

日本解剖学会

第63回東北・北海道連合支部学術集会

会期：平成29年9月9日（土）、10日（日）

会場：弘前大学大学院保健学研究科 E 棟

1 マクロファージの抗炎症性機能分化における細胞内代謝の変化とFABP7との関与

○宮崎啓史¹、穴戸愛¹、香川慶輝¹、安本有希¹、南都文香²、大和田祐二¹
東北大学大学院¹医学系研究科 器官解剖学分野、²医工学研究科 分子病態医工学分野

背景 マクロファージは、細胞内外の刺激に応答して糖や脂質の代謝が変化し、炎症性・抗炎症性の機能を活性化させる。我々はこれまで、肝マクロファージに発現する脂肪酸結合蛋白質7型 (FABP7) が、マクロファージの抗炎症性変化に特徴的な、死細胞食能の制御や、肝の線維化過程に関わることを明らかにした。しかし、FABP7によるマクロファージの抗炎症性機能活性化 (M2 極性化) に対する制御機構は不明である。今回、マクロファージの M2 極性化における細胞内代謝の変化と FABP7 の関与を検討した。

方法 C57BL/6 (WT) マウスおよび FABP7-KO マウスの骨髄由来マクロファージ (BMM) に対し、M2 極性化を誘導する IL-4 刺激により、M2 マーカー分子の発現を比較検討した。また、刺激後の解糖系やミトコンドリア呼吸などの細胞内代謝の変化を、細胞外フラックスアナライザーで測定した。

結果 IL-4 刺激後、KO-BMM では、M2 マーカー遺伝子の発現が WT-BMM と比較して低下していた。IL-4 刺激後、ミトコンドリア呼吸の指標となる酸素消費速度を計測すると、WT-BMM と比較して、KO-BMM で有意に低下していた。また、脂肪酸酸化阻害剤実験では、WT-BMM と比較して KO-BMM で、脂肪酸酸化に依存した酸素消費速度の低下が認められた。

考察 FABP7 は、ミトコンドリアの脂肪酸酸化を制御することで、マクロファージの M2 極性化の調節機構に関与する可能性が示された。(COI: なし)

2 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 構成蛋白質 Ndufs4 がアストロサイトミトコンドリアの機能および動態変化におよぼす影響

○南都文香^{1,2}、Angelina Misiou¹、Subrata Kumar Shil¹、阿部高明²、大和田祐二¹
東北大学医学系研究科器官解剖学分野¹、医工学研究科分子病態医工学分野²

【背景】近年、脳細胞におけるミトコンドリア機能異常は種々の神経変性疾患と関連することが報告されている。しかし、これら病態におけるグリア細胞のミトコンドリア機能とダイナミクスの意義についてはほとんどわかっていない。Ndufs4 はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の構成蛋白質で、この遺伝子の欠損はミトコンドリア障害を誘導する。そこで本研究では Ndufs4 欠損マウスの初代培養アストロサイトをを用いて、Ndufs4 がミトコンドリア機能とダイナミクスにおよぼす影響について検討した。

【方法】Ndufs4 遺伝子欠損型 (KO) および野生型 (WT) マウスの新生児大脳皮質から初代培養アストロサイト作製し、細胞形態および細胞増殖能を比較した。ミトコンドリア機能は細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度 (ミトコンドリア呼吸能の指標) を測定した。形態はミトコンドリアを MitoTracker で標識し観察した。【結果・考察】アストロサイトの形態は KO と WT の違いはなかったが、7日間培養後の生細胞数は WT と比較して KO で有意に低く、Ndufs4 欠損による細胞増殖能の低下が示唆された。KO アストロサイトでは酸素消費速度が WT と比較して低く、ミトコンドリア機能の低下が示された。KO では長い形態のミトコンドリアが多く観察された。以上の結果から、アストロサイトにおける Ndufs4 欠損はミトコンドリア機能を低下させ、細胞増殖能低下を誘導する可能性が示された。ミトコンドリア機能、形態および動態がこれら変化にどのように影響するかについてはさらなる検討が必要である。(COI: なし)

3 哺乳類細胞オートファゴソーム形成過程における膜構造変化の解析

荒井律子、和栗聡
福島県立医科大学 解剖・組織学講座

細胞内大規模分解系であるオートファジー (自食作用) が発動すると、隔離膜が細胞質の一部を取り囲みながら伸張し、これが閉じてオートファゴソームとなる。その後リソソームと融合することにより、内容物は分解される。最近新潟大学の山下らによって、鉄キレート剤 deferiprone (DFP) によって誘導されるマイトファジーにおいて、ミトコンドリア構造の一部分がオートファゴソーム膜に覆われ、分離されることが報告された。しかしながら、この時の膜構造の微細形態についてはほとんど明らかにされていない。そこで CLEM (correlative light electron microscopy) 法を用いて同微細形態を解析することを本研究の目的とした。オートファゴソーム形成マーカーである EGFP-LC3 およびミトコンドリアマーカーである Mito-mCherry を発現する HeLa 細胞を、番地が刻まれたカバースリップ上で培養し、1 mM DFP 存在下、24 時間の誘導処理を行った。パラフォルム・グルタルアルデヒド混合液を用いて固定した後、ミトコンドリア上に LC3 ドットが認められる細胞の蛍光画像を番地と共に記録した。その後、還元オスミウム法による電顕試料を作製し、記録した細胞の連続切片電顕画像を取得した。同一細胞の蛍光像および電顕像を重ね合わせる画像解析を行った結果、蛍光画像で検出したマイトファジー部位において、ミトコンドリア構造の一部分が出芽したような形態をとり、その出芽部を隔離膜が密着して覆う電顕像を得ることができた。これは機能不全のミトコンドリアが特異的かつ直接的にオートファゴソーム分解される選択的マイトファジーの一過程であることを示唆する (COI: なし)

4 超解像顕微鏡による収縮環形成機構の解析

○上条 桂樹
東北医科薬科大・医・解剖学

動物細胞の細胞質分裂は、収縮環の収縮により進行する。収縮環は、分裂後期に染色体間の細胞表層に一過性に作られ、主にアクチンと II 型ミオシン (ミオシン II) から構成されるが、その形成機構の多くは不明のままである。昨年、私たちは、収縮環のアクチンおよびミオシン II フィラメントのほとんどが、分裂後期に新たに赤道面で形成されることを報告した。今回、収縮環の形成機構を解明するために、LLC-PK1 細胞 (ブタ尿細管上皮) を底面側 (腹側) から、超解像顕微鏡 STED で観察した。分裂後期の開始 (染色体の分離) とともに、赤道面のいくつかのスポットで、アクチンフィラメントが放射状に長く伸び出すのが観察された。分裂後期の進行に伴い、アクチンの伸びるスポットの数は増加し、縦線の向きは赤道面と平行となった。直鎖状のアクチンフィラメントの形成を促進する Rho エフェクター分子 DIAPH3/mDia2 を免疫染色したところ、アクチンの伸び出すスポットに一致して局在し、DIAPH3/mDia2 の RNAi では、赤道面でのアクチンの伸長が抑えられた。一方、ミオシン ATPase 阻害剤プレビスタチンで細胞を処理したところ、赤道面のスポットからのアクチンの伸長は起こるものの、アクチンフィラメントの向きは赤道面と平行にならなかった。これらの結果から、収縮環のアクチンフィラメントは、赤道面に局在する DIAPH3/mDia2 から放射状に伸長し、ミオシンとの架橋により赤道面と平行になると推定された。(COI: No)

5 DGK ζ 結合蛋白 NAP1-like proteins を介する p53 アセチル化制御による細胞周期および細胞死の制御機構の解析○田中 俊昭、後藤 薫
山形大・医・解剖学第二講座

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は PKC の生理的活性調節因子と考えられ近年、その機能的役割として癌や細胞死のシグナル伝達への関与が注目されている。我々は、新規 DGK ζ 結合蛋白として Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP1L1), NAP1-like 4 (NAP1L4) を同定し、これら蛋白による細胞周期および DNA 損傷による細胞死への影響について解析を行っている。これまでの研究により、NAP1L1 ノックダウン細胞では細胞増殖が促進し、一方 NAP1L4 をノックダウンすると細胞増殖が抑制されることを明らかにした。また DNA 損傷ストレスに対して、NAP1L1 ノックダウン細胞は脆弱性を示すのに対して、NAP1L4 ノックダウン細胞は抵抗性を示すことを見出した。細胞周期および細胞死は様々な分子によって制御されているが、その中でも癌抑制遺伝子産物 p53 が重要な役割を果たしており、その多彩な機能はリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾により制御されている。今回我々は、NAP1L1 および NAP1L4 が細胞周期および細胞死において相反する作用を及ぼすメカニズムに関して、p53 アセチル化現象を解析した。その結果、NAP1L1 ノックダウンでは 382 番目リジンのアセチル化が亢進するのに対して、NAP1L4 ノックダウンでは 320 番目リジンのアセチル化の亢進が認められた。以上のことから、NAP1L1 および NAP1L4 はそれぞれ特有のリジン残基のアセチル化を介して p53 を制御し、細胞周期および細胞死を調節している可能性が示唆された。(COI: なし)

