

日本解剖学会

第99回近畿支部学術集会

会 期：令和5年11月18日（土）
会 場：京都大学

1 MRIを用いたヒト胎児における腓面形成過程の解析

岩佐結生¹、金橋徹¹、今井宏彦²、大谷浩³、松林潤⁴、山田重人^{1,5}、高桑徹也¹
¹ 京都大・院医・人間健康 ² 京都大・院情報・情報学 ³ 島根大学・副学長 ⁴ 滋賀医大・臨床研究開発セ ⁵ 京都大・院医・附属先天異常標本解析セ

【背景】腹直筋は前腹壁を構成し、その表面には腓面が存在する。成人では腓面の数は2～5個と個人差がある。先行研究では主に成人を対象として腓面の数や形状の評価がなされている。しかし、腓面の発生的要因および形成過程は明らかにされていない。【目的】本研究では拡散テンソル画像(DTI)を使用し、胎児期初期における腹直筋での腓面形成過程の観察を目的とした。【方法】対象は島根大学医学部が保管する外見上先天異常の見られない正常なヒト胎児標本14体（頭殿長45.8～93.7mm）である。これらを7.0TeslaのMRIを用いて撮像を行った。さらにDTIを用いて腓面を検出し、発生箇所や形状の評価を行った。【結果・考察】腹直筋上部では完全型の腓面が多くみられた。一方で、臍の高さでは不完全型の腓面が多く検出され、さらに下の部位では腓面の未検出が目立った。成人と比べると胎児は腓面の個数が少ないため、胎児期において腓面の形成は途上段階であると考えられる。

2 ヒト胎児期における足関節周辺の三次元解析

松田幸樹¹、松林潤²、金橋徹¹、今井宏彦³、山田重人^{1,4}、大谷浩⁵、高桑徹也¹
¹ 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 ² 滋賀医科大学医学部附属病院臨床研究開発センター³ 京都大学大学院情報学研究科情報学専攻 ⁴ 京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センター ⁵ 島根大学副学長
背景 ヒトの足関節部の肢位は脛骨、腓骨、距骨、踵骨により主に決定される。発生5週目末に脛骨、腓骨、足根骨が順に出現し、それぞれの形態形成は、互いに影響を与えながら進行する。胎児の骨形成について論じた研究はあるが、胎児期における足関節部の骨の位置関係の変化や、それらの定量的な評価が十分になされた研究は乏しい。そこで本研究では、ヒト胎児固定標本のMRI画像から三次元再構成像を取得し、ヒト胎児期における足関節部の骨の形成、位置関係の変化を追跡した。方法 京都大学医学研究科附属先天異常標本解析センター保有19体、島根大学医学部解剖学教室保有の5体のMRI画像を対象とした。これらを画像処理ソフトAmiraを用いて下肢骨の3次元立体像を作成し、並行して解剖学的ランドマーク、各骨（大腿骨、脛骨、腓骨、足根骨）の重心、関節周辺の表面情報を取得した。次にMATLABにより長管骨の軸、関節表面の疑似平面を作成して下肢骨を定量的に観察した。結果 再構成像において足関節はCRL34～50mmの範囲で内転、CRL34～43mmの範囲で底屈を示し、どちらもCRL75mm辺りではほぼ中間位をとった。また定義した脛・腓の軸と足底面の角度を冠状面、矢状面の2方向に投影し計測した。どちらの計測値もCRLと角度は脛・腓骨で負の相関を示し、内転、底屈の改善を定量的に観察できた。現在は関節面（膝関節、距腿関節、距腓関節、距骨下関節）に法線ベクトルを定義し、肢位変化への影響を検討中である。結論 今後胚子期後期の個体も観察し胚、胎児期における足関節部の位置関係について定量的な知見を提供できると考えている。

3 ヒト胎児の骨盤の性差の検討

金橋徹¹、松林潤²、今井宏彦³、山田重人^{1,4}、大谷浩⁵、高桑徹也¹
¹ 京都大・院医・人間健康科学系、² 滋賀医大・臨床研究開発セ、³ 京都大・院情報・情報学、⁴ 京都大・院医・先天異常標本解析セ、⁵ 島根大・副学長

【背景】ヒトは思春期以降、骨盤に性差がみられることはよく知られているが、出生前の性差については知見が少なく、見解が一致していない。
【目的】ヒト胎児期初期から中期の骨盤の形態計測を行ない、性差を検討した。
【対象・方法】京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センターならびに島根大学医学部解剖学講座が所有するヒト胎児固定標本（頭殿長50～225mm）、計72例（男子34例、女子38例）の高解像度MRIデータを取得した。性別は外生殖器から判定した。画像解析ソフトAmiraを用いて、骨盤を抽出し、三次元再構築像を作成した。再構成像から大骨盤10か所、小骨盤9か所の2点間距離と、iliac crest angle、恥骨下角を測定した。また、計測値を用いて比を算出した。測定値及び比の性差を、統計ソフトJMPを用いて、頭殿長を共変量とした交互作用項を含む一般線形モデルをあてはめて解析した。有意水準は5%とした。
【結果】骨盤上口の前後径（ $p=0.036$ ）と恥骨下角（ $p=0.034$ ）に性差がみられた。比では、骨盤入口部の横径/前後径（ $p=0.006$ ）、坐骨棘間径/稜間径（ $p=0.019$ ）、坐骨棘間径/棘間径（ $p=0.009$ ）に性差がみられた。その他の測定値や比に性差はみられず、性差を認めた上記部位の各交互作用項に有意差はみられなかった。
【考察】本検討で性差を認めた部位は、成人の骨盤でも性差が報告されている部位である。今回、従来の報告よりも早い胎児期初期からヒトの骨盤に性差がみられることを明らかにした。

