皮膚細胞は独自に女性ホルモンを合成し、それが皮膚細胞の活動を制御している

東京大学大学院総合文化研究科

川戸　佳

We analyzed the local estrogen synthesis systems and estrogen receptors in female rat facial skin tissues. RT-PCR analysis revealed mRNA expressions of representative enzymes and receptors. We compared the skin steroidogenic enzymes/receptors with those of the brain hippocampus which also has the local estrogen synthesis systems and estrogen receptors. In the hippocampus, a center for learning and memory, locally synthesized estrogen plays a crucial role in modulating memory-related synaptic plasticity. Locally synthesized estrogen could also play a significant role in female facial skin condition in addition to plasma estrogen.

1．緒　言

女性の顔の肌のつやつや感を保つには、女性ホルモンであるエストラジオールE2が重要であることは、よく知られている。生理サイクルと顔の肌の状態には密接な関係があり、エストラジオールは肌の最表層の角層の水分を保持し肌の潤いを保つ[1−3]。また、真皮層のコラーゲンやエラスチンの合成を促進して、肌のハリを保ち、シワやタルミを予防する働きがある。本研究では、顔の皮膚細胞が女性ホルモンを独自に合成し、それが皮膚細胞の活動度維持に役立っているという、新しい現象を見出した。

これまでの常識では、卵巣が合成して血中に分泌するエストラジオールとプロゲステロンが皮膚細胞の状態を制御していると思われていた。本研究では、皮膚組織の中に、性ホルモンの合成系の、「コレステロール→[P450scc]→プレグネノロンまたはプロゲステロン→［P450（17α)］→DHEAまたはアンドロステンジオン→[17β-HSD（1, 3)，P450arom]→テストステロン、エストロン、エストラジオール」が存在することを見出すことを目指す（図1)。皮膚細胞が合成する基底量に加えて、血中からくるエストラジオールが上乗せされると予測している。

もう1つの女性ホルモン、プロゲステロンは皮脂の分泌を促進する。皮脂の分泌が過剰になるとニキビの原因になる。このように、女性ホルモンは肌の状態に大きな影響を与え、例えば、エストラジオールがたくさん分泌される時期、つまり、生理が終わってから排卵までの間は、肌にとっては安定した良い時期で、この時期は肌の調子がよく、化粧品ののりが良い。エストラジオール受容体も検出してほかの組織と比較する。最近の化粧品には、肌の状態をよくするために植物エストロゲンなども（イソフラボンなど）使用されているが、皮膚細胞がエストラジオールを合成するのであれば、その基質DHEAなどを含む、肌にやさしい化粧品なども考案できる。