6 紫外線による眼球毛様体小帯の変化

白戸佑貴¹、吉野浩教¹、寺島真悟¹、細川洋一郎¹、敦賀英知¹、
弘前大学大学院保健学研究科放射線技術科学領域¹

眼球の毛様体小帯はオキシタラン線維より構成され、毛様体筋の収縮を効率的に水晶体に伝える役割を担う。加齢に伴う毛様体小帯の変化は水晶体の機能に影響を及ぼすと考えられる。毛様体小帯は構造的に、太陽光の紫外線 UV-A (波長 320~400nm) と UV-B (波長 290~320nm) のどちらにも暴露される。そこで、紫外線が毛様体小帯に与える影響について細胞培養系を用いて解析した。毛様体小帯は無色素毛様体上皮細胞 (HNPCEC) が産生する。HNPCEC を 4 週間培養し、UV-A および UV-B (0, 50, 100 および 150mJ/cm²) を照射し、24 時間後の形態学的変化を Fibrillin-1、-2 の免疫染色により解析した。更に、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -2、-9 の阻害剤の添加による影響も検討した。UV-A 照射による Fibrillin 陽性線維には変化はなかった。UV-B 照射では、Fibrillin-1 陽性線維は 100 mJ/cm² の照射により線維径が減少し、150mJ/cm² で無定形の構造になった。Fibrillin-2 陽性線維は線量依存的に連続性が失われ、150mJ/cm² で消失した。これらの変化は MMP-2、-9 の阻害剤添加により抑制された。以上の結果から、UV-B 照射により毛様体小帯は分解され、MMP-2 または MMP-9 が分解機構に関与する可能性が示唆された。(COI: なし)

7 新生子マウス眼球で消退する硝子体血管内に集積する Galectin-3 陽性細胞

岸本亜由子
北海道大学大学院医学院 組織細胞学教室

眼の血管系は、まず、胎子期に硝子体動脈が眼球乳頭部から進入し、硝子体全体と水晶体後面をおおう硝子体血管系となる。この血管系は産後期までに次第に退縮する。それと入れ代わり、血管網 (網膜中心動脈) が網膜内を広がる。先行研究によって硝子体血管近傍に LYVE-1 陽性のマクロファージが集まり、消退時の血管の処理に関与することが示されているが、消退のメカニズムや誘導機構については不明のままである。われわれは、硝子体血管に付随する細胞群をさまざまなマーカーを使って解析する過程で、糖結合タンパク質の一種 Galectin-3 陽性の細胞が硝子体血管内に集積することを見出した。これらの細胞の特徴を明らかにすることで、硝子体血管の消退に関わる可能性をさぐることにした。

硝子体血管外の LYVE-1 を発現する細胞はリソソームのマーカーである Cathepsin D を強く発現し、消化分解活性が高いことがわかった。また LYVE-1 陽性細胞は F4/80 陽性であり、純粋なマクロファージであることを確認した。LYVE-1/F4/80+細胞は Galectin-3 抗体には反応しないが、血管内部に多数の Galectin-3 陽性細胞が出現した。これらは、LYVE-1 と F4/80 抗体の両方に陰性であった。一方で、Galectin-3 陽性細胞は顆粒球や単球系のマーカーである CD11b と CD68 を発現していた。Galectin-3 陽性細胞には分葉する核を持つものがあり、大多数がペルオキシダーゼ活性を持つ顆粒を有していた。ただし顆粒の数が少なく、幼若な好中球と言える。(COI: なし)

8 ニワトリ胚頸髄特異的細胞死と Hox 転写因子群の関連

○向笠勝貴、佐久間千恵、八木洋洋行
福島県立医科大学 医学部 神経解剖・発生学講座

脊髄運動神経の発生過程では、共通の前駆細胞から複数の種類の運動神経が分化してくるが、脊髄の位置によってその分化様式は異なっている。脊髄の全長にわたって分化する体軸筋支配神経に加え、上肢と下肢の領域では四肢支配神経が、胸髄では肋間筋支配神経と交感神経節前神経が分化する。頸髄に関しては、四肢や肋間筋に相当する筋肉が存在しないことから、主に体軸筋支配神経のみが分化すると考えられるのだが、ニワトリ胚発生過程の観察から、頸髄には同調して細胞死に至る一定の細胞群も存在することが明らかになっている。頸髄だけに見られるこの細胞群の形態はこれまでよくわかっていなかったが、我々のこれまでの研究により、この細胞群は上肢支配神経と相同であることが明らかとなってきた。このことから、上肢支配神経は一度、上肢よりも吻側に広く形成されるが、その後、頸髄では除去され、上肢領域では維持されるという発生様式が考えられた。しかし、この細胞の生死を制御している分子基盤は全くわかっていない。本研究では、脊髄吻尾軸上の特定の位置で発現する Hox 転写因子群が細胞死に関係すると予想し、この仮説の検証を行った。

Hox6 は上肢領域と一致して発現することが報告されている。頸髄で細胞死が起こっている領域を活性化 Caspase3 (Casp3) で調べ、これを Hox6 の発現領域と比較すると、Casp3 と Hox6 はほぼ重複しないことがわかった。このことから、上肢領域では Hox6 が細胞死を抑制していると考えられた。このことを確かめるために、Hox6 を頸髄で異所的に発現させたところ、頸髄で見られる細胞死が減少した。Hox 転写因子には多くのパラログが存在し、機能重複が見られることから、複数の Hox が Hox6 と重複した機能を持っていると考えられる。上肢領域での発現が報告されている Hoxa6, a7, c8 を頸髄に異所的に発現させたところ、Hox6 と同様、細胞死の減少が観察された。一方、Hoxa4, a5, c5 で、同様の実験を行ったところ、頸髄の細胞死に影響は見られなかった。これらの結果から、頸髄で見られる細胞死は Hox6-8 が発現しない細胞で実行され、Hox4-5 は細胞死に対して誘導的あるいは許容的に関与していることが示唆された。今後は、Hox4-5 と細胞死の直接的な関連があるかどうかの検討を行う。(COI: なし)

9 平面内細胞極性を司る新規調節機構の解析

○鮎川友紀、八月朔日泰和、山崎正和
秋田大学大学院 医学系研究科 細胞生物学講座

平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) とは、組織平面において、細胞集団の向きが特定の方向に揃う現象であり、組織・器官の機能発現に重要な役割を果たす。ショウジョウバエを用いた解析から、PCP 制御分子は機能の違いにより二つのグループに分類されている。第一のグループは、7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Fz) や 7 回膜貫通型カドヘリン Flamingo (Fmi) 等によって構成されるコアグループである。これらの分子は個々の細胞において偏在化し、この偏在化が細胞の極性形成に中心的な役割を担う。第二のグループは、非典型的カドヘリン分子である Dachsous (Ds) や Fat (Ft) 等によって構成される Ds グループである。Ds グループ分子はコアグループ分子の上流で器官の方向情報として働き、特定の方向に沿って個々の細胞の極性の向きを揃えるのに重要である。

これまでに我々は、ショウジョウバエを用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行い、PCP に関わる多くの新規遺伝子を同定している。興味深いことに、このスクリーニングの結果を基に行った分子遺伝学的解析から、我々は既知の PCP 制御グループとは異なる PCP 制御グループの存在を見出し、この新規グループの構成因子を複数同定することに成功した。(COI: なし)

10 ハムスターの褐色脂肪は生後に白色脂肪が変化して形成される

小林 純子¹⁾、岡松 優子²⁾、坪田あゆみ²⁾、長屋 一輝²⁾、木村 和弘²⁾、岩永 敏彦¹⁾

1) 北海道大学 大学院医学研究院 解剖学講座 組織細胞学教室
2) 北海道大学 大学院獣医学研究院 生化学教室

脂肪組織には、脂肪を貯蔵する白色脂肪と脂肪を熱に変換することで体温調節に寄与する褐色脂肪がある。本研究は、ハムスターの褐色脂肪が生後どのように発達するかを明らかにするため、形態学的解析を行った。

