

日本解剖学会

第61回東北・北海道連合支部学術集会

会期：平成27年8月29日（土）、30日（日）

会場：盛岡市観光文化交流センター プラザおでって

特別講演

Teeth of the development, by the morphogenesis, for the future

Han-Sung Jung

Dept. of Oral Biology, Yonsei University, Seoul, Korea

Tooth development is regulated by progressive and mutual interactions between epithelium and mesenchyme. The molecular mechanisms underlying this instruction are well-preserved and most of the contributing molecules belong to several signalling families. Research focusing on mouse teeth has uncovered many aspects of tooth development, including molecular and evolutionary detailed and in addition offered a valuable system to analyse the regulation of epithelial stem cells. In mice, the spatial and temporal regulation of cell differentiation and the mechanisms of patterning during development can be analysed both in vivo and in vitro.

The mouse teeth that modulating the balance between inductive and inhibitory signals constitutes a key mechanism regulating the epithelial stem cells and cellular differentiation. I would share current ideas with additional maintenance for the location of the putative dental stem cells and for the stemness. Fine-tuning of the signalling in the regulation of the tooth morphogenesis, and that altering the levels of an inhibitor can cause variation in the tooth patterning. Furthermore, clinical implications including in the diagnosis, prevention and treatment of congenital defects as well as in the design of regenerative therapies would be of fundamental importance in Oral Biosciences.

1 マウス嗅覚系における a1-2 フコース修飾の局在解析

○近藤大輔、佐々木基樹、北村延夫
帯広畜産大学 獣医解剖

嗅覚系において、糖鎖 a1-2 フコース欠損動物では嗅球の発生異常が生じる。我々はこれまでに、ICR マウスにおいて、糖鎖 a1-2 フコースが主嗅球から嗅皮質への出力路である外側嗅索に存在していることを報告したが、その陽性線維がどの細胞に由来するのかについては未だ不明である。本研究では、雌雄の ICR および C57BL/6J マウス（3ヶ月齢、各5個体）の主嗅球における糖鎖 a1-2 フコースの詳細な局在を解析した。なお、結果に系統差および性差は認められなかった。明期条件下の動物を深麻酔してブアン液で灌流固定した後、嗅球の 5 μm 厚パラフィン切片を作製し、糖鎖 a1-2 フコースと特異的に結合するタンパク質 UEA-I を用いた組織化学を行った。層構造に着目すると、嗅神経層およびいくつかの糸球体が陽性反応を示した。さらに、外網状層から内網状層にわたって陽性線維が多数認められ、顆粒細胞層内では陽性の線維束が認められた。主嗅球内の a1-2 フコース陽性線維の由来細胞としては、投射ニューロンである中間および内房飾細胞、僧帽細胞、さらに介在ニューロンである傍糸球細胞や外房飾細胞、外網状層内の顆粒細胞の6種類が同定された。以上の結果から、マウスの主嗅球では、出力路の刺激伝達のみならず、主嗅球内の局所的な刺激伝達においても、糖鎖 a1-2 フコース修飾による複雑な制御を受けている可能性が示唆された。

2 ラット顔面神経切断縫合モデルにおけるクラスリン小胞輸送関連タンパク質の動態変化

○阪場貴夫¹、植村武文²、和栗聡²
福島県立医科大学形成外科学講座¹、福島県立医科大学解剖組織学講座²

ゴルジ体-エンドソーム間のクラスリン小胞輸送はマンノース 6 リン酸受容体を始めとする特定のカーゴタンパク質の選別輸送を担う。同輸送を制御する細胞質因子として、クラスリンアダプター分子の AP-1 (adaptor protein complex 1) と GGA (Golgi-localized, γ-adaptin ear-containing, ARF-binding protein)-1/2/3、そしてクラスリンアダプターアクセサリータンパク質群が知られている。これら分子群の細胞生物学的解析は進んでいるものの、個体末梢神経細胞における機能は不明である。そこで本研究では、ラット顔面神経の切断縫合モデルを確立し、同モデルにおける AP-1、GGA1 およびこれら分子のアクセサリータンパク質の一つである p56 の挙動を解析した。

まず、8 週齢正常雄ラットを灌流固定し、パラフィン切片を作成後、免疫組織化学法を用いて顔面神経核における 3 分子の局在を調べた。AP-1 はエンドソームマーカーである EEA1 よりも、トランスゴルジネットワークマーカーである TGN38 と共局在する傾向を示し、逆に p56 と GGA1 は TGN38 よりも EEA1 と共局在する傾向が強かった。次に 8 週齢雄ラットの右顔面神経本幹を茎乳突孔出口部で切断し、直後に神経縫合を行った。左はシャム手術とした。縫合後 1、3、7、14、28 日目に灌流固定後、免疫組織化学法を用いてラットの顔面神経核における 3 分子の局在発現変化を調べた。AP-1 のシグナルは術後 7 日目に減弱を示し、28 日目に軽度回復した。一方、GGA1 と p56 の蛍光シグナルは両者とも術後 1 日目から減弱し、28 日目でわずかな回復が認められた。以上の結果は、損傷末梢神経では p56 は AP-1 よりも GGA1 のアクセサリータンパク質として機能していることを示唆する。

3 ラット頸動脈小体における P2X 型 ATP 受容体陽性神経終末の形態学的特徴

○横山拓矢^{1,2}、中牟田信明^{1,2}、山本欣郎^{1,2}
岩手大学 農学部 獣医解剖学研究室¹、岐阜大学大学院 連合獣医学研究科 基礎獣医学講座²

【背景と目的】頸動脈小体には P2X2 型および P2X3 型 ATP 受容体 (P2X2、P2X3) 陽性の感覚神経終末が分布しており、化学受容細胞の興奮を中枢へ伝える。本研究では、免疫組織化学によりラット頸動脈小体における P2X 陽性神経終末の形態を解析した。また、多重染色により神経終末と化学受容細胞との関係を調べた。【材料と方法】Wistar ラット（雄、8-10 週齢）の頸動脈小体を採材し、凍結切片を作製した。切片は P2X2、P2X3、チロシン水酸化酵素 (TH)、ドパミン β-水酸化酵素 (DBH)、Bassoon に対する抗体を用いた二重蛍光抗体法により染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。【結果と考察】P2X2 陽性反応および P2X3 陽性反応を示す神経終末は広く分布しており、神経終末上の P2X2 陽性反応は P2X3 陽性反応と一致していた。P2X3 陽性神経線維は複数に分岐して化学受容細胞の集団へ向かい、細胞集団に接する部分で平板状の終末部を形成して周囲を取り囲んでいた。また、細胞間においても P2X3 陽性神経終末が認められた。一方で、P2X3 陽性神経終末の分布が密でない細胞集団も存在した。TH との二重染色では、TH 陽性反応を示す化学受容細胞の集団が認められ、その周囲や細胞間に P2X3 陽性神経終末が観察された。DBH との二重染色では、一部の化学受容細胞に DBH 陽性反応が認められ、その周囲に P2X3 陽性神経終末は密に分布していなかった。Bassoon との二重染色では、化学受容細胞の P2X3 陽性神経終末との接触面に点状の Bassoon 陽性反応が認められた。本研究により、頸動脈小体の化学受容細胞を取り囲む P2X 陽性感覚神経終末の分布様式と形態が明らかとなった。

