

日本解剖学会

第75回中国・四国支部学術集会

会期：令和3年10月30日（土）
会場：川崎医科大学

1 古人骨からみた初期稲作農耕民の拡散

岡崎健治・鳥大・医

日本人の起源問題については、自然人類学関連の研究結果から二重構造モデルが提起されている (Hanihara 1991)。この仮説では、縄文時代には既に日本列島に居住していた在地系集団と弥生時代以降に大陸から移動してきた渡来系集団の混血によって、日本人が形成されている。しかし、最近報告された古人骨のゲノム解析は、この二重構造を三重構造に発展させるかもしれない (Cooke et al. 2021)。この解析結果によれば、弥生時代と古墳時代の渡来系集団は別系統であると考えられる。新たに提起された三重構造モデルについては、ゲノム解析された人骨資料が十分ではないなどの課題が残されているものの、渡来系集団のルーツが一様ではないことを示せたのは大きな前進であろう。本研究は、渡来系集団のルーツがある大陸においてどのような集団構成の過程があったのか、その手掛かりを得るために、中国およびモンゴルの古人骨を対象に調査してきた。本発表では、長江デルタ地域の新石器時代人骨にて確認された結核症の痕跡、頭蓋および歯冠の形態解析、歯冠エナメル質を用いた同位体分析などの結果を基に、新石器時代以降の稲作農耕民の移動、拡散の様相を考察する。

2 AiCT 画像を用いた椎体骨折の有病率

○小林理恵、小川典子、川村篤子、平野 了、松本暁洋、藤谷昌司、大谷 浩
島根大学医学部解剖学講座

【背景】AiCTを用いた解剖学実習の学習時に、椎体骨折が多いことに気付いた。椎体骨折は加齢とともに有病率が上昇する疾患であるが、日本人一般住民の死亡時点での有病率は充分には分かっていない。

【目的】死亡時 AiCT 画像を用いて、椎体骨折の有病率を明らかにすること。

【方法】2017年1月1日～2019年12月31日の間に、島根大学医学部解剖学実習のためにご献体いただいた117柱（男性63柱、女性54柱、平均年齢85.9歳）を対象とした。椎体骨折の診断は、第1頸椎から第5腰椎の全ての椎体において Genant の半定量法を用い、Grade 0～3 で評価した。

【結果】椎体骨折の有病率は59.8%（男性55.6%、女性64.8%）であった。部位で最も多かったのはT12で28.2%（男性23.8%、女性33.3%）、次いでL1で26.5%（男性22.2%、女性31.5%）だった。L4の骨折は男性に有意に多く、T7の骨折は女性に有意に多かった。Grade別の有病率はgrade 1 1.71%（男性0%、女性3.7%）、grade 2 20.5%（男性28.6%、女性11.1%）、grade 3 35.9%（男性23.8%、女性50.0%）であった。重症度ではgrade 2：中等度変形は男性に有意に多く、grade 3：重度変形は女性に有意に多かった。

【結論】日本人一般住民の死亡時における椎体骨折の有病率を明らかにした。有病率は、既存の報告より男女ともに高かった。T12とL1の骨折率が最も高く、重度の椎体骨折は女性に多かった。