生後 5~16 日齢のシリアンハムスターより、他の動物で褐色脂肪の存在部位として知られる肩甲間の脂肪組織を採取し、形態学的解析を行った。また、白色脂肪として、鼠径部の脂肪組織を採取した。HE 染色により観察すると、生後 5 日目の肩甲間の脂肪組織は白色脂肪細胞で占められており、鼠径部の脂肪組織と同様の形態を示していた。組織の周辺部には小型の非脂肪細胞が存在し、それらは分裂細胞のマーカーである Ki67 を発現していた。生後 7 日目になると、非脂肪細胞の割合が増加した。生後 10 日目では、多房性の脂肪滴をもつ uncoupling protein 1 (UCP1) 陽性の細胞が認められるようになり、生後 16 日目にかけて、典型的な褐色脂肪組織へと変化した。生後 7 日目以降には、多房性の脂肪滴をもつ褐色脂肪細胞のほかに、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の中間型と考えられる、比較的小型で、中程度の大きさの脂肪滴のほかに小型の脂肪滴をもつ UCP1 陽性の細胞が多く観察された。褐色脂肪細胞の細胞膜に強く発現することが知られる Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) の免疫電顕では、典型的な褐色脂肪細胞と小型で脂肪滴を持たない未分化細胞様の細胞の細胞膜に強い MCT1 陽性反応が認められた。加えて、比較的小さい脂肪滴をもつ中間型の細胞の細胞膜にも MCT1 の陽性反応が認められた。

以上より、ハムスターの褐色脂肪は生後に形成され、その発達には、1) 未分化細胞が分裂増殖し、褐色脂肪細胞になる経路と、2) 白色脂肪細胞が褐色脂肪細胞へと変化する経路の 2 つが関与すると考えられる。(COI: なし)

11 小臂筋における脂肪浸潤の組織学的検討

○高野優太¹、小林裕人²、由利拓真¹、吉田沙織²、内藤輝²、清重佳郎¹
山形県立保健医療大学大学院 保健医療学研究科¹
山形大学医学部 解剖学第一講座²

【背景】小臂筋は前方線維と後方線維からなり、作用や歩行時の活動はそれぞれ異なることが報告されている。また、高齢になるに従い、前方線維の深層に局限した脂肪浸潤が生じることが MRI を用いた研究により明らかにされているが、この浸潤がどのように生じるかについての詳細な報告はない。【材料と方法】山形大学医学部解剖実習用献体 6 体 9 下肢 (81.5±6.4 歳) を用い、小臂筋の前方線維の脂肪浸潤部と非脂肪浸潤部、後方線維からそれぞれ筋組織を採取し材料とした。HE 染色で組織像の観察、免疫染色で組織像の観察、type 別筋線維数、組成の算出を行い、各群間を比較した。一次抗体には anti-slow myosin heavy chain (MHC) と anti-fast MHC を用いた。本研究は山形大学医学部倫理委員会による承認 (#315) を得て行った。【結果】3 群ともに、脱神経所見とされる type2 線維の小角化が見られ、特に脂肪浸潤部で顕著に観察された。脂肪浸潤部では、筋束単位で筋線維が筋内膜を残し消失しており、後方線維よりも筋線維数が少なく、これは type1 線維の減少によるものであった。また、神経再支配の所見である type grouping は他群と比較し、わずかしか見られなかった。【考察】脱神経筋線維は神経再支配を受け type grouping を形成し、再支配されない場合、筋線維の消失が起きるとされる。今回の結果より、小臂筋の脂肪浸潤部における type1 線維数の減少には脱神経・神経再支配のサイクルの破綻が関係している可能性が示唆され、また、脂肪浸潤は脱神経後、神経再支配を受けずに消失した筋線維のスペースを埋めるように生じることが示唆された。(COI: なし)

12 DGKε欠損は白色脂肪細胞における脂質代謝異常を惹起する

○中野 知之、後藤 薫
山形大学・医学部・解剖学第二講座

摂食によるエネルギーは、中性脂質 (TG) の形で白色脂肪細胞に貯蔵され、TG は必要に応じて分解され、エネルギー源として用いられる。ジアシルグリセロール (DG) は TG 合成の中間産物であると同時に細胞内情報伝達物質として機能する脂質分子である。よって DG は TG 合成系と細胞内情報伝達系の双方を調節するハブとして考えられる。我々は DG のリン酸化酵素 DG キナーゼ (DGK) の遺伝子欠損 (KO) マウスを解析する過程で、ε型 DGK-KO マウスを高脂肪食で飼育すると、白色脂肪の沈着とインスリン抵抗性が生じることを報告した。今回我々は、その詳細なメカニズムを報告する。組織学的解析から、DGKε-KO マウスの精巣上体白色脂肪細胞は、大型化していることが分かった。白色脂肪組織から脂肪細胞を単離し、ウェスタンブロット解析を行った結果、DGKε⁻白色脂肪細胞では、Adipose TG lipase および Hormone-sensitive lipase のタンパク発現が低下していた。両酵素はそれぞれ、TG を DG に、DG をモノグリセリドに分解する酵素であることから、高脂肪食給餌下において DGKε の欠損は脂質分解系全般の機能低下を惹起することが示唆された。肥満状態の脂肪組織にはマクロファージが傷害を受けた脂肪細胞を取り囲む Crown-Like Structure (CLS) が形成され、TNFα など種々のサイトカインが放出される。DGKε-KO マウスにおいては CLS が増加しており、これらは TNFα の免疫陽性反応を示していた。TNFα はインスリンシグナルを障害することが知られている。本研究の結果から、DGKε 欠損は脂質分解酵素の機能低下を惹起し、脂肪細胞を大型化することが明らかになった。さらに CLS 形成により、TNFα が産生され、インスリンシグナルが障害される可能性が示唆された。

13 雌雄ラットの尿道に存在するセロトニン陽性内分泌細胞の組織分布および神経支配

○横山拓矢、齋野朝幸
岩手医科大学 解剖学講座 細胞生物学分野

【背景と目的】尿道の上皮内にはセロトニン (5-HT) を含有する内分泌細胞が存在しており、内腔の刺激を受容して 5-HT を分泌していると考えられている。本研究では、尿道における 5-HT 陽性内分泌細胞の分布と神経支配を免疫組織化学により調べた。
【材料と方法】Wistar ラット (雌雄、8-12 週齢) を灌流固定後、尿道の凍結切片を作製した。切片は 5-HT、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、サブスタンス P (SP)、神経型 NO 合成酵素 (nNOS)、ドパミン β-水酸化酵素 (DBH)、小胞性 ACh 輸送体 (VChT) に対する各種抗体を用いた二重蛍光抗体法によって染色後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。【結果と考察】雄の尿道では、前立腺部において多数の 5-HT 陽性細胞が観察されたが、膜性部では散在性に認められ、海綿体部では少数の細胞のみ分布していた。前立腺部では、細胞の周囲に CGRP 陽性および SP 陽性の一次求心性神経が認められたことから、内分泌細胞は尿道の知覚に関与している可能性がある。膜性部では細胞に接して DBH 陽性の交感神経、VChT 陽性および nNOS 陽性の副交感神経が観察されたことから、排尿機能の調節に内分泌細胞が関係している可能性がある。雌の尿道では、内尿道口から外尿道口まで多数の 5-HT 陽性細胞が観察された。雌の尿道は雄の海綿体部に相当する部分を欠くため、雌雄で内分泌細胞は同様の分布を示していると考えられる。雌の尿道上皮には CGRP 陽性および SP 陽性の一次求心性神経が豊富に分布しており、5-HT 陽性細胞に接していたことから、雌の尿道において内分泌細胞は尿道の知覚に関与している可能性がある。COI: No

14 シェーグレン症候群での耳下腺分泌障害には交感神経系が関与している可能性がある。

守口 霞^{1,2}、東尾 弘典³、横山 拓矢¹、久慈 昭慶²、佐藤 洋一^{1,4}、○齋野 朝幸¹
岩手医科大学解剖学講座細胞生物学分野¹、歯学部口腔保健育成学講座小児歯科学・障がい者歯科学分野²、教養教育センター化学科³、医学教育学講座⁴

