ミニ特集

第81回日本衛生学会
若手プロジェクト研究助成ミニシンポジウム
「ディーゼル排気ガス中のナノ粒子による健康影響—動物実験の知見から—」

ナノ粒子画分の多いディーゼル排気ガスを曝露したマウスの海馬における 学習・行動機能への影響

ティンティンウィンシュエイ^{*1,2}, 藤谷 雄二^{*1}, 平野靖史郎^{*1}, 藤巻 秀和^{*1}

^{*1} 独立行政法人国立環境研究所環境リスク研究センター

^{*2} 独立行政法人国立環境研究所環境健康研究センター

Exposure to Nanoparticle-Rich Diesel Exhaust Affects Hippocampal Functions in Mice

Tin Tin WIN-SHWE^{*1,2}, Yuji FUJITANI^{*1}, Seishiro HIRANO^{*1} and Hidekazu FUJIMAKI^{*1}

^{*1}Center for Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies

^{*2}Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies

Abstract Epidemiological studies have indicated associations between day-to-day particulate air pollution and increased risks of various adverse health outcomes. Although an association between exposure to diesel exhaust particles (DEPs) and the development of pulmonary inflammation has been reported, there are limited reports on the neurotoxic effects of DEPs, particularly those of nanoparticle-rich diesel exhaust (NRDE). In this minireview, we highlighted the effects of NRDE which was generated in the National Institute for Environmental Studies, on hippocampus-dependent spatial learning ability and the expression of memory-function-related genes, neurotrophins, and proinflammatory cytokines in a mouse model.

Key words: nanoparticles (ナノ粒子), diesel exhaust (ディーゼル排気), learning and memory (学習と記憶), hippocampus (海馬), memory-function-related gene expression (記憶関連遺伝子発現)

はじめに

これまで疫学研究では、日々の粒子状物質による大気汚染と、様々な健康影響のリスクとの関連が示唆されている(1, 2)。ディーゼル排気微粒子(diesel exhaust particle; DEP)は大気中の粒子状物質の主要な構成要素であり、直接ディーゼル車から放出されたほとんどの粒子の直径は、1 µmより小さい(3, 4)。DEPは肺機能、免疫システム、生殖器官、および脳発達過程に危険な影響を与える

化合物を多く含有している(5-14)。以前、我々は、ナノサイズのカーボンブラックの気管内投与、点鼻投与が、微粒子のサイズ依存的に肺と脳の炎症を引き起こすことを報告した(15, 16)。ナノサイズの粒子には活性酸素種の生産能力が高く、結果として、比較的粒径が大きい粒子に比べて毒性が強いことが報告されている(17, 18)。しかし、ナノ粒子を含んだディーゼル排気の学習行動とメモリ機能への影響については、まだ不明な部分が多い。

本報告では、最近のディーゼル由来のナノ粒子と脳・神経、中でも海馬への影響について概括する。本稿で紹介する我々の行った実験については、すべて国立環境研究所の動物実験倫理審査委員会の承認を得て実施された。

海馬におけるNMDA受容体の役割

海馬におけるNMDA (N-methyl-D-aspartic acid) 型グル

受付 2011 年 6 月 23 日, 受理 2011 年 7 月 14 日
Reprint requests to: Tin Tin WIN-SHWE
Center for Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8506, Japan
TEL& FAX: +81(29)850-2334
E-mail: tin.tin.win.shwe@nies.go.jp