4 ヒト胎児における主要血管径の左右差の比較検討

中井尚一¹、松林潤²、金橋徹¹、今井宏彦³、山田重人^{1,4}、大谷浩⁵、高桑徹也¹
¹ 京都大・院医・人間健康科学系、² 滋賀医大・臨床研究開発セ、³ 京都大・院情報・情報学、⁴ 京都大・院医・先天異常標本解析セ、⁵ 島根大学・副学長

【目的】ヒト胎児の血管の左右差に関して定性的にはある程度知られている一方で、定量的に比較検討した研究は限られている。そこで本研究ではヒト胎児期初期から中期における血管径を左右差に着目して比較検討することを目的とした。【対象】京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センター及び島根大学医学部解剖学講座所蔵の正常ヒト胎児固定標本30例（CRL26.8～225mm）を高解像度でMRI撮像したものをを用いた。左右対の血管を動脈8対、静脈6対、計14対（頭頸部上肢領域の血管5対、肺動静脈3対、腹部骨盤領域の血管6対）を検討対象とした。【方法】DICOM-Viewerソフトを用いて検討血管の横断面像を表示し、血管内径の計測を行った。対応する左右の血管内径の比を計算し、左右比とした。左右比を10を底として対数変換し、t検定を行い、p値が0.05を下回った場合を有意差ありとした。【結果】総頸動脈は、左は右の1.15倍太く有意差があった。腕頭静脈では、右は左の1.07倍太く有意差があった。肺動脈では、右は左の1.16倍太く有意差があった。上肺静脈では、右は左の1.23倍太く有意差があった。下肺静脈では、右は左の1.21倍太く有意差があった。総腸骨動脈では、右は左の1.08倍太く有意差があった。内腸骨動脈では、右は左の1.24倍太く有意差があった。総腸骨静脈では、左は右の1.17倍太く有意差があった。鎖骨下動脈、内頸静脈、鎖骨下静脈、腎動脈、外腸骨動脈、膈帯動脈は有意差がなかった。【結論】胎児期初期から中期におけるヒト胎児の血管に関して、左右で有意差が見られる血管が存在する。肺の血管では3対（肺動脈、上肺静脈、下肺静脈）全てで有意に右が太かった。

5 自閉スペクトラム症における変異型 ZBTB16 の機能解析

土井美幸^{1,2)}、白井紀好^{1,2,3)}、仲間葉々子¹⁾、藤原悠紀³⁾、吉村武³⁾、片山泰一³⁾、島田昌一^{1,2,3)}
1) 大阪大学大学院、医学系研究科、神経細胞生物学講座
2) 大阪精神医療センター、こころの科学リサーチセンター、依存症ユニット
3) 大阪大学大学院、連合小児発達学研究科
自閉スペクトラム症(ASD)の発症、及び病態のメカニズムについては未だ不明な点が多い。近年、ASD者におけるZBTB16の遺伝子変異が同定されたが、ZBTB16のASD変異がその機能にどのような影響を与え、ASDの発症や病態に寄与するのかわからなかった。ZBTB16はジंकフフィンガー型の転写因子であり、神経分化や骨形成といった幅広い生命現象を制御しているが、脳における機能とASD病態との関連は大部分が未解明である。我々はZBTB16の変異型と野生型をCOS-7細胞に発現させ、タンパク質発現に与える影響を検討したところ、変異型ZBTB16ではタンパク質発現量が野生型と比較して著しく減少することを見出した。そこでZbtb16の発現量が半減しているZbtb16ヘテロマウスの行動解析を行ったところ、社会性行動の低下と反復行動の増加というASD様行動を示した。また、Zbtb16ヘテロマウスの脳の組織学的解析により、大脳皮質深層の薄層化、オリゴデンドロサイトの発生と髄鞘形成の障害を見出した。さらに線条体におけるCank2bの発現量増加と中型有棘神経細胞の増加を見出した。以上の結果から、ZBTB16のASD変異はハプロ不全を引き起こし、大脳皮質及び線条体を中心とした神経回路の障害、社会性行動の障害と反復行動を引き起こす可能性を示唆した。

6 Functional significance of a point mutation in *SBNO1* gene found in an autistic patientSunjidmaa Zolzaya¹, Hidenori Tabata², Alberto Fernández Jaén³, and Yu Katsuyama¹¹Shiga University of Medical Science. ²Aichi Developmental Disability Center.³Universidad Europea de Madrid

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder, of which is not very clear yet and likely to be heterogeneous involving inheritable and environmental factors. Strawberry Notch Homology 1 (SBNO1) is a member of helicase subfamily, and human genome analyses suggested the involvement of SBNO1 mutations in psychiatric disorders. We have previously examined knockout mice and shown that Sbnol1 is essential for the development of normal neuronal networks regulating neurite growth of the cortical neurons.

Our algorithm examination of the whole genome sequence of an autistic patient suggested that a single nucleotide mutation in *SBNO1* (*SBNO1*^{S996P}) is the strongest candidate for cause of the disease. However, it is still unclear how SBNO1 contributes to ASD. In this study, we constructed a model mouse strain in which this mutation was recapitulated employing CRISPR/Cas9 protocol. Sbnol1^{S996P} mouse results in abnormal facial and brain morphology. We found decreased expression of FOXP2 which is strongly implicated in autistic features including speech and language issues. Furthermore, we overexpressed Sbnol1^{S996P} molecule in the association neurons of the mouse cerebral cortex by *in utero* electroporation and visualized the morphology of these neurons. Although neurite growth was not affected by Sbnol1^{S996P}, the spine density in the dendrite was reduced compared to control or wild type Sbnol1 overexpression specimens.

