

日本解剖学会

第73回中国・四国支部学術集会

会 期：平成30年10月20日（土）、21日（日）

会 場：徳島大学蔵本キャンパス長井記念ホール

特別講演

徳島大学所蔵古人骨の研究とこれから
端野晋平（徳島大学埋蔵文化財調査室）

2016年5月より、徳島大学埋蔵文化財調査室では幸運にも、徳島県・愛媛県などの古墳時代～近世の遺跡から出土した古人骨資料を所蔵することとなった。これらの資料はもともと、本学医学部解剖学第1講座（現・顕微解剖学分野）が調査・保管していたものであり、考古学をはじめとする歴史科学、あるいは自然人類学にとって、きわめて学術的価値の高いものである。本報告では、まず演者の解剖学との接点を交えつつ、演者が日ごろ、取り組んでいる考古学、埋蔵文化財の調査研究を紹介する。つづいて、そうしたなかで演者らが行った常三島遺跡の近世火葬墓に関する研究成果を報告する。この研究では、人骨の保存状態がさほど良くなかったにもかかわらず、人骨の出土状態、人骨自体の詳細な観察、炭素14年代測定によって、埋葬のプロセス、埋葬姿勢、火葬のあり方、被葬者の性別・年齢、埋葬の年代といった多くの事実が明らかとなった。そして、常三島という武家屋敷地区のこの場所に、なぜこの人物が埋葬されたのかという疑問が浮かび上がることとなった。最後に現在、九州大学アジア埋蔵文化財研究センターとの共同で準備を進めている、徳島県吉野川流域出土人骨に関する研究の現状と展望について述べる。同センターでは、人骨歯牙を用いたストロンチウム同位体比分析によって、過去の人の移動にかんする研究が行われており、群馬県金井東裏遺跡の甲冑人骨などの例において、すでに成果をあげている。そこで演者らは、同様の方法を用いて、徳島県に所在する5～6世紀の古墳から出土した人骨を素材として、古墳時代における人の移動や通商圏を解明できないかと考えている。幸いにも、これらの人骨が出土した古墳は、地質環境の異なる吉野川の北岸と南岸の二つに分かれて分布しており、ストロンチウム同位体比分析を行ううえで好条件をそなえているといえる。現在、その準備作業として、出土状態、性別判定・年齢推定、形態についての再検討を行っており、さらに炭素14年代測定も行う予定である。考古学界において、古墳時代は首長制社会から国家成立へ至るまでの過渡期に位置づけられ、社会がどのように変化していったのかについては、これまでも豊富な議論が交わされてきた。古墳とそこから出土した人骨は、こうしたことを議論するのに最適な素材であり、地域社会における統合のあり方とその特質を解明する手がかりになるのではないかと期待に胸を膨らませている。

1 多機能有機シリナノ粒子を用いたメソスコピック・マルチモーダルイメージング

○中村 教素
山口大学大学院医学系研究科器官解剖学講座

我々は蛍光イメージングとMagnetic resonance imaging (MRI)の同時観察が可能な多機能有機シリカナノ粒子を作製し、マルチモーダルイメージングを行った。ナノ粒子は経静脈投与により肝臓の正常組織に存在するマクロファージに取り込まれ、肝がんの造影剤として応用できる。多機能有機シリカナノ粒子を肝がん発症モデルであるLong-Evans Cinnamon (LEC) ラットに経静脈投与を行った。MRIで観察したところ、肝臓に腫瘍像が観察できた。次に肝臓を実体蛍光顕微鏡で観察した。マクロ観察とミクロ観察との中間的な領域(メソスコピック)で観察したところ、正常ラットでは肝臓の正常の組織構造を反映し、肝小葉の多角形像の所見が観察できた。LECラットでは所見が正常の構造とは全く異なっていた。MRIと蛍光イメージングによるメソスコピックにおける相関観察を行ったところ、腫瘍組織によっては腫瘍辺縁部に粒子を含有した細胞が集積し、MRIの腫瘍像の大きさに影響を与えることが示唆された。組織切片を作製し、蛍光観察とH.E.染色による観察を行った。正常部位と病変部位における蛍光を示す粒子含有細胞の分布の違いが観察できた。多機能有機シリナノ粒子によりMRIと蛍光イメージングの相関観察や、マクロからメソスコピック、ミクロ観察への連続的な観察が可能であることが示された。

