

日本解剖学会

第104回関東支部学術集会

会 期：平成28年11月19日（土）

会 場：横浜市立大学金沢八景キャンパス YCU スクウェア204号室

特別講演 マーモセットの自閉症モデル

一戸 紀孝
国立精神・神経医療研究センター、RIKEN BSI

新世界ザルマーモセットはブラジル赤道付近に住み、母親は一度に2頭の子供を産み、年に2度の出産を行う。子供は1年半で性的に成熟し、繁殖回転が速い。母親だけでは、この繁殖回転を支えられないので、父親、兄弟姉妹の協力で、子供を育てる協力的で prosocial な特性を持つ。母体へのバルプロ酸(VPA)の投与はヒト、げっ歯類で、自閉症の確率を著しく増大させる。我々はマーモセットにおいても VPA の母体投与を行い多様な社会行動試験、執着試験を行い自閉症を満了す症状を VPA 群マーモセットが示すことを見出した。ヒトのシナプス形成は、生後急速に増大し、1-5歳でピークに達し、思春期に強いシナプスの刈り込みが起こり、成人に至って、刈り込みは緩徐となる。げっ歯類のシナプス形成は、1ヶ月でピークに達し、その後は、緩徐な刈り込みみしか示さず、げっ歯類自閉症モデルは、ヒトでの自閉症診断期・確定期、行動療法期の脳内の病態生理を調査することができない。マーモセットの VPA 群は、ヒトの自閉症と同様に、ピークが高く、刈り込みが緩徐であるという、同様なエンドフェノタイプを我々は示す。我々はシナプスピーク時（3ヶ月）、刈り込みの強い（6ヶ月）の大脳皮質をサンプリし、ジーンチップで遺伝子発現を行った。VPA 群はシナプスの安定性を高める遺伝子群が高くなることが示された。これは、よいモデルとして使われると考えられる。

1 キンギョ脊髄損傷後におけるコンドロイチン硫酸の分布変化と軸索伸長への影響

武田 昭仁、船越 健悟
横浜市立大学医学部神経解剖学教室

哺乳類において中枢神経の損傷はグリア瘢痕を生じさせる。そこから分泌されるコンドロイチン硫酸は、軸索の再生を阻害する事が知られている。一方、再生に許容的な下等脊椎動物における中枢神経損傷後のグリア瘢痕の形成とコンドロイチン硫酸の発現については、ほとんど研究が成されてこなかった。そこで今回の研究では、キンギョの脊髄切断後の損傷側脊髄におけるコンドロイチン硫酸の種類や分布の変化、軸索に対する影響を免疫組織化学的に調査した。脊髄切断後1~2週間経過すると、損傷周辺部においてコンドロイチン硫酸の一種である CSA が細胞外で顆粒状に散在していた。さらに切断後6週間経過すると、損傷中心部の正中近くにおいて CSA がびまん性に発現している部位が出現した。さらに切断後1週間目の脊髄損傷部では、CSAの集積部位においても多数の Acetylated Tubulin 陽性の軸索が走行していた。一方、6週目になると CSA 沈着部位には軸索が存在せず、そこを避けるように伸長していた。また別種のコンドロイチン硫酸である CSC について、1~6週目のどの時点においても無傷に比べて増加や集積は確認できなかった。CSAの顆粒状反応はコンドロイチン硫酸の細胞外マトリクスへの沈着を示唆している。さらに、6週目における CSA のびまん性発現はコンドロイチン硫酸の沈着が蓄積した事を示している。従って、1、2週目においてはコンドロイチン硫酸の発現にも関わらず軸索の再生することが確認できた。一方で6週目になると軸索がコンドロイチン硫酸の沈着部位で影響を受けた原因としては、コンドロイチン硫酸の蓄積による増加が考えられる。

