

日本解剖学会

第66回東北・北海道連合支部学術集会

会期：令和2年9月5日（土）、6日（日）
会場：オンライン開催

特別講演

類随運動神経細胞の発生・分化から見た「くび」の進化

○八木沼洋行

福島県立医科大学医学部神経解剖・発生学講座

我々はこれまで、主にニワトリ胚類随において2つの特異的な運動神経グループ、すなわち(1)軸索を後根から出す運動神経グループおよび(2)発生早期に細胞死を起こす運動神経グループの発生・分化について研究してきた。

軸索を後根から出す運動神経細胞(背側運動神経:dMN)がどの筋を支配し、どのように発生するかについては不明であった。我々は、標識法を用いて、この運動神経細胞が僧帽筋を支配する運動神経であり、類随上部(C1, 2)に存在する副神経脊髄根運動神経と相同であることを明らかにした。さらに神経管における発生領域が Nkx2.2(+)の領域であること、および Phox2b 転写因子を発現することを明らかにした。これは、延髄の鰓弓運動神経と共通する特徴であり、dMN が鰓弓運動系であることが示唆された。すなわち、延髄と同様に類随には体性系と鰓弓系が混在していることを示している。

類随領域で発生早期に細胞死を起こす運動神経細胞がどのような分化過程にある細胞であるのか、Bcl2 の強制発現によって死ぬべき細胞を不死化し、その後の発生を促した。その結果、この運動神経細胞は外側運動神経核(LMC)マーカーである Lhx1、RALDH2 などを発現することが確認された。上肢を支配しない類随領域における LMC 様の運動神経細胞の一過性の出現は、進化過程における頸の伸長(上肢の後方への移動)を反映しているとの解釈も可能と思われる。(COI:No)

1

肉眼解剖学教育用骨格筋の作用を示す可動平面模型の試作

○安田峯生、陶山愛美、上条桂樹
東北医科薬科大学解剖学教室

医師養成に肉眼解剖学の教育は極めて重要であるが、その授業時間は近年減少傾向にある。この状況下で効率よく教育を進めるためには、教材を工夫する必要がある。骨格筋の作用を示す可動平面模型を、段ボール、木板など、工作の容易な素材でいくつか試作した。

一例として、内閉鎖筋は骨盤の閉鎖膜内面とその周辺から起こり、大腿骨転子窩に停止するが、走行途中に小坐骨切痕で約90°向きを変える。限られた解剖学実習時間中にその全貌を剖出して作用を理解するのは容易ではない。模型は寛骨の寛骨臼と小坐骨切痕を通る水平断面を切り抜いて台板に固定し、これに対応する大腿骨頭と大転子の断面を切り抜く。大腿骨頭のほぼ中央部に孔を開け、回転可能な状態で台板に固定する。閉鎖膜前縁に近い恥骨(起始部)と大腿骨の転子窩付近(停止部)に短いピンを立て、小坐骨切痕部にゴム紐を通す小さなつり革を固定、起始部からつり革を通して停止部へとゴム紐をかける。この模型でゴム紐が縮めば大腿骨が外旋することが示される。その他、肋間筋、胸鎖乳突筋、方形回内筋の模型を示した。

このような模型で、骨格筋の作用を丸暗記ではなく、原理に基づいて学生に考えさせることが教育の向上に資すると考える。(COI:No)

2

両側浅上腕動脈の症例報告

○周明¹、石澤章光²、明石英雄¹、鈴木良地¹、板東良雄¹
秋田大学大学院・医学研究科・形態解析学・器官構造学講座¹、
柏市教育委員会理科教育支援²

上腕動脈は大胸筋の下縁の高さで腋窩動脈の続きとして起始し、上腕の内側二頭筋溝を遠位に向かい、肘部の上腕二頭筋腱膜の深部にて橈骨動脈と尺骨動脈に分岐して終わる、上肢の主要な動脈である。分岐部の位置が肘部よりも近位に、且つ正中神経の浅層にある場合、浅上腕動脈とし、深部を走行する動脈を深上腕動脈と命名された。今回、我々は上腕に特徴がある走行を示す両側性の浅・深上腕動脈の例に遭遇したので、ここに報告する。

症例：90歳、女性。左側の上腕動脈は上腕骨近位部で浅・深上腕動脈に分岐した。浅上腕動脈は正中神経の内側を走行し、肘部近くで正中神経の表層を通り外側に移動し、上腕二頭筋腱膜の浅層と深層の間を通過して前腕へ向かい、橈骨動脈となった。その間、大きな分枝は認められなかった。深上腕動脈は通常の上腕動脈の走行並びに分岐を示し、上腕二頭筋腱膜の深層を通過し、尺骨動脈となった。

