

日本下垂体研究会 第30回学術集会

プログラム・講演要旨集

2015年8月5日（水）～7日（金）

黒部市宇奈月国際会館セレネ

〒938-0282 富山県黒部市宇奈月温泉 6-3

ホテル黒部

〒938-0282 富山県黒部市宇奈月温泉 7

「日本下垂体研究会事務局」からのお願い

学会期間中に、日本下垂体研究会事務局の受付を設けます。受付には会員名簿と会費納入状況の書類を準備いたします。この機会に、年会費の確認と支払、会員登録状況の確認、育英資金の支給などを受け付けます。特に、評議員の先生方には、ご自身の所属と会費納入状況の確認とともに、所属学生の移動の有無や会費納入状況の確認をお願い致します。

目次

日本下垂体研究会 第30回学術集会
会期：2015年8月5日（水）～7日（金）
会場：黒部市宇奈月国際会館セレネ
ホテル黒部

| | |
|-------------------|----|
| 会長挨拶 | 4 |
| 開催要領 | 5 |
| プログラム概要 | 9 |
| 日程表 | 10 |
| 学術集会プログラム | 11 |
| 要旨 | |
| 吉村賞授賞講演 | 20 |
| 特別講演 | 22 |
| 教育講演 | 24 |
| シンポジウム | 26 |
| 最優秀発表賞候補者演題 | 31 |
| 一般演題 | 38 |
| 若手企画 | 64 |
| 謝辞 | 65 |

ご挨拶

30期学術集会を北陸 富山にてお世話することになりました。2015年8月5日（水）午後より7日（金）午前までの会期で、富山県黒部市宇奈月温泉で開催いたします。

富山は、“とやまのクスリ売り・置き薬”薬都として知られておりますが、ホルモン（アドレナリン）を化学物質として世界で初めて単離・精製した高峰譲吉博士の故郷であることはあまり知られていません。私が大学院学生だった時に初めて第9回下垂体研究会学術集会に参加させていただきましたが、今回、ここ富山県で本学術集会を開催させていただけることをたいへん光栄に存じます。標高3,000メートルを超える峰々より構成される立山連峰の大自然を仰ぎながら宇奈月温泉の名湯に浸かって日ごろの疲れを癒していただき、本集会でもこれまでの集会と同様、合宿形式で皆様のご研究に関して活発な議論を深めていただけましたら幸いです。

近年、驚くべきことに立山連峰東側斜面に世界最南限となる氷河が複数現存していることが発見されました。会期中、トロッコ列車による黒部峡谷と氷河を抱く北アルプスの迫力ある大パノラマもお楽しみいただけるかと思えます。是非、この機会にご研究活動に加えて自然あふれる富山県も併せてお楽しみいただけましたら幸いです。

日本下垂体研究会 第30回学術集会会長
松田 恒平
(富山大学大学院理工学研究部 教授)



日本下垂体研究会 第30回学術集会 開催要領

1. 会期

平成27年8月5日(水) 幹事会、一般講演、ファイルオンザデスク、若手企画

平成27年8月6日(木) 一般講演、評議員会・総会、吉村賞授賞式・講演
教育講演・特別講演、エクスカーション(黒部峡谷)
懇親会、ファイルオンザデスク

平成27年8月7日(金) シンポジウム、最優秀発表賞授賞式

2. 会場

一般講演・シンポジウム・受賞式等会場

黒部市宇奈月国際会館セレネ

<http://www.unazuki.org/selene/index.html>

〒938-0282 富山県黒部市宇奈月温泉 6-3

TEL: 0765-62-2000 FAX: 0765-62-2020

ファイルオンザデスク、若手企画(宿泊)

ホテル黒部

<http://www.hotelkurobe.co.jp/>

〒938-0282 富山県黒部市宇奈月温泉 7

TEL: 0765-62-1331 FAX: 0765-62-1077

3. 参加受付

8月5日(水) 13:00より国際会館セレネの講演会場前で受付場所を設置します。学術集会参加費および懇親会費を現金にてお支払いください。会計終了後、名札と要旨集をお受け取り下さい。名札ケースはお帰りの際に御返却ください。宿泊費はホテル黒部に直接お支払いください。

4. 学術集会参加費

一般会員 5,000円

学生会員 2,000円

非会員 7,000円

5. 懇親会費

一般会員 5,000円

学生会員 3,000円

非会員 5,000円

6. 弁当

6日（木）の昼食はお弁当を御用意致します。会場内にてお食事頂けます。

宿泊

宿泊はホテル黒部になります。

二泊三日の宿泊費（一室二～四名での宿泊）はつぎのとおりです。

一般：一名あたり 25,000 円（一泊のみ 13,000 円）

学生：一名あたり 20,000 円（一泊のみ 10,000 円）

この宿泊費には、8月5日の夕食、8月6日の朝食と昼食、8月7日の朝食の代金を含まれます。部屋割りは受付時にお渡しいたします。なお、チェックインは15時以降、チェックアウトは10時までとなります。

*朝・夕食、懇親会会場：「雲の平」の間

ファイルオンザデスク、若手企画：「本陣」の間

発表形式

演題は全て口頭発表で行います。吉村賞 40 分、教育講演と特別講演は 30 分です。シンポジウムは質疑応答含めて 30 分です。一般講演の発表時間は 10 分、質疑応答は 2 分です。会場には Windows 7 を搭載した PC を一台用意します。Microsoft office PowerPoint 2010 で作動確認したファイルをご準備下さい。異なる OS や別バージョンの PowerPoint で作成した場合は、上記の環境で問題なく作動することを確認しておいてください。作成した PowerPoint ファイルを USB フラッシュメモリーまたは CD-R に保存して、会場のファイル受付係までお持ちください。5 日の演題は 5 日の 14 時までに会場のファイル受付係までお持ちください。6 日および 7 日の演題については、5 日のファイルオンザデスク会場にてファイルを受け付け致します。この時間帯以外でも柔軟に対応致しますが、ご協力の程よろしくお願い申し上げます。

やむを得ずご自身の PC を持ち込まれる場合は事前に下記メールアドレスまでお知らせ下さい (jspr2015@sci.u-toyama.ac.jp)。接続に必要なアダプターはご持参ください。

ファイルオンザデスク

ファイルオンザデスクはホテル黒部の「本陣」の間にて行います。5 日の夕食後 (21:00-23:00)、および 6 日の懇親会后 (21:00-23:00) にはファイルオンザデスクを行います。演台発表に使用したスライドの印刷版をご持参下さい。アルコールやソフトドリンクを片手に情報交換と交流を深めて下さい。

若手企画

5 日の夕食後、ホテル黒部の「本陣」の間にて 21:00 から 22:00 まで若手企画を行います。進学、研究職への就職を悩む学生、大学院生を主な対象として、複数の研究室を渡り歩いてこられた若手・中堅研究者の先生方に、これまでの経験や、現在の研究内容をご紹介頂き、研究職の具体的なイメージを持って頂く機会を設けさせて頂きました。発表後

はそのままファイルオンザデスクの会場に移動し、演者の先生方には個別に質疑応答、相談などして頂けます。多くの学生、大学院生、および研究者の皆様の御参加をお待ちしております。

最優秀発表賞

最優秀発表賞に応募の演題は、最優秀発表賞審査要項に従って審査されます。審査員の評点をもって、最優秀発表賞受賞者を決定します。

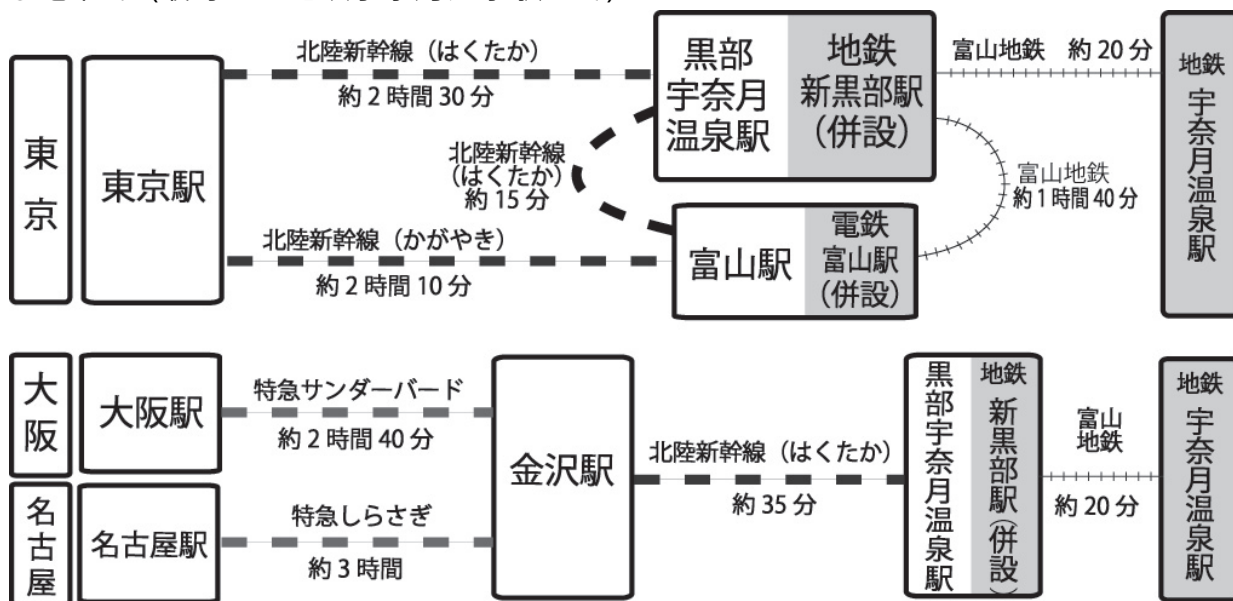
会場までの交通手段

宇奈月温泉までの交通アクセス (参考)

●車で

北陸自動車道 黒部 I.C より約 25 分又は、朝日 I.C より車で約 30 分
 駐車場はセレネの無料駐車場、または黒部ホテルの駐車場をご利用ください。

●電車で (最寄りの地鉄宇奈月温泉駅まで)



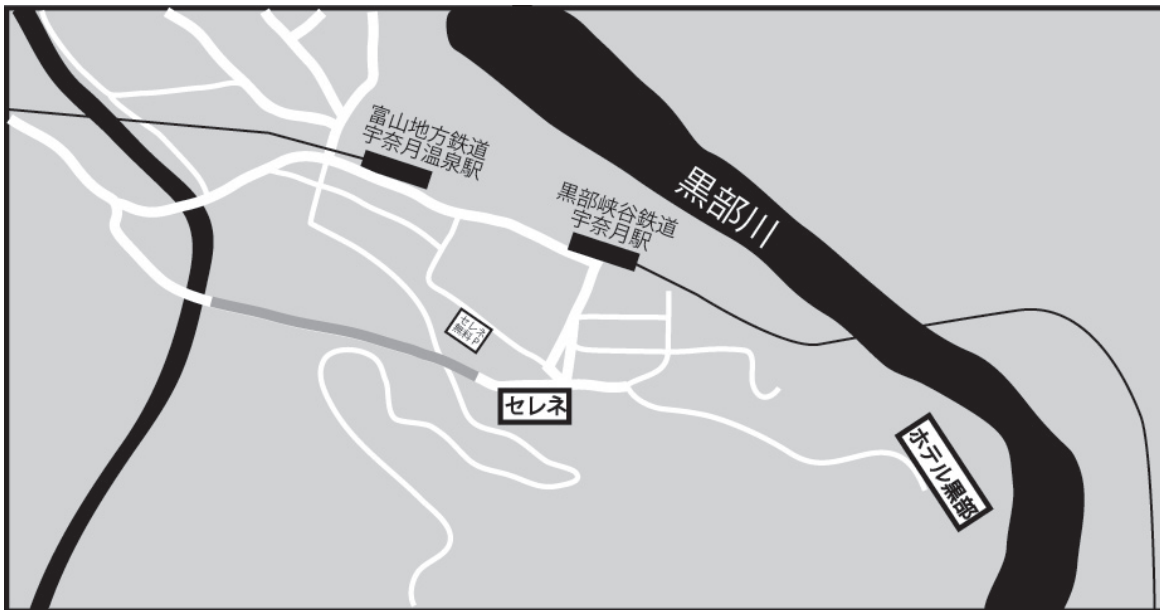
●飛行機で

- ・東京より 羽田空港～富山空港 (約 1 時間)
- ・札幌より 新千歳空港～富山空港 (約 1 時間 35 分)
- 富山空港～「あいの風邪とやま鉄道」富山駅 (バス/約 25 分)

◆◆富山駅から電車に乗り換え◆◆

- (1) 富山地方鉄道「富山駅～宇奈月温泉駅」(約 60～100 分)
- (2) 北陸新幹線にて黒部宇奈月温泉駅へ (約 15 分)。富山地方鉄道新黒部駅に乗り換えて宇奈月温泉駅まで (約 20 分)

富山地方鉄道宇奈月温泉駅より黒部市宇奈月国際会館セレネまで徒歩約 5 分、黒部市宇奈月国際会館セレネからホテル黒部まで徒歩約 5 分です（下記地図をご参照下さい）。



連絡先

第 30 回日本下垂体研究会学術集会事務局
〒930-8555 富山県富山市五福 3190
富山大学理学部生物学科 松田研究室内
電子メール jspr2015@sci.u-toyama.ac.jp
電話 076-445-6638
FAX 076-445-6549

会長：松田 恒平（会期中の連絡先： 090-2036-4153）

事務局：今野 紀文
中町 智哉

プログラム概要

1. 一般演題 I ~ III 26 題
2. 最優秀発表賞候補者演題 6 題
3. 吉村賞授賞講演
金崎春彦（島根大学 講師）
「ゴナドトロピンサブユニット遺伝子発現調節機構に関する研究」
4. 特別講演
塩田清二（星薬科大学 特任教授）
「神経ペプチド PACAP の多彩な機能について」
5. 教育講演
津田正明（富山大学 名誉教授）
「遺伝子発現屋の脳神経科学」
6. シンポジウム
下垂体後葉ホルモン研究の新展開
上田陽一（産業医科大学）
「下垂体後葉ホルモンの蛍光タンパクによる可視化とオプトジェネティクスの応用」
輿水崇鏡（自治医科大学）
「バゾプレッシン V1b 受容体の新知見と応用」
今野紀文（富山大学）
「抗利尿ホルモンの機能からみた脊椎動物の進化」
山口陽子（ハワイ大学）
「下垂体後葉ホルモン受容体の分子進化」
7. 若手企画
夢・希望・現実 -研究を続けようか迷う君へ-
山口 陽子（ハワイ大学）
中町 智哉（富山大学）
佐藤 貴弘（久留米大学）
井田 隆徳（宮崎大学）
8. エクスカーション
エクスカーションとして、2 日目（8 月 6 日）午後 2 時 50 分よりトロッコ電車による黒部峡谷往復ツアーを企画しております。トロッコ電車はすべて定員制になっており、また繁盛期の為、事前予約が必要となります。希望者は 7 月 15 日までにエクスカーション希望の有無をお知らせ下さい。往復運賃（3420 円）については、受付時にお支払いください。トロッコ電車は黒部峡谷鉄道の宇奈月駅より出発しますので、参加者は必ず時間までに宇奈月駅に集合してください。

