

日本解剖学会

第94回近畿支部学術集会

会期：平成30年11月17日（土）

会場：神戸大学医学部・医学研究科神緑会館多目的ホール

1 RET 活性化型変異 C618F は遺伝子量減少によりヒルシュブルング病を誘導する

伊藤圭祐¹, 岡本光正¹, 上坂敏弘¹, 前田貢作², 榎本秀樹¹
 神戸大学大学院医学研究科 神経分化・再生分野¹, 兵庫県立こども病院 外科²

チロシンキナーゼ受容体 RET は GDNF ファミリーのシグナルを伝達して腸管神経系の発生に必須の役割を担う。RET の遺伝子変異はヒルシュブルング病発症に中核的であり、その殆どが RET の機能喪失によるものと説明されてきた。しかし、活性化型 RET が腸管神経発生におよぼす影響の詳細については良く分かっていない。この問題解明のために、我々は MEN2A 患者に同定された活性化変異体 RET51(C618F) の cDNA を *Ret* プロモーター下にノックインしたマウスを作製し、その腸管神経系の発生を解析した。ホモ接合体(*Ret*^{C618F/C618F})では、腸管神経細胞数の増加を認め、RET51(C618F)の生化学的特性と一致した。しかし驚くべきことに、*Ret*^{C618F/-}マウスは重度の腸管無神経症を呈し、正常に腸管神経系が形成される *Ret*^{+/-}マウスと大きく異なる表現型を示した。*Ret*^{C618F/-}マウス胎児では、腸管神経前駆細胞移動の先進部で神経細胞への早熟な分化が起こり細胞移動を抑制していることが示唆された。*Ret*^{C618F/-}マウス胎児における *Gdnf* 遺伝子のコピー数減少は腸管無神経症の重症度を緩和した。以上の結果により、腸管神経系の正常発生は神経分化の精妙な調節に依存しており、活性化型 RET は発現減少を伴うと神経分化の亢進によりヒルシュブルング病を誘導する可能性があることが示唆された。

2 腸管神経系形成不全下におけるシュワン細胞系譜からのニューロン産生

上坂敏弘, 榎本秀樹
 神戸大学大学院医学研究科 神経分化・再生分野

腸管神経系における内在性ニューロンは主に迷走神経堤に由来している。我々は、腸管に投射する外来神経線維に由来するシュワン細胞系譜の細胞から、大腸の神経系の約2割のニューロンが産生されていることを見出し、第2の腸管神経前駆細胞ソースの存在を明らかにしてきた。大腸では、先天性の腸管神経節欠損が生じる疾患（ヒルシュブルング病）が知られているが、迷走神経堤由来の内在性ニューロンを欠いた状態で、シュワン細胞系譜からのニューロン産生がどのような影響を受けているのかが不明である。そこで、ヒルシュブルング病疾患モデルマウスにおいて、シュワン細胞系譜の細胞を遺伝学的に追跡し、大腸での神経節欠損が及ぼすシュワン細胞系譜からのニューロン産生への影響を検証した。その結果、シュワン細胞前駆細胞は、腸の無神経節領域においては、そこに投射する神経線維に付随したままで、ニューロン産生能を有するが、腸管内に広がっていかないことが明らかになった。一方、無神経節領域との境界領域においては、シュワン細胞系譜からのニューロン産生が有意に高まり、神経叢の過半数のニューロンを占めるほどになっていた。このことから、シュワン細胞系譜の細胞は神経線維に付随し、移動能に制限があるが、ニューロン産生能は内在性ニューロンの減少に応じて高まって、神経叢の形成不良を補う能力を有することが示めされた。

3 ラット回腸粘膜における好酸球系列の細胞の組織学的研究

荒井真也¹⁾, 万谷洋平¹⁾, 西田美穂¹⁾, 湯浅秀人²⁾, 横山俊史¹⁾, 星 信彦¹⁾, 北川 浩¹⁾

1) 神戸大院 農・形態機能
 2) 大阪市大院 医・機能細胞形態

【目的および方法】我々は組織学的観点から、ラット小腸粘膜固有層の好酸球は不均一な細胞集団から構成されることを予備的に見出した。そこで、本研究ではラット回腸を用いて、HE 染色による一般組織学的解析および種々の細胞マーカー (CD11b, CD11c, CD103, CD68, CD4, CD8 等) を用いた免疫組織化学的解析によって回腸の好酸球系列の細胞の特徴を精査した。

【結果】回腸粘膜固有層の好酸球系列の細胞の核はその形態から4種類(球状核, 腎形核, 輪状核ないし桿状核)に区分された。腸絨毛の粘膜固有層では球状核ないし腎形核を有するものが多く、腸陰窩周囲の粘膜固有層では輪状核ないし桿状核を有するものが多く認められた。回腸粘膜固有層の好酸球系列の細胞はすべて CD11b 強陽性を示した。この CD11b 強陽性細胞は、腸絨毛の粘膜固有層では大部分が CD11c 陽性を、腸陰窩周囲の粘膜固有層では CD11c 陰性を示し、その他の細胞マーカーでは陰性を示した。

【結論】ラット回腸では、腸陰窩周囲の粘膜固有層に輪状核ないし桿状核を有し、CD11b 陽性 CD11c 陰性を示す好酸球系列の細胞が多く局在する一方で、腸絨毛の粘膜固有層内に球状核ないし腎形核を有し、CD11b 陽性 CD11c 陽性を示す特徴的な好酸球系列の細胞が局在することが明らかとなった。