4 DGKe 遺伝子欠損マウス脂肪組織に認められる脂質分解系の機能不全-脂肪滴増大メカニズムの解析-

○中野 知之、後藤 薫
山形大学医学部解剖学第二講座

脂質は生体の重要なエネルギー源として脂肪や肝臓に貯蔵され、必要に応じて分解されて用いられる。エネルギーの「貯蔵と分解」は厳密に制御されており、何らかの影響でバランスが崩れると肥満状態に陥る。我々は epsilon 型 diacylglycerol kinase 遺伝子欠損 (DGKe-KO) マウスを高脂肪食で給餌すると野生型 (WT) マウスに比して顕著な体重増加と脂肪の蓄積が認められることを発表した。本研究では DGKe-KO マウスの白色脂肪組織に認められる脂肪蓄積メカニズムに関して詳細な解析を行った。DGKe-KO マウス白色脂肪組織における脂肪滴 (LD) は、WT マウスよりも大型であった。この時、2 種の脂質分解酵素 ATGL (adipose triglyceride lipase) および HSL (hormone sensitive lipase) の発現を解析すると、DGKe-KO マウスにおいて ATGL の発現が mRNA およびタンパクレベルで低下していた。一方 HSL の発現に変化は認められなかった。また LD 分解を抑制する perilipin の発現は、両マウスの間に差が認められなかった。組織学的解析の結果、DGKe-KO マウスでは著しいマクロファージの集積 (crown-like structure : CLS) が検出された。以上の結果から、DGKe-KO マウスの白色脂肪では、ATGL の発現低下によって中性脂質の分解抑制が生じ、LD が増大すると考えられる。著しい LD の増大は脂肪細胞に障害をもたらす。CLS により囲まれた脂肪細胞は LD による損傷を受けていることから、DGKe-KO マウスでは損傷を受けた脂肪細胞除去のためにマクロファージの浸潤が亢進することが示唆される。

副腎におけるインソールリン脂質代謝関連分子の発現局在解析

○八月朔日 泰和、後藤 薫
山形大学医学部解剖学第二講座

インソールリン脂質 (PI) 代謝系は外的刺激を受け、フォスホリパーゼ C (PLC) による phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) の加水分解によって、ジアシルグリセロール (DG) とインソール3リン酸を産生する。DG キナーゼ (DGK) はプロテインキナーゼC (PKC) の活性化因子として知られる 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。近年、PI 代謝関連分子の発現が副腎においても報告されているが、DGK の発現局在は不明である。本研究では、ラット副腎におけるDGKアイソザイムおよび他のPI代謝関連分子の発現局在を、免疫組織化学染色法を用いて蛋白レベルで解析した。免疫組織化学染色による解析の結果、DGKアイソザイムおよびPLCβやPKCなどのPI代謝関連分子は、副腎皮質球状帯細胞と副腎髄質クロム親和性細胞に豊富に発現していた。DGK アイソザイムのうち、DGKy, DGKcおよびDGKkの強い発現が球状帯細胞とクロム親和性細胞に認められた。一方、DGKe免疫反応は球状帯細胞に検出されたが、クロム親和性細胞には認められなかった。さらに多重染色法を用いた詳細な細胞内局在の検討により、DGKyはゴルジ体、DGKcは細胞膜、DGKkは核内、DGKkは細胞質にそれぞれ局在することが明らかとなった。球状帯細胞にはPI代謝関連分子のうち、Gαq/11, PLCβ1, PLCβ3, PKCαおよびPKCβIIの発現が検出され、Gαq/11およびPLCβ1は細胞膜、PLCβ3, PKCαおよびPKCβIIは細胞質に局在していた。副腎髄質における多重染色法による解析の結果、クロム親和性細胞では、DGKαが弱く、DGKy, DGKcおよびDGKkが強く発現していた。興味深いことに、DGKyおよびDGKkはアドレナリン細胞のみに発現し、DGKkはアドレナリン細胞およびノルアドレナリン細胞の両者に発現が認められた。クロム親和性細胞に発現が認められたPI代謝関連分子はGαq/11, PLCβ4およびPKCαであった。その他、副腎髄質においてDGKeとPKCβIIはマクロファージに、PLCβ3は神経節細胞に、DGKcおよびPLCβ3は神経線維に発現していた。以上より、DGK アイソザイムおよびPI代謝関連分子は副腎の細胞において異なる細胞発現パターンおよび細胞内局在を示すことが明らかとなった。このことは、副腎皮質ステロイドホルモンやカテコールアミンの副腎からの分泌に、PIシグナル伝達系が関与する可能性を示唆する。

DGK結合蛋白 NAPI1-like proteins による p53 アセチル化修飾は CBP および HDAC4 との結合を介して調節される

○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) は PKC の生理的活性調節因子と考えられ、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 DGK 結合蛋白として Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAPIL1) および NAPI-like 4 (NAPIL4) を同定し、これら蛋白による細胞周期および DNA 損傷による細胞死の制御機構を解析している。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、また DNA 損傷時においては、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。さらに、癌抑制遺伝子産物 p53 のアセチル化修飾に関して、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。今回の研究において我々は、NAPIL1 および NAPIL4 による p53 アセチル化制御に関して、ヒストンアセチル化酵素 CBP および脱アセチル化酵素 HDAC の役割を検討した。免疫沈降実験の結果、NAPIL1 は DNA 損傷において、CBP との結合が減少し、HDAC4 との結合が増加することが明らかとなった。以上のことから、NAPIL1 は p53 と CBP ならびに HDAC4 の結合を調節することにより、p53 のアセチル化修飾を制御している可能性が高いことが示唆された。

ATP 受容体刺激によるマウス耳下腺腺房細胞の細胞内 Ca²⁺濃度上昇は P2Y 受容体が主である。

守口 森 霞^{1,2}、東尾 弘典³、磯部 可奈子^{1,2}、熊谷 美保²、佐藤 洋一⁴、久慈 昭慶²、○齋野 朝幸¹

岩手医科大学 解剖学講座細胞生物学分野¹、歯学部口腔保健育成学講座小児歯科学・障がい歯科学分野²、教養教育センター化学科³、医学教育講座⁴

目的: ATP は、生体内伝達物質として働く他に傷害細胞からも逸脱する。この ATP が耳下腺での放出連関への寄与について解明する事は、臨床的にも重要である。今回、マウス耳下腺腺房細胞に及ぼす ATP の効果を、細胞内 Ca²⁺イオン濃度 ([Ca²⁺]) 変化を指標として検討した。方法: マウス (♀ICR 10-18W) を炭酸ガスにて屠殺し、耳下腺を摘出した。標本を純化コラゲナーゼ 100 U/ml にて 37°C、1 時間消化した。その後、腺房をろ過し、Ca²⁺感受性色素 Indo-1/AM を負荷後、リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) を用いて [Ca²⁺] の画像解析を行った。併せて、Indo-1/AM 負荷前の検体から①mRNA を採取し、RT-PCR を、②ATP 刺激によるアミラーゼ分泌量をキットを用い光度にて検討した。結果: ATP (50 μM) は [Ca²⁺] の増加を引き起こした。細胞外 Ca²⁺ を除去しても [Ca²⁺] 上昇反応は消失しなかった。一方、細胞内ストアに関与する U73122 によって IP₃ 産生を抑制してもこの反応は完全には消失せず、Xestospongin C でも同様であった。細胞外 Ca²⁺ 流入の機転以上に、細胞内 Ca²⁺ 動員が重要と考えられた。受容体について検討すると、P2 受容体抑制薬の suramin によって ATP 誘導性 [Ca²⁺] の増加は完全に阻害され、P2Y 受容体抑制薬の Reactive blue 2 によってもこの反応は強く阻害された。P2Y 受容体刺激薬の 2-MeSADP は [Ca²⁺] を著しく増加させたが、P2Y および P2X の刺激薬である UTP や α,β-methylene ATP は [Ca²⁺] にほとんど影響を及ぼさなかった。また、P2X7 アゴニストの BzATP は [Ca²⁺] 上昇反応を強く認めなかった。以上から、[Ca²⁺] 上昇には P2Y 受容体が主に働いていることが示唆された。P2 受容体の発現について RT-PCR で検討したところ、特に P2X4、P2Y1、10、12、14 が主に発現していることが確認された。考察: マウス耳下腺腺房細胞には P2Y と P2X の プリン受容体双方が存在しているが、実験結果から ATP による刺激-放出連関には P2Y 受容体が主として働いており、特に P2Y1 である可能性が高いと考えられる。