2 下肢リンパ系の解剖研究—近赤外イメージングを用いて—

○品岡 玲^{1,2}、越宗 靖二郎²、木股 敬裕²、大塚 愛二¹
1、岡山大学 人体構成学
2、岡山大学 形成再建外科学

【目的】リンパ浮腫はリンパの慢性的な鬱滞である。確実な診断のためにはリンパ管造影法を行い、解剖学的な変化を鋭敏かつ詳細に捉えることが重要である。しかしながら、リンパ系の解剖学的な情報が少ないため、リンパ管造影法の注射部位・読影法は定まっていないのが現状である。今回、我々は多数のご遺体を用いた下肢リンパ系の解剖研究を行い、下肢リンパ系の分類を、特に起始部に着目し行ったので報告する【方法】遺体100肢に対してジエグノグリン（以下、ICG）リンパ管造影を施行した。足部全体に解剖学的 landmark に基づいた注射部位を19箇所設定し、下肢末梢から始まるリンパルートを描出した。それを走行に応じて分類した。またそれぞれのルートの起始の mapping を注射部位に基づき作成した。この情報を元に全てのリンパルートを造影しうる注射部位の組み合わせを決定した。【結果】下肢末梢から始まるリンパルートは4つに分類することができ、そのルート分類に応じたリンパルート起始部の mapping を作成することができた。それらを元にルート全てを高確率で造影できる注射部位の組み合わせを定めることができた。【結論】複雑に見えたリンパ系解剖は、起始部のエリア、ルートごとの走行ごとに綺麗に分類することが可能であった。このリンパ管の解剖情報は、リンパ管造影法時の注射法を標準化し、それは正確かつ鋭敏にリンパ浮腫を検出することを可能にすると考えられる。

3 細胞骨格微小管の翻訳後修飾と線毛に関するイメージング研究

池上浩司
広島大学大学院医歯薬保健学研究所（医）解剖学及び発生生物学

神経細胞や線毛に存在するチューブリンはポリグルタミン酸化というユニークな翻訳後修飾を受ける。ポリグルタミン酸化修飾酵素の一つ TLL1 (Tubulin tyrosine ligase-like 1) のノックアウトマウスでは、気管線毛の恒常的の屈曲が減少するとともに、線毛運動の非対称性（有効打と回復打の区別）が減少していた。線毛運動非対称性の減少に伴い、Tull1 ノックアウトマウスの気管では粘液線毛輸送機能が減弱し、鼻腔および副鼻腔に顕著な粘液の貯留が見られた。これらのことから、線毛軸糸を構成するチューブリンのポリグルタミン酸化が線毛の非対称な構造と運動機能に必須であることが明らかとなった。

ヒトを含む哺乳動物のからだを構成するほとんど全ての細胞には一次線毛と呼ばれる運動能を持たない線毛が一本ずつ生えている。一次線毛は細胞外のホルモンや成長因子を受容する“ケモセンサー”あるいは細胞外の水流を感知する“メカノセンサー”として機能すると考えられている。一次線毛の構造的機能的な異常は、網膜変性、多発性嚢胞腎、多指症など、全身の器官形成が異常になる原因となることが明らかになっている。一次線毛は細胞周期に応じて形成、伸長、縮退、消失を繰り返すダイナミックな細胞小器官である。私たちは一次線毛の動態についてタイムラプスイメージング解析を行い、一次線毛の先端が刺激に応じて切断され、細胞外に放出される現象を発見した。さらに、一次線毛先端の切断放出を阻害することで、一次線毛の退縮と細胞周期の再開が抑制されることを見出した。これらのことから、一次線毛先端の切断放出が線毛縮退と、その後起こる細胞周期の再開の引き金になっていることが明らかとなった。

4 骨格形成におけるレチノイン酸レセプターシグナルの機能の検討

○住谷 友佑^{1,2}、内部 健太¹、池亀 美華¹、上岡 寛²、岡村 裕彦¹
1)岡山大学大学院医歯薬総合研究科 口腔形態学分野
2)岡山大学大学院医歯薬総合研究科 歯科矯正学分野

【背景、目的】ビタミンAの代謝産物であるレチノイン酸は、核内受容体として知られるレチノイン酸レセプターによりシグナルが伝達され、多くの生物学的現象を制御する。ビタミンAはその過剰摂取や欠乏により骨格に異常をきたすことが知られているが、詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで本研究は、レチノイン酸シグナルの骨格系組織における機能の解析を目的とした。

【方法】各レチノイン酸レセプターに対するアゴニスト、アンタゴニストを用いて、その骨格系組織に対する影響を、in vitro、in vivo で解析した。

【結果】アゴニストを用いた実験では、レチノイン酸シグナルは骨格形成に抑制的に作用することがわかった。特にレチノイン酸レセプターの一つであるRAR γ は、その作用の促進により骨格成長を強力に阻害することが明らかとなった。一方でRAR α 、 β の作用は、RAR γ と比較すると大きくないことがわかった。

