

第 36 回日本下垂体研究会学術集会

プログラム・講演要旨集

会 期： 2022 年 8 月 8 日(月)～8 月 10 日(水)
会 場： 東海大学 山中湖セミナーハウス
(山梨県南都留郡山中湖村山中 323-1)
会 長： 亀谷 美恵 (東海大学 医学部 基礎医学系分子生命科学領域)
実行委員長： 關 敏郎 (東海大学 医学部 内科学系腎臓内分泌内科学)

「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デスクで会費納入案内をお受け取り下さい。今回スタッフは常駐しませんので、会費はゆうちょ銀行の口座にお振込み願います。会費納入状況については、メールで事務局（[阿見彌典子 namiya@kitasato-u.ac.jp](mailto:namiya@kitasato-u.ac.jp)）にお問い合わせください。特に評議員の先生方にはご自身の所属と会費状況の確認とともに、所属学生の異動の有無や会費納入状況の確認をお願いいたします。

育英基金は、事務局長から適宜対象者にお渡しいたします。

目 次

会長挨拶	4
開催要領	6
日程表	13
プログラム	14
<講演要旨>	25
特別講演	27
スペシャルトーク	29
吉村賞受賞講演	31
教育講演	33
シンポジウム①	35
シンポジウム②	43
最優秀発表賞候補演題	49
一般演題	57
謝辞	77

ご挨拶

この度、第36回日本下垂体研究会学術集会を、令和4年8月8日より8月10日の会期で、東海大学山中湖セミナーハウスにて開催する運びとなりました。

当初はコロナウイルス感染も収束の傾向となり、安心して対面方式で開催できると考えておりましたが、昨今の急激な感染拡大により、対面方式にするか、遠隔方式にするかについて、幹事の先生方にお諮りし、万全の準備をして対面式で行うことといたしました。決定が遅れまして、皆様には多大なご心配をお掛け致しました。

これまでの本研究会のコンセプトといたしまして、同じ研究の志を持つメンバーが、忌憚らない意見を交換し、協力して次世代を教育していくということを大事にしてきたことは、新参者の私にもとても印象的であり、また、私自身も大切にしたいと考えました。

今回、本大会の開催をお引き受けするにあたり、私にできることを深く考えてみました。東海大学で学生教育に従事してきた経験からも、対面でなければ指導できない部分を感じておりましたことから、できる限り、本大会を、実際の交流の場としたいと考えました。

また、下垂体について素人同然である私にとって、研究分野間の交流はどうすべきかというのが、本研究会の会員とさせていただいた時からの私のテーマでもありました。私は当時、妊娠免疫とがん免疫の類似性と相違点について研究を開始しており、がん患者を妊娠免疫の機構を用いて治療する方法を模索しておりました。そして、様々な妊娠関連タンパク質について考えておりましたが、下垂体研究に触れることによって、ステロイドに注目するようになりました。大変面白いことに、ヒト胎盤は、大量のプロゲステロンを産生しますが、その産生調節はHPA軸の支配を受けないことが報告されています。そして、胎盤は、胎児が母体のHPA軸支配を逃れる様にプロゲステロンでバリアーを形成しているのです。もちろん、グルココルチコイドも胎盤の酵素により非機能的な分子となる点で、バリアーが形成されているといえます。

この様に、自分の研究についてHPA軸との関連性を考えることによって、重要な新しいテーマが見出せる可能性もあると考えました。そのため、今回のシンポジウムでは、どちらかという下垂体自身の分化や分泌機能ではなく、外部環境とのクロストークという点でシンポジウムをご提案させていただきました。また、一般演題については、下垂体自身の性状解析、下垂体ホルモンと環境、下垂体ホルモンと生殖・繁殖、下垂体と臨床、機能研究に有用な新規研究手法、の5つに分類させていただき、この順でお話いただくことといたしました。

シンポジウム、特別講演、スペシャルトークなど、多くの先生方によるご講演については、

幹事の先生方にご推薦いただき、またご依頼を助けていただきまして、各先生方のご快諾いただくことができました。心より御礼申し上げます。また、最優秀発表賞候補演題、一般演題共に多くのお申し込みをいただきましたことにも、深謝いたします。

また、ポスターに書かれております「富士山を仰ぎながら、夢を語ろう」というのは、北里大学の高橋明義先生よりいただいたお言葉です。目標を高く持って、楽観的に、胸襟を開いて話そうとのことだと思えます。世界情勢も日本国内も多くの問題が山積しておりますが、ひるまず目標を立てて進んでいきたいものです。

今回の研究集会が、下垂体及びそれに関連する様々なテーマの研究の世界を拓く一助となることを願ってやみません。

第 36 回日本下垂体研究会学術集会

会長 亀谷 美恵

(東海大学医学部客員准教授)

第 36 回日本下垂体研究会学術集会 開催要項

1. 会期

2022 年 8 月 8 日(月)

幹事会、最優秀発表賞候補演題、シンポジウム①、教育講演、
フリートーク

2022 年 8 月 9 日(火)

一般演題、スペシャルトーク、吉村賞受賞講演、フリートーク

2022 年 8 月 10 日(水)

シンポジウム②、特別講演、最優秀発表賞授賞式

2. 会長

亀谷 美恵／東海大学 医学部 基礎医学系分子生命科学領域

3. 実行委員長

關 敏郎／東海大学 医学部 内科学系腎臓内分泌内科学

4. 会場

東海大学山中湖セミナーハウス

〒401-0501 山梨県南都留郡山中湖村山中 323-1 TEL. 0555-62-4100

<http://yamanakako.pr.tokai.ac.jp>

5. 学術集会事務局

東海大学 医学部 基礎医学系分子生命科学領域 (担当：杉山)

〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143 TEL. 0463-93-1121

感染予防のお願い

新型コロナウイルス感染症に関しましては、本学術集会では、政府、自治体、関係諸機関等から示される正確な情報の収集に努めるとともに、感染拡大の防止に細心の注意を払い、実施してまいります。会場へお越しいただく皆様におかれましても、手洗いやマスクのご準備など、感染防止策へのご理解とご協力をいただけますよう、何卒よろしくごお願い申し上げます。

感染防止対策として、参加者の皆様が安心してご来場いただけますよう、以下の取り組みを実施いたします。

<ご来場に際して>

- ・マスクのご準備、手洗い、うがいなど、適切な感染防止策を心がけてください。
- ・感染症対策のため、スリッパの用意がございません。必ず館内履きをご持参ください。
- ・恐縮ですが、8月4日(木)以降の陰性証明書をお取りください。
- ・37.5度以上の発熱、倦怠感や呼吸症状、味覚嗅覚障害がある方、または、開催日より14日以内に日本の入国規制国・地域への渡航歴がある方は、ご来場を控えてください。

<受付>

- ・8月8日(月)12時よりセミナーハウス入口にて受付を開始いたします。
- ・受付時に手指消毒をお願い致します。
- ・学生は受付の際、学生証を提示してください。
- ・受付時に「陰性証明書」の提出をお願いいたします。
- ・セミナーハウス入口で検温を実施します。37.5度以上の発熱がある方は、ご来場を控えてください。
- ・セミナーハウス宿泊の方は、宿泊費を大会当日に受付でお支払いください。その上で名札と要旨集をお受け取り下さい。

<会場内でのお願い>

- ・セミナーハウス内に消毒液を準備しております。感染予防のため、随時お使いください。
- ・マスク着用をお願いいたします。

- ・講演会場では適切な座席間隔を確保しています。
- ・講演時に利用したマイクは、使用ごとに除菌シートで消毒いたします。
- ・会場内は定期的に空気の入れ替えをいたします。
- ・お食事を提供するセミナーでは、なるべくお早目にお食事をお済ませの上、お食事後は速やかにマスクのご着用をお願いいたします。お食事中的の会話は控えください
- ・マスク会食にご協力ください。

<体調不良者について>

・来場された当初は体調が良かったにも関わらず、翌日以降、体調不良になった方については、来場を見合わせ、タクシーなどのご帰宅をお願いいたします。また、セミナーハウスは貸切りで、部屋は一部確保していますので、山中湖セミナーハウス宿泊者で体調不良者が出た場合は、発症していない方に部屋を移動していただきます。また、同室の先生の体調をお伺いいたします。ご面倒ではありますが、部屋にウィルス付着物がある可能性があるため、ご参加の先生方のご健康を保つための対応ですので、ご理解ください。

その後、COVID-19 を発症したかどうかを必ず事務局までご連絡ください。出席された先生方でも、会期中は異常がなかったが、1週間以内に COVID-19 を発症した場合は、必ず事務局までご連絡ください。

お名前は出しませんが、リスクのある先生方には個別にご連絡申し上げ、かつ、HPにて感染者が出た旨、周知したいと思います。

万一感染者が発生した場合の拡大防止のため、政府・自治体からの情報提供を求められた場合は、個人情報の取扱いに十分注意しつつ、必要に応じて、参加者の方の個人情報を提供いたしますので、予めご了承のうえご参加ください。

参加者へのご案内

1. 参加登録

事前に日本下垂体研究会のホームページより参加登録フォームに必要事項を記入の上、参加申し込みを行ってください。オンデマンドのみの参加者も参加登録を行ってください。

<https://www.jichi.ac.jp/jspr/2022/>

2. 受付

大会当日は、8月8日(月)12時より会場入り口にて受付を開始いたします。名札と要旨集をお受け取り下さい。

3. 参加費

現地参加者	5,000円
On-Line参加者	1,000円
学生	1,000円

※参加者は、事前に指定の銀行口座にお振込みください。

《振込先》

口座名：日本下垂体研究会学術集会 学会事務局

振込先：三井住友銀行 厚木支店

口座番号：普通口座 9012513

※振込手数料は各自ご負担願います。

4. 昼食

8月9日(水)の昼食は、ランチオンセミナーのお弁当を用意します。

5. 宿泊

セミナーハウスに宿泊される方は原則として相部屋となりますが、なるべく同じ研究室の方同士になるように部屋割りを組ませていただきます。

宿泊費は一泊2食付き5,500円(税込)となり、受付時に事務局にお支払いください。現金にて釣銭がないようにご協力をお願いいたします。部屋割りは当日の受付時にお知らせいたします。

6. フリートーク

新型コロナウイルス感染防止の為、通常行われる File on the desk、懇親会およびエクスカーションは実施いたしません。その代替企画として、8月8日(月)および9日(火)の夕食後(19:00~21:00)にセミナールームを開放しフリートークを実施します。両日とも自由参加になりますので、ふるってご参加ください。

7. 発表方法

<現地発表>

一般演題の発表時間は質疑応答を含め10分を予定しております。会場にはWindows10を搭載したPCを用意します。Macをご利用の方は、ご自身のPCをお持ち込みください。

