

日本解剖学会

第107回関東支部学術集会

会期：令和元年11月2日（土）

会場：東京女子医科大学臨床講堂2

特別講演

The multifaceted roles of thrombopoietin in hematopoietic stem cell maintenance

Ayako Nakamura-Ishizu
Tokyo Women's Medical University, Department of Microscopic and Developmental Anatomy

Circulating blood cells originate from one common cell in the adult bone marrow, hematopoietic stem cells (HSC). HSCs in the adult bone marrow (BM) proliferate and differentiate to replenish mature blood cells in the peripheral blood. In order to maintain a substantial pool within the BM, HSCs are kept cell cycle dormant. Among the various factors which influence hematopoietic stem cell fate, the cytokine thrombopoietin (Thpo), uniquely regulates hematopoietic stem cell self-renewal along as stem cell differentiation to Mk lineages. We have studied the effects of Thpo or cMpl-agonist to mice HSCs especially focusing on Mk-lineage differentiation and mitochondrial metabolism (Cell Reports, 2018). We will discuss the multifaceted roles on Thpo in regulating lineage-specific differentiation as well as cell cycle quiescence through metabolic alterations in HSCs.

1

インターロイキン 17A による大脳皮質異常形成メカニズムの解明

○富銘幸貴^{1,2}、佐々木哲也^{1,2}、権田裕子³、武井陽介^{1,2}¹筑波大学医学医療系解剖学・神経科学研究室²筑波大学院人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻³東京医科大学組織・神経解剖学分野

妊娠中期における母体ウイルス感染が、子の自閉症スペクトラム (Autism spectrum disorder; ASD) の発症リスクを上昇させることが疫学調査および動物実験で示唆されている。近年、母体ウイルス感染時に誘導される炎症性サイトカインのひとつ、インターロイキン17A (IL-17A) がASDの発症に寄与する可能性が示された。胎生中期IL-17A曝露マウス胎児は、ヒトASD患者においても観察される皮質パッチ構造がみられる。しかしながら、IL-17Aの神経発生に対する影響は明らかになっておらず、どのようなメカニズムでASD様の大脳皮質形成異常を生じさせるかはわかっていない。

本研究では、胎生中期IL-17A脳室内投与マウスの脳サンプルを用い、皮質構造の異常およびニューロン・グリア産生比を検討した。

2

慢性的な陽性ストレスがラット脳内アミノ酸代謝に与える影響

○下地康介¹、石田哲夫²、志賀 隆³¹筑波大学人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻²琉球大学理学部海洋自然科学科化学系³筑波大学医学医療系

ストレスには不安や恐怖などのマイナス感情で生じる陰性ストレスと、笑いや愛情、挑戦などのプラスの感情で生じる陽性ストレスがある。最近、笑いの効果としてNK細胞の活性化や糖尿病患者の血糖値上昇抑制が報告されるなど、陽性ストレスが健康促進作用を示すことが知られてきた。しかし、そのメカニズムはほとんど分かっていない。本研究では、慢性的な陰性ストレスが脳内のアミノ酸代謝を変化させることに着目し、慢性的な陽性ストレスが脳内のアミノ酸代謝にどのような影響を与えるかを調べた。また、D-セリンはNMDA型グルタミン酸受容体のコアゴニストとして働き、脳の高次機能に関与する。そこで、D-セリンを含む複数のD-アミノ酸の代謝についても調べた。Tickling刺激は、ラットの腹部をくすぐって快情動を誘発させる陽性ストレスモデルである。Wistar/ST雄ラットを用い、Tickling刺激を一日一回、二週間連続で与えたTickling群とTickling刺激の代わりにライトタッチ刺激を与えたコントロール群を製し、前頭前皮質・前部帯状皮質・膨大後皮質・線条体・海馬・扁桃体・側坐核・視床下部・小脳・松果体・下垂体を摘出して、液体窒素で凍結後、-80℃で保存した。それら脳部位からエタノール処理で抽出した標準アミノ酸をダブシルクロリドでラベルし、LC-MSを用いて分離・定量した。その結果、Tickling刺激を与えた群の前頭前皮質・扁桃体・視床下部・松果体・下垂体で複数のアミノ酸の濃度に有意な増減が観察された。D-セリン、D-プロリン、D-アラニンの定量結果も紹介した。

