

## 総説 (教授就任記念講演)

### 形態学的観点から見た生体調節物質の働き

鶴尾吉宏

徳島大学大学院医歯薬学研究部顕微解剖学分野

(平成29年3月27日受付) (平成29年3月30日受理)

#### はじめに

私は、齧歯類などの実験動物を用いて神経系、内分泌腺などを含む器官における情報伝達による神経内分泌学的な生体調節の仕組みについて、形態学的手法を主として用いた組織化学的解析による研究を中心に行ってきた。

分野が解剖学ということもあり、常に、どのような形をしているのかという、形態学的側面から発想しているが、既成概念に固執せずに、自由な発想で結果を捉えることが大切と考えている。私の研究のいくつかは、このような考え方から得られた。

まず始めに、視床下部を含む中枢神経系ならびに内分泌腺などの組織における各種のペプチド性神経伝達物質について、脳内での局在、発生、神経性制御機構、ならびに下垂体に対する液性調節機構に関して免疫組織化学的手法を用いて光学ならびに電子顕微鏡的な解析から研究を進め、視床下部における複数の神経伝達物質含有ニューロンの性機能との関連性や正中隆起における下垂体の神経内分泌学的調節機構、電顕的二重免疫染色法を用いたペプチド性の情報伝達物質を含有するニューロン間でのシナプス性情報伝達機構、同一細胞内および同一分泌顆粒内での複数の情報伝達物質の共存などを明らかにした。

次に、ステロイドホルモンによる液性の生体調節機構について形態学的解析を進め、ステロイド代謝酵素のうちで脳の性分化に必須の酵素であるアロマトラーゼについて、この酵素を含有するニューロンの脳内での分布と発生、エストロゲン受容体との関係などを明らかにした。アロマトラーゼについては、胃酸を分泌する胃の壁細胞にアロマトラーゼが発現し、胃で産生されるエストロゲンが門脈に内分泌されて肝細胞のエストロゲン受容体に作用することを初めて報告し、gastro-hepatic axis という新

概念を提唱した。また、テストステロンをより強力なアンドロゲンに変換する5 $\alpha$ -リダクターゼについて、この酵素の脳ならびに内分泌腺での局在、機能との関連性なども明らかにした。

さらに、ストレスによる心臓や神経系等への影響を解析し、動物モデルを用いて、たこつぼ心筋症におけるエストロゲンの関与、ならびにヘムオキシゲナーゼ-1の誘導や、このストレス反応に中枢神経系内で関与する部位などを明らかにした。また、胃および肝臓において、酸化ストレスに反応する転写因子 Nrf2 の細胞内での調節経路も明らかにした。

また、中枢神経系で髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの細胞系譜を認識するモノクローナル抗体 (4F2) を作製し、オリゴデンドロサイトの分化に Ddx54 がミエリン塩基性タンパク質 (MBP) と関連して働くことを明らかにし、ラットの胃切除モデルを用いて、胃切除後の骨障害が従来考えられていたような骨軟化症ではないことも初めて明らかにした。

そして、人体系統解剖実習において見出された人体解剖の破格例については、所見を詳細に記録して欧文ならびに邦文の報告を行った。

以上のように、これまでに行った研究は6つの内容に分類される。

#### 1. ペプチド性の情報伝達物質に関する研究

ペプチド性神経伝達物質を含有するニューロンの分布、性差、神経投射、シナプスによる神経性制御について光顕ならびに電顕的に免疫組織化学的に解析した<sup>1-44)</sup>。

ラット視床下部弓状核のサブスタンス P (P 物質) ニューロンの発現に性差があり、メスで生殖機能の変化に伴い形態と超微細構造が変動し<sup>21,31,32,36)</sup>、視索前野の

性腺刺激ホルモン放出ホルモン (LHRH) 細胞に線維投射してシナプスし、P 物質が中枢で性機能制御に関与すること<sup>1)</sup>を初めて明らかにした。弓状核に存在する P 物質含有ニューロンは、正中隆起に神経線維を投射し、下垂体門脈系に P 物質をホルモンとして分泌する。また、P 物質含有ニューロンによるシナプス制御なども電顕的に解析した。つぎに、ラット視床下部弓状核の P 物質含有ニューロンの発現には性差があり、メスでは性周期に伴って細胞の形態、数、微細構造が変化することを見出した。メスでは、発情前期から発情期に P 物質含有ニューロンの染色性と数が増加する。特に弓状核の後部において、その変化は顕著である。ラット視床下部弓状核の P 物質含有ニューロンの細胞内微細構造も、性周期に伴って変化する。発情間期では、細胞内小器官は発達していないが、発情前期になると、発達したゴルジ装置や層状配列した粗面小胞体が見られ細胞内小器官が発達する。

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) 含有ニューロンが視床下部から正中隆起への投射を含む中枢神経系に広く分布し<sup>14, 15, 29)</sup>、消化管の筋間神経叢にも TRH 線維が終末することを示した<sup>13)</sup>。

さらに、複数の伝達物質が同一の神経細胞内ならびに顆粒内に共存すること<sup>4, 15, 26, 40)</sup>を光顕および電顕的に明

らかにした。

同一細胞内に、複数の神経伝達物質やホルモンが共存することについては、視床下部視索上核のオキシトシン含有大型神経細胞に、TRH やコレシストキニンが共存すること<sup>15)</sup>、ならびに膵臓のランゲルハンス島の  $\beta$  細胞に TRH がインスリンと共存することなどを明らかにした<sup>13)</sup>。

