

日本解剖学会

第92回近畿支部学術集会

会 期：平成28年11月27日（日）

会 場：近畿大学東大阪キャンパス 39号館 5 階 501講義室

1 Dab1 is differently involved in morphogenesis of hippocampal subdivisions

Marissa Blume, Fuduki Inoguchi, , Kosuke Taki and Yu Katsuyama

The hippocampal formation (HF) is morphologically and functionally distinguishable into subdivisions, the dentate gyrus, subiculum, and Ammon's horn. Ammon's horn is further divided into CA (Cornu Ammonis)1, CA2, and CA3. Reelin-Dab1 signal is essential for morphogenesis of the mammalian brain. In the neocortex, laminar pattern of the cortical neurons is inverted along the radial axis in the mutants of this signaling pathway. Morphological abnormalities in the HF in the mutants of Reelin-Dab1 signal were reported, but how these abnormalities appear during development had not been extensively studied.

In this report, we examined morphology of the well-developed Dab1 deficient HF stained by a silver impregnation method, and followed the Dab1 deficient HF development immunohistochemically detecting transcription factor proteins basically. We found that lack of Dab1 differently affects morphogenesis in each HF subdivisions, suggesting that the layering of the neurons in the dentate gyrus, CA1, and CA3 employs different developmental mechanisms in which Dab1 function is commonly involved.

2 コヒーシン欠損によるシナプス形成障害

藤田幸¹、山下俊英¹¹大阪大学大学院 医学系研究科 分子神経科学

コヒーシン複合体は染色体接着に関わるタンパク質複合体で、ヒトでは Smc1, Smc3, Rad21, Stag1/2 という4つのサブユニットによって、環状の構造を形成する。この環状の構造を利用して、コヒーシンはゲノムをループ状に束ね、エンハンサーとプロモーターの適切な相互作用を可能にする。これにより、コヒーシンは遺伝子の転写を調節すると考えられている。また、ヒトのコヒーシン関連遺伝子の機能低下では、Cornelia de Lange Syndrome (CdLS)を来す。この疾患では、姉妹染色体分配に大きな異常を呈さないにも拘らず、精神遅滞などの脳機能の以上を伴うことが知られている。このことから、コヒーシンが中枢神経系発生に寄与することが推察された。

そこで私達は、コヒーシンの機能低下が中枢神経の発生や発達に及ぼす影響を明らかにするため、コヒーシン欠損マウスを作成し、解析を行った。このマウスでは、スパインの形態異常を生じると共に、不安様行動が亢進した。以上から、コヒーシンの機能低下によりシナプス形成が障害され、脳の高次機能が破綻する可能性が示唆された。

3 エストロゲン関連受容体 ERR γ のラット脳における局在とその視索前野におけるエストロゲン受容体 ER α との共局在谷田任司¹、松田賢一¹、山田俊児¹、河田光博^{1,2}、田中雅樹¹¹京都府立医科大学 大学院医学研究科 解剖学・生体構造科学²佛教大学 保健医療技術学部

エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor: ERR) は、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) α と高い相同性を持ち、 α , β , γ の3つのサブタイプからなる核内受容体である。ERR の生体内リガンドは見付かっていないが、リガンド非存在下でも DNA 上の応答配列に結合し、エストロゲンシグナルやエネルギー代謝などに関与する遺伝子発現を調節する。ERR のサブタイプのうち γ 型は脳において特に豊富に発現することが知られているが、局在について詳細な情報は無い。そこで、成雄ラットを用いて脳における ERR γ の局在を免疫組織化学的に検索した。その結果、嗅球から大脳、間脳、小脳、および脳幹に至る広い領域で ERR γ の発現が認められた。中でも、視床網様核、脚間核、および橋核においては特に高密度に ERR γ 免疫陽性 (-ir) 細胞が分布していた。また、ERR γ -ir 細胞は ER α が強く発現する視床下部などにも多く認められた。蛍光抗体法によって、視索前野の前腹側脳室周囲核 (AVPV) および内側視索前野 (MPO) において、ERR γ と ER α の二重陽性細胞が確認された。以上より、ERR γ はエストロゲンの脳における作用に関与している可能性が示された。一方、視床網様核など ER 陰性の脳部位においては、ERR γ はエストロゲン非依存的に脳機能に関与することが想定された。

4 パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍糸球体細胞の解析田口勝敏¹、渡邊義久²、辻村敦²、田中雅樹¹¹京都府立医科大学 解剖学教室 生体構造科学²京都府立医科大学 脳・血管系老化研究センター 基礎老化学

α -シヌクレインはパーキンソン病に特徴的なレビー小体の主要構成分子であるが、通常は前シナプスに存在しており、シナプス伝達の調節に関与することが報告されている。しかしながら、その生理機能については未だ不明な点が多く残されている状況にある。我々は、これまでにマウス脳内における α -シヌクレインの発現解析を行い、興奮性シナプスの多くは α -シヌクレイン陽性である一方、抑制性シナプスにおける発現は脳部位により大きく異なるという性質を見出した。このことは α -シヌクレインの発現が脳部位あるいは神経細胞の種類に依存して厳密に制御されていることを示している。近年、興味深いことに α -シヌクレインの過剰発現が神経新生及び分化を阻害するという結果が蓄積されてきた。我々は α -シヌクレインの発現解析を進める過程において、一部の嗅球傍糸球体細胞の細胞体ではその発現が非常に高いことを見出した。これらの細胞では、神経分化を促進する転写因子 NeuroD1 陽性を示すと共に、その多くが神経幹細胞のマーカー分子である Sox2 について陽性を示した。一方、成熟した神経細胞のマーカー分子である NeuN については陰性であり、約半数の細胞では HuC/D の発現を検出することができなかった。以上の結果は野生型のマウス嗅球において、 α -シヌクレインが神経新生の調節、あるいは幼若性の維持に機能している可能性を示している。現在、脳虚血障害後における α -シヌクレイン高発現細胞の形態学的解析を進めており、 α -シヌクレインの生理機能の解明に繋がることが期待される。(COI:なし)

5 Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations

呉 凰美 同志社大学 脳科学研究科 神経回路形態部門

The globus pallidus (GP) is considered a relay nucleus in the indirect pathway of the basal ganglia (BG). Previous studies have used molecular profiling and projection patterns to demonstrate cellular heterogeneity in the GP; for example, parvalbumin (PV) -expressing neurons are known to comprise approximately 50% of GP neurons and represent majority of prototypic neurons that project to the subthalamic nucleus and/or output nuclei of BG, entopeduncular nucleus and substantia nigra (SN). The present study aimed to identify the characteristic projection patterns of PV neurons in the GP (PV-GP neurons) and determine whether these neurons target dopaminergic or GABAergic neurons in SN pars compacta (SNc) or reticulata (SNr), respectively. To address this question, we firstly produced PV-Cre rat (Tanahira et al. 2009) and the Cre/loxP system for gene expression allowed us to identify the axons originating from PV neurons in GP. We initially found that 1) 57% of PV neurons co-expressed Lim-homeobox 6, 2) the PV-GP terminals were preferentially distributed in the ventral part of dorsal tier of SNc, 3) PV-GP neurons formed basket-like appositions with the somata of tyrosine hydroxylase, PV, calretinin and cholecystokinin immunoreactive neurons in the SN, and 4) in vitro whole cell recording during optogenetic photo-stimulation of PV-GP terminals in SNc demonstrated that PV-GP neurons strongly inhibited dopamine neurons via GABA_A receptors. These results suggest that dopamine neurons receive direct focal inputs from PV-GP prototypic neurons. The identification of high contrast inhibitory systems on dopamine neurons might represent a key step toward understanding the BG function.