【考察】骨格形成、特に軟骨形成においてはRAR γ が優位なレセプターであることがわかり、多くの骨格系疾患に対して治療ターゲットとなりうることを示唆された。

5 内性石灰化抑制因子 ASARM とその臨床応用の可能性

○利重匡亮¹, 南崎朋子¹, Faisal Ahmed¹, 櫻井 薫², 香西克之², 吉子裕二¹

広島大学大学院医歯薬保・¹硬組織代謝生物学・²小児歯科学

我々は、骨芽細胞に特異的に発現するエンドペプチダーゼ PHEX がリン代謝調節経路 Klotho-FGF23 の下流エフェクターであることを報告した。また、Klotho 欠損マウスの骨組織において、多量の ASARM ペプチドが蓄積されることを見出した。骨基質タンパク MEPE のプロセシングにより産生される ASARM はアパタイトと高い結合親和性を持つことが報告されている。Klotho 欠損マウスが低石灰化骨を呈することから、ASARM は内性石灰化抑制因子と推察される。ASARM 由来する様々なペプチドを合成し、培養骨芽細胞による骨形成モデルを用いて活性中心を確認したところ、配列中の 2カ所の Ser のリン酸化 (pASARM) が石灰化抑制に必須であった。また、N 末端領域に複数の PHEX 切断部位を認め、PHEX は pASARM を失活させることが判明した。マウス胸部大動脈の器官培養において、pASARM は高リン負荷による石灰化にも抑制効果を示した。この作用はアパタイトの結晶成長阻害のみならず、細胞外基質に応答するシグナル伝達の抑制が関与するものと示唆された。pASARM を正常マウスに持続投与したところ、血中カルシウム・リン濃度、各種骨パラメーターはいずれも正常レベルであったが、血管石灰化モデルにおいて異所性石灰化を抑制した。以上の結果から、pASARM をリード化合物とする新規の石灰化抑制剤の開発が期待される。

6 キンギョのウロコにおけるスクレロステチンの発現局在

○池亀美華¹, 北村敬一郎², 服部淳彦³, 鈴木信雄⁴, 内部健太¹, 岡村裕彦¹
¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔形態学分野, ²金沢大学 医薬保健研究域・保健学系・病態検査学講座, ³東京医科歯科大・教養部・生物学教室, ⁴金沢大・環日本海域環境研究センター・臨海実験施設

キンギョのウロコには骨組織と同様の石灰化基質、骨芽細胞、破骨細胞が存在する。しかし骨細胞の存在についてはよくわかっていない。そこで、ウロコにおける、骨細胞に特異的なタンパク質であるスクレロステチンの発現について検討した。材料としてキンギョの原生ウロコあるいは再生ウロコを用いた。抜去したウロコから RNA を抽出し、qPCR によってスクレロステチン遺伝子 (Sost) の検出を試みた。また、抜去ウロコを固定後、ホルマリン固定、あるいは凍結切片上で、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) ならびに免疫組織化学 (IHC) により、Sost ならびにスクレロステチンの組織内局在を検討した。qPCR の結果、ウロコにおいて Sost が検出され、ISH により Sost の発現は石灰化層の隆起線に沿って配列する細胞に検出された。また、ウロコの再生過程において、Sost は、溝条中の細胞、中央部で石灰化基質に半埋伏した、あるいは表層を覆う細胞、線維層表面の線維芽細胞様細胞の一部にも発現されており、再生日数が進むにつれて、その発現細胞数は減少した。IHC によってもほぼ同様の細胞にスクレロステチンの免疫活性が認められた。キンギョのウロコには骨細胞のような形態を示す細胞は観察されないが、石灰化基質表面の一部の細胞がスクレロステチンを発現しており、また再生過程においてより多くの細胞で発現されることが示された。今後、ウロコにおけるスクレロステチンの機能について検討する必要があると考えられる。

7 PP2A is involved in chondrogenic differentiation

○Weng Yao¹, Guo Jiajie¹, 吉田賀弥², 内部健太¹, 池亀美華¹, 岡村裕彦¹
¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔形態学分野
²徳島大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔保健教育学分野

Background: Serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) plays key roles in a variety of physiological processes such as cell cycle, growth, apoptosis, and signal transduction. However, its role in chondrogenesis remains to be revealed. **Objective:** In this study, we investigated the role of PP2A in chondrocyte differentiation. **Methods:** The expression of PP2A in cartilage was determined by immunohistochemistry. Pre-chondrocyte ATDC5 cells were cultured in the chondrocyte differentiation medium with Okadaic acid (OA; the inhibitor of PP2A) and monitored their morphological change by a phase contrast microscope. The expression level of ColXa1 mRNA were examined by qPCR. In addition, the deposition amount of extra-cellular matrix was detected using alcian blue staining. **Results:** PP2A expression was observed in chondrocytes in cartilage. Treatment of 5 nM OA induced hypertrophic morphological change and significantly increased ColXa1 expression in ATDC5 cells. The intensity of alcian blue staining slightly increased in 1 nM OA-treated ATDC5 cells, whereas the intensity decreased in 5 nM OA-treated cells. **Conclusion:** Our results suggest that PP2A is involved in chondrogenic differentiation of chondrocyte progenitor cells.