また、MS PowerPoint2016で動作確認したファイルをご準備ください。

作製したPowerPointファイルは、USBメモリーに保存して、発表の当日朝に事務局までお持ちください。ご協力をお願いいたします。

<On-Line発表>

事前につながるかの確認をさせていただきます。

8. 最優秀発表賞

最優秀発表賞の演題は、最優秀発表賞審査要綱に沿って審査されます。

授賞式は、最終日に行います。

9. 交通案内

🚉 電車利用の場合

JR 御殿場線 御殿場駅下車。富士急バスにて山中湖村役場前下車、徒歩15分

🚌 バス利用の場合

新宿(中央高速バスターミナル)から富士急バスにて山中湖村役場前下車、徒歩15分

🚗 車を利用の場合

○東名高速道路—御殿場ICから国道138号線または東富士五湖道路で山中湖村へ

○中央高速道路—河口湖 IC から国道 138 号線または東富士五湖道路で山中湖村へ

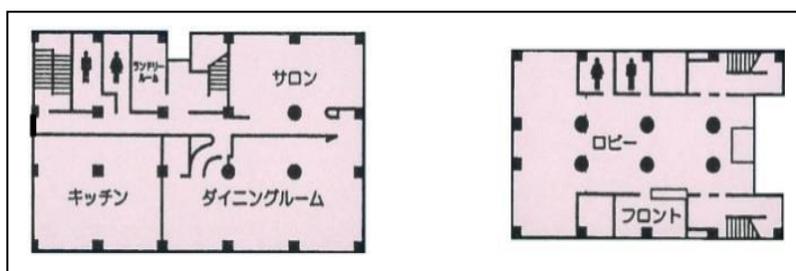


10. 会場案内図 東海大学山中湖セミナーハウス

1階 ロビー、ダイニングルーム

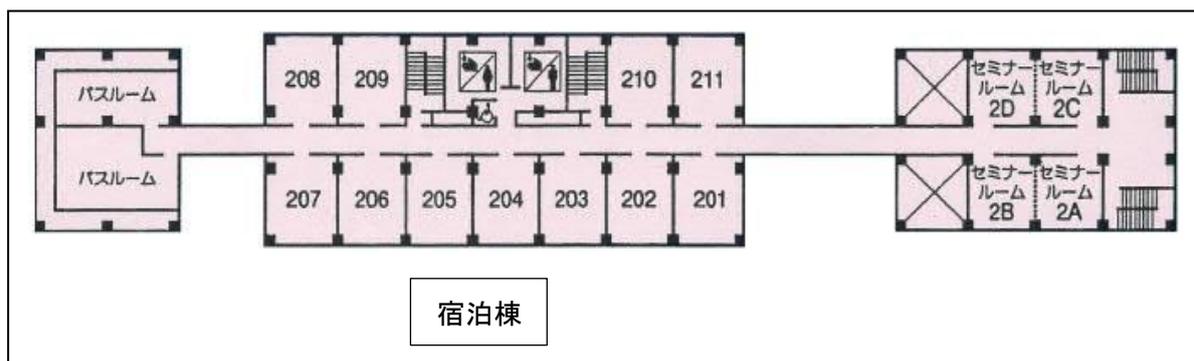
※ダイニングルームへは2階の宿泊棟の階段から行くことができます。

◆食事時間 朝食：7:30～8:30 夕食：18:00～19:30



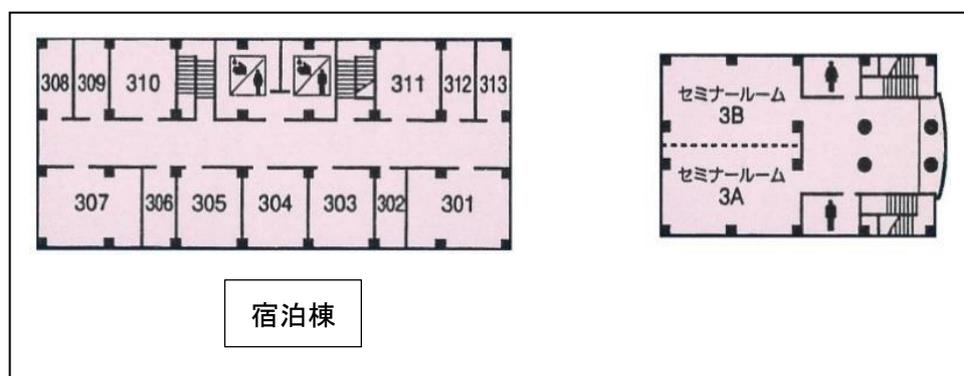
2階 セミナールーム、宿泊棟、バスルーム

※バスルームの入浴時間は16:00～22:00になります。



3階 セミナールーム、宿泊棟

※3階の宿泊棟へは2階の宿泊棟の階段から行くことができます。



日程表

	8月8日(月)	8月9日(火)	8月10日(水)
8:00			
9:00		9:00-9:30 一般演題1 3題	8:30-10:20 シンポジウム②
		9:30-10:00 一般演題2 3題	
10:00		休憩 10:00-10:10	
		10:10-10:40 一般演題3 3題	休憩 10:20-10:30
		休憩 10:40-10:50	10:30-11:20 特別講演
11:00	11:00-12:00 幹事会	10:50-11:30 一般演題4 4題	
		休憩 & 写真撮影 11:30-12:00	
			休憩 11:20-11:30
			11:30-11:40 最優秀発表賞授賞式
			11:40-11:50 次回会長の挨拶
			11:50-12:00 閉会の挨拶
12:00	受付	12:00-13:00 スペシャルトーク	
	12:55-13:00 開会挨拶		
13:00	13:00-13:50 最優秀発表賞候補演題 1	休憩 13:00-13:10	
		13:10-13:40 評議委員会・総会	
	休憩 13:50-14:00	13:40-14:20 吉村賞受賞講演	
14:00	14:00-14:40 最優秀発表賞候補演題 2	休憩 14:20-14:40	
	休憩 14:40-15:00		
15:00	15:00-15:50 シンポジウム①	14:40-15:30 一般演題5 5題	
	休憩 15:50-16:00		
16:00	16:00-16:50 シンポジウム①	15:30-18:00 自由時間	
	休憩 16:50-17:00		
17:00	17:00-18:00 教育講演		
18:00	夕食	夕食	
19:00			
20:00	フリートーク	フリートーク	
21:00			

プログラム

8月8日(月):1日目

12:55～13:00 開会の挨拶

亀谷美恵 (東海大学 医学部 分子生命科学)

關敏郎 (東海大学 医学部 腎臓内分泌科学)

13:00～14:40 最優秀発表賞候補演題発表

13:00～13:50 第1部

座長:藤原 研 (神奈川大学 理学部 生物学科)

1. 「ラット下垂体におけるサイロスティムリン α サブユニット(Gpa2)発現細胞の同定」

峯 萌葉(神奈川大学大学院 理学研究科)

2. 「ニホンウナギ視床下部における摂食関連ペプチドニューロンの局在解析」

加納 千秋(東邦大学大学院 理学研究科)

3. 「ウナギの脳に発現するC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の局在解析と in situ hybridization chain reaction (HCR)法による検証」

齋藤 あみ(東邦大学大学院 理学研究科)

4. 「ストレス条件下における GPR68(OGR1)欠損ゼブラフィッシュの遊泳行動解析」

立原 瞭(明治大学大学院 農学研究科 生命科学専攻)

13:50～14:00 休憩

14:00～14:40 第2部 (各10分)

座長:原口 省吾 (昭和大学 医学部 生化学講座)

5. 「ウナギ血清毒遺伝子の発見と精製法の確立」

遠藤 綾乃(東邦大学大学院 理学研究科)

6. 「オレキシンおよび BMP シグナルが下垂体ゴナドトロピン分泌に与える影響」

副島 佳晃(岡山大学大学院 医師薬学総合研究科 総合内科学)

7. 「ウナギ C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の受容体解析と受容体脳内マッピングによる新規機能予測」

和泉 知輝(東邦大学大学院 理学研究科)

14:40～15:00 休憩

15:00～16:50 シンポジウム① 光環境と動物の行動

座長:松田 恒平(富山大学)

15:00～15:50 「魚類の行動に及ぼす光環境の影響」

高橋 明義(北里大学)

「月周同調産卵魚クサフグにおける生殖神経内分泌系の周期的調節」

安東 宏徳(新潟大学)

15:50～16:00 休憩

16:00～16:50

「 α -MSH による体色調節と行動制御の統合生理学」

渡辺 桂祐・今野 紀文・中町 知哉・松田 恒平(富山大学)

「昼行性げっ歯類ナイルグラスラットの視床下部神経回路と睡眠覚醒行動の制御」

望月 貴年(富山大学)

16:50～17:00 休憩

17:00～18:00 教育講演

座長:柏木 寛史

「免疫不全マウスの開発とヒト化マウスへの応用」

伊藤 亮治(実験動物中央研究所)

18:00～19:00 夕食

19:00～21:00 フリートーク

座長:未定

8月9日(火):2日目

9:00~9:30 一般演題1 下垂体細胞と発現分子の性状分析

座長:塚田 岳大(東邦大学)

1. 「ラット下垂体中葉側の CD9 陽性細胞は前葉へ移動する」
堀口 幸太郎¹、藤原 研²、塚田 岳大³、中倉 敬⁴、吉田 彩舟⁵、長谷川 瑠美¹、
瀧上 周¹ (ON LINE)
1) 杏林大学 保健学部 解剖学・細胞生物学領域
2) 神奈川大学 理学部 生物科学科
3) 東邦大学 理学部 生物分子科学科
4) 帝京大学 医学部 解剖学講座
5) 東京慈恵医科大学 生化学講座

2. 「ラット新生仔下垂体における新規濾胞星状細胞マーカー分子 Aldolase C の発現様式」
伊澤 和人¹、許 瑾¹、石田 睦²、藤原 葉子^{1,3}、矢田部 恵⁴、大野 伸彦⁴、藤原 研^{1,2}
1) 神奈川大学 理学部 生物科学科
2) 神奈川大学 大学院 理学研究科
3) 神奈川大学 総合理学研究所
4) 自治医科大学 医学部 解剖学講座 組織学部門

3. 「ソマトラクチン- α (SL- α)およびソマトラクチン- β (SL- β)遺伝子の二重欠損ゼブラフィッシュの作出とその表現型(外部形態)の観察」
大原 倫仁¹、南 和希¹、今野 紀文²、中町 智哉²、松田 恒平²
1) 富山大学 大学院 理工学研究科 生体制御
2) 富山大学 学術研究部 理学系

9:30~10:00 一般演題2 下垂体ホルモンと環境

座長:菊地 元史(自治医科大学)

4. 「マゴイとニシキゴイにおける液性体色調節因子の作用の比較」
水澤 寛太¹、六鹿 比斗志¹、山川 将輝¹、大野 佑紀²、佐藤 将²、高橋 明義¹

- 1) 北里大学 海洋生命科学部 魚類分子内分泌学教室
 - 2) 新潟県内水面水産試験場
5. 「SABER-FISH 法を用いたメダカ下垂体における遺伝子発現の解析」
佐藤 恵太、大内 淑代
 岡山大学 学術研究院 医師薬学域 細胞組織学
6. 「加齢に伴う皮膚ステロイド合成系の変容は毛包幹細胞において小胞体ストレスを引き起こす」
原口 省吾¹、大滝 博和²、石川 紘司³、杉浦 悠毅⁴、嶋 雄一⁵、土居 雅夫⁶、
 生水 真紀夫⁷、笹野 公伸⁸、末松 誠⁹、宮崎 章¹
- 1) 昭和大学 医学部 生化学講座
 - 2) 東京薬科大学 薬学部 機能形態学
 - 3) 昭和大学 医学部 整形外科学講座
 - 4) 京都大学 医学部附属 癌免疫総合研究センター
 - 5) 久留米大学 医学部 解剖学講座
 - 6) 京都大学 大学院 薬学研究科 システムバイオロジー分野
 - 7) 千葉大学 大学院 医学研究科 生殖医学講座
 - 8) 東北大学 大学院 医学系研究科 病理診断学分野
 - 9) 慶應義塾大学 医学部 医化学教室

10:00~10:10 休憩

10:10~10:40 一般演題 3 下垂体ホルモンと生殖・繁殖

座長:安倍 由美子(医療福祉大学)

7. 「ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)はゴナドトロフからのアネキシン A5 含有マイクロベジクルの放出を促進する」
汾陽 光盛、千葉 秀一、村田 拓也
 岡山理科大学 獣医学部 獣医生理学講座
8. 「卵巣摘出によるラット下垂体前葉内の変化について」
タクマ サイジョウ、金崎 春彦、岡田 裕枝、折出亜希、京 哲
 島根大学 医学部 産科婦人科
9. 「妊娠初期ラットにおける夜間特異的下垂体 NR4A3 発現の増加」

寺島 涼太¹、藤本 和香菜¹、谷 知隆¹、久留主 志朗¹、汾陽 光盛²

- 1) 北里大学 獣医学部 獣医生理学研究室
- 2) 岡山理科大学 獣医学部 獣医生理学講座

10:40～10:50 休憩

10:50～11:30 一般演題 4 下垂体と臨床

座長：和泉 俊一郎(東海大学)

10. 「成長線で気づく下垂体疾患 2 症例の反省」

近藤 朱音^{1,2}、林 亜紀¹、立花 綾香¹、森根 幹生¹、檜尾 健二¹、岩井 艶子²、
前田 和寿^{1,2}

- 1) 四国こどもとおとなの医療センター 産婦人科
- 2) 四国こどもとおとなの医療センター 遺伝医療センター

11. 「捺印細胞診は下垂体手術における術中病理診断に有用か。」

田邊 宣昭^{1,2,3}、井下 尚子¹、山田 正三²

- 1) 森山記念病院 病理診断科
- 2) 森山記念病院 脳神経外科
- 3) 東京医科歯科大学 人体病理学講座

12. 「リポソーム封入プロゲステロンによる腫瘍細胞株増殖抑制効果の解析」

桐ヶ谷 大輔¹、大島 志乃¹、眞鍋 良幸²、安田 敦³、関 敏郎³、亀谷 美恵¹

- 1) 東海大学 医学部 基礎医学系 分子生命科学領域
- 2) 大阪大学 大学院 理学研究科
- 3) 東海大学医学部内科学系腎臓内分泌科学

13. 「妊娠免疫システムを用いたヒト化マウス体液性免疫評価システムの確立」

安田 敦¹、関 敏郎¹、北島 夏見¹、関 雅美²、亀谷 美恵³

- 1) 東海大学 医学部 内科学系腎臓内分泌科学
- 2) 聖隷沼津病院 内科
- 3) 東海大学 医学部 基礎医学系 分子生命科学領域

11:30～12:00 休憩・写真撮影

12:00～13:00 スペシャルトーク

座長:水澤 寛太(北里大学)

「富士五湖の魚類」

青柳 敏裕 (山梨県水産技術センター忍野支所)

13:10～13:40 評議委員会・総会

13:40～14:20 吉村賞受賞講演

座長:汾陽 光盛(岡山理科大学)

「哺乳類におけるインヒビンによる卵胞刺激ホルモン分泌調節の解析とその応用」

渡辺 元 (東京農工大学)

14:20～14:40 休憩

14:40～15:30 一般演題 5 下垂体およびその機能研究に有用な研究手法

座長:亀谷 美恵・東 森生

14. 「妊娠ホルモンによるヒト化マウス免疫系の調節機能解析」

山田 壮我¹、清水 智香¹、大島 志乃¹、大野 裕介^{1,2}、柏木 寛史³、安田 敦⁴、
關 敏郎⁴、和泉 俊一郎³、伊藤 亮治²、亀谷 美恵¹

1) 東海大学 医学部 基礎医学系 分子生命科学領域

2) 公益財団法人 実験動物中央研究所

3) 東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科学

4) 東海大学 医学部 内科学系 腎臓内分泌科学

15. 「プロゲステロンとコルチゾルがヒト化マウス抗体産生機能に与える効果の解析」

大島 志乃¹、山田 壮我¹、清水 智香¹、大野 裕介^{1,2}、柏木 寛史³、後藤 優美
子⁴、關 敏郎⁴、亀谷 美恵¹

1) 東海大学 医学部 基礎医学系 分子生命科学領域

2) 公益財団法人 実験動物中央研究所

3) 東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科学

4) 東海大学 医学部 内科学系 腎臓内分泌科学

16. 「ヒト多能性幹細胞からの下垂体幹/前駆細胞培養系の樹立について」

野々山 葵^{1,2}、河田 美穂²、小谷 侑²、亀山 俊樹²、齋藤 加奈子²、須賀英隆³、
長崎 弘²(ON LINE)

- 1) 藤田医科大学 大学院 医学研究科
- 2) 藤田医科大学 医学部 生理学I講座
- 3) 名古屋大学大学院 医学研究科 糖尿病・内分泌内科学

17. 「深層学習による物体検出の受容体薬理学への応用」

Taka-aki Koshimizu, Sajjaviriya Chortip, Morio Azuma

Division of Molecular Pharmacology, Department of Pharmacology, Jichi Medical University

18. “Evaluation of maternal response to pups by computer vision and machine learning in V1b knockout mouse”

Chortip Sajjaviriya, Morio Azuma, Hiroyoshi Tsuchiya, Taka-aki Koshimizu

Division of Molecular Pharmacology, Department of Pharmacology, Jichi Medical University