ELocally synthesized steroids in facial skin modulate skin functions

Suguru Kawato

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

2．実　験

2. 1. 実験の方針

メスラットを用いて、顔の皮膚組織を用いて、性ホルモンの合成系を解析する。図1に示した系があると考え、合成酵素のmRNAをPCR法で検出する。卵巣の1/200 −

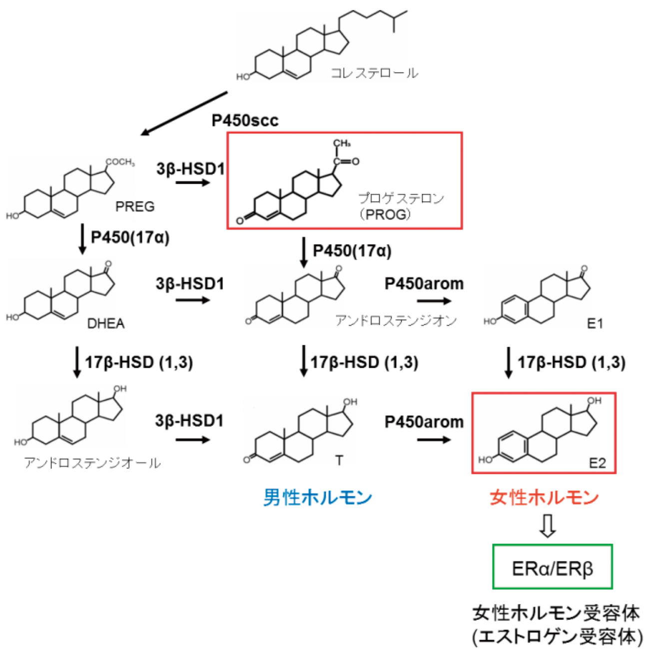


図1　本研究において解析した皮膚における女性ホルモン局所合成経路とその作用経路。川戸研究室の先行研究により、海馬においては、コレステロールから男性ホルモン・女性ホルモンに至る完全な局所合成系が存在し、作用サイトである女性ホルモン受容体や男性ホルモン受容体が神経細胞に局在することが証明されている[4−6]。

1/1000くらいのmRNAが発現していると予想するが、川戸研究室は、この微小量のmRNAの検出が得意である。それは、2000年頃から進めている、記憶中枢の脳海馬での局所的な男性・女性ホルモン合成の研究を行う過程で、技術力を磨いたからである。これはprimer設計を熱力学の自由エネルギー計算を用いて新たに行い、選択性や結合性を改良して、感度を過去の1000倍にした。これによって卵巣の1/200 − 1/1000くらいのmRNAが発現も検出できる。mRNAがこれくらい少なくても、局所の皮膚組織内で作用するのであれば、小さな皮膚組織の体積を総血管体積（ラットで25mL）の1/100 − 1/1000くらいとすると、十分な濃度のエストラジオールが供給できるはずである。ちなみに脳海馬の体積は0.1mLくらいで血管体積の1/250くらいである。エストラジオールが作用する受容体 ERα, ERβも解析する。

質量分析で局所エストラジオール濃度を分析し、血中と比較して、十分な濃度があるのかどうかを検査する。

2. 2. 実験動物

実験動物には、12週齢のメスWistarラットを用いた。実験動物は室温25℃、照明は午前8時に照らし、明暗周期を12時間（午前8時照明点灯、午後8時消灯）の状態で飼育した。餌として固形ペレットを与え、実験動物が餌・水ともに自由に得られる飼育環境にした。実験はすべて東京大学動物実験委員会の承認を得たうえで遂行した。

2. 3. total RNAの抽出

ラットを麻酔下で断頭後、顔の皮膚・卵巣・海馬を氷冷した人工脳脊髄液（pH 7.4, 290 mOsm）中で取り出し、直ちに液体窒素で凍結した。Total RNAの抽出にはSV Total Isolation System（Promega, USA）を用いた。抽出したTotal RNAはRecombinant DNase I（RNase-free DNase I; Takara, Japan）処理を行い、genome DNAの混入を防いだ。タンパク質を除去したのちに260 nmの吸光度を測定してRNA濃度を求めた。

2. 4. RT-PCR法

顔の皮膚や脳の海馬のような局所ステロイド合成系では、ステロイド合成酵素や受容体の発現は非常に少ない。内分泌組織（卵巣・精巣・副腎皮質）と比べて1/300−1/5000くらいと微量である。この場合過去の論文のプライマーを使用していては検出できない。新しくプライマーを特別に設計しないと、正確な発現量は定量出来ない。熱力学的フリーエネルギーΔGがハイブリダイゼーション部位の平均より更に負の値をとるように、コンピュータで計算して設計することで、この問題を解決した[4, 6]。

Total RNA はoligo（dT）プライマーを用いて逆転写反応を行い、一本鎖のcDNAを合成した。反応液（25μL）の組成：totalRNA 10μg, 1x RT buffer, 1 mM dNTP mixture, oligo（dT）15（Promega）2 μg, RNasin Plus（Promega）40U, RTase（Toyobo, Japan）200U。これらを42℃で60分反応させ、cDNAを合成し、75℃で15分間処理して反応を停止させた。cDNA溶液は4U RNase H（Takara bio, Japan）処理を行い、残ったRNAを分解した。得られたcDNA溶液は使用まで−20℃に保存する。

