

日本解剖学会

第82回中部支部学術集会

会 期：令和4年10月15日（土）、16日（日）
会 場：Web 開催

1-1 ニワトリの下丘―視床投射の詳細解析 ―順行性経シナプスペクターを用いて―

伊藤 哲史[†], 小野 宗範[‡], 大森 治紀* († 富山大学 学術研究部医学系システム機能形態学; ‡ 金沢医科大学 医学部 生理学 I; * 京都大学 名誉教授)

トリの聴覚上行経路では nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis (MLd, 哺乳類の下丘と相同)は下位の聴覚神経核全てから入力を受け、両側の nucleus ovoidalis (Ov, 哺乳類の内側膝状体と相同)に投射する。MLd のサブ領域からの軸索は Ov の特定部位に収束することから、脳幹から視床に渡って伝導路がある程度分離していることが示唆される。だが、MLd 特定部位から入力を受ける Ov ニューロンが集塊をなすことは示されていない。また、Ov は MLd から両側投射を受けるわけだが、その投射の強さの左右差についてもわかっていない。そこで本研究はニワトリ MLd に順行性経シナプスペクター-A3V を注入し、標識される両側 Ov ニューロンの分布について解析を行った。結果、注入を行った MLd のサブ領域に対応して、Ov の標識細胞が特定部位で集塊をなしていた。同側/対側標識細胞の比の平均は 1.86 であり、同側投射がやや強いことが示された。左右の異なる MLd サブ領域からの投射が単一 Ov ニューロン上に収束しており、Ov でも両耳分析が起こることが示唆される。本研究より、(1) MLd の各領域は蝸牛神経核の異なる亜核からの入力を受けることから、蝸牛神経核から視床に至る「皮質」下聴覚伝導路全長に渡ってある程度の経路分離があること、(2) トリでは哺乳類と比べ対側投射がかなり強いということ、(3) トリでは多段階の両耳情報処理が行われること、が示唆される。

1-2 三尖弁は、必ずしも3尖ではない

大森拓^{1, 2}、後藤英仁¹
1 ; 三重大学医学系研究科 組織学・細胞生物学
2 ; シーダースサイナイ病院

近年、三尖弁の解剖に注目が集まっている。剖検例を調査した報告では、40-50% で三尖弁は機能的に4尖であり、そのようなケースでは、後尖が2枚になっていることが報告されている。しかし、実臨床で汎用される心エコーを用いて、このような三尖弁の形態を把握することができかどうかは、まだ十分な検証はなされていない。今回、三次元心エコーを用いて、98 人の重度 TR 患者について、機能的4尖の割合について調査した。また、2枚になった後尖間からの逆流の有無についても観察した。この研究は、シーダースサイナイ病院の倫理審査委員の承認の上、行われた研究である（承認番号 00000792）。98 人中 26 人 (27%) で機能的4尖であった。そのうち、2枚になった後尖間から逆流が吹いているケースは12例 (46%) であった。この12例を、機能的4尖である後尖間に逆流のなかった14例と比較すると、TR の重症度が明らかに高かった。心エコーによって、三尖弁の弁葉数は十分に確認することが可能であった。また、特に逆流量の多い超重症 TR 症例において、2枚になった後尖間から逆流が吹く可能性があることが示された。この知見は、三尖弁カテーテル手術前に三次元心エコー検査を行うことの有用性を示唆していると考えられた。

