

日本解剖学会

第93回近畿支部学術集会

会 期：平成29年11月25日（土）
会 場：滋賀医科大学

1 Antibodies set boundaries limiting microbial metabolite penetration and the resultant mammalian host response

Yasuhiro Uchimura^{1,3}, Tobias Fuhrer², Hai Li¹, Uwe Sauer², Andrew J. Macpherson¹

¹ University of Bern, ² ETH Zürich, ³ Shiga University of Medical Science
(滋賀医科大学 解剖学講座 生体機能形態学部門)

Although the mammalian microbiota is well-contained within the intestine and on other body surfaces, it profoundly shapes development and metabolism of almost every host organ, presumably through pervasive microbial metabolite penetration. The challenge is that most metabolites can be of both host and microbial origin. We developed a model to distinguish between microbial and host metabolites by stable isotope tracing using fully ¹³C-labelled live non-replicating *Escherichia coli*, differentiating ¹²C and ¹³C isotopes with high-resolution mass spectrometry. Hundreds of microbial compounds penetrated across 23 host tissues and fluids after intestinal exposure: subsequent ¹²C host metabolome signatures included lipidemia, reduced glycolysis and inflammation. Mucosal barrier maturation with transient microbial exposure increased early clearance of penetrant bacterial metabolites from the small intestine into the urine, independently of antibody induction. Induced antibodies curtailed microbial metabolite exposure at the intestinal surface, by accelerating intestinal bacterial transit into the colon where metabolite transport mechanisms are limiting.

2 転写共役因子 PGCv β の核移行メカニズムと乳酸ストレス応答

谷田任司、松田賢一、山田俊児、田中雅樹
京都府立医科大学 大学院医学研究科 解剖学教室 生体構造科学部門

代謝異常や虚血、低酸素条件下などにおいて嫌氣的解糖により生成された高値の乳酸を代謝し、細胞が恒常性を保つ詳細な分子メカニズムは明らかではない。最近我々は、好氣的代謝のマスターレギュレーターである転写共役因子 PGC-1 α のスプライシングバリエント PGC variant form (v β) をラット視床下部より同定した。PGCv β は、脳、肝臓、腎臓など、乳酸代謝に関わる臓器で強く発現していたことから、PGC-1 α と PGCv β の乳酸に対する応答を、細胞内動態から比較検証した。蛍光標識した PGC-1 α を COS-1 細胞に発現させると核に、PGCv β は細胞質にそれぞれ局在した。乳酸を添加すると、PGC-1 α の局在は変化しなかったが、PGCv β は細胞質から核へと移行した。PGCv β には核外移行シグナル(NES) 配列を 2 ヶ所見出しているが、核局在化シグナルは存在しない。PGCv β の NES 欠失変異体は核優位な局在を示し、乳酸を添加しても野生型ほど顕著な核移行は認められなかった。一方、NES 依存的な核外移行の阻害剤レプトマイシン B を添加すると、PGCv β は核に移行した。分子シャペロン HSP70 ファミリーの阻害剤の存在下では、乳酸による PGCv β の核移行が抑制された。PGCv β との共発現下において、ERR γ の応答配列における転写活性は乳酸により有意に亢進した。また、肝癌由来細胞 HepG2 に PGCv β を導入すると、乳酸の消費が増加した。以上より、PGCv β は乳酸負荷時に HSP70 系による NES の不活性化を介して細胞質から核へと移行し、ERR γ の標的遺伝子などを活性化させ、乳酸を代謝していることが示唆された。

3 ラット回腸における間質細胞を介した細胞間ネットワーク解析への Serial Block Face 走査型電子顕微鏡の有用性

万谷洋平¹、春田知洋²、西田美穂¹、湯浅秀人¹、増田なつみ¹、横山俊史¹、星 信彦¹、北川 浩¹

¹神戸大・院農・形態機能学、²日本電子（株）・アプリ統括室バイオ 3D 推進グループ

【目的および方法】小腸腸陰窩周囲の粘膜固有層（LP）における非遊走性間質細胞（SC）を介した細胞間ネットワークの解明に先駆け、ラットの回腸腸陰窩領域を Serial Block Face 走査型電子顕微鏡（SBF-SEM）にて観察し、その有用性を検証した。【結果】SBF-SEM による観察の結果、様々な遊走細胞、3 種類の SC（便宜上 type1-3 に区別）、複雑に走行する神経線維を観察することができた。SC type 1 および 2 は腸陰窩の底部および側面に位置する LP でみとめられ、SC type 3 は腸陰窩側面の LP で主にみとめられた。SC type 1 および 2 は正染色質の豊富な卵円形の核と明瞭な核小体、豊富な小胞体（ER）や発達したゴルジ装置を有していた。SC type 1 および 2 の細胞突起は薄く、時に枝分かれしており、上皮の基底側に伸長されているほか、様々な遊走細胞やほかの SC type 1 および 2 とコンタクトをとっていた。SC type 2 には複数の腸陰窩に向かって伸長されているものもみとめられた。また SC type 1 および 2 はそれぞれ異なる形状の ER を有しており、SC type 2 の ER が層板状に薄く発達する一方で、SC type 1 の ER は球状に拡張してみとめられた。SC type 3 は扁平な形状で上皮直下に局在しており、ほかの SC に比べて細胞小器官が乏しく、隣接した SC type 3 が互いに細胞突起でコンタクトして網状のネットワークを形成していたが、他の細胞種とのコンタクトはみとめられなかった。【結論】SC を介した細胞間ネットワークを解析する上で SBF-SEM が有用であることが確認されるとともに、腸陰窩の周囲の LP では 2 種類の SC が細胞間ネットワークを形成する可能性が示唆された。