15:30～18:00 自由時間

18:00～19:00 夕食

19:00～21:00 フリートーク

座長:未定

8月10日(水):3日目

8:30～10:20 シンポジウム② HPA 軸とホメオスタシス、その攪乱

座長: 亀谷 美恵

「発生中の生殖器官に対する性ホルモンの不可逆的影響」

井口 泰泉(横浜市立大学)

「エストロゲン・プロラクチンと生物進化」

生水 真紀夫(千葉大学)

「胎生期低栄養により誘発する下垂体グルココルチコイドフィードバックの異常と疾患発症リスクの形成」

根本 崇宏(日本医科大学)

「アンドロゲン曝露によるキスペプチン・ゴナドトロピン分泌異常と不妊症(多嚢胞性卵巣症候群)」

大須賀 智子(名古屋大学大学院)

10:20～10:30 休憩

10:30～11:20 特別講演

座長: 関 敏郎(東海大学)

「WHO 5th 2022 における下垂体腫瘍 Update: Pituitary Neuroendocrine Tumor (PitNET)」

長村 義之(東海大学名誉教授・本会名誉会員)

11:20～11:30 休憩

11:30～11:40 最優秀発表賞授賞式

司会者: 亀谷 美恵

11:40～11:50 次回会長のご挨拶

司会者: 亀谷 美恵

内田 勝久(宮崎大学)

宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター・教授

11:50～12:00 閉会の挨拶

亀谷 美恵(東海大学)

講演要旨



特別講演



WHO 5th 2022 における下垂体腫瘍 Update: Pituitary Neuroendocrine Tumor(PitNET)

長村義之

日本鋼管病院病理診断科部長 東海大学名誉教授

WHO 第 5 版 2022 での組織型新分類において、第 4 版に比べ特記すべきは、種々のホルモン産生能を有する下垂体前葉腫瘍の名称が腺腫(adenoma)から神経内分泌腫瘍(neuroendocrine neoplasms(NENs))に推移した点である。下垂体研究者の間では、下垂体前葉細胞は、(神経)分泌顆粒(SG)があり、神経内分泌細胞であることは良く知られている。NEN の臨床・組織分類は、膵・消化管で整理され、一般的には高分化神経内分泌腫瘍(Neuroendocrine tumors: NETs)と低分化神経内分泌癌(Neuroendocrine carcinomas: NECs)(小細胞型、大細胞型)に大別される。NET は、分化した形態学的特徴を示し、(神経)分泌顆粒を有し、悪性(浸潤・転移する)のポテンシャルを有する腫瘍と定義されている。下垂体腫瘍は、現在機能分化(転写因子)により大別され、良く知られるように中には周囲組織に著しく浸潤し、稀に転移する腫瘍も見られる。下垂体の場合、組織像から転移を予測することは困難とされている。このような背景により、下垂体腫瘍も、NET と呼称されるに相応しいと考えられるようになり、最近 PitNET の略語も良く用いられて来ている。神経内分泌腫瘍 NEN 全般に、横断的な分類(NET, NEC)を提唱する最近の流れの中で、WHO も基本的にそれを踏襲し、下垂体腫瘍もその仲間入りをしたと言える。第 5 版での名称の改変では、PitNET/adenoma と併記し、過渡期であり adenoma も使用可能としたが、NET の名称が推奨されている。特に下垂体では、膵・消化管のように NET を増殖指数により G1,G2,G3 に細分化できるか、純粋な NEC が存在するかなど、検討課題とされている。我々のこれまでの下垂体研究が下垂体腫瘍分類にどのように反映されているかにも言及してみたい。

スペシャルトーク



富士五湖の魚類

青柳 敏裕

山梨県水産技術センター 忍野支所

富士五湖は富士山の北麓に位置し、東から山中湖、河口湖、西湖、精進湖、本栖湖の順に並んでいます。いずれも富士北麓に流出した溶岩流が谷を堰き止めてできた堰止湖といわれ、現在の姿となってからおよそ千二百年と歴史が浅く、固有の魚類はいないとされています。在来の魚類も少なく、山中湖ではフナ、ウグイ、ナマズ、アブラハヤの 4 種であったといわれます。後にアブラハヤは、湖沼型亜種としてヤマナカハヤと命名されましたが、ワカサギの放流に伴い姿を消したとされます。

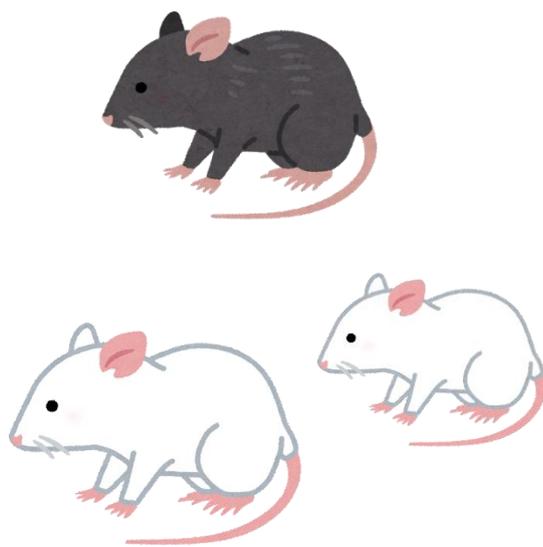
山中湖や河口湖では江戸時代から漁業が盛んで、フナ、ウグイ、ナマズ、コイなどが漁獲されていたそうです。コイは 1801 年に利根川から山中湖に移植放流されたのが、最も古い記録です。明治時代以降になると、様々な魚類の移植(水産利用)が盛んになり、現在の富士五湖では、湖により違いはありますが、概ね 10-20 種類程度の魚類が生息しています。

今回は話題提供として、富士五湖とその周辺にすむ主な魚について、また、2010 年に西湖で発見されたクニマスの試験研究について、紹介させていただきます。

吉村賞受賞講演



教育講演



免疫不全マウスの開発とヒト化マウスへの応用

伊藤亮治

公益財団法人実験動物中央研究所 ヒト疾患モデル研究室

ヒト細胞や組織が生着し、生体内にてこれらの機能や動態を評価できるヒト化マウスは、創薬研究において昨今その需要が拡大している。従来から利用されてきたげっ歯類の前臨床評価モデルは、安価で簡便かつ多個体を用いた評価が可能であるが、ヒトとの分子的種差が大きく正確な薬効・安全性評価が困難であり、臨床試験とのギャップが生じることがしばしば問題となっている。一方非ヒト霊長類はヒトと近縁であるため、多くのタンパク質が交差性を有するが、高価で多個体の使用が困難であること、飼育施設が限定されておりハンドリングに熟練を要すること、倫理的な規制が厳しいことなどから、使用には大きなハードルがある。実験動物中央研究所にて 2002 年に樹立した重度免疫不全 NOG マウスは、従来の免疫不全マウスでは不可能であった初代ヒト細胞の高度な生着性を実現し、さらにヒト造血幹細胞移入により、末梢でヒト T 細胞と B 細胞が同時に分化するヒト免疫系マウスとして利用されてきた。その後 2005 年に米国ジャクソン研究所が同様の遺伝子欠失を持つ NSG マウスを開発し、ヒト化マウスを用いた医学研究が世界的に拡大した。ヒト化マウスはある種のヒト血液疾患や免疫疾患を生体内で再現できるため、これらヒト疾患を標的とした創薬研究の前臨床モデルとして有効である。しかしながら NOG や NSG マウスをベースとした初期のヒト化マウスは、ヒト免疫系再構築の観点からは不十分な点が多く、特にヒトマクロファージや顆粒球などのミエロイド系細胞や NK 細胞がほとんど分化してこないため、これら自然免疫系の細胞が主体となる疾患への応用が困難であった。この問題を克服すべく、我々は様々なヒトサイトカイン遺伝子を導入した NOG マウスを開発し、ヒト血液系、免疫系細胞のさらなる生着性、多系列細胞への分化能向上を図ることで、より多様なヒト疾患を再現する次世代型ヒト化マウスを開発を試みている。本講演では、ヒト化マウスの概要について歴史的な背景も含めて国内外でどのような研究に使用されているか紹介するとともに、実中研で開発した次世代型ヒト化マウスを中心にヒト免疫疾患モデルと創薬研究について概説する。

シンポジウム①

光環境と動物の行動



魚類の行動に及ぼす光環境の影響

高橋明義

北里大学 海洋生命科学部

動物の行動は明暗、たとえばヒトでは大気を通過してくる可視光線（およそ 380nm~780nm）の影響を受ける。日常生活では太陽や照明の光源色をそのまま感じることは少なく、物体から反射された表面色や窓ガラス越しの透過色などの物体色を感じる。この要旨を書いている部屋は、パソコンの画面からの光を除けば、白い壁から反射された LED 光が眼に入る光環境にある。水中では可視光線の比率が変わる。水面直下では大気中と同様であるが、外洋では深くなるにつれて短波長（藍など）および長波長（赤など）の光が減衰し、青や青緑の色がより深く透過する。もちろん総量が減少するので暗くなる。沿岸域では懸濁物などの影響により深度につれて緑色光が優勢になる。実験に使用される魚類は他の動物と同様にほとんどが照明の下で飼育される。筆者らはカレイ目魚類の行動に及ぼす白背地および緑色光の効果を報告してきた。ここではこれまでの成果を整理しつつ魚類の行動と光環境の関係を考察するとともに今後の課題を提示する。

マツカワ (*Verasper moseri*) を実験魚として、まず蛍光灯や環境光を光源とする白背地における摂餌行動と成長を調べた。対照の黒背地に比べると摂餌量が増加していたことから、それが成長に反映されたものと解釈した。これらの体色は白背地で薄く（あるいは明るく）、黒背地で濃い（あるいは黒い）ことから、体色調節に関与するメラニン凝集ホルモン (MCH) と黒色素胞刺激ホルモン (MSH) の機能の強弱が反映されていると一応考えられる。齧歯類の食欲は MCH により促進され MSH により抑制されることがその類推の元である。白背地で増加する MCH がマツカワの摂餌行動を促進すると考えてはいるが、その証拠はまだ得られていない。脳脊髄液内投与では断片的ではあるが、むしろ抑制効果が認められている。したがって白背地と摂餌行動をつなぐ経路は未だに不明である。

LED 光を用いた研究には最初、青、緑、赤色光を用いた。ヒトが感じる白色光の成分である光の三原色を分割して照射することがその発想である。対照を環境光とした飼育実験では青色光と緑色光に加えて、弱いながら赤色光にも成長促進効果が認められた。特筆すべきは飼育期間中にほとんど摂餌せず体重が漸減する低水温下でも、これらの LED 光照射下では摂餌が行われ体重が増加したことである。なかでも緑色光の効果は青と赤色光よりも有意に高いことが認められた。一方で、MCH や成長ホルモンなど内分泌系の各種遺伝子の発現に顕著な増減は認められていない。緑色光照明によって回遊魚のように泳ぎ回るのはホシガレイやヒラメにおいても認められている。カレイ類が生息する水深では緑色光が優勢であることと関連するのであろうが、想像の域を出ない。外温動物の魚類は低水温で活動が低下するが、マツカワでの結果は低水温で機能を発揮する遺伝子の存在を示唆する。それを軸とするメカニズムの解明が大きな課題である。

生息地が白背地であること，ならびに緑色光のみに暴露されることは自然界ではありえない光環境である。この極端な実験環境が色覚と内分泌現象の連関を解明しつつある。

月周同調産卵魚クサフグにおける生殖神経内分泌系の周期的調節

安東宏徳

新潟大学 佐渡自然共生科学センター 臨海実験所

海洋生物の多くは月齢や潮汐に同調したリズムを示す。これらのリズムは、月光に同調してひと月の時間を刻む「概月時計」や潮汐サイクルに同調して半日の時間を刻む「概潮汐時計」によって駆動されると考えられるが、それらの分子機構の解明は進んでいない。動物の多様な環境適応の仕組みの一つとして、これまで半月周性の産卵リズムを持つクサフグをモデルとして、視床下部-下垂体系を中心とする生殖神経内分泌系の周期的調節という点から研究を進めてきた。クサフグは5-7月の大潮（新月と満月）の日の満潮前に海岸の決まった場所で集団産卵を繰り返す。この半月周性（2週間周期）の産卵回遊リズムの調節についての研究から、間脳において **GnRH1** やキスペプチン、**GnIH** の前駆体をコードする遺伝子が新月あるいは満月にピークを持つ月周変動を示すことが明らかになった。これらの生殖調節神経ホルモンの発現変動に月光が関わると考え、月光の情報を脳に伝達するホルモンとしてメラトニンに注目して研究を行った。夜間に高まるメラトニン分泌量は月齢に伴って変化し、またメラトニン投与によりこれらの遺伝子の発現量が上昇した。メラトニンが月光の情報を脳に伝えて生殖調節神経ホルモンの発現を調節する可能性がある。しかし、クサフグは新月と満月で産卵するので、メラトニンによる発現調節だけでは説明できない。半月周性に発現を高める分子機構があるはずである。クサフグの脳を月齢に伴って採集し、**RNA-Seq** 解析を行った結果、多数の遺伝子が新月と満月でピークあるいは底値となる半月周性の発現リズムを示すことが明らかになった。また、複数の神経ペプチド前駆体遺伝子の発現が新月と満月でピークとなるのに対して、それらの受容体遺伝子の発現は低値を示すことがわかった。一方で、潮汐サイクルが関わると考えて、クサフグの脳を3時間ごとに採集し、**RNA-Seq** 解析を行った結果、半月周性の発現リズムを示す遺伝子を含む、複数の遺伝子が12-15時間周期で発現変動することがわかった。このことは、クサフグの脳内に潮汐サイクルに同調する体内時計「概潮汐時計」が存在することを示唆する。概潮汐時計と概日時計の位相は約2週間周期で一致し、両時計があると半月周リズムを作ることができる。本講演では、光と体内時計によるクサフグの半月周性産卵回遊リズムの調節機構について考察する。

