

日本解剖学会

第76回中部支部学術集会

会 期：平成28年10月 8 日（土）、 9 日（日）
会 場：信州大学医学部附属病院

101 胃噴門部の耳垂様構造の詳細な解剖と考察

平島 寛司, 岳 鳳鳴, 友常 大八郎, 佐々木 克典

[緒言・目的] 昨年、本研究室では腹腔鏡下手術におけるランドマークとして役立ちうる解剖学的構造として、胃噴門部の耳垂様構造に注目して 30 体の解剖実習体による調査を行った。その結果を踏まえ、本年は耳垂様構造内の血管をはじめとする詳細な検討を行った。[背景] 胃噴門部付近には、食道静脈や左胃動脈、迷走神経といった重要な構造が存在する。腹腔鏡下でこの部位に侵襲を加える場合、噴門部周囲構造の位置関係を十分に把握する必要がある。昨年は、腹腔鏡下食道腫瘍摘出術や食道下部迷走神経選択的切除術などの手法に有用と考えられるランドマークとして『胃噴門部の耳垂様構造』に注目し、28 例中 22 例(78.6%)において明瞭な構造として観察が可能であり、その 22 例中 18 例 (81.8%) は、耳垂様構造が横隔膜と小網の双方に付着がみられたことを報告した。また耳垂様構造はグレイ解剖学に記載がある『小網の一部に由来した構造』であることが強く示唆され、これらを検証すべく本年度は耳垂様構造の詳細な検討を行った。[結果] 耳垂様構造が顕著にみられる解剖体において、耳垂様構造内部とその周囲の構造を剖出して詳細に検討を行った。明瞭な耳垂様構造は脂肪を多く含んだ弾性軟の組織で満たされ、内部に複数のリンパ節を認めた例があった。血管は左胃動脈および左胃動脈食道枝由来の枝であった。一方で、流入する血管や神経の剖出が困難であるほど膜状に菲薄化し、明瞭でない耳垂様構造を示す解剖体も存在した。

102 高圧気相保存法による移植用臓器の保存

○畑山 直之¹, 平井 宗一¹, 内藤 宗和¹, 伊藤 正裕², 中野 隆¹

¹ 愛知医科大学 医学部 解剖学講座

² 東京医科大学 医学部 人体構造学分野

現在、臓器移植は治療法として普及しており、その需要はさらに高まりつつある。臓器移植の問題点の一つに、臓器の機能を維持できる保存時間が短いことが挙げられ、とくに心臓は他臓器に比べて 4~6 時間と短い。そこで我々は、より長期に臓器の機能を保つ新たな臓器保存方法として、一酸化炭素(CO)と酸素(O₂)の混合ガスを用いた“高圧気相保存法”を開発した。本研究では、ラットの心臓を用いた高圧気相保存法”の有用性を検討した。

ドナーラットから心臓を摘出し、“高圧気相保存法”によって 24 時間保存した。保存した心臓をレシピエントラットに異所性(頸部)に移植し、血流を再開させた。その後、各種評価を行った。対照群として、摘出後すぐに移植した群(Control 群)、および現在一般的に用いられている臓器保存液(University of Wisconsin 液)による単純浸漬保存を行った群(UW 群)を用いた。

CO と O₂ の混合ガスを用いた“高圧気相保存法”によって 24 時間保存した心臓の機能は、移植後の評価において、組織学的および生理学的に Control 群と有意な差を認めなかった。一方、UW 群において 24 時間保存した心臓の機能は、Control 群に比べて明らかな低下を示した。CO と O₂ の混合ガスを用いた“高圧気相保存法”によって、心臓の機能を維持しながら長期に保存できる可能性が示唆された。

103

学生の視点によるアウトカム基盤型骨学実習の提言
～WFME 国際認証に向けて～

1. 愛知医科大学 医学部 医学科 二学年次
2. 愛知医科大学 医学部 医学科 三学年次 3. 愛知医科大学 医学部 解剖学講座
○原公彦¹, 中山幹都¹, 花林卓哉¹, 古屋佑夏¹, 關栄茂¹ 山田崇義²,
小澤由紀³, 内藤宗和³, 中野隆³

【目的】現在、医学教育は WFME 国際認証に向けて、臨床実習の拡充の一方で、基礎医学の授業時間は削減傾向にある。解剖学においても、アウトカム基盤型、すなわち臨床指向の内容への改革が求められている。また骨学は、学生が最初に遭遇する‘難関’で、単純な暗記に陥りやすい。私たちは、‘自己啓発型’の実習書『骨学実習のすゝめ』を作成し、学生の視点から骨学実習の改革に取り組んでいる。その結果を踏まえて、アウトカム基盤型骨学実習について提言する。

【方法】『骨学実習のすゝめ』の総論および各論・上肢を作成した。総論では、窩や頭などの共通部分を‘漢字の部首’と捉え、部位の形状を機能的意義へ結び付けるよう工夫した。さらに、骨折・脱臼のメカニズムに関する課題を加え、臨床的意義の理解へ発展するよう促した。1 学年次の骨学実習において、『骨学実習の手びき』(南山堂)に加えて『骨学実習のすゝめ』を導入した。また、私たちがチューターとして実習指導を行いつつ、意見を聴取した。さらに実習終了後にアンケートを行い、『骨学実習の手びき』と『骨学実習のすゝめ』に対する学生の理解度を比較した。

【結果と考察】アンケートにおいて『骨学実習の手びき』と比較して、理解度は「とても良く分かった」が多く、「分からなかった」は少なかった。すなわち『骨学実習のすゝめ』の導入によって、理解度に改善が認められた。一方、実習に必要な要素を「部位名の暗記」と捉える学生も約 8 割を数えた。現在、『骨学実習のすゝめ』の作成を継続し、有効な活用方法についても検討を進めている。

104

Deletion of Herpud1 Enhances Heme Oxygenase-1 Expression in a Mouse Model of Parkinson's Disease

LE MANH THUONG, TA MINH HIEU, 北尾 康子, 堀 修
金沢大学医薬保健研究域医学系神経解剖学

Herp is an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein that plays a role in ER-associated degradation. We studied the expression of Herp, and its effect on neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease (PD) in which both of the oxidative stress and the ER stress are evoked. Eight hours after administering a PD-related neurotoxin, MPTP, to mice, the expression of Herp increased at both the mRNA and protein levels. Experiments using wild-type (Herp^{+/+}) and Herp^{-/-} mice revealed that the status of acute degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons and reactive astrogliosis were comparable between the two genotypes after MPTP injection. However, the expression of a potent anti-oxidant gene, heme oxygenase-1 (HO-1), was detected to a higher degree in the astrocytes of Herp^{-/-} mice after MPTP administration. These results suggest that deletion of Herp may cause a slightly higher level of initial damage in the nigrastrial neurons after MPTP administration, but that this is compensated for by higher induction of anti-oxidative genes in astrocytes.

105

中枢神経系興奮性シナプス構造の定量的超微形態解析

Ruwaida Elhanbaly, 石川達也、○深澤有吾
福井大学 医学部 脳形態機能学分野

本研究では、複数の脳内興奮性シナプス結合種を対象に、定量的に超微細構造を解析し、シナプス構造の構築原理と結合種固有の構造特徴を捉えることで、新たなシナプス同定法を確立することを目的とした。

8 週齢の C57BL/6J 雄マウスを灌流固定し、背側海馬領域の脳切片を、OTO 法を用いながら樹脂包埋した後、名古屋大学医学部分析機器センター所有の Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscope(FIB-SEM、FEI 社製)により、10 nm 毎の連続電子顕微鏡撮影を行った。海馬 CA1 領域放射状層と分子層より、それぞれ 20 個の軸索-樹状突起棘シナプスを無作為抽出し、3 次元再構築後、シナプス前後構造の体積、シナプス小胞等の各オルガネラの数と体積、シナプス後肥厚面積を測定した。どちらのシナプスでもシナプス小胞数とシナプス前軸索瘤体積、シナプス後肥厚面積、樹状突起スパイン体積の間に有意な正の相関関係が認められた。更に、これら相関の傾きは、シナプス結合種間で有意に異なっていた。

以上の結果より、シナプス結合を構成する各要素は互いに相関関係をもって増減し、その相関の様子はシナプス種毎に固有であることが明らかとなった。これらの結果は、同様な解析をさらに多くのシナプスに対して行うことで、新しい脳内シナプス同定法が確立出来ることを示唆するものである。

106

Cuprizone 誘発性脱髄モデル動物における CD38 の役割

Roboon Jureepon、服部 剛志、堀 修
金沢大学医薬保健研究域医学系神経解剖学

CD38 は NAD より cADPR を産生する膜たんぱく質である。我々はこれまでに、CD38 が生後脳におけるアストロサイト、オリゴデンドロサイトの発達に関与することを見出してきた。CD38 のグリア細胞における役割解明を目的とし、CD38 遺伝子欠損 (KO) マウスの Cuprizone 誘発性脱髄モデルを作成し、グリア細胞の解析を行った。

