

日本解剖学会

第95回近畿支部学術集会

会期：令和元年11月16日（土）

会場：大阪大学大学院歯学研究科F棟5階弓倉記念ホール

1 振り返り学習を活用した口腔組織・発生学教育

中塚 美智子¹、藤田 暁¹、隈部 俊二²、柿本 和俊¹
¹大阪歯大・医療保健、²大阪歯大・歯・口腔解剖

【目的】振り返り学習の口腔組織・発生学の理解への効果を検討するため、振り返りと試験成績、スケッチの相関関係等について統計学的に分析した。

【材料と方法】2018年度に口腔組織・発生学を受講した第1学年の学生91名を対象とした。講義の振り返り、小テスト、組織像のスケッチ、本試験、組織像のスケッチの成績データを統計学的手法により解析した。

【結果】小テスト平均と記述試験および振り返り平均の間、スケッチ課題と小テスト平均、記述試験平均、振り返り平均の間に中程度の正の相関が認められた。

【結論】振り返りができると自己の理解の程度を客観的に分析でき、知識不足である点を補おうとすることも可能である。一方、振り返りができないと成績不振を招いていることから、まず学生自身で講義内容を振り返ることができるようになるようにフォローする必要があることが示唆される。

2 Age-related Morphological Analysis of Circumvallate papilla and Fungiform papillae in Sprague-Dawley Male Rat

Fatma M. Abdelmaksoud^{1,2}, Chizuko Inui-Yamamoto¹, Shiho Honma¹, Makoto Abe¹, Akiyo Kawano¹, Satoshi Wakisaka¹¹ Dept Oral Anat & Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent, Osaka, Japan² Fac Vet Med, Assiut Univ, Egypt

Taste preference is a key component of food choice. It alters along with ages. However, the effects of aging on the taste peripheral mechanism still remain unclear. We here examined morphologies of taste bud and epithelial tissue of the circumvallate papilla (CV) and the fungiform papillae (FF) in different aged rats (group; 6, 11, 23, 39, 75 week-old). The depths and widths of the CV and FF increased along with ages. But, the number of taste buds in the CV did not differ across ages. The depths, but not the widths, of taste buds in the CV and FF decreased along with ages. The epithelial thicknesses of the surface and trench wall decreased along with ages. The thickness of the keratin layer of the trench wall in the 11, 23, 39, and 75 week-old groups was larger than that of the 6 week-old group. The density of taste bud in the whole epithelial tissue significantly decreased along with ages. Taken together, aging changes morphologies of epithelial tissues around the CV and FF. The density of taste buds in the whole epithelial area and the thickness of the keratin layer might have some effects on physical transportations of ligands to taste pores.

3 ラット味覚上皮における DBA 結合部位

倉木 萌、河野彰代、乾千珠子、脇坂 聡
大阪大学大学院歯学研究科・口腔解剖学第一教室

我々は今までラット味覚上皮におけるレクチン結合部位の検討を行い、UEA-I がすべての味蕾構成細胞の細胞膜に、また PNA や Jacalin が球形の基底細胞の細胞膜に認められることを明らかにしてきた。今回、DBA (*Dolichos biflorus Agglutinin*) についてラット味覚上皮での結合部位を検討した。その結果、ラット有郭乳頭では、DBA は紡錘形の細胞の細胞質、特に核上部に強い反応が認められた。そこで、味蕾の紡錘形の細胞型のマーカーとの二重染色を行ったところほとんど(約95%)のDBA陽性細胞がII型細胞のマーカーであるPLCβ2陽性示した。また、PLCβ2陽性細胞の約60%がDBA陽性であった。葉状乳頭味蕾では有郭乳頭味蕾と同様の分布を示し、葉状乳頭前方部と後方部で明らかな違いは認められなかった。また、口蓋前方の鼻切歯管上皮の味蕾にもDBA陽性細胞が認められた。それに対し、茸状乳頭や硬口蓋と軟口蓋の境界部および軟口蓋後方部での味蕾にはDBA陽性細胞は認められなかった。以上の結果よりラット味覚上皮では部位によりDBAの存在が異なり、DBAが認められる場合はII型細胞に局在することが明らかになった。

4 発生期の継続的カゼイン摂取制限が口蓋の味蕾発育に及ぼす影響

上田 甲寅、隈部 俊二、田村 功
大阪歯科大学口腔解剖学講座

適正な栄養摂取は初期発生や発育に必要な不可欠なものであり、発育期の不適切な食事による生活習慣病発症の低年齢化などをうけ一般にも興味をもたれる話題である。我々は、以前より発生期の栄養摂取が味覚受容機構におよぼす影響に注目し、胎生期よりの継続的な塩分摂取制限を施した動物の嗜好性や味細胞の変化に関する報告を行ってきた。また継続的カゼイン摂取制限を施した動物に関する検索も行なっており、苦味やうま味に対する感受性に変化が起きている可能性について発表した。

