

日本解剖学会

第75回九州支部学術集会

会期：令和元年11月9日（土）

会場：九州歯科大学

SL-1 歯科領域の画像解剖を応用した臨床研究

○森本 泰宏
九州歯科大学歯科放射線学分野

「レントゲンなくして医療なし」という言葉があるように、Roentgen 博士が発見したエックス線によって、我々は人体の内部構造を非侵襲的に診ることができるようになりました。その後、エックス線以外にも、超音波や MRI といった人体への影響が少ない画像が登場し、日常臨床に大いに寄与しています。近年、これら画像診断装置は急速な進歩し、その画像解剖なくして日常臨床を行うことはできません。歯科領域の日常臨床でも CT、歯科用コーンビーム CT、MRI、超音波及び PET-CT を応用することが普通の時代になっています。様々な modality を組み合わせて診断することにより、質的診断の正診率は改善します。同時に、MRI や PET-CT を用いた機能画像を応用することでこれ迄は困難であった運動状態を視覚化することも可能になっています。そこで、今回の講演では当教室で行っております歯科臨床に対する画像を応用した臨床研究を紹介し、その意義を明らかにしていきたいと思っております。

SL-2 味蕾細胞分化の調節因子

○三浦裕仁、小柳江梨子、原田秀逸
鹿児島大学 大学院医学総合研究科 口腔生理学分野

味蕾の構造と機能は、ターンオーバーによって細胞が次々と新しく置き換わりながら、一定に維持されている。味蕾の味受容細胞について、その機能を担う分子に関する研究が大きく進展する一方で、未分化な細胞については、その分子レベルの特徴についても未だ不明な点が多い。これまでに、味蕾での発現が報告された Pou2F3 や Mash1 などの転写因子は、味蕾内の一部の細胞に限定して発現し、それぞれ II 型、III 型といった味応答特性の異なる味蕾の細胞種を生み出すように細胞分化を誘導すると考えられている。味蕾細胞は、味蕾の周囲の上皮に存在する幹細胞から生み出されるが、私達は、味蕾細胞系譜の極めて初期の段階から転写因子 Prox1 が、分泌性シグナル因子 Sonic hedgehog (Shh) と共に発現することを見いだした。Prox1 と Shh を共発現する細胞は、胚発生において味蕾原基として出現し、成体の味蕾では味受容細胞の前駆細胞である味蕾基底細胞として存在する。味蕾細胞のターンオーバーでは、Shh が味蕾細胞分化の初期段階で一過性に発現するのとは対照的に、Prox1 はすべての味蕾細胞でその成熟過程を通して発現し続ける。そのため Prox1 の発現は、味蕾で発現することが明らかにされた転写因子の中で唯一、味蕾のほぼ全ての細胞に検出される。しかし、味蕾におけるその役割は明らかでない。本発表では、味蕾細胞の分化における Prox1 の機能について考察する。

SL-3 骨・軟骨発生の理解と多能性幹細胞を用いた発生過程の再現

○大庭 伸介
長崎大学 生命医科学域(歯学系) 細胞生物学分野

組織形成過程の分子メカニズム、特に遺伝子の発現制御機構を明らかにすることは、疾患の理解や治療法の開発の根幹をなすものと考えられる。この観点から、我々は骨・軟骨を対象に、ヘッジホッグシグナルの役割と作用機序を明らかにしてきた (Dev Cell, 2008; J Biol Chem, 2012; J Biol Chem, 2013; PLoS ONE, 2014)。また、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析を通じて、骨・軟骨発生における遺伝子発現制御メカニズムとエピゲノム動態を理解しようとする研究を進めている (Cell Rep, 2015; Development, 2016; Dev Cell, 2016; Trends Genet, 2016)。さらに、発生学的知見を活用し、多能性幹細胞を用いた骨発生の再現・モデリングにも取り組んでいる (Stem Cell Reports, 2014; Sci Adv, 2017)。一連の知見を紹介しながら、骨格発生に関わるシグナル・遺伝子発現制御機構・エピゲノムに関する研究と多能性幹細胞による発生モデリングを統合した研究の方向性についても考察したい。

S1-1 腸回転異常と下大静脈欠損症を合併した稀な一破格例

○諸井佳菜子¹、渡部功一²、田平陽子³、嵯峨 堅²、岩永 謙^{2,3}、能間国光⁴、山本宏一²
1. 久留米大学 医学部医学科第3学年
2. 久留米大学 医学部 解剖学講座(肉眼・臨床解剖部門)
3. Seattle Science Foundation
4. 久留米大学 大学院医学研究科 修士課程第2学年

2018 年度久留米大学医学部系統解剖学実習において、腸回転異常症に下大静脈欠損症を合併する稀な破格例に遭遇した。御献体は、死亡時年齢 76 歳、性別は男性、死因は敗血症であった。心臓および大動脈の配置は正常であり、他の部位にも明らかな異常は認められなかった。小腸および大腸の腹腔内の配置は、空腸および回腸は腹腔内の左側に、大腸は腹腔内の右側に位置しており、下行結腸および S 状結腸は腹腔内右側を下行して骨盤腔に侵入していた。上腸間膜動脈は、通常どおり横行結腸の背側を走行するため Amir-Jahed(1968)の分類では Type II の腸回転異常(Prearterial left-sided cecum)に分類された。このタイプの腸回転異常は、遠位中腸ループの 180 度逆回転によって生じ、腸回転異常の中で 4% の頻度とされており非常に稀であると考えられる。また、腹部の静脈系については、左右総腸骨静脈および左右腎静脈は腹大動脈の右側を走行する腫大した奇静脈に流入していた。この奇静脈は、横隔膜右脚付近を通過した後左上大静脈に流入し、肝静脈のみが横隔膜の大静脈孔を貫いて右心房に流入していた。半奇静脈は、椎体の左側を走行して第 9,10 胸椎椎間のレベルで左側より奇静脈に流入していた。この静脈系の破格は、発生学的には本来腎静脈より頭側の下大静脈(前腎部)となる右下大静脈の形成不全により生じたものであると考えられた。本形態は竹本らの下大静脈の分類にも該当せず、非常に稀な例であると考えられた。

