

# 日本解剖学会

## 第109回関東支部学術集会

会期：令和3年9月11日（土）

会場：オンライン開催（Zoom）

### 特別講演

破骨細胞による骨吸収と脂質代謝との接点を探る

羽毛田 慈之

明海大学歯学部

我々は、骨代謝研究の創成期から約40年間、骨組織を構成する細胞（骨芽細胞・骨細胞・破骨細胞）の分化機能の解析を行ってきた。その多くは独自の細胞学的手法を用い、これまで困難とされてきた骨構成細胞の分離方法の開発によって遂行されてきた。とりわけ、日本の骨吸収を担う破骨細胞の研究は世界をリードしてきた。その多くの研究の中でも画期的な研究として、我々の教室（久米川正好先生グループ）から発信した骨有機基質の分解の主役を演じるカテプシンKの発見、昭和大学（須田立男先生グループ）による破骨細胞分化を引き起こすRANKLと分化を抑制するOPGの発見が挙げられる。これら二つの研究の発見の後、我々は、破骨細胞のマスター転写因子遺伝子の解明を目指し、RANKL依存的に発現誘導される遺伝子の解明を試みた。しかし残念ながら、同時期に高柳広先生グループ（東京医科歯科大学、現東京大学）によって発表されたNFATc1の発見には至らなかった。その代わりに、cholesterol (Chol)-richな細胞膜ドメインであるlipid raft及びcaveolaeの裏打ちタンパク質であるcaveolin (Cav)-1が非常に高い頻度で同定された。このことが私の骨代謝と脂質代謝の接点を探る研究の始まりとなった。本講演では、(1)破骨細胞分化におけるCav-1と細胞膜Cholの役割、(2)破骨細胞分化に対するlow-density lipoprotein (LDL) receptor及び酸化脂質受容体LOX-1の役割、(3)LDL receptorを介したLDL uptakeから惹起される細胞膜外葉へのphosphatidylethanolamine (PE)転座が果たす破骨細胞の細胞融合に対する役割を述べ、破骨細胞分化における脂質の役割を考察したい。

### 1 細胞細胞膜修復に関わる小胞体由来の膜供給の可能性

廣瀬由衣<sup>1)</sup>・三宅克也<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 国際医療福祉大学医学部・<sup>2)</sup> 国際医療福祉大学成田キャンパス基礎医学研究センター

細胞膜修復は小胞融合による開口分泌によって修復される。しかし、それらの小胞の由来や膜修復機構は明らかにされていない。本研究では、膜修復中の小胞体を観察するため、二光子レーザーを用いて培養細胞に膜損傷を行い、DiI、ER-Tracker、またはGFP-KDEL、Sec61 $\beta$ を発現させLIVEイメージングを行った。また、小胞体からゴルジ体シス囊への順行輸送を阻害するBrefeldin A(BFA)を用い、細胞膜損傷後の小胞体の動態を観察した。さらに、マウス骨格筋を用い同様の観察を行った。その結果、細胞外カルシウム存在下で、細管状の小胞体は損傷部のみにおいて瞬時に崩壊し、多くの小胞に変化した。それらの小胞は膜修復後融合しながら元の細管状の形態に戻った。一方、修復できなかった細胞は細管状の小胞体に戻らず泡沫状形態を呈した。この形態変化はFM4-64との組み合わせにより、細胞膜修復完了の確認に有効であった。しかしながら、数多くの細分された小胞体の小胞が、損傷部に直接融合する明瞭な膜融合は観察できなかった。そこで、Airyscanにより準超解像度レベルで観察を行ったところ、膜修復時に小胞体から細胞膜へ細く伸びた管や、それに続く小胞縦隊が観察された。また修復膜にも多くの小さなSec61 $\beta$ の蛍光顆粒が見られ、小胞体由来の膜が膜修復に関わっている可能性が考えられた。さらに、BFA処理した細胞の小胞体は、損傷時に小胞になり管状の小胞体に戻らないなどの異常形態をとりながら細胞膜に融合する様子が観察された。マウス骨格筋にsec61 $\beta$ を発現し筋小胞体の動きを観察したが、培養細胞でみられたような小胞化や融合の様子は観察されなかった。

