

日本解剖学会

第81回中部支部学術集会

会 期：令和3年10月23日（土）

会 場：金沢医科大学（オンライン開催）

1-1 胎生期の脳と周囲頭皮組織の力学的相互作用について

○辻川 幸一郎 1), 齋藤 加奈子 1), 長坂 新 3), 宮田 卓樹 1)

1)名古屋大学大学院医学系研究科機能形態学細胞生物学分野,

2) 藤田医科大学医学部生理学講座, 3) 明海大学歯学部形態機能成育学講座解剖学分野

【目的】哺乳類の頭蓋骨未形成期では、成長する脳と周囲の表皮・間充織からなる頭皮との力学的な相互作用の詳細は明確に分かっておらず、その時期に相当する胎生中期の胎生 12-13 日目にかけてのマウス胚を用い脳と頭皮の力学的関係性を探索した。

【方法と結果】マウス胎児の橋・延髄間の角度は胎生(E)11-E13 間で減少する。頭部の限られた空間内で脳が頭皮を押し出し引き延ばすと、頭皮は反発して脳を閉じ込め折り畳み、脳も頭皮も互いに弾性体のようにふるまう可能性が考えられた。外科的に頭皮を切開し応力解放すると E11-13 の頭皮は反動で大規模に収縮し、反動をなす生体内でのプレストレッチに関与しているのは頭皮のアクトミオシン作用とエラスチンであることが免疫染色の分布と薬剤阻害実験より示され、そのときの圧は E13 で約 77-93Pa だった。また、E13 の頭部から頭皮を除去すると橋・延髄間の角度が開大し、頭皮除去した胚では側脳室から脊髄へのインクの量依存的な到達が失われたことから、頭皮が脳の形態形成や脳脊髄液の分布に関与していると示唆された。ここで、頭皮を分離して伸長状態と非伸長状態で BrdU 取り込ませて培養すると BrdU 陽性の核は非伸長状態で少なく、細胞増殖の低下が示された。

【結論】頭蓋骨が未形成な胎生中期のマウス胚において、脳と頭皮の力学的なせめぎあいと協働の相互作用と成長への寄与が示された。それらのバランスの取れた状態が頭蓋形成までの期間に頭部の形態的・物理的な安定性を担保すると考えられる。

1-2 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、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
名古屋市立大学大学院医学研究科機能組織学

ASIC1a(acid-sensing ion channel 1a)は、中枢神経系で水素イオンセンサーとしてはたらく陽イオンチャネル分子である。一方、成体脳における神経新生は、脳卒中などによる脳虚血時に活性化することが知られている。我々は虚血病変での酸の蓄積（局所的アシドーシス）に着目し、ASIC1a が正常時には神経新生のメディエーターとして働いており、虚血時にその作用が増強するのではないかと考えた。そこで、まずマウス正常脳組織における ASIC1a の成体脳海馬神経新生における時間的発現パターンを、赤色蛍光蛋白質 tagRFP と融合した ASIC1a を発現するノックインマウスを用いて調べたところ、神経新生の初期から神経幹／前駆細胞（NPCs）に発現していることが明らかになった。そこで、ASIC1a が NPCs の増殖に与える影響を BrdU アッセイを用いて調べた。ASIC1aKO マウスでは BrdU 投与 2 時間後の BrdU 陽性細胞の数が野生型より有意に多かったことより、NPCs の増殖が亢進していることが明らかになった。しかし、2 8 日目には逆に野生型より有意に少なかったことより、KO マウスでアポトーシスが亢進している可能性を調べた。その結果、初期アポトーシス細胞数（cleaved caspase-3⁺/nestin⁺細胞数）は ASIC1a KO マウスで野生型より有意に多かった。ASIC1aKO マウスでは NPCs の増殖と初期アポトーシスが亢進していたが、新生ニューロンの内因性 ASIC1a が直接増殖に関与するのか、ASIC1a 欠損によりアポトーシスが亢進し、その結果、代償性に細胞増殖が亢進しているのか調べるため、今後ニューロスフィアアッセイなどを行う必要がある。

1-3 神経ペプチド・マンセリンの脊髄および終糸への局在

○江藤みちる、大河原剛、成田正明
三重大学大学院 医学系研究科 発生再生医学

【目的】マンセリンはラット脳から発見された神経ペプチドで神経系や内分泌系に局在しているが、その機能は明らかにされていない。昨年の中部支部会で我々はマンセリンが後根神経節（DRG）に局在することを報告した。本研究では、マンセリンが脊髄および終糸に局在することを見出した。

