成酵素のmRNA量を測定した。

### EIAによるエストラジオール定量

#### 【実験器具】

○マイクロプレートリーダー; TOSOH MPRA4

#### 【準備試薬】

○Estradiol EIA kit; Cayman

エストラジオールスタンダード

エストラジオールアセチルコリンエステラーゼトレーサー

エストラジオール抗体

エルマン試薬

EIA 緩衝液

#### 【準備試薬】

mRNA 定量に用いた残りの海馬から、第2章ラット海馬スライス、培地からのエストラジオール抽出・精製法の手法でエストラジオールを抽出した。HPLCによるエストラジオールの精製は行わなかった。

抽出したエストラジオールを EIA 緩衝液に溶解させ、定量用のサンプルとした。エストラジオールスタンダードを 10 倍にミリ Q 水で希釈する (bulk standard: 10 ng/ml)。この bulk standard をさらに 10 倍に EIA 緩衝液で希釈する (standard 1: 1 ng/ml)。standard 1 を 2 倍に EIA 緩衝液で希釈する (standard 2: 0.1 ng/ml)。次に、standard 2 を EIA 緩衝液で 2 倍に希釈する (standard 3)。この作業を繰り返し、standard 8 まで作る (standard 8: 7.8 pg/ml)。その後、エストラジオールアセチルコリンエステラーゼトレーサー入ったガラス瓶に 6 ml の EIA 緩衝液を加えた。また、エストラジオール抗体が入ったガラス瓶に 6 ml の EIA 緩衝液を加えた。また、エルマン試薬のガラス瓶に 20 ml のミリ Q 水を入れた。エルマン試薬は作ったその日に使うようにした。

上のようにして調製した試薬を用いてエストラジオール量を測定する。用意したサンプル、試薬を備え付けのプレートに入れていく。プレートに入れる試薬は次の通りである。

well	EIA buffer	sample/std	tracer	antibody	total
blank	-	-	-	-	0
total activity	-	-	5 $\mu$ l	-	5 $\mu$ l
NSB	100 $\mu$ l	-	50 $\mu$ l	-	150 $\mu$ l
Bo	50 $\mu$ l	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l
std/sample	-	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l

NSB: non-specific binding

Bo: binding maximum

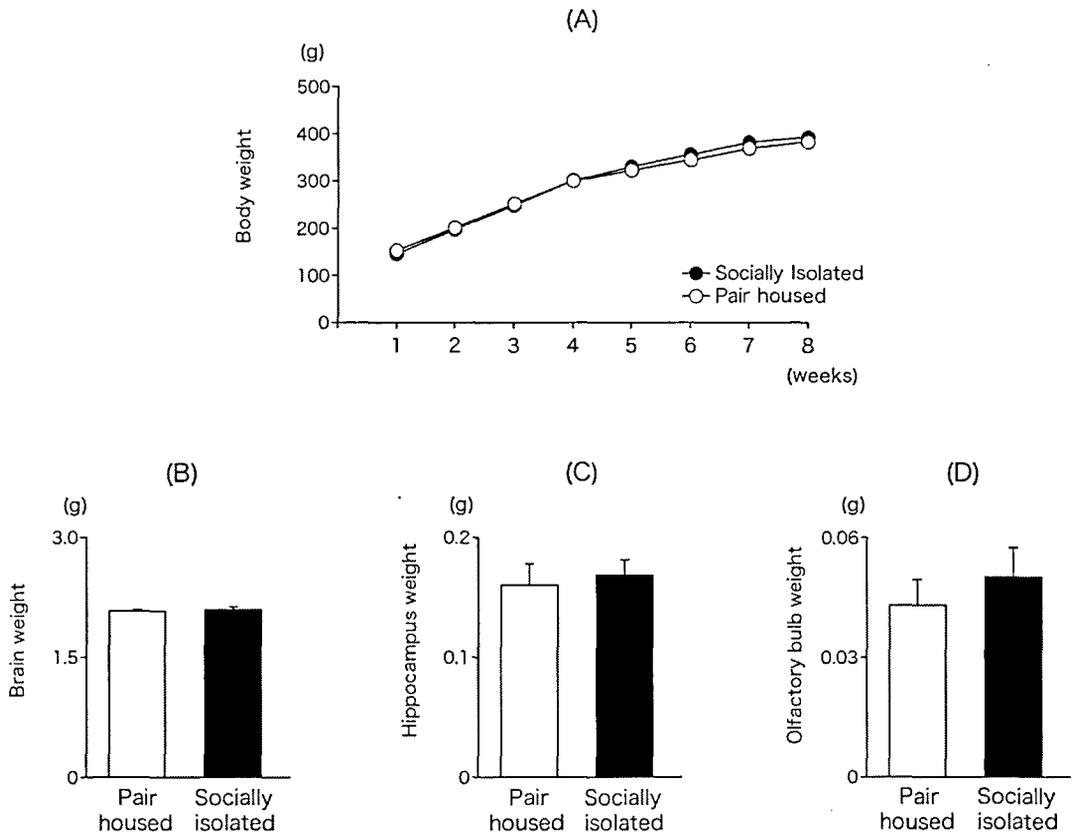
その後以下の操作を順に行った。

- ・試薬、サンプルを入れた後、攪拌・振蕩機上で反応させる (60 min)。
- ・wash buffer で well を 5 回洗う。
- ・エルマン試薬を各 well に 200  $\mu$ l ずつ入れる。ここで、total activity の well にエストラジオールアセチルコリンエステラーゼトレーサーを 5  $\mu$ l 加える。
- ・暗闇で反応させる (60-90 min)。
- ・マイクロプレートリーダーで吸光度を測定する (412nm)。

### 3-3. 結果

社会的孤独環境が体重、全脳重量、海馬重量、嗅球重量に与える影響

Fig. 3-1 に両飼育条件下 (社会的孤独環境、2 匹飼育) で飼育されたラットの体重を示す。各飼育条件のラット間で有意な差は観察されなかった。また、全脳、海馬、嗅球の重量にも有意な差は認められなかった。



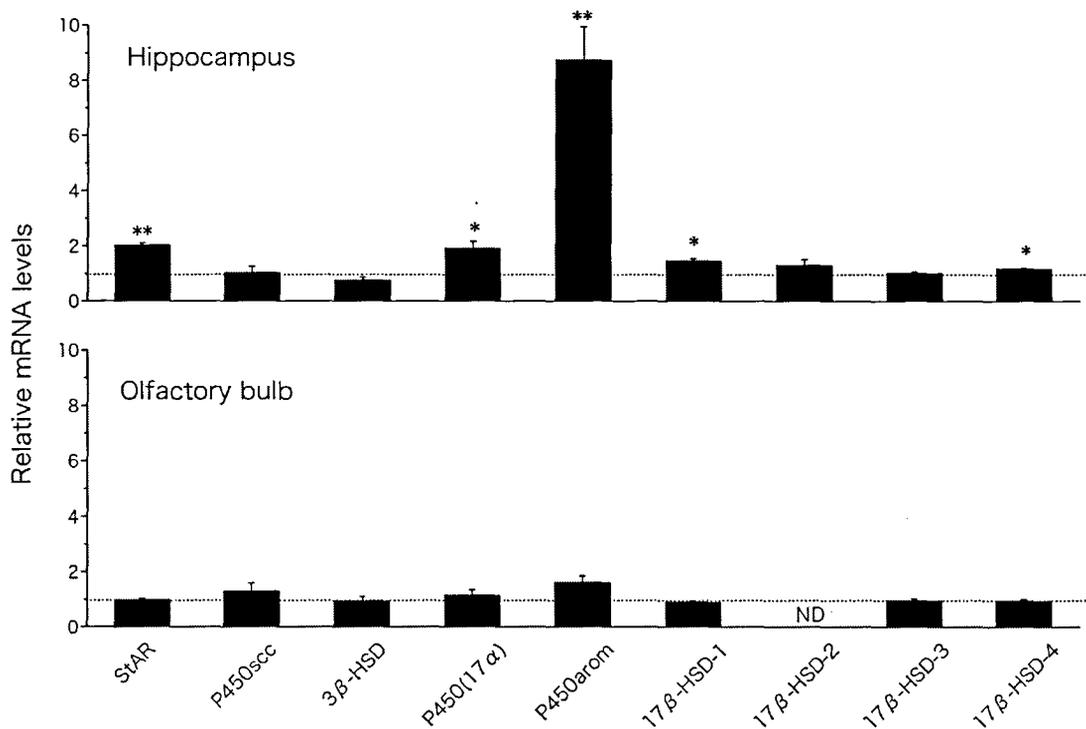
**Fig. 3-1 Effect of social isolation on body, brain and hippocampus and olfactory bulbs weight.**