S1-2 ケタミン投与統合失調症モデルマウスの海馬におけるミクログリアの形態学的解析

○前田祥一朗^{1,2}、藤川理沙子²、山田純²、神野尚三²
¹九州大学 医学部生命科学科 3 年
²九州大学 大学院医学研究院 神経解剖学分野

統合失調症は幻聴や妄想の陽性症状と引きこもりや感覚鈍麻の陰性症状を特徴とする精神疾患である。同疾患の治療には、従来からドパミン D2 受容体拮抗薬が用いられており、その病態はドパミン仮説で説明されることが多い。一方で、臨床的にはドパミン D2 受容体拮抗薬の効果が不十分な例も少なくなく、病態や治療薬の作用機序については不明な点が多い。このため本研究で我々は、近年注目されている統合失調症のグルタミン酸仮説に着目し、NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬であるケタミンの投与によって統合失調症モデルマウスを作出し、行動薬理学的、免疫組織化学的解析を行った。実験では、コントロール群、ケタミン投与群、ケタミンと非定型抗精神病薬であるリスベリドンを投与する 3 群のマウスの比較を行った。統合失調症様行動異常の評価に用いられるプレパルス抑制 (PPI) 試験では、ケタミン投与群では PPI が減弱し、リスベリドンを投与する群では PPI が回復していることが示された。また、オープンフィールド試験では、ケタミン投与群で自発運動が亢進し、リスベリドンを投与によって抑制されていた。これらから、ケタミンとリスベリドンの投与によって、統合失調症モデルマウスとその治療モデルマウスが作出されることが示唆された。次に、グルタミン酸伝達異常との関連が示唆されている海馬のミクログリアの解析を行ったところ、ケタミン投与群では海馬のミクログリアの空間分布密度が増加していたが、リスベリドンを投与する群では密度の増加は抑制されていた。現在、ミクログリアの突起の三次元再構築などの解析を進めており、学術集会ではグルタミン酸仮説とミクログリアについて議論する予定である。

S1-3 心的外傷後ストレス障害モデルマウスの海馬におけるオリゴデンドロサイトの変化

○林田美幸^{1,2}、山田純²、神野尚三²

¹九州大学 医学部生命科学科 3年

²九州大学 大学院医学研究院 神経解剖学分野

心的外傷後ストレス障害 (PTSD) とは、強いショックやストレスを伴う経験の後、時間が経つてからも精神的苦痛や不安が続き、その経験に対して強い恐怖を感じる疾患である。近年、グリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトがうつ病やストレスに関与することが報告され、精神疾患における新たな治療のターゲットとして注目を集めているが、PTSD の病態や治療機転に対するオリゴデンドロサイトの関与はほとんど分かっていない。そこで本研究では、PTSD モデルマウスを作成し、オリゴデンドロサイトやミエリンの変化を形態学的に解析した。恐怖条件づけボックスでマウスに電気ショック (1 mA, 1 sec, 15 回) を与えて、強い恐怖に暴露し、PTSD モデルマウスを作成した。コントロール群として電気ショック (0.5 mA, 1 sec, 1 回) を 1 回だけ与えたマウス、回復促進群として電気ショック (1 mA, 1 sec, 15 回) を与えた直後から豊かな環境で飼育したマウスを用いた。PTSD モデルマウスは、電気ショックを与えた条件づけボックスで強いつきみ反応を示したのに対し、回復促進群ではつきみ反応の軽減が認められた。また、免疫組織化学的解析を行ったところ、PTSD モデルマウスでは、海馬におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞とオリゴデンドロサイトの空間分布密度が、コントロール群よりも減少していることが示された。現在、回復促進群におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞とオリゴデンドロサイトの空間分布密度変化や、PTSD モデルマウスにおけるミエリンの変化などを解析中である。学術集会では、PTSD の病態形成におけるオリゴデンドロサイトの役割や、オリゴデンドロサイトをターゲットとした治療の可能性について議論したい。

S2-1 ヒト大腿骨における骨幹部の弯曲について

○弦本 敏行, 高村 敬子, 今村 剛, 村井清人, 岡本 圭史, 佐伯 和信
長崎大学生命医科学域内眼解剖学分野

ヒト大腿骨骨幹部を肉眼的に観察するとき、それには生理的な前弯変形が認められる。加えて、この弯曲の頂点は外側あるいは内側方向に偏位していると認識されている。この弯曲の程度と方向は、例えば、歩行時の膝関節への荷重負荷の大きさに影響を及ぼす可能性があるため、臨床的にも重要である。本研究では、大腿骨骨幹部の CT 画像を用いてその弯曲の程度を正確に評価・解析することを目的とした。日本人骨格標本 90 体 (男性 46 体、女性 44 体) の右大腿骨を対象とし、それらの CT 画像を撮影した。得られた DICOM データより各ピクセルの CT 値を表す 512×512 の 2 次元行列を抽出。大腿骨骨幹部を等分して 10 の横断面を設定し、各横断面の 2 次元行列をエクセル上に展開した。各断面の皮質骨の輪郭を決定したのち、横断像の重心点の x、y 座標を決定した。これらを上から順に結ぶ線を重心線と定義して、大腿骨の弯曲の程度と方向の指標とした。また、大腿骨骨幹部の各横断面における断面積に対する皮質骨面積の割合 (皮質骨占拠率) を算出し、骨粗鬆症化の程度の指標とした。多くの場合、前弯変形の頂点は外側に位置していたが、これが内側方向へ変位した個体も認められた。とくに男性においてその比率が高かった。前弯変形の程度は、各個体ごとに様々であったが、今回の対象においては男女とも、年齢との関連性は認められなかった。一方、女性においては、皮質骨占拠率が低値を示す個体では弯曲の頂点が大きく外側方向へ変位する傾向があった。これらの個体においては、歩行時、膝関節の内側部分への荷重負荷が増大する可能性があるため、このことが変形性膝関節症の進行に影響を及ぼす可能性があると考えられた。【開示すべき COI なし】