右側の上腕動脈は正中神経ワナ形成部で浅・深上腕動脈に分岐した。浅上腕動脈は正中神経ワナの浅部を通り正中神経の内側を走行し、上腕二頭筋腱膜の浅層と深層の間を通過して前腕へ向かい、橈骨動脈となった。深上腕動脈は通常の上腕動脈の走行を示した。

本例両側の浅上腕動脈の特徴は、上腕二頭筋腱膜に対する走行である。このことは、発生時における腱膜の形成並びに動脈系の関係に示唆を与えるものと考えられる。

COI:No

3

高感度ヒトゲノム検出のための Alu プローブ配列設計

○明石英雄、周明、鈴木良地、板東良雄

秋田大学 大学院医学系研究科 形態解析学・器官構造学講座

ヒトゲノム DNA の解析に先立ち、DNA の質および量を正確に評価し、状態の良好な試料を選定する必要がある。しかし、極めて微量で、高度に断片化し、また他生物由来 DNA が混入する古人骨由来等の試料においては、従来法では正確な定量が難しく、長年の課題となっていた。我々はそのために、霊長類特異的で、さらにヒトゲノムに 100 万コピー以上存在する Alu 配列を標的とするプライマー・プローブを用いた、高感度定量 PCR 法を開発してきた。しかし、その後の研究で、データベースに登録されたヒトゲノム配列中で、プローブ配列と一致する配列が予想に反して少ないことが明らかになった。これは、プローブ配列設計に更なる改善の余地があることを示唆する。今回、我々は、LNA を用いた新規 Alu プローブの開発について報告した。

LNA プローブでは、通常核酸で構成された以前報告したプローブと比較し、完全マッチの標的配列数が増加し、特に低濃度における良い分離が可能であった。また、ミスマッチによる Tm 低下効果が大きくなるため特異性も期待できるが、実際、特に低濃度領域において、特異性が高くなったことにより感度が上昇したことが示された。以上の結果から、ヒトゲノム超高感度測定に用いるための、高感度・高特異性を有する新規 Alu プローブの開発に成功した。(COI:No)

4

肺の血管発生：肺静脈形成過程の静脈内皮細胞の特性

○阿部志津香、村嶋亜紀、木村英二、人見次郎
岩手医科大学 解剖学講座 人体発生学分野

【背景・目的】肺静脈は肺芽周囲の血管叢(肺静脈叢)と左房後壁から萌出した原始肺静脈とが接続することにより形成されるが、この接続のパターン形成に関して詳細は分っていない。これは肺静脈発生過程における血管内皮細胞の特性が不明であり、特異的な分子マーカーが同定されていないことによる。本研究では一般的な血管内皮細胞マーカーである CD31 と Flk1 に加え、腎臓などにおいて静脈特異的に発現すると報告がある Emcn の局在を観察し、肺静脈発生における血管内皮細胞の挙動について検討した。【方法】E8.5 から E16.5 の ICR と Flk1-BacTg マウス胚を用いてホールマウント免疫蛍光染色標本を作成した。それぞれ Emcn と CD31 との二重染色もしくは Emcn での単染色を行い、透明化後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。同時にパラフィン切片による免疫組織化学も行った。【結果】E9.5 以降で肺静脈叢が観察され、Emcn のみが陽性であった。E9.5 から E10.5 で静脈叢と心房後壁との接続が確認でき、この血管も Emcn のみが陽性であった。E11.5 では気管支が分岐し、その周囲の毛細血管網は Emcn 強陽性で CD31 や Flk1 は陰性、もしくは弱陽性であった。発生が進むにつれて、これらの毛細血管や肺静脈の内皮細胞は CD31 や Flk1 も強陽性となった。発生後期では肺動静脈において 3 種すべての分子マーカーの発現を認めたが、Emcn は肺静脈での発現がより強かった。【考察】肺血管形成過程において Emcn は発生早期の静脈叢の段階から既に発現を認めており、肺血管、特に肺静脈の発生を可視化する上で有用な血管内皮細胞マーカーであると考えられた。(COI: No)

5 Pathological alternations of mediastinal fat-associated lymphoid cluster in streptozotocin induced diabetic mouse model