日程表

| | 8月5日(水) | 8月6日(木) | 8月7日(金) |
|------|-------------------------|--|-----------------|
| 700 | | 700 朝食 | 700 朝食 |
| 800 | | | |
| 900 | | 830 一般演題II | 830 教育講演・特別講演 |
| 1000 | | | 930 休憩 |
| | | | 940 シンポジウム |
| 1100 | | 1020 休憩 | |
| | | 1030 一般演題III | |
| 1200 | | | 1140 最優秀発表賞表彰式 |
| | | 1210 昼食 | 1200 閉会 |
| 1300 | 1300 受付開始 | 1310 評議員会・総会 吉村賞授賞式・講演 | |
| | 1330 幹事会 | | |
| 1400 | | 1420 自由時間 (エクスカーション希望者は 宇奈月駅へ移動) | |
| | 1430 開会 | | |
| 1500 | 1440 一般演題I | 1450 エクスカーション トロッコ列車による 黒部峡谷めぐり | |
| 1600 | | | |
| | 1630 休憩 | | |
| 1700 | 1640 最優秀発表賞候補者 演題 | | |
| 1800 | 1800 自由時間 (ホテル黒部に移動) | 1820 自由時間 | |
| 1900 | 1900 夕食, 自由時間 | 1900 懇親会 | |
| 2000 | | | |
| 2100 | 2100 ファイル オンザデスク | 2100 若手企画 | 2100 ファイルオンザデスク |
| 2200 | | | |
| 2300 | | | |
| | 1日目終了 | 2日目終了 | |

日本下垂体研究会 第30回学術集会 プログラム

2015年8月5日(水)～7日(金)

富山県黒部市 宇奈月国際会館セレネ、ホテル黒部

8月5日

参加受付(国際会館セレネ) 13:00～

開会の辞 14:30～14:40

一般演題Ⅰ 14:40～16:30 9演題

座長：前多 敬一郎(東京大学)、堀口 幸太郎(杏林大学)

1. ヒト羊膜細胞における activin A と activin B の遺伝子発現

○渡邊和子¹、山中行義¹、岡林武志¹、定方久延²、亀田高志²、峯岸敬²、安部由美子¹

¹群馬大学大学院 保健学研究科 生体情報検査科学、²群馬大学大学院 医学系研究科 産科婦人科学

2. Identification of tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases expressing cells in human anterior pituitary gland

○Alimuddin Tofrizal¹, Morio Azuma¹, Takehiro Tsukada¹, Ken Fujiwara¹, Kotaro Horiguchi², Takashi Yashiro¹, Shozo Yamada³

¹Division of Histology and Cell Biology, Department of Anatomy, Jichi Medical University School of Medicine, ²Laboratory of Anatomy and Cell Biology, Department of Health Sciences, Kyorin University, ³Department of Hypothalamic and Pituitary Surgery, Toranomon Hospital

3. ヒト ES 細胞からバソプレシン産生細胞への分化誘導法の検討

○小川晃一郎¹、須賀英隆²、水野正明³、長崎弘⁴、有馬寛¹

¹名古屋大学大学院医学系研究科 糖尿病・内分泌内科学、²名古屋大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌内科、³名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター、⁴藤田保健衛生大学医学部 生理学講座

4. Vasopressin receptor 1b regulates cell growth and promotes neurite outgrowth in PC12 cells

○Kyaw Htet Aung, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue

Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development

5. バソインヒビンによる血管内皮細胞と心筋細胞への影響解析

○持永亮、中村恵理、平井里奈、松本彩香、中嶋亮順、針谷敏夫
明治大学大学院 農学研究科 生体機構学研究室

6. AMPK 経路を介した LHβ 鎖発現抑制

○ 森山隆太郎¹、山崎翼¹、中井愛¹、加藤たか子²、加藤幸雄²
近畿大生命科学、明治大院・農

7. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA)はレチノイン酸合成酵素 (RALDH) を誘導し GnRH 発現を抑制する

○スバツタル ウルジ ャルガル、金崎春彦、ミジドルジ ツエルメグ、折出亜希、鈴木伸吾、原 友美、京 哲
島根大学医学部産科婦人科

8. ラット胎児脳神経初代培養細胞を用いた GnRH 及び kisspeptin 発現の検討

○折出亜希、金崎春彦、ミジドルジ ツエルメグ、スバツタル ウルジ ャルガル、原 友美、鈴木伸吾、京 哲
島根大学医学部産科婦人科

9. 性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のパルス状分泌に關与する kappa opioid receptor (KOR) 発現細胞の局在解明

○高橋宙大¹、中村 翔¹、戴 明道¹、後藤哲平²、平林真澄²、上野山賀久³、東村博子³、前多敬一郎¹

¹東大獣医繁殖、²生理研、³名大・生殖科学

休憩

16:30~16:40

最優秀発表賞候補者演題 16:40~18:00 6 演題

座長：汾陽 光盛 (北里大学) 安部 由美子 (群馬大学)

1. オスラットの床敷曝露によるメスラット前腹側室周囲核 (AVPV) キスペプチンニューロンの活性化および LH 分泌の増強作用

○渡辺雄貴^{1,2}、井上直子¹、池上花奈^{1,2}、上野山賀久¹、東村博子¹

1. 名大院生命農、2. 学振特別研究員

2. ガウシアルシフェラーゼの LβT2 細胞におけるホルモン分泌アッセイ系の構築への利用

○佐藤一裕¹、根岸 潤²、中倉 敬³、草田智之²、大森由花²、加藤幸雄^{2,4}、戸村秀明^{2,4}

1 明大院農生命、2 明大農生命、3 帝京大医解剖、4 明大生殖内分泌研

3. 成体下垂体前葉の幹・前駆細胞ニッチの単離とその解析

○西村直人¹、吉田彩舟^{3,5}、加藤たか子^{3,4}、加藤幸雄^{1,2,3}

¹明大院・農、²明大・農、³明大・研究知財、⁴明大・生殖内分泌研、⁵学振研究員

4. プロトン刺激によるマウス下垂体細胞株 LβT2 の応答解析

○持丸雄太¹、新堂真実¹、西田真実¹、金子 諒¹、加藤幸雄^{2,3}、戸村秀明^{1,3}

¹明治大学農学研究科生命科学専攻細胞情報制御学研究室、²明治大学農学研究科生命科学専攻遺伝情報制御学研究室、³明治大学生殖内分泌研究所

5. Gene expression analysis of folliculostellate cells in 'transitional zone' of anterior pituitary gland of rat – special relevance to circadian rhythm –

○Rita Maliza¹, Ken Fujiwara¹, Khongorzul Batchuluun¹, Motoshi Kikuchi^{1, 2}, Takashi Yashiro¹, and Tsuyoshi Soji³

¹Division of Histology and Cell Biology, Department of Anatomy, Jichi Medical University School of Medicine, ²Laboratory of Natural History, Jichi Medical University School of Medicine, ³Department of Functional Anatomy, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

6. キンギョ黒色素胞に及ぼす組換えキンギョソマトラクチン (SL) の影響

○南 和希¹、浜口晃吉²、東 森生³、小林牧人⁴、今野紀文²、中町智哉²、松田恒平^{2, 5}

¹富山大・理・生物、²富山大・院理工・生体制御、³自治医大・医・解剖学、⁴国際基督教大・教養・理学、⁵富山大・院生命融合・生体情報

自由時間 (ホテル黒部に移動) 18:00~19:00

夕食 (ホテル黒部) 19:00~21:00

ファイルオンザデスク 21:00~23:00

若手企画 (ホテル黒部) 21:00~22:00

オーガナイザー 中町 智哉 (富山大学)、藤原 研 (自治医科大学)

「夢・希望・現実 -研究を続けようか迷う君へ-」

山口 陽子 (ハワイ大学 ポストドクトラルフェロー)

中町 智哉 (富山大学 助教)

佐藤 貴弘 (久留米大学 准教授)

井田 隆徳 (宮崎大学 准教授)

8月6日

朝食 (ホテル黒部) 7:00~8:30

一般演題 II 8:30~10:20 9 演題

座長 戸村 秀明 (明治大学)、 塚田 岳大 (自治医科大学)

1. 下垂体組織の領域化に関わる ephrin-B2 と対合 Eph の解析

○吉田彩舟^{1,5}、西村直人²、染谷昌亮³、菅野尚子²、西原大翔²、加藤たか子^{1,4}、加藤幸雄^{1,2,3}

¹明大・研究知財、²明大院・農、³明大・農、⁴明大・生殖内分泌研、⁵学振研究員

2. 下垂体前葉の生後発達における S100 β 陽性細胞の挙動とその制御機構の解明

○堀口幸太郎^{1,2}、舘野こずえ¹、藤原 研³、塚田岳大³、八子英司⁴、長谷川瑠美¹、瀧上周¹、大迫俊二¹、屋代 隆³、加藤たか子^{2,5}、加藤幸雄^{2,4,5,6}

¹杏林大・保健、²明治大・生殖内分泌研、³自治医大・医・解剖 (組織)、⁴明治大・院・農研、⁵明治大・研究知財、⁶明治大・農

3. マウスにおける異型および異所性プロラクチンに関する研究

○諸星和紀、生駒直也、眞野彩織、宮川勇太郎、山野辺一貴、中島亮順、針谷敏夫
明治大学大学院 農学研究科 生体機構学研究室

4. 下垂体での神経堤由来細胞の時空間的局在解析

○上春浩貴^{1,5}、吉田彩舟^{2,5}、菅野尚子¹、西村直人¹、西原大翔¹、加藤たか子^{2,3}、加藤幸雄^{1,4}

¹明大院・農、²明大・研究知財、³明大・生殖内分泌研、⁴明大・農、⁵学振研究員

5. コクサッキーウイルスとアデノウイルスの共通受容体 CAR の胎仔期と成体における局在解析

○陳 黙¹、菅野尚子²、加藤たか子^{1,4}、加藤幸雄^{2,3,4}

¹明大・研究知財、²明大・院、³明大・農、⁴明大・生殖内分泌研

6. ラット下垂体成熟過程における転写因子 Prop1 の DNA メチル化解析

○西原大翔¹、吉田彩舟^{3,5}、菅野尚子¹、西村直人¹、上春浩貴^{1,5}、加藤たか子^{3,4}、加藤幸雄^{1,2,3}
¹明大院・農、²明大・農、³明大・生殖内分泌研、⁴明大・研究知財、⁵学振研究員

7. ラット発情前期下垂体におけるアネキシン A5 関連核内受容体 Nr4a3 の発現調節

○寺島涼太、久留主志朗、汾陽光盛
北里大学獣医生理学研究室

8. Relocalization of pituitary annexin A5 during augmented hormone secretion

○Numfa Funbun, Ryota Terashima, Shiro Kurusu and Mitsumori Kawaminami
Veterinary Physiology, Kitasato University

9. 38 歳で原発無月経を期に診断された Prader-Willi 症候群の一例

○近藤朱音^{1,2}、中奥大地¹、村上雅博¹、高橋千果²、森根幹生¹、和泉俊一郎²、前田和寿¹
1. 国立病院機構 四国こどもとおとなの医療センター 産婦人科、2. 東海大学医学部 産婦人科

休憩 10:20~10:30

一般演題 III 10:30~12:10 8 演題

座長 高橋 明義 (北里大学)、藤原 研 (自治医科大学)

1. メラニン凝集ホルモンは成長ホルモン遺伝子発現の調節因子か?

○伊東快朔、笠木 聡、水澤寛太、天野勝文、高橋明義
北里大学 海洋生命科学研究科 魚類分子内分泌学研究

2. キンギョの情動行動に及ぼすコレシストキニン脳内投与の影響

○飯沼直人¹、中町智哉¹、今野紀文¹、松田恒平^{1,2}
¹富山大・院理工・生体制御、²富山大・院生命融合・生体情報

3. Synchronized expression of kisspeptin and its receptor genes in the diencephalon and pituitary of grass puffer during a lunar cycle

○Md. Shahjahan and Hironori Ando

Sado Marine Biological Station, Faculty of Science, Niigata University

4. 性行動中枢の雄性化／脱雌性化におけるキスペプチンの役割

○中村翔¹、上野山賀久²、池上花奈²、戴 明道¹、高橋宙大¹、平林真澄³、束村博子²、前多敬一郎¹

1 東京大学大学院農学生命科学研究科、2 名古屋大学大学院生命農学研究科、3 生理学研究所

5. ラット下垂体前葉における M2 マクロファージの同定

○矢田部 恵¹、藤原 研¹、Tofrizal Alimmudin¹、屋代 隆¹、西村 智²、永井良三³

1. 自治医科大学医学部解剖学講座（組織学部門）、2. 自治医科大学分子病態治療センター分子病態研究部、3. 自治医科大学

6. Neuronatin は Ca²⁺濃度を調節する細胞内小器官に局在し下垂体の分化に寄与する

○菅野尚子¹、樋口雅司^{2,3}、吉田彩舟⁴、八子英司⁴、陳 默^{2,3}、上春浩貴^{1,5}、西村直人¹、西原大翔¹、加藤たか子^{2,3}、加藤幸雄^{1,6}

¹明大院・農、²明大・研究知財、³明大・生殖内分泌研、⁴学振研究員 PD、⁵学振研究員 DC1、⁶明大・農

7. 下垂体 ACTH 細胞における微小管構成タンパク質 α チューブリンアセチル化修飾の役割

○中倉敬、萩原治夫

帝京大・医・解剖

8. ヒト胚性幹細胞から下垂体 ACTH 細胞への分化誘導法

○須賀英隆^{1,2}、大曾根親文^{2,3}、笠井貴敏³、水野正明⁴

1：名古屋大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌内科、2：理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、3：名古屋大学大学院医学系研究科 糖尿病・内分泌内科学、4：名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

昼食（お弁当） 12:10～13:10

評議員会・総会 13:10～13:40

吉村賞授賞式・講演 13:40～14:20

座長 屋代 隆（自治医科大学）

金崎春彦（島根大学医学部産婦人科）

「ゴナドトロピンサブユニット遺伝子発現調節機構に関する研究」

エクスカージョン希望者は宇奈月駅へ移動 14:20～14:50

エクスカージョン 14:50～18:20

（黒部峡谷トロッコ電車）

休憩・自由時間 18:20～19:00

懇親会 19:00～21:00

ファイルオンザデスク 21:00～23:00

8月7日

朝食 (ホテル黒部) 7:00~8:30

特別講演 8:30~9:00

座長 松田 恒平 (富山大学)

塩田清二 (星薬科大学先端生命科学研究所)