3 骨形態計測による Mir125b-2 のノックアウトマウスの骨代謝機能の解析

小笠原伯宏^{1,2}、南崎朋子¹、河野尚平¹、Davood Kharaghani¹、星野友則¹、外丸 祐介³、谷本幸太郎²、吉子裕二¹

¹ 広島大学大学院医系科学研究科硬組織代謝生物学、² 広島大学大学院医系科学研究科歯科矯正学、³ 広島大学自然科学研究支援開発センター

我々は骨芽細胞が分泌する基質小胞に多くの miRNA が内包され、そのうち Mir125b が Prdm1 を標的として破骨細胞分化を阻害することを見出した (Commun Biol, 2020)。骨芽細胞特異的に Mir125b を過剰発現するマウスでは、生後早期から破骨細胞数の減少に伴う骨量増加を示したが、骨芽細胞および骨形成は正常で、加齢による影響（骨量減少など）は軽度であった (Int J Mol Sci, 2021)。一方、MIR125b/Mir125b を導入した骨髄間葉系幹細胞では、BMPR1B、SMAD4 あるいは Cbfb を標的として骨芽細胞分化が抑制されるという (Cell Physiol Biochem, 2017 他)。MIR125b/Mir125b は2つの染色体に由来するため、我々はそれぞれをノックアウトしたマウスを作製した。今回は12週齢前後の Mir125b-2 ノックアウト (KO) マウス (雄) を用い、骨形態計測を行ったので報告する。KO マウスは正常に出生し、外観上特筆すべき異常は見られなかった。主要臓器における Mir125b 前駆体の転写レベルを確認した。KO マウス大腿骨の Mir125b レベルは野生型 (WT) と比較して低値を示したが、血中 Mir125b レベルは両マウスの間に差は見られなかった。脛骨のマイクロ CT および骨形態計測では、KO マウスの骨量・骨密度や、骨芽細胞数・破骨細胞数・骨形成速度などのパラメータに特筆すべき異常は認められなかった。以上の結果から、Mir125b-2 KO マウスの骨代謝は正常に営まれていると考えられた。

4 O-GlcNAcylation drives calcium signaling towards osteoblast differentiation

WENG Yao, Heriati Sitosari, 福原瑠子, 池亀美穂, 岡村裕彦
岡山大学・大学院歯歯薬総合研究科・口腔形態学分野

Background: Posttranslational protein modification by glycosylation plays an important role in regulating many cellular processes. O-GlcNAcylation is a form of glycosylation. O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) add and remove GlcNAc, respectively, to serine or threonine residues of nuclear and cytoplasmic proteins through UDP-GlcNAc. This study aimed to reveal the possible mechanisms by which O-GlcNAcylation regulates osteoblast differentiation using a series of bioinformatics-oriented experiments. **Methods:** The influence of O-GlcNAcylation levels on osteoblast differentiation were examined in the MC3T3-E1 cells treated with OGT and OGA inhibitors by checking ALP activity, ALP staining and alizarin staining. Correlations between the levels of O-GlcNAcylation and the expression of osteogenic markers as well as OGT were evaluated by qPCR and western blotting. The O-GlcNAcylation proteins which correlated with Runx2 expression were retrieved from several public databases and used for bioinformatics analysis. Intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) was monitored in the cells treated with OGT and OGA inhibitors using a confocal laser-scanning microscope (CLS). The interaction effect between O-GlcNAcylation and $[Ca^{2+}]_i$ on osteogenic marker expression was determined using stable OGT knockdown MC3T3-E1 cells. **Results:** Osteoblast differentiation was regulated by O-GlcNAcylation. The time-course profile of global O-GlcNAcylation proteins showed a distinctive pattern with different molecular weights during osteoblast differentiation. The expression pattern of several O-GlcNAcylation proteins was significantly similar to that of Runx2 expression. Bioinformatics analysis of the retrieved Runx2-related-O-GlcNAcylation-proteins revealed the importance of $[Ca^{2+}]_i$. CLS showed that $[Ca^{2+}]_i$ was rapidly changed by alteration of O-GlcNAcylation in MC3T3-E1 cells. O-GlcNAcylation and $[Ca^{2+}]_i$ showed an interaction effect on the expression of osteogenic markers. OGT knockdown disrupted the $[Ca^{2+}]_i$ -induced expression changes of osteogenic markers. **Conclusion:** O-GlcNAcylation interacts with $[Ca^{2+}]_i$ and elicits osteoblast differentiation by regulating the expression of osteogenic markers.

