

日本解剖学会

第111回関東支部学術集会

会 期：令和5年9月3日（日）
会 場：新潟大学

特別講演

私にとっての解剖学

牛木 辰男
新潟大学 学長

本講演では、私が学生時代を過ごし、また 25 年ほど研究生活を送った新潟大学における解剖学教室の歴史を紹介し、一方で私のこれまでの研究の一端を紹介する。新潟大学の解剖学教室は新潟大学の前身にあたる官立新潟医学専門学校の創立（1910 年）と共に始まり、解剖体系も翌 1911 年に第 1 回が開催されている。創設時の解剖学教室には島田吉三郎（在任期間 1910-1918）、布施現之助（1911-1914）、長谷部言人（1913-1914）の名を挙げることができる。その後、工藤徳安（1915-1951）、平澤興（1930-1946）、小池上春芳（1946-1972）、今村豊（1952-1959）が 2 講座体制を築き、その後、電子顕微鏡のための新たな講座に水平敏知（1960-1963）、山本寅男（1964-1967）が加わり、私が解剖学を学んだ時期は、小片保（1959-1980）、布施栄明（1972-1991）、藤田恒夫（1968-1995）の 3 教授がそれぞれの教室を主宰されていた。学部卒業後、私は大学院生として藤田教授の主宰する第三解剖学教室で学び、岩手医科大学、北海道大学で解剖学者としてのキャリアを積むことになった。さらに 1995 年からは、新潟大学に研究の場を移し、おもに組織学、ないし顕微解剖学という分野でとくに電子顕微鏡を用いた研究を行ってきた。また、この間に、走査プローブ顕微鏡（原子間力顕微鏡や走査イオン伝導顕微鏡）の医学生物学応用に従事した。ここでは、解剖学教室で過ごした私の研究生活を振り返りながら、細胞と組織の三次元構造解析の成果の一端を紹介する。

理事長講演

動的なアクチン構造を可視化する改良型 POLArIS^{act}（F-actin 配向プローブ）の開発

佐藤啓介¹、杉崎綾奈¹、鎌田勝^{2,3}、久野玉雄²、桂一茂²、白水美香子²、寺田純雄¹

¹ 東京医歯大・院（医歯）・神経機能形態、² 理研・BDR・タンパク質機能構造、³ 現所属：理研・開拓研究本部

我々が最近開発した POLArIS^{act} は、蛍光偏光顕微鏡を用いてアクチン線維（F-actin）の配向を可視化するための遺伝子にコードされた蛍光プローブである。F-actin に結合した POLArIS^{act} は線維の長軸に平行な偏光方向の蛍光を発するため、蛍光偏光顕微鏡で解析すれば、F-actin の配向情報が得られる。POLArIS^{act} を細胞に発現させると、アクチン線維は明るく標識されるが細胞質の背景シグナルは低く抑えられるため、通常の蛍光 F-actin プローブとしても極めて有用である。一方、ラメリボディアなどにおける動的なアクチン構造が標識されにくいという課題があった。今回我々は、クライオ電子顕微鏡により、F-actin と POLArIS^{act} の複合体の構造を高解像度で決定した。その結果、F-actin において POLArIS^{act} が結合する領域は、Lifeact などのいくつかの F-actin 結合タンパク質の結合領域と重複することが分かった。得られた構造情報に基づき、結合界面を形成するアミノ酸残基に変異を導入し、F-actin への高い親和性を保ったまま、線維上でのターンオーバーが、より速い POLArIS^{act} 変異体を複数得た。これらの変異体を細胞に発現させると、細胞質の背景シグナルは低く抑えられたまま、動的なアクチン構造への局在が大幅に向上していた。これらの改良型 POLArIS^{act} プローブは、アクチン細胞骨格に関わる様々な現象、特に変化の激しい動的なアクチン構造に関わる現象の解析に役立つと期待される。

