

日本解剖学会

第90回近畿支部学術集会

会 期：平成26年11月29日（土）

会 場：大阪大学医学部保健学科 1 階第 1 講義室

1 細胞骨格制御因子 GrinchGEF の細胞内局在と機能の解析

原 崇之¹、柴田理志²、辻智波²、山川朋世²、古郷幹彦¹、稲垣忍²¹大阪大学大学院 歯学研究科 顎口腔疾患制御学講座、²同・医学系研究科 生体情報科学講座神経生物学

G タンパク質はGuanineヌクレオチド結合タンパク質の略称で三量体Gタンパク質と低分子量Gタンパク質に分類される。さらに低分子量Gタンパク質はRho、Rab、Ras、Ran、Arfと各サブファミリーへと分類され、細胞増殖や分化、細胞骨格形成、細胞内物質輸送等の制御、調節に関与していると考えられている。Gタンパク質の多様な機能制御への関連から、その異常は多岐にわたる疾病を引き起こし、特に細胞運動の異常は種々のがん細胞における浸潤、転移に関与していると考えられている。また、低分子量Gタンパク質サブファミリーにおいて細胞骨格を制御しているRhoファミリーは細胞形態形成、細胞運動等を調節している。そのシグナル伝達、RhoがGTP交換因子であるGEFにより細胞内作用部位で活性型へと変換されることから生じるため、細胞の特異的な動向を考える上でGEFの細胞内局在および機能を明らかにする事が重要となる。先行研究においてRhoに対するGEFであるARHGEF10が分泌小胞に局在し機能している事は明らかにされているが、ARHGEF10の類似体であるGrinchGEFの機能は知られていない。そこで今回GrinchGEFの機能を明らかにするために、上皮系腫瘍細胞由来であるHeLa細胞、MDA-MB-231細胞を用い細胞内局在および機能解析を行った。

2 膵外分泌・内分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能

國井政孝、原田彰宏
大阪大学医学系研究科細胞生物学

膵腺房細胞で合成された消化酵素やβ細胞内で合成されたインスリンはトランスゴルジネットワークから出芽した分泌顆粒によって細胞膜へと輸送され、細胞外へ分泌される。この分泌顆粒と細胞膜の融合はsoluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)と呼ばれる分子群によって調節されている。細胞膜に局在するtarget-SNARE分子の1つであるSNAP23は様々な組織・細胞において分泌顆粒の膜融合に必須であると考えられているが、膵外分泌・内分泌における役割は未だ不明である。本研究ではSNAP23の機能解明のため、SNAP23の膵外分泌腺特異的ノックアウトマウスおよび内分泌腺特異的ノックアウトマウスを作製した。その結果、膵外分泌腺特異的ノックアウトマウスではコレシストキニン刺激によるチモゲン顆粒分泌の減少が認められた。一方、膵内分泌腺特異的ノックアウトマウスではグルコース刺激によるインスリン分泌が増加し血糖値の上昇が抑制されるという表現型が観察された。現在、その分子機構解明に向けた解析を進めており、本会ではこれまでに得られた知見を紹介したい。

3 一次繊毛形成に関わる Rab GTPase の機能解析

岩野智彦（大阪大学医学系研究科細胞生物学教室）
岩野智彦〇、佐藤隆史、國井政孝、吉村信一郎、原田彰宏

体内の多くの細胞の有する一次繊毛は、外来の成長因子や物理的刺激のシグナル受容のアンテナとして器官発生や細胞増殖制御などに重要な役割を果たすことが知られている。一次繊毛を形成する上で脂質膜の供給が必要であり、そのために膜輸送関連タンパク質であるRab GTPaseが機能すると考えられている。

我々は、上皮極性輸送に重要な役割を果たすことが知られるRab8とその近縁分子Rab10に着目し、一次繊毛形成や生体での繊毛機能の解析を行っている。培養細胞ではRab8は一次繊毛長の制御をしているとすでに知られていたが、我々の作成したRab8ノックアウトマウスやMEFにおいては一次繊毛形成やその長さには顕著な異常が観察されなかった。一方、Rab8と同時にRab10の発現抑制をMEFで行うと、一次繊毛形成が阻害された。それらのことから一次繊毛形成においてRab8とRab10は相補的に働くことが示唆された。

4 新規 Rab8 結合タンパク質が上皮極性輸送に果たす役割

吉村信一郎、原田彰宏
大阪大学・医学系研究科・細胞生物学

Rab8は上皮極性輸送に関与す低分子量Gタンパク質で、Rab8欠損マウスの小腸上皮細胞内において頂端面タンパク質の誤輸送されることが明らかになっている。我々はRab8に結合する新規タンパク質を酵母ツーハイブリッド法にて同定し、さらにGST-pull down法にて新規結合タンパク質複合体を同定した。さらにそれらが小腸上皮細胞内にてRab8と共に頂端面輸送を制御していることを明らかにした。