S2-2 マウス大腿骨におけるメカノセンサーの炎症による発現調節

○田原 愛理, 高 瑋琦, 曹 愛琳, 大崎 康吉, 本田 裕子, 西山 めぐみ, 内野 加穂, 西田 寛汰, 城戸 瑞穂
佐賀大学 医学部 生体構造機能学講座 組織・神経解剖学

骨代謝は力学的な刺激により調節されることはよく知られているが、そのメカニズムは未だ不明である。TRPV4 (transient receptor potential-vanilloid 4) は浸透圧や伸展刺激、温度刺激などにより活性化されるカルシウム透過性の陽イオンチャネルである。TRPV4 のヒト遺伝子変異では、低身長や軟骨異形成などの骨格異形成を起こす。また、軟骨特異的 TRPV4 遺伝子欠失マウスでは加齢に伴う変形性関節炎が低減することなどが報告されている。そこで、本研究では TRPV4 のマウス骨組織における発現および炎症による変化を調べた。

実験には、野生型および TRPV4 遺伝子欠失マウスを用いた。マウスは 4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定し、大腿骨を取り出した。組織は脱灰後、通常に従って凍結切片を作製、免疫染色を行った。炎症のモデルとして、卵白アルブミンにより喘息モデルを作製した。

野生型マウスの大腿骨では、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞に TRPV4 の発現を認め、特に骨端成長板の増殖層における軟骨細胞に強い発現を示した。また、喘息群の軟骨組織における TRPV4 発現は対照群と比較して有意に減少していた。以上から、軟骨代謝調節には TRPV4 が関連し、炎症により発現が変化することが示唆された。

【開示すべき COI なし】

S2-3 骨形成における血管新生と機械刺激感受性陽イオンチャネルの発現

○西田 寛汰, 高 瑋琦, 曹 愛琳, 本田 裕子, 西山 めぐみ, 田原 愛理, 内野 加穂, 城戸 瑞穂
佐賀大学 医学部 生体構造機能学講座 組織・神経解剖学

【目的】骨形成には、血管の新生が重要な役割を果たす。近年、骨形成を誘導する特定の毛細血管が軟骨内骨化に先んじて出現することがわかってきた。私たちは、骨形成における血管新生が力学的な事象であることに着目し、胎生期の軟骨への血管進入に伴う機械刺激感受性に関わるイオンチャネルの発現と細胞外基質との関係を探ることとした。

【方法】胎生期の C57BL/6N マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液で固定し、通常に従って大腿骨の凍結切片を作製した。機械刺激感受性陽イオンチャネルおよび血管の特異的マーカーやコラーゲンに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

【結果】胎生 14.5、15.5 日齢において、大腿骨軟骨および軟骨膜に機械刺激感受性陽イオンチャネルの発現がみられた。軟骨膜の I 型コラーゲン層の直下に血管がみられ、その後、I 型コラーゲンの層を貫き血管が軟骨に向かって進入し、血管内皮細胞に機械刺激感受性陽イオンチャネルが発現していた。

以上から、骨発生に伴う新生血管の進入に機械刺激感受性陽イオンチャネルが関与する可能性が示唆された。

【開示すべき COI なし】

S3-1 Neurodegeneration of mesencephalic nucleus due to bimaxillary molar extraction in C57BL/6J mice.

○Ashis Dhar, Eriko Kuramoto, Iwai Haruki, Atsushi Yamanaka, Tetsuya Goto
Department of Oral Anatomy and Cell Biology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University

The trigeminal mesencephalic nucleus (Vmes) is involved with reflex proprioception of the periodontium and of the muscles of mastication in the jaw that functions. After tooth extraction, periodontal mechanoreceptors are known to disappear. The objective of the study is to examine the degeneration of Vmes neurons by the damage of their nerve endings after the bimaxillary molar extraction in C57BL/6J mice.

In this study we used 8-week-old C57BL/6J wild type mice. Bilateral maxillary molars were extracted under general anesthesia. Immunofluorescence staining was performed using primary antibodies against Piezo-2 and ATF3. For the anterograde labeling, fluorogold (FG) was injected tooth socket after the tooth extraction and masseter muscle.

At 5 days after tooth extraction damaged ATF3 positive Vmes neurons appeared, damaged Vmes neurons observed at the caudal part of Vmes. At 10days ATF3 positive Vmes neurons were decreased, but slightly increased at 1 month after extraction. Number of FG positive neurons were not changed between at 5days and 10days. The average size in diameter of the Vmes neurons projected to tooth socket was smaller than those from masseter muscle. At 1 month after tooth extraction the total number of Vmes neurons were significantly less than those in control mice (P < 0.05). Our results suggest that after the maxillary molar extraction Vmes neurons are dead within 10days due to the neurodegeneration by the damage of periodontal mechanoreceptors. No COI disclosure.