4 ラット大腸の上皮直下における間質細胞の部位差に関する免疫組織化学的研究

田村彩貴、万谷洋平、西田美穂、湯浅秀人、増田なつみ、横山俊史、星 信彦、北川浩、神戸大・院農・形態機能学

【目的と方法】小腸および結腸で様々な表現型の上皮直下の間質細胞（SSC）が存在し、上皮細胞の分化を制御することが報告されている。上皮の細胞構成は大腸各部位で異なるが、SSC の部位差は不明であるため、本研究では Wistar 系ラット（雄、7 週齢）の大腸全長の SSC を細胞マーカーレベ（CD34、 α -SMA および PDGFR α ）で免疫組織化学的に分類し、各 SSC の局在の部位差を調べた。この際、CD31 と CD34 の蛍光重染色で CD34⁺CD31⁻SSC と CD34⁺CD31⁺血管内皮細胞とを区別した。【結果】大腸全長で CD34⁺ α -SMA⁺PDGFR α ⁺CD31⁻SSC（CD34⁺SSC）、CD34⁺ α -SMA⁺PDGFR α ⁺SSC（ α -SMA⁺SSC）および CD34⁺PDGFR α ⁺SSC（PDGFR α ⁺SSC）がみとめられた。CD34⁺SSC は盲腸および上行結腸では腸陰窩底部のみにみとめられ、下行結腸および直腸では腸陰窩底部に加えて側面にもみとめられた。腸陰窩周囲の CD34⁺SSC は大腸遠位に向かうほど高頻度であった。 α -SMA⁺SSC は大腸全長の腸陰窩側面でみとめられた。盲腸の α -SMA⁺SSC は他の部位に比べて高頻度であり、側面だけでなく腸陰窩底部にもみとめられた。PDGFR α ⁺SSC は大腸全長の腸表面上皮細胞下で頻繁に、腸陰窩底部で稀に、腸陰窩側面では底部より高頻度でみとめられた。上行結腸から遠位の腸陰窩底部から側面に局在する一部の PDGFR α ⁺SSC が α -SMA 陽性を示したが、大半は α -SMA 陰性であった。【結論】大腸全長において CD34⁺SSC、 α -SMA⁺SSC および PDGFR α ⁺SSC の少なくとも 3 種類の SSC が存在し、特に CD34⁺SSC および α -SMA⁺SSC の局在には大腸各部位間での差異が存在することが示唆された。

5 脳の TLR4 は NF- κ B シグナリングの活性化と体温調節に重要である

宗岡詩織・村山咲希・宮田清司
京都工芸繊維大学大学院・応用生物学系

Toll-like receptor 4 (TLR4)は、グラム陰性菌の認識とその後の自然免疫応答に必須の役割を果たす受容体である。末梢組織ではリポ多糖（LPS）を受容することで NF- κ B を活性化し、炎症反応を引き起こすことが知られているが、脳の TLR4 が LPS による炎症について、どのような機能的意義を持つのかは未だ不明なままである。本研究では、TLR4 が脳室周囲器官、弓状核、孤束核および中心管のアストロサイトや上皮細胞に発現することを明らかにした。LPS の腹腔内投与は、脳室周囲器官、弓状核のアストロサイト、上皮細胞および血管内皮細胞 NF- κ B を活性化した。一方、ミクログリアの NF- κ B 活性化はごく僅かだった。TLR4 阻害剤 LPS-RS の脳室内投与は、LPS によるアストロサイトおよび上皮細胞の NF- κ B 活性化を有意に抑制した。しかし、血管内皮細胞やミクログリアの NF- κ B 活性化には影響がなかった。また、TLR4 阻害剤 LPS-RS および VIPER の脳室内投与は、LPS 末梢投与による発熱を増強した。これらの TLR4 阻害剤の脳室内投与は、脳室周囲器官、弓状核のアストロサイトおよび上皮細胞で強い Fos 発現を誘導した。以上の結果は、脳室周囲 TLR4 は、アストロサイトおよび上皮細胞の NF- κ B シグナリングを介し、LPS による発熱を制御するレギュレーターとして機能することを示唆している。

藤田幸^{1,2}、山下俊英^{1,2,3}
¹大阪大学大学院 医学系研究科 分子神経科学
²大阪大学 免疫学フロンティア研究センター
³大阪大学 生命機能研究科

様々な神経発達障害において、中枢神経回路の破綻が報告されている。中枢神経系の発生・発達期には、神経幹細胞の増殖・分化、標的細胞への神経軸索の伸長、軸索と標的細胞とのシナプス形成という過程を経て神経回路が構築される。申請者はこれまでに **Structural maintenance of chromosomes protein 3 (Smc3)** 欠損マウスがシナプス形成障害を来し、不安様行動の亢進を示すことを明らかにしてきた。**Smc3** は染色体接着因子コヒーシン複合体の一部として、染色体立体構造制御を介して遺伝子発現を調節すると共に、プロテオグリカンとしての単独での機能を有することが示唆されている。プロテオグリカンは中枢神経の発達期に細胞外に集積し、シナプスの形成や維持に重要な役割を担う。本演題では、コヒーシンやプロテオグリカンとして、**Smc3** が中枢神経回路形成にどのような影響を及ぼすのか、これまでの研究結果を発表する。

7 淡蒼球外節は大脳皮質運動野から興奮性投射を受ける

荻部 冬紀・藤山 文乃
同志社大学・脳科学研究科

大脳皮質から大脳基底核への興奮性投射は線条体と視床下核を標的としており、線条体からの直接路・間接路経路および視床下核を介した間接路経路をそれぞれ駆動すると考えられている。古典的な神経投射標識実験によればラットの大脳皮質から淡蒼球外節へも投射があることが示唆されていたが、その詳細は明らかでなかった。今回我々はこの経路を形態学的・電気生理学的に検証した。