タミン受容体は、NR1 と NR2 のヘテロ 2 量体 2 セットからなる 4 つのサブユニットで構成されているとされている。NR2 サブユニットにはさらに NR2A, NR2B, NR2C, NR2D の 4 種類がクローニングされており、それぞれ生体内での発現部位や発現時期が異なる。たとえば、NR2D サブユニットは胎生期に選択的に発現するサブユニットであると考えられている。なお、NR2 サブユニットにグルタミン酸受容サイトがあると考えられている。近年、新たに NR3A, NR3B という二つのサブユニットがクローニングされたが、これらはグルタミン酸受容サイトを持たず、NR1 とヘテロ多量体を形成して陽イオンを通す、興奮性グリシン受容体として働くらしい。海馬は、空間的な学習と記憶機能に不可欠であり、その情報伝達は主としてグルタミン酸受容体を介して行われる (19-22)。空間学習能力とシナプスの可塑性の誘導には、海馬における NMDA 型グルタミン酸受容体 (NR2A ~ 2D, NR1, NR3A, 3B) が重要である (23, 24)。海馬の CA1 領域で NMDA 受容体の NR2 サブユニットを欠いているノックアウトマウスでは、モリス水迷路試験において大きく機能が損なわれることにより証明されている (23)。それゆえ、海馬における NMDA 受容体活性と NMDA の受容体に依存するシナプスの可塑性が、空間的な学習と記憶において重要であると考えられている (25)。マウスの空間認識記憶学習能力を調べるために、モリスの水迷路試験が用いられている。モリス水迷路試験は、水面下に隠れた踏み台を捜す過程の訓練習得トライアル、踏み台を取り去って観察する過程のプローブトライアル、踏み台を習得した場所と反対側において観察する過程のリバーストライアルで行われる。

DEP 曝露と嗅球・海馬

ディーゼル排気粒子のラット海馬内への投与が、実質組織の欠損とグリア細胞繊維性酸性タンパク質、チロシン水酸化酵素、およびアセチルコリン・エステラーゼなどの免疫反応性減少などの障害を引き起こしたことが報告されている (26)。また、培養グリア神経細胞を使用した研究では、DEP が小神経膠細胞を活性化し酸化ストレスを引き起こすことで、結果的にドーパミン神経毒性をもたらすことが報告されている (27)。以前我々は、カーボンブラックナノ粒子の点鼻投与が、マウスの嗅球における炎症性サイトカインをアップレギュレートすることを報告した (28)。Nerve growth factor (NGF) と brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を含むニューロトロフィンは、神経や免疫機能の重要な仲介であり、ニューロンの成長と維持、神経伝達物質と神経ペプチドの生産、および興奮性に働き (29)、またそれらは、学習、記憶、および行動に重要な役割を果たしている (30, 31)。マウスでは、DEP によって誘導されたアレルギーの気道応答にニューロトロフィンが一部仲介していることが報告されている (32)。

Nanoparticle-rich diesel exhaust (NRDE) 曝露と海馬

われわれは、ナノ粒子を含むディーゼル排気 (NRDE) とグラム陽性菌細胞壁構成成分 (リポタイコ酸, lipoteichoic acid; LTA) の併用により、雄マウスの海馬依存的な空間学習能力と記憶関連の遺伝子発現に影響を及ぼすことを示した (33)。その研究では、NRDE と LTA に曝露されたマウスは、モリス水迷路試験の隠されたプラットフォームに到達するまでの時間が長く、NMDA 受容体サブユニットと炎症性サイトカインの mRNA 発現がアップレギュレートされたことが明らかになった。また、その NRDE と LTA の併用がマウス嗅球でのグルタミン酸産生を誘導し、NMDA 受容体サブユニット、それと関連性があるキナーゼ、転写因子の発現を変化させ、神経毒性を引き起こす原因となることも報告した (34)。

われわれは、細菌感染なしの NRDE 吸入曝露が、炎症性サイトカインを誘導し神経性炎症を引き起こすという仮説を立てた。これらの炎症シグナルは、神経・免疫系、特にミクログリア細胞を活性化し、活性化されたミクログリア細胞が興奮性神経伝達物質 (例えば、グルタミン酸塩)、炎症性サイトカイン、および活性酸素種のような有害物質を分泌する可能性がある。過量のグルタミン酸塩は海馬で異常な NMDA 受容体活性化を引き起こし、これはまた、空間的な学習活動を損なう可能性がある。そこで、我々は、清浄空気を吸入させた対照群のほか、低濃度 NRDE (L-NRDE)、高濃度 NRDE (H-NRDE)、除粒子 (filtered diesel exhaust without particles; F-DE) 曝露群を設定し、NRDE の 3 カ月曝露が、動物の空間的学習能力と記憶関連遺伝子発現に及ぼす影響を検証した (35)。