細胞内の同一分泌顆粒内においても、複数の神経伝達物質が共存することを、大きさの異なる金粒子で標識した抗体を用いて電顕的に明らかにした。例えば、視床下部正中隆起外層の神経終末において、エンケファリンと副腎皮質刺激ホルモン放出因子とバソプレッシンが、同一の分泌顆粒内に含有される<sup>26)</sup>。

銀増強法を用いた電顕的二重免疫染色法も開発し<sup>22)</sup>、銀粒子で標識された LHRH 含有ニューロンに P 物質含有神経終末がシナプスすることなどを明らかにした<sup>1)</sup>。

## 2. ステロイド代謝酵素の発現に関する研究

ステロイド代謝の形態学的な解析には、ステロイドホルモンそのものを形態学的に調べることは難しいことから、ステロイド代謝酵素の発現を中心として解析した。

ステロイドホルモンの合成代謝経路において (図 1)、

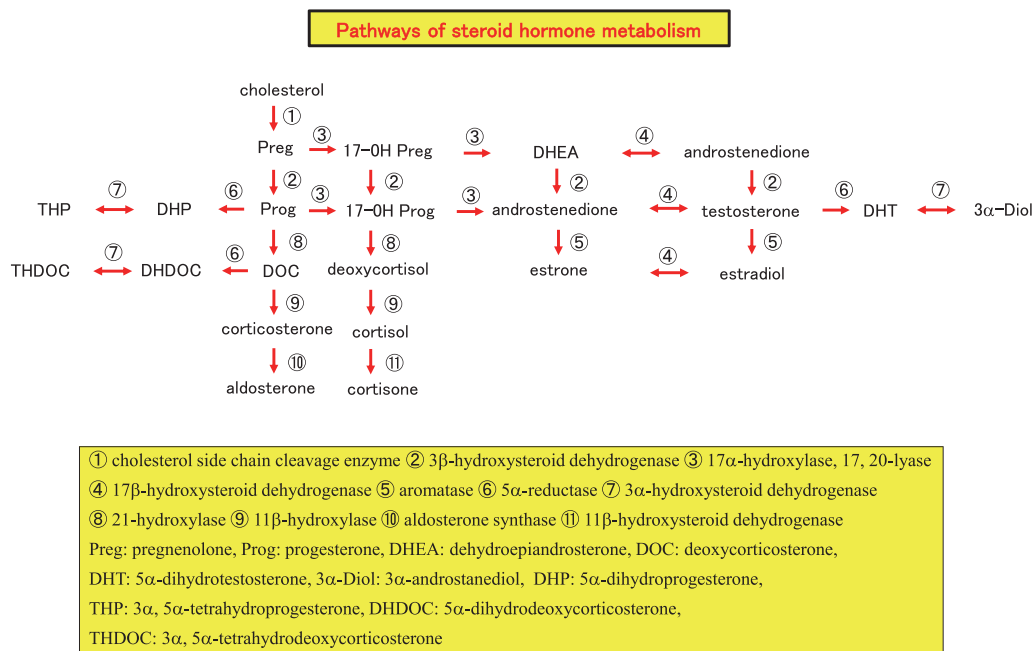


図 1 ステロイドホルモンの代謝経路  
ステロイド代謝酵素の作用部位を矢印で示す。ステロイド代謝酵素は各々の番号の部位で作用する。一方向の矢印は一方方向性のみ代謝し、両方向の矢印は両方向性に代謝できることを示す。

男性ホルモンを女性ホルモンであるエストロゲンに変換する酵素であるアロマターゼ (図1, 2), および男性ホルモンの活性化と不活化に関与し GABA<sub>A</sub> 受容体に結合する GABA 作動性ステロイドの産生に協調して作用する酵素である5 $\alpha$ -リダクターゼと3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド・デハイドロゲナーゼについて (図1, 3) 研究を進めた。

脳の性分化に必須の酵素であるアロマターゼを含有するニューロンのラットおよびマウス脳内の発達過程における局在, エストロゲン受容体との共存を初めて明らかにした<sup>45-47)</sup>。

アロマターゼは脳の性分化に必須な酵素であり, 血行性に脳に運ばれたテストステロンを, 臨界期に脳内のニューロンに存在するアロマターゼがエストラジオールに変換することによって, 変換されたエストロゲンが, 元来メス型である脳をオス型に分化させる (図2)。脳の性分化に必須であるアロマターゼ含有ニューロンのラット脳内における発生については, 胎生13日から17日にかけて, アロマターゼ含有ニューロンが視索前野に多数出現する。胎生19日から生後7日になると, 視索前野から分界条床核にかけて多数のニューロンが認められ, また, 扁桃体内側核にも多数のアロマターゼ含有ニューロンが認められる。生後14日から成熟期に至る時期では, 扁桃体中心核や外側中隔核のようにアロマターゼ含有ニューロンが出現してくる部位もある。このように, 発現パターンによってアロマターゼ含有ニューロンの発現

部位は, 3つのグループ, つまり, 1. 脳の性分化に関係する時期に発現するグループ, 2. 成熟期まで発現するグループ, 3. 生後の時期にのみ認められるグループの3つに分類できる。

