

日本解剖学会

第76回中国・四国支部学術集会

会 期：令和4年10月29日（土）、30日（日）
会 場：香川大学医学部キャンパス
（または Zoom による Web 開催）

特別講演

腎臓と肝臓における Circular Dorsal Ruffle の役割

○吉田 整

南開大学 生命科学学院 （中国・天津市）

Circular Dorsal Ruffle (CDR)は培養された線維芽細胞を増殖因子で刺激した後に出現する大型の膜ラッフルである。CDR は細胞表面に「クレーター状」の構造物として現れ、その後、中心に向かい収束し、その上部が次第に閉じていくことにより、エンドサイトーシスの役割をすることがわかっている。我々は米国ミシガン大学において、細胞生物学の手法を用いて CDR の分子メカニズムの解析を行い、また、生化学的な手法により、CDR はエンドサイトーシスとしての機能に加え、シグナル伝達経路を制御していることも明らかにした (Yoshida et al., *Journal of Cell Science* 2018)。

2020年に中国天津市にある南開大学に研究室を開設し、近年は腎臓と肝臓の機能における CDR の役割について研究している。まず、走査型電子顕微鏡を用いた観察でマウスの腎糸球体表面に CDR を確認した。これはその上皮細胞であるポドサイトに CDR が出現していることを示唆する。実際、培養細胞を用いた系では、線維芽細胞同様に、増殖因子による CDR 出現とシグナル伝達系における役割がポドサイトでも確認された(論文投稿中)。さらに、走査型電子顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ある種の肝細胞癌株が CDR を出現させることを発見した(Sun et al., *Cell Communication and Signaling* 2022)。今回の発表では、これらの研究成果について報告したい。(COI：なし)

1 クロマチンの立体構造変化を介した中枢神経回路形成機序

○藤田 幸

島根大学 医学部医学科 解剖学講座 (発生物学)

コヒーシンは染色体接着に関わるタンパク質複合体で、4つのサブユニットから構成されるリング状の構造を形成する。このリング状の構造の中に、細胞周期S期での複製により生じた姉妹染色分体を束ねて接着し、染色体を正確に分配するという、細胞の分裂・増殖に必須の役割を担っている。一方で、コヒーシン複合体は、染色体高次構造の変化を制御し、遺伝子の転写を調節すると想定されている。ヒトではコヒーシン関連遺伝子の変異により、コヒーシンの機能が低下すると、分化・発達障害を伴うコヒーシン病 ("cohesinopathies")を引き起こす。コヒーシン病の一種であるコルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS)では、顔貌や四肢の形成異常に加え、精神遅滞や自閉症様行動などの高次脳機能の障害を呈することから、コヒーシンの機能が中枢神経系の分化、発生に重要であることが示唆される。また、この疾患では、姉妹染色体分配には大きな異常が検出されていない。このことは、コヒーシンの染色体接着以外の機能、即ち、遺伝子発現調節機能の破綻が、病態や病因に寄与していることを示唆している。本演題では、コヒーシスが神経幹細胞分化及び中枢神経回路形成にどのような影響を及ぼすのか、最近の研究結果を発表する。(COI：なし)

2 血中アルブミンの海馬への移行と血管構造

○濱崎佐和子¹、棕田崇生¹、福田和也²、小山友香¹、中根裕信¹、海藤俊行¹¹鳥取大・医・解剖学²北里大・海洋生命・水族増殖学

海馬は血液脳関門 (BBB) があるため、血中タンパク質が実質に侵入することはないとされている。しかし、これまでに私たちは、血中に投与した BBB 不透過性の色素 Evans blue (EB) が海馬歯状回のニューロンに取り込まれることを見出した。EB は血中アルブミン (Alb) と複合体を作ることから、この結果は歯状回に血中 Alb が到達することを意味する。血中 Alb にはニューロンのてんかん様活性を誘発する働きがあることが知られているため、本研究ではてんかん発作の詳細な発生メカニズムの解明を目的とし、まずは、血中 Alb がどのように海馬歯状回まで到達するのかを調べることにした。

