

〔総説〕

正常、手術対照、松果体除去ラット副腎髓質の計量細胞学的研究 —とくに日内時間およびアドレナリン細胞・ノルアドレナリン細胞間差異との関連

2. 考察、とくに核、支持細胞と分化について

加 地 隆¹⁾

要 旨

先に報告した本総説第1部での分析・統合結果に基づいて、本研究では副腎髓質クロム親性細胞の核構造、支持細胞および細胞分化に焦点を当てた。中でも核小体と他の核構造および支持細胞によるクロム親性細胞表面被覆度のアドレナリン細胞とノルアドレナリン細胞間の差異や支持細胞のパラグングリオン細胞への潜在的分化能との関係を中心主題とし、様々な旧来のおよび新しい知見や考えを提示し、考察した。主な点は以下の通り：1. 核構造については、主に核小体とその位置や超微構造、およびそれらと細胞の型、増殖・分化、日内変動や機能活性との関連について考察し、またクロマチンパターンと核液の両細胞間差異についても言及した。副腎髓質クロム親性細胞でとくに強調された点は、1) アドレナリン細胞におけるPNMT酵素や糖質ステロイド受容体などのアドレナリン合成関連機能の存在、2) 精祖細胞、交感神経主ニューロンや小脳プルキンエ細胞を含む他種細胞との比較、3) 新しい分子・細胞生物学的方法を用いた核内微細構造と遺伝子転写活性の部位差の研究の進展などであった。2. パラグングリオンに分類される副腎髓質と頸動脈小体の支持細胞とそのアミン産生細胞への分化能（あるいは幹細胞としての支持細胞）および関連するVhl遺伝子について、生体の適応機序・予備能とも関連して考察した。3. 近年報告された副腎髓質細胞における α -シヌクレインや細胞内分解系についても簡潔に述べた。

キーワード：核小体、超微構造、クロマチン、細胞分裂、遺伝子発現

I. はじめに

本総説に関する諸問題の中で、副腎髓質の種々の微細構成成分に及ぼす日内時間および/あるいは対照手術(SX)・松果体除去(PX)の影響については、第1部¹⁾および著者らの原著論文^{2,3,4,5,6,7)}や過去の総説^{8,9,10,11)}においてすでにある程度考察した。従ってここでは、副腎髓質クロム親性細胞の核小体における日内変動にも若干は言及するが、主としてその核構造および支持細胞との関連性におけるアドレナリン(A)細胞・ノルアドレナリン(N)細胞間差異に重点をおき、それを取り巻く幾つかの問題点を中心に、若干の新知見を含めて考察する。

A・N細胞間差異の問題については、1) 先の総説¹¹⁾において、N細胞領域は神経組織に比較的近い性質を有

するのに対して、A細胞領域は通常の内分泌腺に、より近い性質を有する(*)との考えを述べた。支持細胞による被覆率や神経終末におけるシナプス小胞数の差異はとくにそのような考えに一致している。また2) 本総説第1部¹⁾の重要な結論の1つとして、PX効果においてもそれがとくにA細胞において著名に認められる明瞭なA・N細胞間差異が認められた。このA細胞に対するPX効果は概して日内時間とも関係した促進的なものであり、単純陽性効果は細胞サイズ、顆粒化核小体頻度、有糸分裂頻度に見られた。そして、このような促進性効果はハムスター副腎髓質A細胞の開口分泌頻度、糸粒体数や神経終末小型明シナプス小胞数にも見られた^{5,6,10,11)}。

著者らの実験が行なわれ、原著論文が発表された1970年代後半から1990年以後に、とくに正常遺伝子の

1) 弘前医療福祉大学保健学部看護学科(〒036-8102 弘前市小比内3-18-1)

*ノルアドレナリン細胞の略称は正式にはNA細胞だがここでは便宜上N細胞を用いる。

解読やその発現調節機序および非翻訳RNA、ホルモン・成長因子と癌・発癌遺伝子、ES細胞やiPS細胞による再生医療などの研究の興隆、およびそれらと連動した細胞の核構造や分化についての関心の高まりや研究の進展があり、その影響が本研究分野にも及んできている。ここでは、そのような流れの中から生まれてきた新しい考え方や実験事実の幾つかを取り上げて考察してみたい。表1に核構造および支持細胞との関連性におけるA・N細胞間差異に関する第1部での結果の要約を示した。

〈*この問題と関連して、遺伝性褐色細胞腫の2つの型に関する記述¹²⁾は興味深いので簡略化して述べる。1) Multiple Endocrine Neoplasia症候群 (MEN2) : 褐色細胞腫 (アドレナリンを分泌)、甲状腺髄様癌、上皮小体機能亢進症/腺腫より成り、責任遺伝子はRET¹³⁾。2) Von Hippel-Lindau症候群 : 2つの型があり、1型は網膜血管障害などで褐色細胞腫を含まない。2型はVHL腫瘍抑制遺伝子変異の患者で、褐色細胞腫 (ノルアドレナリンのみを産生) が低頻度に主に副腎内に起こる。グルカゴン受容体 (-)

II. 核構造 — とくに核小体について

細胞核の構造に関しては古くから活発に研究が継続されている。ここでは私どもが本研究主題のもとで報告した1984年から1990年までの核関連の観察結果^{4, 5, 6)}を中

心に考察したい。観察された幾つかの核構造の中で、とくに計量的に明瞭な成績が得られた核小体の光顕的、電顕的構造を中心に述べる。

A. 核小体の理解のために

a. 本研究での核小体の計測方法と測定個数など⁴⁾

副腎髄質を電顕用に固定しエポン包埋した後、厚さ1 μ mの準超薄切片を作成し、光顕下で測定した。従って、核小体をランダムに切断したものをを用いてはいるが、核小体の平均直径が約1.1~1.3 μ mなので厚さ70nmの電顕用超薄切片に比べて最大径を含む頻度ははるかに高いと推定される。切片上で核小体を有し、測定に用いた日内8時点での核の総数は、NO群・SX群・PX群のA細胞・N細胞各々1,600個ずつで、合計9,600個であった。核断面に含まれた核小体数(核数)は1(8,062)、2(1,455)、3(82)、4(1)、5以上(0)と、核小体を含む大部分の核断面で観察された核小体数は1 (~2) 個で、3個以上の場合にはきわめて少なかった。

b. 核小体の数と細胞分裂

SchwarzacherとWachtler(1993)によると、一般にめったに または まったく分裂しない細胞は、1個または少数の核小体しかもたない¹⁴⁾(例: 神経細胞やセルトリ細胞 表3を参照)。神経芽細胞と神経細胞は発達の間は核1個当たり数個の核小体を有し、細胞分裂が終了後にのみ融合して大型単一の核小体が形成される。従って核小

表1. 核構造および支持細胞との関連性におけるA・N細胞間差異に関する主な研究結果の要約¹⁾

A. 第1部でNO群^{a)}・SX群・PX群に共通してAN細胞間差異があった核と支持細胞関連構造群

1. 差異の有無が客観的な計量結果に基づくもの

[第1群] 核サイズ、細胞サイズ、顆粒化核小体の頻度 :

N細胞よりもA細胞の方が高値を示した。

(これらに細胞分裂頻度を加えた4者は、日内暗期におけるPX動物のA細胞で対照動物よりも高値を示した。)

[第2群] 核小体辺縁化率、支持細胞によるクロム親性細胞被覆率 :

A細胞よりもN細胞の方が高値を示した。

2. 定性所見のみから差異があると判断されたもの

[第3群] ヘテロクロマチンと核液の部分の量 :

N細胞よりもA細胞の方が多いという印象を受けた。

(この群は客観的計量結果に基づいていないため、問題提起ともいうべきもの)