【材料と方法】成獣 Wistar ラットを 4%PFA で灌流固定した後、脊髄は椎骨と一緒にひとまとめにして摘出した。一晚 4%PFA で浸漬固定し、10%EDTA 溶液で 1 週間脱灰し凍結切片を作製した。免疫組織化学を行い、光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】マンセリンは脊髄後角に局在していた。脊髄後角は DRG からの神経線維が投射し層構造を形成している。各層には入力する感覚神経が異なり、DRG において異なる細胞のマーカーである calcitonin gene related peptide (CGRP)は I 層～II 層の外側、isolectin B4 (IB4) は II 層、neurofilament (NF)200 は III 層より内側、と異なる分布を示す。マンセリンと CGRP、IB4、NF-200 との二重免疫組織化学を行ったところ、マンセリンは脊髄後角の I 層～II 層外側に CGRP と共局在していた。また、馬尾に囲まれた領域でマンセリン陽性シグナルが認められ、終糸であると考えられた。

【考察】CGRP は痛覚機能に関与していることから、CGRP と共局在していたマンセリンはともに痛覚調節に関与することが示唆された。また、終糸におけるマンセリンの局在が示唆されたが、その同定は今後の課題である。

2-1 様々な神経損傷に応答するプロテアーゼ DINE の損傷運動ニューロン軸索再生効果

名古屋大学医学系研究科機能組織学
長谷川将暉、桐生寿美子、永田健一、木山博資

DINE (Damage-induced neuronal endopeptidase)は様々な神経損傷に応答し発現誘導されるユニークな分子として我々が単離・同定した神経細胞特異的膜一回貫通型のメタロプロテアーゼである。DINE はニューロペプチドの分解・生成により神経再生に重要な働きをすると考えられるが、コンベンショナル DINE ノックアウトマウスは運動神経の発達異常により呼吸不全で生直後死に至る。このため DINE が神経再生にどのように関与するのかこれまで明らかにすることができなかった。そこで我々は軸索損傷後の運動ニューロン特異的に DINE を欠損することが可能なマウス (DINE CKO) を作製し、損傷運動ニューロンの生存や軸索再生への影響を検討することにした。その結果、運動神経損傷後の運動ニューロンの生存率は、コントロールマウスと DINE CKO の間で有意な差は認められなかった。また、いずれのマウスも神経損傷を受けた軸索は再び標的筋肉に到達していた。ところが、これらの再生線維により再形成される神経筋接合部 (NMJ) の形態を詳細に検討したところ、神経損傷後コントロールマウスに比べ DINE CKO で NMJ のサイズが減少すること、NMJ の複雑性が有意に低下することが明らかになった。従って、神経再生時に DINE が欠損すると、その再生線維は筋肉に到達するものの NMJ 再形成による最終的な神経再生完了には至らず徐々に変性する可能性が示唆された。このような最終表現系に至る以前の神経再生過程をさらに詳細に検討することで原因となる分子メカニズム解明を目指したい。

2-2 Brain damage triggers endoplasmic reticulum stress response in various cells over different time courses

Qiyan Fan¹, Mika Takarada-Iemata¹, Osamu Hori¹
Department of Neuroanatomy, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University

Endoplasmic reticulum (ER) stress is caused by accumulation of misfolded/unfolded proteins in the ER lumen, which leads to activation of unfolded protein response (UPR), a set of signal transduction pathway. UPR coordinates protein homeostasis through the regulation of protein quality, synthesis and degradation. Accumulating evidence suggests that the UPR plays an important role in neuropathological conditions. However, the cell types and timing of UPR induction in pathogenesis are not fully understood. In this study, we investigated cellular and temporal pattern of the UPR after brain injury using stab injury model in ER stress-activated indicator (ERAI) mice, which enable to monitor the UPR by detecting the activity of an ER stress transducer with green fluorescence. The fluorescent signals increased over time in the ipsilateral cortex from 6 hours to 7 days after brain injury in ERAI mice. The reporter signals were observed in injured neurons in the early stages after brain injury. However, the major cells positive for the fluorescent signals were non-neuronal cells such as vascular cells and astrocytes throughout the period analyzed after brain injury. The temporal pattern of various cellular marker expressions detected by quantitative PCR analyses was similar to that of the number of reporter signal-positive cells in each cell except microglia. These results suggest that UPR may play important roles not only in neurons but also in the non-neuronal cells. in the course of neurological diseases including brain injury.