PCR反応液（25 μL）の組成：cDNA（toltal RNA 換算で0.1−200 ng）、1x PCR buffer, 0.2 mM dNTP mixture, 0.2 μMプライマー（forward and reverse）、Blend Taq polymerase 0.63 U（Toyobo, Japan）。PCRは3ステップで行い、その増幅プロトコルは95℃、5分（変性）→［95℃、30秒（変性）→Ta（58 ～ 68）℃、20秒（アニーリング）→72℃、30秒（伸長）］×サイクル数→72℃、5分（伸長）であった。標的名、プライマー配列、サイクル数、アニーリング温度（Ta）といった条件は表1に示した。

PCR産物を2％ アガロースゲルで電気泳動して分離し、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。紫外線を照射し

表1　本研究で用いたPCRの各条件

Gene	Direction	Primer Sequence（5' to 3'）	Product Length（bp）	Ta（℃）	cDNA（ng） 卵巣	皮膚	海馬	PCR cycles
Esr1	Forward	GCCGGCTGCGCAAGTGTTACG	467	68	1	100	100	29
	Reverse	GGAGCGCCAGACCAGACCAATCA						
Esr2	Forward	GCAAACCAGGAGGCAGAAAGTAGC	591	60	0.1	100	50	36
	Reverse	AAGTGGGCAAGGAGACAGAAAGTAAGTA						
Cyp19	Forward	CTGATCATGGGCCTCCTCCTG	276	58	0.1	200	10	40
	Reverse	CCCACGCTTGCTGCCGAATCT						
Hsd17b1	Forward	ACTCCGGGCGTGTGCTGGTGA	517	65	1	100	100	30
	Reverse	GGCGTGTCTGGATCCCCTGAAACTT						
Hsd17b3	Forward	CTCCCCAACCTGCTCCCAAGTCATTT	408	65	1	100	50	38
	Reverse	AGCAAGGCAGCCACAGGTTTCAGC						
Gapdh	Forward	TATGACTCTACCCACGGCAAGTTCAA	830	60	10	10	10	23
	Reverse	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCATATTCAT						

て各PCR産物のバンドから発する蛍光輝度をImage J で解析し、発現量の定量に用いた。PCRサイクル数を横軸に、輝度を縦軸にプロットした増幅曲線を作成し、輝度の対数が線形に増加するサイクル数の範囲(指数増幅期)の中から定量の際に用いたPCRのサイクル数を決定した。例えば、ERα (Esr1) の場合、指数増幅期は26～30サイクルであるので、解析には29サイクルで増幅した試料を用いた。

異なる組織（卵巣・皮膚・海馬）間での標的遺伝子発現量の比較は、内部標準遺伝子であるglycerol dehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（バンドの輝度）で標的遺伝子の発現量を割り算して規格化することで行った。GAPDHについても増幅曲線を作成し、23サイクルで増幅した試料を規格化に使用した。

2. 5. DNA シークエンス

観測したPCR産物が本当に標的遺伝子産物であるかどうかをDNAシークエンスから確認した。電気泳動後のPCR産物をWizard SV Gel と PCR Clean-up System（Promega）を用いてアガロースゲルから抽出し、pGEM-T-Easy vectors（Promega）に組み込む。このベクターをBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて反応させ、蛍光をABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems)で測定してDNA配列を決定した。

2. 6. 質量分析LC-MS/MSによる女性ホルモン濃度の測定

異なる性周期ステージ（卵胞期 : proestrus、排卵期 : estrus、黄体期1 : diestrus 1、黄体期2 : diestrus 2)のメス、卵巣摘出したメス(OVX)を用いた。