5 TAK1 阻害は骨髄腫増殖と骨破壊を惹起する細胞間コミュニケーションを改善する

○寺町順平 沢禎彦
岡山大学学術研究院口腔機能解剖学分野

【背景・目的】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。MM 細胞は骨髄内の骨系細胞との相互作用により骨病変を進行させるだけでなく、薬剤耐性も付与させるため、新規治療薬の登場にも拘わらず依然として治療は困難である。これまでに我々は MM において TAK1 の活性化が腫瘍進展のみならず骨病変形成においても必須であることを見出した。そこで今回、MM と骨系細胞との相互作用により誘導される薬剤耐性や骨病変形成における TAK1 の役割について以下の検討を行った。【方法・結果】1) MM 細胞との共培養により骨髄間質細胞 (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 阻害剤である LLZ1640-2 (LLZ) はこれらの産生・発現を抑制し、BMSC を介した MM の増殖、接着依存性薬剤耐性 (CAM-DR) のみならず破骨細胞形成誘導も抑制した。2) 破骨細胞は BAFF、APRIL や IGF1 を産生し、MM 細胞に液性因子依存性薬剤耐性 (SFM-DR) を惹起させるが、LLZ は破骨細胞からのこれらの因子の産生を抑制した。3) MM 細胞において、TAK1 阻害は BAFF/APRIL の受容体である BCMA や TACI の発現を抑制するだけでなく、NF-κB の活性化も抑制した。5) 我々は最近 TAK1 依存的に MM 細胞から分泌される蛋白として Neogenin1 (NEO1) を見出したが、NEO1 は BMP2 の受容体として作用し、骨芽細胞分化を抑制した。【まとめ・考察】MM 細胞と骨系細胞との相互作用により、MM 細胞とともに BMSC や破骨細胞で TAK1 が活性化していた。さらに、TAK1 阻害は細胞間相互作用を介した薬剤耐性や MM 腫瘍進展および骨病変形成を抑制することが明らかとなった。したがって、TAK1 阻害は細胞内のみならず骨髄微小環境での細胞間相互作用をも標的とする治療薬の候補となりうると考えられる。

6 蛍光有機シリカ粒子を用いた膝窩リンパ節におけるサイズ依存的分布の解析

○黒田千佳¹、望月ちひろ²、中村純奈²、加藤茂樹²、中村教泰²
¹山口大学医学部医学科 4年
²山口大学大学院医学系研究科器管解剖学講座

近年、リンパ節転移したがんに対するドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が期待されており、DDSのキャリアーとしてナノ粒子の応用が検討されている。リンパ節転移したがん細胞がまず辺縁洞に集積するなどその挙動が明らかになりつつある。一方、キャリアーである粒子のリンパ節内の分布様式は未だ明らかになっていない。そこで本研究ではリンパ節を標的とした DDS 技術の開発を目指して、有機シリカ粒子のリンパ節内での局在をサイズに着目し明らかにすることを目的とした。

マウスの足底皮下に5種類のサイズの粒子(直径 120, 380, 840, 1700, 2800 nm)を投与し、24時間後の膝窩リンパ節内の粒子の分布を *in vivo* で蛍光顕微鏡を用いて観察した後、リンパ節を摘出し組織学的、3次元の粒子の分布を観察、解析した。その結果、足底皮下に投与したナノ粒子は24時間後には膝窩リンパ節で観察され、粒子のサイズによって分布が異なることが明らかになった。粒子径が380 nm以下の粒子分布はリンパ節の辺縁洞や被膜直下の外側領域に有意に多く存在し、髄質領域にはほとんど存在しなかった。一方、直径が840 nm以上の粒子分布は髄質領域が多く、外側領域との差は認めなかった。以上から、粒子はリンパ節内でサイズ依存的に分布し、直径380 nm以下の粒子は辺縁洞に集積することから初期のリンパ節転移がんに対する DDS 治療のキャリアーとして有用である可能性が示唆された。

7 脾臓杆状上皮細胞における NR5A1 の発現とその役割

○小野 公嗣¹、森 天海^{1,2}、嶋 雄一^{1,3}
¹川崎医科大学 解剖学、²川崎医療福祉大学 医療技術学専攻、³久留米大学 解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門

NR5A1はステロイドホルモン産生組織である副腎や生殖腺の発生に必須の転写因子であり、脾臓の杆状上皮細胞にも発現する。我々は、NR5A1遺伝子の様々な組織特異的エンハンサー領域を探索する過程で、NR5A1遺伝子の脾臓エンハンサーを同定し、その欠損マウスの作製に成功した。これまでに、正常な杆状上皮細胞について走査型電子顕微鏡を中心とした形態学的解析はなされているものの、杆状上皮細胞におけるNR5A1の機能は未知である。本研究では、脾臓エンハンサー欠損マウスを用いた形態学的解析を行うことにより、NR5A1が欠損した杆状細胞においてどのような形態の異常がみられるかを検証した。エンハンサー欠損マウスでは、体重に占める脾臓の重量が減少していた。次に脾臓のHE染色を観察したところ、欠損マウスにおいて白脾臓が実質の中心に融合して存在していた。また、欠損マウスでは血管の発達が悪く、白脾臓に中心動脈がほとんど認められなかった。走査型電子顕微鏡を用いた解析から、脾臓を構成する杆状上皮細胞の形態と配列に異常が生じていた。以上のことから、NR5A1は脾臓の形成に重要な因子として機能しており、脾臓の正常な形成は脾臓全体の組織構造形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

