

日本解剖学会

第60回東北・北海道連合支部学術集会

会 期：平成26年9月6日（土）、7日（日）
会 場：福島学院大学福島駅前キャンパス

特別講演

一酵素ファミリーから見た生命現象：脂質性二次メッセンジャー代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) の機能解析

後藤 薫・山形大学医学部解剖学第二講座

生体膜脂質の微量成分であるイノシトールリン脂質の代謝過程において産生されるジアシルグリセロール (DG) は、細胞内二次メッセンジャーとして作用することが知られている。DG キナーゼ (DGK) による DG のリン酸化は、全細胞に普遍的に存在する酵素反応であるが、我々はこれまで DGK の遺伝子クローニングによる分子多様性の発見から発現局在解析、また種々の病態における各アイソザイムの機能的役割の解明に取り組んできた。DGK β は脳内においてドーパミン D1 および D2 受容体を含有する線条体投射ニューロンのシナプス周辺部に局在し、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5 および DG 産生酵素 PLC β 1 に近接する。初代培養ニューロンを用いた遺伝子導入実験では、酵素活性依存的に棘突起形成を制御することが明らかになりまた、DGK β -KO マウス線条体の解析では、線条体ニューロンの連位樹状突起における棘突起数の減少が認められた。DGK ζ は核移行シグナルを持ち、一過性虚血ストレス時の NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化によって海馬ニューロンの核から細胞質に移行する。この時、核内 DGK ζ の減少により“ゲノムの守護神”と言われる癌抑制遺伝子 p53 の転写活性が低下する一方、細胞質に移行した DGK ζ は p53 の分解を促進する。DGK ϵ は免疫金コロイド電顕解析により、小脳プルキンエ細胞の樹状突起形質膜直下の滑面小胞体に検出され、IP3 受容体と共局在を示す。小胞体局在化には、N 末端近傍の α ヘリックス構造内に含まれる3つのロイシン残基 (Leu22、Leu25、Leu29) かなる疎水性パッチが重要な役割を果たす。また最近我々は、高脂肪食給餌 DGK ϵ -KO マウスの肝臓および白色脂肪に、脂質の異常沈着が認められることを見出した。糖負荷試験において、DGK ϵ -KO マウスでは高レベルで血糖値が推移し、インスリン抵抗性が誘導されると考えられる。DGK ϵ -KO マウスは生活習慣病モデルとなる可能性がある。

1 腸管濾胞上皮における M 細胞の分化と成熟の制御機構の解析

木村 俊介、木村 恵、岩永 敏彦
北海道大学 大学院医学研究科 組織細胞学分野

小腸のパイエル板に代表されるリンパ濾胞は管腔内の抗原に対する IgA 抗体を産生し、粘膜免疫応答の主役となるリンパ性器官である。同様なリンパ濾胞は大腸を含む腸管に広く分布し、腸管関連リンパ組織を構成する。リンパ濾胞上皮に存在する M 細胞は異物を取込むことで、粘膜免疫応答の開始に働く特殊な上皮細胞である。

我々は濾胞上皮のホールマウント染色法を開発し、さらに複数の分子マーカーを用いることで、成熟 M 細胞と未成熟 M 細胞の可視化と定量化に成功した。この方法によって、腸管各部位における M 細胞の成熟度を調べたところ、盲腸のリンパ濾胞には成熟 M 細胞がほとんど認められないことを見出した。M 細胞分化は RANKL-RANK シグナルによって制御されている。我々はこのシグナルの下流で働く RelB の活性が盲腸 M 細胞では回腸パイエル板 M 細胞に比べて低い状態であることを見出した。RelB 活性は M 細胞の分化に必須であったことから、RelB 活性の制御が M 細胞成熟に重要であると考えられる。

盲腸には回腸よりも多くの常在菌が存在している。M 細胞からの取込みを抑制することが、常在菌に対する過剰な免疫応答を抑え、共生の維持に貢献しているのかもしれない。

2 NALTのM細胞の分子形態学的解析

武藤 麻未¹、木村 俊介²、飯田 順一郎¹、岩永 敏彦²

¹北海道大学 大学院歯学研究科 口腔機能学講座 歯科矯正学教室、²大学院医学研究科 組織細胞学分野

マウスの鼻咽頭関連リンパ組織nasal-associated lymphoid tissues (NALT)は、鼻腔等の上気道における免疫応答の中心となる粘膜免疫組織である。ヒトではワルダイエル咽頭輪に相当すると考えられている。粘膜免疫組織とは腸管のパイエル板に代表される集合リンパ小節などを指し、粘膜に広く分布するリンパ球とリンパ性器官から構成されている。リンパ小節を覆う濾胞被蓋上皮には管腔内の抗原を取り込み、免疫監視に働くM細胞が存在する。近年パイエル板M細胞の発現分子解析が進んでいるが、NALTのM細胞についてはほとんど解明されていない。本研究ではパイエル板とNALTのM細胞について解剖学的形態、分布様式、発現分子、分化制御機構を調べ比較検討した。

形態的特徴並びにGP2、M-Secを初めとした発現分子、蛍光ビーズの取り込み能、RANKL-RANKによる分化制御は、パイエル板とNALTのM細胞で同様であった。しかしながら、M細胞が散在しておらずクラスター状に集合していること、RANKの発現部位がM細胞に限局していることなどパイエル板M細胞との相違点も認められた。

本研究からパイエル板とNALTのM細胞は類似していることが明らかにされた。マウスNALTはインフルエンザや花粉症等に対する経鼻ワクチンの開発のモデルとして注目を集めている。しかし骨に囲まれた器官であることから、研究が難しい面がある。パイエル板の知見をもとにNALTの研究を行うことで、効率よく解析を行えるのではないと思われる。

3 マウスの副鼻腔上皮に見られた新種の細胞について

○岩永敏彦、木村俊介、岩永ひろみ
北海道大学 医学研究科 解剖学講座 組織細胞学分野

鼻腔内には特定の部位にリンパ小節があり、それをおおう上皮にはパイエル板の M 細胞に似た細胞が認められる。M 細胞のマーカーとして知られる GP2 に対する抗体で鼻腔と副鼻腔を染色したところ、多数の GP2 陽性細胞が副鼻腔上皮に認められたが、ここにはリンパ小節は存在しないので、M 細胞とは異なる細胞であると思われた。この細胞の形態学的特徴を、神経との関係に注目しつつ調べた。

副鼻腔上皮の GP2 陽性細胞は、ボーリングのピンの形をした細胞で、基本的には散在性であるが接触して小集団をつくる場合もあった。細胞は基底膜上から管腔までのび、先端部は大きなふくらみをつくるのが特徴で、そこでの GP2 の陽性反応は非常に強かった。電顕レベルでは、GP2 の陽性反応は細胞膜に限局し、管腔側の細胞膜で非常に強く、細胞側面では弱かった。周囲の細胞より細胞質の電子密度が高い以外は、特に発達した小器官や分泌顆粒は認められなかった。神経との接触は頻繁に見られるが、これらの神経は知覚神経のマーカーである CGRP を含まなかった。

副鼻腔上皮で GP2 を発現する特殊な形態の細胞は、気管など他の気道上皮には存在せず、副鼻腔に特異的である。神経との密接な関係があるがそれらの神経は遠心性と思われ、かつ感覚細胞であることを示すシグナル分子の発現も確認できなかった。また、分泌物を含む顆粒は見あたらないので、分泌機能も低いようだが、杯細胞の一変形かと思われる。