同じ個体由来の血漿と海馬を採取し、(1)血漿と(2)海馬から抽出・精製した各ステロイドを質量分析の試料とした。麻酔下で断頭したラットから採取した血液を遠心（1,900 xg、4℃、10分間）して上清の血漿を試験管に分取し、液体窒素で急速凍結後－30℃で保存した。血液の採取と並行して95% O_2 / 5% CO_2 混合ガスで十分にバブリングした緩衝液中で海馬の摘出を行った。

海馬1対あたり4mLの緩衝液を加えた。ホモジナイザーを用いて氷冷しながら穏やかにホモジナイズし、ホモジネートの2倍量のステロイド抽出液（ヘキサン : 酢酸エチル ＝ 2 : 3の混合溶液）を加え10分間撹拌した後、遠心分離(2,500 xg、室温、10分間)して有機層に溶出したステロイドを回収した。溶媒を完全に蒸発させ、C_{18} カラム溶出用溶液（メタノール : DDW ＝ 40 : 60）1mLに再溶し、C_{18} Amprep minicolumns（Amersham）を用いて、脂質等の夾雑物を除いた。C_{18} カラム精製後、HPLCを用いて定量するステロイド毎に分画した。固定相にはシリカゲルの充填された順相シリカゲルカラム（0.46×15 cm, Cosmosil 5SL（Nacalai Tesque Inc.)）を、移動相にはヘキサン、イソプロパノール、酢酸の混合液を用いた。

E2, E1, Tについては質量分析器に導入時のイオン化効率を高め、検出感度を向上するために誘導体化を行った。E1とTについてはpicolinoyl誘導体化を、E2についてはpicolinoylに加えて、pentafluorobenzylでも誘導体化を行った。各ステロイド（誘導体）の構造と、LC-MS/MSの衝突部における開裂パターン・m/z値変化を図2に示した。

ステロイド(または誘導体化したステロイド)試料をトリプルステージ四重極型質量分析計に導入する。第1質量分

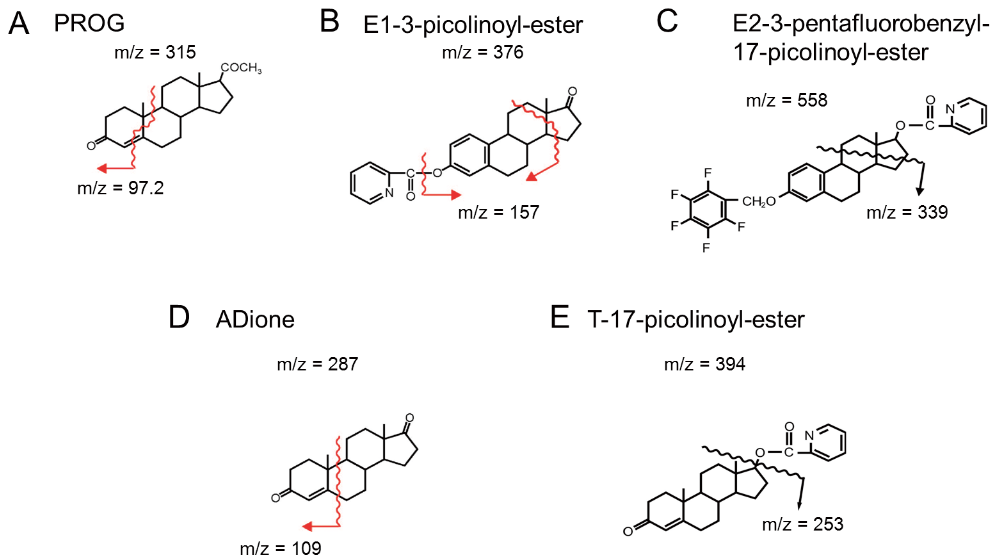


図２　本研究において定量したステロイドとその誘導体。各ステロイドは波線の部分で開裂し、娘イオンを生じる。この娘イオンの信号強度から各ステロイドの量を決定した。

析で親イオンが選択されて通過する（例えば、E2 誘導体なら m/z ＝ 558）。次に窒素ガスとの衝突により誘導体が開裂し、断片化した娘イオン（E2 誘導体なら m/z ＝ 339）が第 2 質量分析で検出される。標準溶液を用いて予め作成しておいた検量線と、観測された娘イオンの信号強度を比較して、各ステロイドを定量した。

