

日本解剖学会

第88回近畿支部学術集会

会期：平成24年12月1日（土）

会場：神戸大学瀧川記念学術交流会館大会議室

1 ラット上行結腸腸陰窩における常在細菌の増殖に対する生体防御に関する研究

万谷洋平, 高原英一郎, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

神戸大院・農学研究科・応用動物学講座

【目的】ラットの上行結腸の腸陰窩における常在細菌の増殖に対する上皮細胞の細胞増殖の変化を定量組織化学的に調べた。【材料と方法】7週齢のWistar系ラット10匹の上行結腸の凍結切片を作製し、Hematoxylin-eosin染色により組織学的に観察するとともに、Toll-like receptor (TLR)-2, -4, -9 および Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対する抗体を用いた酵素抗体間接法により観察した。【結果】上行結腸の腸間膜付着部粘膜炎(MAM)では、腸間膜非付着部粘膜炎(MNM)に比べて腸表面上皮細胞の表面に常在細菌が頻りに接着しており、MAMではMNMに比べて常在細菌の存在する腸陰窩が有意に高頻度でみとめられた。さらに、MAMの常在細菌の存在する腸陰窩では、常在細菌の存在しない腸陰窩に比べて腸陰窩を構成する円柱上皮細胞数が有意に多かったが、杯細胞数は同様であった。一方、MAMの常在細菌の存在する腸陰窩では、常在細菌の存在しない腸陰窩に比べてPCNA陽性円柱上皮細胞およびPCNA陽性杯細胞がともに有意に多かった。また、TLR-2, -4 および-9は腸表面上皮細胞の線条縁で陽性を示し、その陽性強度はMAMではMNMに比べて弱かった。【結論】ラットの上行結腸における常在細菌の優先的な定着部位はMAMの腸表面上皮であることが明らかになるとともに、MAMの腸表面上皮におけるTLRの低発現が、常在細菌の定着に貢献している可能性が考えられた。さらに常在細菌の増殖に対する生体防御の一つとしてMAMの腸陰窩では常在細菌の増殖時に上皮細胞の増殖促進が誘導されることがあきらかとなった。

2 ラット十二指腸粘膜上皮におけるMyeloid differentiation factor-2とToll-like receptor-2の発現に関する免疫組織化学的研究

横山真丈, 万谷洋平, 高原英一郎, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩

神戸大院・農学研究科・応用動物学講座

【目的】ラット十二指腸の粘膜上皮におけるMyeloid differentiation factor (MD)-2とToll-like receptor (TLR)-2の発現について免疫組織化学的に検討した。【材料と方法】7週齢のWistar系ラット5匹の十二指腸を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、凍結切片を作製し、MD-2およびTLR-2に対する抗体を用いた酵素抗体間接法によりこれらの局在を比較検討した。【結果】MD-2およびTLR-2ともに腸陰窩底部ないし中部から腸絨毛頂部の線条縁で陽性を示した。MD-2の陽性は腸陰窩中部から腸絨毛基部にかけて強くなり、腸絨毛頂部までは同程度であったのに対して、TLR-2は腸陰窩中部から腸絨毛頂部に向かうにつれて強くなった。また、腸絨毛の先端を除く部位ではMD-2およびTLR-2ともに陽性強度が運動して変動した。腸絨毛の先端ではMD-2陰性を示す上皮細胞が稀にみとめられたのに対して、TLR-2陰性を示す上皮細胞は頻りにみとめられた。加えて腸絨毛先端ではMD-2およびTLR-2ともに上皮細胞の細胞質に小胞状の陽性がみとめられた。【結論】ラット十二指腸の絨毛円柱上皮細胞では、MD-2はTLR-2と複合体を形成していることが免疫組織化学的に示唆されるとともに、MD-2が他の膜蛋白質とも複合体を形成している可能性が示唆された。

3 ラット肝臓における補体C3およびC4の産生に関する免疫組織化学的研究

又吉 緑, 万谷洋平, 高原英一郎, 河野潤一, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩
神戸大院・農学研究科・応用動物学講座