4 ラット回腸の上皮下線維芽細胞様細胞を制御し得る神経伝達物質の同定

中西裕稀¹⁾, 万谷洋平¹⁾, 田村彩貴¹⁾, 荒井真也¹⁾, 横山俊史¹⁾, 星 信彦¹⁾, 北川 浩¹⁾

1) 神戸大院 農・形態機能

【目的と方法】我々はラット回腸における神経線維の投射対象に関する予備的な検討から、上皮直下に存在する線維芽細胞様細胞 (FBLC) に豊富な神経線維の投射を認めている。そこで本研究ではラット回腸を用い、CD34⁺FBLC と PDGFR α FBLC への各種神経伝達物質 (Vasoactive intestinal peptide (VIP), Neuropeptide Y (NPY), Calcitonin (Cal), Somatostatin (SOM) および Vesicular acetylcholine transporter (VAcHT)) 陽性神経線維の投射程度について、免疫組織化学および定量免疫組織化学的に解析した。

【結果】VIP, NPY, Cal および VAcHT の陽性は腸陰窩から腸絨毛全長の粘膜固有層 (LP) に、SOM の陽性は腸陰窩から腸絨毛基部の LP に認められた。腸陰窩底部に局在する CD34⁺FBLC および腸陰窩側面に局在する PDGFR α FBLC には、すべての神経伝達物質の varicosity 様の陽性が近接して認められた。加えて SOM を除く神経伝達物質の同様の陽性が腸絨毛に局在する PDGFR α FBLC に近接して認められた。これらの神経伝達物質の陽性は主に各 FBLC の LP 側に認められた。さらに VIP, NPY, Cal および VAcHT の varicosity 様の陽性と PDGFR α FBLC の近接は腸絨毛の頂部で、基部ないし腸陰窩周囲より有意に多く認められた。【結論】ラット回腸の上皮直下を走行する神経線維の多くが上皮ではなく各 FBLC に投射することが示されるとともに、各上皮下 FBLC の機能を調節し得る神経伝達物質が明らかになった。加えて腸絨毛の先端に向かうに連れて、PDGFR α FBLC に対する神経支配が多くなることが示された。

5 肝細胞増殖因子が髄核細胞の HIF-1 α 発現と細胞増殖に与える影響

井辻 智典
 京都府立医科大学 生体構造科学

【目的】髄核細胞において Hepatocyte growth factor : HGF が細胞増殖を促進する機序について Hypoxia inducible factor-1 α : HIF-1 α 発現に注目し評価することを目的とした。【対象と方法】日本白色家兔の椎間板組織から髄核細胞を単離し、14日間の初代培養を行った。髄核細胞に HGF (0, 100 ng/ml) を投与後、定常酸素 (20% O₂) と低酸素 (2% O₂) 環境下で培養した。PD98059 (10, 100 μ M) を投与し、MAPK 経路を阻害した。さらに、siRNA を導入し、HIF-1 α の knockdown を行い評価した。細胞活性は WST-8 法を用いて評価し、HIF-1 α の発現を Western Blotting 法で検討した。【結果】HGF 非存在下で、低酸素刺激は細胞増殖を有意に促進した。HGF はいずれの酸素条件下でも細胞増殖を有意に促進した。PD98059 は、低酸素と HGF で上昇する細胞増殖を有意に抑制した。HIF-1 α の knockdown は細胞増殖を有意に抑制した。HIF-1 α 発現は低酸素刺激によって誘導され、HGF によりさらに増強した。PD98059 は髄核細胞における pERK 発現を低下させ、低酸素と HGF で増強した HIF-1 α 発現を濃度依存的に抑制した。【考察】本研究から、低酸素環境下の培養髄核細胞において HGF により HIF-1 α 発現が増加し、細胞活性が促進することが明らかとなり、その機序に MAPK 経路が関与していることが示された。HGF/c-Met シグナルが MAPK 経路を介して髄核細胞における HIF-1 α 発現を調節することで椎間板の恒常性維持に関与している可能性があると考えた。

6 繊維病がもたらす形態異常は、本質的に繊維機能の異常によるものか？

京都府立医科大学 大学院医学研究科 生体機能形態科学部門

近年、多発性嚢胞腎、内蔵逆位や多指症、心臓・眼を含む様々な器官に形態異常を示すバルデー・ピードル症候群・ジョベルト症候群・メッケル症候群・ネフロン癆など、これら責任遺伝子群の多くが繊維毛と呼ばれる細胞頂端より突出する細胞内器官に局在することから、一括りに「繊維毛病」と総称されるようになった。しかしながら、繊維毛遺伝子群の産物（蛋白質）の多くは、繊維毛以外に細胞質や核、中心体、接着斑、中心子などその局在は動的に多様である。にもかかわらず、それら繊維毛以外での役割を明らかにすべく細胞表現型についてはよくわかっていない。注目すべきことに、腎尿管形成後に繊維毛構造そのものを欠失させても嚢胞腎（尿管の異常拡張）を発症しないとする複数の報告がある。これらの報告は、繊維毛病に関わる形態異常は、繊維毛の機能異常の結果というよりは、繊維毛が形成されるまでのプロセスにその病態の本質が隠されていることを示唆している。本発表では、(1) 嚢胞腎モデル (*inv* 変異体マウス) の尿管上皮の表現型 (2) 繊維毛遺伝子群の細胞表現型スクリーニング系の確立に向けた現在の進捗について報告したい。

