

日本解剖学会

第80回中部支部学術集会

会期：令和2年10月31日（土）、11月1日（日）

会場：愛知学院大学歯学部楠元キャンパス

A-1 Elasticity in the subapical area maintains neuroepithelial structure in mammalian developing cerebral cortex.

Department of Anatomy and Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine

○Tomoyasu Shinoda, Takaki Miyata

Neural progenitor cells in developing mammalian cerebral cortex form epithelial structure with ventricular surface as ‘apical’ and pial surface as ‘basal’. We previously showed that elastic property of the subapical space, a microzone ~10 μm from the apical surface, is essential for the nuclear migration of neural progenitor cells⁽¹⁾. However, the sources and the biological meaning of the elasticity still remains to be elucidated. Here, we found that Elastin, which is known to form an elastic extracellular protein complex called the elastic fiber, is highly responsible for the mechanical properties of developing cerebral wall. Elastin localized on the ventricular surface as well as in the space among densely-packed progenitor cells (Figure 1). Depletion of elastin by the treatment with elastase reduced contractility of the apical surface, followed to an increased nuclear density in the subapical space (Figures 2 and 3). These results suggest that elastin ensures structural and mechanical properties of developing cerebral wall by keeping elasticity in the subapical space and therefore contributes well-organized nucleokinesis in the subapical space.

A-2 胎生期大脳におけるミクログリア分布の時空間的制御とその生理学的意義

服部祐季、宮田卓樹

名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学分野

胎生期大脳において、ミクログリアは発生ステージの進行に伴い分布を変化させる。すなわち、胎生14日目には脳室側から脳膜側にわたり均一に存在するが、胎生15~16日目の限定的な期間において皮質板から不在となる。そして、胎生17日目には再び皮質板に進入する。ミクログリアの役割に関して、従来研究が脳室帯、脳室下帯といった本来局在する場所での機能に注目したのに対し、本研究では胎生中期皮質板からの「一過性の不在」が脳形成においてどのような意義を果すのか調べた。

脳スライス培養下観察および二光子顕微鏡による生体内ライブ観察を通じて、胎生14日目にミクログリアが脳膜および脳室下帯から産生されるCXCL12を感知し、産生源に向かって両方向性に移動し皮質板をあげ放すことを見出した。さらに、胎生15~16日目においてミクログリアを皮質板内に強制的に配置すると、ミクログリア周辺のニューロンにおいて、ニューロンサブタイプの決定に関わる重要な遺伝子群 (*Satb2*, *Cux1*, *Ctip2*, *Tbr1* 等) の発現が乱れることを発見した。そして、この現象はミクログリアが産生する1型インターフェロン (IFN-I) とインターロイキン6 (IL-6) によって引き起こされることを明らかにした。

以上の結果から、ミクログリアは胎生中期にCXCL12に誘引され皮質板を一時的に抜け出し、自身が産生するIFN-IやIL-6によってニューロンの成熟・性質獲得の進行が乱されないよう巧みに分布を調節していることが示唆された。

B-1 Fallopian Tube Basal Stem Cells Reproduce the Epithelial Sheets *in vitro*

○Maobi Zhu, Tomohiko Iwano and Sen Takeda

Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, 1110 Shimo-Kateau, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan

The fallopian tube (FT) is an important reproductive organ in females. The luminal epithelium of the FT is composed of highly polarized secretory and ciliated cells. Recently, accumulating lines of evidence have suggested that the origin of high-grade serous ovarian carcinoma (HGSC) is fallopian tube epithelial cells (FTECs). Due to the lack of a high-fidelity model for FTECs *in vitro*, homeostasis, differentiation, as well as the transformation of FTECs are still enigmatic. In this study, we optimized the culture condition for the stable expansion of basal stem cells, as well as inducing differentiation of basal cells into polarized secretory and ciliated cells in the air-liquid interface (ALI) condition suitable for long-term culture. This storable culture method of FTECs provides a versatile platform for studying differentiation mechanisms, intercellular communication, and transformation to HGSC, as well as the physiological function of the FT *in vitro*.

B-2 くも膜顆粒にはリンパ管内皮細胞が存在する

○久富 理¹、竹田 扇¹¹山梨大学大学院総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室

脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid, 以下CSF) は、くも膜下腔からくも膜顆粒を介して硬膜静脈洞へ排出されるという説が古くから提唱されているが、今日実験的にはそれを否定するものが多い。その一方でくも膜顆粒の微細構造については、硬膜などの他の周辺構造との位置関係、構成する細胞や分子などの詳細な情報を含め十分ではない。本研究は、解剖学的にヒトと共通点の多いブタを用い、くも膜顆粒の微細形態解析を行った。

ブタ上矢状静脈洞周辺の脳髄膜は緻密性結合組織の硬膜が主体であるが、硬膜の一部には不連続領域 (ギャップ領域) が見られた。ここは内皮細胞に類似する細胞で内張りされており、その内部には同様の細胞集団が構成する細網構造が観察された。この構造は先行研究 (Alksne and Lovings, *Arch. Neurol.*, 1972) で報告されたイヌのくも膜顆粒の形態的特徴を共有しギャップ領域に存在していることから、我々はこれを「cranial arachnoid granulation-like dural gap: CAG-LDG」と命名した。さらに電子顕微鏡での詳細な形態解析により CAG-LDG がリンパ管内皮細胞の特徴と共有していること、免疫染色と免疫電顕法により代表的なリンパ管内皮細胞マーカーである Lyve-1 がここに局在することを発見した。以上の結果から、古典的なCSF吸収路として考えられていたくも膜顆粒が、形態的および分子的特徴からリンパ管内皮細胞と同様の構造として、CSFの循環に関与する可能性が示された。今後はトレーサー等を用いてその機能的実態を明らかにしていくことを企図する。