### 2 細胞膜損傷時のカルモジュリンとアネキシンファミリーの動態

真島静<sup>1)</sup>・三宅克也<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 国際医療福祉大学医学部・<sup>2)</sup> 国際医療福祉大学成田キャンパス基礎医学研究センター

細胞膜は運動などの機械的負荷により常に傷ついている。この膜損傷部から流入するCa<sup>2+</sup>が引き金となり、細胞内小胞の開口分泌により瞬時に損傷膜が修復される。一方、カルシウムに調整されるカルモジュリン(CaM)は細胞質に豊富に存在し、その下流のCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaM kinase)などのタンパク質が細胞膜修復に関わっていることが報告されているが筋線維では報告がない。また、細胞膜修復に関わるタンパク質として、カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質であるアネキシンファミリーが報告されている。本研究では、高感度検出機能を持つAryscanを搭載した多光子レーザー顕微鏡を使用し、GFPタグを付けたCaM、アネキシンファミリーを発現させた培養細胞(BS-C-1)、生体内に近い筋組織、または分離筋線維を用いてLIVEイメージングを行った。培養細胞および筋線維内で、アネキシンファミリー(A1、A2、A4、A5、A6、A7およびS100A10、S100A11)が、カルシウム依存性の蛍光波として膜損傷部に集まる様子が観察された。しかしながら、小胞融合は確認できず、カルシウムが結合できないドミナントネガティブ体を導入した細胞でも膜修復を阻害できなかった。Cal520によってアネキシン動態との同時カルシウムイメージングも行ったが、アネキシンは細胞膜損傷によって生じるミリ秒単位の細胞内カルシウム波に対応せず、30秒〜3分単位のゆっくりとした反応であった。それに比べ、GFP-CaMは膜損傷後すぐに反応し損傷部へ集積した。筋線維のCaMは膜損傷後素早く損傷部に強く集積したが、アネキシンとは異なる局在を示した。

### 3 細胞膜損傷による隔離膜形成と開口分泌

小西真衣<sup>1)</sup>・三宅克也<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 国際医療福祉大学医学部・<sup>2)</sup> 国際医療福祉大学成田キャンパス基礎医学研究センター

損傷細胞膜はライソゾームの開口分泌によって修復されるとされている。しかしながら、形態学的にライソゾームによる膜修復は未だ捉えられていない。本研究では透過型電子顕微鏡およびLIVEイメージングを用いて膜損傷後の細胞質の動態を観察した。BS-C-1などの培養細胞をHRP中で損傷後、15秒、3分、1-72時間と回復時間をおいてから固定した。その結果、24時間後には膜によってHRPが隔離され、36-72時間にはライソゾーム様の大きな隔離小胞が増加した。この現象をLIVEイメージングにより確認するため、Fdx-Lys-Dextran(10kD)またはAlexa555-Dextran(10kD)をスクラッチローディングにより細胞内へ導入して経時的変化を72時間観察した。その結果、24〜72時間と時間が進むに連れて、細胞内で隔離された小胞が多く観察された。これらの隔離された小胞を持つ細胞を二光子レーザーで再び膜損傷修復すると、多くの隔離小胞は損傷部でない近くの細胞膜に融合する開口分泌が確認された。さらに、これらの細胞にlgp120-GFPを導入したところ隔離小胞の多くはライソゾームと考えられた。また、マウスにFdx-Lys-Dextranを腹腔注射したところ、数日後多くの隔離小胞を持つ細胞が皮下組織中に確認された。これらの細胞を二光子レーザーで膜損傷したところ、活発な開口分泌がex vivo実験でも確認された。尚、無傷細胞を用い、lgp120-GFP導入標識したライソゾーム、またはLC3-GFP導入標識したオートファゴソームを観察したところ、膜損傷またはイオノマイシンによって細胞内カルシウム上昇を引き起こしてもこれらは開口分泌されることはなかった。

### 4 Rabファミリー低分子量Gタンパク質による膜修復機構

○村井花奈<sup>1)</sup>・江上洋平<sup>2)</sup>・川合克久<sup>2)</sup>・遠藤剛<sup>3)</sup>・荒木伸一<sup>2)</sup>・三宅克也<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 国際医療福祉大学医学部・<sup>2)</sup> 香川大学医学部組織細胞生物・<sup>3)</sup> 千葉大学大学院理学研究部生物学研究部門・<sup>4)</sup> 国際医療福祉大学成田キャンパス基礎医学研究センター