7 Sry 関連 HMG-box 転写因子 Sox17 の心内膜前駆細胞の分化と心臓発生に果たす役割

八代健太 京都府立医科大学大学院医学研究科 生体機能形態学・解剖学

心筋を含む心臓を構成する主要な細胞は、心臓前駆細胞から分化すると一般的に考えられている。しかしながら、特異的マーカーが知られていないことから、心内膜細胞の起原および分化過程の多くが不明のままである。ゼブラフィッシュの *cloche* 変異の表現型は、血球細胞と内皮に分化する能力を有する血管芽細胞と心内膜が共通の起原を有することを示唆している。一方で、心臓前駆細胞の代表的マーカーである転写因子 *Nkx2-5* を発現した細胞が心内膜へと寄与することが示されており、この事実は心臓前駆細胞から心内膜が分化することを支持するよう思われる。私達は、心臓前駆細胞の特異的マーカーの解析を目的に、マウス初期胚における心臓前駆細胞の単一細胞遺伝子発現プロファイリングを行った。これにより、従来は内胚葉のマーカーとして信じられてきた Sry 関連 HMG-box 転写因子 *Sox17* が、中胚葉の細胞の中で主として *Nkx2-5* 陽性的心臓前駆細胞に一過的に発現し、*Sox17* を発現する細胞系譜は胚体内では心内膜細胞へと分化することを見いだした。*Sox17* の心内膜細胞への分化に対する十分性を検証するために、心臓前駆細胞で強制的に *Sox17* の発現を誘導したところ、一部の心筋が内皮マーカーを発現していた。即ち、*Sox17* は心内膜細胞分化に十分では無いが、内皮への分化に強いバイアスをかける機能がある。一方、中胚葉特異的に *Sox17* が欠失した場合、心円筒のルーピング異常、心室心筋の肉柱形成不全と、心筋や心内膜の増殖能の著明な低下を認め、*Sox17* は心臓発生過程に関し、心内膜の分化成熟のみならず、心筋の分化成熟と心臓形態のバリエーションに必要であることが判明した。これらの得られた新発見を軸に、心臓発生に寄与する細胞系譜と心内膜の果たす役割に関して議論したい。

8 タニサイト様神経幹細胞の局在とその特徴

古部瑛莉子¹・石井晴葉¹・森田光洋²・クルガノフエルキン¹・宮田清司¹
¹京都工芸繊維大学大学院 応用生物学系
²神戸大学大学院 理学研究科

近年、海馬歯状回および側脳室下帯に加えて、正中隆起・弓状核に存在する α -タニサイトが神経幹細胞であり、神経新生により摂食およびエネルギー代謝を制御することが示された。我々は以前に、終板脈管器官 (OVL)・脳弓下器官 (SFO)、および延髄最後野の中心管にタニサイト様の神経幹細胞が存在することを実証した。しかし、そのタニサイト様神経幹細胞の特徴、延髄領域における神経幹細胞ニッチへの広がりについてはほとんど分かっていない。そこで *Nestin-CreERT2/CAG-CAT^{loxP}/loxP-EGFP* マウスを用いてマーカータンパク質の免疫染色を行う事で、EGFP 陽性のタニサイト様神経幹細胞の第3および第4脳室から脊髄の中心管に至るまでの局在およびその特徴を調べた。その結果、OVL、SFO におけるタニサイト様細胞は GFAP および *Sox2* を発現し、延髄最後野中心管のタニサイト様細胞は *Sox2*、GFAP および *Pax6* 陽性であると判明した。延髄領域において、第4脳室から脊髄まで伸びる中心管のタニサイト様細胞が *Nestin* を発現し、神経幹細胞の特徴を持つことが分かった。また、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) および上皮増殖因子 (EGF) の脳室内投与は、それらの神経幹/前駆細胞の増殖を促進し、FGF-2 および EGF シグナル伝達が増殖調節に関与することを示唆した。さらに脳出血モデルマウスにおいて延髄最後野中心管のタニサイト様細胞の増殖が促進された。これらの結果は、周囲脳室領域が神経幹細胞ニッチとしての役割を持つことを示唆する。

9 性決定前のマウス未分化 XY 性腺の精巢化を誘導する器官培養法の確立とその組織学的評価

長谷川千夏¹、梅村ゆりあ¹、三浦由佳¹、川西航平¹、高田奈々子¹、大野周嗣¹、万谷洋平¹、横山俊史¹、星 信彦¹

1) 神戸大院 農・形態機能

【緒言】哺乳類の未分化 XY 性腺の精巢化の制御機構、とくに精巢化が破綻する機序には不明点が多い。その解明には性腺の発生中に多種の実験操作が可能な「器官培養法」が有用であるが、胎齢 10.9 日 (尾体節数 12) 未満の性腺では精巢化が進行しないとされている。本研究では性決定遺伝子 *Sry* の発現開始前 (胎齢 10.5 日: 尾体節数 8) のマウス未分化 XY 性腺を精巢化させる器官培養法の確立を行った。また、培養条件の安定化が可能な血清代替物の利用も試みた。

【材料と方法】胎齢 10.5 日付近の ICR マウス (XY 個体) 性腺中腎複合体を、10%FBS または血清代替物 (KSR) 添加培養液を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で 4 日間培養した。その際、25G 注射針でアガロースゲル上に溝を作製し、性腺中腎複合体を設置した。さらに、ガラスキャピラリーで作製した半円柱状のゲル小片を用いて微小圧力を加え、性腺の形態を保持した。培養結果は免疫組織化学的に評価した。

【結果と考察】XY 性腺内には精巢索様の構造が出現し、それが性腺全域にわたる個体も認められた。性腺内に精巢化のマーカーである Sox9 および Amh 陽性細胞が認められる一方で、卵巢化のマーカーである Foxl2 は検出されなかったことから、精巢化は十分と判断された。血清代替物でも FBS と同様に分化が進行したことから、安定的に利用可能な実験系であると考えられた。加えて、より幼弱な個体 (尾体節数 6) からの培養でも部分的な精巢化が認められた。以上より、マウス未分化 XY 性腺の精巢化を安定的に誘導可能な器官培養法を確立した。