昼行性げっ歯類ナイルグラスラットの視床下部神経回路と睡眠覚醒行動の制御

望月 貴年

富山大学 学術研究部 理学系

生命科学の基礎研究では、主な被検体動物として、ラット・マウスが用いられている。市販の実験用ラット・マウスは飼育・繁殖が容易であり、長年の管理交配により遺伝的背景が均一化され、個体差の少ない実験動物として利用価値が高い。しかしながら、これらのラット・マウスは全て夜行性であり、昼行性であるヒトのモデル動物としての確かさどうか、時間生物学的観点からは検討の余地がある。そこで我々は、アフリカ原産の昼行性げっ歯類・ナイルグラスラット (*Arvicanthis niloticus*) に着目し、国内で唯一、実験用コロニーを確立した。そして、本ラットの睡眠覚醒行動の解析と、生体時計や睡眠覚醒行動を調節する視床下部を中心とした神経回路の解析に着手した。しかしながら、ラット・マウスと同じネズミ科に属するとは言え、グラスラット属の研究者人口は絶対的に少なく、実験動物としての知見が非常に乏しい現状である。例えば、遺伝子配列データベースや脳解剖学アトラスなど、今日の神経科学研究を進めるために必要なリソースが整備されていない、言わば全く新しい動物への挑戦となる。本発表では、我々がこの3年間で取り組んできた、ナイルグラスラット神経科学研究への挑戦過程を紹介すると共に、これまで専ら夜行性動物にて進められてきた睡眠覚醒調節に係わる神経群の活動性について、昼行性動物で検証した結果を下記2項目を中心に紹介する。今後、本研究により昼/夜行性動物間における行動の時間制御回路の違いなど、脳機能の概日リズム調節に係わる多くの知見を得ることが期待される。

昼行性ラット時計遺伝子の概日リズム性発現調節

本学・今野紀史講師との共同研究により、ナイルグラスラットの主な時計遺伝子配列を確定し、これらを基にオリゴプライマー類を作成し、脳組織中の時計遺伝子発現リズムをRT-PCR解析した。これまでに、生体時計中枢である視床下部視交叉上核においては、夜行性動物と同位相の *Period* 遺伝子や *Bmal1* 遺伝子発現リズムが確認され、一方、視交叉上核の上部に位置する視床下部室傍核ではこれらの時計遺伝子が夜行性動物と逆位相で発現することが確認できている。体内時計シグナルは、視床下部内の神経回路で既に昼行性/夜行性行動スイッチが切り替わることが考えられるが、制御の詳細な分子機構については更なる検討が必要である。

昼行性ラットの睡眠覚醒行動特性

脳波/筋電図測定により、12:12時間の明暗サイクル下で覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠量を解析した。本ラットは外部照明に対し夜行性動物とは反対の感受性を持つことから、

明期照明強度を 10, 100, 1000 lux の 3 条件で検討した。その結果、本ラットは明期照明強度に依存して覚醒量や自発行動量が増加し、暗期には減少する睡眠覚醒調節を示した。また、高照度－低照度群間で、外側視床下部や後部視床下部など、覚醒調節に重要な神経領域で c-Fos 発現細胞数が変化することが確認できた。本ラットのこのような光感受特性を生かし、季節性感情障害など、これまで夜行性動物では不向きであった精神疾患の病態研究に、よりよいモデル動物となる可能性が期待できる。

α -MSH による体色調節と行動制御の統合生理学

渡邊 桂佑¹、今野 紀文²、中町 智哉²、松田 恒平²

¹富山大学 大学院 生命融合科学教育部 生体情報システム科学

²富山大学 学術研究部 理学系

α -黒色素胞刺激ホルモン(α -MSH)は非哺乳類において体色調節に関わる下垂体中葉ホルモンとして知られる。キンギョの間脳視床下部の神経核に α -MSH 陽性細胞および全脳の広範囲に陽性繊維が観察され、脳内の α -MSH が中枢作用として摂食抑制も発揮することが明らかにされた。しかしながら、脳の広範に α -MSH 陽性繊維が観察されたものの、他の中枢作用については報告がほとんど無かった。そこで我々は、キンギョなどの小型魚類の走性に着目して、情動行動、特に不安様行動への影響について探ることとした。その結果、 α -MSH の脳室内投与がメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) を介して不安様行動を増強することを明らかにした。これらの知見から α -MSH は末梢および中枢でそれぞれ個体の生存に直結する機能を有していることが判明したものの、それらが独立しているかむしろ協調しながら機能しているか不明であった。中枢神経系に存在する物質のみならず血中物質が脳内に移行し、中枢機能を発揮することが多く報告されている。下垂体中葉から放出された α -MSH が末梢では体色調節に機能しつつ、中枢のメラノコルチン系と協調しながら摂食行動や情動行動を調節することで行動を最適化し、生存を有利にする可能性が十分に考えられる。この仮説を検証するための第一歩として、末梢を循環している α -MSH の中枢作用を明らかにすることを本研究の目的とした。

末梢を循環する α -MSH の中枢作用を検討するために、 α -MSH を腹腔内投与したキンギョの摂食行動および不安様行動を観察した。摂食行動は、浮遊性の固形餌を体重当たり摂食量として測定した。不安様行動は、接触走性を指標にした行動観察により測定し、用いた円形水槽 (半径 12 cm) の半径を 2 等分するように領域を設定して、内側の領域を中央領域とした。中央領域滞在時間の減少は不安様行動の増強として捉えることができるため、それぞれの領域の滞在時間を測定した。 α -MSH の腹腔内投与は摂食量を有意に減少させ、中央領域滞在時間を有意に減少させた。これらの結果は α -MSH を脳室内投与した実験結果と類似しており、末梢を循環している α -MSH が中枢作用を有する可能性が示唆された。つぎに、これらの作用が内臓神経などの上行性神経を介する可能性もしくは脳内の受容体を介する可能性が考えられたので、それぞれについて検討した。過剰量のカプサイシンによる神経ブロックは α -MSH の作用を阻害しないことが分かった。一方で、 α -MSH の腹腔内投与による摂食量の減少および中央領域滞在時間の減少が HS024 の脳室内投与によって有意に阻害された。これらの結果から、 α -MSH の腹腔内投与による摂食抑制および不安様行動の惹起作用は脳内の MC4R を介して発揮されることが示唆された。現在は、 α -MSH による不安様行動の増強における作用部位の同定、末梢を循環している α -MSH の脳への進入部位の推察を行っており、それらの結果についても判明した結果を報告する。

シンポジウム②

HPA 軸とホメオスタシス、その攪乱



発生中の生殖器官に対する性ホルモンの不可逆的影響

井口泰泉

横浜市立大学 大学院 生命ナノシステム科学研究科

脳下垂体や視床下部は研究テーマにしたことがないので、卒論として、恩師の高杉暹教授から与えられた上記の課題について、その背景およびマウス生殖器官に対するエストロゲンの不可逆化作用についての研究から内分泌かく乱物質への繋がりについて紹介する。

Peiffer (1936)は出生直後の雌ラットに同腹の雄の精巣を移植すると、(周期的な視床下部-下垂体系のホルモン調節機能の喪失により) 膣上皮は連続発情状態を示し、無排卵になり、卵巣摘出により、膣上皮は退縮することを見出した。Takasugi, Bern ら(1962, 1963, 1964)は、出生直後から 3 日以内 (臨界期) の雌マウスにエストロゲンを投与すると卵巣、副腎、下垂体を全て摘出しても、膣上皮はホルモン非依存の増殖と角質化を継続し、低頻度ながら加齢とともに膣癌になることを報告した。一方、Herbst ら (1970, 1971) は、流産防止のために処方された合成エストロゲンのジエチルスチルベストロール(DES) (後に、流産防止作用は無いことが判明) を服用した母親から生まれた、二十歳前後の女性の膣癌を報告し、世界で数百万人に処方されていた事から、DES シンドロームとして研究が開始された。

出生直後のエストロゲンの投与により、卵巣非依存の膣上皮の増殖・角質化を示す膣では、エストロゲン受容体 α (ER α)の恒久的なリン酸化、EGF 関連の細胞増殖因子 (特にアンフィレギュリン、エピレギュリン) mRNA の高発現-*erbB*、EGF 受容体のリン酸化のオートループの形成を示唆した(2004)。また、出生直後のアンドロゲン投与による膣上皮の不可逆的増殖・角質化には ER α が必須である(2010)。膣上皮細胞の増殖には間質細胞の ER α が必要であり、間質細胞から分泌された IGF 等が上皮細胞を増殖させ、上皮の角質化には ER α が必須である(2015)。ミューラー管からは輸卵管、子宮、膣が分化する。輸卵管の分化には間質細胞からの Follistatin-like 1、膣への分化には間質細胞からの FGFs、SAMD・RUNX が必要であることが報告されている。子宮への分化についてはレチノイン酸シグナルが必須であることを示した(2016)。マウスを用いた女性ホルモンの組織 (膣上皮) 不可逆化のメカニズムの解明という宿題は道半ばである。

故 Bern 教授からの強い要請もあり、エストロゲン作用をもつ化学物質の野生生物の生殖影響が報告され、ヒトへの影響の懸念から、1996 年頃から、内分泌かく乱物質 (環境ホルモン) の影響評価系の開発などにも関わるようになり、メダカ、アフリカツメガエルを用いた研究も行い、ミジンコの環境依存性性分化、ミシシッピーワニの温度依存性性分化についても取り組んだ。このような雑多な話をかいつまんでご紹介させていただきます。

エストロゲン・プロラクチンと生物進化

生水真紀夫

千葉大学 真菌医学研究センター 進化生殖学

私は臨床医として、妊孕にかかわる病態の診断や治療に関わってきた。これまでに、エストロゲン合成酵素の欠損症や過剰症、プロラクチン受容体欠損症を発見したが、そのたびにホルモンの作用や意義についてあらたな気づきを得ることができた。そのうちの 하나가、生物は進化の過程でホルモンに様々な作用を刹那的に割り当ててきたという理解である。本講演では、エストロゲンとプロラクチンの作用について述べてみたい。

かつて、エストロゲン合成酵素の欠損症の患者を発見した。最初の患者は胎児(女児)で、エストロゲン合成酵素が欠損したためにエストロゲンが低値となっていたが、同時に(エストロゲン合成基質である)アンドロゲンが蓄積して男性化が生じていた。このことから、胎盤におけるアロマターゼ発現の意義が、男性化の防止にあることが明らかになった。その後、男性患者が発見された。男性患者にもいくつかの想定外の症状が生じていた。そのひとつが骨で、思春期に骨端の閉鎖と骨量増加がおこらず、高身長と骨粗鬆症をきたしていた。この結果、エストロゲンは男性の骨の生理的な成長にも必須であることが明らかになった。エストロゲン合成の意義が女性への分化ではなく男性化の阻止にあることと、女性ホルモンであるエストロゲンが男性の骨の生理的変化に必須であることとに繋がりがあつたことを進化の視点から説明してみたい。

数年前にプロラクチン受容体欠損症の患者を発見した。プロラクチンは高値だが、乳汁分泌は完全に欠如していた。この表現型から、プロラクチン受容体がプロラクチンのネガティブフィードバックと、乳汁分泌とに関与していることが確認された。この欠損症は、少なくとも64億人に1人以下と極めて定頻度と推定された。同族の遺伝子であるGH受容体は小人症の原因遺伝子として知られており、比較的多数の報告例がある。なぜプロラクチン受容体遺伝子の変異が稀なのかは進化の切り口で理解できるように思われる。

胎生期低栄養により誘発する下垂体グルココルチコイドフィードバックの異常と疾患発症リスクの形成

根本崇宏

日本医科大学 医学部 生理学（生体統御学）

胎生期の栄養不足は、脳重量も守るために自身の代謝・内分泌系を変化させるトレードオフにより小さな体格で生まれ、エネルギー消費を抑えた儉約型表現型を獲得する。儉約型表現型は出生後の貧しい栄養環境では生存に有利に働くが、栄養過剰環境に曝されると体質と生後環境のミスマッチにより疾患発症リスクが形成される。我々の樹立した胎生期低糖質カロリー制限低出生体重ラットは、その一部に離乳期までに対照ラットの平均体長と平均体重まで成長が追いつく LBW-CG (low birthweight & catchup growth) と成長が追いつかない短体長低体重 (low birthweight & non-catchup growth, LBW-NCG) ラットとが生じる。LBW-NCG ラットの GH 分泌は、対照ラットの間には差が見られないが、血中 IGF-1 濃度が対照ラットや LBW-CG に比べ有意に低かった。この機序として肝臓での GH 受容体を抑制調節する miRNA 発現の亢進による GH 受容体発現の低下が明らかになった。さらに、LBW-CG と LBW-NCG ラットの血中コルチコステロン濃度は、基礎値では対照ラットとの間に統計学的な差がなかったが、拘束ストレスや高脂肪食を負荷するとコルチコステロンの血中濃度が対照に比べ有意に高く、そして高いレベルを維持し続けることが明らかになった。この機序として、下垂体における long non-coding RNA 発現の亢進の関与が示唆された。従って、LBW-NCG ラットは、カタボリックホルモンであるコルチコステロンレベルが対照ラットに比べ高く、アナボリックホルモンである IGF-1 が低い代謝・内分泌トレードオフにより、小さな体格を獲得した可能性が明らかになった。さらに、LBW-NCG ラットは、対照ラットに比べ絶食後の体重減少率が低く、特に白色脂肪組織重量の減少割合が低い hard-to-burn fat を有し、絶食後の骨格筋重量が減りやすく、再摂食後の回復が悪い easy-to-lose muscle を有する。LBW-NCG への高脂肪食負荷で血圧上昇が観察されたことから、高脂肪食のような出生後の栄養環境ミスマッチに曝すことでさらなるホルモン分泌異常を呈し、疾患発症リスクが形成される可能性が示された。本シンポジウムにおいては、本モデルラットに対する栄養介入による改善効果についても報告したい。

アンドロゲン曝露によるキスペプチン/ゴナドトロピン分泌異常と不妊症(多嚢胞性卵巣症候群)

