

ジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*)の

皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞に関する研究

(Studies on ganglion cell-like (GL) cells in the skin
of Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*))

中平 嶺

ジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*) の
皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞に関する研究

(Studies on ganglion cell-like (GL) cells in the skin
of Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*))

中平 嶺

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻 博士課程

(指導教授：高橋公正)

平成 28 年 3 月

目次

目次	2
第 1 章 序論.....	6
1.1 ペット・実験動物としてのジャンガリアンハムスター (<i>Phodopus sungorus</i>)	6
1.2 ジャンガリアンハムスター (<i>Phodopus sungorus</i>) における神経節細胞様 (GL) 細胞と皮膚非典型線維腫.....	7
1.3 図.....	9
第 2 章 性腺切除によるジャンガリアンハムスター (<i>Phodopus sungorus</i>) の皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞のアンドロジェン依存性の生物学的挙動.....	13
2.1 緒言	13
2.2 材料と方法.....	14
2.2.1 動物	14
2.2.2 GL 細胞増殖の組織学的評価.....	15
2.2.3 GL 細胞増殖のグレーディング	15
2.2.4 GL 細胞増殖巣のサイズの計測	15
2.2.5 GL 細胞の増殖活性の評価	15
2.2.6 統計学的分析.....	17
2.3 結果	18
2.3.1 GL 細胞増殖の組織学的評価およびグレーディング	18
2.3.2 GL 細胞増殖巣のサイズの計測	18
2.3.3 GL 細胞の増殖活性の評価	18

2.3.4	無処置動物に置ける性腺の組織学的検索	19
2.4	考察	20
2.5	小括	22
2.6	図	23
第3章	性腺切除したジャンガリアンハムスターの皮膚 GL 細胞のテストステ ロン長期刺激による形態学的変化.....	29
3.1	緒言	29
3.2	材料と方法.....	30
3.2.1	動物	30
3.2.2	プロピオン酸テストステロン (testosterone propionate: TP) の調 製および用量設定、投与計画.....	30
3.2.3	GL 細胞増殖の組織学的評価.....	31
3.2.4	GL 細胞増殖のグレーディング	31
3.2.5	GL 細胞増殖巣のサイズの計測	31
3.2.6	GL 細胞の増殖活性の評価	31
3.2.7	統計学的分析.....	31
3.3	結果	32
3.3.1	短期試験群	32
3.3.1.1	GL 細胞増殖の組織学的評価およびグレーディング	32
3.3.1.2	GL 細胞増殖巣のサイズの計測	32
3.3.1.3	GL 細胞の増殖活性の評価	33
3.3.2	長期試験群	33
3.3.2.1	GL 細胞増殖の組織学的評価およびグレーディング	33
3.3.2.2	GL 細胞増殖巣のサイズの計測	34
3.3.2.3	GL 細胞の増殖活性の評価	34

3.4	考察	36
3.5	小括	38
3.6	図	39
第 4 章	ジャンガリアンハムスターの皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞におけるレクチン結合性	50
4.1	緒言	50
4.2	材料と方法	52
4.2.1	動物	52
4.2.2	レクチン組織化学的染色	52
4.3	結果	54
4.4	考察	55
4.5	小括	57
4.6	表および図	58
第 5 章	ジャンガリアンハムスターの皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞におけるレクチン結合タンパク質の検索	62
5.1	緒言	62
5.2	材料と方法	63
5.2.1	動物	63
5.2.2	タンパク質抽出および WGA レクチンによる精製	63
5.2.3	SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	64
5.2.4	ゲルの染色	65
5.2.5	泳動バンドからの分子量推定	65
5.2.6	ゲル内消化法によるタンパク質回収およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) 法を	

用いた精製タンパク質の推定.....	65
5.2.7 ウェスタンブロッティング	67
5.3 結果	69
5.4 考察	70
5.5 小括	72
5.6 図	73
第6章 総括.....	76
謝辞.....	80
参考文献.....	81

1 章 序論

1.1 ペット・実験動物としてのジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*)

ジャンガリアンハムスター (ヒメキヌゲネズミ、シベリアンハムスター、ウィンターホワイトハムスター) *Phodopus sungorus* はネズミ目ネズミ上科キヌゲネズミ科ヒメキヌゲネズミ属に属するハムスターで (Fig. 1.1)、ドワーフハムスターと呼ばれる小型のハムスターの一種である。ドワーフハムスターには一般に実験動物として多用されるチャイニーズハムスター *Cricetulus griseus* や、ジャンガリアンハムスターと同属であり形態的にも類似するキャンベルハムスター *Phodopus campbelli*、さらに小型のロボロフスキーハムスター *Phodopus roborovski* が含まれる。

ジャンガリアンハムスターはロシアのカザフ地方、シベリア地方を原産地とし、日本には吉田らが実験目的で輸入したのが初とされている。ジャンガリアンハムスターは本邦ではシリアンハムスター (ゴールデンハムスター) *Mesocricetus auratus* と同様にペットとして飼育頭数の多いハムスターである。しかし、シリアンハムスターやチャイニーズハムスターに比較して、実験動物としての利用は比較的限定的である。Pogosianz は腫瘍研究などに適した動物種として紹介しており (Pogosianz, 1975)、また、同種が季節繁殖動物であることから、光周期がメラトニンや下垂体-副腎-性腺軸の発達に及ぼす影響等に関する実験 (Hira *et al.*, 2001) や、褐色脂肪などに関する実験 (von Praun *et al.*, 2001) などに用いられている。ジャンガリアンハムスターの生理学的特性を実験に多用される他 2 種と比較し表示する (Fig. 1.2)。

また、同種においては非常に多くの腫瘍が発生する事が知られている。これらについてはいくつかの遡及的検索 (Cooper *et al.*, 1991, Kondo *et al.*, 2008, Kondo *et al.*, 2009, Nishizumi *et al.*, 2000, Yoshimura *et al.*, 2015) や様々な

腫瘍の症例報告 (Endo *et al.*, 2000, Li *et al.*, 1998, Madarame *et al.*, 2004, Martorell *et al.*, 2005, Nakao *et al.*, 1999, Sato *et al.*, 2004, Yoshimura *et al.*, 2010) が行われている。

1.2 ジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*) における神経節細胞様 (GL) 細胞と皮膚非典型線維腫

ジャンガリアンハムスターの皮膚において、神経節細胞に類似する細胞の増殖と膠原線維の増生を特徴とする線維腫様腫瘍が発生することが Fujiwara により報告され、これらの細胞はヒトの増殖性筋膜炎に出現する細胞と類似していることが指摘されている (Fujiwara, 1998)。

Baba らによると、この特異な細胞の増殖を特徴とする腫瘍の発生は全例が雄であり、その発生部位はほぼすべてが胸腹部の皮膚であることが示され、組織学的な検索からこの腫瘍を非典型線維腫 atypical fibroma と呼称した (Baba *et al.*, 2003)。また、正常なジャンガリアンハムスターの主に腹側皮膚の真皮から皮下織において同腫瘍で見られるものと類似した細胞が存在し、特に雄で多く確認されることも示されている (Baba *et al.*, 2003, Kashida *et al.*, 2003)。ジャンガリアンハムスターの腹側皮膚において認められるこの細胞は、類円形の核を 1 ないし 2 個、および好塩基性、泡沫状の細胞質を有しており、その形態的な特徴より、神経節細胞様 (ganglion cell-like: GL) 細胞と呼称されている。GL 細胞の増殖巣は加齢に伴い発達し、その大きさを拡大する (Fig. 1.3)。

いずれの報告においても、非定型線維腫の腫瘍細胞および GL 細胞は、細胞核が androgen receptor (AR) に陽性 (Fig. 1.4) を示し、細胞質は vimentin に陽性 (Fig. 1.4) であることが示されている。また、S-100 タンパクには陰性 (Fig. 1.4) で、間質の線維は collagen type 1 および collagen type 3 に陽性を示す (Fig. 1.4)。GL 細胞は AR を発現することや非典型線維腫が高齢雄において好発すること、増殖巣に種々の程度に膠原線維を伴うことなどから、アンドロジェン依

存性の性質を有し、膠原線維の産生能をもつと考えられるが、その存在意義や役割、また、非典型線維腫の腫瘍発生機序なども不明である。

GL 細胞は長らくジャンガリアンハムスターに特異的に存在すると考えられていたが、近年、ロボロフスキーハムスターにおいて、非典型線維腫の発生ならびに GL 細胞の存在が報告され (Johnson *et al.*, 2014)、GL 細胞の存在は種特異的なものではなく、ジャンガリアンハムスターを含む *Phodopus* 属に共通して存在するものと考えられる。

以上の様に、GL 細胞の性質や機能は明らかになっていない。そこで本研究では GL 細胞が AR を発現することに着目し、ジャンガリアンハムスターの GL 細胞の *in vivo* におけるアンドロジェンに対する反応性の検索を行った。また、レクチンを用いた新たなマーカーの検索とその認識糖鎖による修飾タンパク質の解析を試みた。

1.3 図

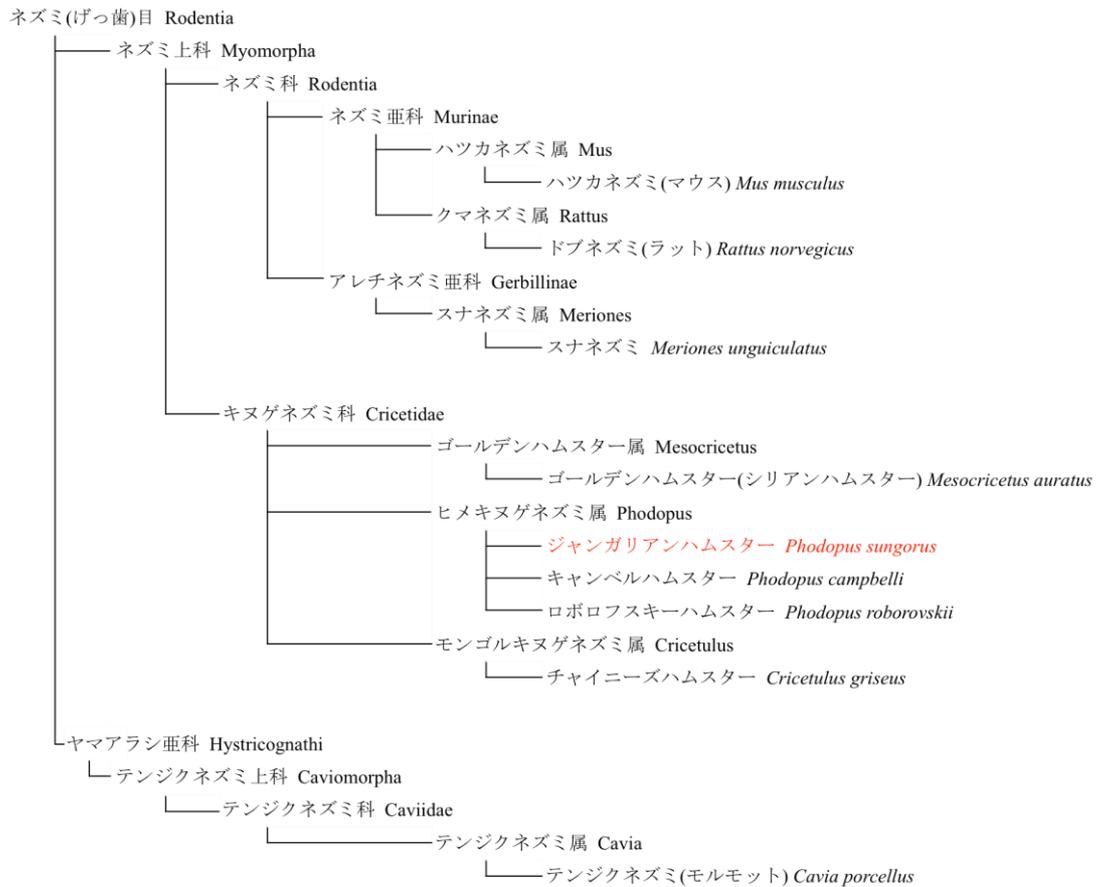


Fig. 1.1 実験動物として用いられるハムスター類を含むげっ歯類の分類。

現代実験動物学 (朝倉書店) の記載をもとに作成。



	ジャンガリアンハムスター	シリアンハムスター	チャイニーズハムスター
分布	ロシア (カザフ地方、シベリア南西部)	シリア、レバノン、イスラエル	中国北西部、内モンゴル自治区
体長	7-10cm	16-18.5cm	8-12cm
体重	35-45g	80-150g	20-40g(♂)
妊娠期間	18-21日	15-16日	約20日
産仔数(平均産仔数)	1-9頭(5頭)	1-15頭(8頭)	(6頭)
離乳	18-21日	18-21日	18-21日
染色体数	2n=28	2n=44	2n=22
寿命	2-3年	2-3年	2-3年
備考	扱いやすく、人に慣れる	雌の方が気が強い	臆病だが人に慣れる 睾丸が大きい

Fig. 1.2 ジャンガリアンハムスターの外観および実験に多用される他のハムスター2種の特徴。現代実験動物学(朝倉書店)の記載をもとに作成。

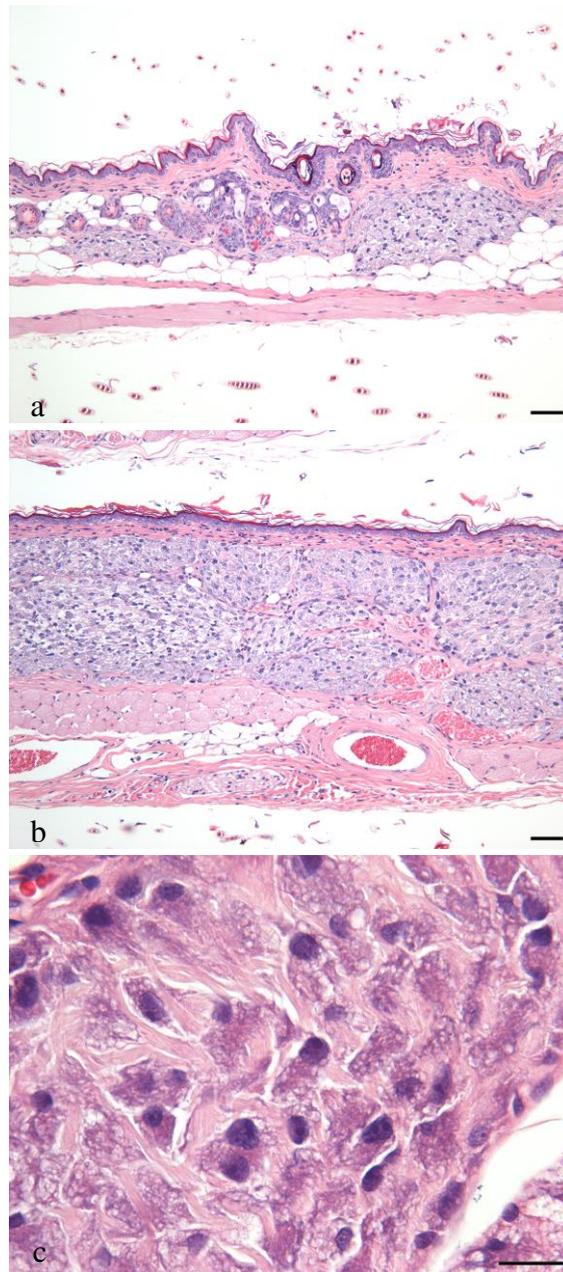


Fig. 1.3 雄ジャンガリアンハムスターの皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞
(a) 性成熟以降早期では島状に存在する。HE 染色。Bar=50 μ m.
(b) 加齢に伴い発達し、びまん性に出現がみられる。HE 染色。Bar=50 μ m.
(c) 類円形の核を 1-2 個有し、細胞質は好塩基性泡沫状を呈する。HE 染色。
Bar=10 μ m.

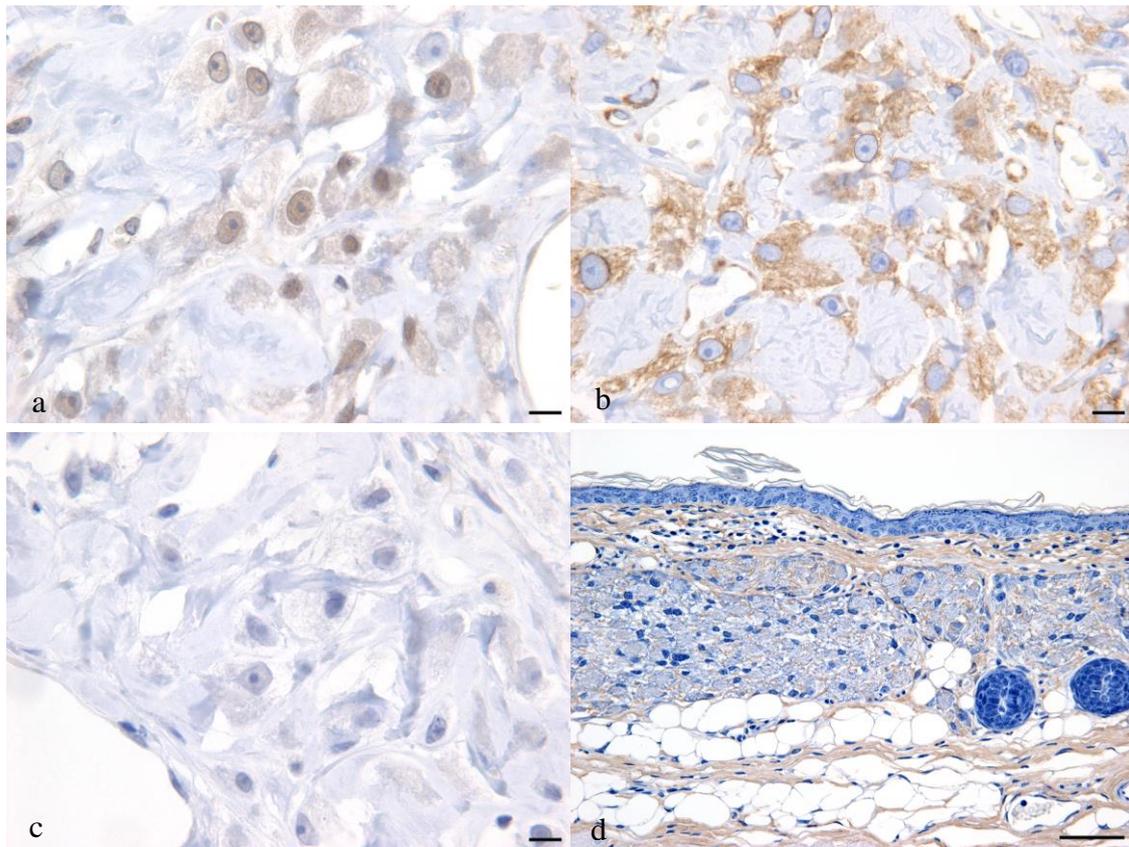


Fig. 1.4 ジャンガリアンハムスターの GL 細胞の免疫組織化学的性状。

(a) androgen receptor の免疫染色。核は androgen receptor に陽性を示す。

Bar=5 μ m.