S3-2 K⁺-Cl⁻共輸送体(KCC2)の発現低下は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する

○安藤 博之, 屋富祖 司, 小坂 祥範, 小林 しおり, 大倉 信彦, 清水 千草, 高山 千利
琉球大学大学院医学系研究科 分子解剖学講座

抑制性神経伝達物質である GABA は、幼若期や神経損傷時には興奮性に働く。幼若期には細胞外に Cl⁻イオンを排出する K⁺-Cl⁻共輸送体 (KCC2) の発現が少なく、細胞内 Cl⁻イオン濃度 ([Cl⁻]_i) が高くなるのが原因である。本研究では、坐骨神経の一枝である脛骨神経の切断・縫合モデルマウスを用いて、GABA の応答性の変化を制御する KCC2 の減少が、神経損傷からの再生に促進的に働くか否かを明らかにすることを目的とした。

C57BL/6J マウスを用いて脛骨神経を切断・縫合し、下肢運動機能評価として Sciatic Function Index (SFI) を算出した。さらに、腰髄における KCC2 の発現変化について免疫組織化学法を用いて解析した。C57BL/6J マウスでは、術後 7 日目で SFI が最も低値となり、その後徐々に回復し、術後 28 日目には、術前の半分程度となった。運動情報の出力を担う脊髄前角における KCC2 の発現は、術後 7 日目に手術側で低下した。運動神経細胞のマーカであるコリンアセチル転移酵素 (ChAT) の発現は、術後 7 日目に手術側で低下し、発現パターンが KCC2 の発現パターンと類似していた。

さらに、KCC2 の発現が半減している KCC2 ノックアウト (KO) マウスのヘテロ接合体及び野生型を用い、上記モデルマウスを作成し、同様の行動解析を行った。その結果、KCC2KO マウスのヘテロ接合体及び野生型も、術後 7 日目に SFI が最も低下し、その後徐々に回復するという経時的変化は同じであったが、野生型と比較して KCC2 ヘテロ接合体の下肢運動障害は、全過程において有意に軽度であった。

これらの結果から、KCC2 の発現変化により、GABA の抑制性から興奮性への変化が脛骨神経損傷初期に起こる運動障害の軽減及び運動障害からの回復促進に関与していることが示唆された。【開示すべき COI なし】

S3-3 脊髄発達過程におけるグリシントランスポーター1(GlyT1)の発現変化

○清水千草¹、友寄竜司¹、平安山貴江¹、小林しおり¹、岡部明仁²、高山千利¹

1. 琉球大学大学院医学系研究科 分子解剖学講座
2. 西南女学院大学、保健福祉学部、栄養学科

脊髄における主要な抑制性神経伝達物質は、グリシン及びGABAである。シナプス間隙に開口放出されたグリシンは、神経終末にあるグリシントランスポーター2(GlyT2)により、GABAはGABAトランスポーター1(GAT-1)により再取り込みされる。一方、アストロサイトにはグリシントランスポーター1(GlyT1)やGABAトランスポーター3(GAT-3)が局在し、それぞれの抑制性伝達物質が除去される。これまで我々は、①脊髄の発達期においてGABA作動性神経終末が先に形成され、グリシンを共放出する神経終末へと変化すること、②運動情報を出力する前角においては生後2週までにグリシンのみを放出する神経終末へと、さらに変化すること、③GAT-3は放射状グリアに見られ、分化を経る過程でアストロサイトに発現し、発達に伴い前角から後角に広がることなどを明らかにしてきた。しかし、脊髄において、アストロサイトが担うグリシンの除去システムの形成については不明な点が多い。

そこで、本研究では、マウス脊髄の発達過程におけるGlyT1の発現変化を免疫組織化学法により検討し、神経終末及びアストロサイトにおける抑制性神経伝達物質の除去システムを総合的に解明することを試みた。その結果、胎齢12日ではGlyT1は、外套層に局在する放射状グリアに認められたが、前索に見られるGAT-3とは異なっていた。胎齢14日ではGlyT1は、放射状グリアの突起に見られたが、GAT-3は横方向に走る線維に見られた。胎齢18日以降には、GlyTとGAT-3はアストロサイトに発現し、脊髄全体に見られた。GlyT2との重染色より、グリシン作動性神経終末が形成される以前に、GlyT1が発現していた。これらの結果から、①グリシンとGABAのグリア細胞への取り込みは、放射状グリア上の異なる場所で行われ始める。②アストロサイトへの分化に伴い、アストロサイトの同じ場所に、グリシンもGABAも取り込まれるようになること、③グリシン作動性神経終末の形成以前にグリシン除去システムは準備されていることが示唆された。【開示すべきCOIなし】

S4-1 免疫組織化学染色法を用いた透過型電子顕微鏡によるマウス褐色脂肪細胞UCP1蛋白質の細胞内局在

○董曉敏¹、千葉政一¹、島田達生²、濱田文彦¹

- 1 大分大学医学部解剖学講座
- 2 大分大学名誉教授

【背景と目的】褐色脂肪組織はミトコンドリア内にuncoupling protein 1 (UCP1) を持つ褐色脂肪細胞から構成され、有胎盤哺乳類の動脈周囲に分布し、体温恒常性維持および過酸化反応制御を担っている。近年、心臓周囲の脂肪組織がUCP1蛋白質を発現させることが報告された。一方で、心臓周囲脂肪組織のUCP1蛋白質の細胞内局在を電子顕微鏡的に解析した報告は少ない。本研究では、心臓周囲脂肪組織UCP1蛋白質の細胞内局在について、免疫組織化学染色による電子顕微鏡を用いて解析した。【方法】実験動物はC57BL/6J雄性的対照マウスおよび肥満糖尿病モデルマウスとした。実験動物から心臓周囲脂肪組織を採取し、細胞内UCP1蛋白質について、一次抗体として抗UCP1抗体を、二次抗体として金標識IgGをそれぞれ用い、電子顕微鏡で観察した。【結果】マウス心臓周囲脂肪組織の褐色脂肪細胞で、1)ミトコンドリアのクリスタ内膜上にUCP1蛋白質陽性反応が認められた。肥満糖尿病モデルマウスでは、2)ミトコンドリアの肥大が認められたが、3)クリスタ内膜上のUCP1陽性反応は対称マウスとほぼ同等であった。【結語】以上より、マウス心臓周囲の褐色脂肪細胞では、UCP1蛋白質がミトコンドリアのクリスタ内膜上に存在し、このUCP1タンパク質局在は肥満糖尿病状態によって影響を受け難い可能性が示唆された。【開示すべきCOIなし】

S4-2 Diethylstilbestrol はヒストン H3K9 の脱アセチル化を介してマウス下垂体 PRL 細胞の増殖並びに FSH, LH 細胞から PRL 細胞への分化転換を制御する