8 マクロファージによる器官再生の促進：昆虫の脚再生をモデルとして

○板東哲哉¹, 奥村美紗², 坂東優希², 萩原万優子², 濱田良真¹, 大内淑代¹
(¹岡山大学・院・医・細胞組織学, ²岡山大学・院・医)

ヒトやマウスは再生能が乏しいが、両生類や昆虫には四肢を切断しても完全に再生できる動物が存在する。我々は、器官再生を制御する普遍的な分子メカニズムを解明するため、不完全変態昆虫フタホシコオロギを用いて研究を行っている。コオロギ幼虫の脚を切断すると、創傷治癒に続いて再生芽が形成され、位置情報に従って、失われた部分が再パターンニングによって付加的に再生される。以上のような再生プロセスは多くの再生可能生物に共通しているが、創傷治癒から再生芽形成に至る分子メカニズムには未解明な点が多い。再生過程で発現が変化する遺伝子を RNA-seq により網羅的に解析したところ、再生脚において自然免疫にはたらく Toll-like receptor (TLR) シグナル因子の発現が上昇していた。TLR シグナル因子を機能低下させると、サイトカインの発現、細胞の増殖、傷口へのマクロファージの遊走が低下し、再生能が低下した。またマクロファージを枯渇させた個体では、TLR シグナル因子、サイトカイン、Jak/STAT シグナル因子の発現が低下して再生芽の形成が抑制され、再生が阻害された。感染性微生物の認識にはたらく分子群を機能低下させても再生能は変化しなかったことから、切断によって傷害された細胞に由来する DAMPs がマクロファージに分布する TLR シグナルを活性化することで、器官再生の開始が促されると考えられた。(COI: なし)

9 マクロファージ由来のエクソソームによって運ばれる歯周病原菌因子の動態

○岡村裕彦¹, Guo Jiajie^{1,2}, Weng Yao¹, 内部健太¹, 池亀美華¹, 吉田賀弥³
¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔形態学分野
²中国医科大学附属口腔医院・牙体牙髓病科
³徳島大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔保健教育学

主に疫学的研究により歯周病が糖尿病などの生活習慣病や他臓器の疾患に関与することが明らかになってきた。しかし、その機序については、未だ明確な科学的根拠が乏しく、さらなる分子生物学的アプローチによるメカニズムの解明が必要である。今回、『歯周病原菌が感染したマクロファージ由来のエクソソーム』に着目し、その内容や体内動態について解析を行った。

ヒト単球 THP-1 細胞に歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 菌を感染させたところ、Pg 菌は細胞内に侵入し、48 時間後も生存していた。この Pg 菌感染 THP-1 細胞から放出されたエクソソームを回収し、内容物を質量分析で解析したところ、菌固有のプロテアーゼである gingipain を含む病原因子や THP-1 細胞由来のヒストン蛋白などが含まれていた。エクソソームの体内動態を調べるため、蛍光標識し、マウスに投与したところ、肝臓および脳に強いシグナルを検出した。さらに、このエクソソームを培養肝細胞 HepG2 に作用させたところ、インスリンに反応したグルコースの取り込みに重要な因子である Akt の活性が低下した。

以上の結果から、Pg 菌は宿主細胞のエクソソームを介して病原因子を遠隔臓器に到達させ、細胞障害を誘導すると考えられる。

10 人体解剖見学実習における上級生学修支援アドバイザーの活用

○津森登志子¹, 加藤洋司¹, 佐藤勇太², 高宮尚美², 金指美帆², 岡村和典²
県立広島大学保健福祉学部看護学科¹
県立広島大学保健福祉学部理学療法学科²

県立広島大学は平成 26 年度文部科学省「大学教育再生加速プログラム」に採択され、授業改善と教育方法の充実・転換を目指したアクティブ・ラーニングを全学的に推進している。本プログラムではアクティブラーナーとして学生の中から「学修支援アドバイザー (SA)」を養成し、様々な授業内・外支援に活用している。本発表では、保健福祉学部理学・作業療法学科 2 年次前期開講の解剖学実習での SA 活用例について報告する。本学の解剖学実習では、広島大学医学部解剖センターにおける人体解剖見学実習の一環として夏休み期間中に実施している。この見学実習では基本的に教員主導による説明は行わず、学生は事前に個別の学修目標を立て、必要な学修資料を作成し、当日は自らの計画に従って解剖標本の観察を主体的に行うというスタイルを貫いている。今年度は本科目受講者 63 人に対し、昨年度も SA として参加した理学療法学科 4 年生 8 人と今年度初めて SA 登録した同学科 3 年生 7 人が加わった。事後アンケートの結果から、SA は事前準備 (学修) を行って参加し、当日も積極的に活動していたことが明らかになった。また、SA として初めて従事した 3 年生は、2 年目 (4 年生) の学生とともに学修支援活動をすることにより、事前準備状況や SA としての実働内容を自分自身と比較しながら振り返りを行うことができていた。一方 2 年生は、見学実習経験者の上級生が SA になることについては全員が肯定的にとらえていたが、当日の SA との関わり方や、来年度自分自身が SA として解剖見学実習で活動してみたいかという希望については、両学科間で異なる傾向が認められた。