2-3 Thiel 法により固定された臓器の組織学的検討

中村恒夫⁽¹⁾ ⁽²⁾ 白石昌武⁽¹⁾ ⁽²⁾ 奥田洋明⁽²⁾ 堀紀代美⁽²⁾ 石川達也⁽²⁾
尾崎紀之⁽²⁾
金沢大学総合技術部生命部門⁽¹⁾
金沢大学医薬保健研究域医学系機能解剖学⁽²⁾
【目的】Thiel (Ti) 法で固定した標本の組織学的検討がどの程度可能なのか明らかにするため、動物を灌流固定後、経時的に組織を採取し、組織学的検討を行った。【方法】ラット3匹を灌流用Ti液で灌流固定した。灌流後すぐに採取したものをTi固定後0日の組織とし、灌流固定後、浸漬用Ti液に2週あるいは4週間浸漬し採取したものを、Ti固定後2週、4週の組織とした。脊髄、肺、心臓、肝臓、胃、腎臓、腹大動脈、脾臓、坐骨神経を検討対象とした。採取した組織は、4%PFAで一晩浸漬固定後、パラフィン切片を作成し、HE染色とアザン染色を行った。Ti固定液のpH値測定も行った。【結果】HE染色では、Ti固定後0日で全ての組織で組織構造は保たれ、核が染色されたが、腎臓では核染色されない細胞がみられた。2週では組織構造が保たれず、核が染まらない組織が多かった。脊髄は断片化するものが多く、心筋では横紋や介在板が、脾臓筋では横紋が観察できず、筋線維に断裂がみられた。肝臓では肝細胞間に隙間ができ、胃粘膜では上皮細胞の配列が乱れ、腹大動脈では層構造が不明瞭になった。4週ではほとんど全ての組織で構造が保たれず、核が染まらなかった。アザン染色では、脊髄と心臓、脾臓筋においてアゾカルミンの染色性が強かった。アニリンブルーによる膠原線維染色は、4週でも観察できた。Ti液は灌流用、浸漬用ともに弱アルカリ性だった。【結論】Ti固定した標本は、灌流固定直後は組織学的検討が可能だが、浸漬2週以上になると組織学的検討は難しいと考えられた。

3-1 マウス・ラット精巣索の三次元構造

仲田浩規¹、表原拓也²、伊藤正裕³、井関尚一³、溝上敦⁴
¹金沢大学医薬保健研究域医学系組織細胞学、²東京医科大学人体構造学、³公立小松大学保健医療学部臨床工学科、⁴金沢大学大学院医薬保健学総合研究科泌尿器集学的治療学
【目的】精巣索の伸長とコイルリングが発生する精巣形成後期過程において、マウスおよびラットの精巣索の詳細な三次元構造を明らかにすることを目的とした。
【材料と方法】マウス (E15.5 と E18.5) ・ラット (E16.5 と E19.5) の右精巣の連続切片を作製し、基底膜タンパク質の免疫染色を行った。三次元再構築ソフトを用いて精細索のセグメントを手動で行い、三次元再構築を行った。
【結果】再構築した精巣索の詳細な形態学的パラメーターを算出することができた。精巣索の本数はマウス・ラットでそれぞれ12.7本・27.8本であった。精巣索1本あたり分岐数がマウス・ラットでそれぞれ1.52箇所・0.30箇所であった。白膜に接しない管の割合がマウス・ラットでそれぞれ6.5%・23.0%であった。マウス・ラットともに、精巣索は頭部側でコイルリングが強く、尾部側でコイルリングが弱かった。また、精巣索は精巣網側から観察すると、すべて時計回りであった。
【結論】マウス精巣索はラットと比較し、高頻度で吻合していることが明らかになった。また、マウス・ラットともに、時計回りの精巣索のコイルリングが頭部側から尾部側に進行することが明らかになった。

3-2 Hoatzin 変異マウスを用いた研究の新展開

成田啓之¹、 大山拓次²
¹山梨大学 医学部 解剖学講座細胞生物学教室
²山梨大学 生命環境学部 生命工学科

【目的】我々は脊椎動物のみが有する機能未知の遺伝子 *Hoatzin* の変異マウスを作成し、これが運動繊維の機能不全が招く典型的な病態である水頭症および造精機能障害を呈するとともに、原因不明の突然死が妊娠出産期に多いことを見出している。今回我々は変異マウスの心臓に注目してその異常を解析するとともに、精製HOATZタンパク質断片を調製してその構造と機能を解析もおこなった。【材料と方法】マウス心臓は灌流固定したのち実顕微鏡で観察するとともにパラフィン包埋切片を組織染色して観察した。HOATZタンパク質のC末断片 (HOATZ-C) は大腸菌を用いて大量発現・精製したのち、円偏光二色性測定に用いるとともに、*Hoatzin* 欠損型マウスの精巣抽出物と混合し結合タンパク質の探索にも用いた。【結果】同腹の雄マウス心臓の観察により、ホモ変異型の心臓に拡張型心筋症様の形態異常を認めた。心筋層の線維化は認めなかった。HOATZ-CのCDスペクトル解析の結果ランダム構造の含有量が58%と高値を示した。また精製HOATZ-Cに結合するタンパク質としてHSPAが同定された。【結論】*Hoatzin* は運動繊維および鞭毛を有する細胞のみならず、心筋細胞でも機能している可能性が示された。これら細胞の共通点として運動装置を有している点が挙げられ、HOATZはこうした細胞のストレス耐性機構に関わっていると推測された。またHOATZ-Cの解析結果から、HOATZがストレス顆粒のダイナミクスに関わる天然変性タンパク質であると推測された。