「神経ペプチド PACAP の多彩な機能について」

教育講演 9:00~9:30

座長 松田 恒平 (富山大学)

津田正明 (富山大学名誉教授)

「遺伝子発現屋の脳神経科学」

休憩 9:30~9:40

シンポジウム 9:40~11:40

オーガナイザー 輿水 崇鏡 (自治医科大学)、松田 恒平 (富山大学)

「下垂体後葉ホルモン研究の新展開」

上田陽一 (産業医科大学医学部)

下垂体後葉ホルモンの蛍光タンパクによる可視化とオプトジェネティクスの応用

輿水崇鏡 (自治医科大学医学部)

バゾプレッシン V1b 受容体の新知見と応用

今野紀文 (富山大学理工学研究部)

抗利尿ホルモンの機能からみた脊椎動物の進化

山口陽子 (ハワイ大学海洋生物学研究所)

下垂体後葉ホルモン受容体の分子進化

最優秀発表賞表彰式 11:40~12:00

閉会の辞 12:00~12:05

講演要旨

吉村賞受賞者講演

金崎春彦（島根大学医学部産婦人科 講師）
「ゴナドトロピンサブユニット遺伝子発現調節機構に
関する研究」

ゴナドトロピンサブユニット遺伝子発現調節機構に関する研究

金崎春彦

島根大学医学部産科婦人科

視床下部 GnRH ニューロンは下垂体門脈へ投射し、GnRH をパルス状（間欠的）に分泌させて下垂体前葉からのゴナドトロピン（LH、FSH）の分泌を制御している。ヒト月経周期の卵胞期前期において GnRH は比較的低頻度のパルス状に分泌され、下垂体からは FSH が優位に分泌されて卵胞発育を促す。その後 FSH に代わって LH の分泌が優勢となり、LH は FSH と共同で卵胞を更に発育させてエストロゲン分泌を増加させ、主席卵胞を形成させる。この時 GnRH のパルス頻度が上昇して高頻度パルス状に分泌される。つまり、視床下部からの GnRH パルスが低頻度の場合は下垂体からは FSH が主として合成分泌される一方、GnRH が高頻度に分泌される場合は FSH よりもむしろ LH 分泌が優位となる。この様にゴナドトロピン分泌には GnRH パルス頻度依存性 LH、FSH 特異的制御機構が存在することが動物実験でも明らかになっている。Perifusion system を用いて培養メディアウムを還流させ、細胞に GnRH パルス刺激を与えるとパルス頻度の違いにより細胞の反応が異なる。高頻度刺激では ERK 活性は GnRH パルスに伴い一過性に活性化と不活性化を繰り返すが、低頻度刺激では ERK 活性化は持続的である。ERK 脱リン酸化酵素である MKP1 発現は高頻度 GnRH 刺激のみに認める。また転写因子の誘導、cAMP 上昇パターンも高低両頻度間で異なるなど、細胞が GnRH パルスを感知していることが分かる。また、ゴナドトロフ自体の性質の変化も認められ、高頻度 GnRH パルスで刺激された細胞には GnRH 受容体がより発現し、フォリスタチン発現が増加する一方、低頻度 GnRH 刺激を行った場合、細胞には PACAP 及びその受容体である PAC1 受容体発現が増加する。PACAP は多機能ペプチドであり様々な作用を持つが、ゴナドトロピン発現能を持ち、PAC1 受容体は GnRH の作用にも影響を与える。GnRH パルス頻度依存性 LH、FSH 特異的発現機構の詳細については未だ不明な点が多いが、Perifusion system を用いた GnRH パルス刺激実験から得られた知見について説明させて頂きたい。

講演要旨

特別講演

塩田清二（星薬科大学 特任教授）

「神経ペプチド PACAP の多彩な機能について」

神経ペプチド PACAP の多彩な機能について

塩田 清二

星薬科大学 先端生命科学研究所 ペプチド創薬 特任教授

PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide)は 1989 年に米国チュレーン大学の有村・宮田らによって羊の視床下部より発見された神経ペプチドである。当初は新規の視床下部ホルモンとしての機能を持つと考えられたが、その後の研究により PACAP はホルモン、伝達物質、修飾物質あるいは栄養因子としての機能をもつことが明らかになってきた。このペプチドの最大の特徴は細胞内の cAMP 上昇を強力に刺激することであり、類似ペプチドである VIP の千倍以上も強力である。一方、PACAP は中枢・末梢神経系の他に視器、副腎、消化系（膵臓、腸管）、生殖器などの諸臓器で発現し、多種多様な機能を持っていることも分かってきた。我々は特にげっ歯類の神経系における PACAP の生理機能を 20 年前から追求してきた。その結果、PACAP には神経細胞死抑制作用、神経新生・再生作用、神経前駆（幹）細胞からグリア細胞への分化誘導作用などのあることが分かった。

PACAP KO マウスを用いた動物実験で、内在性の PACAP が神経細胞死を抑制することが分かった。また細胞内情報伝達は MAP キナーゼを介すること、さらにこのペプチドはグリア細胞を刺激して IL-6 の産生を促すことなど、PACAP による神経細胞死抑制経路の実体が明らかになってきた。PACAP の神経保護作用に係る遺伝子およびタンパク質の網羅的解析を行ったところ、新規軸索伸張関連因子(CRMP2)が同定され、この分子は神経細胞で産生されていることも分かった。ところで、PACAP 受容体(PAC1-R)には 10 数種類のサブタイプが存在し、cAMP-protein kinase A (PKA)および protein kinase C (PKC) を介するシグナル伝達系が存在する。PAC1-R はラット脳内に広く発現し、個体発生過程の極めて早期(E9.5)の神経上皮に発現する。PACAP は神経前駆（幹）細胞の PAC1-R を介して細胞内の PKC を活性化し、グリア細胞（星状膠細胞）への分化誘導を行うと考えられる。現在、我々は PACAP のヒトへの臨床応用に向けて、霊長類における PACAP の神経細胞死防御と神経新生・再生に向けた基盤研究を行っている。

講演要旨

教育講演

津田正明（富山大学 名誉教授）

「遺伝子発現屋の脳神経科学」

遺伝子発現屋の脳神経科学

津田正明

富山大学研究戦略室 学術顧問

私が大学院生の頃（1970年代）、遺伝子組み換えが産声をあげ真核生物の分子生物学が立ち上がりとしていた。私は原核生物におけるオペロンの制御機構に興味があったので、細胞分化と遺伝子発現との関係を知りたいと思った。しかし、それにはグロビンのような組織特異的タンパク質の遺伝子が必要だった。組織特異的遺伝子の発現制御機構を調べれば、細胞分化のメカニズムが分かるだろうというわけである。幸運なことに私は、大学院卒業後米国ボルチモア市にあるカーネギー発生生物学研究所に留学する機会を得た（1988~1989）。鈴木義昭先生が主催していた研究室では、すでに蚕から絹糸フィブロイン遺伝子がクローニングされていた。これは世界で三番目にクローニングされた遺伝子であった。幸運にも私は、それを使って組織特異的遺伝子のエンハンサーの発見(Cell, 1981)を行うことができた。

その後、私は記憶現象に興味を持ち、神経系にフィールドを移した。しかし、“記憶は発生・細胞分化の延長線上の問題である”という信念のもとに、記憶などの神経可塑性の問題を遺伝子発現レベルから解析することを貫いた。そのため、初代培養神経細胞へのDNAトランスフェクションなどの技術の一つ一つクリアして、特に脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF)遺伝子の神経活動依存的な転写制御機構の検討を進めてきた。最終的に、私たちは一つの統一的な誘導機構を提案することができた(J. Neurosci. 35, 5606-5624, 2015)。これは PACAP(Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)などでGPCR(G-protein coupled receptor)を活性化するとNMDAレセプターの活性亢進が起こり、カルシニューリン経路の選択的活性化を介して効率のよいBDNF遺伝子の発現誘導を引き起こされるというものである。この機構は、神経可塑性に関係する多くの脳神経機能に関わっていることを予想させた。本教育講演では、私がどのような考えのもとで、遺伝子発現レベルから神経可塑性にアプローチしてきたか、遺伝子発現屋の辿った足跡を紹介したい。

講演要旨

シンポジウム

—下垂体後葉ホルモン研究の新展開—

上田陽一（産業医科大学 教授）

「下垂体後葉ホルモンの蛍光タンパクによる可視化とオプト
ジェネティクスの応用」

輿水崇鏡（自治医科大学 准教授）

「バゾプレッシン V1b 受容体の新知見と応用」

今野紀文（富山大学大学 講師）

「抗利尿ホルモンの機能からみた脊椎動物の進化」

山口陽子（ハワイ大学 ポストドクトラルフェロー）

「下垂体後葉ホルモン受容体の分子進化」

下垂体後葉ホルモンの蛍光タンパクによる可視化とオプトジェネティクスの応用

上田陽一

産業医科大学 医学部 第1生理学

下垂体後葉ホルモンと知られているバゾプレッシンおよびオキシトシンは、視床下部の視索上核および室傍核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、その軸索の投射先である下垂体後葉の神経終末より神経活動依存的に循環血液中に分泌されます。一方、大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体・樹状突起からも開口放出されて脳内で作用して、愛情、信頼、攻撃性などの高次脳機能に関与することが明らかになってきました。

私は、山下博教授（現 産業医科大学名誉教授）のもと大学院生としてラット視床下部室傍核の大細胞性神経分泌ニューロンへの胃からの迷走神経を介した求心性シナプス入力の電気生理学的研究（ガラス微小電極を用いた活動電位の記録）で学位（医学博士）を取得後、一貫して下垂体後葉ホルモンの生理学的研究を行ってきました。山下博先生は、バゾプレッシンニューロンからの細胞内記録を世界で初めて成功した（*J Physiol* 1972）高名な先生です。

これまでに私たちは、バゾプレッシンおよびオキシトシンニューロンの可視化とその神経活動の Fos タンパクの発現を指標にした可視化を試みてきました。具体的には、緑色蛍光タンパク（eGFP）および赤色蛍光タンパク（mRFP1）遺伝子をバゾプレッシン、オキシトシンおよび *c-fos* 遺伝子に挿入した融合遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作出するという方法です。その結果、蛍光タンパクの発現を指標にバゾプレッシンおよびオキシトシンニューロンを生細胞のまま同定することができ、さらには神経活動の蛍光タンパクによる可視化を実現しました。

ごく最近、オプトジェネティクス技術の応用としてバゾプレッシンニューロンに光感受性イオンチャンネル（チャンネルロドプシン2）を発現させることで青色光照射によって活動電位を誘発することができました。下垂体後葉ホルモン研究へのオプトジェネティクス技術の応用の可能性について論じたい。

バゾプレッシン V1b 受容体の新知見と応用

輿水崇鏡

自治医科大学医学部分子薬理学部門

Dr. G. Oliver と Prof. E. Schaefer により下垂体抽出物に含まれる強力な昇圧物質として報告された神経下垂体ホルモンバゾプレッシンは、V1a 受容体を介して強い昇圧を、V2 受容体を介して腎で効率的な抗利尿作用を示す。V1a 及び V2 受容体は、典型的な G タンパク質受容体 (GPCR) としてカテコラミン受容体とともに解析が進んできた。一方、V1b バゾプレッシン受容体は、生体内で下垂体前葉に最も高い発現が見られ、それ以外にも中枢神経系や末梢臓器に広く発現部位が知られる (海馬、脳幹部、膵β細胞、腸管、副腎髄質など)。バゾプレッシンの抗利尿作用と昇圧作用は臨床応用が進み、V1a または V2 受容体を刺激あるいは抑制することで各種の治療効果が得られている。しかし、V1b 受容体の機能解析と臨床応用は、V1a、V2 受容体と比べて立ち遅れているのが現状である。

今回我々は、in vitro 及び in vivo において V1b 受容体の新たな機能を見出したので報告するとともにその臨床応用について考察する。1) 受容体の細胞内局在； V1a、V2 受容体が細胞膜に発現する典型的な GPCR であるのに対し、V1b 受容体はラット下垂体前葉細胞や発現細胞株において、多くが細胞内に局在することが判明した。受容体の総発現量を合わせた CHO 細胞株では、未刺激における細胞表面の V1b 受容体数は V1a 受容体の約 1 割程度であった。さらに、V1b 受容体は恒常的に細胞内カルボキシル末端がリン酸化され、アレスチンと相互作用していることが判明した。2) 受容体の内在化機構； V1b 受容体発現細胞では細胞表面の受容体数が少ないにもかかわらず、V1a 受容体発現細胞よりも受容体当たりに換算してより多くの放射性バゾプレッシンを内在化させた。この受容体内在化の過程では、細胞外液の浸透圧と Na⁺を感受していると考えられた。3) 受容体複合体の機能； V1b 受容体欠損マウスでは、熱刺激による逃避行動が遅延し、麻薬性鎮痛薬の耐性獲得も遅延していることより、内因性オピオイド及び投与された麻薬性鎮痛薬に対する感受性が亢進していた。下行性痛覚抑制経路には、V1b 受容体とオピオイド受容体が共存することより、両受容体を発現する細胞株で解析したところ、受容体同士の相互作用によりアデニレートサイクラーゼの superactivation が亢進することが明らかとなった。この作用のためには、V1b 受容体の細胞内カルボキシル基末部分が重要であることが判明した。以上より、V1b 受容体拮抗薬を併用することにより、麻薬性鎮痛薬をより安全に使用できる可能性が示唆された。

抗利尿ホルモンの機能からみた脊椎動物の進化

今野紀文

富山大学大学院理工学研究部生体制御学講座

我々はなぜ、陸上で生きることができるのだろうか？我々の祖先は一体、どのようにして水中から陸上環境へと進出できたのだろうか？その答えのひとつが、我々の祖先が進化という長い時間の中で“水を体内に保持する”という仕組みを獲得したことにある。この“水の保持”に必須のホルモンが抗利尿ホルモンとも呼ばれるバソプレシン（非哺乳類ではバソトシン）である。その名の通り、バソプレシンは腎臓において原尿中の大部分の水を再吸収して体内に戻すという働きをしており、その抗利尿作用は腎臓に発現する V2 受容体と、この受容体を介して調節される水チャネル（2 型アクアポリン：AQP2）によって発揮される。このバソプレシン-V2 受容体-AQP2 系の重要性はその異常が尿を濃縮できずに水を失ってしまう尿崩症という疾患を引き起こすことから明らかである。

では、我々の祖先はいつ、この仕組みを手にしたのだろうか？バソプレシンのオースログであるバソトシンは全ての脊椎動物に存在しているが、V2 受容体は我々が研究を始めるまで両生類以降の動物群でしか見つかっておらず、AQP2 もまた魚類のゲノムに存在していなかった。最近、我々は、四肢動物に最も近縁な魚類として知られる肺魚の腎臓に V2 受容体と、AQP2 と同様の機能を示す新規 AQP 分子（AQP0p）が存在し、“夏眠”という陸生適応時にのみ抗利尿作用を発揮することを見出した[1]。さらに、この分子基盤は肺魚と同じ肉鱗魚類のシーラカンスにも存在した。このことは、V2 受容体を介した抗利尿作用が両生類出現以前の肉鱗魚類ですでに獲得されていたことを示唆している。その一方で、急速に進むゲノム情報の整備により、数種類の V2 様受容体がメダカなどの真骨魚類にも存在することが解ってきた[2,3]。では、これらの V2 様受容体もまた抗利尿作用に関わっているのだろうか？現時点での我々の答えは“NO”である。なぜなら、1) 淡水下では体内への水流入が起こる、2) AQP2 および AQP0p は魚類に存在しない、3) 海水魚の腎臓には遠位尿細管（バソトシン感受性ネフロン分節）が無い、などがあげられる。そこで、魚類での V2 受容体を介したバソトシンの機能を探るため、広塩性魚のメダカを用いて V2 受容体とリンクする輸送体を探索した。その結果、サイアザイド感受性 $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送体（NCC）がメダカの腎臓において V2 受容体と共局在すること、メダカへのバソトシンの投与は腎臓での NCC 発現を増加させ、その作用は V2 受容体アンタゴニストの投与によって阻害されることが明らかとなった。淡水魚のメダカにとって、塩類の保持は体液浸透圧を維持する上で必要不可欠であることから、バソトシンが V2 受容体を介して NCC の発現を制御し、塩類の保持に働いているという結果は理に適っていると考えられる。つまり、淡水魚にとって、バソトシンは“抗ナトリウムホルモン”であるのかもしれない。では、海水魚ではどうなのか？と、疑問は尽きないが、生じた疑問をひとつひとつ解決していくことで、バソトシン/バソプレシンの機能の本質に迫りたいと考えている。

[1] Konno et al. *Endocrinology* 2010; 151: 1089-1096.

