

コルチコステロンがマウス脳海馬に与える急性効果と その作用部位に関する検討

小山内裕美*, 鈴木章義*, 小松崎良将*, 川戸 佳**, 齋藤 稔*

Acute Effect of Corticosterone in Mouse Hippocampal Slices and its Binding Site

Hiroshi OSANAI*, Akiyoshi SUZUKI*, Yoshimasa KOMATSUZAKI*,
Suguru KAWATO** and Minoru SAITO*

(Received November 30, 2007)

It is known that corticosterone (CORT), the principal glucocorticoid in rodents, is released from adrenal cortex in response to stress. We have examined the rapid effects of CORT on *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated Ca^{2+} signals in adult mouse hippocampal slices by using Ca^{2+} imaging technique. In our previous study, we found that CORT induced a significant decrease of the peak amplitude of NMDA-induced Ca^{2+} elevation in the CA1 region. The membrane non-permeable bovine serum albumin-conjugated CORT also induced a similar effect in the CA1 region. Therefore the rapid effects of CORT should be induced via putative surface CORT receptors. A possible candidate for surface CORT receptors is a classical intracellular glucocorticoid receptor (GR). In the present study, to confirm this idea, we examined the effects of dexamethasone (DEX: an agonist of GR) and CORT with RU38486 (an antagonist of GR) on NMDA-induced Ca^{2+} signals. As a result, DEX induced a similar effect to the suppressive CORT effect in the CA1 region, and RU38486 inhibited the suppressive CORT effect. These results suggest that the surface CORT receptor could be GR.

Keywords: acute effect, Ca^{2+} signals, corticosterone, NMDA receptor, glucocorticoid receptor, hippocampus

1 はじめに

生物の恒常性維持にホルモンは重要な働きをしている。ステロイドホルモンは通常、生体内・外からの刺激により副腎皮質などの内分泌器官で生合成され、血流に運ばれて体中へ行渡り作用する。ステロイドホルモンには副腎皮質ホルモン、男性ホルモン、卵胞ホルモン、黄体ホルモンがある。これらのうち、副腎皮質ホルモンであるコルチコステロン (corticosterone (CORT)) は糖質コルチコイドの1種で、ストレス負荷時に分泌量が増加することが知られている。これまでCORTは副腎皮質で合成されることが知られてきたが、近年、げっ歯類の脳内でもステロイドホルモンの生合成に必要な酵素群が

見つかり^{1,2)}、脳内でのCORTの生合成の可能性が考えられている。そして、CORTが脳海馬の神経細胞に急性的に影響を与えることが示唆されている^{3,4)}。

脳内では神経細胞同士がシナプスを介して互いに結合し情報伝達が行われている。その情報伝達の方法には、電気シナプスを介する場合と化学シナプスを介する場合があるが、たいていの場合は化学シナプスを介して伝達が行われている。化学シナプスでは、シナプス前末端からシナプス間隙中に神経伝達物質が放出され、シナプス後部の細胞膜上にある受容体に結合する。その結果、直接または間接的にイオンチャネルに作用することにより、チャネルが開きシナプス電位が発生する。このようにして神経細胞間の情報伝達が行われている。

* 日本大学文理学部物理生命システム科学科:
〒156-8550 東京都世田谷区桜上水3-25-40

** 東京大学大学院広域科学専攻生命環境科学系:
〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

* Department of Integrated Sciences in Physics and Biology, College of Humanities and Sciences, Nihon University: 3-25-40 Sakurajosui, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8550, Japan

** Department of Biophysics and Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo: 3-8-1 Meguro-ku, Tokyo, 153-8902, Japan