(b) vimentin の免疫染色。細胞質は vimentin に陽性を示す。Bar=5 μ m.

(c) S-100 の免疫染色。S-100 タンパクには陰性を示す。Bar=5 μ m.

(d) Collagen type I の免疫染色。増殖巣間質の線維は真皮膠原線維と同様に Collagen type I に陽性を示す。Bar=50 μ m.

第 2 章 性腺切除によるジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*) の皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞のアンドロジェン依存性の生物学的挙動

2.1 緒言

成熟した雄ジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*) の腹部および胸部の皮膚には神経節細胞様 (GL) 細胞が存在することが報告されている (Baba *et al.*, 2003, Kashida *et al.*, 2003)。GL 細胞は明瞭な核小体を有する小型の円形核と豊富な好塩基性の泡沫状細胞質を有している。通常、間質に種々の程度の膠原線維を伴った増殖巣を形成し、増殖巣は成熟に伴って増数・拡大する。また、同細胞の核は androgen receptor (AR) に陽性を示し、細胞質は vimentin に陽性を示す (Baba *et al.*, 2003, Kashida *et al.*, 2003)。GL 細胞について、形態的な特徴や免疫表現型については検索されているものの、その性質や機能は未だ不明である。Baba らはテストステロン値の増加が GL 細胞の増殖やこの種で発生がみられる非典型線維腫への腫瘍化に関与すると推測している (Baba *et al.*, 2003)。

本章では GL 細胞のアンドロジェン依存性の挙動を明らかにするため、性腺摘出ジャンガリアンハムスターと未処置のジャンガリアンハムスターにおける GL 細胞の組織的な変化を比較した。

2.2 材料と方法

2.2.1 動物

4 週齢の雌雄ジャンガリアンハムスターを埼玉実験動物供給所（埼玉県杉戸）より購入した。動物は、床敷として corncob Green-Tru (Green Products Co., Iowa, USA) を用いてアルミニウムプレスケージ (W22×D32×H11cm) で飼育した。飼育環境は温度 $22 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、12 時間毎の明暗周期で維持された。飼料（マウス・ラット・ハムスター用飼料 NMF、オリエンタル酵母株式会社）および水は自由摂取とした。繁殖のため雌雄をつがいで飼育し、仔についても同様の環境で飼育した。実験に必要な動物数が得られるまで繁殖を繰り返した。

同一環境で飼育しているジャンガリアンハムスターを用いて、血清学的な微生物学的モニタリングが 6 ヶ月ごとに実施され、*Clostridium piliforme*、*Mycoplasma pulmonis*、HVJ および MHV に対する抗体は認められなかった。また、下記の病原体も検出されなかった：*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella* spp.、*Pasteurella pneumotropica*、*Citrobacter rodentium*、*Corynebacterium kutscheri*、*Mycoplasma* spp.、Dermatophytes、*Giardia* spp.、*Spirochete muris*、および *Syphacia* spp.

4 週齢の雌雄それぞれ 10 匹を実験に用い、1) 性腺摘出群（雄 5 匹、雌 5 匹）および 2) 無処置（雄 5 匹、雌 5 匹）の各群に分け、それぞれの性別ごとに 2 あるいは 3 匹ずつに分けて飼育した。性腺摘出群において、ペントバルビタールナトリウムを 32.4mg/kg で腹腔内投与し麻酔後、外科的に精巣あるいは卵巣を摘出した。操作は無菌的に行い、術創は縫合後 80%アルコールで清拭した。

すべての動物は 18 週齢時にペントバルビタールナトリウムの過剰投与により安楽殺し、胸腹部の皮膚および背部の皮膚を採材した。実験は日本獣医生命科学大学実験動物委員会の承認の下で行われた (No.26K-30)。

2.2.2 GL 細胞増殖の組織学的評価

胸腹部の皮膚および背部の皮膚は厚紙に伸展した状態で張り付け、10%中性緩衝ホルマリンで浸漬固定した後、4-6mm 幅で短冊状に頭尾側方向（正中軸に直交）に 16 等分した。それぞれの短冊は頭側から順に 1-16 まで番号をつけた（Fig. 2.2）。また、無処置群の動物においてはそれぞれの精巣および卵巣も採材、固定した。常法に従って皮膚および性腺はパラフィン包埋し、4 μ m 厚に薄切、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色を行った。

2.2.3 GL 細胞増殖のグレーディング

胸腹部の皮膚および背部の皮膚について、以下のように GL 細胞のグレード分けを行った。グレード 0：GL 細胞は認められない。グレード 1：小型の孤在性の増殖巣として認められる。グレード 2：びまん性に増殖巣が存在する（Fig. 2.1）。グレード分けはすべての皮膚について行い、それぞれの群において集計した。

2.2.4 GL 細胞増殖巣のサイズの計測

HE 染色切片で、それぞれの個体における GL 細胞の増殖層が最大の箇所から 3 カ所を選択し、200 倍視野で撮影を行った。それぞれの画像において GL 細胞増殖巣の垂直長を Adobe Photoshop® CS3 (Adobe Systems, San Jose, California, USA) を用いて計測し、単純な増殖巣のサイズとして用いた。

2.2.5 GL 細胞の増殖活性の評価

GL 細胞の増殖活性の評価として、抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体 (clone PC10, Dako, 希釈倍率 1:200) およびポリマー試薬 (EnVision+ /HRP, Dako) を用い、以下の手順で免疫組織化学的染色を行った。

- 1) 脱パラフィン。キシレン 3 槽各 10 分。
- 2) 親水。100%/100%/90%/80/70%アルコール各 1 槽。
- 3) 蒸留水洗浄。5 分。
- 4) 内因性ペルオキシダーゼブロッキング。0.01% H_2O_2 加 33%メタノール。
室温 30 分。
- 5) 抗原賦活化処理 (121°C10 分、クエン酸緩衝液 (pH6.0))。
- 6) 非特異吸着ブロッキング。2%ブロックエース/PBS (DS ファーマバイオメディカル株式会社)。室温 30 分。
- 7) 一次抗体反応。
- 8) PBS 洗浄。5 分 3 回。
- 9) ポリマー試薬反応。室温 30 分。
- 10) PBS 洗浄。5 分 3 回。
- 11) 顕微鏡下で発色。0.02%3,3'-diaminobenzidine,tetrachloride (DAB) (同仁化学研究所) -0.006% H_2O_2 -pH7.4 HCl-Tris 緩衝液。
- 12) 蒸留水で反応停止。
- 13) ヘマトキシリンで核染色。1 分。
- 14) 流水中で色出し。30 分。
- 15) 脱水。70%/80%/90%アルコール各 1 槽。100%アルコール 3 槽各 10 分。
- 16) 透徹。キシレン 3 槽各 10 分。
- 17) 封入。

表皮基底層の細胞を陽性対照として使用した。PCNA 免疫染色切片において GL 細胞の増殖巣をランダムに 5 カ所 400 倍視野で撮影し、画像上において PCNA 陽性細胞および総細胞数をカウントした。PCNA 陽性率は、PCNA 陽性 GL 細胞数/総 GL 細胞数 $\times 100$ として算出した。

2.2.6 統計学的分析

統計学的評価には、Microsoft Office Excel のアドインソフトウェア Statcel 3 (OMS 出版) を使用した。GL 細胞の増殖グレードについては、まず皮膚の細片からそれぞれの個体における平均を求め、それぞれの群において平均し、*Kruskal-Wallis* 検定および *Steel-Dwass* 検定を用いて比較した。その他については個体の値より群ごとの平均を求め、*Kruskal-Wallis* 検定および *Steel-Dwass* 検定を用いて比較した。いずれにおいても P 値が 0.05 未満において「統計学的有意差あり」とした。

2.3 結果

2.3.1 GL 細胞増殖の組織学的評価およびグレーディング

群間に差はみられたもののすべてのグループの雌雄において GL 細胞の出現が認められた (Fig. 2.2)。GL 細胞は腹側皮膚の腹部中心に特に高頻度に認められた。無処置の雄においては、最も高頻度に認められ、腹側皮膚のみでなく、腹側で高いグレードの領域では部分的に背側皮膚にも認められた。一方で、無処置の雌では無処置の雄に比べ、GL 細胞の分布は狭く、頻度も低かった。加えて、無処置雌ならびに卵巣切除群では背側皮膚において GL 細胞は認められなかった。精巣切除雄においては、無処置の雄に比べ、腹側皮膚の GL 細胞の出現は明らかに少なかった。また、背側皮膚において GL 細胞は認められなかった。無処置雄における平均個体グレード (1.83 ± 0.15) は精巣摘出雄 (0.94 ± 0.27) や無処置雌 (0.56 ± 0.56) に比べ有意に高かった。一方で、無処置雌と卵巣摘出雌 (0.46 ± 0.39) では平均個体グレードに有意な差は認められなかった (Fig. 2.3)。

2.3.2 GL 細胞増殖巣のサイズの計測

精巣摘出雄における GL 細胞増殖巣の平均厚 ($122.37 \pm 54.21 \mu\text{m}$) は無処置雄 ($236.79 \pm 111.71 \mu\text{m}$) に比べ有意に小さかった。また、卵巣摘出雌 ($93.52 \pm 69.15 \mu\text{m}$) と無処置雌 ($94.07 \pm 42.11 \mu\text{m}$) 間においては GL 細胞増殖巣の平均厚に有意な差は認められなかった (Fig. 2.4)。

2.3.3 GL 細胞の増殖活性の評価

無処置雄における PCNA 指数 ($86.85 \pm 3.75\%$) は精巣摘出雄 ($74.08 \pm 9.31\%$)、無処置雌 ($81.36 \pm 4.63\%$) や卵巣摘出雌 ($67.30 \pm 10.71\%$) に比べ有意に高かった。また、無処置雌の PCNA 指数は性腺切除した雌雄に比べ有意に高かった。雌雄のいずれにおいても増殖活性は性腺摘出動物で無処置動物に比べ

有意な低下が認められた (Fig. 2.5, Fig. 2.6)。

2.3.4 無処置動物における性腺の組織学的検索

無処置動物の精巣では精細管における精子形成および卵巣では様々な発達段階の卵胞が認められた。

2.4 考察

無処置雄において、GL 細胞の増殖巣は腹側胸腹部の皮膚全域に広く発達しており、しばしば背側への伸展も認められた。性腺摘出雌雄および無処置の雌では、胸腹部皮膚の GL 細胞は無処置の雄に比べて分布も狭く、背側皮膚においては全く認められなかった。これは Baba らや Kahisda らが記述している分布と同様の結果であると考えられる (Baba *et al.*, 2003, Kashida *et al.*, 2003)。また、同種の皮膚に発生する非典型線維腫も概ね GL 細胞の分布と一致して発生がみられ、核における AR の発現や GL 細胞との形態的類似が認められる (Baba *et al.*, 2003)。これより同腫瘍は GL 細胞に由来することが示唆される。

GL 細胞の出現には性差がみられるのに加え、GL 細胞の PCNA 指数についても無処置雌に比べ、無処置雄では有意に高かった。これは、GL 細胞の増殖に性差があることを意味している。同様の性別による PCNA 指数の傾向は Kashida らも述べている (Kashida *et al.*, 2003)。精巣摘出雄では無処置の雄に比べて、GL 細胞の PCNA 指数ならびに増殖巣のサイズは明確に低下していた。これは GL 細胞の増殖活性が性腺摘出により減少したためと考えられ、それにより分布の拡大が抑制されたものと考えられる。ヒトの男性あるいは雄の動物における性腺摘出による大きなホルモンの変化は血清アンドロゲン値の減少であると考えられる (Michiel Sedelaar *et al.*, 2013, Fukuda *et al.*, 2000)。アンドロゲンによる生物学的な効果の多くは AR およびそのアンドロゲン依存性シグナル経路を介して生じ、最終的にはアンドロゲン調節遺伝子の DNA 配列に対する転写調節に帰結する (Matsumoto *et al.*, 2013)。AR を介したアンドロゲン刺激は、雄性生殖系において細胞の増殖を生じ、前立腺癌、膀胱癌やある種の乳腺癌において腫瘍の発達や増悪に関与しているとも考えられている (Garay *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2012, Massie *et al.*, 2011)。精巣摘出雄における GL 細胞増殖巣の発達不良は、アンドロゲン/AR 経路の欠落によるものと考えられる。

卵巣摘出雌における PCNA 指数は、無処置の雌に比べ、出現グレードや分布に明確な差が認められないにも関わらず、有意に低下がみられた。閉経後の女性における卵巣切除術によって、血清アンドロジェン値が有意に低下することが知られている (Bui *et al.*, 2010, Kulak *et al.*, 2009)。ジャンガリアンハムスターにおいても卵巣は血清アンドロジェンに影響を与えていると考えられる。性腺摘出動物は無処置動物に比べ GL 細胞の増殖活性が有意に低下していることは、性腺摘出による血清アンドロジェンの低値によるものと考えられる。

GL 細胞の出現意義は未だ不明である。シリアンハムスターにおけるハーダー腺やジャービルの腹部臭腺などは性的二形を示す腺であり、個体間コミュニケーションに関与するフェロモン産生などを行っていると考えられている。一方で、これらの腺細胞と異なり GL 細胞は間葉系の細胞であり、体外への直接的なフェロモン分泌を行っているとは考えにくい。GL 細胞は雄ジャンガリアンハムスターにおいて何か特異的な役割を担っていると考えられる。

2.5 小括

ジャンガリアンハムスターの皮膚 GL 細胞はその分布や増殖活性において明確な性差があり、性腺摘出により大きな影響を受けた。GL 細胞の AR 発現に加え、前述の理由より、GL 細胞の発達にはテストステロンのようなアンドロジェンが関与していることが強く示唆された。

2.6 図

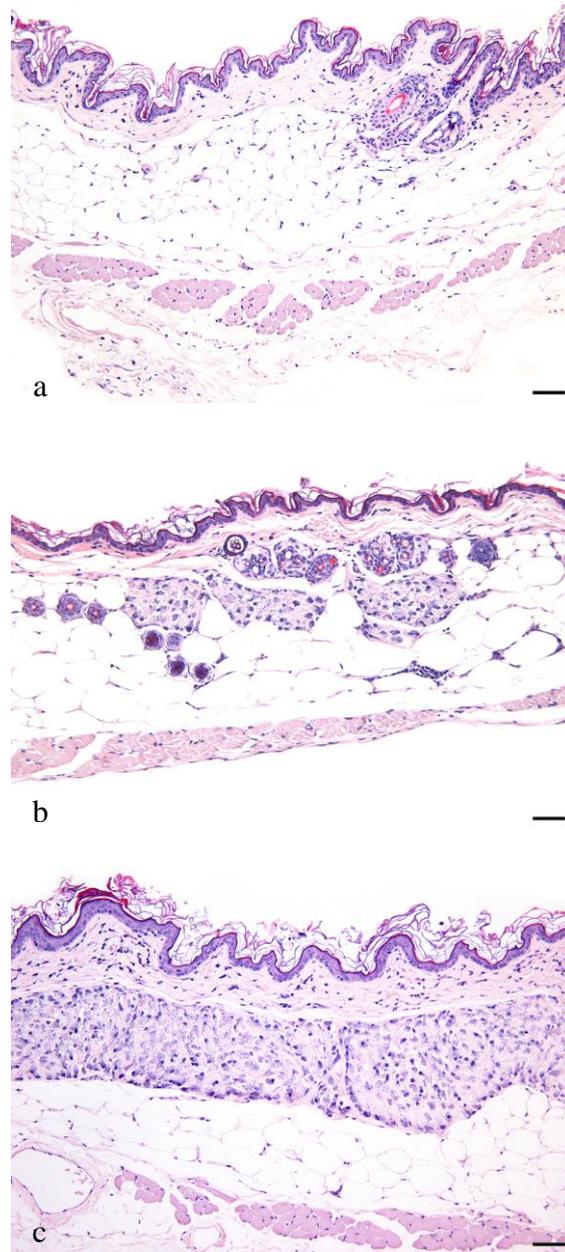


Fig. 2.1 GL細胞増殖巣のグレード分け。

(a) グレード0：GL細胞の増殖巣は認められない。HE染色。Bar=50µm.

(b) グレード1：島状に増殖巣を認める。HE染色。Bar=50µm.

(c) グレード2：びまん性に増殖巣を認める。HE染色。Bar=50µm.