4 パイエル板 M 細胞取り込み機構としての Epidermal fatty acid binding protein (E-FABP)とその共役タンパク質

鈴木木地¹ 志村洋一郎² 徳田信子³ 大和田祐二⁴ 阿部寛¹

秋田大 院医 形態解析学・器官構造学講座¹

秋田県立大 生物資源科学部応用生物科学科 微生物機能研究グループ²

山口大 院医学 保健学専攻 生体情報検査学³

EFABP のパイエル板 M 細胞および、樹状細胞での発現様式は腸管内抗原認識機構への関与を示唆するものである。

EFABP K.O. の糞便中では野生型 C57BL/6 と違って Lactobacillus acidophilus が増えていた。L. acidophilus 菌体成分のうち、特異抗原として機能するのは S-layer protein でこれを認識するマウス側の因子は dendritic cell (DC) specific intercellular adhesion molecule3 (ICAM3) -grabbing nonintegrin (DC-SIGN) である。

ウェスタンブロットによる DC-SIGN 発現解析をしたところ、E-FABP K.O. では full length の DC-SIGN とともに DC-SIGN neck less isoform と思われるバンドが鮮明に検出された。Caco2 細胞を使った強制発現系で検討した結果、両者の共発現下では S-layer protein コートしたビーズの取り込みが有意に減少することが分かった。

これまでの研究結果から M 細胞において EFABP は Galectin4 と共存することが、in vivo および in vitro で分かっている。今回 Caco2 細胞に EFABP, Galectin4, DC-SIGN の組み合わせを変えて共発現させ、S-layer protein コートしたビーズの取り込みを time lapse で観察したところ、EFABP は DC-SIGN の apical 側への移動、S-layer protein-DC-SIGN 複合体の apical 側からの移動を促進すると考えられた。

近年、活性酸素を合成する酵素（活性酸素合成酵素：Nox）が明らかにされ、その発生メカニズムが解明され始め、活性酸素が物質代謝や細胞内輸送、シグナル伝達にも関与することが報告されている。これまで我々はマウス舌における Nox の局在を検索し、各舌乳頭の上皮と味蕾の一部に Nox の発現が観察されることを報告した。そこで今回は、有郭乳頭とその味蕾に焦点を絞り、有郭乳頭における各種 Nox の発現を詳細に検索し、さらに味蕾では、味細胞のマーカーを用い比較検討した。

材料にはマウスを用い、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、舌を摘出、パラフィンに包埋した。薄切後、通法に従い免疫組織化学的染色を行い、Nox1,2,3,4 の発現を検索した。また味蕾では、Ⅱ型細胞のマーカーである gustducin 抗体、Ⅲ型細胞のマーカーである SNAP-25 抗体と各 Nox 抗体との二重染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

有郭乳頭の上皮の顆粒層から基底層の細胞は、Nox1 に弱陽性、Nox2,3,4 に陽性を示した。有郭乳頭の味蕾における各種 Nox の発現は、Nox1 に陽性、Nox2,3 に強陽性を示した。また、Nox4 は味蕾において陽性反応が観察された。さらに、二重染色の結果から gustducin 陽性細胞と SNAP-25 陽性細胞に、Nox1,2,3 の局在が観察された。

以上の結果から、有郭乳頭上皮における角化の過程に Nox が関与することが推察された。また、味細胞に Nox1,2,3 が発現したことから、味細胞の分化や増殖に活性酸素が関与することが考えられた。

魚類であるトラフグの“肝臓”には、肝組織と膵腺胞組織がみられ、両者はひとつの器官を構成する。肝小葉はないが、肝実質細胞、類洞内皮細胞、星細胞、および結合組織などは存在する。肝実質細胞には、おおきな脂質滴が充満し、脂肪肝の状態であるが、肝線維化や肝硬変などはない。膵臓組織には、特有のチモーゲン顆粒をもつ腺房細胞がみられる。このトラフグの“肝膵臓”について、フグ毒に特異的なテトロドトキシシン抗体をもちいた免疫組織化学染色をおこなった。

その結果、フグ毒は膵臓組織の腺胞細胞と、肝臓組織の肝実質細胞、類洞壁内皮細胞、および肝星細胞に陽性反応がみられた。フグ毒は、肝実質細胞以外に、肝組織部分の非実質細胞と膵臓組織部分の腺胞細胞にも存在することが判明した。

(Miura, M., Mezaki, Y., Morii, M., Hebiguchi, T., Yoshino, H., Kawatsu, K., Imai, K., Senoo H.: Histology of the hepatopancreas of puffer fish (*Takifugu rubripes*) in relation to the localization of tetrodotoxin. Archiv Histol Cytol. 2014. in press)

【背景・目的】コラーゲンペプチド（CP）の経口摂取により腱や真皮のコラーゲン細胞の形態が変化することを我々は明らかにしてきたが、全身に分布し、同じ間葉系細胞に由来する脂肪細胞への影響は明らかでない。そこで本研究では、代謝反応のうちエネルギー代謝に大きく関わる脂肪組織の CP による代謝活性の変化を主に形態学的手法を用いて解析した。【材料と方法】6 週齢の雄 BALB/cCrSlc マウスを 14%カゼイン（14C）、10%カゼイン（10C）、または 6%カゼイン+4%CP（6C+4CP）を含有する飼料で 10 週間飼育した。飼育期間中、体重および摂餌量を定期的に測定した。飼育期間終了後、精巣周囲脂肪組織を得、固定後、常法に従いエポンに包埋した。その後、準超薄切片を光学顕微鏡で観察して脂肪滴面積を測定し、さらに超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡を用いて細胞質領域とミトコンドリア形態について観察した。生化学的には筋肉のミトコンドリア酵素活性を測定した。【結果および考察】飼育期間中の内臓脂肪重量や体重で 3 群に有意な差はなかった。摂餌量は 6C+4CP で有意に増加し、肪滴面積は 10C で大きく 6C+4CP で小さいものが有意に多かった。ミトコンドリア面積は 6C+4CP で大きなものが多く、細胞質に占める割合も有意に高かった。酵素活性は 6C+4CP は 10C より高い値を示した。この事により低蛋白食条件下での CP 摂取によるエネルギー代謝の上昇が示された。今回の結果は CP 添加によりエネルギー代謝経路の切り替えが起こり、生成された ATP は全身の ATP 要求性代謝反応（肝臓でのケトン体合成やβ酸化）に利用されやすくなって脂肪滴が小さくなったと推察した。

本研究ではジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）による糖脂質代謝制御メカニズムを解析するために、DGKε-KO および野生型（WT）マウスを高脂肪食で給餌し、脂肪、肝臓および骨格筋などインスリン作動性臓器に注目した解析を行った。高脂肪食給餌により、DGKε-KO マウスにおいて顕著な体重増加と精巣上体周囲の白色脂肪量の増大が認められ、このマウスは肥満を呈することが明らかとなった。糖負荷試験において、高脂肪食給餌後の DGKε-KO マウスでは WT よりも高レベルで血糖値が推移した。白色脂肪を組織学的に解析すると、DGKε-KO マウスでは WT マウスに比べて個々の脂肪細胞のサイズが拡大することがわかった。ウェスタンブロット解析の結果、DGKε-KO の白色脂肪組織では中性脂肪分解酵素の発現低下、さらに PKCδ/θ のリン酸化レベルの亢進および Akt リン酸化レベルの低下が認められ、白色脂肪においてインスリン抵抗性が亢進している可能性が示唆された。一方、肝臓や骨格筋など他のインスリン作動性臓器においては、nPKC の活性化も Akt リン酸化レベルの低下も認められなかった。

以上の結果から、DGKε-KO マウスは高脂肪負荷に対して脆弱であり、容易に肥満を呈することが明らかとなった。この時、白色脂肪において組織特異的なインスリン抵抗性が亢進することが示唆された。