8 Nr5a1 遺伝子の脾臓特異的エンハンサーに結合する因子の探索

森天海 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学専攻

NR5A1は脾臓の洞様毛細血管内皮細胞に発現している。我々は最近、Nr5a1遺伝子の脾臓特異的エンハンサーを同定した。このエンハンサーを欠損させたマウスでは、脾臓でのNR5A1の発現が消失し、脾臓全体の組織構造に異常が認められた。そこで本研究では、エンハンサーに結合する因子の探索を試みた。エンハンサーの中でも動物種間で保存された配列の一つに変異を挿入したところ、脾臓におけるNR5A1の発現が消失したことから、この配列がエンハンサーの機能に重要であることが明らかになった。塩基配列をもとに転写因子のデータベースを探索したところ、この配列にE2E transformation-specific sequence (ETS) family が結合する可能性が示唆された。ETS family は helix-turn-helix DNA 結合モチーフを持つ転写因子で、マウスでは26種類存在する。エンハンサーの配列をもとにさらに詳細な探索を行った結果、ETS family の中でも class III と呼ばれる3つの転写因子が結合する可能性が高いと推測されたため、現在、脾臓からソーティングによって回収したNR5A1陽性細胞を用いて、それぞれの因子の定量的RT-PCR解析を行なっている。

9 時計遺伝子による一次線毛の形態制御

中里亮太、松田 悠生、池上浩司
 広島大学大学院医系科学研究科解剖学及び発生生物学研究室

【背景】一次線毛は細胞外へ突出した毛の様なオルガネラ様構造体である。近年、一次線毛の構造・機能異常を原因とした「線毛病」に関する研究の進展により、一次線毛が多くの生命現象において重要な役割を持つことが解明されつつある。一方、睡眠・覚醒やホルモン分泌など、多くの生命現象は周期的な変化(生体リズム)を刻む。これらは時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群が約24時間周期で発現変動することで生み出されている。本研究ではこの生体リズムと一次線毛の関係性について解析を行った。【方法】マウス線維芽細胞株 NIH/3T3 を100 nM デキサメタゾンで2時間処理し時計遺伝子の発現リズムを同調させ、その後6時間ごとに細胞を4%パラホルムアルデヒド固定し、免疫染色により一次線毛の長さを測定した。また、B57/BL6 マウスを昼夜の各時間帯に灌流固定し、脳凍結切片を作製後、免疫染色により一次線毛の長さを測定した。【結果】NIH/3T3 を使用した解析では、デキサメタゾンの処理により一次線毛の長さに24時間周期のリズム性の変動が確認され、この効果は時計遺伝子の抑制因子 REV-ERB α の合成リガンド SR9011 の処理により消失した。また、マウスの脳では、一次線毛の長さに昼夜で大きな変化が観察された。【考察】以上の結果から、時計遺伝子により一次線毛の形態は制御され、様々な生命現象が持つ生体リズムの形成に一次線毛が関与する可能性が示唆される。

10 O-GlcNAcylation affects the growth and migration ability of human oral squamous carcinoma cell

Heriati Sitosari, Yao Weng, 福原瑠子, 池亀美華, 岡村裕彦
 岡山大学・学術研究院医歯薬学域・口腔形態学分野

The addition of N-acetylglucosamine (GlcNAc) at the serine and/or threonine residues, known as O-GlcNAcylation, has been linked with cancer. However, because previous research about the involvement of O-GlcNAcylation in oral squamous cell carcinoma (OSCC) reported conflicting results, the function of this protein modification in OSCC is still unclear. Screening of OGT and O-GlcNAcylation level in several lines of human oral squamous cell carcinoma (HSC2, HSC3, HSC4, and SAS) was performed followed with treatment with O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase (OGT) and the Protein O-GlcNAcase (OGA) inhibitor (OSMI-1 and Thiamet-G) to assess the effect of O-GlcNAcylation on cell morphology, cell viability, and cell migration. The localization of OGT during the presence and inhibition of O-GlcNAcylation was also evaluated. The presence of beta catenin as one of the O-GlcNAcylated protein was performed to evaluate the possible mechanism of how OGT and O-GlcNAcylation might play role in oral squamous cell carcinoma. The OGT level was varied between the OSCC samples ($p < 0.01$), but no significant difference of global O-GlcNAcylation was observed. OGT was expressed mainly in the nucleus and the inhibition of it significantly affect cell growth. Slight morphological changes were also seen during OGT inhibition. On the contrary, high O-GlcNAcylation through the inhibition of OGA does not affect cell morphology nor cell number. Taken together, the results of this preliminary study suggest that each type of OSCC has different sensitivity to O-GlcNAcylation and OGT inhibition plays significant role in the growth and migration of OSCC.