○柴田恭明、Nandar Tun、Myat Thu Soe、Myo Win Htun、小路武彦
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 組織細胞生物学分野

Diethylstilbestrol (DES) は合成エストロゲンであり、マウス下垂体に於ける PRL 細胞の増殖及び FSH, LH 細胞から PRL 細胞への分化転換を誘導するが、その機序は不明である。我々はその機序にヒストンのアセチル化、特にヒストン H3 のアセチル化が関与すると仮定し、以下の研究を行った。方法として、8週齢雄性ICRマウスにDES (20 mg/kg) および溶媒 (corn oil) を5日毎に皮下注射し、20日目に屠殺した。HDACi投与実験に於いては、5日毎のDES投与に加え、ヒストン脱アセチル化抑制剤 (HDACi) であるフェニル酪酸ナトリウム (800 mg/kg) またはパルブロン酸 (300 mg/kg) または各々の溶媒を5日目から14日目まで毎日腹腔内投与し、10および15日目に屠殺した。抽出した下垂体は4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、5µm厚の連続切片とした。アセチル化ヒストン H3K9、18、23及びPRL、FSH、LH、PCNAは免疫組織化学染色、一部は多重染色で検出し、オートラジオグラフィを用いた解析で、DESはPRL、FSH、LH細胞におけるヒストン H3K9のアセチル化を有意に減少させたが、ヒストン H3K18及び23のアセチル化には影響を与えなかった。連続切片を用いた解析で、DESはPRL、FSH、LH細胞におけるヒストン H3K9のアセチル化を有意に減少させたが、HDACiの投与は、DES依存性のPRL、FSH及びLH細胞に於けるヒストン H3K9アセチル化の減少のみならず、これら細胞数動態の変化も有意に回復すること明らかにした。すなわちDESはヒストン、特にヒストン H3K9の脱アセチル化によりマウス下垂体 PRL、FSH、LH細胞数動態を制御することを示唆した。【開示すべきCOIなし】

S4-3 骨粗鬆症動物モデルマウスにおける乳歯幹細胞由来細胞外小胞の効果

○村田 早羅^{1,2}、園田 聡一郎¹、上原 範久¹、久本 由香里¹、高橋 一郎²、久木田 敏夫¹、山座 孝義¹

¹九州大学大学院 歯学研究院 口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野、²九州大学大学院 歯学研究院 口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野

【目的】乳歯幹細胞移植による治療効果には、ドナー細胞による直接的な骨再生および免疫抑制作用のほか、その放出因子による効果が考えられている。本研究では、骨粗鬆症動物モデルにおいて、乳歯幹細胞が放出する細胞外小胞 (EV) の効果について検討した。

【方法】卵巣摘出手術 (OVX) により、骨粗鬆症動物モデルを作製した。OVX マウスに乳歯幹細胞の培養上清より精製した EV を経静脈的に投与した。また予め RNase で前処理した EV (RNase-EV) も同様投与した。sham 手術マウス (Sham 群) および EV/RNase-EV 無投与 OVX マウス (OVX 群) を対照群とした。OVX 後4週で、マイクロ CT により腰椎椎体体綿骨の骨密度ならびに骨梁を評価した。また、長骨よりレシビエント骨髄間葉系幹細胞 (BMMSC) を単離し、その骨形成能およびテロメラーゼ活性を解析した。

【結果】マイクロ CT 解析により、Sham 群と比較して OVX 群の腰椎椎体体綿骨の骨密度ならびに骨梁が著しく減少していた。OVX マウスへ EV 投与すると、その骨密度ならびに骨量が有意に改善していた。レシビエント BMMSC を用いた *in vitro* 解析では、Sham 群と比較して OVX 群の骨形成能ならびにテロメラーゼ活性が著しく低下していた。EV 投与 OVX 群では *in vivo* 骨形成能およびテロメラーゼ活性が有意に上昇していた。一方、RNase-EV 投与 OVX マウスでは EV 投与による *in vivo* および *in vitro* の効果を認められず、その効果は OVX 群と同等であった。

【考察】骨粗鬆症動物モデルにおいて、乳歯幹細胞由来 EV、特にそれに含まれる RNA 成分が、レシビエント BMMSC のテロメラーゼを賦活化し、骨の再生を促すことが示唆された。

S5-1 自然免疫系の活性化は、海馬のケラタン硫酸陽性ミクログリアの増加を介し、てんかん病態形成を阻害する

○大竜友博、神野尚三
九州大学 大学院医学研究院 神経解剖学分野

ミクログリアは中枢神経に存在する免疫細胞であり、神経保護、異物の食食、シナプス刈り込みなどに関与している。最近の論文で我々は、ピロカルピン誘導性てんかんモデルマウスの海馬において、5D4 抗体で認識されるケラタン硫酸糖鎖抗原が、食食性の活性化ミクログリアに選択的に発現することを明らかにした (Ogumori and Jinno; J Comp Neurol, 2019)。一方で最近、Toll-like 受容体を介した自然免疫系の活性化が、てんかんの病態形成を修飾する可能性が示唆されている。我々は昨年の学術集会において、ピロカルピン投与後のマウス海馬錐体細胞の傷害が、リポ多糖 (LPS) の前処理によって抑制されることを報告した。本年の学術集会においては、LPS によるてんかん病態形成の修飾機構の解明を目指して、形態学・行動薬理学・分子生物学を組み合わせた集学的解析を行ったので、その結果を報告する。ピロカルピン投与を行ったマウス海馬 CA1 上昇層では、VGLUT1 陽性の興奮性シナプスの空間分布密度が増加したが、これは LPS の前処理によって部分的に抑制された。また LPS で前処理したマウス海馬 CA1 上昇層では、Iba1 陽性ミクログリアの空間分布密度に LPS による変化はなかったが、5D4 陽性ミクログリアの空間分布密度が増加していた。フローサイトメトリーで海馬から単離したミクログリアでは、LPS の前処理によって食食および細胞内タンパク質分解に関連する遺伝子の発現が増加していた。行動薬理的解析では、ピロカルピン投与による多動性や短期記憶障害が、LPS 前処理によって抑制されていた。これらの結果は、自然免疫系の活性化は海馬の 5D4 陽性ミクログリアを介した興奮性シナプスの刈り込みを促進し、てんかんの病態形成を抑制する可能性を示唆している。