B. SXやPXあるいは日内時間によってAN細胞間差異が変わるもの

1. NO群の髄質全体における核小体の24時間平均サイズ :

N細胞よりもA細胞の方が大きかった。

2. NO群の髄質辺縁部における核小体サイズの日内変動 :

N細胞では存在せず、A細胞でのみ存在した。

^{a)}NO群 : 正常対照群

体の数が多いことは更なる細胞分裂のための潜在能力が神経細胞に残っていることを示すという。ちなみに著者らの結果で、PXラット副腎髄質A細胞の分裂頻度は日内暗中期でN細胞や対照群A細胞よりも多く、A細胞の潜在的分裂能を示し、また後述の適応能力を示唆する。

NORs (nucleolus-organizing regions) と染色体の二次狭窄に関してはStahl (1982)¹⁵⁾ による説明を参照されたい。急速にタンパク合成の亢進が起こる可能性のある細胞では、必要に応じて利用できるようにリボソーム遺伝子の余分のコピーを多数もつことにも言及されている。本研究結果にも示したように、副腎髄質A細胞ではPXにより細胞機能の亢進が観察されたが、このような緊急状態あるいはストレスに対処する役割をもった細胞では、核小体-リボソーム関連機構にも特殊な調節機構が存在するのかもしれない。

c. 核小体の構造と機能的意義の概説

1993年までの核小体の構造と機能的意義に関する研究の詳細については総説を参照されたい^{14, 15, 16, 17, 18, 19)}。超微構造については、上記総説や一般的細胞組織学教科書^{20, 21, 22)}に記載されているが、簡単に述べると、核小体は核小体糸(部)(Pars nucleolonema)と均質部(Pars amorpha)および核小体付随クロマチンより構成される。もっと高倍率では核小体糸には顆粒部(Pars granulosa)と細糸部(Pars fibrosa)が観察される。細糸部(Pars fibrosa)内部の明調部は拡大してFibrillar center (FC)と呼ばれる状態になることがある。核小体はリボソーム産生のための工場²¹⁾(*)とみなされ、活発に活動している分泌細胞における核小体のサイズは機能的、とくに合成的活性の位相やレベルに結びつけられており(BuschとSmetana¹⁶⁾他)、発達中や成熟後でも増殖能の高い細胞や癌細胞では核小体の活動が亢進するとされている。

〈*近年では非翻訳RNAなどの存在・重要性が明らかにされてきているが、話が複雑になるのでその点の詳細についてはここではふれない。〉

1982年の核小体に関する総説集の中でBouteilleら¹⁷⁾は、核小体構造が静的・安定な小器官ではなく、細胞周期の中では分裂終期(核膜再構成の時期)に形成・分化すること、また各種細胞(例えばリンパ球やニューロン、後述)の分化周期の最終段階で大きく変化しうること、また約1日の周期で日内リズムを示すことなどについても言及している。

核小体に関して著者らの研究開始当時に注目を集めていた問題、あるいはまだ未解決で議論のあった研究主題としては、核小体の日内変動に関する問題、核小体の位

置および/あるいは微細構造的部分と細胞の機能活性あるいは他の細胞活動との関連性の問題があった。著者らは1984年、1988年に核小体のサイズ、位置や微細構造が各種の実験条件によって明瞭な変化を示す計測結果を発表した^{4, 5)}が、それらの問題については1960年代~80-90年代に遺伝子の発現あるいは転写活性とも関連して活発な議論があってその後の大きな展開につながったので、その経緯をここで簡単に述べてみたい。

表2に核小体のサイズ、超微構造、位置およびその他に本論文で問題とされた点と関連する報告を経年的に示し、表3には本論文で取り上げられる核小体の位置と様々な細胞種との関係について示した。

B. 核小体に関する研究経緯

a. 核小体のサイズ、超微構造と日内変動・細胞の機能活性(表2)

QuayとRenzoni(1966)はラット松果体細胞の核小体サイズが日内変動を示すことを初めて報告した²³⁾。Quayは松果体のセロトニンやメラトニン量の日内変動の発見者でもある(総説^{24, 25)}を参照)。その後の研究で、松果体の日内変動は視床下部視交叉上核の中樞時計から上頸交感神経節を経由して伝達・調節されることが明らかにされた。このことから、PébusqueとSeiteら(1981)は、上頸交感神経節主ニューロンにおける核小体の超微構造、とくにそのfibrillar center (FC)の大きさに立体解析学(stereology)的に日内変動を見出した^{26, 27)}。この研究は遺伝子発現とも関連し、核構造とくに核小体の研究者たちの注目を集めた^{17, 18)}。Pébusqueらの報告はまた、電顕的3次元再構築法を用いて上頸神経節主ニューロンの核小体が核膜に接することを明瞭に示した点でも有意義であった²⁷⁾。ちなみに著者ら(1984)は副腎髄質A細胞とN細胞の核小体サイズに日内変動を報告した⁴⁾が、RobagliaとSeite(1985)は副腎髄質細胞(A細胞・N細胞)の区別はされていない)における核小体のFCの大きさにも日内変動を報告している²⁸⁾。これらのフランスグループの報告により、当初はFCサイズがリボソームDNAからの転写量の指標として利用できる可能性も期待された^{15, 18)}が、この考えは必ずしも他の研究者達による全面的支持を得られなかった^{14, 18, 29, 30)}。その理由は、1)上頸神経節主ニューロンの核小体FCサイズは精巣のセルトリ細胞のそれとともに例外的に大きいものであった。2)FCにはリボソームDNA以外に多量のタンパクが含まれる。3)放射線ラベル実験でもリボソームDNAからの転写物質は必ずしもFC部位のみには検出されなかった。4)FCは動的な構造であり、遺伝子産物は一般的には急速に次の段階へと移行するため、転写量の指標には必ずしも適さなかった、などであった。しかし核小体と

そのFCサイズの日内リズムの研究はその後‘時計遺伝子’の研究³¹⁾へと発展して行った。

著者らのラット副腎髄質細胞の研究は、3実験群、日内8時点で、また2つの細胞種に分けての膨大な時間と労力を要する研究であり、また明瞭なFCが観察される頻度は低かった（この点はRobagliaとSeiteも同意見²⁸⁾）ため、FCサイズについては計測していない。それにかわって、核小体にしめる顆粒部分の量が細胞の機能活性とよく相関しPX効果を検出できた（Kachiら、1988）⁵⁾。

そしてこの点に関しては、Wachtlerら（1980）のリンパ球での結果²⁹⁾などとも一致していた（総説^{15,17)}も参照）。核小体の顆粒部について簡潔に説明すると、rRNAはNORから前駆体RNAとして転写された後、修飾・切断され成熟し、タンパクと合体して顆粒部分を形成するとされる。これら転写後変化の最終段階の、あるいは細胞質に輸送される前駆体の、大型と小型2種の小粒子が核膜孔を通過して胞体内へ輸送され、合体してリボソームを構成すると考えられている。このようにして一定期間リ