2 歯牙付着物分析による水中浸漬時間推定法の開発 ～第一報～

○石川 昂、見明 康雄、山本 仁

東京歯科大学 組織・発生学講座

【緒言】水中浸漬時間の推定は、水中死体に対する死後経過時間推定時の重要な評価項目の一つである。水中浸漬時間を推定する事は、死体の入水地点の特定につながり迅速な個人識別へとつながるものと考えられる。今回我々は、歯牙表面への付着物に着目し、水中浸漬時間の推定が可能かどうかを検討したので報告する。【方法・結果・考察】ヒト歯牙を河川水に浸漬し、エナメル質表面への経時的な付着物の変化を走査型電子顕微鏡および電子線マイクロアナライザーを用い比較検討した。浸漬時間は0・7・14・30日で分類し、1試料につき任意の5カ所で定性および定量分析（O, Si, Cl, Na, Al, Mg, Ca）を行った。定量分析の結果、Mgは14日で検出され30日にかけて上昇した。O, Cl, Naは0・7・14日で同等量検出され30日でも上昇した。Siは0日では検出されず7・14日で微量検出され30日でもさらに上昇した。これらの元素は14日と30日の2群間において有意な差を認められた。また、Alは30日で初めて検出が可能となった。Caの検出量に経時的な差は認められなかった。浸漬時間の延長と共に歯牙表面に様々な付着物が異なるタイミングで付着することが確認出来た。そのためこれらの物質が付着するタイミングや、その量を検討する事により、水中浸漬時間推定法への実務応用が可能になると考えられた。しかしこれらの結果は浸漬期間の季節や天気が分析結果に大きな影響を与える事が想定されるため、今後はこれらの因子を考慮すると共に水質（海・河川・湖）の違い等も含め幅広く検討していく必要がある。

3 樹突突起スパイン内分子動態解析

小橋 一喜^{1,2}、井上 康博^{2,3}、岡部 繁男^{1,3}
1. 東大・医・神経細胞生物学
2. 京大・再生研、3. CREST, JS

中枢神経系の興奮性シナプスの後部は、アクチン線維を主要な細胞骨格とする、樹突突起からつきだしたマッシュルーム様の微小突起構造であるスパインに形成される。アクチン線維を含むスパイン内部の微小構造やその動的変化はシナプス機能と強く関連していると考えられている。しかし、その大きさ(~1μm)のためスパイン内部における分子動態や分子集合体の状態を測定することは困難であり、現状では測定可能なパラメーターや方法論が限られている。細胞内での分子拡散は、細胞内構造に影響される。したがって、拡散を解析することで細胞内の微細構造を推定することができると考えた。本研究では、蛍光相関分光法(FCS)あるいは Raster image correlation spectroscopy (RICS) を用いて、スパイン内分子拡散を測定可能か調べた。さらに、薬剤処理やプローブを変化させることで拡散速度がどのように変化するかを調べた。本発表では、実験により得られた分子拡散がスパイン内部構造とどのような関係にあるかについて議論したい。

4 Mitochondrial expression of BLBP in the developing mouse dentate gyrus

Kyoji Ohyama, Toru Sato, Tatsunori Seki
Department of Histology and Neuroanatomy, Tokyo Medical University

Fatty acid-binding proteins (FABPs) bind toxic free FAs in the cytoplasm to transport and oxidize them in mitochondria. BLBP, a brain-type FABP is expressed in both developing CNS and adult neurogenic niche of the hippocampus (Nicola et al., 2015). Oxidization of FAs has been implied to damage mitochondria of BLBP+ cells in adult neurogenic niches, leading them to apoptotic cell death (Young et al., 2013). However, to our knowledge, no mitochondrial BLBP expression has been reported in either developing or adult hippocampus.

Here we first show that BLBP is expressed not only in the nuclei but also in the cytoplasm, consistent with previous studies. We further show that BLBP is localized in the mitochondria of neural progenitors at the marginal zone of the developing mouse dentate gyrus (DG). Given the apoptosis taking place in the developing hippocampus, we are currently investigating the relationship between mitochondrial BLBP+ progenitors and apoptosis.

5 自閉症モデル霊長類の発達期大脳皮質シナプス形成・刈り込みの異常

○佐々木 哲也^{1,2}、真鍋 朋子¹、中垣 慶子¹、一戸 紀孝^{1,2}

1. 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 微細構造研究部
2. 理化学研究所 脳科学総合研究センター 高次脳機能分子解析チーム