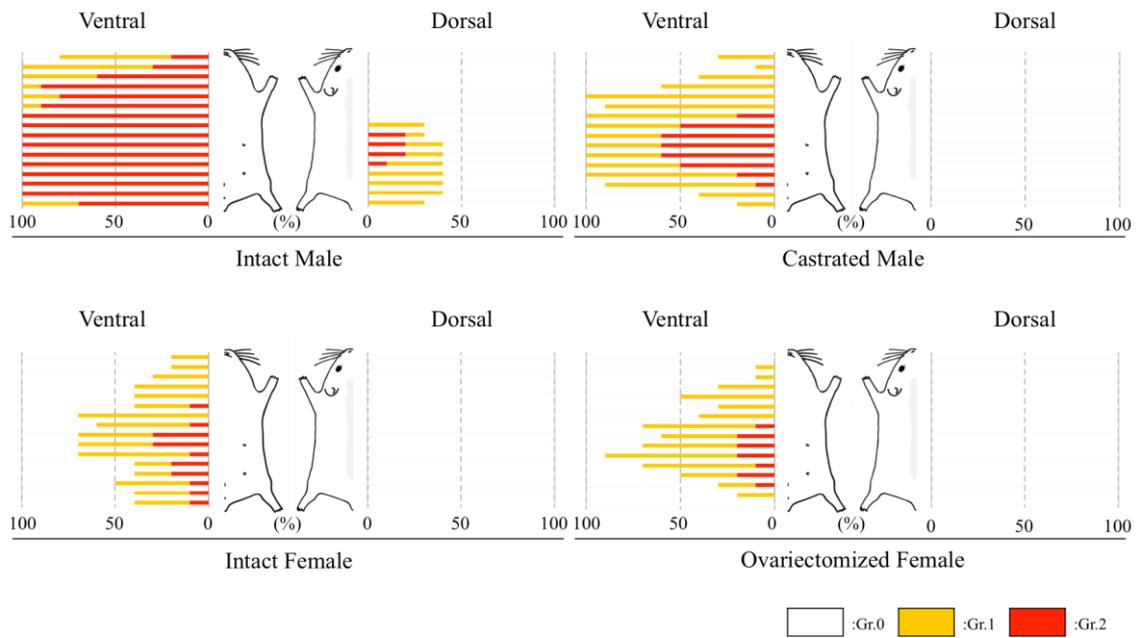


Fig. 2.2 GL細胞出現グレードと平均出現率。

グラフはそれぞれの皮膚の部位におけるグレードごとの比率を示す。どの群においても腹側皮膚の腹部中央において出現頻度が高い。無処置の雄において出現率が最も高く、背側皮膚での出現もみられる。

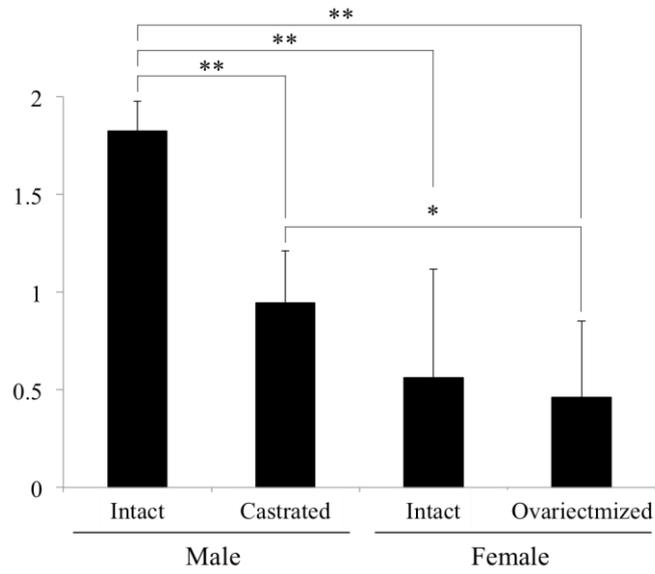


Fig. 2.3 GL 細胞出現グレード平均

無処置雄群はその他の群に比べ有意にグレードが高く、精巣切除雄は卵巣切除雌に比べ有意にグレードが高い。

Mean±SD, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ (*Kruskal-Wallis* 検定および *Steel-Dwass* 検定).

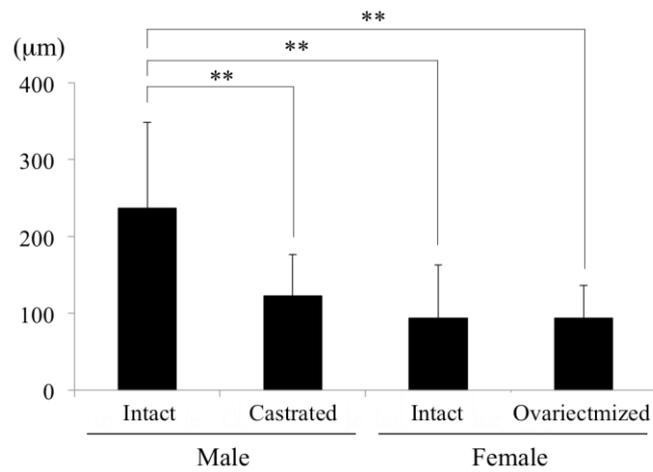


Fig. 2.4 GL 細胞増殖巣の厚さ

無処置雄群はその他の群に比べ有意に厚みを増す。

Mean ± SD, ** : $P < 0.01$ (*Kruskal-Wallis* 検定および *Steel-Dwass* 検定).

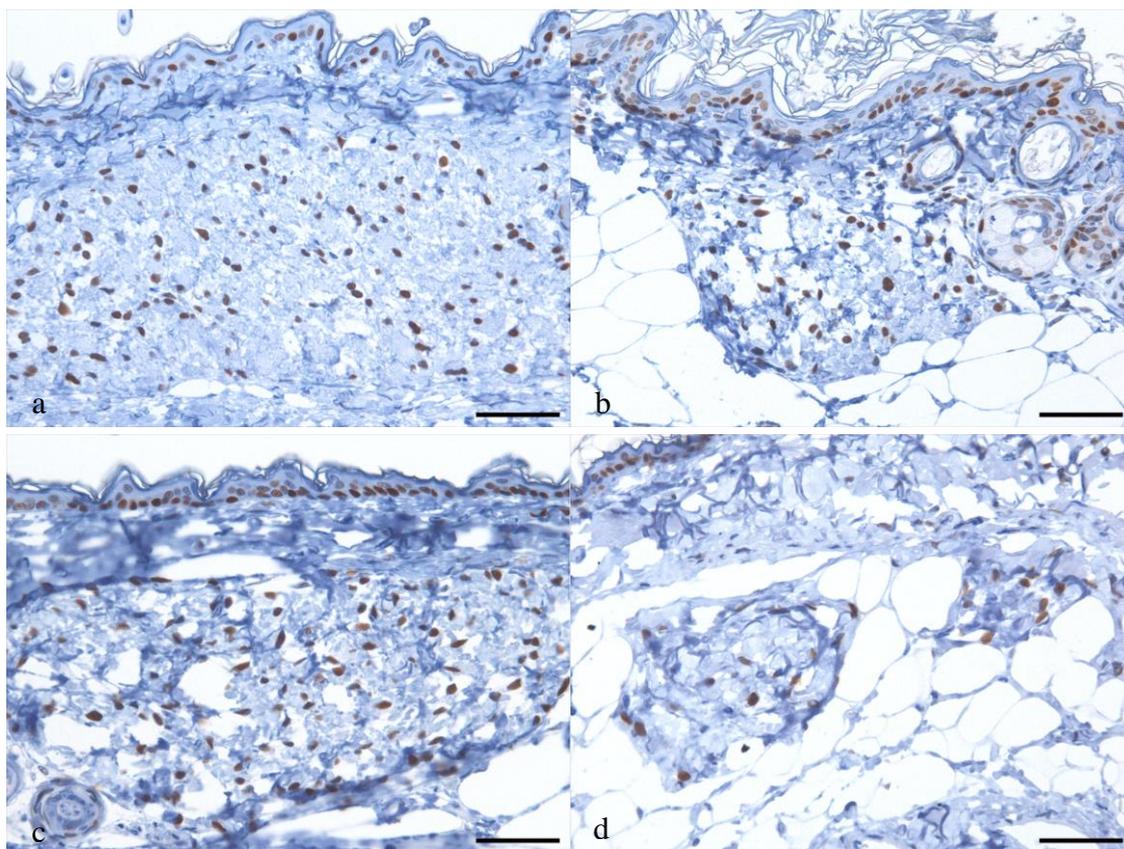


Fig. 2.5 GL 細胞増殖巣における増殖活性

PCNA の免疫染色。(a) 無処置雄群、(b) 精巣摘出雄群、(c) 無処置雌群、(d) 卵巣摘出雌群。卵巣摘出雌群を除く、他の 3 群は比較的高い増殖活性を示す。

Bar=50 μ m.

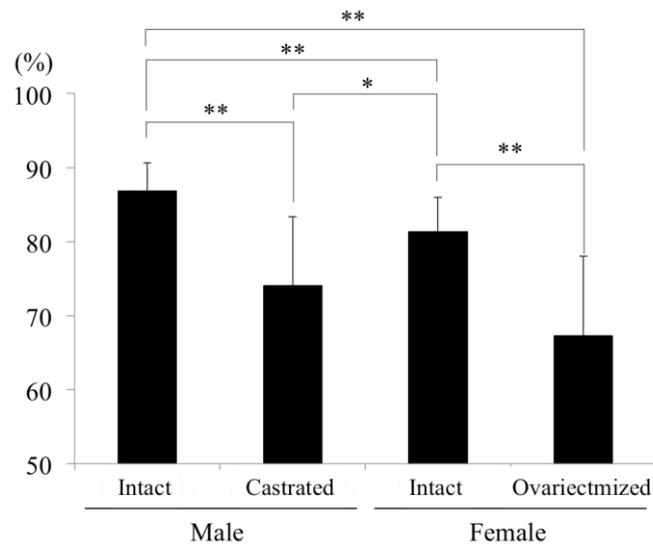


Fig. 2.6 各群における PCNA 指数

無処置群と性腺摘出群間および無処置雄群と他の 3 群間において有意な差が認められる。

Mean±SD, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.05$ (*Kruskal-Wallis* 検定および *Steel-Dwass* 検定).

第3章 性腺切除したジャンガリアンハムスターの皮膚 GL細胞のテストステロン長期刺激による形態学的変化

3.1 緒言

前章において、性腺摘出によりジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*) の皮膚神経節細胞様 (ganglion cell-like: GL) 細胞の発達抑制が生じることを確認した。これは性腺摘出により、血清中アンドロジェンの低下が生じたためと考えられ、GL細胞がアンドロジェン依存性の挙動を示すものと考えられる。今回、性腺摘出したジャンガリアンハムスターにおいて長期間テストステロンの投与を行い、その変化を形態学的に観察した。

3.2 材料と方法

3.2.1 動物

実験に用いるジャンガリアンハムスターは2章と同様に飼育・維持を行った。4週齢の雄53匹、雌61匹を実験に用い、2章と同様に4週齢時に性腺摘出处置を行い、それぞれの投与群、性別ごとにケージ当たり2あるいは3匹ずつ分けて飼育した。

3.2.2 プロピオン酸テストステロン (testosterone propionate: TP) の調製、用量設定および投与計画

試験期間は短期 (12 週間) と長期 (24 週間) に分け、動物は下表のように分け飼育した。

各群の供試動物数

	短期試験 (12 週間)		長期試験 (24 週間)	
	精巣摘出雄	卵巢摘出雌	精巣摘出雄	卵巢摘出雌
対照 (ゴマ油)	13	10	9	9
低用量 (5mg/kg/週)	7	10	7	10
高用量 (20mg/kg/週)	11	10	6	12

プロピオン酸テストステロン (testosterone propionate: TP) (和光純薬株式会社) をゴマ油 (関東科学株式会社) に 4mg/ml あるいは 1mg/ml の濃度で溶解し、高用量群では 20mg/kg、低用量群では 5mg/kg で動物に投与した。TP は 6 週齢時より週に一度、12 週間 (短期試験) あるいは 24 週間 (長期試験) にわたって頸背部皮下に投与した。対照群においてはゴマ油のみを同様に、投与群と同量投与した (Fig. 3.1)。Clark と Barber によるとげっ歯類においては内分泌機能や生殖行動を復元するのに 1mg/kg で充分であるとしており (Clark and Barber, 1994)、マウスにおける骨格筋の萎縮に対するアンドロジェンの影響を

検索した実験 (Serra *et al.*, 2013) やラットにおける実験的前立腺過形成への薬剤の効果を検索した実験 (Guo *et al.*, 2004) を参考に 1 週間当りの投与量を設定した。

短期および長期試験終了時に動物をペントバルビタールナトリウムの過剰投与により安楽殺し、胸部から腹部にかけての全皮膚を採材した。

実験は日本獣医生命科学大学実験動物委員会の承認の下で行われた (No.26K-30)。

3.2.3 GL 細胞増殖の組織学的評価

2 章と同様に全動物について胸腹部および背部の皮膚の HE 染色切片を作製し、組織学的に評価を行った。

3.2.4 GL 細胞増殖のグレーディング

2 章と同様に GL 細胞増殖についてのグレード分けを行った。

3.2.5 GL 細胞増殖巣のサイズの計測

2 章と同様に GL 細胞増殖巣のサイズを各群ごとに計測、評価を行った。

3.2.6 GL 細胞の増殖活性の評価

2 章と同様の手順で免疫組織化学的染色により各群について増殖活性の評価を行った。

3.2.7 統計学的分析

短期試験群および長期試験群それぞれのデータについて、2 章と同様に統計学的処理を行った。

3.3 結果

3.3.1 短期試験

3.3.1.1 GL 細胞増殖の組織学的評価およびグレーディング

精巣摘出雄では高用量群、低用量群および対照群の全てにおいて GL 細胞の出現が認められ、全群において腹部中央において出現頻度が高く、高グレードで認められた (Fig. 3.2)。また、対照群に比べ、TP 投与群では用量依存性に出現グレードが増加する傾向がみられ、特にグレードの高い領域では背部皮膚への GL 細胞増殖巣の伸展も認められた。一方、対照群においては背部皮膚への伸展はみられなかった (Fig. 3.3)。各群の腹側皮膚における出現グレード (平均±標準偏差) はそれぞれ対照群 0.94 ± 0.24 、低用量群 1.56 ± 0.39 、高用量群 1.86 ± 0.12 であった。対照群と投与群間で有意差を認めたが、高用量群と低用量群間において有意差は認められなかった (Fig. 3.4)。

卵巣摘出雌においても、精巣摘出雄と同様全群において GL 細胞の出現が認められ、腹部中央において出現頻度が高く高グレードで認められた (Fig. 3.2)。また、TP 投与群では用量依存性に出現グレードが増加する傾向がみられ、投与群において、特にグレードの高い領域では背部皮膚への GL 細胞増殖巣の伸展も認められた。一方、対照群においては背部皮膚への伸展はみられなかった (Fig. 3.3)。各群の腹側皮膚における出現グレード (平均±標準偏差) はそれぞれ対照群 0.50 ± 0.28 、低用量群 1.68 ± 0.25 、高用量群 1.90 ± 0.08 であった。対照群と投与群間で有意差を認めたが、高用量群と低用量群間において有意差は認められなかった (Fig. 3.4)。

対照群においては精巣摘出雄および卵巣摘出雌間においてグレード平均に有意差を認めた ($P < 0.05$)。

3.3.1.2 GL 細胞増殖巣のサイズの計測

精巣摘出雄の各群における GL 細胞増殖巣のサイズの平均 (平均±標準偏差)

はそれぞれ対照群 $122.12 \pm 49.38 \mu\text{m}$ 、低用量群 $203.59 \pm 78.90 \mu\text{m}$ 、高用量群 $376.85 \pm 129.98 \mu\text{m}$ であり、TP 用量依存性に厚さを増していた (Fig. 3.5)。

卵巣摘出雌の各群における GL 細胞増殖巣のサイズの平均 (平均 \pm 標準偏差) はそれぞれ対照群 $92.06 \pm 37.07 \mu\text{m}$ 、低用量群 $207.53 \pm 82.02 \mu\text{m}$ 、高用量群 $387.19 \pm 168.95 \mu\text{m}$ であり、精巣摘出雄と同様に TP 用量依存性に厚さを増していた (Fig. 3.5)。

対照群および投与群において、精巣摘出雄と卵巣摘出雌間に有意差は認められなかった。

3.3.1.3 GL 細胞の増殖活性の評価

精巣摘出雄の各群の GL 細胞増殖巣における PCNA 指数の平均 (平均 \pm 標準偏差) はそれぞれ対照群 $74.08 \pm 6.23\%$ 、低用量群 $82.43 \pm 5.20\%$ 、高用量群 $90.77 \pm 6.17\%$ 、であり、TP 用量依存性に有意な増加を認めた (Fig. 3.6)。

卵巣摘出雌の各群の GL 細胞増殖巣における PCNA 指数の平均 (平均 \pm 標準偏差) はそれぞれ対照群 $75.03 \pm 8.69\%$ 、低用量群 $81.98 \pm 8.85\%$ 、高用量群 $94.61 \pm 2.92\%$ であり、精巣摘出雄と同様に TP 用量依存性に有意な増加を認めた (Fig. 3.6)。

対照群および投与群において、精巣摘出雄と卵巣摘出雌間に有意差は認められなかった。

3.3.2 長期試験

3.3.2.1 GL 細胞の増殖の組織学的評価およびグレーディング

短期試験群と同様に、精巣摘出雄の全群において GL 細胞の出現を認め、全群において腹部中央において出現頻度が高く高グレードで認められた (Fig. 3.7)。また、TP 投与群において特にグレードの高い領域で背部皮膚への GL 細胞増殖巣の伸展も認められた (Fig. 3.8)。各群における出現グレード平均 (平均 \pm 標準偏差) はそれぞれ対照群 0.88 ± 0.39 、低用量群 1.68 ± 0.18 、高用量群 1.79 ± 0.16

であった。対照群と低用量群あるいは高用量群間において有意差を認めたが、高用量群と低用量群間に有意差は認められなかった (Fig. 3.9)。

卵巣摘出雌においても精巣摘出雄と同様に全群で GL 細胞の出現を認め、全群において腹部中央において出現頻度が高く高グレードで認められた (Fig. 3.7)。TP 投与群においては特にグレードの高い領域で背部皮膚への伸展も認められた (Fig. 3.8)。各群における出現グレード平均 (平均±標準偏差) はそれぞれ対照群 0.62 ± 0.32 、低用量群 1.78 ± 0.11 、高用量群 1.77 ± 0.12 であった。精巣摘出雄と同様に対照群と低用量群あるいは高用量群間において有意差を認めたが、高用量群と低用量群間に有意差は認められなかった (Fig. 3.9)。

