日本解剖学会

第69回中国・四国支部学術集会

会期：平成26年10月25日（土）、26日（日）

会場：広島大学霞キャンパス広仁会館

特別講演

パーキンソン病の発症原因について

○太田 茂

広島大学大学院医歯薬保健学研究院生体機能分子動態学

神経難病の中でも重要な位置を占めるパーキンソン病は、わが国の有病率は人口10万人につき約100人と推定され罹患率の高い疾患といえる。パーキンソン病の中で一番症例が多い孤発性パーキンソン病についてはある種の遺伝的素因が発症に関与することは認められているものの、その影響は大きくなく、発症に環境因子が大きく関与していると考えられている。今から約25年前にMPTPという合成麻薬の副産物がパーキンソン病に酷似した病理学的、生化学的、行動学的変化をもたらすことが明らかにされて以来、MPTPに化学構造や作用の似た化学物質が孤発性パーキンソン病の原因物質として考えられるようになったが、脳内濃度付近においても毒性を発現し発症を引き起こす化合物の特定には至っていない。

一方で遺伝的要因が深く関与している家族性パーキンソン病についてはその原因遺伝子のいくつかの解明されているものの、パーキンソン病全体からすると1割弱の頻度であり、遺伝子の解析のみで発症課程の全体像が捉えられるには至らない。そこでパーキンソン病の発症機構解明のためには、遺伝因子と環境因子の相互作用に関して多段階からの検討を一層強化すべき時期であると考えられる。

本講演ではパーキンソン病発症について特に環境因子に注目し、最近の知見を踏まえて紹介したい。また、環境因子として我々が提唱している脳内性化合物群についても触れ、それらによるパーキンソニズム発症機序について家族性パーキンソン病発症機序と対比しながら紹介したい。

1 ニワトリ胚とマウス胚の部域特異的中軸骨格形成の比較

広島大学大学院医歯薬学総合研究科¹⁾、医歯薬保健学研究院²⁾、医歯薬保健学研究院³⁾ 解剖学及び発生生物学研究室

○増田佑¹⁾、志村菜穂子²⁾、坂本信之³⁾、青山裕彦³⁾

脊椎動物の中軸骨格は、発生初期には互によく似た体節という繰り返し構造から分化し、それぞれ部域ごとに特徴的な形態を有するようになる。頸椎・胸椎および肋骨・腰椎・仙椎における相同性を明らかにすることにより、形態形成の部域特異性を椎骨および肋骨のどの領域に求めるべきかを知ることに本研究の目的である。一方、軸骨格の部域特異性は系統発生の過程でも変化する。ほ乳類と鳥類はいずれも肋骨が胸部に局限しているが、この分化は系統発生上独立に生じたものである。胸部形成の系統発生上の必然性（平行進化の機構）をニワトリとマウス間で軸骨格形成の個体発生を比較することで追究したい。

椎骨の3つの領域（椎体、肋骨及び肋骨相同部位、椎弓）について、その軟骨形成・骨化を観察した。ニワトリ8日胚・マウス14.5日胚では、将来の頸椎横突起腹外側部に独立した軟骨形成が認められ、胸部における肋骨形成との相同性が示唆される。さらに発生の進んだ頸椎原基の組織標本で一過性に不連続領域が認められ、肋椎関節形成過程との相同性が示唆された。また、この3領域の骨化の過程を観察した。ニワトリ胚の椎体と肋骨及びその相同部位では、頸部と胸部とに骨化の開始点が見られたのに対し、マウス胚では胸部で始まった骨化が順次、頸部まで進行した。鳥類の頸椎にはほ乳類のものとは異なる要素が加わっているのかもしれない。

2 マウス胎児中腸の腸管上皮細胞数は吻尾軸方向に沿って変化する

○倉本 純子¹⁾、小川 典子¹⁾、古屋 智英¹⁾、松本 暁洋¹⁾、八田 稔久²⁾、大谷 浩¹⁾
¹⁾島根大学医学部解剖学講座発生生物学、²⁾金沢医科大学解剖学講座 I

【背景】腸管は器官形成期に急速に伸長する。その機構には、細胞増殖、細胞死、細胞分裂軸の調節、Convergent Extension (収斂伸長) など多様な現象が関与していると考えられる。それらの現象を解析する最も基礎的な情報として、細胞数の計測が必要である。

【目的】本研究では、マウス胎児中腸の腸管上皮細胞数の変化を吻尾軸に沿って検討した。

【方法】胎生15.5日のC57BL/6Jマウス胎児腸管の5μmパラフィン連続横断切片を作成した。胃腸移行部から盲腸までの横断切片を、腸管上皮細胞核に特異的なCaudal-type homeobox protein2 (CDX2) に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、3,3'-Diaminobenzidineにより発色をさせた。細胞数は、1mm間隔の5μm厚の横断切片をStereo Investigator (MBF Bioscience Japan) を用いて計測し、ステレオロジー解析を行った。

【結果】中腸の1切片あたりの細胞数は、吻尾軸に沿って変化した。吻側が最も多く、尾側に向かって少ない傾向にあった。

【考察】マウス胎児の中腸の腸管上皮細胞数は吻尾軸に沿って異なり、中腸の発生過程において多様な現象が関わる形態的様相が異なることが示唆された。

3 マウス中胚葉由来組織である尿管の発生過程において Interkinetic nuclear migration (INM) が存在する

○元矢 知志¹⁾、新田 哲哉¹⁾、Rafiq Ashiq Mahmood¹⁾、Jahan Esrat¹⁾、小川 典子¹⁾
古屋 智英¹⁾、松本 暁洋¹⁾、宇田川 潤²⁾、大谷 浩¹⁾

¹⁾島根大学医学部解剖学講座発生生物学、²⁾滋賀医科大学解剖学講座生体機能形態学部門

【背景】幹細胞増殖調節機構として、外胚葉由来の神経上皮細胞の発生過程において頂表面(apical side) から基底面(basal side) の間を頂底軸に沿って、細胞核が細胞周期と同期して移動する Interkinetic nuclear migration (INM) が提唱されている。我々は多くの器官の基盤的構造である上皮管腔組織に着目し、以前に内胚葉由来組織であるマウス胎仔の中腸においても頂底軸に沿った核移動が認められることを報告した。【目的】本研究では中胚葉由来の上皮管腔組織である尿管に注目し、発生過程において INM が存在するか検討した。

【方法】C57BL/6Jマウスの母獣に embryonic day (E) 11.5, E12.5, E13.5の時点で bromodeoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与し、それぞれ1, 2, 4, 6, 8, 10, 12時間後にマウス胎仔を採取した。固定・薄切後、免疫組織化学染色を行った。各時間におけるマウス胎仔尿管上皮のBrdU陽性細胞の頂底軸に沿った核位置を計測し、核位置の分布パターンの変化を多次元尺度構成法により解析した。

【結果】いずれの日齢においても INM 特有の核移動を示す分布パターンの変化が認められ、日齢により分布パターンは異なっていた。【考察】中胚葉由来組織である尿管上皮においても INM 特有の核移動が確認され、その移動様式は日齢により異なることが示唆された。

