

# 日本解剖学会

## 第102回関東支部学術集会

会 期：平成26年11月22日（土）

会 場：東京医科大学病院第1研究教育棟3F第1講堂

### T1 細胞移動を基軸とする海馬歯状回形成のメカニズム探索

篠原広志<sup>1</sup>、佐藤 亨<sup>1</sup>、戸田景子<sup>1</sup>、土森健至<sup>1</sup>、塩田清二<sup>2</sup>、石龍徳<sup>1</sup>  
東京医科大学 組織・神経解剖学<sup>1</sup>、昭和大学・医・解剖一<sup>2</sup>

一般に、神経新生は胎生期に始まり生後初期に終わるが、海馬歯状回では神経新生が胎生期から成体期まで続く。胎生期と成体期での神経新生パターンは異なり、成体の海馬歯状回のニューロンは顆粒細胞下帯で産まれるが、胎生期の神経幹細胞は海馬系近傍の脳室帯（歯状回切痕）にて産生される。その後、神経幹細胞は海馬系上部を通過して軟膜側に移動する。神経幹細胞の移動は顆粒細胞層形成に重要なプロセスであるが、この移動の時空間パターンはまだよく分かっていない。我々は神経幹細胞の移動を追跡するために、子宮内電気穿孔法により RFP 標識を試みた。その結果、歯状回切痕の神経幹細胞が歯状回へと到達することが分かった。この歯状回に到達した RFP 陽性細胞について免疫組織化学的解析を行ったところ、神経前駆細胞マーカー *Tbr2* を発現する RFP 陽性細胞は、歯状回の軟膜直下に認められた。一方、*Sox2* を発現する RFP 陽性細胞は軟膜直下および歯状回門に見られ、神経前駆細胞と神経幹細胞は異なる分布を示した。また GFAP-GFP Tg マウスや蛍光標識した海馬のスライス培養下でのタイムラプス観察によって、神経前駆細胞が歯状回切痕から増殖しながら歯状回へと移動することをリアルタイムに確認できた。辺縁部へ長い突起を伸ばし、その後その突起を短縮して、細胞体が辺縁部へと移動するトランスロケーション様の細胞が認められた。これとは異なる経路や挙動を示す細胞も観察されており、それら細胞の移動経路と細胞運命との関連性について検討した。

### T2 固有感覚性ニューロン投射における転写因子 Runx3 の役割

萩原 裕紀，増田 知之，志賀 隆

筑波大学大学院人間総合科学研究科 医学医療系

筋緊張の情報を司る固有感覚性ニューロンは脊髄神経節（DRG）に存在し、軸索を末梢と中枢に投射している。転写因子 *Runx3* 欠損 (-/-) マウス胎仔ではこのニューロンの軸索投射が消滅しているため、軸索投射に *Runx3* の関与が考えられるが、その詳細は未だ不明である。そこで本研究では、その制御機構の解明を目指し、まずマイクロアレイ解析を用いて *Runx3* -/- マウス胎仔 DRG で発現量の変化した軸索ガイダンス関連遺伝子を選出した。その後、定量 RT-PCR 解析で *neurotrophin-3* (NT3) 受容体 *TrkC* をコードする *Ntrk3-variant 1* (*Ntrk3-v1*) と *Ntrk3-variant 2* (*Ntrk3-v2*) の発現が、*Runx3* -/- マウス胎仔 DRG で有意な減少を示し、かつ両者の発現動向が異なる可能性が示唆された。続いて *in situ* ハイブリダイゼーションで調べたところ、胎生14.5日の *Runx3* -/- マウス胎仔 DRG では *Ntrk3-v1* の大半が消失したのに対し、*Ntrk3-v2* の発現は維持されていた。この結果から、*Ntrk3-v1* は *Runx3* 依存性、*Ntrk3-v2* は *Runx3* 非依存性である可能性が示唆された。さらに、培養実験で野生型マウス胎仔の DRG 軸索が NT3 の軸索誘引活性に反応するのに対し、*Runx3* -/- マウス胎仔の DRG 軸索の反応性は消失することを見出した。以上の結果から、*TrkC* (v1) が NT3 の軸索誘引活性を受容し、*TrkC* (v2) はその活性を受容しない可能性が示唆された。