(A) Body weight is presented as the mean $\pm$ S.E.M. Animals were weighed every a week for the duration of the rearing period (8 weeks total). In 8 weeks, animals were fed *ad libitum*. (B), (C), (D). After rearing period, brain and hippocampus, olfactory bulb weight were measured.

## 社会的孤独環境がラット海馬、嗅球のエストラジオール合成系酵素 mRNA 量に与える影響

ラットを社会的孤独環境下と 1 ケージ 2 匹で飼育 (8 週間) した後、海馬と嗅球のエストラジオール合成系酵素、タンパク質の mRNA 量変化を解析した。StAR、P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD、P450(17 $\alpha$ )、P450<sub>arom</sub>、17 $\beta$ -HSD-1、-2、-3、-4 の mRNA 量は、内部標準として G3PDH の mRNA 量を用いて標準化した。

海馬では社会的孤独環境により StAR、P450(17 $\alpha$ ) の mRNA 量がそれぞれ約 2 倍に有意に増加した (Fig. 3-2)。特筆すべきことは、社会的孤独環境により P450<sub>arom</sub> mRNA 量が約 8 倍に増加したことである。17 $\beta$ -HSD-1、-4 の mRNA 量は有意に増加したがその増加量は 1.5 倍以下であった。その他の各 mRNA 量 (P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD-2、-3) の mRNA 量に有意な影響は観察されなかった。嗅球エストラジオール合成系酵素は社会的孤独環境により影響されなかった (Fig. 3-2)。

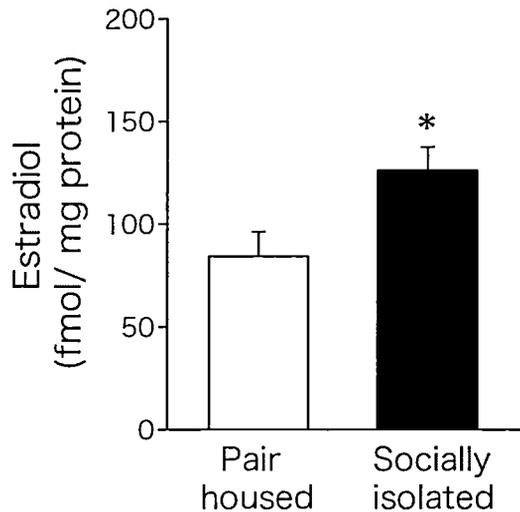


**Fig. 3-2 Real-time PCR analysis of the mRNA levels of neurosteroidogenic enzymes and proteins in the socially isolated rat hippocampus (upper) and olfactory bulb (lower).**

The amounts of mRNA in socially isolated rats are indicated as relative values to those in the corresponding organs of pair housed rats (dashed line). mRNA expression of 17 $\beta$ -HSD-2 was not detected in the olfactory bulb. The columns and error bars represent the means  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 versus pair housed rats. ND, not detected.

## 社会的孤独環境が海馬エストロジオール合成に与える影響

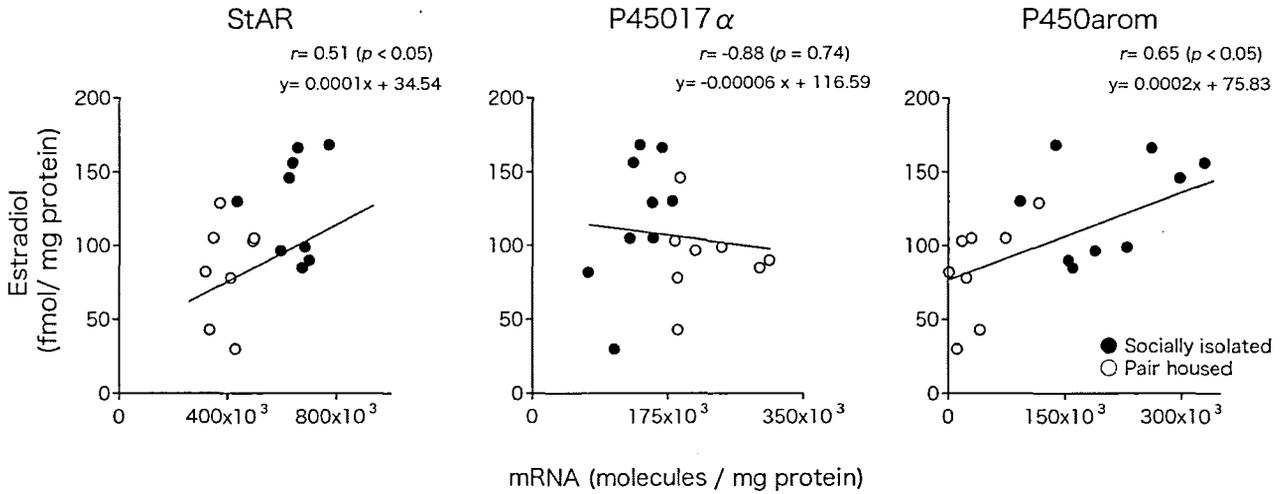
社会的孤独環境は海馬エストロジオール合成系酵素の mRNA 量を増加させたので海馬エストロジオール量に対する影響を解析した。ラットを社会的孤独環境条件あるいは、2匹飼育条件で飼育した後の海馬のエストロジオール量は、それぞれ  $126.3 \pm 11.3$  fmol / mg protein、 $84.4 \pm 11.9$  fmol / mg protein であった。社会的孤独環境によって海馬エストロジオール量が約 1.5 倍に増加した (Fig. 3-3)。



**Fig. 3-3 EIA analysis of estradiol concentrations in pair housed and socially isolated rat hippocampus.**

The vertical axis indicates the estradiol concentration in fmol /mg protein. Social isolation increases the amount of hippocampal estradiol. Each column and error bar represent the mean $\pm$ S.E.M. \*  $p < 0.05$  versus pair housed.