C-1 マウス脳における Na,K-ATPase αおよびβサブユニットアイソフォーム mRNA の発現分布

村田航志^{1,2,3}、木下智貴¹、石川達也³、黒田一樹^{1,2}、星美奈子⁴、深澤有吾^{1,2,5}¹福井大学 脳形態機能学分野、²福井大学ライフサイエンスイノベーションセンター、³金沢大学 機能解剖学分野、⁴神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター 神経変性疾患研究部、⁵福井大学 子どものこころの発達研究センター

Na, K-ATPase はユビキタスに発現する分子であり、Na⁺とK⁺イオンの細胞内外の非対称な分布と膜電位の維持に寄与する。Na, K-ATPase は3つのサブユニットから構成される。αサブユニットはマウスでは4つのアイソフォームを持ち、α1, α2, α3が脳内で発現する。しかし、各アイソフォームの機能的・生物学的意義はまだ十分に解明されていない。最近の研究でα3サブユニットをコードする遺伝子 *Atp1a3* が種々の神経疾患と関連していることが明らかになってきた。本研究では、αサブユニットアイソフォームを発現する脳領域と細胞種を明らかにするために、マウス脳で *Atp1a1*, *Atp1a2*, *Atp1a3* の mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により評価した。 *Atp1a1* と *Atp1a3* は神経細胞で発現していたが、*Atp1a2* はグリア細胞で発現していた。ほとんどの神経細胞が *Atp1a1* と *Atp1a3* を共発現しており、脳領域や神経細胞種によってその発現レベルは大きく異なっていた。たとえば海馬、体性感覚野、後頭葉皮質のパーバルアルブミン (PV) を発現する GABA 作動性ニューロンは、*Atp1a1* をほとんど発現せず *Atp1a3* を高発現する細胞であった。βサブユニットをコードする *Atp1b* 遺伝子のアイソフォーム発現を評価したところ、αサブユニットと同様に脳領域と細胞種によって発現量が異なった。PVを発現するニューロンでは、*Atp1b1* が高発現し、*Atp1b2* と *Atp1b3* が低発現であった。Na, K-ATPase αおよびβサブユニットアイソフォームの発現量は脳領域ならびに神経細胞種によって異なり、本研究で同定された *Atp1a3* を高発現する神経細胞種が種々の神経疾患に関与する可能性が示唆された。

C-2 アストロサイトの貪食作用はミクログリア機能不全を補完する

¹名古屋大学 大学院医学系研究科 機能組織学

²宮崎大学 医学部医学科 感染症学講座免疫学分野

ミクログリアは脳内の貪食細胞として知られている。最近我々はミクログリア特異的にジフテリア毒素受容体を発現するノックインマウスを用い、ミクログリアを効率的に除去する実験系を確立した。この実験系では、ミクログリアによる貪食は行われないうちにかかわらず、ミクログリアの残骸は速やかに脳内から除去される。そのため、ミクログリアに依存しない死細胞除去システムが脳内に存在すると考えられた。まず手がかりを得るために、各種細胞マーカー分子の発現をリアルタイム PCR で調べたところ、アストロサイトマーカーである GFAP が顕著に発現上昇していることが分かった。そこで、アストロサイトに着目し解析を進めた結果、アストロサイトは神経炎症時や脳虚血時とは異なる活性化遺伝子発現プロファイルを示すこと、また、太く変化した突起を用いミクログリア残骸を貪食することが明らかとなった。アストロサイトによる死細胞の貪食は、ミクログリア除去モデルだけでなく、ミクログリアの貪食能低下が見られる Irf8 ノックアウトマウスでも観察された。TAM ファミリー貪食受容体を含む貪食関連分子は正常時のアストロサイトでも発現していることから、アストロサイトの貪食作用はミクログリア機能不全によって発動し、補完的に働くことが示唆された。

C-3 食塩負荷によるミクログリアの活性変化とリン酸化酵素 SGK1 の役割

井上浩一、浅井勇人、森本浩之、佐久間英輔、植木孝俊
名古屋大学医学研究科統合解剖学分野

ミクログリアは中枢神経系における炎症作用など免疫応答に重要な役割を持つ。ミクログリアを起点とした炎症応答は統合失調症など精神神経疾患ばかりではなく、生活習慣病など全身の疾患に影響を及ぼす。経口的な食塩負荷は脳脊髄液のナトリウムの蓄積を促し、血圧上昇に関与することが知られており、近年、食塩負荷がミクログリアの炎症応答に与える可能性が示唆された。一方、我々は、免疫系細胞において炎症応答に関与するリン酸化酵素 SGK1 を含む SGK の神経系における役割について研究を行ってきた。SGK1 は血圧の調節に関与することが報告されており、本研究ではミクログリアにおいて食塩負荷による炎症性分子の誘導と、それに対する SGK1 の役割を検証した。ミクログリアにおいて、食塩負荷の炎症性分子の発現への影響を調べるため食塩負荷の後、炎症誘導分子 LPS を投与したところ、食塩負荷により iNOS 及び一酸化窒素 (NO) の産生は増大したが、反対に、TNF α の放出は減少した。続いて、ミクログリア細胞株 BV2 において、ゲノム編集技術を用いて SGK1 遺伝子を破壊し、SGK1 欠損株の作成を作製した。LPS による炎症応答を検討したところ、野生株に比べ SGK1 破壊株で LPS による iNOS 発現及び TNF α の放出は減少した。SGK1 破壊株に食塩負荷を行ったところ、LPS による NO 産生及び TNF α の放出は共に減少した。以上より、食塩負荷によりミクログリアの活性は修飾を受けるが、SGK1 は食塩負荷の有無にかかわらず、炎症性分子の発現を増加させることが示唆された。