ラット大脳皮質投射細胞を標識し、その神経終末を線条体・視床下核・淡蒼球外節において定量したところ、特に皮質運動野から淡蒼球外節への顕著な投射が同側性に見られた。神経終末の密度は皮質線条体終末の3割に上り、皮質視床下核投射の約8割に達した。一方、前頭眼窩皮質や前辺縁皮質から淡蒼球外節への投射は少なかった。スライス標本を用いて運動野から淡蒼球外節への終末を光遺伝学で刺激したところ、単シナプス性の興奮性電流が観察された。興奮性電流は線条体有棘細胞で記録されるものより小さいが、しばしば活動電位を発生させるに十分であり、また同じ方法で視床下核細胞から記録される電流に匹敵する大きさであった。これらの結果は大脳皮質運動野から淡蒼球外節への直接投射が間接路に影響を与え、大脳基底核の活動を修飾し得ることを示唆している。

8 マウス脳における 5-HT3A 受容体発現分布の全容解明

小山佳久、近藤誠、島田昌一・大阪大学医学系研究科神経細胞生物学

中枢神経系において、セロトニンは重要な神経伝達物質であり、睡眠、知覚、認識や摂食行動など様々な脳機能を制御している。セロトニン受容体の中でもセロトニン3型受容体は唯一のイオンチャネル型受容体である。速い神経応答によって、嘔吐反射や痛覚反応を調節している。5-HT3R を介したセロトニン伝達系の様々な機能を理解する上で、中枢における5-HT3R の発現分布を知ることは非常に重要である。これまで多くの局在解析法にて、脳や脊髄での5-HT3AR 発現が明らかにされてきたが、中枢における局在の全容把握は不十分なままであった。

中枢神経系における 5-HT3R の局在を詳細に解析するため、我々は5-HT3R-gleen fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスを用いて、GFP 抗体による蛍光免疫染色法を行った。その結果、嗅球から仙髄における5-HT3R の局在の全容把握に成功した。5-HT3AR は、カルレチニンもしくはソマトスタチン陽性 GABA 作動性抑制ニューロンに発現しており、特に嗅球、大脳皮質、海馬及び扁桃体で強い発現が観察された。橋、延髄及び脊髄においては、部分的に発現を確認できた。一方で、視床、視床下部及び中脳での発現は弱く、小脳ではシグナルは検出されなかった。本研究において、中枢における詳細な5-HT3R の発現分布図を構築できた。我々の知見は、5-HT3AR の新たな機能の解明に貢献できると考える。

白波瀬 崇平^{1,2} 渡邊 義久¹ 辻村 敦¹ 青木 美空² 山本 俊郎² 金村 成智² 郭 伸^{3,4} 田中 雅樹⁵
¹京都府立医科大学大学院医学研究科 基礎老化学 ²歯科口腔科学 ³解剖学・生体構造科学 ⁴東京大学大学院医学系研究科 ⁵国際医療福祉大学 臨床医学研究センター

脳内の RNA 編集酵素(ADARs)は神経可塑性や神経発達を含む神経機能に密接に関係している。5-HT_{2c}R, GluA2, GABA_A などの受容体は RNA 編集を受けることにより、シナプス伝達調節される。編集型 5-HT_{2c}R は未編集型 5-HT_{2c}R と比べて 5-HT potency、アゴニストの結合効率、構成的活性、G-タンパク結合効率が減少する。我々は以前に側坐核 5-HT_{2c}R の RNA 編集率が飲酒行動と絶望行動に関与していることを発表した。慢性的アルコール暴露により側坐核の ADAR1 と ADAR2 の発現は増加し、5-HT_{2c}R の RNA 編集率が向上することによってアルコール摂取の亢進が起きる。さらに、側坐核の GluA2 Q/R サイトの RNA 編集は強制コカイン断薬によって減少し、側坐核 shell での ADAR2 過剰発現はコカイン探索行動を減弱させることが報告された。これらのことから側坐核 RNA 編集は報酬システムの制御に重要であることを示唆している。本研究では AAV-Cre を使用して側坐核特異的 ADAR2 KO マウスを作成した。側坐核特異的 ADAR2 KO マウスは側坐核内の 5-HT_{2c}R (site D), GluA2 (Q/R), CYFIP2 (K/E) の著明な RNA 編集の減少を認めた。側坐核特異的 ADAR2 KO マウスは不安行動、絶望行動、アンヘドニア関連行動において、コントロールマウスと比較して差は認めなかったが、アルコール慢性暴露後のアルコール摂取量と嗜好性の減少を認めた。これは側坐核 ADAR2 による RNA 編集がアルコール慢性暴露後のアルコール嗜好性の増強に寄与していることを示唆した。

10 新規行動解析システムによる社会的集団における自閉症モデルマウスの行動表現型解析

遠藤のぞみ¹、牧之段学²、堀井謹子¹、柚山奈実¹、小森崇史²、岸本年史²、西真弓¹
¹奈良県立医科大学 第一解剖学講座、²奈良県立医科大学 精神医学講座

自閉症は社会的に顕著な障害を伴う発達障害であり、その発症メカニズムの解明や治療法の開発を目的に、様々な自閉症モデルマウスを用いた研究が行われている。自閉症モデルマウスの一つである BTBR T+ Itpr3tf/J (以下 BTBR) マウスにおいても解剖学的な脳構造異常の他に、様々な社会行動異常が報告されている。しかしながら、これらの行動試験は基本的に新奇環境において数分程度で行われる短期的な試験であり、社会的な集団生活における行動、つまり普段の行動において BTBR マウスがどのような行動表現型を示すのかはこれまで検証されていない。本研究では、我々が近年開発した、社会的集団の中で個々のマウスの行動解析を可能とする行動解析システムを用い、BTBR マウスの社会的集団における行動解析を行った。対照マウスとして C57BL/6J マウスを用いた。社会的集団は1) BTBR マウスのみ、2) C57BL/6J マウスのみ、3) BTBR マウスと C57BL/6J マウスがそれぞれ半々ずつの3条件を設定した。それぞれ初顔合わせの4匹を実験ケージ内で4日間同居させ、同居中の各マウスの行動解析を行った。本発表では、新規行動解析システムの紹介と BTBR マウスの社会的集団における行動解析の結果を報告する。