霊長類の大脳皮質では、出生直後から興奮性シナプスが急速に増え、児童期に最大値に達した後、減少するということが知られている(オーバーシュート型シナプス形成)。近年、このシナプス形成の異常が、様々な精神疾患に関与していることが明らかになりつつある。自閉症スペクトラム障害(ASD)の脳ではシナプス数の増加率が大きく、その後の刈り込みが少いため、過剰なシナプスが維持されていると考えられている。げっ歯類では、明確なシナプス刈り込みが観察されないため、ASDの研究を推進するためには、霊長類モデルが必要不可欠である。本研究では、DSM-5の診断基準を満たす自閉症様行動を示す胎生期バルプロ酸(VPA)曝露マウスの大脳皮質において、ヒトASD患者のシナプス形成の異常が再現できるか調査を行った。我々は、生後0日齢、2ヶ月齢(乳児)、3ヶ月齢(幼児)、6ヶ月齢(青年期)のVPAマウスの前頭前皮質(I2野)と一次視覚野(VI)の第3層錐体細胞に蛍光色素シヤファイエローを注入して基底樹状突起全体を可視化した。VPAマウスのシナプス形成と比較して生後2か月齢以降大きな樹状突起展開面積をもっていることがわかった。また、VPAマウスのスパイン密度は生後2ヶ月齢以降上昇していることが観察された。定型発達個体では、生後3か月齢から6か月齢にかけて約30%スパイン密度が低下する「刈り込み」が起こるのに対して、VPAマウスでは統計的に有意な変化は観察されず、この霊長類モデル動物でASD患者のシナプス刈り込み不全を再現できていることが分かった。ヒト自閉症脳の特徴を正確に反映したモデル動物を用いて自閉症の新しい治療法の開発を目指したいと考えており、現在VPAマウス大脳皮質の遺伝子発現解析を進めている。

6 胎生期マウス翼状突起における器官形成メカニズムの解析

廣内 英智、北村 啓、山本 将仁、松永 智、阿部 伸一
東京歯科大学解剖学講座

軟口蓋の緊張は、口蓋帆筋が口蓋腱膜を引張ることにより起こる。その際、翼状突起を軸に滑車運動が起こる。この滑車のコンポーネントの発生は個々に研究されており、蝶形骨翼状突起、口蓋腱膜は頭蓋神経細胞(CNC cell)に、口蓋帆筋は頭蓋沿軸中胚葉(CPM)に由来するといわれている。しかしながら、それぞれの組織が滑車を形成するプロセスは不明な点が多く残されており、軟口蓋の筋-腱-骨を同時に観察した報告はない。そこで今回我々は、蝶形骨翼状突起、口蓋腱膜、口蓋帆筋がどのように近づき、滑車構造を形成していくのかを明らかにすることを目的に検索を行った。試料として、胎生14-17日のマウスを用い、連続切片を作製した。形態学的観察のためにアザン染色を行った。また抗 desmin 抗体を用い筋腱接合部の形成過程を、抗 collagen type II (col II)抗体、Tartrate-resistant acid phosphate(TRAP)染色、Alkaline phosphatase(ALP)染色を用い翼状突起の骨形成過程を観察した。骨形成を客観的に評価するために、翼状突起の長径、幅径を計測、翼状突起内における破骨細胞数をカウントした。

実験結果から、筋腱接合部の形成時、翼状突起は初期の滑車構造を作るため先に長径を増加させたと考えられた。さらに筋腱接合部の形成後、翼状突起は筋収縮に耐えうる構造を形成するため幅径を増加させ、骨内部を急速に石灰化させたと考えられた。したがって、筋、腱、骨という組織単体の成長に加え、器官形成による相互作用が急速な成長を促すことが示唆された。

7 ヒストンメチル化酵素 Kmt2b 欠損による精原細胞分化障害の解析

小林 裕貴、富澤 淳一、大保 和之
横浜市立大学医学部組織学講座

種の存続のため、生殖細胞は次世代に唯一遺伝情報を伝える能力を持っている。雄生殖細胞である精子は、一生の大半で継続的に産生される。この精子産生は、精原幹細胞数の恒常的な維持が必要である。それは精原幹細胞の自己複製で自身の産生と精原幹細胞から精子への分化のため精原幹細胞数の消費とのシステムにより成立している。このバランスにより精原幹細胞系譜を保持できるが、この分子機構は不鮮明である。我々は近年、精原幹細胞にて大規模なエピジェネティックな変化・変換期を発見し、これが精子への分化開始点に重要であると報告した。

今回、我々は目標をエピジェネティック変化による精原幹細胞の解明とし、男性不妊症に関わりエピジェネティック修飾のヒストンメチル化酵素の一つの Kmt2b に着眼した。本研究では、精原幹細胞から精子への分化過程にて Kmt2b 欠損マウスでは大規模なエピジェネティック変換期に異常が見られたが、それ以前の精原幹細胞の維持には影響がなかった。さらに Kmt2b が制御する遺伝子を網羅的に解析した結果、様々な精原幹細胞分化過程において精子形成に関わる遺伝子のエピジェネティックな調節に重要な働きを担うことが示唆された。

