

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23818

研究課題名(和文) GnRH産生ニューロンの機能状態と微細構造の変化を繋ぐ新たな相関顕微観察法の開発

研究課題名(英文) Development of new correlative light and electron microscopy elucidating the connection between the change of ultrastructure and functional state of GnRH neurons

研究代表者

森永 涼介 (MORINAGA, RYOSUKE)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60845733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：当初の計画通りに神経分泌細胞であるGnRHニューロンのゴルジ装置の形態学的解析を行っていたが、GnRH分泌量を変化させる去勢刺激や性ステロイド刺激によるゴルジ装置の形態変化は認められなかった。そこで目的細胞をVasopressinニューロンおよびOxytocinニューロンに変更し研究を継続したところ、これらニューロンのゴルジ装置はGnRHニューロンに比べより発達した構造を持ち、浸透圧刺激によりゴルジ装置トランスゴルジ網の形態が変化することを明らかにした。今後はさらに、これらゴルジ装置の微細構造を電子顕微鏡による観察により明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴルジ装置は粗面小胞体で生合成された蛋白質を分泌顆粒に選別・濃縮する細胞内小器官であり、ホルモンを大量に分泌する内分泌細胞においては発達している。研究代表者の所属する講座では、下垂体前葉内分泌細胞のゴルジ装置が立体的に球状などの特徴的な構造をしていることを明らかにしており、本研究ではさらに神経分泌細胞におけるゴルジ装置の立体構造を明らかにした。これら知見は、細胞の種類、機能状態とゴルジ装置形態との関係を解明する点において重要な基盤の情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study examined the morphology of the Golgi apparatus of GnRH neurons, neurosecretory cells located in the preoptic area, as the original plan. However, the organization of the Golgi apparatus of GnRH neurons was not affected by the sexual stimulations, castration and administration of sex steroid, increasing or decreasing the GnRH-secretion. Therefore, the target cells were changed to vasopressin and oxytocin neurons in the hypothalamus. The present study morphologically demonstrated that these neurons had more developed Golgi apparatus than the GnRH neurons and the osmotic stimulation changed the shape of trans-Golgi network. In the my future plan, the ultrastructure of the Golgi apparatus of these neurons will be demonstrated by the observation under electron microscope.

研究分野：神経解剖学、細胞生物学

キーワード：ゴルジ装置 神経分泌細胞 視床下部 免疫組織化学 性腺刺激ホルモン放出ホルモン パソプレシン オキシトシン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視床下部には、神経でありながら血液中に大量のホルモンを放出する内分泌細胞の特徴を持つ神経分泌細胞が多数分布している。神経分泌細胞は、その特徴から一般的な神経細胞に比べ、分泌顆粒やゴルジ装置など調節性分泌経路を構成する細胞内小器官の発達が良いと考えられている。神経分泌細胞の一つである性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin releasing hormone, GnRH) ニューロンは、視床下部視索前野に分布し、パルス状とサージ状の2種類の分泌様式でGnRHを下垂体門脈に放出することで、下垂体前葉からの性腺刺激ホルモン分泌を調節している。また、GnRHニューロンは双極神経細胞であり、2本の神経突起は活動電位の発生・伝導を担う軸索と上位ニューロンからの入力を受ける樹状突起の機能を併せ持つ“dendron”と呼ぶべき特殊なものであることが示唆されている (Iremonger & Herbison, *Neuroendocrinology* 102:1-7, 2015)。

このGnRHニューロンに特徴的なGnRHの律動的な分泌にはkisspeptin産生ニューロンからの入力に関与する。さらに、最近、GnRHニューロン自身で発現しているGnRH受容体を介した一種のautocrine制御の関与も示唆されている (Krsmanovic et al., *Trends Endocrinol Metab* 20:402-408, 2009)。ただ、他の神経分泌細胞と比べて機能的に特異なGnRHニューロンの細胞微細構造については、未解明の点が多い。特に、GnRHニューロンにおけるGnRH受容体の発現の有無やGnRH刺激に対する応答性と微細構造変化に関する知見は乏しく、GnRHの特徴ある分泌様式の基盤としてautocrine制御が関与するかどうかについては決着がつかない。

2. 研究の目的

上述した学術的背景を踏まえて、本研究課題では以下の2つの研究目的の達成を目指す。

(1) 複雑な構成の視床下部神経組織の中でGnRHニューロンを正確に同定し、さらにシームレスに立体微細構造解析につなげる新たな相関顕微鏡法 (Correlative Light and Electron Microscopy; CLEM) を開発する。

