

成体脳の神経新生に対するエストロゲン作用 — グラニューリンの関与と加齢に伴う変化 —

千葉 秀一, 鈴木 正寿, 山内 啓太郎, 西原 真杉

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室

はじめに

近年, ヒトを含む多くの哺乳類の成体においても神経細胞の新生が生じていることが明らかになってきた [1]. 哺乳類の成体脳における神経新生はごく限られた領域で生じており [2], 1つは側脳室上皮細胞下に存在する脳室下領域 (subventricular zone; SVZ) で増殖した神経前駆細胞が rostral migratory stream と呼ばれる構造を経て嗅球へと移動し, 顆粒細胞や傍糸球体細胞といった介在神経細胞へと最終分化することが知られている (図1 A). また, 神経新生は海馬歯状回においても生じており, 顆粒細胞層と歯状回門の境界領域である subgranular zone (SGZ) で増殖した神経前駆細胞は顆粒細胞へと分化する (図1 B). 新生した神経細胞は電気生理学的な実験などから機能的な成熟神経細胞へ分化することが示唆されており [3], 細胞分裂阻害薬を用いることによってこれらの領域における神経新生を阻害すると, 記憶形成 [4] や抗うつ薬の作用 [5] が障害されることなどが明らかになっている. 成体脳における神経新生の制御メカニズムの解明は現在精力的に行われており, アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患や脳虚血等によって生じた脳の障害に対する再生療法の開発に大きな貢献がなされるものと期待されている. 現在のところ, 線維芽細胞成長因子 (FGF) やインスリン様成長因子-I (IGF-I) といった成長因子や脳由来神経栄養因子 (BDNF) といったニューロトロフィン, セロトニンやグルタミン酸などの神経伝達物質, エストロゲンやアンドロゲンなどのホルモンが神経新生の制御因子として知られている [2]. さらに, 神経新生は加齢に伴って減少することが明らかになっている [6].

このうちエストロゲンについては, 海馬歯状回SGZの神経前駆細胞の増殖を促進し, 幼若な神経細胞の数を増加させることが示唆されたことから, 近年注目を集めている [7]. エストロゲン受容体 β のノックアウトマウスの研究などから, エストロゲンは学習や記憶といった脳機能を促進することが明らかになっている [8]. また閉経後の女性におけるエストロゲン補充療法が認知機能を向上させるとの報告もある [9]. さらに, エストロゲンは脳虚血などによって生じる脳障害を軽減させることも報告されている [10]. このようなエストロゲンの神経保護作用において, 神経新生の促進が何らかの貢献をしている可能性がある.

SVZやSGZで増殖する神経前駆細胞にはエストロゲン受容体の発現が報告されているが [11], *in vitro*の神経前駆細胞に対するエストロゲンの直接作用による影響が *in vivo*の報告と一致しなかったことなどから, エストロゲンの神経前駆細胞の増殖促進メカニズムについてはいまだ検討の余地が大きい. 神経前駆細胞の増殖はいわゆるnicheにおける細胞外因子より制御されていると考えられ, エストロゲン受容体を発現する細胞は

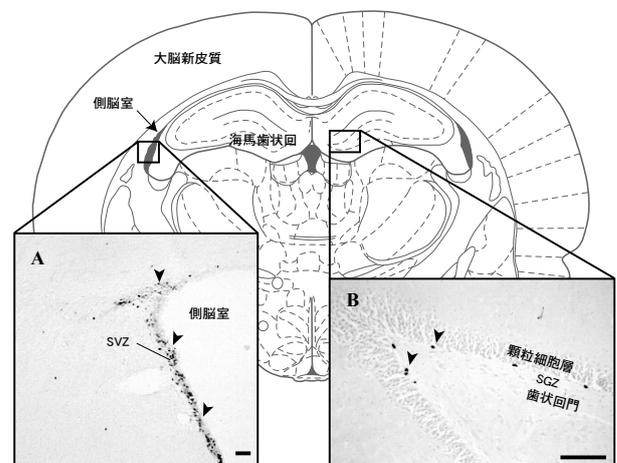


図1 Subventricular zone (SVZ; A) および subgranular zone (SGZ; B) におけるBrdU標識された増殖細胞 (矢頭). 脳断面図はPaxinos and Watson (1996) より改変. Scale bar: 200 μ m.