10 いかなる MRI 条件が成長軟骨板損傷の早期変化を検出できるのか

和田浩明
京都府立医大大学院 運動器機能再生外科学

【はじめに】成長軟骨板の損傷は、将来的に四肢の成長障害や変形などの重篤な後遺症を生じる。本研究の目的は、質的 MR 画像を用いて損傷した成長軟骨板を評価し、成長障害を来す変化を早期に診断することである。【対象と方法】5 週齢の雄性日本白色家兎の右脛骨近位成長軟骨板に、3mm ドリルを用いて内側から成長軟骨板中央に損傷を加えた。処置後 2, 4, 6, 8, 10 週後に両側脛骨近位成長軟骨板の MR 画像の撮像を行った。MR 画像はプロトン強調画像、T2 強調画像、および拡散強調画像を撮像し、T2 計算画像、ADC 計算画像を作成した。評価項目は非損傷領域の成長軟骨板高の測定、同領域の T2 値および ADC 値とした。また各週 2 匹ずつ両脛骨を抽出し μ CT の撮像、組織学的評価を行った。【結果】成長軟骨板高は術後 10 週で低下した。T2 値は術後 2 週で処置側の上昇を、8, 10 週で低下を認め、ADC 値は内外側ともに術後 8, 10 週で処置側の低下を認めた。 μ CT では術後 2 週で損傷部位での一時的な架橋形成を認めたが、4-8 週では一旦架橋は一部離断し、10 週で再度架橋形成を認めた。組織学的には、8, 10 週で肥大軟骨細胞層の高さと割合の低下を認めた。

【考察】成長軟骨板は関節軟骨と同様の硝子軟骨で形成されており、また特徴的な軟骨細胞の柱状構造を示す。成長軟骨板損傷では硝子軟骨の変性に伴うコラーゲン配列、水分含有量、細胞充実性の変化および柱状構造の破綻を生じるため、拡散強調画像や T2 計算画像など関節軟骨の変性を評価できる MRI 撮像法で成長軟骨板の変化を早期に評価できる可能性がある。

11 常在マクロファージの継代培養・増殖法

小川和重、鶴谷真悠、添田三晴、橋本 彩
大阪府立大学・生命環境科学・獣医解剖

【背景と目的】マクロファージ (M ϕ) には単球が組織に浸潤し分化した動員 M ϕ と食細胞が胎生期に器官に浸潤・定着した常在 M ϕ の 2 系統が存在する。多くの器官で常在 M ϕ のポピュレーションは自己増殖により維持されていることが最近明らかになれ、クッパー細胞とミクログリアの初代培養の改良法が次々と報告されるに至っているが、これら常在 M ϕ の増殖培養は簡単でない。我々は、脾臓、肝臓、肺、脳に常在 M ϕ に適用できる継代培養・増殖法を開発したので報告する。

【材料と方法】4-8 週齢の ICR マウスを使用した。ヘパリン添加ハンクス液を灌流して血液を除去した後、脾臓、肝臓、肺、大脳を採取した。Collagenase または Dispase で細胞を分散させた後、10%FBS を含む DME または DME/F12 で M ϕ を含む間質細胞の混合培養を行った。10 日から数週間の培養でオーバーコンフルエントになった状態の細胞を Bacterial Petri Dish に播種し、接着した細胞を M ϕ とみなし回収した。Latex beads (直径 1 μ m) で食食性を調べ、Flow cytometry で M ϕ マーカー分子の発現性状を検討した。【結果と考察】脾臓、肝臓、肺、脳から増殖させ Bacterial Petri Dish への接着性により分離した細胞は beads を食食し、食食細胞の割合は 97.5% 以上であった。これらの細胞は CD11b、CD68、F4/80 など M ϕ マーカー分子を発現していた。炎症組織切片上で、動員 M ϕ と常在 M ϕ を区別することは容易でなく、その動態はよく分かっていない。現在、培養系で常在 M ϕ の性状解析を進めている。

12 Balb/c と C57BL/6 マウスの肺から継代培養・増殖させた常在マクロファージの性状

鶴谷真悠, 小川和重
大阪府立大学・生命環境科学・獣医解剖学

【背景と目的】肺には肺胞マクロファージ (Mφ) と肺間質 Mφ が存在する。肺胞 Mφ の分離・培養法は確立し研究は進んでいるが、肺間質 Mφ の培養法は見当たらず、その性状は不明な点が多い。本研究では、当研究室で開発した常在 Mφ の継代培養・増殖法を肺に適用し、分離した Mφ を材料に性状解析を行った。

【材料と方法】気道をハンクス液で灌流した後の Balb/c と C57BL/6 マウス (♂, 8 週齢) の肺を材料に使用した。蛍光標識 Latex beads の貪食性から分離した細胞における Mφ の割合を算定し、Flow cytometry で Mφ マーカー分子の発現を検討した。

【結果と考察】Beads 貪食細胞の割合は、Balb/c で $99.0 \pm 0.3\%$ 、C57BL/6 で $98.1 \pm 1.0\%$ で、高い純度で Mφ を分離することができた。両系統の Mφ は Mφ マーカー分子 CD11b, CD64, CD68, CD86, CD115, CD169, CD184, CD206 と MerTK に加え、肺胞 Mφ のマーカー分子 CD11c と CD116 を発現し、CD11c には 2 峰性の発現ピークが認められた。単球マーカー分子 Ly6C と肺胞 Mφ マーカー分子 Siglec-F の発現は認められなかった。また、スカベンジャー受容体 CD68 とシアル酸結合タンパク CD169 の発現性は両マウスでやや異なり、Balb/c では 2 峰性、C57BL/6 では単峰性の発現パターンが認められた。以上から、増殖・分離した Mφ は Balb/c と C57BL/6 でやや異なるが、肺胞 Mφ は CD11b 陰性・Siglec-F 陽性と報告されているため、肺間質 Mφ の性状を備えた細胞であると考えられた。この Mφ を材料に、両系統の M1 型・M2 型への分極性について検討を始めている。

