

日本解剖学会

第74回中国・四国支部学術集会

会期：令和元年10月26日（土）、27日（日）

会場：島根大学医学部（出雲キャンパス）看護学科棟

特別講演

華岡流外科の神髄

梶谷 光弘

公益財団法人いづも財団

有吉佐和子が小説『華岡青洲の妻』を発表したのは、1966（昭和41）年のことでした。彼女は、いつの時代にも共通する嫁姑の心理的葛藤を華岡青洲の史実に織り交ぜながら描きました。これによって華岡青洲（1760-1835）は、一躍、多くの日本人が知る江戸時代を代表する医者となりました。

1804（文化元）年10月13日朝、青洲は大和国五條郡の藍屋利兵衛の母に「麻沸散」を飲ませました。すると、「正気沈沈、人事を識らず。終身麻痺して痒痛を覚えず」という状態に陥りました。青洲は、コロンメスにより硬くなった乳房の上部を3寸（約10cm）ほど切開しました。そして、出血する中、創口から指を入れて岩核（腫瘍核）を探したところ、筋肉に癒着して離れなかったため、両手を入れて掴み、コロンメスで切除しました。その後、内部を消毒し、バルサムコンパインという薬を入れて縫合しました。これはエーテルやクロロホルムによる麻酔から40年も前のことで、世界初の全身麻酔による乳がん腫瘍摘出手術でした。

島根大学附属図書館医学分館「大森文庫」には、華岡流外科に関する膨大な史料が所蔵されています。今回、それらの史料を中心として、華岡青洲による全身麻酔薬の開発過程とそれを用いた乳がん腫瘍摘出手術、門人が「春林軒」や「合水堂」などで学んだ医術・薬方、門人による帰国後の医療活動、杉田玄白の次男立柳や幕末の志士橋本左内が執刀した乳がん手術、そして青洲の医学論「内外合一」などについてお話しします。

こうした事実を通して、「華岡流外科の神髄」とは、医者としての真摯な生き方そのものであり、それは近代医学にも通じていることを結論とします。

1 ラット外側結合腕傍核は脳幹覚醒調節領域へ投射する視床下部オレキシン産生ニューロンを支配する

○有馬陽介、横田茂文、藤谷昌司
島根大学医学部・解剖学講座神経科学

オレキシン（ORX）は睡眠・覚醒に重要な役割を果たす神経ペプチドである。ORXを産生するニューロンは視床下部外側部に局限して存在し、睡眠・覚醒を制御する脳領域を支配することでその調節を行っていることが示唆されている。我々は、外側結合腕傍核（LPB）の興奮性ニューロンが視床下部脳弓周囲領域のORX産生ニューロンへ投射線維を送ることを明らかにした。しかし、LPBからの投射線維が、脳幹の覚醒調節領域へ投射するORXニューロンと連絡しているかは明らかとなっていない。そこで本研究では、まず、逆行性標識法とORXに対する免疫組織化学を併用して、腹側被蓋野、背側縫線核、脚橋被蓋核、背外側被蓋核、青斑核へ投射するORX産生ニューロンの分布を解析した。その結果、視床下部外側部には脳幹の覚醒調節領域へ投射するORX産生ニューロンが認められ、その中では青斑核への投射ニューロンが最も多いことが分かった。次に、脳幹の覚醒調節領域へ投射するORX産生ニューロンと逆行性標識法により検出されたLPB投射線維との分布を解析した。その結果、LPBの投射線維は、視床下部背内側核の最外側部および視床下部後核背側部で脳幹の覚醒調節領域へ投射するORX産生ニューロンと近接していた。以上の結果から、LPBからORX産生ニューロンを経て脳幹の覚醒調節領域へ至る神経路の存在が示唆された。我々はLPBが、侵害情報を脊髄および三叉神経脊髄核から視床下部脳弓周囲に伝達する神経路を明らかにしている。したがって、本研究で明らかにされた神経路は、侵害情報によって惹起される覚醒反応に関与することが示唆される。

2 孤東核グルタミン酸作動性ニューロンによる呼吸循環調節機構の機能的・形態学的解析

横田茂文¹、武田湖太郎²、濱 德行³、有馬陽介¹、藤谷昌司¹、岡田泰昌⁴
¹島根大学医学部解剖学講座神経科学、²藤田医科大学保健衛生学部リハビリテーション学科、³島根大学医学部生理学講座神経筋内生理学、⁴独立行政法人国立病院機構村山医療センター（臨床研究部）、電気生理学研究室

孤東核尾側部（cNTS）は血液ガス分圧や血圧などの一般内臓性感覚情報を受けることが知られている。本研究では遺伝子改変動物を用いて、cNTSに存在するグルタミン酸作動性ニューロンの呼吸および循環調節における役割について解析した。まず選択的神経線維標識法によりグルタミン酸作動性cNTSニューロンの投射線維分布を解析した。グルタミン酸作動性cNTSニューロンの投射線維は延髄腹外側部（VLM）および結合腕傍核（PB）に密な終末野を形成し、VLMの終末野には横隔神経核（PhN）投射ニューロンおよびチロシン酸化酵素（TH）陽性ニューロンが、また、PBの終末野にはVLM投射ニューロンが認められた。次にcNTSのグルタミン酸作動性ニューロンの活性化による呼吸および循環に及ぼす影響を解析した。薬理遺伝学的方法によりグルタミン酸作動性cNTSニューロンを興奮させると、一回換気量の増大と心拍数の減少を引き起こした。一方、呼吸頻度および血圧の変化は認められなかった。またグルタミン酸作動性cNTSニューロンの活性化は、PhN投射VLMニューロンおよびVLM投射PBニューロンに対照群と比較してFosタンパク発現を増加させた。さらにVLMに存在するTH陽性ニューロンにもFosタンパクの増加を認めた。以上の結果より、cNTSのグルタミン酸作動性ニューロンは、VLMに存在するPhN投射ニューロンやTH陽性ニューロンおよびPBに存在するVLM投射ニューロンへ連絡することにより呼吸・循環調節を行っていることが示唆された。