3

ラット膨大後皮質における vasoactive intestinal polypeptide 陽性ニューロンの分布

柴田秀史

東京農工大学大学院農学研究科獣医解剖学研究室

【背景】ラット膨大後皮質 (RS) は、大脳半球内側面に存在する帯状回の一部を占め、29a, 29b, 29c, 30野から構成されており、記憶・学習機能において重要な役割を果たすことが解明されつつある。一般的に、大脳皮質のニューロンは約80%が興奮性で約20%が抑制性ニューロンであり、後者は、さらに多くのグループに分類されることが知られている。抑制性ニューロンのうち vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 陽性 (+)ニューロンは、他の抑制性ニューロンの興奮を抑制し、脱抑制によって興奮性ニューロンの発火を調節するため、RSにおいては解明されていない。そこで、本研究では、ラットRSにおけるVIP+ニューロンの分布を免疫組織化学法によって検索した。【方法】体重280-320gのWistar系雄ラット4匹を深麻酔下で4%paraformaldehydeにて灌流固定し、凍結切片を作成して抗VIP抗体を用いてVIP+ニューロンを可視化した。【結果と考察】VIP+細胞体は29a-c野、30野を通じてLayer (L) 2-4に多く、L5, L6では少なく、L1では稀であった。いずれの領野および層においても細胞体は多極性が大部分を占めた。但し、29c野では双極性が比較的多かった。VIP+線維は、29a-c野では、L1・L2境界部、L4・L5境界部、L6に多く、それ以外の層では、やや少なかった。30野ではL2-4~L5浅部、L6に多く分布した。29b, c, 30野のL5, 6では浅深方向に走行する線維が顕著であった。以上の結果は、RSを構成する各領野でVIP+ニューロンの分布が異なることを示し、各領野におけるVIP+ニューロンの機能的役割が異なる可能性を示唆する。利益相反なし。

4

頭頸部筋付着部における形態形成

○内藤 哲、山本将仁、阿部伸一

東京歯科大学 解剖学講座

【目的】顎顔面領域の筋の骨への付着部形態形成過程は、四肢とは異なり特徴的な部位が存在する。中でも、特殊な機能を発揮する顎関節部と視覚器は身体他部と比較して特異的であることが推測できる。そこで今回我々は、頭頸部のいくつかの部位に関する胎生期の組織形態学的観察を行った。

【材料および方法】顎関節部観察のための試料はICR系マウス（胎生13~16日）を用いた。通法に従い連続切片を製し、それらの結合過程を免疫組織学的染色により、形態学的に観察した。視覚器の観察に関しては、起源となる骨への付着部筋の成熟過程を比較した。

【結果および考察】顎関節部において、V字型に整列した筋腱接合部は胎生13日にすでに存在し、胎生16日において、筋腱接合部と骨膜の間にコラーゲン線維が出現した。またこの時期に筋付着部の断端だけでなく、腱および軟骨の成熟もみられた。また視覚器においても、共通の筋付着部腱を起源として成熟する筋と独立した筋に分けられたものの、筋組織の成熟には付着部における腱性組織の成熟が必要である可能性が明らかとなった。今回の研究結果より、顎関節部・視覚器における筋付着部の形態形成過程に、四肢とは異なる発育の一端が明らかになった。(COI:なし)

5 顎舌骨筋の下顎骨付着部における形態形成獲得のプロセス

○山本将仁¹、是澤智久¹、北村 啓²、阿部伸一¹¹東京歯科大学 解剖学講座²東京歯科大学 組織・発生学講座

【目的】

これまで我々は、顎関節部など下顎骨に付着する筋の形態形成について報告してきた。その中で下顎骨内面に付着する顎舌骨筋では、メッケル軟骨がその形態形成に深く関与する事を経時的に調べてきた。今回特には、腱、軟骨、またその前駆細胞で発現する転写因子であるScleraxis, Sox9の発現局在に注目し、胎生期における顎舌骨筋の下顎骨への付着を獲得するプロセスについて調べた。

【材料および方法】

胎生期ICR系マウスを実験材料とした。そしてメッケル軟骨が観察可能な部位を選択し、顎舌骨筋が下顎骨への付着を獲得していく過程を調べた。通常に従い薄切切片を作製後、免疫組織化学的染色を施した。用いた抗体は、筋特異的タンパクDesmin、そしてScleraxis, Sox9とした。