表2. 核小体のサイズ、超微構造、位置と日内変動・細胞機能活性などとの関連

下線が示す内容を各種線上に示した：

核小体の 位置；超微構造；日内変動；機能活性との関連

1. Clermont (1963)³⁰⁾：ヒト精巣におけるA型精祖細胞とB型精祖細胞間の核小体の位置
A型—核膜に接する B型—核内部に存在
2. Forssmann (1964)²²⁾：ラット上頸交感神経節主ニューロン核小体の位置は中央部と辺縁部で同頻度^a
MatthewsとRaisman (1969)²³⁾：Forssmannの報告を支持、模式図を提示
3. QuayとRenzoni (1966)²¹⁾：ラット松果体細胞で核小体サイズの日内変動^bを報告
4. Ghadially (1975)³²⁾ 他：核小体の辺縁化は細胞機能活性の亢進状態を示す
5. Wachtlerら (1980)²⁷⁾：リンパ球をPHA^cで活性化させると核小体の顆粒部が増大することを報告
6. PébusqueとSeite (1981)²⁴⁾：ラット上頸交感神経節主ニューロンで電顕的に核小体のFCサイズの日内変動を報告
Pébusqueら (1981)²⁵⁾：同材料で立体再構築法によりNORsサイズの日内変動、核膜付着核小体の存在を確認
7. Bouteilleら (1982)¹⁷⁾：核膜付着核小体を含む核小体の総説
核小体が核膜近傍に位置することはリボソーム産生に関与する物質輸送に有利
・・‘機能活性反映説’ 一般的現象で進化の結果として自然な位置と主張
8. Kachi, BanerjiとQuay (1984)⁴⁾：ラット副腎髄質A細胞・N細胞の核小体サイズに日内変動を報告
核小体が核膜に付着する頻度：N細胞>A細胞
・・機能活性を反映しないのではないか？
9. Manuelidis (1984)³¹⁾：小脳プルキンエ細胞などで核小体が核の中心にある。
3次元再構築法で確認。高度の分化との関連性を示唆。
10. RobagliaとSeite (1985)²⁶⁾：ラット副腎髄質クロム親性細胞で核小体とそのFCの体積に日内変動を報告
11. MiyauchiとWatanabe (1987)³⁴⁾：顆粒白血球系各種造血細胞の超微構造などの研究
本研究との関連・・前骨髄球の核小体辺縁化
12. Kachi, BanerjiとQuay (1988)⁵⁾：ラット副腎髄質A細胞で、松果体除去による機能活性増加に伴い核小体顆粒部が増大・・機能活性を反映
13. BourgeoisとHubert (1988)¹⁹⁾：核小体辺縁化の‘機能活性反映説’とその部分的修正
14. Wachtlerら (1989)²⁷⁾：rDNAの局在部位はFCではなく、高密度（dense）細糸成分という実験結果を報告
15. Manuelidis (1990)：間期核内の染色体位置や分化と核小体等の核内微細構造の関係を含む総説出版
16. SchwarzacherとWachtler (1993)²⁰⁾：核小体辺縁化の‘機能活性反映説’に反論

^a表3を参照 ^bPébusqueとSeite (1981)により核小体サイズに日内変動があることの世界初の報告とされた。

^cPHA (Phytohaemagglutinin)は植物性リンパ球分裂促進因子

ボソームの新生充進状態が持続するとその前駆物質が核内に蓄積され、核小体顆粒部分の増大を起こすと推測される。

b. 核小体の位置 (核小体辺縁化率)

1. 方法について

核小体の位置を厳密に決定するには連続切片像からの3次元再構築法が最善であろう。しかしながら、この方法は時間と労力を要しすぎ、大量の実験材料を処理するためには現実的ではなかった。一方、多数の核小体の計測によって得られたA・N細胞間の差異という本研究結果には統計学的に高度の有意差 ($P < 0.001$) があり⁴⁾、核と核小体に関する生物学的・機能的に意味のある現象に関連する可能性が高いと考えられた。著者らの計測結果によると、核小体辺縁化率の平均値は45～60%でA細胞よりもN細胞の方が有意の高値であったが、このことは核膜近傍に核小体の存在する頻度がA細胞核よりもN細胞核で高いという定性的観察結果と一致していた。核小体辺縁化率を連続切片からの3次元再構築法によって測定すれば実際はもっと高い値となるであろう。

2. 先行観察記録 (表2、3)

‘核小体が核辺縁部に、あるいは核膜に接して存在することの意味はなにか？ 核小体の位置決定にはどのような機序が関与するか？’ 核小体-核膜関連については古くから関心がもたれ^{17, 19)}、この問題の説明の基礎となる多数の先行観察記録が広汎な分野で蓄積されていた。

核小体の位置による細胞種の分類および関連する説明を表3に、報告の経年記録を表2に示した。表2、3に示すように、盛んに増殖中の細胞では核小体が核膜に付着しており、その細胞と近縁で別種の細胞では核小体が核の内部に存在する例が報告されている。前者の代表的な例は、Clermontによるヒトの精巣におけるA型精祖細胞 (核小体は核膜に付着) とB型精祖細胞 (核小体は核膜に付着しない) の間の差異に関する報告であろう³²⁾。この場合、A型精祖細胞は細胞分裂頻度が非常に高く未分化な細胞であるのに対して、B型精祖細胞は1回分裂した後にきわめて特殊な性質を有する精母細胞に分化する細胞である²⁰⁾。著者らはこの点についての観察報告を核小体サイズの日内変動などの論文内に含めて、J Pineal Resの創刊号 (1984) に発表した⁴⁾。一方後に知ったことであるが、同年に米国のManuelidisは小脳のプルキンエ細胞では核小体が核の中央部に位置することを報告した³⁹⁾。

3. 核小体の位置と細胞の機能活性あるいは分化などとの関連性の問題

1) ‘細胞機能活性との関連 (または機能活性反映) 仮説’

本研究開始の頃のこの問題に関する一般的な考え方は各種の総説^{17, 40)} や組織学教科書²⁰⁾ などに見られるもので、核小体が核膜に接して存在することは核小体でのリボソームの合成と核外への輸送を促進し好都合と考えられ、またそのため進化の過程で保存されてきたという説で、言わば‘細胞機能活性との関連仮説’である。

表3. 核小体の位置と細胞種

-
1. 常にまたは高頻度に核膜近傍に存在する細胞^{17, 19)}: 細胞分裂頻度の高い細胞 (精巣のA型精祖細胞³²⁾、胎生期や生後早期の発達中の細胞など)
 2. 時々核膜近傍に存在する細胞: 交感神経節主ニューロン^{33, 34)}、同SGC細胞^{a 34, 35)}、前骨髄球^{b 36, 37, 38)}
 3. 核膜から離れて、しばしば核の中心部付近に存在する細胞:
中枢神経系の多くのニューロン (大脳や小脳皮質³⁹⁾、脊髄前角など)
精巣のB型精祖細胞³²⁾、セルトリ細胞^c、形質細胞^d
組織学図譜に示される全身の他の多くの分化した細胞
-

^a 上頸交感神経節には主ニューロンの他に小型顆粒含有 (small granule containing) 細胞または小型蛍光濃染性 (SIF, small intensely fluorescent) 細胞があり、カテコールアミン (多くはドーパミン) を含むとされる。核小体辺縁化の幾つかの顕微鏡像が示されている。

^b 骨髄の顆粒球系造血細胞の中で前骨髄球は骨髄芽球から分化して、アズール好性顆粒をもち、大きさ最大。2回の細胞分裂後に、後骨髄球、骨髄球などへと分化・発達して行く細胞型。前骨髄球の電顕的観察で、核小体が核膜に付着する像がしばしば観察されている。分化が更に進むと、ヘテロクロマチンが増加し核小体は消失する。

^c 大型のFCを含む核小体が核の内部に存在する細胞。アンドロゲン結合タンパクの他にもアロマトラーゼを有し果糖を分泌する等、健全な精子形成に対し多様で重要な機能を有する高度に分化した細胞^{20, 30)}

^d Bリンパ球の最終分化段階の細胞。分泌顆粒をもたないが、抗体 (糖タンパク) を合成するため 粗面小胞体とゴルジ装置がよく発達する。ヘテロクロマチンがしばしば核の中心から辺縁部に向かって放射状に配列する (車輪核)^{20, 38)}。

しかしながら、著者らの幾つかの細胞構成成分に関する実験結果は、A細胞よりもN細胞の方がリボソーム合成促進や細胞のタンパク合成あるいは機能活性が亢進することは示しておらず、むしろ逆の状態にあることを示していた。すなわち、A細胞の方がN細胞よりも細胞サイズ、核サイズが大きく、顆粒化核小体頻度が高いため、N細胞の方がA細胞よりもタンパク合成機能活性が高いという根拠は極めて薄弱であった。また、PXによりA細胞における各種の機能的構造が促進性影響をうけるのにも関わらず、核膜近傍に核小体の存在する頻度はA細胞核よりもN細胞核で高いという状態は変わらないという結果も得られた。これら多くの結果は、「核小体が核膜近傍に位置することは細胞の機能活性亢進状態を反映する」という仮説が広く一般化できるものではないことを示していた。つまり著者らの実験結果から、「核小体の位置決定には、リボソーム構成成分の合成と核外への輸送機能への利便性以外の何らかの理由・機序が関与している」ことが考えられた。

