

## 神経機能制御研究室

(第13研究室 金子(大谷)律子 教授)

Laboratory for Regulation and Function of Neurons

### はじめに

当研究室では、色々な因子が神経細胞に及ぼす影響を調べている。現在は特に、ホルモンが神経細胞の発生・成長過程に及ぼす影響を中心に調べている。以下、現在学生が取り組んでいる研究内容について簡単に紹介する。

### 研究内容

【魚の脳の性分化や脳に対するホルモンの影響に関する研究】

#### ① GnRH3産生ニューロンと生殖行動に対するステロイドホルモンの影響

生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH:Gonadotropin-Releasing Hormone)は、生殖機能の二大要素である生殖腺の発達と性行動の発現をコントロールする重要因子である。これまでの研究により、脊椎動物では、GnRH1, GnRH2, GnRH3 という3種類のGnRH遺伝子が存在することがわかっており(Okubo et al.; 2007)、このうちGnRH3は生殖行動の促進を担っていると考えられている。我々のこれまでの研究により、ティラピア脳GnRH3産生ニューロンの細胞数及び大きさに有意な雌雄差が認められた(雄>雌)。そこで、GnRH3産生ニューロンと生殖機能との関わりを明らかにする為に、性ホルモンによるGnRH3産生ニューロン数の変化と生殖行動への影響を調べた。

方法としては、成熟雌ティラピアへ性ホルモン(11-KT;魚類特有の男性ホルモン, E2;女性ホルモン)を腹腔注射し、GnRH3産生ニューロンの形態的变化を免疫蛍光染色により観察した。また、ホルモン投与後2週間、雄型の生殖行動である“巣作り行動”を行うか観察した。

その結果、成熟メスに11-KTを投与することによって、本来は雄のみが行う巣作り行動を雌に誘起することに成功した。さらにこの時、GnRH3産生ニューロン数は、雄と同程度まで増加することがわかった。今後、GnRH3産生ニューロンと生殖行動との直接的な関わりを調べていきたい。(倉持麻未)

#### ② 成熟脳の細胞増殖に及ぼす男性ホルモンの影響

これまでの我々の研究により、成熟ティラピアのGnRH3産生ニューロン数には雌雄差があること及び、雌のティラピアに11-KTを腹腔内注射することによりGnRH3産生ニューロン数が増加し、雄型になる事が明らかになった。

その原因を調べる一環として、本研究では、男性ホルモン(11-KT, MT)投与が雌のティラピア脳の細胞増殖に影響を及ぼすか調べることにした。方法としては、成熟雌ティラピアを4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定後、脳を摘出し、摘出した脳を前額断で連続的に終神経節

から中脳までの凍結切片 (20  $\mu$  m) を作製し、免疫染色を行った。免疫染色には、1 次抗体として抗増殖細胞核抗原 (PCNA) 抗体を、2 次抗体としてビオチンラベル anti-mouse IgG を用い、DAB 法により発色した。その結果、ティラピア脳の脳周囲及び、脳室に PCNA 陽性細胞の存在を確認した。

また、Oil 群 (コントロール) と 11-KT 群、MT 群を比較すると視索前野後部、中脳前部以外の脳室周囲で、男性ホルモン処理 (11-KT、MT) によって PCNA 陽性細胞が有意に増加することがわかった。

今後、この脳の各部位で増殖した細胞が何細胞になるのか、PCNA 抗体と各種抗体を用いた多重免疫組織化学により検討する。(河西大輔)

### ③ 培養 GnRH1 ニューロンに対するホルモン及び内分泌攪乱物質の影響

動物の生殖情報伝達系は「視床下部-脳下垂体-生殖腺」を中心に機能しているが、この生殖の中枢制御の鍵を握っているのが、生殖腺刺激ホルモンを産生・放出調節する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-Releasing Hormone; GnRH) 産生ニューロンである。ヒトや動物の生殖機能は、性ステロイドホルモンの影響を強く受けて調節されており、それらの調節の中心的役割を担っている GnRH 産生ニューロンは、性ステロイドホルモンの直接もしくは間接的な影響を受けていると考えられる。しかしながら、魚類の脳神経細胞の培養系の確立が不十分であったこと、及び GnRH 産生ニュー