5 肝細胞癌組織における delta-like3 のメチル化

水野 諭良、前村 憲太朗、平田あずみ、田中 義久、大槻 勝紀
大阪医科大学医学部生命科学講座 解剖学教室

（背景）肝細胞癌は、C型肝炎や肝硬変を母地として、geneticな変化ばかりでなくゲノムワイドな低メチル化やプロモーター領域の局所的な高メチル化などのEpigeneticな異常が蓄積して発生する。Notch受容体のligandの1つであるdelta-like3 (DLL3)は、網羅的なゲノム解析により、肝臓癌において癌組織特異的にメチル化を起している候補遺伝子の一つとして単離された。（目的）肝臓癌細胞におけるDLL3の遺伝子メチル化・機能および肝臓癌における発現を調べた。（方法と結果）DLL3遺伝子のメチル化をMethylation-specific PCR (MSP)にて検出した結果、10種類の肝臓癌細胞株のうち少なくとも4種類の細胞株で遺伝子メチル化が検出された。Huh2細胞を使用したバイサルファイトシークエンスの結果、DLL3プロモーター領域のCpGアイランドの高度なメチル化を検出し、細胞の脱メチル化剤処理によりDLL3のreactivationが確認できた。さらに、Huh2細胞にDLL3を遺伝子導入で強制発現させると細胞死が誘導された。また、肝臓のTissue Arrayを用いた免疫染色において、肝臓癌組織では背景肝組織に比してDLL3発現抑制が見られた。（結論）肝臓癌におけるDLL3発現のサイレンシングは、DNAメチル化を介しておこり肝細胞癌発育に影響を及ぼしていると推測された。

6

単球/マクロファージの ephrin-A1 発現ノックダウンが血管内皮細胞層通過に及ぼす影響

佐伯法学, 小川和重
大阪府立大学 生命環境 獣医解剖

Eph レセプターとそのリガンド ephrin は細胞の接着・遊走を制御する膜タンパクである。我々は、「EphA/ephrin-A シグナルは単球/マクロファージ(Mφ)の血管内皮細胞(EC)層通過経路の形成を制御する」と仮説を立て、EphA2 と ephrin-A1 を主な対象分子に定め仮説の検証を進めている。これまでに①単球/Mφ の ephrin-A シグナルは運動性を上昇させること、②単球/Mφ の EphA/ephrin-A シグナルは突起形成を誘導すること、③EC の EphA シグナルは細胞間隙の拡大と細胞質の陥凹形成を誘導することを明らかにしてきた。本研究では、単球/Mφ と EC の共培養系で、単球/Mφ の ephrin-A1 シグナルが EC 層通過を制御するか検討した。単球/Mφ 株 J774.1 を材料に shRNA を用いて ephrin-A1 発現をノックダウンさせた安定株 (efn-A1-KD-J774.1; GFP 発現) を作製した。対照として空ベクターを遺伝子導入した安定株(GFP-J774.1; GFP 発現)を作製した。コンフルエント状態の EC 上に efn-A1-KD-J774.1 を播種し、Time-lapse・蛍光観察するとともに EC 層を通過した GFP 標識細胞の頻度を計測した。対照株と比べて efn-A1-KD-J774.1 では EC 層を通過する割合が減少した。また、アクチン蛍光染色により、EphA2-Fc コート基質上の efn-A1-KD-J774.1 は対照株と比較して filopodia が減少していた。以上の結果から、単球/Mφ の ephrin-A1 シグナルは突起の形成制御を介した血管内皮細胞層通過制御に深く関与することが示唆された。