11 マウスの脳室周囲器官におけるミクログリアの恒常的活性化

高木 翔平¹・古部瑛莉子¹・森田光洋²・宮田清司¹
¹京都工芸繊維大学大学院・応用生物学専攻
²神戸大学大学院・理学研究科

ミクログリアは中枢神経系に存在する免疫細胞である。正常時では ramified 型として存在しているが、炎症時や外的損傷を受けた時には急速に活性化し amoeboid 型に変化する。脳室周囲器官は、血液脳関門を欠いており血中分子が実質へと透過できる脳の中でも特殊な部位である。またこの部位には、神経幹細胞が存在している。この部位に存在するミクログリアは、血液情報を直接感知することが可能な為、特殊であると考えられるが、報告はまったくなかった。本研究より、正常時のマウス脳に存在するミクログリアは複数の枝分かれした突起が伸びている ramified 型であったが、脳室周囲器官に存在するミクログリアは突起の少ない amoeboid 型として存在していることが明らかとなった。さらに、このミクログリアは M1 (傷害性) マーカーである CD16/32,CD86、M2 (保護性) マーカーである CD206,Ym1 の発現が他の部位に存在するミクログリアと比較して高かった。以上より、正常時において脳室周囲器官に存在するミクログリアは形態的、機能的に常に活性化状態にあることが明らかとなった。さらに、Nestin-CreERT2/CAG-CAT^{loxP}/q^{loxP}-EGFP マウスを用いた実験から活性化したミクログリアは、脳室周囲器官に存在する神経幹細胞と相互作用していることが示唆された。

12 慢性高血圧による脳血管障害過程におけるミクログリア活性化の解析

小泉崇¹、田口勝敏²、水田依久子¹、鳥羽裕恵⁴、大東誠⁴、大西興洋³、生駒和也³、宮田清司³、中田徹男⁴、田中雅樹²、水野敏樹¹
京都府立医科大学 1 神経内科学 2 生体構造科学 3 整形外科学部門 4 京都薬科大学 臨床薬理学 5 京都工芸繊維大学 応用生物学系生体機能学

脳小血管病発症には慢性的高血圧が大きく関与しているが、その発症機序については未だ不明な点が多い。我々は後天的に高血圧を誘導させた Wistar ラット (DOCA-salt モデル) を用いて脳小血管の障害性とミクログリアの関係について経時的に組織化学解析を行った。DOCA 処理群では 2 週目より Control 群と比較して有意な血圧上昇を認め、3 週目以降で明瞭な臨床症状を現した。各実験群で血圧測定を行うと共に、脳組織障害の有無を MRI によって確認した後、免疫組織化学解析を実施した。その結果、DOCA 処理後 2 週目までは MR 像および HE 染色像で明らかな組織異常を認めることはできなかったが、ミクログリアの動態について詳細に検討したところ、血管壁に接着するミクログリアの存在を見出した。これらの血管接着性ミクログリアは M1 型 (CD68 陽性) および M2 型 (CD206 陽性) どちらの性質も示さなかった。しかしながら DOCA 処理 3 週目においては HE 染色像で局所的に血管構造の変化がみられ、興味深いことに血管周辺において M1 型ミクログリアの増加が見られた。更に、DOCA 処理 4 週ではびまん性に血管構造の変化及びその破綻を確認することができた。血管の破綻に先んじてミクログリアの M1 化が見られたが、その過程において、急性脳梗塞モデルで報告されているような M2-M1 クラススイッチを見出すことはできなかった。現在、静止型ミクログリアの M1 移行プロセスについて詳細に解析を進めており、慢性高血圧が誘導する血管障害メカニズムの解明を目指している。

13 脳卒中後疼痛におけるミクログリアの役割

平賀慎一郎、星子麻記、山下俊英
大阪大学大学院 医学系研究科 分子神経科学

脳卒中後疼痛 (central post stroke pain: CPSP) は、通常では痛みを惹き起こさない刺激を痛みとして感じる「アロディニア」を呈し、主に視床出血により誘発される難治性慢性疼痛疾患である。近年、CPSP の発症には、出血後のグリア細胞の関与が報告されているものの、その詳細な発症メカニズムは不明である。そこで本研究では、CPSP モデルマウスを確立し、CPSP と脳内ミクログリアの関係を検証した。まず我々は、マウスの視床 (後外側腹側核) にコラゲナーゼを投与することで局所的な出血を起こし、von Frey フィラメントを用いた機械刺激により、後肢足底の疼痛閾値を評価した。また視床出血により、障害が想定される脳領域、特に末梢組織からの感覚情報が伝えられる 1 次体性感覚野 (S1) において、ミクログリアと神経活動の変化を免疫染色 (Iba1, c-Fos) により評価した。さらにミクログリアに発現する colony-stimulating factor 1 receptor を阻害することで、マウスからミクログリアを除去し、疼痛と神経活動に与える影響を評価した。その結果、マウスは出血後 6 日目からアロディニアを呈し、その疼痛反応は観察を行った出血後 140 日目まで継続していた。また出血後 1-4 日目ではミクログリアが S1 で活性化しており、その後、出血後 7 日目では S1 第 4 層 (S1L4) ニューロンで c-Fos の発現が増加した。一方、出血前にミクログリアを除去することで、出血後のアロディニアと S1L4 ニューロンで増加した c-Fos の発現を抑制した。以上より、ミクログリアが異所的に活性化した S1L4 ニューロンを介し、CPSP の発症に関与することが示唆された。