今回の研究では、継続的カゼイン摂取制限モデルラットにおける味蕾の発育に焦点を当て、特にうま味感受性に関与していると考えられている軟口蓋の味蕾について、その分布および形態に関する調査を行なった。

その結果、カゼインの摂取制限により軟口蓋の後方部では味蕾の分布範囲と密度の減少がみられ、一方、味蕾の密度が高い軟口蓋前方(硬口蓋との移行部)では数的な変化は認められなかったが個々の味蕾の形態に変化がみられた。

発生期のカゼイン摂取は味蕾の発育に何らかの影響をおよぼし、その変化が嗜好性や食行動に影響をもたらす可能性が示唆された。

5 脳の発生における膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解明

國井政孝、原田彰宏
大阪大学大学院医学系研究科細胞生物学

発生中の大脳皮質や小脳において神経細胞を生み出す神経前駆細胞は、脳室に面する頂端側から基底側である脳軟膜へ突起を伸ばす極性細胞である。神経前駆細胞の極性はその増殖や分化、新生ニューロンの遊走などに重要な役割を持つ。このような極性細胞では膜蛋白質や分泌蛋白質を特定の方向へ輸送する極性輸送機構が細胞の形態形成・維持に重要である。新規合成蛋白質は脂質膜によって形成された小胞によって供与膜側から出芽し、受容側の膜と融合するが、この膜融合過程に必須の分子としてSNARE蛋白質が知られている。SNARE蛋白質の一つであるSNAP23は細胞膜に局在し、全身の広範な組織での膜融合過程に関与していると考えられているが、組織、個体における機能は不明な部分が多い。

我々はSNAP23の組織・個体レベルでの機能解明を目的とし、SNAP23ノックアウト(KO)マウスを作製した。Nestin-Creを用いた神経組織特異的KOマウスでは、大脳皮質の低形成や小脳の欠損といった重篤な表現型を示した。形態学的解析から、KOマウスでは発生中の大脳皮質や小脳における神経前駆細胞の極性が失われ、細胞増殖や分化に異常が生じていることが明らかとなった。さらに、初代培養神経前駆細胞を用いた解析などから、SNAP23が神経前駆細胞において細胞間接着分子の頂端膜への局在化に重要であることが明らかとなった。

6 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^{1,4}

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、⁴大阪大学大学院 医学系研究科 創薬神経科学

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、コヒーシンが神経幹細胞分化及び中枢神経回路形成にどのような影響を及ぼすのか、最近の研究結果を発表する。

7 FIB-SEMを用いた PSD 陽性樹状突起スパイン形態の解析

三田村耕平、猪口徳一、安村美里、岡雄一郎、黒田一樹、謝敏珏、Ruwaida Elhanbaly、深澤有吾、佐藤真
大阪大学大学院医学系研究科神経機能形態学講座

樹状突起スパインと呼ばれる樹状突起上の微小な突出は、興奮性神経伝達の基本的な構成要素である。最新の光学顕微鏡や電子顕微鏡による観察に基づくと、スパインは形態学的に filopodia, thin, stubby, mushroom, blebbed に大別される。一方で、蛍光顕微鏡や単一切片を観察する従来の電子顕微鏡では、スパインの形態を三次元的に解析することは難しく、確定的な観察は必ずしも十分にはなされていない。そこで本研究では、走査型電子顕微鏡による試料表面の電子顕微鏡画像取得と試料表面の削り出しを連続して行うことにより、電子顕微鏡の X-Y 分解能に加えて一般的な電子顕微鏡と比べ2倍以上の Z 軸分解能を有する集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM)を用い、後シナプス構造である post synaptic density (PSD)を、シナプスを形成しているスパインの指標とし、機能的なスパイン形態を詳細に解析した。再構築したスパインの多くは、これまで報告にあった典型的な形態区分に分類することは困難であった。何故ならこれらのスパインは回転対称ではなく、ある方向から見れば mushroom 型であるが他の方向から見ると stubby 型や thin 型に見えるなど、複数の特徴を併せ持ったためである。また、スパイン密度はゴルジ染色での結果よりも樹状突起の長さあたりでは 1 spine/μm 以上高いものとなった。

8 白質におけるオリゴデンドロサイトの3次元超微形態解析

田中達英¹、大野伸彦²、西村和也¹、新城武明¹、竹村晶子¹、辰巳晃子¹、和中明生¹
¹奈良県立医科大学 医学部 解剖学第2講座、
²自治医科大学 医学部 解剖学講座組織学部門