野生型 (WT) において Cuprizone 投与開始から 5 週間にかけて顕著な CD38 の発現上昇を認めた。CD38 KO マウスにおいては、脱髄に伴う MBP の発現減少が有意に抑制されていた。また、CD38 KO マウスにおいては、Cuprizone 投与による GFAP、Iba1 の発現減少が有意に抑制されており、GFAP 陽性細胞数、Iba1 陽性細胞数も WT マウスと比較すると有意に減少していた。Cuprizone 投与 5 週間後の CD38 KO マウスにおけるサイトカイン mRNA の定量においては、WT マウスと比較して IL1b、CCL2、CCL3、CXCL10、NOS2 の発現減少傾向が認められた。

以上の結果より、Cuprizone 誘発性脱髄において、CD38 はアストロサイト及びマイクログリアの活性化を促進し、脱髄を誘導する役割を持つ可能性が示された。

107

自閉症モデルラットにおける中枢性聴覚伝導路の形態学的考察 (第 2 報) — 音源定位の概念と診断への応用 —

三重大学大学院 医学系研究科 医科学専攻 (修士課程)¹、発生再生医学²
○原奈央¹、江藤みちる²、大河原剛²、成田正明²

【目的】音源定位とは音の方向や音までの距離を判断する機能であり、コミュニケーションの際にとっても重要である。また自閉症は先天性の脳機能障害であり、コミュニケーションの障害として知られているが、聴覚過敏もあわせもつ場合が多い。昨年の本会において、自閉症モデルラットにおける聴覚伝導路の形態異常を発表した。今回は昨年の続きとともに、自閉症における音源定位の異常の可能性を報告する。

【材料と方法】Wistar ラットの妊娠 9、10 日目にサリドマイド 500 mg/kg を経口投与した。生まれた仔ラット (自閉症モデルラット) の生後 21 日と 50 日に 4%PFA で灌流固定の後、脳を摘出し、50 μ m の厚さで浮遊切片を作製した。それらを Calbindin D28k 抗体及び Glycine Receptor $\alpha_1 + \alpha_2$ 抗体を用いて免疫染色を行い、脳幹の上オリブ複合体の台形核 (MNTB) 及び外側上オリブ (LSO) を観察した。

【結果】自閉症モデル動物群では、抑制性神経である MNTB の Calbindin の発現が低下していた。グリシン作動性の MNTB は主に同側の LSO へと抑制投射している。そこで、LSO における Glycine Receptor の発現を調べたところ、自閉症モデル動物群では発現が低下していた。

【結論】自閉症モデル動物群は、MNTB と LSO における形態学的異常がみられた。MNTB や LSO は音源定位にかかわる神経核であることから、ヒト自閉症では聴覚過敏だけでなく音源定位にも障害がある可能性が示唆され、音源定位は自閉症の診断への応用も期待される。

108

中脳における音情報の表現様式について

伊藤 哲史
福井大学 学術研究院 医学系部門 解剖学分野

中脳にある聴覚神経核である下丘のニューロンはその形態学的な性質から、興奮性、大型抑制性、小型抑制性細胞の 3 者を同定することが可能である。このうち大型抑制性ニューロンは異なる音情報を符号化するさまざまな神経核からの入力を受束することから、音情報を統合し複雑な音への応答性を作り出すことが想定される。本研究は、下丘で音情報が地図表現されるのか、あるいは細胞の種類によって表現されるのかという問題について検討した。

傍細胞記録・染色法で同定した下丘細胞を免疫染色によって大型抑制性、小型抑制性、興奮性の 3 種類に分類した。標識した細胞体の三次元座標を求めることで、細胞の種類や位置と、音刺激に対する応答性の間に何らかの関連があるか検討した。

結果として、過去の研究と同様、下丘中心核において背腹方向での周波数地図表現が確認できた。一方、多くの音情報が中心核の前後、内外側方向に関して分離して表現されており、中心核には周波数以外の情報も地図表現されていることが明らかになった。さらに、大型抑制性細胞や小型抑制性細胞は時間変化する音に対する選好性があることが明らかとなった。大型抑制性細胞は掃引周波数変調音に対して強い応答性を示した一方、小型抑制性細胞は速い正弦周波数変調に対して高い位相追従を示した。これらのことから、下丘中心核では音情報が地図と細胞種の両方によって表現されていることが示唆された。

109

外側嗅索切断新生児ラットの神経再生—機能回復時期と再生線維量—

福島菜奈恵、黒岩正文、森泉哲次
信州大学医学部医学科人体構造学教室

これまでの実験で、嗅覚伝導路である外側嗅索を新生児ラットで切断しても軸索が再生し、4 週後には機能的にも再生することを報告した。そこで今回、外側嗅索切断新生児ラットにおける正確な機能回復時期、および機能回復に必要な再生線維量を調べたことを目的として実験を行った。生後 2 日 (P2) の新生児ラットの左外側嗅索を低温麻醉下で切断し、P11 で右嗅球を除去し嗅覚機能検査を行った。ラットは嗅覚がないと哺乳できないため、外側嗅索切断ラットの嗅覚機能回復については、胃の中に存在する哺乳したミルクの有無で判断した。その結果、多くのラットにおいて P12 (切断 10 日後) に機能回復が認められた。次に、機能回復に必要な再生線維量を調べるため、P2 の新生児ラットの左外側嗅索を切断後、P5 で順行性の神経トレーサーである biotinylated dextran amine (BDA) を両側嗅球に注入し再生線維を標識した。P10 (機能的に回復していない時期) と P12 (機能回復が認められた時期) で灌流固定し、採取した脳から作成した凍結切片を用いて嗅結節レベルでの BDA 陽性部位の面積と密度を計測した結果、P10 における BDA 陽性部位の面積と密度は、それぞれ、再生側 (切断側) で $1.91 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.13、正常側 (非切断側) で $8.66 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.34 であった。P12 における陽性部位の面積と密度は、それぞれ、再生側で $4.34 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.21、正常側で $11.05 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.35 であった。外側嗅索切断新生児ラットの嗅覚は切断後 10 日で回復し、機能回復に必要な再生線維の量は、嗅結節レベルにおいて面積で約 40%、密度で約 60% であることが明らかとなった。

110

脳膜はマウス大脳原基におけるマイクログリアの分布に関与する

○内藤裕、服部祐季、宮田卓樹

名古屋大学医学系研究科 細胞生物学教室

マイクログリアは胎生期の早い時期から脳に存在するが、胎生期における機能は殆ど知られていない。

マウス大脳におけるマイクログリアの分布を各胎齢で調べたところ、胎生 15 日目 (E15) 以降、大脳壁の皮質板にマイクログリアが存在しなくなることがわかった。この分布の傾向が生まれるメカニズムに、脳膜が関与している可能性を考えた。これを示すため、マイクログリアを可視化する CX3CR1-GFP Tg マウスから脳膜付きの大脳原基スライスを作製し、ライブイメージングにてマイクログリアの移動方向をリアルタイムに観察した。E14 において実験を行った結果、皮質板のマイクログリアの多くが脳膜に移動した。また脳膜を剥がすとマイクログリアの移動の傾向が変化したことから、脳膜が脳膜方向へのマイクログリアの移動を引き起こすことがわかった。さらに薬剤添加実験を行い、脳膜が発現する CXCL12 とマイクログリアが発現する CXCR4 の相互作用がマイクログリアの誘引に関与している可能性が示された。また、さらに早いステージである E10-E13 の大脳におけるマイクログリアの分布や移動についても調査中である。

胎生期のマイクログリアの役割を知るために、マイクログリアの適切な分布・移動のメカニズムを明らかにする意義は大きく、本知見は胎生期マイクログリアの機能解明に幅広く貢献すると期待される。

111

Atf6 α の欠損は舌下神経切断後のマイクログリアの活性を抑制し、神経保護に寄与する

遠山 友希、宝田 美佳、石井 宏史、北尾 康子、堀 修
金沢大学医薬保健研究域医学系神経解剖学

我々はこれまで、いわゆる小胞体ストレス応答の主幹転写因子 ATF6 α が神経系病態において、神経及びグリア細胞の機能に重要であることを明らかにしてきた。今回、運動神経の軸索傷害モデルである舌下神経切断モデルを用いて、舌下神経核における ATF6 α の活性化、及び ATF6 α が神経変性及びマイクログリアの活性化に与える影響について形態学的に評価した。野生型 (WT) マウスにおける ATF6 α の下流遺伝子 GRP78 の発現は、正常時では神経細胞に認めるのみであったが、舌下神経切断後は変性神経を取り囲むように存在する活性化マイクログリアにも強く認められた。次に、WT 及び ATF6 α ノックアウト (KO) マウスを用いて本モデルを作製したところ、切断後 1 週間の段階で両マウスの神経変性に有意な差は認められなかったが、ATF6 α KO マウスにおけるマイクログリアの活性化が WT マウスに比し減弱していた。また、2 週間後以降での ATF6 α KO マウスにおけるマイクログリアの食食能の指標となる CD68 の発現が、WT マウスに比し抑制されていることが示唆された。一方、切断後 2 ヶ月の段階では、ATF6 α KO マウスにおいて神経変性の軽減が認められた。