7

脾臓の EphA2 と ephrin-A1 発現はクロドロン酸内包リボソーム投与による赤碑髄マクロファージの選択的除去により有意に上昇する。

誉田尚子, 佐伯法学, 小川和重
大阪府立大学 生命環境 獣医解剖

我々は、単球/マクロファージ(MΦ)と血管内皮細胞に発現する EphA2 と ephrin-A1 の働きを細胞接着と内皮細胞層通過機構の観点から調べている。近年、血液循環量以上の単球が脾臓に存在し、心筋梗塞など急性傷害時に動員されることが報告された。以上の点から、「脾臓の単球/MΦ の動態に EphA2/ephrin-A1 シグナルが関与する」と仮説を立て、研究を進めている。クロドロン酸内包 (CL 群) およびコントロールリボソーム (対照群) を腹腔投与した Balb/c 雄マウスの脾臓を材料に、RT-PCR により EphA2 と ephrin-A1 の発現強度を比較した。各種マーカー (CD144, 血管内皮細胞; F4/80, 赤脾髄 MΦ; ER-TR7, 細網細胞) に対する抗体で免疫蛍光 2 重染色を行い、CL 投与による EphA2 および ephrin-A1 の発現と局在の変化を検討した。その結果、EphA2 および ephrin-A1 の mRNA 発現は、対照群と比べ CL 群で有意に上昇していることが判明した。EphA2 は脾洞と赤脾髄細網細胞に、ephrin-A1 は脾洞と辺縁帯の血管内皮細胞に比較的強く発現していた。F4/80 陽性細胞が著しく減少した CL 群では、対照群と比べ赤脾髄細網細胞における EphA2 発現の蛍光強度が上昇していた。赤脾髄細網細胞はケモカインを分泌して MΦ を誘引し、接着分子 ICAM-1 を介して接着・保持すること、EphA2 は ICAM-1 発現をアップレギュレートすることが報告されている。CL 群で細網細胞の EphA2 発現が上昇したことから、この機能に EphA2 が関与している可能性が示唆された。

8

各種器官の重層扁平上皮における ephrin-B1, EphB2 発現パターンの比較・検討

小原有加里, 小川和重
大阪府立大学 生命環境 獣医解剖

Eph と ephrin は形態形成に深く関与する膜タンパクである。EphAs と ephrin-As が表皮ケラチノサイトの接着、遊走、分化・増殖を制御することが明らかになっているが、EphBs と ephrin-Bs に関する報告はほとんど見当たらない。我々はこれまでに、齧歯類の胃無腺部の重層扁平上皮に ephrin-B1 と EphB2 が発現することを明らかにしてきた。本研究では、各種器官の重層扁平上皮におけるこれら分子の発現パターンを比較・検討した。7-8 週齢の ICR 雄マウスを用い口唇、舌、食道、胃無腺部、肛門、手掌、足底など粘膜と皮膚における ephrin-B1 と EphB2 発現を RT-PCR と免疫蛍光染色により比較・検討した。検討した全ての器官において、ephrin-B、EphB すべてのサブクラスの mRNA の発現が明らかになった。免疫蛍光染色により、①ephrin-B1 は皮膚・粘膜の重層扁平上皮の基底層と有棘層のケラチノサイトに発現すること、②手掌・足底において、ephrin-B1 は真皮乳頭の発達した表皮の厚い領域に強く発現すること、③舌背において、真皮乳頭の頂部に接し Ki67 陰性となる基底層のケラチノサイトに ephrin-B1 は強く発現すること、④EphB2 は舌や食道など粘膜の重層扁平上皮では明確な局在が認められたが、表皮の発現は不明瞭であることが判明した。これらの結果から、舌背において重層扁平上皮の形状に対応した特徴的な ephrin-B1 の発現パターンが認められること、EphB2 の発現パターンは皮膚と粘膜でやや異なることが明らかとなった。

9

ストレス応答機構に対する抑肝散の効果

清水尚子¹、○宮田信吾¹、田中貴士¹、松村彬世¹、川上あゆみ¹、武田卓²、遠山正彌¹
¹近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門
²近畿大学 東洋医学研究所 女性医学部門
うつ病をはじめとする精神疾患の発症には様々なストレス等の環境要因が大きく関与することが知られている。すなわち、ストレス応答系である視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA axis) が繰り返し受けるストレス等により過剰に刺激され続けることで調節不全に至り、うつ病などの精神疾患が発症するというストレス仮説が以前から想定されている。しかし、その分子機序や脳の機能的変化はこれまでに明らかにされていないのが現状である。我々は、抑肝散の行動心理学的症状(BPSD)への効果に注目した。抑肝散がストレス応答系に関与するか否かについて HPA axis 活性化を指標に検討したところ、抑肝散前処理ストレス群で血中のコルチコステロン量上昇を有意に抑制した。この結果は、抑肝散が HPA axis の正常化に関与する可能性を示唆していた。この HPA axis の調節系の一つとして、海馬や視床下部等に発現するグルココルチコイド受容体(GR)の発現量変化が知られている。そこで我々は更に、抑肝散がストレス応答時の GR の発現調節に関与するか否かについて検討を加えた。さらに、線維束オリゴデンドロサイトにおいても検討したところ、GR mRNA 量調節そのものには抑肝散の関与が認められなかったが、転写後調節機構への抑肝散の関与の可能性を見出したので報告させて頂く。