それでは副腎髄質N細胞において核小体が高頻度に核膜近傍の位置をとることには、あるいはまたA・N細胞間の核小体の位置における差異には、どのような理由・機序が関与しているのでしょうか？

2) 細胞分化との関連(表2、3)

Bouteilleら¹⁷⁾の共同研究者であったフランスのBourgeoisとHubertは1988年の総説でも大部分の動物と植物の体細胞、特に分裂中の細胞において、核小体は一般に核の辺縁部にあると云う説を再度発表した。核内の中央部に位置する核小体を有する少数の細胞型は高度に分化した細胞であり、分化した後は再び分裂しないという点を補足した¹⁹⁾。その引用論文の中でManuelidis(1984)は、種々のニューロンの核をコンピューター解析し、小脳のプルキンエ細胞の少なくとも80%で核小体が核の中心にあること、また大脳皮質運動野や脊髄のニューロンでも核小体は核の中央にあることなどを報告し³⁹⁾、またBourgeoisとHubertら自身もトカゲの卵胞の梨状細胞で核小体と同様の位置を示すことを認めた。さらに³⁾[³H] uridineの取り込みで証明されたようにこれら2型の細胞で核小体の転写活性は非常に高かったという。一方、オーストリアのSchwarzacherとWachtler(1993)¹⁴⁾は、核小体が核膜に接して出現することがしばしば観察されるが、このことは核小体の活動に依存するものではないことを、幾つかの根拠をもとに強力に主張した。その論旨は著者らの考えと一致している。いずれにしても、著者らの結果を説明するためには、「リボソーム合成と核外への輸送機能との関連仮説」とは異なる考え方、例えば細胞分化などとの関連のような別の機序を考慮することが必要と考えられた。

BourgeoisとHubertらの説におけるもう1つの説明困難な問題は、Forssmann(1964)やMatthewsとRaisman(1969)が報告したように、同じ典型的なニューロンであり通常の状態では細胞分裂を行わない分化した細胞と考えられる交感神経主ニューロンで、核小体がしばしば核膜近傍に存在する^{33,34)}ことである。このことは電顕的3次元再構築法でも確認されている²⁷⁾。脳や脊髄の大型ニューロンと交感神経主ニューロンとの間にはこの点に関するいかなる機序の相違があるのだろうか？興味深い問題である。Manuelidis(1984,1990)は分化した細胞毎に異なるセントロメアの位置取りの動的変化の存在を示唆している^{39,41)}。いずれにしても本研究との関係では、種々の生化学的性質やグリア性細胞による被覆率の差異ばかりでなく、核小体の位置においても副腎髄質細胞のN細胞の方がA細胞よりも交感神経節細胞に類似性が高い。

表3に示された種々の分化した細胞の中で、とくに核小体が時々核膜近傍に存在する細胞種については、細胞によってそれぞれに異なる様々な理由・機序が関わる可能性もあり、詳細については、後述するCa⁺⁺、PKC(protein kinase C)との関連も含めて今後の研究に待たなければならない。

4. 核小体の位置と核構造と分子生物学 — 遺伝子転写部位との関連

核小体の位置と関連して、Manuelidis(1884,1990)^{39,41)}、BourgeoisとHubert(1988)¹⁹⁾、HaafとSchmid(1991)⁴²⁾やSchwarzacherとWachtler(1993)¹⁴⁾らによって論じられた共通点に、核(または核小体)骨格と核膜(ラミン)および染色体との関係があった。このように、核小体研究分野の活発な議論から、関連分野の分子生物学的研究(核膜、ラミン、核骨格、染色体、クロマチン、遺伝子とその発現調節機序など)を巻き込んだ分子レベルでの機序を考慮に入れた研究の必要性が出てきた。

1) ヘテロクロマチンと核液：A・N細胞間差異および近年における概念の推移

表1に示したように、クロマチンとの関連では、著者らもA細胞核ではN細胞核よりもヘテロクロマチンと核液の量が多いという報告を行っていた(Kachiら、1984)⁴⁾。N細胞核ではユークロマチンが主体で、クロマチンは密在傾向にあり、A細胞核ではヘテロクロマチンが主体で、クロマチンの間に核液と見られる部分が多く、全体に疎な様相を呈した。しかしながら、CouplandとTomlinson(1989)⁴³⁾によるラット副腎髄質の計量電顕的研究において、クロマチン量のA・N細胞間差異についての計量結果は示されていない。古くから現在にいたる迄、遺伝子転写に関してヘテロクロマチンは非活性部

であり、ユークロマチンは活性の高い部位と見なされている^{20, 21, 22)}。一方、著者らの報告当時からヘテロクロマチンにも遺伝子転写活性が高い部位があり得ると指摘する Fakan と Puvion (1980)⁴⁴⁾ やコーンバーグ (1981)⁴⁵⁾ のような研究者もいた。A細胞の分泌物の合成・分泌には神経性の影響ばかりでなく、GC (糖質ステロイド) による受容体を介した核内機序による内分泌性の影響も強く^{22, 46, 47)}、生体の置かれた状況次第でそのような機序が発現し得るためには、核液スペースを含むヘテロクロマチン主体の存在様式が好適という可能性も考えられた。いずれにしてもこの点は、更なる研究・検討が必要な問題点と考えられた。

その後2000年代に入る頃からヘテロクロマチンに関して、以下に示すような大きな考え方の変化が起きた：1) ヘテロクロマチンには構成的と条件的の2種類があり、両者の間の障壁は最初に考えられていた以上に許容的であり、エピジェネティックマーカーは協力的に作用してクロマチンの抑制状態を維持する；2) ヘテロクロマチンは完全に沈黙しているのではなく、漏出する非翻訳RNA転写活性が遺伝子の安定性維持に重要である、等^{48, 49, 50, 51)}。一方、遺伝子転写活性の高い部分が上述のようにヘテロクロマチンの表面ばかりでなく内部にもあり、辺縁部から内部に連絡路がある海綿状構造も想定された⁵²⁾。また、遺伝子の存在部位を動的に考える必要があり、例えば転写活性化時にはユークロマチンにあった遺伝子が、転写抑制時にはヘテロクロマチン部位に移動するという実験結果も報告されている^{21, 22)}。このように、ヘテロクロマチンと遺伝子発現との間の関連性については近年盛んに探究され、本態の解明が進んでいる。

2) 核内構造の巨視的部位差：近年の研究の流れ

間期核内の染色体の分布領域は互いに混ざり合うことのない区域 (コンパートメント) に分けられていることが明らかにされ、染色体テリトリーと呼ばれている^{21, 22, 41, 52, 53, 54)}。

- (1) 3D-FISH (3次元蛍光in situハイブリダイゼーション) 法を用いた研究によると、染色体は遺伝子密度と相関した放射状核内配置 (radial positioning) をとる^{52, 53, 54)}。
- (2) 遺伝子の転写活性に関して、核の辺縁側と中心側との間に差異があるという実験結果が集積してきている。例：核ラミナ付随遺伝子の大部分は転写的に不活性である⁵⁵⁾。核ラミナへの遺伝子の人工的導入は遺伝子の下方調節を起こす^{56, 57, 58)}。
- (3) ある遺伝子領域は細胞型に依存して核ラミナへ向け、またはそれから離れる方向へ移動し得る^{59, 60, 61)}。
- (4) 細胞の分化に伴い、染色体の基本構造に大改造が起こり⁴¹⁾、細胞の分化特性を決める遺伝子に影響を与え、中心側へ移動した遺伝子は活性化する⁶²⁾。