S5-2 統合失調症モデルマウスの海馬におけるパルプアルブミン陽性ニューロンとペリニューロナルネットの変化

○藤川理沙子、山田純、神野尚三
九州大学 大学院医学研究院 神経解剖学分野

統合失調症は、情報処理能力や認知機能の低下などを呈し、およそ100人に1人の割合で発症する精神疾患である。これまでの研究から、大脳皮質や海馬におけるパルプアルブミン (PV) 陽性 GABA ニューロンの脱落と、細胞外マトリックスの特殊化された構造物であるペリニューロナルネット (PNN) の形成不全がその病態に関与している可能性が示されている。近年我々は、ケタミン投与により統合失調症様の行動異常を示すモデルマウスを作成し、統合失調症の病態基盤として海馬の PNN と PV ニューロンの研究を進めている。昨年の地方会では、PNN 上の HNK-1 抗原を認識するモノクローナル抗体 (Cat-315) を用いた検討の結果、ケタミン投与群の海馬では、Cat-315 陽性 PV ニューロンの密度に変化はないが、Cat-315 陽性 PV ニューロンの密度が有意に減少していることを報告した。また、対照群の海馬には存在しない Cat-315 陽性/PV 陰性細胞がケタミン投与群に存在することを示した。その後の研究によって、ケタミン投与によって減少するのは Basket 型の PV ニューロンであり、Non-basket 型の PV ニューロンには有意な減少が認められないことを発見した。また、Cat-315 陽性/PV 陰性細胞は、YOYO-1 陽性/caspase-3 陰性であり、PV の発現レベルが低下した GABA ニューロンであることを確認した。さらに、ケタミン投与群では、Cat-315 陽性/PV 陽性ニューロン周囲のシナプスの密度に変化はないが、Cat-315 陽性/PV 陰性ニューロンにおけるシナプス密度が低いことを見出した。これらの知見は、統合失調症の病態基盤としての海馬の PNN と PV ニューロンに新たな知見を与えるものであり、今後これらに対する治療薬の作用について検討を進める予定である【開示すべきCOIなし】

S5-3 プロバイオティクスによる加齢マウスの腸内細菌叢の改変と成体海馬神経新生の制御

○山田純、神野尚三
九州大学 大学院医学研究院 神経解剖学分野

腸と脳とは自律神経系や液性因子を介して密に連絡し、腸脳相関として広く知られている。近年では、腸内細菌叢が中枢神経系の機能や発達に関わる可能性が注目されているが、その詳細については不明な点も多い。本研究では、記憶や情動の制御因子とされている成体海馬神経新生現象に着目し、腸内細菌叢に作用するプロバイオティクスを用いて、その作用を集学的に検討した。実験には、若齢マウス (2 カ月齢) と神経新生が減少している加齢マウス (12~14 カ月齢) を使用し、プロバイオティクスとしてカゼイ菌 (*Lactobacillus casei*) を飲水投与 (28 日間) した。カゼイ菌を投与した加齢マウスでは、海馬の新生ニューロンの分布密度が有意に上昇し、新生ニューロンの樹状突起の長さが増加していた。加齢マウスにおけるプロバイオティクスの神経新生促進効果は、腹側海馬よりも背側海馬の方が有意に高かった。さらに、カゼイ菌を投与した加齢マウスでは、新奇物体認識試験において、記憶・学習能力の向上が認められた。一方で、加齢マウスの糞便の有機酸解析では、カゼイ菌を投与したマウスでは、酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸の含有量が増加していた。これらの短鎖脂肪酸カケルを飲水投与した加齢マウスでは、新生ニューロンの密度が増加していた。興味深いことに、このような成体海馬神経新生の促進効果や記憶・学習に対する影響、糞便中の短鎖脂肪酸濃度の変化は、カゼイ菌を投与した若齢マウスでは認められなかった。本研究の結果は、プロバイオティクスによる腸内細菌叢の改変が、加齢に伴う成体海馬神経新生の減少を抑制し、認知機能を改善できる可能性を示唆するものである。

S6-1 The anticancer mechanism of photodynamic therapy using newly synthesized phosphorus porphyrin in human biliary cancer cells

○Nguyen Nhat Huynh Mai¹, 山口 優也¹, 松本 仁², 七島 篤志³, Narantsog Choijookhuu¹, 菱川 善隆¹

¹ 宮崎大学医学部解剖学講座組織細胞化学分野, ² 宮崎大学工学部環境応用化学科, ³ 宮崎大学医学部外科学講座肝臓腸外科学分野

Photodynamic therapy (PDT), involved photosensitizer activation by specific wavelength light, is considered as a useful cancer treatment, but the detailed mechanism of anticancer effect by PDT is still unclear. Therefore, we have applied the newly synthesized phosphorus porphyrin (PPP) [(C₂H₄O)₂(CH₂)₂P(C₄H₈N₂)]Cl for PDT in human biliary cancer cell line (NOZ). After PPP (0.01, 0.025, 0.05 and 0.1 μM) administration, NOZ cells were irradiated with light emitting diodes for 30 minutes and incubated from 0.5 to 24 hr. Mitotracker and JC-1 were used as markers of mitochondria and mitochondrial membrane potential, respectively. Cell viability and apoptosis were examined by MTT assay and flow cytometry, respectively. The expression of mitochondrial respiratory chain complexes (OXPHOS I, OXPHOS III and OXPHOS V) and apoptosis-related proteins (Bcl-2, Bcl-xL, Bax and cleaved caspase-3) were examined by western blotting. As a result, PPP was localized in mitochondria and mitochondrial membrane potential was decreased after PDT in time-dependent manner. Cell viability was decreased after PDT in time and dose-dependent manner. The number of apoptotic cells was increased after PDT in time-dependent manner. Moreover, mitochondrial respiratory chain complexes were decreased from 6 hr after PDT. Bax/Bcl-xL ratio was significantly increased from 0.5 hr and continuously found until 24 hr after PDT, but Bax/Bcl-2 was unchanged. Cleaved caspase-3 expression was also increased from 6 hr after PDT. These results indicated that the change of Bax/Bcl-xL ratio may be important for the anticancer mechanism related to apoptosis in PDT using PPP. 【開示すべき COI なし】