1-1

低分子量 G タンパク質 Arf6 活性化因子 EFA6A 欠損マウスにおける海馬のシナプス形態の異常

松浦輝、菅原健之、阪上洋行
北里大・医・解剖

Arf6 (ADP ribosylation factor 6) は、Rasスーパーファミリーに属する低分子量Gタンパク質であるArfファミリーのうちの1つであり、細胞膜-エンドソーム間の小胞輸送とアクチンダイナミクスの制御において重要な役割を果たしている。Arf6の活性化は、グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)により制御されており、EFA6A (exchange factor for ARF6) は、海馬を含む前脳に特に強く発現するArf6のGEF分子のひとつである。これまでに、EFA6A-Arf6シグナルが神経細胞の軸索や樹状突起、スパインの形態形成に関与していることがin vitroでの研究により報告されている。しかしながら、in vivoにおけるEFA6Aの生理的役割は明らかにされていない。そこで本研究では、EFA6A欠損マウスを作成し、記憶・学習をつかさどる脳領域である海馬でのシナプス形態形成への影響を調べた。まず、成体の野生型およびEFA6A欠損マウスより作成した脳切片を用いて、海馬CA1領域の錐体細胞をLucifer yellowで標識して、樹状突起スパインの形態を解析した結果、EFA6A欠損マウスでスパインの密度の増加が見られた。次に、興奮性ポストシナプスマーカーであるPSD-95に対する蛍光免疫染色をおこなった結果、EFA6A欠損マウスのCA1領域では興奮性ポストシナプスの密度およびサイズの増大がみられた。さらに興味深いことに、抑制性プレシナプスおよび抑制性ポストシナプスのマーカーであるVGATおよびGephyrinに対する免疫染色をおこなった結果、EFA6A欠損マウスのCA1では抑制性シナプスのサイズが縮小していることがわかった。脳における情報処理は、神経回路網の興奮と抑制のバランスにより制御されているが、本研究の結果から、EFA6A 欠損マウスにおいては、興奮性シナプスと抑制性シナプスの形態異常が生じることで、海馬の神経回路での興奮性/抑制性 (EI) バランスの不均衡が生じている可能性が示唆された。

1-2

オリゴデンドロサイトにおける脂質メディエーター合成酵素 Enpp2 欠損マウスの表現型解析

岡 祐季¹、備前 典久¹、青木淳賢²、竹林浩秀^{1,3}

¹新潟大・医・神経解剖、²東大・薬・衛生化学、³新潟大・CCRF

オリゴデンドロサイト(OL)は中枢神経系で軸索周囲に髄鞘を形成し、 跳躍伝導、軸索保護、軸索の栄養などに寄与するグリア細胞であるが、それらの詳細なメカニズムは不明な点が多い。*Enpp2* (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2)は細胞外に分泌される Enpp2 (別名オートタキシン) をコードする遺伝子である。Enpp2 は脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸 (LPA) の合成酵素であり、LPA は細胞膜上の受容体を介して、様々な生理作用をもたらすことが知られている。Enpp2 は中枢神経系においては成熟 OL で顕著に発現しているが、生体脳の OL における機能はほとんど知られていない。本研究では、OL 特異的な *Enpp2* 欠損マウス(*Cnp-Cre; Enpp2* cKO マウス)を作製し、OL の分化・成熟への影響を解析した。*Enpp2* 欠損マウスでは、OL 分化マーカーの発現に顕著な変化は認められなかったが、一部の OL の細胞体の形やランビエ絞輪近傍のパラノードにおける分子局在に異常が生じていることが明らかとなった。これらの結果から、Enpp2 が OL の分化・成熟に関わっていること、さらに、Enpp2 欠損 OL により何らかの機能異常がある可能性が示唆された。

1-3

脳梗塞の分子イメージング解析

岩下明日香¹、澤野俊憲²、大島典子³、小川寛之^{1,3}

¹獨協医大・医、²立命館大・生命科学、³獨協医大・医・先端医科学

脳梗塞などの血管障害に起因する血管性認知症は、患者の生命および家族の QOL へ大きく影響する疾患であり、有効な治療法の基盤となる詳細な分子メカニズムの解明が期待されている。本研究は中大脳動脈閉塞 (MCAO) を施し作製した脳梗塞マウスを用い、超早期治療対象となる MCAO 4 時間後、梗塞巣が拡大・完成する MCAO 24 時間後および比較対象群の脳に対して質量分析による分子イメージング (Mass Spectrometry Imaging, MSI) 解析を行なった。

MSI 解析は、質量分析技術を背景とした分子イメージング技術であり、組織切片に対し連続的にレーザーを照射して分子イオンを観測することによって、一度に数百もの分子群の組織局在と定量情報を取得できる解析技術である。

本発表では脳梗塞後の梗塞部位およびその周囲における時間経過に伴う分子群の局在量の変化について、MCAO 4 時間後・MCAO 24 時間後の脳解析を実施した結果を報告する。梗塞部位およびその周辺組織において、MCAO 後の時間経過とともに局在量が増加する分子群が観察された。偽処置群 (Sham control) や対側との比較解析の結果、分子局在量の変動は脳梗塞による組織損傷およびそれに対する応答反応と考えられ、今後更なる検証を実施する予定である。