このように、核膜に近い領域は遺伝子発現には抑制的な環境であり、核の中心側は促進的な環境である。従って核内部は細胞分化遺伝子の発現に好適な位置と考えられる⁵¹⁾。

以上の大部分の考察はA細胞・N細胞についての実験結果に関するものではないが、近年の核内構造の研究は核内の立体的地図作成ともいべき問題においても着実に進歩してきており、これらの研究結果は核小体の位置決定におけるA・N細胞間差異にも何らかの基礎的な関連を有するものであろう。

5. 副腎髄質A細胞・N細胞間における核小体位置の差異に関する結論と補足

A細胞の特徴であり、N細胞との大きな違いでもあるPNMT (phenylethanolamine N-methyltransferase) 酵素やGC受容体などのタンパク合成のためには、核小体は中心側に存在する方が胞体内の広範囲にリボソームを供給し^{14, 19)}、ホルモン性の調節作用を受けたりする上で都合が良いと考えられる。また核小体が担当するリボソーム供給は、細胞の機能活性充進に関与するタンパク合成能の増加と運動するものと考えられるので、それらにかかわる遺伝子群はタイミング的にも核内の位置的にも連携に都合の良い状態に配置されているのではなかろうか？ さらにまた、活性化遺伝子の位置が核内部にあるとすればクロマチンは緻密に均一に存在するよりもある程度のスペースを含むか、あるいは動的状態にある方が良いかもしれない。一方、N細胞はグリア性支持細胞によってより密に被覆され、神経終末内のシナプス小胞数も多く、神経終末、グリア性細胞および/あるいはN細胞自体の胞体から放出される物質 (例えば神経伝達物質、成長因子やCa⁺⁺など) によってN細胞の核の構造や活動などが影響をうける可能性もあるかもしれない^{3, 7, 11)}。実際、N細胞領域ではA細胞領域よりもCa⁺⁺関連機序が発達しており¹¹⁾、また核膜内面に沿った (常在性あるいは胞体から移動性) PKCの存在も免疫組織化学的に示されている^{63, 64)} ので、それら2つの現象とN細胞の分化に特徴的な遺伝子転写位置と核小体形成領域 (NORs) の核膜近傍における配置が関連している可能性があるかもしれない。

以上のように、本総説の主要な問題点の一つである核小体の位置におけるA・N細胞間差異の理由・機序については、基礎的部分の研究がかなり進展してきているように思われる。今後のこの問題に関する実験的研究の更なる進歩に期待したい。

Ⅲ. 支持細胞・細胞分化・適応

A. 背景

まず、本研究と関係する神経細胞、および松果体細胞や副腎髄質細胞などの神経内分泌細胞の発達・分化についての研究経緯について簡単に紹介する。先の総説(加地、2014)で述べたように、松果体研究分野では第3脳室に近い松果体茎部の細胞群がラットやマウスで松果体芽細胞群あるいは機能的予備層の細胞群と推測された⁶⁵⁾。関連して1960年代のAltmanらの研究^{66, 67)}に端を発し、1990年代の新しい研究方法によって確立された⁶⁸⁾成熟動物の脳におけるニューロンの増殖と分化という重要な発見があり、大きなインパクトを与えた。現在の図式によれば、これらの新しいニューロン群は側脳室の脳室下層における神経幹細胞から発生すると云う⁶⁹⁾。さらに、AltmanとDas⁶⁷⁾によれば、脳のニューロン新生は2相に分けられ、大型投射ニューロンのものは胎生早期に、小型ニューロンのものは遅れて生後(～成熟期)の期間に起こり、後発の小型ニューロンは出生後に大型ニューロンの枠組みに統合される。彼らの仮説的見解によればこの第2の段階は、'環境的影響がニューロン新生を調節してその環境に理想的に適合した脳をつくるための様式'であり、'この階層的な構築過程は脳に安定性と剛直性、そして同時に修飾的、可塑的成分を与える'。

一方古くから、副腎髄質細胞の発生源、増殖・分化と調節機序および髄質の形態学的・化学的性質などの動物種間における多様性について、多くの研究者が興味をもって^{11, 20, 70, 71)}。これらの諸問題の中から浮かび上がり、発達神経生物学分野にもう1つの大きなインパクトを与えたのは1986年にノーベル賞を受けたLevi-Montalciniらによる神経成長因子(NGF)の研究であった(Levi-MontalciniとAloe, 1983)⁷²⁾。このNGF研究に対する大きな推進力となった研究が70年代の後半にあった。すなわち、TischlerとGreene(1975)とGreeneとRein(1977)は褐色細胞腫由来細胞株のPC12細胞に、Unsickerら(1978)は副腎髄質の未熟なクロム親性細胞に、培養下でNGFを作用させると交感神経性の生化学的・形態学的性質を持つようになることを発見した^{73, 74, 75)}。さらにAloeとLevi-Montalcini(1979)はラット胎児にNGFを作用させると髄質細胞が神経細胞に形質変換される⁷⁶⁾こと、またLevi-MontalciniとAloe(1980)は頸動脈小体などにNGFを作用させても同様の現象が起こる⁷⁷⁾ことを報告した。このように、交感神経性副腎髄質細胞の発達と可塑性あるいは神経-内分泌曖昧性の問題が脚光を浴びた(文献^{43, 78)}も参照)。

B. 副腎髄質・頸動脈小体における支持細胞とVhl遺伝子、細胞分化

a. 著者らの報告

表1に示したように、著者らは副腎髄質クロム親性細胞の支持細胞による被覆度あるいは介在度は、A細胞よりもN細胞の方が高度であることを計量電顕的方法により初めて報告し⁷⁾、次いで支持細胞の免疫組織化学的染色性について報告した^{79, 80)}。

b. 幹細胞としての支持細胞、およびO₂センサーや増殖・分化・適応

副腎髄質支持細胞の観察報告に関しては当初は関連する実験結果がほとんど皆無の状態であったが、近年になり、副腎髄質や頸動脈小体のようなパラグングリオン⁸¹⁾(*)において、支持細胞からクロム親性細胞や神経細胞に分化する可能性のあることが報告され、注目されている。最近の報告の意識を含めた抄録を表4に示した。オーストリアのBöckの総説⁸¹⁾によると、高度の高い地域などで生活するヒトや動物では頸動脈小体のサイズが大きいことが知られていた。また呼吸器や心臓血管の慢性疾患のように慢性的酸素供給不足状態の患者でも、やはり頸動脈小体が慢性的に刺激された状態になる。頸動脈小体の主細胞はドーパミンを多量に含有し、交感神経-副腎髄質系の細胞群と同様に神経堤由来の細胞であり、VHL遺伝子の点でも共通点があって興味深いので参考にした。

〈*松果体・副腎髄質(内分泌腺)や頸動脈小体(酸素などに対する化学受容器)はともにアミンを含有する主細胞(頸動脈小体では毛細血管が糸球状に発達するためglomus cellとも呼ばれる)と支持細胞とから成る^{24, 81, 82)}。クロム親(和)性細胞(例:副腎髄質細胞)は胞体内のカテコールアミンがクロム反応性を呈することに由来する名称であるが、この反応は感度が低いため、例えばラットやマウス頸動脈小体の主細胞に含まれるような少量のアミンには陽性反応を示さないと現在では考えられている。〉

Ⅳ. その他

・ α -シヌクレイン

Khanらは2012年にマウスを用いて、 α -シヌクレインの発現レベルが脳皮質よりも副腎髄質ではるかに高いことを見出し、さらに α -シヌクレインがA細胞に選択的に存在し、N細胞には存在しないことを報告した⁸⁷⁾。A細胞における α -シヌクレインの役割など、詳細についてはまだ不明な点が多く、更なる研究が必要である。近年 α -シヌクレインは、神経病理学的に重要な物質と