哺乳類の脳などの中枢神経系では、グルタミン酸が主な興奮性の神経伝達物質である。グルタミン酸受容体にはイオンチャネル受容体と代謝型受容体がある。イオンチャネル受容体にはN-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate (NMDA)) 受容体と、非NMDA受容体 (カイニン酸型と α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 型) があり、どちらも Na^+ や K^+ などの1価のイオンを透過することができるが、NMDA受容体のみが2価の Ca^{2+} も透過することができる。非NMDA受容体では、グルタミン酸が受容体に結合するとチャネルが開き、細胞内外への Na^+ の流入・ K^+ の流出が生じてシナプス後膜が脱分極する。一方、NMDA受容体は通常、細胞外の Mg^{2+} によってチャネルがブロックされているため、グルタミン酸が受容体に結合してもイオンは透過することができない。しかし、シナプス後膜が大きく脱分極するとNMDA受容体の Mg^{2+} ブロックは外れ、 Na^+ 、 K^+ に加え Ca^{2+} が透過できるようになり細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。

海馬にはNMDA受容体が多く存在し、記憶・学習やそれに関連した現象に重要な働きをすることが知られている。例えば、海馬スライスの神経線維を高頻度で刺激した後にシナプス伝達効率が数時間増大する現象はシナプスの長期増強 (Long-term Potentiation (LTP)) と呼ばれ、海馬における記憶・学習の素過程と考えられているが⁵⁻⁷⁾、NMDA受容体を介した細胞内への Ca^{2+} 流入がLTP誘導に不可欠であることが知られている⁸⁾。一方、LTPに対するCORTの作用も数多く報告されている^{9,10)}。最近ではCORTがLTPを急性的に抑制することも報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。

そこで我々は、記憶・学習に関連しているNMDA受容体に注目し、CORTがNMDA受容体を介する Ca^{2+} 流入にどのような影響を与えるか、カルシウムイメージング法を用いて調べてきた。これまでに、マウス脳海馬のCA1領域においてCORTがNMDA受容体を介する細胞内 Ca^{2+} 流入を著しく抑制するという結果が得られた¹⁵⁾。そして、CORTの作用部位は細胞膜上に存在すること、またCORTの抑制作用が遺伝子発現を伴わない急性的なものであることが分かった。

しかしながら、これまでの研究ではCORTの急性的な作用が細胞内のどのような経路によるものか、またどのようなメカニズムによるものなのか明らかにすることができなかった。CORTの作用部位についてはNMDA受容体に直接作用している可能性、未知の受容体に作用している可能性、あるいは細胞質に存在する糖質コルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor (GR)) が細胞膜に

局在し、それに作用している可能性などが考えられる。このような細胞膜上のGRの存在はGR抗体による組織染色実験から海馬と視床下部において既に確認されている¹⁶⁾。そこで、本研究ではCORTが細胞膜上に存在するGRに作用し、NMDA受容体を介する細胞内 Ca^{2+} 流入に対して急性的な作用を引き起こしている可能性を検討することを目的とした。

2 実験方法

実験には成獣 (7週齢) 雄の ddY マウス (三協ラボサービス) の急性全脳スライスを用いた。購入後のマウスはストレスがかからないように留意し、実験に使用するまで滅菌した床敷を敷いたケージの中に一定の室温 (22 ~ 23°C) のもとで飼育し、飼料および水を自由摂取させた。動物を使った本研究のすべての実験は、動物指導書に基づいて行われた。