11 STB/HAP1のユビキチン-プロテアソーム系阻害型細胞死に対する特異的神経細胞保護効果

山口大学大学院医学系研究科 神経解剖学講座

○篠田 晃, 藤永竜太郎, ナビュール・イスラム, 升本宏平, 宮本隼吾, 柳井章江

斑点小体 stigmoid body (STB)は huntingtin-associated protein 1 (HAP1)の発現局在を示す神経細胞質封入体(STB/HAP1)で、視床下部・辺縁系領域に広く分布する。一方でハンチントン病や脊髄球筋萎縮症(SBMA)などの神経変性疾患の標的部である大脳基底核, 視床, 大脳新皮質, 小脳, 運動ニューロン等にはあまり発現せず, STB/HAP1には細胞保護効果があるのではないかと推察され, *in vitro*の実験からもこれを支持する証拠が得られている。今回, 我々はアポトーシス抑制効果・保護効果が *in vitro*で少なくともユビキチン-プロテアソーム阻害型の細胞死に特異的に発揮されることを明らかにした。さらに HAP1-KOマウスの脳を用い, *in vivo*でもユビキチン-プロテアソーム阻害剤による細胞死を抑制していること明らかにした。このことは, STB/HAP1がミスフォールドタンパク質のユビキチン-プロテアソーム系処理を強化あるいはサポートし, 細胞死の閾値を上昇させているものと考えられる。今回は HAP1-Tgマウスにおけるデータも紹介し, STB/HAP1のストレス特異的細胞保護効果のメカニズムについてさらに考察する。

12 Effect of N-Acyl Homoserine Lactone (AHL) on Differentiation and Apoptosis in Osteoblastic MC3T3 Cells

○岡村裕彦¹, Guo Jiajie^{1,2}, Weng Yao¹, Qiu Lihong², 吉田賀弥³, 内部健太¹, 池亀美華¹

¹ 岡山大学・大学院医歯薬総合研究科・口腔形態学分野

² 中国医科大学附属口腔医院・牙体牙髓病科

³ 徳島大学・大学院医歯薬学研究所・口腔保健教育学分野

Gram-negative bacteria are the main pathogens of periodontal disease or apical periodontitis. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), is a gram-negative opportunistic pathogen highly detected in the subgingival biofilm and epithelial cells derived from the patients with periodontitis. Numerous gram-negative bacteria isolated from the oral environment can secrete quorum sensing (QS) signaling molecules, named N-acyl homoserine lactone (AHL), to regulate the production of their virulence factors. Among these AHL, N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (C12-HSL) is produced by *P. aeruginosa*. However, whether C12-HSL is involved in the bone destruction during the development of periodontitis is still unknown.

In this study, we investigated the effects of C12-HSL on differentiation and apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. C12-HSL suppressed alkaline phosphatase (ALP) activity and osteoblast differentiation in a dose-dependent manner. C12-HSL also decreased the expression of bone-related genes including runt-related transcription factor 2 (Runx2), bone sialoprotein (Bsp), and osteocalcin (OCN) in MC3T3-E1 cells. Western blot analysis revealed that C12-HSL induced the activation of Caspase-3 and the cleavage of PARP. The number of TUNEL-positive apoptotic cells increased in the cells treated with C12-HSL. These results demonstrate that C12-HSL inhibits osteoblast differentiation by promoting apoptosis.

13 教員を対象とした組織学実習ならびに中高校生を対象とした組織学実習を实践して

○洲崎悦子¹, 隅田寛², 石村和敬³, 山内宗治⁴, 青山裕彦², 川崎知子¹, 前田恵子¹ ¹ 就実大学薬学部, ² 広島国際大学保健医療学部, ³ 広島女学院大学人間生活学部, ⁴ 広島県立教育センター

「人体に関する知識基盤の向上を目指した実習の提案」という研究課題(H29-30)のもと、今年度は薬学・高校理科教員を対象とした組織学実習を8月18日に実施した。また同じセットを活用して、「ひらめき☆きらめきサイエンス〜よく知っている臓器を顕微鏡で見よう!」という中高校生を対象とした実習を8月20日に実施した。

教員を対象とした実習では、薬学教員1名、高校教員11名の参加を得て、午前3時に実習講義(1.5hr)、懇親会を兼ねた昼食、午後14時に染色と標本の自由観察(2.5hr)を行った。参加者のうち10名は初めての経験であった。また2名は、昨年度のマクロ的実習にも参加した高校教員であった。どの教員も目的意識をもって臨んでいた。これまでの知識を実感の伴った理解にすることができ、また撮影した組織像を利用して今後の授業で活用していくとのことで、早速に文化祭で印刷して展示をしたという報告もあった。昨年度のマクロ的実習と比べて、場所や対象の制限なく実施ができ、参加者全員が、また参加したい、同僚にも勧めたいという参加しやすい有効な実習であることがわかる。一方で、薬学領域からは、昨年度は11名に対して今年度は1名という参加であり、組織学実習への関心が低いと考えられる。