マイクログリアは活性化に際して多くの炎症性物質や神経保護因子を産生する為、小胞体に負荷 (小胞体ストレス) がかかり、ATF6 α の働きが重要になると考えられる。今回の結果から、舌下神経切断後早期に起こるマイクログリアの活性化及び機能に ATF6 α が重要であること、その段階でのマイクログリア活性化の制御が慢性期における神経保護に繋がる可能性が示唆された。

112 分析電子顕微鏡による歯石超薄切片の定量分析

盛口敬一¹、朝倉正紀²、鶴田昌三²、河合達志²、本田雅規¹
愛知学院大学 歯学部 ¹口腔解剖学講座 ²歯科理工学講座

【目的】透過電子顕微鏡にEDS（エネルギー分散型X線分光器）などの分析機能を付加し、観察した微小領域での元素の定性、定量、元素分布観察や化学状態分析を行なう顕微鏡が分析電子顕微鏡である。X線に着目すると、試料から出る特定X線のエネルギーを測定して、その試料の組成元素分析を行うことができ、これをEDS法と呼んでいる。そこで今回、歯石構成元素として知られているCa、PについてJEM-1400Plus（STEM-EDS）による元素の検出を行なうと共に、JEOL-JXA-8530FによるEPMA-WDS（波長分散型）分析結果と比較することを目的とした。

【材料と方法】歯石試料は採取後、2%paraformaldehyde-2%glutaraldehyde混合固定の後、1%OsO₄後固定を行ない、上昇アルコールによる脱水の後Quetol 653に包埋した。超薄切片を作製しJEM-1400PlusにてSTEM-EDS分析を行なうと共に、ベースのゼラチンカプセル表面の歯石材料についてJEOL-JXA-8530FによるEPMA-WDS分析を行い比較した。

【結果と考察】JEM-1400PlusによるSTEM-EDS分析から、Ca/P比は1.5824であった。一方、JEOL-JXA-8530FによるEPMA-WDS分析結果から、Ca/P比は1.5204であった。以上の結果から、歯石切片試料のSTEM-EDSによるCa/P比の値は、EPMA-WDSと同様の結果を得られる可能性が示唆された。

113 骨細胞が反応する応力の種類・強度に関する解析

朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔解剖学分野

○渡邊竜太、矢野航、佐藤和彦、小萱康徳、江尻真一

【目的】メカニカルストレスを感じた骨細胞が分泌型糖タンパク（sclerostin）の産生調節を介して骨芽細胞による骨形成を調節する事が知られている。しかし骨細胞が骨組織内でどのような種類・強度のメカニカルストレスに対して応答するかは明らかにされていない。本研究では有限要素解析結果と、sclerostinの組織学的局在とを比較検討することで、骨細胞がsclerostin産生調節において反応する応力の種類と強度について解析した。【材料と方法】ラット上顎歯槽骨のμCT画像より3Dモデルを作成し、歯に18Nの仮想咬合力を荷重した際の歯槽骨内の圧縮応力・引張応力の分布を有限要素法により解析した。次にモデルを作製した試料の同一部位において、骨吸収部位の骨形成部位を検索し、骨吸収部位に圧縮応力が、骨形成部位に引張応力が分布するように荷重条件を最適化した。その後sclerostinの免疫局在を検索し、同一部位における圧縮・引張応力およびvon Mises応力の分布と比較した。【結果と考察】最適化した荷重条件下では、圧縮応力が分布する領域の骨表面では骨吸収が認められ、引張応力の分布する領域の骨表面では骨形成が認められたが、骨細胞が産生・分泌するsclerostinの免疫局在は圧縮・引張応力との間に明瞭な対応は認められなかった。一方、sclerostinの免疫局在はvon Mises応力の分布と対応しており、30MPaを越えるvon Mises応力が分布する領域では免疫局在は認められなかった。骨細胞の突起は細胞体から放射状に伸び出し互いに網目状のネットワークを形成しているため、骨細胞は方向性を有する圧縮・引張応力ではなく、全ての突起に加わるひずみエネルギーの総和としてのvon Mises応力に反応していると考えられる。また骨細胞はvon Mises応力に対する反応閾値を持っており、閾値を越える強度の応力を感知することでsclerostinの産生が抑制されることが示唆された。

114 メカニカルストレスの変動に伴う骨細胞のsclerostin産生能の変化

○駒形香菜子^{1, 2)}、藤原 敦¹⁾、渡邊竜太²⁾、矢野航²⁾、佐藤和彦²⁾、小萱泰徳²⁾、北井則行¹⁾、江尻真一²⁾

- 1) 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座歯科矯正学分野
- 2) 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔解剖学分野

【目的】骨細胞のメカニカルストレスに対する反応機構解明のため、ラット臼歯部に加えた矯正力を変化させ、メカニカルストレス変動に呼応する歯槽骨骨細胞のsclerostin産生能の変化と骨基質中のsclerostinの局在変化を検索した。【材料と方法】8週齢雄性Wistarラットを用い、上顎第一、第二臼歯間に矯正用ゴムを挿入し、第一臼歯を24時間近心移動させた。その後、直ちに固定した24時間装着群、ゴムを除去し6時間後に固定した除去後6時間群および除去後24時間に固定した除去後24時間群を作製した。未処置群はゴムを挿入せずに固定した。試料を脱灰後、パラフィン切片を作製し、sclerostinをコードするSOSTのmRNAに対するin situ Hybridizationとsclerostinに対する免疫染色を行った。観察部位は上顎第一臼歯近心根と近心口蓋根間の根間隔歯槽骨(M-MP)および近心口蓋根と遠心口蓋根間の根間隔歯槽骨(MP-DP)とした。【結果と考察】未処置群のM-MP、MP-DPではSOST mRNAの発現とsclerostin免疫陽性反応が認められた。ゴム24時間装着群では、M-MP、MP-DP共にSOST mRNAの発現とsclerostin免疫陽性反応は認められなかった。除去後6時間群ではM-MPにおいてSOST mRNAの発現とsclerostin免疫陽性反応が認められたが、MP-DPではSOST mRNAの発現もsclerostin免疫陽性反応も認められなかった。除去後24時間群では、M-MP、MP-DPにおいてSOST mRNAの発現とsclerostin免疫陽性反応が認められた。従って、24時間矯正力を負荷することで消失したsclerostin産生能は、メカニカルストレス除去後6時間で回復することが示された。また、歯槽骨の部位によって骨細胞の感受性が異なる可能性やメカニカルストレスの部位による強度差がsclerostin産生能回復時間に影響する可能性が示唆された。

115 骨格筋分化におけるクラスリンアダプターGGA1の機能解析

○磯部茉莉、亀高諭
名古屋大学医学系研究科リハビリテーション療法学専攻

細胞内における蛋白質輸送、特に膜蛋白質やオルガネラで機能する蛋白質のゴルジ体における選別輸送はホメオスタシスの維持のみならず、細胞機能を適切に発揮するために必須な機構である。我々は、ゴルジ体における選別輸送、特にクラスリン小胞形成を介した輸送に着目し、骨格筋分化におけるクラスリンアダプター分子の基本的な分子機能と生理的役割について解析を行っている。

発生中の骨格筋の成長や筋損傷後の筋線維再生期においては、筋衛星細胞が活性化、分化し筋芽細胞となった後、筋芽細胞同士あるいは筋芽細胞と筋管細胞との細胞融合を経て多核の筋細胞が形成されるが、これらの過程における細胞間の認識機構や細胞膜融合に関わる因子群など、その基本的な分子機構は未だ不明な点が多い。近年、我々は培養筋芽細胞を用いて筋管形成に関与する因子としてクラスリンアダプター分子GGA1 (Golgi-associated, Gamma ear-containing, Arf binding proteins 1) を同定した。GGA1はC2C12細胞においてゴルジ体近傍に局在し、筋分化条件下にその発現が誘導され、さらにGGA1のノックダウンにより筋管形成が阻害されることが明らかになった。また、GGA1ノックダウンによるインスリン依存的な糖取り込み能の変化を調べたところ、GGA1ノックダウンによって筋分化培地中における定常状態での糖取り込み能が低下するとともに、インスリン依存的に誘導される糖取り込み能の低下が見出された。現在、GGA1がインスリン依存的な糖取り込み能にどのように関与しているのか、その分子機能を解析している。