Those observations suggest that this point mutation affects the molecular function of SBNO1 protein and cause abnormal brain development, molecular expression and neuronal network related to ASD.

7 自閉スペクトラム症における眼球運動異常メカニズムの解明

入江浩一郎^{1,2}, 臼井紀好^{1,3,4}, 叶鑫¹, 高瀬篤暉¹, 原田祥太郎⁵, 今井貴夫^{5,6}, 島田昌一^{1,3,4}¹阪大・院医・神経細胞生物, ²阪大・院医・共同研, ³阪大・院連合小児, ⁴精神医療セ・こころ・依存症, ⁵阪大・院医・耳鼻頭頸外, ⁶奈良医大・医・耳鼻頭頸外

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder; ASD) は社会的コミュニケーション・対人的相互反応の障がい、限定された反復行動・興味を呈する神経発達症である。これまでに ASD や注意欠如・多動症などの神経発達症者において眼球運動の異常が報告されており、新たな客観的診断法としての活用が期待されている。しかしながら、眼球運動の異常を引き起こすメカニズムとその神経回路は未だ解明されていない。

本研究では ASD において眼球運動の異常が引き起こされるメカニズムと責任神経回路の解明、および眼球運動による客観的診断法の開発を目的とした。ASD モデルマウスを用いて、眼球運動の評価と眼球運動に関連する脳領域の組織学的解析を行なった。その結果、ASD モデルマウスにおいて眼球運動数の減少および眼球運動の速度の低下が観察された。さらに ASD モデルマウスでは、眼球運動に関わる脳領域における神経細胞数の減少が観察された。

これらの結果より、ASD モデルマウスの眼球運動異常は関連脳領域における神経細胞の減少によって生じる可能性が示唆された。

8 ラットの行動に対するリン脂質の機能-リン脂質の分子構造に着目して

菊池修平¹, 岩崎雄吾², 吉岡美奈¹, 森田真也³, 多田竜⁴, 内村康寛¹, 小林友哉¹, 木下雄介⁵, 古荘義雄⁶, 久保佳範¹, 民秋均⁵, 石山博章¹, 宇田川潤¹ ¹滋賀医大・解剖, ²中部大・応用生物, ³滋賀医大・薬物治療学, ⁴滋賀医大・分子工學研, ⁵立命館大・生命科学部, ⁶滋賀医大・化学

【背景・目的】本研究室では、これまでに胎生期低栄養により仔ラットの脳内リン脂質構成が変化し、行動異常が誘発される可能性を示してきた。今回はリン脂質のいかなる構造がラットの行動に影響を与えるのか調べるために、親水性および疎水性部位の構造の異なるリン脂質で構成されたリポソームをラットに尾静脈投与し、行動に対する機能を解析した。

【方法】リポソームの脳内移行を確認するため、DiIc18 標識リポソームの *In vitro* 血液脳関門モデル透過率や、マウス尾静脈内投与後の脳の蛍光強度測定を行った。脳内取込効率の良いリポソームに数種類の PC あるいは PE を組み込み、ラットの尾静脈から投与後、オープンフィールド試験、新規物体認識試験、高架式十字迷路試験、社会的相互作用試験を行った。

【結果】エステル結合型 PE (18:0/22:6) は自発活動量の減少作用、sn-1 位にビニルエーテル結合を有する PC である Plasmalynylcholine (18:0/20:4) は抗不安様作用を有していた。また、sn-1 位にエーテル結合を有する PE である Plasmalyethanolamine (16:0/22:6) は、探索行動の増加や抗不安様効果と関連していた。さらに、親水性部位の種類や、疎水性部位のうち sn-2 位に結合する脂肪酸の種類も社会的相互作用の制御に関わっていることが明らかとなった。

【考察】脳内に取り込まれたリン脂質は、分子内構造に特徴的な作用をラットの行動に対し発揮すると考えられた。

9 Laminin がアストロサイト前駆細胞である OS3 細胞に与える影響

渡辺真魚、山浦鉄人、佐久間理香、湊雄介、前田誠司、八木秀司
兵庫医科大学 医学部 解剖学細胞生物部門

細胞外マトリックス(ECM)は神経系の発生、維持、再生に重要な役割を担っている。今回、細胞外マトリックスである各種ラミニンの神経系における機能を解析することを目的とし、ラミニンがアストロサイト前駆細胞の分化、増殖に与える影響を解析した。各種ラミニンをコートした培養皿中でアストロサイト前駆細胞株 OS3 細胞を培養し、ウェスタンブロット、WST-8 法を用いて GFAP 発現量、細胞増殖率を比較したところ、成体の皮膚に発現しているラミニン上で GFAP が強く発現し、細胞増殖が抑制されることがわかった。また、ラミニンと結合するインテグリンのブロッキング抗体を用いて細胞増殖に対する影響を検討した結果、ラミニンによる増殖低下が回復した。今回の結果は、ラミニンにより前駆細胞から GFAP 陽性細胞であるアストロサイトへの分化が誘導され、そのために細胞増殖率が低下したことを示していると考えられた。さらにこのラミニンの作用はインテグリンを介している可能性が強く示唆された。

10 LncRNA MANCR はグリオーマ幹細胞において CD44 mRNA 安定化に関与する

佐藤輝英¹, 大江総一¹, 阪本純加¹, 柿崎梨緒¹, 岩下洗¹, 林真一¹, 小池太郎¹, 関(大村)亮平¹, 中野洋輔¹, 佐藤勇輝¹, 平原幸恵^{1,2}, 北田 容章¹¹関西医大・医・解剖, ²関西医大・看護・基礎看護