【背景】糖尿病では、高血糖が持続することで重度の代謝障害が生じる。代謝には副腎から分泌される糖質コルチコイドが大きく関与するが、糖尿病での副腎に関する報告は、長期糖尿病によるものが多く、糖尿病発症早期に発現される病態変化に関するものは少ない。本研究では、ストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病ラットを用いて、早期に発現される副腎の変化を形態学および生化学的に観察した。【方法】Wistar 系ラット雄 18 尾を用い、実験群では STZ を腹腔内に投与した後 24 時間、48 時間、発症 1 週間、2 週間、1 ヶ月後に副腎と血液を採取した。定法に従い作製したパラフィン切片に、H-E 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。血液からはコルチコステロン値を測定した。対照群には生理的食塩水を投与し 24 時間後、実験群と同様に観察した。【結果】副腎皮質は、球状帯、束状帯、網状帯の 3 層に区分され、副腎皮質に占める各層の割合は、両群で大きな変化は認められなかった。束状帯の細胞（束状帯細胞）は、対照群では小型ないし中型の脂肪滴を有するが、実験群では小型の脂肪滴が増加した後、中型から大型の脂肪滴が多数観察される傾向にあった。コルチコステロン値も糖尿病の経過に伴い増加傾向にあった。【考察】長期糖尿病に伴う慢性的な代謝障害により、束状帯細胞の脂肪滴は小型化し減数すると報告がある。今回、糖尿病早期では、束状帯細胞は多数の小型の脂肪滴を有し、糖尿病の経過に伴い中型から大型のものが増加し、血液中のコルチコステロン値も増加した。これらの結果から、糖尿病発症後の早期から、副腎の特に束状帯が影響を受けることが示唆された。

【目的】proton pump inhibitor (PPI) は胃の壁細胞にある proton pump に作用して胃酸分泌を抑制するため、消化性潰瘍などの治療に広く使用されている。しかし、PPI がラットの壁細胞における 17β-estradiol 合成分泌に与える影響は不明であり、PPI の副作用の estrogen 関連症状との関係についても明らかとなっていない。本研究では、雄ラットに lansoprazole (LPZ) を経口投与し、壁細胞における 17β-estradiol の合成分泌への影響について調べた。【方法】Wistar 系雄ラットに lansoprazole (30 mg/kg) を 1 日と 3 日間経口投与し、12 週齢で組織採取を行った。門脈血と動脈血の 17β-estradiol 量は ELISA、胃粘膜上皮と肝臓の遺伝子発現は real-time RT-PCR、タンパク質量は Western blotting もしくは免疫組織化学を用いて検討した。【結果】LPZ 投与により門脈血と動脈血の 17β-estradiol 量は LPZ3d で増加した。また、胃粘膜上皮の aromatase 遺伝子発現とタンパク質量が増加した。肝臓の estrogen receptor 遺伝子発現は変化しなかった。【考察】PPI は壁細胞の 17β-estradiol 合成分泌を促進することが示された。このことから PPI 投与に伴う estrogen 関連症状には、壁細胞の 17β-estradiol の合成分泌の亢進が関与している可能性が示された。

11 GnRH アゴニスト持続投与によりラット LH/FSH 産生細胞で生じる LH 分泌・産生機能の変化

○暮地本宙^己、穂坂正博²、板東良雄³、甲賀大輔¹、平義樹¹、牛木辰男¹、渡部剛¹
旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野¹、秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物科学科 分子細胞機能研究グループ²、旭川医科大学 解剖学講座 機能形態学分野³、新潟大学大学院 歯医学総合研究科 顕微解剖学分野⁴

私達はこれまで、GnRH アゴニストの酢酸リュープロレリン持続投与開始から 1 日後にかけて、ラット LH/FSH 産生細胞で管状細網構造をとる特殊な小胞体構造 (ER patch) が形成される事を報告してきた。そこで今回、リュープロレリン持続投与初期における、ラットの LH の分泌と産生に関わる機能の変化を経時的に解析した。

まず、ELISA 法を用いてリュープロレリン持続投与ラットの血中 LH 濃度を時系列で比較すると、同剤投与 1 時間後から有意な上昇を示し、同剤投与 4 時間後に最高値を示したが、その後急速に低下した。一方で、RT-PCR 法を用いて同剤持続投与ラットの下垂体前葉における LHβ の mRNA 発現を検討したところ、同剤投与後のどの時点においても対照群と比べて有意な上昇を示さなかった。そこで、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロッティング法を用いて、同剤持続投与ラットの下垂体前葉における GnRH 受容体量を時系列で比較したところ、同剤投与 12 時間後から 1 日後にかけて低下していた。

以上の結果から、LH の放出と LHβ の生合成はともに GnRH 受容体下流のシグナル伝達で制御されているが、GnRH アゴニストによる持続的な受容体刺激に対しては、異なる応答様式をとることが示唆された。また、持続的 GnRH 刺激の開始直後の LH 放出の惹起とは別に、より長期的な刺激の結果として GnRH 受容体量が低下するが、同時に LH/FSH 産生細胞で ER patch が形成されるため、両者が関連する可能性も考えられた。

12 プラナリアネオプラスト特異的抗体により同定されたヒト成体多能性幹細胞制御因子とその機能

○明石英雄¹、Mozhdeh Bagheri¹、若尾昌平¹、黒田康勝²、柴田典人³、北田容章¹、藤吉好則⁴、田岡万悟⁵、磯辺俊明⁵、阿形清和³、出澤真理¹
東北大・院医・細胞組織学¹、人体構造学²、京都大・理・生物科学³、名古屋大・院創薬科学・基盤創薬学⁴、首都大・院理工⁵

我々は、ヒト間葉系組織に三胚葉への分化が可能な多能性幹細胞 (Muse 細胞) が存在していることを突き止めた。Muse 細胞は、生体に存在する自然の多能性幹細胞であり、腫瘍形成能を持たないことから、高い安全性を有し、再生医療への応用が期待される。

一方、プラナリアは、下等生物の中でも特に強力な再生能力を持つ生物であり、その再生能は間葉系組織中に存在するネオプラストによるものであることが知られている。ヒトをはじめとする高等生物では、プラナリアのような優れた再生能力は失われてしまったと考えられている。

我々は、ネオプラストから Muse 細胞まで進化的に保存された多能性制御機構が存在するのではないかという仮説を立て、ネオプラストと Muse 細胞に共通な因子を探索した結果、「ヒト・プラナリア共通多能性因子 (P 因子)」を同定することに成功した。さらに、この P 因子はヒト Muse 細胞の多能性維持に関与する因子であり、P 因子を抑制することにより神経細胞様の細胞が形成されることが明らかとなった。

本研究で同定した P 因子は、プラナリアからヒトまで進化的に保存された生体多能性幹細胞の制御因子であることが示唆され、また自然の多能性幹細胞に共通な神経細胞分化に関与している可能性があると考えられる。

13 膵臓組織由来の多能性幹細胞 Muse 細胞の探索と多能性の解析

○串田良祐¹、若尾昌平²、明石英雄²、西村範行^{3,4}、岩谷壮太⁴、香田翼⁴、森岡一朗⁴、溝渕雅己⁵、飯島一誠⁴、出澤真理^{1,2}

東北大学大学院医学系研究科人体構造学分野¹、細胞組織学分野²、神戸大学大学院医学研究科疫学分野³、小児科学分野⁴、兵庫県立こども病院周産期医療センター新生児科⁵

我々は間葉系幹細胞の中の一部に多能性を持つ幹細胞として Multilineage-differentiating Stress Enduring cell (Muse 細胞) が存在することを見出した。Muse 細胞は多能性幹細胞マーカー SSEA-3 と間葉系細胞マーカー CD105 の二重陽性細胞として単離でき、ストレス耐性、自己複製能、ES 細胞の胚様体様の多能性細胞塊の形成、多能性幹細胞マーカーの発現、1 細胞から三胚葉性の細胞に分化するという特徴を持つ。また、組織修復に寄与し、腫瘍形成能も持たないので、安全性の高い細胞移植治療に適した細胞として考えられている。現在、成人組織由来 Muse 細胞の特徴は捉えられつつあるものの、胎児付属物など幼若組織由来 Muse 細胞の特性は明らかになっていない。