14 EAE 発症脱髄マウスの延髄における新しいオリゴデンドロサイトの供給

平塚大士¹、古部瑛莉子¹、森田光洋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 神戸大学大学院・理学研究科

神経幹細胞は、脳梗塞などの脳疾病が起きると、損傷した脳部位に新しい神経細胞やグリア細胞を供給する。近年、脳室周囲器官である脳弓下器官、終板脈管器官、最後野および弓状核に神経幹細胞が存在することが報告された (Furube et al., 2015)。本研究では、多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスを用いて延髄の最後野・中心管に存在する神経幹細胞の組織修復時における働きを調べた。EAE 誘導後 20 日と 50 日ともに、最後野および中心管の BrdU 陽性神経幹細胞の密度はコントロール群と比較して差が認められなかった。一方、EAE 誘導後 20 日における BrdU 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞の密度が孤束核、舌下神経核、傍正中網状核、腹部網様核で顕著に増加したが、EAE 誘導後 50 日では、密度がコントロールレベルまで戻った。トランスジェニックマウスを用いて神経幹細胞の分化を追跡したところ、延髄では神経幹細胞から分化した成熟オリゴデンドロサイトの密度が舌下神経核、傍正中網状核、腹部網様核で顕著に増加していた。

以上の結果より、最後野や中心管に存在する神経幹細胞が、EAE 発症マウスの延髄における新しいオリゴデンドロサイトの供給源であることが示唆された。

15 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¹

1) 京都府立医科大学 解剖学教室・生体構造科学部門
2) 京都府立医科大学 脳・血管系老化研究センター 基礎老化学部門

α -シヌクレイン (α Syn) はパーキンソン病に特徴的な細胞内凝集体「レビー小体」の主要構成タンパク質であり、遺伝子の変異あるいは重複が家族性パーキンソン病の発症をもたらすことからその発症に関わる重要な責任分子の一つであると考えられている。 α Syn の過剰な細胞内発現は凝集体形成及び神経変性を引き起こす危険因子になると考えられており、その発現量と細胞内分布は α Syn の機能や病態との関係を理解する上で非常に重要である。 α Syn は通常、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。近年、興味深いことに、 α Syn が神経新生あるいは分化に関与するという知見が蓄積されてきた。我々は α Syn 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でその発現が非常に高いことを見出した。これらの細胞の多くが神経幹細胞のマーカー分子である Sox2 陽性である一方、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った。更に、脳虚血が α Syn を高発現する嗅球傍糸球体細胞を増加させるという結果を得た。現在、脳虚血後における α Syn 高発現細胞の形態学的解析を進めると共に、 α Syn-KO マウスにおける脳虚血時の表現型解析を実施しており、 α Syn の生理機能のみならず、その病態への関連性についても解析を進めている。

16 *Sfpq* 欠損は超長鎖遺伝子の発現を減少させ、重篤な筋成長不全を伴う代謝性ミオパチーを引き起こした

細川 元靖^{1,2}、武内 章英¹、谷端 淳^{2,3}、飯田 慶¹、武田 伸一²、萩原 正敏¹

(¹ 京大・院医、² 精神・神経研究セ・遺伝子疾患、³ 慈恵医大・細胞生理)

骨格筋では 2Mb を超える遺伝子長を持つ *Dystrophin* (*Dmd*) を初めとする超長鎖遺伝子がその構造・機能に重要である。しかし、これら超長鎖遺伝子の発現制御機構の詳細は未だ明らかにされていない。近年、長鎖遺伝子を高頻度で発現する神経系においてその転写伸長を支える特殊制御が見出されており、当研究室において RNA 結合タンパク質 *Sfpq* をそのコア分子の一つとして同定した。骨格筋での超長鎖遺伝子転写制御における *Sfpq* の役割と、その生理的意義を解明するため、骨格筋特異的 *Sfpq* 欠損 (*Sfpq*^{SM-KO}) マウスを作製し、解析した。

Sfpq の欠損により *Dmd* を含む多くの超長鎖遺伝子の有意な発現低下が認められた。さらにその表現型として筋重量・繊維径の著明な減少、寿命の著しい短縮、代謝性ミオパチーが観察された。表現型の分子解析のため、*Sfpq*^{SM-KO} マウス骨格筋由来の Primary myotubes を用いた大規模遺伝子発現解析により発現低下した遺伝子の機能解析をしたところ、エネルギー産生に関わる様々な代謝関連経路が有意に発現低下していた。このことから、*Sfpq* は骨格筋において、代謝関連遺伝子群の発現を包括的に制御していることが示唆された。以上により、骨格筋の成長や機能に必須な超長鎖遺伝子特有の制御が明らかとなった。

17 ニューロン分化における *Sbno1* 遺伝子の機能

○山本美葉、井之口文月、瀧公介、金田男人、勝山裕

滋賀医科大学・解剖学講座

統合失調症や認知症、精神遅滞などの精神疾患では神経繊維による連絡の低形成が原因の一つと考えられている。*Sbno1* はショウジョウバエで同定された *Strawberry Notch* (*Sbno*) 遺伝子の脊椎動物ホモログの一つであり、タンパク質の一次構造からは DNA/RNA ヘリカーゼに類似している。ヒトゲノム解析から *SBNO1* が精神疾患や正常な脳の発達に関与していることが示唆されている。