連絡先: 千葉秀一, 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室
〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1
TEL: 03-5841-5386
FAX: 03-5841-8017
E-mail: aa47162@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

増殖中の細胞自身のみならず，その近傍の細胞にも発現がみられるようである [12]．そこで，われわれは海馬においてエストロゲンにより誘導され，なおかつ神経新生に関与すると考えられる成長因子がエストロゲンの神経前駆細胞の増殖促進作用に関与しているとの仮説を立てた．そして，その候補としてグラニューリン，IGF-I そしてBDNFの3種の成長因子を候補にあげた．

グラニューリン

ここで，まずグラニューリンについての説明をしたい．グラニューリンは別名をエピセリンとも呼ばれ，分子量6kのシステインリッチなポリペプチドの性状をとる成長因子である [13]．グラニューリンの発現は肺や脾臓，腎臓，精巣上体といったさまざまな臓器で見られる [14]．マウスにおけるin situ hybridizationによるグラニューリンmRNAの発現解析では，脳においては海馬の錐体細胞や顆粒細胞，小脳のプルキンエ細胞などに発現していることが明らかになっている [15]．われわれは，出生後まもないラットの視床下部におけるmRNA量をcDNA subtraction法を用いて雌雄で比較し，その結果雄においてグラニューリン前駆体のmRNA発現量が増加していることを発見した [16]．この時期の雄のラット視床下部では，精巣由来のテストステロンから代謝されたエストロゲンが作用して雄特有の神経回路を形成することで，成熟後に見られる視床下部の解剖学的な性差や雄型性行動の発現，神経内分泌学な性差が生み出されていると考えられている [17]．グラニューリン前駆体mRNAに対するアンチセンスオリゴDNAを雄ラット新生子の視床下部に投与したところ雄型性行動の発現に影響が見られたことから，グラニューリンは雄型神経回路の形成に関与していることが示唆されている [18]．また，グラニューリン前駆体mRNAの発現はエストロゲンにより誘導され，乳腺がん細胞であるMCF7においてエストロゲン依存性の増殖に関与していることが示唆されている [19]．以上の報告から本研究においてグラニューリンに着目することにし，上記の仮説を検討するために12週齢のラットと，middle-ageのモデルとして52週齢のラットを用いて，海馬歯状回における細胞増殖を検討するとともにグラニューリンを含む3種の成長因子mRNA量を解析した．

神経前駆細胞の増殖と成長因子遺伝子発現に対するエストロゲンの作用

10週齢と50週齢のWistar-Imamichi系雌ラットの卵巣を摘出 (OVX) し，その2週間後に芳香化エストロジオール (EB) を投与した．EB投与2時間後にプロモデオキシウリジン (BrdU) を投与し，さらにEB投与4時間後に4%パラホルムアルデヒドによって灌流固定した脳をサンプリングした．サンプリングした脳から30 μ m厚の切片を作成し，BrdUに対する免疫染色を行った．BrdUはチミジン類似化合物で，細胞周期のS期にDNAに取り込まれ，増殖中の細胞を標識することができる (図1の写真参照)．このことを利用し，海馬歯状回におけるBrdU標識された増殖細胞数を計測した結果 (表1)，12週齢のOVXラットではEB処置によって増殖細胞数が増加していることを確認した．52週齢のOVXラットでは，12週齢と比較して増殖細胞数の大きな減少が溶媒投与群とEB投与群の双方で観察された．また，52週齢のOVXラットではEB処置による増殖細胞数の変化は観察されなかった．