3 Localization of Delta3 Form of α -Tubulin in the Mouse Central Nervous System

重政祐司、○Faryal Ijaz、池上浩司

広島大学大学院医系科学研究科 解剖学及び発生生物学

Delta3 form of α -tubulin ($\alpha\Delta 3$), a truncated variant of α -tubulin is generated by the sequential deletion of three residues (EEY) at the C-terminal tail of α -tubulin. We produced an antibody against a peptide that is the C-terminal part of $\alpha\Delta 3$ with the ultimate goal to determine localization of $\alpha\Delta 3$ in the central nervous system. The specificity of the antibody was checked by immunostaining IMCD3 cells overexpressing delta2 or delta3 forms of α -tubulin. The antibody only recognized the delta3 form of tubulin. Next, to know whether the antibody can truly detect $\alpha\Delta 3$, we immunostained IMCD3 cells overexpressing $\alpha\Delta 3$ or $\beta\Delta 4$ C-terminal peptides and found that the antibody detects both $\alpha\Delta 3$ and $\beta\Delta 4$ form of tubulin. To make the antibody specific against $\alpha\Delta 3$, it was cleared against $\beta\Delta 4$ C-terminal peptide. Immunostaining showed that cleared antibody solely detected $\alpha\Delta 3$ signals and did not react with $\beta\Delta 4$. Finally, we examined the distribution of endogenous $\alpha\Delta 3$ in the mouse central nervous system. In the spinal cord, $\alpha\Delta 3$ had the highest signal in the posterior funiculus while in brain; $\alpha\Delta 3$ was enriched in the neuronal axons of the purkinje and granular layer of cerebellum, corpus callosum and striatum, and cerebral cortex.

4 Analysis of the diversity of GABA-immunoreactivity in interneurons of mouse olfactory bulb using light and electron microscopy

○Keita Satoh¹, Emi Kiyokage², Kazunori Toida^{1,3}

¹Dept. Anat., Kawasaki Med. Sch., Kurashiki, Japan.

²Dept. Med. Tech., Kawasaki Univ. Med. Welfare, Kurashiki, Japan.

³Res. Center for ultra-high voltage EM, Osaka Univ., Osaka, Japan.

Odor information is processed in the olfactory bulb (OB) organized by olfactory inputs, interneurons, projection neurons, and centrifugal inputs, which might play roles in regulating olfactory information processing. Among them, like other brain regions, there are many kinds of interneurons and representative types of them are GABAergic. Interestingly, these interneurons have exhibited the diversity of immunoreactivity for GABA with several intensities even in same morphological and chemical neuronal populations from our studies so far analyzed. It could suggest certain heterogeneity in the amount of GABA and thus possibly different phases of function reflected by the volume as neuroactive substances in the same GABAergic neuronal group. Our urgent question at present is what defines this diversity. As the first step to address, in this study, we have examined the diversity of immunoreactivity in all kinds of GABAergic interneurons in the whole layer of the OB of the wild-type mice, by light and electron microscopic observation. In addition, we have quantitatively analyzed the diversity of immunoreactivity and further examined the co-localization of other GABAergic markers such as synthesizing enzymes and transporters in these GABAergic interneurons in the OB using laser scanning microscopy. (COI: NO)

5 大脳皮質5層 - 視床後核投射における巨大シナプス終末の発達

○林 周一^{1,2}, Anna Hoerder-Suabedissen², Emi Kiyokage³, Kazunori Toida¹, Graham Knott⁴ and Zoltán Molnár²

1, 川崎医科大学, 2, University of Oxford, 3, 川崎医療福祉大学, 4, EPFL

大脳皮質5層から皮質下の領域に投射する軸索経路は、哺乳類の随意運動や感覚情報に応じた運動の調節に重要な役割を果たす。その中で、皮質5層から視床後核への投射軸索は特徴的な巨大シナプス終末形態をもち、この形態は皮質からの強力な出力を着実に視床核に伝えるために重要であることが示唆されている。しかし、そのシナプス終末形態の発達を制御する機構は明らかになっていない。本研究では、Rbp4-Cre マウスを用いて大脳皮質5層軸索を特異的に標識し、それらの視床後核におけるシナプス形成過程を調べた。その結果、視床後核における皮質5層投射の巨大シナプス終末は生後2-3週に形成されることが分かった。Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM)を用いて得られた巨大シナプスの3次元再構成像を解析したところ、1つのシナプス前終末が10個前後のスパインを包み込む特殊な形態をとることが明らかになった。皮質5層特異的に Synaptosome Associated Protein 25 (SNAP25) を欠損させたマウスでは、視床後核における巨大シナプス終末の形成が阻害された。以上の結果から、SNAP25を介した小胞放出が視床後核における巨大シナプス終末形成に必須であることが示唆される。

6 喉頭ペーパークラフトの制作

○里田隆博・広島国際大学 総合リハビリテーション学部 言語聴覚療法専攻

喉頭は小さく、その構造はわかりにくい。市販の模型を見ても、学生は愛着がわかない。また、筆者は以前、喉頭の機能を説明するために、大きな模型を作製した。しかし、学生にとって、授業での模型はその時の模型であり、家に帰って学習できない。そのため、今回、手軽に作れるペーパークラフトを考案した。

模型はA4の厚紙一枚で作成できるようにした。輪状軟骨と気管は一体とした。輪状甲筋は甲状軟骨と一体にした。喉頭蓋軟骨は甲状軟骨の内側に張り付けた。輪状甲筋関節は差し込み式にした。披裂軟骨は、折り畳み式にして、尖、声帯突起、筋突起を表現した。声帯軟骨と甲状披裂筋を折り畳み式にして、披裂軟骨に固定できるようにした。後輪状披裂筋と外側輪状披裂筋は、連続して作成し、披裂軟骨の筋突起にかぶせるようにした。横・斜披裂筋は、後ろから披裂軟骨に貼るようにした。披裂軟骨の尖の部分に前庭軟骨を追加した。上喉頭神経と下喉頭神経を作り、上喉頭神経の外枝が輪状甲筋を支配し、下喉頭神経がその他の筋を支配することを表現し、上喉頭神経の内枝は知覚性であるが、下喉頭神経と吻合することも表現した。このペーパークラフトは安価であり、学生自身が作成することで愛着もわき、非常に教育的効果があると思われる。