グリオーマは最も発生頻度の高い原発性脳腫瘍であり、その高悪性度の原因として腫瘍形成能・自己複製能・多分化能を有するグリオーマがん幹細胞 (glioma stem cell: GSC) の存在が注目を集めている。GSC には、神経発生に関わる遺伝子群を発現する「Proneural (PN) 型」、腫瘍形成能が高く予後不良との相関が高いと報告されている「Mesenchymal (MES) 型」等のサブタイプが存在する。われわれはこれまでに、MES 型 GSC で長鎖非コード RNA MANCR (mitotically-associated long non-coding RNA) が高発現すること、MANCR 発現抑制により増殖能・浸潤能低下とアポトーシス亢進を明らかにしている。さらに、MANCR 発現抑制により MES 型のマーカータンパク質である CD44 の発現量が低下することを見出しその分子メカニズムの解明をおこなった。その結果、MANCR は CD44 転写活性を抑制する一方で CD44 mRNA に相互作用しその安定性を向上させることを明らかにした。今後、CD44 発現に関する MANCR の相反する機能について、その制御機構を明らかにしていく。

11 降圧治療によるミクログリア応答の検討

小泉崇¹, 福田尚加¹, 田口勝敏¹, 田中雅樹¹¹ 京都府立医科大学学生体構造科学部門

【目的】高血圧モデル動物脳では活性化ミクログリアや血管周囲ミクログリアの増加といったミクログリアの応答が観察される。臨床的には高血圧患者に降圧薬を用いた降圧療法を行うが、高血圧罹患後に降圧治療を行う事でミクログリア活性化の抑制や血管周囲ミクログリア数が減少するか否かはまだ良く知られていない。本研究では血圧上昇後に降圧治療を開始することでミクログリア応答が抑制されるかを明らかにする。【方法】高血圧モデルとして確立しているDeoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt ラットの脳を用いた。ミクログリア応答がみられる DOCA-salt 処理 2 週目 (D2W) より i) アムロジピン 1 mg/kg/日 (A 群), ii) ヒドロクロロチアジド 6 mg/kg/日 (H 群), iii) 溶媒のみ (P 群) の経口投与を開始し、D4W でのミクログリア応答の変化を組織学的に評価した。【結果】A 群では D3W 時点で血圧上昇が抑えられた。H 群は D3W では降圧効果は見られず D4W 時点で P 群と比較すると血圧低下がみられた。組織学的評価では A 群で有意なミクログリア活性化抑制がみられたが、H 群では抑制がみられなかった。一方で血管周囲ミクログリア数については何れの群間でも有意差はみられなかった。【結語】血圧上昇を抑えれば脳内ミクログリア活性化抑制が望める。しかし血管周囲へのミクログリア遊走抑制効果は見られなかった。ミクログリア遊走には血圧以外の要素が関与している可能性が考えられた。

12 マウス脳室周囲器官における LPS 腹腔内投与時のミクログリアの M1/M2 発現と増殖

円城暁星
京都工芸繊維大学大学院・応用生物学専攻

ミクログリアは、中枢神経系に存在する免疫細胞であり、炎症などにより様々な変化が生じる。マクロファージの培養系の研究から、リポ多糖 (LPS) は M1 型を誘導し、IL-4 などは M2 型を誘導することが報告されている。しかし、M1 と M2 のタイプ分けが、生体内のミクログリアにも適用できるかどうかについては、意見が分かれている。本研究では、マウス脳室周囲器官の多くのミクログリアは正常状態でも M1/M2 型タンパク質を共発現していることが明らかになった。また、敗血症症状を起こす高用量 LPS を腹腔内投与しても、脳室周囲器官などにおけるミクログリアの M1/M2 型タンパク質の発現に変化は見られなかった。また、低用量 LPS を末梢投与すると、脳室周囲器官を中心に多くの脳部位でミクログリアが増殖すること、また高用量 LPS 投与では大脳と海馬以外の脳部位で広く増殖することが分かった。さらに、LPS 投与によるミクログリアの増殖については M1/M2 発現型では増殖率が低い傾向にあった。最後に、ミクログリアの増殖は、ミクログリアの幹細胞様細胞が起点として増殖するのではなく、さまざまな段階のミクログリアが均等に増殖している可能性が示唆された。また以上の結果は、以前の培養系マクロファージにおける M1/M2 型の分類が、生体内のミクログリアにそのまま適用できるわけではないことを示唆する。

13 ゴルジ体内糖鎖合成酵素の微細局在とダイナミクスの解明

國井政孝、原田彰宏
大阪大学医学系研究科細胞生物学教室

多くのタンパク質や脂質には主にゴルジ体において糖鎖が付加されるが、それはそれらの機能に必須であり、生体の正常な発生や機能に必須でもある。タンパク質に付加される糖鎖には N 型、O 型、グルコサミノグリカンなどがあり、タンパク質にどのような種類の糖鎖がどの程度の数だけ結合するかはタンパク質の種類によって決められている。また、1つのタンパク質に複数の種類の糖鎖が結合することも珍しくない。しかし、タンパク質がどのようにゴルジ体内を輸送され、どこでどのような糖鎖合成酵素によって糖鎖修飾を受けるかは、糖鎖修飾の分子機構を考える上で重要であるにもかかわらず、これまでに全く明らかになっていない。それは、糖鎖修飾を行う糖鎖合成酵素がゴルジ体内の槽 (cisterna) のどこでどの程度の時間で基質と接触するかが明らかになっていないことが大きな理由である。我々は、ヒト由来 Caco2 細胞を用い、CRISPR/Cas9 法で様々な tag を糖鎖合成酵素の遺伝子にノックインし、内在性の発現を正確に反映した糖鎖合成酵素の局在を様々な超解像顕微鏡で観察し、それらのゴルジ体内の局在やダイナミクスを明らかにした。