1-3 下顎神経の内側を通る顎動脈

○田所 治、前田 信吾、奥村 雅代、金銅 英二・松本歯科大学 歯学部 解剖学

[緒言] 顎動脈は、外顎動脈の2終枝の一つで下顎頰の後方から起こり、下顎枝の内側を前走し、側頭下窩で側頭筋と外側翼突筋の間を通過して翼口蓋窩に至る。顎動脈の走行経路は、外側翼突筋の浅層、中、深層を通る3つに大別され、外側翼突筋の深層を通る経路は、下顎神経の枝との関係から3つ、ないしは 4 つの経路に細分されている。これらの経路のうち、下顎神経の内側を通る顎動脈の出現頻度は 0.3~1.7%と稀である。今回我々は、下顎神経の内側を通る顎動脈の稀な一例に遭遇し、若干の知見を得たので報告する。[所見] 急性心不全により亡くなされた88歳女性の左側の側頭下窩にみられた。[下顎枝部] 顎動脈は、下顎頰の後方で外顎動脈からほぼ直角に分かれた後、前方に向かい、約11mm 経過後に、後深側頭動脈と下歯槽動脈の共同幹を分けていた。その後、顎動脈は向きを内方に著しく変えて ほぼ直角に屈曲し、下顎神経の後縁に向かっていた。下顎神経の後縁付近で、顎動脈は中硬膜動脈を出しており、顎動脈の内側を耳介側頭神経が通っていた。[翼突筋部] 中硬膜動脈を出した後の顎動脈は、前方に向きを変えて下顎神経の内側を通過していた。顎動脈は下顎神経の内側から離れた後、前下方に頬動脈を、前上方に前深側頭動脈を出していた。[翼口蓋部] 顎動脈は内方に蝶口蓋動脈、前外方に後上歯槽動脈を分けていた。[考察] 以上の所見より、本例の顎動脈の走行経路は、藤田の分類ではE型に属し、前田らの分類ではG型に属する稀な例と考えられた。本例では耳介側頭神経がループをつくらず、顎動脈の内側を通過していた点で、以前の報告例と異なっていた。

2-1 SARS-CoV-2 由来タンパク質 ORF6 は RAE1 と NUP98 の局在変化を引き起こし、mRNA の核外輸送を阻害する

加藤 弘毅、Dini Kurnia Ikliptikawati、小林 亜紀子、Kee Siang Lim、羽澤 勝治、Richard Wong (金沢大学 分子細胞生物学研究室)

2019年11月以降、世界的に大流行している SARS-CoV-2 (病名: COVID19) は一本鎖 RNA ウィルスである。ゲノム RNA はプラス鎖で、14 のオープンリーディングフレーム(ORF)が含まれている。このうち ORF6 タンパク質は、核膜孔複合体を構成する RAE1、NUP98 タンパク質と相互作用することが報告されている。しかしながら、この相互作用が宿主細胞にどのような影響を与えているのかについては明らかになっていなかった。RAE1、NUP98 は mRNA の核外輸送を担っているため、われわれは宿主細胞の mRNA 核外輸送動態に着目し、ORF6 が細胞に及ぼす影響について調べた。

HEK293T 細胞に ORF6 を発現させると、RAE1、NUP98 の局在が核膜から失われた。さらに、ORF6 の発現により核内に mRNA 前駆体結合タンパク質 hnRNP A1 が蓄積することを見出した。RAE1 発現を低下させると、ORF6 発現時と同様に hnRNP A1 の核内蓄積が引き起こされたため、ORF6 が RAE1 と結合することにより、RAE1 の mRNA 核外輸送機能を阻害していることが示された。

これらの結果より、SARS-CoV-2 の ORF6 が核膜孔複合体の RAE1、NUP98 と結合し、宿主 mRNA 輸送機能を阻害することにより宿主の翻訳を抑制し、SARS-CoV-2 自身のゲノムの翻訳を優先させていることが推測された。

2-2 SARS-CoV-2 由来 NSP9 タンパク質は NUP62 の細胞内動態及び機能を阻害することで宿主細胞の核膜輸送を妨げる

1 金沢大学 新学術創成研究科 2 金沢大学 ナノ生命科学研究所 3 金沢大学 新学術創成研究機構 4 金沢大学 がん進展制御研究所
○牧山 桂¹、羽澤 勝治^{2,3}、小林 亜紀子³、Keesiang Lim²、Dominic C Voon^{3,4}、Richard W Wong^{2,3}