11 ラット大脳皮質一線条体連関の同期活動

半田高史 (広島大学・医・神経生物学)

動物が適切な行動を選択するには大脳皮質-基底核連関が重要な役割を果たす。基底核の入力核である線条体と大脳皮質の間は解剖学的な連絡があり、各領域のニューロンの発火活動がいつどのよう情報やり取りするかが分かっている。ラットに二者択一選択課題を遂行させ、逆行性神経トレーサーによって線維連絡を確認した大脳皮質と線条体から同時に神経活動を記録して、神経活動の同期活動を解析した。その結果、ラットの行動成績が良い時、大脳皮質と線条体間で神経活動の同期的活動が多くみられた。この結果から、解剖学的連絡のある大脳皮質と線条体の同期的な活動が、より適切な行動を選択するための情報処理を促進することが示唆された。

12 メタロチオネイン欠損による脳梁形成不全の増悪

○正井加織¹, 菊岡 亮¹, 名越 武¹, 十川千春², 十川紀夫³, 宮崎育子¹, 浅沼幹人¹

1. 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 脳神経機構学, 2. 広島工業大学 生命・生体医学工学, 3. 松本歯科大学 遺伝子工学・分子創薬学

129系マウスの若齢個体では完全または部分的に脳梁欠損を呈することが報告されている。我々はこれまでにパーキンソン病病態における抗酸化物質メタロチオネイン(MT)の関与, およびアストロサイトでのMT生成誘導による神経保護の研究をMT-1/2ノックアウト(KO)マウスなどを用いて行ってきた。その過程で, 129系マウスを野生型(WT)とするMT-1/2 KOマウスでは脳梁欠損が見られる個体の割合が高くなることを見出した。

本研究では脳梁欠損と加齢に伴う変化を生後7週, 12ヶ月, 18ヶ月の129系雄性WTまたはMT-1/2 KOマウスを用いて検討した。その結果, 生後7週では, WTマウス5匹中2匹, MT-1/2 KOマウス5匹全てに線条体レベルの切片において脳梁の完全あるいは部分欠損をみとめた。生後12ヶ月では, WTマウス5匹中2匹, MT-1/2 KOマウス6匹全て, そして生後18ヶ月ではWTマウス5匹中0匹, MT-1/2 KOマウス4匹中3匹に同様の病理所見をみとめた。また, 大脳白質における myelin basic protein (MBP)の発現はMT-1/2 KOマウスにて明らかに低下していた。

以上の結果より, MT-1/2欠損により脳梁形成不全を含む髄鞘形成障害が増悪し, さらに加齢による髄鞘形成障害の減退がみられなくなることが明らかとなった。脳梁欠損を呈する疾患として zinc finger E-box-binding homeobox 2(Zeb2)遺伝子変異による Mowat-Wilson 症候群が挙げられる。MT-1/2欠損による亜鉛欠乏や亜鉛代謝関連分子の異常が脳梁欠損に関与している可能性も考えられる。今後, 髄鞘形成における亜鉛代謝の関与について検討したい。

13 プロテアソーム阻害条件下におけるSTB/HAP1の細胞保護作用

○宇野香菜子¹, 藤永竜太郎², 吉岡淳之介¹, 濱崎楓子¹, 中島拓海¹, Islam Md Nabiul¹, 升本 宏平¹, 柳井 章江¹, 篠田 晃¹

1. 山口大学大学院医学系研究科 神経解剖学, 2. 神戸市看護大学 看護学部

所属研究室が同定した細胞内封入体である斑点小体 Stigmoid body (STB)は培養細胞へのHuntingtin-associated protein 1 (Hap1)の導入により発現するため, HAP1はSTBの機能的意義を検討する上で重要な分子であると考えられる。