14 発生中のマウスミューラー管の構造を維持する器官培養法の検討

加藤隆¹、横山俊史¹、桐月優輔¹、藤川大誠¹、万谷洋平¹、星信彦¹
¹神戸大院・農・形態機能

【緒言】哺乳類の発生初期の雄では、雄性副生殖腺の原基であるウォルフ管に加えて雌性副生殖腺の原基であるミューラー管 (MD) も形成されるが、MD は精巣から分泌される抗ミューラー管ホルモン (AMH) の影響で出生前に消失する。我々は以前、精巣から中腎内へ浸潤性に移行した AMH が MD 頭部および中央部の退行を惹起することを器官培養法で明らかにした [Yamamoto *et al.*, 2018; Kato *et al.*, 2023]。一方で、MD 尾部への AMH の移行機序は未だ不明である。本研究では、MD 尾部での AMH の作用機序の解析に必要な MD 尾部の形態を維持可能な器官培養法の確立を目的とした。【材料と方法】胎齢 12.5 日付近の ICR マウス胎子の性腺中腎複合体、後腎および膀胱を腹部体幹に付着させた状態とし、アガロースブロック上で 72 時間培養した。パラフィン切片を作製し、MD 頭部、中央部および尾部の形態および管径から培養成績を評価した。【結果と考察】培養後の中腎尾部は体壁に沿って伸長し、多くの個体で形態が保存されていた。雄の MD では管腔が形成される一方で、MD 周囲間充細胞の凝集や変性した細胞が認められ、AMH による退行が進行していた。MD 中央部の管径は MD 頭部よりも小さくなり、胎齢 13.5 日の個体および性腺中腎複合体のみで培養した個体と同様の傾向を示した。MD 尾部の管径は MD 中央部よりも大きくなり、胎齢 13.5 日の個体と同様の傾向を示した。雌の MD では上皮細胞数が増加するとともに管腔が形成され、MD の発達が進んでいた。これらの結果から、本培養法は MD 尾部の退行機序の検討に有用と考えられた。

15 精巣化が脆弱な B6Js-XY^{POS} マウス性腺における Sox9 発現の消退

桐月優輔¹、横山俊史¹、藤川大誠¹、加藤 隆¹、犬塚千嘉¹、河合穂香¹、万谷洋平¹、星信彦¹
¹神戸大院・農・形態機能

【背景と目的】マウス未分化性腺において性決定遺伝子 *Sry* の発現が遅延すると、精巣への分化が破綻して卵巣や卵精巣が形成される。C57BL/6JmsSlc (B6Js) 遺伝的背景において、安定性が低い *Mus musculus poschiavinus* 由来の *Sry* を有するマウス (B6Js-XY^{POS}) では、他の Y^{POS} マウスに比べて卵巣化する傾向が高い [Yokoyama *et al.*, 2019]。一方、B6Js-XY^{POS} の胎子性腺では野生型の B6Js と同時期に *Sry* 発現を開始する個体が多数存在したことから、*Sry* の下流で精巣化に機能する *Sox9* の発現が十分でないため、卵巣化することが示唆された [本会 2020]。そこで、B6Js-XY^{POS} における *Sox9* 発現の消退時期について検討した。【材料と方法】B6Js-XY^{POS} の胎子 (胎齢 14.5~15.5 日) および新生子を用い、性腺内の *Sox9* および卵巣化遺伝子 *Foxl2* の発現を免疫組織化学的に検出した。【結果と考察】胎齢 14.5~15.5 日では *Sox9* 陽性細胞を含む性腺が存在したが、*Sox9* 陽性細胞の多くは中腎側に散在した。一方、すべての性腺で多数の *Foxl2* 陽性細胞が認められた。新生子性腺においても *Sox9* 陽性細胞を含む性腺が少数出現したが、その精巣索の形成程度は低かった。性成熟後も精巣を有する個体が少数出現したが、その出現率は新生子において *Sox9* 陽性細胞を含む性腺の出現率よりも低かった。以上の結果から、B6Js-XY^{POS} の *Sox9* 発現の多くは胎子期に消退し、一部性腺を除いて性成熟期までに残存しないことが明らかとなった。また、胎子期の *Sox9* 発現が十分でないことが、精巣化を破綻させて卵巣化を惹起したと推測された。

16 マウス未分化性腺の精巣化へのビタミン D 受容体 (Vdr) の関与

藤川大誠¹、横山俊史¹、桐月優輔¹、犬塚千嘉¹、河合穂香¹、万谷洋平¹、星信彦¹
¹神戸大院・農・形態機能

【緒言】性決定遺伝子 *Sry* の発現は、性腺中央部から開始され、頭側および尾側に広がる。その発現開始に関与する上流遺伝子として *Nr5a1* や *Wt1*, *Gadd45g* 等が知られているが、*Sry* の時空間特異的発現を開始させる機構については不明な点が多い。一方、当研究室における予備的な網羅的遺伝子発現解析において、ビタミン D 受容体 (*Vdr*) が *Sry* 発現開始期の性腺中央部で高発現していたため、*Sry* 発現や未分化性腺の精巣化への関与について検討した。【材料と方法】*Vdr* の結合サイトをバイオインフォマティクス的手法で検索した。胎齢 10.5 日付近の ICR マウス (XY 個体) 性腺中腎複合体を、*Vdr* のアゴニストであるカルシトリオールまたは溶媒 (DMSO) を添加して 37°C、5% CO₂ 条件下で 2 日間培養後、精巣化実行遺伝子である *Sox9* およびセルトリ細胞の分化マーカーとして *Amh* を免疫組織化学的に検出した。【結果と考察】ChIP-Atlas の結果、*Gadd45g*, *Sry*, *Sox9* に *Vdr* が結合する可能性が示された。培養実験の結果、カルシトリオール添加群と溶媒群との間では *Sox9* の発現領域に大きな差異は認められなかった。その一方で、カルシトリオール添加群では *Amh* の発現増強が認められ、セルトリ細胞の分化が促進されることが示された。以上の結果より、*Vdr* が未分化性腺の精巣化に関与することが示唆された。