4 線維芽細胞増殖因子 (FGF) 10 がマウスの頭蓋顎顔面骨格系の形態形成に与える影響

○香川和子^{1,2)}、吉岡広陽²⁾、呉本晃一¹⁾、竹井悠一郎²⁾、南崎朋子²⁾、津賀一弘¹⁾、吉子裕二²⁾

¹⁾ 広大院医歯薬保 先端歯科補綴、²⁾ 広大院医歯薬保 硬組織代謝生物

線維芽細胞増殖因子(FGF)10は上皮-間葉相互作用における間葉因子として知られ、肺、肢芽などの形態形成に預かる。FGF10シグナルの異常は涙腺や唾液腺の無形成、口唇口蓋裂などに関与することが報告されているが、FGF10が頭蓋顎顔面の形態形成に与える影響は未だ不明な点が多く残る。そこで我々は、ドキシサイクリン(Dox)誘導性に*Fgf10*を過剰発現する(*Fgf10* OE)胎仔または新生仔マウスを作製し、骨格系に対する影響を検討した。妊娠12日からDoxを投与したマウスより生まれた*Fgf10* OE新生仔は、体長に比較して吻が短く、頭蓋顎顔面を主体とした劣成長を伺わせた。同新生仔の骨格標本を作製したところ、四肢、椎骨には特に異常を認めなかったが、鼻骨および前上顎骨、下顎骨は吻尾方向に短く、口蓋裂を伴った。特に、際立った所見として下顎頭軟骨の矮小化を認めた。また、胎齢18.5日の*Fgf10* OE胎仔について組織学的に精査したところ、下顎頭軟骨、鼻中隔などの肥大軟骨細胞層の発達が抑制されていることを確認した。さらに、同胎仔の下顎頭軟骨からRNAを抽出し、遺伝子発現を定量的に解析した。野生型マウスと比較し、*Fgf10* OE胎仔では*Fgf10*の発現上昇を認めた。一方、軟骨の分化マーカーであるII型およびX型コラーゲンの発現は減少していた。これは、過剰なFGF10が下顎頭軟骨細胞の分化を負に制御することを示唆している。以上のことから、FGF10がマウス胎生期における頭蓋顎顔面の骨・軟骨形成制御の一端を担う分子であると考えられた。

5 プロテインホスファターゼ PP2A Caは、脂肪細胞分化に関与する

○岡村裕彦、Yang Di、寺町順平、羽地達次
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・口腔組織学分野

PP2A は細胞の分化・増殖やアポトーシスに関与するセリン/スレオニンプロテインホスファターゼである。今回我々は、脂肪細胞分化における PP2A の触媒サブユニット(PP2A Ca) の役割について検討した。[方法] 1. 分化誘導培地で培養したマウス間葉系前駆細胞 C3H10T1/2 と脂肪前駆細胞 3T3-L1 からサンプリングを調整し、PP2A Ca の発現および PP2A の活性を調べた。2. PP2A Ca の発現を抑制した C3H10T1/2 細胞(shPP2A) を樹立し、リアルタイム PCR、Oil red O 染色、Triglyceride assay を用いて、脂肪細胞分化能を調べた。3. 脂肪細胞分化に関わる転写調節因子 PPAR γ の発現を siRNA 導入により抑制し、shPP2A 細胞の脂肪細胞分化能を評価した。4. shPP2A 細胞での Wnt/GSK-3 β /catenin 経路の役割について、ウエスタンブロットを用いて検討した。[結果と考察] PP2A Ca の発現および PP2A 活性は脂肪細胞分化に伴って低下した。shPP2A 細胞では PPAR γ 、C/EBP α および Adiponectin 等の脂肪分化マーカーの発現が増加し、脂肪細胞分化能が亢進していた。PPAR γ の発現抑制により shPP2A 細胞の脂肪細胞分化能が抑制された。shPP2A 細胞では、Wnt10b 発現の低下、GSK-3 β 活性の増加、 β -catenin の活性の低下が認められた。GSK-3 β 阻害剤は shPP2A 細胞における脂肪分化マーカーの発現と分化能を抑制した。以上の結果から、PP2A Ca は、PPAR γ を含む転写調節因子の発現と Wnt/GSK-3 β /catenin 経路を介して脂肪細胞分化を調節する重要な因子であると考えられる。

6 肝 Kupffer 細胞における FABP7 発現調節メカニズムの検討

○児玉孝憲^{1,2} 宮崎啓史² 澤田知夫² 徳田信子¹ 大和田祐二²

山口大学大学院医学系研究科保健学専攻¹
山口大学大学院医学系研究科器官解剖学分野²

【背景・目的】脂肪酸結合蛋白質 (FABP) は長鎖脂肪酸を可溶性、運搬するキャリア蛋白質である。FABP には空間的・時間的に異なる発現を示す 12 種類のサブタイプがあり、脂肪酸の代謝、シグナル伝達や転写制御に関与している。これまで我々は肝マクロファージ (Kupffer cell: KC) に発現する脳型 FABP (FABP7) が、肝障害過程で KC のサイトカイン産生および食能制御に関与することを明らかにした。しかし KC における FABP7 発現調節メカニズムは未だ不明である。本研究では KC における FABP7 の発現について、発達期肝臓および薬剤による KC 除去モデルを用いて検討を行った。

【結果・考察】F4/80 免疫染色を行ったところ、出生後 0 日目 (P0) から 10 日目 (P10) のマウス肝臓における KC の数は 10 週齢マウスと有意な差はなかった。FABP7 陽性 KC は、P0 肝では認められないものの、P4 肝より観察され、P10 肝ではほぼすべての KC が FABP7 を発現していた。また、10 週齢マウスに対し clodronate-liposome を投与し KC を除去したところ、新たに単球より分化したマクロファージは肝臓内で FABP7 を発現することが確認された。以上の結果から KC における FABP7 の発現は、授乳や食餌などによる肝臓内の脂質環境変化により誘導されることが示唆された。

7 脳型脂肪酸結合蛋白質はヒストン修飾を介して caveolin-1 遺伝子発現を制御する。

○香川慶輝¹、大和田祐二¹

¹山口大学大学院医学系研究科器官解剖学

【背景】近年、細胞内脂質環境がヒストン修飾などのエピゲノムに関与することが注目されている。脂肪酸結合蛋白質 (FABP) は多価飽和脂肪酸 (PUFA) に結合、可溶性化し、そのキャリアーとして働くことで細胞内の脂質動態を調整する。FABP7 は n-3 PUFA に強い親和性を持ち、発達期の脳アストロサイトに強く発現している。これまで我々は FABP7 が脂質ラフトの骨格蛋白質である caveolin-1 の発現を介して、アストロサイトの脂質ラフト形成を制御し、外部刺激応答を調節していることを明らかにした。今回我々は、FABP7 がどのように caveolin-1 遺伝子の発現に関与しているかをエピゲノムの変化に焦点を当て検証した。

【方法・結果】FABP7 を過剰発現させた NIH-3T3 細胞株では caveolin-1 の蛋白質、遺伝子発現が増加し、ルシフェラーゼアッセイによりそのプロモーター活性が増加することが明らかになった。H3K27ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により FABP7 過剰発現株では caveolin-1 プロモーター領域のヒストンアセチル化レベルが増加することが明らかになった。FABP7 遺伝子欠失 (FABP7-KO) アストロサイトでは caveolin-1 プロモーター領域のヒストンのアセチル化レベルが低下していた。さらにバイサルファイトシークエンス解析で、FABP7-KO アストロサイトは、野生型に比べ、caveolin-1 プロモーターにメチル化されている CpG 配列を多く含むことが明らかになった。

【考察】FABP7 によって調節される脂質恒常性が、エピゲノム修飾を介して遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