アロマターゼ含有細胞におけるエストロゲン受容体の共存を調べると, マウスおよびラットにおいて, 分界条床核, 扁桃体内側核, 視床下部腹内側核では共存率が高く, 一方, 内側視索前野では共存率が低い。共存率は, 高い部位では60%から80%あったが, 内側視索前野のように低い部位では, 約20%しかエストロゲン受容体を共存していなかった。このように, アロマターゼによって産生されるエストロゲンが作用する細胞は脳部位によって異なる。

男性ホルモンの活性化と不活化や, GABA 作動性ステロイドの産生に協調して作用する2つの酵素のうちの5 $\alpha$ -リダクターゼについて (図3), 副腎における発現を調べた。ラット副腎における5 $\alpha$ -リダクターゼの発現は, 皮質の束状帯と網状帯の腺細胞と髄質の支持細胞に認められた。ラット副腎における5 $\alpha$ -リダクターゼ免疫反応は, ステロイド環境によって変化し, 去勢で増強しテストステロン補充で減弱する。メスでのエストロゲン環境でも, 同様な結果が認められた<sup>48)</sup>。

教科書の記載では, ステロイド合成細胞の特徴として, 精巣の Leydig 細胞で見られるように, 細胞内に小管状のクリステをもつミトコンドリアと充満する管状の滑面小胞体の存在がある。胃の壁細胞でも, 多数のミトコンド

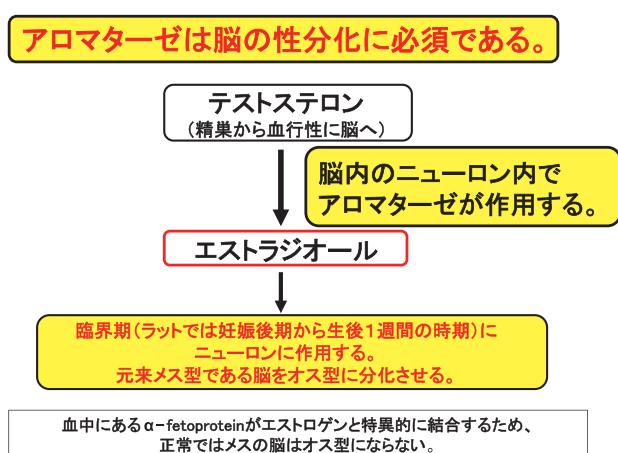


図2 アロマターゼが脳の性分化に関与する仕組み  
アロマターゼによって脳内でテストステロンから変換されるエストロゲンが臨界期に作用して元来メス型である脳をオス型に分化させる。

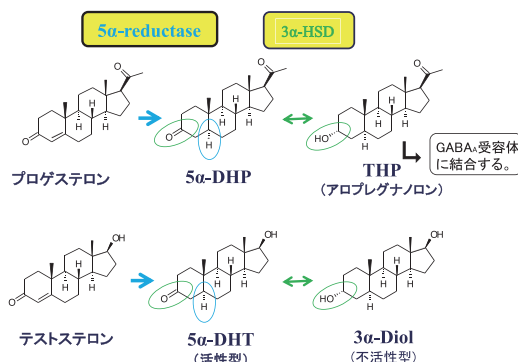


図3 5 $\alpha$ -リダクターゼと3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド・デハイドロゲナーゼが関与するステロイド代謝経路  
3 $\alpha$ -HSD: 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase; 5 $\alpha$ -DHP: 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone; THP: 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -trihydroprogesterone; 5 $\alpha$ -DHT: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone; 3 $\alpha$ -Diol: 3 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -diol

リアがみられ滑面小胞体様の小管小胞系が非常に発達しているが、胃の壁細胞でのステロイド合成は確認されていなかった。しかし、胃の壁細胞でエストロゲンが合成されていることを、ラットを用いて見出した<sup>49)</sup>。胃の壁細胞に、アロマターゼの mRNA およびタンパクの発現が認められ、胃粘膜でエストロゲンが合成され、消化管から肝臓に向かう門脈血中でエストロゲン濃度が増加する。胃を切除すると、門脈血中のエストロゲン濃度は減少し、また、肝臓のエストロゲン受容体量も減少する。逆に、門脈-循環血シャントを行うと、循環血中のエストロゲン濃度は増加することから、胃から分泌されたエストロゲンは、門脈を経由し肝臓に運ばれ、肝臓のエストロゲン受容体に結合してトラップされて、循環血中には出ていかないことが分かった。模式図で示すと、胃の壁細胞で合成されたエストロゲンは、正常では、門脈を経由し肝臓のエストロゲン受容体に結合してトラップされる。胃を切除しても、動脈血中の濃度は変化しないが、門脈-循環血シャントを行うと、胃から分泌されるエストロゲンによって、循環血中のエストロゲン濃度は増加する。このことから、形態と機能の類似性に基づいて、神経内分泌系でみられる Hypothalamo-Pituitary-X axis と同じように、消化器系においても同様な Gastro-Hepatic-X axis の存在(図4)を提唱した<sup>49,50)</sup>。胃の壁細胞からエストロゲンが合成・分泌されることから新たに解明された機能として、肝硬変の症状としての高エストロゲン血症の症状は、門脈-下大静脈のシャントによるものと考えることができ、肝細胞に対する調節因子として胃から分泌されたエストロゲンが機能することも考えられる。