大須賀 智子

名古屋大学 大学院 医学系研究科 産婦人科学

女性不妊症の原因は、排卵障害、卵管閉塞、子宮内膜症、子宮疾患等多彩であるが、排卵障害の原因として代表的なものに多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)が挙げられる。PCOSは性成熟期女性の10%程度に認められるありふれた疾患である。不妊症に加え、糖質・脂質代謝異常や、子宮体がん、周産期合併症の増加にも関与し、女性の健康を長期に渡り害するが、病因の詳細は不明である。PCOSの基本症状は、多嚢胞性卵巣、排卵障害、無月経、高アンドロゲン血症、下垂体ゴナドトロピン分泌異常(高LH血症)であり、これらに着目した検討が行われている。特に、高アンドロゲン血症はPCOSの主要な症状の一つであることから、各種アンドロゲン曝露による動物モデルが作成され、生殖中枢の解析としてキスペプチンやその関連分子に関する検討も試みられてきた。

この中でも、当教室では出生前に経母体的にアンドロゲンであるDHT(5 α -dihydrotestosterone)をラットに投与、出生仔をモデルとした検討を行った。多嚢胞性卵巣や性周期の異常に加え、特に日本人のPCOSに近い、やせ型で高LH血症を示す表現系と、視床下部弓状核におけるキスペプチン陽性細胞の増加を確認した。同様のラットモデルにおいて、出生後(around puberty)のLHパルス頻度の増加と、視床下部における*NKB*、*Kiss1* mRNAレベルの増加も報告されている。ヒトPCOSにおいてもLHパルス頻度上昇が指摘されている。異常卵胞増加による多嚢胞卵巣とこれらキスペプチン/LH分泌異常の関連が示唆される。また、高アンドロゲン(アンドロゲン曝露)とキスペプチン/LH分泌異常については、他にも、DHEA(Dehydroepiandrosterone)投与モデルや、アンドロゲンからエストロゲンへの変換を阻害するアロマターゼ阻害薬投与モデル等においても検証されている。

動物実験において、アンドロゲン曝露によるHPG軸の変容が、PCOS様表現型に関与することが示されてきているが、PCOSの病因につき、アンドロゲン分泌亢進が先なのか、あるいは中枢の変化が先なのかの結論はでていない。動物実験や臨床研究のデータをもとに、アンドロゲン曝露とPCOSの病態の関わりについて考察したい。

最優秀発表賞候補演題



ラット下垂体におけるサイロステイムリン α サブユニット (Gpa2) 発現細胞の同定

○峯 萌葉¹、藤原 研^{1,2}

¹ 神奈川大学大学院 理学研究科

² 神奈川大学理学部 生物科学科

2002年にNakabayashiらにより、ヒト下垂体からLH、FSH、TSHの α サブユニットと β サブユニットに類似した新しい糖タンパク質、glycoprotein subunit alpha2 (Gpa2)とglycoprotein subunit beta5 (Gpb5)が発見された。Gpa2とGpb5は互いにヘテロダイマーを形成し、TSH受容体に結合して甲状腺ホルモン放出を促進する効果が認められたことから、thyrostimulin (サイロステイムリン)と名付けられた。免疫組織化学によりGpa2とGpb5は同一の細胞で産生されると報告されていたが、その後の研究で異なる報告も出ており、発現細胞ははっきりしていない。そこで、本研究ではin situ hybridization法を用いて、ラット下垂体でのGpa2発現細胞を特定することを目的とした。ラット下垂体cDNAからdigoxigeninラベルしたRNAプローブを作製し、雄の下垂体切片でin situ hybridizationを行ったところ、Gpa2陽性細胞は前葉のみで確認された。次に、下垂体前葉ホルモンおよび濾胞星状細胞のマーカー分子のS100 β タンパク質の免疫組織化学により、Gpa2は濾胞星状細胞で発現していることが分かった。また、S100 β タンパク質でGFPを発現する遺伝子改変ラットを用いて下垂体前葉のS100陽性細胞と陰性細胞をセルソーターで分取し、リアルタイムPCR法によりGpa2発現量を定量すると、S100陽性細胞で特異的であることが確かめられた。一方、Gpb5発現量はどちらの細胞分画でも検出限界以下であった。さらに、雌では性周期によりGpa2の発現量の変動がみられた。そこで、卵巣摘出(OVX)とOVX+エストロゲン(E₂)投与ラットで比較したところ、Gpa2発現量はOVX+E₂で著しく減少した。以上の結果より、Gpa2は濾胞星状細胞で発現し、性ホルモンにより発現が調節されることが分かった。Gpa2はGpb5とヘテロダイマーを形成することなく、性腺機能に関連した新たな生理機能を有することが推察された。

ニホンウナギ視床下部における摂食関連ペプチドニューロンの局在解析

○加納千秋¹、恒岡洋右²、海谷啓之³、塚田岳大¹

¹東邦大学大学院 理学研究科

²東邦大学 医学部

³富山大学 理学部

ウナギは飢餓に強く、ストレス負荷により1年以上摂餌せず生存することが可能である。しかし、これまでウナギの摂食中枢(弓状核)や摂食中枢に入力するペプチドニューロンの局在に関する知見は少ない。そこで、本研究は、ニホンウナギを用いて弓状核マーカーであるプロオピオメラノコルチン(POMC)、ニューロペプチドY(NPY)に加え、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)の脳内局在を *in situ* hybridization 法で同定した。その結果、POMC と NPY は正中隆起に、CRH は視索前野、TRH は隆起核(視床下部腹側)に発現していた。さらに、ニホンウナギで同定した2種類のグレリン受容体(RDS 型、KET 型)及び GHRH の局在を調べたところ、RDS 型グレリン受容体が正中隆起、KET 型が隆起核(視床下部背側)、GHRH が隆起核(視床下部腹側)に発現することがわかった。次に、正中隆起に発現していた RDS 型グレリン受容体、POMC、NPY の共局在を調べるため、蛍光標識した short hairpin DNA を用いた新規の mRNA 検出法である *in situ* hybridization chain reaction を用いて二重染色した。その結果、これらの共局在は見られず、RDS 型グレリン受容体は弓状核にある NPY、POMC 以外のニューロンで発現することがわかった。以上の結果により、ウナギの弓状核が正中隆起に存在すること、その近傍に摂食を調節する CRH や TRH ニューロンが存在することがわかった。今後、正中隆起に局在する RDS 型グレリン受容体を発現するニューロンの同定や神経連絡を調べ、ウナギの摂食とストレス入力の間関係を明らかにしていく。

ウナギの脳に発現する C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) の局在解析と *in situ* hybridization chain reaction (HCR)法による検証

○齋藤あみ¹、恒岡洋右²、塚田岳大¹

¹東邦大学大学院 理学研究科、

²東邦大学 医学部

ナトリウム利尿ペプチドファミリーは、ANP、BNP、CNPで構成される。心臓から分泌され体液調節を行う ANP・BNP とは異なり、脳に発現する CNP の機能は分かっていない。哺乳類に存在する CNP は CNP4 の 1 種類であるが、硬骨魚類には 4 種類の CNP (CNP1-4) に加え、当研究室でウナギから同定した CNP4b が存在することがわかっている。このように CNP 分子は硬骨魚類で多様化し、魚類において重要な機能を有していると考えられる。本研究の目的は、比較内分泌学的手法を用いて脊椎動物における CNP の役割を明らかにすることである。そこで、*in situ* hybridization (ISH) 法を用いてウナギ CNP (CNP1,3,4,4b) の脳マップを作成し、CNP の機能予測を試みた。その結果、CNP1 と CNP4 は主に視索前野、CNP3 は下垂体吻部、CNP4b は延髄に発現していた。しかし、CNP1 と CNP4 は発現場所が、CNP4 と CNP4b はヌクレオチド配列が酷似していることから、既存の ISH 法以外の検証が必要である。そこで短い蛍光ヘアピン DNA プローブを複数箇所用いることで、特異的に複数の mRNA を同時に染色可能な ISH chain reaction 法の確立を試みた。その結果、CNP1 と CNP4 は視索前野の別の神経細胞に、CNP4 と CNP4b は視索前野と延髄にそれぞれ発現しており、ISH 法の結果を検証できた。さらに、同研究室の和泉が行ったナトリウム利尿ペプチド受容体の脳マップの結果から CNP 受容体である NPR-B が視床下部に高発現していることが分かった。このことから視索前野に発現する CNP1,4 は視床下部に局在する NPR-B に結合し、視床下部の働きを調節している可能性が示唆された。

ストレス条件下における GPR68(OGR1)欠損ゼブラフィッシュの遊泳行動解析

○立原 瞭¹, 戸村 秀明^{1,2}

¹ 明治大学 大学院 農学研究科 生命科学専攻 細胞情報制御学

² 明治大学 内分泌研究所

(背景)

不安、恐怖などのストレスは視床下部に作用し、下垂体と副腎からのホルモン分泌を促し、心拍数や血圧の上昇のみならず、行動パターンの変化やうつなどを引き起こす。これらの応答は、進化的に保存された原始的な反応と考えられている。プロトン感受性 GPCR の一種である GPR68(OGR1)を欠損するマウスは、不安様行動が変化していることが報告されている。

(目的)

ストレス条件下における GPR68 欠損ゼブラフィッシュの不安様行動の解析を通じて、GPR68 が進化的に不安、恐怖様行動に関与しているのかどうかを明らかにする。

(方法)

壁面の一枚が透明なアクリル板で作られている白い水槽(15X15X14(cm))に、GPR68 欠損ゼブラフィッシュ、または野生型ゼブラフィッシュを一匹ずつ放ち、各々単独での遊泳行動を一定時間ビデオレコーダーで録画し、その後トラッキングソフトウェアを用いて遊泳行動を数値化した。

ストレス刺激としては、(1) 恐怖刺激としてゼブラフィッシュの皮膚から抽出した警告物質の投与、(2) 不安刺激として isolation housing を使用した。

(結果)

GPR68 欠損ゼブラフィッシュは、野生型とは異なる行動を示した。すなわち欠損ゼブラフィッシュでは、不安刺激に対して erratic behavior の頻度が増加していた。また(1) 恐怖刺激と(2) 不安刺激とでは野生型と GPR68 欠損ゼブラフィッシュ間の行動様式の差が異なる可能性が示唆された。

(考察)

GPR68 の不安様行動への関与は、進化的に保存されている可能性が示唆された。マウスと比較してゼブラフィッシュの脳の構造は単純であることから、OGR1 の作用メカニズムの解析にマウスに加えてゼブラフィッシュも利用することは、有用であるものと考えられる。

ウナギ血清毒遺伝子の発見と精製法の確立

○遠藤綾乃¹、山口陽子²、Marty K.S.Wong¹、後藤勝¹、塚田岳大¹

¹東邦大学大学院 理学研究科

²島根大学 生物資源科学部

ウナギの血清中には毒があり、大量に摂取すると、下痢、嘔吐、無気力症など全身性の作用を引き起こすことが知られている。しかし、その遺伝子や作用機序は分かっていない。我々はニホンウナギゲノムデータベースを探索し、ウナギ血清毒の候補遺伝子を発見した。本研究では、候補遺伝子の配列情報を元にウナギの血清毒の全長クローニングを行い、血清毒を産生する主要な臓器をRT-PCRと *in situ* hybridization を用いて同定した。その結果、ウナギ血清毒は推定 116KDa のタンパク質であり、肝細胞にのみ発現することが分かった。分子系統解析では、ウナギ毒とその類似分子が”SE-Cephalotoxin-like”と称されているので、ウナギ以外の一部の硬骨魚類や軟骨魚類、無脊椎動物にも類似の遺伝子が存在することがわかった。次に、硫安分画・疎水性カラム(ブチルカラム)・イオンカラム(DEAE カラム)を用いて血漿から血清毒の単離を試みた。その結果、推定分子サイズの 116KDa に近い大きさのタンパク質の分離に成功し、約 7.5 ml の血漿から約 2.7 mg のタンパク質を精製した。この精製タンパク質を質量分析したところ、肝臓で同定した血清毒遺伝子の翻訳タンパク質であった。また、予備実験ではあるが、マウスを用いて毒性評価を行っている。上記の精製ウナギ毒を 100 µg 腹腔内投与すると約 2 分後に下肢に麻痺が起こり、22 時間後にエンドポイントを迎えた。さらに、*in vitro* でマウスの腸管の収縮作用を調べたところ、精製ウナギ毒は強力な腸管収縮作用があることがわかった。今後 X 線構造解析を用いて精製ウナギ毒の 3 次元構造を明らかにしていくことを目指し、結晶化の条件検討を試みている。

オレキシンおよび BMP シグナルが下垂体ゴナドトロピン分泌に与える影響

○副島 佳晃¹、岩田 菜穂子¹、中山 菜々子¹、平田 真一¹、中野 靖浩¹、山本 紘一郎¹、
須山 敦仁¹、大國 皓平¹、灘 隆宏¹、藤澤 諭²、大塚 文男¹

¹ 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 総合内科学

² 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

オレキシンは中枢神経系での睡眠覚醒や摂食行動の調節が知られているが、その受容体は内分泌臓器を含む末梢組織にも発現しており、オレキシンは内分泌系の制御に広く影響する。また我々はこれまでに下垂体 BMP システムおよび時計遺伝子がゴナドトロピン分泌調節に関与していることを報告してきた。そこで今回我々はマウスゴナドトロープ L β T2 細胞を用いて、オレキシンが下垂体ゴナドトロピン分泌に与える影響を BMP シグナルや時計遺伝子との関連に着目して検討した。その結果、L β T2 細胞にオレキシン受容体 OX1R・OX2R の発現を認め、GnRH 非存在下においてオレキシン A 刺激により濃度依存性にゴナドトロピン発現の上昇を認めた。また GnRH 存在下においては GnRH 刺激により上昇したゴナドトロピンの発現をオレキシン A が有意に抑制することが明らかとなった。さらに、GnRH は OX1R・OX2R の発現を増強させる一方で、オレキシン A は GnRH 受容体の発現を抑制したことから、オレキシン A は GnRH 受容体の発現を調整することによって GnRH 刺激下のゴナドトロピン発現を制御している可能性が示唆された。またオレキシン A と GnRH はいずれも時計遺伝子 Bmal1・Clock mRNA の発現を上昇させることが明らかとなった。次にオレキシン、BMP シグナルおよび時計遺伝子の関係について検討を行った。BMP-6/-15 は OX1R・OX2R の発現および時計遺伝子の発現を上昇させた。さらに、オレキシン A は BMP 受容体 ALK-2/BMPRII の発現増強を介して、BMP 受容体シグナル：Smad1/5/9 リン酸化を増強させることが明らかとなった。以上より、マウスゴナドトロープ細胞において、オレキシンは GnRH 作用および下垂体 BMP システムと相互に影響を与えながら、時計遺伝子の発現を介してゴナドトロピンの発現を制御していることが明らかとなった。