ロンを標識して培養することが困難であったため、魚類 GnRH 産生ニューロンに対する性ステロイドホルモンの影響の解析が為されなかった。我々は、GnRH1 (GnRH ペプチドの 1 つ) 産生ニューロンを Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子導入によって蛍光標識した GFP-GnRH1 トランスジェニックメダカ視床下部細胞の初代培養系を確立した。そしてこの培養系を用いて、GnRH1 ペプチド産生ニューロンに対する性ステロイドホルモンや内分泌攪乱物質の影響について解析を行っている。現在、性ステロイドホルモンとしては  $17\beta$ -エストラジオール (E2)、また内分泌攪乱物質としてはビスフェノール A (BPA) について、GnRH1 ニューロンに対する形態的特徴 (突起の長さや細胞体の大きさ) に対する影響を調べている。(田中純)

### 【マウスの脳の性分化や CRMP4 タンパク質の脳形成への役割に関する研究】

#### ① CRMP4 がマウス脳の雌雄差と生殖機能に及ぼす影響

前腹側脳質周囲核 (AVPV) は、雌の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の分泌パターン形成に関与すると考えられている。これまでの我々のプロテオミクス解析の結果から、AVPV の性差形成時期 (生後 1 日) に部位及び時期特異的に雌雄差がある蛋白質として collapsin response mediator protein-4 (CRMP4) が同定された。解析の結果、生後 1 日での CRMP4 蛋白質及び mRNA 発現量は雄の方が雌より有意に高かったが、雌雄差形成後には蛋白質及び mRNA

発現量の雌雄差は消失した。そこで本研究では、CRMP4 ノックアウトマウスを用いて、CRMP4 遺伝子の欠損により出生率や生殖時期・生殖周期に異常が出現するか調べた。更に、野生型の AVPV で雌雄差が見られる以下の構造について、野生型マウスと CRMP4 ノックアウトマウスとを比較検討した。比較した構造は、AVPV 神経核の大きさ及び同核内の全ニューロン数、キスペプチンニューロン数、ドーパミン作動性ニューロン数である。

その結果、CRMP4 遺伝子の欠損により、出生率が低下することが明らかとなった。また、CRMP4 ノックアウトマウスでは、ドーパミン作動性ニューロンの細胞数が雌のみで増加し、ノックアウトマウスでは野生型に比べ、雌雄差が拡大していた。今回比較したそれ以外の構造については、CRMP4 ノックアウトマウスは野生型と同様の雌雄差を示した。この結果から、我々は、雌の AVPV ドーパミン作動性ニューロン数の調節に CRMP4 が重要であることを発見した。今後、CRMP4 遺伝子の欠損による出生率低下の原因、CRMP4 によるドーパミン作動性ニューロンの細胞数調節メカニズム、CRMP4 が他の神経伝達物質に及ぼす影響などについて調べたいと考えている。(酒匂美幸)

## ② 発生過程マウス脳の CRMP4 mRNA 発現変化

CRMP-4(collapsin response mediator protein-4)は、神経突起先端の成長円錐を崩壊させるセマフォリンの応答を媒介するタンパクである。我々は性差形成時期

である生後1日のラット脳の AVPV(前腹側脳室周囲核)では、CRMP4 の発現に性差(♂>♀)があり、また性差形成終了時期である生後6日目では、その性差が消失するという事を明らかにした。本研究では、我々が発見した AVPV における CRMP4 mRNA の性差を *in situ hybridization* 法を用いて形態的に確かめること、および同法を用いて未だ明らかとなっていない CRMP4 の脳内における詳細な発現部位の同定や発現の生後変化を調べることを目的とした。

生後1日~8週の雌雄マウスを用い、深麻酔下で生理食塩水で灌流後4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定し、脳を摘出した。摘出脳より20μmの凍結切片を作製した。*In situ hybridization* には、DIGラベルした CRMP4 mRNA に相補的な RNA プローブを用いた。プローブと反応させた後、anti-DIG アルカリフォスファターゼ・ラベル抗体と反応させ、その後 NBT/BCIP を用いて発色させ、CRMP4 mRNA の発現脳部位を同定した。