○Yaser Hosny Ali Elewa^{1,2}, 市居修^{1,3}, 中村鉄平⁴, 昆泰寛¹

北大院・獣医解剖¹, エジプト・Zagazig 大², 北大院・農アグリメディカル³, 日本食品分析センター⁴

Diabetes is a global health problem and currently the number of diabetic patients in Japan is exceeding 10 million. Recently, many studies revealed the relationship between diabetes and the development of lung injury. Furthermore, our previous reports revealed the role of mediastinal fat-associated lymphoid clusters (MFALCs) in the progression of respiratory diseases. However, no reports concerning the effect of metabolic-associated disease such as diabetes on the development of MFALCs. Therefore, in this study, we examined the correlations between diabetes and the development of MFALCs and progression of lung injury in streptozotocin induced diabetic mouse model in C57BL/6N mice. Furthermore, immunohistochemistry for CD3, B220, Iba1, CD31, LYVE-1, cleaved caspase3, TNF- α and IL5 was performed. Interestingly, the diabetic group showed the progression of lung injury as well as significant higher ratio of lymphoid cluster (LCs) area to total mediastinal fat tissue (MFT) area when compared to the control group. Also, we revealed significant higher positive cell densities for immune cells, TNF- α and IL5 positive cells within the lung of diabetic group than that of control group. Furthermore, significant positive correlations were observed between blood glucose level and MFALCs size as well as the quantitative parameters of the immune cells, and LYVE-1 positive lymphatic vessels in both the lungs and MFALCs. Thus, we suggest that the diabetes can induce the progression of lung injury via their induction of MFALCs development. However, further investigation is required to clarify the pathogenesis beyond the effect of diabetes on the development of MFALCs and lung injury. (COI: No)

6 表皮型脂肪酸結合タンパク質による パリエル板胚中心マクロファージの取り込み亢進

○鈴木良地¹, 大和田祐二², 板東良雄¹

秋田大学大学院医学系研究科 形態解析学・器官構造学講座¹, 東北大学大学院医学系研究科 器官解剖学分野²

表皮型脂肪酸結合タンパク質 (Epidermal fatty acid binding protein: EFABP) は C57BL/6 マウスパリエル板の M 細胞、樹状細胞、胚中心マクロファージに発現する (R. Suzuki, et al. 2009)。最も発現強度の強い胚中心マクロファージでの EFABP の担う具体的な機能の検証を試みた。正常 C57BL/6 マウスパリエル板において EFABP 陽性マクロファージ周囲で eat-me-signal である phosphatidylserine (PS) と、PS を細胞膜表面に固定する AnnexinV の共局在および、培養系での EFABP 発現と培地中の AnnexinV 量の正相関を既に報告している。PS が露出した細胞のマクロファージによる取り込みの際に、PS 特異的な接着装置である Gas6 とその受容体 Ax1 の関与が予想された。実際、胚中心マクロファージ周囲の Gas6 及び、EFABP 陽性マクロファージでの Ax1 発現が確認できた。

さらに、RAW264.7 細胞を用いた培養系で EFABP 発現と Ax1, Gas6 との相関を検討した。細胞内 Gas6 発現量は EFABP 発現増強によりやや上昇したが、培地中 Gas6 には減少傾向が観察された。一方、Gas6 との結合で増加するリン酸化 Ax1 は EFABP 発現増加に伴い上昇した。これらは、EFABP 発現と相関した Gas6-Ax1 複合体の増加で説明できる。Gas6 と PS の親和性を考え併せると、EFABP 発現は食食亢進に働くと考えられる。(COI: No)

7 Fatty acid binding protein 7 (FABP7)/oleic acid interaction potently drives glioma cell proliferation.

○Banlanjo A Umaru, Yoshiteru Kagawa, Subrata Kumar Shil, Hirofumi Miyazaki, Shuhei Kobayashi, Yuji Owada
Dept. of Organ Anatomy, Tohoku Univ. Grad. Sch. of Med.

【Background】 In glioblastomas, altered lipid metabolism is a prominent characteristic, and associated with poor prognosis. Though polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are shown to inhibit tumor growth, recent growing evidence links oleic acid (OA), n-9 PUFA, to enhanced tumor occurrence and proliferation. Fatty acid-binding protein 7 (FABP7), an intracellular lipid chaperon for especially n-3 and n-9 PUFAs, is highly expressed in glioblastoma and associated with its decreased survival. Multiple studies put FABP7 at the center of glioma proliferation, but the involved mechanisms are still lacking. Here, we examined the effects of FABP7/OA interaction on glioma proliferation focusing on epigenetic regulation. 【Results】 We observed a decrease in proliferation upon knockdown of FABP7 in glioma cells. Similarly, overexpression of FABP7 increased the proliferation rate. Addition of OA exacerbated the proliferation in FABP7-expressed cells, but not in non-FABP7-expressed cells. Interestingly, lipid binding domain mutation in FABP7 abrogated the effect of OA. Furthermore, OA treatment increased FABP7 translocation and expression in the nucleus, as well as OA uptake into the nucleus. In turn, FABP7 translocation to the nucleus increased the acetylation of histone H3K27 and likewise, OA treatment boosted this effect. 【Discussion】 Our findings suggests that intracellular interaction of FABP7/OA may drive tumor cell proliferation through modulation of epigenetic status of proliferation related genes. (COI: No)