S6-2 細胞運動能におよぼすフラボノイドの効果

日野真一郎、溝田知香・中村学園大学・院・解剖生理形態学

【目的】Wnt シグナル構成分子である APC (Adenomatous polyposis coli) や β-カテンンの遺伝子異常により β-カテンンが蓄積することが、大腸癌の発症と深く関わっている。蓄積した β-カテンンは核内に移行して転写因子 Tcf(T-cell factor)/Lef(lymphoid enhancer factor) と複合体を形成し、細胞増殖や細胞周期に関連する遺伝子 *c-myc*, *c-jun*, *fra-1*, *サイクリン D1* 等が誘導され癌化すると考えられている。大腸癌細胞株である HCT-116 細胞を用いて各種 Methoxyflavone(MF)によるスクリーニングを行い、5,7,3',4'-tetra-methoxyflavone (5,7,3',4'-TMF), 7,8,3',4'-TMF が Wnt/β-カテンン経路の標的遺伝子である *c-Myc*, Vimentin, Axin2 の発現を抑制することをこれまでに見出している。Vimentin が癌の浸潤や転移に関与することから、これらの TMF が細胞運動にどのような影響を与えるかを検討した。【方法】HCT-116 細胞に 5,7,3',4'-TMF, 7,8,3',4'-TMF を 72 時間添加後に、創傷治癒アッセイ (wound healing assay) ならびに細胞浸潤アッセイ (CytoSelect™ CELL BIOLABS, INC.) を行った。【結果】創傷治癒アッセイでは、5,7,3',4'-TMF あるいは 7,8,3',4'-TMF 処理群は、コントロールに比べて創傷の治癒が優位に低下した。細胞浸潤アッセイにおいても、5,7,3',4'-TMF あるいは 7,8,3',4'-TMF 処理群において浸潤能が低下していた。両 TMF は β-カテンンと Tcf/Lef の複合体形成を阻害していることから、直接 Wnt/β-カテンン伝達経路に作用することで、細胞運動能を抑制的に制御していることが示唆された。【開示すべき COI なし】

S6-3 独自開発のレンチウイルスベクター (TC-LV) による多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞の同定・除去技術

○井手 佳菜子^{1,5}, 三井 薫^{1,2}, 松田 恵理子¹, 小戩 健一郎^{1,2,3,4,5}
¹ 鹿児島大学 遺伝子治療・再生医学, ² 革新的治療開発研究センター, ³ 同 南九州先端医療開発センター, ⁴ 鹿児島大学病院 探索的医療開発センター, ⁵ ウィック・バイオテック・ファーマヒト多能性幹細胞(hPSC)を用いた細胞移植療法としての再生医療の実現には、腫瘍化の完全阻止技術の開発が最重要課題であるが、既存の間接的な腫瘍化抑制(安全な細胞株の樹立、分化誘導法の改良など)では不十分である。そこで我々は腫瘍化原因細胞(奇形腫を発生させる残存未分化細胞や、発癌をきたす癌化細胞)を「直接」標的・除去可能な、ウイルスベクターを応用した以下の3つの新技術を開発してきた。つまり、①目的細胞を効率的・特異的に単離可能な Adenoviral Conditional Targeting in Stem Cells (ACT-SC) 法 (*Mol Ther* 2005, 同誌 Cover & News, 特許取得), ②癌治療用に独自開発した技術を応用し、hPSC の腫瘍化原因細胞で特異的にウイルス増殖・殺傷効果を生じさせる多因子増殖制御型アデノウイルス (m-CRA) 技術 (*Mol Ther Methods Clin Dev* 2015, 同誌 Featured article, 同誌 Editorial article, 特許取得), ③「腫瘍化原因細胞を同定・殺傷するレンチウイルスベクター」の Tumorigenic Cell-Targeting Lentiviral Vectors (TC-LVs) 技術 (*Stem Cells* 2018, 同誌 Featured article, 同誌 Best of Japan; 特許取得)である。今回は、再生医学の重要問題解決と、発生学、細胞生物学の「未分化機構の解明」を目指した、TC-LV 技術による研究について発表する。まず、「腫瘍化原因細胞を特異的に標的する候補プロモーターの網羅解析」が可能となり、安全性と効果という性能面での優位性に加え、移植前の *in vitro* での腫瘍化原因細胞の除去だけでなく、「理論的には移植後に体内で発生した腫瘍化に対しても自死誘導可能(セーフティスイッチ)となる」等の「従来技術へ優位性」を持つ TC-LV 基盤技術を独自開発した。次に、網羅的な TC-LV 作製・解析により、高い安全性(未分化特異性)と治療効果(完全な腫瘍化阻止)の両方を満たす、第一弾の最適な「promoter+自殺遺伝子」を同定した。さらに最近では、本法の応用性や有用性の実証研究、さらに優れた「promoter+自殺遺伝子」の探索、TC-LV 技術の改良を行なっている中で、概要を発表する。

S7-1 HB-EGF と HGF の肝臓に対する異なる再生・治療作用の特性の解明

○入江 理恵^{1,2}, 小戩 健一郎^{1,2,3,4}

¹ 鹿児島大・歯医学・遺伝子治療・再生医学, ² 同 革新的治療開発研究センター, ³ 同 南九州先端医療開発センター, ⁴ 鹿児島大・病院 探索的医療開発センター