30 種類のタンパク質から成る核膜孔複合体(NPC)は、核膜における選択的分子輸送を介して、核にあるゲノム情報を制御する。ゲノム情報の調節は、発生・分化・ウイルス感染など様々な細胞応答の基盤となるため、NPC は生命現象において中心的な役割を担う。SARS-CoV-2 による感染症は世界中でパンデミックを引き起こしているが、ウイルス感染に伴う宿主細胞の免疫応答に対する理解は不十分である。とりわけ、SARS-CoV-2 由来タンパク質 NSP9 は NUP62 等の NPC 構成タンパク質を標的とすることが報告されているが、これらが NPC の動態や機能に及ぼす影響は不明である。そこで、本研究の目的は、NSP9 と NUP62 の相互作用による生物学的影響を解明することである。NSP9 の細胞内動態および機能解析をするために、N 末に GFP タンパク質を融合した NSP9 タンパク質発現ベクターを構築した。蛍光共焦点顕微鏡による NSP9 の細胞内動態解析により、大部分の NSP9 は宿主細胞の細胞質に凝集体を形成していた。NSP の局在情報をより詳細に調べるために、オルガネラマーカーを用いた免疫蛍光染色解析をすると、NSP9 は小胞体と共局在することがわかった。次に、NSP9 を発現する細胞における NPC 構成分子 NUP62 の局在解析をすると、細胞質に凝集する NSP9 と共局在することが明らかになった。これらより、NSP9 は新たに翻訳された NUP62 の局在を細胞質にとどめる可能性が示唆された。実際に、核(核膜)に存在する NUP62 のタンパク質量は、NSP9 発現細胞では低下していた。続いて、免疫応答を活性化させる NF- κ B の構成分子である p65 の核移行に、NSP9 が及ぼす影響を評価した。NSP9 発現細胞では、TNF α 刺激による p65 の核移行が著しく減少した。さらに、遺伝子干渉法で NUP62 をノックダウンした細胞における p65 の核移行について調べると、NSP9 過剰発現細胞と同様に、p65 の核移行が減少した。これらの研究結果より、NSP9 は、NPC 構成タンパク質である NUP62 の働きを阻害することで、NF- κ B の関わる免疫応答機構を妨害し、ウイルス増殖に有利な環境をつくることが推測された。

2-3

クライオ電子線トモグラフィーによる葉状仮足形成の可視化

○稲葉弘哲^{1,2}、今崎剛³、青山一弘^{4,5}、吉原壮悟²、高崎寛子⁶、加藤貴之⁶、後藤英仁¹、光岡薫⁴、仁田亮³、中田隆夫²

¹ 三重大学大学院医学系研究科組織学細胞生物学 ² 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科細胞生物学 ³ 神戸大学大学院医学研究科生体構造解剖学 ⁴ 大阪大学超高压電子顕微鏡センター生命科学分分野 ⁵ サーマフィッシャーサイエンティフィック ⁶ 大阪大学蛋白質研究所電子線構造生物学

葉状仮足は細胞運動時にみられる扁平でシート状の細胞突起で、Rac1 がアクチン線維の重合と枝分かれを促進することで形成される。このアクチンネットワークの観察には電子顕微鏡の解像度が必要であるが、従来の電子顕微鏡観察には固定や染色が必要で、アーティファクトを生じる可能性があった。クライオ電子線トモグラフィー(Cryo-ET)は、急速凍結法により生体分子の構造を維持し、標識することなく三次元観察できる技術として最近注目されている。そこで本研究では、Cryo-ET によって葉状仮足が形成される過程のアクチン細胞骨格の動態を観察することを目的とした。培養細胞に Rac1 を活性化する光遺伝学ツールとアクチン線維マーカーを遺伝子導入し、金グリッド上で培養した。自動浸漬凍結装置に試料をセットし青色光を照射により葉状仮足形成を誘起した後に急速凍結した。この凍結試料をクライオ蛍光顕微鏡で観察し、葉状仮足を形成した箇所を蛍光像から同定した。透過型クライオ電子顕微鏡 Titan Krios にて、低倍率像と蛍光像との相関を取ることで葉状仮足部位を同定し、高倍で連続傾斜像を撮影した。三次元再構築し、機械学習により細胞膜とアクチン線維、微小管などをセグメンテーションした。さらに、アクチン線維の座標を決定し、線維の長さ、方向、分岐等の情報を得た。今後、時系列的な変化を捉えるため、より多くの画像を取得し解析する。