D-1 神経ペプチド・マンセリンは後根神経節の小型細胞に局在する

○江藤みちる、大河原剛、成田正明
三重大学大学院 医学系研究科 発生再生医学

【目的】マンセリンはラット脳から発見された神経ペプチドである。下垂体、副腎髄質、十二指腸、膵臓、甲状腺、卵管などに局在しているが機能は不明である。マンセリンは内耳の有毛細胞のシナプスやらせん神経節の II 型細胞にも局在していることから、その他の神経節にも局在していることが考えられた。そこで本研究では後根神経節 (DRG) に着目し解析を行った。

【材料と方法】成獣 Wistar ラットを 4%PFA で灌流固定した後、DRG は椎骨や脊髄とひとまとめて抽出した。一晚 4%PFA で浸漬固定し、10%EDTA 溶液で 1 週間脱灰した後、凍結切片を作製した。免疫組織化学を行い、光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】DRG は NF200 陽性の大型細胞と 2 種類の小型細胞 (calcitonin gene related peptide (CGRP) 陽性のペプチドニューロンと CGRP 陰性の非ペプチドニューロン) からなっている。マンセリンは小型細胞に局在していた。蛍光二重染色でマンセリン陽性細胞は CGRP 陽性細胞の一部と一致しており、マンセリンの免疫反応は細胞質内にドット状に観察された。

【考察】マンセリンは DRG において CGRP 陽性細胞に局在し、他の神経ペプチドとともに分泌され機能調節を担っていることが示唆された。

D-2 慢性痛モデルマウスに対する食物由来抗酸化成分を用いた疼痛緩和作用の比較検討

Phattarapon Sonthi, Nichakarn Kwankaew, ○奥田洋明、堀紀代美、石川達也、尾崎紀之
金沢大学 医薬保健研究域 医学系 機能解剖学

食用ビートに含まれる赤色配糖体色素である Betanin は食品添加物として使用されているが、最近、強力な抗酸化作用を持つことが注目されている。我々は神経因性疼痛モデルである chronic constriction injury (CCI) モデルにおいて Betanin が痛覚緩和作用を持つことを見出している。本検討では、Betanin と代表的な抗酸化成分である Curcumin や Vitamin E、Resveratrol との比較検討を行った。

CCI 手術当日より 2 週間、各成分を 1 日 1 回経口投与して痛覚過敏への影響を検討した結果、Betanin 投与群では溶媒投与群と比較して術後 5 日目から疼痛緩和作用が認められ、他の抗酸化成分より効果が早期に認められた。次に、慢性期においても疼痛緩和作用が認められるか検討するため、CCI 術後 14 日目より各成分を 2 週間投与したところ、Betanin 投与群では他の抗酸化成分より早期に痛覚緩和作用が認められた。また、脊髄後角におけるグリア細胞の活性化への影響を検討した結果、Betanin 投与群でのみミクログリアのマーカーである Iba1 の染色強度の減弱が認められた。一方、アストロサイトのマーカーである GFAP の染色強度には各抗酸化成分は影響しなかった。

以上の結果より Betanin は Curcumin や Vitamin E、Resveratrol と比較して、より強い疼痛緩和作用とミクログリア活性化の抑制作用があり、慢性痛の治療・緩和に有用であることが示唆された。

D-3 損傷運動ニューロンはプロテアソーム依存性に極性を失い軸索ミトコンドリア輸送を増加させる

桐生寿美子¹、松下鈴佳¹、田代善崇²、高橋良輔²、吉村武³、井口洋平⁴、勝野雅央⁴、木山博賢¹

¹名古屋大学・医・機能組織学、²京都大学・医・神経内科、³大阪大学・連合小児発達、⁴名古屋大学・医・神経内科

ダメージを受けた運動ニューロンの生存・再生にはユビキチン-プロテアソームによるタンパク質分解が重要な役割を果たすと考えられている。このシステムの破綻は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロン変性疾患を惹起するが、そのメカニズムは不明である。そこで、運動ニューロンでのプロテアソーム感受性ストレス応答機構を明らかにするため、損傷運動ニューロン特異的にプロテアソームサブユニット Rpt3 をノックアウトしユビキチン-プロテアソームシステムを抑制するマウス (Rpt3 CKO) を作製した。作製した Rpt3 CKO マウス損傷運動ニューロンは TDP43 などのタンパク質凝集を伴い細胞・軸索変性を引き起こした。野生型マウスでは神経損傷後早期に軸索内ミトコンドリアが増加し再生に必要なエネルギー需要を満たすが、Rpt3 CKO マウスではそのような変化が認められなかった。これは、Rpt3 CKO マウスでは細胞体と軸索の間に局在し細胞の極性を決定する軸索初節 (AIS) を分解できないため、軸索へのミトコンドリア流入が制限されることに起因する可能性が示唆された。

H-1 生体染色を用いた腸管細胞構造の可視化 (光バイオプシ) 技術の開発

○王淑杰¹ 垣内愛加² 木村一志³ 田中光司⁴ 田中匡介⁵ 後藤英仁¹ 溝口明⁴
1. 三重大組織学・細胞生物学 2. 三重大分子生理学 3. 北海道文教大学人間科学部理学療法学科 4. 三重大個別化がん免疫治療学 5. 三重大附属病院光学医療診療部

【目的】多光子レーザー顕微鏡を用いて、非侵襲的な形で腸組織の腺管構造を可視化するとともに、直径 1 ミリ程度の微細な超早期がんを検知する光バイオプシ技術の基盤を確立することをその目的とする。