3．結　果

3. 1.　17β-HSD（type 1, 3）（遺伝子は *Hsd17b1*, *Hsd17b3*）の発現解析

17β-ハイドロキシ-ステロイド-脱水素酵素（17β-HSD）は、エストロン（E1）→エストラジオール（E2）、DHEA→アンドロステンジオール、アンドロステンジオン→テストステロン（T）への変換、を担う酵素である。ステロイドの 17β 水酸化反応を行う。女性ステロイドホルモン合成系の中で重要な酵素である。14 種存在する 17β-HSD のサブタイプのうち、17β-HSD type1、type 3 は順方向の代謝を行い、type 2，type 4 は逆方向の代謝を行う。本研究では、テストステロン・エストラジオールの合成に重要な 17β-HSD（1、3）の発現解析を行った。

17β-HSD1 の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、PCR 産物は 28 ～ 34 サイクル間で指数増幅し 36 サイクルから飽和状態に達した。PCR は指数増幅期の 30 サイクルで行い、顔の皮膚・海馬・卵巣の発現量を比較した（図 3）。顔の皮膚における 17β-HSD1 の発現量は海馬とは同程度であり、卵巣の約 1/100 であった。

17β-HSD3 の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、PCR 産物は 32 ～ 40 サイクル間で指数増幅し 42 サイクルから飽和状態に達した。PCR は指数増幅期の 38 サイクルで行い、卵巣・顔の皮膚・海馬の発現量を比較した（図 3）。皮膚における 17β-HSD3 の発現量は海馬の 2/3 で、卵巣の約 1/60 であった。

3. 2.　シトクロム P450aromatase（遺伝子は *Cyp19*）の発現解析

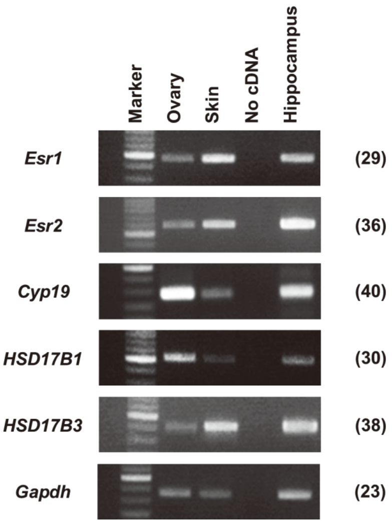
P450arom は、アンドロステンジオン→エストロン、テストステロン（T）→エストラジオール（E2）の変換を行う酵素であり、エストラジオール合成において最も重要な酵素である。

P450arom の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、36 ～ 42 サイクル間で指数増幅し、44 サイクルから飽和状態に達した。PCR は指数増幅期の 40 サイクルで行い、顔の皮膚・海馬・卵巣の発現量を比較した（図 3）。皮膚での発現量は低く、海馬の 1/50 ～ 1/100 であった。卵巣の約 1/20000 であった。

3. 3.　ERα, ERβ（遺伝子は *Esr1, Esr2*）の発現解析

エストロゲン受容体（ER）は、エストラジオールをリガンドとする受容体で α 型（ERα）、β 型（ERβ）の 2 種類が存在している。両者の DNA 結合領域、リガンド結合領域は類似しているが、N 末端の転写調節領域が異なるため、作用様式が異なっている。

ERα（*Esr1*）の PCR 産物量の増幅解析を行った結果、26 ～ 30 サイクル間で指数増幅し、32 サイクルから飽和状



Gene Name	Relative Gene Expression		
	ovary	face skin	Hippo-campus
Esr1	20	2	1
Esr2	8	1/4	1
Cyp19	400	1/50	1
HSD17B1	100	1	1
HSD17B3	60	2/3	1