【目的】シェーグレン症候群とは外分泌腺の乾燥性症状を主とし、慢性炎症を引き起こす自己免疫疾患である。本研究ではモデルマウス (NOD) を用い、耳下腺での各種分泌機構が障害されているかを明らかにする事を目的とする。あわせて、生体内伝達物質としての意義が注目されている Adenosine-5'-triphosphate (ATP) やプロテアーゼ活性化型受容体も、刺激-放出連関に寄与するか解明するため、今回、マウス耳下腺腺房細胞に及ぼす各種試薬の効果も、細胞内 Ca²⁺ イオン濃度 ([Ca²⁺]) 変化を指標として検討した。(方法) 雌マウス (NOD/ShiJcl 及び ICR 19-30W) を CO₂ ガスにて屠殺し、耳下腺を摘出した。標本を純化シグナラーゼ 100 U/ml を用い 37°C、1 時間消化した。消化後、細胞をろ過し、Ca²⁺ 感受性色素 Indo-1/AM を負荷した。その後、リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) によって [Ca²⁺] の画像解析を行った。(結果) カルバコール・ノルアドレナリン (NA)・ATP・PAR-2AP など様々な刺激を行い、[Ca²⁺] 変化を検討した。両群に比較的に差が見られたのは、NA および ATP 刺激であり、NOD 群で [Ca²⁺] 上昇が部分的に抑えられた。(考察) 今回の研究により、SS モデルマウスにおける唾液の分泌低下には交感神経系の機能低下が関係している可能性が高い。しかしながら、ICR と NOD の週数を揃えられなかったことが今回の研究の問題点である。上記の結果が本当であるか、さらなる検証が必要である。今後電子顕微鏡を用いた組織像の比較も行っていく予定である。(COI: なし)

15 スッポンモドキの嗅覚系

中牟田信明^{1,2}、中牟田祥子¹、加藤英明³、山本欣郎^{1,2}
岩手大学 農学部 獣医解剖学研究室¹
岐阜大学大学院 連合獣医学研究科 基礎獣医学連合講座²
静岡大学 教育学部³

カメの嗅覚器は鼻腔の背側部に位置する上脛室上皮と、腹側部に位置する下脛室上皮とからなり、上脛室上皮から出る軸索は嗅神経の外側部を通って嗅球の腹側部へ、下脛室上皮から出る軸索は嗅神経の内側部を通って嗅球の背側部へ投射する。一般に、上脛室上皮は線毛性、下脛室上皮は微絨毛性の嗅細胞を含んでおり、前者は嗅上皮、後者は鋤鼻上皮とも呼ばれる。また、上脛室上皮には付属腺が存在し、下脛室上皮には付属腺が存在しないこと等から、上脛室上皮は主に空気中、下脛室上皮は主に水中の匂いを受容する嗅覚器と考えられている。スッポンモドキ科スッポンモドキ属に分類されるスッポンモドキ *Carettochelys insculpta* は、産卵時を除いては上陸することがない完全水生のカメである。今回我々は、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いてスッポンモドキの嗅覚系を形態学的に解析した。

【結果と考察】鼻腔の背側部と腹側部を裏打ちする感覚上皮は共に線毛性嗅細胞を含み、付属腺を欠いていた。さらに、嗅神経の外側部と内側部や、嗅球の腹側部と背側部を区別することはできなかった。これらの結果は、スッポンモドキの嗅覚系が、他のカメのそれと異なり、主に水中の匂いを受容する単一の嗅覚系で構成されていることを示唆する。(COI: なし)

16 Cholecystokinin-expressing cells in the mouse kidney and their possible roles in urinary sodium excretion

Hiromi Takahashi-Iwanaga, Toshihiko Iwanaga
Laboratory of Histology and Cytology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

In our previous studies, the natriuretic hormone cholecystokinin (CCK) was seen to exhibit its gene transcripts and the peptide products in a renal medullary region, while its specific receptor CCKAR was shown to be functionally active in the late proximal tubule segments. To test the possibility of CCK acting as an intrarenal mediator of sodium excretion, we examined mouse kidneys by (1) immunohistochemistry for CCK at light and electron microscopic levels; (2) the quantitative in situ hybridization technique (Baskin & Stahl, 1993) for CCK mRNA in animals fed a normal- or a high-sodium diet; and (3) metabolic cage experiments for the measurement of urinary sodium excretion in high-salt-fed mice either treated or untreated with the CCKAR antagonist lorglumide. Results showed immunoreactivity for CCK to be localized to rough endoplasmic reticulum cisterns of the renal interstitial cells in the inner medulla and the inner stripe of the outer medulla, with gene expression for the peptide in the latter renal region being enhanced by high sodium intake. Lorglumide significantly diminished natriuretic responses of mice to a dietary sodium load without altering the glomerular filtration rate. These findings suggest that the medullary interstitial cells respond to body fluid expansion by CCK release for feedback regulation of the late proximal tubular reabsorption. (COI: NO)

17 GnRH 誘導体持続投与により生じるラット曲精細管の組織学的変化

○渡部 剛¹、堀 淳一²、柿崎秀宏²、甲賀大輔¹
旭川医科大学 解剖学講座・顕微解剖学分野¹、腎泌尿器外科学講座²

GnRH 誘導体の徐放性製剤は前立腺癌などに対するホルモン療法剤として用いられるが、造精機能への影響については不明な点が多い。そこで、今回我々は、雄ラット背部皮下へ GnRH agonist と antagonist 徐放性製剤を投与し、曲精細管に生じる経時的変化を形態学的に比較した。その結果、agonist 投与群では、投与直後から 7 日目までに精巣重量が急激に減少し、その後 28 日目まで緩徐に精巣の萎縮が進んだ。一方、antagonist 投与群では、投与 7 日目までは精巣重量の低下は緩徐で、その後 28 日目までに急激に精巣の萎縮が進んだ。そこで、光顕及び電顕で精巣組織像を比較したところ、agonist 投与群では、4 日目より変性・融合した精子細胞と思われる多核の巨細胞が曲精細管内に多数出現するとともに、14 日目までにセトリ細胞の細胞突起が基底側に退縮して大部分の精子細胞が曲精細管壁から剥落した。一方、antagonist 投与群では多核巨細胞は出現せず、7 日目まで明瞭な組織学的変化も認められなかったが、その後急激にセトリ細胞の退縮が進み、28 日目までには成熟精子や精子細胞が曲精細管上皮から剥落して、大型の精母細胞が管腔側に露出した。以上の観察より、GnRH 誘導体持続投与により生じる LH や FSH 分泌の抑制は、セトリ細胞の細胞突起の退縮を誘起し、その結果、精子細胞が足場を失って曲精細管上皮より剥落し、精子成熟過程が阻害されることが示された。また、精子細胞が変性・融合した多核巨細胞の出現は、agonist 徐放性製剤投与初期の一過性の LH/FSH 過剰分泌がこの曲精細管の萎縮過程に影響を与えることを示唆するものと思われた。(COI: なし)

18 糖尿病誘発ラットにおける肝線維化の形態学的観察

○植田弘美、森井俊貴、平賀武夫
酪農学園大学 獣医学類 獣医解剖学

【背景と目的】糖尿病に伴った肝線維化の発生機序を形態学的に解析することを目的に、肝線維化において中心的な役割を担っているクッパー細胞、肝星細胞、活性化した肝星細胞(筋線維芽細胞)について組織学的に検索した。【材料と方法】Wistar系ラットを用い、実験群には催糖尿病作用を有するストレプトゾチン60mg/kgを、対照群には生理的食塩水を腹腔内に投与した。糖尿病罹患確認後、6ヶ月間まで飼育し1ヶ月間ごとに材料を採取した。【結果と考察】肝臓に α -amylase併用PAS反応を施すとクッパー細胞を類洞中に見出すことができ、実験群、対照群ともに肝小葉の辺縁に特に認められた。糖尿病の進行に伴い、肝細胞中に脂肪滴が増加するとクッパー細胞の数は減少し、脂肪滴の減少に伴って増加した。肝小葉の辺縁に結合組織の小塊や小葉間結合組織の小塊が見られるようになると、肝星細胞、筋線維芽細胞は増加し、特に筋線維芽細胞はそれらの組織周囲に多数観察された。これらのことより、糖尿病の進行による肝臓の病態変化に伴って、クッパー細胞、肝星細胞、筋線維芽細胞の分布は大いに変化し、糖尿病における肝線維化をもたらしていることが示唆された。(COI:No)

19 実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスの腰髄と神経線維束における galectin-3 陽性細胞の同定と病態に伴う変化

○板橋 哲也¹、小林 純子²、有馬 康伸³、上村 大輔³、樋口 光太郎³、村上 正晃³、渡辺 雅彦⁴、若水 敏彦²
¹北大院医、²北大院医組織細胞学教室、³北大遺伝子病制御研究所 院医分子神経免疫学分野、⁴北大院医解剖発生学教室

ガラクチンは、ガラクトースを認識するレクチンで、様々な生命現象に関与する。本研究は、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)マウスにおける galectin-3 陽性細胞を同定、病態に伴う変化を解析し、病態における役割を明らかにすることを目的とした。

ミエリンオリゴ糖タンパク質を注射したマウスより採取した自己反応性 T 細胞を正常マウスの血管内に移入することで EAE マウスを作成した。T 細胞移入後、発症前、症状ピーク時、症状寛解時の3つの段階で脊髄を含む腰髄(L1-L6)を採取し、光顕および電顕レベルの免疫組織化学により galectin-3 の局在を解析した。