骨格筋線維は運動などの生理的な物理的負荷によって、その5-30%が常に損傷修復を繰り返している。Dysferlin欠損による肢体型筋ジストロフィーは細胞膜の修復ができないことが知られているが、その膜修復機構は未だ明らかになっていない。本研究は膜輸送に必要な因子として知られるRabファミリー低分子量Gタンパク質と膜修復機構について検討した。培養細胞BS-C-1を用い、膜標識試薬FM4-64とGFP-Rab1a、Rab3a、Rab4a、Rab5a、Rab7、Rab8、Rab10、Rab11、Rab20、Rab21、Rab23、Rab24およびRab34を用いて、それらの膜修復時の動態を多光子レーザー顕微鏡で観察した。二光子レーザーで損傷された部位に、FM試薬で強く標識された修復膜が観察されたが、その部位に供給されるGFPの膜動態はどのRabについても観察されなかった。その中のRab23およびRab34を詳細に観察したところ、膜修復周辺部に小さな斑点部周辺にやや強い蛍光リングが観察された。さらにマウス骨格筋を用い、エレクトロポレーションによってGFP-Rab3a、Rab10、Rab23、Rab34、lgp-120およびGFP-Dysferlinを発現させ、培養細胞と同様に膜損傷を起こして膜修復動態を観察した。その結果、Rab23およびRab34がDysferlinと同じようにT細管と筋線維膜に局在し、膜損傷部およびその周辺に強く集積する動態が観察された。さらに、これらのドミナントネガティブ体は骨格筋線維の膜修復を阻害した。これらの結果から、Rab23とRab34が細胞膜修復に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## ラット結腸への動脈分布パターン

木賀田 哲人<sup>1</sup>、柴田秀史<sup>2</sup>、小林 靖<sup>1</sup><sup>1</sup>防衛医科大学 解剖学講座<sup>2</sup>東京農工大学 獣医解剖学研究室

ラットを用いた消化管移植や消化管吻合治療モデルの作出に際して、結腸の一部あるいは全摘出術が行われる。再現性のある処置を行うためには、結腸へ分布する動脈の詳細な分岐パターンや起こりうる変異について把握することが重要であると考えられるが、先行研究における記載は不十分である。そこで本研究では Wistar 系ラット 3 4 匹(雄 1 7 匹、雌 1 7 匹)を用いて、結腸への動脈分布パターンを観察した。ラット結腸には前腸間膜動脈より起始する回結腸動脈、右結腸動脈、中結腸動脈と、後腸間膜動脈より起始する左結腸動脈が分布していた。左結腸動脈の分岐パターンに変異は観察されず、全例において 1 本の左結腸動脈が下行結腸へと分布していた。一方で、回結腸動脈、右結腸動脈、中結腸動脈の分岐パターンにおいては個体差が観察された。回結腸動脈からは 1 本(12%)または 2 本(88%)の結腸枝が起始し、上行結腸の近位部へと分布していた。結腸枝は上行結腸の起始部において網目状の吻合を形成しており、その密度には個体差が観察された。右結腸動脈は 1 本(74%)または 2 本(26%)存在し、上行結腸と右結腸曲へと分布していた。中結腸動脈は 1 本(38%)、2 本(56%)または 3 本(6%)存在し、横行結腸、左結腸曲、下行結腸近位部に分布していた。中結腸動脈の分布パターンには多様な個体差が存在し、計 11 パターンが観察された。ラット結腸への詳細な動脈分布パターンや起こりうる個体差に関する知見は、適切な外科処置を行うために有用である。

## 筋腱接合部：発育過程における Sox9 発現のスイッチング

廣内英智<sup>1</sup>、山本将仁<sup>1</sup>、関谷紗世<sup>1</sup>、山中 基<sup>1</sup>、渡辺元次<sup>1</sup>、金平 智恵美<sup>1</sup>、高木貴博<sup>1</sup>、山本 悠太郎<sup>1</sup>、松永 智<sup>1</sup>、北村 啓<sup>2</sup>、阿部伸一<sup>1</sup><sup>1</sup>東京歯科大学 解剖学講座<sup>2</sup>東京歯科大学 組織・発生学講座