ウナギ C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)の受容体解析と受容体脳内マッピングによる新規機能予測

○和泉知輝¹、井田隆徳²、Marty K.S. Wong¹、塚田岳大¹

¹東邦大学 大学院理学研究科

²宮崎大学 フロンティア科学総合研究センター

ナトリウム利尿ペプチド(NP)は心臓で発現し、血圧調節に働くANP・BNPと、脳で発現するCNPに分類される。しかし、脊椎動物におけるCNPの中枢機能は発見以来30年以上不明である。私達は、硬骨魚類においてCNP分子が多様化し、4つのCNP分子(CNP1-4)が保存されていることに着眼点をおき、魚類を用いてCNPの中枢機能を探っている。近年、私達はニホンウナギにはCNP1,3,4の他にCNP4のパラログ(CNP4b)が発現していることを明らかにしている。しかし、これらの4種のCNP分子がナトリウム利尿ペプチド受容体(NPR)にどのように作用しているかは不明である。そこで、ANPやBNPの受容体(NPR-A)とCNP受容体(NPR-B)をCHO細胞に発現させ、cGMP産生能を調べた。その結果、CNPはNPR-Aに対するcGMP産生能が低い、NPR-Bに対してはCNP4>4b>1>>3の順でcGMP産生能があることがわかった。次に、*in situ* hybridization法を用いてウナギ脳におけるNPR-A, -Bの局在とクリアランス受容体(NPR-C, -D)の局在を調べた。その結果、4種類のNPRsが視床下部や視索前野に局在していた。これらの部位にはCNP1や4が発現しており、CNPとNPR-Bの相互作用(paracrine)があることが示唆された。また、エバンスブルー生体染色により視床下部や視索前野は血液脳関門を欠く部位であることが明らかとなった。以上のことから、脳に発現していないANPやBNPも血液中からこれらの部位に作用する(endocrine)可能性があり、NPファミリーが視床下部-下垂体軸に脳と末梢の両方から作用するペプチドホルモンである可能性が示唆された。

一般演題



- 一般演題
- 1 下垂体細胞と発現分子の性状分布（3）
 - 2 下垂体ホルモンと環境（3）
 - 3 下垂体ホルモンと生殖・繁殖（3）
 - 4 下垂体と臨床（4）
 - 5 下垂体およびその機能研究に有用な研究手法（5）

ラット下垂体中葉側の CD9 陽性細胞は前葉へ移動する

○堀口幸太郎¹、藤原 研²、塚田岳大³、中倉 敬⁴、吉田彩舟⁵、長谷川瑠美¹、瀧上 周¹

- 6) 杏林大学 保健学部 解剖学・細胞生物学領域
- 7) 神奈川大学 理学部 生物科学科
- 8) 東邦大学 理学部 生物分子科学科
- 9) 帝京大学 医学部 解剖学講座
- 10) 東京慈恵医科大学 生化学講座

下垂体前葉には、Marginal Cell Layer (MCL) という中葉と前葉に跨るラトケの遺残腔に接する一層の細胞層がある。MCL には S100 β タンパク質と転写因子 SOX2 を発現する (S100 β /SOX2 陽性) 細胞が存在し、成体組織幹細胞と考えられている。我々は、ラット下垂体の中葉側と前葉側 MCL の S100 β /SOX2 陽性細胞が膜タンパク質 CD9 を発現することを見出した。そして、中葉側 MCL の CD9 陽性細胞が、中葉と前葉との接着部分 (Cell bridge) を移動し、前葉のホルモン産生細胞供給に関わる可能性を報告した。しかし、中葉側 MCL の CD9 陽性細胞がいつどのように前葉側へ移動するのか不明な点が多い。本研究では、移動メカニズム解明の端緒として、細胞の移動を制御する転写因子 SLUG と移動を支える細胞骨格であるファイバー状アクチン (F-actin) の組織学的な観察を行った。その結果、Cell bridge において、CD9 陽性細胞は SLUG 及び F-actin 陽性であることが明らかとなった。また、S100 β のプロモーター領域に GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックラット (S100 β -GFP ラット) の下垂体中後葉と野生型ラットの前葉を重ね合わせてコラーゲンゲル内で器官培養を行うことで、GFP 陽性細胞が野生型の前葉内に観察された。さらに、中葉側 MCL の CD9 陽性細胞で膜タンパク質 tetraspanin 1 (TSPAN1) が高発現することを見出し、*in vitro* においてその発現を抑制すると CD9 陽性細胞の移動が低下した。以上の結果は、中葉側 MCL の CD9 陽性細胞が前葉の成体組織幹細胞の役割を有し、ラトケの遺残腔を越え、前葉側のホルモン産生細胞供給を担っていることを支持すると考えている。

ラット新生仔下垂体における新規濾胞星状細胞マーカー分子Aldolase Cの発現様式

伊澤和人¹、許 瑾¹、石田 睦²、藤原葉子^{1,3}、矢田部 恵⁴、大野伸彦⁴、○藤原 研^{1,2}

¹ 神奈川大学 理学部 生物科学科

² 神奈川大学 大学院 理学研究科

³ 神奈川大学 総合理学研究所

⁴ 自治医科大学 医学部 解剖学講座 組織学部門

濾胞星状細胞を光学顕微鏡で同定するために様々なマーカー分子が報告されている。その中でも、S100 β タンパク質はラットを含め様々な動物における濾胞星状細胞のマーカー分子として用いられている。ラットにおいて下垂体前葉のS100 β タンパク質は免疫組織化学で生後10日 (P10)から検出され、その後増加する (Soji, et. al., 1994)。そのため、P10以前の濾胞星状細胞をは光学顕微鏡下で検出することができず、濾胞星状細胞の発生、機能を理解するうえで、より未熟な個体での濾胞星状細胞を検出できるマーカー分子が必要であった。最近、我々は解糖酵素の一つであるAldolase Cが、成体ラット及びマウスにおける濾胞星状細胞のマーカー分子として利用できることを報告した (Fujiwara, et. al., 2020)。そこで本研究では、ラットを用いてAldolase Cが新生仔期下垂体前葉の濾胞星状細胞で発現するか否かを検証した。免疫組織化学により、S100 β タンパク質陽性反応はP5の前葉ではほとんど見られず、既報に一致しP10の前葉で僅かに検出された。一方、Aldolase CはP0, P5, P10の前葉で陽性反応が確認された。さらに、電子顕微鏡によりP5の下垂体前葉には既に濾胞星状細胞の特徴である偽濾胞を形成する無顆粒性細胞が存在した。免疫電子顕微鏡によりAldolase C陽性反応は、偽濾胞を形成する無顆粒性細胞で確認されたが、顆粒細胞では確認されなかった。以上の結果から、Aldolase Cは新生仔の濾胞星状細胞も検出できるマーカー分子として利用できることが明らかとなった。

ソマトラクチン- α (SL- α) およびソマトラクチン-b (SL-b) 遺伝子の二重欠損ゼブラフィッシュの作出とその表現型(外部形態)の観察

○大原 倫仁¹、南 和希¹、今野 紀文²、中町 智哉²、松田 恒平²

¹ 富山大学 大学院 理工学研究科 生体制御

² 富山大学 学術研究部 理学系

ソマトラクチン(SL)は、成長ホルモン/プロラクチンファミリーに属しており、2分子種(SL- α とSL- β)存在する。SLは成長や脂質代謝、体色等の調節に作用する可能性が報告されている。ゼブラフィッシュは両SL遺伝子を保持し、ゲノム編集実績が豊富であることから、現在ゼブラフィッシュにおけるSLの機能解析を進めている。前大会では、SL- α またはSL- β 遺伝子の欠損は、成長、脂質代謝および体色調節に影響を与えなかったことを報告した。しかしながら、SL- α とSL- β それぞれの遺伝子欠損においてSL- α あるいはSL- β が代償的に作用した可能性が考えられた。そこで、SL- α とSL- β 遺伝子を共に欠損させたゼブラフィッシュ(二重欠損個体)を作出して、表現型解析を進めている。本大会ではその進捗を報告する。

まず、両SL遺伝子の欠損が及ぼす成長への影響を調べるため、WTおよび二重欠損個体の全長、体高および体重を計測した。その結果、WT、二重欠損個体の全長、体高および体重に有意な差はなかった。次に、色素胞数に及ぼす影響を調べるため、WTおよび二重欠損個体における色素胞の数を計測した。その結果、WTおよび二重欠損個体の色素胞数に有意な差はなかった。最後に、体色調節に及ぼす影響を調べるため、白背景または黒背景に飼育したWTおよび二重欠損個体の体全体の輝度を比較した。その結果、白背景または黒背景で飼育したWTおよび二重欠損個体の体全体の輝度に有意な差はなかった。

以上の結果より、両SL遺伝子の欠損は成長、色素胞数、体色調節に影響を与えないことが示唆された。

マゴイとニシキゴイにおける液性体色調節因子の作用の比較

○水澤寛太¹、六鹿比斗志¹、山川将輝¹、大野佑紀²、佐藤 将²、高橋明義¹

¹ 北里大学 海洋生命科学部 魚類分子内分泌学研究室、

² 新潟県内水面水産試験場

魚類は一般に背地色の明暗に合わせて体色を変化させることができる。この体色変化はメラニン凝集ホルモン(MCH)などのホルモンと交感神経によって調節される。これまでに我々は、ニシキゴイの一品種である大正三色において、背地色に応じた生理学的体色変化が起きにくいことを見出した。一方、マゴイにおいても大正三色においてもMCHの血中濃度は背地色によって変化しないことから、マゴイの体色変化に対して、MCHは少なくとも血中ホルモンとしては関与しないと考えられる。本研究では、マゴイと大正三色の体色調節能が異なる原因を明らかにするために、マゴイと大正三色間で鱗の交換移植を行い、それぞれの鱗の黒色素胞における色素分布がレシピエント体内の液性体色調節因子によってどのような影響を受けるかを調べた。黒背地に馴致したマゴイから摘出した鱗を白背地に馴致したマゴイと大正三色に移植した結果、マゴイに移植した鱗の黒色素胞では色素が凝集したが、大正三色に移植した鱗では色素が凝集しないケースが見られた。一方、黒背地に馴致した大正三色の鱗を白背地に馴致したマゴイに移植すると、鱗の黒色素胞において色素が凝集したが、大正三色に移植した鱗では色素がほとんど凝集しなかった。以上の結果は、マゴイでは皮膚内に存在する何らかの液性体色調節因子の濃度が背地色に応じて変化すること、また大正三色では液性体色調節因子の濃度がマゴイほど明瞭に背地色に応じて変化しないことを示唆する。次に、マゴイと大正三色の鱗に対してノルアドレナリンあるいはアドレナリンを投与した結果、ノルアドレナリンはマゴイと大正三色どちらの鱗に対しても用量依存的に黒色素胞の色素の凝集を促したが、アドレナリンはマゴイの鱗に対してのみ用量依存的に黒色素胞の色素の凝集を促した。この結果は、大正三色の鱗の黒色素胞のアドレナリン感受性がマゴイの黒色素胞に比べて低いことを示唆する。

SABER-FISH 法を用いたメダカ下垂体における遺伝子発現の解析

○佐藤恵太、大内淑代

岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 細胞組織学

動物は主要な光受容組織である眼だけでなく、様々な眼外組織で光を感じる能力を持つ。これらの組織で光を細胞応答に変換するのはビタミン A のアルデヒド体(レチナール)を発色団とする光受容分子、オプシンである。第 33 回の本学術集会にて私達は、メダカ下垂体で in situ hybridization(ISH)により複数のオプシンが検出されることを報告し、下垂体ホルモンの発現パターンとの比較から、オプシンを発現するホルモン産生細胞を推定した。しかし、感度と発現量の問題から、NBT/BCIP を用いた発色法ではオプシン mRNA を検出できたが蛍光法では検出できず、下垂体ホルモンとの多重 ISH による細胞同定には至らなかった。

近年、組織・細胞内の核酸を高感度検出する新手法として RNAscope や in situ hybridization chain reaction など、核酸の信号を増強する様々な方法が開発・発表されている。これらの方法はそれぞれコスト、実験結果の安定性などの点で一長一短であり、実験者の環境にあう適切な手法を選択する必要があると考えられる。今回私達は、2019 年に Kishi らが発表した、プライマー交換反応を用いた蛍光 ISH(SABER-FISH: Signal Amplification By Exchange Reaction-Fluorescent ISH)法を導入し、メダカ下垂体に発現するオプシンとホルモンの mRNA 検出を試みた。その結果、この手法を用いて比較的成本パフォーマンスと安定性よく、従来の riboprobe を用いた ISH と矛盾しない実験結果を得た。また、発色法でしか検出できなかった mRNA の蛍光検出が可能となり、オプシンとホルモンの多重蛍光 ISH に成功したため、これを報告する。

加齢に伴う皮膚ステロイド合成系の変容は毛包幹細胞において小胞体ストレスを引き起こす

○原口省吾¹、大滝博和²、石川紘司³、杉浦悠毅⁴、嶋雄一⁵、土居雅夫⁶、生水真紀夫⁷、笹野公伸⁸、末松誠⁹、宮崎章¹

¹昭和大学 医学部 生化学講座

²東京薬科大学 薬学部 機能形態学

³昭和大学 医学部 整形外科学講座

⁴京都大学 医学部附属がん免疫総合研究センター

⁵久留米大学 医学部 解剖学講座

⁶京都大学大学院 薬学研究科 システムバイオロジー分野

⁷千葉大学大学院 医学研究院 生殖医学講座

⁸東北大学大学院 医学系研究科 病理診断学分野

⁹慶應義塾大学 医学部 医化学教室

ステロイドホルモンの主要な産生部位は性腺と副腎であるが、脳や皮膚にも独自のステロイド合成系が存在する。脳や皮膚で合成されたステロイドは循環せず、ステロイド合成細胞の近傍で局所的に作用を発揮する。循環型と局所型のステロイドが協働することで、脳や皮膚の機能を精緻に制御している。しかし、加齢に伴い性腺機能が低下すると、循環する性ステロイド量が減少する。そこで、性腺機能の低下が皮膚のステロイド合成系にどのような変化を引き起こすのか、その変化は皮膚機能にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的として研究を実施した。特に、女性に比べ、エビデンスに乏しい状況にある男性を想定とした。