次に、この海馬エストロジオール量の増加と、StAR、P450(17 $\alpha$ )、P450arom の mRNA 分子数の増加との相関を解析した。StAR はエストロジオール合成の第一段階に関わり、P450arom は最終段階を触媒する酵素である。両条件下で飼育した個々のラットの StAR、P450(17 $\alpha$ )、P450arom の mRNA 分子量とエストロジオール量をプロットし、Pearson の相関係数を求めた。その結果、P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量とエストロジオール量との間に相関は観察されなかったが、StAR、P450arom mRNA 量とエストロジオール量との間に有意な相関が認められた (Fig. 3-4)。これらのことから、社会的孤独環境は海馬での StAR、P450arom の転写を促進し、海馬エストロジオール合成を亢進することが示唆された。



**Fig. 3-4 Relation between the amount of estradiol and the mRNA expression level of StAR, P450(17 $\alpha$ ) and P450arom.**

Relationship between the StAR mRNA level and the estradiol concentration (left). Relationship between the P450(17 $\alpha$ ) mRNA level and the estradiol concentration (center). Relationship between the P450arom mRNA level and the estradiol concentration (right). The Pearson's coefficients of correlation between these mRNA levels and the amount of estradiol (vertical axis) were calculated. The solid lines indicate the regression lines.

### 3-4. 考察

社会的孤独環境は海馬での StAR、P450(17 $\alpha$ )、P450arom、17 $\beta$ -HSD-1、-4 の mRNA 発現量を増加させた。特筆すべきことは、社会的孤独環境により P450arom mRNA 量が 8 倍以上に増加したことである。これら酵素の転写活性化に伴いエストラジオール量が増加したと考えられる。

海馬において、エストラジオールは神経新生、シナプス形成など重要な働きを担っている [78, 160]。また、エストラジオールの神経保護作用について幾つかの研究が報告されている。神経細胞に様々なストレスを加えても、エストラジオールを作用させるとその生存率は上がる [161, 162]。また最近、海馬由来のエストラジオールも神経保護作用を持つということが明らかになっている。例えば、神経毒に曝された P450arom ノックアウトマウス海馬培養細胞は野生型マウスと比べ生存率が激減する [86]。さらに海馬エストラジオール合成を阻害するとアポトーシスが誘導される [82]。また海馬由来のエストラジオールは興奮毒性による神経細胞死を防ぐことも明らかになった [85]。一方、社会的孤独環境は群居性のラットにとってストレスであるため、血中コルチコステロン濃度が上昇する [156]。血中コルチコステロン濃度が高くなると、海馬ではアポトーシスが誘導されたり、神経栄養因子である BDNF の発現量が減少する [154]。エストラジオールはアポトーシスを阻害し、BDNF の発現量を増加させ、コルチコステロンによる細胞毒性を減じるという報告もある [147]。事実、脳障害後には P450arom の転写が促進され、酵素活性も増加する [148]。そして脳内のエストラジオール量も増加すると報告されている [149]。さらに、脳障害は StAR などのステロイド合成分子の転写も活性化させる [163]。本実験でもいくつかのステロイド合成に関わるタンパク質の転写が促進され、エストラジオール合成が増加した。よって社会的孤独環境による海馬エストラジオール合成の亢進は、飼育環境により引き起こされる有害な効果を減じているのではないかと考えられる。神経系は脳に悪影響があった場合、それらの現象に対処するためステロイド合成を増加させ、脳内エストラジオール量も増加させていると考えられる。海馬には様々な有害な影響・刺激からの影響を減じるための防衛機構が存在しているのかもしれない。

社会的孤独環境によってラットのコルチコステロン血中濃度は上昇し約 1  $\mu$ M となる [156]。第 2 章で述べたように、*in vitro* で海馬のスライスに 3  $\mu$ M のコルチコステロンを 48 時間作用させると P450(17 $\alpha$ ) mRNA 量が約 5 倍と大きく増加した。スライスへの短時間曝露系では、1  $\mu$ M コルチコステロンでの影響はみられなかったが、海馬のステロイド合成系はマイクロモル濃度のコルチコステロンで大きく影響された。本実験における社会的孤独環境の実験では 2 ヶ月間ストレスにさらされており、コルチコステロンの血中濃度以外にも多くの変動が起きていると考えられるが、コルチコステロンも海馬ニューロステロイド合成の変動因子の一つと考えても良いであろう。

社会的孤独環境で飼育されたラットは神経疾患のモデルとして考えられているが [156]、本実験では社会的孤独環境と海馬エストラジオール合成の関係を初めて示した。特に、P450arom の mRNA 量は、社会的孤独環境により劇的に増加した。real-time RT-PCR は簡便で再現性の高い結果が得られるため、P450arom mRNA の定量は社会的孤独環境の影響を測るために有用な方法かもしれない。

## 第4章

### 総合考察

本研究ではオスラット海馬のエストラジオール合成に対する影響を、*in vitro*で海馬スライスに有機スズ化合物、レチノイン酸、トリヨードチロニン、ジブチリル cAMP、コルチコステロンを作用させて解析した。また *in vivo*実験として、社会的孤独環境による影響を解析した。いずれの実験においても、エストラジオール合成が活性化されるような場合には必ず P450(17 $\alpha$ )の転写活性化が起こり、多くの場合 P450arom の転写活性化も伴うことが明らかになった。これらの酵素の転写活性の変化が海馬エストラジオール合成を調節すると考えられる。本研究で観察された現象を Table 4-I にまとめた。

末梢内分泌腺では主なステロイドホルモン合成の調節部位は StAR である [27]。今回、海馬スライスの実験では、StAR mRNA 量は海馬エストラジオール合成系酵素の中でも発現量が比較的高く、エストラジオール合成が活性化された場合でもその mRNA 量は変動しなかった。すなわち、*in vitro*の実験では、StAR は海馬エストラジオール合成の調節部位でなく、P450(17 $\alpha$ )が調節部位であると結論づけた。

ところが、*in vivo*の実験では、エストラジオール合成の活性化に伴い、StAR mRNA 量が増加した。しかも mRNA 量とエストラジオール合成活性に相関が見られた。この結果は、StAR がエストラジオール合成の調節部位であることを示している。現時点ではこの差異の原因として様々な要因が考えられる。

(1) *in vivo*と *in vitro*の違い。海馬における StAR の転写は血中由来の様々な物質によって影響される。例えば LH を海馬培養神経細胞に作用させると StAR mRNA 量が増加する [139]。よってラット脳内でも LH により StAR の転写調節が行われている可能性がある。*in vivo*の社会的孤独環境実験では LH などの StAR の発現に影響を与える物質の脳内濃度が上昇しているのかもしれない。一方、*in vitro*では海馬スライスには LH のような物質は供給されない。このように *in vivo*では多くの要因が海馬に同時に作用しうる。この違いが StAR mRNA 量増加の有無に反映された可能性がある。

(2) 新生仔と成熟個体の違い。スライスは生後 10 日齢ラットから調製した。新生仔では StAR によるニューロステロイド合成調節系が未発達であるが、*in vivo*実験に用いた 3ヶ月齢ラットでは十分に機能しており、同じ刺激を受けた場合でもレスポンスが異なるのかもしれない。

(3) 刺激の期間の違い。スライスの実験では 48 時間の刺激を行ったが、*in vivo*ではラットは 2ヶ月間の長期ストレスにさらされた。脳では StAR による調節が非常に緩やかで、数週間以上の連続刺激ではじめて変化するのかもしれない。