そこで、我々は脳の発生・発達における *Sbno1* の機能を明らかにするため、まず特異的抗体を作成しタンパク質発現を調べた。マウス大脳皮質発生過程では新生ニューロンで *Sbno1* タンパク質の発現が始まり、出生後もニューロン特異的に発現していることがわかった。*Sbno1* を受精卵から欠損させると、胚は着床前に致死となることから、新生ニューロンでノックアウトが起きる、*Sbno1* コンディショナルノックアウトマウス (cKO) を作成した。*Sbno1* cKO マウスは生後 3 週で明瞭な四肢の痙性麻痺を呈し、同じ母親マウスから生まれた仔の中からはっきりと区別できる。*Sbno1* cKO マウスの脳をクリューパーバレー (KB) 染色で組織観察すると、大脳皮質が薄くなり、ニューロンの密度が高くなっていった一方で、層構造は保存されていた。顕著な脳梁と内包の低形成も見られ、細胞体の間の空間が狭くなっていることから、*Sbno1* cKO マウスの大脳皮質ではニューロン繊維の低形成が生じていることが示唆された。

Sbno1 は神経繊維の成長に関与することで、精神疾患の原因遺伝子となる可能性が示された。(COI: なし)

18 発生過程における一次体性感覚野内の第 5 層神経細胞の軸索側枝伸展

林 由佳¹⁾、岡 雄一郎¹⁾²⁾、佐藤 真¹⁾²⁾

¹⁾ 大阪大学大学院医学系研究科 解剖学講座 (神経機能形態学)

²⁾ 大阪大学大学院連合小児発達学研究所 こころの発達神経科学講座 (分子生物遺伝学)

大脳皮質の神経細胞には領野間の神経回路を形成する cortico-cortical neuron がある。この神経細胞は各領野で受け取った感覚を他領野に受け渡すことで、情報を統合する役割を担う。先行研究から第 2/3 層と第 5 層の神経細胞が同側皮質内へ投射することが分かったが、それらが発生過程においてどのようなように形成されるかは明らかでない。本研究はマウス脳の一次体性感覚野にある第 5 層神経細胞を対象に、発生過程において領野間の神経回路がどのように形成していくかを調べた。第 5 層神経細胞に強く発現する遺伝子プロモータ制御下に GFP を発現するプラスミドを作製し、マウス大脳皮質に *in utero* electroporation により導入することで、一次体性感覚野内の cortico-cortical neuron を蛍光標識した。標識された神経細胞のトラッキングによって、同側皮質内に伸びる軸索は脳梁を通過して対側皮質へ伸びる軸索の軸索側枝であることが分かった。さらに、1 つの神経細胞から複数の軸索側枝が出芽するが、生後 3 日目では多くの側枝が同側の一次体性感覚野内に収まっているのに対して、内側かつ吻側へ伸びる軸索側枝は同側の一次運動野まで届いていることが分かった。これらの結果から、一次体性感覚野における第 5 層神経細胞の軸索側枝は投射先の領野によって伸展の様式が異なることが分かった。このことは大脳皮質内における情報統合回路の形成メカニズムの解明に繋がると考えられる。

19 延髄における神経幹細胞の特徴とその局在

古部瑛莉子¹・平塚大士¹・森田光洋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 神戸大学大学院・理学研究科

成体脳では海馬歯状回と側脳室下帯において神経幹細胞の存在が報告され、それぞれ記憶や嗅覚情報に関与することがわかっている。近年、これらの脳部位に加え、正中隆起・弓状核に存在する α -タニサイトが神経幹細胞であることが報告され、神経新生により摂食やエネルギー代謝を制御していることが判明した。我々は、延髄最後野の中心管に存在するタニサイト様細胞が神経幹細胞であることを証明したが、延髄における神経幹細胞の局在とその特徴についてはほとんど分かっていない。Nestin-CreERT2/CAG-CAT^{loxP/ProxP}-EGFP マウスとマーカータンパク質との免疫組織化学の結果より、EGFP 陽性のタニサイト様神経幹細胞が第 4 脳室から脊髄中心管にかけて広く存在しており、Sox2 及び Pax6 陽性で GFAP を発現している細胞も存在することが分かった。さらに、神経幹細胞の運命決定と移動先を調べたところ、新しい神経やアストロサイト、オリゴデンドロサイトが最後野及びその周辺の孤束核、10N、12N へ供給されていることが判明し、延髄中心管に神経幹細胞が恒常的に細胞供給を行っており、延髄での機能維持に関わっていることが示唆された。

20 発生期における動眼神経細胞の多様性

川野幸平、後藤仁志、野村真、小野勝彦
京都府立医科大学大学院 神経発生生物学

動眼神経は中脳腹側部で正中線を境に 1 対の細胞集団として存在する。発生期に一部の細胞体は正中線を越え、反対側に移動し交差性回路を形成することが知られている。また、この移動は、反発性軸索ガイダンス分子 Slit と受容体 Robo により早熟な移動を抑制されている。正中交差移動する細胞としない細胞で分子発現の違いがあると考えられるが、詳細は不明である。本研究は、発生段階での動眼神経細胞の多様性を調べる目的で、(1)DiI トラッカー法による移動細胞の同定、(2)動眼神経細胞の最終分裂時期と正中交差移動との関連、(3)移動細胞での Slit2 と Robo2 の発現を調べた。

その結果、動眼神経核の後部で E13~E14 の時期に正中交差移動が起こることがわかった。動眼神経細胞の最終分裂時期は主に E9-E10 であり、このうち後部の細胞は E10 に最終分裂を行う傾向にあった。これらの細胞が、主に正中交差移動を行うものと考えられる。Slit2 は E12 には正中部の底板細胞で発現していたが、E13 になると腹側正中部にある Islet1/2 陽性の移動細胞でも発現がみられた。受容体 Robo2 は、動眼神経核後部の外側部の細胞で発現していたが、正中交差移動している細胞では発現はみられなかった。以上の結果から、動眼神経核内でも、正中交差移動する細胞としない細胞とで、最終分裂時期や分子発現の違いが見出され、前後軸に沿った細胞の多様性が明らかとなった。