最初に若齢(2 ヶ月齢)と高齢(22 ヶ月齢)の雄マウスを用いて、血中と皮膚組織中のステロイド量を LC-ESI-MS/MS で測定した。これまで報告されている通り血中テストステロンは減少していたが、興味深いことに皮膚組織中のテストステロンは増加していた。続いて、イメージング質量分析やヒト脂腺細胞株を用いた解析の結果、皮膚におけるテストステロン量の増加は皮脂腺の機能亢進の結果であった。

次に高齢時の皮膚局所におけるテストステロン量の増加が老人性皮膚疾患などに関与するのか解析を行った。その結果、高濃度テストステロンは体毛の伸長を抑制した。そこで、その作用機序を解析した結果、毛乳頭細胞のアンドロゲン受容体(AR)を介した作用ではなく、毛包幹細胞に直接テストステロンが作用を及ぼしていた。毛包幹細胞において、テストステロンはゴルジ体に発現する亜鉛トランスポーターにアロステリックに作用すると、毛包幹細胞の亜鉛恒常性を破綻させ、小胞体ストレスを引き起こした。その結果、毛包幹細胞の分化・増殖や細胞死が引き起こされ、体毛の伸長が抑制されたと考えられる。

ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)はゴナドトロフからのアネキシン A5 含有マイクロベジクルの放出を促進する

○汾陽光盛、千葉秀一、村田拓也
岡山理科大学獣医生理学研究室

細胞外小胞(Extracellular Vesicle: EV、主としてエクソソームとマイクロベジクル)は、細胞が放出する小さな膜粒子である。エクソソームはエンドソームから開口放出で、マイクロベジクルは、細胞膜から発芽によって生成される。EV は様々なシグナル分子を含んでおり、細胞間コミュニケーションとして近年注目されている。ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)は、ゴナドトロフにおいてアネキシン A5 (ANXA5)の合成を増強し、ANXA5 がゴナドトロピン分泌に対する GnRH の作用を少なくとも部分的に媒介することを報告してきた。我々は、GnRH が性腺刺激ホルモン分泌細胞(LbT2)から ANXA5 を含む EV の放出を促進することを見いだした。ANXA5 は、LbT2 培養上清の 20,000 xg 画分に含まれる。本研究では、この分画のエクソソームマーカータンパク質を調べると共に、免疫細胞化学で EV の観察を試みた。最後に、Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS, qNano Gold, IZON Ltd.) を用いて、LbT2 の培養上清の EV を定量した。ANXA5 は LbT2 培養上清の 20,000 xg 画分にのみ存在し、ESCRT 複合体の構成要素である TSG101 と Alix は 105,000 xg 画分に認められ、ANXA5 を含むのがマイクロベジクルであることが明らかとなった。TRPS によって、GnRH アゴニストによって直径 100nm 前後の粒子の増加することが示された。LbT2 の GnRH アゴニスト刺激 10 分後に、免疫細胞化学的に ANXA5 陽性粒子が検出された。これらの結果は、GnRH がゴナドトロフからの ANXA5 を含むマイクロベジクルの放出を刺激することを示している。

卵巣摘出によるラット下垂体前葉内の変化について

○タクマサイジョウ、金崎春彦、岡田裕枝、折出亜希、京 哲
島根大学 医学部 産科婦人科

【目的】卵巣摘出による下垂体前葉ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ、ラクトロフ)の変化及び性ステロイドホルモン補充の影響について検討した。

【方法】6 週齢の雌ラットの卵巣を摘出し、下垂体前葉におけるゴナドトロピンサブユニット及びプロラクチン発現の変化、関連する視床下部因子の受容体発現及び下垂体インヒビンサブユニット発現について定量 PCR で検討した。

【結果】卵巣摘出により下垂体前葉の LHb サブユニットは約 6 倍、 α 及び FSHb サブユニットは約 2 倍に増加した。卵巣摘出後に E2 を補充したラットではこれらのゴナドトロピンサブユニットの上昇は完全に抑制された。アンドロゲンであるジヒドロテストステロン(DHT)の補充は卵巣除去による LHb サブユニットの増加を抑制しなかったが、FSHb サブユニットの増加は DHT 補充で抑制された。卵巣摘出により下垂体前葉のプロラクチン発現は有意に減少したが、E2 及び DHT 補充ラットではプロラクチンは減少しなかった。卵巣摘出により下垂体前葉に発現する GnRH 受容体遺伝子は有意に増加し、E2 補充でこの増加は完全に抑制された。TRH 受容体、PACAP 受容体、キスペプチン受容体遺伝子発現は卵巣摘出で変化しなかった。下垂体前葉に存在するインヒビン α bA、bB サブユニット発現に卵巣摘出による影響は見られなかったが下垂体前葉のフォリスタチン発現は卵巣除去により約 3.3 倍に増加し、この増加は E2 補充で完全に抑制された。

【考察】卵巣除去による E2 の欠落はネガティブフィードバックによるゴナドトロピン発現の上昇の他、下垂体前葉内でプロラクチン発現を減少させ、GnRH 受容体遺伝子及びフォリスタチン発現を増加させることが分かった。E2 の欠乏により下垂体局所でも様々な変化が生じていることが示唆された。

妊娠初期ラットにおける夜間特異的下垂体 NR4A3 発現の増加

○寺島 涼太¹、藤本 和香菜¹、谷 知隆¹、久留主 志朗¹、汾陽 光盛²

1) 北里大学 獣医学部 獣医生理学研究室

2) 岡山理科大学 獣医学部 獣医生理学講座

NR4A3 (Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3)は核内受容体NR4Aファミリーの一つで、刺激依存的に発現が誘導され、様々な遺伝子の転写調節に関わることが知られている。下垂体内分泌細胞にも発現は認められているが、その機能は不明である。我々は生殖周期における生理的な下垂体NR4A3発現動態を精査し、視床下部下垂体系におけるNR4A3の発現調節と機能の解明を試みてきた。本研究では、妊娠、偽妊娠中ラットに着目し、24時間周期の下垂体NR4A3発現動態と妊娠期による違いについて検討した。まず、発情前期ラットの子宮頸管を刺激し、偽妊娠を惹起させ、頸管刺激後4日目から5日目までの下垂体Nr4a3 mRNA発現動態を調べた。5時点灯19時消灯の飼育環境下のラットにおいて、下垂体Nr4a3 mRNA発現は消灯直前の17時に増加し、20時をピークに5時まで高いレベルで推移し、点灯後8時から発現が低下した。この夜間に増加するNr4a3の発現動態は性周期中のラットでは認められなかった。さらに、妊娠6日、12日、18日の11時と20時のラット下垂体を調べると、妊娠6日のラットでは、11時に比べ20時で有意にNr4a3 mRNA発現が増加した一方で、妊娠12日、18日のラットでは20時の増加は認められなかった。偽妊娠ラット20時の下垂体NR4A3を二重蛍光免疫染色で観察すると、NR4A3はLH、プロラクチン、TSH、ACTHの産生細胞で発現が認められた。以上の結果から、交尾刺激により下垂体NR4A3発現動態が変化し、夜間に増加するようになることが明らかになり、この変化が妊娠初期特異的であることが示唆された。明暗リズムやサーカディアンリズムに関連した妊娠初期特異的な下垂体機能調節にNR4A3の関与する可能性が示唆された。

成長曲線で気付く下垂体疾患 2 症例の反省

○近藤朱音^{1,2}、林亜紀¹、立花綾香¹、森根幹生¹、檜尾健二¹、岩井艶子²、前田和寿^{1,2}

¹ 四国こどもとおとなの医療センター 産婦人科

² 四国こどもとおとなの医療センター 遺伝医療センター

背景

成長曲線を描くことは小児期から思春期にかけての成長を把握する簡便な方法であり、母子保健法で母子手帳に掲載されている。また学校健康診断の項目としても身長・体重を経年的に評価している。その目的は成長異常の早期発見および早期治療、そしてその時点までの適正な成長を確認することの二つである。しかし実際には自治体での乳児健診を終えると自宅での記録を継続していない場合が多い。成長曲線にて早期に気付けた可能性のあった下垂体腫瘍症例について報告する。

症例1:16 歳女児 146cm(-2.2SD) 38.76kg

15 歳時に体重減少を主訴に小児科受診。初診時に低身長を認め、14 歳時から食思不振があり、体重が 44kg から 35kg まで減少していた。また 12 歳で初経があったものの稀発月経であり 15 歳からは無月経となった。精査にて汎下垂体機能低下を認め尿崩症も含め治療開始。画像診断・髄液検査にて下垂体胚細胞腫と診断。成長曲線では生下時から就学前までは正常範囲内であり、11 歳～12 歳での発症が疑われた。

症例2:13 歳女児 130.0cm(-3.5SD) 29.5kg

12 歳時に近医小児科でワクチン接種時に低身長を指摘された。二次性徴なく初経未。汎下垂体機能低下、尿崩症ありホルモン補充療法を実施、画像にて下垂体胚細胞腫と診断。成長曲線では 8 歳半から発育が停滞しており、その時点での発症が疑われた。

考察

下垂体胚細胞腫では発症時の患児の訴えは倦怠感、食欲不振、無月経などであり疾患として捉えにくい場合がある。様々な症状の中で発育異常は客観的に捉えやすい。しかし母子手帳の記載年齢を過ぎるとこどもの発育を経時的に記録していないことも多く親が気付けないこともある。そのため学校健診において児童の発育状況を把握し疾患の早期発見および治療につなげることは重要であると考えられた。

捺印細胞診は下垂体手術における術中病理診断に有用か。

○田邊宜昭^{1,2,3}, 井下尚子¹, 山田正三²

¹森山記念病院 病理診断科、

²森山記念病院 脳神経外科、

³東京医科歯科大学 人体病理学講座

【背景】脳腫瘍手術の術中病理診断において、凍結切片(FS)の組織診に加え、診断精度の向上を図るべく、細胞診を補助診断として用いている。本研究では、術中病理診断の検査精度を検討した。

【対象】対象は森山記念病院で2022年4月から同年6月までに細胞診併用で術中迅速診断を行ったトルコ鞍部腫瘍25例78検体である。断端評価目的の検体も解析の対象とした。

【方法】液状処理細胞診で用いられ、細胞吸着性が高いとされる Surepath®(SP)とコーティングガラス(CG)の2種類を用い捺印細胞診標本を作成した後に凍結切片を作成した。細胞診、凍結切片、永久標本のいずれかで腫瘍ありと確定できたものを陽性とした。その上で、2つの細胞診標本作成法およびFS法単独での感度、特異度を評価した。

【結果】症例は下垂体腺腫15例、頭蓋咽頭腫2例、髄膜腫2例、軟骨肉腫1例、脊索腫1例、ラトケ嚢胞が4例であった。SP法、CG法、FS法の感度はそれぞれ92%、67%、81%、特異度は87%、87%、93%であった。

【考察】3群の比較においてSP法で最も高い感度がみられ、断端評価において十分な有用性が示された。CG法では頭蓋咽頭腫の症例で細胞付着が得られなかった。腫瘍の種類の違いによる細胞接着性の違いが関与している可能性があるため、症例を選択することにより改善の余地がある。FS法では標本作成できた面の腫瘍細胞の有無は偶発的なものであり、細胞診併用により検査精度を高めることができる。

【結語】トルコ鞍部腫瘍の術中迅速診断で細胞診の有用性を検証した。SP法、CG法でも十分な感度・特異度を示しており、断端評価における細胞診の有用性が示された。

リポソーム封入 X による腫瘍細胞株増殖抑制効果の解析

○桐ヶ谷大樹¹、大島志乃¹、真鍋良幸²、安田敦³、關敏郎³、亀谷美恵¹

¹東海大学 医学部 基礎医学系 分子生命科学領域、

²大阪大学 大学院 理学研究科

³東海大学 医学部 内科学系 腎内分泌代謝内科

ステロイドホルモン X は、妊娠維持には必要不可欠なホルモンであるが、細胞増殖を抑制する機能も報告されている。我々の先行研究でも、X 存在下で様々な腫瘍細胞株を培養すると、濃度依存的に細胞増殖が抑制されることが明らかとなっている。しかしその効果は 200 μ M でという生理的濃度を大幅に超える濃度で最も顕著となり、生理的な意義があるかは明らかでなかった。しかし近年、細胞が産生するエクソソームが多様な機能を持つことが明らかとなり、胎盤でも大量のエクソソームが産生されていることから、X がエクソソームに含まれて、直接周囲の細胞に運搬され、影響を与える可能性が考えられた。

我々は、X を liposome に内包することで細胞内に直接 X を運搬し、がん細胞に直接作用させることにより、抑制効果が高められるのではないかと考えた。そこで X を liposome に内包して、Lipo-X を作製した。がん細胞を様々な濃度の X あるいは Lipo-X 存在下で培養し、細胞増殖が抑制されるかを確かめ、両者の抑制効果を比較解析し、Lipo-X が有用であることを明らかにすることを試みた。細胞株は、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231、マウスミエローマ P3X、マウスリンフォーマ A20、ヒトミエローマ Karpas707H を用いた。培養後、細胞数を計測し、統計処理を行って X と Lipo-X の間で比較解析を行った。

Lipo-X を X 濃度 20 μ M 相当で添加することにより、X 200 μ M 添加群と同程度以上の抑制効果が見られた。また、Lipo-X を X 濃度 2 μ M 相当で添加した結果、X 20 μ M 添加群と同程度若しくは X 2 μ M 添加群と X 20 μ M 添加群の中間程度の抑制効果が見られた。