【材料と方法】多光子レーザー顕微鏡におけるがん細胞の観察を可能にするため、がん細胞に比較的特異的に蛍光染色する色素がないかをスクリーニングした。ヒト経口摂取が FDA から認可済みの可食性色素約 1200 種類の中から、生体組織を安全に蛍光標識できる色素を網羅的に探索した。

【結果と考察】スクリーニングの結果、初期がん細胞モデル Val-Ras-GFP 細胞で比較的特異的に染色される色素、赤色 3 号、Merbromin、赤色 104 号を同定した。次に、大腸がんのマウスモデルを用いて、正常腸管細胞よりがん細胞をより強く染める色素を探索し、大腸がん細胞に比較的特異的に集積する可食性色素として、クルクミンを同定した。従って、本方法により従来の内視鏡検査では全く分からなかった、粘膜細胞やがん細胞の生物学的性質を評価できる新規の計測技術の開発への道が切り開かれたと言える。なお、クルクミンは正常の腸組織の腺管構造もきれいに可視化できることも明らかになっている。今後、この色素がヒトのがん組織においても応用可能かを検証していく予定である。

H-2 APC1638T マウス腸内細菌叢のバランス変化-その要因と影響について

山田名美、オントルマ、千田隆夫
岐阜大学大学院医学系研究科病態制御学講座解剖学分野

【背景】APC1638T マウス (*APC^{638T/1638T}*) は、1639 アミノ酸以降の C 末端側が欠損した変異 APC タンパクを発現している。APC1638T マウスは野生型マウス (*APC^{+/+}*) と比較して食餌摂取量は変わらないが、便の排泄量が少ないことが以前から観察されていた。本研究では、APC1638T マウスの便形成に関する腸管の運動や腸内細菌叢の構成を解析することにより、APC タンパク C 末端の新たな機能を解明することとした。

【結果・考察】APC1638T マウスの便の大きさは有意に小さかった ($p < 0.01$)。野生型マウスの腸内細菌叢は Firmicutes 門に属する細菌群が優勢であったのに対して、APC1638T マウスの腸内細菌叢は Bacteroidetes 門に属する細菌群が優勢であった。APC1638T マウス結腸のアウエルバッフ神経叢において、Hu C/D 陽性神経細胞の減少もしくは神経節の形成不全を示唆する所見、GFAP 陽性グリア細胞により構築される網目構造の一部脆弱さを示唆する所見を認めた。APC1638T マウス結腸の粘膜固有層内で IgA 陽性細胞が優位に増加していた。これらのことより、APC1638T マウスは結腸アウエルバッフ神経叢の異常による腸管運動障害があり、腸内細菌叢のバランスに変化が起こった結果、腸管免疫系が活性化している可能性が示唆された。

H-3 APC1638T マウス腸上皮の細胞動態解析

オントルマ¹、李 晨光¹、王 國雅¹、尾之内 高慶²、小川 名美¹、千田 隆夫¹
岐阜大学大学院医学系研究科 解剖学分野¹
藤田医科大学共同利用研究設備サポートセンター生体画像解析室²

【目的】APC1638T (*APC^{638T/1638T}*) マウスは、1639 アミノ酸以降の C 末端側が欠損した変異 APC タンパク質を発現する遺伝子変異マウスである。APC1638T マウスは同週齢の野生型 (*APC^{+/+}*) マウスに比べて体が小さいにも関わらず、腸絨毛が有意に長い。その原因を明らかにするために、APC1638T マウスにおける小腸上皮の細胞構築、細胞動態および増殖シグナル活性を精査して、野生型マウスと比較した。

【結果】APC1638T マウスでは、陰窩-絨毛が伸長し、それとともに腸上皮細胞数の増加が認められた。APC1638T マウスにおける小腸上皮細胞の分裂後の移動速度は、野生型マウスより速かった。APC1638T マウス小腸上皮内の Ki-67 陽性細胞の数は野生型マウスよりも多く、しかも野生型マウスのように陰窩内に局限せずに、絨毛の基部にも存在した。APC1638T マウスでは、絨毛あたりのアポトーシス細胞の数が有意に多かった。APC1638T マウスの腸陰窩では、LGR5 陽性幹細胞、Bmi1 陽性幹細胞および CD133 陽性前駆細胞の数は、野生型マウスと同じであった。APC1638T マウスの腸では、腸上皮幹細胞コンパートメントの増殖に関連するシグナルの活性と下流の標的遺伝子群の発現量は、野生型マウスと比べて差がなかった。

【結論】APC1638T の腸上皮細胞の増殖、移動、アポトーシスに異常が認められたが、その原因は特定できなかった。

I-1 マウス精巣外精路の三次元構造

仲田浩規
金沢大学医薬保健研究域医学系組織細胞学

【目的】マウス精巣外精路の詳細な三次元構造を明らかにする。【方法】C57/BL6N マウス 3 匹の精巣および精巣上体をひとつかたまりとし、ブアン固定・パラフィンブロックを作製した。連続切片を作製し、バーチャルライドスキャナでデジタル化した。三次元再構築ソフト Amira を用いて精巣輸出管と精巣上体管の内腔をセグメントし、三次元再構築を行った。また、その中心線を作成した。中心線と連続切片を比較することで、正確なパラメーターを算出した。【結果】精巣から出た管は 1 本の管として始まり、0.3 mm 以内に 4 本に分岐した。精巣上体に近づくと、再び 1 本の管となり、精巣上体に繋がった。精巣網から精巣上体管までの距離は 19.7 ± 3.1 mm であった。また、精巣上体側のみ繋がった先端をもつ精巣輸出管を 4 本同定した。精巣上体管は分岐のない 1 本の蛇行した管で、長さは 767 ± 26 mm であった。中心線と連続切片を比較することで、精巣上体管を 5 つの部位にわけ、それぞれの正確な長さ・直径を算出した。また、精巣上体管は全体として大きな螺旋を描いていた。【結論】マウスの精巣輸出管と精巣上体管の詳細な三次元構造を明らかにした。本研究で用いた方法はシンプルであるが、複雑な管の構造を解析する強力なツールとなるとともに、正常および病的なヒト精路の三次元解析においても有用となるであろう。