8 DGK ζ は DNA 二重鎖切断における DNA 修復に関与する

○田中俊昭、後藤薫
山形大・医・解剖学第二講座

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) ファミリーは、様々なジアシルグリセロール(DG) 応答分子の生理的活性調節因子として機能し、近年、その機能的役割として癌や炎症応答におけるシグナル伝達への関与が注目されている。

我々は DGK ファミリーのうちゼータ型 DGK (DGK ζ) の機能解析を進めており、これまでの研究により、放射線照射実験において、DGK ζ ノックアウトマウスが放射線照射に対して脆弱性を示すことを明らかにした。また、培養細胞に対して薬剤による DNA 損傷を引き起こした実験においても、DGK ζ ノックダウン細胞ではアポトーシスが惹起されやすいことを報告してきた。DNA は一般的に、紫外線や放射線などの環境要因、活性酸素、DNA 複製に伴う異常などの内部要因により様々な損傷を受ける。特に DNA 損傷の中で細胞にとって最も重篤な DNA 二重鎖切断に対して、細胞は多様な DNA 修復機構を備えている。

今回我々は、DGK ζ 欠失が DNA 損傷に脆弱性を示すことから、DGK ζ が DNA 二重鎖切断における DNA 修復機構に対して、どのように作用するのか解析を行った。その結果、DGK ζ ノックダウン細胞では、DNA 二重鎖切断に対する DNA 修復時に様々なタンパク質をリン酸化することで知られる Akt の活性化が低下することを見いだした。また、DGK ζ ノックダウン細胞では、Akt の活性化を介して、DNA 二重鎖切断部位に集積し、DNA 修復に重要な役割を担う Breast Cancer Susceptibility Gene 1 (BRCA1) の機能が低下していることが明らかとなった。以上のことから、DGK ζ は DNA 二重鎖切断における DNA 修復機構に対して、重要な役割を担うことが示唆された。(COI: なし)

9 三次元ヒト人工腹膜組織を用いた癌腹膜播種動態および治療に関する研究

○浅野義哉¹, 小田切理³, 追切裕江⁴, 小山文望恵⁴, 松崎典弥⁵, 横山良仁⁴, 袴田健一³, 明石満⁶, 下田浩^{1,2}

1 弘前大学・院医 神経解剖・細胞組織学、2 生体構造医学、3 消化器外科学、4 産婦人科学、5 大阪大学・院工 応用化学、6 大阪大学・院生命機能

本研究室(弘前大学医・解剖学)は、大阪大学工学系研究室との医工連携により、細胞外マトリクスの多層コーティング技術の LbL 法を用いて三次元ヒト人工腹膜組織 (artificial human peritoneal tissue; AHPT) を開発し、癌腹膜播種初期動態の可視化と解析に用いた。例として膀胱癌細胞株播種の比較で、低分化型の細胞株 (MIA PaCa-2) は AHPT の中皮下に播種 24 時間以内に侵入し組織全体にびまん性の浸潤を示した一方、中高分化型の細胞株 (Panc-1, BxPC3) では組織浅層での集積あるいは上皮様の腫瘍形態を示した。さらにこれらは、各細胞の癌関連因子発現プロファイルに相関していた。また癌遺伝子治療開発への応用として、卵巣癌細胞での発現低下と増悪の関連が知られるカルボニルレダクターゼ 1 (CR1) について、遺伝子導入による腹膜播種抑制効果を AHPT により可視化および検証した。遺伝子導入キャリアとして dendritic 体を用い、卵巣癌細胞株 HRA の腹膜播種モデルに CR1 導入を行った結果、CR1 dendritic 体の卵巣癌細胞への取り込みと癌浸潤後の増殖抑制を確認した。これらより AHPT は癌腹膜播種メカニズムの解明と治療法開発に有用であると考えられた。(COI: No)