- 2 第92回近畿支部学術集会
- 6 LPS 単発投与によるミクログリア密度の一過性増加：
脳部位による heterogeneity
- 古部瑛莉子・河合晋太郎・稲垣春那・宮田清司
京都工芸繊維大学大学院・応用生物学系
- 脳の免疫担当細胞であるミクログリアは、サイトカイン放出や食食による細胞除去の機能を持っている。また、脳損傷時などには、脳内ミクログリア数が急激に増加するが、細菌構成成分 LPS による炎症刺激では連投により緩やかに増加することが報告されている。本研究では、LPS 単発投与により一過性の急激なミクログリア密度増加が起きるが、脳部位により heterogeneous であることを報告する。発熱を誘起する低濃度 LPS(100 μ g/kg)単発投与では、脳室周囲器官、体温中枢・視索前野、迷走神経中枢・孤束核において、投与3日間でミクログリアの50%以上が BrdU の取り込みを示し、著しい増殖が観察された。さらに、敗血症様低体温を誘起する高濃度 LPS(1 mg/kg)投与では、上記の脳部位に加え、多くの脳部位で数十%のミクログリアが BrdU 陽性であった。いずれの LPS 濃度でも、ミクログリア密度は LPS 投与後 5-10 日間高い状態を維持したが、20 日後にはほぼ標準レベルに戻った。また、LPS 投与 20 日後 BrdU 陽性ミクログリアの生存率を調べたが、増殖しなかったミクログリアとの差は僅かであった。以上の結果より、LPS 単発投与により脳室周囲器官、視索前野、孤束核など炎症や体温調節に関与する脳部位のミクログリア密度は一過的にかつ顕著に増加するが、LPS 濃度が高くなると、大脳を除く多くの脳部位でミクログリア密度が増加することが明らかになった。
- 7 神経分泌状態に依存した下垂体後葉血管系の構造的変化：
血管周細胞ペリサイトの果たす役割
- 西川和範¹・古部瑛莉子¹・森田晶子²・堀井謹子³・西真弓³・宮田清司¹
¹京都工芸繊維大学大学院・応用生物学系
²奈良県立医科大学・医学部・第2解剖学
³奈良県立医科大学・医学部・第1解剖学
- 下垂体後葉では、Oxytocin(OXT)や Vasopressin(AVP)神経の終末部が血管系と接し神経ペプチドを直接的に血中へ放出している。また、OXT や AVP 神経の活動増加に伴いグリア細胞の形態が変化することで終末部の血管系に対する接触率が増加し、神経分泌が促進されることが知られている。本研究においては、血管周皮細胞であるペリサイトに着目しマウス下垂体後葉血管系の構造が神経活動依存的に変化しないか調べた。後葉のペリサイト形態は複雑で、細胞質突起を内皮細胞に対して平行だけでなく垂直方向にも伸長していた。その結果、血管基底膜は波打つように複雑な輪郭を有し、時には perivascular protrusion と呼ばれる突起状の構造を形成した。血管透過性を、低分子トレーサーである FITC や Dextran3,000 を用いて調べたところ、perivascular protrusion で透過性が高かった。神経分泌が促進する浸透圧刺激を与えたところ、ペリサイトの細胞質突起が伸長し perivascular protrusion 数も有意に増加していた。また、浸透圧刺激により低分子分子の血管透過性も増加していた。以上の結果より、下垂体後葉血管系は、ペリサイトの特殊形態により他血管系では見られない複雑な基底膜の構造を持つことが分かった。さらに、OXT や AVP 神経の活動増加に伴い、ペリサイト細胞質突起が perivascular protrusion 数を増やし、終末部一血管の接触面積を増加させることで神経分泌効率を上げることが示唆された。
- 8 RIPK3 による炎症制御機構について
- 森脇健太
大阪大学大学院医学系研究科細胞生物学
- RIPK3 (Receptor interacting protein kinase 3) は細胞質内セリン・スレオニンキナーゼであり、TNF 受容体や Toll 様受容体などの下流で新規プログラム型ネクローシスであるネクロプトーシスを制御することがこれまで知られている。ネクロプトーシスを起こした細胞は、細胞膜の破裂に伴い、細胞外に免疫刺激物質を放出し、炎症反応を誘発する。実際、RIPK3 ノックアウトマウスを用いた解析により、RIPK3 が多くの炎症性疾患に関与していることが明らかとなってきた。しかしながら、RIPK3 が生体内でどのようにして炎症反応を誘導しているかは未だよく分かっていない。本研究では、RIPK3 がネクロプトーシス依存的な経路だけでなく、ネクロプトーシス非依存的な経路を介して、炎症反応を誘導することを示した。我々は、RIPK3 が樹状細胞において LPS 誘導性のサイトカイン産生を正に制御すること、またそのサイトカイン産生が腸炎時の組織の修復に必要であることを明らかにした。そのため、RIPK3 は、ネクロプトーシス依存的、非依存的経路を介して炎症反応を誘発し、生体の恒常性維持、またその破綻に関わっていると考えられる。
- 9 CXCL12 および FOXO1 によるリンパ管内皮細胞機能の調節
- ¹新美健太、¹香原美咲、¹稲垣忍、²古山達雄
¹大阪大学大学院・医・保健・神経生物
²香川県立保健医療大学
- リンパ管新生は既存リンパ管からの新規リンパ管出芽現象である。リンパ管新生の程度は腫瘍の病期などに影響する重要な要素であるが、そのメカニズムの多くは明らかではない。今回我々は新規リンパ管新生調節因子としてケモカインシグナルである CXCL12-CXCR4 系を考えた。CXCL12-CXCR4 系は CXCR4 発現細胞に対して CXCL12 の濃度勾配に従った化学遊走をもたらす因子としてよく知られており、その他にも細胞増殖をはじめ様々な細胞機能に影響する系である。我々はリンパ管内皮細胞に対しての CXCL12-CXCR4 系の化学遊走活性を検討し、その作用には多彩な生理機能を有するフォークヘッド型転写因子である FOXO1 が介在することを明らかにした。さらにリンパ管内皮細胞における CXCL12-CXCR4 系は PI3K/Akt 経路の活性化により FOXO1 の核内外局在を制御することを見出し、細胞増殖能を制御している可能性を示唆した。以上のようにリンパ管内皮細胞における CXCL12-CXCR4 系による化学遊走能・増殖能の制御およびその作用機序としてのフォークヘッド型転写因子 FOXO1 の役割について検討したため報告する。
- 10 単球/マクロファージ株 J774.1 の EphA2 とインテグリンリガンド
吸着基質への接着
- 小川和重、西野慎吾（大阪府大 生命環境・獣医解剖）
- 【背景と目的】我々は「EphA/ephrin-A は単球/マクロファージ(Mφ)の接着と血管内皮細胞層通過を制御する」と考え研究を進めている。細胞内ドメインを GFP に置換した EphA2 (EphA2ΔC)を発現する J774.1 と U937 (単球株)の作製に成功した。本研究では、J774.1 の親株、EphA2ΔC 亜株を材料に EphA が接着に及ぼす影響を検討した。【材料と方法】ephrin-A1-Fc 添加した細胞から免疫沈降で集めた内因性 EphA2 のリン酸化状態を親株と亜株と比較した。蛍光色素 CFSE 標識亜株と Far Red 標識親株の同数の細胞を、インテグリンリガンド ICAM1 または Matrigel と ephrin-A1-Fc の 2 重吸着領域とインテグリンリガンド単独吸着領域が交互に出現する基質上に播種して接着性を同一視野で比較した。【結果と考察】EphA2ΔC が内因性 EphA2 のリン酸化に及ぼす影響は明確には認められなかった。ephrin-A1-Fc との 2 重吸着領域上の親株と亜株の細胞密度はインテグリンリガンド単独吸着領域と比べ有意に高く、両株間で差はなかった。紡錘形細胞の出現頻度は 2 重吸着領域上の亜株で有意に高く、Vinculin/FITC-Palloidin 染色により亜株の接着性が高いことが判明した。以上の結果から、亜株の接着増強は内因性 EphA2 リン酸化への干渉ではなく、EphA2 細胞外ドメインに起因することが示唆された。
- 11 ラットバイエル板における濾胞被蓋上皮のアポトーシスと
RANK/RANKL の発現との関係
- 湯浅秀人¹⁾、増田なつみ¹⁾、西田美穂¹⁾、河野潤一²⁾、横山俊史³⁾、万谷洋平¹⁾、星 信彦³⁾、北川 浩¹⁾
¹神戸大・院農・組織生理、²神戸大・院農・感染症制御、³神戸大・院農・分子形態
- 【目的】本研究では M 細胞の分化に必要なとされる濾胞被蓋上皮 (FAE) におけるアポトーシス抑制への RANK/RANKL の関与について明らかにすることを目的とし、免疫組織化学的に調べた。【材料と方法】7 週齢の Wistar 系ラット雄 10 匹から粘膜上に常在細菌が存在しない部位および存在する部位の抗体を用いた酵素抗体間接法をおこなった。【結果】FAE 上に細菌が存在しないリンパ濾胞 (LF) では M 細胞は主に LF の基部から中部の FAE に多かったが、腸陰窩開口部付近の FAE 上にまで細菌が存在する LF では中部から頂部の FAE で M 細胞が増加した。RANK は細菌の有無にかかわらず腸絨毛および FAE の全長の上皮で弱い陽性を示した。RANKL は腸絨毛で陽性がみられなかったが、LF では FAE 直下の間質細胞が陽性を示し、FAE 上に細菌が存在しない LF ではその密度および陽性強度は頂部でもっとも高く、基部に向かうにつれて低くなっており、その存在する範囲も頂部でもっとも広く、基部に向かうにつれて狭くなった。一方、腸陰窩開口部付近の FAE 上にまで細菌が存在する LF では基部および中部で陽性細胞の密度および陽性強度が高く、その存在する範囲も広がった。また活性型 caspase-3 の陽性は腸絨毛の上皮と比べて FAE では弱かった。【考察】M 細胞の出現および増加部位の変化が RANKL の局在の変化と対応しなかったことから、RANK/RANKL は M 細胞の分化には直接関与しないことが示唆されるとともに、LF 特異的な RANKL の発現が FAE のアポトーシス抑制に関わる可能性が示唆された。