(2) 開発したCLEM法を用いて、GnRHニューロンがGnRH受容体を発現しているかどうか検証し、GnRHのautocrine制御が律動的な神経細胞の活動に関与するかを明らかにする。

以上の研究目標が達成できれば、本研究課題の主題であるGnRHニューロンだけでなく他の神経細胞の機能状態と立体微細構造変化を解析するのに広く適用可能な汎用性の高い研究技法となり、解剖学領域や神経科学領域の研究の発展への大きな波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 標本作成法

①OCT包埋凍結標本作成

光顕免疫組織化学用の組織標本は、対照群ラット (Wistar系雄ラット、8-12週齢) および後述する刺激実験群ラットをケタミン・キシラジン混合麻酔の腹腔内投与による麻酔下で、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) の固定液で灌流固定して作成した。灌流固定したラットから脳を採材し、同固定液により浸漬固定 (overnight) を行った後、30%スクロース溶液による氷晶防止処理を施し、OCTコンパウンド中で凍結させ包埋した。

②樹脂包埋標本

電子顕微鏡観察用の組織標本は、ラット (Wistar系雄ラット、8-9週齢) をケタミン・キシラジン混合麻酔の腹腔内投与による麻酔下で、0.5%グルタルアルデヒドおよび0.5%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) の固定液で灌流固定して作成した。灌流固定したラットから脳組織および下垂体を採材し、0.5%オスミウムを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) で浸漬固定 (1時間、4°C) を行った後、1%リンタングステン酸を含む70%エタノールで脱水 (20分 x 3回、4°C) し、L.R. White樹脂を浸透・重合 (24時間、50°C) させ包埋した。

(2) 免疫組織化学

①抗体

一次抗体としては、ゴルジ装置のcis側、trans側の指標としたGM130 (旭川医科大学製) およびTGN38 (Bio-Rad Laboratories) に対する抗体を用いた。また、神経分泌細胞の同定には、群馬大学生体調節研究所から供与されたGnRHに対する抗体および市販されているVasopressin (Synaptic Systems) およびOxytocin (Chemicon) に対する抗体も用いた。神経活動亢進の指標には、神経活動亢進時に発現するFos蛋白に対する抗体 (Sigma-Aldrich) を用いた。

抗原局在部位の可視化は、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウス抗体 (Vector

Laboratories) および, Alexa488, Alexa594, Alexa647 標識ロバ抗マウス-, ウサギ-, モルモット-, ヒツジ-IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いて行った。

②酵素抗体法

上記 (1) -①に記載した凍結包埋標本から 40 μ m 厚の凍結切片を作成し、酵素抗体法による免疫染色に供した。免疫染色は液中で進行する浮遊免疫染色法により行った。洗浄にはリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4; PBS)、希釈液には 0.5% TritonX-100 を含む PBS を使用した。まず内因性ペルオキシダーゼのブロッキングのために、0.3%過酸化水素溶液に 30 分間、室温でインキュベートした。次に正常ロバ血清によるブロッキング (1 時間、室温) を行い、その後一次抗体に 2 日間、4°C でインキュベートした。一次抗体洗浄後に二次抗体を 2 時間、室温でインキュベートし、洗浄後 ABC kit (Vector Laboratories) および DAB により発色させた。洗浄後にスライドガラスに切片を貼り付け、最後に封入剤により封入し、光学顕微鏡による観察を行った。

③蛍光抗体法

上記 (1) -①に記載した凍結包埋標本から 40 μ m 厚の凍結切片を作成し、蛍光抗体法による免疫染色に供した。免疫染色は酵素抗体法と同様に浮遊免疫染色法により行った。洗浄には PBS、希釈液には 0.5% TritonX-100 を含む PBS を使用した。まず正常ロバ血清によるブロッキング (1 時間、室温) を行い、その後一次抗体に 2 日間、4°C でインキュベートした。一次抗体洗浄後に二次抗体を 2 時間、室温でインキュベートし、洗浄後 DAPI により核染色を行った。洗浄後にスライドガラスに切片を貼り付け、最後に封入剤により封入し、共焦点顕微鏡 (OLYMPUS) による観察を行った。

④電子染色

上記 (1) -②に記載した樹脂包埋標本から準超薄切片を作成し、切片を 1% トルイジンブルーおよび 1% ホウ砂を含む蒸留水により染色し、神経核を同定した。同定した神経核の超薄切片を作成し、電子染色を行った。電子染色は、2% 酢酸ウラニル染色液で 10 分間、室温でインキュベートし、その後クエン酸鉛染色液で 5 分間、室温でインキュベートすることで行った。電子染色した超薄切片は、透過電子顕微鏡 (HITACHI) による観察を行った。