次に，12および52週齢のOVXラットにEBを投与し，その4時間後に海馬をサンプリングして，total RNAを抽出した．逆転写反応 (RT) によりtotal RNAからcDNAを得た後に，リアルタイムPCRを行い，グラニューリン，IGF-I，BDNFのそれぞれの前駆体mRNA量を測定した (表2)．その結果，12週齢のOVXラットでは，グラニューリン前駆体のmRNA量がEB処置によって約4倍に増加していることが明らかになったが，IGF-I，

表1 海馬歯状回SGZにおける細胞増殖に対するエストロゲンの影響

週齢	処置	BrdU陽性細胞数
12	対照	10.3 \pm 0.7
12	EB	13.3 \pm 1.1*
52	対照	1.2 \pm 0.3†
52	EB	0.9 \pm 0.1†

EB：芳香化エストロジオール．値は1切片あたりの細胞数の平均 \pm 標準誤差．*は対照に対して，†は12週齢の同処置群に対してP<0.05で有意差があることを表す．

表2 海馬の成長因子mRNAレベルに対するエストロゲンおよび加齢の影響

週齢	処置	グラニューリン	IGF-I	BDNF
12	対照	0.69 \pm 0.31	0.33 \pm 0.042	1.08 \pm 0.09
12	EB	2.60 \pm 0.72*	0.29 \pm 0.036	1.01 \pm 0.04
52	対照	0.61 \pm 0.19	0.23 \pm 0.023	0.97 \pm 0.16
52	EB	0.56 \pm 0.15	0.24 \pm 0.033	0.76 \pm 0.12

IGF-I：insulin-like growth factor-I，BDNF：brain-derived neurotrophic factor．値は各mRNA量をribosomal protein S29で標準化したものの平均 \pm 標準誤差．*は対照に対してP<0.05で有意差があることを表す．

BDNF前駆体のmRNA量には変化が見られなかった。一方、52週齢のOVXラットでは、3種の成長因子のmRNA量はいずれもEB処置によって変化しなかった。

以上の実験の結果から、エストロジェンの歯状回の細胞増殖および海馬グラニューリン発現に対する促進作用は加齢に伴って消失してしまうものの、12週齢のOVXラットにおいて、エストロゲンによって発現誘導されたグラニューリンが、エストロジェンの歯状回の細胞増殖に対する促進作用を仲介している可能性が示された。

培養神経前駆細胞に対するエストロゲン作用

上記の可能性を検討するために、10週齢の雌ラット由来の海馬をトリプシン処理し、回収・播種した神経前駆細胞をbFGF、上皮成長因子(EGF)、ヘパリンを加えたDMEM/F12で培養した。培養神経前駆細胞に β エストラジオール処置し、24時間後の細胞数をテトラゾリウム塩(WST-1)の還元によって生じたホルマザンの濃度を測定した。神経前駆細胞は β エストラジオールの濃度依存的に増殖し、もっとも顕著な反応がみられた 10^{-5} M β エストラジオール存在下では対照の約1.5倍に増加していた。さらに、 10^{-5} M β エストラジオール存在下で、グラニューリン前駆体に対する抗体を10 μ g加えたところ、 β エストラジオールの細胞増殖促進作用は消失した(表3)。培養神経前駆細胞からtotal RNAを抽出し、RT-PCRによってエストロゲン受容体(ER)およびグラニューリン前駆体のmRNA発現を調べたところ、ER α およびER β のmRNA発現は今回の実験では確認することができなかったが、グラニューリン前駆体mRNAが発現していることが確認できた。以上の結果から、エストロゲンは神経前駆細胞に直接作用して細胞増殖を促進することが示唆され、この作用にはグラニューリンの自己分泌作用によって仲介されている可能性がある。なお、今回の実験では神経前駆細胞にエストロゲン受容体の発現が確認できなかったが、エストロゲンの作用が比較的急性であることなどを考えると、エストロゲンが細胞膜受容体を介して、遺伝子の転写を伴わない作用を

表3 培養神経前駆細胞の増殖に対するエストロゲンおよび抗グラニューリン抗体(Anti-Grn)の影響

抗体	処置	相対細胞数(%)
IgG	対照	100 \pm 14
IgG	E2	147 \pm 12*
Anti-Grn	対照	100 \pm 13
Anti-Grn	E2	115 \pm 10