2-4

クライオ電子トモグラフィーを用いたパーベック顆粒の三次元構造解析

小田賢幸（山梨大学大学院総合研究部医学域解剖学講座構造生物学教室）

ランゲルハンス細胞は、表皮や粘膜上皮に局在する特殊な抗原提示細胞である。ランゲルハンス細胞に接触した病原体は、C 型レクチンである langerin に捕捉され、パーベック顆粒と呼ばれる特殊な構造を持つ小胞に取り込まれる。ランゲルハンス細胞やパーベック顆粒の免疫学的役割は広く研究されているが、ビルベック顆粒の特徴である zippered membrane 構造の形成機構は不明であった。本研究では、単離されたパーベック顆粒をクライオ電子トモグラフィーを用いて観察し、ランゲリンのハニカム格子の繰り返し単位を 6.4Å の分解能で再構築した。その結果、2 つの langerin 3 量体は、258-263 残基の flexible loop が secondary carbohydrate binding cleft に挿入されることによって結合することがわかった。このループに変異を導入すると、パーベック顆粒の形成と HIV の取り込みが阻害されることがわかった。これらの知見はパーベック顆粒形成における膜変形機構を示唆し、ウイルス感染防御における langerin の役割に洞察を与えるものである。

3-1

ASIC2a点変異トランスジェニックラットに認められた小脳変性症の解析

○柴田泰宏¹ 佐久間英輔² 熊本奈都子¹ 植田高史¹ 鶴川真也¹

¹ 名古屋市立大学大学院医学研究科 機能組織学分野
² 名古屋市立大学大学院医学研究科 統合解剖学分野)

【目的】酸感受性イオンチャネル ASIC2a(acid-sensing ion channel 2a)は、水素イオンで活性化される陽イオンチャネルであり、主に神経細胞に発現している。しかし、その機能的役割については不明な点が多い。そこで変異 ASIC2a を強制的に発現させたトランスジェニック(TG)ラットを作成し、病理学的側面から ASIC2a の機能を調べた。

【材料と方法】ラット ASIC2a の 430 番目のグリシンをフェニルアラニンに置換すると、ASIC2a のチャネル特性は、リガンド作動性から常時開口型へと劇的に変化する。この ASIC2a-G430F gain-of-function ミュータントを、ASIC2a 自身のプロモーター下で発現させた TG ラットを作成した。外観観察、体重測定、ロータロッド試験、フットプリント試験、Western blotting 解析、および脳の組織学的検討を行った。トランスジェニック挿入箇所の決定にはゲムウォーキング法を用いた。

【結果】トランスジェニックは第 18 番染色体長腕に挿入された。TG ラットには、劇的な小脳萎縮が認められ、小脳性運動失調が観察された。組織学的検討により、小脳でプルキンエ細胞と顆粒細胞の変性が認められた。透過型電子顕微鏡で、プルキンエ細胞のネクロシスを示唆する所見が得られた。これらの結果から、小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞が ASIC2a の gain-of-function 変異の発現により死滅することで、特徴的な病態を引き起こしていると考察できた。

【結論】ラットにおいて ASIC2a の機能獲得形質は小脳の萎縮と小脳失調を発症させた。

3-2

神経ペプチド・マンセリンのラット孤束核への局在

○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あり、前駆タンパク質セクレトグラニン II から切り出される。下垂体、副腎髄質、十二指腸、膵臓、甲状腺、卵管、内耳、頰動脈小体など神経系や内分泌系に局在しているが機能は不明な点が多い。今回はマンセリンがラット延髄の孤束核に局在することを報告した。

【材料と方法】成獣 Wistar ラットを 4%PFA で灌流固定し、脳を摘出後、クライオスタットで 50μm の浮遊切片を作製し、免疫組織化学を行った。

【結果】ラット孤束核は延髄の背側に位置し吻尾軸に沿って V 字型の構造をしている。吻側には味覚の求心路、中央部は心血管系および呼吸器系の求心路、尾側には舌咽神経、迷走神経より、その他内臓知覚の求心路がきている。マンセリンは孤束核の吻側から尾側にかけて孤束核全体に広く局在していた。セクレトグラニン II の局在とは異なっていた。