3-3 高脂肪摂取マウスにおける小腸粘膜固有層に分布する IgA 陽性細胞の経時的変化

坂本祐太^{1,2)}、志茂聡³⁾、村松憲⁴⁾、丹羽正利⁵⁾
1. 健康科学大学 健康科学部 理学療法学科、2. 杏林大学大学院 保健学研究科、
3. 健康科学大学 健康科学部 作業療法学科、4. 杏林大学 保健学部 理学療法学科、
5. 杏林大学 保健学部 作業療法学科
【はじめに】肥満・糖尿病では免疫機能が低下し、易感染性や感染の易重症化することが問題となっている。本研究は、高脂肪食摂取 (肥満・糖尿病モデル) マウスの腸管におけるIgA、IgM、IgG1局在を免疫組織化学的に解析した。
【方法】12週齢または20週齢の高脂肪食群 (以下、HFD群) と同週齢の通常食摂取群 (以下、SCD群) の小腸を生体内凍結技法により固定し、試料を作製した。形態学的解析は、HE染色を用いた。免疫組織化学的解析は、抗IgA、IgM、IgG1抗体を用いた。統計学的解析は、各抗体に対する陽性細胞数を面積で除した密度を比較した。
【結果】形態学的解析では、SCD群と比較してHFD群は単層円柱上皮細胞質内に多くの空胞を認めた。免疫組織化学的解析では、SCD群の12週齢と20週齢ともに粘膜固有層にIgA陽性細胞を豊富に認めたが、HFD群ではIgA陽性細胞は12週齢と20週齢ともにSCD群に比べ減弱していた。IgMおよびIgG1は、SCD群では粘膜固有層にIg陽性細胞を認めたが、HFD群では減弱していた。統計学的解析では、SCD群の粘膜固有層内のIgA陽性細胞数は、12週齢に比べ20週齢で有意に増加したが、HFD群のIgA陽性細胞数は、20週齢で同週齢のSCD群に比べ有意に減少した。
【結語】通常食摂取では腸管粘膜固有層のIgA陽性細胞は通常12週齢から20週齢にかけて増加するが、高脂肪食摂取ではIgA陽性細胞数の増加が抑制されることが示唆された。高脂肪摂取による小腸のIg陽性細胞数減少が肥満・糖尿病の腸管免疫機能低下に関与している可能性が示唆された。

3-4 迅速組織透明化法(RAP)を用いた組織3Dイメージング

○坂田ひろみ、 増田浩子、友杉充宏、八田稔久

近年我々は、迅速組織透明化プロトコル(RAP)を用いた迅速骨染色法(RAP-B)を開発した。本発表では、RAPによる組織透明化の応用例と3Dイメージングを紹介する。
E10またはE11のICRマウス胎児を採取して4%PFAに浸漬した。また、成獣ICRマウスおよびコラーゲン誘発型関節炎(CIA)マウスを深麻酔下で4%PFAにて灌流固定した。灌流固定した成獣マウスから脳を採取して100~500 μm厚の凍結切片を作製した。胎児および脳スライス標本はRAPによる透明化処理の後、免疫染色を行った(RAP-IHC)。CIAマウスは、除毛処理とRAP-Bを組み合わせた手順(RAP-B/HR)にて骨染色した。
マウス胎児を抗neurofilament抗体を用いたRAP-IHCによりwhole-mount免疫染色したところ、免疫陽性線維が従来法よりも明瞭に描出された。また、組織深部において単一細胞レベルの解像度を有する画像を取得することが可能であった。また、成獣マウス脳スライス標本を抗parvalbumin抗体と抗GAPF抗体を用いたRAP-IHCにより染色した後、共焦点レーザー顕微鏡でZ-stack撮影して3D像を再構築したところ、parvalbumin陽性神経細胞の細胞体や突起、およびGFAP陽性アストロサイトの形態が明瞭に描出された。また、RAP-B/HRで染色したCIAマウス骨染色標本を蛍光ズーム顕微鏡でZ-stack撮影して3D像を再構築したところ、骨びらんや骨棘などさらに微細な骨病変を描出することができた。また、手根部や中手指節関節背側部では微小な遊離骨が描出された。以上より、RAPは免疫組織化学的解析や成獣マウス等の大型標本のWhole mount骨染色に応用が可能で極めて汎用性の高い組織透明化法であることが示された。また、RAP-IHCで染色された組織標本やRAP-B/HR骨染色標本をZ-stack撮影することにより、3D像を再構築することができ、各種構造や分子の組織内局在や微細な骨病変の描出が可能であることが明らかとなった。