このように、成熟個体の海馬での StAR のエストラジオール合成に対する役割については、まだまだ研究する必要がある。

本研究では、スライス培養という単純化した系により、P450(17 $\alpha$ )という今まで知られていなかったステロイド合成の調節部位を見出すことができた。しかし、*in vivo*では複数の調節部位があり、それらが役割分担をしている可能性もある。例えばある微小な部位（海馬の特殊なシナプス周辺など）ではコレステロールからの *de novo* の合成で局所的に特に高濃度のエストラジオールを供給しており、その微小部位では StAR が調節を行っている可能性も否定できない。また血中から多量のテストステロンが供給される成熟したオスの脳の血管周辺では、P450arom の活性変化がエストラジオール供給を主に制御していても不思議ではない。今回見出した P450(17 $\alpha$ )という一つの調節部位にとらわれることなく、脳のニューロステロイド合成系の全体像を徐々に解明していきたい。

本研究では *in vivo*, *in vitro* での海馬エストラジオール量を測定した。*in vivo* の実験系では海馬中に 84.4 fmol / mg protein (約 3nM) のエストラジオールが検出された。また、*in vitro* の実験系では 10 日齢ラット海馬スライスを 24 時間前培養すると、19.7 fmol / mg protein (約 0.7 nM) が検出され、*in vivo* と *in vitro* で得られた値に違いがあった。この差異は、8 週齢ラットと 10 日齢ラットの脳内エストラジオール濃度の違いを表しているのかもしれないが、*in vivo*, *in vitro* の違いを表しているのかもしれない。LC-MS / MS を用いてエストラジオールを定量した大石 (2007) の実験によると、成体ラットから分離した新鮮海馬中には 8.4 nM、また成体ラットから作成したスライスには 0.48 nM のエストラジオールが検出され、本研究と同様、*in vivo* の方が高い値が検出された [164]。海馬スライスは調製段階で HBSS を満たしたチャンバー内に置かれるため、元々海馬スライス中に存在したエストラジオールは溶出されてしまうのかもしれない。一方、本研究の RIA, EIA によるエストラジオールの定量と大石 (2007) の LC-MS / MS を用いた定量の値に大きな違いはない [164]。このことは本研究で用いたエストラジオール定量法の妥当性を示している。

本研究により海馬エストラジオール量を 9-*cis*-レチノイン酸が約 2 倍に、社会的孤独環境が約 1.5 倍に増加させることが明らかになった。海馬エストラジオール合成系酵素の発現量は末梢内分泌腺と比較すると非常に低いため [73]、海馬で合成されるエストラジオールは極微量であると思われる。しかし、海馬で合成されるエストラジオールは長期抑圧の誘導や神経保護など、生理的に重要な機能と密接に関わる [82, 83]。また Prange-Kiel らは GnRH (10nM) を神経培養細胞に作用させると、海馬エストラジオール合成が 2 倍になることを明らかにし、さらにエストラジオール量の増加がスパイン形成を促すことも示している [88]。このことから、本研究で観察された海馬エストラジオール合成亢進も、スパイン形成や神経保護作用などの重要な生理的機能を向上させると推測される。

本研究では *in vitro*, *in vivo* の実験系を用いてラット海馬エストラジオール合成調節の分子機構について解析した。得られた主な知見は以下の通りである。

1. スライス培養という単純化した系により、P450(17 $\alpha$ ) という新たなエストラジオール合成の調節部位を見出した。
2. その P450(17 $\alpha$ ) の転写が、9-*cis*-レチノイン酸やトリブチルスズといった RXR アゴニストによって活性化されること、また、コルチコステロンやジブチリル cAMP によっても活性化されることを見出した。
3. ラットを社会的孤独環境で飼育することにより、海馬エストラジオール合成が活性化されるという新たな知見を得た。これは *in vivo* で海馬エストラジオール合成を変動させた初めての実験であると思われる。さらに、ニューロステロイド研究におけるラットの飼育環境の重要性も明らかにした。

脳でのニューロステロイド合成は未知の部分が非常に多い。本研究により海馬エストラジオール合成の新たな調節部位とその調節因子を明らかにすることができ、また飼育環境による影響も見出した。この成果はニューロステロイド合成調節の分子機構の全容解明に多少なりとも貢献するであろう。

Table 4-I

	mRNA levels			
	StAR	3 $\beta$ -HSD	P450(17 $\alpha$ )	P450arom
<b>tributyltin</b>	-	-	<b>++</b>	<b>+</b>
<b>dibutyltin</b>	-	-	-	<b>+</b>
<b>9-<i>cis</i>-retinoic acid</b>	-	-	<b>++</b>	<b>+</b>
<b>all-<i>trans</i>-retinoic acid</b>	-	-	-	-
<b>triiodothyronine</b>	-	-	-	-
<b>dibutryl cAMP</b>	-	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>
<b>corticosterone</b>	-	-	<b>++</b>	-
<b>social isolation</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+++</b>

The relative increase of mRNA expression in hippocampal slices by various compounds and social isolation.; (+/++/+++) indicates the level of mRNA expression induced by indicated compounds; (-) indicates the unchanged mRNA level.

## 謝辞

本研究を通じて長年にわたり終始きめ細かいご指導と暖かいご激励を賜りました広島大学総合科学部 山崎岳先生、石田敦彦先生、故 アブラハム・ヨゼフ小南思郎先生に心から感謝いたします。本論分の作成に際して多大なご指導とご助言を賜りました坂田省吾先生、川原明先生に深く感謝いたします。

また研究だけでなく、様々な面でお世話になり、楽しく研究生活を過ごさせてくれた山崎・石田研究室、清水研究室、坂田研究室の皆さん、本当にありがとうございました。

最後に、色々な面で支えとなってくれた家族に感謝します。

## 引用文献

- [1] V. Papadopoulos, M. Baraldi, T.R. Guilarte, T.B. Knudsen, J.J. Lacapere, P. Lindemann, M.D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M.R. Zhang, and M. Gavish, Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 402-9.
- [2] W.L. Miller, Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter, *Biochim. Biophys. Acta* 1771 (2007) 663-76.
- [3] W.L. Miller, Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA, *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12 (1998) 67-81.
- [4] A.H. Payne, and D.B. Hales, Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 947-70.
- [5] S. Nakajin, and P.F. Hall, Side-chain cleavage of C21 steroids to C19 steroids by testicular microsomal cytochrome P-450: 17 $\alpha$ -hydroxy C21 steroids as obligatory intermediates, *J. Steroid Biochem.* 14 (1981) 1249-52.
- [6] S. Kominami, K. Shinzawa, and S. Takemori, Purification and some properties of cytochrome P-450 specific for steroid 17  $\alpha$ -hydroxylation and C17-C20 bond cleavage from guinea pig adrenal microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109 (1982) 916-21.
- [7] W.M. Geissler, D.L. Davis, L. Wu, K.D. Bradshaw, S. Patel, B.B. Mendonca, K.O. Elliston, J.D. Wilson, D.W. Russell, and S. Andersson, Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3, *Nat. Genet.* 7 (1994) 34-9.
- [8] E.R. Simpson, C. Clyne, G. Rubin, W.C. Boon, K. Robertson, K. Britt, C. Speed, and M. Jones, Aromatase—a brief overview, *Annu. Rev. Physiol.* 64 (2002) 93-127.
- [9] G.J. Hickey, S.A. Chen, M.J. Besman, J.E. Shively, P.F. Hall, D. Gaddy-Kurten, and J.S. Richards, Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis, *Endocrinology* 122 (1988) 1426-36.
- [10] P. Nokelainen, T. Puranen, H. Peltoketo, M. Orava, P. Vihko, and R. Vihko, Molecular cloning of mouse 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and characterization of enzyme activity, *Eur. J. Biochem.* 236 (1996) 482-90.
- [11] J.K. Amory, and W.J. Bremner, Regulation of testicular function in men: implications for male hormonal contraceptive development, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85 (2003) 357-61.
- [12] L.R. Chaudhary, J.C. Hutson, and D.M. Stocco, Effect of retinol and retinoic acid on testosterone production by rat Leydig cells in primary culture, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158 (1989) 400-6.
- [13] R. Palermo, Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis, *Reprod Biomed Online* 15 (2007) 326-37.
- [14] B.M. Sherman, J.H. West, and S.G. Korenman, The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42 (1976) 629-36.
- [15] J.K. Wickenheisser, V.L. Nelson-DeGrave, K.L. Hendricks, R.S. Legro, J.F. Strauss, 3rd, and J.M. McAllister, Retinoids and retinol differentially regulate steroid biosynthesis in ovarian theca cells isolated from normal cycling women and women with polycystic ovary syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 4858-65.