【考察】これまでにマンセリンが腸管神経系に局在することを 2017 年の解剖学会全国大会で報告した(Mahmulul H et al, 第 122 回日本解剖学会全国学術集会, 2017)。孤束核の尾側には内臓からの入力がある。また、マンセリンは頰動脈小体にも局在する(Ida-Eto M et al, Acta Histochem, 2018)。頰動脈小体からの信号は舌咽神経を介して孤束核の中央部に至る。マンセリンは腸管や頰動脈小体の調節において末梢神経系のみならず中枢神経系の孤束核においても関与していることが示唆された。

3-3

Inhibition of glial scar formation after spinal cord injury by anti-Noggin antibody treatment and in Noggin conditional knockout mice

Li Shuo^{1,2}, Yukihiro Matsuyama², Kohji Sato¹, Satoru Yamagishi^{1,3}

¹Organ and Tissue Anatomy, ²Orthopedic Surgery, ³Optical Neuroanatomy, Preeminent Medical Photonics Education & Research Center, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

【INTRODUCTION】Noggin is a classical BMP (bone morphogenetic protein) antagonist. Application of Noggin is considered to inhibit BMP signal and glia scar formation after spinal cord injury (SCI). However, its expression was not carefully analyzed. In this research project, we analyze the expression and function of Noggin during spinal cord injury, and elucidate the mechanisms of glial scar formation in SCI.

【MATERIALS AND METHODS】We performed spinal cord injury at T9 level at 60 kdyn using the IH-impactor. Noggin expression was analyzed by immunostaining and utilizing Noggin-GFP transgenic mice. SCI was also performed on Noggin^{flx}, Nestin-Cre conditional knockout mice to eliminate Noggin from astrocytes and neurons. Anti-Noggin antibody treatment for one week by micro-osmotic pumps was also performed.

【RESULTS】Noggin was observed in microglia and fibroblasts in the meninges and some part of white matter, mainly in astrocytes, in the normal condition. Noggin expression was upregulated after SCI in the glial scar. It was expressed in newly generated astrocytes. When Noggin was depleted from neurons and astrocytes in the cKO mice the expression of GFAP-positive astrocytes after spinal cord injury was reduced. In addition, a similar result was observed by anti-Noggin antibody treatment.

【CONCLUSION】Noggin was upregulated in the astrocytes after SCI and loss of function of Noggin inhibited subsequent glial scar formation. These results indicate Noggin has a function to promote glial scar formation after SCI.

3-4

遺伝性痙性対麻痺関連分子群の相互作用ネットワークと病態発症機序の解析

○亀高論、高垣知輝、鶴若祐太

名古屋大学大学院総合保健学専攻 バイオメディカルイメージング情報科学 生体機能科学

遺伝性痙性対麻痺は下肢の痙縮と筋力低下を主徴とする神経筋疾患である。現在までに、50 を超える原因遺伝子 (SPG 遺伝子) が同定されているものの、本疾患の発症及び病態の分子機序は不明な点が多く残されている。SPG 遺伝子の 1 つである SPG3A/atlastin-1 は 2 つの膜貫通領域を持つ dynamin-like GTPase をコードしており、小胞体膜の融合に関与することが知られている。これら小胞体に局在する SPG 分子群のネットワークとその生理的意義を明らかにする目的で、Spg3A と相互作用する他の SPG 分子を探索した結果、新たな相互作用因子として Spg12/Reticulon2 を見出した。Spg3A と Spg12 は、Spg12 の 2 つの膜貫通領域を含む Reticulon Homology Domain を介して相互作用していることが示唆された。

本疾患の発症家系より同定された変異型 SPG12 遺伝子である SPG12-R60fs は、膜貫通領域を含む C 末端側を大きく欠損する。この短縮変異型 SPG12 は過去の報告 (Montenegro et al., 2012) に反し、膜貫通領域を持たないにもかかわらず膜構造に局在し、界面活性剤により可溶性画分に移行することから細胞内における膜構造への結合が示唆された。さらに、この変異型タンパク質の強制発現により小胞体の膜構造の変化および ER exit site の減少、小胞体からゴルジ体への膜蛋白質輸送の遅延が見出されたことから、Spg12-R60fs 変異体が小胞体機能に影響することが示唆される。