【結果および考察】

顎舌骨筋の発生初期には、メッケル軟骨に近接する細胞群に付着するように筋束の断端が作られ、筋断端にはDesminの強発現が観察された。また、顎舌骨筋の腱原基と思われる部位には Scleraxis が強発現していた。この部位はメッケル軟骨に接触している様な像が得られた。胎生中期ではメッケル軟骨とその下方に Sox9 は発現していた。今回の観察結果から、顎舌骨筋の下顎骨への付着部の形態形成は下顎骨より早期に進み、そのための足場としてメッケル軟骨およびその周囲の細胞が必要である可能性が考えられた。

6 網膜変性時のミュラー細胞の脱分化・増殖に関与する Notch シグナル

○齋藤典文、蔭池かおり、藤枝弘樹

東京女子医科大学 医学部 解剖学（神経分子形態学分野）

Notch は神経幹細胞の未分化性の維持に必要な転写制御因子であるが、魚類では傷害網膜のミュラー細胞の脱分化・増殖を抑制するのに対し、哺乳類では脱分化・増殖を促進するなど、その機能は不明な点が多い。これまでに、アルキル化剤投与による視細胞変性モデル動物を作製し、網膜変性時のミュラー細胞の増殖・脱分化の解析を行ない、マウスでは視細胞変性後もミュラー細胞の増殖は全く見られないが、ラットではほぼ全てのミュラー細胞が細胞周期に進入することを明らかにした。本研究では、ラットおよびマウスの傷害後の網膜における Notch および標的因子の発現変化と機能を解析した。その結果、ラットでのみ傷害後に Notch の発現が強く誘導されており、ミュラー細胞の増殖は Notch 阻害剤により阻害されることから、視細胞変性モデルにおいて Notch の活性化がミュラー細胞の脱分化・増殖に必要であることが明らかになった。また、Hey を過剰発現したマウスのミュラー細胞では、脱分化・増殖能が亢進した。さらに、Hes を過剰発現したラットのミュラー細胞では、脱分化・増殖能が抑制された。これらの結果から、哺乳類では、Notch シグナルは網膜傷害時のミュラー細胞の脱分化・増殖を促進する因子と、抑制する因子の誘導に関与することが明らかになった。今後は Notch の標的因子の発現制御による網膜の再生能を検討していく。

7 筋線維の壊死および再生における High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の関与

○小笠原悠大^{1,2}、崎山浩司¹、坂東康彦¹、長坂 新¹、小野澤 豪^{1,3}、天野 修¹¹ 明海大学歯学部解剖学講座² 明海大学歯学部病態診断治療学講座口腔顎顔面外科学II分野³ 明海大学歯学部病態診断治療学講座口腔顎顔面外科学I分野

【目的】 High mobility group box 1 (HMGB1) は、癌周囲の筋線維が壊死を起こすと強く発現する。舌癌の浸潤は、癌細胞から放出される HMGB1 が周囲の筋組織を壊死させ、さらに、壊死した筋組織からも HMGB1 が放出される。筋組織の壊死に伴ってきた空隙を埋め、遠方の筋組織も壊死させることで浸潤すると考えられている。また、浸潤に MMP-2 の関与も報告されている。一方で、炎症後の筋線維修復においても HMGB1 の関与が示唆されている。そこで、癌での筋線維の再生で HMGB1 がどのように関与するかを検索した。【方法】 BALB/cAJcl ノドマウスを用い、舌尖左側に SCC7 癌細胞を注入した。注入は1回とし、SCC7 の着床を試みた。注入終了後、2週、3週、4週経過後に試料の採取を行い、これらを SCC7 細胞注入群とした。観察部位は舌中央とし、抗 HMGB1 抗体、HMGB1 の受容体である Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) に対し抗 RAGE 抗体、抗 MMP-2 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。【結果および考察】 3週後の SCC7 細胞注入群では、筋線維の壊死が確認され、壊死により生じた空隙部に、中心核をもつ筋細胞が認められた。このことから、筋線維が再生されていることがわかった。さらに、筋線維壊死部では、HMGB1 と RAGE の発現が認められたが、再生筋線維部では、HMGB1 のみが核と筋線維周囲の間質にも局在した。また、MMP-2 の発現もみられなかった。以上のことより、壊死した筋線維から放出された HMGB1 は筋線維の再生を誘導するのではないかと示唆された。(COI:なし)