7 解剖体の灌流固定を想定したラット血液中ホルモニン濃度の定量法の検討

○小見山高明、品岡玲、大塚愛二
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科人体構成学

【目的】防腐処置は一般的に10%ホルモニン溶液を動脈より灌流固定に行ってきたが、近年では手術手技研修で用いられる Thiel 固定法など従来よりも低濃度での固定方法も多く使用されている。実際の灌流後末梢血中のホルモニン濃度は不明で、経験則により行われている。ホルムアルデヒドの定量法としては分光光度法、ガスクロマトグラフ(GC)法、液体クロマトグラフィー(LC)法が一般的であるが、血液の混ざったサンプルでは測定が不安定で経費もかかる。今回我々は、灌流固定を想定しホルモニン溶液を添加したラット血液を用いて、簡単・迅速・安価・安全にホルモニン濃度を測定できる方法として分光光度法の一つであるアセチルアセトン法を利用しホルモニン濃度の定量法を検討した。【方法】①ホルモニン標準希釈液を調整し、検量線を作成する。②0.2、2及び10%ホルモニン溶液を調整し、等量のラット血液を加え、0.1、1及び5%のサンプルとする。③②で調整したサンプルをさらに吸光度を測定できる濃度まで希釈し、測定後希釈率分を換算し測定濃度とする。④保存方法別ホルモニン濃度の経時変化を確認するためサンプル調整後、室温、4℃それぞれで保存し経時変化を確認した。【結果と考察】アセチルアセトン法を用いてラット血液中ホルモニン濃度の定量を行うことができた。保存方法としては4℃で保存したサンプルの方が経時変化が小さく、また、サンプルが高濃度になるにつれ経時変化が小さかった。本法は、解剖体での測定に適していると考えられる。

8 若手研究者の会・これまでの歩みと夏の学校報告

鍋加浩明
愛媛大・院医・解剖学・発生学

2018年11月に日本解剖学会「若手研究者の集い」準備委員会が立ち上げられ、2019年3月に新潟で開催された第124回日本解剖学会総会・全国学術集会の若手ランチョンセミナーで「若手研究者の会」が正式に発足した。現在「交流シンポジウム班」「教育研究キャリア班」「総会・懇親会班」の3班体制で組織している。

交流シンポジウム班の企画として2019年8月24日(土)・25日(日)の2日間、愛知県名古屋の邦和セミナープラザにおいて「夏の学校」を開催したので報告する。1日目には他学会の若手の会代表者を招いてパネルディスカッションを行い、それぞれの団体の成り立ちや組織の違いを浮き彫りにする事で今後の日本解剖学会若手研究者の会の方向性について話し合った。2日目は若手研究者の会の規約案について話し合うと共に今後の活動について個別の議題についてワークショップ形式で討論を行った。

その他、若手研究者の会ではメーリングリストの構築、パスワード付きWebページでの教育資料共有・交流掲示板の作成準備を行っている。また、2020年3月に山口で開催される第125回日本解剖学会総会・全国学術集会において若手研究者の会総会と若手シンポジウムを予定している。

(COI:なし)

9 タブレット端末カメラを利用した組織学実習が医療系学生の学修モチベーションに与える効果

○津森登志子 県立広島大学保健福祉学部

県立広島大学保健福祉学部では理学・作業療法学科2年次に解剖学実習を開講しており、この中では組織学実習も行う。しかし、顕微鏡に慣れない学生が長時間接眼レンズ経由で標本を観察しながらスケッチを行うことには相当な困難を伴い、実習そのもののモチベーションを低下させる原因にもなっていた。そこで、視野選択までは顕微鏡下で行うが、顕微鏡視野の画像をタブレット端末のカメラで取得し(前田ら,2018)、必要部分をタブレット上で拡大しながら観察・討論・スケッチを行う方法を試行した。接眼レンズとタブレット端末のカメラ接続には簡易アダプターを考案することにより、画像取得を容易にする工夫を行った。実習終了後にはアンケートを実施し、本試行が学生に与えた影響について検討した。その結果、顕微鏡観察による負担が軽減されたことにより、学生が組織学実習をより取り組みやすいものと捉えるようになったことがわかった。また、タブレット上の画像をもとに学生-教員間、学生-学生間の情報共有が容易になったことにより、実習室内でのディスカッションも活性化した。さらに、学生が取得したモデル視野を教卓スクリーンで提示させる機会を設けることにより、よりよい視野選択への意欲も刺激できた。今回の試行は、従来からの個で完結する組織学実習のスタイルに変化をもたらし、学生の学修モチベーション向上にも寄与する取り組みであると考えられた。事後アンケートの結果では、大部分の学生が次年度以降もこのスタイルを継続することを希望した。(COI:なし)

10 Interkinetic nuclear migration in the tracheal and esophageal epithelia of the mouse embryo.

○Regassa Dereje Getachew¹, Akihiro Matsumoto¹, Yasuhiro Uchimura², Jun Udagawa², Hiroki Otani¹

1. Department of Developmental Biology, Faculty of Medicine, Shimane University.

2. Department of Anatomy, Shiga University of Medical Science

Interkinetic nuclear migration (INM) is the migration of nuclei of the epithelial cells in synchrony with cell cycle, undergoing cell division at apical and back to basal side during interphase. We investigated the inter-organ and regional differences of INM pattern in the epithelia of trachea and esophagus of mouse embryos at E11.5 and E12.5 and the following 12 hrs. The chronological changes in 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) labeled nuclei along the apico-basal axis were analyzed. We ran one-way ANOVA using MorphoJ package to analyze the comparison among the groups. The trachea total vs. esophagus total at E11.5 showed different INM patterns of EdU-labeled nuclei distribution ($P = 0.0001$), while at E12.5 no differences between the two organs ($P = 0.0959$). Trachea at E11.5 showed regional difference (dorsal vs. ventral) ($P = 0.012$), while at E12.5 no regional differences ($P = 0.302$). Esophagus showed no regional differences at either E11.5 or E12.5 ($P = 0.694$, $P = 0.602$, respectively). These findings suggest that the inter-organ INM pattern difference exists at E11.5 between trachea and esophagus, and regional difference exists in trachea at E11.5 but not in esophagus, which may be involved in the later different development of the organs.