持続的なGnRH刺激を受けたラットLH/FSH産生細胞における細胞内膜系の変化と細胞内分解システムの関係

○暮地本 吉己¹、甲賀 大輔¹、板東 良雄²、穂坂 正博³、牛木 辰男⁴、渡部 剛¹
旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野¹、機能形態学分野²、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³、新潟大学大学院 医歯学総合研究科 顕微解剖学分野⁴

ラットの下垂体前葉LH/FSH産生細胞では、酢酸リユープロレリンなどのGnRHアゴニスト持続投与後初期に、管状細胞構造をとる小胞体塊 (ER patch) が一過性に出現する。今回私達は、ER patchが出現する機能的意義に関して、顕微免疫組織化学法および電顕観察法を用いて経時的に検討した。

まず、リユープロレリン持続投与後のLH/FSH産生細胞におけるER patchの出現時期を検討したところ、同剤持続投与12時間後から48時間後にかけてER patchが出現した。次にER patchに局在する小胞体関連機能分子を検索したところ、BiPやcalnexinなどの小胞体シャペロンに加え、HRD1やBAP31など、ユビキチンプロテアソーム系を介して蛋白質を分解する、小胞体関連分解に関わる機能分子が強く集積した。そこでリユープロレリン持続投与後にER patchの出現したLH/FSH産生細胞内の微細構造を電顕で観察したところ、細胞質を分画する多層膜構造体がER patchに隣接して出現していた。さらに同細胞内にはオートファジーで特異的に分解されるp62の蓄積が見られた。

以上の所見から、LH/FSH産生細胞ではGnRH受容体を介したシグナル伝達系による同一のインプットを介して、異なった細胞内分解システムであるユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系が協調的に変化し、機能を果たしている可能性が示された。

ラット甲状腺濾胞上皮細胞におけるゴルジ装置と微小管の構築

○渡部 剛、暮地本 吉己、甲賀 大輔
旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野

甲状腺濾胞上皮細胞は、まず外分泌腺として発生するが後に導出管が失われるために内分泌細胞に転化する興味深い細胞である。そこで、今回我々は、対照群雄ラットの甲状腺を材料とし、免疫組織化学法を用いて同細胞におけるゴルジ装置の形態や中心小体の位置、微小管構築などの特徴を検討し、他の内分泌細胞や外分泌細胞と比較した。その結果、甲状腺濾胞上皮細胞のゴルジ装置は、内面が trans 側、外面が cis 側に相当する環状あるいは円筒状の配置をとることが明らかになった。中心小体は腺腔側細胞膜直下に局在し、微小管はこの高さで水平な網目を形成した。この環状のゴルジ装置の内外を通過して下方の基底側に向かって伸展していた。さらに、この甲状腺濾胞上皮細胞の機能状態を実験内分泌学的方法で人為的に変化させゴルジ装置の経時的変化を解析したところ、TRH や抗甲状腺剤 propylthiouracil 持続投与で同細胞におけるサイログロブリン (TG) 生合成を亢進させるとゴルジ装置は細胞の長軸に沿って増生した。一方、thyroxine 持続投与で同細胞における TG 生合成を抑制するとゴルジ装置は環状の構築のまま平坦化した。これらの所見から、双方向性の分泌動線を有する甲状腺濾胞上皮細胞では、ゴルジ装置は腺腔側と基底側の両方に大きな開口部を持つ環状の構築をとり、TG の産生量と呼吸して細胞長軸方向に増生あるいは縮退することが示された。これまで分泌細胞は、細胞表面の極性と分泌の方向性から、内分泌細胞と内分泌細胞の2つに大別されてきたが、今回観察した甲状腺濾胞上皮細胞におけるゴルジ装置の大局的構造を考慮に入ると、粗面小胞体、ゴルジ装置、分泌顆粒など分泌経路を構成する小器官の細胞内配置にも細胞固有の一定の秩序があり、今後この観点から多様な分泌細胞を再整理・類型化する必要があることが示唆された。

雌ラットの胃壁細胞における17β-estradiol 合成分泌に対するproton pump inhibitor の影響

○小林 裕人¹、吉田 沙織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
東北文化学園大学 医療福祉学部 リハビリテーション学科 理学療法学²

【目的】proton pump inhibitor は胃の壁細胞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使用されている。その一方で男性には女性化乳房、女性には月経異常などエストロゲン関連性の副作用が報告されている。演者らは雄ラットを用いて、proton pump inhibitor の一つである lansoprazole (LPZ) が胃の壁細胞に存在する aromatase、門脈および動脈血中 17β-estradiol 量を増加させ、肝エストロゲン代謝酵素を減少させることを報告している。本研究では、雌ラットを用いて LPZ の壁細胞の 17β-estradiol 合成分泌への影響と副作用への関与について調べた。【方法】12 週齢の Wistar 系雌ラットに 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) に溶解した LPZ (30 mg/kg) を 3 日間経口投与し、発情間期に合わせて組織採取を行った。対照群には 0.5% CMC 水溶液を経口投与した。血中 17β-estradiol 量、胃の aromatase 遺伝子発現とタンパク質量、肝エストロゲン代謝酵素の遺伝子発現を検討した。【結果】LPZ 投与により、胃粘膜上皮中の aromatase 遺伝子発現と aromatase タンパク質量が増加し、門脈血中 17β-estradiol 量が増加した。また、肝エストロゲン代謝酵素の遺伝子発現が増加し、動脈血中 17β-estradiol 量が減少した。【考察】LPZ は雌の壁細胞の 17β-estradiol 合成分泌も亢進させることが明らかとなった。また、LPZ による肝エストロゲン代謝の雌雄差などが、エストロゲン関連性の副作用に関与している可能性が示唆された。

11 An attempt to develop a program for drawing three-dimensional trajectories in motion studies

○Mitsuhiro Nito¹, Wataru Hashizume¹, Manabu Jimenji¹, Katsuhiko Kato², Akira Naito¹

¹Dept. Anat., Yamagata Univ. Sch. Med., ²Gigatex Corp.

