

日本解剖学会

第67回東北・北海道連合支部学術集会

会 期：令和3年9月4日（土）、5日（日）
会 場：Web 開催

特別講演

ミトコンドリア先制医療

阿部 高明・東北大学大学院 医工学研究科/医学系研究科

ミトコンドリアは生体の細胞内エネルギー産生の90%以上を担い、ミトコンドリア機能異常はミトコンドリア由来酸化ストレス (mitROS) の増加と高エネルギー担体ATPの減少により様々な病態を引き起こす。ミトコンドリアの機能低下は、難聴、サルコペニア等の末梢臓器障害やうつ、パーキンソン病等の神経系異常やがんを誘導し寿命を決定する。従って低下したミトコンドリア機能を回復させることこそが QOL を維持した健康寿命をもたらす延長の“セントラルドグマ”である。

我々は植物ホルモンの Auxin としても知られる indole acetic acid (IAA) をリード化合物としたインドール化合物 MA-5 をミトコンドリア内 ATP を増加させる作用があることを見いだした。MA-5 投与により Leigh 線維芽細胞の細胞生存率が上昇し細胞内 ATP 量が増加しかつ mito-ROS 産生は減少することを見いだした (Suzuki T. TJEM 236: 225, 2015)。ミトコンドリア異常症の変異 DNA(4696bp deletion) をミトコンドリアに導入したミトコンドリア病モデルマウス Mitomice (Nakata K. Nat Med 2001) に MA-5 を長期投与すると Mitomice の生存率を上げ、心臓と腎臓のミトコンドリア呼吸鎖蛋白質 Complex IV の Cytochrome c Oxidase 活性が上昇してミトコンドリア機能低下が改善された。

現在我々は、AMED ムーンショットプログラムの支援のもと応用研究を推進しており、その目標である「2040 年までに 100 歳まで健康不安なく人生を楽しむためのサステナブルな医療・介護システムを実現」の達成を目指している。

1 比較形態学をテーマとしたアウトリーチプログラムと地域貢献

長岡朋人（青森公立大学経営経済学部）、矢野航（防衛医科大学校生物学教室）、長岡俊成（大安寺）

ヴェサリウスがファブリカで解剖の到達地点として骨格を示した様に、骨格標本は医学における人体構造の内部性の象徴である。また、初学者にとって、骨格標本は見て触れることによって高い教育効果が期待できる教材である。今回、将来の科学を担う子どもたちの科学リテラシーの向上を目指し、動物骨格標本を用いたアウトリーチプログラムを企画した。青森県の下北半島はブラキストン線を挟んで北海道とは異なる生態系を有し、ニホンザル、ツキノワグマ、ニホンカモシカの北限の地である。2016 年に下北ジオパークが認定され、下北半島の地質構造やそれが織りなす生態系に対して地域住民から深い関心が寄せられるようになった。そこで、青森県むつ市のコミュニティカフェを会場に親子向けのサイエンスカフェを企画した。下北に住む生き物たちを教材として、下北半島の成り立ちから生物の進化の話題を提供するとともに、子どもたちにニホンザルやツキノワグマの実物の骨格標本に触れさせながら、比較形態学の世界を体験してもらった。本発表では実施概要を報告し、比較形態学標本を用いたアウトリーチプログラムの将来性を議論したい。

2 マウスにおける下大静脈発生の時空間的解析

○村嶋亜紀、人見次郎
岩手医科大学 解剖学講座 人体発生学分野

Huntington と McClure によると、下大静脈およびその枝の発生は胎生期に出現する① Posterior cardinal vein (PCV) ② Subcardinal vein (SubCV) ③ Supracardinal vein (SupCV) よりなる両側性の原始静脈系の吻合、偏位、消退によって構成されるとされており、この概念に基づいて多くの発生学的研究が行われ、肉眼解剖における下大静脈の破格を考察するうえでも重要な知見を与えてきた (Huntington and McClure, 1920, 1925)。これらの研究によると、ヒトにおいて、右側 SubCV および SubCV 間吻合は下大静脈腎上部および腎部を、左右 Sub-SupCV 間吻合は左右腎静脈を、右側 SupCV は下大静脈腎下部を、PCV 尾側端および PCV 間吻合は左右の総腸骨静脈を形成する。ところが近年、ヒト胎児を用いた 3 次元的解析から、下大静脈腎下部が PCV に由来することが示され、下大静脈形成において SupCV が寄与しない可能性が示唆された。本研究では、マウス胎児を用いて下大静脈およびその枝の形成過程を時-空間的に解析しその起源を同定するとともに、各原始静脈系の定義について再考察を行う。(COI:No)

3 顕微解剖学的視点からヒトリンパ系を再考する

○千葉智博、白戸佑貴、渡邊誠二、下田浩
弘前大学 大学院医学研究科 生体構造医科学講座

【目的】ヒトリンパ系は組織間質からの過剰な組織液の除去に関与し、細胞の微小環境と代謝向上性の維持に重要な役割を果たしている。がん手術におけるリンパ節郭清等により、集合リンパ管を損傷すると毛細リンパ管で吸収された組織液が漏れ出しリンパの流れが停滞してしまう。ヒトリンパ系の配向性や階層性についての情報は極めて少なく、これらの情報を理解しておくことは形成外科などを中心とした臨床医学だけでなく、リンパ系治療に関わるすべての分野においても有益な情報をもたらすことが期待できる。そこで本研究はヒトリンパ系における配向性や階層性について報告する。

【方法】弘前大学医学部医学研究にご献体頂いたご遺体より上肢、下肢のリンパ節およびその周辺の組織を採取し、マクロ～ミクロ～ナノレベルに至る横断的研究を行った。ヒトリンパ系の配向性について光学顕微鏡を用いて解析した。