図 3　メスラットの卵巣・顔の皮膚・海馬におけるステロイド合成酵素と受容体の発現解析。（左）各遺伝子の cDNA の PCR 産物を電気泳動したゲルイメージ。（　）内は解析に用いた PCR のサイクル数。卵巣・皮膚・海馬で流した cDNA 濃度は異なるので、規格化した比較は右の表が正しい。（右）卵巣・皮膚・海馬におけるステロイド合成酵素と受容体の発現量の比。Gapdh で規格化したのち、海馬を 1 として比較した。皮膚は、女性ホルモン前駆体の合成系は海馬と同程度存在するが、女性ホルモンへの変換能は弱そうである。受容体は十分な量発現している。

態に達した。PCRは指数増幅期の29サイクルで行い、卵巣・顔の皮膚・海馬の発現量を比較した。皮膚におけるERαの発現量は海馬の2倍であり、卵巣の1/10、であった。比較的多いといえる。

ERβのPCR産物量の増幅解析を行った結果、33～37サイクル間で指数増幅し、39サイクルから飽和状態に達した。PCRは指数増幅期の36サイクルで行い、顔の皮膚・海馬・卵巣の発現量を比較した。皮膚における*Esr2*の発現量は海馬の1/4であり、卵巣の約1/320であった。このことから、皮膚で発現するエストロゲン受容体のタイプは、主に*Esr1*であることがわかった。

3. 4. 海馬と血中におけるエストラジオールとプレグネノロンの濃度

女性ホルモンの一種であるプレグネノロンPROGは、女性ステロイドの合成における前駆体である。親イオンのm/z値は315、フラグメント化した娘イオンのm/z値は97.2であった。PROG濃度は、海馬内ではProestrus : 55.7 nM（n = 4）、Estrus : 40.7 nM（n = 4）、Diestrus 1 : 87.0 nM（n = 3）、Diestrus 2 : 48.0 nM（n = 4）、OVX : 24.5 nM（n = 5）であった。一方、血漿ではProestrus : 20.5 nM（n = 4）、Estrus : 16.7 nM（n = 4）、Diestrus 1 : 51.6 nM（n = 3）、Diestrus 2 : 24.1 nM（n = 4）、OVX : 10.1 nM（n = 5）であった。これらを川戸研の研究[7]のオスのデータも入れてまとめたものが図4である。どの群においても、メスの海馬内濃度は血漿の2倍程度である。ここで、体積から考えて、血漿濃度は全血中濃度の約2倍と考えてよい。

E2の親イオンのm/z値は558、フラグメント化した娘イオンのm/z値は339であった（図2）。E2濃度は、海馬内ではProestrus : 4.3 nM（n = 6）、Estrus : 1.0 nM（n = 4）、Diestrus 1 : 0.51 nM（n = 3）、Diestrus 2 : 0.7 nM（n = 4）、OVX : 0.7 nM（n = 4）、であった。一方、血漿ではProestrus : 0.111 nM（n = 6）、Estrus : 0.017 nM（n = 6）、Diestrus 1 : 0.009 nM（n = 5）、Diestrus 2 : 0.029 nM（n = 6）、OVX : 0.005 nM（n = 5）であった。これらを[7]から得られたオスのデータも入れてまとめたものが図4である。海馬内濃度は血漿濃度の10～100倍程度という非常に高い濃度であった。E2の血漿濃度は低すぎてグラフのスケールでは見えない。

4. 考　察

本研究では、メスラットの顔の皮膚におけるステロイドホルモンの局所合成系・作用系に関わる分子の発現解析を行った。川戸研の研究で良くわかってきている、海馬の局所合成系との発現量比較を行い、顔の皮膚における局所合成系と作用系の意義を考察する。

4. 1. 顔の皮膚におけるエストラジオールE2の局所合成とその意義

海馬で得られたE2合成酵素の発現量とE2局所濃度のデータを用いると、顔の皮膚におけるE2合成酵素の発現量のデータから、皮膚のE2濃度を推定することができる。その生理的意義も考察する。