### T3 生後発達期の母仔関係がマウスの脳と行動の発達に与える影響

李海燕、石川千尋、増田知之、志賀隆  
筑波大学医学医療系神経生物学

生後発達期の短時間の母仔分離（ハンドリング）は、マウスやラットの仔を毎日短時間（5分15分間）母親から引き離す操作であり、成長後の仔の行動に影響を及ぼすことが報告されている。しかし、動物種や系統によって結果が異なり、その脳内機構の解明は遅れている。そこで本研究では、BALB/c マウスを用いて、生後発達期のハンドリングが成体期の学習・記憶、不安やうつ様行動、痛覚感受性などの行動、および脳内セロトニン（5-HT）神経系に与える影響を調べることを目的とした。ハンドリング群は、生後1日目から14日目まで、毎日1回15分間、仔マウスを母親から引き離し、一方コントロール群は、何の操作も加えず通常飼育した。生後21日目に離乳し、生後57日目から空間学習・記憶、不安やうつ様行動、痛覚感受性を評価した。また、生後71日目に、前頭皮質、海馬、中脳（縫線核を含む）を切り出し、5-HT<sub>1A</sub> 受容体、5-HT<sub>2A</sub> 受容体、脳由来神経栄養因子（BDNF）の mRNA 発現量を定量リアルタイム PCR 法で定量した。その結果、生後発達期のハンドリングにより、空間学習・記憶能力が向上し、不安レベルが低下した。うつ様行動と痛覚感受性に変化は見られなかった。一方、海馬の BDNF と中脳の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の mRNA 発現量が増加したが、前頭皮質の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体、5-HT<sub>2A</sub> 受容体、BDNF の mRNA 発現量に変化は見られなかった。これらのことから、生後発達期のハンドリングが空間学習・記憶の向上と不安様行動の低下を引き起こし、その作用に海馬の BDNF と縫線核を含む中脳の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が関与する可能性が示唆された。

### T4 生後発達期のセロトニン神経系が行動の発達に及ぼす影響

石川千尋、李海燕、増田知之、志賀隆  
筑波大学医学医療系神経生物学

セロトニン(5-HT)は、発達期では神経栄養因子として働き、神経回路形成を調節する。また、発達期の 5-HT は、成体期の不安、うつ、記憶学習に関与している。しかし、その作用がどの 5-HT 受容体を介するかといった詳細な脳内機構は明らかにされていない。そこで、本研究では、脳内 5-HT 量の低下が報告されている BALB/c マウスを用いて、生後発達期の 5-HT と 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が成体期の不安、うつ、空間学習に及ぼす影響を調べた。生後1日目(P1)から P21 に、選択的 5-HT 再取り込み阻害剤であるフルオキシセチン、または 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストである 8-OH-DPAT を経口投与し、生後9週目から10週目に不安やうつ様行動、空間学習を評価した。また、P22 と P71 に、リアルタイム PCR 法で内側前頭前皮質、扁桃核、背側・腹側海馬、縫線核の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体と脳由来神経栄養因子 (BDNF) mRNA 発現量を測定した。フルオキシセチンを投与すると、不安様行動の減少、うつ様行動の減少傾向、空間学習の向上が見られた。一方、8-OH-DPAT を投与すると、不安様行動の減少、うつ様行動の増加傾向が見られた。また、フルオキシセチンにより、P22 の内側前頭前皮質と腹側海馬の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体と腹側海馬の BDNF 発現量が増加した。これらの結果から、不安様行動は発達期の 5-HT<sub>1A</sub> 受容体を介していること、不安様行動とうつ様行動は別の脳内機構によることが示唆された。

### T5 ホルモン代替液 (N-Vinyl-2-Pyrrolidone ; NVP) 固定遺体の肉眼解剖所見

○灰塚嘉典<sup>1</sup>，松村譲児<sup>1</sup>，小林靖<sup>2</sup>，藤倉義久<sup>3</sup>  
杏林大学医学部解剖学教室（肉眼）<sup>1</sup>  
防衛医科大学校解剖学講座<sup>2</sup>  
大分大学医学部分子解剖学講座<sup>3</sup>