8 ヒト神経培養細胞株を用いたプロサポシンの神経保護作用の解析

鍋加 浩明¹、下川 哲哉¹、松田 正司¹
¹愛媛大・院医・解剖学・発生学

プロサポシンはサポシン A、B、C、D の前駆体タンパク質であり、リソソーム内でタンパク質水解性に切り出されて各サポシンを生ずる。各サポシンはスフィンゴ脂質のリソソームでの分解に関与する。一方、神経系においてプロサポシンはサポシンの前駆体物質であるだけでなく、プロサポシン自体が分泌性蛋白質として機能する。プロサポシンは神経栄養因子であると同定されており、神経細胞の成長や保護、再生を促進すると報告されている。しかしながらその詳細は未解明であり、プロサポシンの神経保護作用を解明していく事は医学的にも重要である。

本研究ではヒト神経培養細胞株 SH-SY5Y にプロサポシンペプチド及びカイニン酸 (Kainic Acid) を投与し、Caspase 3 活性を測定する事により細胞障害及びプロサポシンの神経保護作用を評価した。カイニン酸は回虫駆除剤として用いられる海人草 (カイニンソウ) から抽出されたグルタミン酸骨格を含む興奮性神経活性アミノ酸である。

プロサポシンの神経保護作用の仕組みは未解明であるが、本研究を通してプロサポシンの機能解明が進む事が期待される。

9 ライセルイメーシングによる細胞膜修復を行う小胞膜の起源についての検討

○三宅 克也、江上洋平、川合克久、荒木 伸一(香川大・医・組織細胞生物)

細胞膜は運動などの生理的負荷により常に傷ついている。この膜損傷部から流入するカルシウムイオンが、細胞内小胞を融合させながら exocytosis を引き起こし、損傷部へ膜を供給して膜修復を行うと考えられている。この膜修復を行う細胞内の小胞膜の起源として、血管内皮細胞では輸送小胞、ウニ卵では卵黄顆粒、線維芽細胞ではライソソーム、消化管粘膜上皮では粘液顆粒、骨格筋線維では T 細管など様々な報告がされている。このように、膜修復を行う細胞内の小胞膜の起源は混沌としている。我々は、細胞内小器官および小胞の膜輸送にかかわる GFP タグをつけた Rab1b、-4A、-5A、-7、-11、-20、-23、-24、-34、-35、LC3、lgp120、glut4、KDEL、Sec61 β 、ミトコンドリアおよび細胞膜マーカーを培養細胞 (BS-C-1) に発現させ、二光子レーザーにより細胞膜を損傷し、その修復過程における膜動態を観察した。その結果、FM 色素などによって損傷部への小胞膜供給はみられたが、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクルエンドソーム、ゴルジ体、オートファゴソーム、ライソソーム、小胞体、ミトコンドリア、ならびに細胞膜を標識する GFP の明瞭な膜供給は観察することができなかった。Ca²⁺依存的に膜修復を行う小胞は、既知の細胞内小器官とは異なる起源を持つ可能性も示唆された。

10 Klotho 欠損マウス腎臓のイメージング質量分析

○藤野陽子^{1,2}、南崎朋子²、宮脇聡子³、川上朝子⁴、宮地孝明⁴、櫻井薫^{2,5}、竹井悠一郎²、吉岡広陽²、香西克之³、岡田貢¹、吉子裕之²
広島大学大学院医歯薬保¹障害者歯科学²硬組織代謝生物学³小児歯科学³広島大学歯学部歯科学⁵岡山大学自然科学生命科学研究支援センター

イメージングマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析 (MALDI-TOF MS) は、生体組織の凍結切片から得られた MS スペクトルを組織上でイメージングする技術 (IMS) である。これまで、IMS によるタンパク質など高分子を同定した事例はほとんどない。そこで、野生型および Klotho 欠損 (ヒト老化モデル) マウス腎臓を用い、Klotho 欠損に伴って分布の変動するタンパク質を IMS で同定することを試みた。

新鮮凍結切片を伝導性スライド上で乾燥後、エタノールで洗浄し、減圧乾燥させた。次いでマトリックス (0.1%シナピン酸 TFA-アセトニトリル (1:1) 飽和溶液) を蒸着し、Bruker ultrafleXtreme にて 40,000 m/z 以下のスペクトルを flexImaging で解析した。その結果、特定の分布を示し、かつ Klotho 欠損に伴って変動するスペクトルが多数得られた。隣接切片をトリプシン消化した後、測定範囲 600-6000 m/z において解析したところ、良好なスペクトルを確認した。そこで、トリプシン消化した切片を 0.1% TFA により抽出し、EASY-nLC (C18 カラム、移動相 A: 0.1% TFA, 移動相 B: CH₃CN) を用いて MS/MS 解析し、MASCOT サーチにより切片に含まれるタンパク質を推定した。この結果をトリプシン消化した切片の IMS に反映させ、特徴的な分布を示すタンパク質を得た。

以上、Klotho 欠損マウスの腎臓切片を IMS により網羅的に解析した結果、Klotho 欠損に伴って組織特異的に変動するタンパク質が得られたものと思われる。

11 理学および作業療法学科学生への効果的な人体解剖見学実習の試み

○津森登志子・県立広島大学保健福祉学部看護学科

県立広島大学保健福祉学部では、理学・作業療法学科2年生(各30名)の前期に解剖実習(90時間)を行い、発表者を含む教員2名で担当している。本実習では骨学・組織学実習に加え、本学前身の広島県立保健福祉短大時代に準備されたブタとニホンザルの標本を用いた肉眼解剖実習も行っている。この肉眼解剖実習は、前期終了後の夏休み期間中に広島大学医学部で受け入れていただいている人体解剖見学実習の前準備としての位置づけも含む。コメディカルの学生にとって貴重な、しかし短時間の見学実習をいかに効果的に行うことができるかは重要な問題である。本発表では、今年度から実施した理学・作業療法学科対象の解剖実習の内容と、それを人体解剖見学実習につなぐ工夫について紹介する。さらに、見学実習後に実施した学生へのアンケート調査から、全員が視診だけでなく触診も行いつつ意欲的に実習を行ったこと、事前に学習目標を立て、それに従って実習に役立つ資料を作成して臨んだこと、そのことで有意義な実習を行えたことによる満足感を得ていたことなどが明らかになったので併せて報告する。

12 就実大学薬学部生5名の解剖実習～その1:自律神経系について～

○洲崎悦子¹、木瀬なつみ¹、木下深¹、山川直樹¹、石村和敬²、隅田寛³、青山裕彦⁴

¹就実大学薬学部、²広島女学院大学人間生活学部、³広島国際大学保健医療学部診療放射線学科、⁴広島大学医歯薬保健学研究科解剖学および発生生物学

就実大学薬学部5年生5名が広島大学医学部で3日間の解剖実習を行った。2グループに分かれて腹部血管系と自律神経系の解剖を行った。自律神経系の解剖を行った御献体については、大動脈からの分岐の変異も観察された。

まず、頸部を解剖し、内頸静脈と総頸動脈の間に迷走神経を、前斜角筋の前面に横隔神経を見つけ、各々を胸部へ向かって解剖した。迷走神経については、反回神経の分岐や食道神経叢を確認した。次に、脊髄の右側において交感神経幹を解剖し、大内臓神経と小内臓神経を確認した。これらをさらに腹部へと辿って腹腔動脈周囲の神経叢まで確認した。しかし、胸部及び腹部の諸器官の癒着が激しく、腹腔神経節は見つけることができなかった。一方で、交感神経幹を頸部へと辿り、鎖骨下動脈下縁で頸胸(星状)神経節を、さらに総頸動脈内側の深部に椎骨動脈神経節を観察した。