このことから、Lipo-X を添加することで、X と比較して約 10 倍の腫瘍細胞増殖抑制効果が得られ、Lipo-X は、生理的濃度の X 含有量で免疫抑制効果があることが明らかとなった。今後は、リポソーム封入 X が抗がん剤として有用かを *in vivo* で解析していく予定である。

妊娠免疫システムを用いたヒト化マウス体液性免疫評価システムの確立

○安田 敦¹, 関 敏郎¹, 北島 夏見¹, 関 昌美², 亀谷 美恵³

¹東海大学 医学部 内科学系 腎内分泌代謝内科

²聖隷沼津病院 内科

³東海大学 医学部 基礎医学系 分子生命科学領域

(目的)ヒト免疫系が再構築されたヒト化マウスは、分子標的薬創薬やワクチンによる抗体産生評価に役立つもので、抗体産生能を評価するための優れたモデルの開発が待たれる。しかし、完全に分化した T 細胞と B 細胞の維持が成功せず、マウスで抗原特異的 IgG を発現させることは困難である。我々は、妊娠中の母親が特定の抗体産生を維持しながら、胎児を受け入れることに着目し、妊娠関連タンパク質 IL-4 の発現に基づいてヒト化マウスの産生を試みた。(方法)乳がんワクチンモデルとして開発した 20mer HER2 ペプチド CH401MAP を、健康なドナーの末梢血単核細胞 (PBMC) を移植した NOG-hIL-4-Tg マウスに免疫した。次に、T 細胞のサブセットと活性化レベルをフローサイトメトリーで確認した。糖質コルチコイド受容体 (GR) はリアルタイム RT-PCR で定量化し、ELISA/LC-MS で抗体産生性能を確認した。(結果・考察)高濃度 IL-4 の存在下で、PBMC を移植した NOG-hIL-4 マウスの血漿中に抗原特異的 IgG 抗体産生が検出された。糖質コルチコイドは体液性免疫だけでなく、自然免疫および細胞性免疫も抑制するため、GR 発現レベル、ヒトリンパ球サブセットのプロファイル、および PBMC 移植 NOG-hIL-4 マウスの体液性免疫状態の関係を分析した。結果は、NOG-hIL-4-Tg 脾細胞が免疫後に従来の NOG 脾細胞よりも有意に低いヒト GR mRNA レベルを有することを示した。さらに、血漿中の B 細胞比率と抗原特異的 IgG 濃度は、GR mRNA レベルと強い負の相関を示した。IL-4 は GR 発現を低下させ、B 細胞の生存率を高め、特異抗体を産生するクローン増殖とクラススイッチを誘導すると考えられる。このシステムは、母親の免疫力が感染症や癌から体を守り、さらに、病原体特異的 IgG を産生して胎児に送るのに役立つ可能性がある。

妊娠ホルモンによるヒト化マウス免疫系の調節機能解析

○山田 壮我¹、清水 智香¹、大島 志乃¹、大野 裕介²、柏木 寛史³、安田 敦⁴、關 敏郎⁴、
和泉 俊一郎³、伊藤 亮治²、亀谷 美恵¹、

¹東海大学 医学部 基礎医学 系分子生命科学

²公益財団法人実験動物中央研究所

³東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科学

⁴東海大学医学部 内科学系 腎内分泌代謝内科

【目的】免疫の調節に関連するステロイドホルモンとして、胎盤では妊娠を維持するためにプロゲステロン(P4)が分泌されている。一方担がん状態ではストレスホルモンであるグルココルチコイド(COR)が分泌され、免疫抑制に関与する可能性が考えられている。本研究では、ヒト末梢血単核球(PBMC)を移植したNOGマウスの移植片対宿主病(GVHD)モデル実験系を用いてP4とCORが免疫系に与える影響を比較し、両者にどのような相違があるかを明らかにする事を目的とした。

【方法】健常者から同意を得て採血した後、Ficoll液による比重遠心分離を行い、ヒトPBMC画分を採取した。NOGマウスに経尾静脈でPBMCを移植し、コントロール群(PBSのみ)、P4投与群、COR投与群に分けて週2回の間隔でそれぞれ投与を行った。移植後4週で解剖し、PBMC、脾臓、骨髄、肺を採取し、フローサイトメトリー、組織染色でヒトリンパ球の解析を行った。

【結果】P4投与群ではコントロール群より脾臓細胞数が多く、中でもCD8T細胞が多かった。脾臓と骨髄の両方でヘルパーT細胞よりもキラーT細胞の割合が高い傾向が示された。しかし、これらの細胞の活性化マーカーレベルは低いままであり、また、肺へのヒト白血球の浸潤は低く抑制されていた。また、体重減少などのGVHDの症状はほとんど観察されなかった。COR投与マウスの脾臓細胞数はコントロール、P4と比較して少なく、中でもT細胞が少なかった。また、CD25と疲弊マーカーのPD-1の発現が脾臓では高く骨髄では変わらず、活性化または、疲弊した細胞が多いことが明らかになった。以上の結果から妊娠ホルモンであるP4は、リンパ球の免疫不全マウスへの生着に寄与すること、またキラーT細胞の割合は増加するがGVHDを抑制することが明らかになった。

プロゲステロンとコルチゾールがヒト化マウス抗体産生機能に与える効果の解析

○大島志乃¹、山田壮我¹、清水智香¹、大野裕介²、柏木寛史³、後藤優美子³、關敏郎⁴、
亀谷 美恵¹

¹ 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

² 公益財団法人実験動物中央研究所

³ 東海大学医学部専門診療学系産婦人科学

⁴ 東海大学医学部内科学系腎内分泌代謝内科

P4 と COR は共に妊娠で産生が亢進するステロイドホルモンであるが、妊婦の抗体産生にどのように関与するかは明らかではない。そこで、本研究ではヒト化マウスを用いてこれを明らかにすることを目的とした。

ヒト末梢血単核球(PBMC)を重度免疫不全マウスである hIL-4Tg-NOG マウスに移植した hu-PBL hIL-4 NOG マウスには、ヒト B 細胞が生着し、B 細胞は抗体産生細胞様のマーカー (CD27+CD38+) を発現する。我々はこのマウスに Her2 部分ペプチドである CH401MAP を免疫し、4週間後に脾臓に局在したヒトB細胞とミエローマ細胞(P3X)を電気的融合法により融合させ、ハイブリドーマを得た。これらハイブリドーマはヒト IgG 抗体を産生しており、免疫により CH401MAP 特異的な抗体産生も見られた。

そこで高濃度の P4 または COR で短時間培養した PBMC を hIL-4Tg-NOG マウスに移植し(P4 処理マウスまたは COR 処理マウス)、CH401MAP で免疫を行った際に、マウス血漿中の CH401MAP に対する抗体や脾臓細胞の特異的抗体細胞に相違があるのか検証を行った。

その結果、P4 で処理したマウスの脾臓細胞数は COR 処理したマウスより多く、CH401MAP 抗体産生ハイブリドーマの割合や、抗体濃度も高かった。

P4 はヒト B 細胞の抗体産生能を維持させるが、COR は維持できないことが示唆された。

このヒト化マウスを用いることにより、ヒトホルモンがB細胞の抗体産生に与える影響を検証することが可能であると考えられた。

ヒト多能性幹細胞からの下垂体幹/前駆細胞培養系の樹立について

○野々山葵^{1,2}(Aoi Nonoyama), 河田美穂²(Miho Kawata), 小谷 侑²(Yu Kodani), 亀山俊樹²(Toshiki Kameyama), 齋藤加奈子²(Kanako Saito), 須賀英隆³(Hidetaka Suga), 長崎 弘²(Hiroshi Nagasaki)

¹藤田医科大学大学院 医学研究科 (Fujita Health Univ Grad Sch Med, Aichi, Japan)

²藤田医科大学 医学部 生理学I講座 (Dept Physiol, Fujita Health Univ Sch Med, Aichi, Japan)

³名古屋大学大学院 医学研究科 糖尿病・内分泌内科学 (Dept Endocrinol & Diabetes, Nagoya Univ Grad Sch Med, Aichi, Japan)

近年のげっ歯類を用いた先行研究によって下垂体幹/前駆細胞の存在が見出されたが、ヒト下垂体幹/前駆細胞の存在についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) および胚性幹細胞 (ESC) から誘導した視床下部・下垂体オルガノイドを用いて、ヒト下垂体幹/前駆細胞について検討を行った。蛍光免疫染色により、げっ歯類の下垂体幹/前駆細胞マーカーとして知られている SOX2, CD9, PRRX1/2, PROP1, E-cadherin, Cytokeratin, S100 β , FOXJ1 がオルガノイド内の下垂体様組織で発現を確認した。PSC をオルガノイドから抽出するため、まず下垂体細胞をその表面マーカーである EpCAM を用いて磁気ビーズ法によりソーティングした。EpCAM 陽性細胞を平面的に継代培養したところ、数継代後に紡錘形の接着性細胞が優勢になった。フローサイトメリーでは P6 の接着性細胞の約 98.5% に CD9 が発現していた。免疫組織および RT-PCR にて SOX2, CD9, PRRX1/2, PROP1, E-cadherin などの下垂体幹細胞マーカーおよび下垂体前駆細胞マーカー PITX1, LHX3 の発現を確認した。一方、P7 の接着性細胞には P0 で見られた POMC 発現が見られなかった。以上より接着性細胞は幹細胞性を有する細胞集団であることが示唆された。分化誘導のため P7 の接着性細胞を 3D 培養し血清を添加したところ、7~11 日後に細胞の一部で副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) および成長ホルモン (GH) の免疫活性が認められた。今回の検討でヒトオルガノイド内に下垂体幹/前駆細胞の特徴を有する細胞が存在しており、これらの細胞は MACS と 2D 継代培養により分離、増殖できること、ホルモン産生細胞への分化の可能性が示された。

深層学習による物体検出の受容体薬理学への応用

Practical application of deep learning and object detection to molecular pharmacology of pituitary hormone receptors

○Taka-aki Koshimizu, Sajjaviriya Chortip and Morio Azuma

自治医科大学 医学部 薬理学講座 分子薬理学部門

Division of Molecular Pharmacology, Department of Pharmacology, Jichi Medical University

[Purpose and Background] Diverse phenotypes of our cells, tissues and organs are regulated by hormones and receptors, including pituitary hormone-receptor systems. The size of the phenotypic data as a consequence of the receptor activation continues to rise in an unprecedented pace in hormonal research. How we can effectively handle a big data in basic research to create new findings are under intensive debate. We now have additional tool to measure and analyze a large body of data obtained from humans and animals using deep learning models. When observations by eyes and under microscope were combined with computer vision, images and videos are excellent materials for the deep learning-mediated analysis. [Methods] On the Ubuntu OS server equipped with graphical processing units (GPUs), Tensorflow (TF) and PyTorch were maintained in Conda virtual environments. Pretrained models such as Faster RCNN, SSD ResNet, and CenterNet were used for transfer learning in TF version 1 and 2. [Results and Discussion] We trained our deep learning models using thousands of images of 129/B6 (brown) and C57BL/6 (black) mice in clean cage with new bedding and home cages in the natural condition. For transfer learning based on CenterNet, RAM capacity in GPU and CPU needed at least 48 and 32 GB, respectively, independent of batch size. After training, failure of mouse detection in 4500 images were less than 12 images (0-0.2%) and mean Average Precision (mAP) value was 77% for the mouse detection in clean cage. Repeated detections by the same model reproduced the same XY-coordinates of mouse locations. The results of TF version 1 and 2 were very similar but not the same. These results indicate that established architectures of deep learning models for object detection can be reliably applicable to evaluate effects of drug treatment and genetic interventions on animal behavior in unbiased manner with enough high accuracy. In an on-going trial, vision transformer architecture will be incorporated. Example of our analysis on mother-baby relationship will be presented in a separate paper in this meeting.

Evaluation of maternal response to pups by computer vision and machine learning in V1b knockout mouse

○Chortip Sajjaviriya, Morio Azuma, Hiroyoshi Tsuchiya, and Taka-aki Koshimizu

自治医科大学 医学部 薬理学講座 分子薬理学部門

Division of Molecular Pharmacology, Department of Pharmacology, Jichi Medical University

【Background】 Maternal care giving is intensive process and crucial for the survival and growth of newborn infants. Although maternal care is widely preserved in living animals, genetic factors of strong motivation to maintain the maternal care are not fully understood. By acting on two types of G-protein-coupled receptors, V1a and V1b, arginine vasopressin (AVP) exerts a variety of regulations of social behaviors, including the maternal behaviors. V1a vasopressin receptor is widely expressed in the central nervous system, and seems to play a main role in AVP-mediated maternal behavior regulation in rodents. In contrast, the role of V1b receptors in maternal behavior is unclear. It was reported that blocking of V1b receptor in rodent brain affected maternal behavior. However, it might be difficult to detect specific V1b function due to limited effect of a V1b blocker.

【Purpose】 Using genetically modified mice, which specifically lack the V1b receptor gene, we examined behavioral changes during maternal care in the lactation phase.

【Methods】 Taking the advantage of behavioral computer science into account, we employed the computer vision and deep learning to investigate a possible role of V1b receptor in pup retrieval test.

【Results and Discussion】 Dam and pups were recorded in a video and their images were trained by deep learning models. The models were then applied to a large scale of new dataset to detect objects, in this case dam and multiple pups. Interestingly, our developed deep learning models successfully analyzed the relationships between lactating dam and pups in wild type and gene knockout mice during freely moving open field and pup retrieval observations. The reproducible results were obtained by our object detection protocol; the same model repeatedly detected an object with the same XY-coordinates. Finally, we found that this method using computer vision and deep learning can be widely applicable to delineate complex effects of gene-deletion and drug treatment on maternal behaviors.

謝辞

第 36 回日本下垂体研究会学術集会の開催にあたり、ご寄付、広告掲載に協賛いただきました、各社様に感謝申し上げます。

第一三共株式会社

田辺三菱製薬株式会社

帝人ヘルスケア株式会社

日本イーライリリー株式会社

日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

持田製薬株式会社

(五十音順)

本シンポジウム開催にあたっては、東海大学総合研究機構から一部補助を受けております。