【結果】上肢、下肢に分布しているリンパ管の特徴として、毛細リンパ管は真皮層、皮下組織層、筋膜層に分布していた。真皮層に分布していた毛細リンパ管と集合リンパ管は皮下組織層の脂肪間隙をとり集合リンパ管に合流していた。筋膜周辺の毛細リンパ管は筋膜でネットワークを形成し皮下組織層のリンパ節につながる太い集合リンパ管と合流した。

【結論】ヒトリンパ系を顕微解剖学的視点から配向性・階層性を分析した結果、リンパ系の損傷や閉塞によって炎症をはじめとする脂肪組織の病態変化がおり、リンパ液の吸収や輸送不全をもたらすリンパ浮腫を増悪させることが考えられた。本研究所見はヒトリンパ系の配向性・階層性について顕微解剖学的エビデンスに基づく解剖学的基盤を提供する (COI:No)。

4 背側線条体の興奮性シナプスの強度設定は種を超えて保存される

○山崎美和子、宋紅曉、今野幸太郎、渡辺雅彦
北海道大学・大学院医学研究院・解剖発生学教室

脳内の情報処理においては「強いシナプス」と「弱いシナプス」が適切に配置されることが重要である。シナプス強度の主要な決定因子は、速いシナプス伝達を担うシナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体の数や密度であり、マウス海馬や小脳では細胞の種類や入力経路によって大きく異なることが知られている。しかし、出力経路との関係や、果たしてそれが種を超えて保存されるかについては不明である。本研究では、出力経路の異なる投射細胞がそれぞれ複数の経路から入力を受ける背側線条体でのシナプス強度とその配分に関し、マウスと霊長類のコモンマーモセットを用いて比較検討を行った。背側線条体の投射細胞である中型有棘細胞のうち、黒質に直接投射する直接路細胞と淡蒼球外節に投射する間接路細胞は、それぞれドーパミン D1 受容体と D2 受容体の発現により識別することができる。D1 受容体と D2 受容体の YFP レポーターマウスを用いて、包埋後免疫電顕を行いそれぞれの出力経路の皮質線条体シナプス、視床線条体シナプスの合計四種類のシナプスにおける AMPA 受容体密度を比較したところ、シナプスの間で密度の違いは認められなかった。また、主要な抑制性介在ニューロンであるパルブアルブミン陽性細胞のシナプスと中型有棘細胞のシナプスにおける密度にも違いは認められなかった。さらに中型有棘細胞では AMPA 受容体の密度が高い傾向にあり、これは海馬や小脳の投射細胞の主要なシナプスで密度が低く抑えられている点と対照的であった。この特性はコモンマーモセットでも同様に観察された。以上の結果から、線条体の興奮性シナプスの強度設定とその配分は種を超えて保存される重要なしくみであり、代謝型受容体を介するドーパミンやアセチルコリンの神経伝達修飾の影響を大きくしている可能性が示唆される。

淡蒼球外節から線条体への抑制性投射は線条体マトリックス領域に強い選択性を示す

荻部 冬紀・藤山 文乃 北海道大学・医学研究院

淡蒼球外節から線条体への投射の詳細を明らかにする目的で、ウイルスベクターを用いた軸索標識を行った。順行性ウイルスベクターを淡蒼球外節に注入すると、淡蒼球外節からの軸索は線条体の幅広い領域に投射していたが、その投射は一様ではなかった。線条体ストリオソーム領域で強く発現する μ オピオイド受容体の抗体で蛍光免疫染色を行ったところ、淡蒼球外節からの投射はマトリックス領域に対して強い選択性を持つことが分かった。この投射はGABA作動性であった。淡蒼球外節には、主として視床下核や黒質に投射する prototypic 細胞と、線条体のみに投射する arkyptallidal 細胞が存在する。prototypic 細胞の一部も線条体へ投射する軸索側枝を持つ。マトリックス選択性がどちらのタイプに由来するかを明らかにするため、逆行性 Cre 発現ウイルスベクターを用いて、これらの細胞群を別個に標識した結果、どちらのタイプもマトリックス領域に選択性を持つことが分かった。Optogenetics を用いて、電気生理学的な結合を調べたところ、マトリックス領域のアセチルコリン作動性細胞へ淡蒼球外節からの強い抑制性入力記録され、形態学的にも細胞体近辺へのアポジションが頻繁に観察された。以上の結果から、淡蒼球外節―線条体投射は、線条体の感覚・運動領域に強く投射し、その局所回路に関与することが示唆された。(COI:No)

視床下部一下垂体系におけるグランイン蛋白の発現パターンの差異

○森永涼介¹、甲賀大輔¹、穂坂 正博²、渡部 剛¹

¹ 旭川医科大学解剖学講座顕微解剖学分野

² 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

【背景・目的】視床下部-下垂体系の神経分泌細胞はペプチドホルモンを放出する神経であり、正中隆起で放出する前葉系と下垂体後葉で放出する後葉系に分けられる。後葉系では、neurophysin が分泌顆粒へのペプチドホルモンの選別輸送・蓄積過程で働いていると考えられてきた。一方で下垂体前葉内分泌細胞では、グランイン蛋白がペプチドホルモン輸送・蓄積を担っている。本研究では、グランイン蛋白が神経分泌細胞のペプチドホルモン輸送・蓄積に関与することを明らかにするために、視床下部-下垂体系におけるグランイン蛋白の発現を免疫組織化学的に検出した。【材料方法】Wistar 系ラット（8-9 週齢）から視床下部、下垂体を採材し、グランイン蛋白であるクロモグランイン（Cg）A、CgB、セクレトグランイン（Sg）2、Sg3 に対する抗体で免疫染色を行った。【結果】正中隆起腹側および下垂体柄の血管周囲には多数の Sg2 および Sg3 陽性神経終末がそれぞれ認められた。また、ここを通過するバソプレシン（VP）およびオキシトシン（OT）陽性神経線維には Sg3 陽性反応のみが認められた。下垂体後葉の VP および OT 陽性神経終末には Sg3 陽性反応が認められたが、Sg2 陽性反応は認められなかった。室傍核および視索上核に分布する VP および OT 陽性神経細胞体も同様に Sg3 陽性反応が認められたが、Sg2 陽性反応はその周囲の神経終末にのみ認められた。【考察】Sg3 は前葉系と後葉系の両方に認められ、視床下部-下垂体系のペプチドホルモン輸送・蓄積に重要な意義を持つことが示された。特に後葉系では neurophysin と共同して Sg3 が働いている可能性があることが新たに示された。