また、大動脈弓からの血管の分岐に変異が観察され、腕頭動脈から右の総頸動脈と鎖骨下動脈が分岐するが、腕頭動脈の基部を共有する形で左総頸動脈が分岐をしていた(存在比率13%)。その左方から、左鎖骨下動脈は大動脈弓から直接分岐をしていた。発生学的に総頸動脈は第3大動脈弓由来とされるが、全ての部分が第3大動脈弓由来ではなく、基部は大動脈弓遠位部に由来していると考えられる変異であった。

その他の所見として、頭蓋腔と腹腔とをつないで脳脊髄液を排出するためと思われるチューブが留置され、胃瘻も造設されていた。発生学的にも臨床的にも非常に参考になる観察ができた。

13 就実大学薬学部生5名の解剖実習～その2:腹部血管系について～

○仲宗根輝俊¹、福島有夏¹、領家洋美¹、洲崎悦子¹、隅田寛²、青山裕彦³

¹就実大学薬学部、²広島国際大学保健医療学部診療放射線学科、³広島大学医歯薬保健学研究科解剖学および発生生物学

就実大学薬学部5年生5名が広島大学医学部で3日間の解剖実習を行った。2グループに分かれて腹部血管系と自律神経系の解剖を行った。腹部血管系の解剖は今年度4年目となり、変異に気付くように解剖を試みた。

腹部の血管系として、腹腔動脈、上腸間膜動脈、下腸間膜動脈、及び静脈門脈系を解剖した。腹腔動脈は、左胃動脈、脾動脈、総肝動脈に分岐をしていたが、総肝動脈の分岐が通常とは異なっていた。まず、胃十二指腸動脈と胆嚢動脈に分岐し、前者から右胃動脈と固有肝動脈が分岐しており、通常は固有肝動脈の右枝から分岐する胆嚢動脈が、本例では固有肝動脈とは独立して分岐するという珍しい例であった(存在比率2%)。また、左胃動脈から左副肝動脈、上腸間膜動脈から右副肝動脈が分岐し、2つの副肝動脈をもつという変異が観察された(存在比率4~6%)。

上腸間膜動脈については、中結腸動脈と右結腸動脈が共通幹として分岐をした後、各々へと分岐をしていたのに対し、回結腸動脈は単独の枝として分かれていた。下腸間膜動脈は、左結腸動脈、S状結腸動脈、上直腸動脈を各々分岐していた。さらに、左結腸動脈は、中結腸動脈と合流していた。なお、腹部の主な静脈については、通常に分岐であった。

その他の所見として、下行-S状結腸に非常に多くの憩室が観察された。また、処女で動脈硬化が生じており、上行大動脈壁には石灰化を伴うアテロームが見られた。

人体について多くのことを学んだ解剖実習となった。

14 内耳機能模型の製作

○養田芽萌理¹、生田奈津美¹、下江宰司²、里田隆博²

¹広島大・歯・口腔健康科学科口腔工学専攻4年生

²広島大・院・医歯薬保健学・口腔健康科学

内耳の構造と機能は非常に複雑である。鼓膜に伝わった音の振動はツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨と伝わる間に増幅され、前庭窓から外リンパの液体の振動として、前庭階を通過して蝸牛階に伝わり、第二鼓膜から鼓室に放散される。その際、蝸牛管のラセン器の基底膜の振動を引き起こす。また平衡感覚は、卵形嚢と球形嚢により、それぞれ水平方向、垂直方向の加速度、および三半規管により、回転の加速度を感じる。今回、この内耳の仕組みを説明するために模型を作製した。模型は、骨の外形を木材を芯として紙粘土にて作製した。膜迷路に相当する構造は、青色の布で表現した。アブミ骨からの音の振動は、チューブを使い、ワイヤーの振動として第二鼓膜に伝わるようにした。また、蝸牛の構造は、蝸牛神経を芯として、蝸牛管および音の振動を表すチューブを蝸牛神経に巻きつけることにより表現した。卵形嚢と球形嚢の平衡斑はブラシの上に砂を張り付けることにより表現した。また、三半規管の構造は、内リンパの流れをワイヤーの外を内リンパに相当するチューブが動くことで表現した。膨大部の内面には、膨大部襞をブラシを使って表現した。この模型により内耳の構造と機能をうまく説明することができた。

15 操作しやすい嚥下模型の製作

○生田奈津美¹、養田芽萌理¹、下江宰司²、里田隆博²

¹広島大・歯・口腔健康科学科口腔工学専攻4年生

²広島大・院・医歯薬保健学・口腔健康科学

嚥下の仕組みは非常に複雑である。咽頭は空気と食塊が交差するが、ヒトでは特に咽頭という空間が広いので、空気の流れを完全に遮断して、食塊を嚥下する。嚥下反射は食塊が奥舌に達すると起こる。嚥下反射は軟口蓋が挙上し鼻咽腔閉鎖の後に、口腔閉鎖、声門閉鎖の状態、咽頭収縮筋が上から順に収縮し、舌骨上筋群の収縮と甲状舌骨筋の収縮が起こり、喉頭全体が前上方に持ち上げられる。その結果、喉頭蓋は舌根に押されて倒れ、食道入口部が開き、この部位に陰圧が生じることにより、食塊は咽頭収縮筋により押し出されると同時に、食道の中に引きこまれる。ご遺体を使った解剖学実習では、この喉頭の動きを再現することはできない。またCGを使った教材が、三次元的に見えたとしても、それは画面の中である。今回、この複雑な嚥下の仕組みを誰でも操作できるように、二つのレバーを操作することにより、表現できる模型を作製した。模型は、脊柱に相当する柱に水平にレールを取り付け、このレールにより、舌と軟口蓋が同時に動くようにした。また、この柱の前後にレールをつけ、これをワイヤーにて連結し、後ろのレールを押し下げることにより、前のレールが上がるようにした。後ろのレールでは、咽頭収縮筋の収縮を表した。また、前のレールでは、喉頭の上昇を表現させた。この模型により嚥下の仕組みがうまく説明することができた。

16 骨格筋特異的カルパイン-3の膜損傷時における動態

○馬場智朗¹、三宅克也¹、川合克久¹、秦勝志²、大内史子²、反町洋之²、荒木伸一¹(¹香川大・医・組織細胞生物、²都医学研・生体分子先端)

カルパインはCa²⁺依存性細胞内プロテアーゼであるが、その活性に必要な濃度は細胞質内の生理的濃度を遙かに超えている。一方、骨格筋線維は生理的負荷により常にその細胞膜は傷つき修復を繰り返している。この膜損傷部から細胞質内へ流入するCa²⁺は生理的濃度を遙かに超え迅速なexocytosisを引き起こし、損傷部へ膜を供給して瞬時に膜修復を行う。また、培養細胞の膜修復ではμ-カルパインが必要不可欠と示されているが、カルパイン-3と骨格筋線維の膜修復との関係はよくわかっていない。本研究では、GFP-カルパイン-3(野生型, WT)およびカルパイン-3不活性プラスミド(不活性型) C129Sをマウス骨格筋線維に遺伝子導入し、二光子レーザーによって損傷してカルパイン-3の動態を確認した。その結果、筋線維内に発現したカルパイン-3は、WT, C129Sどちらもαアクチンの間に局在し縞状構造を呈していた。カルパイン-3(WT)は、損傷後5分~15分で損傷部周辺において縞状構造は崩壊し拡散したが、カルパイン-3を不活性にしたC129Sは損傷5分後も縞状構造を維持した。このことは損傷部から流入した高濃度のカルシウムがカルパイン-3に結合し活性を示したと考えられた。しかしながら、WTまたはC129Sを導入した骨格筋線維でも細胞膜は修復された。また、カルパイン-3-KOマウスの骨格筋線維でも膜修復は行われた。