4.1.1. 顔の皮膚におけるエストラジオールの前駆体の合成系

メスにおける性ホルモンの局所合成において、主な前駆体はPROGである。血中のPROG濃度は性周期に伴って変動し、20～50 nMと十分な量が供給される。海馬では

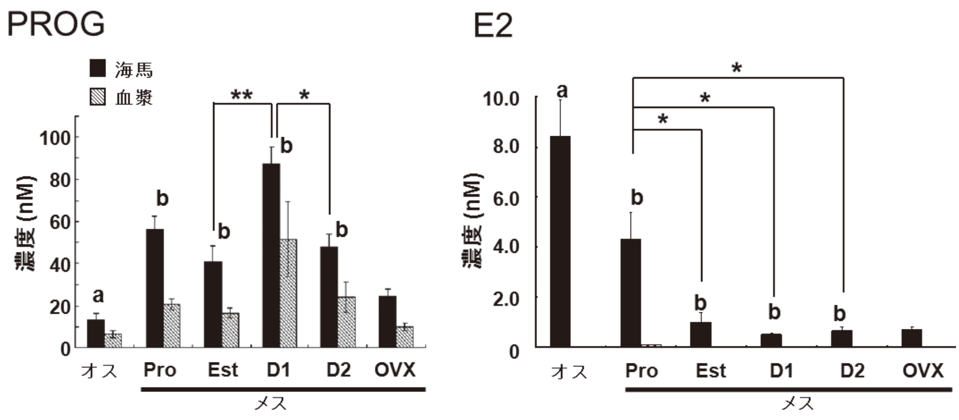


図4　メスラット脳海馬における、性周期ステージにおけるPROG, E2の濃度変動を質量分析により測定したもの。PROGは局所合成系において、E2をはじめとする性ホルモンの前駆体となる。濃度が海馬E2 >> 血中E2であることから、海馬では血中のE2は低濃度過ぎて寄与出来なくて、海馬におけるE2はほぼすべてPROGを前駆体として海馬内で局所合成されることがわかる。Pro: 卵胞期、Est: 排卵期、D1：黄体期1、D2：黄体期2。*p<0.05, **p<0.01。a, bは、オスとメスを比較して有意差 (p<0.05) がある[5]。mRNAの発現を比較すると、皮膚においても同様の局所合成が起こっていることが示唆される。

これに海馬自身が合成したPROGが加算されて、そこから、エストロンE1→E2（アンドロステンジオン→テストステロンも）を合成している。PROGよりも下流の局所合成された海馬ステロイドの濃度は血中濃度よりもずっと高い。本研究のｍRNA発現の結果から、皮膚でも同様の現象が起きていることが予想される。

女性ホルモン合成酵素の途中に位置する17β-HSD（type 1, 3）の皮膚における発現量は、卵巣の1/100であるが、海馬とは同程度であり、局所合成系としては比較的高かった。従って17β-HSD（type 1, 3）は十分な量のE2前駆体の合成を行っていると推測できる。海馬においては、メスで2nM 程度のアンドロステンジオンの産生を見出している[5, 7-9]ので、皮膚においてもE2前駆体が、やはり、1～2 nM程度の局所濃度を持つことが予想できる。血中のアンドロステンジオンの最大値は、高々0.4nMであり、局所合成系で合成されたアンドロステンジオンが皮膚におけるE2合成の前駆体となっていると考えられる。

また、17β-HSD（type 1, 3）は、E1をE2に変換する経路も触媒するので、アンドロステンジオンがE1に変換された場合には、速やかにそれをE2にしているものと考えられる。

4. 1. 2. 顔の皮膚におけるエストラジオールの合成系とその意義

脳海馬のE2局所濃度は、卵胞期で最大値4.3 nM（血漿は0.1nM)を取り、他は0.5～1.0nM程度である(この時の血漿濃度は0.01 nM)。しかし、いずれのステージでも血漿のE2の最大濃度0.1 nMよりも高い値であり、海馬では局所合成されたE2が生理作用を担っている。