10 細胞質分裂における収縮環形成の超解像ライブイメージング

○上条 桂樹
東北医科薬科大・医・解剖

動物細胞の細胞質分裂では、収縮環の収縮により細胞がくびれ、2 つの娘細胞が分離する。収縮環は、分離した染色体間の細胞表層である赤道面にアクチンとミオシンのフィラメントが集積して形成される。私たちは、これまで収縮環の形成が Rho シグナルによって制御されることを明らかにしてきたが、Rho の下流でどのようにして収縮環が形成されるのかよくわかっていない。今回、収縮環形成過程を超解像ライブイメージング観察したので報告する。ブタ尿管上皮細胞 LLC-PK1 に Lifeact-mCherry, ミオシン-EGFP の融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を確立し、横河電機 SoRa ディスクを搭載したオリンパススピニングディスク超解像顕微鏡 SpinSR10 でミオシン、アクチンの動態を観察した。分裂後期に染色体が分離すると、アクチンフィラメントは染色体間の細胞表層の複数のスポットから放射状に伸長した。一方、ミオシンフィラメントは放射状のアクチンフィラメントに沿うように集積し、スポットの中心方向に移動した。時間経過とともにアクチンフィラメント、ミオシンフィラメントはいずれも赤道面に平行になった。これらの観察結果から、スポットから伸長したアクチンフィラメント上のミオシンフィラメントが、別のスポットから伸長したアクチンフィラメントを捉えて架橋することに由来する収縮環が形成され、収縮環の収縮が開始されると考えられた。(COI: No)

11

高浸透圧ストレス下における非膜性オルガネラの形成と分解

○田村 直輝、和栗 聡
福島県立医科大学 医学部 解剖・組織学講座

浸透圧ストレスは泌尿器系や消化器系などの臓器で日常的にみられる現象である。細胞が高浸透圧ストレスに曝されると、水分が細胞内から放出され、細胞質中の分子密度が増加する。この条件下では、液-液相分離により細胞質にストレス顆粒などの境界膜をもたない非膜性オルガネラあるいは液滴が形成され、神経変性疾患でみられる不可逆性の凝集体形成に繋がると考えられている。最近、ユビキチン結合ドメイン(UBD)を有する p62 (あるいは SQSTM1) が液滴形成分子であることが報告されたことから、本研究では膀胱癌由来細胞株である T24 細胞において、高浸透圧ストレス下における p62 ファミリー分子の挙動を追った。培地に 0.2~0.4 M スクロースを添加すると 30 分以内に p62 液滴が形成され、オートファジーマーカーと共局在した。また、他の UBD タンパク質である NBR1、TAX1BP1 とともにリソソーム依存的に選択的に分解された。この条件下で、p62 液滴は可逆性を示した。一方、ストレス顆粒は p62 液滴と一致せず、そのマーカータンパク質である G3BP1 はリソソーム依存的に分解されなかった。さらにスクロースの濃度を 0.6~0.8 M に上げると p62、NBR1、TAX1BP1 分子は Triton-X-100 不溶性画分に移行し、その分解量は 0.2~0.4 M の時に比べて減少した。この不溶性画分はストレス除去によって再び可溶性画分に戻ったことから、可逆的であると考えられた。以上の結果より、細胞質では高浸透圧のストレス強度に依存して多段階的に p62 の形成・分解が制御されていることが分かった。(COI:No)

12

Ndufs4 ablation results in presynaptic loss in hippocampus

○Subrata Kumar Shil¹, Yoshiteru Kagawa¹, Banlanjo Abdulaziz Umaru¹, Hirofumi Miyazaki¹, Yui Yamamoto², Shuhei Kobayashi¹, Takaaki Abe³, Yuji Owada¹ ¹Dept. of Organ Anatomy, Tohoku Univ. Grad. Sch. of Med. ²Dept. of Anatomy, Tohoku Med.&Pharm. Univ. ³Dept. of Endo.&Vascular Med., Tohoku Univ. Grad. Sch. of Med.

【Background】 Impaired function of mitochondrial respiratory chain complex I (CI) in brain cells is related to many neurodegenerative diseases. Notably, NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) is one of the compartments of mitochondrial CI and its mutation in human shows several phenotype including subacute necrotizing encephalopathy. However, the role of Ndufs4 in neuronal function is poorly understood. In this study, we determined the expression of Ndufs4 in hippocampal neuronal cells and its involvement in the change of neuroplasticity using Ndufs4-KO mouse. 【Results】 Immunohistochemistry revealed that Ndufs4 was highly expressed in NeuN-positive neuron of hippocampus. Although the number of NeuN positive neurons was not changed in Ndufs4-KO hippocampus, the expression of synaptophysin, a presynaptic protein, was significantly decreased. To investigate the detail mechanism, we created differentiated Neuro2A cells with silencing of Ndufs4 gene expression and found shorter neurite length with decreased expression of synaptophysin. Furthermore, western blot for phosphorylated ERK revealed that Ndufs4 silencing decreased the activity of ERK signaling. 【Discussion】 Ndufs4-modulated mitochondrial activity may be involved in the neuroplasticity via regulating synaptophysin expression. (COI: No)