11 ニワトリ胚における neuro-mesodermal progenitors (NMP) の検証

○下北英輔¹、鈴木仁美²、鶴尾吉宏¹、竹本龍也² (¹徳島大学医歯薬学研究所顕微解剖分野、²徳島大学先端酵素学研究所発生生物学分野)

脊椎動物の発生過程において、尾部の神経系及び中胚葉系組織は、neuro-mesodermal progenitor (NMP) と呼ばれる前駆細胞から作られると近年報告されている。NMP という表現は、①神経系と中胚葉系の両方に分化できるという分化能の観点と、②神経系と中胚葉系の両方に分化するという細胞系譜の観点とが混在して使用されているが、厳密にこれら2つの条件の両方を満たす細胞の存在は実証されていない。本研究では、ニワトリ胚でのNMPの存在を検証するため、NMPマーカーと考えられている Sox2・Tbx6L 共発現細胞に注目し、その分化能と細胞系譜とを区別して解析を行った。

ニワトリ胚において、中胚葉で発現する Tbx6L を阻害したところ、本来中胚葉へと分化する細胞は Sox2 の発現を異所的に上昇させ、神経系へと分化転換した。この結果から、分化能の観点ではニワトリの予定中胚葉細胞はマウスと同様に神経へと分化できる細胞であることを示している。一方、Sox2・Tbx6L 共発現細胞群に対して、胚表層に存在する集団と深層に存在する集団とを区別して系譜を追跡したところ、表層の細胞は神経系組織のみに寄与した。この結果は、ニワトリ胚では、予定神経細胞と予定中胚葉細胞とが異なる胚領域に存在することを示している。マウスではこれまで胚表層と深層とを区別して解析されていないため、NMP の存在及び概念を改めて検証する必要性を提起する。

12 内皮細胞特異的 FOXO1 欠失マウスにおけるペリサイトの形態変化

○新美健太¹、足立裕美¹、石川寛子¹、久保田義顕²、稲垣忍³、古山達雄¹

1. 香川県立保健医療大・教養 2. 慶応大・医・解剖 3. 阪大・連合小児ペリサイトは微小血管壁を被覆し血管構造を安定化させる細胞であり、その欠失は糖尿病性網膜症などの微小血管関連疾患の一因とされている。FOXO1 転写因子は内皮細胞に多く発現し、内皮細胞における欠失により血管新生異常が起こること報告されている。しかし内皮細胞における FOXO1 の欠失によりペリサイトがどのように影響されるかは不明である。我々は今回、内皮細胞特異的 FOXO1 欠失マウス(以下 KO)の網膜における細小血管のペリサイトの観察を試みた。生後3週齢で観察すると、対照マウス(以下 WT)の細動脈におけるペリサイトは帯状の規則正しい形態を示したが、KO においてはペリサイトのフィラメント方向が非常に不規則化しており、成熟ペリサイトマーカーの発現が減少していた。なおペリサイト数やペリサイトの増殖、細胞死などは変化がなかった。この結果からペリサイトの分化異常を考え、FOXO1 をノックダウンした初代培養動脈内皮細胞において分化に関わる因子をスクリーニングし TGF β 活性化作用がある thrombospondin1 (THBS1) を特定した。実際、KO の細動脈で THBS1 の発現減少を確認でき、内皮・ペリサイト共培養実験により FOXO1-THBS1 経路が部分的にペリサイトの分化を担っていることを示すことができた。(COI: なし)

13 脾臓形成過程における脾洞杆状内皮細胞の役割

○小野 公嗣・川崎医科大学解剖学、嶋 雄一・川崎医科大学解剖学

Ad4BP/SF-1 は核内受容体型の転写因子であり、ステロイドホルモン産生組織である副腎や生殖腺の発生に必須の因子であることが報告されている。我々は、Ad4BP/SF-1 遺伝子の様々な組織特異的エンハンサー領域を探索する過程で、Ad4BP/SF-1 遺伝子の脾臓エンハンサーを同定し、その欠損マウスの作製に成功した。Ad4BP/SF-1 が発現する脾洞の杆状内皮細胞は、これまで発生学的な観点からの解析はほとんどなされておらず、杆状内皮細胞の分化メカニズムは不明である。本研究では、脾臓エンハンサー欠損マウスを用いた形態学的解析を行うことにより、脾臓エンハンサーの欠損に伴って杆状細胞においてどのような形態的異常がみられるかを検証した。

エンハンサー欠損マウスの表現型を解析した結果、体重に占める脾臓の重量が減少していた。次に脾臓の HE 染色を観察したところ、欠損マウスにおいて白脾臓が実質の中心に融合して存在していた。また、欠損マウスでは血管の発達が悪い傾向にあり、白脾臓に中心動脈がほとんど認められなかった。走査型電子顕微鏡を用いた解析から、脾洞を構成する杆状内皮細胞の配列に異常が生じていた。さらに、欠損マウスでは、Howell-Jolly body を有する赤血球が有意に増加していた。以上のことから、Ad4BP/SF-1 は脾洞の形成に重要な因子であり、また脾洞の正常な形成は脾臓の発生過程において大きな役割を果たしている可能性が示唆された。