17 ランソプラゾールは p38 MAPK/Nrf2 抗酸化経路を介してシスプラチン誘導性細胞障害を抑制する

山岸直子
和歌山県立医科大学医学部解剖学第一講座

プロトンポンプ阻害薬であるランソプラゾール (以下、LPZ) は、胃酸分泌抑制作用とは独立して抗酸化作用を発揮することが示されている。我々はこれまで、LPZ が Nrf2 経路を介して薬物性肝炎モデルラットにおいて肝臓保護作用を示すことを明らかにした。本研究では、LPZ による肝細胞保護の分子メカニズムを解明することを目的とした。ラット肝細胞株 RL34 に LPZ を処理すると、転写因子 Nrf2 の活性化が誘導され、下流の抗酸化ストレス因子である HO1、NQO1、GSTA2 の発現量が増加した。また、LPZ はシスプラチン誘導性細胞障害モデルにおいて細胞生存率を有意に上昇させた。この LPZ による肝細胞保護効果は、HO1 阻害剤では部分的にしか消失しなかった。そこで Nrf2 をノックダウンしたところ、LPZ の細胞保護効果は完全に消失した。最後に、LPZ による Nrf2 活性化に関わるシグナル伝達経路を探索した。LPZ によって p38 MAPK のリン酸化が増強していたため、p38 MAPK 阻害剤を用いた実験を行ったところ、LPZ による Nrf2 経路の活性化と細胞保護効果は完全に消失した。以上のことから、LPZ は p38 MAPK シグナル伝達経路に依存性に Nrf2 を活性化し、シスプラチン誘導性細胞毒性に対する肝細胞保護作用を発揮することが示唆された。(COI : なし)

18LPS 前投与によるマウス敗血症の軽減

安元千晴、宗岡詩織、村山咲希、宮田清司、吉村亮一
京都工繊大・応生

体温反応は感染症関連症候群の特徴であり、感染の重篤度と周囲温度に応じて発熱または低体温が引き起こされる。また、自然免疫の一つとしてエンドトキシン耐性という生体防御機構が知られており、事前にエンドトキシンにさらされることで、発熱反応の緩和と致死的な症状の回避等が観察される。しかし一方で、体温低下を引き起こす重度の敗血症に対する事前暴露の効果は明らかにされていない。そこで、本研究では、重度の感染症状である敗血症及び敗血症ショック時の体温低下に対する低用量リボポリサッカライド (LPS) プレコンディショニングの予防効果を評価することを目的として実験を実施した。その結果、低用量 LPS の単回または繰り返し投与による自然免疫刺激が、高用量 LPS による敗血症様症状 (体温低下及び疾病行動) の度を緩和する事が明らかとなった。LPS プレコンディショニング群では体温低下が約 1.5~2℃抑制され、前投与を単回よりも 3 回行った方が体温低下の度をさらに減少させた。また、異なるエンドトキシンによる敗血症に対しても同様の結果を得た。3 回の前投与は、体温以外の活動量減少の抑制、体重・摂食量・飲水量の減少の程度には、単回前投与に比べて差を生じさせなかったものの、回復までに要する時間を短縮することを示した。以上の結果より、低用量 LPS プレコンディショニングは体温及び疾病行動の恒常性維持に関与し、高用量エンドトキシンによる重症化予防に、エンドトキシンの種類によらず有効な方法であることが示唆された。

19ネオニコチノイド系農薬曝露による腸内細菌叢変動メカニズムに関する研究

世ノ一さくら¹、石田祐也¹、原悠佳子¹、伊藤慎子¹、布引沙利香¹、吉本彩乃¹、平野哲史²、万谷洋平¹、横山俊史¹、池中良徳³、中村公則⁴、綾部時芳⁴、星信彦¹
¹神戸大院・農・形態機能、²富山大研究推進機構 分子・構造解析、³北海道大院・獣医・毒性、⁴北海道大院・先端生命科学・自然免疫

【緒言】近年、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介したネオニコチノイド系農薬 (NN) の哺乳類における毒性が明らかとなっている。NN の一種であるクロチアニジン (CLO) はマウスの腸内細菌叢を変動させることが報告されたが、そのメカニズムは不明である。一方、小腸陰窩のパネート細胞により分泌される抗菌ペプチドの α ディフェンシンは、腸内細菌叢の制御に重要である。CLO はパネート細胞および自律神経系に発現する nAChR を介して α ディフェンシン分泌に影響を及ぼし、腸内細菌叢を攪乱する可能性がある。本研究では、CLO がマウスの α ディフェンシン (Crp1) 分泌に及ぼす影響を検証した。【材料と方法】C57BL/6N 雄マウス (9 週齢) に CLO を 0, 50, 150 mg/kg/day (CLO-0 群, CLO-50 群, CLO-150 群) で 28 日間経口投与した。その後、ELISA 法による糞便および盲腸内容物における Crp1 定量、小腸における Crp1 の免疫組織化学的解析、盲腸内容物における 16S rRNA シーケンスを用いた腸内細菌叢解析を行った。【結果と考察】CLO 曝露群の盲腸内容物では、CLO-0 群と比較して *Lachnoclostridium* などの短鎖脂肪酸産生菌の減少を伴う dysbiosis が確認された。一方、CLO 曝露群の糞便および盲腸内容物中 Crp1 濃度は、CLO-0 群のそれと比較し著しく低値となった。免疫染色の結果、CLO-50 群のどくに回腸では CLO-0 群と比較し、パネート細胞の細胞質全体に強い Crp1 陽性像が認められ、分泌 (放出) が抑制された結果と考えられた。以上より、CLO 摂取により dysbiosis が起こるメカニズムの一端として、パネート細胞の α ディフェンシン放出が著しく抑制され、細胞内に α ディフェンシンが滞留することを初めて明らかにした。