全群において精巣摘出雄と卵巣摘出雌間に有意差は認められなかった。

3.3.2.2 GL 細胞増殖巣のサイズの計測

精巣摘出雄の各群における GL 細胞増殖巣のサイズの平均 (平均±標準偏差) はそれぞれ対照群 $135.85\pm 61.95\mu\text{m}$ 、低用量群 $317.00\pm 129.55\mu\text{m}$ 、高用量群 $422.88\pm 106.97\mu\text{m}$ であり、TP 用量依存性に厚みを増していた。対照群と低用量群あるいは高用量群間に有意差を認めたが、低用量群と高用量群間に有意差は認められなかった (Fig. 3.10)。

卵巣摘出雌の各群における GL 細胞増殖巣のサイズの平均 (平均±標準偏差) はそれぞれ対照群 $89.96\pm 42.56\mu\text{m}$ 、低用量群 $461.80\pm 108.54\mu\text{m}$ 、高用量群 $405.62\pm 105.26\mu\text{m}$ であり、対照群と比べ、TP 投与群では有意に厚さを増していた。また、低用量群と高用量群間に有意差は認められなかった (Fig. 3.10)。

低用量群の精巣摘出雄と卵巣摘出雌間で有意差を認めたが、対照群と高用量群では精巣摘出雄と卵巣摘出雌間に有意差は認められなかった。

3.3.2.3 GL 細胞の増殖活性の評価

精巣摘出雄の各群の GL 細胞増殖巣における PCNA 指数の平均 (平均±標準偏

差) はそれぞれ対照群 $83.54 \pm 6.99\%$ 、低用量群 $91.39 \pm 3.46\%$ 、高用量群 $95.98 \pm 1.48\%$ であり、TP 用量依存性に有意な増殖活性の増加を認めた (Fig. 3.11)。

卵巣摘出雌の各群の GL 細胞増殖巣における PCNA 指数の平均 (平均 \pm 標準偏差) はそれぞれ対照群 $83.49 \pm 7.18\%$ 、低用量群 $91.12 \pm 2.89\%$ 、高用量群 $92.26 \pm 5.28\%$ であり、対照群と低用量群あるいは高用量群間に有意な増殖活性の増加を認めた。また、低用量群と高用量群間に有意差は認められなかった (Fig. 3.10)。

高用量群において精巣摘出雄と卵巣摘出雌間に有意な差を認めた ($P < 0.05$) が、対照群および低用量群においては精巣摘出雄と卵巣摘出雌間に有意差は認められなかった。

3.4 考察

前章において性腺摘出によりジャンガリアンハムスターの皮膚 GL 細胞の発達抑制が生じることを示したが、本実験の短期投与試験および長期投与試験のいずれの性腺切除対照群においても GL 細胞の発達抑制が認められた。加えて、精巣切除雄における GL 細胞の出現は、卵巣切除雌に比べて高い頻度やグレードを示した。閉経後の女性において、卵巣切除により血清アンドロジェンの低下がみられること (Bui *et al.*, 2010, Kulak *et al.*, 2009) や男性では女性に比べ副腎由来 DHEA-S (性腺外アンドロジェン) の分泌が高い (Goldman *et al.*, 2007, Sonka *et al.*, 1968) ことが知られている。これらが対照群における性差の一因と考えられる。この結果は前章の結果と類似しており、また、矛盾は無いものと考えられ、短期的のみでなく、長期的にも性腺摘出により GL 細胞は発達不良をきたすことが示された。

短期投与群および長期投与群のいずれにおいても、GL 細胞の出現グレードや増殖巣のサイズ、PCNA 指数は対照群に比べ有意な増加を示した。また、TP 投与用量の増加に伴い、GL 細胞増殖巣の分布拡大や、厚さの増加などが組織学的に認められた。さらに、PCNA 指数も TP 投与用量依存性に増加がみられた。これらより、GL 細胞はアンドロジェンの濃度に依存して増殖活性が増加し、増殖が促進されるものと考えられる。

GL 細胞の出現グレードは短期投与群と比較すると、長期投与群においてわずかに高い傾向が認められたが、群間において有意な差は認められなかった。特に高用量群においてはほぼすべての動物が腹部皮膚の広い範囲でグレード 2 を示すため、高アンドロジェン条件下では短期的にプラトーに達するものと考えられる。しかし、増殖巣のサイズ (厚さ) や PCNA 指数においては投与期間の異なる群間で有意な差が認められることから、アンドロジェンの暴露期間の延長によって GL 細胞の増殖は継続するものと考えられる。これらより、GL 細胞の増殖は暴露期間にも影響を受けるものの、主にアンドロジェン濃度に依存す

ることが示唆される。

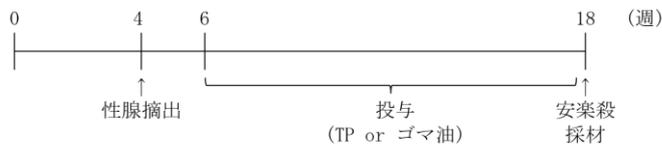
今回、*in vivo*において GL 細胞の増殖がテストステロンの刺激によって亢進することが示された。また、GL 細胞の発達が性腺切除により抑制され、TP 投与により濃度依存性に増殖活性の亢進と分布の拡大がみられることから、テストステロンなどのアンドロジェンがジャンガリアンハムスターの GL 細胞の発生や分化、維持に重要な役割を担っていることが示唆される。

3.5 小括

性腺摘出ジャンガリアンハムスターにおいて皮膚 GL 細胞の発達抑制がみられ、一方、テストステロン投与 (5mg/kg および 20mg/kg) により用量依存性に増殖がみられた。これは GL 細胞がテストステロンのようなアンドロジェンに対し高い感受性を有し、用量依存性に増殖することが示された。

3.6 図

短期試験群



長期試験群

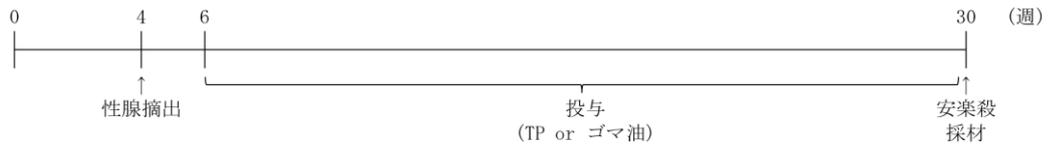


Fig. 3.1 テストステロン投与計画

プロピオン酸テストステロン (TP) および対照群のゴマ油は、図の期間で投与した。

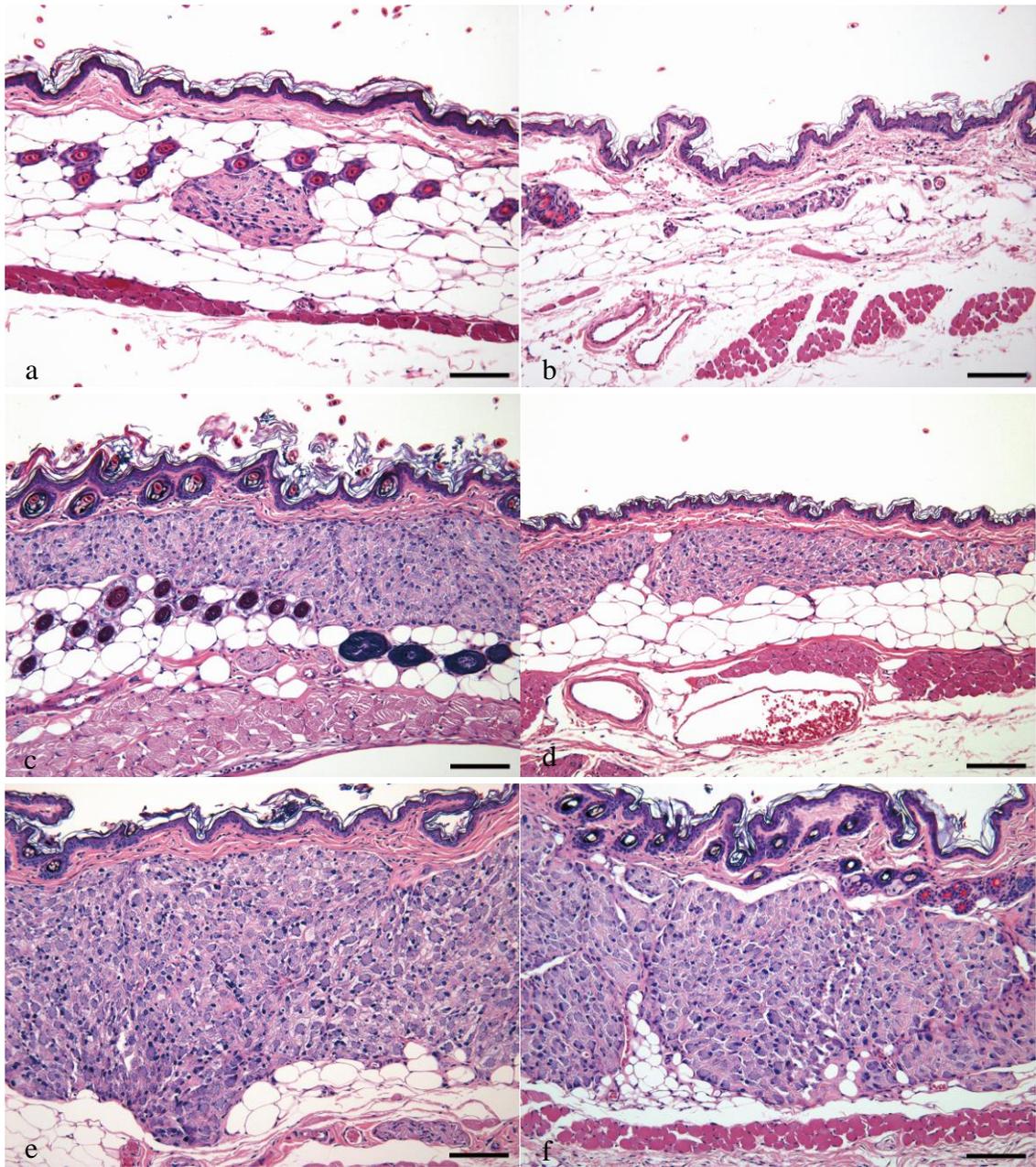


Fig. 3.2 短期試験の腹側皮膚における GL 細胞の出現。

(a) 対照群雄、(b) 対照群雌、(c) 低用量群雄、(d) 低用量群雌、(e) 高用量群雄、(f) 高用量群雌。対照群においてはグレード 1 での出現が多い。低用量群および高用量群ではグレード 2 での出現が認められるが、増殖巣の厚さは低用量群に比べ、高用量群で顕著に増している。HE 染色。Bar=50 μ m.

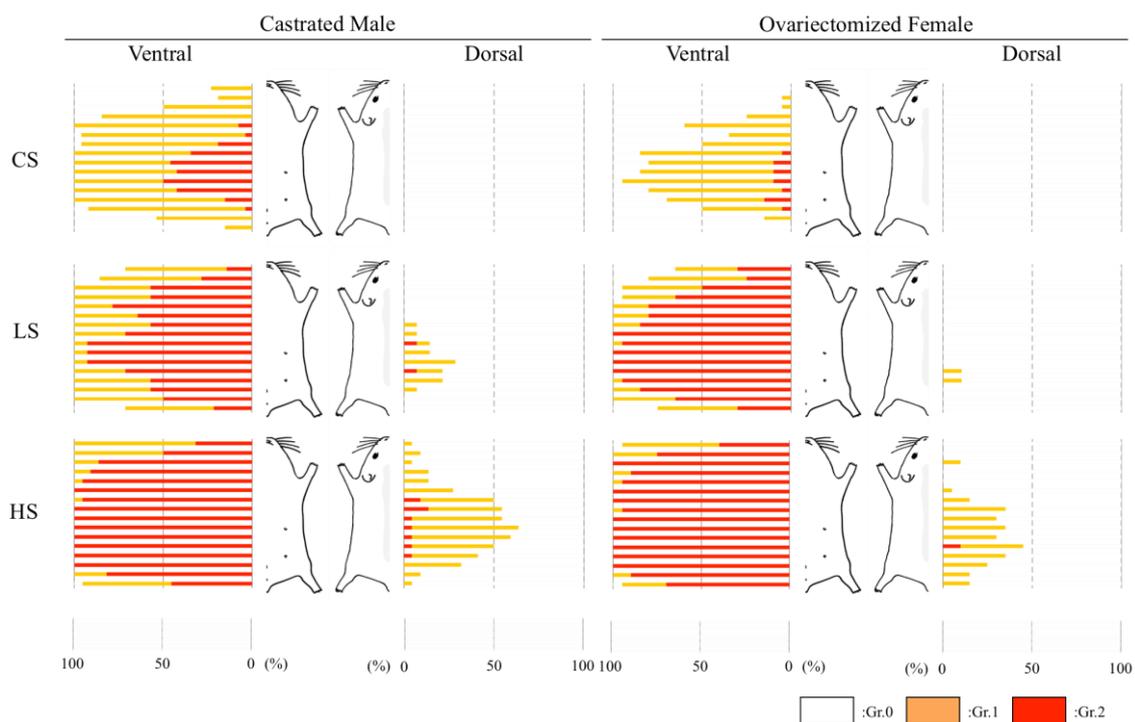


Fig. 3.3 TP 短期投与試験における GL 細胞の出現グレードとその平均出現率。グラフは皮膚のそれぞれの部位におけるグレードごとの比率を示す。どの群においても腹部中央において出現頻度が高いが、投与群においては腹側の広い範囲において高グレードでの出現が認められ、特に高いグレードを示す領域では背側皮膚への伸展も認められる。

CS : 対照群、LS : 低用量群、HS : 高用量群。

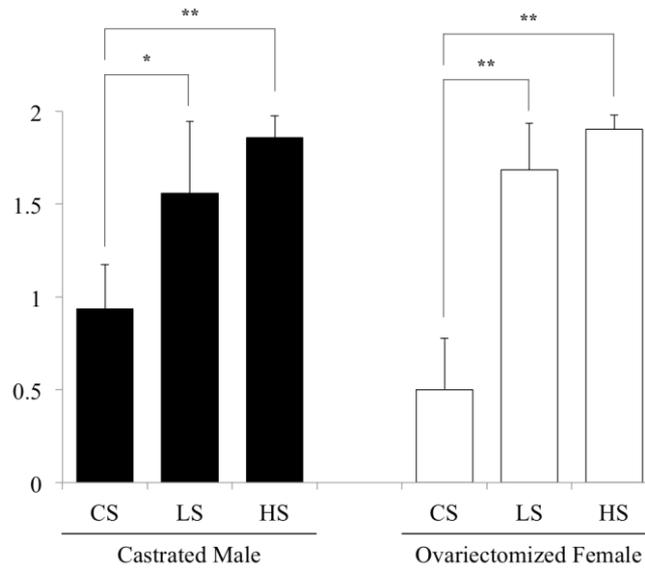


Fig. 3.4 TP 短期投与試験における GL 細胞出現グレードの平均。

精巣摘出雄雄、卵巣摘出雌ともに対照群と TP 投与群間に有意差を認めるが、低用量群と高用量群間に有意差は認めない。

CS : 対照群、LS : 低用量群、HS : 高用量群。

Mean±SD, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定).

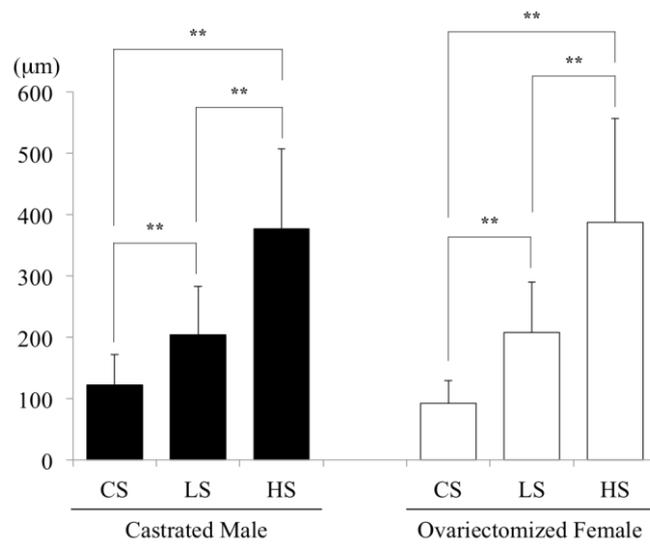


Fig. 3.5 TP 短期投与試験における GL 細胞増殖巣の厚さ。

精巣摘出雄、卵巣摘出雌ともに TP 用量依存性に有意な増加が認められる。

CS : 対照群、LS : 低用量群、HS : 高用量群。

Mean±SD, ** : $P < 0.01$ (*Kruskal-Wallis* 検定および *Steel-Dwass* 検定).

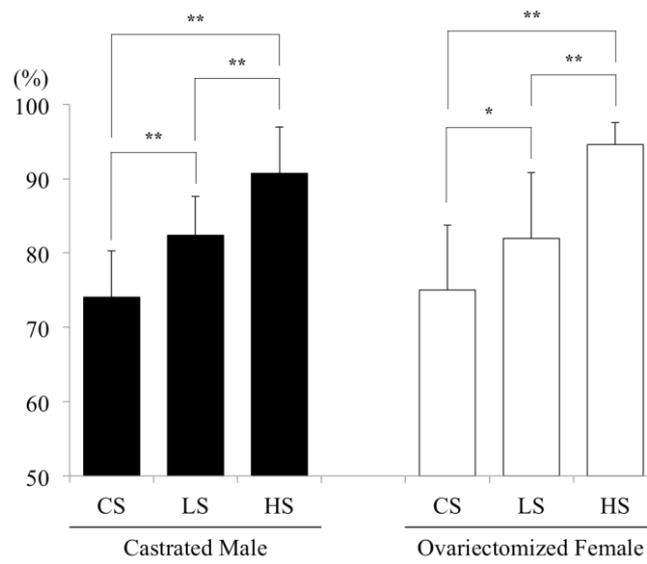


Fig. 3.6 TP短期投与試験におけるGL細胞増殖巣におけるPCNA指数の平均。精巣摘出雄、卵巣摘出雌ともにTP用量依存性に有意なPCNA指数の増加を認める。

CS：対照群、LS：低用量群、HS：高用量群。

Mean±SD, **: $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis検定およびSteel-Dwass検定).