副甲状腺ホルモン投与で誘導される皮質骨多孔化について

○阿部未来¹、山本知真也¹、2、本郷裕美¹、網家憲生¹、長谷川智香¹

¹ 北海道大学大学院歯学研究院 硬組織発生生物学教室

² 陸上自衛隊真駒内駐屯地 北部方面衛生隊²

【目的】骨粗鬆症治療薬として用いられている副甲状腺ホルモン(PTH)製剤は間歇投与により海綿骨の骨量を増加させるが、長期間の継続投与で皮質骨の多孔化を誘導することが報告されている。本研究では、PTH 投与による皮質骨多孔化のメカニズム解明の一助として、PTH 間歇投与マウスの大腿骨を組織化学的に解析した。

【材料と方法】 生後 6 週齢 C57BL/6J マウスに 40 μ g/kg/day の hPTH[1-34] を 1 日 4 回腹腔内投与し、投与 1、3 日、1、2、3 週間後にパラホルムアルデヒド固定を行い、大腿骨・脛骨をパラフィン・エポキシ樹脂に包埋した。これらのサンプルを用いて HE 染色、TRAP 染色、および、各種免疫組織化学 (ALP、endomucin、PDGFBb) を行った。

【結果と考察】 PTH 間歇投与マウスの大腿骨では、経時的に海綿骨が増加する一方、骨幹端部成長板直下から骨幹部に向かって皮質骨が多孔化する傾向が認められた。多孔化した皮質骨の骨内膜側表面には、多数の ALP 陽性骨芽細胞が認められるとともに、TRAP 陽性/ PDGFBb 陽性破骨細胞を伴った endomucin 陽性血管が観察された。同部位では、コントロールマウスと比較して、endomucin 陽性血管が骨内膜側に偏在しており、一部の血管は ALP 陽性骨芽細胞・前骨芽細胞細胞層を貫いて骨表面に近接していた。さらに、endomucin 陽性血管が TRAP/ PDGFBb 陽性破骨細胞とともに、皮質骨内部へと侵入している像も認められた。

以上より、PTH 間歇投与による皮質骨多孔化には、骨内膜側からの破骨細胞を伴う血管侵入に関与する可能性が推測された。現在、これらの組織学的メカニズムについて、詳細な解析を進めている。

(COI : No)

感知系脳室周囲器官神経幹細胞の機能的役割の解明

古部瑛莉子・旭川医科大学解剖学講座機能形態学分野

成体哺乳類の脳で、神経幹細胞が存在し、神経新生が起こる場所として最も研究されているのは海馬歯状回と側脳室下帯であり、海馬歯状回は記憶の形成、側脳室下帯は嗅覚依存行動に関与することが知られる。近年、これらの部位以外に脳室周囲器官にも神経幹細胞が存在することが示されている。しかし、感知系脳室周囲器官である終板器官、脳弓下器官、最後野の神経幹細胞についての特徴や意義についての報告はほとんどない。本研究では、Nestin-CreERT2/CAG-CAT^{loxP}/EGFP マウスおよび BrdU を用いた免疫組織化学の結果から、感知系脳室周囲器官には Nestin 陽性のアストロサイト様神経幹細胞と、ependymal cell layer に存在し、脳実質側に伸びる長い突起を有したタニサイト様神経幹細胞の 2 種類の神経幹細胞が存在することが明らかにした。アストロサイト様神経幹細胞はほぼすべてが GFAP 陽性であったが、タニサイト様神経幹細胞には GFAP 陽性のものとそうでないものが存在していたことから、さらに複数のタイプに分けることができると考えられる。分化について調べたところ、脳室周囲器官だけでなく、隣接した脳部位にも細胞を供給しており、その多くはオリゴデンドロサイトであることが判明した。神経幹細胞の機能的役割を調べるため、マウスに 50w/v%スクロース水を 3 週間飲水させたところ最後野神経幹細胞および前駆細胞の増殖が促進されており、摂食またはエネルギー代謝の制御に関わる可能性が示唆された。

DGK ϵ 遺伝子欠損マウスはインスリン依存的に非震え熱産生機構の障害を引き起こす

中野知之、後藤 薫

山形大学医学部解剖学第二講座

褐色脂肪組織 (BAT) は非震え熱産生機構で中心的な役割を果たす。我々は、 ϵ 型ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK ϵ) 遺伝子欠損 (KO) マウスは、高脂肪食給餌により、脂肪細胞特異的な脂質代謝異常が生じることを報告した。本研究では、DGK ϵ の熱産生機構における役割を解明するために、DGK ϵ -KO マウスを 6℃で飼育し、表現型を解析した。その結果、直腸温と血糖値の有意な低下が認められた。ウェスタンブロット解析の結果、KO マウスの BAT では、交感神経マーカー、チロシン水酸化酵素の発現が顕著に亢進するが、交感神経依存的熱産生の責任分子である UCP1 の発現は、野生型 (WT) マウスとの間に顕著な差は、認められなかった。両マウスの間には、 β 3 アドレナリン受容体 (β 3AR) のタンパク発現には差が認められなかった。しかし免疫組織化学解析の結果、WT マウスにおいて β 3AR は、形質膜に免疫陽性反応が認められるのに対し、KO マウスでは細胞質に顆粒状に検出された。血中インスリンレベルを測定すると、6℃条件において KO マウスでは WT マウスよりも高値を示すことが明らかとなった。インスリンシグナルの下流で働く Akt のリン酸化レベル (活性) は亢進していた。BAT における免疫組織化学解析の結果、KO マウスでは、インスリンにより局在が制御される GLUT4 の形質膜移行が促進していた。以上より、DGK ϵ -KO マウスは寒冷環境において、交感神経の活動が活性化する一方、インスリンレベルの亢進により β 3AR の細胞質への取り込みが生じ、その結果、交感神経シグナルが遮断され、熱産生が不十分となることが示唆された。