8 EGF 受容体エンドサイトーシス経路に対する2種類の抗癌剤および放射線の効果

○青木武生、大野由美子、原 孝光

群馬県立県民健康科学大学 診療放射線学部

我々は、以前からEGF受容体を過剰発現している癌細胞を材料として、放射線照射によって、受容体が細胞内にエンドサイトーシスされ、初期エンドソームを経由して、まだ不明の経路を通して核内に侵入している可能性を検討している。今回我々は、細胞骨格との関連性および、2種類の抗癌剤の作用と放射線による相乗効果が、このような経路にどのような影響を与えているのか、また、その経路にエンドサイトーシスに関係している、Rab5やRab7の活性型、不活性型を発現させることで、どのような変化があるのかを検討しているため、その一部を紹介する。サイトカラシン B やコルセミド処理では、EGF 受容体が細胞膜から解離し、細胞内に小胞を形成したことから、細胞膜における発現に細胞骨格との強い関与が示唆された。またいくつかの予備実験では、EGFR のヒト・マウスキメラモノクローナル抗体であるセツキシマブ (商品名アービタックス EBT) は、EGFR のエンドサイトーシスの阻害作用が顕著で、膜表面における発現を抑制しているような所見が見られた。EGFR のチロシンキナーゼを選択的に阻害するゲフィチニブは、細胞膜上や細胞内の EGFR の発現を弱める方向に作用し、EGF 受容体は EEA1 陽性の初期エンドソームへの移動が促進された。HeLa 細胞において Rab5 に依存したエンドサイトーシス機構が存在することも確認された。これらの薬品が濃度依存性に細胞分裂にどのような効果をもたらすのか、また放射線でどのように変化するのを細胞の所見と分裂に対する効果を中心に検討した結果を供覧する。

9 DNFB接触性皮膚炎におけるPDPNの発現

○清水一彦¹、加藤幸成²、佐藤二美¹¹ 東邦大学 医学部 解剖学講座 (生体構造学分野)² 東北大学大学院 医学系研究科 抗体創薬研究分野

【背景】 Podoplanin (PDPN) はリンパ管内皮やI型肺胞上皮などのマーカーとして汎用されているが、幾つかの炎症の場での発現も報告されている。しかしながら PDPN の機能は不明な点が多い。我々は以前、創傷治癒の場における PDPN 陽性細胞の出現とその機能について報告した。しかし、それ以外の炎症の場における PDPN の機能調査や発現調査は報告が少ない。そこで今回、DNFB 接触性皮膚炎モデルマウスを作製し、皮膚炎における PDPN の発現とその役割を調査した。

【材料と方法】 BALB/c マウス左耳後方に0.3%のDNFBを塗布した。右耳はコントロールとして溶媒のみを塗布した。一部の実験群には抗 PDPN 抗体である PMab1 を尾静脈より注射し、PDPN 阻害実験を試みた。塗布1日後に凍結切片を作製して PDPN と種々の抗体を用いた多重免疫染色を行った。また、一部の実験群より total-RNA を抽出し、real-time PCR 用のサンプルも抽出した。

【結果と考察】 塗布1日後、左耳は有意に厚みが増していた。免疫染色の結果、PDPN 陽性細胞が多数出現していることが確認できた。また、PDPN 陽性細胞は HSP47 陽性であった。PMab1 投与は HSP47 陽性細胞数に影響を与えなかったが、PDPN の発現は有意に減少した。Real-time PCR の結果、PMab1 を投与することで CCL2 の発現が減少する事が分かった。これらの結果から、PDPN は接触性皮膚炎において線維芽細胞上に発現し、CCL2 発現の上流を制御する可能性が示唆された。

10 画像解剖導入型解剖学実習の取り組みについて

○川島友和、星 秀夫、清水一彦、石原義久、佐藤二美

東邦大学歯学部解剖学講座生体構造学分野

医用画像機器は、体内情報を得るために欠かせない検査・診断ツールとして、その価値を増し続けている。しかし、その断層画像の理解は容易ではないため、早期より繰り返しのトレーニングが必要である。人体の空間的配置を学習する解剖学実習は、その断層像とのイメージ変換トレーニングの機会としても最適であり、画像解剖導入時期になりうると考えている。そこで、2018年度より画像を用いた解剖学実習の取り組みを開始し、その効果の検証を試みた。

東邦大学医学部では、1年次で解剖学の系統講義を行い、2年次で正常画像解剖を含む局所解剖学講義を行うとともに断層画像素材を取り入れた解剖学実習を導入した。実習では、各班へ貸与されるiPadや実習室へ設置されたワークステーションPC内に、実習前に撮像された実習解剖体CTデータを収載し、人体の立体構造と断層像を同時に学習できるように計画した。

この試みに対し、学生からの質問紙調査や自主画像課題を通じて、さらなる改善に努めている。これまでの本取り組みの概要とその成果の一部について紹介を行った (COI なし)。