13 開発した継代培養法で増殖させた脳常在マクロファージの性状

添田三晴, 小川和重 (大阪府立大学・生命環境科学・獣医解剖学)

【背景と目的】最近、常在マクロファージ(Mφ)は胎生期に食細胞が器官に浸潤・定着し独自に分化した細胞で、ポピュレーションは自己増殖により維持されていることが明らかになった。中枢神経系の常在 Mφ にはミクログリアと血管周囲 Mφ が存在する。ミクログリアの初代培養法は、生後直後のマウス・ラットの脳を材料にグリア細胞の混合培養法として確立しているが、回収量は多くない。我々は、各器官にて適用できる常在 Mφ の継代培養・増殖法を開発した。この方法で 4 週齢のマウスを材料に純度の高い脳常在 Mφ を得ることができたので報告する。【材料と方法】硬膜を除いた ICR 雄マウスの大脳を材料に、Dispass で細胞を分散させてグリア細胞の混合培養を行った。継代 2 代目までのオーバーコンフルエンス状態の細胞を剥離後、細菌用ペトリディッシュに播種し、接着性の違いから Mφ を分離した。蛍光標識ビーズ(直径 1μm)を取り込ませて Mφ の純度を算定し、Flow cytometry で Mφ マーカーの発現を検討した。【結果と考察】ビーズ貪食細胞の割合は $98.8 \pm 0.7\%$ で高純度の Mφ が得られ、CD11b, CD45, CD68, CD86, CD115, CD169, CD206, F4/80 の単峰性の陽性発現性が認められた。ミクログリアマーカーの GLUT5 を発現していなかったため(RT-PCR)、血管周囲 Mφ の可能性が排除できない。また、継代を続けたグリア細胞の混合培養中に、非常に高い増殖性と細胞凝集性を示す極小型の細胞が比較的高頻度に出現した。この細胞はビーズの貪食性を有し、CD68 と GLUT5 を発現していたが、CD11b, CD45, CD169 は陰性であった(RT-PCR)。高い増殖性かつ不死亡した可能性が考えられた。

14 転写共役因子 PGCvf の可視化とその機能解析

谷田任司, 松田賢一, 田中雅樹
京都府立医科大学 大学院医学系研究科 解剖学教室 生体構造科学部門

代謝異常や虚血、低酸素条件下などにおいて生成された高値の乳酸を代謝し、細胞が恒常性を保つ詳細な分子メカニズムは明らかではない。最近我々は、好氣的代謝のマスターレギュレーターである転写共役因子 PGC1α のスプライシングバリエーションをラット視床下部より同定し、これがヒト PGC1 variant form (PGCvf) のホモログであることを確認した。PGCvf は、脳や肝臓など、乳酸代謝に関わる臓器で強く発現していたことから、PGC1α と PGCvf の乳酸に対する反応を細胞内動態から比較検証した。蛍光標識した PGC1α を COS-1 細胞に発現させると、PGCvf は細胞質にそれぞれ局在した。乳酸を添加すると、PGC1α の局在は変化しなかったが、PGCvf は細胞質から核へと移行した。生細胞での動態解析より、PGCvf の細胞質局在は 2 ヶ所存在する核外輸送シグナルに依存し、乳酸による核移行にはストレス応答性分子シャペロン HSC70 が関与していることが判明した。PGC1α は核内受容体 ERRα および γ による転写を調節することから、PGCvf の ERR に対する役割を検証したところ、PGCvf は乳酸存在下で ERRγ と相互作用し、その転写を亢進させることが明らかとなった。更に、PGCvf は ERRγ を介してミトコンドリアを活性化し、乳酸代謝を促進することが示唆されている。本演題では、以上の知見を報告すると共に PGCvf の生理機能について考察したい。

15 マウス移植乳癌転移モデルにおけるリンパ節での転移前ニッチの形成

柴田雅朗, 伊藤裕子, 田中義久, 二木杉子, 濱岡仁美, 近藤洋一
大阪医科大学 医学部・生命科学講座解剖学教室

【目的】癌転移の成立には、転移予定臓器での癌細胞の生着や増殖に適した転移前ニッチの形成が重要である。そこで、マウス乳癌転移モデルを用いて、リンパ節の転移前ニッチの形成について、分子病理学的に解析した。

【方法】転移性マウス乳癌細胞株 BJMC3879Luc2 を BALB/c マウス雌に移植し、発光イメージングにより、経時的にリンパ節転移の有無を解析した。その結果、移植後 4 週に屠殺剖検し(転移前群)、リンパ節を採取した。また、無処置対照群の動物も同様にリンパ節を採取した。リンパ節の病理組織標本より、RNA を抽出し、Real-time PCR を用いて、遺伝子発現を解析し、更に免疫組織学的染色を実施した。

【結果】病理組織学的解析において、転移前群では 2 例の腋窩部センチネルリンパ節に微小転移が観察された。単径部の非センチネルリンパ節について LYVE-1 の免疫組織学的染色を行った結果、転移前群において、著しいリンパ管新生を示した。Real-time PCR 解析では、転移前群で *Lyve1*, *Prox1*, *Vegf-c* および *Vegf-a* が著しく上昇していた。