【目的】消化器系における補体の分泌部位を特定する研究の一環として、肝臓における補体の局在を免疫組織化学的に明らかにすることを目的とした。【材料と方法】7週齢のラットの肝臓を4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、定法に従って凍結切片を作製してC3およびC4に対する抗体を用いた酵素抗体間接法により免疫組織化学的に精査した。【結果】肝臓内の小葉間動脈、類洞や中心静脈等の内腔にC3およびC4の陽性がみられたが、さらに強い陽性が類洞周囲腔にみとめられた。類洞周囲腔のC3の陽性強度は中間帯付近から小葉辺縁性に強くなるとともに、小葉間結合組織およびリンパ管内腔に強い陽性がみとめられた。C3については類洞周囲腔直下の肝細胞の細胞質に微細顆粒状の陽性がみとめられた。これに対して、C4の陽性については主に小葉中間帯付近に散在して類洞周囲腔並びにその直下の肝細胞の細胞質に微細顆粒状の陽性がみとめられ、さらに中心静脈周囲の肝細胞の細胞質や結合組織にやや弱い陽性がみとめられた。小葉間結合組織には陽性がみとめられたが、リンパ管内腔には殆どみられなかった。また、毛細血管や小葉間胆管等はC3およびC4ともに陰性であった。【結論】肝臓における補体の産生部位が特定され、消化管内へは分泌されないことが示唆された。また、肝細胞で産生されたC3が結合組織内に拡散した後、リンパ管に流入し、全身循環へ向かうことが示唆されたが、C4の全身循環への移行経路については現在検討中である。

4 ラット空腸腸絨毛の毛細血管内皮における乳ビ球に対する受容体に関する免疫組織化学的研究

高原英一郎, 万谷洋平, 横山真丈, 又吉 緑, 横山俊史, 星 信彦, 北川 浩
神戸大院・農学研究科・応用動物学講座

【目的】ラットの空腸腸絨毛では、直径75nm以下の小型の乳ビ球が中心リンパ管のみならず、上皮直下の毛細血管からも吸収されることが超微形態学的に明らかになるとともに、毛細血管内皮の通過には受容体が介在することが推察されている。そこで本研究では毛細血管内皮における乳ビ球に対する受容体を免疫組織化学的に明らかにすることを目的とした。【材料と方法】7週齢のラットを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、定法に従って空腸の凍結切片を作製した後、VLDL受容体とLDL受容体に対する抗体を用いた酵素抗体間接法により精査した。【結果】乳ビ球の産生が盛んな腸絨毛先端では多くの毛細血管に内皮にVLDL受容体陽性を示したが、乳ビ球の産生が不活発な腸絨毛では同受容体の陽性反応がほとんどみられなかった。これに対してLDL受容体は乳ビ球の産生量に関わらず腸絨毛先端の毛細血管内皮は陰性であった。【結論】ラットの空腸腸絨毛先端では、乳ビ球の輸送時に毛細血管の内皮細胞にVLDL受容体が発現し、この受容体によって小型の乳ビ球が毛細血管内腔へトランスサイトシスされることが示唆された。

5 ラットとマウス胃の無腺部-噴門部境界領域の粘膜上皮に発現するEphBとephrin-B

小川和重, 佐伯法学, 林 裕大, 石井万幾
大阪府立大 生命環境・獣医解剖

【背景と目的】我々は、胃の無腺部-噴門部境界領域の粘膜上皮は境界から離れた領域と比較してEphB2とephrin-B1の発現性状が異なり、無腺部粘膜上皮では(1)境界をピークに境界から離れるとEphB2発現強度が減弱すること、(2)ephrin-B1発現強度は境界に近づくにつれて減弱することを明らかにした。本研究では、免疫染色で境界領域の上皮の特性を詳細に調べるとともに、無腺部粘膜を材料にKeratinocyte (KT)の初代培養を行い、EphB/ephrin-Bシグナルが細胞の増殖性・運動性に及ぼす影響を検討した。【材料と方法】ICRマウスとWistarラットの胃を材料にCytokeratin 6 (CK6)、Cytokeratin 7 (CK7)、Ki67、EphB2、ephrin-B1抗体を使用して免疫染色を行った。UEA-Iレクチンを表在部粘液細胞の同定に使用した。ラットのKTを材料に、EphB/ephrin-Bシグナルが細胞の増殖性と運動性に及ぼす影響をMTT assayとScratch assayにより検討した。【結果と考察】免疫染色の結果、境界領域の粘膜上皮細胞は噴門部側でCK7陽性、無腺部側でCK6陽性を示し、離れた領域の相同細胞と比較して免疫染色性が異なっていた。噴門部側の境界領域の粘膜上皮細胞は、ラットではUEA-I陰性・Ki67陽性、マウスではUEA-I陽性・Ki67陰性で、差違が認められた。可溶性レセプターEphB2-Fcでephrin-Bを活性化するとKTの増殖性は低下し、また、ephrin-B1-FcでEphBを活性化するとKTの運動性が低下した。以上の結果から、境界領域に発生すると想定されるEphB2/ephrin-B1シグナルは、噴門部-無腺部上皮の境界形成に関与する可能性が高いことが示唆された。