J-1 嗅上皮におけるプロサポシンとその G 蛋白質共役型受容体 GPR37 および GPR37L1 の局在について

○北村海¹、本間健志¹、Sohel MD Shahriar Hasan²、尾之内佐和^{1,2}、齋藤正一郎^{1,2}
¹岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医解剖学研究室、²岐阜大学大学院共同獣医学研究科獣医解剖学研究室

【目的】プロサポシンは細胞質内でリソソームに運ばれて糖脂質分解酵素の補酵素として機能するサポシン A~D へと分解される一方、サポシンへと分解されずに細胞外へ分泌されるプロサポシンも存在し、このプロサポシンは神経栄養効果を示す。嗅上皮は支持細胞、嗅細胞および基底細胞からなる偽重層上皮であり、粘膜固有層に付属腺としてボウマン腺を有している。嗅上皮では個体の生涯を通して嗅細胞のターンオーバーが生じており、様々な神経栄養因子の発現が報告されているが、プロサポシンとその G 蛋白質共役型受容体 GPR37 および GPR37L1 の局在は不明である。本研究では、マウスの嗅上皮におけるこれら分子の局在を免疫組織学的染色により検討した。

【材料と方法】マウス (Slc:ddY) 雄成体 6 匹を使用した。0.1M リン酸緩衝液 4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定後、鼻腔を剖出・脱灰し、定法に従い 5μm 厚のパラフィン切片を作製し、ウサギ抗プロサポシン抗体 (Bioss Antibodies, bs-1879R)、ウサギ抗 GPR37 抗体 (Bioss Antibodies, bs-13534R) もしくはウサギ抗 GPR37L1 抗体 (Bioss Antibodies, bs-15390R) を反応させ、蛍光 2 次抗体を適用して発色・観察を行った。

【結果・考察】プロサポシンの免疫反応が嗅細胞の細胞体に観察された。GPR37 および GPR37L1 の免疫反応はボウマン腺に観察された。本研究から、嗅細胞はプロサポシンの分泌によりボウマン腺からの嗅粘液の分泌を制御している可能性が示唆された。

J-2 内耳におけるチャネル X の発現と機能解析

名古屋市立大学大学院 医学研究科 機能組織学分野
○柴田泰宏、横井雄斗、熊本奈都子、植田高史、鶴川真也

これまでアゴニスト不明とされてきたチャネル X について、電気生理学的機能について検討を行った。チャネル X を強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学検討により、持続的な内向き電流を生じるイオンチャネル活性を持つことが示された。この電流はアミロライドには感受性を示さず、亜鉛イオン、ガドリニウムイオンにより可逆的に阻害された。また、この内向き電流は、酸によって増大した。

P7、P14、4W におけるチャネル X レポーターマウスの内耳の検討にて蝸牛および前庭系ともに、有毛細胞に一致する発現をみた。特に P7 の蝸牛においては有毛細胞、外有毛細胞に一致するように内 1 列、外 3 列の特徴的な分布を示した。

P2 から P7 にかけて外有毛細胞を材料に電位固定パッチクランプを行ったところ、野生型マウスの外有毛細胞においては酸刺激による一過性の流入電流に引き続いて持続的な内向き電流が測定されたが、チャネル X ノックアウトマウスでは一過性流入電流は保たれているがその後の持続的な内向き電流が消失していた。このことから、チャネル X は出生早期のマウス内耳外有毛細胞において細胞膜上に機能をもって発現していることが示唆された。

K-1 膵島におけるプロサポシンとその G 蛋白質共役型受容体 GPR37 および GPR37L1 の局在について

○冬木愛実¹、Sohel MD Shahriar Hasan²、北村海¹、本間健志¹、高島茂雄³、尾之内佐和^{1,2}、齋藤正一郎^{1,2}
¹岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医解剖学研究室、²岐阜大学大学院共同獣医学研究科、³岐阜大学高等研究院科学研究基盤センターゲノム研究分野

【目的】プロサポシンはリソソームの糖脂質分解酵素の活性化因子であるサポシン A~D の前駆体蛋白質である一方、サポシンへと分解せずにプロサポシンを豊富に含有する細胞も存在し、また脳脊髄液、血漿、乳汁、精液、尿液などの体液にもプロサポシンが存在することが報告されている。我々はこれまでに、プロサポシンの受容体である G 蛋白質共役型受容体 GPR37 および GPR37L1 が膵島に発現していることを明らかにした。本研究では、膵島においてこれら受容体を発現している細胞を検討するとともに、プロサポシンの発現性についても検討した。

【材料と方法】マウス (Slc:ddY) 雄成体 6 匹を使用した。0.1M リン酸緩衝液 4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定後、膵臓を剖出し、定法に従い 20μm 厚の凍結切片を作製し、抗インスリン抗体 (Abcam, ab7842) に、抗プロサポシン抗体 (Bioss Antibodies, bs-1879R)、抗 GPR37 抗体 (Bioss Antibodies, bs-13534R) もしくは抗 GPR37L1 抗体 (Bioss Antibodies, bs-15390R) を混合して反応させ、蛍光発色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710, Leica Microsystems) で観察した。