演者らは、ホルモリン (FA) 代替液として、親水性高分子モノマーである N-Vinyl-2-Pyrrolidone (以下 NVP) 溶液を遺体の注入固定に用い、種々の濃度における遺体の保存状態および解剖所見について比較検討を行っている。今回、解剖学実習において要求される遺体の硬化程度、柔軟性ならびに弾力性が保持される濃度を検討した。

NVP 最終体重換算濃度 5% 例では、全身が柔軟で弾力性に乏しく、関節の可動性も大きい。結合組織や靭帯は明瞭に識別され、関節構造の観察も容易であるが、内臓はきわめて軟弱で弾力性に乏しく、心臓も FA 固定例に比べて硬化度は低い。また、脳は自重で潰れるほどに脆弱である。

最終体重換算濃度 20% 例では、FA 固定例に比べて軟らかいが、結合組織には白色化と硬化が認められ、関節の可動性も制限される。内臓は 5% 例に比べて硬化を示すが、FA 固定例よりも柔軟で弾力性も保持される。

実習体として適度な柔軟性と硬化度を示す濃度を検索した結果、最終体重換算濃度約 10% 例が比較的良好であることが確認された。脳も適度な柔軟性と弾力性を示し、関節可動域の低下も比較的軽度であった。最終体重換算濃度約 10% の例について各部の解剖所見を提示する。

## T6 ラット慢性逆流性食道炎モデルの食道重層上皮における微細構造の変化についての検討

○小池 正人<sup>1</sup>、森 広樹<sup>2</sup>、後藤 隆洋<sup>3</sup>、市村 浩一郎<sup>4</sup>、浅岡 大介<sup>2</sup>、小黒 雅子<sup>2</sup>、永原 章仁<sup>2</sup>、上野 隆<sup>5</sup>、渡辺 純夫<sup>2</sup>、内山 安男<sup>1,6</sup>  
 順天堂大・院医・1 神経機能構造学、2 消化器内科学、4 解剖学・生体構造科学、5 研究基盤センター、6 神経疾患病態構造学、3 甲子園大学・栄養学部

我々は、ラット慢性逆流性食道炎モデルにおいて光顕レベルで局在変化を示す事が知られているタイトジャンクション(TJ)構成タンパク質 Claudin-3 について電顕レベルで詳細に検討したので報告する。

Asaoka らの方法によりラット慢性酸型逆流性食道炎モデルを作成し、単開腹のみの対照群とともに術後 14 日目に採取した剥離粘膜を浸漬固定し、EPON 樹脂包埋標本、徳安法のための凍結標本を作成した。凍結切断レプリカ法に際しては、組織の膨張によるレプリカ膜の破損を防止・DAPI 染色による目的部位の確認のため、グリッドマップ法を試みた。

純形態観察では、顆粒層に TJ 構造物を認め、食道炎群ではその数は減少していた。観察された TJ 構造物は単層円柱上皮のものより構造が単純であり、凍結切断レプリカ観察でも典型的な TJ ストランド構造を認めなかった。免疫電顕では、食道上皮細胞の表面に Claudin-3 陽性シグナルを認め、食道炎群での免疫反応性は低下していたが、両群ともに細胞膜上のびまん性な分布を示した。凍結超薄切片では細胞膜上の局在に加え、食道炎群では細胞内小胞構造への Claudin-3 の局在を認めた。

以上より、ラットの食道上皮において、Claudin-3 は傷害時の鋭敏なマーカーであるが、TJ 構造物の構成以外の機能に関与する可能性が示唆された。

## T7 長期間のメラトニン投与が骨粗鬆症モデルに及ぼす効果の検討

五十嵐-右高潤子<sup>1</sup>、平田和明<sup>1</sup>、服部淳彦<sup>2</sup>  
 聖マリアンナ医科大学解剖学講座<sup>1</sup>、東京医科歯科大学教養部生物<sup>2</sup>