表皮型脂肪酸結合タンパク質による phosphatidylserine (PS)接着装置発現制御

○鈴木良地¹、大和田祐二²、板東良雄¹

秋田大学大学院医学系研究科 形態解析学・器官構造学講座¹、

東北大学大学院医学系研究科 器官解剖学分野²

脂肪酸結合タンパク質(Fatty acid binding protein: FABP)は疎水性の脂肪酸と複合体を形成することで細胞内コンパートメント間の移動を促進すると考えられている。

我々は FABP のうち表皮型脂肪酸結合タンパク質 (Epidermal fatty acid binding protein: EFABP) が C57BL/6 マウスパリエル板のM細胞、樹状細胞、胚中心マクロファージに発現する (R.Suzuki, et.al. 2009) ことを示し、その機能解析を行ってきた。マクロファージにおける EFABP 発現強度は上記の細胞のなかで最強で、周囲の細胞の貪食への関与が示唆され、これまで我々は次の 1)-4) を明らかにしてきた。

1)EFABP 陽性マクロファージ周辺で eat-me-signal である phosphatidylserine (PS) と PS を細胞膜表面に固定する AnnexinV は共局在する。2) in vitro での EFABP 発現と培地中の AnnexinV 量は正に相関する。3) PS 特異的な接着装置である Gas6 とその受容体 Axl が EFABP 陽性マクロファージに発現する。4) RAW264.7 細胞での EFABP 強制発現で Axl 発現が増強する。今回、EFABP の脂肪酸結合ドメイン変異体の強制発現系を用いて、EFABP-脂肪酸複合体の関与を検討した。EFABP とその変異体の強制発現系で Axl の発現量に有意差はなかったが、PS 吸着 microsphere の取り込みは低下した。EFABP-脂肪酸複合体の貪食能への関与が示唆された。(COI:No)

11 ゼータ型 DGK の欠失は DNA 修復複合体の機能低下をもたらす

田中 俊昭、後藤 薫
山形大・医・第二解剖

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) ファミリーは、様々なジアシルグリセロール(DG) 応答分子の生理的活性調節因子として機能し、近年、その機能的役割として癌や炎症応答におけるシグナル伝達への関与が注目されている。我々は DGK ファミリーのうちゼータ型 DGK (DGK ζ) の機能解析を進めており、これまでの研究により、放射線照射実験において DGK ζ ノックアウトマウスが放射線照射に対して脆弱性を示すことを明らかにした。また、培養細胞に対して薬剤による DNA 損傷を引き起こす実験においても、DGK ζ ノックダウン細胞ではアポトーシスが惹起されやすいことを報告してきた。DNA は一般的に、紫外線や放射線などの環境要因、活性酸素、DNA 複製に伴う異常などの内部要因により様々な損傷を受ける。特に DNA 損傷の中で細胞にとって最も重篤な DN 二重鎖切断に対して、細胞は多様な DNA 修復機構を備えている。今回我々は、DGK ζ 欠失が DNA 損傷に脆弱性を示すことから、DGK ζ が DNA 二重鎖切断における DNA 修復機構に対して、どのように作用するのか解析を行った。その結果、DGK ζ ノックダウン細胞では、DNA 二重鎖切断に対する DNA 修復時に様々なタンパク質をリン酸化することで知られる Akt の活性化が低下すること、また、Akt の活性化によって DNA 二重鎖切断部位に集積し、DNA 修復に重要な役割を担う BRCA1 の機能が低下していることが明らかとなった。さらに DNA 二重鎖切断部位を認識し、DNA 修復複合体の各構成分子を会合させる機能を持つ p95/NBS が、DNA 修復時において DGK ζ ノックアウト細胞では、核外に移行していることから、核内における DNA 修復複合体は機能不全を陥っている可能性が示唆された。

12 ビースミールマイトファジー隔離膜構築プロセスの電子顕微鏡解析

荒井律子¹、山下俊一²、杉崎達也¹、Wu Huajui¹、神吉智丈²、和栗聡¹

¹福島県立医科大学医学部 解剖・組織学講座、²新潟大学医歯学総合研究科機能制御学分野

オートファジーを介してミトコンドリア (Mt) を選択的に分解する現象をマイトファジーと呼ぶ。脱共役剤によって誘導されるマイトファジーでは、断片化された Mt がまるごと「隔離膜 (IM)」によって取り囲まれる。一方、鉄キレート剤である deferiprone (DFP) によって誘導されるマイトファジーでは断片化が先行せず、Mt 本体の一部分が隔離分解される。この「ビースミール」マイトファジーはどのように進行するのだろうか？ HeLa 細胞を用いた電顕観察から、DFP 誘導マイトファジーでは Mt 外膜と IM の間隔が 20 nm 程度にまで近接しており、脱共役剤で誘導されるものより有意に狭いことが分かった。さらに、IM マーカーである LC3 およびオートファジー受容体である BNIP3 を Mt と共に蛍光ラベルした HeLa 細胞を用いて CLEM (光-電子相関顕微鏡法) 解析を行ったところ、LC3 と BNIP3 が共存する箇所において、IM の密着伸長を伴う Mt の出芽様構造 (ビースミール像) が認められた。一方、オートファジー受容体を欠損させた HeLa 細胞では、野生型と比べて初期のビースミール像が極めて少なかった。以上のことから、同受容体を介した IM の密着伸長が、ビースミールマイトファジーに寄与していると考えられた。また、電子線トモグラフィ法による 3 次元モデル解析を行った結果、Mt 上の IM とそれに近接した小胞体との間に小管・小胞様構造が介在していることが分かった。この構造が IM への脂質供給の場となっている可能性が考えられる。(COI:No)