川島友和、酒井 真、佐藤二美
東邦大・医・解剖・生体構造

本学では、平成30年度より系統解剖学実習に画像解剖学演習を導入した取り組みを行ってきた。今回は、その取り組みの概要とその工夫と改善点について報告する。
東邦大学医学部倫理委員会への申請・許可を経て、実習に供されるご遺体の単純CT撮影を実施した。解剖実習体とその画像データを対比することで、平面断面データと肉眼3次元構造の対応関係や複雑な人体の空間的配置を理解することを主目的としている。さらに、アクティブ・ラーニングやリサーチマインドの涵養の一助として、画像所見と解剖所見等を組み合わせた自主提出画像課題の作成と提出を促している。
自主画像課題の提出率は年々上昇し、近年はほぼ学生全員が興味を持って取り組んでいる。画像閲覧媒体として2種の画像解剖学習用ソフトウェアとともに、WindowsならびにMac用DICOM viewerを実習室内に配備し、学生のPC使用経験、ソフトウェアへの適応、画像解剖への好奇心に応じて使用媒体を選択させた。必要機能や作業効率等を検討して、解析ソフトウェアの変更とマニュアルの更新も繰り返し行ってきたことで、多くの学生が複雑な課題へ挑戦するようになった。一方で、様々なアーティファクトや低コントラストなどの遺体特有の画像ノイズを低減し、生体臨床データの画質へ近づけることが大きな課題であった。最終的には、ノイズ低減ソフトウェアを導入した結果、軟組織の識別が容易となり、画像読影効果や画像構築意欲が高まった。

2-1 脳組織のハイブリッド・オミクス解析：分子局在イメージングから複合体サイズ変動まで

小川寛之
獨協医大・医・先端医科学

我々の体では、様々な分子・原子が特定のコンパートメントに局在し適切な形とサイズに保たれ、秩序ある構造体として組織・器官を構成している。それによって生体物質群は細胞・組織・臓器の中で個々の機能を協調的かつダイナミックに発揮することができる。またこの秩序を支える仕組みが破綻した時、物質レベルの変調は疾患として現れる。
これまで様々な疾患の発症において、分子局在や分子サイズの変化（オルガネラ、小胞、二量体、複合体、凝集体の形成など）が疾患発症や病態進展の中心のカスケードに位置するという報告がなされてきた。しかし生体における物質レベルの変調を包括的に理解するためには、物質データの取得状況は未だ十分ではない。そのため生体における分子・原子の種類・状態・局在について、同一試料から多くの情報を極限まで取得し、統合的に解析する技術が必要である。
本講演では発表者を中心とした研究チームが脳組織試料に対して既に実施している、質量分析を中心とした統合的オミクスアプローチについて紹介する。生体を構成する全ての分子・原子の局在とその分子状態の情報を取得するため、連続組織切片を用いた分子・元素局在解析と、精密な生化学的分離技術による包括的定量オミクス解析を実現した。本手法は、生体組織内のサイズ特性と組織局在情報によって分子や元素の変動を分析・追跡できる有望なアプローチであり、疾患メカニズムの解明へ向けたヒト疾患試料の統合オミクス解析技術として、生命の本質や病態を広く深く理解するブレークスルー基盤となる可能性を持つ。

2-2 マウスとラットにおけるエストロゲン受容体β発現細胞の全脳マッピング

森下雅大、肥後心平、岩田衣世、石井寛高
日本医科大学 大学院医学研究科 解剖学・神経生物学分野

エストロゲンは社会行動、学習・記憶、生殖内分泌、エネルギー代謝など様々な脳機能を調節する。哺乳類の脳に発現する核内エストロゲン受容体にはα型（ESR1）とβ型（ESR2）の2種類のアイソフォームが存在し、それぞれ異なる脳機能に寄与することが知られている。げっ歯類ではESR1とESR2のmRNAは発現部位が部分的に異なることが示唆されており、発現部位の違いが生理機能の違いと関連している可能性がある。しかし、ESR2はmRNAもタンパク質も共に検出が困難なため、ESR2発現細胞の詳細な分布は明らかになっていない。そこで本研究では、脳内におけるESR2発現プロファイルを明らかにする事を目的とした。ESR2タンパク質の検出には、近年新たにヒト・マウス・ラットのESR2タンパク質に対する特異性と交差性が確認されたマウスモノクローナル抗体（PP20506）を用いた。雌雄のマウスとラットの脳切片にPP20506を用いた免疫染色を施し、ESR2発現細胞の全脳マッピングと、ESR2発現部位の性差と種差の解析を行った。その結果、ESR2発現細胞は、視索前野、拡張扁桃体、視床下部、中脳、大脳皮質の小領域に局在することが明らかになった。一部の脳部位におけるESR2発現細胞の分布と数には、性差と種差があった。さらに、ESR2発現に対する血中エストロゲンの影響を明らかにするため、卵巣を切除した雌マウス・ラットに対してエストロゲンを曝露した後、ESR2発現細胞数に及ぼす影響を調べた。その結果、雌マウス・ラットのESR2発現は、生理的なエストロゲン条件下で維持され、枯渇もしくは過剰な条件下では抑制されることが明らかになった。本研究から明らかになったげっ歯類の脳におけるESR2の詳細な発現プロファイルは、エストロゲンの中枢作用の理解に資すると考えられる。