17

脳発達期の母子分離は海馬 BDNF 発現とその下流シグナルを低下させる

○加地 智洋¹、太田 健一²、鈴木 辰吾²、割田 克彦²、三木 崇範²¹香川大学医学部(医学科3年)、²香川大学医学部神経機能形態学

発達期の脳は可塑性に富むばかりでなく、ストレス等の環境有害因子に対して脆弱である。この時期の神経回路網形成はその後の高次機能獲得に重要な意義を有する。我々はこれまで、生後早期の母子分離が成熟後の記憶・学習能を低下させることを報告してきた。先行研究で得た記憶・学習能低下は、母子分離によるストレスが海馬の神経栄養因子の動態に影響を与えた事に起因しているのではないかと考え、神経回路網形成に重要な役割を担う因子の一つである脳由来神経栄養因子(BDNF)とその下流シグナルを海馬で解析した。

生後2日から20日まで母子分離したラット仔の海馬を採取し、real-time PCR及びwestern blotにて解析した。7日齢において、BDNFの高親和性受容体TrkBの発現には変化が認められなかったがBDNF自体の発現が低下していた。しかし10,14,21日齢ではBDNF、TrkB発現に有意な変化は認められなかった。更に、7日齢においてBDNFの下流シグナルを解析すると、Erk1/2のリン酸化が低下しており、このシグナルに転写・発現が制御されているEgr-1, ArcのmRNA発現も低下していた。

ラット7日齢は海馬の神経回路網形成に重要な時期であり、BDNFが神経発達に深く関与する時期であることを鑑みると、母子分離によるこの時期の海馬におけるBDNFシグナルの低下はたとえ一過性であっても神経回路網形成に大きな影響を与え、成熟後の記憶・学習能低下の原因となっている事が示唆される。

18

ラット骨格筋、膵臓と小腸の毛細血管血流調節

○黒瀬智之¹、前田久²、川真田聖一¹¹広島大学 大学院医歯薬保健学研究院²社会福祉法人こうほうえん 錦海リハビリテーション病院

内皮細胞と特異的に結合するトマトレクチン(*Lycopersicon esculentum* lectin)を使い、構造と機能が大きく異なる骨格筋、膵臓と小腸で、血流のある毛細血管の割合(毛細血管開通率)を比較した。8週齢雄ラットを麻酔後、人工呼吸しながら開胸し、心臓から生理的食塩水で2倍希釈したFITC標識トマトレクチン(1mg/ml)を200 μ 注射し、全身に循環させてから3分後に鉗子で心停止させた。実験中、右下腿は37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C内に保った。右下腿の筋(ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋)、膵臓と小腸を採取し、急速凍結して厚さ10 μ mの凍結切片を作製して、蛍光二重免疫染色を行った。抗FITC抗体でトマトレクチンが結合した血管を染め、続けて抗PECAM-1抗体で全血管を染めた。蛍光顕微鏡Biorevo BZ-9000で、切片の中央を写真撮影し、顕微鏡付属の画像解析ソフトBZ-IIの感度を補正後、PECAM-1陽性血管数に対するトマトレクチン陽性血管数の割合を求めて、毛細血管開通率とした。全ての筋、膵臓と小腸の毛細血管開通率は非常に高かった。下腿の温度が変化して血流量が変わっても、20-40 $^{\circ}$ Cの範囲で骨格筋の毛細血管開通率は有意差がないことから、個々の毛細血管の血流量が変化すると考えられている。骨格筋、膵臓と小腸は構造や機能が異なるにもかかわらず毛細血管開通率が一律に高かったため、膵臓と小腸でも個々の毛細血管の血流量が変化して血流を調節することが示唆された。

19

ヒトの手の小動脈壁における弾性線維構築の走査型電子顕微鏡観察

○木戸真由子、品岡玲、百田龍輔、小阪美津子、大塚愛二

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科人体構成学分野)

血管壁の弾性線維は弾性の保持やリモデリングに関与するといわれ、動脈硬化などの病態に深く関わり、その立体構築の理解は重要である。これまで血管壁の弾性線維構築の走査型電子顕微鏡観察は大動脈などの太い血管に限られていたが、当研究室では胃酸消化法と血管鋳型法を組み合わせて、ラットで微小血管壁の弾性線維構築を報告した(Shinawa et al., 2013, Microsc. Microanal. 19)。本研究ではこの方法を応用して、ヒトの微小血管における弾性線維構築の3次元の構造解析を試みた。

本実験はホルマリンで固定後アルコール脱水したご遺体(日本人女性)の橈骨動脈・尺骨動脈終末部から血管鋳型樹脂を注入し、試料を硝酸にて消化して走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、ヒトの微小血管における弾性線維構築はメッシュ状の構造をしており、直径約50nmの線維が束となって構成されていた。その弾性線維構築を詳細に観察すると共に、ラットの微小血管における弾性線維構築と比較して解析している。

20

舌下動脈の走行に関する肉眼解剖学的研究

○益井 孝文、関 伸一郎、角田 佳折、山下 菊治、

アルダルツォゴト・ドルゴルスレン、北村 清一郎

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面形態学分野

本研究はヒト舌下動脈の走行分類を目的としたもので、54遺体103側を用い、口腔底と舌に分布する動脈と、それに関連する顔面動脈近位部ならびにオトガイ下動脈の全走行を肉眼解剖学的に調査した。

舌下動脈の走行は、舌骨舌筋に対する内側走行型と外側走行型、および顎舌骨筋貫通型の3つに分類され、さらに9つの亜型に細分された。内側走行型では通常の舌動脈走行を示す1亜型のみが見られ、通常型とみなした。外側走行型と顎舌骨筋貫通型は、舌下動脈が顔面動脈やオトガイ下動脈から分枝するもので、それぞれ4亜型あり、合わせて非通常型とみなした。103側中、通常型を60側、非通常型を43側観察し、非通常型での内訳は外側走行型が21側、顎舌骨筋貫通型が22側であった。男女差にみると、男性56側では通常型26側で非通常型30側、女性47側では通常型34側で非通常型13側と、女性では通常型が多いのに対し、男性では非通常型が多かった。左右では顕著な差は見られなかった。左右ともに観察できた49側では、左右ともに通常型が23側、一側のみ通常型が10側、左右ともに非通常型が16側で、左右の一致が通常型のみならず非通常型においても多く見られた。また、舌下動脈の分枝は舌動脈とオトガイ下動脈の太さを有意に大きくした。

本研究では従来報告のなかった外側走行型の舌下動脈を観察することができた。また、舌下動脈の詳細な走行分類は、舌動脈の造影後解析や口腔底出血時の結紮部位などを考える際に重要な情報を提供すると考えられる。

21

カニクイザルの大脳発達における脳溝長の変化

○坂本和仁¹、澤田和彦²、坂田ひろみ¹、今井統隆¹、福西克弘¹、福井義浩¹¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 機能解剖学分野²つくば国際大学 医療保健学部

ヒトでは大脳皮質の形態に左右非対称性が認められるが、近年、種々の精神発達障害と大脳皮質の非対称性に関連があることが報告されている。我々は、系統発生学上ヒトに近い実験動物であるカニクイザルで、胎生期の脳溝形成過程および成獣での領域特異的な脳溝長の左右差について解析を行った。本研究では、カニクイザルの生後発達過程における主要脳溝長の変化を観察し、各脳溝長で左右差が確立される時期を検討した。