We had developed a program for drawing two-dimensional (2D) trajectories (RO299-4588, Gigatex, Osaki, Japan) using a simultaneous recording system for digital video pictures and electric signals (The Teraview, Gigatex) and a 3D position sensor (Liberty, POLHEMUS, Colchester VT, USA). This program enabled us to automatically draw 2D trajectories of motions on monitor displays of the system with data (x, y, z) from the sensor (x, y: frontal plane; y, z: sagittal plane; x, z: horizontal plane). By using these devices, we had been studying motions of healthy human subjects and patients with disturbances of motility. However, we found that the 2D trajectories were insufficient to investigate motions of the thumb. In this study, we attempted to develop a program for drawing 3D trajectories using the system and sensor. Consequently, a new program, which enables us to draw 3D trajectories of motions from data recorded in our previous studies, has been developed.

12 Device for measuring direction and strength of shoulder-force

○Manabu Jimenji¹, Hayato Hoshi², Takuji Miyasaka², Akira Naito¹

¹Dept. Anat., Yamagata Univ. Sch. Med., ²Dept. Judo Therapy, Teikyo Univ. Facult. Med. Technol.,

A device for measuring a direction and strength of human shoulder-force with the shoulder kept in a downward position was developed. The abduction, flexion, adduction, and extension directions were represented by 0°, 90°, 180°, and 270°, respectively. Two strain gauges (SG-1, SG-2) fastened to the abduction and extension sides of a steel cylinder (φ150 mm) were fitted with a steel holder. The cylinder was pulled using wire from 12 directions (30° step) with a load (0.5-16.0 kg) and voltage data from SG-1 (V₁) and SG-2 (V₂) were recorded. By processing the load (kg), direction (θ), and voltage data (V₁, V₂), the following formulae were derived. $\tan\theta = (-0.0686 V_2/V_1 - 0.0209) / (0.0305 V_2/V_1 + 0.0573)$, $F_x(\text{kg}) = V_1/0.075 \cos(\theta - 24^\circ)$, $F_y(\text{kg}) = V_2/0.061 \sin(\theta - 160^\circ)$. The formulae were fed into a computer with a 2-D Lissajou presentation program for plotting the force on a 2-D coordinate (x, y) graph in which F was represented by a distance from (0, 0) and θ was by an angle to the x axis in a monitor display. By using the device we attempted to measure the force in healthy human subjects. In consequence, it was confirmed that the subjects could exhibit the maximum force of flexion, extension, abduction, adduction, and circumduction of the shoulder with reference to the display. Applications of the device to research and clinical fields were discussed.

13 解剖学的観点からの「情報薬[®]」の考え方と分類: I型から V 型まで

○辰巳治之¹, 溝口照悟¹, 新見隆彦¹, 二宮孝文¹, 市川量一¹, 菊池真¹, 太田秀造¹, 戸倉一²

札幌医科大学・大学院医学研究科生体情報形態学¹
附属総合情報センター²

情報を、「フル・マルチメディア刺激で、伝えて心を動かすもの」と定義する。そこで「心」とは神経細胞の機能の表れであり、一般的には、外的刺激(言葉・薬など)、或いは、内的刺激(記憶・意志等)により、細胞の状態を変えることが出来る。ある特殊な刺激のパターンが、シグナルとなり、そして情報となる。今回は、それを解剖学的に示す。情報をタイミング良く処方すると、細胞や人に作用する「薬」として使える。フル・マルチメディアの刺激から、細胞、人、社会に適した良い治療薬の開発が可能である。このような発想から「情報薬[®]」という言葉を生み出し、その応用実験を行ってきた。現在のところ情報薬は I 型: In Social, II 型: To-Brain, III 型: In-Brain, IV 型: To-Cellular, V 型: In-Cellular に分類される。この定義に従えば、従来の薬は IV 型の細胞へ直接働きかける情報薬の範疇に入り、遺伝子治療や放射線治療は細胞内へ直接働きかける V 型と言える。分子細胞生物学的発想、社会心理情報科学的及び、アダムスミスの感情道徳論等の観点から、解剖学的発想を基に「情報薬[®]」による治療法を考える。これは全力医療(FPM: Full-Powered Medicine)の中核をなし、言い換えると、身体に良い物は全て活用するということである。そこからすると、現代の医療は Partial Medicine と言わざるを得ない。「情報薬[®]」は、いわばコペルニクス的転回に近く、戦略的防衛医療構想の要でもある。

14 視蓋層形成過程の浅層における接線方向への細胞移動

○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15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。昨年支部学術集会では、発生中の視蓋中間層において視蓋出力軸索束に沿って接線方向に移動する細胞群が存在し、移動後に MAP2 (微小管結合タンパク質2) および NRP1 (ニューロピリン1) 陽性の多極性神経細胞に分化することを報告した。本発表では、視蓋浅層を接線方向に移動する、新たな細胞群について報告する。

ニワトリ胚 E4.5 から E5.5 の視蓋脳室帯の細胞をエレクトロポレーションにより GFP 標識すると、標識された細胞は放射状方向に上層に向かって移動していくが、その一部が E7.0 以後に表層付近に達すると直角に曲がって水平方向に向きを変えた。その後の動きを視蓋組織を取り出して培養下で経時的に蛍光観察すると、標識細胞が視蓋浅層を接線方向に移動して、拡散してゆく様子が捉えられた。視蓋中間層での細胞移動が、背腹方向に走行する視蓋出力軸索束に沿った二方向性の動きであったのとは対照的に、浅層で移動する細胞は分枝した先端突起を持ち、多方向性に移動していることがわかった。視蓋の広範囲に広がった移動中の細胞は、浅層で NeuN や Hu 陽性の神経細胞に分化していた。これらの結果から、視蓋浅層での接線方向の細胞移動は、視蓋全体への一様な神経細胞の分布に貢献することが示唆された。

15 アンモン角錐体ニューロンと歯状回顆粒ニューロンの前駆細胞は発生過程で混在する

○勝山裕¹, 杉山拓², 大隅典子², 大和田祐二¹

東北大学大学院医学系研究科 器官解剖学分野¹、発生発達神経分野²

大脳皮質発生初期の前脳背内側後方にある海馬予定域には、将来歯状回、アンモン角のニューロンを生み出す各領域が腹側から背側にむかって連続的に配置していると考えられている。しかし歯状回顆粒細胞とアンモン角錐体細胞が海馬体発生過程で、いかにして空間的に分かれるのか不明であった。

本研究では、マウス海馬体形成過程における歯状回顆粒細胞 (Prox 陽性) とアンモン角錐体細胞 (Math2 陽性) の前駆細胞を免疫組織学的に検出し局在動態を検討した。その結果、それぞれ歯状回、アンモン角を形成する過程で、この両領域の境界部では両者の前駆細胞が混ざり合った層を観察された。Math2 陽性細胞の形態を観察すると、Math2 発現が強くなるに従い、細胞の長軸が接線方向から放射方向へ変化していくことが示唆された。つまり錐体ニューロン前駆細胞は細胞分化が進むにつれ、移動が接線方向から放射方向へと変わり錐体細胞層を形成し、髄膜に沿って接線移動を続ける歯状回前駆細胞とは異なる場所に細胞層を形成することが示唆された。