脳の発達や機能、精神神経疾患の病態には、ミエリン（髄鞘）による神経伝達の調節が深く関わっている。中枢神経系のミエリンはオリゴデンドロサイト (OL)が形成しているが、白質に存在する OL の特徴は細胞体が一列に並んだビーズ状の分布をとることである。この規則的に並んだ白質の「細胞ビーズ」がどのように形成されるのか、またこの規則的な配列にどのような意義があるのか、などの問いに対して現時点では明確な回答はない。

コネクトーム解析により脳構造の全容を理解するための大規模プロジェクトが世界規模で進行しているが、これまでの研究は灰白質の神経細胞の形態やシナプス結合を対象とした研究がほとんどであり、こうした先端イメージング技術のグリウ細胞への応用は極めて少ない。そこで我々は、細胞ビーズを形成する OL の詳細な形態を3次元超微形態解析で明らかにすることを目的とした。マウス脳梁組織の連続電顕画像データを2000枚取得し、各OLが形成するミエリンの形態を詳細に解析した結果、ビーズ状のOLは不均一な集団であり、各々が神経軸索の特徴を選別してミエリンを形成する可能性が高いことや、細胞体近傍の神経軸索にはミエリンを形成せず、むしろ非常に長い突起を伸ばして遠隔部の軸索にミエリンを形成することなど、既存のOLの構造的概念とは大きく異なる新たな知見を取得できたので紹介したい。

9 腸管神経系におけるシュワン細胞系譜からのニューロン産生を促す環境要因

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

腸管に形成される腸管神経系に外来神経線維が投射し、それらに沿ってシュワン細胞前駆細胞 (SCPs) が腸管神経系に侵入してくる。我々はこのシュワン細胞系譜から大腸の腸管ニューロンが生後に産生されていることをマウスにおいて明らかにした。シュワン細胞系譜からのニューロン産生は大腸末端部の腸管神経叢の形成に欠かせないことがわかってきたが、シュワン細胞系譜からのニューロン産生の意義についてはまだ不明な点が多い。我々は新たに、シュワン細胞系譜からのニューロン産生が腸内環境や内在性ニューロン密度の変化に応じて生じることを見出した。SCP由来のニューロンは腸内菌叢を持たない無菌マウスでは有意に少なく、無菌マウスに菌叢の移植を行うと SCP 由来のニューロン産生が誘発された。このことから、シュワン細胞系譜からのニューロン産生は腸内細菌に応じて制御されていることが明らかになった。また、内在性の腸管神経叢の形成不全が生じ、ニューロン数が減少している領域では、シュワン細胞系譜からのニューロン産生が有意に高まっていたことから、減少している神経節細胞に応じてシュワン細胞系譜からのニューロン産生が促進されると推察された。これらのことから、シュワン細胞系譜からのニューロン産生は腸管神経系の組織恒常性維持のための重要な役割を担っていると考えられる。

10 精巣マクロファージの継代培養増殖・分離とステロイドホルモン産生能について

小川和重、山本皓介 (大阪府立大学・生命環境科学・獣医解剖学)

【背景と目的】精巣マクロファージ(Mφ)はライディッヒ細胞(LC)周囲(卵黄嚢の食細胞由来)と精細管周囲(単球由来)に局在し、レチノイン酸やCSF-1分泌を介して精子形成に関与することが示唆されている。一方、肺胞Mφやミクログリアは隣接細胞とギャップ結合を形成することで、器官固有の機能に関与する。本研究では「LC周囲の精巣MφはLCとギャップ結合を形成し、testosterone合成に関与する」と仮説を立て、培養精巣Mφを材料に仮説の検証を行った。【材料と方法】Ogawaらの方法(BMC Immunol, 2019)に従って、ICRマウスの精巣からMφを継代培養増殖・分離した。このMφを材料に、latex beads 食細胞の割合からMφの純度を、flow cytometryでMφマーカー分子の発現を、RT-PCRでステロイドホルモン産生関連分子およびConnexin 43 (Cx43)の発現を調べた。また、免疫蛍光染色でMφとCx43の分布を調べた。【結果と考察】増殖・分離した細胞中のbeads食細胞の割合は99.78 ± 0.11%であった。Flow cytometryによりCD11b, CD115, CD169, CD206, MerTK, F4/80の明確な発現が認められ、既報のLC周囲のex vivo Mφの発現性状とは多少異なるが、増殖したMφは顕著な増殖性から卵黄嚢由来のMφであると考えられた。RT-PCRによりSTAR, CYP11A1, HSD3B1発現が明らかになり、progesterone合成能を備えていることが示唆された。Cx43 mRNAを発現すること、免疫蛍光染色よりLC塊の内部・周囲に局在するMφとLC間にCx43陽性反応が見られたことから、両細胞のギャップ結合形成が示唆された。