6 単球/マクロファージへの分化に伴う EphA と ephrin-A サブクラスの発現動態

向井 翠, 佐伯法学, 石井万幾, 小川和重
大阪府立大 生命環境・獣医解剖

【背景と目的】我々は、マウスの単球/Mφ とヒトの血管内皮細胞が EphA2 と ephrin-A1 を発現し、単球/Mφ の血管外遊走に EphA/ephrin-A シグナルが関与する可能性が高いことを示唆してきた。本研究では、(1)単球/Mφ への分化に伴う EphA と ephrin-A の発現動態、(2)単球/Mφ における EphA/ephrin-A シグナルと基質への接着性との関係を検討した。【材料と方法】ヒト骨髓性白血病細胞株 HL60 をビタミン D と TNFα で単球/Mφ に分化誘導した。非特異的エステラーゼ染色、CD14, CD115 発現で分化度を評価し、分化に伴う EphA, ephrin-A サブクラスの mRNA の発現動態を RT-PCR で調べた。また、Stripe assay により、EphA, ephrin-A シグナルと単球/Mφ の基質への接着性との関係を調べた。さらに、マウス骨髄から単核球を遠心分離し、M-CSF を培養液に添加して単球/Mφ を分化・増殖させ、培養 1 日後と増殖・分化後の EphA, ephrin-A サブクラスの mRNA の発現を比較した。【結果と考察】HL60 では、単球/Mφ への分化に伴い EphA2 と EphA4 の mRNA の発現が誘導され、ephrin-A4 発現は有意に上昇した。マウス骨髄の単核球では、単球/Mφ への増殖・分化後に、EphA2, ephrin-A1, ephrin-A2 発現が有意に上昇し、EphA7 発現が減少した。Stripe assay では、HL60 由来の単球/Mφ は、対照領域と比較して ephrin-A1-Fc, EphA2-Fc コート領域に有意に高い細胞密度で接着し、その領域の細胞は伸長し、アクチン線維陽性の突起を多数有していた。以上の結果から、単球/Mφ への分化に伴い EphA, ephrin-A の発現が増強し、これらのシグナルを介して基質や血管内皮細胞への接着性が促進する可能性が示唆された。

7 ラット視床 MD ニューロンの軸索投射様式を単一細胞レベルで解析する

倉本恵梨子, 藩世秀, 古田貴寛, 日置寛之, 金子武嗣
京都大院 医学研究科 高次脳形態学

The mediodorsal thalamic nucleus (MD) receives inputs from a wide variety of subcortical structures, and projects to the prefrontal cortical areas. In the prefrontal areas, although it is known that axon fibers of MD are distributed mainly in the middle layers and slightly in layer 1 at a population level, it is unknown how the axon fibers of single MD neurons are distributed in the telencephalon. In the present study, we examined the axonal arborization of single MD neurons in rat brain by a single neuron labeling method with a Sindbis viral vector expressing membrane targeted-GFP.

The rat MD is subdivided into 3 portions, the medial (MDm), central (MDC), and lateral segments (MDl). The distinction between these segments is based mainly on cytoarchitecture and myeloarchitecture. In addition, the differential distribution of calbindin D28k immunoreactivity is useful for a distinction between the 3 MD segments; calbindin immunoreactivity is more intense in the MDm and MDl than in the MDC. Thus, the location of single MD neurons infected with the virus was examined by immunoreactivity for calbindin, and further confirmed in Nissl-like staining. The MD neurons were completely visualized by immunoperoxidase staining for GFP, and their axonal arborization was reconstructed. In the cerebral cortex, MDC and MDm neurons sent their axons mainly to the orbital areas, whereas MDl neurons primarily projected to the prelimbic area. All the MD neurons formed another axonal arborization in the cingulate, agralunar insular or frontal association areas.