16 マウス胎生 11.5 日生まれの神経細胞に発現している Wnt7b は、脳の形態形成に必須である

○橋本光広

福島県立医科大学 神経解剖・発生学講座

LacZ 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを用いて、マウス胎生 18.5 日の脳における、マウス胎生 11.5 日生まれの神経細胞の脳内分布を可視化したところ、その脳内分布が、Wnt7b の発現パターンと一致することを見いだした。そこで、Wnt7b の発現を抑制するアデノウイルスベクターを作製し、マウス胎生 11.5 日生まれの神経細胞特異的に Wnt7b 遺伝子の発現を抑制した。その結果、大脳皮質の低形成・パルプアルブミン陽性介在神経の減少・異常行動・異常脳波・小脳脳部が欠損した小脳形成不全を呈することが明らかとなった。Wnt7b は、人においてクロモソーム 22q13.3 にコードされており、22q13.3 欠失症候群 (Phelan-McDermid syndrome) が知られている。22q13.3 欠失症候群では、大脳皮質低形成・異常脳波・小脳脳部が欠損した小脳形成不全が観察される。アデノウイルスベクターを用いた、マウス胎生 11.5 日生まれの神経細胞における Wnt7b の抑制は、人の 22q13.3 欠失症候群と同様の症状が観察される。そのことから、Wnt7b は 22q13.3 欠失症候群の責任遺伝子の一つと考えられる。

17 Dachsaus 依存的な Spiny-legs の非対称局在はショウジョウバエにおける平面内細胞極性の方向を決定する

○鮎川 友紀^{1,2}, 秋山 正和³, Mummery-Widmer Jennifer⁴, Stoeger Thomas⁴, 佐々木純子⁵, Knoblich Juergen⁴, 佐々木 雄彦^{2,5}, 妹尾 春樹¹, 山崎 正和^{1,2} 秋田大学大学院医学系研究科 細胞生物学講座¹, 秋田大学生体情報研究センター², 北海道大学電子科学研究所³, Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences⁴, 秋田大学大学院医学系研究科 微生物学講座⁵

上皮組織内には、細胞の頂部-基部軸と直交する、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、組織・器官の構築に重要な役割を果たす。例えば、哺乳動物の内耳には、極性を有した有毛細胞が存在し、音の振動を効率よく感知するためにこれらの細胞は組織平面内で一定方向に配向している。PCP に異常が生じるとこの配向が乱れ、その結果、聴力は著しく損なわれる。また、PCP は囊胞腎等の疾患や幹細胞の運命制御に関与しており、その多様な役割が注目されている。

PCP の主要制御因子は機能的な相違から大きく2つのグループに分類されている。一つ目は、7回膜貫通型受容体 Frizzled (Fz) 等によって構成されるコアグループである。これらの因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である Dachsaus (Ds) 等に構成される Ds グループである。Ds は組織平面内で発現勾配を形成しており、ショウジョウバエ翅では翅の先端方向に向けてその発現が徐々に低下する。この発現勾配がコアグループ偏在化の方向情報として用いられていると考えられている。

ショウジョウバエ翅の細胞では Ds の発現の低い側に Fz が局在するのに対し、複数の細胞では Ds の発現が高い側に Fz が局在する。両組織において、Ds は方向情報として機能するにも関わらず、興味深いことに、両組織間で Fz 局在の向きが異なる。この謎は PCP 研究における解決すべき最重要課題の一つであるが、その分子機構は不明であった。我々は、Prickle (Pk) とそのアイソフォームである Spiny-legs (Sple) の発現量が翅と複眼で大きく異なることを発見し、Pk と Sple の発現量のバランスが、Ds 配対に対するコアグループ分子局在の方向決定に重要であった。

(参考文献)
Akiyama T, Akiyama M, Mummery-Widmer JL, Stoeger T, Sasaki J, Knoblich JA, Senoo H, Sasaki T, Yamazaki M. Dachsaus-dependent asymmetric localization of spiny-legs determines planar cell polarity orientation in *Drosophila*. *Cell Reports* 8, 610-621 (2014)

18 ヒト成体多能性幹細胞における新規多能性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, 北田章章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², 京都大学理学研究科生物科学専攻³, 名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学

Muse 細胞は生体中に存在する自然の多能性幹細胞であり、三胚葉細胞への分化能を持つ一方、腫瘍形成能を持たない。さらに40年に渡る骨髄移植においてヒトに移植されていた細胞であることから、高い安全性を有し、再生医療への応用が期待される。

生物界を見渡すと、Muse 細胞と同じ間葉系組織に存在し、かつ、三胚葉への分化能を有する多能性幹細胞ネオプラストが、ブラナリアにも存在する。我々は、ヒト Muse 細胞とブラナリアのネオプラストとの共通性に着目した。

ネオプラスト特異的抗体を用いてヒト Muse 細胞を免疫染色したところ、ネオプラストに見られたのと同様に核での染色像が得られた。ネオプラスト抗体に対するヒト抗原因子を同定するために、多能性を有するヒト NTERA2 細胞を用いて免疫沈降実験、質量分析実験を行った結果、1種類の特異的な産物 (P 因子) が同定された。Muse 細胞において、これらの産物を特異的に認識する抗体を用い、ネオプラスト抗体との二重免疫染色実験を行ったところ、細胞内局在の一致が観察された。

Muse 細胞において P 因子を抑制すると、MAP2, Mash1, NeuroD1 などの神経細胞の分化マーカーを発現した。次世代シーケンス解析においても、発現上昇遺伝子の半分以上が脳関連因子、また発現減少遺伝子は脳以外の様々な中胚葉、内胚葉に属する組織に由来するものであることが明らかになった。

以上のことから、本研究で同定した因子は、進化的に保存された自然の多能性幹細胞に共通な神経分化の制御機構に関与している可能性がある。

19 臍帯組織中に存在する多能性幹細胞 Muse 細胞の多能性の解析

○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, 溝淵雅巳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理学分野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

我々はヒト間葉系組織に多能性を有する 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され、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、多能性マーカーの発現、I 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、腫瘍形成能を持たないため、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。これまでの成人由来の Muse 細胞の性質については明らかにされていないもの、胎児付着体由来の Muse 細胞の特徴については明らかにされていない。本研究では、臍帯組織由来の Muse 細胞の性質について報告する。

臍帯組織由来の間葉系幹細胞から単離した Muse 細胞は、I 細胞での浮遊培養により多能性マーカーを発現する細胞塊の形成、自発的な三胚葉性の細胞への分化や自己複製能を有することが確認された。また、特定のサイトカインを用いた分化誘導により、神経幹細胞、肝細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞、骨芽細胞への分化が確認された。以上より、臍帯組織由来 Muse 細胞は成人組織由来の Muse 細胞と同様の性質を有することが示唆された。

20 Muse 細胞を使用した悪性グリオーマの自殺遺伝子治療

○若尾昌平¹, 山崎友裕², 難波宏樹², 出澤真理¹

¹ 東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野, ² 浜松医科大学付属病院脳神経外科

悪性グリオーマは脳内に浸潤性に広がる腫瘍であり、難治性疾患であるため現行の放射線療法・化学療法による根治は不可能であり、代替療法の開発が必要である。これまでに、腫瘍細胞に遊走する細胞に自殺遺伝子である単独ヘルペスチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を発現させて移植をし、その後抗ウイルス薬であるガンシクロビル (GCV) を投与することにより、遠位に浸潤した腫瘍細胞をターゲットとした自殺遺伝子治療の有効性や安全性が検証されてきた。これまでの研究では、自殺遺伝子の運び屋として神経幹細胞や骨髄間葉系幹細胞を使用した悪性グリオーマに対する自殺遺伝子療法の報告が行われてきた。