本研究では、膵臓組織由来の Muse 細胞の探索と、それらの特性を検証した。神戸大学より供与された患者の同意を得て採取した膵臓組織より樹立した間葉系細胞には約 2% の SSEA-3 陽性細胞が内在し、この細胞は組織中では血管周囲の Wharton's jelly に多く存在していることが確認された。SSEA-3 陽性細胞は Nanog、Oct3/4、Sox2、PARK4 などの多能性幹細胞マーカーを発現し、1 細胞で浮遊培養すると、多能性幹細胞マーカーを発現する多能性細胞塊を約 50% の割合で形成した。この多能性細胞塊を接着培養すると、Neurofilament、MAP-2 (外胚葉マーカー)、Smooth muscle actin、Nkx2.5 (中胚葉マーカー)、Cytokeratin 7、alpha-fetoprotein (内胚葉マーカー) の発現が観られ、自発的な三胚葉性の細胞への分化能が確認された。

14 正常ヒト皮膚線維芽細胞から誘導された Schwann 細胞のラット坐骨神経損傷モデルに対する治療効果

○村上 徹¹、若尾 昌平¹、出澤 真理^{1,2}
東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野¹、人体構造学分野^{1,2}

Schwann 細胞は末梢神経に存在する末梢性グリア細胞であり、軸索においてミエリンを形成し跳躍伝導に関与するだけでなく、神経軸索の伸長を促進することから、末梢神経障害に対する細胞移植治療への可能性が期待されている。本研究では、骨髄や臍帯と比較しても採取がより容易で侵襲が少ないと考えられる皮膚線維芽細胞からの Schwann 細胞の誘導を試みた。以前報告された方法と同様に、ヒト皮膚線維芽細胞に β メルカプトエタノールとレチノイン酸を作用させた後、特定のサイトカインで処理し、Schwann 様細胞を誘導した。誘導された細胞において、Schwann 細胞に特異的な複数のマーカーの発現が、RT-PCR および免疫細胞化学で確認された。また、神経成長因子を作用させた PC12 細胞は神経軸索のモデルとして知られているが、誘導した細胞と共培養した後、Sudan black 染色と免疫細胞化学で評価することにより、*in vitro* でミエリンの形成が確認された。

さらに我々は誘導された細胞を人工チューブに充填し、切断したラットの坐骨神経を架橋することによって細胞移植を行った。誘導された細胞は、内在性の Schwann 細胞と同様に、切断された坐骨神経の軸索再生、坐骨神経支配領域の神経筋接合部の再形成を促進しており、移植片内でミエリンを形成していることが免疫組織化学で確認された。さらに行動評価によって、坐骨神経機能の回復に寄与していることが確認された。

15 マウス肝障害モデルを用いた Muse 細胞移植療法の検討

伊関雅裕^{1,2}、若尾昌平¹、串田良祐¹、海野倫明²、出澤真理¹
#1 東北大学医学系研究科細胞組織学分野、#2 同消化器外科学分野

【背景】
間葉系幹細胞は、安全性が高く臨床応用が展開されている細胞である。近年間葉系幹細胞の胚葉を越えた 3 胚葉性細胞への分化能が注目されてきたが、この多様な分化能を説明する Muse 細胞が発見された。Muse 細胞は間葉系幹細胞に含まれる 3 胚葉性細胞への分化を示す多能性幹細胞であり、既存の多能性幹細胞と異なり、腫瘍化しないという点でより細胞移植治療に適していると考えられる。肝不全は根治療法が肝移植しかない致死的な病態であり、代替療法が望まれている。Muse 細胞移植が肝不全への新たな治療法となる可能性があると考え、マウスを用い Muse 細胞移植の効果を評価することを目的とした。

【実験方法・結果】
単離した Muse 細胞の自発的分化を肝細胞系マーカーの DLK、AFP、CK18、CK19 を用い、肝細胞系へ分化することを確認した。また、*in vitro* における Muse 細胞の遊走能試験と *in vivo* で体内動態実験から、Muse 細胞は障害肝への高い遊走能を有していることが示された。

マウス急性肝炎モデルに対して Muse/Non-Muse 細胞移植を行ったところ、血液検査では有意差はみられなかったが、免疫組織化学において、Muse 細胞移植群で多くの移植細胞の生着、および肝細胞マーカー陽性細胞への分化が確認された。マウス肝線維化モデルへの移植実験では、血清総ビリルビン・アルブミン値は Muse 細胞移植群で改善が認められた。また肝線維化面積も Muse 細胞移植群で狭小化していた。免疫組織化学では Muse 細胞移植群でより多くの移植細胞の生着および肝細胞マーカー陽性細胞への分化が確認された。

【考察】
Muse 細胞は肝細胞系への分化も示す細胞であり、障害肝への遊走能も高く、全身投与による細胞移植に適していると考えられた。マウスに対する移植実験においても効率的な生着・分化が確認され、特に肝線維化モデルにおいては肝機能の改善・肝線維化の改善がみられた。これらのことから、Muse 細胞移植が肝不全の新たな治療法になる可能性があると考えられた。

16 Muse 細胞は慢性腎不全モデルにおいて糸球体構成細胞に分化し腎機能を改善する

内田 奈生^{1,3}、若尾 昌平¹、串田 良祐²、呉 繁夫³、出澤 真理^{1,2}
東北大学大学院 医学部 細胞組織学講座¹、解剖学講座²、小児病態学講座³

【背景】 Multi-lineage differentiating stress enduring 細胞 (以下、Muse 細胞) は間葉系組織に含まれる多能性幹細胞であり、ES 細胞マーカーである SSEA-3 陽性の細胞として同定される。この細胞は自己複製能と 3 胚葉性に分化する能力を有する。免疫不全マウスの肝障害、脊髄損傷モデルに血管投与すると損傷臓器に遊走・生着し、組織を構成する細胞に分化することが報告されている。今回、免疫不全マウスに慢性腎疾患 (CKD) モデルを作成し、Muse 細胞投与の効果を検討した。【方法】 SCID マウスにドキシソリンを投与し、CKD モデルを作成した。投与後 1 週間時点で 3 群に分け、ヒト骨髄 MSC 由来の Muse 細胞と non-Muse 細胞 (SSEA-3 陰性細胞群) をそれぞれ 2×10^4 細胞ずつ、あるいは生理食塩水を尾静脈投与した。以後 8 週まで、血漿クレアチニン、BUN、尿タンパク/クレアチニン比、クレアチンクリアランス (Ccr) を測定した。8 週後、腎組織像を評価した。【結果】 Muse 群では 4 週以降、Ccr が緩やかに回復した。その他のパラメーターは 3 群で有意差はなかった。8 週時点で Muse 細胞は糸球体構成細胞の $11.1 \pm 2.4\%$ を置換していた。また、一部の Muse 細胞は足細胞、血管内皮細胞、メサングウム細胞のマーカーを発現し、Muse 細胞が糸球体構成細胞に分化したものと考えられた。組織学的評価では糸球体硬化面積、間質線維化面積、糸球体あたりの足細胞数はいずれも Muse 群で生食群に比べ有意に改善していた。一方、non-Muse 群は機能的にも組織学的にも生食投与群と有意差がなかった。【結論】 Muse 細胞は CKD モデルの腎臓に生着し、糸球体構成細胞に分化することにより腎機能を回復した。

17 ウサギ Muse 細胞を用いた気道再生

○鈴木亮¹、小椋文貴²、串田良祐³、若尾昌平²、仲江川雄太¹、柳川明弘¹、野本幸男¹、大森孝一¹、出澤真理^{2,3}
福島県立医科大学 耳鼻咽喉科学講座¹
東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野² 人体構造学³