14 ゲノム編集によるシステインロイコトリエン受容体遺伝子 *cysltr1* ノックアウトマウスの作製 -骨疾患における機能解明-

藤田洋史¹、安藤碧¹、土生田宗憲¹、服部高子²、久保田聡²、大内淑代¹
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科¹細胞組織学分野、²口腔生化学分野

脂質炎症性メディエーターであるシステインロイコトリエン CysLT と、その Gタンパク質共役受容体 CysLT1R は、炎症・免疫反応の一部を担う重要なシグナル経路である。また、破骨細胞の分化と骨吸収活性には、炎症・免疫反応に関連する分子またはそのファミリー分子が、重要な役割を持つことが明らかになっている。そして、これらの分子が、様々な骨疾患に関与することも報告されている。しかし、CysLT1R の骨疾患における役割は十分に明らかではない。これまでに私たちは、骨髄マクロファージと破骨細胞に *Cysltr1* が発現することを明らかにしている。本研究では、骨疾患における CysLT1R の機能を明らかにするために、CRISPR-Cas9 を用いて *cysltr1* 変異(KO)マウスを作製した。本マウスは、*cysltr1* 遺伝子のエクソン 4 の 112 塩基を欠失させており、フレームシフト変異が生じて CysLT1R タンパク質全長の約 7 割が欠損する。また、オフターゲット変異は認められなかった。定量 PCR 法による遺伝子発現解析により、KO マウスにおいて、正常な *Cysltr1* を発現していないことを確認した。さらに、もう一つの CysLT 受容体である *Cysltr2* の遺伝子発現に変化は認められなかった。現在、このゲノム編集マウスを用いて、卵巣摘出による骨粗鬆症モデルの骨の形態解析を進めている。

15 The expression and role of O-GlcNAc transferase on osteoblast and osteoclast differentiation

○Weng Yao¹、Guo Jiajie¹、Yuan Haoze¹、吉田賀弥²、池亀美華¹、岡村裕彦¹

¹岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・口腔形態学分野

²徳島大学・大学院医歯薬学研究所・口腔保健教育学分野

Background: Posttranslational protein modification by glycosylation plays an important role in regulating many cellular processes. O-GlcNAcylation is a form of glycosylation, the attachment of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine and threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins. O-GlcNAc glycosylation is catalyzed by O-GlcNAc transferase (OGT) and the O-GlcNAc residue is deglycosylated by O-GlcNAcase (OGA). In this study, we examined the role of OGT in osteoblast and osteoclast differentiation. **Methods:** The intracellular localization and expression of OGT were examined by immunocytochemistry and western blotting, respectively, in mouse preosteoblastic MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured in the osteoblast differentiation medium with/without OSMI-1 (an OGT inhibitor). The effect of the inhibitor on osteoblast differentiation and mineralization was examined by ALP activity assay, ALP staining, qPCR and Alizarin red staining. To investigate the effect of the inhibitor on osteoclast differentiation, we performed TRAP staining in mouse monocytic RAW264 cells. **Results and Conclusion:** OGT is mainly localized in nucleus in osteoblasts. OSMI-1 decreased the ALP activity and the expression of osteoblastic differentiation markers in MC3T3-E1 cells. OSMI-1 treatment suppressed the number of TRAP-positive multinuclear cells in RAW264 cells. The inhibition of OGT inhibited mineralization ability in osteoblasts, as determined by Alizarin red staining. Also, inhibition of OGT suppressed osteoclast differentiation. These results suggest that protein O-GlcNAcylation is involved in osteoblast differentiation.

16 The role of Vgl3 co-transcription factor during osteoblast differentiation

Yuan Haoze, Mika Ikegame, Weng Yao, Guo Jiajie, Hirohiko Okamura

Department of Oral Morphology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Vgl3, which is a co-transcription factor, and have been shown as an adipogenic differentiation inhibitor. Moreover, up-regulation of Vgl3 gene expression induced osteogenic-related gene expression. We previously found that the expression of Vgl3 was up-regulated during the tensile-stress induced osteoblast differentiation in mice cranial sutures. However, the role of Vgl3 in osteoblast differentiation is still not clear. Therefore we investigated the expression of Vgl3 during the osteoblast differentiation to clarify its function. We examined the Vgl3 expression during the differentiation of the osteoblastic cell line MC3T3-E1 by real-time PCR, and the intracellular localization of Vgl3 protein by immunofluorescence. The expression of Vgl3 was increased during the process of osteoblastic differentiation. We further knockdown the Vgl3 gene in MC3T3-E1 cells, and found the decrease of gene expression levels for Runx2, Osterix and Alkaline phosphatase. However, the expression of Dlx5 has hardly changed. These results suggest that Vgl3 plays an important role in osteoblast differentiation, probably from the early stage. We are going to investigate the transcription factors which will work together with Vgl3 for the osteoblast differentiation.

17 クォーラムセンシング因子は骨芽細胞の分化および細胞死に関与する

○岡村裕彦¹, Guo Jiajie¹, Weng Yao¹, Yuan Haoze¹, 吉田賀弥², 池亀美華¹¹ 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・口腔形態学分野² 徳島大学・大学院医歯薬学研究所・口腔保健教育学分野