[2] Konno et al. *Peptides* 2010; 31: 1237-1239.

[3] Yamaguchi et al. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012; 178: 519-528.

下垂体後葉ホルモン受容体の分子進化

○山口陽子^{1,2}、海谷啓之³、今野紀文⁴、宮里幹也³、内山実⁴、兵藤晋²

¹ ハワイ大学海洋生物学研究所

² 東京大学大気海洋研究所・生理学分野

³ 国立循環器病研究センター研究所・生化学部

⁴ 富山大学大学院理工学研究部（理学）

哺乳類の脳下垂体神経葉（後葉）ホルモンであるバソプレシン（VP）とオキシトシン（OT）は、異なる組織で多彩な機能を発揮する。それを可能にするのが3種類のVP受容体（V1aR、V1bR および V2R）と1種類のOT受容体（OTR）である。これら受容体は発現組織やリガンド結合能に加えて下流のシグナル伝達経路に違いがあり、V2Rは二次情報伝達物質としてcAMPを、その他の受容体はCa²⁺を用いる。後葉ホルモンの機能を理解するためには、ホルモン分子の挙動に加え、こうした受容体の特性を把握することが必要不可欠である。

複数のホルモン分子と受容体で構成される現在の後葉ホルモン系は、どのような過程を経て、いつ成立したのだろうか。これまでの研究から、現生無顎類（円口類）がVP属ホルモンのみを持つのに対し、顎口類はVP属・OT属の両方を持つことがわかっており、OT属ホルモンは無顎類から顎口類への進化の過程でVP属から生じることが示唆されている。受容体に関しては、硬骨魚類以上の分類群で上記の4種類が確認されていることから、今日の後葉ホルモン受容体ファミリーが脊椎動物の進化のかなり早い段階で形成されたことが伺える。しかしそこに至る過程やタイミング、特に唯一cAMP経路とカップルしたV2Rがどのように出現したのかは不明であった。鍵を握るのは、これまで研究の進んでいなかった無顎類、および現生顎口類の中で最初期に分岐した軟骨魚類（サメ・エイ）である。我々は近年、軟骨魚類で唯一全ゲノムデータが公開されているゾウギンザメに着目し、その後葉ホルモン受容体を網羅的にクローニングした。その結果、V2Rと高い配列相同性を有しながら、細胞内情報伝達にCa²⁺を用いる新規VP属受容体を発見し、既知のV2RをV2aR、新規受容体をV2bRと命名した（Yamaguchi et al., 2012）。詳細な機能・分子系統・シグナル解析により、V2bRが円口類から鳥類までの分類群に広く存在し、既知のV2aRと他の後葉ホルモン受容体を繋ぐ進化上のミッシングリンクであることが判明した。本講演では、ゾウギンザメでの研究と新規受容体V2bRを軸に、後葉ホルモン受容体の分子進化に関する最新の知見を紹介する。

発表要旨

最優秀発表賞候補者演題および一般演題

最優秀発表賞候補者演題：6 演題

一般演題：26 演題

最優秀発表賞候補者演題-1

オスラットの床敷曝露によるメスラット前腹側室周囲核 (AVPV) キスペプチンニューロンの活性化および LH 分泌の増強作用

○渡辺雄貴^{1,2}、井上直子¹、池上花奈^{1,2}、上野山賀久¹、東村博子¹

1. 名大院生命農 2. 学振特別研究員

ラットやヤギ、ヒツジなどの哺乳動物において、フェロモンなどオス由来の化学物質によりメスの黄体形成ホルモン (LH) の分泌が増加することが報告されている。この LH 分泌の増強作用は、オスの存在下で確実に排卵する為に有効だと考えられる。本研究では、生殖を第一義的に制御するキスペプチンニューロンに着目し、オスラットの床敷曝露が、メスラットのキスペプチンニューロンおよび LH 分泌に及ぼす影響を検討した。Wistar-Imamichi 系統成熟メスラットを卵巣除去し、高濃度エストロゲン処置を施した。オスラットを 1 週間飼育したケージからオスラットを取り除いた後、同ケージへメスラットを移し (オス床敷曝露)、その 1 時間後に、メスラットの脳を採取した。キスペプチンニューロンに発現する c-Fos タンパク (神経の活性化マーカー) の発現を免疫組織化学により検討した。さらに、同様の処置を施したメスラットを用い、オス床敷への曝露後から 1 時間間隔で 8 時間採血し、LH サージへの効果を検証した。オス床敷曝露により、メスラットの前腹側室周囲核 (AVPV) において c-Fos を共発現したキスペプチンニューロン数は、未使用の床敷の入ったケージに移したメス (対照群) と比較し、有意に増加した。一方、弓状核においては、c-Fos を共発現するキスペプチンニューロン数に、オス床敷曝露群と対照群との間に有意な差は認められなかった。またオス床敷曝露開始直後より、メスラットにおける血中 LH 濃度が増加し、曝露開始から 8 時間までの LH 濃度曲線下面積および LH サージのピーク値は対照群と比べ有意に高かった。以上の結果より、オスラット由来の化学物質を介した嗅覚刺激によってメスラットの AVPV のキスペプチンニューロンが活性化することで LH サージが増強する可能性が示唆された。

最優秀発表賞候補者演題-2

ガウシアルシフェラーゼの $L\beta T2$ 細胞におけるホルモン分泌アッセイ系の構築への利用

○佐藤一裕¹, 根岸潤², 中倉敬³, 草田智之², 大森由花², 加藤幸雄^{2,4}, 戸村秀明^{2,4}

1 明大院農生命, 2 明大農生命, 3 帝京大医解剖, 4 明大生殖内分泌研

ゴナドトロフ由来の細胞株を用いた実験において、培養液中へのホルモン放出量を測定することは重要である。しかしながら培養液中へのホルモンの放出量は微量である。このような微量のホルモンを測定するためには、RIA や ELISA などのイムノアッセイが従来、用いられてきた。これらの方法は、測定に多くのステップと時間を要するので、これらの方法に加え培養液中のホルモン分泌を簡便且つ継時的に測定するアッセイ系があると便利である。今回我々は、ガウシアルシフェラーゼ(GLuc)に注目した。GLuc は、発現した細胞の外に分泌される特性を持ったルシフェラーゼである。本研究では、GLuc を用いた実験の有用性を明らかにするため、ゴナドトロフ由来の細胞株である $L\beta T2$ を用いて、各種刺激時に培養液中に放出される GLuc の活性測定を行った。初めに、 $L\beta T2$ に GLuc 遺伝子を導入後、GnRH, KC I で刺激し、培養液中に放出された GLuc を発光量として測定した。また同様の実験を、GnRH のアンタゴニストであるアンチド、カルシウムイオンチャネルの阻害剤であるニモジピンをそれぞれ作用させたうえで行い、発光量の変化を測定した。この実験において、GnRH, KC I それぞれの刺激により、培養液の発光量がコントロールと比較して増加した。またアンチドを作用させた場合では、GnRH 刺激による発光量はコントロールと同程度まで抑制されたが、KC I 刺激による発光量の増加には変化が観察されなかった。さらにニモジピンを作用させた場合は、KC I 刺激による発光量がコントロールと同程度まで抑制された。以上のことから、 $L\beta T2$ において、GLuc の一部は、調節性分泌により細胞外に放出されている可能性が示唆された。GLuc を用いたアッセイが、ホルモン分泌の簡便な検出法として利用できる可能性がある。

最優秀発表賞候補者演題-3

成体下垂体前葉の幹・前駆細胞ニッチの単離とその解析

○西村直人¹、吉田彩舟^{3,5}、加藤たか子^{3,4}、加藤幸雄^{1,2,3}

¹明大院・農、²明大・農、³明大・研究知財、⁴明大・生殖内分泌研、⁵学振研究員

近年、成体下垂体にも組織幹・前駆細胞が存在し、組織新生・維持に寄与することが示唆されている。我々は幹・前駆細胞マーカーSOX2 や接着分子 CAR を用いた解析から、密着結合を介した幹・前駆細胞ニッチ(微小環境)が Marginal Cell Layer(MCL)及び前葉実質層のクラスター構造として存在していることを報告している。MCL ニッチは下垂体原基に既に存在しているが、実質層ニッチは生後に構築される。これらのニッチの構造は明確に異なり、ニッチの構築過程や細胞供給機構における、機能的差異に関しても未解明である。本研究では、三次元的構造を維持したニッチの単離が必要であると考え、他の組織に存在するニッチが、周囲と異なる細胞外マトリックスによって維持されている点に着目し、タンパク質分解酵素に対する反応性の違いを利用したニッチの単離を試みた。その結果、下垂体前葉細胞の中に、コラゲナーゼとトリプシンによる段階的な処理でも、分散されない細胞塊の存在を確認した。これら細胞塊は、免疫染色の解析から、細胞塊を形成する全ての細胞が、ホルモン陰性、SOX2 陽性であることを確認した。また、我々がニッチでの存在を確認している膜タンパク質 ephrin-B2, CAR, E-cadherin も陽性であった。さらに、成体下垂体ニッチのうち、実質層ニッチのみで発現を確認している転写因子 PROP1 が陽性であることも確認した。以上のことから、本細胞塊は、実質層ニッチを構造的に維持した状態で単離されたものと考えられる。今後は、MCL の単離を試み、組織新生・維持に関わる2様のニッチの機能的差異に関して研究を行う予定である。

最優秀発表賞候補者演題-4

プロトン刺激によるマウス下垂体細胞株 L β T2 の応答解析

○持丸雄太¹, 新堂真実¹, 西田真実¹, 金子諒¹, 加藤幸雄^{2,3}, 戸村秀明^{1,3}

¹ 明治大学農学研究科生命科学専攻細胞情報制御学研究室,² 明治大学農学研究科生命科学専攻遺伝情報制御学研究室,³ 明治大学生殖内分泌研究所

【背景】下垂体に存在する性腺刺激ホルモン産生細胞 (gonadotropes) は、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH) の合成、分泌を通じて生殖機能を制御している。これらホルモンの合成、分泌は、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)により主に調節されている。近年、オートクリン、パラクリンにより産生された下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)、プロスタグランジン F₂ α やプロスタサイクリンなどが gonadotropes に作用し、LH, FSH の合成、分泌などを調節していることが明らかとなりつつある。これら gonadotropes の機能を調節する GnRH, PACAP やプロスタグランジン刺激は、すべて G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して受け取られている。そこで gonadotropes に発現している GPCR の種類を調べることにより、新たな gonadotropes 機能調節因子が明らかとなる可能性がある。今回我々は、OGR1 と呼ばれる GPCR がマウス下垂体細胞株 L β T2 に発現していることを見出した。この受容体は細胞外プロトンを感じて活性化するという特徴を有する。【目的】プロトン刺激により L β T2 細胞応答が、どのように変化するのかを明らかにする。【方法】酸性化に伴う細胞内カルシウム濃度の変化を、fura2 を用いて測定した。SRE-, NFAT-プロモーターをもつレポーター遺伝子を細胞に導入後、培養液の pH を変化させ、各々のレポーター遺伝子の活性を測定した。【結果】酸性化に伴い、細胞内カルシウムの一過性の上昇が観察された。また SRE-, NFAT-レポーターの活性化の修飾が観察された。【考察】下垂体組織内の局所的な pH の低下が、OGR1 を介して gonadotropes の機能を調節している可能性がある。

最優秀発表賞候補者演題-5

Gene expression analysis of folliculostellate cells in 'transitional zone' of anterior pituitary gland of rat – special relevance to circadian rhythm –

○Rita Maliza¹, Ken Fujiwara¹, Khongorzul Batchuluun¹, Motoshi Kikuchi^{1, 2}, Takashi Yashiro¹, and Tsuyoshi Soji³

¹Division of Histology and Cell Biology, Department of Anatomy, Jichi Medical University School of Medicine, ²Laboratory of Natural History, Jichi Medical University School of Medicine, ³Department of Functional Anatomy, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

The activities of the hormone-producing cells of the anterior pituitary are controlled primarily by hypothalamic hormones via hypothalamo-hypophysial portal circulation and by feedback from peripheral endocrine tissues. In addition to these regulations, Soji's group has proposed a novel regulatory system via folliculostellate (FS) cells, which form cellular network through gap junctions. FS cells are distributed from pars tuberalis to pars distalis, and especially at higher density in 'transitional zone', an anterior region of pars distalis of rat. Their group also found that LHRH stimulates intracellular Ca²⁺ concentration in FS cells of transitional zone (Endocrinology. 2013, 154: 400-9). Interestingly, there is a difference in the LHRH-response of FS cells between tissues sampled in the morning and afternoon. However, molecular mechanism underlying the different LHRH-response is unknown. Purpose of this study is to analyze the mechanisms of LHRH-response in FS cells and to evaluate its relation with circadian rhythm. To analyze gene expression pattern in the transitional zone, we first sampled tissues from adult Wistar rats in the morning (AM group) or afternoon (PM group), and then processed for DNA microarray. We identified 28 down-regulation genes and 30 up-regulation genes in PM group. Next, in order to analyze gene expression in FS cells, we used S100b-GFP-transgenic rats that express GFP specifically in FS cells of anterior pituitary gland. FS cells were purified by FACS and the gene expression was compared with FS cells and other anterior pituitary cells by DNA microarray. From this microarray and AM vs PM group microarray, we extracted the genes that were predominantly expressed in FS cells and also had different expression level between AM and PM group. Furthermore, we determined cells expressing these candidate genes in the transitional zone by means of in situ hybridization. Further studies are needed to clarify the role of these genes in circadian rhythm of LHRH-response in FS cells.