空間的な学習能力への NRDE 曝露の影響として、すべてのグループで同様の水泳速度がみられたにもかかわらず、H-NRDE 曝露されたマウスは、隠されたプラットフォームに達するまでの時間が長く、曝露濃度依存的な空間的学習能力の低下が認められた ($P < 0.05$) (図 1A)。リバーストライアルのフェーズでは、プラットフォームを反対の四分円に動かし、訓練習得トライアルのように踏み台までの到達時間を記録した。H-NRDE 曝露されたマウスは、隠されたプラットフォームに達するまでに、対照群と比較して長い時間が必要であった (図 1B)。

雌マウスでの 3 カ月の高濃度 NRDE 曝露が空間的学習能力に影響し、海馬の NMDA 受容体サブユニット NR2A mRNA 発現レベルをアップレギュレートするのが明らかになった。以前の研究では、雄マウスでの高濃度 NRDE と細菌細胞壁構成成分 LTA の 1 カ月曝露は、海馬における NMDA 受容体サブユニットの発現レベルを増加し、空間的学習能力を低下させることを、初めて報告した (33)。しかしながら、NRDE の吸入曝露そのものが学習能力に影響するかどうかは、まだ不明である。したがって我々は、2 つの異なる濃度の NRDE 曝露群と除粒子群を用いて、雌マウスにおける、空間的学習能力と海馬の記憶関連遺伝子発現への影響を検討した。

図1 空間認識記憶学習能力 (A) 訓練習得トライアル, (B) リバーストライアル。Mean±SE (n=6) (* $P<0.05$ vs. clean air; + $P<0.05$ vs. L-NRDE; # $P<0.05$ vs. F-DE)。

前述の通り、海馬では、NMDA 受容体は空間的記憶学習行動に重要な役割を果たしている (22)。私たちの前回の研究では、雄マウスでの高濃度 NRDE と細菌細胞壁構成成分 LTA の 1 カ月曝露は海馬における NMDA 受容体の NR1 サブユニットの発現が NR2A と NR2B サブユニットに比べ、著しい増加を示した (32)。また、嗅球においても雄マウスでの高濃度 NRDE と細菌細胞壁構成成分 LTA の 1 カ月曝露が細胞外液グルタミン酸量と NR1, NR2A, および NR2B の mRNA 発現に影響を及ぼすことを明らかにした (33)。雌マウスの海馬における NR1 と NR2B の mRNA 発現レベルは、対照群に比べて NRDE を 3 カ月曝露されたグループで相違がなかった。しかしながら、NR2A mRNA の発現レベルは H-NRDE 群で増加した (図 2)。我々の結果は、曝露期間の違いがマウス脳への NRDE の効果に影響を及ぼす可能性を示している。いずれの NRDE 曝露においても calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) あるいは cAMP response element binding protein 1 (CREB1) mRNA 発現への変化は認

図2 マウス海馬における NMDA 受容体サブユニットの mRNA 発現への NRDE 曝露の影響: (A) NR1, (B) NR2A, (C) NR2B。Mean±SE (n=6) (* $P<0.05$ vs clean air)。

められなかった。それは NRDE 曝露後の NMDA の受容体関連のメモリ機能における、異なった情報伝達経路の起動によるものとも考えられる。

また、H-NRDE に 1 カ月曝露された雄マウスの海馬で炎症性サイトカイン tumor necrosis factor (TNF)- α の mRNA 発現の増加も認められた (32)。TNF- α は、グルタミン酸をアップレギュレートすることによってミクログリアからグルタミン酸放出を刺激する主要なサイトカインであり、その結果、興奮性神経毒性を引き起こす (36)。NRDE の 1 カ月曝露の研究では、TNF- α 発現レベ

図3 マウス海馬におけるニューロトロフィンの mRNA 発現への NRDE 曝露の影響: (A) NGF, (B) BDNF。Mean $\pm$ SE (n=6) (* P < 0.05 vs clean air)。

ルで変化は見られなかったが、CCL3 の発現は、L-NRDE 曝露によって有意に増加し、H-NRDE 曝露で増加する傾向が見られた。この結果は、NRDE の3カ月の曝露はマウス海馬で神経炎症を引き起こすことを示唆している。