まず、マウスにジエチルエーテルを用いて麻酔し、断頭後に脳を摘出し、厚さ 300 μm のスライスを作製した。スライス作製中はスライサー (堂阪イーエム, DTK-1000) のチャンバの周りを氷で冷却し、脳の代謝を低下させておいた。作製したスライスは30°Cに保たれた 2mM Mg^{2+} ACSF (Artificial cerebrospinal fluid: 124 mM NaCl, 5mM KCl, 22mM NaHCO_3 , 10mM D (+)-グルコース, 1.24mM NaH_2PO_4 , 2mM MgSO_4 , 2mM CaCl_2) の入ったチャンバ内に移し、95% O_2 /5% CO_2 ガスで60分間バブリングしながら代謝回復を行った。代謝回復後、スライスを Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura-2/AM 溶液の入ったチャンバ内に移し、バブリングしながら室温で30分間染色した。Fura-2/AM 溶液はジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide (DMSO)) を溶媒とした 1mM Fura-2/AM 溶液を、2mM Mg^{2+} ACSF で 10 μM に希釈したものをを用いた。Fura-2/AM は疎水性であるため水に溶けにくいので、溶解補助剤として Cremophor EL を用い、その最終濃度は 0.02% となるようにした。染色後、細胞外に残った Fura-2 を洗い落とすため、再び 2mM Mg^{2+} ACSF の入ったチャンバ内にスライスに移し、バブリングしながら室温で30分間洗浄を行った。

作製したスライスは測定30分前からCORT、デキサメタゾン (dexamethasone (DEX) : GRのアゴニスト) あるいはRU38486 (GRのアンタゴニスト) を含む溶液でインキュベーションした。インキュベーション溶液は、事前に作製しておいたCORTやDEX, RU38486のDMSO溶液を100 μM Mg^{2+} ACSF (124mM NaCl, 5mM KCl, 22mM NaHCO_3 , 10mM D (+)-グルコース, 1.24mM NaH_2PO_4 , 0.1mM MgSO_4 , 2mM CaCl_2) で最終濃度に希

釈し作製した。溶液中のDMSO濃度はいずれの場合も0.05%以下であった。以下の実験では0.05%のDMSOを含む100 μ M Mg^{2+} ACSFでインキュベーションした実験をCORTおよびDEX作用に対するコントロール実験(control)とした。

インキュベーション後、スライスを顕微鏡ステージ上の測定用チャンバに移し、インキュベーション時と同じ溶液(30°C)を1ml/minで灌流した。デジタル蛍光顕微鏡システムにより、波長340nm及び380nmで励起した場合の510nmの蛍光強度(F340及びF380)を測定し、5秒間隔で蛍光画像を取得した。この蛍光強度の比(F340/F380)をとることで、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定することができる。測定時間は6分間とし、測定

開始150秒後からNMDA受容体アゴニストの1mM NMDAを灌流した。得られた蛍光画像や蛍光強度比変化はAQUACOSMOS Ver.1.3(浜松ホトニクス)により解析した。その際、計測ウィンドウ(5ピクセル \times 5ピクセル(100 μ m \times 100 μ m))をCA1及び歯状回(dentate gyrus (DG))領域に12箇所ずつおき、領域ごとにその12箇所の蛍光強度比の平均値を求めた。

以下、各データは平均値 \pm 標準誤差で表記した。n(データ数)は測定した全脳スライスの数とした。統計解析には一元配置分散分析法(ANOVA)を用いて多試料の平均値の比較を行い、有意水準0.05を満たした場合Tukey-Kramer法を用いてどのペアに有意差が存在するか検定した。