10

運動による海馬神経新生の増大や抗うつ効果には 5-HT3 受容体が必須である

近藤 誠
大阪大学大学院医学系研究科 神経細胞生物学講座

Exercise has a variety of beneficial effects on brain structure and function, such as hippocampal neurogenesis, mood and memory. Previous studies have shown that exercise enhances hippocampal neurogenesis, induces antidepressant effects, and improves learning behavior. Brain serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) levels increase following exercise, and the 5-HT system has been suggested to play an important role in these exercise-induced neuronal effects. However, the precise mechanism remains unclear. In this study, analysis of the 5-HT type 3A receptor subunit-deficient (*htr3a^{-/-}*) mice revealed that lack of the 5-HT type 3 (5-HT₃) receptor resulted in loss of exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects, but not of learning enhancement. Furthermore, stimulation of the 5-HT₃ receptor promoted neurogenesis. These findings demonstrate that the 5-HT₃ receptor is the critical target of 5-HT action in the brain following exercise, and is indispensable for hippocampal neurogenesis and antidepressant effects induced by exercise. This is the first report of a pivotal 5-HT receptor subtype that plays a fundamental role in exercise-induced morphological changes and psychological effects.

11

成体マウスの下垂体後葉における血管新生

古部瑛莉子¹、萬成哲也¹、森田晶子^{1,2}、宮田清司¹
¹京都工芸繊維大学大学院応用生物学専攻
²奈良県立医科大学第二解剖学講座

下垂体後葉系は、神経終末から血中に Vasopressin (AVP) と Oxytocin (OXT) を分泌することにより体液の浸透圧恒常性や授乳を調節している。成体哺乳類の下垂体後葉では、慢性的生理刺激により、神経-血管や神経-グリアの再構築が起きるが、血管のダイナミクスに関する報告はない。本研究の目的は、成体マウスの下垂体後葉で、持続的な血管新生により神経終末と血管の再構築が起きることを明らかにすることである。BrdU や Ki-67 の免疫組織化学により、内皮細胞が活発に増殖していることが明らかになった。血管内皮細胞増殖因子 A (VEGFA) が pituicytes、VEGF 受容体 2 が内皮細胞に強く発現していた。また、血小板由来成長因子 B (PDGFB) が OXT 含有神経終末、PDGF 受容体 B がペリサイトに発現していた。VEGF 受容体のチロシンキナーゼ阻害剤 AZD2171 あるいは PDGF 受容体のチロシンキナーゼ阻害剤 STI571 の投与は内皮細胞の増殖を顕著に抑えた。さらに、AZD2171 投与により内皮細胞のアポトーシスが増加し血管密度が減少したが、投与を止めると内皮細胞は急速に増殖し、血管密度は通常レベルに回復した。AZD2171 投与は、AVP と OXT 含有神経終末の密度を減少させたが、STI571 は AVP 含有神経終末密度のみ選択的に減少させた。本研究より、成長因子依存のダイナミックな血管構造の再構築が下垂体後葉で起きている事が明らかになった。これは、従来変化がないと考えられてきた血管系が血管新生によりダイナミックな構造変化を起こし、神経分泌と関連していることを示している。

12 CF#1 系由来遺伝性水晶体破裂マウスに関する研究

○徳原顕泰、中森健人、長井寛明、武下愛、三野将城、近藤友宏、岡田利也
大阪府立大学生命環境科学研究科実験動物学教室

【背景と目的】CF#1 系由来遺伝性水晶体破裂マウス (CF#1/r マウス) は白内障のひとつのタイプである水晶体破裂型に分類される。その遺伝様式は常染色体劣性で、原因遺伝子が 3 番染色体上の D3Mit79～D3Mit216 の 2.4 cM の領域に存在することがわかっている。本研究では肉眼的発症および組織学的変化の特徴ならびに原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。【材料および方法】①発症様式：CF#1/r マウス 123 匹 (雌 63 匹、雄 60 匹) について、開眼時期である 2 週齢より 21 週齢まで週 2 回、眼球を肉眼的に観察し、水晶体の混濁が認められた日を発症日とした。②組織学的変化：水晶体の混濁が点状 (pinhead) に出現し、その後、混濁が大きな点 (large)、真っ白 (white) になったことから、pinhead～white までの眼球の組織切片を作製した。③原因遺伝子：D3Mit79～D3Mit216 の領域に存在する候補遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて調べ、変化の見られた遺伝子のシークエンス解析を行った。【結果および考察】①生後 3 週齢から 11 週齢で多くの発症個体が出現し、6 週齢前後で発症する個体が多かった。②組織学的観察によって、先ず水晶体繊維の膨化が、続いて水晶体上皮の空洞化が引き起こされ、その後水晶体皮質の空洞化と水晶体核の脱落が引き起こされることがわかった。③qRT-PCR 法による解析において Bcar3 の有意な減少が認められた。さらに、シークエンス解析によって 1 塩基の挿入変異が Bcar3 遺伝子に新たな終止コドン形成していることがわかった。