目的：Sox 遺伝子群のなかで Sox9 (SRY-box9) は、哺乳類の性分化だけでなく軟骨形成に必須の役割をもつ転写因子であることが報告されている。しかし、これまで複合体である筋骨格系の構築過程における Sox9 の関与については報告がなかった。そこで本研究では、ダブルトランスジェニックマウスを作成し、筋骨格系の発育過程における Sox9 発現に関する組織内の局在について検索を行った。

方法：試料として C57BL6J マウス、Sox9creER; R26tdTomato マウス、Wnt1Cre; Sox9flox/+マウスを用いた。それぞれのマウスに対して通常に従い凍結ならびにパラフィン包埋を行い、5-10 μm にて薄切後、各種染色を施した。筋骨格系の発育過程における Sox9 発現細胞の系譜解析の為に、Sox9creER; R26tdTomato の胎生 9、12 日齢にタモキシフェンを投与し、胎生 18 日齢にて解析した。また、Wnt1Cre; Sox9flox/+マウスに対して組織学的解析により、頭部神経堤領域における Sox9 の機能についても検索を行った。

結果と考察：検索結果から、筋の骨への付着部付近で Sox9 が発現した幼弱な細胞は腱組織ではなく、筋線維へと分化成熟したことを証明できた。また経時的に Sox9 の発現部位は、筋束末端の幼弱な細胞が存在する部位から、将来の腱組織へ成熟する部位、そして腱が付着する骨組織と発現部位を移動していることも見出した。これらの結果は、筋骨格系を構成する各コンポーネント(筋、腱、骨)で Sox9 の発現をオンにすることが、筋骨格系の組織構築に不可欠であることを示している。

## 蛍光チラミド増感法の開発とその応用

山内健太<sup>1,2</sup>、岡本 慎一郎<sup>1,2</sup>、古田貴寛<sup>3</sup>、小池正人<sup>1,2</sup>、日置寛之<sup>1,2</sup><sup>1</sup>順天堂大学医学部 神経生物、<sup>2</sup>順天堂大学 健康総合科学先端研究機構、<sup>3</sup>大阪大学大学院歯学研究科 口腔解剖第二教室

Tyramide signal amplification (TSA) is a highly sensitive method for histochemical analysis, including immunohistochemistry, immunofluorescence (IF), and DNA and RNA in situ hybridization (ISH) histochemistry. Previously, we reported a straightforward and cost-effective TSA system, BT-GO (Biotinylated Tyramine-Glucose Oxidase), for bright-field imaging. Here, we developed FT-GO (Fluorochromized Tyramide-Glucose Oxidase) as a multiplex fluorescent TSA system. FT-GO involves peroxidase-catalyzed deposition of FTs with hydrogen peroxide produced in enzymatic reaction between glucose and glucose oxidase. Using a neuronal marker, NeuN/Rbfox3, we showed that FT-GO markedly enhanced IF signals while maintaining low background signals. Compared with a conventional indirect detection, FT-GO demonstrated a more widespread distribution of monoaminergic projection systems in the mouse brain. We further applied FT-GO to multiplex mRNA fluorescent ISH histochemistry and succeeded in labeling specific neocortical interneuron subtypes by coupling with indirect IF detections. Given its simplicity, cost-effectiveness and a staining with a high signal-to-noise ratio, FT-GO would provide a versatile platform for histochemical analysis.