CRMP4 mRNA に相補的な RNA プローブを用いた *in situ hybridization* 法により、我々が発見した生後1日における CRMP4 mRNA 発現の性差を切片上で確認した。さらに、嗅球と大脳皮質では、生後1日から生後7日目にかけて CRMP4 mRNA の発現する層が変化するという新しい知見が得られた。現在、CRMP4 の機能を明らかにする目的で、CRMP4 ノックアウトマウスでの嗅球層構造形成異常について調べている。(土屋貴大)

【神経細胞の保護に関する研究】

① 網膜神経節細胞に及ぼす女性ホルモンの神経保護作用

これまで我々の研究グループ（東洋大学・金子および聖マリアンナ医科大学眼科学）は、女性ホルモンの網膜神経節細胞に対する保護作用を明らかにしてきた。そこで、本研究ではアポトーシス誘導に深く関係しているとされる 14-3-3zeta 蛋白質に注目し、神経毒である N-methyl-D-aspartate (NMDA) による網膜神経節細胞死の過程およびそれに対する女性ホルモン (17 $\beta$ -Estradiol (E2)) の保護作用過程に 14-3-3zeta 蛋白質が関与しているか検討した。実験動物として生後 8 週の Wistar rat (♀) を用い、Sham 群 (対照群)、Ovx 群 (卵巣摘出群)、Ovx + E2 群 (卵巣摘出 + E2 移植群) の 3 群を作製した。これらの Wistar rat を 2 週間後、右眼にコントロールとして 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、左眼に 10mM NMDA を注入し、24 時間および 6 時間後に眼球を摘出し、蛋白抽出、RNA 抽出および血液採取を行った。Western blot 解析法および Real-time PCR 解析法を用いて、14-3-3zeta 蛋白質、p-14-3-3zeta 蛋白質および 14-3-3zeta mRNA の発現を調べたところ、NMDA 注入後の 14-3-3zeta 蛋白質発現、p-14-3-3zeta 蛋白質発現および 14-3-3zeta mRNA 発現に群間で差が認められ、NMDA による網膜神経節細胞の細胞死、および E2 による神経保護効果にリン酸化 14-3-3zeta 蛋白質が関与することが示唆された。(小関夏子)

② マウス海馬神経培養細胞株における女性ホルモンの神経保護効果

過去の研究報告では、虚血や神経毒による神経細胞死に対する女性ホルモン (estradiol (E2)) の神経保護効果が報告されている。しかし、E2 の神経保護効果の詳しいメカニズムには未だ不明な点が存在する。これまでに、マウス海馬神経培養細胞株である HT-22 cell を用い、glutamate 毒性に対する E2 の神経保護効果を調べた研究報告が幾つか存在するが、HT-22 cell への E2 の作用機序に関して矛盾する報告が多く、統一的な見解が未だ得られていない。

そこで、本研究では、HT-22 細胞を用いて、glutamate 毒性に対する E2 の神経保護効果の作用機序を検証することを目的とし、まず、glutamate の HT-22 細胞に対する影響および glutamate に対する E2 の神経保護効果について検討した。さらに、E2 の神経保護効果のメカニズムの解明として、Estrogen receptor (ER) の発現、E2-BSA の神経保護効果、ER 拮抗薬 (ICI182,780) の作用について検討した。

その結果、glutamate による神経細胞死および glutamate 毒性に対する E2 の神経保護効果については、glutamate は 2.5mM から有意に神経細胞死を起こし、高濃度 (10 $\mu$ M) の E2 添加によって、glutamate 単独処理と比較して有意に細胞生存率が回復することが分かった。次に ER の発現を調べたところ、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、GPR30 の 3 種類の ER のうち、ER $\alpha$  と GPR30 の mRNA の発現が HT-22 細胞に認められた。また、glutamate 毒

性に対する E2-BSA の神経保護効果を検討したところ、E2-BSA による神経保護効果が認められなかった。さらに、ER 拮抗薬 (ICI182,780) を用いて ER の関与を調べたところ、ICI182,780 による E2 の神経保護効果の阻害が認められなかった。