12 赤脾髄マクロファージの ephrin-A、EphA と細胞接着

○西野慎吾, 小川和重 (大阪府大 生命環境・獣医解剖)

【背景と目的】赤脾髄(RP)線維芽細胞(Fb)はインテグリンリガンド ICAM-1 陽性で、ケモカイン CXCL12 を分泌することが報告され、一般にマクロファージ(Mφ)はインテグリン LFA-1 とケモカイン受容体 CXCR4 陽性である。我々は、RP-Mφ の枯渇により RP-Fb の EphA2 発現が上昇することを見出した。これらの点から、「RP-Mφ の定着に RP-Fb の EphA が関与する」と仮説を立て、これまでに RP-Fb と RP-Mφ の増殖・分離法を開発し、両細胞の EphA、ephrin-A 発現を検討してきた。本研究では、両細胞の接触で発生が想定される EphA と ephrin-A シグナルの働きを RP-Mφ の接着の観点から検討した。

【材料と方法】マウス脾臓より増殖・分離させた RP-Mφ を使用した。EphA2-Fc または ephrin-A1-Fc とインテグリンリガンド ICAM-1 または VCAM-1 の 2 重吸着領域とインテグリンリガンド単独吸着領域が交互に現れる基質を作製し、両領域に対する RP-Mφ の接着性を比較し、ephrin-A、EphA の活性化が接着に及ぼす影響を検討した。

【結果と考察】EphA2-Fc、ephrin-A1-Fc いずれも ICAM-1 の 2 重吸着領域上で細胞密度が有意に高く、細胞個々の接着面は著しく増大していた。VCAM-1 は、単独吸着領域と比べ 2 重吸着領域上で細胞個々の接着面は相対的に増大していたが両領域間で細胞密度の差は認められなかった。以上より、RP-Mφ の ephrin-A および EphA シグナルはインテグリンを介して細胞の接着性を上昇させることが示唆された。

13 急性骨髄性白血病株 HL60 の単球分化と接着関連分子の発現

○駿河宣彦, 西野慎吾, 小川和重 (大阪府大 生命環境・獣医解剖)

【背景と目的】HL60 は単球系に分化誘導できる。我々は、Vitamin D と TNFα (VD+TNF) の添加で(1) NaF 耐性非特異的エステラーゼ陽性細胞率が 65% 以上と HL60 を高率に単球に分化でき、分化に伴ない Matrigel 吸着基質への接着性が誘導されること、(2) EphA2、EphA4 の発現誘導と ephrin-A4 の発現上昇が起こり、EphA および ephrin-A の活性化で Matrigel 吸着基質への接着性が著しく増強することを明らかにしてきた。本研究では、分化に伴う接着性の誘導現象を調べる目的で、HL60 の分化マーカー分子と接着関連分子の発現を検討した。