13 CAGE 解析を用いたマウス歯周組織における老化関連細胞外マトリックス分解酵素の探索

中村 恵
東北大学大学院歯学研究科
顎口腔組織発生学分野

主要な細胞外マトリックス分解酵素である Metzincin superfamily は matrix metalloproteinases (MMPs), a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs), ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTSs) から構成される。皮膚では老化に伴い metzincin superfamily の発現レベルが増加するとの報告があり、組織の老化に細胞外マトリックスが関与することが示されているが、歯周組織の老化における metzincin superfamily の発現や役割に関する情報は少なく、その詳細は不明である。そこで本研究では、歯周組織の老化に関与する metzincin superfamily の特定を目的とし、網羅的遺伝子解析法の一つである cap analysis of gene expression (CAGE) 法を用いて、生後 10 週齢 (若齢) と生後 50 週齢 (高齢) のマウスの歯周組織を対象に遺伝子の発現変動解析を行った。CAGE 法による解析の結果、高齢で遺伝子発現が上昇する metzincin superfamily は MMP3、10、12 であることがわかった。MMP3、10、12 について Real-time PCR 法による検証を行ったところ、MMP3 と MMP10 の mRNA 発現レベルは高齢で有意に上昇した。MMP12 については、統計的に有意差は認められなかった。さらに、歯周組織における MMP3 と MMP10 の発現について免疫組織化学的検討を行った。MMP3 の免疫反応は歯根膜と歯槽骨に見られ、MMP10 の免疫反応はセメント質と歯槽骨に見られた。以上のことから、加齢に伴って歯周組織における MMP3 と MMP10 の発現量が増加し、細胞外マトリックス分解が亢進され、これらの MMPs が歯周組織の老化に関与する可能性が示唆された。

14 FABP3 はパルプアルブミン陽性介在ニューロンの成熟を制御する

○山本由似^{1,2}、尾形雅君¹、大和田祐二²、上条桂樹¹

¹東北医科薬科大学医学部 解剖学、²東北大学大学院 医学系研究科 器官解剖学分野

【背景】脂肪酸結合蛋白質 3 (FABP3) は中枢神経系において神経細胞にのみ発現する。我々はこれまで、成熟期マウス前帯状皮質 (ACC) のパルプアルブミン陽性抑制性介在ニューロン (PV ニューロン) に FABP3 が高発現すること、FABP3 欠損 (KO) マウスの新奇探索行動異常と ACC における GABA 合成酵素 (GAD67) の過剰発現による局所的な GABA 濃度の上昇を明らかにした。FABP3 は、胎生期脳において発現は認められず、生直後から脳内に発現し始める。生直後から発達期脳における FABP3 の機能的役割は明らかにされていない。本研究では、生直後 (P0) マウスの ACC を含む内側前頭野 (mPFC) から初代培養神経細胞を作成し、PV ニューロンの形態学的解析を行った。

【結果・考察】野生型 mPFC 由来初代培養神経細胞の FABP3 の局在を確認したところ、PV ニューロンに強い発現が観察された。PV ニューロンの神経突起の形成における FABP3 の機能を明らかにするため、MAP2 と PV の共染色を行ったところ、FABP3KO 由来神経細胞において、PV ニューロンの突起伸長の異常が観察された。mPFC 由来興奮性ニューロンや mPFC 以外の大脳皮質由来初代培養神経細胞では、形態学的な変化は認められなかった。FABP3 は ACC を含む mPFC において、局所的な PV ニューロンの時空間的制御を行っている可能性が示唆された。(COI:No)

15 ホスホリバーゼ D の細胞内局在および組織分布解析

○八月朔日 泰和、山崎 正和

秋田大学大学院医学系研究科細胞生物学講座

イノシトールリン脂質代謝系は、外的刺激を受けたホスホリバーゼ C による phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) の加水分解によって、ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール3リン酸を産生する。DG はプロテインキナーゼ C の活性化因子として知られ、DG キナーゼによりホスファチン酸 (PA) に変換される。一方、ホスファチシルコリン (PC) がホスホリバーゼ D (PLD) により PA に変換され、その PA から生じる DG も存在する。PIP₂ 由来の DG と PC 由来の DG は各々特徴的な脂肪酸組成からなることが知られている。これは同じ DG でも PIP₂ 由来のものと PC 由来のものでは機能が異なる可能性を示唆しており、PLD の細胞内シグナル伝達系における重要性を示している。

哺乳動物の PLD アインザイムとして主に活性が確認されているのは PLD1 と PLD2 である。PLD1 と PLD2 は細胞内シグナル伝達系において重要な分子であるにも関わらず、特異性が十分に確認された抗体が確立されていないことから、両者のタンパクレベルでの詳細な細胞内局在や組織分布は未だ不明な点が多い。本研究では遺伝子導入法などにより PLD1 および PLD2 の細胞内局在および組織分布について解析した。また PLD1 と PLD2 に対する特異抗体を各々作製し、内在性 PLD1 と PLD2 について形態学的解析を行った。