On the basis of different cortical projections, thalamic neurons are divided into two types: core-type and matrix-type neurons project to the middle layers and superficial layer, respectively. Since the axon fibers of most MD neurons were abundantly distributed in layers 2-4, MD neurons were classified to core-type neurons, and their axon fibers were targeted to the basal dendrites of layers 2-4 pyramidal neurons.

8 5-HT_{2C}受容体のRNA編集は視索上核で浸透圧刺激により変動する

古部瑛莉子, 渡邊義久, 青木美空, 田口勝敏, 田中雅樹
京都府立医科大学大学院 基礎老化学

セロトニンは 2C受容体(5-HT_{2C}R)を介して視床下部神経内分泌ニューロンに作用し、下垂体後葉から vasopressin や oxytocin の分泌を促進させることが知られている。また 5-HT_{2C}R は RNA 編集を受けて A から E の 5 か所の部位に編集が起こり、第 2 細胞内ループの 3 か所のアミノ酸置換が起こることが知られるタンパク質でもある。今回慢性の浸透圧刺激により、視索上核(SON)と視床下部室傍核(PVN)の 5-HT_{2C}R の RNA 編集頻度が変化するかを検索した。C57BL/6 マウスで 1 週間 2% 高塩食塩水負荷を行った群と対照群を作製し、負荷後 SON、PVN 組織を断頭採取し、total RNA 抽出、cDNA を合成し、定量 PCR による 5-HT_{2C}R、編集酵素 ADAR1.2 の mRNA 量検索とシーケンシによる RNA 編集頻度の検索を行った。定量 PCR では SON において 5-HT_{2C}R、ADAR1.2 発現とも食塩水群ではコントロールに対して減少がみられたが、PVN では両群に有意差は見られなかった。RNA 編集検索では SON の B、D の編集部位で編集割合が有意に低下していたが、PVN では編集部位に変化は見られなかった。アミノ酸のイソフォームでは SON で VNV 型や VSV 型など VXXV で示される 2 個以上アミノ酸が変化したものが対照群 83% に対して食塩水群では 50% に減少していた。編集率が低下すると、セロトニンの 5-HT_{2C}R への作用が増強するとされるので慢性浸透圧刺激下では発現は低下するが、SON では RNA 編集度を低下させることにより受容体へのセロトニン作用効率を向上させていることが示唆された。

9 神経胚形成期の低栄養がラット行動に与える影響

須藤佑輔¹, 原澤俊也¹, 金子隼也¹, 大井雅之¹, 堀内辰郎¹, 小島秀人², 金井裕彦³, 山田尚登³, 村上哲男⁴, 松田和郎¹, 岡野純子¹, 宇田川潤¹
¹滋賀医大・解剖、²滋賀医大・分子遺伝医学、³滋賀医大・精神医学
⁴近畿大学・農学部・食品栄養

【背景・目的】

胎生期の低栄養は精神疾患発症のリスクを上昇させる事が疫学的に示されている。本研究では、妊娠初期の低栄養と生後の行動異常との関連を検討した。

【方法】

全妊娠期間を通して、標準精製飼料 (AIN-93G) を自由摂取させた母ラットからの産仔を対照群、妊娠 5.5 日から 10.5 日に対照群の 50% に給餌量を制限した母ラットから産仔を栄養制限群とし、生後 12 週にオープンフィールド試験および強制水泳試験などを行った。

【結果】

栄養制限群のラットは、オープンフィールド試験において多動が認められた。また、強制水泳試験において swimming 時間の減少が認められた。

【考察】

胎生 5.5 日から 10.5 日は、胚の子宮への着床直前から神経管閉鎖直前の時期である。また、オープンフィールド試験での多動、および強制水泳試験での swimming 時間の減少は中枢神経系のセロトニン系神経伝達の異常を示唆している。これらの結果は、神経胚形成期の神経幹細胞の特性変化が、生後のセロトニン神経系の機能異常を引き起こす可能性を示している。