中高校生を対象とした実習では、中学生11名、高校生6名の参加があり、生徒自身でHE染色した標本を観察・撮影した組織像を印刷してオリジナルシートを作製した。ほとんどの参加者がとても面白く、わかりやすく、科学への興味を非常に湧いたこととあり、若い人達への組織学実習も有意義であると考えられる。

14 Therapeutic implication of an 18-mer peptide derived from prosaposin in a chicken model of neural tube defects

○Md. Sakirul Islam Khan, 鍋加浩明, Farzana Islam, 下川哲哉, 山宮公子, 土居原拓也, 松田正司

愛媛大学大学院医学系研究科 解剖学・発生学講座

Closure of the neural tube during embryogenesis is a crucial step in development of central nervous system. Failure of this process results neural tube defects (NTD) including spina bifida aperta (SBA) that causing lifelong neurological disorders. *In utero* small molecule-based therapies for NTD may be of interest due its possible impact on maintaining normal environment of the developing fetus. This study is aimed to assess the role of a prosaposin derived 18-mer peptide (PS18), which has shown protective potentiality in progressive neurodegenerative diseases, in a neural tube surgery-induced chicken model of SBA. The findings showed that *in ovo* treatment with a single dose of PS18 almost completely restored the injured neural tube. In addition, PS18 significantly reduced the open wounds in the lumbosacral region and preserved the spinal tissue area. These outcomes expose the possibility of using PS18 as a promising therapeutic agent for congenital diseases such as SBA.

15 Histological analysis of the smooth muscle cell layers and epithelial lumen in the mouse developing duodenum

○Jahan Nusrat¹, 松本 暁洋¹, Jahan Esrat¹, Regassa Dereje Getachew¹, 小川典子¹, Rafiq Ashiq Mahmood², 平野 了¹, 大谷 浩¹

¹ 島根大学医学部解剖学講座発生生物学, ² 島根大学戦略的研究推進センター 先天異常総合解析プロジェクトセンター

The mechanism of the development of smooth muscle (SM) layer, epithelium, and mesenchyme of the gut during embryogenesis is important to understand whole gut development. The SM layer, which develops from mesenchyme, consists of the inner circular (IC) and outer longitudinal (OL) layers and has been shown to play important roles in villi formation. We here analyzed development of the SM layers and epithelial lumen angle and orientation against the mesentery of the duodenum in C57BL/6 mouse embryos at embryonic day (E) 13.5, 15.5, 17.5 (each day, n=3) by histomorphometry. IC layers were arranged in 2-3 layers at E13.5, at E15.5 mostly 2 layers and better organized than at E13.5, and at E17.5 well organized 3-4 layers. Number of IC layers showed a regional difference related to the mesentery, larger at the mesentery axis than at the vertical-to-mesentery axis. OL layer first appeared at E15.5. These findings on SM layer in the duodenum suggest difference from those of our previous study on ileocecal junction. The epithelial luminal axis showed a general clockwise rotation against the mesentery along the longitudinal axis of the duodenum. The present findings suggest regional differences in development of SM layer and epithelium and their possible relationship with the macroscopic morphogenesis of the duodenum.

16 心臓における刺激伝導系前駆細胞の系譜解析

○坂口 あかね¹, 小久保 博樹², 安島 理恵子³・相賀 裕美子³

¹ 理化学研究所 生命機能科学研究センター 心臓再生研究チーム

² 広島大学 心臓血管生理医学教室 ³ 国立遺伝学研究所 発生工学研究室

心臓の刺激伝導系の前駆細胞は、胎生(E)9.5日頃に観察される静脈洞原基において *Hcn4* を発現する細胞として知られているが、それ以前の発生段階においては前駆細胞を特異的に標識する遺伝子が同定されていないため、その発生過程については未だ不明な点が多い。

これまでに我々は、E6.5日頃の前腸陥入時に形成される中胚葉で一過的に発現する *Mespl* 遺伝子を発現した細胞の系譜は主に心血管系へと寄与するが、刺激伝導系の細胞には分化しないことを明らかにした。またその一方で、Wntシグナルの阻害因子である *Sfrp5* 遺伝子が、E7.5日頃に形成される心臓原基から静脈洞原基へと継続して発現することを明らかにした。今回、刺激伝導系に寄与する細胞系譜には特異性があることに着目し、Cre, Dre 二種類の相同組み換えシステムを用いた二重系譜追跡を行った。その結果、刺激伝導系の前駆細胞は、静脈洞原基形成以前から識別できることが示された。この結果に基づき、刺激伝導系の発生過程について議論したい。

17 ヒトがん細胞で発現する OCT4 転写・翻訳産物の同定と機能解析

○小阪美津子¹、水野伸彦¹、宮本朋幸^{1,2}、藤谷陽子¹、大塚愛二¹
 1 岡山大学・医・人体構成
 2 九州保健福祉大学・生命医科

ヒト体性組織由来がん細胞における転写調節因子 *octamer-binding transcription factor 4A (OCT4A, POU5f1, OCT3/4A)* 遺伝子の発現については多くの報告があるものの、検出方法の非特異性が指摘されており、その真偽は長年不明であった。