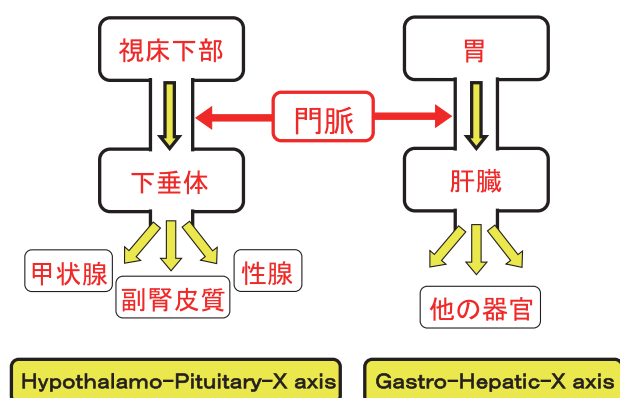


図4 Hypothalamo-Pituitary-X axis と Gastro-Hepatic-X axis との類似性  
視床下部-下垂体-内分泌腺の関係と胃-肝臓-他の器官との関係を対比して示す。

### 3. ストレスに関連する研究

不動化ストレスを加えることによって、左心室の心尖部に一過性の収縮低下を起こし、たこつぼ型の収縮像を示すことから、この動物モデルがたこつぼ型心筋症のモデルになることを見出した<sup>51)</sup>。この動物モデルに交感神経遮断薬を投与すると正常化することにより、この特殊なたこつぼ型の心筋収縮には交感神経の活性化が関与していることが分かった<sup>52,53)</sup>。このたこつぼ型心筋症動物モデルにエストロゲンを投与すると、左心室の収縮低下が減弱して心拍数の増加も減弱することから、エストロゲンが情動ストレスによる心臓の反応を減弱させることが分かった。このモデル動物を使い、酸化ストレスから細胞を保護する働きをしているヘムオキシゲナーゼ-1が、心臓・大血管に存在するマクロファージにおいて増加することも見出した。不動化によって、心臓で増加するヘムオキシゲナーゼ-1の発現が交感神経の  $\alpha$ ,  $\beta$  遮断薬で抑制されることや、この酵素がマクロファージに発現すること、また、転写因子の Nrf2 によって発現が誘導されることから、不動化ストレスによるカテコラミンの増加によって、心血管系で発現誘導されるヘムオキシゲナーゼ-1は、酸化ストレスに対抗するように働いていることが分かった<sup>54)</sup>。

### 4. オリゴデンドロサイトの分化に関する研究

髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの細胞系譜を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、陽性細胞の発達初期からのラット中枢神経系での分布を免疫組織化学的に示した<sup>55)</sup>。オリゴデンドロサイトを認識する新規のモノクローナル抗体4F2を作製し、この抗体が、オリゴデンドロサイトの未熟および成熟の両細胞を認識することを確認した。4F2は、オリゴデンドロサイトの前駆細胞のマーカーと局在が一致するが、アストロサイトやニューロンのマーカーとは局在が異なることから、新規モノクローナル抗体4F2が、オリゴデンドロサイトの細胞系譜に特異的に反応することが分かった。免疫組織化学的に検討すると、胎生期の早期 E9 から神経管の神経上皮細胞に発現しており、発達過程の胎仔期において、中枢神経系の広範囲で脳室帯の脳室周囲にある神経上皮細胞に発現することが分かった。胎生期から生後発達に伴って、脳内に分布した4F2陽性細胞は、繊細な突起を多数分枝する。また、4F2は神経幹細胞マーカーとは一

致するが、分裂後の神経前駆細胞マーカーとは一致しないことから、4F2抗体は神経幹細胞を標識する。そこで、この抗体が認識するのは何であるのかを調べたところ、DEADbox型のヘリカーゼに属するDdx54であった。このDdx54の働きについては、共免疫沈降法による解析によって、Ddx54が分化して成熟過程にあるオリゴデンドロサイトにおいてMBPの4つのisoformと結合し、また、細胞質画分と核画分にある両方のMBPと結合することが分かった。さらに、Ddx54との共発現実験によって、MBPの21.5 kDaのisoformだけが核画分で発現強度が増加することから、21.5 kDaのMBP isoformがDdx54と結合して核内に移行し、オリゴデンドロサイトの発達過程と再髄鞘化に関与することが分かった。次に、Ddx54に対するショートヘアピンRNAを発現するアデノウイルスを用いて、Ddx54をノックダウンさせる実験を行った。生後2日のマウス側脳室の片方に投与して生後9日に解析すると、ノックダウンした側では、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーであるミエリン関連糖タンパク質陽性細胞の突起が少なく粗になった。また、成熟オリゴデンドロサイトの別のマーカーであるMBP陽性細胞は、ノックダウンした側ではsubplate layerに集積し脳梁でのMBP免疫反応が著減した。このように、Ddx54の発現をノックダウンすると髄鞘形成が低下する。このとき、Ddx54の発現をノックダウンすることによって、MBPの21.5 kDaのisoformの発現は低下する。これらことから、Ddx54はMBPの21.5 kDaのisoformと結合することによって、オリゴデンドロサイトの分化に関与していることが分かった<sup>56)</sup>。

## 5. 骨代謝に関する研究

骨代謝に関する研究について、胃切除を行うと骨が脆くなるのはなぜかについて研究を行った。胃切除後の骨障害について教科書での記載では、カルシウムの負のバランスやビタミンDの吸収障害によって骨軟化症が起こるということが記載されているが、最新版ではその記載さえもみられない。つまり、30年前から骨軟化症への考え方は変わっておらず、そもそもこの問題に取り組んでいないので、この説明は本当に正しいのかということから研究を始めた<sup>57)</sup>。