値は対照を100%とした時の相対細胞数 \pm 標準誤差。*は対照に対して $P < 0.05$ で有意差があることを表す。

示している可能性もあり、今後さらなる解明を進めたい。

おわりに

本研究によりエストロジェンの神経新生に対する作用にグラニューリンが関与していることが示唆された。グラニューリンの神経新生に対する作用については今後もさらなる検討が必要だと考えている。われわれはグラニューリンノックアウトマウスを作出して、解剖学的・行動学的な解析を進めており、そこから新たな知見が得られるものと期待している。

また、本研究では加齢に伴って神経前駆細胞増殖に対するエストロゲン作用が消失していたことが見いだされた。本研究のようにエストロゲン作用が加齢に伴って変化することを報告した例はあまり見られないが、嗅球や視床下部ではエストロゲン受容体が加齢に伴って変化しているとの報告もある[20, 21]。海馬歯状回におけるエストロゲン受容体発現の加齢に伴う変化にも興味をもたれるところであるが、そのためにも神経前駆細胞増殖に対するエストロゲンの作用期序について、さらなる解明が必要であろう。近年のWomen's Health Initiativeの報告[22]等により、認知機能に対するエストロゲン補充療法の効果については懐疑的な見方も多くなってきているが、この効果について、加齢などの条件がエストロゲン作用を修飾している可能性があることを提唱したい。

文献

- Gross CG (2000) Neurogenesis in the adult brain : death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1, 67-73.
- Hagg T (2005) Molecular regulation of adult CNS neurogenesis : an integrated view. *Trends Neurosci* 28, 589-595.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.0
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age : sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. [see comment]. *Annals of Neurology* 52, 135-143.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neu-*

- roschi 19, 5792-5801.
8. Rissman EF, Heck AL, Leonard JE, Shupnik MA, Gustafsson JA (2002) Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3996-4001.
 9. Maki PM (2006) Hormone therapy and cognitive function : is there a critical period for benefit? *Neuroscience* 138, 1027-1030.
 10. Wise PM (2002) Estrogens and neuroprotection. *Trends Endocrinol Metab* 13, 229-230.
 11. Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D (2002) Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci* 21, 512-520.
 12. Perez-Martin M, Azcoitia I, Trejo JL, Sierra A, Garcia-Segura LM (2003) An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat. *Eur J Neurosci* 18, 923-930.
 13. Bateman A, Bennett HP (1998) Granulins : the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol* 158, 145-151.
 14. Bhandari V, Giaid A, Bateman A (1993) The complementary deoxyribonucleic acid sequence, tissue distribution, and cellular localization of the rat granulin precursor. *Endocrinology* 133, 2682-2689.
 15. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A (2000) Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* 48, 999-1009.
 16. Suzuki M, Yoshida S, Nishihara M, Takahashi M (1998) Identification of a sex steroid-inducible gene in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 242, 127-130.
 17. Suzuki M, Nishihara M (2002) Granulin precursor gene : a sex steroid-inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol Genet Metab* 75, 31-37.
 18. Suzuki M, Bannai M, Matsumuro M, Furuhashi Y, Ikemura R, Kuranaga E, Kaneda Y, Nishihara M, Takahashi M (2000) Suppression of copulatory behavior by intracerebroventricular infusion of antisense oligodeoxynucleotide of granulin in neonatal male rats. *Physiol Behav* 68, 707-713.
 19. Lu R, Serrero G (2001) Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 142-147.
 20. Jezierski MK, Sohrabji F (2001) Neurotrophin expression in the reproductively senescent forebrain is refractory to estrogen stimulation. *Neurobiol Aging* 22, 309-319.
 21. Chakraborty TR, Hof PR, Ng L, Gore AC (2003) Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER alpha) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *J Comp Neurol* 466, 409-421.
 22. Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN, 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J (2003) Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women : the Women's Health Initiative Memory Study : a randomized controlled trial. *JAMA* 289, 2651-2662.