我々は、ポリプロピレン製骨格とコラーゲンスポンジの足場からなる組織再生誘導型人工気管を喉頭や気管といった気道の再建材料として臨床応用し、良好な結果を得ている。複数例の臨床経験をふまえ、再建後の人工気管内腔面上の上皮化に要する時間短縮のために改良を次の課題と位置づけ、組織再生誘導型人工気管に培養細胞を付加した新規気道再建材料の開発研究を行っている。これまでに、線維芽細胞などを組織再生型人工気管に付加して作製した新規人工気管を用いて、実験動物での評価を行い、移植部位の気管内腔の上皮化が促進したことを報告してきた。一方、ヒト間葉系組織には、自己複製能や三胚葉性の細胞へと分化する能力を有する天然の多能性幹細胞である Muse 細胞が存在する。この Muse 細胞は、ヒト多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 を用いることで単離可能な細胞であり、最大の特徴として腫瘍形成能を持たない細胞であるため、再生医療における組織再生に寄与する細胞ソースとして非常に有用であると考えられる。

我々は、ウサギの脂肪組織から脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)を樹立し、SSEA-3 をマーカーとしてウサギ Muse 細胞を単離することが可能であった。気管欠損モデルを作製し、細胞を付加しない人工気管のみの群、ASC を付加した群、他家 Muse 細胞を付加した群、自家 Muse 細胞を付加した群を設定した。付加した細胞数を 2×10^4 、 6×10^4 、移植後 2 週間、6 週間をエンドポイントとした。他の群と比較し、自家 Muse 細胞の群では、上皮化の促進が見られ、また、より成熟した上皮がみられたので、報告する。

18 毛様体神経節などを確実に解剖する方法の検討

周 明、石澤 章光、金津 嘉徳、鈴木 良地、阿部 寛
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

従来の眼窩の解剖においては、眼窩上壁の骨除去と眼窩骨膜の切開から始め、上方から前頭神経・上眼瞼神経・上直筋と動眼神経上枝を解剖し、続いて涙腺や上斜筋・内側直筋・外側直筋と支配神経、動眼脈の枝を確認し、最後に毛様体神経節を解剖していた。しかし毛様体神経節は視神経と外側直筋の間の狭い部分にあり、眼窩脂肪体を除去しながら細い神経根と小さな神経節を同定する必要があるため、多くの学生にとって観察が困難であると思われた。

我々は毛様体神経節の剖出率を高くするため、眼窩骨膜を除去後に以下の方法を試みた。1. 後方から脳神経の根元をまず解剖する方法：総腱輪と上眼窩裂を開放して、動眼神経・滑車神経・外転神経・眼神経を分離する。外転神経が外側直筋へ進入する部位を確認し、その近くで毛様体神経節を観察する。2. 眼窩の外側から解剖する方法：眼窩の外側壁を除去し外側直筋の筋腹を切断して翻す。視神経の外側で毛様体神経節を観察する。3. 眼窩内容をすべて摘出する方法：外眼筋を眼球につけたまま、眼窩内容をすべて取り出す。外側直筋と視神経の間を広げて毛様体神経節を観察する。続いて他の構造を観察する。

以上のいずれにおいても眼窩内の構造をほとんど観察できたが、特に第2の方法において実習時間内で確実に毛様体神経節を観察でき、続いて他の構造も観察できたので、学生実習として最も適切であると考えられた。

19 左上大静脈遺残を伴う冠状静脈と周辺の静脈の複合異常

○石澤 章光、周 明、鈴木 良地、阿部 寛
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

平成26年度解剖学実習において、前立腺癌で亡くなられた72歳男性に、左上大静脈の遺残を伴う極めて稀な大動脈後性左腕頭静脈(Postaortic left brachiocephalic vein: Palbv)の存在と冠状静脈口閉鎖の複合異常を観察した。冠状静脈洞と左心房の短絡路は認められなかった。冠状静脈洞には小静脈、中心静脈、大静脈そして左心室後静脈が流入していた。逆漏斗状の太い左心房斜静脈が心膜を貫いて左上大静脈へ向かっていた。左上大静脈と(右)上大静脈の間を繋ぐ吻合静脈は2本存在した。1つは通常の左腕頭静脈で、他は動脈管索の背側を通り気管と上行大動脈に挟まれて走行し、右上大静脈と吻合する背側大動脈後性左腕頭静脈(dorsal Palbv)であった。後者は前者よりも太く、また右上大静脈との吻合部位は奇静脈の右上大静脈への吻合部位よりもわずかに遠位であった。

本例の形成過程として、胎生4-8週齢に冠状静脈口が閉鎖し、冠状静脈洞の血液が右心房に流入することができないことに起因すると考えた。その時点で既に上行大動脈の腹側・背側に静脈網が形成されており、冠状静脈洞の血液が左心房斜静脈を経てこの静脈網の背側部分に流入し、dorsal Palbv が形成された。また、頭部・左上肢の血液が通常の左腕頭静脈と左上大静脈に分かれ、左上大静脈の中の血液が左心房斜静脈からの血液と混合したため、dorsal Palbv が通常の左腕頭静脈より太く発達したと考えた。

20 A trial to measure the motion range of the carpometacarpal joint of the thumb in healthy humans

Mitsuhiro Nito¹, Wataru Hashizume¹, Yoshiro Kiyoshige², Akira Naito¹
¹Dept. Anat., Yamagata Univ. Sch. Med., ²Dept. Phys. Ther., Yamagata Pref. Univ. Health Sci.

In order to evaluate the motion range of the carpometacarpal (CM) joint of the thumb, movements of the head and base of the first metacarpal bone (1st MC) during full circumduction were recorded using a three-dimensional (3D) position sensor system in four healthy human subjects (male, 21-30 years old). During the experiment, the subjects sat on a chair with the forearm fixed in the semiprone (neutral) position and the wrist in 30° of extension on an experimental table. 2D (x, y: frontal plane; y, z: sagittal plane; x, z: horizontal plane) and 3D trajectories of movements of the head and base were prepared from 3D data (x, y, z). Although the 2D trajectories showed that the head moved widely in the frontal plane and the base in the sagittal in all subject, shapes of the 2D and 3D trajectories of the head and also those of the base were quite different from subject to subject. These findings suggest that individual differences are observed among the movements of 1st MC, namely the motion range of the CM joint.

21 医学文献への解剖学的アプローチ：形態解析による発語者意図の抽出

新見隆彦
札幌医科大学 医学部 解剖学第1講座

一般的に文書・文献は、無作為・無秩序に語が羅列されたものではなく、一定の形式(文法・語法等)に準じて形成されている。これは文書を構成する要素(語彙素、すなわち名詞、形容詞、助動詞、助詞等及びその活用語尾)と文脈(context)との間に、意味的関係性と系統性が存在すること考えられる。

この意味は、文書の全体的構造と段落などの部分構造、構成要素である言語の機能に対して形態学的(=解剖学的)なアプローチが可能であることを示している。

具体的には、語の出現頻度(頻出度)と関連性(共起性)、語および段落間の意味的関係などの解析により、文脈(context)やキーワード、すなわち意味的に強勢(stress=強調された)が置かれた語の抽出により「著者が表現しようとした意図した内容」、いわゆる主題・要点の抽出・明示が可能となる。

本研究では、形態素解析器を用い、文書の構成要素である語の形態学的解析、それらにより構成される段落・文書全体の構造解析に加え、文書の機能としての意味の解析(Semantic Analysis)を連携する語彙の共起関係解析から導き出し、文書の Author が強調点として文献上に表出した語彙を抽出する。

この結果、文書の構造解析による語と意味の相発・相補関係がパネモデル上に表現された。また、著者(Author)の意図が抽出語彙の頻出度に関連すること、段落(paragraph)間が強調語により連関すること明らかとなったことにより、著者意図抽出の可能性が示唆された。

加えて、解析器が格納する辞書(reference dictionary)の参照語登録により、試験答案の解析をはじめとする医学教育への活用はもとより、患者愁訴の narrative 分析など臨床医学への応用の可能性が示唆された。