13 Kifl4 KO マウスと Kifl4Tg レスキューマウス脳の形態

○寺島俊雄¹⁾、薛富義¹⁾、Junaedy Yunu¹⁾、勾坂敏朗²⁾
神戸大学・院・医学研究科¹⁾神経発生学、²⁾膜動態学

ラガードマウス laggard mouse (遺伝子記号: lag) は常染色体劣性遺伝性の自然発症性ミュータントマウスで、平板な顔面頭蓋と振戦・失調性歩行など小脳性運動失調を特徴とし、生後 2 週間内外で死亡する。ラガードの脳は髄鞘の低形成、小脳・嗅球・海馬の細胞構築異常を特徴とする。我々はラガードの原因遺伝子がキネシン・スーパーファミリーに属する Kifl4 遺伝子の異常であることを突き止めたが、Kifl4 ノックアウト (KO) マウスを作成し、その脳の細胞構築を調べたところ、上記のラガードマウスホモ個体のフェノタイプと区別することができなかった。次に野生型 Kifl4 トランスジェンを導入した Kifl4 トランスジェニック (Tg) マウスを 3 系統作成し、ラガードホモマウス (lag/lag) と交配したところ、ヘテロマウスのフェノタイプは正常化した (レスキュー実験)。以上より自然発症性ミュータントマウス・ラガードの原因遺伝子が KIFL4 であることが確認できた。これらの結果は、Kifl4 がオリゴデンドログリアによる髄鞘形成、嗅球や海馬、小脳における細胞分裂や移動に関与することを示唆する。

14 質量顕微鏡で髄鞘脂質をみる！
—— 04 モノクローナル抗体が認識する物質の本体 ——

平原幸恵、山田久夫
関西医科大学・解剖学第一講座

中枢神経においてミエリン鞘は、オリゴデンドロサイト (OL) により構築される。04 モノクローナル抗体は、胎生期 OL 前駆体細胞から生後の髄鞘形成に至るまでの OL 分化・成熟過程を認識する分化マーカーとして知られている。この認識部位に関しては、生化学的解析から、硫酸化糖脂質、スルファチドであることが決定されている。ただし、OL 前駆体細胞では、スルファチド合成が確認されないため、このステージの 04 認識抗原は、スルファチド以外のものである可能性が考えられてきた。一方で、スルファチドを合成する酵素セレブリン硫酸基転移酵素 (CST) を欠損するマウス脳では、スルファチドは合成されないと共に 04 陽性細胞も出現しない。従って、OL 前駆体細胞の 04 認識抗原に関して 2 つの仮説が考えられる。一つは、胎生期 OL 前駆体細胞では、スルファチドは合成されず、04 は別の物質を認識する。その物質は、CST により合成されるが、CST には硫酸基を転移するもう一つの基質が存在する。2 つめは、胎生期 OL 前駆体細胞のスルファチド含有量が少なく、今まで捉えられていない。そこで、本研究は、組織切片中の脂質分布密度を 10 マイクロメートルピッチの解像度で検出できる質量顕微鏡を使って、これらの仮説を検証した。結果は、OL 前駆体細胞においてスルファチドが検出された。ただし、ミエリン鞘で豊富な長い脂肪酸 (C24) をもったスルファチドではなく、短い脂肪酸 (C18) をもったスルファチドであった。OL 前駆体細胞の 04 認識抗原は、脂肪酸の短いスルファチドであることが明らかとなった。従来の生化学的手法による解析に、この脂肪酸の長さが影響していたのかは不明であるが、質量顕微鏡の技術を使うことにより、検出以下であったスルファチドを捉えることができたと考えられる。