最近、私たちは偽陽性を確実に排除しうる方法を開発し、多種類のヒト体性組織由来がん細胞株で既知の転写産物 (*OCT 4A, B, BI*) に加えて5種の新規バリエーションが存在するのに対し、正常組織由来分化細胞株ではそのほとんどが転写されていないことを結論付けた。さらに、その発現は培養ヒトがん細胞のごく少数に確認され、*OCT4* 発現細胞を特異的に死滅させると、がん細胞の移動能およびマトリゲル浸潤能が顕著に抑制されたことから悪性度への関与が示唆された*。

現在、ヒトがん細胞における内在性 OCT4 タンパク質の同定とその機能解析を進めており、上記の内容と併せて紹介する。

*STEM CELLS, 36(9):1341-1354, September 2018

18 FOXO1 転写因子による尾の真皮における発達期リンパ管新生の制御

○新美 健太¹⁾、稲垣 忍²⁾、古山 達雄¹⁾

1) 香川県立保健医療大学教養部
 2) 大阪行岡医療大学医療学部理学療法学科
 リンパ管新生は個体の発生過程において重要な現象であるが、その分子機構については不明な点が多い。今回我々はリンパ管内皮細胞に豊富に発現するフォークヘッド転写因子 FOXO1 が発達期の皮膚のリンパ管新生に及ぼす影響について、タモキシフェン誘導性内皮細胞特異的 FOXO1 ノックアウトマウスを用いて解析を試みた。生後のリンパ管新生の観察には尾の真皮を用いた。最初にリンパ管マーカーを用いた免疫組織化学により野生型マウスの尾の真皮のリンパ管が3層構造からなることを見出した。次いでタモキシフェンを生後1日目から3日目にかけて投与し生後5日目、8日目、21日目で観察すると、それぞれ異なる層のリンパ管にリンパ管長の減少や管腔の拡大といった異常が見られた。またタモキシフェンを投与するタイミングを生後4〜5日目あるいは生後6〜7日目にずらし、生後8日目で観察することによって新生異常が見られる層が異なることが分かった。これらの結果は発達期の真皮において各層のリンパ管が新生するに当たり、それぞれ異なる時期に FOXO1 転写因子に依存していることを示唆する。(COI:なし)

19 TAK1 阻害による腫瘍進展—骨破壊病変形成悪循環の断絶

○寺町順平
 徳島大学大学院 医歯薬学研究所 組織再生制御学分野

多発性骨髄腫 (MM) は、骨吸収の著明な亢進と骨形成の抑制が相まって広範な骨破壊性病変を呈する。VLA-4-VCAM-1 を介した骨髄間質細胞 (BMSC) への MM 細胞接着は、接着依存性薬剤耐性および骨破壊病変を惹起する。我々は骨髄腫細胞で発現亢進している TAK1 が腫瘍進展と骨破壊に関与していることを見出した。そこで本研究は、MM と骨髄細胞との相互作用に対する TAK1 の役割や TAK1 阻害の治療効果について検討を行った。【方法・結果】1) MM 細胞株及び患者骨髄検体では TAK1 の発現およびそのリン酸化が亢進していた。2) MM 細胞との共培養により BMSC の TAK1 のリン酸化が亢進し、IL-6 の産生のみならず、VCAM-1 や RANKL の発現が誘導された。しかし、TAK1 阻害剤 LLZ1640-2 (LLZ) はこれらの産生・発現を抑制し、BMSC を介した骨髄腫の増殖・接着や薬剤耐性を抑制した。3) LLZ は MM 細胞の $\beta 1$ -integrin の発現を抑制し、VCAM-1 への接着を抑制した。4) LLZ は MM 細胞の NF- κ B、p38MAPK、ERK 及び STAT3 の活性化を抑制し、MM 細胞に細胞死を誘導した。5) MM 細胞培養上清は骨芽細胞分化を抑制するが、LLZ の添加により抑制された骨芽細胞分化が回復した。6) MM 細胞は破骨前駆細胞に TAK1 のリン酸化を誘導し、破骨細胞 (OC) 形成を促進させたが、LLZ の添加により OC 形成の亢進は顕著に抑制された。7) LLZ はマウス骨髄腫モデルにおいて腫瘍の著明な縮小と骨破壊病変形成を抑制した。【まとめ・考察】MM 細胞と骨髄との相互作用により、MM 細胞とともに BMSC や OC で TAK1 が活性化していた。しかし、TAK1 阻害は接着依存性薬剤耐性や骨破壊を伴う MM 腫瘍進展を抑制することが明らかとなった。したがって、TAK1 は腫瘍進展と骨破壊病変形成を促進する極めて重要な制御因子であり、TAK1 阻害は腫瘍細胞のみならず骨髄微小環境を標的とする治療薬の候補となりうると思えられた。