正常マウスは、脊髄と神経線維束に galectin-3 細胞は検出できず、EAE マウスでは、発症前より脊髄、髄膜、神経線維束に galectin-3 細胞が観察された。脊髄および髄膜の galectin-3 細胞は、Iba1⁺もしくは F4/80⁺のマクロファージもしくは活性化型ミクログリアであった。神経線維束では前根にのみ galectin-3 細胞が観察され、前根の一部の galectin-3 細胞は Iba1⁺/F4/80⁺で、変性した髄鞘と軸索を包むマクロファージであった。前根の大部分の galectin-3 細胞は Iba1⁺/F4/80⁺で、長い糸状の形態を示し、グリア細胞マーカー(3PGDH)を発現、基底膜をもつことからある種のシュワン細胞であると思われる。前根における galectin-3⁺シュワン細胞は症状寛解時にもっとも多かった。

本研究により、EAE マウスでは、galectin-3 は炎症反応や脱髄に関与すると予想されるマクロファージもしくはミクログリアと、変性軸索の再生や再ミエリニ化に関与する可能性が示唆されるシュワン細胞に発現することがわかった。(COI:なし)

20 HGF は Cuprizone 誘発性脱髄を抑制する

○高野琢磨¹、板東良雄¹、船越洋²、吉田成孝¹
旭川医科大学 解剖学講座 機能形態学分野¹
旭川医科大学 教育研究推進センター²

多発性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)は中枢神経系においてオリゴデンドロサイトあるいは髄鞘が傷害される脱髄疾患であり、炎症に伴う脱髄に続いて軸索変性が生じると考えられている。一方、神経保護作用をもつ肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)はニューロンから分泌され、MS患者の脳脊髄液においてその濃度が上昇することが知られている。また、これまでに我々は MOG 誘発性実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)において、神経細胞特異的に HGF を過剰発現させたマウス(HGF-Tg)では、野生型マウスに比べて臨床症状が緩和することを明らかにした。しかしながら、脱髄における HGF の役割には未だ不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、Cuprizone 誘発性脱髄において HGF が及ぼす効果について組織学的検討を行った。0.2%の Cuprizone を添加した飼料を C57BL/6J 野生型雌マウスおよび HGF-Tg 雌マウスに4週間投与することによって、脳梁において脱髄を誘発した。髄鞘を染色するフルオロミエリン染色を行ったところ、野生型マウスでは脳梁における脱髄が観察された。これに対し、HGF-Tg マウスでは脱髄の程度が低かった。また、抗 Iba-1 抗体および抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織化学法を行ったところ、野生型マウスではミクログリアやアストロサイトの集積が脱髄領域に認められたが、HGF-Tg マウスではこのようなグリア細胞の集積が抑制されていた。以上の結果より、HGF は Cuprizone 誘発性脱髄を抑制する。その機序として、HGF がアストロサイトやミクログリアの脳梁への集積を抑制するという可能性が考えられる。(COI:なし)

21 抗 MOG 自己抗体とオリゴデンドロサイト

○板東良雄、吉田成孝
旭川医科大学 解剖学講座 機能形態学分野

多発性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)は脱髄を主体とした中枢神経の炎症性疾患であり、自己免疫機序が病態として考えられているものの、原因は未だ不明である。また近年、aquaporin-4 や myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG)に対する自己抗体の発見により、従来は MS の亜系と考えられていた疾患が視神経脊髄炎スペクトラム疾患(NMOSD)や MOG 抗体疾患という異なる疾患に分類されるようになってきている。MOG 抗体疾患は NMOSD に続く3番目の新しい MS 類似疾患であり、髄鞘を構成するオリゴデンドロサイト特異的に発現する MOG に対する自己抗体の存在が認められているが、抗 MOG 自己抗体がオリゴデンドロサイトに対してどのような作用を持つかについては不明である。そこで本研究では、抗 MOG 自己抗体が培養オリゴデンドロサイトに及ぼす影響について細胞生物学的検討を行った。

培養オリゴデンドロサイトの培地中に抗 MOG 自己抗体を添加し、髄鞘構成蛋白である myelin basic protein (MBP)について検討した。MBP に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、抗 MOG 自己抗体の添加により、細胞は著しく肥大した。さらに western blot 法を用いて MBP の発現量を検討したところ、MBP の発現がむしろ上昇していることが明らかとなった。このような所見は抗 MBP 抗体や抗 MOG 抗体を用いた系では認められなかった。

以上の結果から、抗 MOG 自己抗体はオリゴデンドロサイトに直接作用し、髄鞘構造変化を引き起こすことが示唆された。(COI:なし)

22 三次元ヒト人工腹膜組織により可視化した 癌細胞腹膜播種の初期動態

○豊見山山良介¹、浅野義哉¹、追切裕江³、松崎典弥⁴、明石満⁵、下田浩^{1,2,5}
¹弘前大学(医)神経解剖・細胞組織学講座、²弘前大学(医)生体構造医科学講座、³弘前大学(医)産婦人科学講座、⁴大阪大学(工)応用化学専攻、⁵大阪大学(生命機能)ビルディングブロックサイエンス共同研究講座

我々は、ヒト培養細胞の積層化と組織化を可能とする細胞集積法を用いて、三次元ヒト人工腹膜組織を開発した。本人工組織はヒト初代培養細胞を材料とし、細胞間接着を伴うシート構造の中皮細胞層と、血管あるいはリンパ管ネットワークを含む結合組織様構造からなり、ヒトの癌細胞腹膜播種動態を in vitro で再現する実験系となると考えられる。現在我々は、本人工組織を癌腹膜播種モデルとして、腹腔内および骨盤内臓器由来癌細胞株の播種動態とメカニズムおよび治療効果機序について解析を行っている。本研究では、大腸癌細胞株 HT-29、および卵巣癌細胞株 SKOV3 について、人工腹膜組織における播種初期動態を形態学的に解析した。HT-29 は、中皮上に穿孔を形成しながら接着し、その後三次元的に増殖しながら粗大な円形集塊を形成した。この集塊は HT-29 細胞間の強固な接着構造を伴っており、癌細胞の二次元的拡散、および結合組織様構造への浸潤はみられず、低い転移能を示した。一方、SKOV3 は高い転移能を伴う動態を示した。中皮上に穿孔を形成後、浸潤突起を結合組織様構造に伸ばしながら早期に中皮下に浸潤し、更に増殖しながら結合組織様構造全体に拡散した。加えて、SKOV3 細胞の人工リンパ管内への侵入も認めた。これは、人工組織において癌細胞の中皮侵襲、結合組織への浸潤と増殖、リンパ管内転移を連続的に捉えた初めての例と考えられる。以上より、三次元ヒト人工腹膜組織は癌腹膜播種初期動態を可視化し、更に分子機構の解明および創薬において有用なツールとなると考えられる。(COI:No)

23 延髄腹側呼吸群における左右連絡の形態学的解析

○森永涼介^{1,2}、中牟田信明^{1,2}、山本欣郎^{1,2}
岩手大学農学部獣医解剖学研究室¹、岐阜大学大学院連合獣医学専攻基礎連合講座²

【背景】延髄腹側外側にある延髄腹側呼吸群(VRC)は、pre-Bötzing complex(PBC)を中心に呼吸リズムの形成を行っている。過去の報告で、左右のPBC間で神経線維の投射があり、左右のPBCで形成された呼吸リズムを統合させていることが明らかになっていく。しかし、VRCには、PBCの側面にBötzing complex(BC)が、尾側にventral respiratory group(VRG)があり、VRC全体における左右連絡については明らかにされていない。本研究では、VRCの各領域における左右連絡を、逆行性神経トレーサー標識法により明らかにすることを目的とした。【材料・方法】Wistar Rat(雄、8-10週齢)を4群に分け、左側のBC、PBC、anterior rostral VRG(arVRG)、posterior rostral VRG(prVRG)にコレラトキシンBサブユニット(CTB)をそれぞれ注入した。注入1週間後に、4%パラホルムアルデヒドで還流固定後、脳幹の50 μ m厚凍結切片を作製した。凍結切片は抗CTB抗体を用いて免疫染色し、200 μ m毎に右側のVRCにおけるCTB陽性神経細胞数を測定した。【結果】どの群においても右側の延髄腹側外側に陽性神経が広く認められ、特にPBCにおいて陽性神経は多く、右側のVRCに認められる陽性神経の30~33%がPBCに認められた。また、BC注入群ではBCに、arVRG注入群ではarVRGにPBCに次いで陽性神経が認められ、それぞれ22.8%と27.1%であった。【まとめ】PBCを中心としてVRC全体で左右連絡することで、左右の呼吸リズムを統合していると考えられる。(COI:なし)