最優秀発表賞候補者演題-6

キンギョ黒色素胞に及ぼす組換えキンギョソマトラクチン (SL) の影響

○南 和希¹, 浜口晃吉², 東 森生³, 小林牧人⁴, 今野紀文², 中町智哉², 松田恒平^{2, 5}

¹富山大・理・生物, ²富山大・院理工・生体制御, ³自治医大・医・解剖学, ⁴国際基督教大・教養・理学, ⁵富山大・院生命融合・生体情報

ソマトラクチン (SL) は、1991 年に発見された成長ホルモン/プロラクチンファミリーに属する魚類特有の腺性下垂体ホルモンであり、下垂体中葉に発現する。キンギョにおいて、SL は 2 分子種 (SL- α と SL- β) 存在するが、SL- α と SL- β の生理機能の異同に関する報告はない。そこで、我々は、キンギョの SL- α と SL- β の生理機能を明らかにすることを目的とした研究を進めており、飼育水槽の明暗により下垂体の各 SL 発現動態が変動し、SL- α mRNA 発現量は黒背景飼育個体において高く、一方、SL- β mRNA 発現量は白背景飼育個体において高いことを見出した。また、黒背景では SL- α 産生細胞の肥大が、白背景では SL- β 産生細胞の肥大がそれぞれ観察され、白背景では細胞内 SL- α 含有量と SL- α 分泌量が有意に減少し、細胞内 SL- β 含有量と SL- β 分泌量が有意に増加した (昨年度本大会にて報告)。今回、キンギョ SL- α および SL- β の組換えタンパク質を作製し、キンギョ鱗の黒色素胞に及ぼす影響を探ったところ、組換え SL- α の添加によって黒色素胞内の顆粒は拡散し、一方、SL- β の添加は黒色素胞内の顆粒の凝集を引き起こした。これらの結果より、キンギョにおいて体色の暗化に SL- α が、明化に SL- β が、それぞれ関与する可能性が示唆された。

一般演題 I-1

ヒト羊膜細胞における activin A と activin B の遺伝子発現

○渡邊和子¹、山中行義¹、岡林武志¹、定方久延²、亀田高志²、峯岸敬²、安部由美子¹

¹ 群馬大学大学院 保健学研究科 生体情報検査科学、² 群馬大学大学院 医学系研究科 産科婦人科学

【背景・目的】早産のもっとも重要な原因として絨毛膜羊膜炎が存在する。絨毛膜羊膜炎の妊婦の羊水中では炎症性サイトカインが増加するが、ヒト組織由来の細胞を含む様々な細胞で、炎症性サイトカイン刺激により activin A 分泌と activin A 遺伝子発現の増加がみられることが報告されている。当研究室でも、グラム陰性菌体成分の LPS と炎症性サイトカイン TNF- α がヒト羊膜上皮細胞からの activin A 分泌を促進することを報告している。一方、activin B については、マウス肝細胞では LPS 刺激により activin B 遺伝子発現が亢進することが、ラット精巢のセルトリ細胞とヒト肺非小細胞癌細胞では、TNF- α 刺激により activin B 遺伝子発現が低下することが報告されており、炎症性刺激による activin B 遺伝子発現の変動は細胞により異なる可能性が推測される。このため、ヒト羊膜上皮細胞を TNF- α で刺激し、activin A 遺伝子 (INHBA) と activin B 遺伝子 (INHBB) の mRNA 発現を解析した。【方法】院内臨床試験審査委員会の承認の下にインフォームド・コンセントを得て、満期帝王切開後の羊膜より羊膜上皮細胞を単離、培養し、TNF- α 添加後の INHBA mRNA、INHBB mRNA 発現量を qPCR により測定した。【結果】絨毛膜羊膜炎の妊婦で検出される TNF- α 濃度において、INHBA mRNA 発現は用量依存的に増加し、TNF- α 0.1 ng/ml 以上で有意な増加を示した ($P < 0.05$)。一方、INHBB mRNA は用量依存的に減少する傾向が認められた。【結論】ヒト羊膜上皮細胞では TNF- α 刺激によって、INHBA mRNA が INHBB mRNA に対し優位な状況となることが示唆された。

一般演題 I-2

Identification of tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases expressing cells in human anterior pituitary gland

○Alimuddin Tofrizal¹, Morio Azuma¹, Takehiro Tsukada¹, Ken Fujiwara¹, Kotaro Horiguchi², Takashi Yashiro¹, Shozo Yamada³

¹Division of Histology and Cell Biology, Department of Anatomy, Jichi Medical University School of Medicine, ²Laboratory of Anatomy and Cell Biology, Department of Health Sciences, Kyorin University, ³Department of Hypothalamic and Pituitary Surgery, Toranomon Hospital

Extracellular matrix (ECM) is essential in tissue physiology. It interacts with cells to mediate cell growth, migration, and differentiation. Arrangement and composition of ECM is unique in each tissue and defines organogenesis, rigidity, and consistency. Compositions of ECM are constantly maintained by production and degradation of constituent molecules. We recently reported that there are many types of collagen-producing cells in the human pituitary gland. On the other hand, the mechanisms of ECM-degradation are still unknown. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) inhibit matrix metalloproteinases, which degrade ECM components. To clarify mechanism for the ECM maintenance in human pituitary gland, we identified the TIMPs expressing cells in normal human pituitary by means of in situ hybridization and immunohistochemistry. Normal parts of pituitary tissue from craniopharyngioma lesions were obtained during surgery at Toranomon Hospital. We performed in situ hybridization for TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 and TIMP-4. TIMP-1 and -2 expressing cells were observed in vascular wall, perivascular space, and parenchyma. Cells expressing TIMP-3 were observed exclusively in vascular wall and in perivascular space, while TIMP-4 mRNA was expressed only in parenchymal cells. In order to characterize TIMP-expressing cells, we added immunohistochemical study for α SMA (pericyte marker), cytokeratin (epithelial cell marker), S-100 protein (folliculostellate cell marker) and pituitary hormones. This is the first report clarifying TIMPs producing cells in normal human pituitary.

一般演題 I-3

ヒト ES 細胞からバソプレシン産生細胞への分化誘導法の検討

○小川 晃一郎¹、須賀 英隆²、水野 正明³、長崎 弘⁴、有馬 寛¹

¹名古屋大学大学院医学系研究科 糖尿病・内分泌内科学、²名古屋大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌内科、³名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター、⁴藤田保健衛生大学医学部 生理学講座

【背景】視床下部-下垂体後葉系の中心的存在であるバソプレシン (AVP) ニューロンは、AVP 分泌量を変化させ浸透圧を精密に制御している。この AVP が枯渇した中枢性尿崩症に対し、現状ではホルモン補充療法を行っているが、ときにコントロールに難渋する場合がある。浸透圧に正しく反応する AVP 細胞が出来れば、これを再生医療に用いて現状の問題点を改善できる可能性がある。2008 年、マウス ES 細胞から視床下部ニューロンへ分化誘導する方法が確立された。次に取り組むべきはヒト AVP ニューロンを得る方法を確立することである。

【目的】ヒト ES 細胞から AVP ニューロンへの分化誘導法を確立する。発生に沿った分化を再現することで、ヒト ES 細胞から視床下部組織全体を誘導することを目指す。

【方法】視床下部は神経管の中で最も吻側から発生するとされる。視床下部分化の初期のマーカーとして Rax が重要である。視床下部は更に背側と腹側とに分かれ、それぞれ Pax6 および Nkx2.1 が発現する。背側視床下部からは Otp を経て AVP が発現する。分化誘導法の検討においてもこれらをマーカーとして活用した。神経管の吻側の誘導に適するとされる gfCDM を用いて浮遊培養を行った。

【結果】マウス ES 細胞の場合とは異なり、gfCDM のみではヒト ES 細胞が分化しなかったため、培地の調整を行い、Rax が高効率に発現する条件を得た。次に腹側および背側を作り分ける条件を検討し、背側視床下部からは Otp が発現することを確認した。更に分散培養を行うことで神経分化を促し、AVP ニューロンを免疫染色にて確認した。しかし現状では分化効率が低く、今後の改良を要する。

一般演題 I-4

Vasopressin receptor 1b regulates cell growth and promotes neurite outgrowth in PC12 cells

○Kyaw Htet Aung, Kazuaki Nakamura, Akito Tanoue

Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development

The neurohypophysial hormone arginine vasopressin (AVP) is essential for a wide range of physiological functions, including water reabsorption, cardiovascular homeostasis, hormone secretion, and social behavior. These and other actions of AVP are mediated by at least three distinct receptor subtypes: V1a, V1b, and V2. AVP action through V1b receptor is known to regulate social memory and social aggression in rodents. However, it is largely unknown how V1b receptor contributes to the regulation of these behaviors. Since alterations in connectivity in neuronal circuits has been postulated to be a critical step in social behavioral deficits, we here examined the role of V1b receptor in the formation of neurite outgrowth, which is indispensable for shaping neuronal circuit, by using rat PC12 pheochromocytoma cells. PC12 cells can be differentiated into neuron-like cells with elongated neurites by exposing to neurotrophic factors. Interestingly, we found that nerve growth factor (NGF) treatment, which is well known to induce neurite outgrowth in PC12 cells, decreased the gene expression level of V1b receptor in a dose-dependent manner, implying the involvement of V1b receptor in the formation of neurite outgrowth in PC12 cells. To address this possibility, we used V1b receptor antagonist or siRNA against V1b receptor to suppress the activity of V1b receptor in PC12 cells. We found that blocking or knock down of V1b receptor inhibits cell proliferation and promotes neurite outgrowth in PC12 cells. Moreover, these deactivations of V1b receptor promote the formation of neurite outgrowth induced by NGF. These data suggest that V1b receptor plays an important role in neurite outgrowth formation through regulation of cell proliferation, and downregulation of V1b receptor might alter the cell status from a proliferative phase into a differentiation phase.

一般演題 I-5

バソインヒビンによる血管内皮細胞と心筋細胞への影響解析

○持永亮、中村恵理、平井里奈、松本彩香、中嶋亮順、針谷敏夫
明治大学大学院 農学研究科 生体機構学研究室

バソインヒビン (Vi) は、プロラクチンからアスパラギン酸プロテアーゼによって産生される N 末端側約 16kDa のペプチド断片である。Vi は血管内皮細胞に対して、抗血管新生作用やアポトーシス誘導作用、血管拡張阻害作用などを持つ。また Vi は様々な疾病に関与していることが報告されており、周産期心筋症 (PPCM) もその一つである。PPCM とは、心疾患の既往がなかった女性が妊娠、出産を契機に心不全を発症する妊娠関連疾患である。その発症機構は未だ明らかになっていない。近年、Vi が血管内皮細胞を介して心筋細胞の代謝障害を誘導することが報告されたことから、Vi の抗血管新生作用と心筋細胞障害作用により PPCM が発症するという仮説が立てられた。

本研究では、Vi と血管内皮細胞、心筋細胞との 3 者の関連性を明らかにするために、以下の 2 点に着目し研究を行った。①血管内皮細胞における遺伝子発現に対する Vi の影響を検証するため、Vi 添加培養後のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において、血管新生促進因子である内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) と低酸素刺激誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、抗血管新生因子である可溶性 Fms 様チロシンキナーゼ (sFlt-1)、細胞障害因子である腫瘍壊死因子 α (TNF- α) とインターロイキン 6 (IL-6) の mRNA 発現の有無、発現量を解析した。②血管内皮細胞との共培養条件による心筋細胞のアポトーシス、細胞肥大に対する Vi の影響を検証するため、単一培養および HUVEC との共培養条件下のラット心筋芽細胞株 (H9c2) に Vi 添加後、アポトーシスと細胞肥大を解析した。

その結果、Vi によって HUVEC の iNOS、TNF- α 、IL-6 遺伝子発現が増加し、eNOS 遺伝子発現が減少した。また、単一培養および共培養ともに、Vi は H9c2 のアポトーシス、細胞肥大に影響を与えなかった。

以上の結果から、Vi は血管内皮細胞に対して細胞障害因子の発現を誘導するが、心筋細胞に対してアポトーシス、細胞肥大誘導作用を持たない可能性が示唆された。

一般演題 I-6

AMPK 経路を介した LHβ 鎖発現抑制

○ 森山隆太郎¹, 山崎翼¹, 中井愛¹, 加藤たか子², 加藤幸雄²

¹近畿大生命科学, ²明治大院・農

【目的】我々は、マウス下垂体のゴナドトロフが性腺機能を制御するエネルギーセンサー細胞であると考え、グルコース拮抗利用阻害剤 2-deoxy-*D*-glucose (2DG) 暴露により、そのセンシングに重要な AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化が誘起されることをゴナドトロフ株化細胞 LβT2 で観察している。本研究では、LHβ 鎖発現における AMPK リン酸化の役割を検討した。

【方法】AMPK 活性化剤である 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) に暴露した LβT2 細胞を用いて、*Lhb* mRNA 発現量を real-time PCR 法で測定した。さらに、ラット *Lhb* 遺伝子の転写開始点上流を pSEAP2-Basic に組み込んだベクターを用いて、AICAR 暴露時のレポーターアッセイと、2DG 暴露時の細胞内 Ca²⁺濃度の測定を行った。

【結果】AICAR 暴露時の *Lhb* mRNA は、暴露前に比べて減少傾向を示した。そして、AICAR 暴露時のプロモーター活性を調べると、*Lhb* の転写開始点-2527bp から-2198bp の領域で AICAR 暴露群による統計的有意なプロモーター活性の低下が観察された。また、細胞内 Ca²⁺濃度測定を測定した結果、2DG 暴露により細胞内 Ca²⁺の上昇が観察された。以上より、AMPK のリン酸化は *Lhb* 遺伝子の転写開始点上流の-2527bp/-2198bp に作用し、転写を抑制することが明らかとなった。また、2DG 暴露により細胞内 Ca²⁺の上昇が観察されたことから、Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase 経路の関与が示唆された。

一般演題 I-7

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA)はレチノイン酸合成酵素 (RALDH)を誘導し GnRH 発現を抑制する

○スガハツル ウルヅヤルガ、金崎春彦、ミヅドルヅ ツエルメグ、折出亜希、鈴木伸吾、原 友美、京 哲
島根大学医学部産科婦人科

【目的】 昨年の本研究会ではヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA)は下垂体ゴナドトロピン FSH β サブユニットを特異的に発現させ、同時にレチノイン酸合成酵素 (RALDH)を増加させることを報告した。今回我々は GnRH 産生ニューロンにおける TSA の作用について検討し、キスペプチン及びレチノイン酸の効果についても併せて検討した。