本研究室で見出された Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞は、生体由来の多能性幹細胞であり、そのまま生体へと投与するだけで損傷した組織へと遊走・生着し、場の論理に応じて必要な細胞へと分化することで組織の修復を行う。また多能性と自己複製能を有しているが腫瘍形成能は低い安全性が高く、臨床応用における細胞ソースとして期待されている。そこで今回我々は、自殺遺伝子である HSV-TK 遺伝子を発現する Muse 細胞を作製し、これらの細胞を移植することで悪性グリオーマに対する自殺遺伝子治療の効果を検討したので報告をする。

21 ヒト Muse 細胞の代謝解析および細胞増殖活性効果の検討

○樋口淑江¹, 若尾昌平¹, 巽一喜², 出澤真理¹

東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野¹, 株式会社 Clio²

【背景】 Muse 細胞は、組織修復能を有する多能性幹細胞であり、間葉系幹細胞中に数%の割合で存在する。iPS 細胞や ES 細胞のような多能性幹細胞は嫌気代謝を行い、かつ腫瘍性増殖能を有するのに対し、自然由来の Muse 細胞は腫瘍性の懸念が低い。このことから安全な細胞移植治療の細胞ソースとしての期待が高まる一方で、臨床応用のためには十分な Muse 細胞数の確保が課題である。本研究では Muse 細胞の代謝メカニズムの解明と共に代謝制御による増殖活性効果を検討し、有用な培養法の開発を目的とした。【方法】 ヒト骨髄間葉系細胞 (hMSC) 由来 Muse 細胞、Muse 由来分化細胞、非 Muse 細胞および iPS 細胞を用いて、酸素消費速度、解糖能、ミトコンドリア量および ATP 量の解析を行い、比較検討した。また、hMS を低酸素 (1%O₂) で培養し、Muse 細胞の陽性率および多能性を検証した。【結果】 Muse 細胞の酸素消費速度、ミトコンドリア量、ATP 量は、非 Muse 細胞よりも低く、iPS 細胞よりも顕著に高いことが明らかとなった。また解糖能は iPS 細胞で最も高く、Muse 細胞および非 Muse 細胞では同程度であった。以上より Muse 細胞の代謝は、iPS 細胞ほど嫌気的ではなく、非 Muse 細胞ほど好気的でもない、中間の状態であるということが明らかとなった。また Muse 細胞の脂肪細胞への分化に伴い、より好気的な呼吸へシフトした。さらに、hMSC を低酸素 (1%O₂) 条件下で 2 週間培養したところ、含まれる Muse 細胞の割合が 2~3 倍程度増加しており、多能性細胞塊形成能および多能性因子発現量の解析から多能性を維持または僅かに上昇する傾向が確認された。

22 ヒト上顎大臼歯の形態変異：形態地図法による定量化

○森田 航¹, 森本 直記², 大島 勇人³

北海道大学大学院歯学研究科口腔機能解剖学教室¹, 京都大学大学院理学研究科 自然人類学研究室², 新潟大学大学院医歯学総合研究科 硬組織形態学分野³

歯の形態における連続的な変化傾向について、field theory と clone theory という2つの仮説が提唱されてきた。近年の実験発生学研究により、これらは提唱時に考えられていたような互いに排他的なものではなく、相補的なものだと理解されつつある。具体的には、活性化因子-抑制因子の相互作用に基づき、臼歯間の相対的なサイズ差についての抑制カスケードモデル、咬頭形成についてのパターンニングカスケードモデルという形態形成モデルが示されている。

今回、我々は形態地図法という新しい3次元形態測定法を用いて、ヒト上顎大臼歯間 (UM1, UM2, UM3) の形態変異を解析し、i) 大臼歯間の近心から遠心への形態的勾配と ii) 変異の増大、iii) サイズに相関して UM が UM1 の形態へと収斂する傾向、を定量化・視覚化した。これらの結果を元に形態と歯の形態形成モデルとの関係を議論する。

23 蛍光免疫染色像とオスミウム浸軟SEM像の相関顕微鏡観察法の開発

○甲賀 大輔¹、久住聡²、暮地本由己¹、渡部剛¹、牛木辰男³
 旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野¹、鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 形態科学分野²、新潟大学大学院 医歯学総合研究科 顕微解剖学分野³

オスミウム浸軟法は、細胞内の微細構造、特にゴルジ装置やミトコンドリア、小胞体などの膜性小器官をSEMにより観察できる魅力的な手法であり、これまで私たちは、この浸軟法を用いて主にゴルジ装置の立体微細構造解析を行ってきた。一方で、この手法では、膜の固定や細胞質内の可溶性蛋白質を除去するためにオスミウム酸液を用いるため、免疫細胞化学的手法の適用は困難であった。そこで本研究では、この問題を解決するため、従来TEM観察用の標本作製技術として用いられてきた凍結切片法(徳安法)とオスミウム浸軟法を組み合わせ、新たな顕微鏡観察手法を開発した。その結果、従来のオスミウム浸軟組織観察だけでは同定が困難であったLH細胞は、徳安法で採取した切片の免疫染色により正確に同定することができた。さらに、細胞内におけるゴルジ装置や小胞体関連蛋白質の局在も蛍光像とSEM像とを照らし合わせて観察することができた。本法で得られたSEM観察像の像質については、ミトコンドリアのクリステやゴルジ装置のゴルジ槽、分泌果粒の微細構造などが十分に保たれており、従来のオスミウム浸軟法にほぼ匹敵する解析が可能であることが示された。この新たな顕微鏡観察法を用いれば、オスミウム浸軟法により得られる細胞内の立体微細構造情報に機能分子の局在に関する情報を結びつけることができる。この手法は、今後、下垂体だけでなく、様々な細胞が混在する複雑な組織(膵島、腸管上皮内散在性内分泌細胞など)にも適用可能であり、立体微細構造と機能の連関を解析する有効な手段となることが期待される。

24 鼻涙道に散在し不思議な形態をとる GP2 含有細胞

○岩永敏彦、岸本亜由子、木村俊介、岩永ひろみ
 北海道大学 解剖学講座 組織細胞学分野

GP2は腺外分泌部の分泌顆粒膜に局在し 涙液中に放出される糖蛋白であるが、抗GP2抗体を使ってマウスの結膜とそれに続く鼻涙道 nasolacrimal duct を染色したところ、2種類の細胞が選択的に染まった。このうち鼻涙道の重層扁平上皮内に散在する細胞は、これまでに記載のない特異な細胞であった。結膜では、PAS 陽性の杯細胞が散在性にあるいは小集団をつくって広く分布するが、それらのすべてがGP2のmRNAと蛋白質を強く発現していた。消化管や気管の杯細胞はまったくGP2を発現しないので、結膜の杯細胞に特有の性質であるといえる。鼻涙道は涙小管、涙囊および鼻涙管の3つの部分からなり、全体を通して上皮内に GP2 陽性細胞が散在していた。陽性細胞は円柱形で、基底膜から上皮表面まで伸びていた。その中にはアーチ状のあるいは分岐する細胞質突起を基底膜に伸ばしているものが多数見られた。電顕レベルでは、GP2の陽性反応はbasolateral membrane に局在するほか、管腔側の分泌顆粒(結膜の杯細胞の場合)の限界膜、管腔側細胞質の小胞や小胞体(涙囊と鼻涙管の場合)に見られた。これらの形態は、GP2が管腔内へ放出される可能性を示唆している。GP2は管腔側に放出され、細菌感染に防衛的に働くと思われる。

