

## 5. コレステロール 25-ヒドロキシラーゼの血清成分による転写抑制

獨協医科大学学生化学

杉本博之, 安戸博美, 堀端康博, 青山智英子

【目的】我々は培養液中の Fetal bovine serum (FBS) の濃度を低下させると, ホスファチジルエタノールアミン (PE) (主なリン脂質の1つ) 合成の律速酵素 CTP : phosphoethanolamine cytidyltransferase (ET) およびコレステロール合成の律速酵素 HMG-CoA reductase の転写が促進され, この促進は 25-ヒドロキシコレステロール (25-HC) ( $1.25 \mu\text{M}$ ) などのオキシステロール添加により濃度依存性に抑制されることを見出した. 25-HC は, コレステロール 25-ヒドロキシラーゼ (CH25H) により, コレステロールを基質として産生されるため, CH25H の発現制御機構に注目した.

【方法】NIH3T3 細胞を 35 mmDish に撒き, 0.5% FBS で培養後, 0.5-10% FBS または  $1.25 \mu\text{M}$  25-HC またはコレステロールを添加し, 12-24 時間培養した. RNA 抽出後逆転写を行い, Taq-Man Assay 2-step RT-PCR kit と 7300 Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いた.

【結果】NIH3T3 細胞においてオキシステロールを産生する酵素の中でも CH25H は十分な発現が認められた. そこで CH25H の転写も培養液中の FBS 濃度に依存し変化するの否か検討した. その結果, CH25H の mRNA 量は培養細胞の FBS 濃度を低下させると, ET や HMG-CoA レダクターゼと同様な濃度依存性を示し増加した. この増加は FBS の再添加により抑制され可逆性であった. CH25H の mRNA 量の増加は, FBS のクロロホルム/メタノール (C/M) 分画による水層や FBS 透析画分を添加することにより著明に抑制されたが, 脂質層添加では変化なかった.

【考察と結論】FBS 中に存在する CH25H の転写抑制因子は, 水溶性で分子量の比較的大きいものであり, 25-HC とは異なる分子であると推測された. 細胞内の 25-HC の増減により ET や HMG-CoA reductase の発現が制御される可能性が示唆された.

## 6. 免疫組織化学染色を用いた腸管神経叢発育の評価

獨協医科大学越谷病院小児外科

畑中政博, 長谷川真理子, 五十嵐昭宏,

藤野順子, 石丸由紀, 田原和典, 池田 均

免疫染色による腸管 Hypoganglionosis (HG) の診断に関する報告が散見されるが, いまだ一定の診断基準はない. これには対照となる正常腸管の評価が未確立であることも大きい. 今回, HG の診断法確立の為, 胎児期から成人期にかけての腸管壁の経時変化と, 神経叢内の神経節細胞とグリア細胞を同定する抗体を選別し, 新たな診断法について検討した.

25 例 (胎生 8 週~20 歳) の回腸組織を対照群とし, 光顕的に HG と診断された 3 例を H.E 染色と免疫染色にて比較検討した.

対照群では胎生 16 週の腸管神経叢内ですでに神経節細胞とグリア細胞が分化しており, それぞれの細胞数の比率は出生直前まで 1:1 だが, その後神経節細胞の比率が低下していた. 神経節細胞を同定する抗体として HuC/D 抗体, グリア細胞には Sox10 抗体が独自の染色性を有し, H.E 染色と比較しても細胞の同定は対照群, HG 群ともに容易であった. また, HG 群の神経叢内の神経節細胞数とグリア細胞数は対照群に対し有意に減少していた.

HG の発症機序を知る上で腸管神経叢内の細胞を免疫染色にて検討することは有益であり, その評価には Sox10, HuC/D を用いた免疫染色が有益であった.