クォーラムセンシングは、緑膿菌などグラム陰性菌がもつ細胞間情報伝達機構である。クォーラムセンシング因子である N-acyl Homoserine Lactone (AHL) は、細胞間の情報伝達を仲介する因子であり、細菌数の増殖に応じて、その産生量が増加する。同種・異種の細菌に対する AHL の作用に比べて、宿主の細胞の機能や細胞死に関する AHL の役割は未知の点が多い。今回我々は、AHL が骨芽細胞の分化や細胞死にどのような影響を及ぼすか解析した。マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を様々な濃度の AHL で処理した。骨芽細胞の分化や細胞死に関するマーカーの発現や動態について調べた。培養初期では、AHL の濃度に依存して細胞死が誘導された。しかしながら、培養を継続すると細胞増殖が回復し、低濃度 (30 μM) の AHL は、Runx2, Osterix, BSP などの骨分化マーカーの発現増加を伴って骨芽細胞の分化を促進した。一方、高濃度 (50 μM) の AHL は、ミトコンドリアからの cytochrome C の放出、Caspase-3 の活性化を伴うアポトーシスを誘導した。AHL の動態を調べた結果、短時間で骨芽細胞内に取り込まれ、主にミトコンドリアと小胞体に集積することが分かった。また、AHL は濃度によって異なるパターンで細胞内カルシウムイオンの増加を誘導した。以上の結果から、骨芽細胞の機能に与える AHL の影響はその濃度によって異なり、細菌が増殖して AHL 濃度が高くなった状態では、骨芽細胞の分化を抑制し、骨形成を阻害すると考えられる。

18 骨由来 miR-125b による骨転移制御

○吉子裕二, Nushrat Sarmin, 南崎朋子

広島大学大学院医系科学研究科(歯)硬組織代謝生物学

マイクロ RNA の一部は血液などの体液に放出され、標的細胞の特定の遺伝子発現、翻訳を抑制する。我々は骨芽細胞に発現するマイクロ RNA が選択的に骨質に蓄積されることを見出した。このうち、miR-125b は骨吸収に伴って骨髄小環境中に放出され、Prdm1 を標的遺伝子として破骨細胞の形成、骨吸収を抑制することを見出した。骨転移では、がん細胞による破骨細胞の活性化、骨吸収を伴う。骨転移能を有するがん細胞株の miR-125b レベルは骨芽細胞に比較して著しく低値であった。さらに、がん細胞株に miR-125b を導入すると、増殖、遊走能が低下した。そこで、マウスの尾動脈から乳がん細胞株 PY8119 を投与し、*in vivo* イメージングで骨転移を定量に解析したところ、野生型 WT に比較し、miR-125b を骨芽細胞に過剰発現するトランスジェニック(Tg)において有意な骨転移の抑制が確認された。これと一致して、骨吸収を示す各種骨形態計測パラメータは Tg が有意に低値であった。組織学的にも Tg マウスの骨転移巣の縮小を認め、転移巣と骨境界面の破骨細胞数も有意に低値を示した。以上の結果から骨由来 miR-125b はがん細胞に直接および間接的に作用し、骨転移を抑制することが示唆された。

19 糖尿病発症機序における膵臓内 Iba1 陽性マクロファージの役割について

○木戸玲子, 玉村慎宏, 下北英輔, 鶴尾吉宏
徳島大・院医歯薬・顕微鏡

【目的】

成体ラットの膵臓には、Iba1 陽性マクロファージ (Iba1⁺Mφ) が多数分布しているが、糖尿病の病態形成における関与についてはほとんどわかっていない。本研究では、膵臓内 Iba1⁺Mφ と糖尿病発症機序との関係を形態学的に解析した。

【材料と方法】

ラット (SLC: Wistar ♂, 7-9 週齢) 12 匹にストレプトゾトシン (STZ, 30mg/kg) を実験開始時および 2 週間後の 2 回、腹腔内に投与して糖尿病モデル動物を作製した。実験開始から 1 カ月後に、4% PFA による灌流固定を行い凍結切片を蛍光免疫染色した。

【結果】

膵臓の小葉内導管周囲には Iba1⁺Mφ が密に分布しているが、高血糖となると導管周囲および近接する膵島内に ED1 陽性の炎症性マクロファージと CD8 陽性 T 細胞の増加がみられた。高血糖ラットの膵島内では Iba1⁺Mφ は β 細胞領域に存在することから Iba1⁺Mφ が β 細胞の破壊に関与することが示唆された。

【考察】

高血糖で惹起された膵島組織の障害によって Iba1⁺Mφ の炎症性マクロファージへの分化が促進されることが示唆された。膵島が小葉内導管に近接していることから、導管周囲に存在する Iba1⁺Mφ が組織恒常性維持から炎症の亢進へと機能変化して糖尿病の病態成立に関与することが考えられた。

20 骨髄腫細胞における脱リン酸化酵素活性制御異常と TAK1 を介する生存シグナルの活性化

寺町順平 徳島大学大学院医歯薬学研究所 組織再生制御学

【背景・目的】 形質細胞の悪性腫瘍である多発性骨髄腫 (MM) は、骨髄微小環境に依存した進展を示し、骨破壊病変を形成しつつ進展する。我々は骨髄腫細胞において TAK1 が高発現し恒常的にリン酸化され、腫瘍進展や生存にかかわっていることを見出した。通常、キナーゼによりリン酸化を受けたタンパク質は速やかにフォスファターゼにより脱リン酸化されるが、骨髄腫細胞での TAK1 の恒常的な活性化は、その脱リン酸化酵素の異常により引き起こされているのではないかと考え、以下の検討を行った。【方法・結果】 1) MM 細胞においてセリン・スレオニンフォスファターゼである PP2A が高発現していた。2) MM 細胞に PP2A 阻害剤であるオキサダ酸を処理すると TAK1 のリン酸化が誘導される一方、PP2A の活性剤である SMAP を処理すると逆にリン酸化 TAK1 の発現が抑制され、PIM2 や MYC などの抗アポトーシス因子の発現を抑制し、細胞死を誘導した。3) PP2A の活性化は、内因性 PP2A 抑制因子である CIP2A, PME-1, SET などの発現により調節されているが、その中でも CIP2A が MM 細胞において高発現していた。4) MM 細胞に CIP2A を標的とした shRNA を導入すると、TAK1 のリン酸化及びその発現が抑制された。5) TAK1 阻害剤 LLZ1640-2 により MM 細胞の CIP2A の発現が抑制されたが、PME-1, SET の発現は抑制しなかった。6) MM 細胞にプロテアソーム阻害薬を処理すると、転写レベルで CIP2A の発現が抑制され、さらに TAK1 阻害薬との併用により、効率的に骨髄腫細胞の増殖を抑制した。【まとめ・考察】 MM 細胞において、TAK1 の高発現・恒常的なリン酸化は CIP2A を介した PP2A 活性の減弱により惹起されていること、さらに TAK1 自身がその発現および活性化の自己増幅を引き起こしていることが示唆された。