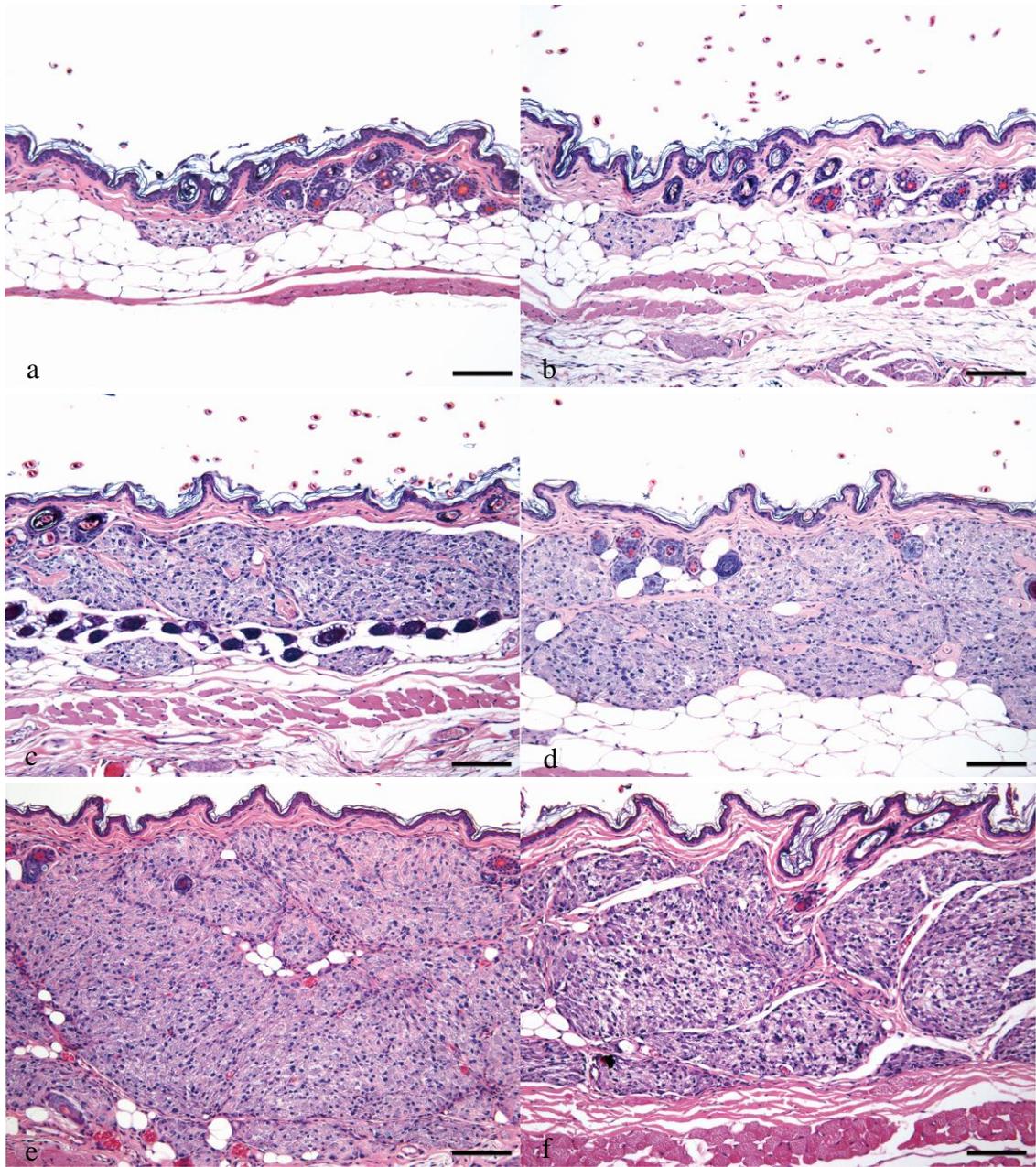


Fig. 3.7 TP 長期投与試験の腹側皮膚における GL 細胞の出現。

(a) 対照群雄、(b) 対照群雌、(c) 低用量群雄、(d) 低用量群雌、(e) 高用量群雄、(f) 高用量群雌。対照群においてはグレード 1 での出現が多い。低用量群および高用量群ではグレード 2 での出現が認められるが、増殖巣の厚さは低用量群に比べ、高用量群で顕著に増している。HE 染色。Bar=50 μ m.

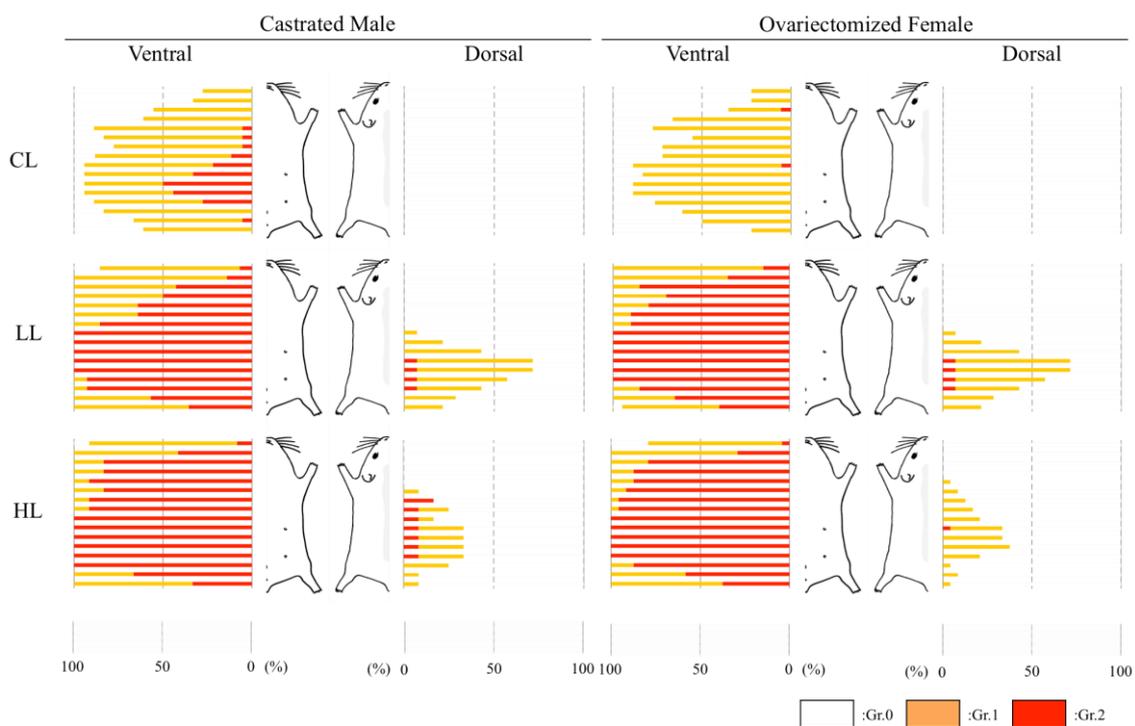


Fig. 3.8 TP 長期投与試験における GL 細胞の出現グレードとその平均出現率。グラフは皮膚のそれぞれの部位におけるグレードごとの比率を示す。どの群においても腹部中央において出現頻度が高いが、投与群においては腹側の広い範囲において高グレードでの出現が認められ、特に高いグレードを示す領域では背側皮膚への伸展も認められる。

CL : 対照群、LL : 低用量群、HL : 高用量群。

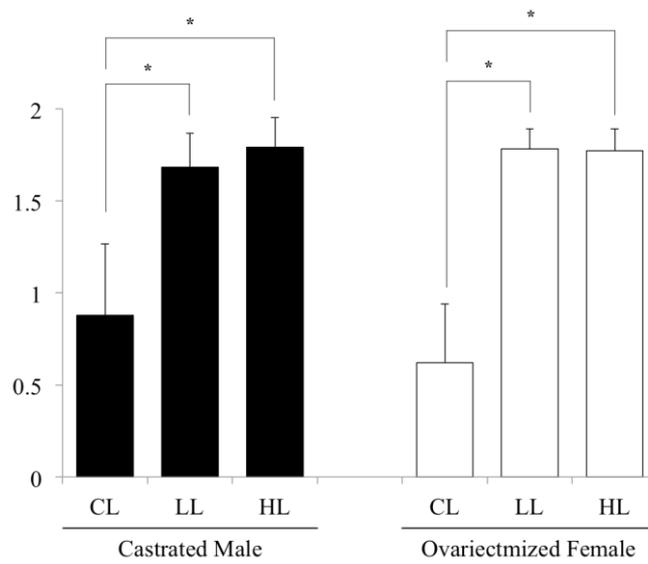


Fig. 3.9 TP 長期投与試験における GL 細胞出現グレードの平均

精巣摘出雄、卵巣摘出雌ともに対照群と TP 投与群間において有意差を認めるが、低用量群と高用量群間に有意差は認めない。

CL : 対照群、LL : 低用量群、HL : 高用量群。

Mean±SD, * : $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定).

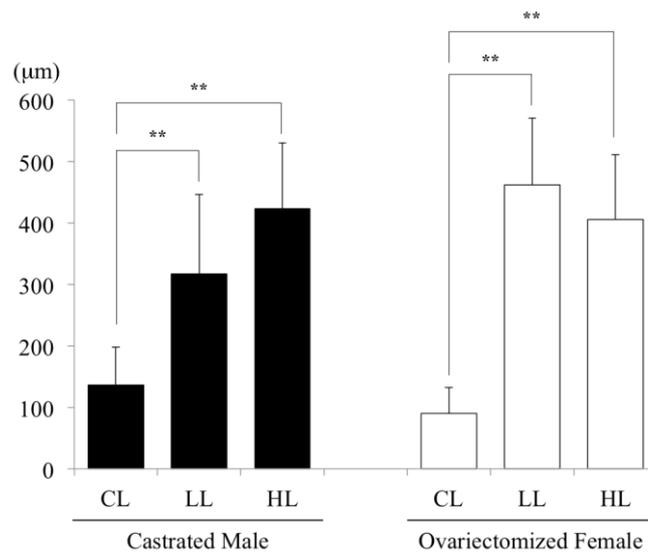


Fig. 3.10 TP 長期投与試験における GL 細胞増殖巣の厚さ

精巣摘出雄、卵巣摘出雌ともに対照群と TP 投与群間において有意差を認めるが、低用量群と高用量群間に有意差は認めない。

CL : 対照群、LL : 低用量群、HL : 高用量群。

Mean±SD, **: $P < 0.01$ (*Kruskal-Wallis* 検定および *Steel-Dwass* 検定).

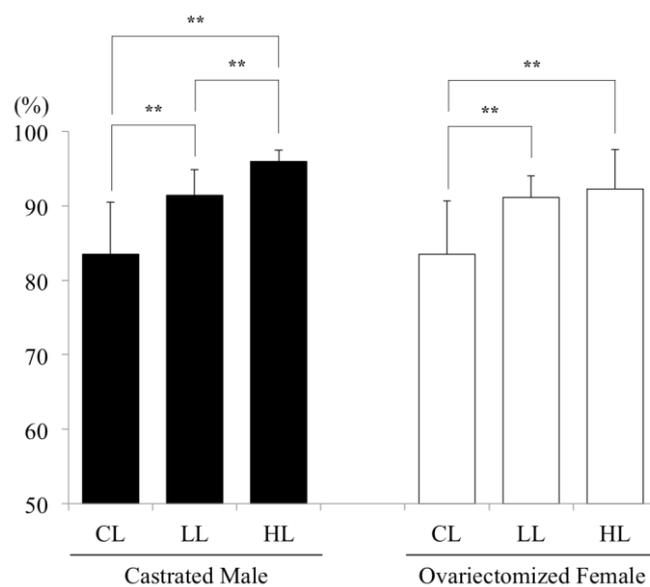


Fig. 3.11 TP 長期投与試験における GL 細胞増殖巣における PCNA 指数の平均。

精巣摘出雄では TP 投与用量依存性に有意な増加を認める。卵巢摘出雌においては対照群と TP 投与群間に有意差を認めるが、低用量群と高用量群間に有意差は認めない。

CL : 対照群、LL : 低用量群、HL : 高用量群。

Mean±SD, ** : $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定)。

第 4 章 ジャンガリアンハムスターの皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞におけるレクチン結合性

4.1 緒言

ジャンガリアンハムスターの GL 細胞においては免疫組織化学的な検索が行われており、核は androgen receptor (AR) に、細胞質は vimentin に陽性を示すことが知られている。その他のマーカーについては、GL 細胞の細胞質が Heat shock protein 47 (HSP47) や β チューブリンクラスIIに陽性を示すという報告もある (Kashida *et al.*, 2003)。また、細胞間の膠原線維はマッソントリクローム染色において青染し、collagen type 1 あるいは 3 を用いた免疫染色で陽性を示す (Baba *et al.*, 2003)。膠原線維産生能を有する間葉系細胞であることが示唆され、前章で示したようにアンドロジェンに対し用量依存性の増殖を示すことがわかってきたが、特異的なマーカーも見当たらず、GL 細胞の機能や役割は現時点では不明のままである。

レクチンは赤血球をはじめ様々な種類の細胞を凝集させる性質を有することから見いだされた植物や微生物、動物が有する分子であり、Goldstein らにより以下のように定義されている (Goldstein *et al.*, 1980)。

- ・免疫反応産物以外の糖結合性のタンパク質あるいは糖タンパク質で、細胞または複合糖質を凝集するもの。
- ・2つ以上の結合部位を有し、動物あるいは植物細胞を凝集することが可能。
- ・凝集は単糖あるいはオリゴ糖の添加により特異的に阻止される。

レクチンは単糖あるいはオリゴ糖を認識し、数個までの糖鎖の糖配列やその結合位置を認識する事が可能である。また、それぞれのレクチンには特異性があり、通常は特定の糖鎖とのみ結合する。この性質を利用して、糖タンパク質や細胞の同定、精製、構造解析や生合成実験、あるいは神経経路のマッピングなどに用いられている (Dan *et al.*, 2015, Sharon and Lis, 2004)。

本章では、GL 細胞の表現型や性質を明らかにする一助として、糖鎖特異的結合を示す 8 種のレクチンを用いたレクチン組織化学的検索により、GL 細胞が有する特定糖鎖の検出を試みた。

4.2 材料と方法

4.2.1 動物

実験に用いるジャンガリアンハムスターは2章と同様に飼育・維持を行った。7ヶ月齢、10ヶ月齢、16ヶ月齢、24ヶ月齢の4匹の雄ジャンガリアンハムスターをペントバルビタールナトリウムの過剰投与により安楽殺し、腹部の皮膚を採材した。

4.2.2 レクチン組織化学的染色

腹部皮膚は厚紙に伸展し貼付けた状態で10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。4 μ mで連続パラフィン切片を作成し、一枚についてHE染色を実施、残りについて以下の手順に基づいてレクチン組織化学的染色を実施した。使用したレクチンおよびその特異性についてTable 4.1に記載した。

1) 脱パラフィン。

キシレン3槽各10分。

2) 親水。100%/100%/90%/80%/70%アルコール各1槽。

3) 蒸留水洗浄。5分。

4) 内因性ペルオキシダーゼブロッキング。0.3% H_2O_2 加PBS。室温30分。

5) PBS洗浄。5分。

6) 非特異吸着ブロッキング。1%ブロックエース/PBS (DSファーマバイオメディカル株式会社)。室温30分。

7) ビオチン化レクチン (VECTOR)。10 μ g/ml。4 $^{\circ}$ C一晩。

8) PBS洗浄。5分3回。

9) HRP標識ストレプトアビジン (Dako)。500倍。室温30分。

10) PBS洗浄。5分3回。

11) 顕微鏡鏡検下で発色。0.02%3,3'-diaminobenzidinetetrachloride (DAB) (同

仁化学研究所) -0.006% H_2O_2 -pH7.4 HCl-Tris 緩衝液

- 12) 蒸留水で反応を停止。
- 13) ヘマトキシリンで核染色。1分。
- 14) 流水中で色出し。30分。
- 15) 脱水。70%/80%/90%アルコール各1槽。100%アルコール3槽各10分。
- 16) 透徹。キシレン3槽各10分。
- 17) 封入。

4.3 結果

検索に用いたジャンガリアンハムスターの腹部皮膚ではすべての個体で GL 細胞の増殖巣が認められた (Fig. 4.1)。

ジャンガリアンハムスターの皮膚組織中において小麦胚芽凝集素 (Wheat Germ Agglutinin:WGA) レクチンは GL 細胞の細胞質に特異的に顆粒状あるいは小空胞の壁を縁取るように反応がみられ、泡沫状の陽性像を呈した (Fig. 4.2)。加えて、Succinylated WGA (sWGA) レクチンも GL 細胞の細胞質が WGA と同様に反応した (Fig. 4.2)。また、Concanavalin A (ConA) レクチンも同様に GL 細胞の細胞質に反応したが、同時に皮下の横紋筋においても反応がみられた (Fig. 4.2)。また、UEA-I においては表皮や皮膚付属器の上層の細胞が陽性を示した (Fig. 4.2)。

以上の GL 細胞におけるレクチン反応性は月齢の差に関係なく、同様の結果を示した。また、その他の DBA、PNA、RCA₁₂₀、SBA の各レクチンについてはジャンガリアンハムスターの皮膚において GL 細胞を含むすべての組織・細胞に対し反応がみられなかった (Fig. 4.2)。

4.4 考察

糖鎖付加あるいはグリコシル化はアスパラギン (Asn) 残基に結合する *N*-結合型グリコシル化およびペプチド中のセリン (Ser)、トレオニン (Thr) 残基に結合する *O*-結合型グリコシル化が知られている。*N*-結合型グリコシル化は特に真核生物におけるペプチドの折りたたみに重要な過程であり、小胞体及びゴルジ装置で修飾を受ける。一方 *O*-結合型グリコシル化はゴルジ装置で生じ、特に *O*-GlcNAc はセリンあるいはトレオニンにおけるリン酸化とのクロストークを介してシグナル伝達、転写調節などに関与している (Hart *et al.*, 2011.)。