生後0, 3, 12, 24ヵ月齢、および成獣の雄カニクイザルの脳を用い、脳重量、前頭後頭極長、シルビウス溝周囲領域での半球幅、主要脳溝の長さを計測した。また、Asymmetry Quotient [(R-L)/(R+L)×0.5]を用いて脳溝長の左右差を評価した。その結果、脳重量、前後長、半球幅は、3ヵ月齢で成獣と同レベルに達した。主要脳溝の長さは3ヵ月齢でピークとなり、その後、緩やかに減少した。また、成獣においては、弓状溝長には右偏側性が、中心溝長および頭頂間溝長では左偏側性が認められたが、生後0~24ヵ月齢では、これらの側性に一定の傾向はみられなかった。以上より、雄カニクイザル脳は、生後3ヵ月で成獣と同程度の大きさになるが、主要脳溝長における成獣様の左右非対称性は生後24ヵ月以降に明瞭になることが示唆された。

22

高炭酸ガス負荷による呼吸促進路を遺伝子改変マウスを用いて機能形態学的に解析する

○横田茂文¹、Kaur S.²、Vanderhorst V.G.²、Saper C.B.²、安井幸彦¹、Chamberlin N.L.²¹島根大学医学部解剖学講座神経形態学²ベイスラエル病院・ハーバード医学校

橋の結合腕傍核は高炭酸ガス負荷に対する呼吸促進に重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、まず、頸動脈小体からの入力線維が終止する孤束核において、高炭酸ガス負荷によって活性化されるニューロンの分布様態と化学的性質をFosに対する免疫組織化学とin situ hybridization法の併用により解析した。その結果、2時間の10%炭酸ガス負荷は尾側孤束核の内側亜核(NTSm)と交連亜核(NTScom)および腹外側亜核(NTSvl)ニューロンのFos蛋白発現を増加させた。これらのうち、NTSmとNTSvlに発現したFos陽性細胞の多くは小胞性グルタミン酸輸送体2(VGLUT2)mRNAに陽性を示し、NTSvlのFos陽性細胞の多くは小胞性GABA輸送体(VGAT)mRNAに陽性を示した。次に、cre-loxPシステムを用いた選択的神経路標識法により、結合腕傍核における孤束核VGLUT2ニューロンおよびVGATニューロンの投射線維分布を解析した。その結果、孤束核VGLUT2ニューロンは結合腕傍核のexternal lateral 亜核とlateral crescent 亜核に密な終末野を形成するとともに、dorsal lateral 亜核およびKölliker-Fuse核に多くの投射線維を送り、孤束核VGATニューロンはdorsal lateral 亜核およびKölliker-Fuse核に密な投射線維を送っていた。さらに、DREADDsシステムを用いて孤束核VGLUT2ニューロンを選択的に興奮させると、結合腕傍核において炭酸ガス負荷時と類似したFos蛋白発現ニューロンの分布を認めた。以上より、炭酸ガス暴露による呼吸促進は、孤束核NTSmおよびNTScomニューロンが結合腕傍核へ興奮性の投射をすることにより惹起されることが示唆された。

23 新規小脳変性疾患マウスの病理学的解析及び責任遺伝子の同定

○ 早坂直人^{1,2,3}、三好由夏³、吉岡芳親⁴、鈴木衣子⁵、宮崎太輔⁶、西郷和真⁷、楠進⁷、渡辺雅彦⁶

¹山口大院医・機能神経解剖、²JST さきがけ、³近畿大医・解剖、⁴大阪大・免疫学フロンティア、⁵東京都老人総合研・神経病理、⁶北海道大・解剖、⁷近畿大・神経内科
我々は、近交系マウスコロニーの中から、生後約3週から後肢を引きずり、頻りに転倒する、また、進行性で数か月後には後肢の麻痺が見られるといった症状を呈するマウスを発見した。そのマウスからの系統樹立に成功し、*ts3 mutant*と命名した。遺伝様式から常染色体劣性の自然発症突然変異であることが予想された。*ts3* マウスの病因を明らかにすべく、我々はまず、micro-MRIを用いて、中枢及び末梢神経系の異常について解析を行ったところ、小脳の有意な萎縮を認めた。その後詳細な病理解析により、小脳プルキンエ細胞の樹状突起の形態異常、プルキンエ細胞及び顆粒細胞の有意な減少などが明らかになった。超高压電顕を用いた解析から、樹状突起棘 (dendritic spine) の著明な形態異常が見出された。このことから、小脳プルキンエ細胞と平行線維とのシナプス形成異常が予測されたため、免疫組織化学並びに電顕により解析を行った結果、プルキンエ細胞と平行線維のシナプスの多くに異常な形態が認められた (free spine, mismatched synapse)。以上の結果から、プルキンエ細胞と平行線維間のシナプス形成不全が、*ts3* マウスで見られる行動異常の原因であることが示唆された。更に責任遺伝子を同定すべく、病態の類似性から複数の候補遺伝子あるいはタンパク質の発現を解析した結果、プルキンエ細胞特異的に発現する glutamate receptor delta 2 (*grid2*)とそのリガンドである cerebellin 1 (*Cbln1*) 遺伝子産物の発現が認められなかった。遺伝子配列解析の結果、*ts3* では *grid2* 遺伝子の6つのエクソンが欠失しており、その結果 N 末の一部以外は翻訳されない変異であることが明らかになった。

24 運動による血中アンジオテンシン II 濃度の上昇がもたらす成熟海馬の神経新生に関する検討

○ 小山友香^{1,2}、濱崎佐和子^{2,3}、椋田崇生^{1,2}、古川康雄²、海藤俊行¹

¹鳥取大学医学部解剖学講座、²広島大学大学院総合科学研究科神経生物学研究室、³広島大学大学院生物圏科学研究科水族生理学研究室

海馬は、生涯を通して新たに神経細胞が生み出される脳領域の一つであり、神経新生は海馬機能の維持や改善に寄与すると考えられている。適度な運動は、VEGF などの成長因子を介して成熟海馬の神経新生を促進することが知られているが、運動が成長因子の発現・分泌を促進する機序は明らかになっていない。一方、アンジオテンシン II (Ang II) は直接細胞増殖を高める作用はないが、末梢の血管新生では、1型受容体に作用して VEGF の産生を高めることが知られている。そこで本研究では、運動の神経新生促進効果における Ang II の役割について検討した。成熟ラットにトレッドミルで走行運動を行わせると、運動直後では、血中 Ang II 濃度が一過性に安静時の2倍近くに上昇していた。この走行運動を1週間継続させると、海馬の新生細胞数は対照群と比べて約1.5倍に増加した。次に、非運動群の血中に Ang II を1日1回、1週間投与すると、海馬の新生細胞数および幼若神経細胞数はともに対照群と比べて約1.5倍に増加した。また、これらの効果は Ang II 1型受容体選択的阻害剤であるロサルタンによって抑制された。これらの結果は、運動により上昇する血中 Ang II が1型受容体を介して間接的に海馬の神経新生を促進することを示唆している。従って、運動直後に急性かつ一過性に起こる血中 Ang II 濃度の上昇は、成長因子による成熟海馬の神経新生のトリガーである可能性が考えられた。

25 5-HT_{2A/2C} 受容体の活性化は胎生期エタノール曝露による中脳縫線核の 5-HT 細胞数減少を抑制する

○ 石黒 司、坂田 ひろみ、福井 義浩
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 機能解剖学分野