血中 Alb が海馬に移行するルートとして、海馬の血管内皮細胞に小孔が形成される (経細胞ルート)、あるいは内皮細胞間結合の破綻が生じる (傍細胞ルート) 可能性が考えられる。通常、BBB が構築されている海馬は連続性毛細血管を持つとされているが、私たちは RNA-Seq 解析により、海馬で小孔構成タンパク質である Plasmalemma Vesicle Associated Protein (PLVAP) の mRNA が発現していることをつきとめた。このことは海馬に有癌性毛細血管が形成されている可能性を示唆する。また、免疫染色により PLVAP の局在も調べたのでその結果を報告する。(COI：なし)

3 蛍光色素エバンスブルーを用いた海馬歯状回シナプス伝達亢進ニューロン検出法の探索

○棕田崇生、久米祥太郎、濱崎佐和子、小山友香、中根裕信、海藤俊行

鳥取大・医・解剖学

脳の大部分は血液脳関門が構築されているが、少なくともげっ歯類の海馬歯状回では、微量のアルブミンが血中から恒常的に移行している。そこでこの機構を利用して、海馬依存的な学習によってシナプス伝達が高まった歯状回顆粒細胞を簡便に検出するための新たな手法の探索を試みた。

成熟ラットにバーンズ迷路課題を課して空間学習を成立させたのちに、腹腔に、血中アルブミンと結合する蛍光色素エバンスブルー(EB)を投与して90分後に海馬を固定・摘出し検鏡した。空間学習の有無にかかわらず、歯状回に局在する大型の紡錘形や卵形のインターニューロンが EB 陽性だった。さらに学習群では、顆粒細胞層外側領域で EB 陽性ニューロンが認められる個体が出現した。一方、非学習群ではこの領域での EB 陽性ニューロンは認められなかった。これらの結果は、学習依存的に歯状回顆粒細胞層外側領域のニューロンで EB の細胞内への取り込みが促進されている可能性を示唆する。海馬歯状回に移行した EB-アルブミン複合体は受容体内在化によってニューロンに取り込まれると想定されている。この機序を解明することで、血中由来 EB を指標として、シナプス伝達が高進した歯状回顆粒細胞を同定するための新たな手法が確立できるものと思われる。(COI：なし)

4 敗血症後症候群における海馬 TSPO の役割

○相澤秀紀¹、菊谷和也²、細川康二³、儀賀晋嗣²、太田浩平²、松股美穂¹、Meina Zhu¹、志馬伸朗²¹広島大学大学院医系科学研究科 神経生物学、²広島大学大学院医系科学研究科 救急集中治療医学、³福井大学 麻酔科

全身炎症を伴う敗血症から生じた患者は、筋力低下などの身体症状に加えてしばしば不安やうつなどの精神症状を示す。このような続発症は敗血症後症候群と呼ばれ、その病態については未だ不明な点が多い。

TSPO は炎症や酸化ストレス、ステロイド合成など様々な生体機能に関与するミトコンドリアタンパク質で、精神疾患や認知症への関与が示唆されている。本研究では、マウス敗血症モデルの行動解析により敗血症後症候群の進展における TSPO の役割を検討した。

盲腸結紮-穿孔法 (CLP) により全身炎症を引き起こした野生型マウスは、術後14日目には対照群と同様の体重回復を見せた。これらのマウスは握力やオープンフィールドにおける行動量の低下を示す、一方で、尾懸垂試験や高架十字迷路試験では、有意な行動異常は見られなかった。興味深いことに CLP 術後の TSPO 欠損マウスでは、尾懸垂試験での無動時間延長や高架十字迷路試験でのオープンアーム滞在時間延長などのうつ様病および不安様行動がみられ、敗血症後症候群様の行動異常が示唆された。

これらの背景にある、神経機構を調べるため、精神神経疾患への関与の示唆される海馬の遺伝子発現解析を行なった結果、TSPO 欠損マウスにおける Clq シグナルの異常上昇を見出した。本発表では、これらの遺伝子発現解析を踏まえて敗血症後症候群の病態モデルについて議論したい。(COI：なし)