10 ストレスによる白質構造変化の分子機序

宮田信吾, 遠山正彌
近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門

うつ病の発症率は年々増加しており、患者の精神症状、身体症状の問題、それを支える家族や社会全体の負担の問題、非常に高い再発率など、その経済的・社会的損失は非常に大きな問題である。このうつ病の発症には環境要因が大きく関与することが知られており、ストレス負荷による視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA axis) の過剰刺激が、うつ病を引き起こす大きな原因として想定されているものの、その分子機序や脳の機能的変化はこれまでに明らかにされていない。

これまでに我々は、慢性ストレス負荷によるうつ病モデルマウスの形態学的解析を行い、白質オリゴデンドロサイト特異的な構造異常が起こることを見出した。さらに Microarray 解析から、白質特異的発現上昇因子として Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (Sgk1) を見出した。

そこで本研究では、白質オリゴデンドロサイトに発現する SGK1 の相互作用因子として N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) に注目し、その活性化機序の解析を行ったところ、慢性ストレス特異的なシグナルカスケードが白質オリゴデンドロサイトに存在する可能性を見出したので報告する。

11 転写因子 Prox1 は海馬歯状回顆粒細胞の運命決定に機能する

○岩野野彦¹、増田亜紀²、清成寛²、榎本秀樹²、松崎文雄²

¹ 大阪大院 医学系研究科 細胞生物学

² 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

【背景と目的】海馬は哺乳類の中枢神経系で古くから詳しく研究されている脳の領域の一つである。海馬は、組織学的・機能的に大きくアンモン角 (cornu ammonis: CA) と呼ばれる領域と歯状回と呼ばれる領域に大きく分けられる。CA 領域は錐体細胞が構成され、その細胞の形と機能から CA1, CA2, CA3 と分けられる。一方、歯状回は顆粒細胞で主に構成される。それぞれの神経細胞の特徴や神経回路の解析は古くから行われ理解が進んでいるが、顆粒細胞と錐体細胞の運命決定機序はあまり知られていない。【材料と方法】歯状回顆粒細胞は、その神経幹細胞から成熟した顆粒細胞に至るまで持続的に転写因子 Prox1 を発現している。歯状回顆粒細胞における Prox1 の機能を理解するために、条件的 Prox1 遺伝子破壊マウスを作成し、その変異マウスの解析を行った。【結果と考察】神経上皮細胞で Prox1 遺伝子を欠損させると、すべての歯状回顆粒細胞が失われた。一方、最終分裂後の神経成熟過程の細胞で Prox1 遺伝子を欠損させると、歯状回領域に CA3 錐体細胞が顆粒細胞の代わりに構造形成していることが観察された。その異所的にできた CA3 錐体細胞はその遺伝子発現パターンだけでなく、細胞形態もまさに錐体細胞の特徴を示していた。反対に錐体細胞へ Prox1 を過剰発現させると、顆粒細胞への分化が誘導された。この解析により、Prox1 は、初期には細胞の生存、神経成熟過程には顆粒細胞としての運命決定に必要な役割を果たしていることが示された。また、顆粒細胞と錐体細胞という違った種類の神経細胞の運命決定は、神経分化後の成熟過程においても可塑的であることが分かった。

12 骨転移巣の酸性環境は Trpv1 の活性化による CGRP の発現増加を介して疼痛を誘発する

中西 雅子^{1,2}、波多 賢二²、米田 俊之²、大槻 勝紀¹

¹、大阪医科大学 解剖学教室

²、大阪大学大学院歯学研究所 生化学教室

骨転移巣は、癌細胞、炎症細胞、あるいは骨を破壊する破骨細胞などにより酸性環境が形成されている。本研究では、骨転移巣における酸性環境と神経伝達物質である CGRP 発現の関連性、さらにその発現調節メカニズムについて検討した。