- [16] E.R. Simpson, and M.R. Waterman, Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex, *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61 (1983) 692-707.
- [17] M.A. Magiakou, G. Mastorakos, E. Webster, and G.P. Chrousos, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 816 (1997) 42-56.
- [18] J.C. Achermann, and J.L. Jameson, Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, *Mol. Endocrinol.* 13 (1999) 812-8.
- [19] H. van Poppel, and S. Nilsson, Testosterone surge: rationale for gonadotropin-releasing hormone blockers?, *Urology* 71 (2008) 1001-6.
- [20] S.L. Lightman, The neuroendocrinology of stress: a never ending story, *J. Neuroendocrinol.* 20 (2008) 880-4.
- [21] F.J. Karsch, and N.P. Evans, Feedback actions of estradiol on GnRH secretion during the follicular phase of the estrous cycle, *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56 (1996) 715-25.
- [22] G.H. Williams, Cardiovascular benefits of aldosterone receptor antagonists: what about potassium?, *Hypertension* 46 (2005) 265-6.
- [23] T. Yamazaki, T. Kimoto, K. Higuchi, Y. Ohta, S. Kawato, and S. Kominami, Calcium ion as a second messenger for o-nitrophenylsulfenyl-adrenocorticotropin (NPS-ACTH) and ACTH in bovine adrenal steroidogenesis, *Endocrinology* 139 (1998) 4765-71.
- [24] I.C. Guo, M.C. Shih, H.C. Lan, N.C. Hsu, M.C. Hu, and B.C. Chung, Transcriptional regulation of human CYP11A1 in gonads and adrenals, *J. Biomed. Sci.* 14 (2007) 509-15.
- [25] L.K. Christenson, and J.F. Strauss, 3rd, Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action, *Arch. Med. Res.* 32 (2001) 576-86.
- [26] M.R. Waterman, A rising StAR: an essential role in cholesterol transport, *Science* 267 (1995) 1780-1.
- [27] C. Jefcoate, High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 881-90.
- [28] U. Meinhardt, and P.E. Mullis, The essential role of the aromatase/p450arom, *Semin Reprod Med* 20 (2002) 277-84.
- [29] K. Morohashi, The ontogenesis of the steroidogenic tissues, *Genes Cells* 2 (1997) 95-106.
- [30] F. Beuschlein, C.E. Keegan, D.L. Bavers, C. Mutch, J.E. Hutz, S. Shah, Y.M. Ulrich-Lai, W.C. Engeland, B. Jeffs, J.L. Jameson, and G.D. Hammer, SF-1, DAX-1, and acd: molecular determinants of adrenocortical growth and steroidogenesis, *Endocr. Res.* 28 (2002) 597-607.
- [31] M.C. Hu, E.F. Chiang, S.K. Tong, W. Lai, N.C. Hsu, L.C. Wang, and B.C. Chung, Regulation of steroidogenesis in transgenic mice and zebrafish, *Mol. Cell. Endocrinol.* 171 (2001) 9-14.
- [32] S. Liao, Androgen action: molecular mechanism and medical application, *J. Formos. Med. Assoc.* 93 (1994) 741-51.
- [33] P. Negri-Cesi, A. Colciago, A. Pravettoni, L. Casati, L. Conti, and F. Celotti, Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109 (2008) 294-9.
- [34] J.D. Wilson, G. Shaw, M.L. Leihy, and M.B. Renfree, The marsupial model for male phenotypic development, *Trends Endocrinol Metab* 13 (2002) 78-83.
- [35] A.M. Billeci, M. Paciaroni, V. Caso, and G. Agnelli, Hormone replacement therapy and stroke, *Curr Vasc Pharmacol* 6 (2008) 112-23.
- [36] C.E. Graham, D.C. Collins, H. Robinson, and J.R. Preedy, Urinary levels of estrogens and pregnanediol and plasma levels of progesterone during the menstrual cycle of the chimpanzee; relationship to the sexual swelling, *Endocrinology* 91 (1972) 13-24.
- [37] A. Kawai, H. Takashima, and N. Kuzuya, Mechanism of action of cortisol on glucose metabolism by adipose tissue, *Metabolism.* 22 (1973) 503-6.
- [38] D.J. Ingle, Permissive action of hormones, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 14 (1954) 1272-4.

- [39] M. Truss, and M. Beato, Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors, *Endocr. Rev.* 14 (1993) 459-79.
- [40] N. Vasudevan, and D.W. Pfaff, Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain, *Front. Neuroendocrinol.* 29 (2008) 238-57.
- [41] P. Morley, J.F. Whitfield, B.C. Vanderhyden, B.K. Tsang, and J.L. Schwartz, A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium, *Endocrinology* 131 (1992) 1305-12.
- [42] D. Manthey, S. Heck, S. Engert, and C. Behl, Estrogen induces a rapid secretion of amyloid beta precursor protein via the mitogen-activated protein kinase pathway, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 4285-91.
- [43] T. Simoncini, A. Hafezi-Moghadam, D.P. Brazil, K. Ley, W.W. Chin, and J.K. Liao, Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase, *Nature* 407 (2000) 538-41.
- [44] D.D. Murphy, and M. Segal, Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1482-7.
- [45] C. Behl, Sex hormones, neuroprotection and cognition, *Prog. Brain Res.* 138 (2002) 135-42.
- [46] R.L. Moss, Q. Gu, and M. Wong, Estrogen: nontranscriptional signaling pathway, *Recent Prog. Horm. Res.* 52 (1997) 33-68; discussion 68-9.
- [47] C. Stahn, and F. Buttgerit, Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids, *Nat Clin Pract Rheumatol* 4 (2008) 525-33.
- [48] C. Grossmann, and M. Gekle, Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance, *Steroids* 73 (2008) 973-8.
- [49] B.S. McEwen, S.E. Alves, K. Bulloch, and N.G. Weiland, Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging, *Neurology* 48 (1997) S8-15.
- [50] J.J. Cerqueira, C. Catania, I. Sotiropoulos, M. Schubert, R. Kalisch, O.F. Almeida, D.P. Auer, and N. Sousa, Corticosteroid status influences the volume of the rat cingulate cortex - a magnetic resonance imaging study, *J. Psychiatr. Res.* 39 (2005) 451-60.
- [51] F. Holsboer, and M. Ising, Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists, *Eur. J. Pharmacol.* 583 (2008) 350-7.
- [52] J.M. Schwarz, and M.M. McCarthy, Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109 (2008) 300-6.
- [53] H.B. Patisaul, and E.K. Polston, Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain, *Brain Res Rev* 57 (2008) 352-62.
- [54] B.S. McEwen, Permanence of brain sex differences and structural plasticity of the adult brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7128-30.
- [55] J. Zhou, H. Zhang, R.S. Cohen, and S.C. Pandey, Effects of estrogen treatment on expression of brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures, *Neuroendocrinology* 81 (2005) 294-310.
- [56] D.D. Murphy, N.B. Cole, V. Greenberger, and M. Segal, Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons, *J. Neurosci.* 18 (1998) 2550-9.
- [57] H. Honjo, K. Iwasa, S. Fushiki, T. Hosoda, H. Tatsumi, M. Mihara, Y. Hirasugi, M. Oida, K. Kariya, N. Kikuchi, and M. Kawata, Estrogen and non-feminizing estrogen for Alzheimer's disease, *Endocr. J.* 50 (2003) 361-7.
- [58] J.A. Chowen, I. Torres-Aleman, and L.M. Garcia-Segura, Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons, *Neuroendocrinology* 56 (1992) 895-901.
- [59] G.D. Hilton, A. Ndubuizu, J.L. Nunez, and M.M. McCarthy, Simultaneous glutamate and GABA(A) receptor agonist administration increases calbindin levels and prevents hippocampal damage induced by either agent alone in a model of perinatal brain injury, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 159 (2005) 99-111.