25 Comparative anatomy of the pericapillary mesangial tissues in the renal glomeruli: scanning and electron microscopic observations

○Hiromi Takahashi-Iwanaga
 Laboratory of Histology and Cytology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

The pericapillary mesangial interpositions that affect spaces between the endothelium and basement membrane in the renal glomeruli were observed in four vertebrate classes: mammals (rats and rabbits), reptiles (greeniguanas), amphibians (bullfrogs), and teleosts (carp). The specimens were examined both by SEM after hydrolytic removal of extracellular matrices and by TEM according to a conventional method. The observations discriminated three types of pericapillary tissue. The first, acellular interpositions, occurred universally, with mammals displaying rudimental ones. This tissue type corresponded with subendothelial grooves filled with loose matrices, and often constituted an anastomosed system of channels which can convey glomerular filtration residues into the mesangial region. In the second, compound type that was specific to reptiles and amphibians, fine mesangial processes--which accompanied considerable amounts of fibrillar matrices--were loosely associated with the endothelial bases, indicating their possible nature as a kind of myofibroblast. Occurrence of the third, cellular interpositions was confined to small incidental loci in mammalian and teleost glomeruli. This tissue type was occupied by thick processes or main bodies of the mesangial cells that were tightly attached to the endothelium.

26 カミツキガメ *Chelydra serpentina* の嗅覚系に関する形態学的研究

○中牟田祥子¹、加藤英明²、山本欣郎^{1,3}、中牟田信明^{1,3}

岩手大学 農学部 獣医解剖学研究室¹、静岡大学 教育学部²、岐阜大学大学院 連合獣医学研究科 基礎獣医学専攻³

多くの脊椎動物は主嗅覚系と鋤鼻系という2つの独立した嗅覚系を持つ。本研究で我々は、特定外来生物であるカミツキガメの嗅覚系について形態学的特徴を調べた。カミツキガメの鼻腔は、上憩室と下憩室の2憩室に分かれ、共に感覚上皮で裏打ちされていた。付属腺は上憩室上皮にだけ存在した。上憩室上皮には線毛性感覚細胞、下憩室上皮には微絨毛性感覚細胞が分布していた。それらの感覚細胞は共に匂い受容体に共役するGαolfと2型鋤鼻受容体に共役するGαoの両方を発現していた。上憩室上皮から出た軸索束は嗅球の腹側部へ、下憩室上皮から出た軸索束は嗅球の背側部へそれぞれ投射していた。上憩室上皮と嗅球腹側部、下憩室上皮と嗅球背側部によって構成されるは2つの嗅覚系は互いに異なるレクチン染色性を示した。上下両憩室はほぼ同大で、嗅球腹側部と背側部もほぼ同大だった。カミツキガメは嗅覚器、嗅神経、嗅球がよく発達し、鋭い嗅覚を持つことが示唆された。また、カミツキガメ嗅覚器の形態学的特徴は、いずれも半水生カメであるクサガメやアカミミガメのものに似ていたが、スッポンのそれとは異なっていた。半水生カメの鼻腔は、その内眼解剖学的特徴と付属腺の有無から、上憩室が空気中、下憩室が水中で機能すると考えられている。カミツキガメの上憩室や嗅球腹側部が下憩室や嗅球背側部と同程度に発達していることから、カミツキガメは空気中の匂いを受容する十分な能力を持つことが示唆された。

27 腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) の活性化および細胞死の形態学的解析

○尾形雅君¹、大和田祐二¹、伊藤恒敏²
¹東北大学大学院 医学系研究科 器官解剖学分野、²東北福祉大学

【目的】マウスに抗 CD3 抗体を投与すると、30 分以内に十二指腸および空腸の絨毛上皮細胞に DNA 断片化が誘発され、その後上皮細胞の剥離を伴う下痢が生じる。この一連の現象において、上皮細胞間リンパ球 (IEL) の活性化に伴う変化を形態学的に確認できるのか、T細胞抗原受容体 (TCR) 関連抗原の発現は変化するのか、最終的に IEL はどのような転帰をたどるのかを検証した。【結果・考察】抗体刺激後、IEL と上皮細胞の間隙が生じ、核の凝縮像も観察された。間隙には顆粒状の構造物も確認された。TCR 関連抗原の染色性は抗体投与後に弱くなり、90 分以降には消失するのに対し、CD8αに変化はみられず、抗 CD3 抗体が TCR-CD3 複合体に結合して IEL が活性化したものと考えられる。抗体刺激2時間後の絨毛においても IEL が確認されたため、刺激後の IEL の最終的な転帰をさらに検討した。48 時間後までは時間経過に伴って数は減少するものの、長時間にわたって IEL が絨毛上皮内に存在し続けることが確認された。72h 後、IEL は残存する上皮層から完全に消失した。抗体投与後の IEL の形態観察では、細胞の縮小化、核の凝集、細胞核の強い好塩基性染色、細胞核の小体化、細胞表面の blebbing などの典型的な細胞死の形態を示す像が観察され、TCR 関連マーカーの消失と併せて、刺激を受けた IEL は絨毛上皮間で細胞死を起こし、最終的にその場で消滅することが強く示唆された。

28 Epidermal fatty acid binding protein (EFABP)によるパリエル板 M 細胞腸管内抗原取り込み機構制御

○鈴木良地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 東北大 院医学 器官解剖学分野⁴
 表皮型脂肪酸結合タンパク質 (Epidermal fatty acid binding protein:EFABP) の C57BL/6 マウスパリエル板M細胞、樹状細胞の発現様態は腸管内抗原認識への関与を示唆するものである。

腸管内の常在菌の一つである *L.acidophilus* は EFABP ノックアウトマウス (EFABP K.O.) の腸管内で増えていた。 *L.acidophilus* は dendritic cell (DC) specific intercellular adhesion molecule3 (ICAM3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) によって認識される。EFABP K.O. と野生型 C57BL/6 マウスの小腸ホモジネートを用いた DC-SIGN ウェスタンブロット解析で、EFABP K.O.由来のサンプルでのみ DC-SIGN neckless isoform に相当するバンドが明瞭に検出された。

DC-SIGN, DC-SIGN neckless それぞれと、DC-SIGN, DC-SIGN neckless 同時発現した Caco2 細胞培養系に、DC-SIGN によって認識される *L.acidophilus* の菌体成分である S-layer protein をコートした蛍光ビーズを加え共焦点レーザー顕微鏡で10分毎の time-lapse 撮影をした。同時発現系ではビーズ下に形成された蛍光シグナルの集積が維持されず、ビーズを離してしまう様子が観察された。

EFABP シグナルの下流に腸管抗原認識分子の転写調節機構があり、腸管内抗原の粘膜下への提示が間接的に制御されていると考えられた。

29 粘膜組織のリンパ濾胞上皮 M 細胞の分化機構の解析

○木村俊介¹、武藤麻美²、岩永敏彦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¹、大学院歯学研究科 口腔機能学講座 歯科矯正学教室²

鼻腔、消化器のような粘膜組織では免疫系が発達し体内で最も多くのリンパ球が常駐する。各所に点在するリンパ濾胞は免疫系の制御の中心となる。リンパ濾胞上皮の Microfold 細胞 (M 細胞) は管腔内抗原の取り込み口であり、粘膜免疫応答において最も初期に抗原と接する細胞である。正常時には M 細胞は濾胞上皮に限局するが、炎症性腸疾患や食中毒菌の感染によって腸上皮全域に異所性の出現が認められるようになる。そのため、M 細胞は炎症性疾患の発症と慢性化に関係すると想定され、その分化機構の全容の解明は、炎症性腸疾患や感染症における新たな治療戦略の開発につながると期待される。