(3) 実験動物モデルの作成

①去勢モデル

この実験モデルでは、去勢手術により性腺からの性ステロイドホルモン (テストステロン等) による負のフィードバック機構が失われ、GnRH ニューロンは持続的に刺激される。去勢手術は、ケタミン・キシラジン混合麻酔の腹腔内投与による麻酔下で、精巣除去することで行った。去勢手術後 1 日後、1 週間後、1 ヶ月後にそれぞれ脳組織を採材し、形態学的解析に供した。

②性ステロイド持続投与モデル

去勢モデルとの対比モデルとして、性ステロイドを持続投与したモデルも作成した。去勢手術より内因性の負のフィードバックを除去した状態で、テストステロンやエストラジオールなどの性ステロイドを持続投与することで、GnRH ニューロンを持続的に抑制する。上記の去勢手術後、テストステロンあるいはエストラジオールを充填したシリコンチューブを背部皮下に埋め込んだ。手術 1 週間後に脳組織を採材し、形態学的解析に供した。

③浸透圧刺激モデル

研究成果で後述するが、GnRH ニューロンの形態学的解析を行ったが、GnRH ニューロンの神経核での分布密度が疎である点や刺激実験動物モデルでゴルジ装置の形態変化が認められなかった点などの問題点が認められた。今後の電子顕微鏡による微細構造の観察が困難であると考え、目的細胞を GnRH ニューロンと同じ神経分泌細胞である Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンに変更した。これらニューロンは、視床下部・室傍核および視索上核に密に局在し、浸透圧刺激により容易に刺激されることから、GnRH ニューロンに比べ容易に電子顕微鏡による観察ができると考え、目的細胞に選択した。

この実験モデルでは、高浸透圧/低浸透圧溶液の投与により体内浸透圧を増加/減少させることで、Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンを興奮/抑制させることができる。高浸透圧刺激には 9% 食塩水を、また低浸透圧刺激には蒸留水をそれぞれ単回腹腔内投与し、2 時間後、1 日後、2 日後にそれぞれ脳組織を採材し、形態学的解析に供した。また、持続的な高浸透圧刺激として、2% 食塩水を 1 週間自由飲水させた後、脳組織を採材し、形態学的解析に供した。

4. 研究成果

(1) GnRH ニューロンの形態学的解析

①対照群における GnRH ニューロンの形態学的解析

GnRH ニューロンの形態およびこのニューロンのゴルジ装置の形態を解析するために、対照群ラットで GnRH ニューロンを観察した。GnRH ニューロンは視索前野に最も多く局在しているが、密には認められず、やや散在的に認められた。GnRH ニューロンの形態は、約 80%が単極性、約 20%が双極性、わずかに他極性であった。またゴルジ装置の形態は、1 本の紐状のゴルジ装置が核周囲を囲うとともに、そこから神経突起へ 1 本あるいは 2 本の紐状のゴルジ装置が伸びていた。単極性の場合にはゴルジ装置は神経突起にある側に伸びており、大部分の双極性の場合には 2 本の神経突起の両方に均等に伸びているが、一部の双極性の場合には 1 本の神経突起に偏るようにゴルジ装置が認められた。また、GM130 陽性のシスゴルジ網の内側に TGN38 陽性のトランスゴルジ網が認められた。

②性刺激による GnRH ニューロンのゴルジ装置の形態学的変化

去勢モデルによる GnRH ニューロンの形態学的解析を行ったところ、去勢 1 日後、1 週間後の実験群の単極性の GnRH ニューロンの個数が、対照群に比べそれぞれ約 1.3 倍に増加していた。しかし、去勢 1 日後、1 週間後、1 ヶ月後の実験群において GnRH ニューロンに神経活動亢進の指標となる Fos 陽性反応は認められず、対照群のゴルジ装置の形態と比較して大きな変化は認められなかった。また、去勢したラットにエストラジオールあるいはテストステロンを持続投与した実験群において、テストステロン持続投与群の単極性の GnRH ニューロンの個数が、対照群に比べ約 0.8 倍に減少していたが、Fos 陽性反応やゴルジ装置の形態については、どの性ステロイド持続投与群においても対照群との大きな違いは認められなかった。

以上の結果より、GnRH ニューロンの散在的な分布と性刺激による GnRH ニューロンの大きな形態変化は期待できないことが明らかになったため、電子顕微鏡による微細構造変化の解析が困難であると考え、目的細胞の変更を行った。