5

概日リズムにおける脳内一次線毛の形態解析

○中里亮太、木曾遼太郎、松田悠生、池上浩司

広島大学医系科学研究科解剖学及び発生生物学研究室

【背景】睡眠・覚醒など、多くの生命現象は約 24 時間周期の「概日リズム」を示す。概日リズムは脳視床下部の視交叉上核と呼ばれる神経核に発現する「時計遺伝子」により生み出されている。最近、発表者らは、オルガネラ様構造体である「一次線毛」の長さが 24 時間周期で変化することを *in vitro* で明らかにした。本研究では、マウスを用いた *in vivo* 解析により生体内における一次線毛と概日リズムの関係性について検討を行った。【方法】C57BL/6 マウスの灌流固定を 6 時間ごとに行い、脳の凍結切片を作製した。続いて、脳組織に発現する時計遺伝子 (Per1) と一次線毛マーカータンパク質 (AC3, Arl13b) を免疫組織染色により蛍光標識し、時計遺伝子の発現量解析と一次線毛の形態解析を行った。【結果】脳の視交叉上核における時計遺伝子の発現量と一次線毛の長さに、24 時間周期のリズム性変動が観察された。また、時計遺伝子の発現量と一次線毛の長さの間には相関関係が認められた。さらに、大脳皮質、海馬、線条体といった他の脳領域においても、灌流固定を行った時間帯により一次線毛形態の著明な変化が観察された。【考察】以上の結果から、実際の生体内においても一次線毛の長さはリズム性の変動を示し、様々な生命現象の概日リズム形成に一次線毛の関与が示唆された。(COI：なし)

6

Shrinking and loss of primary cilia associated with delocalization of pericentriolar proteins upon hypertonic shock

○大谷拓史、中里亮太、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

Almost every type of mammalian cell has a small protruding organelle called a primary cilium which is known to function as mechanical and chemical sensors. These functions are critical in development and maintaining homeostasis. We used epithelial cells of murine kidney intramedullary collecting duct (mIMCD-3 cells) to investigate how primary cilia respond to environmental shocks. We have recently found that primary cilia of mIMCD-3 cells get shortened and reduced in number under hypertonic shock on fixed samples. To investigate chronological changes of primary cilia under hypertonic shock, we created mIMCD-3 cells expressing Arl13b-venus and performed time-lapse imaging on them. After around two hours of hypertonic shock, cilia-positive cells started to lose their primary cilia. Primary cilia are built upon mother centrioles and we hypothesized that localization of centrosomes are also affected upon hypertonic shock. To test this hypothesis, we stained γ -tubulin, a pericentriolar protein, on fixed samples and found that γ -tubulin delocalizes upon hypertonic shock. We also stained ODF2 to see if the mother centrioles maintain the dividing structure, transition fiber, between the cytoplasm and the ciliary space. Fixed samples revealed that ODF2 also delocalizes upon hypertonic shock. The relationship and/or connection between the delocalization of pericentriolar proteins and the shortening of primary cilia is being investigated. (COI：なし)

7

Rab10 は 2 か所の領域によってそれぞれ異なる膜構造へ局在化する

○川合克久、丹羽 悠、荒木伸一

香川大・医・組織細胞生物学

我々は、マクロビノサイトーシスから派生する新規輸送経路として Rab10 陽性管状エンドサイトーシスを見出した。従来 Rab10 はゴルジ体や小胞体に局在することが知られているが、この新規輸送経路では、Rab10 がマクロビノゾーム前駆体のカップ構造に集まり、そこから Rab10 陽性チューブがゴルジ域に向かって伸びる。一般的に Rab タンパク質の局在は C 末端の脂質修飾領域近傍のアミノ酸配列により決定される。しかし、Rab10 の異なる膜構造への局在化がどのようにしておきるのかは不明である。そこで、Rab10 の C 末端付近のアミノ酸を塩基性アミノ酸に置換した点変異体の局在を観察すると、Rab10 のゴルジ体および小胞体局在は失われ、塩基性アミノ酸の数を増やすと細胞膜に局在するようになった。Rab35 など他の Rab タンパク質の C 末端と Rab10 の C 末端を入れ替えたキメラ変異体の発現実験では、Rab10 のゴルジ体および小胞体局在は Rab10 の C 末端側アミノ酸配列が担い、Rab10 陽性管状エンドサイトーシスにおけるカップおよびチューブへの局在は C 末端以外の領域が担うことが分かった。また Rab10 の C 末端以外の領域によるカップおよびチューブへの局在化は、Rab10 エフェクターである EHBPI との結合に依存していた。(COI：なし)