24 カルシウムチャネル Cav2.1 は成体期プルキンエ細胞の生存、バンド状発現、神経支配テリトリーの維持に不可欠である

○宮崎 太輔¹, 山崎 美和子¹, 崎村 建司², 渡辺 雅彦¹
¹北海道大院・医・解剖発生
²新潟大・脳研・神経細胞生物学

小脳皮質唯一の出力ニューロンプルキンエ細胞 (PC) は、遠位樹状突起では数十万本の平行線維、近位樹状突起では一本の登上線維による興奮性支配を受けている。P/Q型カルシウムチャネルの必須サブユニット Cav2.1 は登上線維刺激によるプルキンエ細胞脱分極に反応して細胞内へカルシウムイオンを流入させる。PC 特異的 Cav2.1 欠損マウスでは、登上線維支配領域の近位縮小化、平行線維支配領域の近位拡大化、登上線維多重支配の残存が認められ、さらに PC 細胞死、小脳バンド状分子発現パターン形成不全が認められた。今回、成体期に薬剤で遺伝子欠損を誘導する Cav2.1 欠損マウスを作成し、成体期 PC における Cav2.1 の機能を調べた。変異マウスでは誘導後 1 週で Cav2.1 タンパクの有意な減少、2 週で明らかな運動失調、5 週で PC 細胞死が観察された。誘導後 3 週では、登上線維の支配領域や単一支配様式には変化は見られなかったが、近位樹状突起における棘突起過剰形成と平行線維支配領域の近位拡大化が観察され、バンド状発現パターン形成不全も観察された。以上の結果から、Cav2.1 は成体 PC において登上線維単一支配の維持には関わっていないものの、近位樹状突起における平行線維シナプス形成を抑制することで神経支配テリトリーを維持し、バンド状分子発現や PC 生存維持にも関わっていることが明らかとなった。(COI:NO)

25 マウス線条体シナプスの AMPA 型グルタミン酸受容体の密度は細胞種や出入力経路によらず一様である

○山崎美和子、宋曉紅、渡辺雅彦

北海道大学大学院 医学研究院 解剖発生学教室

線条体は大脳皮質や視床からの入力を統合し、直接路・間接路と呼ばれる出力経路により直接もしくは間接的に淡蒼球内節と黒質網様部へ投射する。運動の制御や認知機能には線条体内での情報処理や直接路・間接路のバランスが重要であるが、その基盤となるグルタミン酸作動性シナプスの強度分布は不明である。この問題を明らかにするため、シナプス強度の決定因子として重要な AMPA 型グルタミン酸受容体の密度と、細胞種や出入力経路との関係について包埋後免疫電顕法により検討した。直接路・間接路の中型有棘細胞の棘突起が、それぞれ大脳皮質と視床由来のグルタミン酸作動性終末と形成する 4 種類のシナプスを調べた結果、AMPA 受容体の密度に有意差は認められなかった。主要な抑制性存在細胞であるパルブアルブミン陽性細胞でも、大脳皮質と視床から入力を受けるシナプスの受容体密度の間に有意差はなく、中型有棘細胞とほぼ同じレベルだった。この結果は、少数の“強い”シナプスの受容体密度が、大多数の“弱い”シナプスの約 5 倍である海馬や小脳の分布様式とは対照的であり、さらに線条体での受容体密度は、海馬や小脳の“弱い”シナプスと比べ約 3 倍だった。以上の結果は、AMPA 受容体密度が細胞種や出入力経路に関わらず一様に高いことを示している。このような分子解剖学的基盤はアセチルコリン受容体やドーパミン受容体による伝達修飾の影響や入力線維の発火頻度の変化を効率的に出力するための仕組みとして機能していることが示唆される。(COI:なし)

26 視蓋浅層での接線方向細胞移動のダイナミズム

渡邊 裕二、佐久間 千恵、八木沼 洋行

福島県立医科大学 医学部 神経解剖・発生学講座

脊椎動物の中脳背側部を占める視蓋は、ヒトを含む哺乳類の上丘に相当し、視覚・聴覚・体性感覚の入力を受けて感覚地図の作成・統合に機能する。胎児期に発達する視蓋の多層構造は、放射状方向および縦線方向への細胞移動を介して構築される。我々は 1.5 層からなる層構造を発達させるニワトリの視蓋層形成に注目して、層形成過程における細胞移動とその制御機構について調べている。これまでに発生中期の視蓋の中間層と浅層での様式の異なる 2 種類の接線方向への細胞移動の概要を明らかにしている。本発表では、浅層での接線方向細胞移動の挙動についての解析の結果を報告する。

ニワトリ胚 E5.5 の視蓋室室帯の一角をエレクトロポレーションにより GFP 標識した後、放射状方向移動を経て E7.0 に浅層に達した標識細胞の接線方向への動きを、3 日間こわつて組織培養してタイムラプス撮影した。標識細胞の一群は、視蓋浅層を始めては背腹軸方向に、やがて全方向性に広範囲に拡散していった。個々の移動細胞は、先端が分岐する先導突起を伸縮させながら進み、核・細胞体が分岐点まで移動すると選択された一方の突起を先導突起として伸長させ、もう一方の突起を後続突起として取り込みながら方向転換をする一連のサイクルを繰り返して移動していた。移動細胞同士が出会うと、すれ違ったり立体交差して、互いに反発するよりは避け合いながら広い領域に拡散していく様子が捉えられた。また視蓋の周縁部では、移動細胞が被蓋との境界線に達すると先導突起を引っ込めて方向転換して、境界外への逸脱を避ける動きを示した。移動後の細胞は最終的には視蓋浅層の神経細胞に分化することから、分岐する先導突起を駆使した移動細胞の動きが、視蓋全体への一様な神経細胞の分布に寄与すると考えられた。(COI:なし)

27 小脳と睡眠-覚醒サイクルの制御を関連付ける、小脳から内側傍小脳脚核 (内側結合腕傍核) への直接投射

○橋本光広、八木沼洋行
 福島県立医科大学 神経解剖・発生学講座

小脳形成不全を伴う多くの疾患では、睡眠障害が併発する。しかし、小脳が、睡眠-覚醒サイクルにどのように寄与しているかは不明であった。そこで、小脳と、睡眠-覚醒サイクルに関与する神経核との神経連絡を調べるため、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを順行性トレーサーとして用い、マウス小脳小葉 VI、VIII、ならびに IX におけるプルキンエ細胞の軸索投射を調べた。蛍光タンパク質 (hrGFP) を発現する AAV ベクターを小脳小葉 IX または小葉 VIII に注入すると、hrGFP 陽性の軸索、ならびに、hrGFP およびシナプトフィジン 2 重陽性軸索終末が内側傍小脳脚核 (MPB) に観察された。これは、小脳小葉 IX または小葉 VIII の神経細胞が、MPB に直接投射していることを示唆している。MPB は、レム睡眠とノンレム睡眠間の相転移を制御している神経核である。対照的に、AAV ベクターを小脳小葉 VI に注入した場合、MPB に hrGFP 陽性軸索は観察されなかった。そこで、MPB への投射神経を調べるために、片側 MPB に逆行性トレーサーの Fast Blue を注入した。Fast Blue を注射した MPB と同側の小葉 VIII-X・片葉・腹側傍小葉の小脳プルキンエ細胞が、Fast Blue によって逆行性標識された。一方、小葉 V-VII・小脳半球では、Fast Blue 標識プルキンエ細胞は観察されなかった。結果は、小葉 VIII-X のプルキンエ細胞は、同側 MPB に直接投射するが、小葉 V-VII のプルキンエ細胞は、同側 MPB に直接投射しないことを示している。小葉 VIII-X のプルキンエ細胞から MPB への直接投射は、小脳が MPB を介し、睡眠-覚醒サイクルを制御に関与することを示唆している。(COI:なし)

28 サブスタンス P 受容体に類似する受容体の脊髄における役割

○中山(直野) 留美¹、石田 雄介¹、船橋 英樹²、宮原 裕²、高宮 考悟³、西森 利数²、上条 桂樹¹
 東北医科薬科大学 医学部 解剖学教室¹、宮崎大学 医学部 精神医学分野²、宮崎大学 医学部 統合生理学分野³

中枢神経系における「痒み」の研究は、2007 年に脊髄において痒み受容体が同定されたことを端とする研究分野である。臨床的には抗ヒスタミン薬やステロイド外用薬が痒みの治療薬として使用され、疾患部位への塗布によって痒みを抑制できるが、全身性で難治なアトピー性皮膚炎といった痒みには、効果を十分に発揮できないことが課題である。

