

両生類幼生の尾における甲状腺ホルモンによる筋細胞死の分子機構

中島圭介・矢尾板芳郎
広島大学

最初のスライド (1)、お願いします。私たちの研究は両生類幼生の尾の退縮の分子機構を明らかにすることであり、そのことを応用することにより高感度の甲状腺ホルモン検出系の開発に着手しております。次のスライド (2) お願いします。無尾両生類の変態において、四肢の発達や尾と鰓の退縮など、ほとんど総べての器官が変化します。アフリカツメガエルの変態の場合は st 61 から 1 週間以内に、特に st 63 前後に体長の 2 倍以上あった尾がほぼ消失します。次のスライド (3) お願いします。変態におけるこれらの変化は主に甲状腺ホルモンの血中濃度増加によりますが、退縮中の尾における甲状腺ホルモンによる細胞死の分子機構に関してはほとんど理解されておりました。甲状腺ホルモンが退縮中の尾における細胞死を引き起こす遺伝子の発現を調節しているのではないかと推測されてきました。幼生の尾の鰓や鰓の器官培養の際、甲状腺ホルモンによって collagenase 活性の上昇と器官の大きさの減少が観察されることから、甲状腺ホルモンによる collagenase 合成が collagen の再構成に関わっていると考えられてきました。次のスライド (4) お願いします。Don Brown 博士らにより退縮中の尾で甲状腺ホルモンによって発現が増減する多くの遺伝子が PCR を用いた subtractive hybridization により単離され、in situ hybridization により解析されました。stromelysin-3 や collagenase-3 などの細胞外基質を破壊する酵素は、筋組織をとりまく皮下線維芽細胞では高く発現していますが、尾の筋組織では発現しておりました。しかし、筋繊維が付着している筋腱結合部位ではよく発現していました。これらのことから、甲状腺ホルモンにより分泌性の matrix metalloproteinase が増加し、細胞外基質を分解することにより筋腱結合部位が破壊され、筋細胞が細胞外基質から離れ細胞死が起きると考えられており、これを murder model (他殺説) と呼びます。次のスライド (5) お願いします。この説では、甲状腺ホルモンが分泌性蛋白質、例えば細胞外基質を分解する matrix metalloproteinase などを産生、分泌し、それが自分の回りの細胞や、自分自身を殺すというものです。

次のスライド (6) お願いします。一方、私たちは、幼生の尾由来の筋芽細胞株 XLT-15 を樹立し、それが甲状腺ホルモンによりアポトーシスを起こすことを報告しております。この細胞を上段は control で、下段はこの細胞を 10nM の活性型甲状腺ホルモン T3 で 3 日間処理したものです。下段ではヘキストで強く光る凝縮した核が観察され、それは TUNEL で陽性で、apoptosis で細胞死を起こした事がわかります。このことは尾の筋細胞が自律的に死ぬことを示唆しているために suicide model (自殺説) を支持しております。次のスライド (7) お願いします。これは単純で甲状腺ホルモンに反応した細胞だけが直接、死ぬモデルです。murder model では甲状腺ホルモンが分泌蛋白を介して細胞を殺します。しかし、この実験結果は培養系の実験によるものであり、細胞外基質と結合している生体内細胞の生理的死を反映していない可能性があります。更に、甲状腺ホルモン処理された筋芽細胞が分泌した可溶性の因子により、相互に殺している可能性も否定できません。

次のスライド (8) お願いします。ドミナントネガティブ甲状腺ホルモン受容体 (DNTR) は甲状腺ホルモン反応性塩基配列には結合するが甲状腺ホルモンには付かないので、正常甲状腺ホルモン受容体による甲状腺ホルモン反応性遺伝子の転写を抑制します。つまり、甲状腺ホルモンのシグナル伝達を阻害します。以後、DNTR と呼びます。suicide model と murder model を区別するために、次のような DNTR を用いた実験を考えました。全体の一部の細胞に DNTR と reporter gene を発現させて甲状腺ホルモンで処理します。murder model では DNTR を発現していない細胞から細胞死誘導因子が分泌されますから、DNTR の発現している細胞も、していない細胞も全て死ぬ事になります。しかし、suicide model では DNTR の発現していない細胞は死にますが、DNTR の発現している細胞は生き残ることになり、区別がつくことになります。この実験を培養細胞の系と生きているオタマジャクシの系で行いました。

次のスライド (9) お願いします。第一に尾由来の筋芽細胞株 XLT-15 に transfection により DNTR 遺伝子と reporter gene を導入して、甲状腺ホルモン処理を 3 日間しました。C は未処理で、T3 は処理したもので、左側は DNTR 遺伝子を、右側はその代わりに vector を入れたものです。縦軸は reporter gene を発現し