大腿骨のCT像から、胃切除後では骨幹の骨皮質の厚さは薄くなり、骨端の海綿骨も粗になった。骨の組織像でも、胃切除後に骨髓腔は広くなり、皮質骨の厚さも薄

くなることから、確かに骨量は胃切除後に減少する。大腿骨遠位骨端の組織像と標識物質による骨形成速度の測定を行った結果、胃切除後、骨芽細胞は肥大、増数し、破骨細胞も増数した。また、骨石灰化の速度も増加した。骨形態測定のパラメーターを見ると、骨形成における、類骨量、骨芽細胞面、骨芽細胞数、一方、骨吸収における、吸収面、破骨細胞面、破骨細胞数、骨吸収速度、いずれのパラメーターも、胃切除後に増加していた。このことから、胃切除後では、骨形成と骨吸収はともに亢進することが分かった。また、骨石灰化のパラメーターである、骨石灰化速度、骨形成速度、骨石灰化遅延時間は、胃切除後にいずれも増加し、骨の石灰化速度は亢進した。一方、骨量のパラメーターの変化から、骨ボリュームと骨梁は胃切除後に減少していた。血液の生化学的検査では、胃切除後、血中のカルシウムと25水酸化ビタミンD3の濃度は減少し、一方、無機リンの濃度は増加して、活性型ビタミンD3の濃度は著増していた。遺伝子発現を見ると、胃切除後には、骨の破骨細胞と骨芽細胞の活動マーカーはともに増加し、腎臓での活性型ビタミンD3合成酵素が著増していた。しかし、肝臓のエストロゲン受容体 $\alpha$ 、成長ホルモンレセプター、甲状腺の副甲状腺ホルモンは低下していた。よって、胃切除後の骨変化は、類骨の過剰形成と骨石灰化の亢進を伴った、高代謝回転型の石灰化骨量の減少を示す。血中のカルシウム濃度は減少し、リン濃度は増加し、活性型ビタミンD3は著増し、腎臓の $1\alpha$ -水酸化酵素は亢進していた。

このことから、胃切除後の骨変化は、骨軟化症の骨変化とは、類骨の過剰形成と石灰化骨量の減少という点では同じであるが、骨軟化症では、骨石灰化の障害があり、低代謝回転型の骨量減少であることや、血中リン濃度は減少し、活性型ビタミンD3は低下するという点で異なる。また、骨粗鬆症の骨変化とは、高代謝回転型の石灰化骨量の減少という点では同じであるが、骨粗鬆症では、類骨の割合が正常であり、血中のカルシウム、リン濃度、活性型ビタミンD3は変化しないという点で異なる。つまり、胃切除後の骨変化は、骨軟化症とも、骨粗鬆症とも異なるものであることが分かった(図5)。

## 6. 人体肉眼解剖の破格例に関する研究

人体系統解剖実習において見出される人体解剖の破格例について、所見を詳細に記録して、欧文あるいは邦文にまとめて報告をしている。人体の系統解剖実習では、

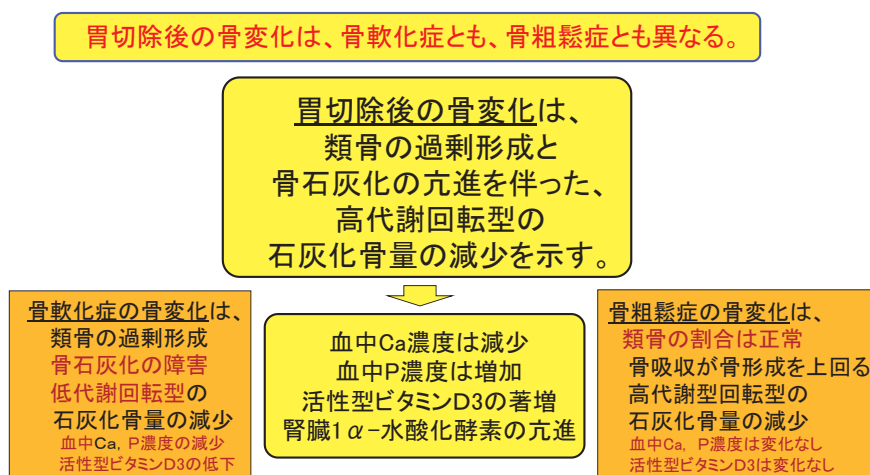


図5

胃切除後の骨変化は、骨軟化症とも、骨粗鬆症とも異なる。  
中央に胃切除後の骨変化、左下に骨軟化症の骨変化、右下に骨粗鬆症の骨変化を示す。同  
じ変化を黒字で、異なる変化を赤字で示す。

毎年度、数例の破格例が見られる。左前腕に見られた遺残正中動脈の破格例についても報告を行った<sup>58)</sup>。遺残正中動脈と連絡する浅掌動脈弓の動脈分枝について、8つのパターンに分類した。破格例はこのうちのf型に分類された。

#### おわりに

私の研究は神経系や内分泌腺などを対象とし、神経伝達物質、ステロイド代謝酵素の局在やその働きについて主に形態学的手法を用いて解析し、神経内分泌学的な生体調節機構を形態学的に明らかにしてきた。研究領域は、神経発生、ストレスに対する生体反応、骨代謝や、人体肉眼解剖の破格例にも及ぶ。形態学的な観点から、生体調節機構に果たす情報伝達物質やステロイド代謝酵素などの働きに関する研究を進め、いくつかの研究は従来の定説に修正を加えるような結果を生み出した。これからも形態学の考え方を基盤として、新規の発見や概念につながるよう研究を進めていきたい。