22 マウス臼歯歯根成長における Rho signaling の役割

○藤原尚樹¹、熊上深香¹、大津圭史¹、原田英光¹
岩手医科大学 解剖学講座 発生生物・再生医学分野¹

【目的】臼歯歯根形成は、エナメル器の下端に形成される Hertwig 上皮鞘 (HERS) が象牙芽細胞を分化誘導することで開始する。HERS の伸長とともに歯根は成長し、同時に歯冠側の HERS では断裂が生じて、セメント質・歯根膜・歯槽骨の形成に関わる。HERS の成長や断裂のメカニズムには不明の点が多く残されており、今回我々は細胞骨格を制御する Rho signaling に注目し、HERS 細胞の遊走性や上皮間葉転換 (EMT) との関わりについて検討を行った。【材料と方法】マウス下顎第一臼歯歯胚を凍結切片で免疫組織化学、器官培養系と HERS 細胞由来細胞株 HERS01a を用いた RhoA の gain/loss of function 実験、歯根形成期上皮特異的に RhoA dominant negative を発現させたマウス(DN)による組織変化の観察を行った。【結果と考察】外エナメル上皮と HERS で active RhoA の発現が認められた。器官培養で Rho inhibitor を添加すると、HERS 細胞の配列や歯根成長の抑制が見られた。Rho activator 添加培養では、歯根象牙質上に HERS 細胞が断裂することなく残っていた。Rho activator 添加培養での HERS の形態変化は TGF-β の inhibitor を添加した培養系の HERS と類似しており、HERS の断裂に EMT 誘導の可能性があること、それらの調節への Rho signaling の関連性が示唆された。DN でも、対照群に比較して HERS 伸長の抑制と歯根長の短縮が認められた。activator を添加培養した HERS01a は細胞同士の境界面にアクチンが集積し、突起や細胞質内に広く見られた Rho inhibitor 添加群と異なっていた。以上より Rho signaling は HERS の細胞形態や移動・断裂の調節を通じて歯根形成の誘導に重要な役割をもつことが示唆された。

23 歯胚における成長因子とそのレセプターの局在解析

○久本 芽璃¹、岩永 敏彦²北海道大学大学院 歯学研究科 口腔機能学講座 口腔機能補綴学教室¹北海道大学大学院 医学研究科 解剖学講座 組織細胞学分野²

本研究の目的は、マウスの胎子と新生児の歯胚に発現する成長因子とそのレセプターの発現様式を *in situ hybridization* 法によって解析し、それらの相互関係を明らかにすることである。

TGFβ1 は歯胚の象牙芽細胞に強く発現するのに対し、TGFβ receptor-1/2 と Smad3 はエナメル芽細胞に発現していた。つまり TGFβ のシグナルは象牙芽細胞からエナメル芽細胞へ向かって発せられていた。BMP2 と BMP4 の胎子での主な発現部位は、ともに歯乳頭であった。しかし、新生児では BMP2 が象牙芽細胞に発現するのに対し、BMP4 は主にエナメル芽細胞に発現した。一方、PDGFα は胎子では内エナメル上皮に、新生児では未分化なエナメル芽細胞に発現していた。PDGFα receptor は歯乳頭や象牙芽細胞に強く発現していたので、PDGFα のシグナルはエナメル器から歯乳頭へ発せられ、象牙芽細胞の分化誘導に関与すると思われる。歯小囊には胎子、新生児ともに IGF1 と IGF-binding protein3 が強く発現していた。興味深いことに、IGF receptor-1 は歯胚の中間層に強い発現を示した。中間層には PDGFα receptor も発現しており、中間層の役割を再認識させる結果となった。CTGF (connective tissue growth factor) の発現は胎子では内外のエナメル上皮であったのに対し、新生児では歯小囊と象牙芽細胞へ移行した。IGF と CTGF の歯胚での機能は明瞭ではないが、歯根膜や歯槽骨を含めた歯周組織の形成に重要な因子なのであろう。

24 ノルアドレナリンは α1 受容体を介して涙腺腺房細胞からムチン分泌を促す。

黒澤 千花¹、○齋野 朝幸²、東尾 浩典³、佐藤 洋一⁴、黒坂 大次郎¹岩手医科大学 医学部 眼科学講座¹、統合基礎講座解剖学講座細胞生物学分野²、全学教育推進機構 教育センター化学科³、医学教育学講座⁴

目的: 交感神経の節後線維終末からはノルアドレナリン(NA)が分泌される。この NA が涙腺の刺激-放出連関にどのように寄与するかを解明することは、臨床的にも極めて重要である。交感神経(β 作用)は分泌顆粒からのタンパク分泌に関わると言われているが、それが本当であるかラント涙腺腺房細胞に及ぼす NA の効果を、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]$) 変化を指標として検討した。**方法:** ラット(雄 Wistar 7-12W)を炭酸ガスにて屠殺し、涙腺を摘出した。標本を HEPES バッファーム中で純化コラゲナーゼ 100 U/ml を用い 37℃、1 時間消化した。その際に 15 分ごとに酸素ガスを吹き付けた。消化後、腺房をろ過して腺房細胞を回収し、 Ca^{2+} 感受性色素 Indo-1/AM を負荷後、細胞を固着させ、リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡(Nikon RCM/Ab)によって $[Ca^{2+}]$ の画像解析を行った。併せて、Indo-1/AM 負荷前の検体から mRNA を採取し、RT-PCR を行った。また、腺房細胞浮遊液に NA 投与後、経時的に上清のベロキシダーゼ活性を ELISA 法で測定した。**結果:** NA 刺激で二相性の $[Ca^{2+}]$ の上昇を認めた。細胞外 Ca^{2+} 除去、および Ca^{2+} チャネルブロッカーで 2 相目の $[Ca^{2+}]$ 上昇が抑えられた。Suramin および U73122 は $[Ca^{2+}]$ の上昇を阻害した。受容体について検討したところ、Phenylephrine で強い $[Ca^{2+}]$ の上昇を認めたが、Clonidine および Isoproterenol では、 $[Ca^{2+}]$ 上昇を認めなかった。ムチン分泌はベロキシダーゼ活性を代用し検討した。活性は、NA 刺激後 60 分までは優位な吸光度の上昇があり、80 分後プラトーとなった。A23187 刺激でもベロキシダーゼの有意な吸光度の上昇を認めた。RT-PCR では、MUC 受容体の 1, 5AC, 5B, 16 の発現が認められ、分泌型ムチンの存在が確認できた。**結論:** NA は主に α1 受容体を刺激し、 $[Ca^{2+}]$ が上昇していると考えられた。A23187 刺激でベロキシダーゼの吸光度が上昇していたことより、ムチンに代表されるタンパクの分泌は Ca^{2+} 依存性であることが確認された。 Ca^{2+} イメージングの検討から β 受容体ではなく、主に α1 受容体の関与が示唆された。RT-PCR の結果も含めて検討すると、α1 受容体刺激による $[Ca^{2+}]$ 上昇によってムチン分泌が起こる可能性が示唆された。

25 DGKζ 結合蛋白 NAPI-like proteins による p53 アセチル化調節を介した細胞周期および細胞死の制御

○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) は PKC の生理的活性調節因子と考えられ近年、その機能的役割として癌や細胞死のシグナル伝達への関与が注目されている。我々は、新規 DGKζ 結合蛋白として Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAPIL1) および NAPIL-like 4 (NAPIL4) を同定し、これら蛋白による細胞周期および DNA 損傷による細胞死への影響について解析を行っている。これまでの研究により、NAPIL1 ノックダウン細胞では細胞増殖が促進し、一方 NAPIL4 をノックダウンすると細胞増殖が抑制されることが明らかとなっている。また DNA 損傷時には、NAPIL1 ノックダウン細胞は DNA 損傷に脆弱性を示すのに対して、NAPIL4 ノックダウン細胞は DNA 損傷に抵抗性を示すことを見出した。細胞周期および細胞死は様々な分子によって制御されているが、その中でも癌抑制遺伝子産物 p53 が重要な役割を果たしており、その多彩な機能はリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾により制御されている。今回我々は、NAPIL1 および NAPIL4 が細胞周期および細胞死において相反する作用を及ぼすメカニズムに関して、p53 アセチル化現象を解析した。その結果、NAPIL1 ノックダウンでは 382 番目リジンのアセチル化が亢進するのに対して、NAPIL4 ノックダウンでは 320 番目リジンのアセチル化の亢進が認められた。以上のことから、NAPIL1 および NAPIL4 はそれぞれ特有のリジン残基の p53 アセチル化部位の変化を介して、細胞周期および細胞死を調節している可能性が高いことが示唆された。