116 羊膜間葉系幹細胞のサブクラスの特性

吉田淑子¹、荒井健一²、岡部素典¹、周 凱旋¹、古市恵津子¹、孫 毅¹
齋藤 滋³、二階堂 敏雄¹

¹富山大学大学院医学薬学研究部再生医学講座、²佐賀大学医学部臓器再生医工学講座、³富山大学大学院医学薬学研究部産婦人科

【目的】羊膜には、羊膜間葉系細胞(Human amnion mesenchymal cells:HAM)が存在するが、HAMから、3つのステップを経ることにより、HAM α 、HAM α S、HAM α M、HAM α Lという特性の異なる幹細胞を分取することができる。今回は、この中で、中等度の大きさのHAM α Mに着目し、その形態的特徴、機能的特徴を細胞表面マーカー、転写因子の発現、分化能について組織化学的、分子生物学的に検討した。更にHAM α Mを肝硬変モデルマウスに投与し、有効性を明らかにした。

【結果】HAM α M細胞はファクスによる選別を実施している時には中等度の大きさだが、培養を繰り返す間に細胞質が豊富な細胞となり、サイトスピン標本で観察すると、HAM α Lよりも大型の細胞として、観察された。細胞質がOct3/4によく染まり、SSEA4や神経幹細胞のマーカーであるNestinやMusashiに良く染まる細胞である。また、間葉系幹細胞では染まり難い、Tra-1-60に陽性の細胞が散在する。一方で、Sox2やKLF4の発現が弱い。肝細胞への分化誘導では、他のサブクラスとは異なり、albuminやCYP2D6など肝細胞特有のmRNAの発現が顕著であった。

【結論】HAM α M細胞は、外胚葉系の特性が強く、神経や、肝細胞への分化が容易である。間葉系幹細胞を利用するには、幹細胞のサブクラスの特性を考えたうえで、医療材料として利用することが、安全で有効な活用方法である。

117 富山大学羊膜バンク設立の経緯と眼科領域での利用

岡部素典・富山大学大学院医学薬学研究部再生医学講座

【目的】ヒト羊膜について①細胞源として再生医療に活用する②独自の方法で乾燥させたハイバードライヒト羊膜(HD-AM)を開発し、種々の疾患に対し被覆材や足場として利用する、をテーマとして研究を重ねてきた。富山大学眼科での先進医療を中心に「羊膜バンク」を作ることになった経緯、システムなどについて報告する。

【材料と方法】1) インフォームドコンセントの得られた妊婦で帝王切開症例より羊膜を採取し、a.凍結乾燥ヒト乾燥羊膜(FD-AM)を作製した。b.減圧下で、遠赤外線、マイクロウエーブを用いてHD-AMを作製した。2) 実体顕微鏡・光学顕微鏡・走査型電子顕微鏡で形態を比較した。3) 眼表面の治療へ利用した。

【結果】HD-AMはFD-AMに比べて上皮と結合組織の微細構造が保たれていた。再発翼状片では眼球結膜欠損部のパッチとして、角膜穿孔では足場の役割として働き、治療に有効であった。

【結論】HD-AMはFD-AMより優れており、安全で、さらに多くの臨床利用が可能であると考えられた。

【参考文献】Okabe, M., et al.:Hyperdry human amniotic membrane is useful material for tissue engineering: physical, morphological properties, and safety as the new biological material.: J Biomed Mater Res A,102, 862-70,2014

118

MELAS患者由来iPS細胞の樹立

藤田保健衛生大学 医学部 解剖学Ⅰ
○八幡直樹, 秦 龍二

【目的】 ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (MELAS) は母系遺伝をするミトコンドリア病の一つで、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の点変異により引き起こされることが知られている。mtDNAは1細胞中に数百～数千コピー存在しており、変異mtDNAの存在率が病態の発症や重篤度に深く関わっていると考えられているが、未だ明らかでない点が多い。2007年に報告されたヒトiPS細胞作製技術によって、体細胞を初期化することにより、疾患を有する患者自身の体細胞から、疾患特異的iPS細胞を経て、疾患の標的細胞を入手することが可能になった。そこで、本研究では、MELASの病態解析および治療法開発に向けて、疾患患者由来皮膚線維芽細胞からiPS細胞の樹立を行うことを目的とした。

【方法と結果】 エピソーマルベクターを用い、初期化因子Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, p53 shRNAを皮膚線維芽細胞に導入した。数週間後に出現したiPS細胞コロニーを選択した。各iPS細胞についてARMS-qPCR法、PCR-RFLP法等により、変異mtDNAの有無および存在率を解析した。変異mtDNAを含むiPS細胞は数クローン存在したが、それ以外のiPS細胞において変異mtDNAは検出されなかった。得られたiPS細胞について、ES細胞に特異的なマーカーの発現確認、胚様体を介した*in vitro*での三胚葉への分化能の評価、核型解析等を行い、正常mtDNAのみのiPS細胞2クローン、変異mtDNAを含むiPS細胞2クローンを選別した。今後、選別したiPS細胞を標的細胞へ分化誘導し、病態解析等を行っていく予定である。

119

Anti-oxidant activity of amnion-derived cells against oxidative stress induced by X-irradiation and H₂O₂ stimulation

Cluguang Han¹, Qing li Zhao², Toshiko Yoshida¹, Motonori Okabe¹, Kaixuan Zhou¹, Yi Sun¹, Shigeru Saitou³, Takashi Kondo², and Toshio Nikaido¹
¹ Department of Regenerative Medicine, ² Department of Radiological Science, ³ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama,

【Introduction】 Reactive oxygen species (ROS) can be generated by different cellular sources within a cell mainly as a byproduct to various biological processes and as signal transduction molecules. This study was designed to determine the anti-oxidative capacity of amniotic stem cells against X-irradiation and H₂O₂ stimulation.

【Materials and Methods】 Immortalized amniotic epithelial cells (iHAEs), immortalized amniotic mesenchymal cells (iHAMs) and human skin fibroblasts (HSF) were used in this study. Detection of intracellular ROS was performed with dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR) by using flow cytometry. Cell survival was determined using Cell Counting Kit-8 (Dojindo).

【Results】 In iHAMs, intracellular ROS was increased immediately after X-irradiation. However, no effect on cell survival was observed in any of cell line following X-irradiation. In contrast, exposure to H₂O₂ caused dramatic increase in the intracellular ROS in HSF and iHAMs, further marked decrease in the cell survival was observed in both cells after 24 h incubation. On the other hand, in iHAEs, intracellular ROS generation was not increased and cell survival remains un-affected following H₂O₂ stimulation.

【Conclusion】 Taken together, all findings showed that iHAEs possess the superior anti-oxidative capacity against oxidative stress induced by ionizing radiation and H₂O₂.

120

スカイフルーツの抗酸化作用について

○周 凱旋¹, 吉田淑子¹, 吉田一晴², 木 勝人³, 岡部素典¹, 古市恵津子¹
¹富山大学大学院医学薬学研究部再生医学講座,²東京理化学テクニカルセンター,³医療法人社団芦屋ベנקリニック院長

スカイフルーツ (SF) は、オオバマホガニーの果実であり、東南アジアでは循環器系、特に高血糖や高血圧に有効な伝統生薬であり、強壮剤としても知られている。また、センダン科であることから同科の高麗人参と効能が近いといわれているものの詳細な報告はほとんどなされていない。【目的】 SFの抗酸化作用をヒト皮膚線維芽細胞 (HSF細胞) およびヒト羊膜間葉系幹細胞 (HAMα細胞) を用いて検討した。【材料と方法】 SFの抽出液を培養液濃度が最終的に0.005、0.05、0.5 mg/mlになるように調整した。HSFおよびHAMα細胞 5.0×10⁵ 個を96wellで72時間培養後、過酸化水素 (H₂O₂) 880μMを含む培地で24時間培養、その後、濃度0.005、0.05、0.5 mg/mlのSF添加培地に交換し、24時間後に細胞数を計測した。上記条件で培養した細胞を回収し、インターカラーター (SYBR Green)法を用いたリアルタイムPCR法によりマンガンSOD、Catalase及びDNA 8-OG修復酵素(hOGG1)のmRNA発現量を定量した。

【結果】 H₂O₂刺激時のHSF細胞およびHAMα細胞に及ぼすスカイフルーツ (SF) 抽出物の効果を検討した。過酸化水素刺激24時間後にSF抽出物を添加し、さらに24時間培養したところ、①HSFおよびHAMα細胞いずれにおいても濃度依存性に細胞数の増加がみられた。②抗酸化関連酵素Mn-SODとカタラーゼとDNA 8-OG修復酵素などのmRNAの発現において、HSFでは、ほとんど差が認められなかったが、HAMαでは、いずれの酵素のmRNAの発現量も増加した。【結論】スカイフルーツ (SF) は、抗酸化作用を増強し、酸化ストレスによる細胞ダメージを修復する。