#### 文 献

- 1) Tsuruo, Y., Kawano, H., Hisano, S., Kagotani, Y., *et al.*: Substance P-containing neurons innervating LHRH-
- 2) Kawano, H., Tsuruo, Y., Bando, H., Daikoku, S.: Hypophysiotrophic TRH-producing neurons identified by combining immunohistochemistry for pro-TRH and retrograde tracing. *J.Com. Neurol.*, 307: 531-538, 1991
- 3) Tsuruo, Y., Kawano, H., Kagotani, Y., Hisano, S., *et al.*: Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide Y in the rat septo-preoptic area. *Neurosci. Lett.*, 110: 261-266, 1990
- 4) Kagotani, Y., Hisano, S., Tsuruo, Y., Daikoku, S., *et al.*: Intracellular co-storage of neuropeptide Y and arginine vasopressin in the paraventricular magnocellular neurons of the rat hypothalamus. *Cell Tiss. Res.*, 262: 47-52, 1990
- 5) Kagotani, Y., Hisano, S., Tsuruo, Y., Daikoku, S., *et al.*: Vasopressin-deficient paraventricular magnocellular neurons of homozygous Brattleboro rats synthesize neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.*, 112: 37-42, 1990
- 6) Hisano, S., Tsuruo, Y., Kagotani, Y., Daikoku, S., *et al.*: Immunohistochemical evidence for synaptic con-

containing neurons in the septo-preoptic area of rats. *Neuroendocrinology*, 53: 236-245, 1991

- nections between neuropeptide Y-containing axons and periventricular somatostatin neurons in the anterior hypothalamus in rats. *Brain Res.*, **520** : 170-177, 1990
- 7) Kagotani, Y., Tsuruo, Y., Hisano, S., Daikoku, S., *et al.* : Axons containing neuropeptide Y innervate arginine vasopressin-containing neurons in the rat paraventricular nucleus. Dual electron microscopic immunolabeling. *Histochem. Cell Biol.*, **91** : 273-281, 1989
- 8) Kagotani, Y., Tsuruo, Y., Hisano, S., Daikoku, S., *et al.* : Synaptic regulation of paraventricular arginine vasopressin-containing neurons by neuropeptide Y-containing monoaminergic neurons in rats. Electron-microscopic triple labeling. *Cell Tissue Res.*, **257** : 269-278, 1989
- 9) Kagotani, Y., Hashimoto, T., Tsuruo, Y., Kawano, H., *et al.* : Development of the neuronal system containing neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **7** : 359-374, 1989
- 10) Hökfelt, T., Tsuruo, Y., Ulfhake, B., Cullheim, S., *et al.* : Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **553** : 76-105, 1989
- 11) Daikoku, S., Tsuruo, Y., Hashimoto, T., Okamura, Y., *et al.* : Hypothalamic neurons from a developmental aspect. *Arch. Histol. Cytol.*, **52 Suppl** : 217-223, 1989
- 12) Daikoku, S., Hisano, S., Kawano, H., Tsuruo, Y., *et al.* : Immunohistochemical approach to the functional morphology of the hypothalamic-hypophysial system. *Brain Dev.*, **11** : 73-79, 1989
- 13) Tsuruo, Y., Hökfelt, T., Visser, T.J., Kimmel, *et al.* : TRH-like immunoreactivity in endocrine cells and neurons in the gastro-intestinal tract of the rat and guinea pig. *Cell Tissue Res.*, **253** : 347-356, 1988
- 14) Tsuruo, Y., Hökfelt, T., Visser, T.J. : Thyrotropin-releasing hormone (TRH) -immunoreactive neuron populations in the rat olfactory bulb. *Brain Res.*, **447** : 183-187, 1988
- 15) Tsuruo, Y., Ceccatelli, S., Villar, M.J., Hökfelt, T., *et al.* : Coexistence of TRH with other neuroactive substances in the rat central nervous system. *J. Chem. Neuroanat.*, **1** : 235-253, 1988
- 16) Seroogy, K., Tsuruo, Y., Hökfelt, T., Walsh, J., *et al.* : Further analysis of presence of peptides in dopamine neurons. Cholecystokinin, peptide histidine-isoleucine/vasoactive intestinal polypeptide and substance P in rat supramammillary region and mesencephalon. *Exp. Brain Res.*, **72** : 523-534, 1988
- 17) Meister, B., Hökfelt, T., Tsuruo, Y., Hemmings, H., *et al.* : DARPP-32, a dopamine-and cyclic AMP-regulated phosphoprotein in tanycytes of the medio-basal hypothalamus : distribution and relation to dopamine and luteinizing hormone-releasing hormone neurons and other glial elements. *Neuroscience.*, **27** : 607-622, 1988
- 18) Hisano, S., Kagotani, Y., Tsuruo, Y., Daikoku, S., *et al.* : Localization of glucocorticoid receptor in neuropeptide Y-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, **95** : 13-18, 1988
- 19) Ceccatelli, S., Tsuruo, Y., Hökfelt, T., Fahrenkrug, J., *et al.* : Some blood vessels in the rat median eminence are surrounded by a dense plexus of vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine (VIP/PHI) immunoreactive nerves. *Neurosci. Lett.*, **84** : 29-34, 1988
- 20) Tsuruo, Y., Hökfelt, T., Visser, T. : Thyrotropin releasing hormone (TRH) -immunoreactive cell groups in the rat central nervous system. *Exp. Brain Res.*, **68** : 213-217, 1987
- 21) Tsuruo, Y., Hisano, S., Nakanishi, J., Katoh, S., *et al.* : Immunohistochemical studies on the roles of substance P in the rat hypothalamus : possible implication in the hypothalamic-hypophysial-gonadal axis. *Neuroendocrinology*, **45** : 389-401, 1987
- 22) Maegawa, M., Hisano, S., Tsuruo, Y., Katoh, S., *et al.* : Differential immunolabeling for electron microscopy of diverse peptidergic neurons. *J. Histochem. Cytochem.*, **35** : 251-255, 1987
- 23) Hökfelt, T., Tsuruo, Y., Meister, B., Melander, T., *et al.* : Localization of neuroactive substances in the hypothalamus with special reference to coexistence of messenger molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **219** : 21-45, 1987
- 24) Hökfelt, T., Millhorn, D., Seroogy, K., Tsuruo, Y., *et al.* : Coexistence of peptides with classical neuro-