21 16p13.11 微小重複による神経新生亢進の分子メカニズムの解明

○藤谷昌司, 有馬陽介
島根大学医学部・解剖学講座神経科学

16 番染色体短腕の 16p13.11 微小重複は、AD/HD、自閉スペクトラム症などの神経発達障害、または統合失調症に関連した危険因子であるが、その異常の分子メカニズムは全くの未解明であった。我々は、ヒトの 16p13.11 遺伝子座のコア領域を含む BAC トランスジェニックマウスを作製し、マウスを解析したところ、神経新生の亢進と多動の表現型を示した。子宮内胎仔脳電気穿孔法により、miR-484 および RNase ドメインを含む RNA 結合タンパク質 *Marf1* を原因候補遺伝子として同定した。miR-484 と *Marf1* は、胎児脳皮質に発現し、miR-484 または *Marf1* の過剰発現は、*in vivo* で神経前駆細胞の増殖を減少させ、神経新生が増加した。ルシフェラーゼアッセイを用いたスクリーニングにより、プロトカドヘリン-19 (*Pcdh19*) の 3' UTR が miR-484 の標的として同定した。さらに、RNA 免疫沈降-マイクロRNA 解析により候補ターゲットを同定した。これらの結果により、miR-484 と *Marf1* は、それぞれのターゲットを阻害することにより相乗的に神経新生を促進したと考えられた。不均衡な miR-484 および *Marf1* 発現による神経新生の異常亢進は、16p13.11 微小重複症候群の病因に寄与すると考えられた。

22 2 型糖尿病の病期が異なる OLETF ラットにおける不安様行動と扁桃体の抑制性神経細胞の変化

○越智亮介¹, 藤田直人¹, 後藤夏季¹, 西条寿夫¹, 浦川将¹
1: 広島大学大学院医系科学研究科運動器機能医科学
2: 富山大学大学院医学薬学研究所システム情動科学

2 型糖尿病の合併症として不安障害のような精神疾患が目ざされている。過食により 2 型糖尿病の症状が進行していくモデルである Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) ラットは不安様行動を含む行動変容が報告されているが、2 型糖尿病の進行に伴う変化や、その神経基盤は明らかにされていない。本研究は、OLETF ラットの 2 型糖尿病の病期が異なる 8 および 20 週齢時点において、不安様行動および抑制性神経細胞のサブタイプであるコレシストキニン (CCK) とパルプアルブミン (PV) 陽性細胞に着目して、行動学および組織学的解析を行った。対照は、非糖尿病モデルである Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットとした。8 週および 20 週齢のどちらにおいても、OLETF ラットは対照群より体重が大きかった。経口ブドウ糖負荷試験を行ったところ、OLETF ラットは 8 週齢より 20 週齢において耐糖能が悪化していた。不安様行動評価のためのオープンフィールドテストでは、8 週および 20 週齢のどちらにおいても、OLETF ラットは対照群よりフィールド中央部の移動距離が少なかった。また、8 週および 20 週齢のどちらにおいても、OLETF ラットは対照群より扁桃体外側核と基底外側核における CCK 陽性細胞数が多かったが、PV 陽性細胞数には有意差がなかった。これらの結果から、2 型糖尿病進行前の初期から OLETF ラットは不安様行動が亢進しており、扁桃体基底外側核の CCK 陽性細胞数の増加が関与していることが示唆された。

23 母子分離が引き起こす攻撃性増大と関連する脳領域

○荒木 智尋¹、氏原 英敏¹、太田 健一²、鈴木 辰吾²、三木 崇範²¹香川大学医学部 (医学科 2年)、²香川大学医学部形態・機能医学講座神経機能形態学

母子分離は発達期の児にストレスを与えるものであり、それは脳発達を阻害し様々な高次機能に影響を与えるものである。しかし、そのようなストレスがどのように高次機能の異常を引き起こすのか、またそれは具体的にどの脳領域が原因となっているのかについてはまだ不明な点が多い。本研究では、母子分離が児の攻撃性に与える影響に焦点を当てて、SDラットを用いて解析を行った。

実験群は発達期に仔を個別に母獣から分離した (3時間×2回/日、生後 2-20日) (Maternal deprivation [MD]群)。対照群は母獣と共に通常飼育を行った (Mother-reared control [MRC]群)。各群の雄を 21日齢で離乳後、通常飼育し9週齢で解析に用いた。攻撃性を調べるために resident-intruder paradigm test を行ったところ、MD群はMRC群に比べて有意に攻撃頻度が高く、攻撃性が高いことが示された。またこの行動試験の90分後に脳を採取し、c-fos陽性細胞数を扁桃体で解析したところ扁桃体全体でc-fos陽性細胞数が増加していたが、内側核や基底外側核では両群に変化は見られなかった。一方で中心核ではMD群で有意にc-fos陽性細胞数が増加しており攻撃性と有意な相関性も認められた。これらの結果から、脳発達期における母子分離は児の攻撃性を増加させるものであり、その原因は扁桃体中心核の過剰な活性化状態にあることが示唆された。

24 うつ病様行動における細胞外基質再編成の役割

相澤秀紀
広島大学 医系科学研究科 神経生物学

近年、うつ病における手綱核の機能異常が相次いで報告され、うつ病発症におけるその役割が急激に注目を集めているが、このような手綱核の病的活動異常がどのようにして引き起こされるかは不明な点が多い。