121

パルブロ酸が脊髄神経の形成に及ぼす影響

坂田ひろみ¹⁾, Bold Jurant²⁾, 福井義浩²⁾, 島田ひろき¹⁾, 八田稔久¹⁾

¹⁾金沢医科大学医学部 解剖学Ⅰ
²⁾徳島大学大学院医学歯薬学研究部機能解剖学分野

胎生期パルブロ酸(VPA)曝露により脊髄神経形成異常(SNDs)が引き起こされることが報告されている。本研究は、胎生期VPA曝露に起因するSNDsの詳細について、神経管閉鎖不全(NTDs)の場合と比較して検討することを目的とした。

VPA投与日によるSNDs有病率の違いを検討するため、ICRマウスの妊娠6、7、8、又は9日にVPA400 mg/kgを投与した。妊娠10日に胚を採取し、抗ニューロフィラメント抗体を用いたホールマウント免疫染色を行脊髄神経の走行を観察した。次に、SNDs有病率と投与量の相関性を明らかにするため、妊娠8日に100、200、400、又は600 mg/kgのVPAを投与し、同様の観察を行った。さらにSNDs発症に対する葉酸の効果を検討するため、妊娠6-10日に3 mg/kg/dayの葉酸投与を受けたマウスに対し、妊娠8日にVPA400 mg/kgを投与し、SNDs有病率を解析した。その結果、VPA曝露胚では、主に胸神経と腰神経において神経束の欠損や隣接する神経束との吻合、および後根神経節の分節化の異常などのSNDsが認められた。SNDs有病率は、妊娠8日での投与のみで有意に増加したが(60.0%)、NTDsの有病率は妊娠7日(26.4%)または8日(27.7%)の投与で有意に増加した。また、VPA曝露胚におけるSNDsとNTDsの有病率には有意な用量相関性が認められた。さらに、葉酸投与はVAPにより誘発されるNTDsの発症を有意に抑制したが、SNDsに対しては効果を示さなかった。以上より、胎生期VPA曝露によるSNDsの感受期は妊娠8日であること、およびSNDsの発症頻度はVPA投与量と用量相関性があることが明らかになった。また、胎生期VPA曝露によるSNDsとNTDsは、臨界期は類似するものの、葉酸による抑制効果の違いから、異なるメカニズムにより誘発される可能性が示唆された。COI: なし

122

ストレス誘発性疼痛における脊髄ミクログリア活性化機序の解析

○安井正佐也¹, 校條由紀², 内藤宗和¹, 中野隆¹, 木山博資²

1. 愛知医科大学医学部解剖学講座
2. 名古屋大学大学院医学系研究科機能組織学分野

【目的】我々は、複合的持続ストレス(CS)モデルラットを用いて、疼痛の発症に脊髄ミクログリア活性化が関与する事を明らかにした。しかし、ストレスがミクログリア活性化を引き起こす機序は、明らかになっていない。そこで、CSモデルにおけるミクログリア活性化機序を解析することを目的に、本研究を行った。

【材料と方法】SD系雄性ラットに複合的な持続ストレス(1.5cmの水を張ったケージで6日間飼育)を負荷して、CSモデルを作成した。CS負荷後より、疼痛評価を行った。CS負荷中の腰髄および後根神経節(DRG)を免疫組織化学にて解析した。CS負荷5日目の前脛骨筋(TA)および足底皮膚において、炎症性サイトカインのmRNA発現を確認した。片側の足関節を髓内釘固定したラットにおいて、CSモデルを作成し、固定側および非固定側のミクログリア変化を調査した。

【結果】CSモデルにおいて、TAと足底の痛覚増強が1週間以上持続した。CS負荷1日目から、L5DRGニューロンにおいて、ATF3(神経過活動マーカー)の免疫応答が漸増した。CS負荷4日目から、腰髄Iba1(ミクログリアマーカー)の免疫応答が漸増した。TAと足底皮膚においてTNF-α、IL-1β、IL-6のmRNAの発現は認められなかった。また、CS負荷中の筋電図において、ヒラメ筋の過活動が認められた。髓内釘固定したCSモデルにおいて、固定側の腰髄Iba1免疫応答の増大は抑制された。

【結論】複合的な持続ストレスにより生じる腰髄ミクログリアの活性化には、筋の過活動に伴うDRGニューロンの過剰興奮が誘因となることが分かった。

123

膜骨格蛋白4.1G欠損マウスの末梢神経における機能と形態変化の検討

○齊藤百合花^{1,2}, 寺田信生²

¹ 帝京科学大学 医療科学部 東京理療法科学科
² 信州大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 医療生命科学分野

【目的】これまで膜骨格蛋白4.1Gが髄鞘にあるシュミット・ランターマン切痕への蛋白輸送に必須であることを報告した。今回、作製した4.1G欠損マウスにおいて、末梢神経の機能および形態変化を検討した。【材料と方法】機能の検討として、4.1G欠損と野生型マウスにおいて、5分間の尾懸垂負荷を1日2回4日間行い、負荷前後に尾懸垂試験を行って神経障害を比較した。また右臀部坐骨神経の運動神経伝導速度を比較した。形態の検討としては坐骨神経について、傍紋輪部のCaspr(contactin-associated protein)を免疫染色して光顕観察、さらに髄鞘や傍紋輪部を透過型電顕で観察した。【結果】尾懸垂試験で4.1G欠損マウスは体幹方向に前後肢を握る反応(hugging behavior)を5分以内に示すものが多く、連日の懸垂負荷後でその頻度と時間が増加した。運動神経伝導速度は4.1G欠損マウスでは野生型と比較して有意に低下していた。電顕観察では髄鞘において、4.1G欠損で二重輪や局所の肥厚や突出を認め、野生型と比較して過剰形成状態であった。さらに傍紋輪部において、Casprを指標にすると4.1G欠損によってランビエ紋輪を挟んで非対称性バターンが多く、電顕観察でシュワン細胞の髄鞘先端が軸索に接着する部位が一部解離する形態変化を認めた。【考察と結論】4.1G欠損で、運動過負荷により末梢神経機能障害が増悪するoverwork weaknessを認めた。また髄鞘が過剰形成であることから、4.1Gの髄鞘形成制御への役割が示唆され、伝導障害はこれと傍紋輪部の髄鞘の形態変化が関連すると考えられた。

124 アルツハイマー病抵抗遺伝子 BRI2 に由来するペプチドの性状解析

○松田修二、小川名美、千田隆夫

岐阜大学大学院医学系研究科病態制御学講座解剖学分野

アルツハイマー病 (AD) は、 β アミロイドの沈着である老人斑、タウの高度リン酸化である神経原繊維変化、神経細胞の消失を特徴とする痴呆性疾患であり、高齢化社会ではその対策が急務とされる。 β アミロイドは、その前駆体である APP から順次蛋白質分解酵素によって代謝され、生産されてくる。AD の病態は諸説あるが、APP を代謝する機序になんらかの病因があることは間違いない。

2 型の一回膜貫通構造をもつ BRI2 は、APP に結合し、APP が代謝される α 、 β 、 γ 経路をすべて阻害する。この BRI2 の APP 代謝阻害は、BRI2 トランスジェニックマウスや、BRI2 ノックアウトマウスを AD モデルマウスと掛け合わせることで、個体レベルでも BRI2 は APP の代謝を抑制し β アミロイドの沈着を抑制する。ことから、BRI2 は AD 抵抗遺伝子であるということが出来る。

BRI2 の APP に対する作用は、BRI2 の膜近傍に近い細胞外の短い部分が責任領域であり、その領域に対応するペプチドを合成すると、APP 代謝の β 経路の阻害剤として働くことがわかった。この BRI2 ペプチドは、痴呆症のモデルマウスに見られる、記憶の低下や、海馬での LTP の減弱を改善する。