20 妊娠・授乳期エポキシ樹脂曝露産仔マウス脳への影響に関する組織学的・行動学的検討

○浅沼幹人、宮崎育子、禪正和真、菊岡 亮、磯岡奈未、新居 麗、園部奏生、船越英丸、中山恵利香、進 浩太郎、山本大地、Kyle Quin
 岡山大学・医歯薬・脳神経機構学

缶詰、飲料缶の内面コーティング剤として用いられ、食品中への微量の移行ならびにエストロゲン活性が報告されているエポキシ樹脂 Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) について、これまでに母体への曝露が新生仔頭頂皮質第2/3層細胞数減少、第5層錐体細胞増加という層構造の変化および初代培養大脳皮質神経細胞への添加により著明な神経突起伸長をきたすことを報告してきた。今回、母体への BADGE 曝露による産仔神経分化への影響について明らかにするために、欧州食品安全機構が発がん性がなく安全とした BADGE 一日許容摂取量 (TDI 0.15 mg/kg/日) およびその10倍量、マウスの妊娠全期から授乳期にわたり固形食餌に混ぜて投与し、新生仔マウス (1日齢) の大脳皮質の組織学的検討を行った。妊娠・授乳期の母体への TDI の10倍量の BADGE 曝露により、1日齢新生仔マウス頭頂皮質において nestin 陽性 radial glia の減少がみられ、第5層錐体細胞増加のみならず錐体細胞のマーカーである Ctip2 陽性シグナルが対照群と比べ第5層により限局していた。また、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路による行動評価を5-8週齢まで毎週行った。10倍量の BADGE 曝露産仔が5週齢の早期にオープンフィールドでのコーナーへの滞在時間が有意に延長していた。以上の結果より、妊娠・授乳期における高濃度の BADGE への曝露は、早期の神経分化をもたらし、若年期に不安様行動を惹起させる可能性が示唆された。

21 Effects of testosterone on androgen receptor expression and the dynamics of intrinsic plasticity in CA1 pyramidal neurons of male rat

○Md. Nabiul Islam¹, Yua Sakimoto², Naoya Kamimura¹, Ayako Nakai¹, Koh-hei Masumoto¹, Akie Yanai¹, Dai Mitsushima² and Koh Shinoda¹
¹Division of Neuroanatomy, Department of Neuroscience, ²Department of Physiology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Japan.

Primary male sex hormone, testosterone, exerts profound effects on brain sexual differentiation, reproductive behavior and learning/memory functions, which are mediated mainly by androgen receptor (AR). To elucidate the effects of testosterone (T) or dihydrotestosterone (DHT) and nonsteroidal testosterone antagonist flutamide (F) on the AR expression and intrinsic plasticity of the neurons containing-AR, we performed immunohistochemistry, Western blotting and whole-cell current-clamp recording in CA1 pyramidal neurons of intact, orchietomized (OCX), OCX+T, OCX+DHT, OCX+flutamide or intact+flutamide male rats. OCX significantly decreased AR-immunoreaction, resting membrane potential, action potential numbers and membrane resistance whereas it significantly increased action potential threshold and membrane capacitance. These effects were successfully reversed by the treatment with either T or non-aromatizable DHT. Flutamide administration in intact rats showed the similar changes in intrinsic plasticity as OCX rats, whereas flutamide could not upregulate the AR expression, suggesting that androgen affects the dynamics of intrinsic plasticity of CA1 pyramidal neurons by directly acting on AR. (COI:No)

22 母子分離による社会的認知能力の低下とその原因

○太田 健一、小澤 徹、鈴木 辰吾、三木 崇範
 香川大学 医学部 形態・機能医学講座 神経機能形態学

母子間接触は子供の脳発達に重要な因子でありそれが希薄な状態 (母性剥奪) は発達障害を引き起こすことが指摘されているが、その詳細については不明な点が多い。本研究はこれを明らかにするために、母子分離モデルを用いて発達障害の特徴である社会性の低下に焦点を当てた解析を行った。

SD ラットを用いて、生後2-20日まで母親から個別に分離したラットを母子分離 (MD) 群とした。対照 (MRC) 群は母親と共に通常飼育を行った。9週齢で社会性に関連した行動解析を行ったところ、MD群で社会的認知能力の低下が示唆される結果が得られた。そこで社会的認知能力との関係が報告されている内側前頭皮質 (mPFC) について詳細な解析を行ったところ、MD群は抑制性シナプスに関連した因子が低下しており興奮/抑制バランスが崩れていることが示された。更に mPFC について社会行動試験中の活性を c-fos を指標に評価したところ、MD群では c-fos 陽性細胞数が減少していた。加えてこの減少は本来活性化すべき抑制ニューロン自体の減少に起因することを示唆する結果が得られた。mPFC の抑制ニューロンは周期的な神経活動に関わっており、その減少は神経活動の同期性を低下させ社会性の発現に必要な情報処理を損なわせることが報告されていることから、母子分離は mPFC の抑制性ニューロンの発達を阻害しこれが本研究でみられた社会的認知能力の低下を引き起こしたと考えられる。