- [60] G.D. Hilton, J.L. Nunez, and M.M. McCarthy, Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats, *Neuroscience* 116 (2003) 383-91.
- [61] N.A. Compagnone, and S.H. Mellon, Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators, *Front. Neuroendocrinol.* 21 (2000) 1-56.
- [62] C. Corpechot, P. Robel, M. Axelson, J. Sjoval, and E.E. Baulieu, Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 4704-7.
- [63] C. Corpechot, M. Synguelakis, S. Talha, M. Axelson, J. Sjoval, R. Vihko, E.E. Baulieu, and P. Robel, Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain, *Brain Res.* 270 (1983) 119-25.
- [64] I.H. Zwain, and S.S. Yen, Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain, *Endocrinology* 140 (1999) 3843-52.
- [65] 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 (2001) 3578-89.
- [66] B. Ebert, GABA(A) receptor inhibition - site matters!, *Acta Physiol (Oxf)* 188 (2006) 151.
- [67] M. Horak, K. Vlcek, M. Petrovic, H. Chodounska, and L. Vyklicky, Jr., Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors, *J. Neurosci.* 24 (2004) 10318-25.
- [68] G. Puia, M.R. Santi, S. Vicini, D.B. Pritchett, R.H. Purdy, S.M. Paul, P.H. Seeburg, and E. Costa, Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors, *Neuron* 4 (1990) 759-65.
- [69] J.M. Wang, P.B. Johnston, B.G. Ball, and R.D. Brinton, The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4706-18.
- [70] M.C. Gonzalez Deniselle, L. Garay, S. Gonzalez, F. Saravia, F. Labombarda, R. Guennoun, M. Schumacher, and A.F. De Nicola, Progesterone modulates brain-derived neurotrophic factor and choline acetyltransferase in degenerating Wobbler motoneurons, *Exp. Neurol.* 203 (2007) 406-14.
- [71] N.A. Compagnone, and S.H. Mellon, Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 4678-83.
- [72] C. Mathis, S.M. Paul, and J.N. Crawley, The neurosteroid pregnenolone sulfate blocks NMDA antagonist-induced deficits in a passive avoidance memory task, *Psychopharmacology (Berl)*. 116 (1994) 201-6.
- [73] Y. Hojo, G. Murakami, H. Mukai, S. Higo, Y. Hatanaka, M. Ogiue-Ikeda, H. Ishii, T. Kimoto, and S. Kawato, Estrogen synthesis in the brain: role in synaptic plasticity and memory, *Mol. Cell. Endocrinol.* 290 (2008) 31-43.
- [74] S.H. Mellon, and C.F. Deschepper, Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain, *Brain Res.* 629 (1993) 283-92.
- [75] C. Le Goascogne, N. Sananes, M. Guezou, S. Takemori, S. Kominami, E.E. Baulieu, and P. Robel, Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain, *J. Reprod. Fertil.* 93 (1991) 609-22.
- [76] E.E. Baulieu, Neurosteroids: a novel function of the brain, *Psychoneuroendocrinology* 23 (1998) 963-87.
- [77] Y. Hojo, T.A. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H.T. Ishii, H. Mukai, J.H. Morrison, W.G. Janssen, S. Kominami, N. Harada, T. Kimoto, and S. Kawato, 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 (2004) 865-70.

- [78] O. Kretz, L. Fester, U. Wehrenberg, L. Zhou, S. Brauckmann, S. Zhao, J. Prange-Kiel, T. Naumann, H. Jarry, M. Frotscher, and G.M. Rune, Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis, *J. Neurosci.* 24 (2004) 5913-21.
- [79] J. Prange-Kiel, U. Wehrenberg, H. Jarry, and G.M. Rune, Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons, *Hippocampus* 13 (2003) 226-34.
- [80] H. Mukai, N. Takata, H.T. 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* 138 (2006) 757-64.
- [81] C. von Schassen, L. Fester, J. Prange-Kiel, C. Lohse, C. Huber, M. Bottner, and G.M. Rune, Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth, *J. Neuroendocrinol.* 18 (2006) 847-56.
- [82] L. Fester, V. Ribeiro-Gouveia, J. Prange-Kiel, C. von Schassen, M. Bottner, H. Jarry, and G.M. Rune, Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis, *J. Neurochem.* 97 (2006) 1136-44.
- [83] H. Mukai, T. Tsurugizawa, G. Murakami, S. Kominami, H. Ishii, M. Ogiue-Ikeda, N. Takata, N. Tanabe, A. Furukawa, Y. Hojo, Y. Ooishi, J.H. Morrison, W.G. Janssen, J.A. Rose, P. Chambon, S. Kato, S. Izumi, T. Yamazaki, T. Kimoto, and S. Kawato, Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons, *J. Neurochem.* 100 (2007) 950-67.
- [84] G. Murakami, N. Tanabe, H.T. Ishii, M. Ogiue-Ikeda, T. Tsurugizawa, H. Mukai, Y. Hojo, N. Takata, A. Furukawa, T. Kimoto, and S. Kawato, Role of cytochrome p450 in synaptocrinology: endogenous estrogen synthesis in the brain hippocampus, *Drug Metab. Rev.* 38 (2006) 353-69.
- [85] L. Zhou, N. Lehan, U. Wehrenberg, E. Disteldorf, R. von Lossow, U. Mares, H. Jarry, and G.M. Rune, Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors, *Exp. Neurol.* 203 (2007) 72-81.
- [86] C.F. Roselli, Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 106 (2007) 143-50.
- [87] G. Murakami, T. Tsurugizawa, Y. Hatanaka, Y. Komatsuzaki, N. Tanabe, H. Mukai, Y. Hojo, S. Kominami, T. Yamazaki, T. Kimoto, and S. Kawato, Comparison between basal and apical dendritic spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351 (2006) 553-8.
- [88] J. Prange-Kiel, H. Jarry, M. Schoen, P. Kohlmann, C. Lohse, L. Zhou, and G.M. Rune, Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis, *J. Cell Biol.* 180 (2008) 417-26.
- [89] T. Nakanishi, J. Nishikawa, Y. Hiromori, H. Yokoyama, M. Koyanagi, S. Takasuga, J. Ishizaki, M. Watanabe, S. Isa, N. Utoguchi, N. Itoh, Y. Kohno, T. Nishihara, and K. Tanaka, Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 2502-16.
- [90] T. Kanayama, N. Kobayashi, S. Mamiya, T. Nakanishi, and J. Nishikawa, Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway, *Mol. Pharmacol.* 67 (2005) 766-74.
- [91] V. Giguere, Orphan nuclear receptors: from gene to function, *Endocr. Rev.* 20 (1999) 689-725.
- [92] V. Giguere, Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling, *Endocr. Rev.* 15 (1994) 61-79.
- [93] R.C. Agis-Balboa, G. Pinna, F. Pibiri, B. Kadriu, E. Costa, and A. Guidotti, Down-regulation of neurosteroid biosynthesis in corticolimbic circuits mediates social isolation-induced behavior in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 18736-41.