今回の発表では、BRI2 ペプチドを用いて、標的部位や作用機構を議論する。

201 中腎管の転写因子発現に対する BMP4 の作用

○城倉浩平¹、櫻井裕之²

¹信州大学 医学部 組織発生学教室

²杏林大学 医学部 薬理学教室

【目的】腎臓発生において中腎管は後腎間葉の誘導に応答し尿管芽を形成する。中腎間葉の成長因子 BMP4 はこの応答性を抑制することが知られている。BMP4 による抑制の機序を理解するために、腎臓発生に重要とされる転写因子群の発現変動を調べた。【材料と方法】胎生 12、13 日の SD ラット中腎を用いた。E12 中腎を器官培養し、GDNF による尿管芽誘導や BMP4 の効果評価を行い、転写因子抗体等で蛍光免疫染色した。E13 中腎管をほぼ上皮細胞のみの状態に単離し、ゲル包埋培養を FGF9 (125 ng/ml) で維持し、BMP4 やその阻害剤を添加して転写因子群の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法で解析した。【結果】GDNF による E12 中腎の尿管芽誘導培養に BMP4 を添加すると尿管芽形成は強く抑制された。一方、内在性 BMP4 の働きを中和抗体、Noggin、Smad1/5/8 経路阻害剤 (Dorsomorphin) などで抑制すると、尿管芽形成は促進傾向が認められ、BMP4 が抑制的に働くことが確認された。FGF9 で維持培養した E13 単離中腎管では、腎臓発生に重要な転写因子群が比較的安定して発現し、Hnf1b、Emx2、Pax2、Lhx1、Sox9 等の発現は BMP4 添加で有意に低下した。このうち Hnf1b、Emx2 発現は Dorsomorphin 添加で有意に回復し、Smad1/5/8 経路の関与が示唆された。E12 中腎の器官培養 24 時間では中腎管上皮細胞の核が HNF1b 染色陽性であり、BMP4 を投与すると染色性の減弱が認められた。【結論】間葉の BMP4 による中腎管の分化応答性抑制機構には、HNF1b 等腎臓発生に必須とされる転写因子の発現制御が含まれる可能性が示唆された。

202 APC1638T マウスにおける小腸上皮の細胞分化と細胞動態の解析

○王 図雅¹、山田名美¹、尾之内高慶²、松田修二¹、千田隆夫¹

¹岐阜大学大学院医学系研究科解剖学分野

²藤田保健衛生大学医学部病理学第一講座

【目的】Adenomatous polyposis coli (APC) は、家族性腺腫性ポリポーシス症 (FAP) の原因遺伝子として発見された。その遺伝子産物である APC 蛋白質は Wnt シグナル系を負に制御し、癌抑制因子として機能していることが明らかとなっている。一方で近年、APC が形態形成や脳機能に深く関与していることがわかってきた。しかし、APC ノックアウトマウスのホモは胚性致死、APCMin/+ マウスは若年で大腸癌が発生し死亡するため、APC の癌抑制以外の生体機能の解析は遅れている。APC1638T/1638T (APC1638T) マウスは、APC の β -カテニン結合部位の一部、Tublin(微小管)、EB1(微小管結合因子)等の結合部位を欠損しているが、生涯癌が発生せず長期生存することがわかっている。これまでの私たちの研究によって、APC1638T マウスでは発育障害、統合失調症様行動異常、腸絨毛の伸長などの異常を認めた。本研究では、小腸上皮における APC の C 末端特異的機能に焦点を当てて解析した。【結果・結論】APC1638T マウスの体は野生型マウスより小さく、腸の長さも野生型より短かった。APC1638T マウスでは、腸絨毛が伸長し、小腸上皮細胞数の増加を認めたが、腸絨毛 100 μ m あたりの細胞密度には有意差はなかった。APC1638T マウスでは BrdU 陽性の小腸上皮細胞が、野生型マウスよりも腸絨毛先端に存在した。杯細胞は十二指腸と回腸で増加し、空腸で減少した。内分泌細胞は、十二指腸で増加し、空腸で減少、回腸では有意差はなかった。パネート細胞は小腸全域で増加を認めた。これらのことにより、APC の C 末端は小腸上皮の分化及び分裂増殖に関与している可能性が示唆された。

203 CD133 and CXCR4 positive endometrial cancer cells possess cancer stem-like cell characteristics

Yi Sun¹, Toshiko Yoshida¹, Motonori Okabe¹, Kaixuan Zhou¹, Fang Wang³, Chika Soko¹, Shigeru Saitou², Toshio Nikaido¹

¹Department of Regenerative Medicine, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, ³Anesthesiology, Huashan Hospital of Fundan University

Endometrial cancer is the most familiar gynecologic malignant tumor of the female reproductive system in developed countries, besides, incidence rates of EC is increasing per year. Although surgery, radiation, and chemotherapy were established for the treatment, alternative therapies are urgently required, especially for recurrent diseases that have acquired radio- or chemoresistance. It has been reported that a small subpopulation of cancer cells has a great advantage of cell proliferation, proposing the concept of cancer stem cells (CSCs) in malignant tumors that are responsible for tumor formation and progression. In this experiment, the identification of CSCs in the EC was focused on the cell surface marker and stem cell marker. The tissues were got from human endometrial cancer from endometrial patients. The tissues were separated to three parts. One was for cell culture, one was transfected to nude mouse and the other one was investigated with histopathology. By using RT-PCR methods, we found that the cultured cells strongly expressed stemness related genes, such as c-myc, octA, sox2, nanog, abcg-2, nestin and bmi-1. The surface markers such as CD24, CD133, and chemokine marker CXCR4 were expressed by Flow Cytometry examination. CD133+CXCR4+ cells existed 7.2% and 9.3% in EC cells. After cell sorting, we found CD133+CXCR4+ primary endometrial cancer cells grew faster, expressed highly mRNA of stemness related genes, made more spheres, and were higher clonogenic ability than other subpopulations. The CD133+CXCR4+ cells are also more resistant to anti-cancer drugs than other subpopulations. Besides, the CD133+CXCR4+ cells have cancer-initiating ability. The data indicate CD133+CXCR4+ cells may have some characteristics of CSCs in primary endometrial cancer. This CD133+CXCR4+ cells are useful for making the drug of cancer molecular target for CSCs in primary endometrial cancer.

204 生後発達におけるマウス精細管の三次元構造

仲田浩規、井関尚一

金沢大学医薬保健研究域医学系組織細胞学

【目的】半自動でマウス精細管の三次元再構築を行い、複数の週齢・サンプルを解析可能にする。それにより、生後発達におけるマウス精細管の三次元構造を明らかにするとともに、三次元で精上皮のステージ解析を行う。

【方法】0 日齢、3 週齢、3 ヶ月齢のマウス精巢 (各 3 個) の連続切片を作製し、蛍光染色または PAS 染色を行い、基底膜を抽出した。三次元再構築ソフト Amira を用いて、デジタル化した画像の軸合わせを行い、精細管を精巢網から連続的に半自動でマークし、三次元再構築を行った。再構築した精細管の芯線を抽出し、解析を行った。また、再構築した精細管に蛍光 PNA レクチン染色または PAS 染色によるステージ情報を付加した。

【結果】半自動でマウス精細管の三次元再構築に成功した。0 日齢、3 週齢、3 ヶ月齢において、精細管の本数の平均はすべて 12 本、分岐の平均はそれぞれ 13.3、14.3、19.3 カ所、精巢網との結合点の平均はそれぞれ 36.3、36.7、42.0 カ所、精細管の全長の平均はそれぞれ 71.9、741.7、1612.0 mm であった。盲端は 3 週齢において 1 カ所のみであった。また、再構築した精細管の三次元ステージ分布を明らかにした。

【結論】精細管は胎生期の精巢索の規則性を保っていることが判明したが、個体により細部に多様性があることがわかった。

205 大腸がんにおける細胞外小胞と免疫寛容誘導メカニズム

○山田名美¹、倉永祐希²、松田修二¹、赤尾幸博²、千田隆夫¹

¹岐阜大学大学院医学系研究科解剖学分野

²岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

【目的】細胞外小胞 (Extracellular vesicles; EVs) は生体膜由来の小胞で、かつては細胞から出る単なる老廃物と考えられていたが、近年、内部にタンパク質、mRNA、microRNA などを含む、細胞間における水平方向の情報伝達に利用されていることが明らかとなった。特にがん細胞は EVs を積極的に分泌しているが、その生物学的意義や機能については依然不明な点が多い。そこで本研究では、大腸がんが EVs を分泌する生物学的意義を腫瘍免疫の観点から解明すべく、以下の実験を行った。

【材料と方法】ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 と WiDr を EVs の Donor、T 細胞性白血病細胞株 Jurkat および正常 CD4⁺ T 細胞を EVs の Recipient として使い、大腸がん細胞による EVs を介した免疫寛容誘導に関する細胞内シグナルを、ウェスタンブロットおよび Real-Time PCR により解析した。

【結論】大腸がん細胞由来の EVs には TGF- β が豊富に含まれており、T 細胞の G₀/G₁ arrest を引き起こすとともに、Smad シグナリングを活性化し抑制性 T 細胞様細胞 (Treg-like cell) への分化を誘導していることがわかった。さらにこの Treg-like cell は *in vitro* から *in vivo* において、腫瘍増殖を促進する活性を持つことがわかった。本研究により、大腸がん細胞は EVs を分泌することで T 細胞内シグナリングを操作し、免疫寛容および腫瘍増殖を促進する性質を有した T 細胞を誘導することで、腫瘍の進展に有利な微小環境を構築することが明らかとなった。