- transmitters. *Experientia*, **43** : 768-780, 1987
- 25) Hökfelt, T., Fahrenkrug, J., Ju, G., Ceccatelli, S., *et al.* : Analysis of peptide histidine-isoleucine/vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the central nervous system with special reference to their relation to corticotropin releasing factor-and enkephalin-like immunoreactivities in the paraventricular hypothalamic nucleus. *Neuroscience*, **23** : 827-857, 1987
- 26) Hisano, S., Tsuruo, Y., Katoh, S., Daikoku, S., *et al.* : Intragranular colocalization of arginine vasopressin and methionine-enkephalin-octapeptide in CRF-axons in the rat median eminence. *Cell Tissue Res.*, **249** : 497-507, 1987
- 27) Hisano, S., Ishizuka, H., Nishiyama, T., Tsuruo, Y., *et al.* : Immunoelectron microscopic observations of hypothalamic TRH-containing neurons in rats. *Exp. Brain Res.*, **63** : 495-504, 1986
- 28) Heike, Y., Hisano, S., Tsuruo, Y., Katoh, S., *et al.* : Immunocytochemical evidence for synaptic regulation of paraventricular vasopressin-containing neurons by substance P. *Brain Res.*, **369** : 341-346, 1986
- 29) Nishiyama, T., Kawano, H., Tsuruo, Y., Maegawa, M., *et al.* : Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing neurons involved in the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis. Light microscopic immunohistochemistry. *Brain Res.*, **345** : 205-218, 1985
- 30) Daikoku, S., Okamura, Y., Kawano, H., Tsuruo, Y., *et al.* : CRF-containing neurons of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, **240** : 575-584, 1985
- 31) Tsuruo, Y., Hisano, S., Okamura, Y., Tsukamoto, N., *et al.* : Hypothalamic substance P-containing neurons. Sex-dependent topographical differences and ultrastructural transformations associated with stages of the estrous cycle. *Brain Res.*, **305** : 331-341, 1984
- 32) Tsuruo, Y., Hisano, S., Daikoku, S. : Morphological evidence for synaptic junctions between substance P-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.*, **46** : 65-69, 1984
- 33) Daikoku, S., Okamura, Y., Kawano, H., Tsuruo, Y., *et al.* : Immunohistochemical study on the development of CRF-containing neurons in the hypothalamus of the rat. *Cell Tissue Res.*, **238** : 539-544, 1984
- 34) Daikoku, S., Maki, Y., Okamura, Y., Tsuruo, Y., *et al.* : Development of immunoreactive LHRH neurons in the fetal rat hypothalamus. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **2** : 113-120, 1984
- 35) Adachi, T., Ohtsuka, M., Hisano, S., Tsuruo, Y., *et al.* : Ontogenetic appearance of somatostatin-containing nerve terminals in the median eminence of rats. *Cell Tissue Res.*, **236** : 47-51, 1984
- 36) Tsuruo, Y., Kawano, H., Nishiyama, T., Hisano, S., *et al.* : Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hypothalamus. Light and electron microscopy. *Brain Res.*, **289** : 1-9, 1983
- 37) Daikoku, S., Hisano, S., Kawano, H., Okamura, Y., *et al.* : Ontogenetic studies on the topographical heterogeneity of somatostatin-containing neurons in rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, **233** : 347-354, 1983
- 38) Daikoku, S., Chikamori, M., Adachi, T., Okamura, Y., *et al.* : Ontogenesis of hypothalamic immunoreactive ACTH cells in vivo and in vitro : role of Rathke's pouch. *Dev. Biol.*, **97** : 81-88, 1983
- 39) Tamura, M., Kagawa, S., Tsuruo, Y., Ishimura, K., *et al.* : Effects of flavonoid compounds on the activity of NADPH diaphorase prepared from the mouse brain. *Jpn. J. Pharmacol.*, **65** : 371-373, 1994
- 40) Tamura, M., Kagawa, S., Kimura, K., Kawanishi, Y., *et al.* : Coexistence of nitric oxide synthase, tyrosine hydroxylase and vasoactive intestinal polypeptide in human penile tissue - a triple histochemical and immunohistochemical study. *J. Urol.*, **153** : 530-534, 1995
- 41) Tsuruo, Y., Ishimura, K., Tamura, M., Kagawa, S., *et al.* : Biochemical and histochemical studies of the effects of cerebral metabolism-improving drugs on NADPH diaphorase activity in mouse brain. *Jpn. J. Pharmacol.*, **65** : 285-288, 1994
- 42) Tsuruo, Y., Sato, I., Iida, M., Murakami, T., *et al.* : Immunohistochemical detection of the ob gene product (leptin) in rat white and brown adipocytes. *Horm. Metab. Res.*, **28** : 753-755, 1996
- 43) Tamura, M., Kagawa, S., Tsuruo, Y., Ishimura, K., *et al.* : Localization of NADPH diaphorase and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurons in the efferent pathway to the rat corpus cavernosum.