## 涙道関連リンパ組織におけるM細胞による抗原取り込み機構の解析

大谷祐貴、木村俊介、中村有孝、長谷耕二

慶應義塾大学薬学研究所 生化学講座

眼は空気中や皮膚から侵入してくる抗原に晒されており、涙液中のIgA抗体が防御機構として働く。その産生は抗原が粘膜上皮を通過し涙道と粘膜に存在する粘膜関連リンパ組織内の抗原提示細胞に認識されることで開始する。M細胞は粘膜上皮を構成する上皮細胞であり、管腔内物質の取り込みを担う細胞である。涙道関連リンパ組織TALT: tear duct-associated lymphoid tissueの濾胞関連上皮にはM細胞が存在することが報告されているが、その研究は進んでいない。本研究ではTALTにおけるM細胞の分子マーカーと分化機構を解析し、免疫応答への関与を検証した。マウス顔面部から涙嚢を含む鼻涙管を摘出しホルマリン固定免疫染色を行った結果、涙嚢部にB細胞の集積を認めた。また、ヘマトキシリン・エオジン染色した組織切片において、同じ部位にTALTの存在を確認した。続いて、複数の腸管M細胞マーカーによる免疫組織染色を行い、GP2, Sox8, Tnfrap2陽性細胞がTALT濾胞関連上皮に存在することを見出した。この細胞は点眼した微粒子を取り込むこと、腸管や呼吸器におけるM細胞誘導因子であるRANKLの腹腔内投与により増加したことから、TALT M細胞であると結論付けた。続いて、卵白アルブミン (OVA: ovalbumin 抗原) とコレラ毒素を点眼して免疫応答を誘導した結果、RANKL投与群では涙液中のOVA特異的IgA抗体が増加していた。これはTALT M細胞の増加が眼部の粘膜免疫応答を活性化させる可能性を示唆している。これまでM細胞の解析は腸管と呼吸器において行われてきた。これらの組織は単層上皮で覆われる一方で、TALTを覆うのは重層扁平上皮である。本研究から、RANKLによるM細胞分化誘導は上皮の形状に関わらず共通すること、さらに、粘膜上の異物がM細胞を介して重層上皮を越えて取り込まれる機構が明らかになった。本研究の成果を応用することで、点眼による粘膜免疫応答の活性化を利用したワクチン開発につながる可能性がある。

## Passenger Leukocytesの選択的除去による新しい移植免疫応答抑制法の開発

上田祐司、北沢祐介、沢登祥史、松野健二郎、徳田信子

獨協医科大学医学部 解剖学講座

移植免疫応答には移植片拒絶とGvHDがあり、相反する応答はどちらも増大すると致命的となる。免疫抑制薬の発展により移植成績は飛躍的に改善したが、その薬効は免疫系全体に及ぶため癌や感染症に罹患するリスクを伴うのが現状である。このような背景から移植免疫応答の特異的抑制法の開発が望まれてきている。我々は移植免疫応答を組織形態学的に解析する過程で、ドナー臓器に内包される白血球 (passenger leukocytes PL) とレシピエント免疫細胞との相互作用が応答の鍵となることを見出した。本発表ではラット移植片拒絶と急性GvHDにおけるPLの役割と、それらを選択的に除去することによる移植免疫応答の特異的抑制法について発表する。

ラット肝臓には非実質細胞が約 5 x 10<sup>7</sup> 個存在し、移植により 10%程度が PL としてレシピエントの脾臓やリンパ節、パイエル板などの二次リンパ器官に遊走する。PL 成分中のドナー樹状細胞 DC は遊走先のレシピエント T 細胞に自身の主要組織適合抗原 MHC を直接提示することで、T 細胞に抗ドナー-MHC 応答を激しく惹起した。一方、PL 中のドナー T 細胞はレシピエント DC 上の MHC で活性化され、免疫抑制下のレシピエントにて激しい増殖性応答を示した。このような相互作用が移植後 1 日目より開始されており、これがやがて拒絶や GvHD として顕在化することが明らかとなった。そこでこれらの結果をもとに、臨床応用可能な免疫抑制法として、臓器保存液中で DC あるいは T 細胞に対する抗体を反応させた上で移植したところ、目的細胞だけを除去することで拒絶や GvHD を抑制することに成功した (特許取得)。本法は、移植免疫だけを抑制可能で、かつ抗体のカスタマイズや副作用も要さないことから新たな免疫抑制法として有用であると期待される。COI: なし

## 分子モーターMyosin Idは樹状突起棘に局在する

佐々木 哲也、大塚優江、岩田 卓、武井陽介

筑波大学医学医療系生命科学部 解剖学・神経科学研究室

ミオシンはアクチンと結合する分子モーターである。ミオシン Id は自閉スペクトラム症(ASD)のリスク遺伝子であり、脳内の発現分布およびニューロンでの局在や機能は不明である。ミオシン Id は成体マウス脳全体に発現が見られたが、線条体、視床、脳幹において特に強く発現していた。培養神経細胞にEGFP 融合ミオシン Id を発現させたところ、樹状突起スパインに集積が認められ、この局在には TH1 ドメインが重要であることが判明した。本研究結果は、ASD 発現・病態における本分子の役割を理解する手がかりを与えられ、考えられる。