8

破骨細胞由来 IGF1 の骨髄腫薬剤耐性と骨破壊における枢軸的役割

○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、破骨細胞による骨吸収の亢進による骨破壊病変を形成しつつ進展する造血器悪性腫瘍である。MM 骨病変部の破骨細胞は骨吸収のみならず、薬剤耐性にも寄与する。本疾患は依然治癒がもたらされておらず完治不能であり、特に薬剤耐性がその治療成績の向上を制限している。したがって、薬剤耐性を克服する新規治療法の開発が課題である。IGF1 は MM に限らず、多くの癌腫においては腫瘍進展や薬剤耐性の誘導に重要な役割を果たしている。ところで、我々は、破骨細胞自身が IGF1 を産生することを報告した。そこで今回、破骨細胞由来 IGF1 による MM 薬剤耐性および骨病変形成における役割について以下の検討を行った。【方法・結果】1)破骨細胞、骨髄間質細胞および MM 細胞からの IGF は破骨細胞が最も多く産生した。2)正常マウス(WT)由来の破骨細胞と MM 細胞を共培養するとボルテゾミブによる薬剤耐性が惹起されたが、破骨細胞特異的 IGF1 ノックアウトマウス (IGF1cKO)由来破骨細胞では薬剤耐性が惹起されなかった。3)MM の細胞内情報伝達系を解析したところ、WT 破骨細胞培養上清は MM の Akt, p38, ERK および NF- κ B 経路を活性化したが、IGF1cKO 破骨細胞培養上清では惹起されなかった。4)破骨細胞形成系において IGF1cKO は WT に比べて減弱し、骨吸収能も低下した。【まとめ・考察】骨髄微小環境において IGF1 は破骨細胞から産生され、MM 細胞の薬剤耐性および骨病変形成を惹起していることが明らかとなった。このことから、破骨細胞からの IGF1 産生制御は MM の薬剤耐性ならびに骨病変形成を抑制することが示唆された。

9

Inhibition of protein phosphatase 2 by okadaic acid changes nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferase localization

○Sitosari Heriati¹, Weng Yao^{1,2}, Zheng Yilin¹, 福原瑠子¹, 池亀美華¹, 岡村裕彦¹

¹ 岡山大学・学術研究院医歯薬学域・口腔形態学分野

² 岡山大学・学術研究院医歯薬学域・インプラント再生補綴学分野

Phosphorylation and O-GlcNAcylation can occur at the same site of the protein: serine and threonine residues. This phenomenon may cause crosstalk and possible interactions between the molecules involved. Protein phosphatase 2 (PP2), also known as PP2A, is widely expressed throughout the body and plays a major role in dephosphorylation or phosphate removal. At the same location where PP2A acts, O-GlcNAc transferase (OGT) can introduce UDP-GlcNAc molecules and mediate O-GlcNAc modifications. Since these two proteins can function or target the same amino acid site, there is a possibility of interaction between them. In this study, MC3T3-E1 cells were treated with Okadaic Acid (OA), a strong protein phosphatase inhibitor. Following this treatment, OGT localization, OGT levels, and total O-GlcNAcylation were evaluated. Under OA treatment, the OGT location changed. This change occurs in the nucleocytoplasmic isoform (ncOGT). To confirm the result of OA treatment, a siRNA experiment for PP2A α was conducted. Knockdown of PP2A α significantly affected OGT expression ($p < 0.05$), and there was a correlation between PP2A α and OGT expression ($r = 0.93$). These preliminary results suggested a possible interaction between PP2A and OGT, which strengthens the notion of an interaction between phosphorylation and O-GlcNAcylation. (COI：No)