13

ラット胃壁細胞 Aromatase の加齢変化

○小林 裕人¹、白澤 信行²、内藤 輝¹
山形大学 医学部 解剖学第一講座¹
東北化学園大学 医療福祉学部 リハビリテーション学科 理学療法専攻²

【背景】ラット胃壁細胞には Aromatase が存在し、多量のエストロゲンを産生している。このエストロゲンは胃静脈と門脈を介して肝臓に流入し、その殆どが代謝されるが、未だその存在意義や制御機構などについて不明な点が多い。Wistar 系ラット胃壁細胞の Aromatase は生後 20 日齢頃に発現し、40 日齢頃まで増強しプラトーとなり、その後少なくとも 12 週齢頃までは一定で持続することが明らかとなっている。【材料と方法】本研究では、12、24、48、72 週齢 Wistar 系雄ラットを材料に組織採取を行い、胃壁細胞 Aromatase の加齢変化を調べた。【結果】72 週齢の胃粘膜上皮には加齢変化に伴う粘膜筋板の肥厚や間質細胞の増生・線維化、壁細胞の減少などの所見が認められた。胃粘膜上皮中の Aromatase mRNA 発現量は 24 週齢から低下し続けていたものの、壁細胞には Aromatase が発現していた。【考察】胃壁細胞は加齢による胃粘膜の萎縮性変化に伴う数の減少や形態学的変化がみられるものの、生涯エストロゲンを産生し続けることが示唆された。(COI: No)

14

DGKε欠損マウスにおける体温調節メカニズムの異常

○中野知之、後藤 薫
山形大・医・解剖学第二講座

余剰脂質は、トリグリセリド (TG) として主に脂肪細胞内の脂肪滴に貯蔵されるほか、熱産生のエネルギーとして使用される。前者では白色脂肪細胞が、後者では褐色脂肪細胞がその役割を担う。我々は、TG 合成の中間産物であるジアシルグリセロール (DG) のリン酸化酵素、ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の機能解析を行ってきた。DG は細胞内二次伝達物質としても機能することから、DGK は脂質代謝系と細胞内情報伝達系の双方を調節すると考えられている。本研究では、脂肪組織の熱産生機構に着目し、DGKε-KO マウスを用いた寒冷暴露実験を行った。室温 (22°C) 飼育条件において、DGKε-KO マウスの直腸温は、野生型 (WT) マウスに比べて低い傾向にあった。寒冷条件 (6°C) で飼育すると、DGKε-KO マウスの直腸温は有意に低下した。一方、30°C で飼育した場合、両マウスの直腸温に差は認められなかった。6°C および 22°C 条件では、DGKε-KO マウスの血糖値は WT よりも低下していた。各種脂肪組織の相対重量を測定した結果、6°C 条件において、DGKε-KO マウスの褐色脂肪組織量が増加していた。褐色脂肪組織では、交感神経により誘導されミトコンドリアに局在する uncoupling protein 1 (UCP1) が熱産生を担っている。ウェスタンブロット解析の結果、交感神経刺激を受容するβ3 アドレナリン受容体および UCP1 のタンパク質発現は、30°C 条件に比べて 6°C では亢進したが、WT と DGKε-KO マウスの間に顕著な差は認められなかった。本研究の結果、DGKε-KO マウスでは、体温調節メカニズムの障害が生じる可能性が示唆された。(COI:No)

15

ラット頸動脈小体における小型型スクレオチド輸送体の局在および短時間低酸素曝露による免疫反応性の増強

○横山拓矢¹、山本欣郎²、加藤弘毅³、平川正人¹、松浦誠¹、齋野朝幸¹
¹岩手医科大学 医学部 解剖学講座 細胞生物学分野、²岩手大学 農学部 共同獣医学科 獣医解剖学研究室、³防衛医科大学校 動物実験施設、⁴岩手医科大学 薬学部 臨床薬学講座 地域医療薬学分野