これまでに我々は培養細胞へSTBおよびHAP1を発現させることで, プロテアソーム阻害剤で誘導される細胞死が顕著に抑制されることを見出した。また, 同条件下では, 培養細胞の核周囲にリング状の集塊 perikaryal reticulogranular clump (PRGC)が形成されることを認めている。

そこで本研究では, こうしたHAP1の細胞保護作用や形態変化がマウス脳内でも認められるか検討することを目的とした。

プロテアソーム阻害剤であるLactacystinをSTB/HAP1が豊富に発現する扁桃体領域へ注入し, 灌流固定後に免疫組織学的解析を行った。その結果, 扁桃体のHAP1陽性細胞の中には, STBに加えてPRGC様構造を形成するものが確認された。また, 変性した神経細胞を特異的に染色するFluoro-Jade c染色を実施したところ, 扁桃体基底外側部で強い陽性反応が認められた。基底外側部はSTB/HAP1の発現が特に少ない領域である。そのため, 生体内においてもSTB/HAP1を発現する細胞は, プロテアソーム阻害ストレスに対する耐性が高い可能性が示唆される。

14 ウシおよびマウスの眼球と網膜の生後成長に関する研究

兵頭 宗敏¹, 今井 啓之¹, 加納 聖², 日下部 健¹

¹山口大学 共同獣医学部 獣医解剖学研究室, ²山口大学 共同獣医学部 獣医発生学研究室

【緒言】新生子の視覚の成熟速度には動物種差がある。ウシは早成性動物で出生時から高度な視覚能力をもつが, 晩成性動物であるマウスは出生時に開眼していない。本研究ではウシおよびマウス網膜の生後発育過程を観察した。【材料と方法】両動物から眼球を採材し, H-E染色標本を作製して形態計測を行った。未固定の網膜からRNAを抽出し, 発現遺伝子についてRT-PCR解析を行った。【結果】ウシ眼球の重量とサイズは1-2ヶ月齢まで急速に増加し, 以後は緩やかな増加を続けた。網膜は0日齢が281.3μmと最も厚く, その後2ヶ月齢まで急速に減少し, 90ヶ月齢では128.3μmとなった。網膜の組織学的な10層構造は0日齢から確認された。視細胞マーカであるopsin2は0日齢を含む全日齢の網膜で確認され, 神経節細胞マーカであるRNA binding protein with multiple splicing (RBPMs)と, 神経栄養因子受容体であるtropomyosin receptor kinase (Trk) Bも0日齢から発現していた。マウス網膜についても, 0日齢が284μmと最も厚く, その後急速に減少した。出生時の網膜は無層構造であったが14日齢までに10層構造を形成した。【考察】ウシ網膜は出生時から完成した組織構造を有し, 分化した視細胞と神経節細胞を持っていると考えられた。神経栄養因子はウシ網膜の早熟性に関与する可能性がある。また, ウシ網膜では2ヶ月齢までの間に細胞や神経線維の組織構成が顕著に変化することが示唆された。マウス新生子にはウシに比べて, 網膜の分化と視覚の獲得が晩熟的であることが確認された。

15 小型魚類メダカを用いた網膜色素変性症原因遺伝子 *eyes shut homolog* の機能解析

佐藤恵太¹, Liu Yang¹, 山下高廣², 大内淑代¹

¹岡山大学 院医歯薬・細胞組織, ²京都大学 院理・生物物理

網膜色素変性症(RP, retinitis pigmentosa)は, 遺伝的要因により網膜視細胞の変性が進行し, 視野狭窄から失明に至る疾患である。RPの病型は遺伝子型, 表現型ともに多様であり, 原因遺伝子ごとの分子病態の理解が効果的な治療法開発のために肝要である。細胞外基質蛋白質をコードする *Eyes shut homolog (EYS)* は日本を含む東アジアや欧州において高頻度に見られる RPの原因遺伝子である。EYSを原因とするRPの分子病態を理解するためには遺伝子産物の生理機能を理解することが必要だが, マウスなど主要な哺乳類モデル動物のゲノムからはEYS遺伝子が失われている。