内田仁司、田井中一貴
新潟大・脳研・システム脳病態学

近年、脳を覆う軟髄膜（くも膜と軟膜）と硬膜から成る髄膜は、脳を保護する「物理的かつ免疫学的なバリア」であることが明らかになりつつある。定常状態の軟髄膜に存在する免疫細胞は、脳脊髄液を監視し、脳の恒常性維持に寄与する。軟髄膜における主な免疫細胞はマクロファージであるが、その空間分布や生理学的・病態生理学的役割は十分に解明されていない。これらの研究背景に基づく本研究は、髄膜性マクロファージの空間分布を明らかにするために、組織透明化および三次元組織染色法と光シート顕微鏡を組み合わせて、髄膜性マクロファージの三次元解析を行なった。その結果、ミクログリア／マクロファージを標識するレポーターマウスの全脳イメージングを通じて、定常状態の軟髄膜における髄膜性マクロファージが集積して存在することを見出した。次に、髄膜性マクロファージの複数のマーカー分子に対する抗体を用いた三次元組織染色の実験条件を確立させ、野生型マウスでの染色実験を行ったところ、上記と同様の知見を得ることができた。また、集積領域は、個体毎に異なることも明らかになった。さらに、その集積は血管周囲に認められた。現在、新たな組織透明化手法の開発等を通じて、より詳細な性格付けを行っており、その結果についても紹介したい。

2-4 An Olig2-expressing astrocyte subtype in developing and adult mouse dentate gyrus

¹Shoichiro Omura, ¹Rina Ogawa, ¹Hiroki Sugimoto, ¹Tomomi Kawachi, ¹Aya Ogawa, ¹Yuuki Arai, ¹Tokiharuru Takahashi, ²Hideyuki Maeda, ¹Kyoji Ohyama
¹Department of Histology and Neuroanatomy, Tokyo Medical University
²Legal Medicine, Osaka University

Transcription factor Olig2 is expressed in oligodendrocytes and some neuronal progenitor cells. It was recently shown that Olig2 is also expressed in some astrocytes in developing and adult spinal cord (Vogel et al., Glia. 2020). Consistent with this, Olig2 expression was found in astrocytes in adult mouse brain such as cerebral cortex (Tatsumi et al., Front Neuroanat, 2018; Wang et al., Mol Brain, 2021). However, it is not fully understood whether Olig2 is expressed in astrocytes in other brain regions.

Here we show that Olig2 is expressed in late embryonic, postnatal, and adult mouse dentate gyrus (DG). In addition to Olig2+/Sox10+ oligodendrocytes, many Olig2+/Sox9+ cells were found in the DG. They co-expressed BLBP but only a small fraction of them co-expressed GFAP. They did not express a neuronal marker NeuroD. These data suggest that the Olig2+/Sox9+/BLBP+ cells are a subtype of astrocytes. We are currently investigating their development in more detail. Their functional significance will be discussed.

2-5 Investigation of Oligodendrocyte-Neuron interaction in the mouse cerebellum

Batpurev Battulga¹, Yasuyuki Osanai¹, Reiji Yamazaki¹, Tom Kouki¹, Megumi Yatabe¹, Sasikarn Looprasertkul¹, Yoshiaki Shinohara¹ and Nobuhiko Ohno^{1,2}
¹Dept Anat, Div Histol Cell Biol, Jichi Med Univ, ²Div Ultrastruct Res, Natl Inst Physiol Sci.

Oligodendrocytes produce myelin sheaths, which are essential for cognitive and motor functions. An oligodendrocyte myelinates multiple neuronal axons and increases the speed of nerve conduction velocity. Previous studies suggested that some of the oligodendrocytes preferentially myelinate a specific class of axons in distinct brain regions in the central nervous system. However, it has been technically difficult to investigate myelination specific for neuron classes and observe the morphology of oligodendrocytes using conventional immunostaining methods. In this study, we developed a simple method for observing myelination toward a particular class of axons using an attenuated rabies virus vector and the tissue-clearing technique for immunohistochemical analyses. We visualized oligodendrocytes in the cerebellar white matter by the attenuated rabies virus injection, and Purkinje cell axons and the other types of axons were labeled by anti-calbindin and anti-neurofilament antibodies. We found that an attenuated rabies virus vector sparsely labeled oligodendrocytes, and many myelin sheaths were formed by the single oligodendrocytes in the mouse cerebellar white matter. Interestingly, approximately 50% of oligodendrocytes selectively myelinated axons derived from Purkinje cells. These results suggest that this method is a useful tool for analyzing the oligodendrocyte-neuron interaction, and would address the role of oligodendrocytes for cerebellum-dependent learning through the selective formation of myelin.