10

Detection of extracellular Z-form DNA in mature *Porphyromonas gingivalis* biofilm

○Zheng Yilin¹, Sitosari Heriati¹, Weng Yao^{1,2}, 味野範子³, 福原瑠子¹, 池亀美華¹, 岡村裕彦¹

¹ 岡山大学・学術研究院医歯薬学域・口腔形態学分野、² 岡山大学・学術研究院医歯薬学域・インプラント再生補綴学分野、³ 岡山大学病院・総合歯科部門

Background: Poor oral care allows oral bacteria to form stable biofilms in the gingival sulcus, which evokes severe periodontal disease. Analyzing the mechanisms of bacterial biofilm formation and preventing its development are important for clinical dental care. Oral biofilms consist of an extracellular polymeric matrix (EPM) that includes proteins, polysaccharides, and extracellular DNA (eDNA). There are two structurally different forms of eDNA: (B-DNA) and Z-form DNA (Z-DNA). B-DNA is sensitive to DNase treatment, whereas Z-DNA is resistant. In this study, we aimed to establish the most suitable culture system for biofilm formation by periodontal pathogens to detect the presence of Z-DNA in the biofilms. **Materials and Methods:** *Porphyromonas gingivalis* (5×10^7 CFU) was cultured in a 24-well-microplate with 500 μ L BHI-hemin culture medium per well. Biofilm formation was analyzed by biofilm safranin staining assay, LIVE/DEAD biofilm viability assay, and scanning electron microscopy (SEM). Extracellular Z-DNA in *P. gingivalis* biofilm was detected by immunofluorescent using antibody against Z-DNA. **Results:** The total cell number, including living and dead cells, steadily increased during the 24 and 48 h culture time. A stable biofilm structure and EPM were observed after 48 h of culture, suggesting the formation of a mature biofilm. **Conclusion:** The suitable time for mature *P. gingivalis* biofilm formation is between 24 h and 48 h and Z-DNA increases during *P. gingivalis* biofilm maturation. (COI：No)

11 Low Estrogen Condition Accelerated the Adipose Tissue Development in Mice

○Danang Dwi Cahyadi¹, Katsuhiko Warita^{1,2}, Yoshinao Z. Hosaka^{1,2}¹Joint Graduate School of Veterinary Sciences, Tottori University²Joint Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tottori University

Estrogen (E2) and estrogen receptors (ERs) are thought to play important roles in adipocyte differentiation and function but remain unknown. We sought to elucidate the effects of low E2 status on fat accumulation and morphometry in female mice. Subcutaneous (sWAT), perirenal (prWAT), and mesenteric white adipose tissue (mWAT) depots were collected and analyzed from sham and ovariectomized (OVX: low E2 concentration) female C57BL/6J mice fed with standard rodent diet (RD) and high-fat diet (HFD). Mice were weighed weekly and adipose tissue was collected after 20 weeks. In addition, knockout (KO) mice were analyzed to search for ERs (ERα or ERβ) involved in adipogenesis. The HFD group showed significant weight gain and abundant adipose tissue accumulation compared to the RD group; and the OVX/HFD group gained significantly more weight than the Sham/HFD group. However, the adipose tissue weight varied among the tissue depots. Adipose tissue weight naturally increased with the HFD feeding, both in normal and low E2 condition, compared to the mice fed with standard diet. Moreover, OVX groups tend to increase of the tissue weight in sWAT and prWAT, and more significant in the HFD groups. It suggested that the low estrogen condition accelerated adiposity, in tissue site-dependent manner. To explore the effect of the low E2 condition on adipose tissue morphology, the cross-sectional area of the adipocytes in hematoxylin-eosin (HE) stained tissue sections were examined. OVX mice showed enlarged adipocyte cross-sectional area, indicating that adipogenesis is more likely to progress under low E2 conditions, and HFD-fed ERα KO mice significantly accelerated weight gain, suggesting that ERα may regulate adipogenesis. (COI : No)