11 マウス健常雄個体の性腺における Sry 発現の左右差に関する定量組織学的研究

川西航平¹、長谷川千夏¹、中村大河¹、加藤 菜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

【背景と目的】マウスの未分化性腺の雄性化の過程では、胎齢11.0日付近における性決定遺伝子Sryの適切な発現が重要である。その発現遅延が起きた場合、性分化関連因子の発現が攪乱され、卵精巣や卵巣が形成されることが報告されている。一方、片側に精巣、反対側に卵巣を形成する真性半陰陽マウスにおいて、精巣を左側に形成する例が多く報告されていることから、健常雄個体の未分化性腺内における性分化関連因子の発現には微小な左右差が存在し、性分化の破綻時にその差異が顕在化することが想定された。そこで、健常雄個体におけるSry発現を、時空間的に詳細に検討した。

【材料と方法】胎齢11.0日付近のC57BL/6N雄マウスの性腺全領域を、横断方向10μm間隔の間断連続パラフィン切片とした。Sryを免疫組織化学的に検出し、発現細胞数および分布について計測するとともに性腺の体積を算出した。

【結果】Sry発現細胞数は発生の進行に伴い左右ともに増加したが、その際、左側において右側よりSryを多く発現する個体が多数認められた。性腺の体積は左右で同程度であったことから、Sry発現細胞の密度が左右で異なることが示唆された。さらに、左右両性腺の外側において内側より多数のSry発現細胞が認められた。

【考察】性決定期の性腺内のSry発現には左右差が存在すること、左側のSry発現がわずかに先行すること、および頭尾方向および腹背方向に加えて、内外側方向にもSry発現の差異が存在することが示された。さらに、Sry発現に関連する性分化関連因子の発現にも、差異が存在することが示唆された。

12 ラット小腸粘膜における好酸球の多様性に関する組織学的研究

荒井真也^{1,2}, 万谷洋平², 中西怜稀², 春田知洋³, 西田美穂², 湯浅秀人⁴, 横山俊史², 星信彦², 北川浩²

¹大阪大学・IFReC・実験免疫学 ²神戸大院・農・形態機能

³日本電子株式会社・アプリ統括室バイオ3D推進グループ ⁴大阪市大・院医・機能

【目的および方法】我々は組織学的観点から、ラット回腸好酸球が不均一な細胞集団で構成されることを見出した(第94回大会)。そこで、本研究ではラット小腸を用いて、HE染色による一般組織学的解析およびSerial block-face 走査型電子顕微鏡を用いた3次元超微形態学的解析により小腸好酸球の特徴を精査した。

【結果】十二指腸および空腸においても回腸と同様、腸絨毛の粘膜固有層では球状核/腎形核好酸球が多く、腸陰窩周囲の粘膜固有層では輪状核/桿状核好酸球が多く認められた。3次元超微形態学的解析の結果、腸絨毛頂部では球状核/腎形核好酸球が多く認められた一方、腸絨毛基部から腸陰窩周囲では輪状核好酸球が多く認められた。また検出された好酸球の中に桿状核を有するものは見られなかった。腸絨毛頂部の一部の球状核/腎形核好酸球の核には、細い貫通孔が認められた。加えて、球状核/腎形核好酸球と比較して輪状核好酸球は有意に多くの顆粒を有しており、顆粒数と核の貫通孔径の間には正の相関が認められた。

【結論】ラット小腸好酸球は、以前報告した核の形状やCD11b/CD11cの発現パターンに加えて、細胞体および顆粒数等から多様性に富む細胞集団であることが明らかになった。本研究で見出された小腸腸絨毛粘膜固有層内の球状核/腎形核を有する好酸球は未熟ないし成熟途上の好酸球であり、粘膜固有層内で核の形態変化および顆粒の増加を伴う成熟を行う可能性が考えられた。