ている細胞のうちで apoptosis で死んだ細胞の割合を示しております。明らかに DNTR により細胞死が抑制されております。つまり、suicide model を強く支持しております。

次のスライド (10) お願いします。この細胞は甲状腺ホルモン処理により 92kDa の gelatinase を分泌することが知られています。先程の培養上清を zymography で gelatinase 活性を調べてみますと、vector、DNTR のどちらかの transfection でも甲状腺ホルモン処理で同様の活性が検出されました。このことは murder model が正しければ、分泌性の細胞死誘導因子が DNTR の transfection に関わらず、同じ濃度存在することになり、DNTR の transfection により細胞死は抑制されないことになり、実験結果と矛盾し、否定されます。

次のスライド (11) お願いします。生きているオタマジャクシの尾の筋細胞の甲状腺ホルモンによる細胞死が自殺か他殺かを確かめるための実験を行いました。今日、いらっしゃっているドゥミニ・博士が開発された筋組織への DNA 注入法を用いました。基本的なやり方は若い stage の尾に DNTR と reporter gene を注入し、尾が消失しかけた stage64 に reporter gene を発現している筋細胞を定量することです。

次のスライド (12) お願いします。この実験を行う前にいくつかの予備実験を行いました。reporter gene として beta-galactosidase の遺伝子を注入すると、このように筋節内に筋細胞の走行に従って beta-galactosidase の活性が観察されます。横断切片にし、筋特異的蛋白質 tropomyosin の抗体で染色しますと、beta-galactosidase の活性を持つ細胞は全て筋細胞であることが理解されます。

次のスライド (13) お願いします。また、遺伝子導入した尾が退縮している時に筋細胞を見てみると、beta-galactosidase の活性を持つ細胞も持たない細胞と同様に断片化して細胞死を起こしています。このことから reporter gene の過剰発現は細胞死に影響を与えないと解釈されます。

次のスライド (14) お願いします。また、細胞死の抑制された筋細胞が退縮中の尾でどのような形態を示すのかを調べるために細胞死抑制遺伝子 bcl-XL と beta-galactosidase の遺伝子を注入しました。stage 59 ではこのぐらい大きな尾が stage 64 ではここまで縮小します。これが脊髄で、これが脊索で、こちらでは消失しています。これらの筋細胞はこちらでは beta-galactosidase 活性を持つ細胞だけが生存しているだけで、ほとんど無細胞構造になっています。それが何であるかをみるために、各 stage の尾を type IV collagen に対する抗体で染めてみました。次のスライド (15) お願いします。collagen は脊髄の回りに分布しているものは stage 64 まで変化していませんが、脊索の回りには尾が急速に退縮する時に変性、消失しています。筋細胞の境界にある collagen は筋細胞死につれて集まってきているように見えます。stage 64 には脊髄以外の空間を占めているように思えます。つまり、bcl-XL を過剰発現している細胞だけが stage 64 には細胞外基質の中に浮いているものと考えられます。

次のスライド (16) お願いします。今度は DNTR と beta-galactosidase 遺伝子を注入した尾を stage 64 で解析しました。bcl-XL 遺伝子を注入した時と同じ結果が得られました。青く染まったものを拡大しますと、このように筋組織特有の縞模様が観察されます。次のスライド (17) お願いします。この実験を数多くの尾で行った結果が次の様です。surviving とは前のスライドのように beta-galactosidase 活性陽性の筋細胞が stage 64 で生存していた場合の尾の数で、Dead は存在していなかった尾の数を示します。Negative control の vector, luciferase では青い細胞は生き残っていませんでしたが、bcl-XL、特に DNTR を注入した細胞では beta-galactosidase 活性陽性の筋細胞がよく生存している事が示されています。このデータは suicide model を支持します。次のスライド (18) お願いします。DNTR と reporter gene が注入された筋細胞は生き残りますが、甲状腺ホルモン受容体遺伝子も一緒に注入された筋細胞は生存しなくなります。この結果は beta-galactosidase 活性陽性の筋細胞の生き残りが DNTR による甲状腺ホルモンシグナルの阻害の結果であることを示しています。