12 ステロイド合成経路の阻害が前立腺がん細胞の EMT および アトロパスタチン感受性に及ぼす影響

○田代二郎¹、杉浦曜大²、石川拓郎³、保坂善真^{1,2}、割田克彦^{1,2}¹鳥取大 農・獣医解剖 ²鳥取大院 共同獣医学研究科 ³愛知医大 医・解剖

【目的】去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) などの一部の前立腺がんでは、がん細胞が自らアンドロゲン産生を行う。コレステロールからステロイド合成を媒介するコレステロール側鎖切断酵素 CYP11A1 の遮断は、細胞内コレステロールの蓄積をもたらし、コレステロール合成系 (メバロン酸経路) を抑制すると予想される。一方、脂質異常症の治療薬であるスタチンはメバロン酸経路を阻害し、間葉系がん細胞ならびに上皮間葉転換 (EMT) を起こしたがん細胞に強い制がん効果を発揮する。しかし、CYP11A1 を阻害した CRPC 細胞におけるスタチンの影響は明らかでない。本研究では CYP11A1 の発現抑制が、CRPC 細胞の EMT とスタチン感受性に及ぼす影響を検討した。【方法】CRPC 細胞株 DU-145 を用いて、CYP11A1 siRNA 処置を行い、EMT マーカー遺伝子の発現量を解析した。また、CYP11A1 の発現抑制がスタチンの 50%阻害濃度 (IC50) およびスタチンの標的である HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) の発現量に及ぼす影響を評価した。【結果と考察】siRNA 処置した細胞では、間葉系様の形態変化に加え、EMT を示唆するマーカー遺伝子の変動を認めた。また、CYP11A1 の発現抑制は IC50 を約 80 μM から 30 μM に低下させ、さらに HMGCR の発現を抑制した。これまでにスタチンは上皮系よりも間葉系のがん細胞に対して強い制がん効果を発揮すること、また、HMGCR の発現抑制ががん細胞のスタチン感受性を高めることが知られている。今回の結果から、CYP11A1 の発現抑制は CRPC 細胞の EMT を誘導するとともに、HMGCR の発現抑制を介してスタチン感受性を高める可能性が示唆された。(COI : なし)

13 新型人工転写因子による光誘導型遺伝子発現系の開発

○三浦隆一郎¹、鈴木辰吾^{1,2}、太田健一¹、川合杏奈¹、大給日香里¹、三木崇範¹¹香川大学医学部神経機能形態学²産業技術総合研究所健康医工学研究部門細胞機能解析研究グループ

本研究では、我々の研究室で独自開発した新型人工転写因子 (DIMN 型人工転写因子) を光誘導型に改変することにより、培養細胞において、光誘導性遺伝子発現を可能とする遺伝子発現系の確立を最終的な目標とした研究を行った。まず、DIMN 型転写因子 (Dm-TF) の DNA 結合ドメインと転写誘導ドメインを分離し、それらが光刺激によって会合するための一対のドメイン (Magnet システムを採用) をそれぞれに付加したものを設計した。これらは、プラスミド内の DNA 配列として設計し、その機能は HEK293T 細胞および培養大脳皮質神経細胞において評価した。タンパク質発現誘導は luciferase と GFP を指標に計測した。実験では、Magnet 蛋白質のアミノ酸配列への新規変異導入や、Magnet の多量体、さらに転写誘導ドメインの小型化などの影響を検討した。その結果、HEK293T 細胞において、一時間の光照射により 100 倍以上の luciferase 遺伝子発現を誘導するシステムの構築に成功した。さらに、神経細胞においても、一時間の光照射によって、十分に観察できる程度にまで GFP の発現を誘導することが可能であることを確認した。これらの結果は、今回開発した光誘導型遺伝子発現システムが、HEK293T 細胞や培養神経細胞において十分機能することを示している。(COI : なし)