20クロチアニジンがアトピー性皮膚炎症状に及ぼす影響について

石田祐也¹、世ノ一さくら¹、原悠佳子¹、伊藤慎子¹、布引沙利香¹、吉本彩乃¹、万谷洋平¹、横山俊史¹、池中良徳²、星信彦¹
¹神戸大院・農・形態機能、²北海道大院・獣医・毒性

【緒言】近年、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して神経毒性を示すネオニコチノイド系農薬 (NN) が哺乳類にも作用することが明らかとなった。nAChR は免疫細胞にも存在し、コリン作動性システムが免疫および炎症の調節に関与するとされる。本研究では、アトピー性皮膚炎 (AD) に着目し、NN の一種であるクロチアニジン (CLO) が AD に及ぼす影響についてモデルマウス (NC/Nga) を用いて検証した。【材料と方法】8 週齢の NC/Nga 雄マウスを無処置群 (NT 群)、AD 誘発群 (AD 群)、AD 誘発+CLO 投与群 (AD+CLO 群) の 3 群に分け、農薬評価書の無毒性量を参考に CLO 濃度が 47.2 mg/kg/day になるように給水ゲルを介して初回 AD 誘発の 11 日前から採材まで CLO を自由摂取させた。初回 AD 誘発日を 0 日目 (D0) とし、AD 誘発の途中である D14、AD 誘発を終えた D21、AD 誘発を終えて 1 週間経過した D28 における血中 IgE 濃度、表皮の肥厚および肥満細胞数を計測した。【結果と考察】D14 において、AD 群よりも AD+CLO 群で血中 IgE 濃度が有意に高値を示したが、表皮の肥厚および肥満細胞数は有意に低値を示した。一方で D21、28 ではこれらの解析項目において、AD 群と AD+CLO 群間に差が認められなかった。以上より、CLO 曝露が AD の発症 (初期症状) における抗体産生を促進し、表皮の肥厚・肥満細胞浸潤を抑制することが初めて示された。D21、28 において CLO 投与による影響が認められなかったのは CLO 投与の影響よりも AD 症状の進行による影響が大きいためであると考えられる。D14 で示された CLO 投与による血中 IgE 濃度の上昇および表皮の肥厚・肥満細胞数の低下について、免疫細胞に発現する nAChR との関与を含め、その作用機序は検討中である。

21マウスにおける LPS 誘発性炎症反応に対する TRPM8 の抑制効果

小村まり、堀川璃々花、白木千夏、宮田清司、吉村亮一
京都工芸繊維大学大学院・応用生物学専攻

人やマウスでは、細菌やウイルスによる感染が軽度な場合は発熱を引き起こし、重度の場合は全身性炎症反応である敗血症を生じ低体温を引き起こす。Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) は、28 度以下の冷温度やメントールによって活性化されるイオンチャネルである。TRPM8 は末梢感覚神経や脳内で発現することがわかっているが、エンドトキシン誘発性の体温変化と炎症における TRPM8 の機能は不明である。本研究では、TRPM8 がリボポリサッカライド (LPS) 誘発性の発熱及び敗血症症状に関与していることを報告する。50 μ g/kg の低用量 LPS 腹腔内投与は、野生型 (WT) マウスで発熱を引き起こすのに対し、TRPM8 ノックアウト (KO) マウスでは WT マウスとは逆の低体温症を引き起こした。さらに、WT で敗血症様低体温症を誘起する 5 mg/kg の高用量 LPS 腹腔内投与では、TRPM8 KO マウスは WT マウスより重度の低体温症と活動量低下を示した。TRPM8 KO マウスでは、低濃度 LPS により、WT マウスに比べて視床下部領域の体温調節や疾病行動に関連する脳部位で Fos 発現が増加した。TRPM8 を活性化する Icilin 20 mg/kg を LPS に先立って前投与したマウスは Vehicle を前投与したマウスと比較して、5 mg/kg の高用量 LPS による敗血症様の体温低下、活動量低下、体重・摂食量・飲水量低下を緩和させた。以上のことから、TRPM8 はエンドトキシンによる炎症時の体温変化に関与し、疾病応答を抑制していることが明らかとなった。

22神経-マクロファージ相互作用からみた内臓痛の新規センシング機構

田中達英、石西綾美、辰巳晃子、和中明生
奈良県立医科大学・医・解剖学第 2 講座

精神的ストレスや自律神経失調等で引き起こされる過敏性腸症候群は、消化管に器質的病変が存在せず腸の機能異常により便通異常や腹痛を呈する消化管の機能性疾患である。しかし、その病態発症メカニズムについては未だ不明である。我々は遺伝子変異マウスを駆使することで大腸の粘膜固有層に局在するマクロファージに着目し内臓痛制御にどのように関わるかを明らかにしたいと考えている。近年のイメージング技術、一細胞 seq 解析の進展により、CX3CR1、MHC class2 陽性の神経 associate 型マクロファージが神経機能に影響することが報告されており、本研究では大腸粘膜固有層の CX3CR1 陽性マクロファージおよびこれまで皮膚感覚機能に関与することを明らかにしてきた SNX25 (Sorting nexin 25) に着目し内臓痛との関連を検証した。また、胃・小腸を含む消化管粘膜層のマクロファージや神経支配が領域によりバリエーションが異なるデータが得られたことから、内臓痛発症メカニズムも各領域で異なることも示唆される。我々の最近の結果を紹介したい。