次のスライド (19) お願いします。今度は reporter gene として GFP 遺伝子を注入して、生きているオタマジャクシの尾での発生過程での変化を観察してみました。GFP と vector 50ng、DNTR 50ng、300ng と注入して GFP による蛍光を追ってみました。パネルの間の数字は発生にかかった日数、白線は fin 以外の尾の輪郭を示しています。vector では尾が急速に退縮する stage 63 で蛍光が急激に減少すると共に筋細胞の形が丸くなっています。stage 64 にはほとんど消失していました。DNTR を打った尾では同じく、stage 63 で筋細胞は丸くなりますが、stage 64、65 に蛍光が減少していました。この減少は DNTR を 50ng 打とうが、300ng 打とうがおなじだったので DNTR の発現量の問題では無いと考えられます。従って、DNTR による

蛍光減少の遅れや、尾が完全に消失した stage 66 でも GFP 陽性細胞が生存していることは suicide model を支持し、stage 64-65 での蛍光の減少は murder model の正当性を示しています。次のスライド (20) お願いします。これは蛍光を定量化したもので、横軸は stage 61 からの日数を示しています。DNTR による蛍光の減少の遅れと stage 66 での GFP 陽性細胞の生存は suicide model を、stage 64-65 での蛍光の減少は murder model を支持しています。次のスライド (21) お願いします。DNTR を注入した尾では変態後 3 週間でも全ての尾に GFP 陽性細胞が生存しています。次のスライド (22) お願いします。GFP と DNTR を 1 つおきに筋節に注入しますと、最初はこのように見えますが、発生が進みますと、stage 63 には GFP 陰性の筋節が消失し GFP 陽性の筋節が残り、場所に関わらず同時に丸くなり、その後、残った細胞も減少していきます。つまり、stage 62 以降の筋細胞死では suicide model と murder model の両方が正しく、筋細胞は尾の退縮による張力の低下により丸くなると考えられます。

次のスライド (23) お願いします。DNTR を注入した尾では尾が消失した stage 66 でも GFP 陽性細胞が観察されますが、これが、Brown 博士の提唱している甲状腺ホルモン抵抗性の筋組織、cord である可能性があります。cord は TM228, TM311 陽性ですが、尾の筋細胞は TM311 陽性、TM228 陰性です。御覧のとおり、この GFP 陽性細胞は cord ではなく、普通の筋細胞です。これらは足や直腸の周りの成体型筋細胞です。

次のスライド (24) お願いします。GFP と vector を注入した筋細胞は stage 62 に、DNTR を注入した筋細胞は stage 63 に急激に死に始めますが、これらの細胞が anti-active caspase-3 抗体で認識されることから、どちらも apoptosis で死んでいく事が理解されます。

次のスライド (25) お願いします。次に実際、尾の筋細胞がいつから死んでいくかを調べるために、非常に若いオタマジャクシの尾に GFP と vector を注入して経過観察を行いました。その結果、stage 57 から、つまり変態の climax の前から死に始める事が明らかになりました。この stage 57-62 の細胞死は DNTR も注入することにより完全に抑制できました。次のスライド (26) お願いします。前の実験を定量化したグラフで明確なように蛍光の減少は DNTR で抑制されて、stage 57-62 の細胞死は suicide model に従う事が明らかであり、筋細胞自体は甲状腺ホルモンへの感受性が高いことが理解されます。

次のスライド (27) お願いします。幼生では stage 57 で筋細胞死が始り、甲状腺ホルモンは stage 57-62 の間では尾の筋細胞の自殺（細胞自律的な死）を誘導し、stage 62-64 では筋肉を急速に完全に取り除くために他殺と自殺の機序を介して筋細胞死を執行するという仮説を提唱します。

次のスライド (28) お願いします。この分子機序を利用して、高感度の甲状腺ホルモンの生物活性検出法を開発中です。つまり、1 つの筋節に GFP と甲状腺ホルモン受容体遺伝子、internal control として、もう 1 つの筋節に GFP と DNTR を注入して甲状腺ホルモン処理を行って GFP の蛍光を観察しますと、このように 0.3nM の T3 でも楽に検出できます。私たちの研究が内分泌攪乱物質の検出に貢献できることを祈って、私の話しを終わりにします。

質疑応答

吉里：それでは、質問かコメントをどうぞ。

質問：たいへんクリアなデータでした。データを見せていただきありがとうございました。ステージ 57 からステージ 62 までは、自殺モデルが適用できるが、ステージ 62 以降は、他殺モデル因子が働く。その他のマーカーである 92 kDa のゼラチナーゼ活性はステージ 62 までは低いままだが、ステ

ージ 62 を過ぎると高くなるということでしょうか。

矢尾板：そうですね。ステージ 62 以降、非常に高値になります。少なくともメッセージャーRNA は。

質問：もう 1 つ質問がありますが、時間がないようですので、あとで議論できればと思います。ありがとうございました。