【材料と方法】VD+TNF 添加と非添加(対照群)の HL60 を材料に、単球マーカー CD14 と CD16、単球に発現するインテグリン(In)α 鎖と β 鎖とケモカイン受容体、In 活性化制御分子 Rap1A 発現を RT-PCR とセルアナライザーで検討した。

【結果と考察】添加群で CD14 発現が明確に誘導され CD16 発現レベルは非常に低い。HL60 は炎症性単球に分化したと考えられた。両群ともに α4、α5、α6、αL、αM、β1、β2、CXCR4 の細胞表面の発現と Rap1A の mRNA 発現が認められ、添加群と同様に対照群にも多様な In および In 活性化制御分子の発現が明らかになった。In リガンドとして α6β1 は Laminin、αLβ2 と αMβ2 は Collagen と結合することから、対照群の HL60 が Matrigel 吸着基質に十分な接着性を示さない原因を調べる必要がある。

14 ラット回腸粘膜における各種間質細胞の局在

万谷洋平¹⁾, 宮本和樹¹⁾, 西田美穂¹⁾, 湯浅秀人¹⁾, 増田なつみ¹⁾, 横山俊史²⁾, 星 信彦²⁾, 北川 浩¹⁾
¹⁾神戸大・院農・組織生理, ²⁾神戸大・院農・分子形態

【目的】本研究では、回腸粘膜における telocyte (TC) などの各種間質細胞の局在を免疫組織化学的に明らかにすることを目的とした。【材料と方法】7 週齢の雄 Wistar 系ラット 5 匹の回腸バイエル板を摘出し、CD34、CD31 (血管内皮細胞マーカー)、α-smooth muscle actin (α-SMA、筋線維芽細胞 (MF) マーカー)、c-kit (Cajal 介在細胞マーカー) を免疫組織化学的に検出した。【結果】CD34 は、回腸組織中の血管内皮細胞、一般腸腔窩 (IC) 周囲の粘膜固有層 (LM)、粘膜下組織、各種神経叢の周囲や筋層の間質細胞で検出され、CD34⁺CD31⁺間質細胞 (TC) は IC 底部周囲の LM 内、粘膜下組織、各種神経叢および筋層内でみとめられた。α-SMA は一般粘膜中のすべての平滑筋細胞や主に IC 側面の上皮直下の間質細胞で、また c-kit は各種神経叢、輪筋層の間質細胞で検出された。一方、濾胞付属腸絨毛 (FAIV)、FAIV に付属する腸腔窩周囲の LM およびリンパ濾胞では CD34⁺CD31⁺間質細胞および c-kit⁺間質細胞はみとめられず、α-SMA は FAIV の LM 内の平滑筋細胞、FAIV に付属する腸腔窩のうち濾胞付属腸腔窩 (FAIC) の底部から側面の上皮直下、FAIC に対置する腸腔窩の側面の上皮直下、円蓋域の一部、傍濾胞域の間質細胞で検出された。CD34-α-SMA および CD34-c-kit の蛍光二重染色では、いずれの組合わせでも共局在はみとめられなかった。【結論】一般粘膜の腸腔窩とリンパ小節近傍の腸腔窩では上皮直下間質細胞の種類が異なることが明らかになり、IC では主に底部に TC が、側面に MF が存在する一方で、FAIC では底部から側面にまで MF が存在することが示唆された。

15 膵外分泌・内分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能と阻害化合物の検討

○國井政孝, 原田彰宏
大阪大学医学系研究科細胞生物学

膵臓腺房細胞からの消化酵素の分泌やランゲルハンス島 β 細胞からのインスリン分泌は分泌顆粒と細胞膜との融合によってなされる。この膜融合は 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 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と細胞膜と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、膵外分泌腺特異的および内分泌腺特異的ノックアウト (KO) マウスを作製した。その結果、膵外分泌腺特異的 KO 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、SNAP23 が膵外分泌に必須であることが示唆された。一方、膵内分泌腺特異的 KO マウスでは逆に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、SNAP23 はインスリン分泌においては抑制的に機能していることが考えられた。さらに、我々は SNAP23 の機能を阻害する低分子化合物を同定し、この化合物がマウスにおいてインスリン分泌を増加させることを確認した。

16 ラット呼吸器系粘膜を覆う粘液層における β-defensin 1 および β-defensin 2 の存在および分泌源の同定

増田なつみ¹⁾, 万谷洋平¹⁾, 西田美穂¹⁾, 湯浅秀人¹⁾, 河野潤一³⁾, 横山俊史²⁾, 星信彦²⁾, 北川 浩¹⁾
¹⁾神戸大・院農・組織生理, ²⁾神戸大・院農・分子形態, ³⁾神戸大・院農・感染症制御

【目的】ラット呼吸器系における β-defensin 1 (BD1) および β-defensin 2 (BD2) の分泌細胞の分布および粘液層における BD1 および BD2 の存在を免疫組織化学的に調べた。【材料と方法】7 週齢の Wistar 系ラット雄 5 匹の鼻腔粘膜、喉頭、気管、肺外および肺内気管支、細気管支および肺胞上皮を 4%paraformaldehyde (PFA) で、3 匹の鼻腔粘膜、喉頭、気管および肺外気管支を Carnoy 液で固定し、BD1 および 2 に対する免疫組織化学をおこなった。Carnoy 固定組織に対しては PAS 反応もおこなった。【結果】PFA 固定組織では、鼻と肺外気管支の無絨毛無微絨毛上皮細胞 (NC) の少数が BD1 および 2 陽性を、鼻と肺外気管支の杯細胞 (GC) の少数が BD1 のみ陽性を示したが、喉頭、気管および肺内気管支では BD1 ないし 2 陽性の NC および GC はほぼみられなかった。細気管支ではいずれの上皮細胞の細胞質も陰性であり、肺胞では大肺胞上皮細胞のみがまれに BD2 弱陽性を示した。加えて、鼻腺の漿液細胞の少数、介在導管の上皮細胞の大部分、喉頭腺および気管腺の導管の粘液細胞および導管内容物が頻繁に BD1 および 2 陽性を示した。喉頭腺および気管腺の終末部は陰性であった。Carnoy 固定組織では、いずれの部位においても PAS 陽性を示す粘液層が残存し、BD1 のみ陽性を示した。【結論】生理的条件の呼吸器系では、BD1 と BD2 の分泌細胞が主に鼻から肺外気管支にかけて配置され、さらに BD1 が常に鼻から肺外気管支を覆う粘液層に存在することによって細菌の定着しにくい環境が形成される可能性が推察された。