21 ヒト II 型若年性ネフロン癆モデルマウス *inv* を用いた腎尿管構築原理の解明

茂田 昌樹、金澤 洋隆、河村 翔平、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

腎尿管拡張を伴う嚢胞性腎疾患は、繊毛病 (Ciliopathy) の最も典型的な症状で、嚢胞腎での細胞増殖インデックスの増加から繊毛機能と細胞周期制御の関係が注目されてきた。しかしながら、この増殖インデックスが細胞周期長の変化によるのか、細胞運命決定の異常によるのかは明らかにされていない。ヒト II 型若年性ネフロン癆モデルマウス *inv* は、腎臓皮質でも嚢胞形成が認められ、この病態発症機構を解明することは、正常な腎尿管構築を解明することにも繋がる。

本研究では、この *inv* 変異体において、尿管上皮細胞の細胞周期の長さ (倍加時間) は影響を受けていないことがわかった。また尿管拡張の初期は、管を構成する細胞数の増加ではなく、細胞形態の変化によることも判明した。さらに、細胞の増殖異常 (BrdU 増加) には、尿管上皮ネクロシスを伴うことも明らかとなった。この嚢胞形成初期にみられる新たな細胞動態は、その数値モデル解析によっても支持され、生後マウス腎臓発生における尿管形成で細胞数を一定に保持するメカニズムの存在が示唆された。本発表では、マウス腎臓皮質迷路における尿管構築原理について考察したい。

22 マウスのミュラー管退行における AMH 作用様式

山本 杏¹⁾、表原拓也²⁾、三浦由佳¹⁾、川西航平¹⁾、長谷川千夏¹⁾、万谷洋平¹⁾、北川 浩¹⁾、横山俊史¹⁾、星 信彦¹⁾

¹⁾ 神戸大・院農・形態機能学、²⁾ 東京医大・人体構造学

【背景と目的】哺乳類の雄では、胎子期に精巣のセルトリ細胞で産生された抗ミュラー管ホルモン (AMH) の作用によってミュラー管が退行し、卵管・子宮・膈上部への分化が抑制される。しかしながら、当研究室の B6N 背景 Y^{POS} 系統の真性半陰陽マウスにおいては、精巣側ではミュラー管由来の器官が退行して認められない一方で、卵巣側には卵管・子宮が形成される。このことから、精巣から分泌された AMH は精巣側のみ作用していることが想定されたため、真性半陰陽個体のミュラー管退行について検索するとともに、AMH の作用様式を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】胎齢 13.5 または 14.5 日の B6N 野生型および真性半陰陽マウス胎子の性腺中腎複合体を用い、免疫組織化学およびウエスタンブロット法 (WB) により AMH の発現・分布を解析した。

【結果と考察】ミュラー管退行開始時期の真性半陰陽個体において、精巣側でのみ精巣索内に AMH の陽性ならびにミュラー管の退行が確認された。野生型では、精巣間質部に瀰漫性の AMH 陽性反応がみられ、さらに、精巣頭側部・中腎の境界領域および中腎頭側部内にも AMH 陽性反応が認められた。また、WB により中腎の尾側部と比較して頭側部で AMH が多く検出された。これらの結果に加え、ミュラー管が頭側から尾側方向に退行することも考慮すると、セルトリ細胞から分泌された AMH は、体液による全身循環ではなく、精巣の頭側部から中腎領域に浸潤する形で作用していると考えられた。

23 Ephrin-B1- and EphB2/B4-predominant expression compartments present alternately along the excurrent duct system in the adult mouse testis and epididymis

Md. Royhan Gofur, Kazushige Ogawa
Lab. Vet. Anat., Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.

Eph receptors and ephrin ligands are membrane-bound cell-cell communication molecules that regulate spatial organisations in various tissues and organs by repulsive or adhesive signals arising from contact between Eph- and ephrin-bearing cells. However, the expression and functions of Eph and ephrin in the testis and epididymis are virtually unknown. We detected several EphB receptors and ephrin-B ligands in the testis and epididymis of the adult mouse by RT-PCR amplification. Immunostaining showed complementary expression patterns in epithelia along the excurrent duct system in the testis and epididymis: ephrin-B1 was strongly expressed in epithelia of the rete testis and the segment I in the ductus epididymis while EphB2 and/or EphB4 were strongly expressed in those of the straight tubules and the efferent ductules. Moreover in the testis, ephrin-B1 was expressed in spermatogonia, Leydig cells and peritubular myoid cells. By contrast EphB2 was expressed in elongated spermatid and EphB4 was expressed spermatogonia and Leydig cells. Furthermore these receptors were found to be tyrosine phosphorylated in the testis and/or epididymis, suggesting that EphB/ephrin-B signalling might occur in seminiferous tubules as well as epithelial junctions among the straight tubules, the rete testis, the efferent ductules and the epididymal duct. Based on these findings, we propose that EphB/ephrin-B signalling may regulate epithelial boundary formation in the excurrent tubule/ductule/duct system as well as modulate spermatogenesis and spermiation.