M 細胞分化機構を明らかにするために新規 M 細胞発現分子の探索を行った。その結果、M 細胞分化を抑制する分子を見出した。抑制分子は M 細胞自身が分泌し、濾胞上皮において M 細胞の過剰な分化を防ぐ機構が存在していることが明らかになった。

30 発達期の脳血管内皮に発現する栄養素トランスポーター

○岸本亜由子、岩永ひろみ、渡辺雅彦、岩永敏彦

北海道大学 解剖学講座 組織細胞学分野

発達期 (授乳期) の脳の栄養素としてはグルコースよりもケトン体や乳酸が重要であり、それらを取り入れるために脳血管には MCT (monocarboxylate transporter) が発現している。ケトン体は乳脂肪から大量に供給されるからである。マウス新生子での MCT1 免疫組織化学解析により、このときの脳の血管内皮には無数の MCT1 陽性の糸状・ひも状の突起が伸びていることがわかった。血管先端の出芽部位ばかりでなく横方向に放射している細長い突起は、GLUT1 よりも MCT1 抗体で強く染め出され、通常の血管の出芽とは異なる像と思われる。Adult の脳にはこのような突起は見られない。ついで、この突起を詳細に観察するために、網膜の whole mount 標本を観察した。網膜表層を伸びる新生血管は MCT1 を強く発現していたが、GLUT1 の発現は限定的で非常に弱かった。そして、脳の血管以上に、MCT1 を発現する血管内皮は細く長い突起を密に周囲に伸ばしていた。これらの血管は GLUT1 抗体には染まらなかったが、硝子体血管では、逆に GLUT1 がより強く発現し、その血管壁に少数の MCT1 陽性の内皮細胞がはまり込んでいた。成長中の血管内皮には MCT1 が、消退過程にある血管では GLUT1 が発現していることになる。水晶体の周囲には水晶体血管膜があるが、ここでは MCT1 陽性の血管と GLUT1 陽性の血管がモザイク状に配列していた。これらの知見は、発達期の脳や網膜の血管の特異性 さらに栄養素の供給を考える上で、多くの情報を提供するという。

31 眼の初期血管系の形成過程

○橋浦哲哉^{1,2}、木村英二¹、藤澤志津子^{1,2}、及川里百合¹、黒坂大次郎²、人見次郎¹岩手医科大学 解剖学講座 人体発生学分野¹、眼科学講座²

【背景】眼の血管系は視覚の機能維持に必須だが、その形成過程の多くは不明のままである。本研究では Zebrafish (*Danio rerio*) を用い、初期血管系の形成過程を形態学的に解析した。【材料と方法】血管内皮細胞で特異的に緑色蛍光を発する EGFP-transgenic zebrafish を生きたまま二光子顕微鏡でタイムラプス撮影し、血管系の形成過程を解析した。また動脈と静脈のマーカー遺伝子として、それぞれ *hey2* と *flt4* を用い、眼の血管系の発生母地の発現パターンを *in situ* hybridization 法を用いて解析した。受精後 1 日目胚の眼の血管形成領域に関しては、GMA 樹脂包埋標本の準超薄連続切片 (厚さ 300nm) を作成し、写真撮影後に 3 次元再構築ソフト (Amira) を用いて血管系と眼胞との位置関係を解析した。【結果と考察】頭部の初期血管系は、眼胞吻側に形成される ROC (rostral organizing center) と、眼胞と耳胞の間に形成される MOC (midbrain organizing center) の 2 つの血管床から生じ形成されるが、ROC からは、血管新生により頭部の動脈系の CrDI (cranial division) と CaDI (caudal division) が、MOC からは動脈系の PICa (primitive internal carotid artery) と LDA (lateral dorsal aorta) と静脈系の PMBC (primordial midbrain channel) が形成されるとの報告がある (Proulx et al., 2010)。今回我々は、OA (optic artery) が ROC から、OV (optic vein) が、PMBC の尾腹側からそれぞれ発生することを明らかにした。OA と OV は共に眼胞の腹側から眼杯裂に侵入し吻合し、その後、OV は眼杯外側へ変位していく。連続切片の 3 次元再構築により、OA と OV の眼杯への侵入が眼杯裂に一致し、さらに眼杯内の間葉組織内を OV が外側へ変位していくこと確認した。一方、眼の表面の血管系は、CrDI が眼胞の背側に伸展し PMBC と繋がり、PMBC の吻側からは、水晶体表面へ伸長する枝である DCV (dorsal ciliary vessel) が形成される。DCV は水晶体表面から、さらに前方背側へ伸長するとともに、NCA (nasal ciliary artery) が、CrDI と PMBC との吻合部辺りから起こり、水晶体に向かって伸長していく。これら 2 つの血管系は、水晶体の外側表面で冠状に吻合し、初期の眼球血管系が形成される。初期の血管床では、ROC に *hey2* が、PMBC に *flt4* が発現しており、非常に早い発生段階から ROC の動脈としての形質が認められた。今回の結果は、発生異常研究のための基盤であり、今後はその制御メカニズムの解析を進めていく。

32 ブルキンエ細胞に発現するカルシニューリン CNB1 サブユニットは小脳の興奮性および抑制性シナプス回路形成に重要である

○宮崎 太輔¹、崎村 建司²、渡辺 雅彦¹¹北海道大 院・医・解剖発生²新潟大・脳研・神経細胞生物学

カルシウム/カルモジュリン依存的な脱リン酸化酵素のひとつカルシニューリンは、中枢神経系に広く発現し、様々な神経活動に関わっていることが知られているが、小脳の神経回路形成にどのような影響を与えているかについては不明な点が多い。本研究ではカルシニューリン調節サブユニット CNB1 に着目し、小脳ブルキンエ細胞特異的 CNB1 欠損マウスの形態学的な解析を行った。免疫染色法および神経標識法を行ったところ、欠損マウスでは登上線維・ブルキンエ細胞支配領域が近位に縮小しており、登上線維が近接するブルキンエ細胞近位樹状突起を支配し、登上線維-ブルキンエ細胞多重支配を引き起こしている様子が観察された。次に免疫電顕を行ったところ、本来ブルキンエ細胞樹状突起と対称性シナプスを形成する抑制性神経終末がブルキンエ細胞棘突起との間に非対称性シナプスを形成している様子が頻繁に観察された。このような棘突起型抑制性シナプス後部には興奮性シナプス後部に限局する PSD95 や AMPA 受容体の局在が認められたが、抑制性シナプス後部に限局する GABAA 受容体や足場タンパク gephyrin の発現は樹状突起型抑制性シナプスに比べて非常に弱いことが明らかとなった。一方、平行線維-ブルキンエ細胞シナプス後部では AMPA 受容体が有意に増加していた。以上の結果から、ブルキンエ細胞に発現する CNB1 は平行線維シナプス後部の AMPA 受容体密度を制限し、登上線維-ブルキンエ細胞単一支配化に強く関わっていることが明らかとなった。さらに抑制性終末-ブルキンエ細胞間での対称性シナプス形成にも影響を与えていることが明らかとなった。