【結果・考察】プロサポシン陽性細胞は膵島内で散見して認められ、インスリン共存性および非共存性の両方の細胞が認められた。GPR37 および GPR37L1 陽性細胞は膵島に広く認められ、少数の陽性細胞のみがインスリン免疫反応陰性であった。以上より、膵島にはプロサポシン分泌細胞が少数存在すること、インスリン分泌細胞以外にもプロサポシンの受容体を発現している事が明らかとなった。

K-2 2歳齢の Zucker fatty (fa/fa)、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichi の下垂体前葉濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの透過電顕を用いた検討

○金子綱憲¹⁾、和田郁雄²⁾、高瀬弘嗣³⁾、佐久間英輔¹⁾、大曾根史織¹⁾、扇谷昌宏¹⁾、井上浩一¹⁾、植木孝俊¹⁾

1) 名古屋市立大学大学院医学研究科 統合解剖学分野 2) 愛知淑徳大学健康医療科学部 3) 名古屋市立大学大学院医学研究科 共同研究教育センター

【研究目的】成熟ラットにおいてギャップジャンクションは特異的に下垂体前葉濾胞星状細胞間のみ認められ顆粒細胞の細胞膜上には存在しない。今回は、生後2年の Zucker fatty (fa/fa) ラットの下垂体前葉内の構造を、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichi の両ラットを比較対象として、透過電顕を用いて加齢がギャップジャンクションの維持に与える影響について研究する。【方法】Zucker fatty (fa/fa)、Zucker lean (+/-)、Wistar Imamichi の雄の2歳齢を各々5匹づつ用いた。エポン812に包埋、約60nmにスライスした切片を透過型電子顕微鏡 (JEM-1400Plus) にて観察した。【結果】Zucker fatty (fa/fa) では2歳齢では濾胞星状細胞間のギャップジャンクションはほとんど観察できなかった。一方、以前から我が研究対象としてきた Wistar Imamichi では以前に観察した60日齢から1歳齢と同様の結果となる2濾胞当たり1の割合でギャップジャンクションが観察できた。しかし、以前の試験では1歳齢までは、Wistar Imamichi と同様の存在比率でギャップジャンクションが観察された Zucker lean (+/-) では (Microsc Res Tech. 2014) 少数のギャップジャンクションしか観察できなかった。

【考察】今回の実験結果から、レプチンが伝達するシグナルが、加齢変化が予想される2歳齢のラットにおいて、濾胞星状細胞間のギャップジャンクションの維持に対して有効に作用していることが推察された。

K-3 先天的副腎欠損マウスに移植した副腎の組織学的評価

前川眞見子、田上文子、池田やよい
愛知学院大学 歯学部 解剖学講座

【目的】Steroidogenic factor 1 (SF-1; 別名 Nr5a1/Ad4BP) は、ステロイドホルモン産生に必須の転写調節因子で、SF-1 遺伝子欠損マウスは副腎がなく、生後まもなく死亡する。しかし、正常な副腎を皮下に移植することにより延命できる。今回、移植した副腎について形態学的、免疫組織化学的な評価を行った。

【方法】オリーブ油に溶解したステロイド (400 µg/ml hydrocortisone、40 ng/ml dexamethasone、25 ng/ml fludrocortisone acetate) を SF-1 遺伝子欠損マウスに生後0日から7日まで、毎日50µl 皮下注射した。生後8日目に、マウスの左腋窩の皮下にドナー (野生型の同腹仔) の副腎を2個移植した。移植後、生後9、10、13、15、17、21日にステロイド注射を行った。9週齢 (移植後8週) に4%PFAで灌流固定し、移植した副腎を取り出しパラフィン包埋した。組織切片を作成し、HE染色および抗 SF-1 抗体、抗 3β-HSD 抗体、抗 TH (tyrosine hydroxylase) 抗体を用いて免疫染色を行った。同じ週齢の野生型マウスの副腎を対照とした。

【結果と考察】副腎移植した SF-1 遺伝子欠損マウスは順調に発育し、固定時の体重も対照マウスと大きな差はなかった。移植副腎の皮質は、対照副腎と同様の三層構造を示し、SF-1、3β-HSD の存在が確認できた。おそらく移植副腎の皮質の機能は維持され、マウスの生存が可能になったと考えられる。一方、移植した副腎の髄質は変性し、細胞構造は認められなかった。副腎髄質はマウスの生存・発育に影響はないことが示唆された。

M-1 脳特異的 SF-1 欠損マウスの骨リモデリング制御

○永井亜希子、田上文子、前川眞美子、池田やよい
愛知学院大学歯学部解剖学講座

【背景】ステロイドホルモン産生酵素の転写調節因子である Steroidogenic factor-1 (SF-1/NR5A1) は、内分泌系、生殖系、神経系に発現する。SF-1 遺伝子の total KO マウスでは、副腎、生殖腺が欠損し、下垂体前葉、視床下部腹内側核 (VMH) に形成異常が見られ、生後間もなく致死となる。脳特異的 SF-1 コンディショナル KO マウス (SF-1cKO^{neuro}) は、エネルギー代謝や情動行動制御に異常がみられる。このマウスを用いて、SF-1 発現ニューロンの骨リモデリング制御への役割について検討を行った。

【実験方法】Cre-loxP システムを利用し、Nestin プロモータ活性が陽性である神経細胞において SF-1 を欠失させたマウスについて解析した。【結果と考察】SF-1cKO^{neuro} マウスの脳では、本来 VMH が位置する部位における SF-1 の発現がほとんど消失していることが、免疫染色により判明した。第3脳室は拡大していて、total KO マウスと同様 VMH の発生不全があることが示唆された。ELISA 測定では、血中のレプチン、ノルアドレナリン、活性型オステオカルチンの増加が cKO^{neuro} 群で認められた。副腎の組織学的、免疫組織学的検討で、各群間で大きな差異は認められないことから、cKO^{neuro} 群で交感神経系の活性化していることが示唆された。骨組織の TRAP 染色では TRAP 陽性部位が増大していて、cKO^{neuro} 群で破骨細胞の活性化が示唆され、SF-1 の骨リモデリングへの関与が推測された。