後根神経節(DRG)の細胞において、酸感受性受容体 Trpv1 と CGRP の共有基が認められた。DRG を酸性環境下 (pH5.5) で器官培養すると CGRP mRNA の発現が著しく増加した。一方 Trpv1KO マウスの DRG を pH5.5 で培養したところ、CGRP mRNA 発現増加は野生型マウスと比較して有意に低下した。また、Trpv1 のアンタゴニストである I-RTX は、酸刺激による CGRP mRNA 発現の増加を有意に抑制した。したがって、酸刺激は Trpv1 の活性化を介して CGRP の発現を増加させることが明らかとなった。DRG 初代培養細胞を酸刺激すると、転写因子 CREB のリン酸化が増強され、この効果は I-RTX により抑制された。さらに siRNA により CREB の発現を抑制、あるいは A-CREB によりシグナルを阻害すると、酸刺激による CGRP mRNA の発現増加は有意に低下した。また、レポーターアッセイならびに ChIP アッセイの結果、リン酸化 CREB は CGRP 遺伝子のプロモーター領域に結合して CGRP の転写を直接促進することが示された。

癌の骨転移が生み出す酸性環境は、知覚神経上の Trpv1 を活性化させ、CREB のリン酸化を介して CGRP の転写活性を誘導する。増強された CGRP が痛みの受容を変化させることで、癌性骨痛の発生に関与していることが示唆された。

13 レスベラトロールの細胞生存及び細胞死の調節機構

早川直哉^{1,2}、柴田昌宏³、小池正人⁴、内山安男⁴、後藤隆洋¹

¹甲子園大・栄養・細胞生物、²大阪大院・医・分子病理、³新潟大院・歯医学総合・機能再建医・肉眼解剖、⁴順天堂大院・医・神経生物・形態

レスベラトロール (RSV) は腫瘍(未分化)細胞には障害的に作用し、正常 (分化) 細胞には保護的に作用することが示唆されているが、この細胞の分化度により何故逆の効果をもたらすのか、そのメカニズムをラット PC12 細胞を用いて解析した。PC12 細胞は本来腫瘍性で、NGF 処理で神経分化するので、RSV の作用を同一細胞株で解析できる。形態学、免疫細胞化学及び生化学的手法を用い、RSV 無処理細胞群と比較し、RSV 投与群 (1, 10, 100 μ M) で以下の結果が得られた。細胞死は未分化細胞で RSV 濃度依存的に増加したが、分化細胞では 100 μ M でのみ増加した。神経突起伸長度と神経特異的タンパク質の発現は未分化細胞で変化なかったが、分化細胞で濃度依存的に増加した。SIRT1 の発現は未分化細胞で減少したが、分化細胞では変化しなかった。SIRT3 は 100 μ M では未分化細胞で減少、分化細胞でより増加した。ミトコンドリアと ATP 合成酵素 β サブユニットの発現は未分化細胞で減少傾向にあるが、分化細胞で濃度依存的に増加した。オートファジーのマーカーであるオートファゴソームと LC3-II/LC3-I 比は未分化細胞で減少、分化細胞で増加した。エネルギーセンサーの AMPK (AMP 活性化キナーゼ) のリン酸化型 (活性型) の発現は未分化細胞で減少、分化細胞で増加した。LC3 ノックダウン細胞では未分化と同様分化細胞でも 10 μ M でオートファゴソームが減少し細胞死が増加した。以上より、RSV の SIRT による AMPK の未分化細胞の抑制及び分化細胞の活性化は、それぞれミトコンドリアとオートファジーの抑制及び促進と関連し、細胞死及び細胞生存を誘導することが示唆された。

14 RhoGEF10 の細胞内局在変化とチロシンリン酸化

河内 翼、柴田 理志、徳原 康哲、茶屋 太郎、稲垣 忍
大阪大学 医学系研究科 保健学専攻 神経生物学研究室

低分子量 G 蛋白質である Rho A は細胞骨格であるアクチンフィラメントを再構成することにより細胞の運動、分裂、分化等で機能している。RhoA は細胞内で、GDP 結合型 (不活性化型) から GTP 結合型 (活性化型) への交換を促進する GEF (guanine nucleotide exchange factor) の働きによって活性化され、GTP 結合型から GDP 結合型への分解を促進する GAP (GTPase activating protein) の働きによって不活性化される。

我々が機能解析を行っている RhoGEF10 は RhoA の GEF であり、332 番目のトレオニン (T) がイソロイシン (I) に置換した変異体 (T332I) をもつ個体において末梢神経での神経伝達速度の遅延や髄鞘形成不全が生じることが報告されている。我々は以前、T332I が恒常的活性体として働き、HeLa 細胞に強制発現すると細胞が円形化すること、この円形化が T332I による RhoA の活性化によること、T332I が恒常的にチロシンリン酸化されていること、チロシンリン酸化されない T332I Y21F/Y231F 変異体 (T332I DM) では恒常的な GEF 活性は有するが細胞の円形化は誘導されないことを前回報告した。