【考察】転移前のリンパ節では、既にリンパ管新生の誘導因子が上昇し、著明なリンパ管新生がもたらされ、非センチネルリンパ節において転移前ニッチは形成されていた。これは癌細胞とその生着に有利な修飾を受けたリンパ節との間に何らかの液性因子を介した作用があることが示唆された。

16 マウス体性感覚野における交連及び連合ニューロン発現遺伝子のスクリーニングとその比較解析

¹大阪大学大学院医学系研究科 解剖学講座 神経機能形態学、²大阪大学大学院連合小児発達学研究所 ころの発達神経科学講座分子生物遺伝学 土井美幸¹⁾、岡雄一郎^{1,2)}、佐藤真^{1,2)}

大脳皮質は機能領野に分かれ、各々の領野において処理された情報は領野間を繋ぐ連合ニューロンを介して統合される。連合ニューロンによる神経回路投射及び機能の解析のためには、連合ニューロンに特異的に発現する遺伝子の同定が有用である。そこで我々はマウスの一次体性感覚野(S1)から一次運動野(M1)に伸びる連合ニューロンをモデルとし、発現遺伝子について、半球間を繋ぐ交連ニューロンとの発現比較も行いながら解析を進めた。逆行性トレーサーである Fluoro gold (FG) を同側の M1 もしくは対側の S1 に注入したところ、S1 の第 2/3 層及び第 5 層、第 6b 層に標識連合ニューロン、第 2/3 層及び第 5 層に標識交連ニューロンを認めた。標識されたニューロンを各層からそれぞれ回収し、DNA マイクロアレイを行い、各層の連合もしくは交連ニューロンにおいて高い発現を示す遺伝子を同定した。連合ニューロンにおいて高い発現を示した遺伝子(候補遺伝子)の大脳皮質での発現パターンを *in situ* hybridization (ISH) により検討したところ、それらは標識したニューロンを回収した層に特異的に発現していた。さらに、連合及び交連ニューロンにおける個々の候補遺伝子の発現を、ISH と FG での標識により S1 パレル野で解析した。その結果、全ての候補遺伝子について、FG で標識された連合及び交連ニューロンにおける、候補遺伝子発現細胞の割合は、交連ニューロンよりも連合ニューロンで高くなっていた。その割合は候補遺伝子間で異なっていたため、連合ニューロンにおけるサブタイプの存在が示唆された。

17 中枢神経回路形成における染色体接着因子コヒーシンの機能解析

藤田幸^{1,2)}、山下俊英^{1,2,3)}
¹大阪大学大学院 医学系研究科 分子神経科学
²大阪大学 免疫学フロンティア研究センター
³大阪大学 生命機能研究科

コヒーシンは染色体接着に関わるタンパク質複合体で、4 つのサブユニットから構成されるリング状の構造を形成する。このリング状の構造の中に、細胞周期 S 期での複製により生じた姉妹染色分体を束ねて接着し、染色体を正確に分配するという、細胞の分裂・増殖に必須の役割を担っている。一方で、コヒーシン複合体は、染色体高次構造の変化を制御し、遺伝子の転写を調節すると想定されている。ヒトではコヒーシン関連遺伝子の変異により、コヒーシンの機能が低下すると、分化・発達障害を伴うコヒーシン病 (cohesinopathies) を引き起こす。コヒーシン病の一種であるコルネリア・デ・ラング症候群 (CdLS) では、顔貌や四肢の形成異常に加え、精神遅滞や自閉症様行動などの高次脳機能の障害を呈することから、コヒーシンの機能が中枢神経系の分化、発生に重要であることが示唆される。また、この疾患では、姉妹染色体分配には大きな異常が検出されていない。このことは、コヒーシンの染色体接着以外の機能、即ち、遺伝子発現調節機能の破綻が、病態や病因に寄与していることを示唆している。本演題では、コヒーシンが中枢神経回路形成にどのような影響を及ぼすのか、これまでの研究結果を発表する。

18 脳回路形成における自閉症原因遺伝子 *FOXP1* の役割白井紀好^{1,2}、島田昌一¹

1. 大阪大学大学院医学系研究科神経細胞生物学講座
2. 大阪大学大学院医学系研究科附属共同研究実習センター

自閉症は社会性コミュニケーションの困難、限定された行動や興味を示す発達障害である。本研究では自閉症者のゲノム解析から同定された原因遺伝子 *FOXP1* に着目し、自閉症の病態および脳回路形成における *FOXP1* の役割を明らかにすることにした。はじめに、前脳特異的に *Foxp1* を欠損させた *Foxp1* コンディショナルノックアウトマウスを作製し、行動解析の結果から母子間におけるコミュニケーション障害および社会性相互作用障害などの自閉症様行動を示すことを見出した。次に、脳内の遺伝子発現解析および脳組織解析を行い、*Foxp1* が神経細胞の分化と移動に重要な役割を担うことを明らかにした。本会では脳回路形成における自閉症原因遺伝子 *FOXP1* の役割とその分子メカニズムについて報告する。

19 ラット前頭皮質から大脳基底核への投射様式

荻部 冬紀、藤山 文乃・同志社大学・脳科学研究科

大脳皮質-大脳基底核投射の機能解明には、そのトポグラフィに加えて、(1) 皮質錐体細胞からの投射は複数の基底核を標的とすること (2) 基底核のコンパートメント構造 (3) 単一の基底核の中に存在する複数の細胞タイプ、についても考慮する必要がある。このような観点から、ラットの前頭皮質(一次運動皮質・二次運動皮質・前頭眼窩皮質・帯状回皮質)から、大脳基底核への投射様式を比較検討した。