そこで中枢神経系における新たな痒み受容体として、「痛み」受容体の代表であるサブスタンス P 受容体と類似な受容体に着目した。というのは、『痒みと痛み』は体性感覚として類似しているが、それらの違いは未だ解明できていないからである。

評価方法として、体性感覚の伝達に寄与する脊髄後角における発現様式の検討や、サブスタンス P 受容体に類似な受容体発現を脊髄において一過的に抑制させたモデル動物(ノックダウン動物)を用いて、痒み誘発物質の皮下投与による痒み行動の誘発を評価した。

その結果、サブスタンス P 受容体に類似な受容体は、脊髄後角においてサブスタンス P 受容体とは発現様式が異なり、さらに脊髄での受容体のノックダウン動物による痒み行動の誘発は抑制された。

従って、サブスタンス P 受容体に類似する受容体は、痒み受容体として機能することが示唆された。(COI:なし)

29 RANKL-OPG による腸管恒常性維持機構の解明

木村俊介、岩永敏彦

北海道大学大学院 医学研究院 組織細胞学分野

M細胞は腸管のリンパ性器官であるパイエル板上皮に存在し、管腔内の抗原を取込み、粘膜免疫応答の開始に働く特殊な細胞である。上皮細胞と免疫応答開始機構の関係を理解するために重要であるだけでは無く、ワクチン開発など応用面でも着目されているが、その分化機構は明らかになっていないことが多い。

M細胞はパイエル板上皮のおよそ 10%程度しか存在しておらず、従来の組織切片では解析が困難であった。我々はM細胞を効率良く解析する研究手法を開発し、これにより新たなM細胞発現因子として Osteoprotegerin (OPG) を見いだした。

免疫組織染色、in situ hybridization 法による解析から OPG は M 細胞の分化初期段階に発現し、基底膜側へと分泌されていることが想定された。OPG 欠損マウスでは、瀧上皮M細胞の数が増加していた。

M細胞分化の誘導が RANKL によって引き起こされること、OPG が RANKL の抑制因子であることから、OPG は M 細胞分化のネガティブフィードバック機構として機能すると考えられる。

(COI:なし)

30 Dual effects of bleomycin on the intra-thoracic immune hemostasis and lung injury in autoimmune disease model mice

Yaser Hosny Ali Elewa, Osamu Ichii, Yasuhiro Kon

Laboratory of Anatomy, Department of Basic Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Japan

Mediastinal fat-associated lymphoid cluster (MFALCs) is a novel immune tissue, and C57BL/6 (B6) mouse strain and autoimmune disease model mice have relatively large size of MFALCs. The pathological development of MFALCs seemed to be correlated with the severity of lung injuries caused by autoimmune abnormalities or drug such as bleomycin (BLM) in mice. In this study, we compared the intra-thoracic immune condition and lung injury among BLM-induced pneumonitis using autoimmune disease model mice. The histopathology of mediastinal fat tissues and lungs was examined in two autoimmune disease models, MRL/MpJ-lpr (carrying a Fas mutation) and BXSJ/MpJ-Yaa (Yaa; carrying a translocation of X chromosome telomeric region to Y chromosome), and their wild-type strains (MRL/MpJ and BXSJ/MpJ, respectively) at 7 and 21 days (d) following intranasal instillation of either BLM sulfate (5 mg/kg) (BLM group) or vehicles (PBS group). Furthermore, immunohistochemistry was performed to detect immune cells, lymph vessels, and high endothelial venules (HEVs). Although both autoimmune disease models showed higher values in relative spleen weight and serum autoantibody titers compared with wild-type strains, these values were significantly decreased in Yaa mice of BLM group at 21d. Furthermore, except for Yaa mice, the BLM group presented prominent MFALCs, with a significantly greater ratio of lymphoid cluster area to total mediastinal fat tissue area and more apparent lung injury compared with the PBS group. On the other hand, the Yaa mice of BLM group at 7 and 21d showed significantly lower ratio of lymphoid cluster area to total mediastinal fat tissue area and significantly less lung injury score compared with the PBS administered group. Interestingly, except for Yaa mice, the higher number of PNAI-positive HEVs were observed in the lung tissues in BLM group than in PBS group. Therefore, our data suggest a potentially dual role of BLM on the intra-thoracic immune hemostasis and lung injury and a crucial role of HEVs in the degree of lung injury. These differences would be caused by the genetic background of mouse strains, therefore further investigation is required to clarify the pathogenesis of the diverse effect of BLM on the intra-thoracic immune status.

31 Electromyographic studies of the deltoid and pectoralis major muscle activities during isometric contractions toward eight directions in humans.

Takuya Yoshimoto¹, Fumihito Sato², Mitsuhiro Nito¹, Manabu Jimenji¹, Wataru Hashizume¹, Takuji Miyasaka³, Akira Naito¹

¹Dept. Anat. Struct. Sci., Yamagata Univ. Sch. Med., ²Shinshu Inst. Alt. Med. Wel., ³Dept. Judo Ther., Teikyo Univ. Facult. Med. Tech.

Activities of the anterior (DA), middle (DM) and posterior part of the deltoid muscle (DP) and the pectoralis major muscle (PM) during isometric contractions toward eight directions of the shoulder in fourteen healthy men were studied by electromyography (EMG). The eight directions were flexion (F), extension (E), adduction (AD), abduction (AB), F-AD, F-AB, E-AD and E-AB. During the experiment, the subject sat on a chair and set the upperarm in a force measurement device developed by us. EMGs of the muscles recorded with surface electrodes were rectified and integrated. The subjects exhibited isometric contractions toward the directions with the force of 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 kg. DA was activated during the contractions toward F-AD, F, F-AB, AB and E-AB, DM was during those toward F, F-AB, AB, E-AB and E, DP was during those toward F-AB, AB, E-AB, E and E-AD and PM was during those toward E-AD, AD, F-AD and F. The amplitude of EMGs linearly increased with an increment of the force and was highest during the contraction toward F in DA, AB and E-AB in DM, E-AB in DP and AD in PM. The results suggest that the muscles show various actions, i.e. a synergistic or antagonistic action, by changing the direction of the contraction. (COI: No)

32 ヒト左心房の微細構造特性

小泉和久¹、大谷一平¹、木村沙江¹、成田大一²、渡邊誠二²、下田 浩²、

弘前大学医学部¹、弘前大学大学院医学研究科 生体構造医学講座²、神経解剖・細胞組織学講座³

【目的】心臓の壁構造については様々な実験動物において多くの知見が得られているが、ヒト心房の微細構造についての情報はきわめて乏しい。特に、心房細動の発生源として近年注目される myocardial sleeve を有する肺静脈から左心房にかけての構造特性は不整脈発生機序の解明および evidence-based medicine の開発の面からも解明すべき課題である。そこで本研究では、ヒト心臓の左心房から肺静脈壁の微細構造特性について顕微鏡学的解析を行った。【方法】平成 25 年から平成 27 年にかけて弘前大学医学部に献体された 2 例の解剖体 (男性 1 例、女性 1 例) より心臓を採取し、10%ホルマリンまたは Karnovsky 液で固定した後パラフィン包埋組織切片より走査電子顕微鏡用試料を作製し、組織化学的および電子顕微鏡的解析を行った。【結果】ヒト左心房では心室筋に比べて細く分岐に乏しい円柱状の心筋が平面状、鞍状、または組手状の介在板を介して直列、並列、または交差して連結していた。左心房の肺静脈口から肺静脈幹にかけて myocardial sleeve を形成する心筋群の内膜側には横紋形成と筋原線維に乏しい扁平・不整形を示す特殊心筋様の細胞が密に分布していた。【考察】ヒト心筋は心室筋とは異なる微細構造を呈し、特異な機能形態を構築していた。myocardial sleeve 内膜側には特殊心筋様細胞が分布し、このことは独自の自動能の発現と心房細動の発症メカニズムを示唆している。(COI: なし)

33 骨芽細胞から骨細胞へのスイッチングにおける podoplanin の局在

○永井伯弥^{1,2}、長谷川智香¹、横山敦郎²、網塚憲生¹

北海道大学 歯学研究院¹ 硬組織発生生物学教室、²口腔機能補綴学教室

【目的】骨細胞が骨基質において均等に存在していることは骨芽細胞から骨細胞への分化のタイミングが時空的に一定の間隔を有することを意味している。我々は骨芽細胞から骨細胞へ分化しつつある細胞を組織化学的に明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】生後 4 週齢マウスの大腿骨・脛骨で podoplanin, CD44, アクチン線維、組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNALP) の免疫組織化学、ならびに、podoplanin の免疫顕微鏡観察を行った。