今回、様々な変異体の細胞内局在や円形化、GEF 活性を観察し、T332I DM、1-332 番目までのアミノ酸を切断した Δ N が野生型や T332I とは異なる局在を示すこと、 Δ N は T332I DM と同様に GEF 活性を有することが明らかとなった。これらの結果から T332I DM、 Δ N の局在化が GEF 活性を有することとチロシンリン酸化部位をなくすことにより引き起こされることが示唆された。

15 性腺分化と性分化カスケードに関する分子形態学的研究

木下今日子、長原大知、段上めぐみ、徳本順子、表原拓也、小林泰丈、辰巳敬哉、横山俊史、北川 浩、星 信彦

神戸大院・農学研究科・応用動物学講座

【背景】近年、雌雄表現型およびその機能を維持するためには、様々な性分化関連因子の時空間特異的な性的二型性発現が必要不可欠であることが示されている。性逆転症系統である B6-Y^{pos} マウスの成獣は性染色体構成が XY であるにもかかわらず、精巣ではなく卵巣または卵精巣を有する個体が生まれるなど、性腺における形態機能の異常が報告されている。本研究では、B6-Y^{pos} マウスにおける性分化関連遺伝子群の発現およびそのカスケードを明らかにし、性分化の破綻機構を解明することを目的とした。【材料と方法】B6-Y^{pos} 新生子性腺の組織学的検索ならびに qRT-PCR による各種遺伝子発現の定量を行った。【結果と考察】卵巣では卵胞数が少なく、髄質の低形成が認められた。また、卵巣組織の近傍に精巣上体様組織が観察される個体もいた。さらに、その卵巣では Sox9 など精巣化およびその維持に関わる遺伝子の発現量が対照精巣と比べて有意に低値であり、新生子の時点ですでに雄化カスケードが正常に働いていないことが示唆された。今後は、このカスケードの破綻がいつどこで起こるかを明らかにするため、胎子期に遡った更なる解析が必要であると考える。

16 エストロゲン関連受容体 ERR の形態・分子イメージング

谷田 任司、松田 賢一、山田 俊児、河田 光博

京都府立医科大学 大学院医学研究科 解剖学・生体構造科学

エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor: ERR) は 3 つのサブタイプ α , β , γ を有し、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) と高い相同性を持つ転写調節因子である。内因性ホルモンとは結合しないが、リガンド不在下でも DNA 上の応答配列に結合し、下流の遺伝子発現を調節する。ERR は ER を発現する脳、子宮、乳房組織などで強く発現するが、エストロゲン機能との関連性については不明点が多い。今回、分子イメージング法により ERR の細胞内動態を解析し、ERR のエストロゲン機能への関与について検証した。蛍光タンパク YFP にて標識した各サブタイプの ERR (YFP-ERR α , β , または γ) を COS-1 細胞系に発現させたところ、いずれのタイプの ERR も主として核に蛍光が認められた。また、細胞系に Estradiol (E₂) を添加しても、いずれのタイプの ERR も分布様式の変化を示さなかった。一方、ERR α と ER が共存した場合の動態を確認するため蛍光タンパク CFP で標識した ER α (CFP-ER α) と各 YFP-ERR を細胞系に共発現させ、E₂ 添加後の変化を解析した。その結果、YFP-ERR β と CFP-ER α を共発現させた場合のみ ERR の蛍光が顆粒状に集積し、更に、ERR β と ER α の各々の蛍光像が重なることが分かった。YFP-ERR β と CFP-ER α を共発現させ FRAP 解析を行ったところ、E₂ 添加群では未添加群と比べブリーチ痕の回復が有意に遅れ、E₂ により ERR β の可動性が減少することが明らかとなった。以上より、ERR β は ER α が存在しない状態では E₂ に反応しないが、ER α と共存した場合には E₂ に反応し、ER α と相互作用を起こす特性を有することが示された。