17 腎尿細管構築における繊毛病遺伝子 Inv の役割

茂田 昌樹, 横山 尚彦
京都府立医科大学 大学院医学研究科 生体機能形態科学部門

腎尿細管の構築と伸長を制御する機構は、細胞増殖と細胞分裂軸の関わりが考えられている。囊胞腎は、尿管が拡張する疾患であり、尿管構築の異常による病態であると考えられる。本研究では、尿管の構築・伸長過程について、①尿管の管腔を構成する細胞数 ②管腔径 ③ BrdU を用いた増殖率 ④ EdU パルスチェイス実験による細胞分裂後の娘細胞の動態に注目して、その変化を経時的に解析し、Inv 変異体 (囊胞腎モデル) と比較した。【結果】①尿管管腔を構成する細胞数のピークが P1⁺4 で減少し、P9 で最小となり、その後増加する。②管腔径は P1⁺4 で増加し、P9 に短くなり、その後 P15、P30 と段階的に長くなることがわかった。③尿管上皮の増殖率は、P4 ではほとんど見られず、P15 にかけて増加、最大となり、Inv 変異体では、すべての発生段階で増加し、そのピークは P9 で対照と比べ早かった。④細胞数の倍化が確認され、分裂後の娘細胞の配置動態を調べる系が確立された。【考察】管腔を構成する細胞数は、P1⁺4 を除いて管腔の長さや相関しており、発生段階で規定されている可能性が示唆された。また管腔を構成する細胞数と増殖率は発生段階 (P1⁺9) によっては相関せず、細胞配置の再編が尿管形態に影響する一要因と考えられた。Inv 変異体では、ネフロン新生が終了し始めるとされる P4 で、尿管の拡張前に異常増殖が先行して起きることがわかった。今後は、分裂後の娘細胞の配置変化の詳細を調べることで、細胞増殖と尿管構築・伸展の関係が明らかにされ、囊胞腎発症機構の解明が期待される。

18 腎神経温存虚血/再灌流ラットを用いた腎組織変性・線維化の組織学的解析

○藤平真弓、前田誠司、湊 雄介、田中宏一、大谷佐知、八木秀司
(兵庫医大・解剖・細胞生物)

我々は、腎傷害に伴う線維化における自律神経系の関与を検討するために、腎動脈周囲の腎神経を温存して虚血/再灌流(I/R)を行うラットモデルを作成した(第121回本学会総会,2016)。今回我々は、本モデルラットにおける尿細管傷害および、それにつづく間質線維化の過程を形態的に検討した。ラット左腎神経を温存しI/Rを行い、再灌流後一定時間ごとに採材した。尿細管変性および間質線維化は、切片にHE染色およびVanGieson染色(VG)を施し検討した。マクロファージ(Mφ)および筋線維芽細胞(MFCs)は、免疫組織化学を施し検出した。CD68陽性Mφの単位面積当たりの細胞数は再灌流後4日目に最大となった後徐々に減少していった。この傾向は特に外髄質で顕著であった。CD206陽性Mφは、皮質では再灌流後24時間の段階から増加し4日目に最大となった。尿細管変性の推移と比較すると、Mφの増加とともに変性尿細管が減少し始める傾向がみられた。尿細管間質において抗α-SMA抗体陽性MFCsの局在はVG陽性領域と重なっており、皮質および外髄質の変性尿細管間質において特に顕著な集積がみられた。尿細管間質のα-SMA領域は4日目以降に明らかに増加し、線維化の進行と相関が見られた。また4日目と7日目と比較するとα-SMA領域の増加は緩やかであるのに対しVG領域の強い拡張が見られた。以上から、I/Rラット腎臓において、尿細管変性後の組織修復にCD206 Mφが、また、尿細管間質線維化にMFCsの増加が関連すると考えられる。今後、本モデルラットを用い、腎傷害時における自律神経系の関与について検討していく。

19 膀胱ATPシグナル伝達の生理的・病的意義の検討

上田倫央1,2)、近藤誠1)、竹澤健太郎1,2)、野々村祝夫2)、島田昌一1)
1)大阪大学大学院医学系研究科 神経細胞生物学講座
2)大阪大学大学院医学系研究科 泌尿器科学講座

【背景と目的】膀胱の尿路上皮はこれまで単なるバリアと考えられてきた。しかし近年、尿路上皮がメカノセンサーとして働き、神経伝達物質としてATPを放出することが明らかになった。そして、この膀胱ATPシグナルが排尿反射に関与していることが示された。しかし、膀胱ATPシグナルの詳細な役割は明らかでない。そこで本研究は詳細な膀胱機能評価法を用いて、膀胱ATPシグナルの意義について検討することを目的とした。【方法】ワイルドタイプ(WT)マウスとATP受容体(P2X2、P2X3)ノックアウト(KO)マウスの正常状態での膀胱機能を比較した。次にWTマウスにP2X受容体アンタゴニスト(PPADS)を膀胱内投与し、膀胱機能変化を評価した。さらに、LPS膀胱炎モデルを用いて、WTマウスとKOマウスの膀胱機能を比較した。膀胱機能評価方法は、我々が確立したエコー併用膀胱内圧測定法と排尿記録装置を用いた。【結果】正常状態ではWTマウスとKOマウスで膀胱機能に有意差は認めなかった。WTにPPADSを投与しても膀胱機能に変化は認めなかった。LPS膀胱炎においては、WTマウスもKOマウスも排尿間隔は短縮したが、その変化はKOマウスで軽減された。LPS膀胱炎のWTマウスにPPADSを膀胱内投与すると、排尿間隔の短縮は軽減した。【結論】膀胱ATPシグナルは正常状態ではほとんど機能せず、病的な頻尿において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

20 周波数領域干渉計法を応用した超音波イメージングの高解像度化における生体材料を用いた評価方法の開発

瀧 公介、勝山 裕

滋賀医科大学解剖学講座神経形態学

非侵襲的かつ安価・簡便に画像所見を得ることができる診断法である医用超音波検査はスクリーニングでの使用に適しており、その空間分解能を向上させることによって頸動脈など大血管における超音波診断が早期の血管病変、発見に貢献すると期待できる。周波数領域干渉計法や適用型信号処理は大気レーダーや光学カテゴリーの分野では実用化された高分解能イメージング法に応用されているものの、医用超音波装置への適応には困難があった。我々は通常の医療現場で現在使われている超音波診断装置を上記の原理を応用した信号処理だけで高性能化する理論的可能性が指摘されていたことに対し、生体材料を用いた実証実験を行ってその機能を確認した。ブタ大腿動脈から2種の超音波ファントムを作成し、単離血管ファントムの撮像で動作を確認すると共に、固定包埋血管ファントムでは超音波での観測面で切断できるセットアップを組み立てて、切断面の顕微鏡像と比較することで超音波イメージング法の血管厚測定の正確さを評価した。この正確性の評価において実測値の0.331mmに対して提案法では0.330mmあるいは0.340mmという値を測定し、通常のBモード像による0.310mmに対しても優位性があった。この研究により提案法の実現性及び従来法に対する優位性が示された。」

21 Tbx5 遺伝子発現制御の進化と対鰭の起源

Noritaka Adachi, Molly Robinson, Aden Goolsbee, and Neil H. Shubin・理化学研究所 倉谷形態進化研究室, Department of Organismal Biology and Anatomy, University of Chicago