この問題に取り組むため、我々は慢性ストレス下でうつ病様の行動異常を示すマウスの手綱核の細胞外環境に注目し、解析を進めている。最近の研究結果によると慢性ストレスは手綱核における細胞外マトリックスの再編成を制御する Matrix metalloproteinases (MMPs) の過剰活性化及び単球などの炎症性細胞の遊走を惹起しており、向炎症性サイトカイン産生が上昇していることが明らかになった。網羅的遺伝子発現解析によると、手綱核で特異的に発現する Proprotein convertase (Pcsk5) と呼ばれる MMPs の活性化酵素がストレス負荷により上昇していた。この酵素は手綱核神経細胞で産生されており、in vitro における microglia の遊走を増強した。Pcsk5 の機能抑制が慢性敗北ストレスによる回避行動を抑制しており、Pcsk5 のうつ病様行動発現における因果関係が明らかとなった。

これらの事実は、手綱におけるストレス応答因子として Pcsk5 の重要性を示唆するものであり、うつ病病態における脳内モノアミン異常の分子基盤を明らかにするものとして期待される。

25 神経障害性疼痛に対するアデノシン A₃ アゴニストの効果

○寺山隆司

広島大学大学院医系科学研究科顎顔面解剖学研究室

神経障害性疼痛の各種動物実験モデルにおいてアデノシン A₃ レセプター (A₃AR) アゴニストの鎮痛効果が認められている。しかしながら A₃AR アゴニストの鎮痛効果の発現機構についてまだ十分に解明されていない。この研究では脛骨神経損傷後の触覚刺激に対する侵害防御行動、脊髄後角におけるミクログリアの活性化、ならびに脊髄後角二次ニューロンに対する侵害受容一次ニューロンからの収斂投射における A₃AR アゴニストの効果を検討した。行動学的指標による検討において、脛骨神経損傷後 3日目で触覚刺激に対する一時的な低感受性が見られたが、神経損傷後 14日目でアロディニアの状態となった。この神経損傷モデルを用いて神経損傷を行う当日、または神経損傷後 7日目から 8日間連続で A₃AR アゴニスト (0.1 mg/kg/day) を全身投与しその効果を検討したところ、薬剤の投与開始時期に関係なく神経損傷後 14日で見られるアロディニアが抑制された。またこの薬剤投与によって神経損傷後の脊髄後角におけるミクログリアの活性化、脊髄後角二次ニューロンに対する侵害受容一次ニューロンからの異常な収斂投射が抑制されることが明らかとなった。これらの結果は A₃AR アゴニストが末梢神経損傷後の脊髄後角におけるミクログリアの活性化ならびに損傷を受けていない一次ニューロンからの脊髄後角二次ニューロンに対する過剰な侵害受容入力を抑制することによって神経障害性疼痛を減弱させていることを示している。(COI:無し)

26 Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) is a novel immunohistochemical marker for myenteric neurons in the mouse

○Abu Md Mamun Tarif, Md Nabiul Islam, Emi Miyasato, Takumi Nakashima, Kanako Nozaki, Akie Yanai, Koh-hei Masumoto and Koh Shinoda
Division of Neuroanatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Yamaguchi

HAP1 is a neural huntingtin interactor, being considered as a core molecule of stigmoid body (STB). STB/HAP1-enriched regions of the brain and spinal cord tend to be spared from neurodegeneration, while areas with little or no STB/HAP1, including the striatum, thalamus, cerebral cortex, cerebellum and spinal motoneuron are neurodegenerative targets. Recently, we have clarified that most of the spinal pre-ganglionic autonomic neurons express HAP1, which suggests an important role of HAP1 in protection of autonomic transmission. HAP1-immunoreactive (ir) structures, However, have yet to be determined in the enteric autonomic nervous system. In the present study, using light and fluorescence microscopy, we determined the distribution of HAP1-ir cells and characterized their relationships with different functional markers in the gastrointestinal (stomach, duodenum and colon) autonomic nervous system of adult mice. HAP1 is present luxuriantly in Auerbach's plexus, while very few in Meissner's plexus. Double-immunofluorescence staining showed that most of the ChAT, NOS, Calretinin and Calbindin-ir cells expressed HAP1, whereas about 55%, 50%, 44% and 18% of HAP1-ir cells expressed ChAT, NOS, Calretinin and Calbindin, respectively in myenteric neurons. Our current results suggest that HAP1 might be considered as the novel immunohistochemical marker for all types of neurons in Auerbach's plexus. STB/HAP1 may play an important role in protecting myenteric neurons by increasing the threshold to neurodegeneration and decreasing the vulnerability to stress or aging.

27 末梢神経に影響する翻訳リードスルータンパク質: Large myelin protein zero の機能解析

○大谷嘉典¹・馬場広子²・藤谷昌司¹¹島根大学 医学部 解剖学講座 (神経科学)
²東京薬科大学 薬学部 機能形態学

Large myelin protein zero (L-MPZ) は、myelin protein zero (P0) の C 末端側に 63 アミノ酸が付加された翻訳リードスルー産物で、P0 と共に正常な末梢神経髄鞘の構成成分として存在する (Yamaguchi et al., 2012)。また、免疫性神経障害患者の血清中で高率に抗 L-MPZ 抗体が認められることから、疾患との関連性も示唆されている。しかし、L-MPZ の生理的および病的役割に関しては未だ不明な点が多い。

本研究は生理的リードスルーにより産生される L-MPZ の機能や生理的意義を明らかにすることを目的とし、新たに L-MPZ のみを発現するマウス (L-MPZ マウス) を作製し、その表現型や形態学的解析を行った。その結果、L-MPZ マウスにおいてシャルコー・マリー・トゥース病様の運動神経障害やミエリン膜の異常が観察された。これらの症状はこれまでに報告されている P0 を欠損したマウスとは完全に一致しないため L-MPZ は P0 と異なる機能を持つことが示唆された。また興味深いことに P0 と L-MPZ の割合が 1:1 に近い状態の L-MPZ ヘテロ接合体マウスでも症状が認められたため、P0 と L-MPZ のタンパク質量比が末梢有髄神経で重要である可能性が示唆された。