8 大脳皮質ニューロンの樹状突起形成におけるセロトニン4型受容体の機能解析

○加瀬谷治樹¹、志賀隆^{1,2}
¹筑波大学大学院フロンティア医科学専攻、²医学医療系

セロトニン(5-HT)は成体の脳では神経伝達物質として神経精神活動を制御し、その異常はうつ病などの精神疾患に関与する。5-HT受容体には1~7型まで存在するが、その中でも5-HT4型受容体の活性化はうつ病のモデルマウスを用いた行動実験において、既存の抗うつ薬と比較して即効性を示したことから注目されている。また、5-HTは発達期では神経栄養因子としてニューロンの神経発生過程を制御するが、その作用を担う5-HT受容体の役割について不明な点が多い。

発達過程において、神経細胞は細胞体から複数の神経突起を伸ばし(神経突起の新生)、それらが伸長や分岐をしながら軸索と樹状突起に分化する。これらのプロセスによって、特徴的な樹状突起と軸索の形態をとるようになり、その形態は機能と密接な関連がある。そこで本研究では樹状突起の発達に注目した。

胎生18日目のラット胎仔から前頭皮質を取り出し、神経細胞を分散培養した。その際に、5-HT4受容体作動薬(RS 67333)を慢性添加した。培養4日目に樹状突起のマーカーである微小管関連タンパク質に対する抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得し、樹状突起の発達について解析した。その結果、5-HT4受容体作動薬添加によって樹状突起の伸長と分岐形成が促進されることが明らかになった。5-HT4受容体作動薬による作用は、5-HT4受容体拮抗薬の同時添加で打ち消されたことから、5-HT4受容体を介する特異的な作用であることが確認できた。したがって、5-HT4受容体は樹状突起の形成に対して促進作用を持つことが示された。

9 キンギョの視神経切断後における再生軸索の癒痕通過メカニズム

根岸 春樹、武田 昭仁、船越 健悟
横浜市立大学大学院 神経解剖学

傷害によって不可逆的な損傷を蒙る哺乳類の中樞神経系と異なり、魚類や両生類などの中樞神経系においては軸索の再生が起きることが知られている。しかし解析が進む脊椎などに比べ、同じく中樞神経系としてグリアの構成が異なっている視神経での損傷部における詳細な再生メカニズムを解析した研究は少ない。本研究ではキンギョの視神経切断の損傷部を用い、グリアおよび細胞外マトリックスと再生軸索との関連を調べた。キンギョに開頭手術を行い、左側の視神経をメスで完全切断した。室温で1週、2週、3週、6週飼育後灌流固定を実施し、免疫組織化学的に多重染色を行い無傷のキンギョとの比較を行った。切断後21日モデルには電子顕微鏡における詳細な観察も行った。切断1週目では切断部に線維性の癒痕を確認した。14日においては一部軸索で癒痕部への進入が確認されたが、軸索の方向は一定ではなかった。21日では基底膜と膠原線維が軸索に沿って走行するとともに、軸索の束状構造が癒痕部を貫通しているのが観察された。さらに6週では損傷部を通過した軸索周囲を正常視神経と同様に基底膜と膠原線維から成る結合組織が囲んでいた。キンギョの視神経の切断により、線維性癒痕が形成されるものの、正常の視神経でみられる基底膜とコラーゲンによる束状構造が再構築されることにより、軸索の通過が可能になるという事が考えられる。