14 蛍光細胞イメージングによる金ナノ粒子表面機能化有機シリカナノ粒子の 4T1 マウス乳がん細胞株への放射線治療効果の評価

○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

X 線などを用いた放射線治療は最も効果的ながん治療の 1 つである。また金ナノ粒子は X 線増感材料として注目されており、ナノメディシンとしての利用が期待される。本研究では、蛍光細胞イメージングにより、金ナノ粒子表面機能化有機シリカナノ粒子 (OS/Au) の 4T1 細胞 (マウス乳がん細胞株) への放射線増進効果を多面的に評価した。OS/Au 表面をカチオン性ポリマーであるポリエチレンジアミン (PEI) で修飾した OS/Au/PEI は、細胞による取り込みが増加した。この X 線照射 (8Gy) による細胞障害活性を、ヘキスト染色による細胞核占有面積イメージングアッセイにより評価したところ、核占有面積の減少が確認された。これは一般的な細胞障害活性評価である WST-1 と強い相関を示し、同時に形態学的評価ができる利点があった。X 線照射後の核形態は、平らな精円形の正常核ではなく巨核であった。またトリパンブルー染色による生・死細胞数測定では、X 線照射 1 日後であっても細胞増殖率の低下、死細胞の増加が確認され、コロニー形成アッセイよりも短期間で X 線照射効果が確認できる利点があった。さらに蛍光顕微鏡観察により、DNA 損傷マーカーである γ-H2AX の発現増加、テトラメチルローダミンメチルエステル (TMRE) 染色によりミトコンドリア膜電位の低下が確認された。さらにアネキシン V 染色により、アネキシン V 陽性のアポトーシス細胞と、アネキシン V 陰性かつ巨核な老化様細胞死が多く観察された。以上より OS/Au/PEI は 4T1 細胞に対して放射線治療増進効果を示した。(COI : なし)

15 ベンザルコニウム塩化物による膀胱上皮細胞除去と臨床的応用

○鈴木 満理奈¹、横西 哲広²、清藤 恵美³¹川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 医療技術学専攻 臨床検査学研究コース、²川崎医科大学 解剖学、³川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科

間質性膀胱炎 (Interstitial cystitis; IC) は、膀胱の非特異的な慢性炎症に伴い、頻尿・尿意亢進・尿意切迫感・膀胱痛を呈する疾患である。IC の病因は、膀胱上皮細胞の接着障害などのバリア機能の破綻に起因する、尿の間質への漏出だと推測されている。IC は適切な疾患モデルがなく、根治的な治療法は未だ確立されていない。ベンザルコニウム塩化物 (Benzalkonium Chloride; BC) は、精巢上皮細胞の除去効果があることが報告された。そこで、BC 注入にて、機能障害を有する膀胱上皮細胞を除去し、健全な上皮細胞を移植することで、IC の根治的治療になると考えた。本研究では、BC の膀胱上皮に対する影響を検討した。

メスマウスの膀胱内に 0-0.01%BC を注入して観察したところ、0.01%以下の極低濃度の BC 注入は、表層細胞間の細胞接着を破壊することが明らかになった。また、0.04%BC では、表層細胞の剥離が認められ、0.08%BC では、上皮細胞の全層が完全に除去された。BC 注入後の上皮下への影響を、免疫染色やウェスタンブロッティングを用いて解析したところ、血管構造や筋層、間葉系細胞への明らかでない影響はみられなかった。これらの結果から、極低濃度の BC 注入は、膀胱上皮細胞の接着障害をきたすことから、IC のモデルマウスの作成に、また、高濃度の BC 注入で、膀胱上皮を除去できることから、細胞移植の前処置への応用が期待された。今後は、極低濃度 BC の反復注入により、慢性炎症を伴う IC モデルの作成と評価、膀胱上皮細胞移植による治療に挑戦する。(COI : なし)

16 マクロファージと活性酸素による昆虫脚再生の制御

○板東哲哉¹、奥村美紗²、大内淑代¹¹岡山大学学術研究院医歯薬学域 細胞組織学、²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞組織学分野