【方法】 GnRH 産生 GT1-7 細胞を用いた。TSA 刺激による GnRH 発現の変化、RALDH 発現をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。キスペプチン、レチノイン酸及びレチノイン酸受容体阻害剤、レチノイン酸代謝阻害剤の効果も併せて検討した。

【結果】 TSA は GT1-7 細胞において濃度依存的に GnRH mRNA 発現を抑制した。キスペプチンは GnRH 発現を変化させず、TSA による GnRH 減少にも影響を与えなかった。TSA は RALDH1 及び RALDH2 を共に増加させたが、キスペプチンにこの作用はなかった。GT1-7 細胞をレチノイン酸で刺激すると、GnRH mRNA 発現は有意に抑制された。レチノイン酸受容体アゴニスト BMS493 及びレチノイン酸代謝阻害剤 Liazole は TSA による GnRH 抑制に影響を与えなかった。

【結語】 GnRH 産生細胞において TSA は分化促進酵素である RALDH を発現させ、レチノイン酸を合成する事で GnRH 発現を抑制していると推測したが、その作用機序は依然不明である。

一般演題 I-8

ラット胎児脳神経初代培養細胞を用いた GnRH 及び kisspeptin 発現の検討

○折出亜希、金崎春彦、ジドルジ ツエルメグ、スクバツタル ウルジヤルガル、原 友美、鈴木伸吾、京 哲

島根大学医学部産科婦人科

【背景と目的】視床下部キスペプチンニューロンは HPG-axis の最上位に位置し、GnRH 分泌を制御しているとされる。しかしながら、GnRH 産生ニューロン株 GT1-7 細胞においてキスペプチンは ERK 及び cAMP/PKA 経路を活性化させるが、GnRH 発現を変化させない。今回我々はラット胎児脳神経細胞の初代培養を行い、GnRH 及びキスペプチン発現について検討した。

【方法】妊娠 16-18 日ラットの子宮より胎児を取り出し、胎児全脳を採取して初代培養を行った。この初代培養細胞を用い、エストラジオール、キスペプチン (KP-10)、GnRH 刺激による GnRH 及びキスペプチン mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。

【結果】まずラット胎児脳神経初代培養細胞に GnRH 及びキスペプチンが存在する事を免疫染色で確認した。エストラジオールを初代培養細胞に添加すると、キスペプチン mRNA 発現は有意に増加した。一方 GnRH mRNA 発現はエストラジオールで変化しなかった。ラット胎児脳神経初代培養細胞を KP-10 で刺激すると GnRH mRNA 発現は約 1.5 倍に増加した。また KP-10 刺激でキスペプチン mRNA 発現は約 2.2 倍に増加した。GnRH 刺激では GnRH mRNA 発現が約 1.8 倍に増加、キスペプチンは約 1.4 倍に増加した。

【考察】キスペプチンは GnRH 発現を促進するものの、その変化はドラスティックなものではなかった。しかしキスペプチンは GnRH ニューロン及びキスペプチンニューロン自身に作用し、GnRH 及びキスペプチン発現に関与している可能性がある。GnRH も同様に、GnRH ニューロン及びキスペプチンニューロン双方に作用するのではないかと考えられた。

一般演題 I-9

性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) のパルス状分泌に関する kappa opioid receptor (KOR) 発現細胞の局在解明

○高橋 宙大¹, 中村 翔¹, 戴 明道¹, 後藤 哲平², 平林 真澄², 上野山賀久³, 東村博子³, 前多 敬一郎¹

¹東大獣医繁殖, ²生理研, ³名大・生殖科学

哺乳類の生殖機構は、視床下部-下垂体-性腺軸によって制御されている。視床下部からの GnRH のパルス状分泌は、下垂体からの黄体形成ホルモンのパルス状分泌を促し、雌では卵胞発育、雄では精子形成を引き起こすと共にステロイド合成を制御する。GnRH のパルス状分泌をさらに上流で制御と考えられているキスペプチンニューロンは、視床下部弓状核 (ARC) に局在する。同ニューロンは、neurokininB (NKB) と dynorphin (Dyn) という 2 つの神経ペプチドを共発現しており、KNDy ニューロンと呼ばれている。NKB は KNDy ニューロンの活動を促進する一方、Dyn は抑制することから、この 3 つの神経ペプチドがパルス状 GnRH 分泌の発生に関与していると考えられる。NKB 受容体である NK3R は KNDy ニューロン自身に発現しているが、Dyn 受容体である KOR は KNDy ニューロンに発現しておらず、パルスの発生に重要と考えられる KOR 発現細胞の局在や KNDy ニューロンとの連絡等は不明である。

本研究では GnRH パルス発生メカニズムの解明を目的とし、KOR 発現細胞の局在を明らかにしようとした。KOR のプロモータ領域の末端に蛍光蛋白質 Venus の配列を結合させた遺伝子を導入し、Tg ラットを作製した。この第一世代成熟雌の Tg ラットの脳を灌流固定し、凍結切片を作成後、GFP 抗体および神経細胞マーカーである NeuN 抗体を用いた二重免疫染色を行った。その結果、パルス状分泌の中核と考えられる ARC および視床下部室傍核において、Venus の発現が観察され、この KOR を発現すると考えられる細胞は神経細胞であることが示された。今後は、in situ hybridization により Venus 陽性細胞が KOR 発現細胞であることを示すとともに、本細胞を同定していく予定である。

一般演題 II-1

下垂体組織の領域化に関わる ephrin-B2 と対合 Eph の解析

○吉田彩舟^{1,5}、西村直人²、染谷昌亮³、菅野尚子²、西原大翔²、加藤たか子^{1,4}、加藤幸雄^{1,2,3}
¹明大・研究知財、²明大院・農、³明大・農、⁴明大・生殖内分泌研、⁵学振研究員

下垂体にも幹・前駆細胞が存在し、組織新生・維持に寄与している。我々は下垂体の幹・前駆細胞の微小環境(ニッチ)が Marginal cell layer(MCL)と前葉実質層の2種類の領域であること、また、それらニッチの制御因子として細胞間接触型シグナル分子 ephrin-B2 とその受容体 EphB3 の存在を報告している。一方で、ephrin/Eph は種々の組織において、組織の領域化や移動に寄与することが知られている。そこで、本研究では、下垂体の組織形成とニッチ形成における ephrin/Eph の関与を調べた。まず、下垂体発生過程における ephrin-B2 の局在解析の結果、ephrin-B2 は下垂体原基であるラトケ嚢において、MCL と将来の隆起葉であるロストラルチップ(RT)に存在していた。次に、ephrin-B2 の対合分子の一つである EphB2 の局在を解析すると、EphB2 は RT を除く主部に存在し、ephrin-B2 と EphB2 間での住み分けが観察された。一方で MCL に存在する ephrin-B2 は、発生初期から別の対合分子である EphB3 と、cis-(不活性)型の存在様式を示した。しかし、ephrin-B2 陽性の幹・前駆細胞が MCL から実質層へ移動する際には、EphB3 陰性となり、実質層のニッチに定着すると EphB3 の発現が再確認された。

以上から、ephrin-B2 は下垂体の形成において、EphB2 との組み合わせにより RT の領域化に関与し、一方で EphB3 による ephrin-B2 シグナルの不活性化はニッチの形成と定着に関与することが示唆された。

一般演題 II-2

下垂体前葉の生後発達における S100 β 陽性細胞の挙動とその制御機構の解明

○堀口幸太郎^{1,2}、館野こずえ¹、藤原研³、塚田岳大³、八子英司⁴、長谷川瑠美¹、瀧上 周¹、大迫俊二¹、屋代 隆³、加藤たか子^{2,5}、加藤幸雄^{2,4,5,6}

¹杏林大・保健、²明治大・生殖内分泌研、³自治医大・医・解剖（組織）、⁴明治大・院・農研、⁵明治大・研究知財、⁶明治大・農

下垂体前葉に存在する S100 β タンパク質陽性細胞 (S100 β 陽性細胞) は、非ホルモン産生細胞の一つである。突起状の細胞質を伸ばしホルモン産生細胞を取り囲み、同種細胞間で接着して偽濾胞を形成するなどの特徴があり、濾胞星状細胞とも呼ばれる。その機能は、幹細胞の可能性や貪食能、ホルモン産生調節、ギャップ結合を介した情報伝達など様々な報告がある。S100 β 陽性細胞の発生は、生後 10 日ごろに前葉内に出現することで観察でき、その後、移動・増殖して前葉内に広がり、生後 30 日ごろに成体と同じような配置に定着すると考えられていた。一方、我々は最近、胎児期に一部の S100 β 陽性細胞が下垂体前葉外から侵入し、前葉内に定着することを示唆するデータを得ている。いずれにしても、S100 β 陽性細胞がどのような制御により前葉内を移動・増殖・定着するかは不明である。そこで本研究では、S100 β 遺伝子のプロモーター領域下に GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックラットを利用し、生後 5 日齢の下垂体を切片培養し、タイムラプス撮影を行った。その結果、前葉内に出現した S100 β 陽性細胞が移動・増殖する挙動を観察することができた。そして、細胞の移動・増殖を制御する転写因子である SLUG を S100 β 陽性細胞が発現し、その発現量は生後 10 日ごろにピークを迎えることが明らかとなった。以上から、生後初期の S100 β 陽性細胞は、SLUG を発現することで移動・増殖し、前葉全体に広がり、成体下垂体前葉の形成に寄与していることが示唆された。

一般演題 II-3

マウスにおける異型および異所性プロラクチンに関する研究

○諸星和紀、生駒直也、眞野彩織、宮川勇太郎、山野辺一貴、中島亮順、針谷敏夫
明治大学大学院 農学研究科 生体機構学研究室

プロラクチン(prolactin: PRL)は主に脳下垂体前葉で合成・分泌される約 23kDa のペプチドホルモンである。PRL には通常の分子量とは異なる異型 PRL と下垂体以外の場所で合成・分泌される異所性 PRL が存在する。当研究室の過去の実験において、マウスの乳腺、心臓において分子量が約 24.5kDa に増加した PRL が発見された。分子量の増加を伴う翻訳後修飾には糖付加、リン酸化、二量体化された異型 PRL が候補としてあげられる。このうち、二量体化、リン酸化については分子量が大きく異なるため、今回発見された 24.5kDa PRL は糖付加を受けた異型 PRL ではないかと考えた。また、24.5kDa PRL は下垂体では発現しておらず、乳腺や心臓に存在していることから、異所特異的に発現しているタンパク質であるという仮説をたてた。

本研究では 24.5kDa PRL が糖付加 PRL であることを検証するためにトリフルオロメタンスルホン酸を用いて化学的に脱グリコシル化を行った。その後、ウェスタンブロット法にて PRL タンパク質の検出を行ったところ、分子量が 24.5kDa から 23kDa へ減少したことを確認した。また、過ヨウ素酸-シッフ塩基反応によって糖タンパク質の染色を行ったところ、脱グリコシル化したサンプルでは発色が認められなかった。これらのことから 24.5kDa PRL は糖鎖修飾を受けている可能性が示唆された。

加えて、乳腺、心臓以外の未経産、妊娠、泌乳、離乳期の末梢組織での 24.5kDa PRL タンパク質の存在を検証するために、ウェスタンブロット法を行ったところ、全ての時期の子宮、卵巣、脾臓、膵臓に関しても 24.5kDa PRL の存在が確認された。同時に、それぞれの組織においての PRL mRNA を RT-PCR 法を用いて検証したところ、組織ごとにバラつきはみられるものの発現を確認することができた。

これらのことから 24.5kDa PRL は糖付加 PRL であり、異所特異的に発現していることが示唆された。

一般演題 II-4

下垂体での神経堤由来細胞の時空間的局在解析

○上春浩貴^{1,5}、吉田彩舟^{2,5}、菅野尚子¹、西村直人¹、西原大翔¹、加藤たか子^{2,3}、加藤幸雄^{1,4}
¹明大院・農、²明大・研究知財、³明大・生殖内分泌研、⁴明大・農、⁵学振研究員

成熟後の下垂体ホルモン産生細胞の供給には、下垂体幹細胞が不可欠である事が明らかとなってきた。我々は、下垂体特異的転写因子 PROP1 が胎仔期より下垂体に存在し、下垂体幹・前駆細胞で機能している事を報告している。また、生後より前葉に出現する S100 β についての成熟下垂体で PROP1 との共存を調べると、PROP1 陽性細胞の 8 割以上が S100 β 陽性であった。これは、胎仔期には存在しない PROP1/S100 β 二重陽性細胞が成熟後の幹・前駆細胞として機能している事を示唆しており、幹細胞の性質が胎仔期と異なる可能性が示された。一方、神経堤細胞は、様々な組織に侵入し、組織の形成や成熟後の再生に関与する事が知られており、昨年度の本学会で神経堤細胞マーカー遺伝子 SOX10 陽性の細胞が成熟下垂体に存在することを報告した。本年は、SOX10 陽性細胞の下垂体での時空間的局在解析の結果を報告する。

SOX10 陽性細胞は、ラット胎齢 21.5 日に後葉吻部に出現し、生後 3 日 (P3) では局在を尾部まで広げていた。P15 では中葉にも出現し、細胞の増殖、分化が盛んな第二次成長期後期から終了後 (P15 から P30) にかけて、SOX10 陽性細胞の存在比が増加していた。前葉では、P3 で少数の SOX10 陽性細胞が尾部で確認され、成熟後まで少数が存在するのみだった。S100 β との共存を調べると、P15 から P30 の間に、中葉に存在するほぼ全ての SOX10 陽性細胞が S100 β と共存するようになり、局所的に SOX10/PROP1/S100 β 三重陽性細胞が存在した。前葉でも、P3 から成熟下垂体まで、SOX10/PROP1/S100 β 三重陽性細胞が存在していることが明らかとなった。

以上より、神経堤細胞が生後の下垂体幹・前駆細胞の一部を担う可能性が示された。

一般演題 II-5

コクサッキーウイルスとアデノウイルスの共通受容体 CAR の胎仔期と成体における局在解析

○陳黙¹、菅野尚子²、加藤たか子^{1,4}、加藤幸雄^{2,3,4}

¹明大・研究知財、²明大・院、³明大・農、⁴明大・生殖内分泌研

膜受容体 CAR は、多様な生物種でその存在が確認されており、種間で高い保存性が維持されている。CAR の発現は個体発生の初期に高く、胚発生の進行に伴い広範な組織での発現が確認され、様々な生理機能に関与するという報告がある。我々は、CAR が、細胞間接着を介して、下垂体の幹細胞ニッチ形成に関与することを明らかにした。今回、さらに下垂体以外の組織における CAR の発現様式について報告する。