WGA レクチンは 1963 年、悪性化細胞を凝集することが発見され (Aub *et al.* 1963)、*N*-acetylglucosamin (GlcNAc) あるいはシアル酸 (*N*-acetylneuraminic acid (NeuAc)) を認識する。また、sWGA レクチンは GlcNAc のみを認識するとされている。WGA および sWGA レクチンが GL 細胞の細胞質に反応を示したということは、GL 細胞の細胞質において GlcNAc の糖鎖付加が行われているということを示しており、それに加えてシアル酸の糖鎖付加が行われている可能性もある。WGA レクチンでのレクチン染色において、陽性像は顆粒状あるいは小胞状に認められた。これらのレクチンに対する反応はジャンガリアンハムスターの皮膚組織において GL 細胞にのみ認められ、これは GL 細胞細胞質の小胞体においてこれらの糖鎖付加が活発に行われていることを示している。WGA レクチンに反応を示す細胞としては、羊の鼻腔粘膜の細胞、気道上皮の自由縁や杯細胞、また、気道粘膜の混合腺における粘液細胞 (Ibrahim *et al.*, 2014)、豚の精嚢分泌上皮 (Sakairi *et al.*, 2005)、あるいは成熟マウス脳における神経幹細胞 (NSCs) あるいは神経前駆細胞 (NPCs) (Kitada *et al.*, 2011) などが報告されている。また、筋、骨、腱や靭帯組織における間質結合織 (Kostrominova, 2011) やコラーゲン線維への反応 (Söderström, 1987) も報告されている。また、WGA レクチンは心筋梗塞の線維化領域に一致して染色され、この評価に有用であるという報告もある (Emde *et al.*, 2014)。このように、WGA レクチンは何らかの分泌細

胞や神経系細胞、及び膠原線維性組織などに反応すると考えられる。GL 細胞の増殖巣や非典型線維腫の腫瘍巣内に種々の程度に collagen type 1 に陽性を示す膠原線維を含むことに加えて、既報において WGA レクチンが膠原線維などの細胞間基質への反応がみられることから、GL 細胞は線維芽細胞に近い性質を有している可能性が考えられる。

また、ConA レクチンが反応していることより、修飾糖鎖にはマンノース (Man) も存在していると考えられる。一般に真核生物の細胞内における N-結合型糖鎖は GlcNAc および Man を含んでおり (Schachter, 2014)、GL 細胞にみられる糖鎖も構成成分として両者を含んでいるものと考えられる。

WGA レクチンはジャンガリアンハムスターの皮膚組織において GL 細胞に特異的に反応することから、WGA は GL 細胞の特異的マーカーとなり得ると考えられる。

4.5 小括

ジャンガリアンハムスターの GL 細胞においては特異的なマーカーが存在していなかったが、皮膚組織において WGA レクチンが GL 細胞に特異的に反応することが示された。これより、GL 細胞においては *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) あるいはシアル酸による糖鎖修飾が行われていることが示され、また、WGA レクチン認識糖タンパク質は GL 細胞のマーカーとなり得ると考えられる。

4.6 表および図

レクチン	由来	糖鎖特異性
Con A	Jack Bean (<i>Canavalia ensiformis</i>)	Man
DBA	Horse Gram (<i>Dolichos biforus</i>) seeds	α GalNAc
PNA	Fruits of <i>Arachis hypogaea</i>	Gal- β (1-3)-GalNAc
RCA ₁₂₀	Castor Bean (<i>Ricinus communis</i>) seeds	Gal
SBA	Soybean (<i>Glycin max</i>) seeds	Gal, GalNAc
UEA I	Furze Gorse (<i>Ulex europaeus</i>) seeds	Fuc
WGA	Wheat germ (<i>Triticum vulgare</i>)	GlcNAc, SA
Succinylated WGA	Wheat germ (<i>Triticum vulgare</i>)	GlcNAc

Table 4.1 使用したレクチンと由来および糖鎖特異性

Development and Applications of lectins as Biological Tools in Biomedical Research (Dan *et al.*, 2015)、Table3 および VECTOR LABORATORIES 社カタログレクチン特性を参考に作成。

Man: Mannose、GalNAc: *N*-Acetylgalactosamine、Gal: *D*-Galactose、Fuc: Fucose、GlcNAc: *N*-Acetylglucosamine、SA: Sialic acid

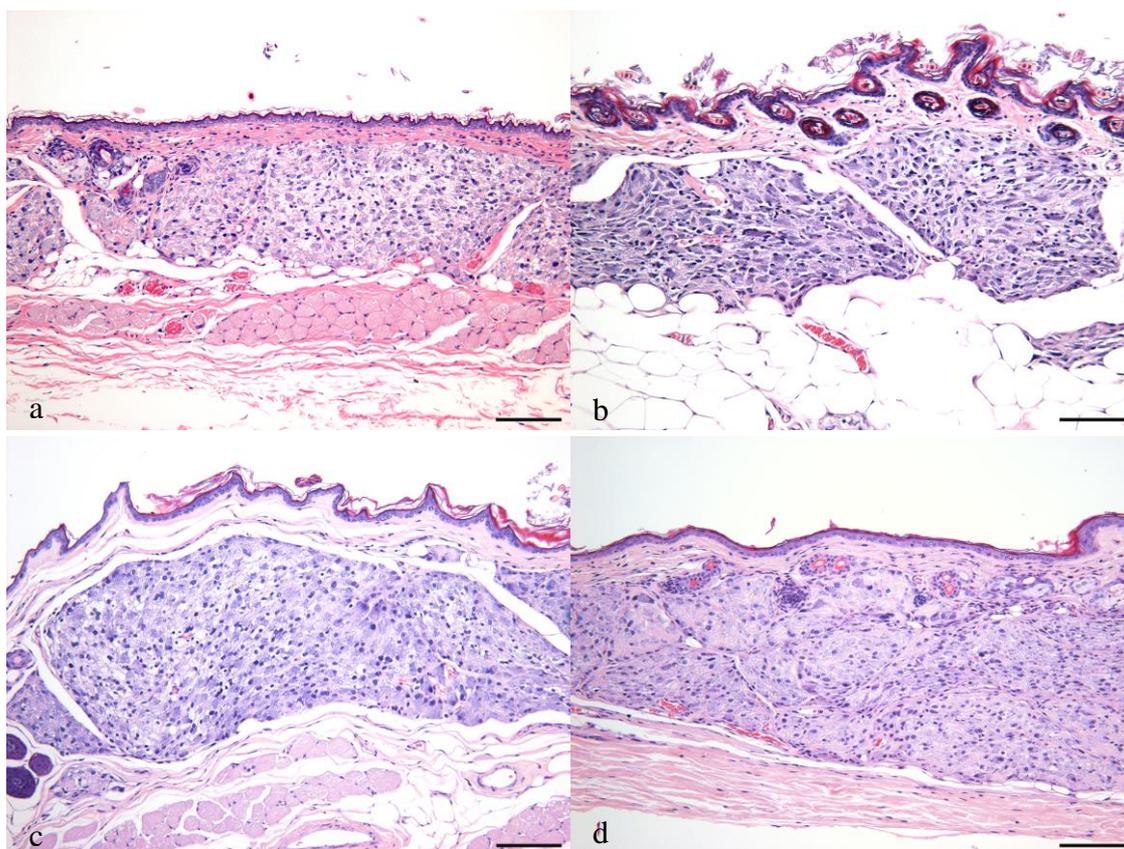


Fig. 4.1 腹部皮膚における GL 細胞

(a) 7 ヶ月齢雄個体の腹部皮膚。HE 染色。Bar=100 μ m.

(b) 10 ヶ月齢雄個体の腹部皮膚。HE 染色。Bar=100 μ m.

(c) 16 ヶ月齢雄個体の腹部皮膚。HE 染色。Bar=100 μ m.

(d) 24 ヶ月齢雄個体の腹部皮膚。HE 染色。Bar=100 μ m.

いずれの個体においても真皮あるいは真皮から皮下織において GL 細胞の増殖巣を認める。

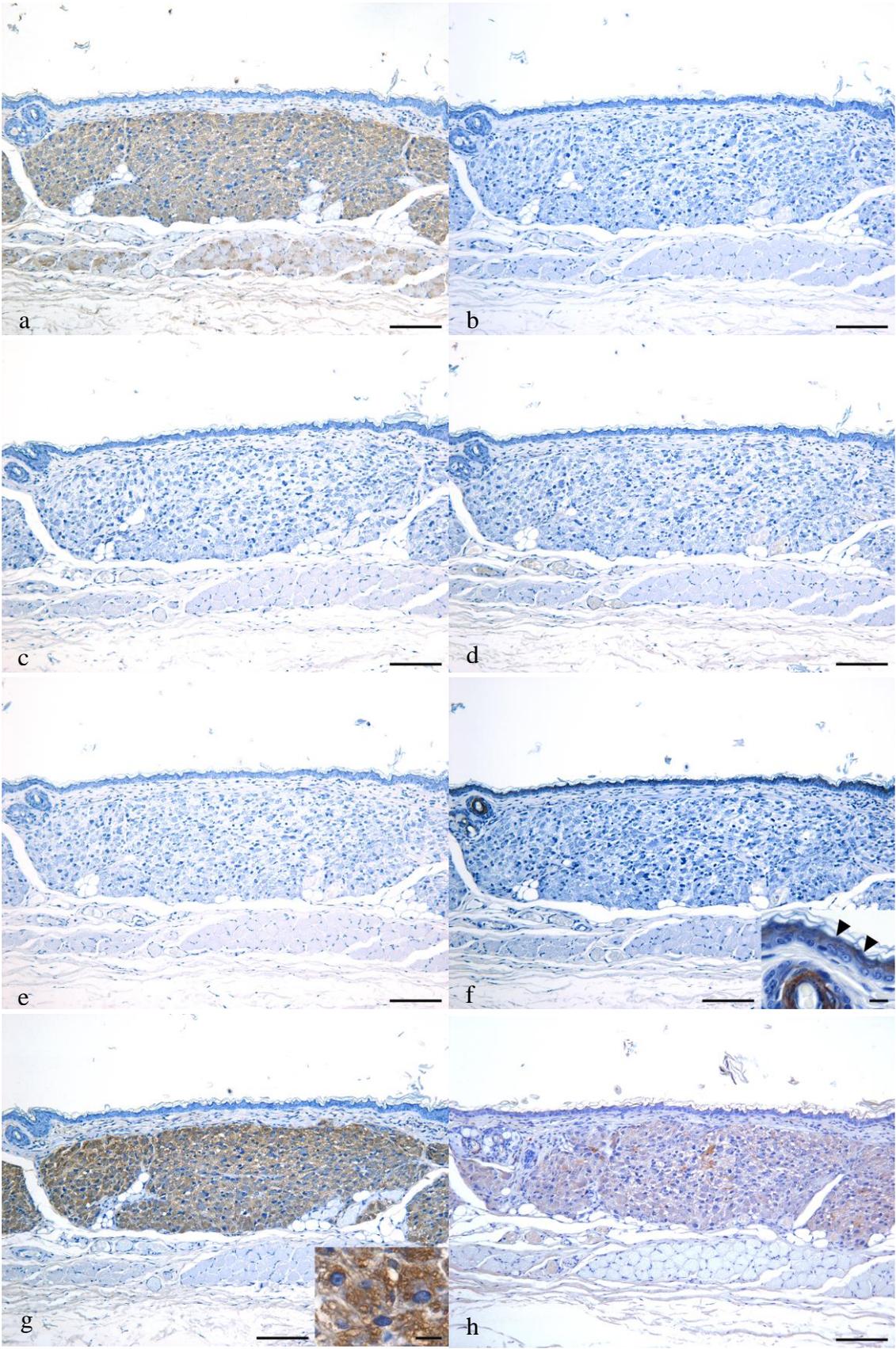


Fig. 4.2 ジャンガリアンハムスター皮膚 GL 細胞におけるレクチン染色性
全て7ヶ月齢雄ジャンガリアンハムスターの腹部皮膚を示す。

(a) GL 細胞は ConA レクチンに陽性を示すが、表皮、筋においても陽性像がみられる。Bar=100 μ m.

(b) GL 細胞は DBA レクチンに陰性を示す。Bar=100 μ m.

(c) GL 細胞は PNA レクチンに陰性を示す。Bar=100 μ m.

(d) GL 細胞は RCA₁₂₀ レクチンに陰性を示す。Bar=100 μ m.

(e) GL 細胞は SBA レクチンに陰性を示す。Bar=100 μ m.

(f) GL 細胞は UEA-1 レクチンに陰性を示す。Bar=100 μ m.

inset : 皮膚および皮膚付属器の上層の細胞が陽性を示す。Bar=10 μ m.

(g) GL 細胞は WGA レクチンに陽性を示す。Bar=100 μ m.

inset: WGA レクチンは GL 細胞の 細胞質において顆粒状あるいは小空胞状に陽性を示す。Bar=10 μ m.

(h) GL 細胞は sWGA レクチンに陽性を示す。Bar=100 μ m.

第 5 章 ジャンガリアンハムスターの皮膚神経節細胞様 (GL) 細胞における WGA レクチン結合タンパク質の同定

5.1 緒言

前章において WGA レクチンが GL 細胞の細胞質に特異的に反応することを示した。これは GL 細胞の細胞質内において WGA 認識糖鎖の修飾が行われていることを示している。

4 章でも述べたように糖鎖による修飾は *N*-結合型グリコシル化 (*N*-グリカン) と *O*-結合型グリコシル化 (*O*-グリカン) が知られている。*N*-グリカンの腫瘍細胞における細胞内シグナル伝達系や細胞接着への関与 (Zhao *et al.*, 2008) や *O*-結合型 GlcNAc の細胞内シグナル伝達や転写調節などへの関与 (Hart *et al.*, 2011) および膵臓 β 細胞におけるグルコースセンサーとしての働き (Durning *et al.*, 2015)、また、cofilin のセリン-108 における *O*-GlcNAc 化は乳癌細胞の浸潤性に重要な因子となっている (Huang *et al.*, 2013) ことなどが報告されている。このように糖鎖によるタンパクの修飾は、タンパク質の生理活性の発現などに深く関わっており、オリゴ糖構造の変化は細胞の増殖、移動や分化、腫瘍の浸潤や宿主-病原体の相互関係、細胞輸送や膜を介したシグナル伝達などといった生理学的あるいは病理学的な変化に関連していることを示唆している (Zhao *et al.*, 2008)。

本章では GL 細胞における WGA 認識糖鎖の修飾に関わるタンパク質を明らかにすべく、組織からの抽出物に対し WGA レクチンのアフィニティカラムを用いて WGA レクチン認識糖鎖の結合するタンパクを精製し、その解析を試みた。

5.2 材料と方法

5.2.1 動物

実験に用いるジャンガリアンハムスターは2章と同様に飼育・維持を行った。ジャンガリアンハムスターは10ヶ月齢雄、16ヶ月齢雄、24ヶ月齢雄の3個体を用い、ペントバルビタール（ソムノペンチル、共立製薬）の多量投与による過麻酔で安楽殺し、腹部の皮膚を採材した。腹部の皮膚は100mgごとにチューブに分けて、液体窒素により急速凍結し、タンパク質抽出を行うまで -80°C で保管した。採材部位近傍の皮膚は常法に従いHE染色切片を作製し、GL細胞出現の有無を確認した。また、3個体のいずれにおいても肉眼、組織学的な検索において異常は認められなかった。

5.2.2 タンパク質抽出およびWGAレクチンによる精製

皮膚より以下の手順でタンパク抽出を行った。

氷上で、ジャンガリアンハムスターの腹部皮膚サンプル100mgを0.0625M Tris-HCl/5% Glycerol/Protein Inhibitor Cocktail (SIGMA ALDRICH, Complete, Mini, EDTA-free, Cat.11 836 170 001) 中においてIKA® T10 basic ULTRA-TURRAX®を用い、30秒ホモジェナイズ-30秒冷却を7サイクル行った後、ソニケーター (TOMY,ULTRASONIC DISRUPTOR,UD-200) を用いて30秒ソニケーション-30秒冷却を4サイクル行い、ホモジェネートを作製した。これを15000rpmで5分遠心分離し、可溶性画分として上清を回収した。

可溶性画分はWGAアフィニティカラム (Thermo Scientific, Glycoprotein Isolation Kit, WGA, Cat.89805) を用いて以下の手順でタンパクの精製を行った。

- 1) サンプル300 μl に $\times 5$ Binding/Wash Buffer 75 μl を加える。
- 2) WGAレクチンレジンを200 μL をカラムへ慎重に移す。
- 3) 1000 $\times g$ で1分間遠心。

- 4) Binding/Wash Buffer 200 μ L をカラムに加える。
- 5) 1000 \times g で 1 分間遠心。
- 6) 3) - 4) を 2 回繰り返す。
- 7) カラムにボトムキャップを装着し、1 で調整したサンプルを加え、室温で 30 分間震盪。
- 8) ボトムキャップを外し 1000 \times g で 1 分間遠心。
- 9) Binding/Wash Buffer 400 μ L をカラムに加える。
- 10) 1000 \times g で 1 分間遠心。
- 11) 9) - 10) を再度行う。
- 12) カラムにボトムキャップを装着し、Binding/Wash バッファー200 μ L を加え、室温で 5 分間震盪。
- 13) ボトムキャップを外し 1000 \times g で 1 分間遠心。
- 14) 12) - 13)を再度行う。
- 15) カラムにボトムキャップを装着し、Elution Buffer 200 μ L を加え、室温で 10 分間震盪。
- 16) 1000 \times g で 1 分間遠心し、溶出液を回収。
- 17) 15) - 17)を繰り返し、溶出液を回収。

溶出液に 0.0625M Tris-HCl/2% SDS/5% Glycerol/0.005% BPB/5% 2-ME を加え懸濁した後、100 $^{\circ}$ C 10 分煮沸し、泳動サンプルとした。

5.2.3 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

可溶性画分および WGA アフィニティカラムでの溶出液には等量の 0.125M Tris-HCl (pH6.8) /4%SDS/10%Glycerol/0.01%BPB/10%2-ME を加え、100 $^{\circ}$ C 10 分加熱し、抽出サンプルとした。抽出サンプルは 5-20%密度勾配ポリアクリルアミドゲル (和光、SuperSepTMAce,5-20%,17well,194-15021) を用いて SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical Unit for 2 slab gels, Complete (GE lifescience,