206 ライブイメージングによる一次繊毛の動態観察

池上浩司¹、瀬藤光利¹
¹浜松医科大学 細胞分子解剖学講座

脊椎動物のからだを構成するほとんど全ての細胞には、一次繊毛と呼ばれる細胞表面に突出している細胞小器官が存在する。一次繊毛にはセロトニン (5-HT) やソマトスタチンの受容体、カルシウムチャネルなどが局在しており、一次繊毛は気道上皮細胞の動繊毛とは異なり運動能を持たず、静的な構造として捉えられているが、細胞の状態に応じて伸長・退縮を繰り返すなど、動的な側面も持ち合わせている。本研究では、一次繊毛の形態を微速度撮影することで一次繊毛の動的な側面を観察し、意外な動態や動きの発見を目的とする。マウス繊維芽細胞由来の細胞株 NIH/3T3 細胞、あるいは、マウス腎臓髄質集合管上皮細胞由来の細胞株 IMCD3 細胞に、蛍光タンパク質を融合させた一次繊毛局在性のセロトニン受容体 5HT6、あるいは、ソマトスタチン受容体 Sstr3 を過剰発現させた。共焦点顕微鏡により、数秒から 20 秒に一枚のフレームレートで 1 時間程度、微速度撮影し、数十倍の速度で再生することで一次繊毛の動きを観察した。多くの一次繊毛が 1 時間以上安定して維持される一方で、10 μm の繊毛が 15 分程度で完全に退縮する様子が観察された。また、記録中に一次繊毛の中腹で突然切断される現象も観察された。さらに、驚くべきことに、一次繊毛の先端が切り離され、細胞外に放出される現象も観察された。

207 オートファゴソーム膜への PC 供給機構の解析

小笠原裕太、内田岬希、藤本豊士
名古屋大・院医

オートファジーは真核生物が持つ主要な分解系である。細胞は外環境から栄養を獲得できなくなると、二重膜小胞(オートファゴソーム)によって自身の一部を隔離・分解し、自ら栄養素を産生する。オートファゴソーム膜を形成する際に、既存の膜を再利用しているのか、それとも新規合成された脂質が供給されているかについては明らかになっていない。本研究ではオートファゴソーム膜への脂質供給機構を明らかにするために、生体膜の主要な成分であるホスファチジルコリン(PC)に着目し、新規合成されたPCがオートファゴソーム膜へ取り込まれるか否かを解析した。哺乳類ではコリンを基質とするkennedy pathwayによって大部分のPCが合成されるため、コリンにアルキンを付加したpropargylcholineを代謝ラベルし、クリック反応によりCy3-Azideを特異的に結合させることで新規合成されるPCのみを可視化できる。実験にはGFP-LC3を安定発現するMEF細胞を用い、propargylcholineを含む飢餓培地で培養後、クリック反応によって新規合成されたPCを可視化した。その結果多くのオートファゴソームに新規合成されたPCが取り込まれていることが示された。このことから、オートファゴソーム膜が、既存の膜を再利用するのではなく、新規に合成された膜脂質の供給によって形成されることが示唆された。

208 新規繊毛関連遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析

成田啓之¹、長友啓明²、若山照彦²、竹田扇¹
¹山梨大学大学院 総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室
²山梨大学 発生工学研究センター

【目的】繊毛は哺乳類では浮遊細胞を除くほぼ全ての細胞が持つ細胞小器官であるが、その構造と機能は組織によって異なっている。こうした多様性の分子基盤については不明な点が多い。今回我々は網羅的解析に基づき繊毛との関連が予想された新規遺伝子のノックアウトマウスを作出してその表現型を解析した。【材料と方法】遺伝子改変マウスはゲノム編集プラスミドを用いて作出した。各臓器の異常の有無は組織染色 (H&E) および免疫染色を行い検討した。また成獣の精巣上体から精子を採取してその運動能を観察するとともに、形態を走査型電子顕微鏡で解析した。【結果】1 種類のゲノム編集プラスミドを用いて、塩基挿入・欠失の様態が異なる 3 種類の遺伝子改変マウスを得た。ヘテロ接合型マウスの雌雄を交配したときに得られる産仔の遺伝子型の比率はメンデルの法則に従っており、内臓逆位・錯位は見られなかった。ホモ接合型の雄マウスは軽～重度の水頭症を呈し、また重度の造精機能障害により生殖能力を欠いていた。これらの精巣上体から採取した精子には著しい鞭毛形成不全が見られ、鞭毛運動は全く確認できなかった。【結論】この新規遺伝子は精子の鞭毛形成および運動能獲得に極めて重要な役割を担う一方で、他組織の繊毛形成および機能へ与える影響は限定的であった。今回作出した遺伝子改変マウスは、繊毛の構造的・機能的多様性を産み出す分子機構解明の足がかりになると同時に、遺伝子変異を原因とする男性不妊の病態解明にも資することが期待される。

209 坐骨神経への損傷の種類が運動機能に及ぼす影響

唐澤未佳、森泉哲次、福島菜奈恵
信州大学医学部医学科 人体構造学教室

〔目的〕末梢神経損傷における重要な課題である (1) 損傷を免れた残存軸索数と運動機能の関係並びに (2) 反復損傷における損傷間隔の違いと損傷回数が運動機能へ与える影響を明らかにすることを目的として、成熟ラットの坐骨神経損傷実験を行った。
〔方法と結果〕(1) 杉田クリップや止血クリップを用いて総腓骨神経に圧迫損傷を加えた。損傷の程度は 1 秒から 180 秒まで圧迫時間を変えることによって調節した。下肢の運動機能は損傷 48 時間後に採取した Foot print から Sciatic static index (SSI) 値を算出し、機能正常群と機能障害群 (軽度・中等度・高度) に分類した。灌流固定後に前脛骨筋を採取し、縦断で連続凍結切片を作成した。抗 β III-tubulin 抗体と α-bungarotoxin を用いた蛍光二重染色により、神経筋接合部における軸索残存率 (受容体に占める割合) を計測した結果、機能正常群の軸索残存率は 36.5%~88.7% であった。
(2) 損傷間隔と回数の違いが損傷後の神経再生と運動機能の回復に与える影響を調べるため、1~4 週間隔で 2 回または 3 回の圧迫損傷を坐骨神経に加えた。圧迫は杉田クリップで 180 秒間行い、全軸索を損傷した。運動機能評価は 1 週ごとに 8 週間まで行った。また、3 回損傷群では 3 週間と 8 週間の前脛骨筋を採取し、神経筋接合部における再生神経線維の陽性率 (受容体に占める割合) を計測した。1 回損傷群の運動機能は 3 週間後に急激に回復し正常機能に達したが、2 回および 3 回損傷群の運動機能回復は遅く 8 週間後に機能正常となった。損傷回数および損傷間隔の違いによる運動機能の回復には大きな差は見られなかった。神経筋接合部における神経再生率は 1、2 週間隔で反復損傷したラットにおいて損傷 3 週間後に 1 回損傷群よりも高値を示し、反復損傷による神経再生促進効果を認めたが、8 週間では 1 回損傷群よりも低値であった。
〔結論〕正常な運動機能の維持には約 40% 以上の軸索が必要であることが明らかとなった。反復損傷では、損傷間隔に関わらず神経再生率が 1 回損傷群よりも最終的には低く、機能回復が遅れることが明らかとなった。

210 The involvement of MCP-1/CCR2 signaling in Gastric Hyperalgesia related to Diabetic Gastropathy

金沢大学 医薬保健研究域 医学系 機能解剖学
○Aye Aye Mon、堀 紀代美、小酒井 友、奥田 洋明、尾崎 紀之

Diabetic gastropathy is one of the autonomic neuropathies in diabetic mellitus (DM) and often associated with altered gastric emptying and gastric pain. This study aims to assess the gastric emptying and gastric pain in streptozocin (STZ) induced diabetic rats and to examine the role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCR2 signaling in gastric hyperalgesia in that model.
Loss of weight gain and hyperglycemia were observed from 3 days after STZ. Cutaneous mechanical hyperalgesia was started from 2 weeks after STZ until the end of the experiment. Rapid gastric emptying was found in diabetic rats at 2 weeks after STZ. Intense gastric hyperalgesia was developed in 2 weeks after STZ but it was not related to the hyperglycemic level. Intrathecal CCR2 antagonist (INCB3344) attenuated established gastric hyperalgesia occurred in diabetic rats.
We have been able to develop a potential animal model of gastric hyperalgesia associated with diabetes. Chemokine MCP-1 and CCR2 play an important role in gastric pain associated with diabetic gastropathy.