3-1 齧歯目の頬袋制御筋とその支配神経の特殊性について

川島友和、佐藤二美

東邦大・医・解剖・生体構造

脊椎動物の顔面・頸部には顔面神経より支配される一連の皮筋群が存在するが、有胎盤哺乳類（真獣類）の頸部ではその数が減少し、一般に広頸筋のみが存在する。しかし、原始的哺乳類（原獣類・後獣類）や顔面・頸部に特殊構造を有する真獣類では、頸部にも多様な頸括約筋群が観察される。

今回、われわれは頸部の皮筋の派生形質と共通形質を理解する目的で、記載の乏しい頬袋を有する齧歯目を対象に、その制御筋と神経支配に関して比較解剖学的に解析した。

解析対象は、口腔に対する位置によって外頰袋種と内頰袋種に区別される2種類を含めた。外頰袋を有する2上科の各々からホリネズミ (*Geomys bursarius*) 3体6側とカンガルウラット (*Dipodomys deserti*) 2体4側を選定し、内頰袋を有するシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) 4体8側と比較した。

その結果、頬袋制御筋の種類やその発達程度などに違いが観察されたが、注目すべき点は、外頰袋を有する2種には、頬袋開口部括約筋 (*Sphincter sacculi*) が観察された。この頬袋開口部括約筋や深頰括約筋の腹側内部筋束などの、顔面・頸部皮筋群の腹内側筋群は顔面神経に加えて、頸神経の支配を受けていた。顔面神経は筋の裏面から、頸神経は、筋の外側面もしくは表面から侵入する傾向があった。頸部の特殊皮筋が出現する場合には、頸神経がその支配に関与する可能性が考えられた。一方で、二重神経支配での頸神経支配の意義づけや一部の有胎盤哺乳類に見られる深頰括約筋とそれ以外の脊椎動物の深頰括約筋の同定性の検証などは今後の重要な課題である。

3-2 舌神経の三次元的走向と筋間隙との関係から予測する神経損傷リスク評価

大島勇人、勝見祐二

新潟大・院医歯総合（歯）・硬組織形態

〔目的〕本研究は、解剖体を用いて舌神経の三次元的走向と筋間隙との関係を調査し、頭部CT画像上で視覚化することによって、筋間隙の観察から患者固有の舌神経の走向経路を予測する方法論を確立することを目的とした。

〔方法〕2019～2021年度新潟大学歯学部および大学院医歯学総合研究科における人体解剖学実習用の日本人成人遗体26体52側を用い、解剖体頭部離断後に1回目の頭部CTを撮影した。頭部半切後に舌神経および周囲組織を剖出した後、舌神経に沿って金属ワイヤーを挿入した状態で2回目のCTを撮影した。撮影後ワイヤーを除去し、肉眼解剖にて実際の舌神経の走向経路と内側翼突筋、顎舌骨筋、上咽頭収縮筋、茎突舌筋との位置関係を観察した（承認番号2019-0083）。

〔結果と考察〕下顎骨内側面において、内側翼突筋前縁と顎舌骨筋後縁が離開しているものをType I、上方で一部接触しているものをType II、双方が重なっているものをType IIIと分類したところ、Type I が最も多く（9/16例）、Type III が最も少なかった（2/16例）。さらに、顎舌骨筋後縁が智歯より近心に位置する場合をA型、遠心に位置する場合をC型、両者が一致する場合をB型とした。C型では、骨面と舌神経の間に顎舌骨筋が介在するので舌神経損傷リスクが低く、A型では舌神経が骨面に近接するので舌神経損傷リスクが高くなる。智歯が残存する3体について調査した結果いずれもC型であった。舌神経は内側翼突筋と下顎骨の間を走行した後、内側翼突筋前縁・顎舌骨筋後縁・上咽頭収縮筋下縁・茎突舌筋内側縁で囲まれる隙を走行すること、舌神経が内側翼突筋前縁と顎舌骨筋後縁間で特に骨に近接し、原則顎舌骨筋後に接しながら下行すること、内側翼突筋と顎舌骨筋の前後的な位置関係に起因して、舌神経の走向が筋間隙の形態の影響を受けることが判明した。従って、術前CTの筋間隙及び顎舌筋線の観察から患者固有の舌神経走向経路が予測可能であり、智歯との位置関係から術前の舌神経損傷のリスク評価が可能であると考えられた。