## 11 PRKN変異患者ドバミン神経細胞におけるミトコンドリアスフェロイド化応答の電子顕微鏡解析

横田睦美<sup>1</sup>、角田 宗一郎<sup>2</sup>、吉野 佑太郎<sup>1</sup>、志賀孝宏<sup>3</sup>、石川景一<sup>3,4</sup>、岡野栄之<sup>5</sup>、服部信孝<sup>4</sup>、赤松和士<sup>3</sup>、小池正人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>順天堂大学医学部 神経機能構造学講座 <sup>2</sup>順天堂大学 形態解析イメージング研究室

<sup>3</sup>順天堂大学 ゲノム再生医療センター <sup>4</sup>順天堂大学医学部 脳神経内科

<sup>5</sup>慶應義塾大学医学部 生理学教室

パーキンソン病は中脳黒質におけるドバミン神経の変性を特徴とする神経変性疾患である。家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つであるPRKNは、ミトコンドリアの品質管理（良質なミトコンドリアを維持する機構）に関与している。病態発症の要因としてこのミトコンドリアの品質管理の破綻による損傷ミトコンドリアの蓄積が示唆されているが、ドバミン神経特異的な細胞死の機序については不明な点が多い。

我々はドバミン神経細胞を特異的に標識、解析するため、ドバミン神経マーカーであるTyrosine Hydroxylase (TH) 遺伝子にGFP遺伝子をノックインしたTH-GFP iPS細胞株を健常者及びPRKN変異患者において作出している。これらのTH-GFP iPS細胞株から分化誘導を行ったGFP発現ドバミン神経細胞について酸化ストレス処理を行い、光顕・電顕相関観察を行った。

その結果、酸化ストレス処理を行った健常者ドバミン神経細胞においてはミトコンドリアが管状からスフェロイド状へと形態変化していることが明らかとなった。本学術集会では、この酸化ストレスによるミトコンドリアスフェロイド化応答について健常者と患者の応答の違いや酸化ストレス処理時のオートリソソーム形成の健常者と患者の違いについて報告する。

## 12 神経前駆細胞およびオリゴデンドロサイト前駆細胞の維持に関わる分子機構の解明

備前典久<sup>1</sup>、Anna Simankova<sup>1</sup>、Asim K Bepari<sup>1</sup>、周 麗<sup>1</sup>、阿部 学<sup>2</sup>、崎村建司<sup>2</sup>、小野勝彦<sup>3</sup>、竹林浩秀<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新潟大学大学院 歯学総合研究科 脳機能形態学分野

<sup>2</sup>新潟大学 脳研究所 モデル動物開発分野

<sup>3</sup>京都府立医科大学大学院 神経発生生物学

Olig2は、発生期の腹側背髄の脳室帯に発現するbHLH型転写因子であり、オリゴデンドロサイト(OL)や運動ニューロンの発生に必須であること、神経前駆細胞(NPC)の増殖にも関与することが報告されている。しかし、Olig2による細胞増殖・分化制御の分子機構の詳細については未だ不明な点が多い。我々は、酵母ツーハイブリッド法によりOlig2と結合する因子としてDEAD-box型RNAヘリカーゼDdx20を新たに同定した。Ddx20はスプライシング、RNA輸送、miRNAの生合成などのRNA代謝に関与するほか、転写調節因子としても働く多機能な因子として知られている。NPCおよびOL前駆細胞(OPC)特異的Ddx20欠損マウスを解析したところ、NPCおよびOPCにおいてp53経路活性化による細胞死および細胞増殖の低下が認められた。これらの結果より、Olig2結合因子のDdx20は、p53経路の活性化を抑えることによりNPCおよびOPCの維持に関わっていることが示唆された。