211 ラット後肢不動後に生じる広範囲機械痛覚増強の病態解明
～酸化ストレスにより生じた神経原性炎症の関与～

愛知医科大学医学部解剖学講座
○大道裕介、安井正佐也、大道美香、内藤宗和、中野隆

【目的】身体の不動により生じる慢性痛の発症機序を解明するため、我々はギブス固定後慢性痛 (chronic post-cast pain: CPCP) モデルラットを開発した。このモデルにおける長期に生じる広範囲機械痛覚増強の維持に、腰髄アストロサイトの活性化が関与することを明らかにした。また、急性期に活性酸素除去剤の NAC および Tempol を投与すると、いずれも発症早期の痛覚増強を抑制できたことから、疼痛の発症に酸化ストレスが関与する可能性が考えられた。そこで今回、CPCP モデルラットにおいて、広範囲機械痛覚増強の発症に対する酸化ストレスの関与について明らかにすることを目的として、本研究を行った。
【材料と方法】SD 系雄ラットを用いて四足立位で片側後肢を 2 週間ギブス固定し、CPCP モデルラットを作成した。ギブス固定前、固定終了時 (2 週間目)、除去後 1 日目において、後肢の横断切片を 8-OHdG (酸化ストレスマーカー) で免疫染色し、酸化ストレスの時間変化と局在を解析した。またギブス除去直前に Tempol を腹腔内投与 (100, 250 mg/kg) し、投与後の不動肢における血漿管外漏出量の変化を Evans blue dye (EBD) で評価した。Tempol 投与後、各部位における疼痛様行動 (皮膚: 足底、下腿内側部、尾部、筋: 腓腹筋部) の経時的な評価を除去後 5 週目まで行ったのち、腰髄切片を GFAP (アストロサイトマーカー) で免疫染色し、後角におけるアストロサイトの活性化を評価した。
【結果】8-OHdG の免疫応答が、ギブス固定除去後 2 時間から 1 日目にかけて不動肢の全域 (皮膚、筋、骨格筋、骨膜など) で漸増した。また不動肢における EBD の管外漏出量は Tempol の用量依存性に有意に減弱した。疼痛様行動は、すべての部位において、Tempol の用量依存性に抑制された。腰髄後角のアストロサイトの活性化は、Tempol 投与によって有意に抑制された。
【結論】酸化ストレスは、不動肢において神経原性炎症を生じさせ、慢性的な広範囲機械痛覚増強を誘発する可能性が示唆された。

212 MHC 欠損マウスの線条体におけるシナプスの量的異常に関する研究

1) 藤田保健衛生大学 医学部解剖学 II, 2) 疾患モデル教育研究センター
○ 深澤元晶¹, 長尾静子², 森山陽介¹, 白田信光¹

【目的】MHC(主要組織適合遺伝子複合体)クラスI分子は、中枢神経細胞に発現し、発達過程の神経突起の刈り込み・シナプス形成に関与することが近年知られるようになった。本研究では、軽鎖β2m欠損マウスの中脳ドパミン神経細胞とその投射先である線条体の神経細胞について、形態的解析を行った。
【材料と方法】β2m欠損マウスの成体オスを用いた。動物を灌流固定し、パラフィン切片をSynaptophysin (Syn) 抗体を用いて酵素抗体法を行った。対物レンズ100倍で撮影し、顆粒状産物をシナプスとして計数した。凍結切片をGABAポリクロナル抗体とtyrosine hydroxylase (TH) モノクロナル抗体を用いて蛍光抗体法を行い、線条体の神経細胞のシナプス数を解析した。鍍銀染色 (Golgi-Cox) を行い、神経細胞の突起の数を計数した。
【結果】Syn陽性の顆粒の密度は、腹側被蓋野・背側線条体・側坐核において欠損マウスで多かった (欠損マウス: 2.0–3.8個/μm²; 正常動物: 0.5–1.8個/μm²)。蛍光抗体法においては、線条体の中型有棘神経細胞の細胞体周囲にTH陽性の顆粒が多数観察されたものの、細胞体におけるシナプス密度の差は顕著ではなかった。また、側坐核の神経細胞の突起の数はβ2m欠損マウスで有意に多かった。
【結論】β2m欠損マウスの線条体におけるシナプス過剰が観察された。軸索細胞体間シナプスより軸索樹状突起間シナプスにおいて差が顕著であると考えた。シナプス形成異常が線条体の機能異常に関与することが示唆された。

213 APC1638T マウスにおける歩行時の肢間位相性の欠如

○ 石田裕保 WANG TUYA 小川名美 松田修二 千田隆夫
岐阜大学大学院医学系研究科 病態制御学講座 解剖学分野

【目的】APC (adenomatous polyposis coli) 1638T マウスは、APC タンパク質の 1639 アミノ酸以降の C 末端が欠損している変異 APC タンパク質を発現するマウスである。この APC1638T マウスでは肉眼的に四肢の協調性を欠いた異常歩行が確認できる。本研究では、APC1638T マウスと野生型 APC マウスの四肢の協調運動の違いを明らかにすることを目的とした。【材料と方法】1) 歩行解析には DigiGait 小動物用歩行解析システム (Mouse Specifics, Inc.) を用いた。2) 透明のトレッドミル上で速度 25cm/s でマウスを歩かせ、下方から高速カメラ (135frames/s) で撮影した。3) 足底の接地時間を算出し、四肢の遊脚相と立脚相の位相性を解析した。【結果】1) 野生型 APC マウスに対し、APC1638T マウスの後肢の左右のリズミカルで協調的な運動が困難となっていた。2) 歩行時の後肢の肢間位相性が崩れていた。【考察】前肢と後肢では無意識的にリズミカルで協調的な運動が生じ、この運動には CPG (central pattern generator) と呼ばれる脊髄介在ニューロン群が関与している。この CPG は、歩行の基本リズムを生成するとともに歩行に参画する屈筋や伸筋群の運動パターンを決定する役割を持っている。近年の研究で、CPG は、Th11-L1 の腹内側面に多く局在することが報告されている。歩行時の後肢の肢間位相性が崩れていた APC1638T マウスでは、脊髄の CPG に関与する介在ニューロンの数やシナプス構造に何らかの異常をきたしていることが推察される。今後、免疫組織化学法などを用いて CPG の解析を行い、APC1638T マウスの異常歩行の原因を明らかにしていく予定である。

214 成体脳神経新生における酸感受性イオンチャネル ASIC1a の役割

熊本奈都子、星川真理子、柴田泰宏、植田高史、鵜川真也
名古屋市立大学大学院医学研究科機能組織学

成体脳における神経新生は、脳卒中などによる脳損傷時に活性化することが知られており、機能回復に寄与していると考えられているが、その制御機序は不明である。我々は、脳虚血時のアシドーシスが神経新生に何らかの影響を及ぼしていることを想定した。そして、中枢神経系の神経細胞に広く発現し、水素イオンによって活性化される酸感受性イオンチャネル ASIC1a に着目した。
成体マウス海馬歯状回の新生ニューロンを対象にレトロウイルスを用いて ASIC1a の発現を抑制し、そのとき見られる樹状突起の形態学的・機能的変化について in vivo で解析した。ASIC1a 抑制新生ニューロンは、樹状突起が短く、複雑性も低下していた。また、マッシュルームスパインの大きさも小さかった。既存の神経回路からの入力を電気生理学的に解析したところ、シナプス形成が盛んになり始める誕生 2 1 日目の新生ニューロンでは eEPSC が検出される割合は ASIC1a ノックアウト群の方が低く、惹起される電流の大きさも小さかった抑制されていた。
これらの結果より、海馬新生ニューロン発現する ASIC1a が、同ニューロンの成熟および既存神経回路への組み込みに関与する可能性が示唆された。

215 ミクログリア細胞における GPR84 の機能解析

時實恭平、魏麗、木山博資
名古屋大学大学院 医学系研究科 機能組織学講座

G 蛋白共役型受容体の GPR84 は神経損傷および多発性硬化症モデルマウスのミクログリアにおいて発現誘導されることから炎症応答等に関連し、創薬のターゲットになることが期待される。末梢のマクロファージにおいては遊走能や炎症性サイトカインの発現に関わると報告がある一方、中枢神経系に存在するミクログリアにおける機能は未だ不明である。そこで我々はマウス新生仔を用いて単離したミクログリア細胞に 6-OAU などの GPR84 作動薬を投与した。炎症性サイトカイン (IL1-β, IL6, TNF-α, iNOS) の発現動態については vehicle 投与群と比較して発現に有意な差は認められなかった。一方、6-OAU などの作動薬投与後のミクログリア細胞を経時的に観察したところ、膜ラフリングを伴う細胞移動能 (速度および移動距離) が顕著に増加した。また G_{αi} pathway を阻害する百日咳毒素事前投与および GPR84 タンパク欠損の DBA/2J マウス由来のミクログリアにおいて 6-OAU 等による細胞移動能の促進は認められなかった。
以上より GPR84 を介するシグナルは炎症性サイトカインの発現には関与しないく、ミクログリアの遊走性を促進することが示唆された。