11 齧歯目とその近縁種における椎骨の適応変化と制約について

○川島友和、佐藤二美
東邦大学医学部解剖学講座生体構造学分野

椎骨は、周囲軟組織の構造評価のための基準構造物の1つとして多用される。古くより各種脊椎動物の椎式に関して多くの報告がなされた結果、実験発生学的根拠に基づいた蓄積データの総論的解釈が提示されるようになった。その中で、齧歯目は変異の少ない安定した椎式を有することが報告されている。しかし、現存する哺乳類種の約4割も占める齧歯目は、解析対象としてその多くを網羅することが困難であるため、特殊環境へ進化を遂げた種は対象から除外されることが多い。さらには、哺乳類の横断的調査においては、齧歯目として選定される解析種はサンプルサイズが得やすい実験動物であるマウスやラット等の繁殖種であり、野生種ではない。つまり、齧歯目として記載されてきたデータの多くは、地理的・生物学的情報を有さないばかりでなく、その多様性が反映されていない偏りのあるデータといえる。

我々は、これまで特殊な運動様式の1つである滑空性哺乳類の機能解剖学的解析を行っており、その比較的安定している椎骨にも派生的な変化が現れているのではないかと仮説を立てた。

そこで、椎骨のクレード内・間での系統的变化や、機能収斂・多様な運動様式を有する種における椎骨の派生的変化を探ることを目的に、齧歯目とその近縁種の433個体の椎式に関して比較を行った。その結果の概略について報告を行った(COIなし)。

12 神経細胞における Arf6 活性化因子 EFA6A と Kalirin-7 との新規相互作用の機能的役割

○井瀧貫太、深谷昌弘、阪上洋行
北里大学医学部解剖学

低分子量 GTP 結合タンパク質である Arf6 は、細胞内の小胞輸送やアクチン細胞骨格の再構成に関与している。Arf6 を活性化する GEF である EFA6A は、神経細胞の樹状突起の形成や維持に関与することが知られているが、EFA6A の分子ネットワークを介した神経機能の制御機構は不明な点が多い。本研究では、EFA6A の新規結合分子として酵母ツーハイブリット法で同定された Kalirin-7 に着目し、Kalirin-7 のマウス脳内での分布や細胞内局在を明らかにするとともに、EFA6A と Kalirin-7 の相互作用が互いの GEF 活性に及ぼす影響を解明することを目的として研究を行った。

免疫染色の結果、Kalirin-7 は、終脳に多く発現し、特に海馬 CA1 のニューロビル領域で微細な点状反応として検出された。多重蛍光免疫染色では、Kalirin-7 陽性反応は、PSD-95 と高い共局在性を示し、EFA6A と共存していた。また、包埋後免疫電子顕微鏡解析の結果、Kalirin-7 は興奮性シナプスの PSD 内部に豊富に局在していた。次に、EFA6A と Kalirin-7 を発現させた HeLa 細胞での GEF 活性をプルダウンアッセイ法で解析した結果、EFA6A と Kalirin-7 の共発現では、単独発現に比べ、活性型 Arf6 と活性型 Rac1 がそれぞれ有意に減少していた。

以上より、Kalirin-7 は、興奮性シナプスの PSD に選択的に局在し、EFA6A と Kalirin-7 の相互作用は、互いの GEF 活性を抑制的に調節することが示唆された。これらのことから、シナプス後部において、EFA6A-Arf6 と Kalirin-7-Rac1 シグナル経路が、EFA6A と Kalirin-7 の相互作用を介して抑制的に調節し、樹状突起形成を制御する可能性が考えられた。

13 視床下部パターンニングにおける転写因子発現の時間制御

○大山恭司¹、Marysia Placzek²
¹東京医科大学 組織・神経解剖学分野
²Dept. Biomedical Sciences, University of Sheffield

視床下部は、神経管の前方腹側に位置する。視床下部の発生は、神経板が脊索前板由来の Shh により腹側化され、Shh の下流転写因子 (Gli1 など) を発現することから始まる。その後、脊索前板そして視床下部底部に発現する BMP7 の持続的作用により、Gli1 発現の低下、背側化転写因子 (Pax7 など) の発現が上昇する。つまり、時間軸における BMP7 と Shh の拮抗作用が、視床下部の発生プログラムを進行させる原動力となる。現在、BMP による転写因子発現の時間制御について、その詳細を解析中である。利益相反なし。