その結果、従来からの報告どおり、運動皮質からの投射は背側線条体の側方部に集中していた。これに加えて、Calbindin D-28K および μ -オピオイド受容体の発現で識別される線条体内のコンパートメントに対する投射様式が、一次・二次運動皮質の間で異なっていた。また、内側線条体に多く投射する帯状回・前頭眼窩皮質の間でも、コンパートメントに対する選択性に差異が見られた。大脳皮質から淡着球外節への投射では、領野に依存したトポグラフィに加え、そのシナプス結合の強度とシナプス後細胞タイプとの間に強い相関が見られた。大脳皮質-視床下核投射でも、領野に依存したトポグラフィが見られた。これらの結果と基底核間の投射をふまえて、皮質-基底核投射の機能を考察する。

20 視床下部背内側核および外側視床下部に局在するニューロペプチド Y 発現ニューロンの解剖学的解析

山田俊児¹、森塚磨³、辻村敦²、田中雅樹¹

1. 京都府立医科大学 大学院医学研究科 生体構造科学
2. 京都府立医科大学 大学院医学研究科 基礎老化学
3. 信州大学 医学部 分子細胞生理学

ニューロペプチド Y (NPY) は 36 アミノ酸からなる神経ペプチドである。視床下部において NPY は弓状核 (ARH) のニューロンに発現し、それらは室傍核 (PVN) に投射して強い摂食促進作用を有する事が報告されている。近年、視床下部背内側核 (DMH) や外側視床下部 (LH) に存在する NPY ニューロンも、エネルギー代謝に関わる機能を有することが明らかとなつてきた。しかしながら、これらの NPY ニューロンは、免疫染色による組織学的解析が困難であるためその解剖学的特徴は不明な点が多い。そこで、本研究では DMH や LH の NPY ニューロンへの神経入力を明らかにすることを目的とし、偽型狂犬病ウイルス (pRABV) を利用した逆行性トレーシング法を行った。NPY-Cre マウスの DMH もしくは LH に 2 種類の AAV を投与し、Cre-FLEX system を用いて NPY ニューロンに TVA 受容体と RABV の再構築に必要な Gタンパクを発現させた。次に、TVA 受容体を持つ細胞のみに感染し且つ GFP を発現する pRABV を同じ部位に投与した。これにより、NPY ニューロン内における RABV の再構築と投射ニューロンへの伝播を促し、それぞれの部位の NPY ニューロンに投射するニューロンを GFP で可視化した。その結果、LH の NPY ニューロンは PVN に局在するニューロンから多くの投射を受けることが明らかとなった。また、外側中隔 (LS)、視索前野 (POA)、視交叉上核、中脳中心灰白質、扁桃核からの投射も見られた。一方、DMH の NPY 神経は、LS や POA からの入力に加え、中脳の腹側被蓋核から顕著な投射を受けることが明らかとなった。(COI)なし

21 顆粒性島皮質に伝達される閉口筋筋紡錘固有感覚の脳内伝達機構の解明

池之上悦子、佐藤文彦、古田貴寛、吉田篤
大阪大学大学院歯学研究科高次脳機能学講座

(背景、目的) 閉口筋筋紡錘から発する固有感覚は、顎反射を惹起する。また、三叉神経中脳核ニューロンによって三叉神経上核 (Su5) に伝達された後、視床後内側腹側核尾腹内側端 (VPMcv) を経て、顆粒性島皮質背側部の小領域 (dGlrvs2) に伝達される。一方、連続電気刺激で顎運動が誘発される島皮質部位が存在する。本研究では、dGlrvs2 からの下行投射を明らかにして閉口筋筋紡錘感覚の脳内伝達機構、特に顎運動に関わる機構を解明することをめざした。

(方法) ラットを用いた。咬筋神経の電気刺激に対する応答を記録して閉口筋筋紡錘感覚が入力する dGlrvs2 を同定し、そこへ逆行性トレーサーである biotinylated dextranamine (BDA) を注入した。BDA で標識された軸索終末の脳内分布を解析した。

(結果) 標識終末は、三叉神経運動核に投射する運動前ニューロンが存在する Su5 や三叉神経側核、外側網様体にも認められた。また、閉口筋筋紡錘感覚が dGlrvs2 に至る上行路の中継核である Su5 と VPMcv にも認められた。

(考察) dGlrvs2 に達した閉口筋筋紡錘感覚は、顎反射と島皮質が誘発する顎運動に関わる可能性が示された。また、dGlrvs2 に達する閉口筋筋紡錘感覚は、feedback control を受ける可能性が示された。よって、明らかになった上記の dGlrvs2 に達した閉口筋筋紡錘感覚の顎反射と島皮質が誘発する顎運動に対する関与は、この feedback 回路によって調節されることが示唆された。

22 うつ病モデルマウスにおける“意欲”の行動学的解析

山本奈実¹、遠藤のぞみ¹、小森崇史²、西真弓¹

- 1 奈良県立医科大学 第一解剖学講座
- 2 奈良県立医科大学 精神医学講座

うつ病は当事者の QOL の低下という個人の問題にとどまらず、その生涯有病率の高さから社会的損失の大きな疾患の一つである。そのため、うつ病の神経基盤の解明は基礎研究における喫緊の課題といえる。本研究では、うつ病の主症状の一つである「意欲の減衰」に着目し、その生物学的メカニズムを探るため、よりヒト臨床との類似性・外挿性の高い行動試験によりうつ病モデルマウスの行動表現型を検証することを試みた。