- [94] A. Sudaryanto, S. Takahashi, I. Monirith, A. Ismail, M. Muchtar, J. Zheng, B.J. Richardson, A. Subramanian, M. Prudente, N.D. Hue, and S. Tanabe, Asia-Pacific mussel watch: monitoring of butyltin contamination in coastal waters of Asian developing countries, *Environ Toxicol Chem* 21 (2002) 2119-30.
- [95] T.M. Nemanic, H. Leskovsek, M. Horvat, B. Vrizer, and A. Bolje, Organotin compounds in the marine environment of the Bay of Piran, northern Adriatic Sea, *J Environ Monit* 4 (2002) 426-30.
- [96] J. Widdows, P. Donkin, F.J. Staff, P. Matthiessen, R.J. Law, Y.T. Allen, J.E. Thain, C.R. Allchin, and B.R. Jones, Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea, *Mar Environ Res* 53 (2002) 327-56.
- [97] T. Horiguchi, H. Shiraishi, M. Shimizu, and M. Morita, Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, *Environ Pollut* 95 (1997) 85-91.
- [98] H. Harino, M. Fukushima, and S. Kawai, Accumulation of butyltin and phenyltin compounds in various fish species, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (2000) 13-9.
- [99] D.S. Forsyth, and V. Casey, Butyltin compounds in retail mollusc products, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 445-52.
- [100] H. Iwata, S. Tanabe, T. Mizuno, R. Tatsukawa, and W.e. Bremner, High accumulation of toxic butyltins in marine mammals from Japanese coastal waters, *Environ. Sci. Technol* 29 (1995) 2959-2962.
- [101] A.H. Penninks, The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin)oxide, *Food Addit. Contam.* 10 (1993) 351-61.
- [102] K. Kannan, R.A. Grove, K. Senthilkumar, C.J. Henny, and J.P. Giesy, Butyltin compounds in river otters (*Lutra canadensis*) from the northwestern United States, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36 (1999) 462-8.
- [103] H. Iwai, O. Wada, and Y. Arakawa, Determination of tri-, di-, and monobutyltin and inorganic tin in biological materials and some aspects of their metabolism in rats, *J. Anal. Toxicol.* 5 (1981) 300-6.
- [104] G.M. Cooke, Effect of organotins on human aromatase activity in vitro, *Toxicol. Lett.* 126 (2002) 121-30.
- [105] M. Saitoh, T. Yanase, H. Morinaga, M. Tanabe, Y.M. Mu, Y. Nishi, M. Nomura, T. Okabe, K. Goto, R. Takayanagi, and H. Nawata, Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (2001) 198-204.
- [106] 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* 70 (2005) 913-21.
- [107] L.A. Galea, M.D. Spritzer, J.M. Barker, and J.L. Pawluski, Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult, *Hippocampus* 16 (2006) 225-32.
- [108] J. Zimmer, and B.H. Gahwiler, Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata, *J. Comp. Neurol.* 228 (1984) 432-46.
- [109] M. Omura, R. Ogata, K. Kubo, Y. Shimasaki, S. Aou, Y. Oshima, A. Tanaka, M. Hirata, Y. Makita, and N. Inoue, Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats, *Toxicol. Sci.* 64 (2001) 224-32.
- [110] E.D. Lephart, Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61 (1997) 375-80.
- [111] A. Aranda, and A. Pascual, Nuclear hormone receptors and gene expression, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 1269-304.
- [112] P. Chambon, A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *FASEB J.* 10 (1996) 940-54.
- [113] M. Maden, and N. Holder, The involvement of retinoic acid in the development of the vertebrate central nervous system, *Development Suppl* 2 (1991) 87-94.

- [114] R.H. Zetterstrom, E. Lindqvist, A. Mata de Urquiza, A. Tomac, U. Eriksson, T. Perlmann, and L. Olson, Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid, *Eur. J. Neurosci.* 11 (1999) 407-16.
- [115] E. Bonnet, K. Touyarot, S. Alfos, V. Pallet, P. Higuieret, and D.N. Abrous, Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats, *PLoS ONE* 3 (2008) e3487.
- [116] F. Mingaud, C. Mormede, N. Etchamendy, N. Mons, B. Niedergang, M. Wietrzych, V. Pallet, R. Jaffard, W. Krezel, P. Higuieret, and A. Marighetto, Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice, *J. Neurosci.* 28 (2008) 279-91.
- [117] M.Y. Chiang, D. Misner, G. Kempermann, T. Schikorski, V. Giguere, H.M. Sucov, F.H. Gage, C.F. Stevens, and R.M. Evans, An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression, *Neuron* 21 (1998) 1353-61.
- [118] Y. Shinozaki, Y. Sato, S. Koizumi, Y. Ohno, T. Nagao, and K. Inoue, Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase, *Neuroscience* 147 (2007) 153-63.
- [119] P.J. McCaffery, J. Adams, M. Maden, and E. Rosa-Molinar, Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen, *Eur. J. Neurosci.* 18 (2003) 457-72.
- [120] H. Nakshatri, and P. Chambon, The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 890-902.
- [121] S. Takase, K. Suruga, and T. Goda, Regulation of vitamin A metabolism-related gene expression, *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 2 (2000) S217-21.
- [122] R.E. Nelson, S.K. Grebe, O.K. DJ, and R.J. Singh, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of estradiol and estrone in human plasma, *Clin. Chem.* 50 (2004) 373-84.
- [123] T. Hajszan, T.A. Milner, and C. Leranth, Sex steroids and the dentate gyrus, *Prog. Brain Res.* 163 (2007) 399-415.
- [124] J. Mey, and P. McCaffery, Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates, *Neuroscientist* 10 (2004) 409-21.
- [125] J.L. Spencer, E.M. Waters, R.D. Romeo, G.E. Wood, T.A. Milner, and B.S. McEwen, Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function, *Front. Neuroendocrinol.* 29 (2008) 219-37.
- [126] J.S. Janowsky, The role of androgens in cognition and brain aging in men, *Neuroscience* 138 (2006) 1015-20.
- [127] M.A. Lane, and S.J. Bailey, Role of retinoid signalling in the adult brain, *Prog. Neurobiol.* 75 (2005) 275-93.
- [128] A. Lefevre, E. Rogier, C. Astraud, C. Duquenne, and C. Finaz, Regulation by retinoids of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor, cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta (5-4)-isomerase and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P-450 messenger ribonucleic acid levels in the K9 mouse Leydig cell line, *Mol. Cell. Endocrinol.* 106 (1994) 31-9.
- [129] G. Wolf, Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor?, *Nutr. Rev.* 64 (2006) 532-8.
- [130] P. Germain, P. Chambon, G. Eichele, R.M. Evans, M.A. Lazar, M. Leid, A.R. De Lera, R. Lotan, D.J. Mangelsdorf, and H. Gronemeyer, International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 760-72.