(2) Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンの形態学的解析

①対照群における Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンの形態学的解析

まず対照群のラットで Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンの形態解析を行った。Vasopressin ニューロンは室傍核尾側外側および視索上核腹側に密に局在しており、Oxytocin ニューロンは室傍核吻側内側および視索上核背側に密に局在していた。Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンの形態は多極性であり、これらニューロンのゴルジ装置は、核周囲半分から全体を覆う網状の構造をしていた。また、GM130 陽性のシスゴルジ網の内張りするように TGN38 陽性のトランスゴルジ網が認められた。

②浸透圧刺激による Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンのゴルジ装置の形態学的変化

刺激実験の妥当性を確認するために、神経活動亢進を示す Fos 陽性反応の検出を行った。高浸透圧刺激である 9%食塩水の単回腹腔内投与 2 時間後の実験群において、ほとんどすべての Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンに Fos 陽性反応が認められた。低浸透圧刺激である蒸留水の単回腹腔内投与 2 時間後の実験群では、対照群に比べ、Fos 陽性反応が認められる Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンは減少した。これら刺激実験の結果から、本実験における浸透圧刺激が、これらニューロンの活動を亢進あるいは抑制できることが確認できた。

次にこれら浸透圧刺激によるゴルジ装置の形態変化について解析した。9%食塩水および蒸留水の単回腹腔内投与 2 時間後の実験群におけるこれらニューロンのゴルジ装置の形態は、対照群と比較して大きな違いは認められなかった。しかし、9%食塩水単回腹腔内投与 1 日後の実験群において、GM130 陽性反応を示すシスゴルジ網には変化は認められなかったが、TGN38 陽性反応を示すトランスゴルジ網が細かく分かれ、細かい粒状に認められるようになった。一方で、蒸留水単回腹腔内投与 1 日後、2 日後の実験群において、同様に GM130 陽性反応については変化が認められなかったが、TGN38 陽性反応を示すトランスゴルジ網は対照群に比べ太くなり、葉状あるいは板状に認められた。さらに持続的浸透圧刺激である 2%食塩水自由飲水を 1 週間させた実験群においては、9%食塩水単回腹腔内投与 1 日後の実験群と同様に、GM130 陽性反応には変化が認められなかったが、TGN38 陽性反応を示すトランスゴルジ網が細かく分断され、粒状に認められた。これら形態変化は、室傍核や視索上核の間で同様に認められた。

これら結果から、高浸透圧刺激により神経活動を亢進させることは、ホルモンを分泌させ続けることで分泌顆粒に膜が消費させ、トランスゴルジ網を細かく分断することが示唆された。また、低浸透圧刺激により神経活動を抑制した場合、ホルモン分泌量が減少し、分泌顆粒への膜の消費が減少するため、トランスゴルジ網が太く葉状あるいは板状に認められるようになったと考えられる。

③透過電子顕微鏡による Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンの微細構造の観察
浸透圧刺激による Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンのゴルジ装置の形態変化が生じることが明らかになったため、さらに Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンの微細構造の形態学的解析を進めた。対照群の脳組織を用いた透過電子顕微鏡による観察により視索上核にこれらニューロンと思われる神経が密に分布していることが確認できた。さらに、これらニューロンのホルモン分泌部位である下垂体後葉における観察も行い、神経終末に分泌顆粒が密に詰まっていることを確認した。また下垂体後葉の神経終末には、有芯小胞のみのもの、シナプス小胞のみのもの、および両方が含まれるものがそれぞれ認められた。

(3) 本研究の総括と今後の展望

当初の計画通り目的細胞として GnRH ニューロンの形態学的解析を開始したが、GnRH ニューロンの形態学的解析を通して、GnRH ニューロンの分布が散在的である点や刺激実験によるゴルジ装置の形態変化が認められなかった点が明らかになったことから、電子顕微鏡による微細構造の観察が困難であると考えた。そのため、目的細胞を Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンに変更し研究を継続した。これらニューロンの形態学的解析により、浸透圧刺激により容易に刺激され、ゴルジ装置の形態が変化することを明らかにできた。今後はこれらニューロンの微細構造を解析するために、電子顕微鏡による観察を継続して行う。まず透過電子顕微鏡を用いた電顕免疫組織化学により Vasopressin ニューロンおよび Oxytocin ニューロンそれぞれの同定を行うとともに、浸透圧刺激によるゴルジ装置や分泌顆粒などの細胞小器官の微細構造変化を解析する。また、当初の計画にある連続切片からの立体再構築やオスミウム浸軟法による立体微細構造の観察を行い、これらニューロンにおける立体微細構造解析を確立する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------