現存の脊椎動物は鰭のない円口類と、鰭をもつ顎口類にわけられる。ヤシメウナギやスタウナギなどの円口類は対鰭をもたないが、顎口類は2対の対鰭、胸ビレと腹ビレをもつ(胸ビレと腹ビレは前肢と後肢に相当する)。水中を泳ぐ、土を掘る、空を飛ぶなどの複雑な運動において、脊椎動物の対鰭は重要な役割を担っている。しかしながらその起源はわかっていない。本研究では胸ビレの形成に必要な不可欠な遺伝子 Tbx5 の発現と制御を、円口類と顎口類において比較し、その根本的な差異を同定した。その差異は初期顎口類でみられる形態進化と対応し、Tbx5 発現と制御の変更が胸ビレの進化の鍵となったことを示唆するものである。

22 鳥類キメラ、蛍光色素標識、EGFP-Tol2 システムを用いた冠状血管内皮細胞の起源の検討

上村竜也・山岸敏之・中島裕司
大阪市立大学大学院医学研究科器官構築形態学

心臓の冠状血管内皮細胞(CVEC)の起源は、鳥類では静脈洞腹側の臓側中胚葉に形成される心外膜原基(PEO)、マウスでは静脈洞内皮細胞および心室心内膜細胞に由来することが報告されている。本研究の目的は鳥類キメラ、蛍光色素(DiI-LDL、CFSE)標識、Tol2システムを用いたEGFP遺伝子導入によってCVECの起源を再検討することである。ウズラ静脈洞内皮細胞をDiI-LDLで標識しPEOと共にニワトリ胚に同所性移植、ウズラPEO表面をCFSEまたはEGFPで標識し静脈洞と共に移植、EGFPで心室心内膜を標識したニワトリ胚にウズラ静脈洞とPEOを移植したキメラを作製し、冠循環が完成する9日胚まで孵卵した。心臓の連続切片を作製しウズラ血管内皮細胞マーカーQH1で染色し、DiI-LDL、CFSE、EGFP陽性CVECを検出し、CVECの起源を検討した。その結果、静脈洞に由来すると考えられるCVECは主に冠状動脈主幹部、心室自由壁に認められ、心室心内膜に由来するCVECは心室中隔冠状血管に分布していた。PEO表層の臓側中胚葉由来の細胞は主に冠状血管中膜に認められた。以上の結果から、鳥類のCVECは従来の報告とは異なり、主に静脈洞に由来し、心室心内膜は心室中隔のCVECを供給することが明らかになった。(COI:なし)

23 ニワトリ雌右性腺退縮メカニズムの解明

南 貴一¹⁾、表原拓也¹⁾、田渕圭章³⁾、平野哲史¹⁾、横山俊史¹⁾、万谷洋平²⁾、北川 浩²⁾、星 信彦¹⁾
¹⁾神戸大・院農・分子形態、²⁾神戸大・院農・組織生理、³⁾富山大・生命科学先端研究センター

【緒言】ニワトリを含む多くの鳥類の性腺形成過程には、哺乳類とは異なる特徴的な事象が存在し、雄では精巣が左右両側に形成されるのに対して、雌では卵巣が左側にのみ形成される。この左右差形成に関するメカニズムの詳細は未だ明らかになっていないため、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析およびバスウェイ解析による性腺左右差形成メカニズムの解明を試みた。【方法】孵卵7日の雌雄ニワトリ白色レグホーン種から左右性腺を別々に採取した後、RNA抽出を行い、5個体分のRNAプールを作製した。それらに対してマイクロアレイを行った後、バスウェイ解析を行い、遺伝子ネットワーク図を作製した。【結果・考察】雌右性腺において最も高発現を示した遺伝子は81個、最も低発現を示した遺伝子は177個であり、その中には細胞増殖および細胞死に関連するクラスターが多くみられた。また、エストロゲンシグナルの関連を調べると雌右性腺特異的に細胞増殖を抑制するシグナル経路の存在が示唆された。今後、これらの経路における中心的な役割をもつ遺伝子について詳細に調べることで雌右性腺の退縮メカニズムの解明に関する手がかりとなることが期待される。

24 マウス真性半陰陽個体のミューラー管退行と AMH の作用様式

山本 杏¹⁾, 表原拓也¹⁾, 久保田直人¹⁾, 南 貴一¹⁾, 平野哲史¹⁾, 万谷洋平²⁾, 北川 浩²⁾, 横山俊史¹⁾, 星 信彦¹⁾

¹⁾神戸大・院農・分子形態, ²⁾神戸大・院農・組織生理

【背景と目的】当研究室の C57BL/6N 系統遺伝子改変マウス(Y^{POS})からは、約 2 割の個体で片側に精巣、反対側に卵巣を有する真性半陰陽が出現する。哺乳類の雄では、胎子期に精巣のセルトリ細胞から分泌される抗ミューラー管ホルモン(AMH)の作用によってミューラー管が退行し、卵管、子宮、膈上部への分化が抑制される。しかしながら、Y^{POS}の真性半陰陽個体は、精巣側には精巣上体および精管を、卵巣側には卵管および子宮を有していることから、精巣から分泌された AMH は、卵巣側のミューラー管には作用せず、精巣側のみ作用することが想定される。

【材料と方法】ミューラー管退行時期を考慮して胎齢 13.5 または 14.5 日の C57BL/6N 野生型および Y^{POS}の生殖腺中腎複合体を用い、AMH ならびに精巢化・卵巢化マーカー(Sox9・Foxl2)の免疫組織化学的解析を行った。

【結果と考察】片側の生殖腺で AMH を発現する Y^{POS} 個体において、AMH 陽性細胞は生殖腺内に偏在しており、陽性強度は野生型より明らかに弱かった。また、AMH 陽性側のミューラー管径が陰性側のそれと比較して小さかった。これらのことから、Y^{POS}の生殖腺から分泌される AMH の総量は野生型より極めて少量であるが、隣接する中腎のミューラー管退行を誘導するのに十分であることが推察された。そこで現在は、AMH がセルトリ細胞から中腎領域に拡散して作用する可能性を検証中である。

25 ごく初期の胎生期低栄養ストレスによる生後の脛骨骨端軟骨細胞機能低下メカニズムの解析

木村智子¹⁾、日野広大¹⁾、河野匡暁¹⁾、玉川俊広¹⁾、森田航²⁾、中務真人²⁾、高野淳³⁾、醍醐弥太郎³⁾、牛尾哲敏⁴⁾、新田哲久⁴⁾、高瀬隆太⁵⁾、日野信次朗⁵⁾、中尾光善⁵⁾、工藤基¹⁾、宇田川潤¹⁾ (¹⁾滋賀医大・解剖 ²⁾京大・理学 ³⁾滋賀医大・臨床腫瘍 ⁴⁾滋賀医大・放射線 ⁵⁾熊大・発生医学)