4-1 The protective role of calreticulin in a mouse model of spinal cord injury

Anastasiia Melnikova, Ishii Hiroshi, Hattori Tsuyoshi, Takarada Mika, Hori Osamu
Department of Neuroanatomy, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University

Spinal cord injury (SCI) is one of the most common devastating injuries in the central nervous system, with little possibility of recovery in humans. Recent reports demonstrated that endoplasmic reticulum (ER) stress is involved in the pathology of SCI. Deletion of CHOP, a mediator of ER stress-induced cell death, resulted in the enhanced recovery of hindlimb locomotor with a decrease in white-matter loss after SCI. Our group recently reported that calreticulin (CRT), a molecular chaperone in the ER with high Ca²⁺ binding capacity, has neuroprotective roles against ER stress and excitotoxicity. To obtain better understanding of the role of ER stress after SCI, we analyzed the expression and role of CRT in a mouse SCI model. Spinal cord contusion was induced in Th9 using the IH impactor. RT-qPCR and immunohistochemistry revealed that the expression of CRT enhanced after SCI. Comparative analysis between wild-type (WT) and CRT^{+/−} mice revealed that the recovery of hindlimb locomotion was reduced in CRT^{+/−} mice, based on the evaluation using the BMS and inclined plane test. Immunohistochemistry also revealed inflammation and subsequent neuronal damage in the acute stage and axonal damage at the chronic stage were observed at higher levels in CRT^{+/−} mice compared with WT mice after SCI. These results suggest that CRT plays a protective role after SCI.

4-2 消化管壁内における中枢神経 - 内在性神経制御機構相互連関の形態解析

○玉田 宏美^{1,2}、飯野 哲¹、木山 博資²

¹福井大学・医・解剖学 ²名古屋大学・医・機能組織学

消化管は迷走神経などを介して中枢と連絡しているが、さらに消化管内部には独自の腸管神経系 (ENS) とカハールの介在細胞 (ICC) などの間葉系細胞が内在性の神経制御機構を構築している。脳と腸の機能との相関は広く認められつつあるものの、これら三者間の相互作用 (中枢神経 - ENS - 間葉系細胞) について統合的な理解はこれまでにない。そこで本研究では、消化管管壁における迷走神経線維と内在性神経制御機構の相互連関について、膜・シナプス結合などの微細構造レベルで理解することを目的とした。マウス上部消化管を用い、消化管に投射する迷走神経線維と ENS の神経線維を区別するため、迷走神経背側核に Dextran や AAV-palGFP をインジェクションすることで、迷走神経運動神経線維をラベリングした。標識された神経線維を光学顕微鏡にて同定後、集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (FIB/SEM) サンプルとし、連続電顕像を取得した。得られた連続電顕像から画像処理や深層学習を用いて三次元化し、先に取得した光顕像を用い光・電子相関顕微鏡法 (CLEM 法) を試みた。

光学顕微鏡による観察では、迷走神経背側核インジェクション後約 3 週間後、消化管内に投射する神経線維のラベリングが観察され、神経節内の ChAT 陽性線維の内、一部の線維のみが標識されることが確認できた。Varicosity 様構造が線維に沿って分布し、その構造が ICC と密接する所見も得られた。さらに FIB/SEM 画像からの解析対象の三次元化により、その神経線維自身の定量評価や周囲の神経要素、間葉系細胞との連絡についても微細構造レベルで明らかにすることが期待される。