培養細胞内で GFP 融合 PLD1 と PLD2 は細胞質において点状または果粒状にシグナルが検出された。また、細胞辺縁を囲むような膜状シグナルが認められた。作製した PLD1 および PLD2 に対する抗体を用いて、NIH3T3 細胞に対して免疫細胞化学染色を行ったところ、PLD1 および PLD2 免疫反応は細胞質や細胞辺縁に点状または果粒状に検出され、線状の反応も認められた。さらにウェスタンブロット法にて、マウス脳および肺で PLD1 と PLD2 の両者がタンパクレベルで発現することが確認された。

以上より、PLD1 および PLD2 が細胞質および細胞辺縁に局在すること、また両者がマウス脳および肺に発現することが明らかとなった。これらの結果は、PLD1 と PLD2 が細胞内小器官や細胞膜、またはその近傍に局在して生体内で機能する可能性を示唆する。(COI:No)

16 齧歯類および霊長類におけるグルタミン酸受容体 GluD2 の小脳外局在

今野幸太郎、山崎美和子、渡辺雅彦
(北海道大学・院医・解剖発生)

イオンチャネル型グルタミン酸受容体の 1 つである GluD2 はマウス小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスに選択的に発現し、小脳皮質内回路形成の制御に重要な役割を果たしている。近年、GluD2 の遺伝子である GRID2 の二重欠失が重度の小脳萎縮を持つヒトの家系で次々と報告された。興味深い事に、いずれの家系も言語能力や認知能力の発達障害が認められ、大脳皮質などの高次脳機能領域における GluD2 の機能が示唆されているが、小脳外領域における GluD2 の空間発現分布や機能については未だ不明である。本研究では、マウスとマーモセットの成体脳を用いて GluD2 に対する特異的プローブを作製し、*in situ* hybridization 法および免疫組織化学的手法によって検討した。マウスとマーモセットの小脳外領域において、GluD2 mRNA およびタンパクは内側前頭前野、帯状皮質、脳梁膨大後皮質、海馬、線条体などの高次脳機能領域で広く認められた。さらにマーモセット脳において体性感覚連合野、運動野、視覚野、側頭皮質といった大脳皮質領域に広く分布していた。マウスおよびマーモセットの脳梁膨大後皮質において GluD2 mRNA は GABA 作動性介在ニューロンと比較しグルタミン酸作動性ニューロンで高発現しており、その免疫反応は小胞性グルタミン酸トランスポーター 2 (VGluT2) 陽性グルタミン酸作動性神経終末に選択的に近接した局在が認められた。さらに GluD2 遺伝子欠損マウスでは脳梁膨大後皮質における VGluT2 陽性終末の密度は野生型マウスと比較し有意に減少していた。以上の結果から、マウスおよびマーモセットにおいて、GluD2 は小脳外領域においても神経細胞種選択的発現・回路選択的局在特性を有し、関与する特定の神経回路形成を制御することが示唆される。

17 炭酸脱水酵素関連分子 Car8 欠損マウス小脳における神経回路およびシナプス結合様式の変化

○宮崎 太輔^{1,2}、山崎 美和子²、渡辺 雅彦²

北海道大学 保健科学研究所 リハビリテーション科学分野¹、医学研究 解剖発生学教室²

炭酸脱水酵素 Car8 は胎生期より小脳プルキンエ細胞に強く発現している。Car8 は IP3 と競合的に働き、滑面小胞体からのカルシウムイオン放出に対して抑制的に働くことが知られている。これまでの研究より、自然発生系 Car8 変異マウスでは協調運動障害に加え、神経終末との結合を持たないフリースパインの出現、平行線維シナプスにおける終末の肥大化および結合スパイン数の増加、登上線維支配領域の遠位拡大化といった小脳形態異常を示すことが報告されているが、Car8 がどのように小脳の神経回路形成に関わっているのかについて不明な点が多い。今回我々は Car8 欠損マウスを作成し、その形態学的解析を行ったところ、登上線維が近接するプルキンエ細胞を異所的に支配することで登上線維—プルキンエ細胞多重支配を引き起こしている様子が観察された。電子顕微鏡観察では、抑制性終末ではプルキンエ細胞スパインとの間に非対称性シナプスを高頻度に形成している所見が得られた。この異常なスパイン結合型抑制性シナプスでは AMPA 型グルタミン酸受容体や興奮性足場タンパク PSD93 だけでなく、抑制性の GABA 受容体 α 1 サブユニットや足場タンパク gephyrin の中程度の発現、さらにシナプス間接因子 GluD2 の強い発現が認められた。興味深いことに、Car8 欠損マウスにおいて GluD2 をノックダウンするとスパイン結合型抑制性シナプスの形成が有意に抑制された。以上の結果は Car8 が登上線維—プルキンエ細胞単一支配化、興奮性終末—プルキンエ細胞スパイン間の選択的シナプス結合に関わっていることを強く示唆するものであった。(COI:No)