胎生期のエタノール曝露により、中脳縫線核においてセロトニン (5-HT) 細胞の数が減少することが知られている。今回、5-HT_{2A/2C} 受容体を介したシグナル伝達を活性化することで、胎生期エタノール曝露による 5-HT 細胞の減少を軽減できるか否かについて検討した。SD ラットの妊娠 10~20日に2.5~5.0% (w/v)エタノールを含む液体飼料を与えた。対照にはエタノールを等カロリーのスクロースに置換した液体飼料を与えた。これらのラットに対し、妊娠 13~19日に5-HT_{2A/2C} 受容体の作用薬である1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI, 1mg/kg/day) を投与した。妊娠 20日帝王切開して胎仔 (胎生 20日齢) を取り出した。胎仔の脳を用いて、中脳縫線核における 5-HT 細胞数の計測、全脳 5-HT 量およびその代謝産物の定量を行った。その結果、DOI はエタノール曝露による中脳縫線核での 5-HT 細胞数の減少を抑制し、さらに胎仔脳中の 5-HT 量の減少も抑制することが明らかとなった。以上より、胎生期エタノール曝露で生じる 5-HT 細胞数の減少は、脳発達期の 5-HT_{2A/2C} 受容体の活性化により軽減されることが示唆された。

26 Expression of the huntingtin-associated protein 1-immunoreactive stigmoid bodies in the spinal cord of adult rat

Md. Nabiul Islam, Ryutaro Fujinaga, Yukio Takeshita, Akie Yanai, Mir Rubayet Jahan, Gregory Wroblewski, Keiji Kokubu, Koh Shinoda (Division of Neuroanatomy, Department of Neuroscience, Yamaguchi University Graduate School of Medicine)

Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) is a neural huntingtin interactor and is considered to be a determinant marker of the stigmoid body (STB). STB/HAP1 has putative protective functions against neurodegeneration. Although the expression of STB/HAP1 has been well described in the brain, little is known about its presence in the spinal cord. We determined the distribution of STB/HAP1 in the spinal cord of adult Wistar rat in light and fluorescence microscopy. HAP1-ir cells were abundantly expressed in the lamina I, II, IV, V, sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons of lamina VII, and lamina X, whereas HAP1-ir cells were sparse in lamina III and VI. In contrast, no HAP1-ir cells were found in the motoneurons of the lamina IX. Our present study suggests that STB/HAP1 in the spinal cord might play an important role in diverse spinal sensory and autonomic functions. Sensory and autonomic neurons in the spinal cord should be stable against neurodegeneration due to putative STB/HAP1 protectivity, whereas motoneurons might be vulnerable to neurodegenerative diseases due to the absence of STB/HAP1 in lamina IX. Our result might explain why motoneurons are the constant target in certain neurodegenerative diseases.

27 The Ceramics Radiating Far Infrared Ray Energy (Rhyolite) Promote the Formation of Bone

○ Aldartsogt Dolgorsuren^{1,2}, Kikui Yamashita¹, Shine-Od Dalkhsuren², Kaori Sumida¹, Shinichiro Seki¹ and Seiichiro Kitamura¹

¹ Dept. of Oral & Maxillofacial Anatomy, Grad Sch. of Oral Sciences, the Univ. of Tokushima

² Dept. of Gross Anatomy, Sch. of Bio-Medicine, Health Sciences Univ. of Mongolia

Introduction: Far infrared ray (FIR) energy radiated by the natural ceramics (Rhyolite) cooled FIR ceramics activates water molecules and blood circulation to stimulate skin and other tissues. The aim of our study is to make clear whether the FIR ceramics radiating FIR energy affect or not on the new bone formation *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** MC3T3-E1 cells were cultured in FIR CO₂ incubator. The cell proliferation and the gene expression were analyzed by using WST-8 assay kit, RT-PCR and micro array analysis. The enzyme activities were analyzed by using the *api[®]ZYM* kit. Furthermore, titanium and natural FIR ceramics compounds were implanted under the periosteum of rat skull bone by injection method. Four weeks later, the samples were examined by the light microscope and micro CT analyses. **Results:** Proliferation of MC3T3-E1 cell was and DNA concentrations were inhibited by FIR energy radiation. The ALP activities were accelerated and the area of calcification nodules increased on 4 weeks. The RT-PCR data showed that the gene *Runx2*, *Osterix*, *BSP*, *OCN*, *Colla1* and *OPN* expression of MC3T3-E1 osteoblast like cells was activated. Bone mineral density (BMD mg/cm²) of implanted sites of T50-F50, T25-F75 and F100 groups was significantly enhanced after 4 weeks compared with control groups. This data shows FIR energy radiation by the natural FIR ceramics promoted bone-forming activity of osteoblasts.

28 H3K27 demethylase Jmjd3 associates with the transcription factors Runx2 and Osterix to regulate osteoblast differentiation

○ 楊 諱、岡村裕彦、羽地達次
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・口腔組織学分野

Post-translational modifications of histones including methylation play important roles in cell differentiation. Jumonji domain-containing 3 (Jmjd3) is a histone demethylase, which specifically catalyzes the removal of trimethylation of histone H3 at lysine 27 (H3K27me3). In this study, we examined the expression of Jmjd3 in osteoblasts and its roles in osteoblast differentiation. Jmjd3 expression was induced in response to the stimulation of osteoblast differentiation. Silencing of Jmjd3 expression suppressed osteoblast differentiation *in vitro* and *in vivo*. Silencing of Jmjd3 decreased the promoter activities of Runx2 and Osterix and increased the level of H3K27me3 on the promoter regions of Runx2 and Osterix. Introduction of the exogenous Runx2 and Osterix partly rescued osteoblast differentiation in the Jmjd3 knockdown cells. The present results indicate that Jmjd3 plays important roles in osteoblast differentiation.

29 PKR による炎症性骨破壊制御

○寺町順平¹, 篠原宏貴², 稲垣裕司², 楊諦¹, 岡村裕彦¹, 永田俊彦², 羽地達次¹

¹ 徳島大学 大学院 HBS 研究部 口腔組織学分野

² 徳島大学 大学院 HBS 研究部 歯周歯内治療学分野

【背景・目的】蛋白質リン酸化酵素である二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (PKR) は、TNF- α 、LPS などに応答し細胞の防御機構やアポトーシスに関与する。歯周病微小環境で過剰産生される LPS や TNF- α は骨破壊や歯周病の進行に重要な役割を演じている。我々は昨年の本学会で *in vitro* において PKR が LPS や TNF- α による破骨細胞形成に重要な役割を果たしていることを報告したが、その詳細なメカニズムや *in vivo* における PKR の役割については不明である。そこで各種細胞培養系および炎症性骨破壊モデルを用いて以下の検討を行った。【方法・結果】破骨前駆細胞において LPS と TNF- α は PKR の発現を誘導した。次に LPS および TNF- α 誘導破骨細胞形成における PKR の発現を検討したところ、破骨細胞分化に伴ってその発現は誘導された。さらに PKR 阻害剤、PKR 変異型細胞株および siRNA にて PKR の活性・発現を抑制すると LPS や TNF- α による破骨細胞形成が抑制された。また、細胞内情報伝達系の解析を行ったところ PKR 阻害により破骨前駆細胞の NF- κ B 経路や MAP キナーゼ経路活性化は著明に抑制された。PKR 阻害剤を用いた炎症性骨破壊治療効果を検討するために、LPS 誘導歯周炎モデルラットおよび頭蓋冠への TNF- α 注射モデルで検討したところ PKR 阻害剤により破骨細胞形成および骨破壊の抑制が認められた。

【まとめ・考察】LPS や TNF- α は破骨細胞の PKR 発現の強力な誘導因子であること、また PKR は破骨細胞の形成促進を媒介する重要な機能調節因子として作用していることが示された。