小型魚類メダカは遺伝子操作や視覚刺激による行動誘起が容易で, 目に近い構造の網膜を持つなど視覚研究の優れたモデル動物である。本研究で我々はCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により *eyes shut* 遺伝子の開始コドンを含む領域を欠失させ, *eyes shut* ノックアウト (KO)メダカを作出した。免疫組織化学染色の結果, EYS蛋白質は野生型メダカ視細胞外節の基部, 結合線毛の近傍に局在したが, KOメダカでは消失した。*eyes shut* KOメダカでは視細胞外節蛋白質輸送の異常, 錐体視細胞外節長の短縮が見られた。また透過型電子顕微鏡観察を行うと, *eyes shut* KOメダカでは錐体視細胞外節に異常な小胞が生じラメラ状の膜構造が破壊されていた。さらに *eyes shut* KOメダカでは *visual motor response* が減弱した。結合線毛には視細胞外節への小胞輸送を制御する蛋白質が集積している。従って, EYSはこれらのタンパク質と協調して視細胞外節の構造・機能維持の一端を担うと考えられた。

16 局所的蛍光標識による体壁形成過程における側板細胞移動の3次元解析

○坂本信之, 池上浩司

広島大学大学院医系科学研究科解剖学及び発生生物学

体壁は側板中胚葉側板および体節に由来する。側板は外側へ成長しつつ, 腹側へ巻き込み運動を起こした後, 正中で癒合する。その後, 体節細胞が側板内に侵入し, 肋骨や筋を形成することで, 体壁が完成する。この体節細胞の移動は, 外側への移動だけでなく, 肋骨の形成に見られるような頭側への移動も含む。侵入される側である側板細胞も頭側へ移動している可能性がある。我々は, ニワトリの胸壁形成過程における胸部側板細胞の移動を調べるために, 解卵2.5日ニワトリ胚の胸部側板細胞を局所的なEGFP遺伝子導入により標識し, FRUIT法による組織透明化を施した後, 体壁に広がった標識細胞を3次元的に解析した。解卵4.5日, 5.5日において, 側板細胞は側方へ広がっていた。解卵6.5日では, 側板細胞の一部が体壁の深層を頭側へ移動していた。頭尾軸レベルの異なる2ヶ所の側板細胞を標識した結果から, 深層を移動する尾側部側板細胞は, 浅層を側方に広がる頭側部側板細胞の深層に潜り込むように移動していることが明らかとなった。ニワトリの体壁発生過程において, 側板細胞は, 浅層を外側へ移動する経路と, 体節細胞と同様に体壁の深層を頭側へ移動する経路との2つの経路で移動することが示された。

17 Xpaマウス精子形成不全におけるオートファジーの解析

○中根裕信, 小山友香, 海藤俊行
鳥取大学医学部解剖学講座

A群色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum:XP)は, 日光紫外線による高頻度の皮膚癌発生や重篤な精神神経症状, 性腺発育不全を示し, スクレオチド除去修復(nucleotide excision repair:NER)機構に異常をもつヒト遺伝性疾患である。

我々は, A群色素性乾皮症遺伝子(Xpa遺伝子)を欠損したマウス(Xpaマウス)を作成し, Xpaマウスが, 紫外線誘発の皮膚癌および自然発生癌を高率に発生し, さらに精子形成不全となることを明らかにした。しかしながら, Xpaマウスの精子形成不全の病態は不明であった。我々は, 3ヶ月令Xpaマウス精巢を調べたところ, 大きな空胞がXpaマウス精細管には多く生じていたが, 対照群には見られなかった。そこで, オートファジーマーカーのmicrotubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)抗体を用いて検索したところ, 免疫組織化学的方法でXpaマウス精細管において変性過程の細胞に強いLC3のシグナルを認めた。さらに同精巢のWBでLC3-IとLC3-II(オートファジー誘導でLC3-Iから変化する)の発現も検出しオートファジーの誘導が確認できた。一方, 対照マウス精細管ではLC3強陽性の変性細胞は認めず, WBでLC3-IIの発現も見られなかった。このことから, Xpaマウスの精子形成不全の病態に, オートファジーの誘導が関与することが示された。