18 ラット頸動脈小体における NMDA 型グルタミン酸受容体 GluN2A および GluN2B の局在

○横山拓矢¹、山本欣郎²、平川正人¹、齋野朝幸¹

¹岩手医科大学 解剖学講座 細胞生物学分野、²岩手大学 農学部 共同獣医学科獣医解剖学研究室

【背景と目的】頸動脈小体 I 型細胞が感知した低酸素の情報は舌咽神経の感覚神経終末を介して延髄へ伝えられ、この情報伝達は NMDA 受容体によって調節されることが示唆されている。我々は、チロシン水酸化酵素 (TH) 陽性 I 型細胞を取り囲む感覚神経終末に小胞型グルタミン酸輸送体 VGLUT2 が存在することを報告し、神経終末からグルタミン酸が放出される可能性を見出した。本研究では、ラット頸動脈小体における NMDA 受容体のグルタミン酸結合部位 (GluN2A, GluN2B) の発現と局在を検索した。【結果】RT-PCR では、頸動脈小体において NMDA 受容体サブユニット GluN1, GluN2A, GluN2B mRNA の発現が認められた。免疫組織化学では、GluN2A および GluN2B は点状の陽性反応として I 型細胞の辺縁部に観察された。これらの陽性反応は抗原吸収試験によって消失した。TH との二重染色では、98.7% の GluN2A 陽性細胞および 99.5% の GluN2B 陽性細胞が TH 陽性反応を示した。一方、ドパミン- β 水酸化酵素 (DBH) との二重染色では、8.6% の GluN2A 陽性細胞および 9.3% の GluN2B 陽性細胞が DBH 陽性反応を示した。VGLUT2 およびシナプス前部足場蛋白 Bassoon との三重染色では、点状の Bassoon 陽性反応が GluN2A あるいは GluN2B 陽性細胞と VGLUT2 陽性反応との間に認められた。VGLUT2 陽性反応と接触する GluN2A 陽性細胞および GluN2B 陽性細胞は、94.2% および 90.1% であった。【考察】感覚神経終末から放出されたグルタミン酸は NMDA 受容体のグルタミン酸結合部位 GluN2A および GluN2B を介して I 型細胞の化学受容活性を調節している可能性がある。(COI : No)

19 放射状グリア細胞における細胞周期因子 Cyclin D2 の mRNA 輸送機構の解析:有胎盤類の大脳皮質拡大に寄与する可能性

吉川貴子¹、若松義雄¹、井上-上野由紀子²、鈴木久仁博³、井上高良²、大隅典子¹

1. 東北大学 大学院医学系研究科・発生発達神経科学分野
2. 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第6部
3. 日本大学 松戸歯学部 口腔科学研究所

大脳皮質の発生過程では、長い放射状の突起を伸ばす放射状グリア(RG)細胞と呼ばれる神経幹細胞が予め決められたタイミングで増殖・分化し、多様な神経細胞が産生される。我々はこれまでに、細胞周期促進因子 CyclinD2 の mRNA が RG 細胞の基底膜側突起の末端部まで輸送されることや、*CyclinD2* mRNA の 3' UTR 領域に輸送に必要な配列があることを明らかにしている(Tsunekawa et al., 2012)。ゲノム編集技術により、この mRNA 輸送配列欠失マウスを作製したところ、*CyclinD2* mRNA の輸送が阻害されるとともに、大脳皮質の厚みが減少した。この輸送配列は哺乳類の中でも有胎盤類にのみ保存されており、有袋類のオポッサムおよび鳥類のニワトリの大脳原基では内在性の *CyclinD2* mRNA は基底膜側突起に輸送されていなかった。一方、マウスの輸送配列を付加した GFP レポーター遺伝子をオポッサムやニワトリの大脳原基で強制発現すると、GFP の mRNA が基底膜突起に輸送された。これらの結果から、鳥類と哺乳類の共通祖先にはすでに基底膜側突起に mRNA を輸送する機構があり、有胎盤類の進化過程において *CyclinD2* mRNA 輸送配列が獲得されたと考えられる。RG 細胞に由来する Tbr2 陽性の中間増殖細胞は有胎盤類の大脳皮質原基にのみ認められ、有袋類や鳥類では Tbr2 陽性細胞は分化途中の幼若な神経細胞である(Nomura et al., 2016)。以上のことから、基底膜側突起に輸送された *CyclinD2* が Tbr2 陽性細胞の増殖を促進することで有胎盤類の大脳皮質の拡大に貢献した可能性が考えられた。(COI:No)

20 胎生期大脳皮質における Pax6 下流因子 δ カテニンの発現推移と雌雄差解析

○越智翔平¹、眞鍋悠¹、Seung Hee Chun^{1,2}、吉川貴子¹、大隅典子¹

東北大学大学院 医学系研究科 発生発達神経科学分野¹、
Max Planck Institute of Neurobiology, Martinsried, Germany²

転写制御因子 Pax6 は、哺乳類の発生過程の大脳皮質において、細胞増殖と神経分化のバランスを制御する。Pax6 欠損マウスを用いた組織学的解析の結果から、 δ カテニンの発現は Pax6 に制御されることが報告されている。 δ カテニンは、中枢神経系において生後ニューロンに局在を認め、樹状突起の成熟に関与することが主な機能として報告されているが、胎生期における δ カテニンの発現局在や機能についてはほとんど未開である。一方、重度自閉症の女性患者が多発する家系におけるエクソーム解析から、 δ カテニン遺伝子 (CTNND2) が新規 ASD 関連遺伝子として報告されている。これらの背景から、本研究では、胎生期における δ カテニンの発現局在の推移、遺伝子発現量に関する雌雄差の探索を目的とした。

終脳における δ カテニンの発現推移を明らかにするために、神経発生過程の 3 点(胎齢 11.5、14.5、17.5 日)で、野生型マウスの終脳における δ カテニンの発現を確認したところ、脳室帯(神経幹細胞を多く含む領域)と中間帯・皮質板(ニューロンを多く含む領域)には発現を認めるが、脳室下帯(中間前駆細胞を多く含む領域)では発現を認めないことが判明した。脳室帯における δ カテニンの発現量は、胎齢 14.5 日をピークとして増減し、Pax6 陽性細胞の密度と正の相関があることが示唆された。一方、中間帯・皮質板における δ カテニンの発現は、神経発生過程において徐々に発現量が増加することが判明した。また、神経発生過程の終脳、脳室帯における δ カテニンの発現量に関する雌雄差に関して、雄の方が雌よりも発現量が多いことが認められた。

以上の結果から、胎生期の終脳において、 δ カテニンの発現が脳領域において異なる増減の挙動を示すことが示唆された。このことは、それぞれの脳領域で、 δ カテニンが異なる制御機能を与えている可能性を提起する。加えて、今回我々は、脳室帯における δ カテニンの発現に雌雄差が存在することを見出した。このことは、雌雄における δ カテニンの発現の量的な違いが、女児特異的な重度自閉症の発症メカニズムに関して、分子レベルの解明に繋がる可能性がある。