【目的】我々は、これまでにラット妊娠初期の低栄養ストレスにより、仔ラット雌に生後の脛骨成長障害が生じることを示した。今回は、脛骨骨端軟骨細胞の遺伝子発現ならびにヒストン修飾解析を行った。【方法】Wistar ラットで妊娠 5.5~11.5 日の給餌量を対照群 (CON) の 40%に制限した低栄養群 (UN) を作り、両群の仔ラット雌脛骨近位骨端軟骨を生後 0.5 日齢で採取した。採取後、軟骨分化成熟関連遺伝子の発現量を qRT-PCR にて定量し、ChIP-qPCR にてこれら遺伝子のヒストン修飾解析を行った。また、培養実験により軟骨細胞の II 型コラーゲン産生量や IGF-1 刺激による増殖性を測定した。【結果】培養実験では軟骨細胞の II 型コラーゲン産生量や IGF-1 刺激による増殖性が UN で低下していた(p<0.05)。また、新生仔軟骨の *Igf1* 発現には差はないが、その受容体 *Igf1r* や II 型コラーゲン遺伝子(*Col2a1*)の発現は UN で低下した(p<0.05)。これら遺伝子の転写調節因子 *Sox5/6* 発現には差がなかったが、基本転写因子 *Sp1* の発現は UN で低下した(p<0.05)。さらに、*Col2a1* や *Igf1r* について H3K9/14 のアセチル化・H3K4 のトリメチル化レベルを調べたところ、両群間に差は認められなかった。【結論】ごく初期の胎生期低栄養ストレスにより、骨端軟骨細胞では *Col2a1* や *Igf1r* の発現低下が生じ、軟骨細胞機能が低下して生後の脛骨成長が抑制されたと考える。この原因として、脛骨形成予定領域の間葉系幹細胞に生じたエピゲノム変化が子孫細胞にまで引き継がれた可能性が考えられる。今後は *Sp1* などの基本転写因子やノンコーディング RNA なども視野に入れながら解析を進めていきたい。

26 Ethanol-induced elevation of testicular germ cell apoptosis is associated with enhanced autophagy in Sertoli cells

○Akio Horibe¹, Nabil Eid¹, Yuko Ito¹, Yoshihisa Tanaka¹, Yoshinori Otsuki², Yoichi Kondo¹

¹ Department of Anatomy and Cell Biology, Division of Life Sciences, Osaka Medical College

Excessive alcohol consumption has been reported to enhance germ cell apoptosis via a mechanism related to enhanced oxidative stress, but Sertoli cells are resistant to apoptosis. However, the possible involvement of autophagy in Sertoli cells resistance to apoptosis following acute ethanol exposure is not reported yet. The authors in the current study investigate apoptosis and autophagy in the testes of acute ethanol-treated rats (ETRs). Adult male Wistar rats were treated with ethanol (5 g/kg body weight, i.p.) as a rat model of binge ethanol exposure, while a control group received equal volumes of PBS. The animals were sacrificed at various time points (0, 3, 6 and 24 h) following ethanol exposure. H&E staining revealed testicular damage in ETRs evidenced by increased germ cell detachment and giant cell formation. TUNEL labelling demonstrated a significant increase in the number of apoptotic germ cells in the testes of ETRs compared to the control group; however, Sertoli cells were TUNEL negative. Immunohistochemical study for autophagy-related proteins revealed a significant increase in LC3 puncta in Sertoli cells of ETRs compared to the control group specifically at 6 and 24 h, indicating increased autophagosome formation. These morphological observations were confirmed by western blot analysis, showing enhanced expression of LC3 and downregulation of p62 in the testes of ETRs compared to the control group; indicating enhanced autophagic flux. These results indicate that upregulation of autophagy in Sertoli cells of ETRs may reflect ethanol toxicity and could be an antiapoptotic mechanism essential for spermatogenesis.

27 脳の TRPV1 は STAT3 シグナリングと体温調節経路の活性化に重要である

吉田亜矢加¹・古部映莉子¹・萬成哲也¹・稲垣春那¹・富永真琴²・宮田清司¹

¹京都工芸繊維大学大学院・応用生物学系

²自然科学研究機構・生理学研究所

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)は、熱 (>43℃)、機械的/浸透圧刺激、酸によって活性化される非選択的陽イオンチャネルである。また、唐辛子の辛味成分であるカプサイシンは、TRPV1 を活性化し発汗や体温変化を引き起こすことが知られている。このチャネルは、末梢組織での痛覚受容や炎症に関与することが知られているが、脳の TRPV1 については不明な点が多い。本研究においては、脳の TRPV1 が炎症性シグナルと体温調節に関与することを調べた。TRPV1 作用薬である resiniferatoxin (RTX) の脳室内投与は、脳室周囲器官と体温調節中枢・視索前野のアストロサイト STAT3 を活性化した。アストロサイト STAT3 が活性化された脳部位は、グラム陰性菌由来 LPS の末梢および脳室内投与によるものと酷似していた。また、TRPV1 KO マウスでは、LPS 投与による STAT3 活性化が顕著に低かった。RTX の脳室内単独投与は顕著な体温低下を引き起こしたが、LPS の末梢投与による発熱は TRPV1 阻害剤 capsazepine の脳室内投与により増強された。以上の結果より、脳の TRPV1 活性化は、炎症誘発性の STAT3 を活性化することが明らかになった。また、脳の TRPV1 活性化は低体温を引き起こすが、炎症時には内因性解熱作用があることも明らかに、経口摂取したカプサイシンが脳の炎症性シグナリングや体温調節経路に作用を及ぼしている可能性を示唆している。

28 幼少期ストレスが嗜好性食餌に対する報酬行動に及ぼす影響について

笹川 誉世、堀井 謹子、西 真弓
奈良県立医科大学 第一解剖学

虐待や育児放棄など幼少期に劣悪な養育環境に曝されることは、視床下部一下垂体一脳下垂体質系の破綻等の原因となり、脳の構造・機能に継続的かつ重大な影響を引き起こし、鬱病等の様々な精神疾患への罹患リスクを高めている。また近年、被虐待経験者では、報酬に対する感受性の低下が見られることが報告されている。報酬系は、摂食行動等の様々な行動の調節を担う重要な機構であるが、幼少期ストレスが報酬系に影響を及ぼす分子基盤は明らかになっていない。そこで本研究では、幼少期ストレスモデルである母子分離を用いて、嗜好性摂食行動及び報酬系神経回路に対する母子分離の影響について検討を行った。嗜好性摂食行動は、条件付場所嗜好性試験を用い、嗜好性食餌に対する報酬行動について評価を行った。また、主な報酬系神経回路で知られる中脳辺縁系(腹側被蓋野、側坐核)に着目し、ドーパミン合成酵素及びドーパミン受容体(D1R、D2R)の発現について検討を行った。その結果、母子分離群の雌マウスでは、嗜好性食餌に対する報酬行動の低下と側坐核における D1R の発現低下が認められた。さらに、これらの発現変化の分子基盤を明らかにするため、D1R のプロモーター領域における DNA のメチル化状態を調べた結果、有意にメチル化の上昇が認められた。以上の結果より、雌マウスにおいて、母子分離はエピジェネティックな機構を介して、側坐核の D1R の発現低下を引き起こし、嗜好性食餌に対する報酬行動の低下を引き起こすことが示唆された。