3-3 マウス頭蓋顔面形成における Six ファミリー転写因子および自然免疫因子 MASP3 の役割

高橋将文^{1,5}、町田豪²、米沢朋³、竹本龍也⁴、砂河孝行⁵、武田憲彦⁵、関根英治²、野田泰子¹

¹自治医大・医・解剖学、²福島医大・医・免疫学、³長崎大・院・医薬学、⁴徳島大・先端酵素研、⁵自治医大・分子病セ・循環

頭蓋顔面形成は形作りの重要な要素であり、その破綻は重篤な小児先天性疾患に直結する。頭蓋顔面形成不全に関わる幾つかの原因遺伝子が同定されているが、分子機序の詳細は未解明である。転写因子をコードする *Six1* および *Six4* の二重遺伝子欠損マウスは、上下顎低形成と下顎切歯欠損を生じる。今回我々は、切歯ブラコード陥入前において、上顎間葉に発現するが、下顎間葉には発現しない *Six2* に着目した。胎齢13.0日の *Six1/Six4/Six2* 三重遺伝子欠損マウスでは、切歯形成領域を含む上顎・鼻原基が完全に欠損した。次に、*Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウス下顎原基での遺伝子発現変動をRNAシーケンスにより解析した。その結果、*Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスでは、顔面形成に関わる転写因子遺伝子、筋分化や自然免疫制御に関わる遺伝子の発現が顕著に変動していた。我々は、発現が低下する遺伝子のうち、ヒト頭蓋顔面形成疾患3MC症候群の原因遺伝子 *Masp1* に着目した。*Masp1* は自然免疫補体活性化に関わるセリンプロテアーゼをコードし、C末端構造が異なるアイソフォームタンパク質MASP1およびMASP3が合成される。興味深いことに、マウス胎齢11.5日では、*Masp3* が下顎原基間葉細胞に発現し、*Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスではその発現が消失した。また、MASP3単独欠損マウスでは、胎齢18.5日において顔骨と頭蓋骨の形成不全が明確であった。以上の結果から、上顎形成において *Six2* が *Six1/Six4* の機能を補うこと、*Masp3* 発現の一部は *Six1/Six4* により制御され、MASP3はマウス頭蓋顔面に極めて重要な因子であることが明らかとなった。

3-4 耳小骨形成における Shh の時間的量的重要性の解明

川崎盛¹、川崎真依子²、大峽 淳²

¹新潟大・歯・高度口腔機能教育研究センター、²新潟大・歯・口腔解剖学分野

耳小骨は、哺乳類の中耳に存在する軟骨性の器官であり、耳小骨の異常は伝音性難聴を引き起こす。耳小骨の発生には Shh シグナルが関わるとの報告があるが、それについては未だ不明な点も多い。一次線毛は様々な機能を有する細胞小器官であるが、特に Shh シグナルを制御すると言われていた。そこで、今回我々は、神経堤由来細胞特異的に遺伝子を欠損または過剰発現させたマウスを作製し、それらの解析から耳小骨の発生について検討を行った。

Smo;*Wnt1*Cre では、耳小骨は形成されなかった。一次線毛局在分子である *Ofd1* を欠損させたマウス (*Ofd1*;*Wnt1*Cre) を作製したところ、胎生10.5日で *Ofd1* は欠失していたが、耳小骨原基の細胞凝集、一次線毛、Shh シグナルに変化は認められなかった。これに対し、胎生11.5日の *Ofd1*;*Wnt1*Cre では、一次線毛が消失し、Shh シグナルも有意に減少した。また、それに伴い、細胞増殖も減少し、耳小骨原基の大きさが増大せず、最終的に耳小骨が著しく小さくなった。このことから、胎生10.5日の耳小骨における Shh シグナルは、胎生11.5日以降のものとは活性機序が異なることが示唆された。M2マウスは、*Smo* の過剰発現により、Shh シグナル活性を上昇させる。このマウスを *Ofd1*;*Wnt1*Cre に交配させた *Ofd1*;*M2*;*Wnt1*Cre を作製したところ、耳小骨の劣形成がレスキューされた。胎生10.5日の *Ofd1*;*M2*;*Wnt1*Cre を解析したところ、一次線毛が存在しており、WTよりもShhシグナルが上昇し、それに伴い細胞凝集も増大していた。しかし、胎生11.5日以降の *Ofd1*;*M2*;*Wnt1*Cre では、一次線毛が消失し、Shhシグナルの欠損により細胞増殖は停止していた。これは、一次線毛が消失した状態では、*Smo* が過剰発現してもShhシグナルは上昇せず、胎生10.5日の段階でのShhシグナルの上昇により一時的に増えた耳小骨原基の細胞が、その後の細胞増殖の停止を補填し、耳小骨の劣形成をレスキューしたと考えられる。以上のことから、耳小骨発生における Shh シグナルは、その initiation が生じる胎生10.5日とそれ以降で活性機序が異なること、また、胎生10.5日の細胞数増加が一次線毛機能不全による耳小骨の劣形成を回復させることが示された。