15 霊長類における下腿筋の機能差—位置的行動との関係—

後藤達佑、熊倉博雄
大阪大学大学院人間科学研究科生物人類学研究分野

霊長類の足部の形態はなぜ変異に富むのだろうか。懸垂や跳躍に適応した霊長類は、四足歩行を主たるロコモーション様式とする霊長類の足部とは明らかに異なるかたちの足部を持つ。このことから、霊長類の足部は位置的行動を反映して豊かな形態変異で特徴づけられるようになったことは自明である。しかしながら、実際には変異の間に存在する機能差については不明な点が多い。本研究では、変異間の機能差を明らかにすることを目的として、足部に停止する下腿筋の力学的性質に注目した。広範な系統的位置を占め、特徴的な位置的行動を行う 10 種霊長類 (計 31 個体) の下腿筋の三次元配置を数量化し、特にヒラメ筋と前脛骨筋の力学的性質を評価した。その結果、筋の力学的性質の指標であるメカニカルアドバンテージから、懸垂型もしくは跳躍型霊長類の下腿筋は四足歩行を行う霊長類とは異なる力学的性質を持つことが示された。発表では霊長類における位置的行動と下腿筋の機能の関係について考察する。

16 皮質脊髄路側枝形成に関与する受容体分子の探索と解析

○猪口徳一¹⁾、尾身 実²⁾、岡 雄一郎¹⁾、森 泰丈¹⁾、佐藤 真^{1,3,4)}

¹⁾ 大阪大学大学院医学系研究科解剖学講座 (神経機能形態学)、²⁾ 福井大学医学部形態機能医科学講座組織細胞形態学神経科学領域、³⁾ 大阪大学大学院連合小児発達学研究科 こころの発達神経科学講座、⁴⁾ 福井大学子どものこころの発達研究センター

大脳から脊髄へと長い軸索を伸ばす皮質脊髄路はその途中で複数の神経核に「軸索側枝」を伸ばす。「軸索側枝」は脊髄への出力と同時に複数の神経核に信号を送ることで、脳全体としての神経活動の協調性を実現する。過去の報告より、側枝伸長の標的である神経核より何らかの誘導因子が出ていることが示唆されているが、実際の脳内で側枝形成が誘導される分子実態については多くが不明である。我々はこれまでにアレイ解析から側枝形成が始まる時期にその標的脳領域 (橋核・上丘など) で発現の高いリガンド候補因子を得ている。今回、それら独自に得たリガンド候補因子に加えて、公共データベース解析で得たものに対してその受容体を探索し、105 の受容体候補分子を得た。そして、皮質脊髄路側枝形成への関与を調べるため、各受容体に対してノックダウンベクタープールを用いて、皮質脊髄路起始細胞である大脳皮質 5 層神経細胞で網羅的なノックダウンを行った。その結果、橋核への側枝が阻害される分子が 10、促進される分子が 4 つ得られた。ノックダウンによって側枝形成に影響を与えた受容体の中には大脳皮質領域特異的な発現様式を示すものが含まれており、領野特異的な軸索側枝の刈り込みや投射パターン制御への関与が示唆された。

17 ラット大脳皮質一次体性感覚野から三叉神経運動前ニューロンへの直接投射と顎運動との関連

○内野勝郎、東山景一朗、加藤隆史、佐藤文彦、武田理恵子、大原春香、堤香奈子、吉田篤
大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学講座

【背景と目的】大脳皮質一次体性感覚野 (S1) の吻側部から、開口筋運動前ニューロンと閉口筋運動前ニューロンが混在する三叉神経傍域 (Vjuxt) と三叉神経吻側核 (Vo) に直接投射が存在することを既に報告している (Yoshida et al., 2009, J Comp Neurol)。この下行性投射の顎運動への関与を明らかにするため、S1 の電気刺激で顎運動を誘発する部位を同定し、下行投射との関連を検討した。【方法】ラットを用い、塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの筋注による麻酔下で行った。ガラス被覆したエルゾロイ単極電極を S1 に刺入し、高頻度短刺激と低頻度長刺激を与えた。顎運動誘発部位と Vjuxt と Vo への投射部位とを比較検討した。【結果】S1 吻側部の低頻度長刺激で、持続性の開口が誘発され、両側の顎二腹筋前腹から EMG 活動が記録された。刺激閾値の低い部位が S1 の最吻側部に認められた。これらの刺激部位は、高頻度短刺激によって開口と少なくとも反対側の顎二腹筋前腹からの EMG 活動が記録された部位と近似していた。【考察】ラットの S1 吻側部には Vjuxt と Vo に投射するニューロンが多数存在し、また、Vjuxt に投射するニューロンは S1 最吻側部に特に多く存在することは既に報告している (Yoshida et al., 2009, J Comp Neurol)。よって、ラット S1 吻側部の高頻度短刺激ばかりでなく低頻度長刺激で顎運動が誘発されるという本研究結果は、この顎運動の誘発には、Vjuxt と Vo への投射が関与し、特に Vjuxt への投射がより強く関与していることを示唆している。