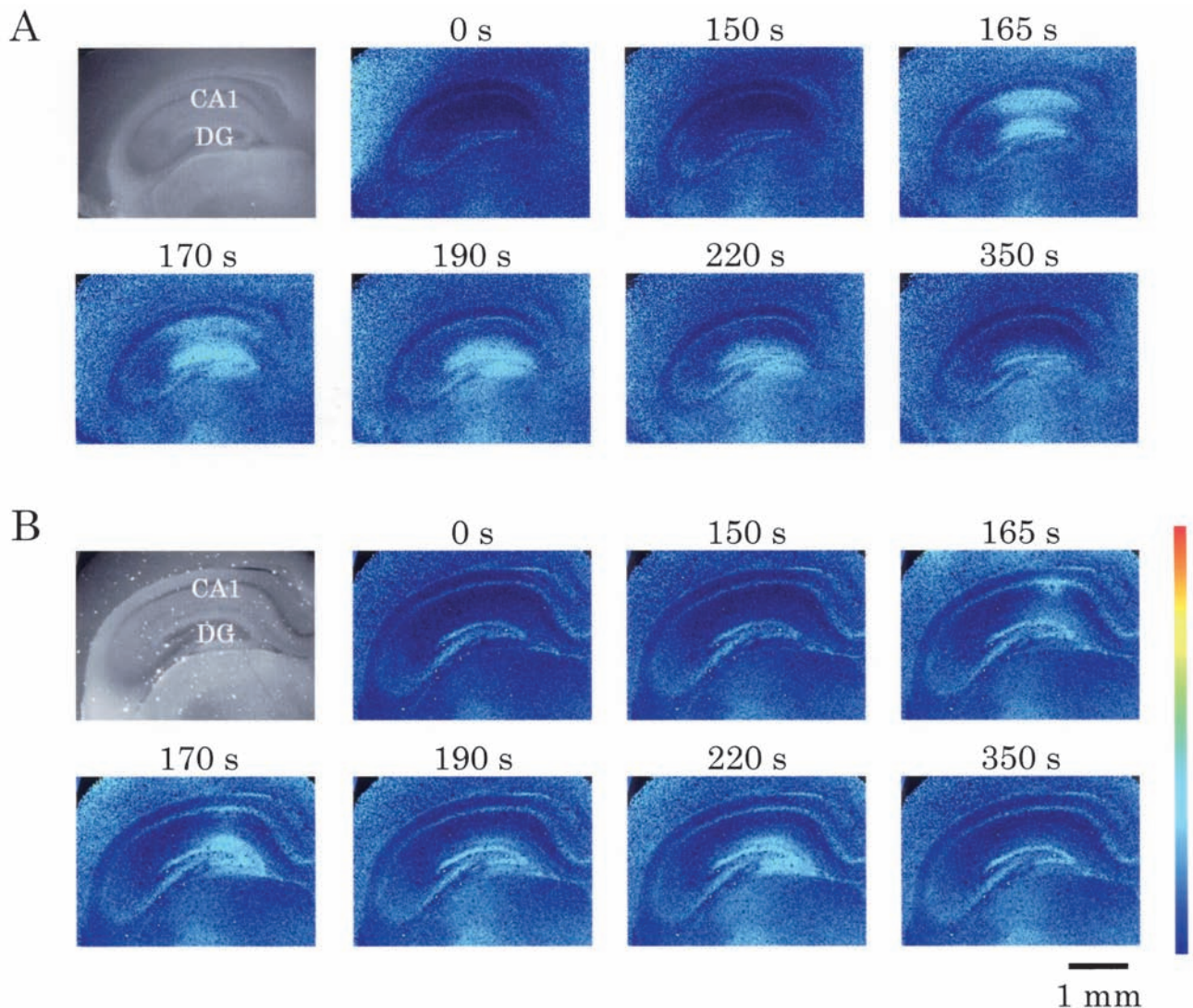


図1 マウス脳スライスを1mM NMDAで刺激した際の蛍光画像の経時変化；(A) control, (B) 1 μ M DEX投与。A, Bともに左上は380nmで励起した場合のスライスの蛍光画像である。それ以外の擬似カラー画像では340nmと380nmで励起した場合の蛍光強度比(F340/F380)の大きいピクセルが赤色、小さいピクセルが青色で表されている。実験開始後150秒から1mM NMDAで刺激した。