## 13 シュワン細胞発生におけるRNAヘリカーゼDdx20の機能解析

益子洋樹、備前典久、竹林浩秀

新潟大学大学院 歯学総合研究科 脳機能形態学分野

シュワン細胞は末梢神経軸索にミエリン鞘を形成し、軸索伝導の調節や軸索保護に寄与する。末梢神経系における髄鞘形成の破綻は、シャルコー・マリー・トゥース病などの難治性神経疾患を発症する。我々はこれまでにRNA代謝や転写調節に関与するRNAヘリカーゼDdx20 (DEAD box protein 20)が、中枢神経系におけるオリゴデンドロサイトの分化と髄鞘形成に不可欠であることを明らかにした。シュワン細胞発生におけるDdx20の役割を解明するため、シュワン細胞特異的Ddx20欠損マウスを作製した。免疫組織化学およびin situ hybridization法によって組織学的な解析を行ったところ、Ddx20欠損マウスのシュワン細胞において、p53の蓄積とp53標的遺伝子発現の亢進が認められた。これらの結果は、Ddx20がシュワン細胞の発生に不可欠な因子であることを示唆している。

## 14 移動神経細胞における低分子量Gタンパク質Arf4の機能的役割

原 芳伸、阪上洋行  
北里大学医学部解剖学教室

神経細胞移動は脳形成期に見られる現象であり、その異常は重篤な脳構造異常を引き起こす。放射状グリアにより生み出された幼若神経細胞は、接着分子や受容体などを細胞内小胞輸送により絶えず再配置しながら脳表層に向かって移動する。近年、RabやADPリボシル化因子(Arf)などの低分子量Gタンパク質を介した膜分子のリサイクリング機構の重要性が明らかになってきたが、分泌経路については制御分子や積荷分子、リサイクリング経路との機能的住み分けの分子機構など不明な点が多い。そこで本研究では、主に分泌経路の小胞輸送に関わるArf4およびArf5に着目し、幼若神経細胞における発現局および機能解析を行った。特異抗体を用いた免疫組織染色による細胞内局在解析の結果、Arf4は幼若神経細胞では主にゴルジ装置、トランスゴルジ網、およびリサイクリング小胞に局在していた。子宮内電気穿孔法によるArf4およびArf5のノックダウン実験の結果、Arf4がノックダウンされた幼若神経細胞は、皮質板への移動が阻害されており、そのような細胞ではゴルジ装置が肥大し、トランスゴルジ網が縮小していた。一方、Arf5がノックダウンされた幼若神経細胞は、皮質板への移動は阻害されなかったが、Arf4ノックダウンと同様にゴルジ装置の肥大とトランスゴルジ網の縮小が生じていた。これらの結果から、Arf4とArf5は、幼若神経細胞においてゴルジ装置からトランスゴルジ網へ的小胞輸送に関して重複した役割を持つとともに、Arf4は、Arf5とは異なる特異的な機能を介して神経細胞移動の制御に関与することが示唆された。

## 15 ライブ観察による口蓋突起挙上時の組織変形の解析

長坂 新<sup>1</sup>、崎山浩司<sup>1</sup>、坂東康彦<sup>1</sup>、小野澤 豪<sup>1,2</sup>、天野 修<sup>1</sup>

<sup>1</sup>明海大学歯学部 解剖学分野

<sup>2</sup>明海大学歯学部 口腔顎顔面外科学I

二次口蓋は、舌をはさむように位置する左右の外側口蓋突起が舌の沈下に伴って水平方向に挙上し、やがて正中中部で接着・癒合することによってその形ができてくる。この発生過程のどこかに異常が生じると口蓋裂が発症することとなる。マウスを用いた解析によって口蓋裂発症に対する生化学的な理解が進んでいる一方、二次口蓋の正常な発生過程でその組織自体がどのように変形するのか、他の口腔組織とどのように協調しているのかなどは不明な点が多い。そこで本研究では、口蓋発生過程の中でも特に大規模な組織変形を伴う「外側口蓋突起の挙上」という現象に着目し、変形の過程を明らかにすることを目的とした。大脳原基の観察などで用いられるライブ観察法をマウス胎仔の口蓋突起に応用し、リアルタイムでの組織変形を経時観察した。条件検討の結果、6時間のライブ観察を行うことができ、口蓋突起の挙上を観察することができた。口蓋突起の角度変化を1時間ごとに調べたところ、口蓋突起は常に舌側方向へ挙上を続け、6時間で約12°の変形があった。また、口蓋突起の舌側はより鋭角に変形し、6時間で約17°、頬側は鈍角に変形し6時間で約2°の変形があった。今回、口蓋突起挙上のリアルタイムでの観察を目指しライブ観察法の構築を行なった。その結果、6時間の組織変形を観察することができ、口蓋突起の部位特異的な変形度合いの違いを観察することができた。本研究で用いたライブ観察法は市販の標識試薬を用いて簡便に組織および組織内の細胞を可視化した観察することが可能であり、マウス胎仔の口蓋突起以外の組織にも応用が可能と考えられる。