21 神経管形成遺伝子の発現制御機構の進化

向笠勝貴、佐久間千恵、八木沼洋行

福島県立医科大学 医学部 神経解剖・発生学講座

脊髄発生の初期段階では、様々な転写因子が神経管の背腹軸に沿って部分重複、入れ子状、あるいは排他的な領域で発現し、これらの転写因子の発現パターンにより、神経管の細胞は背腹軸に沿って区分化される。このような転写因子の発現パターンの多くは脊椎動物で保存されているため、神経管の背腹軸に沿った区分化は脊椎動物共通の発生機構であると考えられている。一方で、形態学的観察では、羊膜類(マウス、ニワトリ等)と魚類では神経外胚葉から神経管が成立する際の細胞動態が異なることも知られている。本研究では、神経管の背腹軸に沿った区分化は脊椎動物で保存されているが、その成立過程は脊椎動物で異なっているという仮説を立て、比較ゲノムによりその検証を行った。まず、公共データベースから、神経発生に関わる転写因子の ChIP-seq データや神経前駆細胞由来の ATAC-seq データを取得し、その解析結果から、神経管区分化に関与する転写因子のシス制御領域を特定した。次に、特定したシス制御領域の保存性を解析した。その結果、脊椎動物間でよく保存されたシス制御領域が特定されたが、それに加え、Pax6、Gsxl、Dbx2、Irx3、Olig2 といった神経管区分化に関与している転写因子において、保存性が低いシス制御領域が同定された。これらのシス制御領域は多くの場合、四肢動物では保存されているが、真骨魚類では消失していた。また、同定したシス制御領域はニワトリ胚神経管におけるレポーター解析で、エンハンサー活性があることも確認できた。機能的なシス制御領域であるにも関わらず、その保存性は低いことから、神経管形成に関わる転写因子の発現制御機構は脊椎動物で保存されていないことが示唆された。

22 人工三次元ヒト血管組織を用いた巨核芽球性白血病細胞による血栓誘導の観察

○渡邊誠二¹、森島彩華²、土岐 力³、下田 浩¹、千葉智博¹、白戸佑貴¹

¹弘前大学大学院 医学研究科 生体構造医科学講座、²弘前大学医学部、³弘前大学大学院 医学研究科 小児科学講座

【背景と目的】血管内皮細胞が損傷すると、von Willebrand factor (vWF) と膠原線維が露出し、これに血小板が接着する。さらに血小板はフィブリノーゲンと架橋することで血栓を形成する。今回、我々はヒト臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)と新生児ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)からなるヒト人工三次元血管組織を作製し、ヒト赤芽球性白血病細胞(CMK)および末梢血白血球を組織上に播種することによって、血管内皮細胞の障害や障害部位における vWF の発現と血小板の集結が生体と同様に出現するのかを観察した。

【方法】HUVEC と NHDF を毛細血管内皮と結合組織に立体的に人工三次元血管壁を LBL 細胞集積法により作製した。得られた立体組織上に CMK を播種し、1 時間後に血球を播種した。2 日間培養した後に固定し、組織中の vWF、HUVEC、CMK と血小板に対して免疫染色に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一部の組織は SEM 標本で vWF を直接観察した。【結果】共焦点レーザー顕微鏡での観察によりヒト人工血管組織の内皮細胞では vWF が弱発現していたが、CMK を播種した場合には、vWF が内皮細胞細胞質内に高発現するとともに、血管傷害部位の線維芽細胞層に拡散していることが確認された。さらに、CMK と血球を同時に播種した場合は、CD41 で検出される血小板の凝集が結合組織表面に集積していた。SEM 画像では、長くからまった線維に接着する血小板と思われる像が確認された。

【考察】結果より、ヒト人工三次元血管組織において生体と同様に CMK が内皮細胞に vWF の発現を増加させ、血小板を集結させることが確認された。従って、人工三次元組織は、凝固系異常のメカニズムを in vitro で研究する手法として応用が期待される。(COI:No)

23 間葉系幹細胞を基盤とした三次元人工リンパ管ネットワーク
組織の移植とリンパ流路形成

○浅野義哉¹、岡野大輔¹、齊藤絵里奈¹、明石満³、下田浩^{1,2}

¹弘前大学大学院医学研究科神経解剖・細胞組織学講座、²弘前大学大学院医学研究科生体構造医科学講座、³大阪大学大学院生命機能研究科ビルディングブロックサイエンス共同研究講座

我々は、三次元組織構築技術の細胞集積法(LbL 細胞コート法)により、血管およびリンパ管ネットワーク組織を作製し、さらに癌浸潤モデル、脈管を含む腹膜モデル、神経組織モデル等に応用した研究を展開している。この中で、人工リンパ管ネットワーク組織を二次性リンパ浮腫の再生医療に応用するための研究を行ってきた。二次性リンパ浮腫の治療はリンパマッサージや圧迫療法、リンパ管/静脈吻合術が主流だが、さらなる選択肢として自己細胞や人工組織を用いた再生医療が期待される。これまでヒト線維芽細胞を組織の基盤としてきたが、本研究では、自家細胞としてヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)に着目し、これを基盤とした人工リンパ管ネットワーク組織を作製した。この結果、積層化したASCによる旺盛な脈管新生関連因子の分泌を背景として、線維芽細胞を基盤とした組織に比べより動的な脈管網形成がみられた。さらに、ヌードマウス下肢リンパ節郭清とインドシアニンググリーン(ICG)投与によるリンパ流路再生可視化モデルを作製し、上記組織の移植を行ったところ、in vivo イメージングおよび組織標本での検索において流路形成促進を示唆する結果を得た。

(COI: No)