3 実験結果

マウス脳スライスを 1mM NMDA で刺激した際の蛍光画像の経時変化を図 1 に示す。蛍光強度比 (F340/F380) (すなわち細胞内 Ca²⁺濃度) の大きいピクセルが赤色, 小さいピクセルが青色で擬似カラー表示されている。(A) が control, (B) が 1 μ M DEX を投与した場合である。図 2 には 1mM NMDA で刺激した際の蛍光強度比の経時変化を示す。NMDA 刺激後, 急激に蛍光強度比が増加し, ピーク値をとった後, 徐々に一定レベルに減衰していった。測定開始から 70~100 秒の蛍光強度比の平均値を basal level とし, NMDA 刺激後のピーク値と basal level との差を蛍光強度比の最大変化量 (Δ (F340/F380)) とした。control では蛍光強度比の最大変化量は CA1 領域で 0.24 ± 0.02 (n=15), DG 領域で 0.23 ± 0.01 (n=15) であった (図 3)。NMDA 受容体をその阻害剤である MK-801 でブロックすると, このような蛍光強度比変化は見られなくなったことから, その変化は

NMDA 受容体を介する細胞内 Ca²⁺流入によるものであることが確認された。

これまでの研究から, CORT が CA1 領域でこのような NMDA 受容体を介する細胞内 Ca²⁺流入を著しく抑制することが分かった。図 3 に示すように, 1 μ M の CORT を投与した場合には蛍光強度比の最大変化量が control に比べて $66.2 \pm 11.5\%$ (n=9, $p < 0.05$) に減少した。細胞膜不透過性の BSA-CORT (bovine serum albumin-conjugated corticosterone) でも同様な抑制作用が見られたことから, 我々は CORT の作用部位は細胞膜上に存在すると結論づけた¹⁵⁾。また, シクロヘキサミド (cycloheximide) でタンパク合成を阻害した上で CORT の作用を調べたところ, CORT の抑制作用が阻害されることはなかった。このことから, CORT の抑制作用が遺伝子発現を伴わない急性的なものであると結論づけた。なお, CA1 領域で見られた CORT の抑制作用は DG 領域では見られなかった。以下では, CA1 領域における結果のみを述べることにする。

本研究の目的は, CORT の抑制作用が GR に作用することによって引き起こされている可能性を検討することである。そこでまず, GR のアゴニストである DEX が

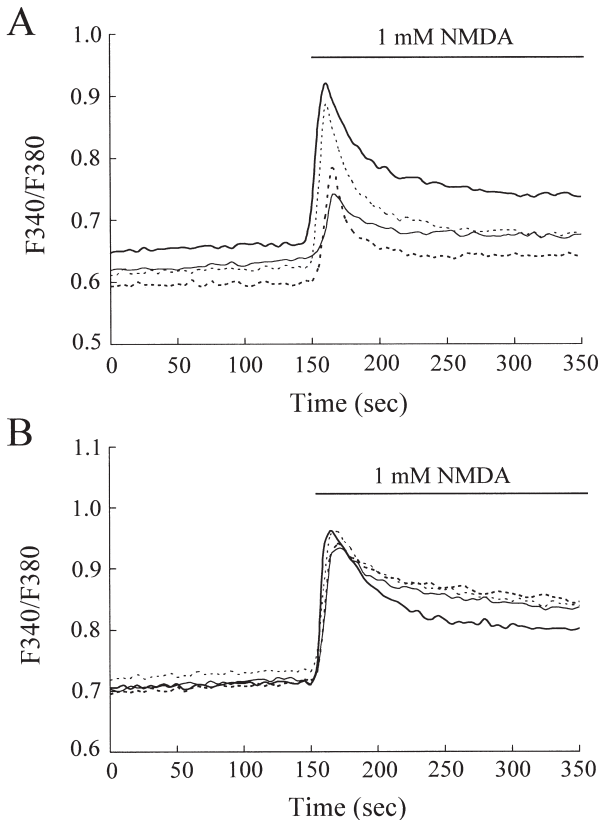


図 2 1mM NMDA で刺激した際の蛍光強度比 (F340/F380) の経時変化; (A) CA1 領域, (B) DG 領域。太線が control, 細線が 1 μ M CORT を投与した場合, 太点線が 1 μ M DEX を投与した場合, 細点線が RU38486 (5 μ M) と共存させた上で 1 μ M CORT を投与した場合を表す。