【結果と考察】骨基質の表層、埋め込まれつつある骨細胞の細胞膜および細胞突起に podoplanin 陽性反応が観察されたほか、骨芽細胞の一部にも podoplanin 陽性反応が認められた。podoplanin 陽性骨芽細胞の actin 線維の走行は周囲の骨芽細胞とは異なっていた。骨幹端では、CD44 陽性破骨細胞と podoplanin 陽性骨芽細胞/骨細胞が接触または近接する像が観察されたのに対し、皮質骨骨髄側では、CD44 陽性細胞と骨芽細胞が接する像は認められなかった。皮質骨骨髄側では、podoplanin 陽性骨芽細胞や骨細胞がやややや等間隔に存在するように見受けられ、骨幹端に向かうにつれて、その数は減少する傾向を示した。以上から、骨芽細胞は podoplanin を発現することで、アクチン線維の構築を変化させるとともに、骨細胞に分化するタイミングを得ている可能性が推察された。骨細胞分化における podoplanin によるアクチン線維再構築のシグナルは、CD44 以外の因子を介する可能性が推測され、今後これらのメカニズムについてさらなる検討を進める必要性が考えられた。(COI: なし)

34 ヤツメウナギ鰓のビタミン A 貯蔵細胞

○吉川究、今井克幸、三浦光隆、八月朔日泰和
秋田大学大学院 医学系研究科 細胞生物学講座

動物はビタミン A を生合成することができず、すべてを食餌に依存している。ビタミン A 貯蔵細胞は摂取されたビタミン A の余剰分を脂質滴に貯蔵し、必要に応じて血液中に放出することで血中ビタミン A 濃度を常に一定の範囲内に制御している。すなわち、ビタミン A 貯蔵細胞はビタミン A が関わる様々な生理機能 (視覚や核内受容体を介した遺伝子の転写制御) の恒常性を維持する細胞であると考えられる。

肝臓の星細胞 (stellate cells) はビタミン A 貯蔵細胞の代表的な細胞であり、ヒトをはじめ哺乳類では体内の総ビタミン A の約 80% を貯蔵しているとされている。腸管壁、脾臓、肺、腎臓などにもビタミン A を貯蔵する間葉系の細胞が存在するが、それらの数、ビタミン A 貯蔵量ともに肝臓星細胞に比べて少ない。これに対して、円口類に属するヤツメウナギでは、肝臓以外の臓器に大量のビタミン A が貯蔵されている。我々は、ヤツメウナギの鰓にこれまでに報告されていないビタミン A 貯蔵細胞を見いだしたことで報告する。

成体ヤツメウナギ (*Lampetra japonica*) から鰓を採取・固定し、形態学的解析を行った。ヤツメウナギの鰓においては、1 次鰓弁 (axial plate) および 2 次鰓弁 (secondary lamella) の間質に存在するピラー細胞 (pillar cells) がビタミン A 貯蔵細胞として報告されているが、この細胞以外に、1 次鰓弁基部を走行する輸入動脈の両側に存在する細胞塊にビタミン A の強い自家蛍光を認めた。この細胞は脂肪染色で陽性であり、LRAT (lecithin retinol acyltransferase: 細胞内に取り込まれたビタミン A をエステル化する酵素、ビタミン A の貯蔵に関わる) の免疫組織染色にて陽性であった。以上より、この脂肪貯蔵細胞は、既存の報告にはない新たなビタミン A 貯蔵細胞であることが示唆された。(COI: No)

35 ヒト末梢血中の多能性幹細胞 Muse 細胞の探索と機能解析

佐藤哲哉^{1,2}、若尾昌平²、串田良祐²、久志本成樹¹、出澤真理²
東北大学大学院医学系研究科外科病態学講座救急医学分野¹、
東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野²

【背景】Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞は結合組織中に内在する多能性幹細胞として報告され、三胚葉性の細胞への分化能を持ち、傷害部位へ遊走・生着し、組織修復を行う。各成人組織由来の Muse 細胞の特徴については明らかにされておらず、ヒト末梢血中における naive な Muse 細胞についてはまだよくわかっていない。【目的】ヒト末梢血単核球 (h-PBMC) から Muse 細胞を同定し、その特徴を明らかにすること。【方法】末梢血より比重遠心法にて単核球を分離し、多能性細胞マーカーである SSEA-3 を用いて h-PBMC Muse 細胞を単離し、単核球における割合、造血系マーカー、間葉系マーカーの発現を解析した。次に、h-PBMC Muse 細胞から RNA を抽出し、Q-PCR を用いて、多能性因子である Nanog, Oct4, SOX2 の遺伝子発現解析を行った。【結果】健康ボランティア 16 名における単核球中の h-PBMC Muse 細胞の割合は 0.03 ± 0.01% (平均 ± SE) であった。その内の 1 名にて SSEA-3 陽性細胞に対する各マーカーの陽性率は CD19 で 73.1 ± 4.2% (平均 ± SD), CD73 で 58.7 ± 6.3%, CD45 で 100% であった。その他については低値であった。遺伝子発現解析では h-PBMC Muse 細胞において h-PBMC non-Muse 細胞に対して Nanog では 2.8 倍、Oct4 と SOX2 では 2.6 倍の発現を示した。【結論】h-PBMC Muse 細胞は細胞表面上造血系の特徴を示しているが、遺伝子レベルでは多能性を高く維持していることがわかった。(COI: Properly Declared)

36 無尾両生類における癒痕の残らない皮膚再生時に現れる細胞は組織修復能をもつ

大塚(山口) 理奈
東北大学 大学院医学系研究科 細胞組織学分野

ほ乳類では、皮膚構造の真皮に至る創傷を負うと、表皮は再生するが真皮は再生せず、失われた真皮を埋めた肉芽組織により癒痕が形成される。一方両生類は、真皮に至る創傷を負っても、表皮・真皮ともに完全に再生し、癒痕は残らない。我々は、この両生類の高い創傷治癒能力に着目した。先行研究は無尾両生類の一種アフリカツメガエルの創傷治癒モデルを使用し、その創傷治癒過程において、ほ乳類では現れない細胞集団が現れること、さらにその細胞集団は単核であり未分化性を持つことを明らかにした(Yokoyama and Maruoka et al. Journal of Investigative Dermatology. 2011)。一方で、その細胞集団が実際に再生する真皮の細胞に分化する組織修復能をもつ細胞かは、これまで明らかにされていなかった。

今回我々は皮膚移植実験モデルを確立し、GFP 蛍光により細胞を追跡することで、細胞集団が再生する真皮細胞に分化する組織修復能をもつ細胞であることを明らかにした(Otsuka-Yamaguchi et al. Developmental Dynamics. 2017)。この結果から、両生類の創傷治癒に特異的に出現する細胞集団の役割が、失われた細胞への分化による組織修復であることが確実になり、今後はこの細胞について、由来や詳細な機能など、さらなる解析が期待される。(COI:なし)

37 IoTを使った「おからだ手帳」:新しい献体の可能性

○辰巳治之、新見隆彦、竹中郁夫、瀬川宗教、二宮孝文、市川量一、菊池真
札幌医大・院・生体情報形態学

白菊会関連団体の献体の精神は同じであるが、各大学の運営体制や種々の対応には様々な違いがある。日本列島改造論(昭和47年)により医学部新設が実現され、急速に献体の数が不足した。(財)日本篤志献体協会(昭和48年)も設立されたが、その後活動は停滞・休眠状態であったのを昭和57年活動を再開し、三橋公平理事長が私財を投じて再建を目指した(参考1)。その後「献体法(昭和58)」が成立した。近年ではさらなる安全・安心医療の社会的ニーズも高くなり、折しも大学における腹腔鏡事故(平成22-26年)が話題になり、種々の変革を迫られるようになった。札幌医大では平成15年から、札幌医大白菊会の協力を得て、献体を用いた手術手技向上に取り組んできた。平成20年、北海道での市民フォーラムが起端となり厚労省班会議が組織され、解剖学会・外科学会からガイドラインが発表され、平成24年厚労省から「実践的な手術手技向上研修事業実施団体の公募」が開始され、次のステップを考える時期にきた。そこで我々はIoT(Internet of Things)を活用した市民参加型の健康管理システムに、フル・オプトイン・オプトアウト(臓器提供や献体の希望、そして蘇生措置拒否など)の機能を加えた「おからだ手帳」を提案している。これは高齢化社会の諸問題の一つである総医療費の増大を阻止し、安全安心の医療を安く実現するための市民参加型の医学研究開発の基盤構築を目指すものである。解剖学教室が貢献する一つの道として、多角的な観点から社会、地域、医療に貢献する方法を模索している。(COI:なし)参考1 <https://nippon.zaidan.info/seikabutsu/1996/00999/contents/018.htm>