【背景と目的】我々は、頸動脈小体において P2X3 受容体を有する感覚神経終末がチロシン酸化酵素 (TH) 陽性 I 型細胞を選択的に取り囲むことを示し、特定の細胞群から ATP が分泌される可能性を見出した。本研究では、ATP の小胞輸送に関わる小型型スクレオチド輸送体 (VNUT) の頸動脈小体における発現と局在を解析した。また、ラットへ 24 時間までの低酸素 (10% O₂ in N₂) 曝露を行い、時間経過による VNUT 発現変化を解析した。【結果と考察】RT-PCR では、Wistar ラット (雄、8-10 週齢) の頸動脈小体において VNUT mRNA の発現が認められた。免疫組織化学では、一部の I 型細胞の細胞質において VNUT 陽性反応が認められた。I 型細胞のうち、VNUT 陽性反応は TH 陽性細胞集団に限局し、ドパミンβ水酸化酵素 (DBH) 陽性細胞には観察されなかった。VNUT 陽性 I 型細胞の P2X3 陽性神経終末との接触面には、シナプス前部足場蛋白 Bassoon 陽性反応が認められた。したがって、VNUT を発現する I 型細胞が特異的に ATP を小胞分泌していることが示唆された。低酸素曝露実験では、対照群および 2、4 時間曝露群において VNUT 強陽性反応を示す I 型細胞が散在的に観察されたが、6、12、24 時間曝露群ではほぼ全ての I 型細胞が VNUT 強陽性反応を示した。VNUT 陽性 I 型細胞の平均蛍光強度は、6、12、24 時間曝露群では対照群に比べ有意に増加し (p<0.05)、このうち、12 時間曝露群は 6、24 時間曝露群と比べ有意に増加した (p<0.05)。以上のことから、I 型細胞における VNUT の発現が低酸素曝露により亢進されることで、頸動脈小体の興奮伝達が増強されていることが示唆された。(COI: No)

16

神経型ニコチン性アセチルコリン受容体の分子シャペロン TMEM35A(NACHO)の成体マウス脳における発現解析

○山崎美和子¹、大坪琴美²、今野幸太郎¹、渡辺雅彦¹
北海道大学 大学院医学研究院 解剖発生学教室¹、医学部医学科²

イオンチャネル共役型である脳内のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)はα2-α7, β2-β4 の組み合わせからなる五量体である。近年、4 回膜貫通型のタンパク質 TMEM35A(NACHO)が脳内の大半の nAChR のアセンブリに重要であることが分かってきた。しかし脳内での局在や、nAChR のサブユニット発現との関連については不明であったため、成体マウス脳における発現解析を行った。in situ ハイブリダイゼーション法で検討したところ、TMEM35A の mRNA は脳内に広く分布するが、発現には強弱があることがわかった。特に梨状皮質、扁桃核、視床下部腹内側核、青斑核、全ての運動性脳神経核に強く発現し、これらの領域内のほぼ全ての細胞で発現が認められた。その他には海馬の歯状回顆粒細胞や GABA 作動性介在ニューロン、内側手綱核のコリン作動性ニューロンなど特定の細胞集団に強い発現が確認された。その一方で、中脳のドパミン作動性神経細胞や、橋脚被蓋核などの非運動性コリン作動性神経細胞での発現は非常に弱かった。また、α3, β2 サブユニット発現との間にのみ正の相関が認められた。特異的抗体を用いた染色では TMEM35A のタンパク質は細胞体の核周囲部や樹状突起基部に強く集積していたが、神経終末には検出されなかった。免疫電顕により細胞内分布を検討したところ、局在を示す粒子は細胞質や小胞体膜に留まり、細胞膜には殆ど検出されなかった。以上の結果、TMEM35A の発現の有無により優先的に形成されるチャネル構成が異なる可能性や、同じ構成のチャネルでも機能に強弱が生じるなど、機能制御の多様性が存在する可能性が示唆された。(COI:No)

17 小脳抑制性介在ニューロンルガロ細胞の帯状構造特異的な出力様式

○宮崎 太輔^{1,2}、山崎 美和子²、渡辺 雅彦²
 北海道大学 保健科学研究所 リハビリテーション科学分野¹、医学研究
 院 解剖発生学教室²

小脳顆粒細胞層の抑制性介在ニューロンの細胞形態や神経化学的特性は非常に多様である。この中で、ルガロ細胞 (LC) は顆粒細胞層上部に多く分布する小型紡錘形細胞であり、プルキンエ細胞 (PC) 層に平行な樹状突起を伸ばす特徴的な形態が知られている。しかし LC は特異的なマーカー分子を持たないため、これまで詳細な形態学的解析は困難であった。今回、我々は LC 特異的に蛍光タンパクを発現するモデルマウスを作成し、LC の形態学的解析を行なった。蛍光 *in situ* hybridization では、LC の約 70% は GAD67/GlyT2 共陽性であり、残りは GAD67 単独陽性であった。プルキンエ細胞層の接線面で観察したところ、LC 樹状突起同士は互いにジャンクション構造によって結合しており、PC 反回軸索終末、苔状線維、登上線維、顆粒細胞上行線維、GlyT2 陽性線維による入力を受けていた。また、小脳帯状構造のマーカーである aldolaseC との相関性を検討したところ、個々の LC 樹状突起伸長領域は小脳帯状構造と対応していることが明らかとなった。一方、LC からの軸索は分子層の抑制性介在ニューロンやゴルジ細胞に投射しており、上行線維による同一帯域内への強い入力と側方側枝による帯域を超えた入力を行っていることが明らかとなった。以上の結果から、LC は特定の帯域内での入力を統合し、抑制性介在ニューロンに選択的に出力することが示された。LC の標的である分子層の抑制性介在ニューロンやゴルジ細胞は PC や顆粒細胞への抑制を行っていることから、LC は帯域特異的な入力にตอบสนองしてこれらのニューロン群を効果的に脱抑制すると考えられる。(COI:No)