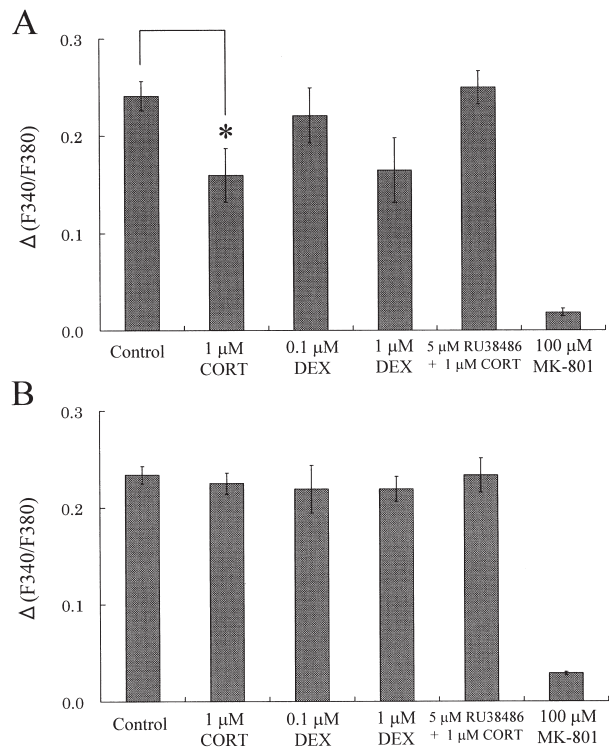


図 3 1mM NMDA で刺激した際の蛍光強度比の最大変化量 (Δ (F340/F380)); (A) CA1 領域, (B) DG 領域。各データは平均値 \pm 標準誤差で表されている。* は control に比べて $p < 0.05$ を表す。

CORTと同様に細胞内Ca²⁺流入に対する抑制作用を引き起こすかを調べた。その結果、0.1 μMのDEXを投与した場合には蛍光強度比の最大変化量に顕著な変化は見られなかったが(controlに比べて91.6±11.7% (n=8)), 1 μMの場合には68.2±13.7% (n=8)に減少した(図3)。CORTとGRのアゴニストのDEXとで同様な細胞内Ca²⁺流入に対する抑制作用が見られたことから、CORTの作用部位がGRである可能性が示唆された。しかしながら、GRに対するDEXの親和性はCORTに比べて高いにも関わらず、1 μMのDEXを投与した場合に見られた蛍光強度比の最大変化量の減少は有意な差としては認められなかった(CORTの場合0.4 μMで細胞内Ca²⁺流入に対する有意な抑制作用が見られる¹⁵⁾)。そこで、CORTの作用部位がGRであることを確認するため、次にGRのアнтаゴニストであるRU38486 (5 μM)と共存させた上でCORTの作用を調べてみた。その結果、RU38486と共存させると、1 μM CORTを投与した場合に見られた蛍光強度比の最大変化量の減少が確かに見られなくなった(controlに比べて103.5±7.1% (n=8)) (図3)。

4 結論

CORTは海馬CA1領域でNMDA受容体を介する細胞内Ca²⁺流入を著しく抑制する。本研究では、CORTとGRのアゴニストのDEXとで同様な細胞内Ca²⁺流入に対する抑制作用が見られたこと、CORTにGRのアンタゴニストであるRU38486を共存させるとCORTの抑制作用が見られなくなることから、CORTの作用部位がGRである可能性が示唆された。そして、これまでの我々の研究からそれは細胞膜上に存在するものと考えられ、またCORTの抑制作用は遺伝子発現を伴わない急性的なものであると考えられる。古典的には、CORTは細胞質に存在する細胞内受容体に結合し、遺伝子発現を調節して新たなタンパク質の合成を促すことにより細胞内Ca²⁺濃度を調節すると考えられているが¹⁷⁻²⁰⁾、従来から知られている細胞内受容体を介する遺伝子調節経路に加えて、細胞内受容体を介さない非遺伝子経路が海馬神経細胞内に存在する可能性が示唆される。