我々は、ラットの胎仔期 13.5 日齢と生後 60 日齢の組織について、CAR、幹・前駆細胞マーカー SOX2、E-cadherin などの抗体を用いて、免疫組織化学を行った。その結果、胎仔期の CAR は、胚葉の由来を超えて、多くの組織原基で発現し、SOX2 或いは E-cadherin と共存していた。それらの組織での CAR の局在は、管腔に面する単層の細胞のアピカル側に極性を示すものと、実質層細胞のバソラテラル側に極性を示さないものが観察された。成体においても、胎仔期の管腔に面して存在する CAR の局在は維持され、その多くは成体幹・前駆細胞として存在し、一部は幹細胞ニッチを形成していた。一方、極性を示さない CAR の局在は脳の脈絡叢、肝臓の実質細胞、精巣のライディッヒ細胞、精原細胞と精母細胞、精子に観察された。興味あることに、卵巣の生殖上皮、顆粒層細胞、そして卵母細胞の膜上にも CAR の局在が確認された。

以上、CAR は胚葉を超えて、多くの組織原基の幹・前駆細胞の一部で発現し、成体においても、様々な組織に存在し、その多くは幹・前駆細胞であった。しかし、CAR の細胞膜における極性は、組織あるいは細胞によって異なり、このことが CAR の多様な機能を反映していると推測される。

一般演題 II-6

ラット下垂体成熟過程における転写因子 Prop1 の DNA メチル化解析

○西原大翔¹、吉田彩舟^{3,5}、菅野尚子¹、西村直人¹、上春浩貴^{1,5}、加藤たか子^{3,4}、加藤幸雄^{1,2,3}
¹明大院・農、²明大・農、³明大・生殖内分泌研、⁴明大・研究知財、⁵学振研究員

【背景】転写因子 Prop1 は、下垂体組織特異的に発現し、発生過程において下垂体形成と下垂体前葉のホルモン産生細胞の分化に重要な役割を果たしており、この遺伝子の発現制御機能の解明は、下垂体形成の理解に必須である。本発表では、胎仔期 (E) 13.5 日と出生後 (P) 30 の両組織における DNA メチル化解析を行ったので、昨年度の本学術集会の結果に追加して、報告と考察を行う。

【材料と方法】ラット E13.5 のラトケ嚢と P30 の下垂体前葉および中・後葉、非下垂体組織として E13.5 および P30 の肝臓を摘出し、DNA を抽出後、バイサルファイトシーケンス法によってメチル化パターンを解析した。

【結果・考察】E13.5 のラトケ嚢の Prop1 は、肝臓と比較して転写開始点上流約-2.6kb 周辺、転写開始点上流近位からイントロン 1 までの領域が低メチル化状態であった。また、PROP1 陽性細胞率が低い P30 の下垂体前葉と中・後葉においても、それら領域の低メチル化状態は維持されていた。興味深いことに、本研究でみられた下垂体組織特異的に低メチル化状態の領域には、唯一 Prop1 因子として同定されている RBP-J の結合配列が存在していた。また最近、我々が、Prop1 遺伝子の制御因子の候補としている SOX2 および下垂体の複数の転写因子の結合配列も、それら低メチル化領域に存在していた。以上の結果から、DNA メチル化による制御は PROP1 の発現が始まる胎仔期に起こっており、転写制御因子と関連し Prop1 の組織的な発現に関与することが示唆される。

一般演題 II-7

ラット発情前期下垂体におけるアネキシン A5 関連核内受容体 Nr4a3 の発現調節

○寺島涼太、久留主志朗、汾陽光盛

北里大学獣医生理学研究室

性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)によって合成の促進されるアネキシン A5 (ANXA5) の欠損マウス下垂体で、Nr4a3 の発現が増強されること、GnRH が Nr4a3 発現を促進し、Nr4a3 が FSH β mRNA 発現を抑制すること、更にラット下垂体の Nr4a3 発現が発情前期の 14 時から 17 時に顕著に増加することを明らかにしており、そのゴナドトロピンサージへの関与が示唆される。本研究では、ラット下垂体における発情前期の Nr4a3 発現調節機序を調べるとともに、Nr4a3 発現に対する ANXA5 の影響を検討した。発情前期の 11 時あるいは 14 時に GnRH 受容体拮抗薬セトロリックスを投与すると、LH 分泌は抑制されたものの、Nr4a3 発現に変化は認められず、急性の GnRH の関与は無いと考えられた。一方、発情前期の 10 時から 11 時の間に卵巣を摘出すると、14 時の Nr4a3 発現は基底レベルまで低下した。ところが、発情前期の 11 時あるいは 14 時にエストロゲン受容体拮抗薬 ICI 182 720 を投与しても、発情前期の 10 時から 11 時の間に卵巣を摘出したラットに Estradiol-17 β を投与しても 14 時の Nr4a3 発現に影響しなかった。下垂体の ANXA5 発現は、発情前期の 11 時から 23 時にかけて増加し続けた。マウスゴナドトロフ細胞株 L β T2 に GnRH 作動薬を持続投与すると、Nr4a3 発現が有意に促進されたが、ラット ANXA5 発現ベクターをトランスフェクションすることで有意に抑制された。以上の結果から、下垂体前葉の Nr4a3 発現が発情前期午後に卵巣由来の因子によって増加することが明らかになり、更に ANXA5 発現の増加によって Nr4a3 発現の増加の終了していることが示唆された。これらの変化がこの時期に観察される FSH β mRNA 発現増加に関与していることが示唆された。

一般演題 II-8

Relocalization of pituitary annexin A5 during augmented hormone secretion

○Numfa Fungbun, Ryota Terashima, Shiro Kurusu and Mitsumori Kawaminami
Veterinary Physiology, Kitasato University

Annexin A5 (ANXA5), a member of annexin family proteins, is predominantly expressed in the pituitary gonadotropes and gonadotropin releasing hormone (GnRH) stimulates the expression of ANXA5. We have already demonstrated that ANXA5 is involved in GnRH-stimulated gonadotropin secretion. As a signal sequence is not composed within the mRNA sequence of ANXA5, ANXA5 has been assumed as an intra-cellular protein. However, it has also been demonstrated that ANXA5 acts extracellularly in various occasions. In the present study, we aimed to clarify whether GnRH would induce the externalization of ANXA5 during LH secretion. We first examined the distribution of ANXA5 in the pituitary gland after non-specific stimulation with high concentration of potassium ion. Hemi-pituitary organ culture was challenged with 50 mM KCl and tissues were collected at 10 and 30 minutes of incubation. The pituitary tissues were also stimulated with GnRH agonist. Tissue specimens were observed with a confocal microscope after the immunohistochemistry with anti-ANXA5. High K treatment induced obvious plasma membrane association and peripheral accumulation of ANXA5. Intensive accumulation of ANXA5 between cells was striking. GnRH agonist also elicited similar effect on ANXA5 distribution but lesser extent. As a second approach, the relocation of ANXA5 was examined during a physiological hormone release. ANXA5 was also shown to accumulate to plasma membrane and nuclear envelope of gonadotropes during LH surge of proestrous rats (17:00 h) by double staining immunohistochemistry with anti-ANXA5 and -LH β . The intense distribution at plasma membrane and nuclear envelope were diminished at 23:00 h of proestrus. Finally, we examined the extracellular ANXA5. Pituitary tissues were rinsed with a medium with or without EDTA. The washout was subjected to SDS-PAGE and Western-blotting. EDTA augmented the quantity of ANXA5 in the washout, suggesting calcium dependent association of ANXA5 to the outer-surface of cells. High K stimulation of cultured pituitary tissues resulted in the increase of EDTA-extracted ANXA5. GnRH agonist did not show an apparent increase of extracellular ANXA5. It was confirmed that extracellular ANXA5 is increased by a non-specific stimulation with high K. As GnRH agonist showed similar effect on the relocation of ANXA5 and the relocalization was observed when LH surge occurs, GnRH is suggested to stimulate externalization of ANXA5 at the gonadotropes. It is suggested that the externalization and relocation to the nuclear envelope of ANXA5 would be a part of mechanisms by which ANXA5 augments GnRH stimulated LH release.

一般演題 II-9

38歳で原発無月経を期に診断された Prader-Willi 症候群の一例

○近藤朱音^{1,2}、中奥大地¹、村上雅博¹、高橋千果²、森根幹生¹、和泉俊一郎²、前田和寿¹

1. 国立病院機構 四国こどもとおとなの医療センター 産婦人科、2. 東海大学医学部 産婦人科

はじめに：Prader-Willi 症候群(PWS)は視床下部の機能障害が原因と思われる乳児期早期の筋緊張低下と摂食障害、また乳児期後期～小児期早期に始まる過食と病的肥満症を特徴とする症候群である。一般的に低身長、特徴的顔貌、斜視、側彎をしばしば認める。多くの症例で成長ホルモン不全があり、筋形成を阻害し基礎代謝を低下させていることが肥満とも関連している。運動発達や言語発達が遅れ、性腺機能低下症を認めることも多い。肥満の患者におけるインスリン非依存性糖尿病も特徴の一つである。

症例：38歳0経妊0経産。右橈骨骨折に対して近医整形外科で手術をしたが、原発性無月経のため婦人科医の診察を受けたところ、低身長・肥満・糖尿病・軽度の精神発達障害を認めため先天性異常を疑われ、精査目的に当院紹介となった。当院の初診時診察所見では身長：128cm、体重：62kgと低身長、肥満(BMI：37.8)であった。また歩行は可能であるが、筋力は弱い印象であった。乳房発育 Tanner 分類II～III、陰毛発達 Tanner 分類IIと二次性徴が乏しく、子宮は小さく卵巣も描出困難であり性腺機能低下症であると想定された。血液検査、内分泌検査にて明らかな異常はなかったものの特徴的な顔貌などから Prader-Willi 症候群であることが疑われた。確定診断のため SNRPN プローブを用いた FISH 法による染色体解析を行い診断に至った (46,XX. ish del(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-))。

考察：Prader-Willi 症候群は特異的な症状があるものの現代においても成人してから診断される例は少なくない。本症例においても乳児期より症状があり、その後も無月経、糖尿病など介入するタイミングはあったと考えられるが診断に至っていなかった。早期診断により理学療法、成長ホルモン投与や性腺機能低下についての内分泌治療、栄養指導などその後の予後の改善につながる治療を開始することは重要であると考えられる。そのためにも特徴的な顔貌など気になる点がある場合には専門医と連携することが望ましいと考えられた。

一般演題 III-1

メラニン凝集ホルモンは成長ホルモン遺伝子発現の調節因子か？

○伊東快朔、笠木聡、水澤寛太、天野勝文、高橋明義
北里大学 海洋生命科学研究科 魚類分子内分泌学研究

【目的】近年、背景色は魚類の成長に影響を与えることがわかってきた。サクラマスにおいて白背景水槽で飼育した個体は黒背景水槽で飼育した個体よりも成長が早い。この現象には成長を促進させるホルモンのひとつである成長ホルモン(GH)が関わる可能性がある。そこで本研究ではサクラマスと同じサケ科魚類であるニジマスをもしくは白背景水槽内で飼育し、GH 発現レベルの違いを検討した。また、体色調節ホルモンであるメラニン凝集ホルモン(MCH)の発現レベルは一般に背景色に応じて変動する。そこで、本実験環境下において背景色が MCH 発現レベルに影響するか否かあわせて検討した。

【材料と方法】2014 年 11 月および 2015 年 4 月に、ニジマスを背景色と給餌条件の異なる 4 水槽(黒背景給餌、白背景給餌、黒背景絶食、白背景絶食)中で 10 個体ずつ 15 日間飼育した。飼育後、脳と下垂体を採取して、total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により下垂体内 GH mRNA と脳内 MCH mRNA を定量した。

【結果と考察】脳内 MCH mRNA 量は、給餌条件と絶食条件のいずれにおいても白背景群の方が黒背景群に比べて高かった。GH mRNA 量は、11 月の実験では給餌条件下において白背景群の方が黒背景群よりも高かったが、4 月の実験では差はなかった。また、黒背景条件下において絶食条件下の方が給餌条件下よりも高かった。哺乳類と魚類において、一般的に絶食は GH の産生と分泌を高めることが知られている。本実験の結果は、ニジマスにおいて GH の発現が摂食条件のみならず背景色条件に対しても変化することを示唆する。また、背景色に対する GH の発現応答には MCH が関与する可能性が考えられる。

一般演題 III-2

キンギョの情動行動に及ぼすコレシストキニン脳内投与の影響

○飯沼直人¹、中町智哉¹、今野紀文¹、松田恒平^{1,2}

¹富山大・院理工・生体制御、²富山大・院生命融合・生体情報

コレシストキニン (CCK) は末梢や中枢神経系に広く存在し、摂食行動を制御することが知られている。また、室傍核から下垂体後葉への投射が認められることから、後葉ホルモンの分泌制御が示唆されている。さらに、近年、げっ歯類において情動行動の調節因子としても機能することが明らかになってきた。しかしながら、非哺乳類における精神運動活性に及ぼす CCK の影響に関する知見はない。先行研究において、CCK は終脳、視蓋および視床下部などの領域に広く発現していることから、精神運動活性に影響を及ぼすことが考えられた。そこで本研究では、キンギョをモデルとして、遊泳運動量と情動行動に及ぼす CCK の影響を探ることを目的とした。

キンギョ脳室内に 8 残基のアミノ酸より構成される硫酸化 CCK (CCK-8s) の 1、2.5 及び 5 pmol/g 体重を投与したところ、円形水槽における遊泳量は有意に増加した。遊泳量はセロトニン 10 pmol/g 体重の投与やセロトニン再取り込み阻害薬フルオキセチン 2 pmol/g 体重の投与で有意に減少した。一方、中枢型ベンゾジアゼピン受容体インバーサアゴニスト FG-7142 の 10 pmol/g 体重の投与で有意に増加したことから、CCK-8s の遊泳量増加作用は精神生理学的影響の結果である可能性が考えられた。キンギョは水槽の暗所や下部を好む性質を有することから、暗所と上下の選好テストを用いて、暗所と上下選好に及ぼす CCK-8s の影響を探った。その結果、CCK-8s の 5 pmol/g 体重の投与により FG-7142 を投与した時の結果と類似して水槽暗所や下部に留まる時間が有意に延長した。CCK-8s の作用 (不安惹起様作用) は、CCK 受容体アンタゴニストのプログルミド 50 pmol/g 体重の投与によって消失した。

これらの結果より、CCK-8s はキンギョの遊泳量を高め、不安様行動を誘発する作用を有することが初めて分かった。

一般演題 III-3

Synchronized expression of kisspeptin and its receptor genes in the diencephalon and pituitary of grass puffer during a lunar cycle

○Md. Shahjahan and Hironori Ando

Sado Marine Biological Station, Faculty of Science, Niigata University

Grass puffer is a semilunar-synchronized spawner; spawning occurs on beach only for several days around new moon and full moon from spring to early summer. In our previous study, kisspeptin (*kiss2*) and kisspeptin receptor (*kiss2r*) genes in the brain and pituitary showed seasonal variations during the reproductive cycle with massive expression during spawning season (Shahjahan et al., 2010; Ando et al., 2013). Besides, during the spawning periods, *kiss2* and *kiss2r* genes showed daily and circadian fluctuations in expression in the hypothalamus (Ando et al., 2014). These evidences suggest that the *kiss2/kiss2r* may be important for the semilunar-synchronized spawning in grass puffer and their expressions may be regulated by lunar cycle during the spawning period. Therefore, to investigate the role of kisspeptin in the lunar synchronized spawning, lunar age-dependent variation in expressions of *kiss2* and *kiss2r* genes were examined by quantitative real-time PCR in grass puffer. Mature fishes were kept in aquarium under natural light/dark condition in a lunar month during the spawning period. The diencephalon and pituitaries were collected at 5 days interval at Zeitgeber time (ZT) 9 (middle of photoperiod) and ZT18 (middle of dark period). Both *kiss2* and *kiss2r* showed lunar variation with a peak at lunar age 10 at ZT9 and lunar age 15 at ZT18 in the diencephalon and pituitary. These specific expressions of *kiss2* and *kiss2r* genes may be important to control the precisely-timed semilunar spawning of the grass puffer.