10 A549細胞とHeLa細胞におけるEGFRに対する放射線の効果

○塚原 愛海、青木武生 群馬県立県民健康科学大学 診療放射線学部

【目的】腫瘍細胞はEGFR過剰発現が特徴的であり、放射線による腫瘍の感受性は、EGFRとCaveolin-1が関与しているといわれている。今回は癌細胞のなかでも、A549とHeLa細胞に注目し、放射線によるEGFRとCaveolin-1の挙動を確認し、異なる癌細胞における両蛋白質の挙動の違いを蛍光顕微鏡で確認する。【方法】A549とHeLaに2Gyまたは4Gy(AIとCuフィルタ無し)のX線を照射し、20分後に固定。その後、核、EGFR、Caveolin-1を抗体による蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。【結果】無刺激細胞において、A549細胞ではEGFRとCaveolin-1が、HeLa細胞ではEGFRのみが細胞表面で発現していた。放射線照射後両細胞では両蛋白質は内在化され、特徴的な区画内で共局在が観察されるが、この局在は細胞によって異なっていた。核の変形も顕著に観察された。細胞内の共局在部位はEEA1陽性所見から初期エンドソームと思われるが、以前の論文で指摘されていたような、核への移行は頻繁には確認できなかった。一方、この放射線照射誘導性のEGFR陽性部分ではcaveolin-1はリン酸化されており、H₂O₂でも類似した反応が再現できた。【考察】A549細胞とHeLa細胞では放射線に対して、EGFRは異なる局在を示した。腫瘍細胞が異なる放射線感受性で、それに呼応した蛋白質の挙動が異なると考えられる。今後詳しく実験し、放射線による感受性とその効果について解明していく。

11 子宮内電気穿孔法を用いたマウス脳内神経細胞における活動制御の試み

ハズラ デバブラタ、久保 健一郎、仲嶋 一範
慶應義塾大学 医学部 解剖学教室

近年、光遺伝学は大幅な発展を遂げ、部位特異的な光感受性チャネルの発現により部位特異的、時間特異的かつ可逆的な神経細胞の活動制御が可能になった。しかし、今日用いられているウィルスベクター等を用いた一般的な神経細胞への光感受性チャネルの導入方法では、大脳皮質の層特異的な光感受性チャネル発現は不可能である。大脳皮質は組織学的に数層に分かれており、それは前頭前皮質においても例外ではない。組織学的に異なる層には異なる働きがあると予想され、報告されている前頭前皮質の高次脳機能はその個々の層の働きの統合であるとも考えられる。そこで所属研究室にて開発された技術であり、層特異的な遺伝子導入を行うことができる子宮内電気穿孔法を用いて、マウス前頭前皮質に光感受性チャネルを発現させた。マウスが出生、生育した後光刺激用のプローブを取り付ける手術を行い、低周波数帯の光刺激を加えて行動への影響を観察した。行動解析にはY字迷路試験及びオープンフィールド試験を用いた。Y字迷路試験は作業記憶を判定するといわれており、低周波数帯による刺激でそのスコアがどのように変化するかについて解析と検討を行った。

12 新生仔期及び幼若期脊髄損傷ラットにおける一次知覚線維の脊髄への投射による後肢運動の機能代償メカニズムの解析

池田 佳彦¹、香月 健吾¹、丁 一澤¹、宮下 郁苗²、武田 昭仁³、滝口 雅人³、船越 健悟³

1.横浜市立大学 医学部 医学科 4年 2.横浜市立大学 医学部 医学科 3年
3.横浜市立大学 医学部 神経解剖学

成体ラットが胸髄切断を受けると後肢の運動機能が失われほとんど回復しないが、新生仔ラットの場合にはある程度の機能回復が起こることが知られている。当教室では新生仔期胸髄切断後に一次知覚線維の脊髄前角や中間質への投射が増加することを形態学的に明らかにした。本研究では、この一次知覚線維の変化はいつどのように起こるか、及び切断する時期によって変化するかを解析するために以下の実験を行った。(1) 後肢の運動機能が回復しない幼若期である出生後 20 日齢 (P20) において胸髄切断し、一次知覚線維の脊髄への投射を後根神経節への順行性トレーサー注入により調べた。(2) 新生仔期である P5 において胸髄切断し、より早い段階 (P19) でトレーサー注入し一次知覚線維の脊髄への投射を解析した。(3) 発達段階の脊髄切断後のペリニューロナルネット (PNN) の発現を解析した。P20 における胸髄切断後では、後肢の運動機能は回復しなかったが一次知覚線維の脊髄前角や中間質への投射は増加していた。P5 の胸髄切断から 2 週間後 (P19) にトレーサーを注入したラットの一次知覚線維の脊髄前角や中間質への投射は、正常ラットに比べてわずかに増加していた。また、幼若期の脊髄損傷後の PNN の発現は他の時期の損傷に比べて著しく増加していた。以上の結果から、新生仔期胸髄切断後の一次知覚線維の投射の変化する時期は新生仔期に始まるか、幼若期に著しく起きていることが明らかになった。また、幼若期の胸髄切断後には一次知覚線維の脊髄前角や中間質への投射が増加するが、PNN の発現によって適切なシナプス形成が行われなかった可能性が示唆された。