SE260-10A-.75), EPS 3501XL Power Supply (GE lifescience, 18113005) で電気泳動 (400V15 分+400V 90 分) を行った。マーカーは BIO-RAD Precision Plus Protein™ Standards All Blue (Cat. #161-0373) を用いた。

5.2.4 ゲルの染色

泳動後のゲルは銀染色 MS キット (Wako, Code299-58901) を用いて、以下の手順で銀染色を行った。

- 1) 固定。5%酢酸加 50%メタノール、20 分間震盪。
- 2) 50%メタノール中、10 分間震盪。
- 3) 蒸留水、10 分間震盪。
- 4) 増感液、1 分間震盪。
- 5) 蒸留水、1 分間震盪、2 回。
- 6) 染色液、20 分間震盪。
- 7) 蒸留水、1 分間震盪、2 回。
- 8) 現像。現像液、目視で適当な染色像が得られるまで震盪。
- 9) 反応停止。停止液を加える。1 分間震盪。
- 10) 蒸留水、1 分間震盪、3 回。

染色後のゲルはスキャナを用いて撮影を行った。

5.2.5 泳動バンドからの分子量推定

5.2.4 において銀染色を施したゲルの撮影画像を Quantity One (BIO-RAD) を用いて解析し、泳動バンドより分子量の推定を行った。

5.2.6 ゲル内消化法によるタンパク質回収およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) 法を用いた精製タンパク質の推定

MALDI-TOF MS法に用いるため、泳動後のゲルをCBB染色し、軽く脱色後、任意のバンドを切り出し、ゲル内消化法を用いてサンプルを調製した。サンプルの調製はIn Gel Digestion Kit (Thermo Scientific, 89871) および ZipTipC18 (Millipore,ZTC18S096) を用いて以下の手順で行った。

- 1) 1mm×1mm 角のゲルをチューブにとり、Destaining Solution 200 μ L を加え 37 $^{\circ}$ C、30 分間震盪しながらインキュベート。
- 2) Destaining Solution を取り除く。
- 3) 1) - 2) を再度行う。
- 4) Reducing Buffer 30 μ L をチューブに加え、60 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベート。
- 5) チューブを冷却し、Reducing Buffer を取り除く。
- 6) Alkylation Buffer 30 μ L をチューブに加え、室温で1 時間インキュベート。
- 7) Alkylation Buffer を取り除く。
- 8) Destaining Solution 200 μ L をチューブに加え、37 $^{\circ}$ C、15 分間震盪しながらインキュベート。
- 9) Destaining Solution を取り除く。
- 10) 8) - 9) を再度行う。
- 11) Acetonitrile 50 μ L を加え、室温で15 分間インキュベート。
- 12) Acetonitrile を取り除き、ゲルを風乾。
- 13) Activated Trypsin 10 μ L をチューブに加え、室温で15 分間インキュベート。
- 14) Digestion Buffer 25 μ L をチューブに加え、30 $^{\circ}$ Cで一晩震盪しながらインキュベート。
- 15) 消化液を回収。
- 16) Zip-Tip C18 をマイクロピペットにセットし、0.1%TFA/Acetonitrile 10 μ L を吸引・排出して洗浄。
- 17) 0.1%TFA/MilliQ 10 μ L を吸引・排出し Zip-Tip C18 を活性化。
- 18) 17) を2 回繰り返す。
- 19) 15) で得られたサンプルの吸引・排出を3 回行い、Zip-Tip への吸着を行う。
- 20) 0.1%TFA/MilliQ 10 μ L を吸引・排出し、非吸着物質を洗い流す。

21) 0.1%TFA/Acetonitrile 2 μ L を吸引し、吸引・排出を 3 回繰り返す。

22) ターゲットプレート上に排出し、自然乾燥させる。

ペプチドスタンダードは Peptide calibration kit をマトリックス溶液 (HCCA: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid 2mg/TA30 100 μ L) と等量混合し、調整した。ペプチドスタンダード 1 μ L をサンプルと同様にターゲットプレート上に滴下し、自然乾燥させた。

質量分析計 (Bruker, autoflex speed TOF/TOF) および flexControl (Bruker) を用いてサンプルの LIFT (MS/MS) 測定を行い、得られた結果を SwissProt データベース (2015/8) を用いて Mascot Search を行った。

5.2.7 ウェスタンブロッティング

泳動後にセミドライ式トランスファー装置 (BIO CRAFT, BE-331) および電源 (BIO CRAFT, Real Power, BP-5) を用いて PVDF メンブレンに転写を行った。転写後のメンブレンは、以下の手順で検出を行った。

1) 0.05%Tween80 加トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) で洗淨。5 分間 2 回。

2) 4%ブロッケーアス/TBS-T でブロッキング。室温 1 時間。

3) TBS-T で洗淨。5 分間 2 回。

4) 一次抗体反応

抗 β -actin ウサギポリクローナル抗体, MBL, PM053, 2000 倍 (/TBS-t)。

4 $^{\circ}$ C で震盪しながら一晩。

5) TBS-T で洗淨。10 分間 3 回。

6) 二次抗体反応。

二次抗体反応 (ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体, Dako, E0432, 10000 倍 (/TBS-T))。室温 1 時間。

7) TBS-T で洗淨。10 分 \times 3 回。

8) アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (SIGMA-ALDRICH, S2890, 10000 倍 (/TBS-T))。室温 1 時間

9) TBS-T で洗淨。10 分×3 回。

10) 発色液 (SIGMAFAST™ BCIP/NBT, 1tab/10ml-miliQ, SIGMA-ARDRI-CH, B5655) で可視化。

11) 蒸留水で反応停止し、乾燥。

乾燥後のメンブレンはスキャナを用いて撮影を行った。

5.3 結果

採材個体すべての腹部皮膚において GL 細胞の出現が認められた (Fig. 5.1)。

WGA レクチンアフィニティカラムを用いた精製タンパクについて SDS-PAGE を行ったところ、43kDa から 103kDa にかけて複数のバンドが確認された。特に 43kDa、56kDa、75kDa に明瞭なバンドが確認された (Fig. 5.2)。

MALDI-TOF MS 解析においては 43kDa のバンドから切り出したゲルからの抽出物において、SwissProt データベースを用いた Mascot 解析により、ヒト/マウス/ラットの Actin, cytoplasmic 1 (β -actin) に相当する断片が認められた。また、56kDa のバンドから切り出したゲルからの抽出物において、同様に断片中ヒト/マウス/ラット α -6-*D*-mannoside- β -1,2-*N*-acetylglucosaminyl-transferase II (MGAT2, GlcNAc-T II, GnT II, UDP-GlcNAc, EC 2.4.1.143) に相当する断片が認められ、MS-Digestion により予測される MGAT2 断片に近い分子量の断片が認められた。本解析においては、上記の 2 つの糖タンパク質を除き、抽出サンプルとしたバンドの分子量と合致する候補物質は認められなかった。

抗 β -actin ウサギポリクローナル抗体を用いた、ウェスタンブロッティングにおいて 43kDa のバンドが認められた (Fig. 5.3)。

5.4 考察

糖鎖付加反応あるいはグリコシル化はタンパク質の最も一般的な翻訳後修飾の一つであり、特に *N*-グリコシル化は頻度が高く、真核生物のタンパク質のほぼ半数がグリコシル化されていると考えられている。また、グリコシル化は生体内において様々な役割を有している。その修飾は小胞体やゴルジ装置で生じ、糖鎖転移酵素やグリコシダーゼなど様々な酵素が関わっている (Schachter, 2014, de-Freitas-Junior *et al.*, 2015)。

MGAT2 (α -6-*D*-mannoside- β -1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase II, GlcNAc-T II, GnT II, UDP-GlcNAc, EC 2.4.1.143) はヒトにおいて 14q21 に存在する *Mgat2* 遺伝子にコードされる糖鎖の転移酵素である (Tan *et al.*, 1995)。MGAT2 はゴルジ装置に存在しており、アスパラギン結合グリカン複合体の正常な構成に不可欠である (Schachter, 1986)。

Mgat2 遺伝子の変異による *N*-グリカン複合体合成の異常が生じ、特に中枢神経系における糖鎖修飾異常は Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome (CDGs) 2 型の要因となっている (Jenny Tan *et al.*, 1996, Pohl *et al.*, 1997)。また、*Mgat2*-null マウスは出生後初期に死亡し、異なる *Mgat2* 変異の動物を交配したものでは低頻度ではあるが生存がみられ、*N*-グリカンを欠失したマウスではヒトの CDCs2a 型の症状が認められる (Wang *et al.*, 2001)。

ジャンガリアンハムスターの GL 細胞においても MGAT2 の発現が示唆された。また、4 章で述べた通り、GL 細胞の皮膚において WGA レクチンは GL 細胞にのみ特異的に発現しており、これを含め GL 細胞では活発に MGAT2 による GlcNAc の糖鎖付加が行われていると考えられる。

また、ウェスタンブロッティングにより、腹部皮膚において WGA レクチンアフィニティカラムを用いて抽出された物質には β -actin が含まれていることが確認された。これは GL 細胞において β -actin が GlcNAc あるいはシアル酸を含む糖鎖修飾を受けていることを示している。 β -actin は細胞の形状を維持する分

子と考えられていたが、血管内皮細胞や血小板において一酸化窒素合成酵素 3 (NOS-3) の調節を行うシグナル伝達分子である可能性 (Su *et al.*, 2007) や転写調節を介して細胞の成長や運動等を調節する機能 (Bunnell *et al.*, 2011, Tondeleir *et al.*, 2012) も示されている。

第 4 章のレクチン組織化学的染色では、ジャンガリアンハムスターの皮膚組織において、WGA レクチンは GL 細胞特異的に反応がみられた。 β -actin は前述の通り、広く様々な細胞において認められる分子であるが、GL 細胞において特異的な糖鎖修飾を受けている事が示された。現時点では GL 細胞において β -actin がどのような役割を担っているかは不明確であるが、この特異な糖鎖修飾が GL 細胞における β -actin の役割を決定、あるいは何らかの影響を与えている可能性が示唆される。

今回、MALDI-TOF MS 解析において抽出元のバンドの分子量に明らかに合致したものは MGAT2 および β -actin のみであった。しかし、現在、ジャンガリアンハムスターのゲノムやタンパク質の全てが明らかになっているわけではないため、既存のタンパク質でない可能性や、糖鎖修飾による分子量の変動も考慮する必要がある。

今後は被修飾物質である β -actin の GL 細胞における役割の検索や、MGAT2 による被糖鎖修飾物質のより詳細な検索が GL 細胞の性質を検索する上で必要であると考えられる。

5.5 小括

GL細胞を含む腹部皮膚からWGAレクチンアフィニティカラムを用いてタンパク質の精製を行った。抽出物中には複数の分子量のタンパク質が含まれており、WGAレクチンの認識糖鎖を転移するMGAT2の存在が示唆され、また、被修飾物質として β -actinの存在が確認された。GL細胞における β -actinの糖鎖修飾の意義は不明確であり、今後その他の修飾物質の探索を含め更なる検索が期待される。

5.6 図

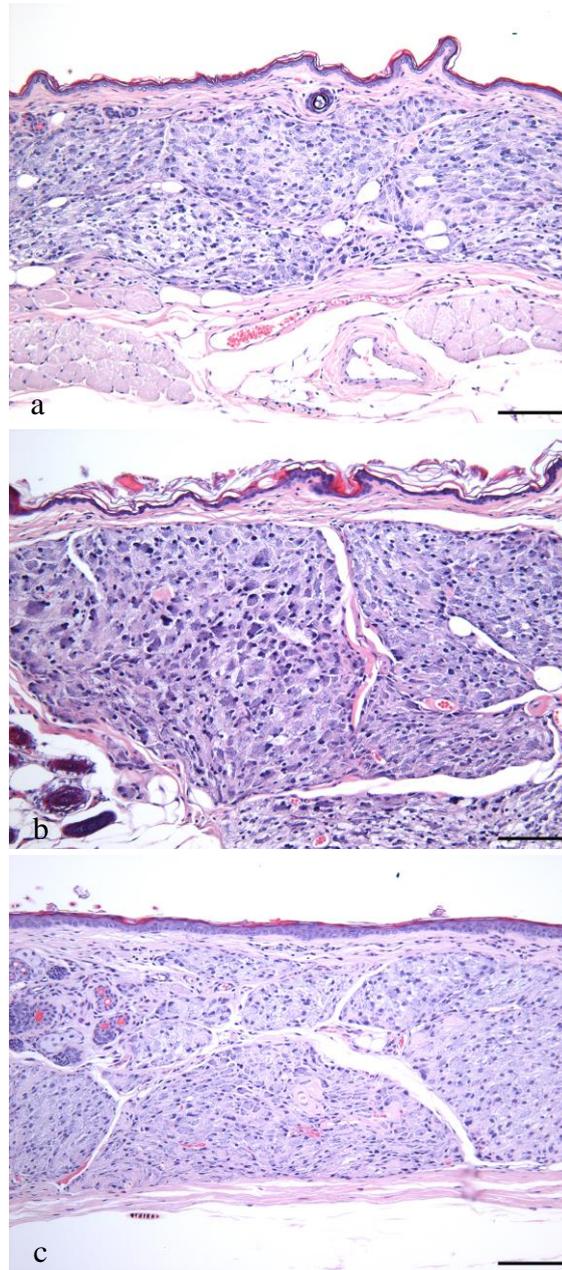


Fig. 5.1 採材個体における腹部皮膚の GL 細胞の出現

(a) 10 ヶ月齢雄個体。HE 染色。Bar=100 μ m.

(b) 16 ヶ月齢雄個体。HE 染色。Bar=100 μ m.

(c) 24 ヶ月齢雄個体。HE 染色。Bar=100 μ m.

いずれの個体においても GL 細胞のびまん性の出現が認められる。

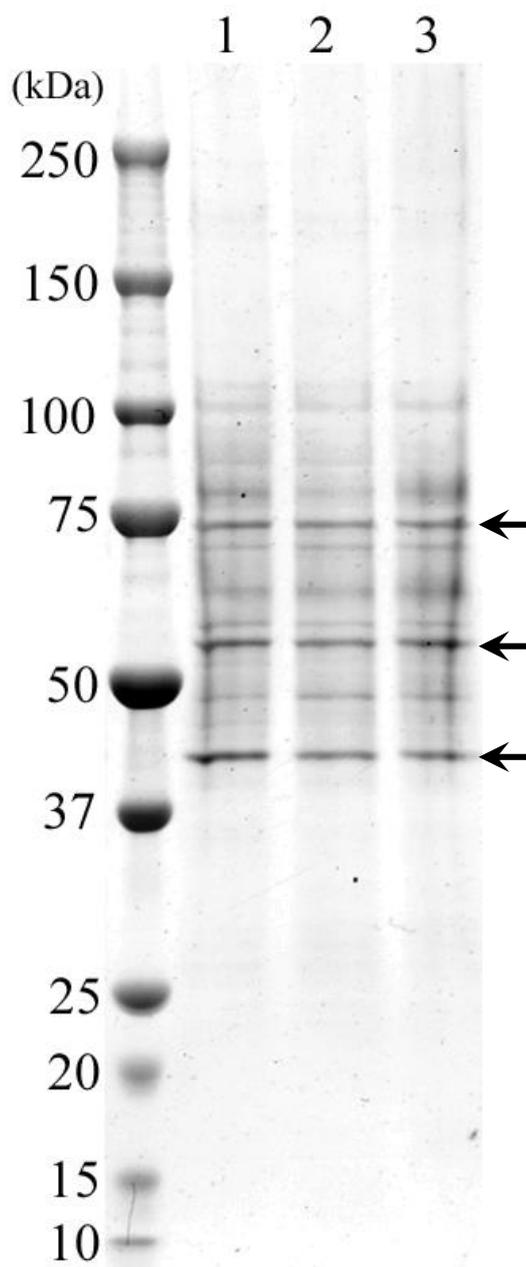


Fig. 5.2 WGA アフィニティカラム抽出物の 1 次元 SDS-PAGE の銀染色像
3 個体すべてにおいて 43kDa から 103kDa にかけてバンドが認められ、特に
43kDa、56kDa、75kDa に明瞭なバンド (矢印) が確認された。
1 : 24 ヶ月齢雄個体、2 : 16 ヶ月齢雄個体、3 : 10 ヶ月齢雄個体。

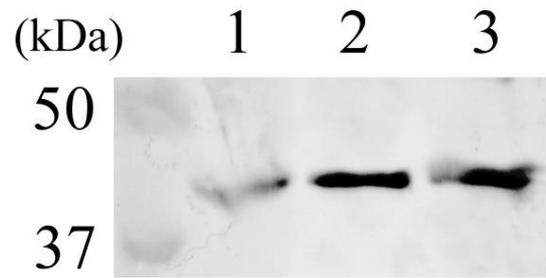


Fig. 5.3 β アクチンを用いたウェスタンプロットティング
43kDa の位置にバンドが確認される。

1 : 24 ヶ月齢雄個体、2 : 16 ヶ月齢雄個体、3 : 10 ヶ月齢雄個体。

第 6 章 総括

ジャンガリアンハムスターの胸腹部の皮膚には神経節細胞様 (Ganglion cell-like: GL) 細胞と命名された特異な細胞が存在する。それらは 1 ないし 2 個の類円形の核と、好塩基性、泡沫状の細胞質を有し、神経節細胞に類似する。GL 細胞は特に雄で多く確認され、性成熟に伴い増殖し、その分布域を拡大する。免疫組織化学的に GL 細胞の核は androgen receptor (AR) に、細胞質は vimentin に陽性を示し、間質の線維は collagen type 1 および type 3 に陽性を示す。GL 細胞は AR を発現し、雄に多く認められること、増殖巣に種々の程度に膠原線維を伴うことなどから、アンドロジェン依存性の性質を有し、膠原線維の産生能をもつと推察される。しかしながら、GL 細胞の詳細な性質や機能は未だ不明のままである。