29 オリゴデンドロサイトにおける統合失調症関連因子の機能解析

清水 尚子、遠山 正彌、宮田 信吾
近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門

統合失調症の発症には神経発達障害に関与していることが示唆されており、近年、統合失調症とオリゴデンドロサイトの分化異常によるミエリンの形成障害との関連性が指摘されている。死後脳の研究により、統合失調症患者ではオリゴデンドロサイトの細胞数の減少、配置異常、ミエリンの形成異常がみられることや、オリゴデンドロサイトまたはミエリンに関連した因子の発現が変化していることが報告されている。また、遺伝的解析からも統合失調症とミエリン関連因子との関連性が示唆されている。統合失調症は多因子疾患であり、複数の遺伝的要因に環境要因が加わって発症すると考えられている。これまでに統合失調症発症に関わる遺伝子が数多く報告されているが、統合失調症発症に関わる詳しい分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで我々は統合失調症関連遺伝子 DISC1 の結合因子である DBZ (DISC1-Binding Zinc finger protein) のオリゴデンドロサイトにおける機能について着目し、統合失調症発症の分子機構の解明を目指した。

30 脊髄損傷後の皮質脊髓路再編成にリハビリテーションがもたらす効果

中西 徹、藤田 幸、山下 俊英

大阪大学大学院 医学系研究科 分子神経科学

近年、脊髄損傷モデル動物を用いた実験により、皮質脊髓路からの側枝が脊髄固有ニューロンに接続し、新たな神経回路を形成することで、損傷後の運動機能回復に寄与することが明らかとなった。この過程で、皮質脊髓路軸索は一度過剰な側枝を伸ばした後、標的細胞とシナプスを形成した側枝のみが残り、余分な側枝は刈り込まれる。私たちは、リハビリテーションが側枝の刈り込みを促すことで、損傷後の運動機能回復に寄与しているのではないかと考えた。

脊髄損傷モデルマウスに対し Rotarod を用いたリハビリテーションを行うとともに、大脳皮質運動野後肢領域に順行性トレーサー-BDA を注入し皮質脊髓路からの側枝を標識した。その後、運動機能の評価と側枝数の測定を実施した。その結果、リハビリテーション群において側枝数が減少し、運動機能が向上していた。このことから、リハビリテーションが側枝の刈り込みを促進し、運動機能の回復に寄与していることが示唆された。

さらに、Neuropilin-1 shRNA を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いて、大脳皮質運動野後肢領域での Neuropilin-1 をノックダウンした。その結果、ノックダウン群において、損傷後 28 日目における側枝数が増加した。このことから、側枝の刈り込みに Neuropilin-1 が関与していることが示唆された。

31 後肢免荷と再荷重が老化した骨格筋の細胞外マトリクスに与える影響

金澤佑治^{1,2}、筋野賢²、鯉沼聡²、長野護²、池上啓介²、大井優紀³、大西智也³、杉生真一¹、武田功¹、梶博史²、重吉康史²

¹大阪人間科学大学 人間科学部、²近畿大学大学院医学研究科、³宝塚医療大学 保健医療学部

(目的) 老化した骨格筋は廃用性筋萎縮後の再負荷による回復が遅延することが知られている。老化は筋線維のみならず細胞外マトリクスの構造にも影響を与えて筋機能を低下させる。しかしながら萎縮筋の回復を検討している先行研究の多くは筋線維におけるタンパク合成と分解経路や筋再生能を主とした解析を行っているため、老化した筋線維を取り巻く細胞外マトリクスが後肢免荷と再荷重によってどのような影響を受けるかはほとんど知られていない。そこで本研究では老化した骨格筋に生じた廃用性筋萎縮が回復する過程で、筋線維ならびに細胞外マトリクスにどのような変化が生じているかを検討した。(方法) 動物は3ヶ月齢と20ヶ月齢の雄Wistarラットを用いた。尾部を懸垂してラットの後肢を免荷することで抗重力筋であるヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起した。その後、尾懸垂から解放することで後肢に再荷重を加えて萎縮筋の回復を促した。その過程において尾懸垂後0日、14日、再荷重後1日、7日にヒラメ筋を採取して形態学的観察ならびに分子生物学的な解析を行った。(結果) 20ヶ月齢のラットでは回復期において基底板構造が不規則になり、細胞の輪郭が不明瞭になる像が観察された。後肢免荷から回復期にかけて筋周膜や筋内膜に膠原線維が増加し、さらに筋再生過程を示唆する中心核細胞が増加した。一方、3ヶ月齢ではこの所見を認めなかった。また3ヶ月齢ラットで再荷重時に増加した基底板構築に必要ないくつかの遺伝子が、20ヶ月齢においては増加しなかった。(結論) 老化したラット骨格筋の回復過程では基底板関連因子の発現低下によって基底板に異常が生じ、筋の回復が遅延することが示唆された。

32 G-CSF 刺激による肩腱板断裂修復促進効果

加太 佑吉^{1,2}、森原 徹¹、松田賢一²、田中雅樹²

¹ 京都府立医科大学大学院運動器機能再生外科学

² 京都府立医科大学大学院生体構造科学

【目的】顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony-stimulating factor; G-CSF) は好中球減少症の治療薬として既に臨床応用され、骨髓幹細胞を末梢血に動員させることが報告されている。本研究の目的は、肩腱板断裂修復術後における腱骨接合部の修復に対する G-CSF 刺激の効果について検討することである。

【方法】12 週齢雄性 SD ラットおよび 8 週齢 GFP ラットを用いた。SD ラットに対して棘上筋腱を上腕骨付着部で切離し、Mason-Allen 法に準じて再縫着した。術後 1 日目から 5 日目まで PBS、G-CSF 10μg/kg を皮下注射した群をそれぞれ PBS 群、G-CSF 群とした。術後 4、8 週で検体を摘出後、HE および safranin O で染色し、組織学的に評価した。術後 4、8 週で最大破断強度を測定し、力学的評価をおこなった。GFP 骨髓細胞を SD ラットに骨髓移植し GFP 骨髓キメララットを作製した。GFP 骨髓キメララットに対して SD ラット同様に手術と薬剤の皮下注射を行った。術後 4 週で PI 染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いて腱骨接合部を観察した。

【結果】組織学的評価では、術後 4、8 週で G-CSF 群は PBS 群と比較して腱骨接合部に多くの線維軟骨組織を認めた。最大破断強度は術後 4、8 週において G-CSF 群で PBS 群より有意に高かった。共焦点レーザー顕微鏡では G-CSF 群において GFP 陽性細胞が腱骨接合部に多く認めた。

【考察】本研究の結果から腱板修復に G-CSF 刺激を用いることで骨髓由来細胞が末梢血に移動し腱骨接合部で作用し修復を促進した可能性がある。