N-1 歯の3次元計測値を用いた個人識別のための性別判定

愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座
加藤彰子、本田雅規

【目的】歯を用いて個人識別のための性別判定を行う場合、従来法では肉眼における形態観察やノギスによる計測を行うが、男女の平均値は広範囲に重なり合うため基準が確ではなく判定が困難である。本研究はマイクロ CT を用いて個人識別における新たな性別判定の指標を作成することを目的とした。【試料と方法】歯科矯正治療により抜去された日本人の上顎第一小臼歯 (男性32本、女性32本) を用いた。ノギス計測による全長、歯冠長、歯根長、歯冠近遠心径、歯冠頬舌径およびマイクロ CT データによる表面積と体積を歯全体、歯冠、歯根について計測し、さらに歯根/歯冠比を算出した。各項目について男女の性差を表す「性差百分率」 $[(M-F)/F] \times 100$ を求め、ノギスを用いた場合とマイクロ CT を用いた場合の性別の判別効果を検討した。【結果】性差百分率はノギス計測では全長 (10.8%)、歯根長 (10.0%) が最も高かったのに対して、マイクロ CT 計測では歯根体積 (24.4%) と歯根表面積 (19.4%) が最も高い値であった。男女の判別効果についてはノギス計測値の判別率は73.4%、マイクロ CT 計測値の判別率は81.3%であった。【結論】男女の性差は歯根体積と歯根表面積において顕著に認められた。さらに従来法に比べてマイクロ CT を用いた3次元計測値による方法は、個人識別における性別判定に有用であることが示唆された。

N-2 メキシカン・ヘアレスドッグ由来犬における歯の形態変異：マイクロCTによる解析

子安和弘、池田やよい
愛知学院大学歯学部解剖学講座

【目的】本研究では、メキシコで遺跡時代から飼育されてきた無毛犬種であるメキシカン・ヘアレスドッグに由来するイヌについて、その歯の形態と変異性についての解析をおこなった。【材料と方法】研究の対象としたのは Foxl3 の変異遺伝子と野生型の遺伝子をヘテロに持つ23個体のヘアレス個体ならびに野生型の遺伝子をホモに持つ2個体、および表現型の不明な1個体の合計26個体であった。これらの個体の歯についてマイクロ CT 装置を用いて断面撮影をおこない、歯冠形態とその変異性について解析をおこなった。【結果】標準的なイヌの歯冠形態から離脱した形態は、ヘアレスドッグ23個体のすべてに認められた。特に変異性の高かったのは上顎では第4小臼歯 (P⁴)、第1大臼歯 (M¹)、第2大臼歯 (M²) であり、下顎では第1大臼歯 (Mi) と第2大臼歯 (M₂) であった。これらの歯では歯帯に退化傾向が認められた。上・下顎の犬歯 (C/C) は唇舌方向に薄くなり、湾曲が弱くなり前方に突出していた。ヘアレスドッグの乳歯の形態は、正常な遺伝子構成をもつ幼犬の乳歯形態と異なっていた。【考察】哺乳類の歯の進化過程においては大型化と複雑化の方向性、すなわち「大臼歯化」が起きている。ヘアレスドッグにおける歯冠形態の変化と変異性はこうした進化傾向と逆であり、これは Foxl3 遺伝子が哺乳類の歯の形態進化において重要な働きを担っていることを示している。

O-1 Thiel 固定標本の経時的な組織学的変化の観察

○中田貴之¹⁾、朝倉善史¹⁾、芹川富美男¹⁾、塚田剛史²⁾、島田ひろき²⁾、坂田ひろみ²⁾、東伸明²⁾、八田稔久²⁾、金沢医科大学アナトミーセンター¹⁾、金沢医科大学解剖学 I²⁾

Thiel 法は主にサージカルトレーニングに使用される遺体の固定に用いられるが、固定後、脳や内臓が融解する事が多数報告されている。今回、ICR マウスを Thiel 法で固定し、肝臓組織の経時的変化を観察した。成獣 ICR マウス雄を3種混合麻酔下で左心室よりヘパリンを注入後、生理食塩液で灌流しつつ右心房より脱血を行い、引き続き Thiel 液 100ml を灌流した。固定後、標本をタッパーに入れて冷暗所で保存し、注入後1週から24週まで定期的に肝臓を切り出し、4%パラホルムアルデヒドにて2週間再固定した。パラフィン切片 (5µm 厚) を作成し、HE染色および Hoechst33342 による核染色を施した。Thiel 固定後1週までは HE の染色性は良好であったが、2週以降は核のヘマトキシリン染色性が、中心静脈やグリソリン管などの管腔構造の近傍で悪く、3週以降は全視野で染まらなくなった。細胞質は膨化が認められたがエオジン好性を保持していた。Hoechst33342 による蛍光核染色の結果も同様に、管腔構造の近傍から外側に向かって、核が染まらないもの、リング状に核の輪郭だけが染まるもの、正常に核が染まるものが混在して観察された。核の染色性が低下する原因として、Thiel 液の影響、開腹状態、頻りにタッパーの蓋を開け閉めする事による落下細菌、またはカビの繁殖による組織の融解、ホルマリン濃度の低さによる組織の自己融解などが考えられた。管腔構造の近傍で核の染色性が悪いことから、灌流操作の影響も否定できない。今後、混合する試薬の組成の変更や灌流方法の検討を行い、組織学的解析にも適した Thiel 法の改良を目指す。