表4.パラグングリオンと支持細胞と遺伝子・細胞分化

Katsetosら (1998)⁸³⁾

神経性分化のための確立された系であるラットPC12褐色細胞腫細胞株を gelfoam matrices 内培養 (3 次元的に増殖させる方法) を用いて培養。

PC12細胞中にグリア様表現型*を有する (多分 支持細胞性) 細胞の出現を観察。

Pardalら (2007)⁸⁴⁾

慢性的低酸素状態で成長する成熟動物頸動脈小体内に幹細胞を発見。

幹細胞はグリア様支持細胞で、グリア標識で同定可能。幹細胞由来のglomus細胞 (頸動脈小体主細胞) は通常のglomus細胞と同様の化学受容特性を有し、ドーパミンを含み、グリア細胞株由来神経成長因子を分泌する。哺乳動物頸動脈小体は成熟期における生理的機能を有する新生神経の供給源となることができ、パーキンソン病に対する細胞治療に有用である可能性がある。

Maciasら (2014)⁸⁵⁾

von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子の交感神経-副腎髄質系機能における役割調査の目的でカテコールアミン性細胞のVhl遺伝子欠損マウスを作成。

Vhl欠損マウス: 1) 頸動脈小体、副腎髄質および交感神経節の萎縮; 2) 成熟期頸動脈小体内部に幹細胞の増数。新生ニューロン様glomus細胞の蘇生は重篤に阻害; 3) 正常酸素分圧下では正常、低酸素分圧下では数日間のみ生存。所見: 著名な赤血球増多症、肺水腫、右室肥大。

正常の交感神経-副腎髄質系状態でVhl欠損は腫瘍に結びつかない。

低酸素状態下での生存に必要な末梢性酸素センサー系の発達・可塑性を損なう。

Rubin de Celisら (2015)⁸⁶⁾

グリア様ネスチン発現前駆細胞が成熟動物副腎髄質の可塑性に貢献。この細胞は副腎髄質支持細胞の特徴をもち、多能性で、クロム親性細胞と神経細胞に分化できる。副腎はストレスへの適応に中心的な役割をもつ。ストレス下でこれらの前駆細胞の活性化と新しいクロム親性細胞への分化を示したin vivoでの実験結果は、新しいグリア様多能性幹細胞集団の副腎組織ストレス適応への関与を証明。

*成熟ラット副腎髄質支持細胞がS-100とGFAPタンパクを発現するというSuzukiとKachi (1995)⁷⁹⁾の論文が引用されている。

して盛んに研究され、現在 神経系の生理学、病理学や臨床医学などの分野で最も注目を集める物質の1つになっている^{88, 89, 90)}。生理学的には、 α -シヌクレインはニューロンにおいて膜との相互作用を介してシナプス小胞のプールを調節するという⁸⁹⁾。

〈*神経科学の多くの研究者により (Maroteauxらの原著⁹¹⁾を参照)、神経系や神経内分泌器官^{24, 25, 46)}などにおいて核を含む細胞の活動または機能がいかに調節されるか、また病態下ではどのように変化するかなどについての研究が進み、その中で1988年に米国Stanford大学のMaroteauxら (1988) が同定したシヌクレインという物質⁹¹⁾が注目されるようになった。彼等はシナプスやアセチルコリン受容体などの研究にしばしば用いられるシビレエイ (*Torpedo*) の電気器官から純化したコリン作動性シナプス小胞に対する抗体を用いて、143個のアミノ酸からなるニューロン特異的タンパクのシヌクレインを単離した。シヌクレインは神経終末の膜とシナプス小胞、および核膜の一部の構成成分と同定された。Maroteauxらはシナプス (synapse) と核 (nucleus) に局在することから、このタンパクをシヌクレイン (synuclein) と命名

し⁹²⁾、ニューロンがその核とシナプスに起こる現象を統合・調整 (coordinate) する際にこのタンパクが関与すると仮説的に考えた。この物質は後に、神経変性疾患と重要な関わりがあるとされた物質と同じものであることが明らかにされた⁹³⁾。現在ではシヌクレインには α 、 β 、 γ の3種があるとされる。〉

• プロテアソームなどの分解系

副腎髄質A細胞においてはリソソーム酵素の酸性フォスファターゼ活性が高いことが古くから知られており⁹⁴⁾、またアドレナリン合成酵素のPNMTなどの酵素や糖質ステロイド受容体は分泌顆粒小胞外に存在するサイトゾルタンパクである。これらおよび核小体などの実験結果も併せ考えると、A細胞では各種の合成・分解活動が盛んであると推測される⁴⁷⁾。近年 タンパク分解におけるプロテアソームの重要性が明らかにされている⁹⁵⁾。著者の専門分野外でもあり、詳細は割愛させて頂くが、顆粒小胞やサイトゾルタンパク等、および核内での代謝を含めたA細胞・N細胞間の比較に関して、合成系ばかりでなく分解 ('オートファジー') 系をも含めた専門家による系統的検索と解説を期待したい。

おわりに

本稿を書き進める過程で、研究において糸口・手がかりとしての小さな観察結果、そして様々な議論、さらには実験技術の進歩を含む他分野との関わりによる研究の急速な展開、あるいは問題点を異なる角度から見直すことによる新しい発展などが重要であることを再認識した。また綿々と続く研究の流れの中で小生らのつたない観察結果が今なお生き続けているように感じられ、感謝している。

謝辞

本研究の完成に際し弘前大学名誉教授（大学院医学研究科ゲノム生化学講座）、現本学教授の土田成紀博士に、また造血細胞の核構造についてはPCL Sapporo所長 藤田昌宏博士に、御多忙の中、貴重な御助言をいただいた。ここに深く感謝の意を表したい。

（受理日 平成29年2月21日）

文献

1. 加地隆：正常，手術対照，松果体除去ラット副腎髄質の計量細胞学的研究—とくに日内時間およびアドレナリン細胞・ノルアドレナリン細胞間差異との関連 1. 分析・統合結果を中心として 弘前医療福祉大学紀要 7: 1-16, 2016
2. Kachi T, Banerji TK, Quay WB: Daily rhythmic changes in synaptic vesicle contents of nerve endings on adrenomedullary adrenaline cells, and their modification by pinealectomy and sham operations. *Neuroendocrinology* 28: 201-211, 1979
3. Kachi T, Banerji TK, Quay WB: Circadian and ultradian changes in synaptic vesicle numbers in nerve endings on adrenomedullary noradrenaline cells, and their modifications by pinealectomy and sham operations. *Neuroendocrinology* 30: 291-299, 1980
4. Kachi T, Banerji TK, Quay WB: Quantitative cytological analysis of functional changes in adrenomedullary chromaffin cells in normal, sham-operated, and pinealectomized rats in relation to time of day: I. Nucleolar size. *J Pineal Res* 1: 31-49, 1984
5. Kachi T, Banerji TK, Quay WB: Quantitative cytological analysis of functional changes in adrenomedullary chromaffin cells in normal, sham-operated, and pinealectomized rats in relation to time of day: II. Nuclear-cytoplasmic ratio, nuclear size, and pars granulosa of nucleolus. *J Pineal Res* 5: 141-159, 1988a
6. Kachi T, Quay WB, Banerji TK, Imagawa T: Effects of pinealectomy on the mitotic activity of adrenomedullary chromaffin cells in relation to time of day. *J Pineal Res* 8: 21-34, 1990
7. Kachi T, Suzuki T, Takahashi G, Quay WB: Differences between adrenomedullary adrenaline and noradrenaline cells: quantitative electron-microscopic evaluation of their differential cellular association with supporting cells. *Cell Tissue Res* 271: 257-261, 1993
8. Kachi T, Banerji TK, Quay WB: Functional cytological changes in rodent adrenomedullary cells: Interactive effects of time-of-day, pinealectomy and sham-surgery. *Current Trends in Comparative Endocrinology*. Lofts B, Holmes WN, eds. 1017-1019. Hong Kong: Hong Kong Univ Press. 1985
9. Kachi T: Pineal actions on the autonomic system. *Pineal Res Rev* 5: 217-263, 1987
10. Kachi T, Banerji TK, Quay WB: Pineal-adrenomedullary relations: Hormonal mechanisms affecting tumor growth. *The Pineal Gland and Cancer*. Gupta D, Attanasio A, Reiter RJ, eds. 333-344. London, Tübingen: Brain Res Promotion. 1988b
11. Kachi T, Takahashi G, Suzuki T et al: Dynamic and versatile structures of adrenal medulla, related to pineal and surgery. *Dynamic Cells: Cell Biology of the 21st Century*. Proceedings of the 1st Hirosaki International Forum of Medical Science. Yagihashi S, Kachi T, Wakui M, eds. 47-58. Amsterdam: Elsevier. 1998
12. Pacak K, Timmers HJLM, Eisenhofer G: Chapter 109. Pheochromocytoma. *Endocrinology. Adult and Pediatric* (6th ed). Vol II. Jameson JL, De Groot LJ, eds. 1998-1999. Philadelphia, PA: Saunders. 2010
13. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM: Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 42: 581-588, 1985
14. Schwarzacher HG, Wachtler F: The nucleolus. *Anat Embryol* 188: 515-536, 1993
15. Stahl A: The nucleolus and nucleolar chromosomes. *The Nucleolus*. Jordan EG, Cullis CA, eds. 1-24. Cambridge, London, New York: Cambridge Univ Press. 1982
16. Busch HK, Smetana K: The nucleolus. Academic Press, New York. 1970
17. Bouteille M, Hernandez-Verdun D, Dupuy-Coin AM, Bourgeois CA: Nucleoli and nucleolar-related structures in normal, infected and drug-treated cells. *The Nucleolus*.