26 DGKζ 結合蛋白 DDX5 による転写因子 NF-κB の制御機構

○田中 賢¹、高木理彰²、後藤 薫¹
山形大学医学部解剖学第二講座¹、山形大学医学部整形外科科学講座²

我々はゼータ型ジアシルグリセロールキナーゼ (DGKζ) の新規結合タンパク質として、転写調節因子 DDX5 を同定し解析を行っている。転写因子 NF-κB は、免疫応答、炎症応答、細胞増殖、癌化などのプロセスにおいて、中心的な役割を果たすことが知られている。我々はこれまで NF-κB 経路において、DGKζ ノックダウンまたはノックアウトは IκB の分解促進により NF-κB p65 サブユニットのリン酸化を亢進し、p65 サブユニットの核内移行を促進し、標的遺伝子の転写を増加させることを報告してきた。本研究では、転写因子 NF-κB の制御機構における DDX5 の役割を明らかにするために、DDX5 ノックダウン HeLa 細胞における NF-κB 関連分子の発現をウェスタンブロット法で解析した。DDX5 ノックダウン HeLa 細胞では、野生型 HeLa 細胞に比べて NF-κB p65 サブユニットの Ser536、Ser468、Ser311 におけるリン酸化レベルが抑制された。一方 p65 サブユニットを細胞質に保留する IκB の発現に変化は認められなかった。次に TNF-α 刺激による転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイで解析したところ、DDX5 ノックダウン細胞では野生型 HeLa 細胞に比べて、NF-κB 活性が抑制されることが明らかとなった。以上により NF-κB 制御機構において、DDX5 は IκB の分解には影響を与えないが、p65 サブユニットのリン酸化を亢進させることにより NF-κB 経路に促進的に作用する可能性が示唆された。

27 上皮成長因子受容体の恒常的分解と細胞増殖に関与する GGA 分子の解析

植村武文、和栗聡 福島県立医科大学 医学部 解剖・組織学講座

EGFR は細胞増殖を制御する EGF の細胞膜受容体であり、その遺伝子の変異、発現異常や異常活性は癌病態と密接に関係する。我々はゴルジ-エンドソーム局在型クラスリンアダプター分子である GGA (ヒトでは 3 種) に注目し、GGA2 発現抑制細胞では EGFR がリソソームに誤って運搬されること、GGA2 が EGFR 細胞質領域と結合することを見出した。今回は、GGA2 発現抑制による EGFR のポストゴルジ輸送の変化、および細胞増殖への影響について検討した。ARPE-19 細胞に GGA2 siRNA を導入し、Rab5 変異体 (Q79L) を過剰発現させた場合 EGFR は主に初期エンドソームに蓄積した。次に、EGFR 機能に依存して増殖することを確認できた 4 種類の細胞を用いて GGA2 を安定に発現抑制した細胞株を作製した。細胞増殖を測定したところ、これらすべての細胞種において GGA2 発現抑制により細胞増殖能が低下した。以上の結果から、GGA2 発現抑制細胞では EGFR がエンドソーム経由でリソソームに運ばれること、GGA2 発現抑制により実際に細胞増殖能の低下を来すことが示された。

28 平面内細胞極性の分子機構に関する研究

○山崎正和^{1,2}、鮎川友紀^{1,2}、秋山正和³、佐々木雄彦^{2,4}、妹尾春樹¹¹ 秋田大学大学院医学系研究科・細胞生物学講座、² 秋田大学・生体情報研究センター、³ 北海道大学電子科学研究所・動的数値モデリング研究分野、⁴ 秋田大学大学院医学系研究科・微生物学講座

上皮組織内には、細胞の頂底軸と直交する、組織平面の特定の軸に沿った極性が存在する。これは平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) と呼ばれ、様々な組織・器官において観察される一般的な現象である。例えば、哺乳類の内耳では、非対称な形態 (極性) を有した個々の有毛細胞の向きが組織平面の特定の軸に沿って揃っており、「PCP」は「器官の機能」が密接に関連する。また最近、PCP が体の左右非対称性や囊胞腎等の疾患、幹細胞の運命制御に関与することが報告され、その多彩な役割が注目を集めている。ショウジョウバエを用いた解析から、PCP 制御因子は機能の相違により 2 つのグループに分類される。一つ目は、7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Fz) などによって構成される「コアグループ」である。これらの分子は個々の細胞において偏在化し、この偏在化が細胞の極性形成に中心的な役割を担っている。二つ目は、非典型的カドヘリン分子 Dachsous (Ds) などによって構成される「Ds グループ」であり、コアグループの上流で機能する位置情報としての役割が指摘されている。ショウジョウバエ翅では位置情報である Ds 発現の勾配が翅の根本 (近位側) から先端 (遠位側) に向かって低くなるように形成され、Fz は Ds 発現の低い側 (遠位側) に非対称に局在する。一方、ショウジョウバエの複眼においては、Ds 勾配の方向と Fz の非対称局在の関係が反対であることが知られている。これらの結果から、組織毎に両グループの関係を変換する機構の存在が示唆されるが、その実体は全く不明である。最近我々は、ショウジョウバエを用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングの結果を基に、既知の PCP 分子である Prickle (Pk) とそのアイソフォームである Spiny-legs (Sple) の発現バランスが上述の謎を解く鍵となることを見出した。本学術集会では、Pk と Sple の発現バランスが Ds 勾配に対する Fz の非対称局在の向きを決定する分子機構について議論すると共に、Ds 勾配と Fz 局在に関する数値モデルについてご紹介したい。

29

実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルにおける早期脱髄病変の解析

板東 良雄¹、暮地本 宙己²、渡部 剛²、吉田 成孝¹

¹旭川医科大学 解剖学講座 機能形態学分野

²旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野

多発性硬化症は中枢神経系における炎症性脱髄性疾患であり、炎症細胞の浸潤によって脱髄および軸索変性が生じることが知られているが、脱髄の機序に関して不明な点が多い。そこで本研究では、多発性硬化症の動物モデルとして確立されている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) モデルを用いて、髄鞘および軸索の形態学的変化について経時的に解析を行った。

C57BL/6 雌マウス (6-8 週齢) にミエリン構成蛋白の一つである myelin oligodendrocyte glycoprotein のペプチド(MOG35-55)をアジュバンドとともに皮下に免疫することによって EAE を誘導した。その後、経時的に採取した脊髄をオスミウム浸軟法によって処理した後、走査型電子顕微鏡を用いて髄鞘や軸索を観察した。

EAE の発症は免疫後 10-12 日に末梢から中枢神経組織内への炎症細胞の浸潤に伴って認められるが、髄鞘が軸索から離れる、あるいは髄鞘の過形成などの異常な髄鞘構造が EAE 誘導後 3 日目から先行して認められた。一方、この時期には炎症細胞の浸潤等が認められなかったことから、非炎症性脱髄という新しい脱髄機序が EAE の病態形成の初期変化として重要である可能性が示唆された。