13 Serial block-face 走査型電子顕微鏡を用いたラット回腸粘膜における神経接続の三次元解析

中西怜稀¹, 万谷洋平¹, 春田知洋², 横山俊史¹, 星信彦¹

¹神戸大院・農・形態機能

²日本電子株式会社・アプリ統括室バイオ3D推進グループ

【目的と方法】腸管粘膜内には豊富な神経線維の走行が認められるが、その投射対象および投射様式には不明な点が多い。そこで、serial block-face 走査型電子顕微鏡を用いてラット回腸粘膜4部位(腸絨毛頂部、腸絨毛基部、腸陰窩側面および腸陰窩底部)における神経線維の接続対象および接続構造を網羅的に解析した。【結果】神経線維束の分岐は腸絨毛頂部でとくに多く認められた。各部位において線維束から分離して単独で走行している神経線維が検出され、腸絨毛の頂部でとくに多く認められた。神経線維の粘膜内の細胞への接続数は腸絨毛頂部で最も多く、ついで腸絨毛基部、腸陰窩底部の順で少なくなり、腸陰窩側面では極めて少数であった。神経線維は線維芽細胞様細胞(FBLC) type II~IV、大食細胞様細胞(MLC)、形質細胞、好酸球、絨毛筋細胞等に接続しており、とくにFBLC type IIIおよびMLCへの接続が多く認められた。また、各種細胞への神経線維の接続は部位ごとに傾向が異なっており、FBLC type III, FBLC type IV およびMLCへの接続は他の部位と比較して腸絨毛頂部で多く認められた。一方、各種上皮細胞への接続はほとんど認められなかった。接続構造を三次元化して最大直径を計測し、「最大直径」および「神経線維が含まれている神経線維束」との関係を実験結果、接続構造は少なくとも4種に分類された。【結論】ラット回腸粘膜で新たな神経の接続様式が存在が示唆されるとともに、すでに神経投射先として報告されているFBLCや大食細胞だけでなく、形質細胞や好酸球等の免疫担当細胞にも神経線維が投射することが示唆された。

14 A point mutation in the Ret gene, RET(S811F), causes Hirschsprung's disease and kidney agenesis in a dominant-negative fashion

Mukhammad Sunardi, Hideki Enomoto
Kobe University Graduate school of Medicine
Division of Neural Differentiation and Regeneration

Hirschsprung's disease (HSCR) is a congenital disorder characterized by the absence of the enteric nervous system (ENS) in the distal part of the gastrointestinal tract. Genetic studies revealed that HSCR is a multifactorial disorder in which mutations in multiple genes are required for the expressivity of the disease. Among those HSCR-associated gene mutations, mutations in the *RET* gene, encoding the RET receptor tyrosine kinase, are most frequently identified and thought to play a central role in the pathogenesis of HSCR. RET is essential for development of the ENS and kidneys because RET-deficient mice display total intestinal aganglionosis and kidney agenesis. However, in human HSCR cases, RET mutations are mostly point mutations and widely distributed throughout the entire regions of the *RET* gene, making it difficult to understand the pathophysiological significance of each mutation. Most importantly, it has not been clear, to date, whether any one of those mutations alone is sufficient for inducing HSCR. In this study, we focused on a missense mutation of the *RET* gene reported in a HSCR case displaying unilateral kidney agenesis (Sugimoto et al. 2016). This mutation substitutes Serine 811 within the tyrosine kinase domain of the RET protein to Phenylalanine (hereafter referred to as RET(S811F)). By utilizing an electroporation-mediated genome editing technology, we generated a mouse *Ret* allele harboring the S811F mutation. *Ret*^{S811F} animal showed the complete absence of the ENS and kidney, indicating that the *RET*(S811F) allele is null. Surprisingly, all *Ret*^{S811F} animals displayed ENS deficits, which ranged from oligo-ganglionosis to long segment aganglionosis, indicating that RET(S811F) exerts a dominant-negative effect on ENS development. Some of *Ret*^{S811F} mice also displayed unilateral kidney agenesis. Moreover, we found that neuronal subtype specification is impaired even in ganglionated gut regions of *Ret*^{S811F} animals. This study shows for the first time to our knowledge that a single amino acid substitution in one allele of the RET gene can induce HSCR. It also suggests that specific cares should be taken for patients carrying a dominant-negative form of RET mutations because the remaining ENS may not function properly due to impaired neuronal differentiation.

15 ラット腎尿管上皮細胞におけるアドレナリン受容体の発現分布と作用の解析

堀 日和^{1,2}, 前田 誠司², 湊 雄介², 大谷 佐知², 八木 秀司²

(¹関西学院大・生命科学, ²兵庫医大・解剖学細胞生物部門)

腎臓は主に内分泌系により制御されている。一方で、多くの交感神経が投射しており、その調節機構の重要性が近年明らかになりつつある。しかしながら、交感神経の投射する標的が腎臓内では細動脈やネフロン各部など多岐に渡り、これら標的細胞のアドレナリン受容体(ADRs)の応答が複雑なことから、神経性調節の詳細は明らかでない。本研究では、交感神経の標的の一つである尿管上皮細胞に注目し、ラット尿管上皮細胞におけるADRsおよびβ-ADRの発現分布と、交感神経の投射を観察した。RT-PCRにより、ラット腎臓組織にはADRAサブタイプ全6種およびβ1, β2サブタイプが、ラット尿管上皮由来のNRK-52E細胞にはα1A, α2A, α2B, β1 およびβ2サブタイプのmRNAの発現を認めた。NRK-52E細胞のβ2-ADR下流シグナル分子のcAMP応答性は、10 nMおよび100 nMのIsoproterenol添加後5分で、cAMPのピークが最大になった。さらに腎臓組織でのβ1-ADRおよびβ2-ADRの発現部位を免疫組織化学および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。β1-ADRは尿管管基底側に偏在に局在しており、β2-ADRは尿管管腔側および糸球体に強く発現していた。また尿管の基底側には交感神経終末が分布していた。ノルアドレナリン(NA)は交感神経終末からの分泌以外に血管を介して原尿中にも流入することが知られている。以上の結果と報告より、尿管上皮細胞に対して、交感神経終末由来のNAがβ1-ADRを介し、原尿中のNAがβ2-ADRを介して再吸収の機能を制御する可能性が示唆された。