18 Adult マウスの脳での paternally expressed gene 10 発現に関する *in situ* hybridization analysis

○石田雄介、直野留美
 東北医科薬科大学医学部 組織解剖学教室

Adult マウスの脳で、レトロトランスポゾン由来の transposable element である paternally expressed gene 10 (PEG10) の発現に関して *in situ* hybridization 法を用いて検討した。その結果 PEG10 は視床下部に強く発現することが示唆された。PEG10 は胎盤形成に必要とされており、また卵巣や精巣にも強く発現することが報告されている。これらから PEG10 は生殖や cell proliferation に関与することが予想される。PEG10 は、視床下部一下垂体-末梢内分泌系 (卵巣や精巣など) 軸で重要な役割を果たしている可能性がないだろうか。その他多少の考察をくわえ、本学術集会で報告させて戴きたい (COI: No)。

19 ラット前頭皮質から淡蒼球外節への投射様式

○苅部冬紀・藤山文乃
 北海道大学 大学院医学研究 解剖学分野 組織細胞学講座

前回の解剖学会において報告したラット大脳皮質運動野から淡蒼球外節への投射に関して、さらに解析を行った。前頭皮質のうち、一次・二次運動野と帯状皮質から淡蒼球外節への投射が見られ、二次運動野と帯状皮質からの投射はより密であった。一方、運動野より尾側にある体性感覚野からはほとんど投射が見られなかった。また、運動野の物側にある前頭眼窩皮質からの投射は、淡蒼球外節の中でも腹側に偏り、腹側淡蒼球でさらに強い投射が見られた。以上の点から、淡蒼球外節への投射は大脳皮質の運動関連領域を主な起源とすることが示唆された。また、逆行性アデノ随伴ウイルスベクターにより標識したところ、皮質-淡蒼球外節投射細胞は 2-6 層の広い層にわたって存在しており、また 5 層細胞には皮質下投射細胞のマーカーである Ctip2 が発現していた。皮質-淡蒼球外節投射細胞と皮質-橋投射細胞を同時に標識したところ、5 層の少数の細胞で二重標識が見られた。(COI: No)

20 脊髄神経発生過程における Robo3 の発現制御機構とその種間多様性の解析

○向笠勝貴、佐久間千恵、八木洋行
 福島県立医科大学 医学部 神経解剖・発生学講座

本研究では、まず、脊髄の最も腹側で分化する V3 インターニューロン(V3IN)に焦点を当て、この神経で Robo3 の発現がどのように調節されているのかについて解析を行った。まず、ニワトリ胚脊髄の切片で、V3IN で発現することが知られている NKX2-2、SIM1 などの発現を ROBO3 とともに調べたところ、ROBO3 は神経発生の比較的后期に産生される V3IN のサブグループで発現することが明らかとなった。一方、ゼブラフィッシュでは、robo3 はインターニューロンだけでなく運動ニューロンにも発現しているという報告がある。この点は、公共データベースから取得したゼブラフィッシュ single-cell RNA-seq のデータを独自に解析することによっても確認することができた。以上のことから、羊膜類と魚類では Robo3 の発現制御が異なっていることが予想された。この点を確認するために、Robo3 遺伝子周辺のゲノム配列を脊椎動物間で比較し、Nkx2-2、Olig2、Neurog2 などの神経発生における主要な転写因子の ChIP-seq データと照らし合わせて解析を行った。その結果、マウスゲノムにおいて、Robo3 から約 20kb 上流の位置に多数の転写因子結合サイトが存在し、その領域はシラカンスを含む四肢動物では保存されているが、真骨魚類では消失していることがわかった。この配列の機能を確かめるために、マウスゲノムからこの配列を単離し、ニワトリ胚エレクトロポレーションでレポーター解析を行った。その結果、レポーター-GFP の発現が、内在性の Robo3 の発現とほぼ一致して確認できた。このことから、この配列が Robo3 の発現制御において決定的な役割を果たしていることが明らかとなった。また、この配列が真骨魚類で失われていることは、羊膜類とゼブラフィッシュにおける Robo3 の発現細胞の違いに関連していると考えられる。(COI:No)