参考文献

- 1) T. Kimoto, T. Tsurugizawa, Y. Ohta, J. Makino, H. Tamura, Y. Hojo, N. Tanaka, 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) 3578-3589.
- 2) Y. Hojo, T. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H. Ishii, J. H. Morrison, W. G. M. Janssen, H. Mukai, S. Komiyama, N. Harada, T. Kimoto and S. Kawato, Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101** (2004) 865-870.
- 3) D. J. de Quervain, B. Roozendaal and J. L. McGaugh, Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory, *Nature*, **394** (1998) 787-790.
- 4) S. J. Lupien and B. S. McEwen, The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies, *Brain Res. Rev.*, **24** (1997) 1-27.
- 5) P. A. Schwartz and K. Wester, Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the *in vitro* hippocampal slice, *Brain Res.*, **89** (1975) 107-119.
- 6) P. Andersen, S. H. Sundberg, O. Sveen, H. Wigström, Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampus slices, *Nature*, **266** (1977) 736-737.
- 7) G. S. Lynch, T. Dunwiddie and V. Gribkoff, *Nature*, Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation, **266** (1977) 737-739.
- 8) T. V. P. Bliss and G. L. Collingridge, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, **361** (1993) 31-39.
- 9) H. Krugers, D. N. Alfarez, H. Karst, K. Parashkouhi, N. Gemert and M. Joëls, Corticosterone shifts different forms of synaptic potentiation in opposite directions, *Hippocampus*, **15** (2005) 697-703.
- 10) O. Wiegert, Z. Pu, S. Shor, M. Joëls and H. Krugers, Glucocorticoid receptor activation selectively hampers N-methyl-D-aspartate receptor dependent hippocampal synaptic plasticity *in vitro*, *Neuroscience*, **135** (2005) 403-411.
- 11) C. Vidal, W. Jordan and W. Zieglgangersberger, Corticosterone reduces the excitability of hippocampal pyramidal cells *in vitro*, *Brain Res.*, **383** (1986) 54-59.
- 12) D. M. Diamond, M. C. Bennett, M. Fleshner and G. M. Rose, Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation, *Hippocampus*, **2** (1992) 421-430.
- 13) D. S. Kerr, A. M. Huggett and W. C. Abraham, Modulation of hippocampal long-term potentiation and long-term depression by corticosteroid receptor activation, *Psychobiology*, **22** (1994) 123-133.
- 14) M. Rey, E. Carlier, M. Talmi, B. Soumireu-Mourat, Corticosterone effects on long-term potentiation in mouse hippocampal slices, *Neuroendocrinology*, **60** (1994) 36-41.
- 15) S. Sato, H. Osanai, T. Monma, T. Harada, A. Hirano, M. Saito, S. Kawato, Acute effect of corticosterone on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in mouse hippocampal slices, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321** (2004) 510-513.
- 16) Z. Liposits and M. C. Bohn, Association of glucocorticoid receptor immunoreactivity with cell membrane and trans-

- port vesicles in hippocampal and hypothalamic neurons of the rat, *J. Neurosci. Res.*, **35** (1993) 14-19.
- 17) 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) 225-231.
- 18) Y. Watanabe, E. Gould and B. S. McEwen, Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons, *Brain Res.*, **588** (1992) 341-345.
- 19) L. P. Reagan and B. S. McEwen, Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus, *J. Chem. Neuroanat.*, **13** (1997) 149-167.
- 20) S. M. Nair, T. R. Werkman, J. Craig, R. Finnell, M. Joëls and J. H. Eberwine, Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons, *J. Neurosci.*, **18** (1998) 2685-2696.