- Jordan EG, Cullis CA, eds. 179–211. Cambridge, London, New York: Cambridge Univ Press. 1982
18. Goessens G: Nucleolar structure. *Int Rev Cytol* 87: 107–158, 1984
 19. Bourgeois CA, Hubert J: Spatial relationship between the nucleolus and the nuclear envelop: structural aspects and functional significance. *Int Rev Cytol* 111: 1–52, 1988
 20. 伊藤隆：組織学（阿部和厚改訂，19版）36–37, 249–254, 518–523. 東京：南山堂. 2005
 21. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al: *Molecular Biology of the Cell* (6th Ed). 173–216, 329–331. New York, Oxford: Garland Science. 2015
 22. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, et al: *Molecular Cell Biology* (8th ed). 301–471. New York: WH Freeman. 2016
 23. Quay WB, Renzoni A: Twenty-four-hour rhythms in pineal mitotic activity and nuclear and nucleolar dimensions. *Growth*, 30: 315–324, 1966
 24. Quay WB: *Pineal Chemistry in Cellular and Physiological Mechanisms*. Springfield, IL: Charles C. Thomas. 1974
 25. Wurtman RJ, Axelrod J, Kelly DE: *The Pineal*. New York, London: Academic Press. 1968
 26. Pébusque M-J, Seite R: Evidence of a circadian rhythm in nucleolar components of rat superior cervical ganglion neurons with particular reference to the fibrillar centers: an ultrastructural and stereological analysis. *J Ultrastruct Res* 77: 83–92, 1981
 27. Pébusque M-J, Dupuy-Coin A-M, Cataldo C, et al: Three-dimensional electron microscopy of the nucleolar organizer regions (NORs) in sympathetic neurons. *Biol Cell* 41: 59–62, 1981
 28. Robaglia A, Seite R: Changes in nucleoli and nucleolar fibrillar centers of chromaffin cells in rat adrenal medulla over 24-h period: an ultrastructural and stereological analysis. *J Cell Sci* 77: 255–262, 1985
 29. Wachtler F, Ellinger A, Schwarzacher HG: Nucleolar changes in human phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Cell Tissue Res* 213: 351–360, 1980
 30. Wachtler F, Hartung M, Devictor M et al: Ribosomal DNA is located and transcribed in the dense fibrillar component of human Sertoli cell nucleoli. *Exp Cell Res* 184: 61–71, 1989
 31. 岡村均, 深田吉孝編：時計遺伝子の分子生物学. 東京：丸善. 2012
 32. Clermont Y: The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Amer J Anat* 112: 35–51, 1963
 33. Forssmann WG von: Studien über den Feinbau des Ganglion cervicale superius der Ratte. *Acta anat* 59, 106–140, 1964
 34. Matthews MR, Raisman G: The ultrastructure and somatic efferent synapses of small granule-containing cells in the superior cervical ganglion. *J Anat* 105: 255–282, 1969
 35. Williams T, Jew J: Monoamine connections in sympathetic ganglia. *Autonomic Ganglia*. Elfvin L-G, ed. 235–264. Chichester, New York, Brisbane: John Wiley & Sons. 1983
 36. Miyauchi J, Watanabe Y: Immunocytochemical localization of lactoferrin in human neutrophils. An ultrastructural and morphometrical study. *Cell Tissue Res* 247: 249–258, 1987
 37. 張ヶ谷健一：造血器 三輪血液病学（第3版）浅野茂隆, 池田康夫, 内山卓 監修. 第1部I-B. 33. 東京：文光堂. 2006
 38. 三輪史朗・渡辺庸之輔：血液細胞アトラス（第5版）361–452. 東京：文光堂. 2016
 39. Manuelidis L: Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3123–3127, 1984
 40. Ghadially, FN: *Ultrastructural Pathology of the Cell*. 42–45. London: Butterworths. 1975
 41. Manuelidis L: A view of interphase chromosomes. *Science* 1533–1540, 1990
 42. Haaf T, Schmid M: Chromosome topology in mammalian interphase nuclei. *Exp Cell Res* 192: 325–332, 1990
 43. Coupland RE, Tomlinson A: The development and maturation of adrenal medullary chromaffin cells of the rat *in vivo*: a descriptive and quantitative study. *Int J Devl Neuroscience* 7 (Development and plasticity of sympathoadrenal cells 特集号): 419–438, 1989
 44. Fakan S, Puvion E: The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol* 65: 255–299, 1980
 45. コーンバーグRD, クラッグA: ヌクレオソーム 日経サイエンス 4月号：96–112, 1981
 46. Axelrod J: Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis. *Science, N.Y.* 173: 598–606, 1971
 47. Carmichael SW, Winkler H: The adrenal chromaffin cell. *Sci Am* August 1: 30–39, 1985
 48. Trojer P, Reinberg D: Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28: 1–13, 2007
 49. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, et al: Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9