以上の結果から、HT-22 細胞には、ER  $\alpha$  と GPR30 が発現しているが、glutamate 毒性に対する E2 による神経保護の作用は ER を介するものでないと判断された。(荻野友佑)

#### 【マイクロチップを用いた細胞応答観測システムの構築】

##### マイクロチップを用いた細胞培養の確立

近年、マイクロチップを用いた細胞培養の開発が進んでいる。マイクロチップを用いた細胞培養のメリットとしては、① 例えば生検のために摘出した癌細胞などのように、少数しか得る事が出来ない細胞についての分析や薬剤テスト (抗癌剤など) を可能にする、② 流路内は極少量な空間しかないため、測定時間を大幅に短縮できる、③ 試薬・廃液の削減、などが挙げられる。これらのメリットを活かし、将来的に医療用検査システムとしての利用が期待されている。しかし、マイクロチップを用いた細胞培養は未だ開発段階である。本研究ではマイクロ科学技研株式会社協力の下、PC12 (ラット副腎髄質由来) 細胞を用いてマイクロチップ培養法の確立に取り組んだ。

使用しているマイクロチップ内には幅  $200\mu\text{m}$ 、深さ  $100\mu\text{m}$  の溝があり、この流路内で培養や分析を行うことができる。

DMEM 培地 (FBS10%, penicillin および streptomycin 添加) 中で  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養した PC12 細胞を消化酵素 (パパイン) を用いて培養フラスコから剥がし、セルマトリックスIVなどの基質で予めコートしたチップ内に  $100\mu\text{L}$  のシリンジで細胞を導入した。一定の静置時間後培養液を流し、細胞の定着を観察した。本研究では、細胞を定着させるための基質濃度や静置時間などについて検討を行った。(肥後孝幸)

#### 【2010年度 国際誌発表論文】

1. Ooka S, Nakano H, Matsuda T, Okamoto K, Suematsu N, Kurokawa MS, Ohtani-Kaneko R, Masuko K, Ozaki S, Kato T. Proteomic surveillance of autoantigens in patients with Behcet's disease by a proteomic approach. *Microbiol Immunol.* (2010) 54:354-61.
2. Iwakura T, Iwafuchi M, Muraoka D, Yokosuka M, Shiga T, Watanabe C, Ohtani-Kaneko R. In vitro effects of bisphenol A (BPA) on developing hypothalamic neurons. *Toxicology.* (2010) 272(1-3):52-8.
3. Ohtani-Kaneko R, Iwafuchi M, Iwakura T, Muraoka D, Yokosuka M, Shiga T, Watanabe C. Effects of estrogen on synapsin I distribution in developing hypothalamic neurons. *Neurosci Res.* (2010) 66:180-8.

**【2010年度 学生学会発表】**

1. 小関夏子 他 「網膜神経節細胞に及ぼすエストロゲンの神経保護作用」  
第 81 回日本動物学会 口頭発表
2. 荻野友佑 他 「マウス海馬神経培養細胞株におけるエストロゲンの神経保護効果」第 81 回日本動物学会 口頭発表
3. 岩倉聖 他 「ラット視床下部における性差発現蛋白質 CRMP4 の性差形成への関与」第 81 回日本動物学会 口頭発表
4. 酒匂美幸 他 「CRMP4 がマウス脳の雌雄差形成に及ぼす影響」第 81 回日本動物学会 口頭発表
5. 土屋貴大 他 「発生過程マウス脳の CRMP4 mRNA 発現変化」第 81 回日本動物学会 口頭発表
6. 倉持麻美 他 「ティラピア脳 GNRH3 産生ニューロンと生殖行動に対するステロイドホルモンの影響」第 81 回日本動物学会 口頭発表
7. 河西大輔 他 「成熟ティラピア脳の細胞増殖に及ぼすアンドロゲンの影響」第 81 回日本動物学会 口頭発表

この他、神経発生研究会、「成体脳のニューロン新生懇談会」、「バイオナノ国際シンポジウム」でも学生が多数ポスター発表を行った。