骨を構成する骨芽・破骨細胞の分化や機能は、様々な局所因子やホルモンにより調節されている。松果体で産生され、体内時計の情報伝達や抗酸化作用を持つメラトニンは、加齢に伴い激減することから、加齢性の骨粗鬆症との関連性が示唆されている。そこで、自然加齢マウスを用いて、メラトニンの骨粗鬆症に対する効果について調べた。＜モデルマウス＞雄 BALB/c マウスを 4・10・20 ヶ月齢まで自然加齢させ、大腿骨を採取した。pQCT 法により、骨密度および骨強度の指標となるねじり強度を測定した所、全骨密度は骨幹・骨幹端ともに加齢に伴い有意に減少し、ねじり強度は骨幹端で有意に減少した。これらの結果から、マウスは加齢性の骨粗鬆症のモデルになり得ると考えられた。＜メラトニンの効果＞4 ヶ月齢より飲料水にメラトニン (100ug/ml) を溶解し、20 ヶ月齢で大腿骨を採取した。その結果、pQCT はメラトニン投与群の骨密度が骨幹端で有意に高く、ねじり強度は骨幹・骨幹端共に有意に強かった。また、切片による形態計測から骨量(BV/TV)はメラトニン投与群が対照群に対して 1.6 倍増加していた。以上から、4 ヶ月齢から 20 ヶ月齢までの長期メラトニン投与は骨強度・骨密度の低下を抑制、すなわち加齢性の骨粗鬆症の予防効果があると推察された。現在、作用機序の詳細を調べるため更なる骨形態計測、リアルタイム RT-PCR を行っている。

## T8 筋芽細胞重層化メカニズムに関する検討

芹川雅光、梅澤貴志、山根茂樹、山本将仁、松永智、阿部伸一  
 東京歯科大学解剖学講座

**目的** 頰粘膜などの広範な粘膜摘出後において、咀嚼・嚥下機能を回復させるためには、粘膜直下に存在する筋層を再構築させる必要がある。現在我々は上皮細胞シートと筋芽細胞シートの間に関業系細胞の層を挟んだより正常組織に近い三層構造の積層シートの作製に取り組んでいる。前回の日本解剖学会関東支部学術集会において関業系幹細胞とカラーゲンゲルは筋芽細胞の重層化に影響を与える可能性があることを報告した。今回は筋芽細胞の重層化のメカニズムの解明を目的として、重層化した筋芽細胞の増殖能について検討した。

**方法** 6 ウェルプレートインサート上に日本家兎口腔粘膜から分離した骨格筋筋芽細胞を播種したものを用意し、カラーゲンゲルの有無ならびに日本家兎より採取した関業系細胞との共培養の有無による影響について検討した。14 日間培養し、BrdU 取り込み試験も行った。回収した筋芽細胞シートは組織学的および DNA 細胞周期解析を行った。

**結果** 日本家兎由来骨格筋筋芽細胞は、関業系細胞、カラーゲンゲルと共培養することによって単独の培養で観察されなかった重層化が観察された。カラーゲンゲルとの共培養で観察された増殖能低下傾向は関業系細胞との共培養においては観察されなかった。

**結論** 骨格筋筋芽細胞の重層化のメカニズムについてはさらに容細な検討が必要であるが、関業系細胞は筋芽細胞の増殖能に影響を与えている可能性が考えられた。

## T9 糖尿病モデルマウスに対するヒト骨髄由来関業系幹細胞(hMSCs)の膵臓内投与による有用性の検討

村井謙允<sup>1,2</sup>・大滝博和<sup>1</sup>・渡邊潤一<sup>1</sup>・徐枝芳<sup>1</sup>・佐々木駿<sup>1</sup>・松本皆子<sup>1</sup>・泉崎雅彦<sup>2</sup>・塩田清二<sup>1</sup>