うつ病モデルマウスとして、世界的に広く使用されている社会的敗北ストレスモデルを用いた。具体的には、C57BL/6N (B6) マウスに 1 日 10 分間 攻撃性の高い ICR マウスからの攻撃に暴露し、それを 10 日間繰り返すことで作製した。その後、新奇の ICR マウスあるいは B6 マウスを提示し、それぞれのマウスに対する接近・回避行動を定量化することで社会的な意欲を測定した。次に、嗜好物獲得に関する意欲を測定するため、独自の行動試験によりハイコストハイリターンとローコストローリターンのどちらをより選択するかを定量化する試験を行った。この試験では、「ハイコストハイリターン」として嗜好性の高いチョコレート、すなわち高い報酬を得るために「高い壁を乗り越える」というコストを必要とする道と、「ローコストローリターン」として通常エサと同組成の報酬だが、獲得が容易な道を用意した。本発表では、それぞれの行動試験の結果を報告するとともに、社会的敗北ストレスマウスの行動表現型について考察したい。

23 神経細胞間伝播性 α -シヌクレインシードの同定とその解析田口勝敏¹、渡邊義久²、辻村敦²、田中雅樹¹

- 1: 京都府立医科大学 生体構造科学
- 2: 京都府立医科大学 基礎老化学

α -Synuclein (α Syn) はパーキンソン病に特徴的な細胞内凝集体「レビー小体」の主要構成タンパク質である。レビー小体の形成領域は病気の進行に伴って下部脳幹から大脳皮質に向かって上行性に広がって行く。この病変拡大の分子的背景として「プリオン様伝播モデル」が注目されているが、細胞間の伝播を担う分子(シード)の性質については現在も不明な点が多く残されている。本研究では、*in vitro* でレビー小体凝集体を有する病的神経を作製した後、その培地中に含まれる α Syn の存在に着目した。病的神経を一定期間培養した培地を回収・濃縮し、密度勾配遠心による生化学的分画を実施した。その結果、低密度画分において α Syn の存在を確認することができた。次に、Native-PAGE を用いてこの画分に含まれる α Syn の分子量を解析したところ、興味深いことに、線維様 α Syn のような高分子量ではなく、低〜中分子量域において均一で明瞭なシグナルを検出することができた。この画分を含む培地で健康な神経細胞を培養したところ、レビー小体凝集体を形成させることができた。以上の結果は病的神経を培養した培地中にはある特定の分子量を有する高分子化 α Syn が存在しており、病的神経の産生したシードであることを示唆している。現在、我々はこのシード分子を標的とした構造特異抗体による細胞間伝播抑制システムの構築を目指している。

24 TRPM8-expressing "cold-neuron" mapping in mouse hypothalamus and medulla

Erkin Kurganov, Kaho Okamoto, Seiji Miyata
Kyoto Institute of Technology, Dept. of Applied Biology

Environment temperature sensation is crucial to animal survival. Although thermosensation through periphery nerve endings under the skin has been well studied, brain temperature sensing is poorly understood. Recent studies have shown the importance of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) as well as TRP vanilloid 1 (TRPV1) ion channels as warm-sensitive neurons in the Preoptic area (POA) of the hypothalamus. Here, we report the presence of neurons expressing cold-sensitive TRPM8 in somatodendrites of the medial preoptic nucleus (MPA), lateral septal nucleus (LS) and in axonal terminals of the median eminence (Me) in the mouse hypothalamus and mapping in pons, medulla and spinal cord. TRPM8 is a cold and menthol receptor that is activated by chemical cooling agents and temperature dropping below $<26^{\circ}\text{C}$. Some TRPM8-expressing neurons possess relatively large somata and dendritic spines, but TRPM8 is not expressed with inhibitory neuronal marker proteins, parvalbumin, and somatostatin, indicating they are expressed in excitatory neurons. Moreover, some axonal terminals of GnRH, VGlut2 neurons in the Me are colocalized with TRPM8. We also observed TRPM8 expressing neuronal pathway from trigeminal ganglia (TG) to pons that forwarded to the medulla. TRPM8 expressing neurons were found in the spinal trigeminal nucleus (sp5) of the medulla. Thus, our findings suggest that TRPM8 proteins are expressed at both excitatory and inhibitory neurons, and TRPM8-expressing neuron in the hypothalamus and medulla is a putative "cold neuron".

25 クライオ電子顕微鏡解析により明らかとなった MAP4 による微小管安定化機構

今崎 剛¹, 重松 秀樹², 土岐 知央³, 青木 真理², 鷲見 拓哉⁴, 坂本 恵香², 内窪 友美², 徳楽 清孝³, 白水 美香子², 仁田 亮¹
¹神戸大学, ²理研, ³室蘭工業大学, ⁴大阪大学

Tau-family 微小管結合タンパク質 (MAPs) は微小管結合ドメイン (MBD) を介して微小管と結合し、その安定化や微小管輸送を制御する。MAPs の MBD は選択的スプライシングで制御された 3-5 のリピート配列から構成され、リピート数が機能に影響を与えている。MAPs の重要性にもかかわらず、そのリピート配列の役割はほとんど分かっていない。

MAP4 は MAPs の一つで神経細胞を除くほぼ全ての細胞に発現しているタンパク質である。我々は MAP4 の MBD による微小管制御機構解明のため、クライオ電子顕微鏡により微小管 - キネシン - そして 4 回繰り返し MBD (4R-MAP4)、もしくは 5 回繰り返し MBD (5R-MAP4) との複合体構造を解明した。4R、5R-MAP4 共に微小管プロトフィラメントに沿って複合体形成をしていた。とくに微小管を構成している α チューブリンと β チューブリンの継ぎ目部分に強い MAP4 の density が観測された。4R、5R 構造の詳細、制御メカニズムについて会場で議論したい。