4-3 マウスの蝸牛神経核および前庭神経核におけるプロサポシン (PSAP) およびその G タンパク質共役型受容体 (GPR) 37 の局在について

○山本紗紀、冬木愛実、尾之内佐和、齋藤正一郎

岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医解剖学研究室

【目的】平衡聴覚器系的一次中枢である蝸牛神経核および前庭神経核におけるプロサポシン (PSAP) およびその G 蛋白質共役型受容体 (GPR) 37 の発現性について、マウスを用いて免疫組織化学的に解析した。【方法】成体雄マウス (Slc : ddY) 5 匹を 4%PFA にて灌流固定し、脳を採材、30%スクロース溶液に浸漬した後、10–20μm の凍結切片を作成し、抗 PSAP 抗体、抗 GPR37 抗体およびニューロンのマーカーである抗 PGP9.5 抗体を用いて、DAB 染色、蛍光二重染色を行なった。【結果】PSAP の免疫反応は、蝸牛神経核および前庭神経核の両方において、細胞質内に顆粒状の反応として観察され、蛍光二重染色によりニューロンとグリアの両方において陽性反応が認められることが明らかとなった。GPR37 の免疫反応は、蝸牛神経核において弱度、前庭神経核において微弱度に観察され、蛍光二重染色によりニューロンにおいてのみ陽性反応が認められることが明らかとなった。【考察】本研究から蝸牛神経核および前庭神経核の神経細胞は PSAP およびその受容体を発現していることが明らかとなった。PSAP の異常に伴う平衡聴覚器系の障害について、報告されている末梢器官のみならず、その一次中枢にも異常が生じている可能性が示唆された。さらに、蝸牛神経核は前庭神経核よりも PSAP 感受性が高い可能性が示唆された。今後は、蝸牛神経核および前庭神経核の各領域における詳細な検討が必要である。

4-4 *Hoatzin* 変異マウスの水頭症発症機構に関する研究

成田啓之

山梨大学 医学部 解剖学講座細胞生物学教室

【目的】運動繊毛の機能不全が水頭症を招く機構としては、脳室壁を裏打ちする上皮細胞の運動繊毛の異常が脳脊髄液の停滞と流路の閉塞を招くことが原因とされる。*Hoatzin* 変異マウスの水頭症の症状には個体差があり、その原因は不明である。今回、*Hoatzin* 変異上皮細胞が予想外の影響を周囲の細胞に与えていることを見出したので報告する。【材料と方法】初代培養上皮細胞は新生児マウスの脳室壁組織を分散して播種し、接着性の弱い細胞を除去することで作成した。RNA 抽出と遺伝子発現解析、免疫染色は定法に基づき行った。【結果】RNA-seq 解析により、初代培養上皮細胞にはミクログリアが共存しており、変異型では活性化していることを見出した。この培養細胞をミクログリアのマーカーである *Iba1* に対する抗体を用いて免疫染色したところ、変異型では活性化ミクログリアの特徴である細胞の形態変化を認めた。一方、海馬組織の RT-PCR では、変異型に培養系と同様のミクログリア活性化は認めなかった。しかし変異型ではミクログリアのスカーベンジャー受容体 *Marco* の発現が亢進していることを見出した。【結論】*Hoatzin* 変異型上皮細胞は自身が有する運動繊毛に異常を呈するのみならず、周囲の細胞にも影響を及ぼし、ミクログリア活性化を招くことが示された。これにより *Hoatzin* 変異マウスの水頭症は単純な運動繊毛の機能不全によるものではなく、慢性炎症による神経変性と組織萎縮も背景にある可能性が示唆された。

5-1 胎生期ミクログリア機能解析のためのミクログリア除去技術

名古屋大学 大学院医学系研究科 機能組織学

小西博之、李晨受、木山博資

ミクログリアは中枢神経系に常在するマクロファージの一種である。ミクログリアはマクロファージが持つ抗原提示などの機能以外にも、中枢神経系特異的な機能を持つことが予想されている。胎生期においても様々な役割を果たすと考えられるが、効果的なミクログリア除去モデルが存在しないことも影響し、胎生期のミクログリア機能はほぼ分かっていない。我々は、ミクログリア特異的な遺伝子として *Siglech* を見出し、その遺伝子座にジフテリア毒素 (DT) 受容体遺伝子をノックインした *Siglech*^{tr} マウスを用いて、マウス成獣からミクログリアを特異的に除去する技術を確立している。そこで、本研究では、この除去技術のマウス胎仔への応用を目指した。まず、DT を妊娠 *Siglech*^{tr} マウスの母体に腹腔内投与したが、胎仔のミクログリアは除去されなかった。胎盤が関門となり胎仔への DT 流入を妨げている可能性が考えられたため、マウス羊水へ DT を注入した結果、ミクログリア除去に成功した。ミクログリアが中枢神経系に侵入し始める胎生 10.5 日以降の任意のタイミングで、中枢神経系全体にわたりミクログリアが 4 日間除去された。神経系に存在するミクログリア以外のマクロファージは影響を受けなかったことから、この除去モデルはミクログリアに特異的であり、胎生期におけるミクログリア機能解析に有効であることが示された。