4-1 メダカの胸鰭における脊髄運動ニューロンのシナプス形成過程の検討

相馬 健一、渡辺 啓介、長島 寛、佐藤 昇

新潟大・医・解剖

脊髄運動ニューロンのシナプス形成期において、アセチルコリン受容体の競合的阻害剤であるクラーレ (d-tubocurarine) の投与によって神経筋活動を抑制すると、運動ニューロンの「プログラムされた細胞死」が回避されると共に、脊髄神経の軸索分枝とシナプス (神経筋接合部 NMJ) が増加することが知られている。従って、脊髄運動ニューロンの発生において、神経筋活動が重要な役割を果たしていると考えられるが、神経筋活動の抑制によるプログラム細胞死が回避されるメカニズムや、軸索分枝とNMJが増加するメカニズム、更には両者の関連などは明らかになっていない。メダカ胚では運動ニューロンのプログラム細胞死が観察されないため、神経筋活動の抑制による胚への影響を、軸索分枝とNMJの形成に示ぼって検討できる系となりうる。我々はメダカ胚を用いて、胸鰭レベルにおける脊髄運動ニューロンのシナプス形成過程を検討した。その結果、卵期3.5日目に脊髄神経が胸鰭へ侵入し、4日目に標的である筋が形成され、5日目には a-bungarotoxin 陽性のNMJが観察できた。さらに、卵期5日目から9日目までのメダカ胚にクラーレを連続投与すると、卵期9日目では、コントロール群に比して、クラーレ投与群で胸鰭の動きの回数が有意に減少することが確認できた。一方、軸索分枝とNMJの組織像については、両者の間で明らかな違いを確認できなかった。

4-2 ヒト iPS 細胞由来神経オルガノイドを活用した新規人工神経の移植による末梢神経再生

奥山健太郎^{1,2}、西島貴之^{2,3}、中山純平¹、内山景子¹、小御門希優¹、木村洋朗³、早津学¹、信藤知子^{2,4}、芝田晋介^{1,2,4}

¹新潟大・医・顕微解剖、²慶應大・医・生理学、³慶應大・医・整形外科、⁴慶應大・医・電顕室

事故や手術などによって末梢神経に広範囲の断裂が生じた場合、移植治療が必要になる。現在の標準治療法である自家神経移植や、近年臨床応用が開始されている既存の人工神経移植は、適用範囲や治療効果、術後障害などに課題を抱えており、代替法となる新規人工神経の開発が求められている。

そこで我々は、特殊培養デバイスで作製したヒトiPS細胞由来神経オルガノイドを活用し、多数の軸索の束から構成され細胞体を含まない新規人工神経を開発した。野生型ラットの坐骨神経欠損モデルへの移植実験において、新規人工神経の移植が自家神経移植に迫る優れた治療効果をもたらすことを確認した。移植した軸索の経時的解析や再生組織のトランスクリプトーム解析の結果、新規人工神経の移植が免疫系の活性化を介して再生の足場環境の形成を促進し、良好な治療効果に寄与したことが示唆された。すなわち、移植された軸索は数週間以内に分解されるが、その過程でマクロファージなど免疫系細胞の集積と活性化を介して血管新生やシュワン細胞の遊走が誘導され、間接的にホスト由来の軸索の伸長が促進されると考えられた。この考察を裏付けるように、免疫不全ラットを用いた同様の実験では治療効果を認めなかった。今回開発した新規人工神経は、野生型ラットを用いた移植実験において自家神経移植に迫る治療効果を示した。また、移植物は細胞体を含まないため腫瘍化リスクが低く安全で、免疫系の機能で消化されることにより神経再生を促進するため免疫抑制の必要がなく、末梢神経損傷治療に有用であると考えられた。現在、治療効果と安全性、応用性を最大限に高める条件を検討しつつ、大型動物を用いた前臨床試験を開始している。