18 Au(I)錯体含有発光有機シリカナノ粒子の合成と細胞蛍光イメージング

○望月ちひろ, 中村純奈, 中村教泰
山口大学大学院医学研究科器官解剖学講座

蛍光イメージングは、蛍光プローブを細胞や組織などに標識し視覚化する技術である。また高感度、高時間分解能、マルチチャンネル、低コストといった大きな利点がある。また蛍光ナノ粒子は、*in vitro*, *in vivo*において、蛍光プローブとしての高い蛍光強度と光安定性により、蛍光を含むマルチモーダルイメージングに有望な材料である。中でも蛍光シリカナノ粒子は多機能化や生体適合性により、蛍光イメージングへの応用が期待されている。従来の蛍光シリカナノ粒子の合成には有機色素や発光元素が用いられてきた。本研究では、Au(I) の多核錯体の発光に着目した。Au(I)錯体は、強いAu(I)-Au(I) 相互作用により Au(I)-Au(I) 間の距離が近づくことで発光特性を示す。この発光は、良好な光安定性、大きなストークスシフトを有することが知られている。よって、Au(I)錯体の発光は蛍光イメージングの新しい蛍光プローブとして有望と考えられる。我々は新たなシリカ粒子であるチオール有機シリカナノ粒子内に Au(I)錯体を含有させ、発光特性を付与させることに成功した。この Au(I)錯体含有有機シリカナノ粒子は赤色発光を有していた。本発表では、Au(I)錯体含有有機シリカナノ粒子のサイズ制御、発光特性、生体応用に向けた物性評価、さらに細胞蛍光イメージングについて報告する。

19 Network Microscopy の試み

松田宣昭^{1,2*}、清藤恵美^{1,3}、佐藤慧太⁴、市川聡⁵、樋田一徳^{2,4,5}

1 川崎医療福祉大学大学院医療技術学専攻、2 川崎医科大学中央研究センターバイオイメージングユニット、3 川崎医療福祉大学医療技術学部臨床検査学科、4 川崎医科大学解剖学、5 大阪大学超高压電子顕微鏡センター

川崎医科大学中央研究センターは、川崎学園施設（医科大学、医療福祉大学、総合医療センター等）の共同研究施設として様々な研究機器が設備されている。しかし、主要機器が整備される医科大学と離れた総合医療センターなどの施設の研究者にとり研究活動に困難を伴っているのが現状である。加えて新型コロナウイルスの感染拡大のため施設間の移動を要する研究に支障をきたしている。そこで、施設間の移動を伴わず研究が行えるよう、本学の電子顕微鏡等の諸機器を遠隔地から、また学外施設（大阪大学の超高压電子顕微鏡）を本学から観察するシステムの構築を試みている。

本学の電子顕微鏡はJEM -1400 (JEOL) を使用した。顕微鏡のオペレーション PC に直接 LAN を介することが出来ないため、モニターの信号を分配する必要があった。そこで、USB キャプチャーを使用し分配信号を Web 会議アプリ上で画面共有し、遠隔地と同時観察をしている。大阪大学の超高压電子顕微鏡は、電子線トモグラフィーの連続傾斜撮影を行うため 4K カメラ用モニターと解析用モニターを頻繁に切り替える必要があり、可動性を考慮し iPad と ZOOM を使用した。その結果、大阪大学との観察では iPad でモニターを映しているため微細構造の観察が難しかったが、ZOOM や Microsoft Teams を併用することで画面上に文字や線の入力やマウスポインタで任意の箇所を伝えることができスムーズに行えた。移動が困難な場合や共同研究で複数の遠隔地から電子顕微鏡観察に参加したい場合などには有効であると考え。Web 会議アプリ上のモニター画面の解像度の向上が必要と考え、現在改良を加えている。

20 マウス輪回し行動解析における新規マイクロコントローラシステムの構築

相澤秀紀, Meina Zhu, Deepa Kamath Kasaragod, 菊谷知也, 田口慧 (広島大学・医・神経生物学)

輪回し行動は、睡眠や概日リズム、自発的運動意欲を測定する上で有用な指標であり、精神疾患や神経疾患の疾患モデルマウスの表現型解析に広く用いられている。しかし、測定に必要なコンピュータやインターフェース機器を清浄度の高い動物実験施設へ設置する必要があり、測定準備が煩雑な場合がある。我々は、この問題を解決するため、バッテリー駆動のマイクロコントローラを用いて単独稼働可能な計測システムを開発した。Wheel Running Activity Acquisition (WRAQ) システムと呼ぶこの機器では、30 日以上に渡る長期間の測定データを随時無線接続でサーバーと共有し、行動のオンラインモニタリングが可能にしている。実際、マウス敗血症モデルや化学遺伝学による神経回路操作による行動異常を WRAQ システムにより検出することに成功している。WRAQ システムは、組み立てや解析に必要なプログラムやハードウェア設計図をインターネット上で公開しており、今後幅広いユーザの使用によりその発展的な開発が期待される。