ニューロトロフィンの研究では、NGF ではなく、BDNF の mRNA 発現レベルが H-NRDE と F-DE の曝露群で増加している (図3)。しかしながら、BDNF の mRNA 発現は、H-NRDE と F-DE の曝露群で相違は見られなかった。CO, SO₂, NO_x, NO₂, NO や CO₂ などのガスの成分は、H-NRDE と F-DE チャンバー内でほぼ同等だった。これは、BDNF 発現への影響がナノ粒子よりディーゼル排気ガス成分による可能性を示唆する。ガス成分の中でも、CO と NO は BDNF 発現を調節している可能性もある。酸化的ストレスマーカーであるヘム・オキシゲナーゼ 1 の最終産物の1つである CO が、ニューロンとグリア細胞の両方の可溶性グアニル酸シクラーゼ-プロテインキナーゼ経路を介して、BDNF と glia cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) 発現を調節するという報告がある (37)。外因性の NO に関しては不明な点が多いが、内因性の NO と BDNF は情報伝達経路を互いに増幅させることによ

り、海馬の CA1 領域の長期増強を仲介することが報告されている (38)。さらに、BDNF はグルタミン酸塩で仲介されたトランスマッションを機能アップし、NMDA 受容体を調節して、記憶を容易にし、樹状突起棘とシナプスの数を増加させることも示唆されている (39-44)。

おわりに

本研究では、神経伝達物質濃度には言及しなかったが、NRDE 曝露により興奮性アミノ酸 (特にグルタミン酸塩) が海馬の特定の NMDA 受容体サブユニットの異常活性化で仲介され、神経損傷を引き起こしながら空間的学習能力に影響することが示唆された。NMDA 受容体サブユニット NR2A とニューロトロフィン BDNF の mRNA 発現増加との関連性は、神経損傷への代償性反応から生じる可能性も考えられる。

謝 辞

本研究は、一部環境省の環境研究総合推進費 (C-0901) により実施された。

文 献

- (1) Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002;287:1132-1141.
- (2) Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*. 1993;329:1753-1759.
- (3) Kittelson DB, Watts WF, Johnson JP, Remerowski ML, Ische EE, Oberdörster G, Gelein RM, Elder A, Hopke PK, Kim E, Zhao W, Zhou L, Jeong CH. On-road exposure to highway aerosols. 1. Aerosol and gas measurements. *Inhal Toxicol*. 2004;16 Suppl 1:31-39.
- (4) Kittelson DB. On-road particles-Characteristics and measurement, International Workshop on Vehicle-related Nanoparticles and Environmental Health, 2007; February 2, Seoul, Korea, 47-71.
- (5) Ichinose T, Yajima Y, Nagashima M, Takenoshita S, Nagamachi Y, Sagai M. Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*. 1997;18:185-192.
- (6) Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Inoue K, Yoshida S, Takeda K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M. Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles. *Arch Toxicol*. 2002;76:146-151.
- (7) Fujimaki H, Yamamoto S, Kurokawa Y. Effect of diesel exhaust on immune responses in C57BL/6 mice intranasally immunized with pollen antigen. *J UOEH*. 2005;27:11-24.
- (8) Fujimaki H, Kurokawa Y, Yamamoto S, Satoh M. Distinct