## 16 マウス成長板のseptoclastにおけるインテグリンα2の局在

坂東康彦<sup>1</sup>、小野澤 豪<sup>1,2</sup>、長坂 新<sup>1</sup>、崎山浩司<sup>1</sup>、大和田裕二<sup>3</sup>、天野 修<sup>1</sup>

<sup>1</sup>明海大学歯学部 解剖学分野

<sup>2</sup>明海大学歯学部 口腔顎顔面外科学I

<sup>3</sup>東北大学大学院医学系研究科 器官解剖学分野

septoclastは長管骨成長板の骨軟骨境界部で非石灰化軟骨基質の横隔に突起を伸ばし、その吸収に関与する単核の食細胞である。我々はこれまでにseptoclastが血管周皮細胞(ペリサイト)に由来し、表皮型脂肪酸結合タンパク(E-FABP/FABP5)が発現することを報告した。

今回我々は軟骨基質に多く含まれるII型・X型コラーゲンと接着するインテグリンα2β1のseptoclastとペリサイトにおける局在を免疫組織化学的に調べた。生後2-3週齢のddYマウス脛骨頭矢状断の凍結組織切片を作製し、免疫組織化学的染色を行った。抗インテグリンα2抗体、抗E-FABP抗体、抗PGPRβ抗体をそれぞれインテグリンα2β1、ペリサイト/septoclast、ペリサイトを検出するために用いた。

その結果、インテグリンα2はseptoclastに局在していたがペリサイトはその発現を欠いていた。X型コラーゲンは骨端板の非石灰化基質である横隔と石灰化基質である縦隔の両方に強い局在が見られたが、II型コラーゲンは縦隔にのみ弱い局在が見られた。

電子顕微鏡による観察から、septoclastの突起の先端の微絨毛が横隔に進入し、縦隔には細胞質からの短い突起が接しているのが観察された。今回の結果はseptoclastに局在するインテグリンα2β1がseptoclastと骨端板軟骨基質の接着に関与することを示唆する。

## 17 ラット大唾液腺介在部における線維芽細胞と筋上皮細胞の関係

小野澤 豪<sup>1,2</sup>、小笠原悠大<sup>1</sup>、長坂 新<sup>2</sup>、坂東康彦<sup>2</sup>、崎山浩司<sup>2</sup>、天野 修<sup>2</sup><sup>1</sup>明海大学歯学部 口腔顎顔面外科学 I<sup>2</sup>明海大学歯学部 解剖学分野

唾液腺がその機能を発揮するためには、小葉内結合組織と腺上皮の連携が必須であるが、線維芽細胞の分布や形態および腺上皮との関係については不明の点が多い。我々は、ラット大唾液腺について、線維芽細胞に特異的に発現する HSP47 を用いた免疫組織化学的染色を行い、昨年度の本学会でラット大唾液腺において介在部導管に密接する線維芽細胞の局在を報告した。今回は線維芽細胞の三次元的配列と介在部導管に発達する筋上皮細胞との関係を詳細に解析した。

ウィスター系 8 週雄ラットを灌流固定し、3 大唾液腺及び膵臓を摘出、その後、厚さ 20  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、抗 HSP47 抗体を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察を行なった。比較のため、HE 染色と、筋上皮細胞のマーカーである  $\alpha$  平滑筋アクチンに対する抗体を用いた二重免疫染色も行なった。

いずれの大唾液腺においても、小型の線維芽細胞が介在部導管を取り巻くように突起を伸ばし、筋上皮細胞のすぐ外側に鞘状の集団を形成していた。しかし、筋上皮が無い膵臓外分泌部の介在部導管では同様の HSP47 陽性線維芽細胞の集団は認められなかった。

以上の結果から、ラット大唾液腺の介在部導管周囲には、線維芽細胞による鞘状の構造物（介在部導管周囲鞘）が特異的に存在し、導管の長軸方向に縦走する筋上皮細胞の突起とも密接していることから、筋上皮による導管収縮の回復に関与するのではないかと考えられる。