24 転写因子 KLF4 はヘッジホッグシグナリングを制御することで骨芽細胞分化を抑制する

阿部真土、竹内優斗、鬼頭昭吉、脇坂聡
大阪大学大学院歯学研究科 口腔解剖学第一教室

Kruppel Like Factor 4 (KLF4) は骨芽細胞分化を抑制することが報告されているが、その機序はいまだ不明である。今回、骨芽細胞の分化に必須の細胞膜構造である一次線毛の形成や維持に KLF4 が関与するか検討したところ、培養骨芽細胞で KLF4 により一次線毛を持つ細胞の割合が有意に増加した。この時 Gli1 の発現は KLF4 により減弱していたため、ヘッジホッグシグナル経路は抑制されていることが示唆された。そこでヘッジホッグシグナル経路のアゴニストを添加すると、KLF4 による骨芽細胞分化の抑制は濃度依存的に解除された。次に KLF4 が培養骨芽細胞で誘導する因子を検討した結果、タンパク質のトランスサイトosisに関わる MAL、MAL2 が見出された。骨芽細胞におけるヘッジホッグシグナル依存的な転写活性は MAL、MAL2 いずれにおいても抑制された。以上の結果から、KLF4 の骨芽細胞分化の抑制の機序として、MAL ファミリー分子によるヘッジホッグシグナルの抑制が一因であると考えられた。

25 ニワトリ胚心筋凍結傷害モデルの修復過程

馴松 麻悠、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

ヒトの心筋細胞は傷害を受け壊死すると再生しない。近年、ゼブラフィッシュや新生仔マウスは心筋再生能力を持っていることが明らかになったが、胚子期の心筋傷害修復過程については未知である。本研究の目的は、ニワトリ胚を用いて心筋傷害修復過程を明らかにすることである。心外膜形成前の原始心室心尖部に凍結傷害を与え胚心筋凍結傷害モデルを作製した。傷害部位の経過を調べるために HE 染色、蛍光免疫染色をおこなった。傷害部位は内皮細胞、間葉細胞、心外膜によってふさがれ、未熟な心筋細胞は検出されなかった。さらに残存心筋の細胞増殖を調べるために蛍光免疫染色で心筋細胞の細胞周期を調べた。凍結傷害群では傷害 5 時間後の S 期の心筋細胞が減少し、G1/S 期を制御するサイクリン E-CDK2 のインヒビターである p27 が有意に増加していた。以上の結果から、胚心筋傷害の修復過程はゼブラフィッシュや新生仔マウスとは異なり、積極的な心筋細胞の幼若化と増殖は起こらないと示唆された。

26 がん抑制遺伝子 REIC/Dkk3 の生体内における性質

井上 順治¹、公文 裕巳²、大内 淑代³、近藤 洋一³
1.大阪医科大学 解剖学教室
2.新見公立大学
3.岡山大学 細胞組織学教室

Reduced expression in immortalized cell(REIC) 遺伝子は正常細胞では発現しているが、ほぼ全てのがん細胞で発現が消失している。そこで、担がんマウスに対し REIC を強制発現させたところ、がんが消失した。この結果から、REIC の抗がん遺伝子としての性質が注目され、現在ヒトに対する REIC を用いた抗がん薬剤の創薬が進められており、岡山大学で行われている様々ながんに対する REIC 抗がん薬剤の臨床前試験では、*in vitro*、*in vivo* ともに REIC 遺伝子治療薬剤は、がんを抑制する働きがあることが示されている。

一方 REIC はこの遺伝子のがん治療現場での呼び名であり、生物学的には *Dickopf3(Dkk3)* と呼ばれている。*Dkk3* にはがん抑制遺伝子としての機能はあるが、生体内でどのような機能を有しているかについてはほとんど分かっていない。そこで我々は、生体内 *Dkk3* の機能解析の基礎として、生体マウスの各器官系の組織における発現パターンを解析し、*Dkk3* はマウスの消化器、内分泌組織、神経組織、リンパ性器官、生殖器官において、組織特異的に発現していることを示した。また生体内において、*Dkk3* タンパク質は組織によって異なる糖修飾を受けていることが明らかとなり、さらに *Dkk3* タンパク質は血中や消化管内、脳脊髄液内に分泌されている性質があることが示唆された。

27 霊長類の生態と手指の形態及び機能の関連性

玉川俊広^{1,7}、椎野顕彦²、目良裕³、重蔵憲治⁴、日野広大¹、木村智子¹、内村康寛¹、本間智⁵、江木直子⁶、宇田川潤¹
滋賀医大¹解剖²神経難病研究センター³生命科学⁴マルチメディアセンター、⁵京大・解剖、⁶京大・霊長研、⁷甲賀健康医療専門学校

【背景・目的】動物の指骨の構造は、その機能に適した形態に進化してきたと考えられる。本研究では、樹上性のテナガザル・クモザルおよび地上性のヒヒの標本から棒把握時及びぶら下がり時の関節トルクを計算・比較することによって、手指の構造と把握機能との関連を調べた。

【方法】テナガザル・クモザル・ヒヒの前肢標本を解剖し、浅・深指屈筋を牽引して棒を把握させ、4.7T MR 装置で撮影した。把握時の指屈筋のモーメントアーム長や関節中心間距離・関節角度を求め、物体把持やぶら下がり時に必要な屈筋の牽引力 (Fm) を計算し、一般推定化方程式を用いて種間で比較を行った。

【結果】Fm は棒把握時及びぶら下がり時、すべての種において指の屈曲と共に減少し、その傾向は PIP 関節より MCP 関節で著明であった。

MCP・PIP 関節において、Fm 値はテナガザルよりヒヒで小さいが、指の屈曲と共にテナガザルの MCP 関節の Fm 値が急激に小さくなることが分かった。

【考察】ヒヒでは把握時・ぶら下がり時に MCP・PIP 関節共にトルクを発生しやすい構造となっていた。一方、テナガザルでは関節の構造として負担は大きい、MCP 関節では屈曲角度の上昇と共にトルクを発生しやすくなることや体重が軽いことぶら下がりなど樹上生活に適応していると考えられる。

(COI: なし)