顔の皮膚において、女性ホルモンE2 またはE1 を合成する酵素P450 aromataseの発現量は海馬と比較して低かった。その発現量は、海馬の1/50程度である。しかし、これだけの発現量があれば、例えば、卵胞期における局所濃度の推定値は$4.3 \times 1/50 = 0.08$ nM となり、血中とほぼ同程度の合成が行われていると推測される。よって、血中から供給されるE2に顔の皮膚自身の合成したE2が上乗せされて、十分な発現量を持つ皮膚ERαに結合し、顔の皮膚の状態を改善する効果を発揮しているであろう。

4. 2. 皮膚におけるエストラジオールE2の作用系

女性ホルモンE2は皮膚水分・コラーゲン合成・ヒアルロン酸増加といった生理作用を及ぼし、皮膚の状態を改善する[1-3]。このE2の作用サイトの候補として、ERα、ERβの二つがある。本研究で、顔の皮膚において女性ホルモン受容体であるERαは、卵巣の1/10という十分に高い発現量であることが分かった。これに対して、ERβの発現量は卵巣の約1/300であった。このことから、顔の皮膚において女性ホルモンは、主にERαを介して生理作用を十分に発揮していると考えられる。

海馬においては、E2がERα、ERβを介してシナプス可塑性の変化や樹状突起スパイン(シナプス後部)密度の増加などを引き起こす[10, 11]。本研究において、顔の皮膚におけるERα、ERβの発現量は海馬と同程度であることから、ERは、生理作用を引き起こすのに十分な量だけ発現している。

5. 総　括

(1) メスラット顔の皮膚において、女性ホルモンの局所合成系が存在することを明らかにした。エストラジオールE2合成系の酵素、及び、その受容体ERα、ERβは、脳の海馬と同程度のレベルで発現していた。

(2)顔の皮膚におけるE2局所濃度は、血中とほぼ同程度と推測される。これは海馬と血中におけるE2濃度の質量分析結果を用いて、局所合成系mRNAの発現レベルを比較して推測した。顔の皮膚で合成されるE2と血中から来るE2が合流して、ERα、ERβに結合して、皮膚の状態を改善していることが示唆される。

(3)海馬での局所合成能(mRNA発現)は性周期によらなかったので[5]、顔の皮膚でも局所合成能が一定だと仮定すると、卵巣からくるPROGとE2の性周期変動によって、顔の皮膚でのE2の性周期変動が作り出されるのではないか。

(References)

1）Ashcroft, G.S., et al., *Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response*, in *Am J Pathol*. 1999: United States. p. 1137-46.

2）Dunn, L.B., et al., *Does estrogen prevent skin aging? Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I)*. Arch Dermatol, 1997. **133** (3): p. 339-42.

3）Hall, G.K. and T.J. Phillips, *Skin and hormone therapy*, in *Clin Obstet Gynecol*. 2004: United States. p. 437-49.

4）Hojo, Y., et al., *Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101** (3): p. 865-70.

5）Kato, A., et al., *Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines*. Front Neural Circuits, 2013. **7**: p. 149.

6）Kimoto, T., et al., *Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in* *the male rat hippocampus*. Endocrinology, 2010. **151** (12): p. 5795-806.

7）Hojo, Y., et al., *Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus*. Endocrinology, 2009. **150** (11): p. 5106-12.

8）Hojo, Y., et al., *Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 43.

9）Mukai, H., et al., *Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis*. Cereb Cortex, 2011. **21** (12): p. 2704-11.

10）Mukai, H., et al., *Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons*. J Neurochem, 2007. **100** (4): p. 950-67.

11）Ooishi, Y., et al., *Estradiol rapidly rescues synaptic transmission from corticosterone-induced suppression via synaptic/extranuclear steroid receptors in the hippocampus*. Cereb Cortex, 2012. **22** (4): p. 926-36.