- methylation by RNAi. *Science* 297: 1833–1837, 2002
50. 中山潤一：高次クロマチンの形成機構とエピジェネティック制御 蛋白質 核酸 酵素 (特集エピジェネティックの制御機構) 53: 801–808, 2008
 51. Gay S, Foiani M: Nuclear envelope and chromatin, lock and key of genome integrity. *Int Rev Cell Mol Biol* 317: 267–329, 2015
 52. Cremer T, Cremer C: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292–301, 2001
 53. 田辺秀之：染色体テリトリー：間期核における染色体の核内配置と核高次構造に関する最近の研究 *Environ Mutagen Res* 25: 11–22, 2003
 54. Bolzer A, Kreth G, Solovei I, et al: Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3(5): e157, 2005
 55. Guelen L, Pagie L, Brasset E, et al: Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453: 948–951, 2008
 56. Finlan LE, Sproul D, Thompson I, et al: Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet* 4, e1000039. 10. 1371/journal.pgen.1000039. 2008
 57. Kumaran RI, Spector DL: A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence. *J Cell Biol* 180: 51–65, 2008
 58. Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H: Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452: 243–247, 2008
 59. Kosak ST, Skok JA, Medina KL, et al: Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296: 158–162, 2002
 60. Zink D, Amaral MD, Englmann A, et al: Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol* 166: 815–825, 2004
 61. Williams RR, Azuara V, Perry P, et al: Neural induction promotes large-scale chromatin reorganization of the Mash 1 locus. *J Cell Sci* 119: 132–140, 2006
 62. Peric-Hupkes D, Meuleman W, Pagie L et al: Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol Cell* 38: 603–613, 2010
 63. Wood JG, Girard PR, Mazzei GJ, Kuo JF: Immunocytochemical localization of protein kinase C in identified neuronal compartments of rat brain. *J Neurosci* 6: 2571–2577, 1986
 64. Cambier JC, Newell MK, Jastement LB, et al: Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* 327: 629–632, 1987
 65. 加地隆：松果体腫瘍と発達・思春期 2. 正常松果体との関連における松果体実質腫瘍についての考察 *弘前医療福祉大学紀要* 5: 1–18, 2014
 66. Altman J: Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135: 1127–1128, 1962
 67. Altman J, Das GD: Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207: 953–956, 1965
 68. Reynolds BA & Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707–1710, 1992
 69. Sanes DH, Reh TA, Harris WA : Development of the Nervous System (3rd ed). 66–73. Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 2012
 70. Gorgas K, Böck P: Morphology and histochemistry of the adrenal medulla. I. Various types of primary catecholamine-storing cells in the mouse adrenal medulla. *Histochemistry* 50: 17–31, 1976
 71. Kobayashi S: Adrenal medulla: Chromaffin cells as paraneurons. *Arch histol jpn* 40, Suppl: 61–79, 1977.
 72. Levi-Montalcini R, Aloe L: The effect of nerve growth factor on autonomic ganglion cells. *Autonomic Ganglia*. Elfvin L-G, ed. 401–426. Chichester, New York: John Wiley & Sons. 1983
 73. Tischler AS, Greene LA: Nerve growth factor-induced process formation by cultured rat pheochromocytoma cell. *Nature* 258: 341–342, 1975
 74. Greene LA, Rein G: Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells. *Brain Res*, 129: 247–263, 1977
 75. Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H: Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: Impairment by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci, USA* 75: 3498–3502, 1978
 76. Aloe L, Levi-Montalcini R: Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells *in vivo* into sympathetic neurons: Effect of antiserum to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1246–1250, 1979
 77. Levi-Montalcini R, Aloe L: Tropic, trophic and transforming effects of nerve growth factor. *Histochemistry and Cell Biology of Autonomic Neurons, SIF Cells and Paraneurons*. Eränkö O, Soimila S, Päivärinta H, eds. *Adv Biochem Psychopharmacol* 25: 3–16. New York: Raven Press. 1980

78. Unsicker K, Seidl K, Hofmann HD: The neuro-endocrine ambiguity of sympathoadrenal cells. *Int J Devl Neuroscience* 7 (Development and plasticity of sympathoadrenal cells 特集号): 413–417, 1989
79. Suzuki T, Kachi T: Immunohistochemical studies on supporting cells in the adrenal medulla and pineal gland of adult rat, especially on S-100 protein, glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Acta Anat Nippon* 70: 130–139, 1995
80. Suzuki T, Kachi T: Similarities and differences in supporting and chromaffin cells in the mammalian adrenal medullae: an immunohistochemical study. *Anat Rec* 244: 358–365, 1996
81. Böck P: *The Paraganglia*. 8–24. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1982
82. Quay WB, Kachi T: Amine-Secreting Endocrines. *Hormones and Aging*. Timiras PS, Quay WB, Vernadakis A, eds. 67–84. Boca Raton, New York: CRC Press. 1995
83. Katsetos CD, Herman MM, Balin BJ, et al: Class III β -tubulin isotype (β III) in the adrenal medulla: III. Differential expression of neuronal and glial antigens identifies two distinct populations of neuronal and glial-like (sustentacular) cells in the PC 12 rat pheochromocytoma cell line maintained in a gelfoam matrix system. *Anat Rec* 250: 351–365, 1998
84. Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, Lopes-Barneo J: Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131: 364–377, 2007
85. Macias D, Fernandez-Aguera MC, Bonilla-Henao V, Lopez-Barneo J: Deletion of the von Hippel-Lindau gene causes sympathoadrenal cell death and impairs chemoreceptor-mediated adaptation to hypoxia. *EMBO Mol Med* 6: 1577–1592, 2014
86. Rubin de Celis MF, Garcia-Martin R, Wittig D, et al: Multipotent glia-like stem cells mediate stress adaptation. *Stem Cells* 33: 2037–2051, 2015
87. Khan MB, Lee BR, Kamitani T: A simple and sensitive method for the demonstration of norepinephrine-storing adrenomedullary chromaffin cells. *Histochem Cell Biol* 138: 155–165, 2012
88. Wakabayashi K, Takahashi H: α -Synuclein, synphilin-1 and inclusion body formation in alpha-synucleinopathies. *Adv Brain Res. Cerebrovascular Disorders and Neurodegeneration*. Satoh K, Suzuki S, Matsunaga M, eds. 149–156. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 2003
89. Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S: α -Synuclein: Membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 211–233, 2010
90. Love S, Budka H, Ironside JW, Perry A (Eds): *Greenfield's Pathology* (9th ed). Vol.1. 740–753. Boca, London, New York: CRC Press. 2015
91. Maroteaux L, Campanelli J, Acheller RH: Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8: 2804–2815, 1988
92. Tanji K, Mori F, Imaizumi T, et al: Expression of α - and β -synucleins in cultured astrocytes and the effects of inflammatory cytokines. *Adv Brain Res. Cerebrovascular Disorders and Neurodegeneration*. Satoh K, Suzuki S, Matsunaga M, eds. 157–164. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 2003
93. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, et al: The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14: 467–475. 1995
94. Eränkö O: Fluorescing islets, adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla of some common laboratory animals. *Ann Med Exp Biol Fenn* 33: 278–290, 1955
95. ゴールドバーグ AL, エレッジ SJ, ハーパー JW: プロテアソーム 細胞がタンパク質を解体する仕組み *日経サイエンス* 4月号: 76–83, 2001

**Quantitative cytological study on the adrenal medulla
in normal, sham-operated and pinealectomized rats,
with special reference to time-of-day and differences
between adrenaline cells and noradrenaline cells.**

2. Discussion, especially on nuclei, supporting cells and differentiation

Takashi Kachi

Hirosaki University of Health and Welfare, 3-18-1 Sanpinai, Hirosaki 036-8102, Japan

Abstract

Based on the results of the analysis and integration, which were reported in the first part of this review, this study focused on the nuclear structures of adrenomedullary chromaffin cells, supporting cells and cellular differentiation. Among these, the main themes selected were differences between adrenaline cells and noradrenaline cells in the nucleoli and other nuclear structures, in the ratio of chromaffin cell surface covered with supporting cells, and the potentiality of supporting cells for the differentiation to paraganglion cells. Various old and new findings and concepts were presented and discussed. The main topics were as follows: 1. Concerning nuclear structures, the nucleolus, its ultrastructures and relationships with diurnal rhythms and functional activities, and relationships of its position with cell types, proliferation and differentiation, were mainly discussed, and differences in the chromatin pattern and the nuclear sap between two cell types were also mentioned. Particularly emphasized points in adrenomedullary chromaffin cells were: 1) the existence of adrenaline synthesis-related functions such as the PNMT enzyme and the glucocorticoid receptor in adrenaline cells, 2) comparisons with other types of cells including spermatogonia, sympathetic principal neurons and cerebellar Purkinje cells, and 3) research advances by using new molecular and cell biological methods regarding regional differences in intranuclear fine structures and gene transcriptional activities. 2. Supporting cells in the adrenal medulla and the carotid body which are classified as the paraganglia, and their potentiality of differentiation to the amine-producing cells (or supporting cells as stem cells) and Vhl gene involved in those were discussed, relating also to the body's adaptation and reserve mechanisms. 3. Recently reported results on α -synuclein and the intracellular catabolic system in adrenomedullary cells were also mentioned briefly.

Key words: nucleolus; ultrastructure; chromatin; cell division; gene expression