4-3 腸管 M 細胞の抗原取り込みにおける Plekhs1 の機能解析

木村 俊介¹、小林 伸英^{1,2}、高野俊輔¹、増山 大一¹、田中 啓介¹、長谷 耕二¹

¹慶應義塾大学 薬学部 生化学講座

²金沢大学 医薬保健研究域 医学系細菌学

M 細胞は管腔内の抗原を取り込み、トランスサイトosisにより上皮下へと運ぶ特殊な上皮細胞である。この M 細胞の機能により上皮下の抗原提示細胞が管腔内抗原を受けとることで粘膜免疫応答が活性化する。M 細胞は数十 nm から 1 μm の物質を取り込むが、その取り込みに関与する分子機構は不明である。我々はマウス M 細胞発現遺伝子の網羅的解析の結果、機能未知遺伝子 Plekhs1 を見出した。Plekhs1 は細胞膜を構成するイノシトールリン脂質に親和性を示す PH ドメインを持ち細胞内輸送系への関与が考えられた。そこで、M 細胞の抗原取り込み機能における Plekhs1 の機能を解明することを目的とし、Plekhs1 の PH ドメインとイノシトールリン脂質との結合性を検証した。大腸菌により Plekhs1 の PH ドメインと GST タグの融合タンパク質 GST-Plekhs1(PH)を発現させ、GST タグを使用したアフィニティ精製により精製した。細胞膜を構成する 7 種類のイノシトールリン脂質をそれぞれ含むリポソームを作製し、GST-Plekhs1 (PH)との共沈降実験を行った。さらに緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質 GFP-Plekhs1 を HeLa 細胞へと発現させ、細胞内局在を解析した。GST-Plekhs1(PH)は PI(3,4)P2 と PI(3,4,5)P3 を含むリポソームとの共沈降が認められ、特に PI(3,4)P2 との結合が強く認められた。そして、GFP-Plekhs1 は HeLa 細胞の細胞膜上に存在し、細胞膜の Ruffling 構造への局在が認められた。マクロフィノサイトーシスは細胞膜の Ruffling 構造から形成され、その際に PI(3,4)P2 が集積する。したがって、Plekhs1 はイノシトールリン脂質と相互作用し、マクロフィノサイトーシス経路に関与する分子であり、M 細胞からの取り込みの制御に寄与すると想定される。今後は、Plekhs1 欠損マウスを用い M 細胞からの物質取り込みにおける機能を明らかにする。

4-4 マウス肝線維化の三次元解析

早津 学¹、尾曲 大輔²、鳥海 拓³、三上 剛和¹

¹新潟大・医・顕微解剖、²鶴見大・歯・病理、³日本歯科大・新潟生命歯・解剖学 I

【序論】非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、進行性の線維化を特徴とし、肝硬変や肝がんの発生に大きく関与する。食生活の変化や肥満人口の増加に伴い、その罹患者は世界規模で増加している。単純性脂肪肝から NASH への移行には肝星細胞や炎症性細胞の活性化が関与するが、その詳細は不明である。肝線維化機序の解明には、これらの関連細胞や線維化の詳細な肝組織内局在を把握し、それぞれの因果関係を明らかにすることがカギとなる。そこで我々は、連続切片-三次元再構築法を用いて肝線維化を解析し、その有効性を検討した。

【方法】マウス NASH モデルは、高脂肪食（High fat diet: HFD）と Lipopolysaccharide (LPS) (HFD+LPS 群) を与えることによって作製した。比較群として、通常食のみ、HFD のみ、および通常食と LPS を与えた群についても解析を行った。これらマウスの肝臓について、組織切片を用いた光学顕微鏡観察と連続切片を用いた三次元再構築解析を行った。線維化組織の検出にはアザン染色法を用いた。三次元構築には、Amira ソフトウェア（Thermo Fisher）を用いた。

【結果】組織切片の光学顕微鏡による観察では HFD+LPS 群において線維化と肝細胞内の脂肪の蓄積が最も顕著に観察された。一方、連続切片-三次元再構築では、ソフトウェア処理において、Align Slices、Extract Subvolume、Interactive Thresholding、Binary Smoothing、Generate Surface によって構成されるレシピを用いることによって、肝臓全体の線維化組織の分布から 1 細胞レベルの局在までを観察することのできる広視野高解像度三次元再構築に成功した。この三次元解析によって、HFD+LPS 群では他の群と比較して、肝線維化が増加していることを定量的に明らかにすることができた。

【考察】連続切片-三次元再構築法は肝線維化の評価に有効であり、さらに免疫組織化学染色と組み合わせることで肝線維化関連細胞の局在と線維化の同視野三次元観察が可能になる。これらの解析は NASH 発症機序の解明に大きく貢献することが期待される。