本研究では GL 細胞が AR に陽性を示すことに注目し、この細胞のアンドロジェンに対する反応性の検索を行った。また、レクチンを用いた新規のマーカー検索とその認識糖鎖による被修飾タンパク質の解析を試みた。

1. 性腺切除によるジャンガリアンハムスター (*Phodopus sungorus*) の皮膚 GL 細胞のアンドロジェン依存性の生物学的挙動 (第 2 章)

GL 細胞がアンドロジェン依存性の生物学的挙動を示すかどうかを検索するため、性腺摘出による GL 細胞の変化を組織学的に評価した。雌雄の動物を 4 週齢時に性腺を摘出し、18 週時に胸腹部の皮膚を採材し、組織学的検索を行った。組織学的検索は性腺摘出動物と無処置動物の GL 細胞の出現グレードとその分布、増殖活性を組織学的に評価し、比較した。去勢雄は無処置雄に比較して、グレードや増殖活性は低く、分布も狭かった。これらの 3 つのパラメータに関

しては卵巣摘出雌と無処置雌間および無処置雄と無処置雌間においても同様の傾向が認められた。

これらの結果はジャンガリアンハムスターの GL 細胞がその分布や増殖活性において性差を有することを示しており、その発達にはアンドロジェンが関与している可能性が示唆される。

2. 性腺切除したジャンガリアンハムスターの皮膚 GL 細胞のテストステロン長期刺激による形態学的変化 (第 3 章)

アンドロジェンの GL 細胞に及ぼす影響を形態学的に検索するため、前章と同様に性腺摘出した雌雄ジャンガリアンハムスターに短期 (12 週) 間あるいは長期 (24 週) 間にわたり低用量 (5mg/kg) および高用量 (20mg/kg) のプロピオン酸テストステロン (TP) を毎週 1 回皮下投与した。短期および長期のいずれの雌雄においても、TP 投与群では用量依存性に GL 細胞の出現率や増殖率の増加がみられた。また、TP 長期投与群は雌雄ともに、それぞれの短期投与群に比較し、高用量群では顕著な差は認められなかったが、低用量群では長期投与の方が短期投与よりも増殖巣の厚みを増し、高い増殖率を示す傾向が認められた。

前章と同様に性腺摘出により皮膚 GL 細胞の発達抑制がみられたが、テストステロン投与により用量依存性に増殖がみられた。これは GL 細胞がテストステロンのようなアンドロジェンに対し高い感受性を有しており、その増殖に大きな影響を与えていることが示された。

3. ジャンガリアンハムスターの皮膚 GL 細胞におけるレクチン結合性 (第 4 章)

ジャンガリアンハムスターの GL 細胞において AR および vimentin 以外の新規のマーカーを見出すためにジャンガリアンハムスターの皮膚においてレクチン

組織化学的検索を行った。用いたレクチン: ConA、DBA、PNA、RCA₁₂₀、SBA、UEA-1、WGA およびサクシニル WGA (sWGA) のうち、WGA および sWGA が GL 細胞に特異的に反応した。

このことから、GL 細胞内のある種のタンパク質において *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) あるいはシアル酸による糖鎖修飾が行われていることが示された。また、両レクチンは GL 細胞のマーカーとなり得ると考えられる。

4. ジャンガリアンハムスターの皮膚 GL 細胞における WGA レクチン結合タンパク質の同定 (第 5 章)

前章においてジャンガリアンハムスターの皮膚組織において、GL 細胞の細胞質に WGA レクチンが特異的に反応したことから、WGA レクチン認識糖鎖で修飾されるタンパク質が GL 細胞の機能に関連するものと考えた。そこで腹部皮膚組織から WGA レクチンのアフィニティカラムを用いてタンパク質の精製を行い、糖鎖被修飾タンパク質の解析を試みた。泳動で得られた複数のバンドに対し、MALDI-TOF MS 解析およびウェスタンブロッティング法を行ったところ、 β -actin と糖鎖の転移酵素である MGAT2 の存在が示唆された。

近年 β -actin については細胞骨格として形状の維持に関わる機能以外にも転写調節に関連するシグナル伝達分子のような機能が示されている。GL 細胞における β -actin の糖鎖修飾の意義は現時点で不明確であるが、この特異な糖鎖修飾が GL 細胞の機能に関わっている可能性が考えられる。

以上より、ジャンガリアンハムスターの GL 細胞はアンドロジェン依存性に発達することが明らかとなった。さらに GL 細胞の細胞質においては MGAT2 による GlcNAc の糖鎖修飾あるいはシアル酸の糖鎖修飾が行われており、その被修飾

タンパク質には β -actin が含まれていることが示された。WGA レクチンとの特異的反応性は、今後、GL 細胞の新しいマーカーとして利用でき、この細胞の機能解明の手がかりとなるかもしれない。この細胞はフェロモン様物質を産生している可能性も考えられたが、解明には至らなかった。

謝辞

本研究に際し懇切丁寧な御指導を賜りました、指導教官である日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室教授・高橋公正先生に心より感謝致します。研究のみならず広く病理学の道を御教示頂きましたことは今後の糧となるものであります。また、本研究のみならず、様々な面で御指導を賜りました同講師・道下正貴先生に御礼申し上げます。

5章に関し、分子生物学的な知識、技術を御教授頂きました日本獣医生命科学大学生体分子化学研究室教授・田崎弘之先生、同准教授・片山欣哉先生ならびに同助教・佐藤稲子先生に深く感謝致します。また、貴重な抗体を分与していただきました日本獣医生命科学大学獣医保健看護基礎部門講師・落合和彦先生ならびに日本獣医生命科学大学獣医外科学研究室内の箱崎貴治さんに深く御礼申し上げます。

加えて、分子生物学的な技術の習得に協力頂いた、日本獣医生命科学大学生体分子化学研究室内の野澤聡司さんならびに関根舞さん、本研究に際し動物の管理など様々な協力を頂いた日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室の安井潤紀さん、岸本拓也さん、高木毬子さん、原田賢吾さん、香取優希さん、宮澤有果さん、作図に関してイラスト作製を引き受けて頂いた佐野絢子さんに感謝致します。

最後に、長く自身の思う道を進む事について、辛抱強くそして温かく見守り、支援して下さった両親に深く感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

参考文献

- Aub JC, Tieslau C, Lankester A.: Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1963;50:613-619.
- Baba Y, Takahashi K, Nakamura S.: Androgen-dependent atypical fibromas spontaneously arising in the skin of Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Comp Med*. 2003;53(5):527-531.
- Bui HN, Struys EA, Martens F, de Ronde W, Thienpont LM, Kenemans P, Verhoeven MO, Jakobs C, Dijstelbloem HM, Blankenstein MA.: Serum testosterone levels measured by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry in postmenopausal women versus those in women who underwent bilateral oophorectomy. *Ann Clin Biochem*. 2010;47:248-252.
- Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM.: β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell*. 2011;22(21):4047-4058.
- Cooper JE, Knowler C, Pearson AJ.: Tumours in Russian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet Rec*. 1991;6;128(14):335-336.
- Clark AS, Barber DM.: Anabolic-androgenic steroids and aggression in castrated male rats. *Physiol Behav*. 1994;56(5):1107-1113.
- Dan X, Liu W, Ng TB.: Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. *Med Res Rev*. 2015;20. doi: 10.1002/med.21363.
- de-Freitas-Junior JC, Morgado-Díaz JA.: The role of N-glycans in colorectal cancer

progression: Potential biomarkers and therapeutic applications. *Oncotarget*. 2015; doi: 10.18632/oncotarget.6283.

Deutschland M, Denk D, Skerritt G, Hetzel U.: Surgical excision and morphological evaluation of altered abdominal scent glands in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet Rec*. 2011;169(24):636-641.

Durning SP, Flanagan-Steet H, Prasad N, Wells L.: O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) acts as a glucose sensor to epigenetically regulate the insulin gene in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 2015;Nov 23. In press. pii: jbc.M115.693580.

Emde B, Heinen A, Gödecke A, Bottermann K.: Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. *Eur J Histochem*. 2014;58(4):2448.

Endo Y, Sato T, Shirai W, Matsuo K.: Malignant fibrous histiocytoma in a Djungarian hamster. *J Vet Med Sci*. 2000;62(5):539-541.

Fukuda S, Iida H.: Effects of orchidectomy on bone metabolism in beagle 212 dogs. *J Vet Med Sci*. 2000;62:69-73.

藤原公策: 伴侶動物の臨床病理組織学アトラス II(ハムスター・兎類・小鳥類など). 1998;44-45

Garay JP, Karakas B, Abukhdeir AM, Cosgrove DP, Gustin JP, Higgins MJ, Konishi H, Konishi Y, Lauring J, Mohseni M, Wang GM, Jelovac D, Weeraratna A, Sherman Baust CA, Morin PJ, Toubaji A, Meeker A, De Marzo AM, Lewis G, Subhawong A, Argani P, Park BH.: The growth response to androgen receptor signaling in ER α -negative human breast cells is dependent on p21 and mediated by MAPK activation. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R27.

- García-Macia M, Rubio-Gonzalez A, de Luxán-221 Delgado B, Potes Y, Rodríguez-González S, de Gonzalo-Calvo D, Boga JA, Coto-Montes A.: Autophagic and proteolytic processes in the Harderian gland are modulated during the estrous cycle. *Histochem Cell Biol.* 2014;141(5):519-529.
- Goldman N, Gleib DA.: Sex differences in the relationship between DHEAS and health. *Exp Gerontol.* 2007;42(10):979-987. Epub 2007 May 24.
- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N.: What should be called a lectin? *Nature.* 1980;285:66.
- Guo QL, Ding QL, Wu ZQ.: Effect of baicalein on experimental prostatic hyperplasia in rats and mice. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(3):333-337.
- Hira Y, Sakai Y, Matsushima S.: Effects of photoperiod and melatonin on the development of growth hormone cells and the pituitary-adrenal axis in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus.* *Arch. Histol. Cytol.* 2001;64:211-222.
- Huang X, Pan Q, Sun D, Chen W, Shen A, Huang M, Ding J, Geng M.: O-GlcNAcylation of cofilin promotes breast cancer cell invasion. *J Biol Chem.* 2013;288(51):36418-36425.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O.: Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:825-858.
- Ibrahim D, Nakamuta N, Taniguchi K, Yamamoto Y, Taniguchi K.: Histological and lectin histochemical studies on the olfactory and respiratory mucosae of the sheep. *J Vet Med Sci.* 2014;76(3):339-346.

Johnson JG 3rd, Blair R, Brandão J, Tully TN Jr, Gaunt SD.: Atypical fibrosarcoma in the skin of a Roborovski hamster (*Phodopus roborovskii*). *Vet Clin Pathol*. 2014;43(2):281-284.

Kashida Y, Ishikawa K, Arai K, Mitsumori K.: Morphological characterization of skin ganglion-like cells in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet Pathol*. 2003;40(5):548-555.

笠井憲雪, 吉川泰弘, 安居院高司編: 現代実験動物学, 朝倉書店, 2009;101-156

Kitada M, Kuroda Y, Dezawa M.: Lectins as a tool for detecting neural stem/progenitor cells in the adult mouse brain. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011;294(2):305-321.

Kondo H, Onuma M, Ito H, Shibuya H, Sato T.: Spontaneous fibrosarcoma in a Djungarian hamster (*phodopus sungorus*). *Comp Med*. 2008;58(3):294-296.

Kondo H, Onuma M, Shibuya H, Sato T.: Morphological and immunohistochemical studies of spontaneous mammary tumours in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Comp Pathol*. 2009;140(2-3):127-131.

Kostrominova TY.: Application of WGA lectin staining for visualization of the connective tissue in skeletal muscle, bone, and ligament/tendon studies. *Microsc Res Tech*. 2011;74(1):18-22.

Kulak J Jr, Urbanetz AA, Kulak CA, Borba VZ, Boguszewski CL.: Serum androgen concentrations and bone mineral density in postmenopausal ovariectomized and non-ovariectomized women. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53:1033-1039.

Li X, Wardrip C, Seps S, Padrid P.: Renal Cell Carcinoma in Two Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Contemp Top Lab Anim Sci*. 1998;37(1):70-73.

- Li Y, Izumi K, Miyamoto H.: The role of the androgen receptor in the development and progression of bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2012;42:569-577.
- Madarame H, Itoh A, Hirose M, Ogihara K.: Spontaneous extraskeletal osteosarcomas of the subcutis in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*): report of two cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2004;51(5):232-236.
- Martorell J, Fondevila D, Ramis A.: Spontaneous squamous cell carcinoma of the cheek pouch in two dwarf hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet Rec.* 2005;14;156(20):650-651.
- Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, Boren J, Stark R, Fazli L, Warren A, Scott H, Madhu B, Sharma N, Bon H, Zecchini V, Smith DM, Denicola GM, Mathews N, Osborne M, Hadfield J, Macarthur S, Adryan B, Lyons SK, Brindle KM, Griffiths J, Gleave ME, Rennie PS, Neal DE, Mills IG.: The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* 2011;30:2719-2733.
- Matsumoto T, Sakari M, Okada M, Yokoyama A, Takahashi S, Kouzmenko A, Kato S.: The androgen receptor in health and disease. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:201-224
- Michiel Sedelaar JP, Dalrymple SS, Isaacs JT.: Of mice and men-warning: intact versus castrated adult male mice as xenograft hosts are equivalent to hypogonadal versus abiraterone treated aging human males, respectively. *Prostate.* 2013;73:1316-1325.
- Nakao K, Sato T, Shirai W, Matsuo K.: Malignant basal cell tumor in a Djungarian hamster. *J Vet Med Sci.* 1999;61(2):191-193.
- Nishizumi K, Fujiwara K, Hasegawa A.: Cutaneous mastocytomas in Djungarian hamsters. *Exp Anim.* 2000;49(2):127-130.

- Petri I, Dumbell R, Scherbarth F, Steinlechner S, Barrett P.: Effect of exercise on photoperiod-regulated hypothalamic gene expression and peripheral hormones in the seasonal Dwarf Hamster *Phodopus sungorus*. *PLoS One*. 2014;6;9(3):e90253.
- Pogosianz HE.: Djungarian hamster-a suitable tool for cancer research and cytogenetic studies. *J Natl Cancer Inst*. 1975;54(3):659-664.
- Pohl S, Hoffmann A, Rüdiger A, Nimtz M, Jaeken J, Conradt HS.: Hypoglycosylation of a brain glycoprotein (beta-trace protein) in CDG syndromes due to phosphomannomutase deficiency and N-acetylglucosaminyl-transferase II deficiency. *Glycobiology*. 1997;7(8):1077-1084.
- Sakairi A, Tsukise A, Meyer W.: Glycoconjugate histochemistry of the secretory epithelium lining the seminal vesicles of the miniature pig. *Arch Histol Cytol*. 2005;68(3):193-204.
- Sato T, Takada M, Shibuya H, Shirai W, Matsuo K.: A malar granular cell tumor in a djungarian hamster. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2004;51(1):23-26.
- Schachter H.: Complex N-glycans: the story of the "yellow brick road". *Glycoconj J*. 2014;31(1):1-5.
- Serra C, Sandor NL, Jang H, Lee D, Toraldo G, Guarneri T, Wong S, Zhang A, Guo W, Jasuja R, Bhasin S.: The effects of testosterone deprivation and supplementation on proteasomal and autophagy activity in the skeletal muscle of the male mouse: differential effects on high-androgen responder and low-androgen responder muscle groups. *Endocrinology*. 2013;154(12):4594-4606.
- Sharon N, Lis H.: History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004;14(11):53R-62R.

- Söderström KO.: Lectin binding to collagen strands in histologic tissue sections. *Histochemistry*. 1987;87(6):557-560.
- Sonka J, Fassati M, Fassati P, Gregorová I, Pícek K.: Serum lipids and dehydroepiandrosterone excretion in normal subjects. *J Lipid Res*. 1968;9(6):769-772.
- Su Y, Kondrikov D, Block ER.: Beta-actin: a regulator of NOS-3. *Sci STKE*. 2007;18;2007(404):pe52.
- Tan J, Dunn J, Jaeken J, Schachter H.: Mutations in the MGAT2 gene controlling complex N-glycan synthesis cause carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II, an autosomal recessive disease with defective brain development. *Am J Hum Genet*. 1996;59(4):810-817.
- Thiessen DD, Friend HC, Lindzey G.: Androgen control of territorial marking in the Mongolian gerbil. *Science*. 1968;160(3826):432-434
- Tondeleir D, Lambrechts A, Müller M, Jonckheere V, Doll T, Vandamme D, Bakkali K, Waterschoot D, Lemaistre M, Debeir O, Decaestecker C, Hinz B, Staes A, Timmerman E, Colaert N, Gevaert K, Vandekerckhove J, Ampe C.: Cells lacking β -actin are genetically reprogrammed and maintain conditional migratory capacity. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(8):255-271.
- von Praun C, Burkert M, Gessner M, Klingenspor M.: Tissue-specific expression and cold-induced mRNA levels of uncoupling proteins in the Djungarian hamster.

Physiol Biochem Zool. 2001;74(2):203-211.

Wang Y, Tan J, Sutton-Smith M, Ditto D, Panico M, Campbell RM, Varki NM, Long JM, Jaeken J, Levinson SR, Wynshaw-Boris A, Morris HR, Le D, Dell A, Schachter H, Marth JD.: Modeling human congenital disorder of glycosylation type IIa in the mouse: conservation of asparagine-linked glycan-dependent functions in mammalian physiology and insights into disease pathogenesis. *Glycobiology.* 2001;11(12):1051-1070.

Yoshimura H, Kimura N, Nakahira R, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Takahashi K.: Lipid-rich carcinoma in the mammary gland of a Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Vet Diagn Invest.* 2010;22(2):305-309.

Yoshimura H, Kimura-Tsukada N, Ono Y, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K, Matsuda Y, Ishiwata T, Takahashi K.: Characterization of Spontaneous Mammary Tumors in Domestic Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Vet Pathol.* 2015;52(6):1227-1234.

Zhao J, Patwa TH, Lubman DM, Simeone DM.: Protein biomarkers in cancer: natural glycoprotein microarray approaches. *Curr Opin Mol Ther.* 2008;10(6):602-610.