O-2

解剖学実習でみられた副鎖骨舌骨筋について

○伊藤義生¹、采谷久留美¹、友松麻美¹、藺村貴弘²

1) 朝日大学 歯学部 3年 2) 朝日大学 歯学部 解剖学分野

【緒言】浅頸筋(胸鎖乳突筋、広頸筋、舌骨上筋群、舌骨下筋群)は変異が多いことで知られている。そのうち舌骨下筋群は通常、胸骨舌骨筋、肩甲舌骨筋、胸骨甲状筋、甲状舌骨筋で構成されているが、発生学的には由来が同じといわれており、頸部浅層ではなくそれに類する種々の破格筋の存在が報告されている。また、舌骨下筋群の支配神経は頸神経ワナや舌下神経であり、破格筋もこれらを支配神経に持つといわれている。我々は、令和元年度の朝日大学で行われた頸部局所解剖セミナーの御遺体(80歳、男性)に、左鎖骨に起始し舌骨に停止する副鎖骨舌骨筋が見つけれられたので報告する。【所見】本破格筋は左鎖骨上面の胸鎖関節面から19mmの位置から37mmの幅で起始し、上内側に走行して、舌骨体左側に24mmの幅で停止した。この筋は他の筋と合することもなく、中間腱もみられなかった。破格筋の深さの位置関係は、二分していた胸鎖乳突筋の鎖骨の起始部より深層にあり、左右とも正常な走行をしていた肩甲舌骨筋の上腹、胸骨舌骨筋、胸骨甲状筋、甲状舌骨筋より浅層であった。また、破格筋の筋腹に頸神経ワナの枝が入っているようにみえたが、正確に確認することはできなかった。【考察】今回の副鎖骨舌骨筋は起始部の幅径が37mmと広く、片側にしかなかったのにも関わらず、他の舌骨下筋群にそこまで大きな左右差がみられなかったことから、舌骨の下制に左右差があった可能性がある。

Q-1

ヒト脂肪組織由来幹細胞における増殖能と細胞周期関連遺伝子発現の検討

鳥海拓¹、増渕洋祐²、大桑雄太¹、飛田護邦²、本田雅規¹¹愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座、²順天堂大学革新的医療技術開発研究センター

脂肪組織由来幹細胞(adipose-derived stem cells; ASCs)は、再生医療等安全性確保法下ですでに治療として提供されている。非臨床研究において、ASCsの増殖に個体差がみられたことから、細胞増殖の差と細胞周期関連遺伝子の発現について着目し、検討した。本研究は順天堂大学医学部倫理委員会の承認(順大医倫第2017092号)を得て実施した。ASCsを単離する脂肪組織は、某美容外科でインフォームドコンセントを実施し、同意を得た患者4名の脂肪吸引手術で余剰となった吸引皮下脂肪を用いた。回収した脂肪組織は細切し、リベラーゼによる酵素処理をおこなった。そして得られた細胞をディッシュに播種して培養を開始した(0継代)。そして、80%コンフルエントで継代培養し、細胞数を計測して増殖曲線を作成した。また、ASCsのRNAを抽出し、細胞周期関連遺伝子の発現をリアルタイムPCRで解析した。各患者由来のASCsはすべて継代培養が可能であった。増殖曲線の傾きから、増殖能の高い群と低い群とに分けた。そして、増殖能の低い群を対照として、高い群に共通して2.5倍以上増加する遺伝子を探索したところ、M期に関連する5種類の遺伝子A、B、C、D、およびEであった。また、増殖能の高い群を対照として、低い群に共通して2.5倍以上増加する遺伝子を探索したところ、G1期に関連する1種類の遺伝子Fであった。以上の結果より、ASCsの増殖能が高い群では、分裂期に関連する遺伝子の発現が高かった。今回の結果で得られた遺伝子の発現が増殖能の高いASCsを識別する指標となれば、ASCsの品質を評価する一助になると考える。

Q-2

ヒトiPS細胞由来上皮細胞による上皮形成に関する研究

普天間拓、鳥海拓、本田雅規

愛知学院大学歯学部 口腔解剖学講座

【目的】ヒトiPS細胞から上皮細胞を誘導し、誘導した細胞が生体で生着するかを検証することにした。【方法】ヒトiPS細胞(253G1株)をDEFCS500培地でサブコンフルエントになるまで培養した。そしてDMEM/F12に1 μ M RA、25 ng/ml BMP4 および1 \times N2を添加した誘導培地で28日間培養し、上皮細胞マーカー(P63, CK18)および細胞接着マーカー(CDH1)により継日的に上皮細胞への分化を確認した。次に上皮欠損モデルを作成した。6週齢のSCIDマウスの背部皮膚を切除後に真皮欠損用グラフトであるテルダーミスを貼付し12日間飼育した。上皮欠損モデルへ誘導した細胞を移植した。7日目に摘出した組織をH-E染色および免疫組織学的解析をした。さらに細胞移植部位からRNAを抽出し、ヒト特異的なプライマー(P63, CK18, CDH1)で増幅した。【結果】誘導した細胞は上皮細胞マーカーおよび細胞接着分子マーカーが発現していた。CK18が上昇していた誘導3日目の細胞を上皮欠損モデルへ移植したところ、7日目には移植部位は縮小し、組織学的解析で重層扁平上皮を確認した。またP63およびPCNA抗体による免疫染色では有棘層まで陽性細胞が確認された。さらにヒト特異的なプライマー(CK18, CDH1)で増幅することを確認した。【結論】iPS細胞は上皮細胞に誘導され、上皮欠損モデルの細胞移植部位では重層扁平上皮が確認された。したがって誘導した細胞が定着している可能性が示唆された。