- Eur. Urol., 32 : 100-104, 1997
- 44) Matsuda, J., Yokota, I., Tsuruo, Y., Murakami, T., *et al.*: Developmental changes in long-form leptin receptor expression and localization in rat brain. *Endocrinology*, 140 : 5233-5238, 1999
- 45) Tsuruo, Y., Ishimura, K., Fujita, H., Osawa, Y.: Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre- and postnatal development. *Cell Tissue Res.*, 278 : 29-39, 1994
- 46) Tsuruo, Y., Ishimura, K., Osawa, Y.: Presence of estrogen receptors in aromatase-immunoreactive neurons in the mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 195 : 49-52, 1995
- 47) Tsuruo, Y., Ishimura, K., Hayashi, S., Osawa, Y.: Immunohistochemical localization of estrogen receptors within aromatase-immunoreactive neurons in the fetal and neonatal rat brain. *Anat. Embryol.*, 193 : 115-121, 1996
- 48) Yokoi, H., Tsuruo, Y., Miyamoto, T., Ishimura, K.: Steroid 5  $\alpha$ -reductase type 1 immunolocalized in the adrenal gland of normal, gonadectomized, and sex hormone-supplemented rats. *Histochem. Cell Biol.*, 109 : 127-134, 1998
- 49) Ueyama, T., Shirasawa, N., Numazawa, M., Yamada, K., *et al.*: Gastric parietal cells: potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis. *Endocrinology*, 143 : 3162-3170, 2002
- 50) Ueyama, T., Shirasawa, N., Ito, T., Tsuruo, Y.: Estrogen-producing steroidogenic pathways in parietal cells of the rat gastric mucosa. *Life Sci.*, 74 : 2327-2337, 2004
- 51) Ueyama, T., Kasamatsu, K., Hano, T., Yamamoto, K., *et al.*: Emotional stress induces transient left ventricular hypocontraction in the rat via activation of cardiac adrenoceptors: a possible animal model of 'tako-tsubo' cardiomyopathy. *Circulation J.*, 66 : 712-713, 2002
- 52) Ueyama, T., Hano, T., Kasamatsu, K., Yamamoto, K., *et al.*: Estrogen attenuates the emotional stress-induced cardiac responses in the animal model of tako-tsubo (ampulla) cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 42 Suppl 1 : S117-S119, 2003
- 53) Ueyama, T., Ishikura, F., Matsuda, A., Asanuma, T., *et al.*: Chronic estrogen supplementation following ovariectomy improves the emotional stress-induced cardiovascular responses by indirect action on the nervous system and by direct action on the heart. *Circulation J.*, 71 : 565-573, 2007
- 54) Ueyama, T., Kawabe, T., Hano, T., Tsuruo, Y., *et al.*: Upregulation of heme oxygenase-1 in an animal model of takotsubo cardiomyopathy. *Circulation J.*, 73 : 1141-1146, 2009
- 55) Ueki, T., Tsuruo, Y., Yamamoto, Y., Yoshimura, K., *et al.*: A new monoclonal antibody, 4F2, specific for the oligodendroglial cell lineage, recognizes ATP-dependent RNA helicase Ddx54: possible association with myelin basic protein. *J. Neurosci. Res.*, 90 : 48-59, 2012
- 56) Zhan, R., Yamamoto, M., Ueki, T., Yoshioka, N., *et al.*: A DEAD-box RNA helicase Ddx54 protein in oligodendrocytes is indispensable for myelination in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 91 : 335-348, 2013
- 57) Ueyama, T., Yamamoto, Y., Ueda, K., Yajima, A., *et al.*: Is gastrectomy-induced high turnover of bone with hyperosteoidosis and increase of mineralization a typical osteomalacia? *PloS one*, 3 : e65685, 2013
- 58) Tsuruo, Y., Ueyama, T., Ito, T., Nanjo, S., *et al.*: Persistent median artery in the hand: a report with a brief review of the literature. *Anat. Sci. Int.*, 81 : 242-252, 2006

## *Functional analysis of biological regulators from a morphological viewpoint*

*Yoshihiro Tsuruo*

*Department of Anatomy and Cell Biology, Tokushima University Graduate School of Medical Science, Tokushima Japan*

### SUMMARY

My initial research was focused on the nervous system and endocrine organs, and analyzed the neuroendocrinological mechanism of regulating biological systems by investigating the locations and functions of neurotransmitters and steroid-metabolizing enzymes using mainly morphological techniques. Research areas spread over several related fields including neural development, stress reaction, bone metabolism and anomalies of human anatomy. Based on a morphological viewpoint, my future research should be advanced to revise conventional ideas or to make novel discoveries.

Key words : morphological viewpoint, neuroendocrinological mechanism, nervous system, endocrine organ, steroid-metabolizing enzyme