肝細胞増殖因子(HGF)は、肝臓の栄養・増殖因子として発見された後、肝臓を含む多くの組織・臓器への生理作用、さらには治療作用について、精力的に研究が進められてきた。一方、ヘパリン結合EGF様増殖因子(HB-EGF)は、一部の組織の生理学的役割や病態への関与の研究はあるものの、全容は解明されておらず、治療作用の研究も非常に限られている。我々は以下のように、HGF ならびに HB-EGF の組換え蛋白質、並びにウイルスベクターを用いた遺伝子導入の手法を使い、肝臓における生理作用、治療作用の研究を進めてきた。まず HGF が、肝細胞に再生誘導作用だけでなく、強力な抗アポトーシス作用を賦与すること、また治療法のない劇症肝炎への効果的な治療薬となる可能性を明らかにした (Human Gene Ther 1998; Biochem Biophys Res Commun 1998; Hepatology 1999)。次に、HB-EGF が急性肝障害に対し HGF よりも強力な抗アポトーシス作用と肝再生誘導作用を示すこと、HB-EGF は蛋白質医薬品としても肝疾患への効果的な治療薬となる可能性について、初めて明らかにした (J Hepatol 2006; Hepatol Res 2011, 国内・国際特許取得)。さらにネクロシスや線維化なども含む複雑な病態を示す胆道閉塞性の慢性肝障害モデルで、HB-EGF, HGF あるいは両コンビネーションの遺伝子治療 (導入) 実験を行った (Int J Mol Med 2016)。両増殖因子とも様々な病態に治療作用・効果を示したが、HB-EGF は HGF よりも急性肝障害への肝細胞保護作用が強く、慢性期の抗線維化作用、胆汁鬱滞性の肝細胞死 (ネクロシス主体) への治療作用は、HGF のみならず HB-EGF でも著明に認められた。また両コンビネーション遺伝子治療で、胆汁鬱滞性の肝細胞死の抑制作用、肝細胞の再生誘導効果はさらに増強した。一方、障害胆管細胞への治療作用は、いずれも認めなかった。このような HGF ならびに HB-EGF の肝臓に対する生理作用、様々な治療作用、さらに治療薬としての可能性について報告する。(COI: 申請済み)

S7-2 セメント細胞ネットワークの3次元構造解析

○平嶋伸佑^{1,2}、都合亜記暢³、常吉梨沙¹、太田啓介³、楠川仁悟²、中村桂一郎¹

1) 久留米大学医学部解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門、2) 久留米大学医学部 歯科口腔医療センター、3) 久留米大学医学部 先端イメージング研究センター

【背景】セメント質は骨と類似した構造を持つ歯根表面を覆う硬組織である。その構成成分として含まれるコラーゲン線維は、歯根膜線維と連続するシャーピー線維と固有線維の2種類に分けられる。また、その機能は歯の固定と支持、歯根の位置補正や修復である。これまでにセメント質には lacuno-canalicular network が存在し、セメント細胞が突起により周囲の細胞とコンタクトを持つことが報告されてきたが、そのネットワークの深さや広がり、さらに機能についての詳細は未だ不明である。そこで我々は免疫組織化学・FIB/SEM を用いて、セメント細胞のネットワークについて解析した。【方法】C57BL/6 (♂, 24 週齢) を灌流固定後、歯槽骨と歯牙を一塊となるようにトリミングし、脱灰・包埋・薄切後、共焦点走査型顕微鏡・多光子励起顕微鏡・FIB/SEM tomography 等各種イメージング法にてセメント細胞の3次元形態・ネットワークの範囲について解析した。【結果・考察】FIB/SEM tomography によりセメント細胞の突起は歯根膜細胞の突起と連結しており、セメント細胞のネットワークは歯根膜細胞のネットワークと連結し、広範囲に及ぶ細胞のネットワークを形成していることが観察された。また免疫染色により、セメント質中の細胞突起に沿って Cx43 陽性シグナルが観察された。このセメント質-歯根膜細胞ネットワークは歯の萌出や移動による歯根の位置変化におけるセメント質や歯根膜線維の協調的なりモデリングに関与していることが推測される。

S7-3 グリオキサル系・ホルマリン代替固定液・ALTFix[®]を用いたラット脳を中心とする固定性の評価

○豊嶋(青山)典世、高橋 伸育、澤口 朗
宮崎大学・医学部・解剖学講座・超微形態科学分野

ホルムアルデヒド(FA)は、カルボニル基がアミノ基と反応してメチレン架橋を形成する化学物質であり、一般的に4%FA水溶液(10%ホルマリン)が固定剤として長年用いられている。FAは教育・研究・診療等で多岐にわたり使用される一方で、ヒトに対して発がん性のある劇物であり、その管理上、各種法規制を受けている。現在、我々が着目しているグリオキサル(シュウ酸ジアルデヒド)は化学構造式が OHCCHO であり、アルデヒド基を持つことからホルマリン(HCHO)と同様にタンパク質の架橋重合反応を起こすことで固定作用を示す。催涙性および刺激臭がなく、使用中の安全性が高い。

カダバー固定への応用を視野に、我々はグリオキサル系固定剤の中長期使用に関する検討を行っている。市販の組織固定液アルテフィックス[®](ファルマ社)を用いて成獣ラットを灌流固定後、サンプリングした脳を1週間～数ヶ月冷蔵にて浸漬固定した。パラフィン包埋後に薄切した切片では組織レベルでの染色性に経時的変化はみられず、安定した固定効果を示した。他方、安楽死させたラットの心尖より体重当たり約20%量の固定液を注入し、個体ごと冷蔵保管した場合、頭蓋内の脳は数ヶ月以上肉眼的に形態維持されており、薄切・包埋後の染色も可能であった。グリオキサル系固定液はFAと比較すると固定液の浸透完了までに時間を要するという報告もあるが、中長期的にみても固定液としての作用はホルマリンと同等に持続していると考えられた。

【開示すべきCOIなし】