5-2 TOX3 による outer radial glia の誕生の制御

城 航平、宮田卓樹、川口綾乃：名古屋大学大学院医学系研究科 細胞生物学分野

ほ乳類の脳の発生過程で観察される神経前駆細胞には、脳室面から脳膜面に達する放射状の突起を持ち、脳室面で分裂する apical radial glia (aRG) の他に、脳室面への突起を持たず、脳室帯よりも外層の脳室下帯 (SVZ) で分裂する神経前駆細胞もあり、これらは outer radial glia (oRG) と呼ばれる。oRG の誕生頻度は胎生初期から中期にかけて増加することが知られているが、その制御機構は明らかにされていない。本研究では、発生初期から中期にかけて aRG 内で発現上昇する転写因子 *Tox3* に注目し、*Tox3* の発現上昇が oRG 誕生頻度の増加をもたらしているのではないかと仮説を検討した。*Tox3* を子宮内エレクトロポレーション法により強制発現させた群では SVZ など脳室面以外で分裂する前駆細胞の割合が有意に増加し、また斜めに分裂する aRG の割合も有意に増加していた。また、ライブイメージングによる細胞挙動の観察では強制発現群では脳膜側方向へ素早い細胞体の動き (mitotic somal translocation, MST) を示したあと SVZ で分裂するパターンが増加した。逆に、*Tox* ノックアウト下での *Tox3* の機能阻害実験では、脳室面以外で分裂する前駆細胞が減少した。これらの強制発現実験と機能阻害実験の結果から、aRG 中での *Tox3* 発現増加が oRG 誕生数の増加に貢献しており、また、発生の時間軸に沿った oRG の誕生は、aRG 中での *Tox3* 発現増加によって引き起こされている可能性が示唆された。

5-3

SIDS モデルラットの橋・延髄で発現が増加していたケモカインとその受容体の *in situ* hybridization による解析

○大河原 剛、江藤 みちる、成田 正明
三重大・院医・発生再生医学

乳幼児突然死症候群（SIDS）は、今まで何の予兆もなかった児が睡眠中に突然無呼吸に陥り、覚醒できずにそのまま亡くなる疾患である。無呼吸からの覚醒を制御するセロトニン神経系の発生の異常が指摘され、亡くなる直前の細菌感染などが引き金となり発症すると考えられているが、その詳細な発症メカニズムは不明である。我々は、妊娠中の疑似ウイルス感染が胎仔のセロトニン神経系に異常を起こすことを明らかにし、そのことを利用して SIDS モデルラットを作製した。我々の作製した SIDS モデルラットは、生後 11 日目の疑似細菌感染（LPS 投与）による死亡率の増加が見られ、特定の発達期（生後 11～13 日目）に高 CO₂ ガス（73.3% N₂, 20.8% O₂, 5.9% CO₂）を吸気させた際の呼吸能に異常がみられるなど、SIDS と似た病態を示す。さらに LPS 投与 4 時間後の SIDS モデルラットの橋・延髄における遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した結果、7 つのケモカインと 3 つのケモカイン受容体の発現量が増加していることを明らかにした。今回、LPS 投与 4 時間後の SIDS モデルラットの橋・延髄におけるこれらの遺伝子の発現を *in situ* hybridization により調べた。その結果、ミクログリアで過剰発現しているケモカインとケモカイン受容体が各 1 つ、神経細胞様の形態の細胞で発現しているケモカインが 1 つ、血管周囲と脳の実質で発現しているケモカインが 1 つ、血管内皮細胞と脳実質で発現しているケモカインが 2 つあることを明らかにした。今後は、SIDS モデルラットの橋・延髄でこれらケモカインを過剰発現させた際に、SIDS 様の病態が再現できるのか確認したい。