18 Three Types of Thalamocortical Projections from the Rat Lateral Posterior Thalamic Nucleus: A Single Neuron-Tracing Study Using Viral Vectors

○中村 悠、日置 寛之、古田 貴寛、金子 武嗣
京都大学・医学研究科・高次脳形態学

The lateral posterior thalamic nucleus (LP) is one of the components of the extrageniculate pathway in the rat visual system, and cytoarchitecturally divided into three subdivisions, lateral (LPl), rostromedial (LPm) and caudomedial portions (LPcm). To clarify the differences in the axonal arborizations among the three subdivisions, we applied a single neuron labeling technique with viral vectors to LP neurons. LPl, LPm and LPcm were different from one another in terms of the projection targets: the main target cortical regions of LPl and LPm neurons were the secondary and primary visual areas, whereas those of LPcm neurons were the postthral and temporal association areas. Furthermore, the principal target cortical layers of LPl neurons in the visual areas were middle layers, but that of LPm neurons was layer I. This indicates that LPl and LPm neurons can be categorized into the core- and matrix-types of thalamic neurons in the visual areas, respectively. In addition, LPl neurons formed multiple axonal clusters within the visual areas, whereas the fibers of LPm neurons were widely and diffusely distributed. It is therefore presumed that these two types of neurons play different roles in visual information processing by dual thalamocortical innervation of the visual areas.

19 レム睡眠における錐体路連続電気刺激に対する開口筋の応答特性

東山亮*、加藤隆史*、Haque Tashnuf*、佐藤文彦*、矢野博之*、吉田篤*
大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学講座*

【背景と目的】ヒトや動物のレム睡眠では顎筋の単収縮 (twitch) やリズムカルな顎運動が発生することが報告されている (Kato et al. J Appl Physiol 2013)。しかし、レム睡眠中に顎筋運動ニューロンへ興奮性入力を出力する神経機構の特性は明らかではない。本実験では錐体路電気刺激によって顎筋活動を誘発する実験モデルを用いて、レム睡眠における開口筋の応答特性を調べた。【方法】全身麻酔下にてモルモットに手術を施し、脳波、眼電図、心電図、筋電図 (顎筋・咬筋・顎二腹筋) を測定する電極を設置した。また、刺激電極をリズムカルな顎二腹筋活動を誘発できる錐体路内に留置した。その後、自由行動下で短時間連続刺激 (300 μsec, 3 発, 500 Hz) と長時間連続刺激 (200 μsec, 2 s, 30 Hz) を与え、顎二腹筋の応答を記録した。【結果】短時間連続刺激では、レム睡眠で顎二腹筋に短潜時応答を誘発できたが、覚醒・ノンレム睡眠と比較すると、その誘発率は約 3 分の 1 で、振幅は小さかった。また、長時間連続刺激でもレム睡眠で顎二腹筋にリズムカルな活動を誘発できたが、その誘発率は覚醒・ノンレム睡眠の約 6 分の 1 であった。【考察】レム睡眠では運動ニューロンが抑制されているが、錐体路を介して前運動ニューロンや顎運動リズム発生機構から出力される興奮性入力が顎二腹筋運動ニューロンを興奮させる可能性が示唆された。

20 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD2B の脳における機能解析

藤原慧、藤田幸、山下俊英

〈目的〉ヒストン脱メチル化酵素 JMJD2B は哺乳類の脳で高い発現を示すが、その機能に関しては不明である。本研究では JMJD2B の脳における機能を明らかにすることを目的とする。

〈方法〉胎生期から成体に至るマウスの脳切片を用いて、JMJD2B の発現分布を in situ hybridization 法で検証した。さらに JMJD2B を神経細胞特異的にノックアウトしたマウスを作製し解析を行った。

〈結論〉JMJD2B は周産期の大脳皮質および成体の海馬で高い発現を示した。また JMJD2B ノックアウトマウスでは多動傾向が認められ、海馬において AMPA 受容体サブユニットの一つである GluR2 の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。さらにノックアウトマウスでは、組織学的に未熟な構造のスパインが増加していることも明らかとなった。