16 クッパー細胞の Eph, ephrin シグナルが接着に及ぼす影響

古原 翔, 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】マクロファージ(Mφ)は遊走細胞である。定常状態のクッパー細胞は、類洞から離れて肝臓を出ることはないと考えられているが、クッパー細胞の類洞定着機構は十分に調べられていない。我々は、組織在位Mφの継代培養法を開発し、クッパー細胞の大量培養にも成功している(Ogawa et al. *BMC Immunol*, 2019)。一方、細胞間接触により発生する膜タンパク Eph と ephrin のシグナルは integrin を介した接着と遊走を制御することが報告されている。我々は、「クッパー細胞と類洞内皮細胞に発現する Eph と ephrin は、クッパー細胞の定着に関与している」と仮説を立て、検証を行った。【材料と方法】C57BL/6 雄マウスの肝臓から増殖・分離した Mφ と血管内皮細胞(EC)を材料にした。両細胞の Eph と ephrin 発現, Mφ の integrin α, β subunit 発現, EC の ICAM-1 (integrin ligand) 発現を RT-PCR で調べた。Stripe assay で ICAM-1 吸着基質への接着性を Eph, ephrin シグナルの観点から検討した。【結果と考察】肝臓の培養 Mφ と EC は、数種類の EphA, ephrin-A, EphB, ephrin-B を発現していた。Mφ は、integrin α4, α5, α6, αL, αM, αX, β1 と β2, EC は ICAM-1 を発現していた。ICAM-1 を全面に、ephrin-A1-Fc, EphA2-Fc, ephrin-B1-Fc または EphB4-Fc を stripe 状に吸着させた基質上に肝臓 Mφ を播種した結果、ephrin, Eph 吸着領域上に有意に高い密度で Mφ は接着した。以上の結果から、類洞内皮細胞との接触により発生が予想されるクッパー細胞の EphA, ephrin-A, EphB, ephrin-B シグナルは、クッパー細胞の integrin αLβ2, αMβ2, αXβ2 と類洞内皮細胞の ICAM-1 を介した細胞接着の増強に働くことが示唆された。

17 小腸上皮形成と脂質代謝における Rab6a の役割について

森脇健太¹, 岩城彩乃², 傍島智明^{1,2}, 三善英知², 原田彰宏¹
大阪大学大学院医学系研究科 ¹細胞生物学, ²分子生化学

小腸上皮細胞は極性細胞であり、アピカル膜、バソラテラル膜という機能・組成の異なる膜領域を有する。極性細胞内では細胞内の方向性に沿った選択的輸送(極性輸送)が行われており、小腸上皮の形成、機能に重要な役割を果たしている。その異常は、吸収障害による栄養失調や、腸内細菌に対する過剰な免疫反応による炎症・組織傷害を引き起こす。本研究では、細胞内膜輸送を制御する Rab タンパク質の一種である Rab6a の小腸特異的ノックアウト (Rab6a KO) マウスを作成し、小腸における Rab6a の役割を検討した。Rab6a KO マウスはメンデルの法則に則り生まれ、生後直後の体格差は認められないが、その後腸管内出血を伴う組織傷害を起こし、4日以内に全て死亡した。生後2日目の Rab6a KO マウスの小腸上皮細胞では過剰な脂質の蓄積と顕著な細胞死の亢進が観察された。E18.5の胎児小腸ではこのような異常は観察されなかったが、取り出した胎児に母乳を与えることによって脂質の蓄積と細胞死が引き起こされた。以上のことから、Rab6a は小腸における母乳由来脂質の代謝制御と組織恒常性の維持に重要であることが明らかとなった。