- [131] J. Bernal, and J. Nunez, Thyroid hormones and brain development, *Eur. J. Endocrinol.* 133 (1995) 390-8.
- [132] B. Desvergne, How do thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements?, *Mol. Cell. Endocrinol.* 100 (1994) 125-31.
- [133] J.S. Richards, New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells, *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 209-18.
- [134] X. Lin, H. Takemori, Y. Katoh, J. Doi, N. Horike, A. Makino, Y. Nonaka, and M. Okamoto, Salt-inducible kinase is involved in the ACTH/cAMP-dependent protein kinase signaling in Y1 mouse adrenocortical tumor cells, *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 1264-76.
- [135] W. Fan, T. Yanase, Y. Wu, H. Kawate, M. Saitoh, K. Oba, M. Nomura, T. Okabe, K. Goto, J. Yanagisawa, S. Kato, R. Takayanagi, and H. Nawata, Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) 127-41.
- [136] N. Yivgi-Ohana, N. Sher, N. Melamed-Book, S. Eimerl, M. Koler, P.R. Manna, D.M. Stocco, and J. Orly, Transcription of Steroidogenic Acute Regulatory protein (STAR) in the rodent ovary and placenta: alternative modes of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate dependent and independent regulation, *Endocrinology* (2008).
- [137] N. Yivgi-Ohana, N. Sher, N. Melamed-Book, S. Eimerl, M. Koler, P.R. Manna, D.M. Stocco, and J. Orly, Transcription of steroidogenic acute regulatory protein in the rodent ovary and placenta: alternative modes of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate dependent and independent regulation, *Endocrinology* 150 (2009) 977-89.
- [138] C.R. Mendelson, and A. Kamat, Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 106 (2007) 62-70.
- [139] T. Liu, J. Wimalasena, R.L. Bowen, and C.S. Atwood, Luteinizing hormone receptor mediates neuronal pregnenolone production via up-regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression, *J. Neurochem.* 100 (2007) 1329-39.
- [140] M. Palkovits, G. Schmid, U. Bahner, K. Hempel, and A. Heidland, Rapid alterations in cAMP accumulation in brain nuclei of rats following microinjections of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) into the lateral ventricle, *Neuropeptides* 25 (1993) 351-5.
- [141] A.M. Etgen, and E.T. Browning, Activators of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate accumulation in rat hippocampal slices: action of vasoactive intestinal peptide (VIP), *J. Neurosci.* 3 (1983) 2487-93.
- [142] J.L. Gerlach, and B.S. McEwen, Rat brain binds adrenal steroid hormone: radioautography of hippocampus with corticosterone, *Science* 175 (1972) 1133-6.
- [143] J.K. Morse, and J.N. Davis, Regulation of ischemic hippocampal damage in the gerbil: adrenalectomy alters the rate of CA1 cell disappearance, *Exp. Neurol.* 110 (1990) 86-92.
- [144] C.S. Woolley, E. Gould, and B.S. McEwen, Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons, *Brain Res.* 531 (1990) 225-31.
- [145] C. Behl, T. Trapp, T. Skutella, and F. Holsboer, Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death--a novel role for RU486, *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 912-20.
- [146] K. Mizoguchi, T. Kunishita, D.H. Chui, and T. Tabira, Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats, *Neurosci. Lett.* 138 (1992) 157-60.

- [147] K. Takuma, A. Matsuo, Y. Himeno, Y. Hoshina, Y. Ohno, Y. Funatsu, S. Arai, H. Kamei, H. Mizoguchi, T. Nagai, K. Koike, M. Inoue, and K. Yamada, 17beta-estradiol attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress in ovariectomized rats, *Neuroscience* 146 (2007) 60-8.
- [148] L.M. Garcia-Segura, A. Wozniak, I. Azcoitia, J.R. Rodriguez, R.E. Hutchison, and J.B. Hutchison, Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair, *Neuroscience* 89 (1999) 567-78.
- [149] T.M. Saleh, B.J. Connell, C. Legge, and A.E. Cribb, Estrogen synthesis in the central nucleus of the amygdala following middle cerebral artery occlusion: role in modulating neurotransmission, *Neuroscience* 135 (2005) 1141-53.
- [150] M. Hatsuta, K. Abe, K. Tamura, T. Ryuno, G. Watanabe, K. Taya, and H. Kogo, Effects of hypothyroidism on the estrous cycle and reproductive hormones in mature female rat, *Eur. J. Pharmacol.* 486 (2004) 343-8.
- [151] D. Dong, and N. Noy, Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by the receptor's self-association properties, *Biochemistry (Mosc.)* 37 (1998) 10691-700.
- [152] K. Morohashi, U.M. Zanger, S. Honda, M. Hara, M.R. Waterman, and T. Omura, Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP, *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) 1196-204.
- [153] B.G. Mockett, W.M. Brooks, W.P. Tate, and W.C. Abraham, Dopamine D1/D5 receptor activation fails to initiate an activity-independent late-phase LTP in rat hippocampus, *Brain Res.* 1021 (2004) 92-100.
- [154] K.H. Choy, Y. de Visser, N.R. Nichols, and M. van den Buuse, Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory, *Hippocampus* 18 (2008) 655-67.
- [155] T. Yamazaki, S. Kominami, N. Nishida, and S. Takemori, Incorporation of bovine adrenal 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase into phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1257 (1995) 293-6.
- [156] K.C. Fone, and M.V. Porkess, Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32 (2008) 1087-102.
- [157] G. Alquicer, J.C. Morales-Medina, R. Quirion, and G. Flores, Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis, *J. Chem. Neuroanat.* 35 (2008) 179-87.
- [158] S.H. Mellon, Neurosteroid regulation of central nervous system development, *Pharmacol. Ther.* 116 (2007) 107-24.
- [159] M. Serra, E. Sanna, M.C. Mostallino, and G. Biggio, Social isolation stress and neuroactive steroids, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17 (2007) 1-11.
- [160] B.S. McEwen, A.M. Magarinos, and L.P. Reagan, Structural plasticity and tianeptine: cellular and molecular targets, *Eur Psychiatry* 17 Suppl 3 (2002) 318-30.
- [161] I. Azcoitia, A. Sierra, S. Veiga, S. Honda, N. Harada, and L.M. Garcia-Segura, Brain aromatase is neuroprotective, *J. Neurobiol.* 47 (2001) 318-29.
- [162] S. Veiga, I. Azcoitia, and L.M. Garcia-Segura, Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus, *Neuroreport* 16 (2005) 1599-603.
- [163] E. Lavaque, A. Mayen, I. Azcoitia, M. Tena-Sempere, and L.M. Garcia-Segura, Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system, *J. Neurobiol.* 66 (2006) 308-18.
- [164] 大石悠貴, 海馬におけるニューロステロイドのシナプス作用の解析, 東京大学大学院広域科学専攻 博士論文 (1990).