- requirements for interleukin-6 in airway inflammation induced by diesel exhaust in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2006;28:703-714.
- (9) Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K, Sagai M. Effects of diesel exhaust particles on the male reproductive system in strains of mice with different aryl hydrocarbon receptor responsiveness. *J Reprod Dev.* 2007;53:1191-1197.
- (10) Li C, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G, Taya K. Estrogenic and anti-androgenic activities of 4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;217:1-6.
- (11) Li C, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Li X, Fujitani Y, Ito Y, Nakajima T, Suzuki AK. Effects of inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust on regulation of testicular function in adult male rats. *Inhal Toxicol.* 2009;21:803-811.
- (12) Ramdhan DH, Ito Y, Yanagiba Y, Yamagishi N, Hayashi Y, Li C, Taneda S, Suzuki AK, Watanabe G, Taya K, Kamijima M, Nakajima T. Nanoparticle-rich diesel exhaust may disrupt testosterone biosynthesis and metabolism via growth hormone. *Toxicol Lett.* 2009;191:103-108.
- (13) Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:20.
- (14) Suzuki T, Oshio S, Iwata M, Saburi H, Odagiri T, Udagawa T, Sugawara I, Umezawa M, Takeda K. In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:7.
- (15) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Effect of intratracheal instillation of ultrafine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;209:51-61.
- (16) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Ahmed S, Kakeyama M, Kobayashi T, Fujimaki H. Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Lett.* 2006;163:153-160.
- (17) Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;175:191-199.
- (18) Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 2003;111:455-460.
- (19) Tombaugh GC, Rowe WB, Chow AR, Michael TH, Rose GM. Theta-frequency synaptic potentiation in CA1 in vitro distinguishes cognitively impaired from unimpaired aged Fischer 344 rats. *J Neurosci.* 2002;22:9932-9940.
- (20) Foster TC. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;3:236-249.
- (21) Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem.* 1993;268:2836-2843.
- (22) Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 1986;319:774-776.
- (23) Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 1996;87:1327-1338.
- (24) Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RG. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature.* 1995;378:182-186.
- (25) Shi L, Adams MM, Long A, Carter CC, Bennett C, Sonntag WE, Nicolle MM, Robbins M, D'Agostino R, Brunso-Bechtold JK. Spatial learning and memory deficits after whole-brain irradiation are associated with changes in NMDA receptor subunits in the hippocampus. *Radiat Res.* 2006;166:892-899.
- (26) Andersson H, Lindqvist E, Westerholm R, Grägg K, Almén J, Olson L. Neurotoxic effects of fractionated diesel exhausts following microinjections in rat hippocampus and striatum. *Environ Res.* 1998;76:41-51.
- (27) Block ML, Wu X, Pei Z, Li G, Wang T, Qin L, Wilson B, Yang J, Hong JS, Veronesi B. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J.* 2004;18:1618-1620.
- (28) Win-Shwe TT, Mitsushima D, Yamamoto S, Fukushima A, Funabashi T, Kobayashi T, Fujimaki H. Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;226:192-198.
- (29) Olgart Höglund C, de Blay F, Oster JP, Duvernelle C, Kassel O, Pauli G, Frossard N. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur Respir J.* 2002;20:1110-1116.
- (30) Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci.* 2000;3:533-535.
- (31) Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 2003;112:257-269.
- (32) Farraj AK, Haykal-Coates N, Ledbetter AD, Evansky PA, Gavett SH. Inhibition of pan neurotrophin receptor p75 attenuates diesel particulate-induced enhancement of allergic airway responses in C57/B16J mice. *Inhal Toxicol.* 2006;18:483-491.
- (33) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, Fujimaki H. Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to

- nanoparticle-rich diesel exhaust. *Neurotoxicology*. 2008; 29:940-947.
- (34) Win-Shwe TT, Mitsushima D, Yamamoto S, Fujitani Y, Funabashi T, Hirano S, Fujimaki H. Extracellular glutamate level and NMDA receptor subunit expression in mouse olfactory bulb following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure. *Inhal Toxicol*. 2009;21:828-836.
- (35) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, Fujimaki H. Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice. *Nanotoxicology*. 2011; (doi: 10.3109/17435390.2011.590904).
- (36) Takeuchi H, Mizuno T, Zhang G, Wang J, Kawanokuchi J, Kuno R, Suzumura A. Neuritic beading induced by activated microglia is an early feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport. *J Biol Chem*. 2005;280:10444-10454.
- (37) Hung SY, Liou HC, Fu WM. The mechanism of heme oxygenase-1 action involved in the enhancement of neurotrophic factor expression. *Neuropharmacology*. 2010; 58:321-329.
- (38) Leßmann V, Stroh-Kaffei S, Steinbrecher V, Edelmann E, Brigadski T, Kilb W, Luhmann HJ. The expression mechanism of the residual LTP in the CA1 region of BDNF k.o. mice is insensitive to NO synthase inhibition. *Brain Res*. 2011;19:1391C:14-23.
- (39) Woolley CS. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav*. 1998;34:140-148.
- (40) Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*. 2003;10:86-98.
- (41) Adams MM, Fink SE, Janssen WG, Shah RA, Morrison JH. Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *J Comp Neurol*. 2004;474:419-426.
- (42) Luine VN. Steroid hormone modulation of hippocampal dependent spatial memory. *Stress*. 1997;2:21-36.
- (43) McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, Li C, Yuen G, Milner TA. Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:7093-7100.
- (44) Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem*. 2002;9:224-237.