18 マウス乳癌転移モデルにおけるリンパ節での転移前および転移後微小環境の *Vegfs* を標的とする microRNA プロファイル

柴田雅朗、谷口高平、奥崎大介、伊藤裕子、白岡千夏、生出林太郎、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、転移に先立って、癌細胞の着生に適した転移前ニッチが形成されていることが重要である。そこで、マウス乳癌転移モデルを用いて、転移前から転移後におけるリンパ節と血中の循環型エクソソーム microRNA (miRNA) 発現プロファイルを解析した。方法：マウス乳癌細胞株 BJMC3879Luc2 を BALB/c マウス雌に移植し、移植後 4 および 7 週に全採血により安楽死させ剖検した。また無処置対照群の動物も同様に処置した。血中エクソソームおよびリンパ節組織から RNA を抽出し、miRNA の網羅的解析には Real-time PCR 解析を行い、免疫組織染色並びに電顕的観察を行った。結果：単径部非センチネルリンパ節について、LYVE-1 の免疫組織染色を行った結果、転移前群ではリンパ洞の増生を示し、*Vegfc* や *Vegfa* の上昇が示されたが、微小転移を認めたリンパ節ではむしろそれらは低下を示した。電顕では転移前のリンパ節辺縁洞内にエクソソームが頻りに観察されたが、無処置対照群のリンパ節では殆ど認められなかった。miRNA の網羅的解析においては、転移後では、転移前と比較して、血中エクソソームおよびリンパ節ともに、*Vegfs* を標的とする miRNA が著しい上昇を示した。考察：癌細胞が分泌するエクソソーム miRNA のうち、*Vegfs* を標的とする miRNA が転移前から転移後におけるリンパ節の微小環境の形成に一役を担っている可能性が示唆された。

19 Rab とそのエフェクタータンパク質が関与する細胞内コレステロール輸送

吉村信一郎、傍嶋智明、原田彰宏
大阪大学 医学系研究科

エンドサイトーシスで取り込まれたリポタンパク質内のコレステロールは、リソソームに運ばれた後、細胞内の様々なオルガネラに運ばれる。私たちは Rab11 に結合するタンパク質がリサイクリングエンドソーム (RE) からトランスゴルジネットワーク (TGN) へのコレステロール輸送を制御することを見出した。Rab11 に結合する新規タンパク質 RELCH は TGN で機能するコレステロール転移タンパク質である OSBP と結合する。Rab11-RELCH-OSBP 複合体は、RE あるいは RE 由来の輸送小胞と TGN の間で繫留に機能することをノックダウン法及び間接蛍光抗体法を用いた観察、さらには人工リポソームを用いた再構成系の実験で示した。加えて私たちは人工リポソームを用いた系で、Rab11 と RELCH が OSBP による RE から TGN へのコレステロール転移を促進することを明らかにした。実際これら遺伝子の発現を抑制した細胞では TGN のコレステロール量の減少が見られた。これらのことから RE から TGN へのコレステロール輸送はこれまで示唆されていた小胞 (膜) 輸送依存的機構とは別に、OSBP 依存的な小胞 (膜) 輸送非依存的機構も存在することが示唆された。

20 線条体へ投射する淡蒼球外節細胞は大脳皮質運動野から興奮性入力を受ける

荻部 冬紀、藤山 文乃
同志社大学 脳科学研究科

先に報告したラット大脳皮質運動野から淡蒼球外節 (GP) への投射について詳細に解析した。視床下核と GP における一次運動野 (M1) からの軸索終末密度を比較すると、GP では視床下核の約 50% の密度であり、二次運動野 (M2) からの投射では約 80% であった。また、GP の内外側部では皮質終末が少なくなる傾向が見られ、カルビンディン陰性の GP の中心部に多く存在した。GP は、線条体へ投射する神経細胞と視床下核へ投射する神経細胞で構成される。スライス標本を使ったホールセル記録を行ったところ、チャンネルドプシンを導入した皮質終末を興奮させると、線条体へ投射する GP 細胞では、記録した細胞の 8 割以上でシナプス電流が測定された。電流の振幅は皮質から視床下核へのシナプス入力と有意な差がなかった。一方、視床下核へ投射する GP 細胞では記録細胞の 3-5 割にしかシナプス電流が見られず、その振幅も小さかった。免疫染色の結果、皮質入力を受けていた線条体投射 GP 細胞の多くが、Forkhead box protein P2 (FoxP2) を発現する arkipallidal neuron であった。以上の結果から、皮質運動野から GP への入力は GP の投射細胞タイプに依存しており、GP から線条体への抑制性投射を通して大脳基底核の働きに影響していることが示唆された。

21 ラットの閉口筋筋紡錘感覚の視床髄板内核群への伝達路の解明

加戸聖也、佐藤文彦、堤友美、池之上悦子、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口腔解剖学第二教室