30 コンドロイチン硫酸による破骨細胞の分化と機能発現の制御

○保坂 善真・近藤 竜明
鳥取大学・農学部・獣医解剖学

【背景】グリコサミノグリカン (GAG) は幹細胞の分化や機能に影響を及ぼす。近年 GAG の一種のコンドロイチン硫酸 (CS) に破骨細胞の分化や機能の抑制活性があることが明らかになってきた。しかし破骨細胞と CS との詳細な関連については不明である。本研究では CS が破骨細胞の分化と機能に与える影響と、その機構を解析した。【材料と方法】CS は 2 単糖あたり硫酸基を 2 個有する CS-E と硫酸基を持たない CS-O、両 CS をコンドロイチナーゼ ABC で処理した二単糖 CS を使用した。これらを含む破骨細胞分化培地で破骨細胞前駆細胞を培養し、破骨細胞へ分化を誘導した。その後、固定細胞を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) で染色し、3 核以上の陽性細胞の数とその面積を計測し比較した。また、破骨細胞の骨吸収能を評価するため、骨質上で培養し吸収面積を計測した。さらに CS-E、CS-O と分化関連因子 (RANKL、M-CSF) との結合を水晶共振マイクロバランス法で確認した。

【結果と考察】TRAP 陽性を示す多核細胞の数は CS の添加で抑制され、骨吸収部位の面積も陽性対照と比較して有意に減少した。二単糖 CS を添加した場合は TRAP 陽性多核細胞の数は陽性対照のレベルまで回復した。また、両 CS の添加で TRAP 陽性細胞の面積は減少した。これらの結果から CS は硫酸基の有無に関わらず破骨細胞の分化と骨吸収能を抑制し、その糖鎖長が分化を決定する因子であると考えられた。また CS は、RANKL と結合性を示したが M-CSF とは結合性を示さなかった。CS は RANKL と結合し破骨細胞の分化と機能発現を抑制的に調節しているのだろう。

31 Glutathione は TNF α による破骨細胞形成を促進する

○藤田洋史¹, 荻野哲也², 青山絵理子³, 大内淑代¹

¹ 岡山大学大学院 歯歯薬学総合研究科 細胞組織学分野、² 岡山県立大学 保健福祉学研究所 基礎看護学講座、³ 岡山大学歯学部先端領域研究センター

関節炎に伴う骨破壊は、破骨細胞による過剰な骨吸収が原因である。この破骨細胞の誘導には、滑膜線維芽細胞による RANKL の発現と、TNF α などの炎症性サイトカインの産生が必要である。また、RANKL による破骨細胞の誘導には、細胞内シグナル分子としての活性酸素種の生成が重要であり、抗酸化物質の N-acetylcysteine が破骨細胞形成を抑制することが報告されている。一方、生体内の主な抗酸化物質である glutathione (GSH) の破骨細胞に対する作用は明らかでない。本研究では、TNF α による破骨細胞形成に対する GSH の作用を明らかにすることを目的とした。

酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色で解析した結果、マウス骨髄マクロファージにおいて、RANKL 存在下で TNF α は、破骨細胞形成を促進した。GSH は、この破骨細胞形成を濃度依存的に促進した。GSH 合成阻害剤 Buthionine sulfoximine は破骨細胞形成を有意に抑制した。また、タイムラプス撮影により細胞融合を解析した結果、GSH は破骨細胞形成における細胞融合を促進した。さらに、細胞融合に重要な DC-STAMP タンパク質発現や、破骨細胞分化に必須の転写因子 NFATc1 の核内における局在も、GSH により促進された。以上の結果より、*in vitro* において GSH は、TNF α による破骨細胞形成を促進することが明らかとなった。

32 鳥類骨髄骨の破骨細胞におけるエストロゲンによる機能制御

○樋山伸二¹・安井佑輝²・門山裕美子²・渡邊峰朗¹・内田隆¹

¹ 広島大学大学院歯歯薬保健学研究院 基礎生命科学部門 口腔細胞生物学

² 広島大学歯学部学生

【背景と目的】鳥類雌の特異組織である骨髄骨は、卵殻のカルシウムの供給源として、長骨の骨髄腔に形成される。この骨髄骨は、産卵周期における血中エストロゲン値の増減に伴い、リモデリングを繰り返す。血中エストロゲン値の高い骨形成期では、破骨細胞は骨髄骨表面に休止状態で存在している。これまでの研究から、骨髄骨の破骨細胞はエストロゲンによりアポトーシスが誘導されないが、骨吸収が抑制されることが推察された。しかしながら、その詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では、雄ウズラへのエストロゲン (E2) 投与による骨髄骨形成モデルを用いて、V-ATPase に着目し、エストロゲンの破骨細胞への作用を検討した。

【方法・結果】E2 投与 3 日後の大腿骨の骨髄細胞を破骨細胞誘導因子および 17 β エストラジオール (17-E) を添加し培養した。これらの細胞における V-ATPase の発現を検討したところ、17-E による遺伝子発現に顕著な増減は認められなかったが、免疫染色においては陽性反応が減少した。次に、E2 投与 5 日後に E2 を再投与し、骨髄骨表面の破骨細胞への影響を検討した。骨髄骨は骨髄中心にさらに形成が進み、その表面の破骨細胞は扁平に近い形態を呈し、これらの細胞における V-ATPase の発現は一過性に減少した。再投与後、時間の経過とともに、細胞の形態が戻りつつ、V-ATPase の発現が回復した。

【考察】エストロゲンによる鳥類骨髄骨の破骨細胞の機能制御は、V-ATPase の発現抑制が 1 つの要因として示唆された。

33 骨基質タンパク MEPE-由来 ASARM は血中リン濃度非依存的に骨量を減少させる

○櫻井薫^{1,2}, 南崎寿子³, 川本真貴子³, 藤野陽子^{2,4}, 竹井悠一郎², 吉岡広陽², 岡田 貢⁴, 香西克之¹, 吉子裕二²

広島大学大学院歯歯薬保¹小児歯科学²硬組織代謝生物学⁴障害者歯科学³広島大学歯学部歯学科 5年

ASARM は MEPE を含む骨基質タンパク SIBLING ファミリーに共通するモチーフで、分泌後切断されて遊離する。ASARM は PHEX による切断認識配列を持ち、リン利尿因子の 1 つとして論じられている。ASARM の Ser は複数リン酸化 (pASARM) を受けると考えられており、私たちは PheX の発現が低レベルで、骨密度が減少している Klotho 変異マウスの骨に pASARM が蓄積することを見出した。そこで、今回は正常マウスの骨形成に対する pASARM の影響を検討した。

骨芽細胞培養下、pASARM は骨芽細胞分化マーカー遺伝子の変動を伴わず骨質石灰化を抑制し、可溶性 PHEX は pASARM の作用の少なくとも一部を阻害した。一方、pASARM は RANKL による RAW 細胞の破骨細胞分化に影響しなかった。浸透圧ポンプを用いて正常マウスに pASARM を 2 週間持続投与しても、血清リンおよびカルシウム濃度は正常レベルを維持し、腎臓の *Slc34a3* および *Cyp27b1* の発現に変動は見られなかった。また、骨芽細胞マーカーの発現に有意差は見られず、血清 PINP 濃度も正常であった。一方、 μ CT 解析では、骨体積や骨面積が減少し、カルセイン標識による石灰化の減少を認めた。脛骨での骨芽細胞数に明瞭な変化は見られなかったが、破骨細胞の増加を認めた。

以上より、pASARM は低リン血症を伴わず、骨の石灰化を負に制御すると推測される。破骨細胞分化、骨吸収への影響も含め、pASARM の作用機序をより詳細に検討する必要がある。