1 昭和大・医・解剖学・顕微解剖  
 2 昭和大・医・生理学・生体調節機能

糖尿病は、インスリンを産生する膵β細胞の破壊により高血糖状態をきたす疾患である。近年、糖尿病に対する治療戦略のひとつとして、ヒト骨髄由来関業系幹細胞(hMSCs)の細胞移植が試験されている。しかし、そのほとんどは静脈内投与(iv)による試験であり、一過性の血糖値改善効果は認められるが十分な有用性があるとはいえない。我々は、実験的糖尿病モデルを用い、hMSCsの膵臓内投与(ipan)がivより有用であることを見出したので報告する。マウスはストレプトゾトシン(115mg/kg)の腹腔内単回投与により糖尿病モデルを誘導した。7日後、hMSCs(1x10<sup>6</sup>)をipanもしくはivし、血糖推移を比較した。さらに、hMSCsは2回のipanを行い、長期的な血糖推移を観察した。糖尿病誘発56日後に血中インスリン濃度の定量および免疫染色による膵インスリン陽性細胞の検討を行った。hMSCsのivは一過性の血糖値の改善を認めたが、ipanの作用は持続した。hMSCsの2回のipanは漸次的な血糖値の改善を示した。56日後における、hMSCs投与群の血中インスリン濃度および膵インスリン陽性細胞は、対照群に比べ有意な改善を認めた。本結果は、hMSCsのipanが、ivに比べ有用な投与方法であり、膵インスリン産生能を改善することを明らかにした。hMSCsの作用機序に関しては現在検討中である。

## L1 スーパーエレクトロポレーターNEPA21(In Vitro&In Vivo 遺伝子導入装置)を用いた遺伝子改変ラット(マウス)の作製、培養細胞や動物個体への直接遺伝子導入法

松本 光二郎  
 ネッパジーン営業部

ネッパジーン社製スーパーエレクトロポレーターNEPA21 (In Vitro&In Vivo 遺伝子導入装置)は、4ステップ式エレクトロポレーション法を特徴とし、細胞膜に一過性の孔を開けるポアリングパルス、遺伝子を細胞内に運ぶトランスファーパルスを送ることが可能な高性能装置である。

「哺乳類の受精卵(前核期)で、透明帯未処理のもの」、「核酸分子種として、特定配列を有するRNA分子(ZFN・TALEN・CRISPER-Cas)」、「電気パルス条件が3ステップ式矩形波多重パルスを与える」ことで、遺伝子改変(ノックアウト、ノックイン)ラット・マウスの作製が可能である。

電極間に受精卵を設置し電気を出力する手法の為、実験に要する時間は数分である。その為マイクロインジェクションができる熟練者が不在の研究室でも、誰でも目的の遺伝子を改変した動物を、簡単に作製ができるハイスループットな手法である。また一度の実験で、50前後の受精卵へ特定のRNA分子を導入する事ができる。

更に4ステップ式エレクトロポレーション法を採用する事で、培養細胞へ高い水準の生存率・導入効率を得る事ができる。使用する溶液は増殖用培地で、消耗品はキューベットの電極のみである。その為ランニングコストが格段に抑えられる。

応用面では、付属の電極を取り付けると、In Vivo・In Utero・Ex Vivo・In Ovoの実験も1台で可能であり汎用性も備えている。本セミナーにて、機器概要と共に、今迄の実例を挙げ紹介する。

## L2 松浪硝子工業の製品紹介

横井 諒  
 松浪硝子工業株式会社 ライフサイエンス営業本部

細胞・組織・DNA・タンパクなど幅広いバイオの研究にお役に立てる消耗品・機器を御紹介致します。

- 【細胞(ライブイメージング)】
- ・ガラスボトムディッシュ/ハイドロ
- ・チャンバースライド/カバー
- ・ガラスボトムプレート
- ・丸カバーガラス
- ・顕微鏡用培養装置
- 【組織】
- ・組織切片剥離防止用プラチナプロコートスライドグラス
- ・マイクローム替刃
- ・スライドグラスフロスト印字機
- 【DNA・タンパク】
- ・DNA/タンパク/糖鎖糖各種アレイ用スライドグラス及び関連機器

その他特注品等消耗品から機器類まで幅広い商品を取り扱っております。