ヒトやマウスが手足を失うと再生できないが、両生類や昆虫は再生能が高く手足を再生できる。器官再生の分子メカニズム解明のため、我々は新規再生モデル昆虫フタホシコオロギの脚再生を制御する遺伝子群の機能解析を行なっている。コオロギの脚を切断すると、傷口が癒蓋と傷上皮に覆われ、傷上皮の直下に再生芽が形成される。失われた組織は再生芽細胞によって再生されるが、再生芽の形成メカニズムには未解明な点が多い。

コオロギ脚再生に働く遺伝子の機能解析から、Toll 様受容体を発現するマクロファージが死細胞を認識して傷口へ遊走し、サイトカインを放出して細胞増殖を亢進させ、再生芽形成を促進することを解明した。マクロファージは活性酸素 (ROS) を産生することも知られている。そこで脚再生における ROS の役割を調べたところ、細胞外に ROS を産生する NADPH oxidase の発現を減少させると再生芽が肥大することが分かった。この再生芽の肥大は、サイクリンの発現増加による再生芽細胞の増殖の亢進が原因であり、Hippo 経路の活性に依存していた。同様の表現型は ROS 産生阻害剤を用いた実験でも再現された。これらの結果から、コオロギ脚再生はマクロファージが産生するサイトカインによって促進され、ROS によって抑制されると考えられる。(COI : なし)

17 PRDM1 欠失マウスにおける血管新生異常

○新美健太¹、児島有彩¹、都留里佳¹、久保田義顕²、古山達雄¹¹香川県保医大・検査・解剖²慶應・医・解剖

PRDM1 は B 細胞が形質細胞に分化する際に発現する転写抑制因子であり、正常な抗体産生に必要である。PRDM1 は免疫細胞以外では発生期の血管内皮細胞にも発現することが知られているが、その機能については不明である。

我々は PRDM1 の血管新生における機能を明らかにするために内皮細胞特異的 PRDM1 ノックアウトマウス(KO)の血管新生を観察し、野生型マウス(WT)と比較した。観察対象としては網膜を用い、免疫組織化学により血管内皮細胞等を可視化することで観察した。

KO では WT と比較して明らかに血管伸長距離が減少していた。先端部分における血管内皮細胞の出芽は KO で減少しており、血管内皮細胞の遊走能の低下が予想された。しかし最先端部分の tip 細胞マーカーである ESM1 の免疫組織化学では、むしろ KO で ESM1⁺内皮細胞は増加していた。tip 細胞が損なわれていないが血管の伸長が障害されている理由として、遊走の方向性の異常を予想した。遊走方向に局在するゴルジ装置を免疫組織化学により可視化したところ、KO では tip 細胞でゴルジ装置が伸長方向の後方に局在するが多かった。

以上の結果から、PRDM1 が血管内皮細胞で遊走の方向性を決定することで血管新生を制御している可能性が示唆された。(COI：なし)

18 リンパ管内皮細胞において FOXO1 はフェロトーシスを阻害する

○砂川沙紀¹、新美健太¹、古山達雄¹¹香川県保医大・検査・解剖

フェロトーシスは鉄依存性の過酸化脂質の蓄積を主とする非アポトーシス性の酸化ストレス死である。FOXO1 は一般に catalase や SOD 等の転写調節を介して抗酸化ストレス機能を有することが知られている転写因子だが、フェロトーシスへの関与は不明である。

我々は今回、リンパ管内皮細胞でのフェロトーシスにおいて FOXO1 が及ぼす影響について調べた。リンパ管内皮細胞にフェロトーシス誘導剤である RSL3(GPx4 阻害剤)を用いたところ、FOXO1 をノックダウンしたリンパ管内皮細胞ではフェロトーシスが促進されることがわかった。また、多くのフェロトーシス関連遺伝子において FOXO1 をノックダウンするとフェロトーシスに対して促進的に働く遺伝子変化がみられた。また、FOXO1 欠失マウスの尾の皮膚新生リンパ管において過酸化脂質の蓄積が多くみられた。

これらの結果より、リンパ管内皮細胞において FOXO1 はフェロトーシスを阻害することが示唆された。今後はそのメカニズムや他の細胞についても検討する。(COI：なし)