〈結論〉ヒストン脱メチル化酵素 JMJD2B は海馬の GluR2 発現上昇を介して、行動を制御する役割を果たす可能性が示唆された。

21 プロキネチシン受容体 2 欠損マウスの嗅球における傍糸球体細胞の局在

長野護、久保厚子、重吉康史

近畿大学医学部解剖学

プロキネチシン受容体2欠損 (*Pkr2*^{-/-}) マウスにおいては嗅球が縮小しており、糸球体層の欠損、顆粒細胞層の狭小化を伴う嗅球形成異常が観察される。この *Pkr2*^{-/-} マウス嗅球の形成異常は、嗅神経軸索の嗅球への進入障害や嗅球の介在ニューロンの1つである顆粒細胞の遊走障害によって生じる。嗅球の介在ニューロンは、側脳室の脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) から吻側移動経路 (rostral migratory stream: RMS) を介して常に供給され続けている。そこで、プロキネチシン受容体2が、すべての介在ニューロンの細胞遊走に関与するかを明らかにしたいと考えた。そこで、介在ニューロンのもう1つのタイプである傍糸球体細胞 (periglomerular cell: PGC) (calretinin (CR), calbindin (CB), ドーパ脱炭酸酵素 (DDC), チロシン酸化酵素 (TH) 産生ニューロン) の主嗅球への移動に対する影響について免疫組織染色を用いて検討を行った。その結果、*Pkr2*^{-/-} マウスの嗅球の辺縁部領域 (野生型マウス嗅球における糸球体層に相当する領域) において、これらの傍糸球体細胞は観察された。また、CR、CB陽性細胞数には、顕著な変化は認められなかった。一方、DDC陽性細胞数の減少が見られたが、TH 陽性細胞においてはさらなる顕著な陽性細胞数の減少が認められた。これらの所見が、軸索進入の障害によるものか、細胞遊走の障害によるものか現在検討中である。

22 Functional significance of the phase wave in the SCN

Yasufumi Shigeyoshi
Department of Anatomy and Neurobiology Kindai University Faculty of Medicine

The suprachiasmatic nucleus (SCN) is the mammalian circadian rhythm center. Individual oscillating neurons have different endogenous circadian periods, but they are usually synchronized by an intercellular coupling mechanism. Recently, we have reported the clustering of oscillators with similar periods (Koinuma et al. E. J. N. 2013). We artificially disrupted the intercellular coupling among oscillating neurons in the SCN and observed regional differences in the periods of the oscillating small-latticed regions of the SCN using a transgenic rat carrying a luciferase reporter gene driven by regulatory elements from a *Per2* clock gene (*Per2::luc*). The analysis divided the SCN into two regions—a region with periods shorter than 24 h (short-period region, SPR) and another with periods longer than 24 h (long-period region, LPR). The SPR was located in the smaller medial region of the dorsal SCN, whereas the LPR occupied the remaining larger region. Interestingly, the SPR corresponded well with the region where the SCN phase wave is generated. What is the significance of the periodically different oscillators and phase propagation that keeps gradual phase difference within the SCN? One possible explanation is that the phase wave keeps the day length without disrupting the coherence among oscillators. By utilizing in situ hybridization technique, we found two clusters altering phase difference dependent on the length of light period in the SCN. The finding suggests that the SCN recognizes day-length by two circadian oscillators with period difference and that the two oscillators are what has been known as morning and evening oscillators.

23 線条体 FoxO1 の細胞内局在変化に関与するドーパミン受容体の同定

安永雅行¹、森口大輔¹、紀戸恵介¹、稲垣忍¹、古山達雄² (大阪大学大学院・医学系研究科・保健学専攻・神経生物学研究室、²香川県立保健医療大学)

FoxO(Forkhead box O)転写因子は4つのサブタイプから構成される転写因子で、肝臓や骨格筋、脂肪、脳などに発現している。また、FoxOは細胞質から核内へと移行し標的遺伝子の転写活性を上昇することで、アポトーシスや細胞分裂、糖代謝など様々な生理機能に関与することが知られている。

FoxO1は脳内において線条体に強く発現しているが、生理機能や調節因子については不明のままである。線条体は中脳黒質から投射されるドーパミン神経により修飾を受けている。従って我々は、ドーパミン関連薬剤をICRマウスに投与し、線条体FoxO1の細胞内局在を観察することにした。

線条体FoxO1は、シナプス間のドーパミン濃度を上昇させるメタンフェタミンによって有意に核内へと移行した。一方、メタンフェタミンの投与前にドーパミン受容体タイプ1(D1R)のアнтаゴニストであるSCH23390またはドーパミン受容体タイプ2(D2R)のアнтаゴニストであるハロペリドールで前処理することで線条体FoxO1の核内移行は抑制された。また、D1RアゴニストのA68930、D2Rアゴニストのキンピロールをそれぞれ単独投与した場合は線条体FoxO1の局在に影響を与えなかったが、同時に投与することでFoxO1が核内へ移行することが確認された。以上の結果から、線条体FoxO1の核内移行にはD1RとD2Rの活性化が必要であることが示唆された。