重症の Tourette syndrome (TS) 患者には、視床髄板内核群の Nucleus centromedian-parafascicularis (CeM-Pf 核) に対する脳深部刺激療法 (DBS) が用いられる。先日我々は、TS 症状が歯科スプリントの咬合で抑制されることを報告した (Murakami, Yoshida et al. 2019 Mov Disord)。我々は、この結果は歯科スプリントの咬合で賦活される閉口筋筋紡錘感覚が CeM-Pf 核に伝達される可能性を示している、と考えた。そこで本研究ではラットを用い、(1) 閉口筋筋紡錘感覚を中継する三叉神経上核に、逆行性神経トレーサー (BDA) を注入した。BDA 標識終末が視床髄板内核群の oval paracentral nucleus (OPC) に認められた。(2) 咬筋神経の電気刺激および受動的閉口 (閉口筋が伸張し、閉口筋筋紡錘感覚が賦活される) に対する応答が OPC から記録された。(3) OPC に逆行性神経トレーサー (CTb) を注入した。CTb 標識神経細胞体が三叉神経上核に認められた。以上より、閉口筋筋紡錘感覚が三叉神経上核経由で視床髄板内核群の OPC に伝達されることが明らかになった。ラットの OPC がヒトの CeM に相当するならば、TS 治療における DBS と歯科スプリントの咬合の効果は、類似の脳神経機構が関与している可能性が高いと考えられる。

22 ホルマリンによる二相性疼痛の形態学的解析

廣田 郁詠^{1,2}、小山 佳久¹、中山 隆志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
2.近畿大学薬学部医療薬学科 化学療法学

ホルマリン試験は実験動物の疼痛評価方法として古くより確立されている手法である。足裏の皮下にホルマリンを注入し、注射部位を舐めるなどの疼痛に関連した行動の経過時間や回数によって疼痛度合いを評価する。これまでホルマリン刺激による疼痛関連行動の二相性については数多く報告されているが、行動の二相性に関連した中枢神経系の経時的変化を詳しく形態学的に解析した知見はほとんどない。

ホルマリン試験の二相性における脊髄の神経活性状態を検討するため、2%ホルマリン刺激によって疼痛を誘発したマウス脊髄における神経活性の経時的変化について、神経活性マーカーである c-Fos 抗体を用いた蛍光免疫染色法を行った。その結果、一相目において脊髄後角深層領域 (V-VII 層) に、二相目において脊髄後角表層領域 (I-III 層) にそれぞれの神経活性が多く認められた。さらに、明確な二相性を示さない低濃度のホルマリンやカプサイシンを用いて検討を行った結果、どちらの刺激においても脊髄後角表層領域のみに神経活性が多く観察された。以上のことより、ホルマリン試験における疼痛関連行動の二相性は初期に観察される脊髄深層領域の活性に起因している可能性を形態学的に明らかにした。

疼痛関連行動における神経活性の変化を形態学的に明らかとした本研究は、難治性慢性疼痛のメカニズムを知る上で非常に有用である。

23 ラット皮膚触覚受容器の *in vivo* 脳幹軸索内記録・標識法による可視化

榎原智美^{1,2}、竹中 綾¹、吉田 篤¹、熊本賢三²、古田貴寛¹
1 大阪大学・歯学部・口腔解剖学第二
2 明治国際医療大学・解剖学

顔面の皮膚感覚を受容する一次感覚ニューロンは、三叉神経節に細胞体を有する偽単極性細胞である。ラット脳幹三叉神経路において *in vivo* 軸索内記録・標識法を行い、三叉神経核への投射はもとより、三叉神経節細胞を経て顔面の皮膚感覚受容器まで標識に成功したので報告する。近年、我々は三叉神経節細胞からの記録・標識に成功していた (Tonomura et al., 2015)。脳質を除去して脳底にある三叉神経節を可視下に置く手技的な困難から、動物への侵襲も高く、成功率が低かった。一方、脳幹での細胞内記録・標識は従来より行われてきた比較的易しい手技だが (Jacquin et al., 1986, 1993, Furuta et al., 2008, 2010)、末梢までのトレースは非常に困難とされていた。標識に比較的高濃度のトレーサ (10% BDA) を用いること、電極を工夫すること、術後数日以上生存時間を確保すること、および染色法を改良し、安定した標識が得られることがわかった。吻鼻部ヒゲ洞毛の毛包に局限する各種機械受容器 (A β 軸索の先でメルケル終末、棍棒状終末ほか) や、ヒゲ周辺に一般毛に分布を広げる櫛状神経終末 (A δ 線維由来) も末梢で確認できた。同一個体において複数のニューロン検索も可能で、三叉神経節細胞体、および脳幹軸索の側枝と微細な終末も弁別的にトレースできた。各領域間の接続には現時点で未だ課題はあるが、機能形態の異なる一次感覚ニューロンの対比的な検索が可能であることが示された。