30

Tlx3 はエピジェネティック因子 CBP との相互作用によりグルタミン酸作動性ニューロンへの分化を運命づける

下村 敦司^{1,2,3}, Dharmeshkumar Patel^{2,3}, Sarah M. Wilson^{2,4}, Karl R. Koehler^{2,3}, Rajesh Khanna^{2,4}, Eri Hashino^{2,3,4} 北海道医療大学 心理科学部¹, Stark Neurosciences Research Institute², Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery³, Department of Pharmacology and Toxicology⁴, Indiana University, USA
ホメオドメイン転写因子 T cell leukemia 3 (Tlx3) は、抑制性の GABA 作動性ニューロンの分化を抑え、興奮性のグルタミン酸作動性ニューロンへの分化誘導に働く細胞運命の決定因子である。しかし、その分化運命決定メカニズムは明らかにされていない。私達は、Tlx3 がエピジェネティック因子 CREB binding protein (CBP) と、ホメオドメインを介して結合することを明らかにした。また、この Tlx3 と CBP の結合は、TALE-クラスホメオドメイン転写因子 Pbx3 により促進される。私たちは、Tlx3 を発現させた ES 細胞をニューロンへと分化させると、グルタミン酸作動性ニューロン特異的に分化することを報告した。この *in vitro* 分化系における Tlx3 と CBP の結合は、分化誘導前には起こらず、分化誘導後にのみ起こる。この時の Pbx3 の発現量は、ES 細胞の分化に伴って増加してくる。さらに、Tlx3 を発現させた ES 細胞 (Tlx3-ES 細胞) と、CBP との結合ドメインを欠失させた Tlx3 ΔHD を発現させた細胞 (Tlx3 ΔHD-ES 細胞) を使い、これらの分化能を比較した。その結果、Tlx3 ΔHD-ES 細胞のグルタミン酸作動性ニューロンへの分化能は、Tlx3-ES 細胞よりも有意に低下した。一方、Tlx3-ES 細胞と Tlx3 ΔHD -ES 細胞のニューロンへの分化能には変化が見られなかった。以上の結果は、Tlx3 と CBP との機能的な相互作用が、脳神経系の発生過程におけるニューロンサブタイプの分化に重要な役割を担っていること、またサブタイプ特異的遺伝子の発現は、エピジェネティックな制御機構により調節を受けている可能性を示唆している。

31

視蓋の層形成における細胞移動とその制御について

渡邊 裕二、佐久間 千恵、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

脊椎動物の中脳背側部を占める視蓋は、ヒトを含む哺乳類の上丘に相当し、視覚・聴覚・体性感覚の入力を受けて感覚地図の作成・統合に機能する。胎児期に発達する視蓋の多層構造は、放射状方向および接線方向への細胞移動を介して構築される。我々は 1-5 層からなる層構造を発達させるニワトリの視蓋層形成に注目して、層形成過程における細胞移動とその制御機構について調べている。

活発な層形成が進行する発生中期に視蓋組織を GFP 標識して細胞の移動を追跡すると、視蓋中間層 (第 III 層) において、視蓋から出力する軸索をたどって接線方向に移動する細胞群を見いだした。これらの細胞は、接線方向移動の後に上層 (第 IV/V 層) で MAP2 陽性の多極性細胞に分化した。またこの多極性細胞は受容体 Neuropilin1 を発現し、そのリガンドである軸索誘導因子 Sema3A がその上層 (第 VI 層) に相補的に発現していた。これらのことから、視蓋の層形成に Sema3A-Neuropilin1 が関与することが予想された。そこで Sema3A を視蓋層に過剰発現すると、多極性細胞が反発され、第 IV/V 層から消失した。また多極性細胞が消失すると、脳室側から軟膜側への放射状方向への細胞移動が亢進して、波打った視蓋層が形成された。これらの結果から Sema3A-Neuropilin1 シグナルが視蓋層形成の制御に関与することが示唆された。

32

扁桃体基底核の内在性カンナビノイドシグナル伝達を備えた抑制性シナプスにおける VGluT₃ の共発現

大宮友貴、内ヶ島基政、渡辺雅彦
北海道大学大学院医学研究科 解剖学講座 解剖発生学分野

内在性カンナビノイド 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) は、ポストシナプス側に分布するジアシルグリセロールリパーゼ α (DGL α) を介して産生され、プレシナプス側のカンナビノイド受容体 CB1 に対して逆行性に作用することでシナプス伝達を抑制する。扁桃体基底核において CB1/コレシストキニン (CCK) 陽性バスケッ トニューロンシナプスが CB1 と DGL α を共発現し、2-AG による強力な制御を受ける。今回、この終末が 3 型小胞膜グルタミン酸トランスポーター (VGluT3) を発現することを新たに見出したので報告する。扁桃体において、VGluT3 mRNA 陽性ニューロンは基底核に分布し、CB1 mRNA 強陽性介在ニューロンの 28% と一致した。mRNA 発現と一致して、扁桃体基底核における VGluT3 陽性終末は CB1/小胞膜抑制性アミノ酸トランスポーター (VIAAT) 共陽性となる抑制性終末の一部と重なった。その一致率は細胞体で高い割合を示した。さらに、VGluT3 に対する免疫電子顕微鏡解析では、細胞体上の VGluT3 陽性の軸索終末は細胞体へ陥入する特徴的構造 (陥入型シナプス) を認めたのに対し、陰性終末では認めなかった。一方、2-AG の合成を駆動する Gq/11 共役型受容体である代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5 の分布を調べたところ、mGluR5 は陥入型シナプス周囲においてもその発現を認めた。このような形態学的基盤は陥入型シナプスにおいて VGluT3 を介して放出されたグルタミン酸がポストシナプス側の mGluR5 を活性化させることで 2-AG の合成を駆動し、プレシナプス側の CB1 を介して GABA 作動性ニューロンを逆行性に抑制している可能性を示唆する。

33

ベータ型ジアシルグリセロールキナーゼは GluR2 を介して線条体投射ニューロンの棘突起形成に関与する

○八月朔日 泰和、後藤 薫
山形大学医学部解剖学第二講座

ジアシルグリセロール (DG) キナーゼ (DGK) は、プロテインキナーゼ C の活性化因子として知られる二次伝達物質 DG をリン酸化し、フォスファチジン酸に変換する酵素である。DGK アイソザイムのうち、ベータ型 DGK (DGK β) は脳の線条体に強い発現を示す特徴を有する。我々はこれまで DGK β 特異抗体を作製し、DGK β がドーパミン D1 および D2 受容体を有する線条体投射ニューロン (medium spiny neurons (MSNs)) に発現し、興奮性シナプスを構成する棘突起のペリシナプス領域に局在することを明らかにした。さらに初代培養神経細胞を用いた実験により、DGK β がその酵素活性を介して棘突起形成に関与することを報告した。本研究では、神経細胞における DGK β の機能的役割を追求するため、DGK β ノックアウト (DGK β -KO) マウス線条体について、Golgi-Cox 法および初代培養線条体ニューロンを用いて解析を行った。また DGK β の細胞内シグナル伝達系における役割を明らかにするために、免疫沈降法を用いて結合タンパクの検討を行った。DGK β 欠失による MSNs の形態変化を検討するため、DGK β -KO マウス線条体について Golgi-Cox 法を施行した。その結果、MSNs の遠位樹状突起において野生型に比べて棘突起数の減少が認められた。一方 DGK β 欠失は、棘突起の形態的な変化に影響を与えなかった。さらに、発達段階における樹状突起および棘突起形成に与える影響を解析するため、交配により GFP を発現する DGK β -KO マウスを作製し、MSNs の初代培養を行った。培養 1 日目および 7 日目について検討した結果、MSNs の樹状突起および棘突起形成に影響は認められなかった。次に DGK β -KO マウス成体における棘突起形成異常に関与するシグナル伝達系を検討するため、線条体タンパクを用いた免疫沈降法を施行した。その結果 DGK β は、AMPA 型グルタミン酸受容体のサブユニットの 1 つである GluR2 と結合することが明らかになった。DGK β および GluR2 の結合アッセイの結果、GluR2 は DGK β のカルボキシル端側と結合することが明らかになった。以上より DGK β は MSNs において、GluR2 を介して棘突起形成に関与する可能性が示唆された。