一般演題 III-4

性行動中枢の雄性化／脱雌性化におけるキスペプチンの役割

○中村翔¹、上野山賀久²、池上花奈²、戴明道¹、高橋宙大¹、平林真澄³、東村博子²、前多敬一郎¹

1 東京大学大学院農学生命科学研究科、2 名古屋大学大学院生命農学研究科、3 生理学研究所

哺乳類の脳の基本型は雌型であるが、雄では発達期にテストステロンの感作により脳が雄性化および脱雌性化し、雄型の脳へと変化することが知られている。げっ歯類の雌は雌型性行動のロードシスを示すが、雄では抑制されており（脱雌性化）、雄は雄型性行動としてマウント行動を示す（雄性化）。これまでに Kiss1 KO ラットの性行動解析によりキスペプチンは性行動中枢の雄性化および脱雌性化に必要であることを明らかにしてきた。本研究は、キスペプチンが雄において性行動中枢を雄性化および脱雌性化する作用機序を解明することを目的とした。Kiss1 KO ラットの雄が発達期にテストステロンを分泌しているか検証するため、胎生 18 日および出生直後の個体から採血した。その結果、Kiss1 KO ラットの雄は野生型の雄と同様の血漿中テストステロン濃度を示し、発達期のテストステロン分泌はキスペプチンに依存せず分泌されることが明らかとなった。次に、成熟後の Kiss1 KO ラットの性行動の異常が、性成熟期以降に分泌されるテストステロンの欠如によるものか検証した。性成熟前の 32 日齢より Kiss1 KO 雄ラットへテストステロンを継続的に投与すると、マウント行動が回復した。一方、同処置を施しても Kiss1 KO ラットの雄ではロードシスは抑制されなかった。これらのことからキスペプチンは性成熟期に HPG 軸を活性化することによりテストステロン分泌を促進し、性行動中枢を雄性化すると考えられる。キスペプチンを出生直後に皮下投与すると、Kiss1 KO ラットの雄でのみ成熟後にロードシスが抑制された。同処置を施しても雌ではロードシスが抑制されなかったことから、性行動中枢の脱雌性化にはキスペプチンおよびキスペプチンに依存しないテストステロンが協同で作用する必要があると考えられる。これまで注目されてきた生殖内分泌系のみならず、キスペプチンには性に特有の性行動を発現するためにも重要な役割を有することが示唆された。

一般演題 III-5

ラット下垂体前葉における M2 マクロファージの同定

○矢田部 恵¹、藤原 研¹、Tofrizal Alimmudin¹、屋代 隆¹、西村 智²、永井良三³

1. 自治医科大学医学部解剖学講座（組織学部門）、2. 自治医科大学分子病態治療センター分子病態研究部、3. 自治医科大学

下垂体前葉にはホルモン産生細胞以外にも、濾胞星状細胞をはじめとする多様な細胞種が存在することが分かってきており、それらの細胞の役割が注目されている。前葉には定常的にマクロファージが存在することは報告されているが、その詳細な性質及び機能についてはほとんど不明である。マクロファージは機能的に少なくとも二種類に分類される。すなわち、古典的マクロファージとして知られる M1 型と、組織修復や免疫抑制、腫瘍における血管形成などに関わる M2 型である。本研究の目的は、ラット下垂体前葉においてけるマクロファージの性状を明らかにすることである。また、エストロゲン誘発プロラクチノーマモデルラットを用いてプロラクチノーマ形成過程でのマクロファージの動態についても検討した。観察に用いたラットは Wistar 系雄ラットもしくはプロラクチノーマモデルとして diethylstilbestrol (DES) を処理した LEXF ラットである。M1 マクロファージを iNOS、M2 マクロファージをマンノース受容体 (MR) の抗体を用いた免疫組織化学により細胞同定を行った。さらに電子顕微鏡により微細構造の観察をおこなった。その結果、正常ラット下垂体前葉において血管周囲腔に pan マクロファージのマーカーである CD68 免疫陽性細胞をみとめた。この細胞は、iNOS 陽性 (M1 マクロファージ) もしくは MR 陽性 (M2 マクロファージ) であることが分かった。電子顕微鏡により MR 陽性細胞は微細構造上、多数の小胞と大型のライソソームを持つことが明らかとなった。興味深いことに、DES 処理 4 週間後の下垂体で M2 マクロファージの著しい増加が観察された。これらの結果から、本研究によりラット下垂体前葉に M1 型と M2 型マクロファージが存在し、後者はエストロゲン誘発プロラクチノーマでその数が増加することが明らかとなった。今後、この細胞の機能を明らかにしていく必要がある。

一般演題 III-6

Neuronatin は Ca²⁺濃度を調節する細胞内小器官に局在し下垂体の分化に寄与する

○菅野尚子¹, 樋口雅司^{2,3}, 吉田彩舟⁴, 八子英司⁴, 陳黙^{2,3}, 上春浩貴^{1,5}, 西村直人¹, 西原大翔¹, 加藤たか子^{2,3}, 加藤幸雄^{1,6}

¹明大院・農, ²明大・研究知財, ³明大・生殖内分泌研, ⁴学振研究員 PD, ⁵学振研究員 DC1,

⁶明大・農

Neuronatin タンパク質 (NNAT)は新生仔マウスの脳で同定され、最近では Ca²⁺濃度調節を介して ES 細胞から神経細胞への分化に関わる事が報告されている。我々は、以前の本学術集会で、ラット胎仔期下垂体の SOX2 陽性幹/前駆細胞が Nnat を発現し、ホルモン産生細胞への分化過程で消失することを報告した。

今回、出生後の下垂体における NNAT 陽性細胞の解析と、下垂体由来株化細胞 LβT2 を用いた細胞内局在の解析結果を報告する。

出生後の NNAT 陽性細胞は、出生後 60 日では、出生直前の 45.1%から 0.03%へと激減していたが、その陽性細胞の 23%が SOX2 陽性であり、その他の多くは SOX2 陽性細胞に近接して存在していた。また、コミットメントマーカー PIT1 に陽性を示す NNAT 陽性細胞は 33%であり、胎仔期と同様に分化過程における Nnat の発現維持が確認された。さらに、Nnat を発現するゴナドトロフ由来の LβT2 を用いた、YFP を融合させた細胞内局在化ベクターによる NNAT の細胞内局在の解析では、既報の小胞体に加え、細胞内 Ca²⁺貯蔵を担う小胞体と密接に関係するミトコンドリア、リソソーム、ペルオキシソームで観察されたが、ゴルジ体には局在しなかった。さらに、その局在化には、NNAT の N 末端疎水性領域が重要であることも判明した。従って、細胞内 Ca²⁺濃度の調節を担う小器官に局在し、下垂体の細胞分化に寄与すると推察された。

一般演題 III-7

下垂体 ACTH 細胞における微小管構成タンパク質 α チューブリンアセチル化修飾の役割

○中倉敬, 萩原治夫

帝京大・医・解剖

微小管の構成タンパク質である α チューブリンは様々な翻訳後修飾を受けることで細胞の形態維持や増殖、細胞内輸送といった微小管機能の調節に関わることが知られるが、その一方でアセチル化についてはその修飾部位が微小管内腔に面していることもあり、役割について不明な点が多い。私たちはこれまでに、下垂体から分泌されるストレス適応ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の産生細胞における下垂体形成に対する役割や細胞増殖メカニズムについて分子形態学的に研究を進めてきたが (Nakakura et al., Cell Tissue Res., 2006; Nakakura et al., J Histochem Cytochem., 2010)、ごく最近になり副腎を除去したラット下垂体 ACTH 細胞で α チューブリンのアセチル化が増加することを見出した。この結果から、下垂体への副腎からのネガティブフィードバック調節と α チューブリンのアセチル化修飾の間に何らかの機能的関連があることを示唆しているが、その意義は不明である。 α チューブリンのアセチル化の役割が未だ不明なことを考えると、ACTH 細胞に着目して解析を進めればアセチル化修飾を介した微小管の新しい機能を明らかにできる可能性が高い。このため本研究では、マウス下垂体 ACTH 細胞株 AtT20-D16/F を用い、 α チューブリンアセチル化酵素 (α TAT1) および脱アセチル化酵素 (HDAC6) に対するノックダウン実験を行った際のホルモンの合成・分泌や遺伝子発現を調べ、ACTH 細胞における α チューブリンアセチル化の役割について解析を進めた。

一般演題 III-8

ヒト胚性幹細胞から下垂体 ACTH 細胞への分化誘導法

○須賀英隆^{1,2}、大曾根親文^{2,3}、笠井貴敏³、水野正明⁴

1：名古屋大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌内科、2：理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、3：名古屋大学大学院医学系研究科 糖尿病・内分泌内科学、4：名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

我々は現在、ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）から、下垂体前葉組織への分化培養法確立を目指している。多能性を示す未分化状態 ES 細胞を刺激して分化を促す方法は多種類が報告されているが、大別すれば、培養皿上に接着した二次元状態で誘導する場合と、三次元の細胞塊を浮遊形成させて分化誘導をかける場合とがある。我々は、胎児内での発生を再現することで目的組織を得るという基本方針を採用し、それに適すると考えられる三次元立体培養を選択した。

一般に、胎児発生において下垂体原基（ラトケ嚢）は、視床下部神経組織と口腔外胚葉組織とが相互作用した結果形成される。我々が以前開発したマウス ES 細胞での分化誘導法を元に誘導条件を改変し、ヒト ES 細胞塊においても、視床下部様組織と口腔外胚葉様組織とが同時誘導される条件を見出した。ラトケ嚢様組織形成も観察された。これらの形成には、BMP および Fgf シグナルが必要と判明した。両シグナルは胎児でのラトケ嚢発生において重要であり、我々の誘導法が生体分化と似ているとすることができる。

引き続き、ラトケ嚢様組織を長期培養し、ACTH 産生細胞を得ることに成功した。ヒト ES 由来 ACTH 細胞は、試験管内で CRH に反応し、糖質コルチコイドでネガティブフィードバックを受けることを確認した。これを下垂体機能不全モデルマウスに移植すると、生存率が改善した。また、GH 産生細胞の誘導にも成功し、現在その性質を検討中である。

今後の技術展開は様々な方向性が考えられるが、当面は、世の趨勢に従って、再生医療実現に向けての技術開発に注力する。我々の誘導で得られる細胞塊内には下垂体前葉細胞のみならず視床下部神経も含まれるため、下垂体のホルモン産生細胞だけを選別する方法が必要である。ACTH 細胞や GH 細胞の選別に適した表面抗原など、会場の皆様の知恵を拝借できれば幸いである。

若手企画：夢・希望・現実 -研究を続けようか迷う君へ-

オーガナイザー： 中町 智哉（富山大学）、藤原 研（自治医科大学）

企画主旨

本研究会に参加している学部生、大学院生の中には、研究に興味があっても、研究者として働くことに不安を感じている方も多いのではないのでしょうか。また、研究職を志望する方の中にも、どのような過程を経て研究職に就くのか？ ポストドクターになったが、その先は？ 研究職の生活の実態は？ など多くの疑問を抱えている人も少なくないでしょう。本企画は、学部生、大学院生に、研究職の具体的なイメージを持って頂きたく、複数の研究室を渡り歩いてきた若手・中堅研究者の先生方に、これまでの経験や現在の研究内容について紹介して頂きます。

日時 8月5日 21:00 ~ 22:00

会場 ホテル黒部 「本陣」

演者経歴

* 山口 陽子（ハワイ大学海洋生物学研究所・ポスドクトラルフェロー）

神奈川県川崎市出身。学部時代のテーマはイモリ視細胞の電気生理学（筑波大学・中谷敬研究室）。その後、東京大学大気海洋研究所の兵藤晋先生の下で、軟骨魚類（サメ・エイ）の体液調節機構とその内分泌制御に関する研究で修士・博士号を取得。かねてより親交のあった現所属の E. G. Grau 先生の申し出により、ハワイでポスドクになって現在4年目。魚類の淡水適応ホルモンであるプロラクチンの制御機構を研究中。

* 中町 智哉（富山大学理工学研究部・助教（テニュアトラック））

石川県金沢市出身。富山大学理学部生物学科に入学し、松田恒平先生の下で修士課程まで魚類の摂食行動に関して研究した。その後、基礎医学を学ぶため、昭和大学医学部の塩田清二先生の下でマウスにおける神経ペプチド PACAP の機能解析について研究を進めて学位を取得し、ポスドクターを経て助教となった。その後、母校に戻る道を選択し、富山大学理工学研究部のテニュアトラック制度の助教として脊椎動物における PACAP の機能解析を進めている。

* 佐藤 貴弘（久留米大学分子生命科学研究所・准教授）

宮城県出身。東北大学農学部（山口高弘（故人）教授）にて、反芻家畜における下垂体前葉細胞の分化機構について研究を進め、学位を取得した。その後、久留米大学分子生命科学研究所（児島将康教授、グレリンの発見者）にてポスドクとして研究を開始し、グレリン遺伝子欠損マウスを作出した。また、このマウスの解析を通してグレリンの生理作用を明らかにし、現在に至っている。

* 井田 隆徳（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・准教授）

宮崎大学農学部出身で、村上昇先生のもとでペプチドの機能解析をして学位を取る。また、国立循環器病センターに出向中、ペプチド探索にはまってしまった。昨年、テニュアトラックを経て晴れて PI とし研究室を構えた。

謝辞

日本下垂体研究会第30回学術集会の開催にあたり、ご寄付、広告掲載ならびにご協賛いただきました団体、各社に感謝申し上げます。

株式会社アミノアップ化学

エーザイ株式会社

大塚製薬株式会社

冠元富山会

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

第一三共株式会社

武田薬品工業株式会社

帝人ファーマ株式会社

富山県酒造協同組合

並木薬品株式会社

株式会社日立ハイテクノロジーズ

株式会社ペプチド研究所

(五十音順)

本学術集会の一部は富山県並びに黒部市からの助成による