17 生後発達期における TCDD による神経発達障害の分子基盤

段上めぐみ¹、田阪 健¹、須谷真巳¹、長原大知¹、木下今日子¹、徳本順子¹、表原拓也¹、小林泰丈¹、辰巳敬哉¹、谷田任司²、横山俊史¹、野野美津³、赤星英一³、北川 浩¹、星 信彦¹
¹神戸大院 農学研究科・応用動物学、²京都府立医大・解剖学、³(株)東芝 研究開発センター

【背景】ダイオキシン類は実験動物やヒトに対して認知・行動科学的な障害を引き起こし、運動発達の遅延や多動などを生じさせる。近年、ドーパミン作動性 (DA) 神経機能に密接に関わる注意欠陥多動性障害 (ADHD) とダイオキシン類との関与が報告されており、その作用点として中脳 DA 神経機能が考えられている。また、うつ病などに関わるセロトニン (5-HT) 作動性神経は TCDD の標的となることが示唆されている。そこで、胎子期および授乳期における TCDD 曝露がセロトニン・ドーパミン作動性神経に及ぼす影響について解析した。【材料と方法】妊娠 8.5 日目の雌マウスに TCDD (20, 200, 2000, 5000 ng/kg; 以下 T20・T200・T2000・T5000 群) を単回経口投与し、その雄産子を胎齢 18.5 日齢、1 日齢、3 日齢、2 週齢、8 週齢で採材した。中脳縫線核において 5-HT とトリプトファン酸化酵素 2 (TPH-2)、中脳 DA 神経核 (A9, A10, A8) においてチロシン水酸化酵素 (TH) の発現を免疫組織学的に解析した。【結果と考察】中脳縫線核において、出生直後では 5-HT、TPH-2 の発現が低下したが、性成熟後では TPH-2 のみでこの TCDD 曝露による影響が持続していた。また、中脳 DA 神経核において、出生直後では TH の発現が用量依存的に増加し、性成熟後では T200 群の A9 のみで増加していた。胎齢 18.5 日齢、2 週齢については現在解析中である。以上のことから、胎子期・授乳期 TCDD 曝露は 5-HT 作動性神経系、特に TPH-2 に影響を及ぼし、中脳 DA 神経系においては神経核特異的に影響が変化すると示唆された。

18 ネオニコチノイド系農薬が鳥類の繁殖能力に及ぼす影響の基礎的評価

徳本順子¹, 長原大知¹, 木下今日子¹, 段上めぐみ¹, 表原拓也¹, 小林泰丈¹, 辰巳敬哉¹, 橋口峰雄⁴, 関島恒夫³, 上曾山博², 横山俊史¹, 北川浩¹, 星信彦¹ (神戸大院 農・形態機能¹, 神戸大院 農・栄養代謝², 新潟大院 農・環境共生科学³, 香川大 農・附属農場⁴)

【背景】ネオニコチノイドは選択毒性を持つ農薬として1990年代前半に開発されたが、近年、雄ラットに酸化ストレスを通して生殖異常を引き起こすことが報告されている。日本ではトキなどの希少鳥類の繁殖が試みられているが、その生息地である水田においてもこの農薬は使用されているため、同農薬が鳥類の繁殖能力に及ぼす影響を調べた。【方法】雌雄ニホンウズラに、クロチアニジンを含むダントツ (住友化学) 0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg (以下 Control, CTD0.01, CTD0.1, CTD1, CTD10) を6週間経口投与し、精巣または卵巣、肝臓、脾臓を採取し重量測定後、組織学的解析に供した。また、産卵率、受精率、孵化率、胚発生を評価した。【結果】雄の体重増加率は投与群においてわずかに減少し、肝臓および脾臓重量は濃度依存的に増加する傾向がみられた。精細管および雌雄肝臓の肝細胞内における空胞数および大きさ、ならびに精細管のDNA断片化生殖細胞数は濃度依存的に増加した。卵重量、受精率、胚発生ステージ、頭腎長、孵化率に影響はみられなかったが、産卵率、胚重量は濃度依存的にわずかに減少傾向を示した。

【考察】クロチアニジンは鳥類の繁殖能力に影響を及ぼすことが示唆された。すなわち、生殖細胞のDNA断片化ならびに産卵率の低下を引き起こすものであり、感受性の高い個体の繁殖能力に重篤な作用を及ぼす可能性が示された。また、酸化ストレスマーカーについては現在検討中である。