23マウス前脳における TRPM8 発現神経の特徴

西川汰一¹、恒岡洋右²、船戸弘正^{2,3}、吉村亮一¹、宮田清司¹

¹京都工芸繊維大学 応用生物学、²東邦大学医学部 解剖学講座、³筑波大学国際統合睡眠医学科学研究機構

体温中枢として知られる視床下部の視索前野には、深部体温を感知し、体温の維持を行う温ニューロンと冷ニューロンが存在すると考えられている。近年、Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) 発現ニューロンが温ニューロンであると報告された。一方、冷ニューロンについては、冷温度感受性を有する TRPM8 発現ニューロンが有力候補として考えられているが、体温中枢における TRPM8 発現ニューロンの機能や特性についてはほとんど報告がない。そこで、本研究では、TRPM8 遺伝子を GFP に置き換えたノックアウトマウスを用いて、体温中枢における TRPM8 発現神経の特徴について調べた。TRPM8 発現神経細胞は、中隔核 (LS) および視索前野 (POA) において GFP 陽性細胞として観察され、抑制性神経マーカーであるグルタミン酸脱炭酸酵素 GAD67 mRNA との共存が認められたが、興奮性神経マーカーの小胞性グルタミン酸トランスポーター VGLUT2 mRNA との共存は認められなかった。さらに、GFP 陽性神経終末部では、小胞性 GABA トランスポーター VGAT との共局在が認められ、よって、TRPM8 発現神経は主として抑制性の GABA 作動性であることが示された。また、TRPM8 ヘテロマウスを用いて、リボポリサッカライド LPS 投与時の TRPM8 神経の Fos 発現について調べたところ、LS 前部の方が LS 後部に比べて Fos を発現している TRPM8 発現神経細胞数が多いことが分かった。以上より、LS の TRPM8 発現神経には、LPS に対する応答の異なる特定の集団が存在することが示唆された。

24 大脳皮質形成における細胞内輸送制御分子 Rab6 の機能の解析

國井政孝¹、Zhang Yu¹、原田彰宏¹¹ 大阪大・院医・細胞生物学

神経細胞は軸索と樹状突起という極性を持っており、この極性は脳の組織形成や神経伝達に必須である。細胞極性の形成には細胞内での方向性を持った蛋白質輸送（極性輸送）が重要であり、低分子量 GTPase の Rab 蛋白質や SNARE 蛋白質など多くの蛋白質が関わっている。しかし、神経組織や個体内におけるこれらの輸送制御分子の機能には未知の点が多い。そこで本研究では Rab 蛋白質の一つである Rab6 に注目した。Rab6 は、ゴルジ体から細胞膜へ向かう蛋白質の順行性輸送や、細胞膜からゴルジ体への逆行性輸送の制御に関与すると言われていたが、組織・個体レベルでの機能は殆ど解明されていない。そこで我々は Rab6 のノックアウト (KO) マウスを作製した。その結果、Rab6 KO マウスでは大脳皮質や小脳の形成不全が生じ、胎生後期の Rab6 KO の大脳皮質では新生ニューロンの軸索伸長による中間帯の形成が障害されていることを見出した。以上の結果から、Rab6 が神経細胞の軸索伸長を介して大脳皮質形成に重要な役割を担っていることが示唆された。本会では Rab6 KO マウスの組織や神経細胞の解析によってこれまでに得られた知見について報告したい。

25 成体マウス最後野における高濃度グルタミン酸による神経細胞死からの神経修復

藤居恰那¹、南部有理¹、吉村亮一¹、古部瑛莉子^{1,2}、Nitin Shrikant Sawant³、森田光洋³、宮田清司¹¹ 京都工繊大・応生、² 旭川医大・医・解剖・機能形態、³ 神戸大・理・生物

成体哺乳類前脳の側脳室下帯や海馬歯状回の顆粒細胞下帯に存在する神経幹細胞 (NSCs) や神経前駆細胞 (NPCs) は神経を新生するとともに、損傷後の部分的修復に関与している。近年、延髄の最後野 (AP) にも NSCs が存在していることが示されたが、神経の修復機能については報告がない。通常、血液由来分子は BBB によって脳内に自由に拡散することができないが、脳室周囲器官 (CVOs) は、有窓性毛細血管を有し、BBB を欠く。本研究では、この CVOs の高い血管透過性を利用し、成体マウス AP において神経細胞死を引き起こし、その後の神経新生について調べ、成体マウスにおいて、AP が神経細胞を再生する能力を有する可能性を示した。Monosodium glutamate (MSG) は、高濃度で興奮毒性により神経細胞死を起こす。マウスに大量の MSG の皮下注射を行うと、投与後 2 時間で AP において Fos+細胞および Fos+, HuC/D+神経細胞密度が優位に高くなった。また、神経細胞を貪食していると考えられるミクログリアの密度が、1~3 日で有意に増加した。HuC/D+神経細胞密度は MSG 投与後数日で顕著に減少し、21 日後にはコントロールの 44% となったが、2 ヶ月後にはコントロールレベルに回復した。さらに、MSG 投与後 7 日以内に NSCs を示す bromodeoxyuridine (BrdU)+, SOX2+細胞が顕著に増加し、MSG 投与後 2 週間にわたり BrdU+, Math1+の NPCs 密度が有意に増加した。MSG 投与後 2 ヶ月では、BrdU+, HuC/D+成熟神経細胞が顕著に増加していた。最後に、Nestin-CreERT2/CAG-CATloxP/loxP-EGFP トランスジェニックマウスによる細胞系統追跡から、増加した神経細胞は NSCs でなく NPCs 由来である可能性が示された。以上の結果は、成体マウスの AP において、高濃度の MSG による神経細胞死の後、神経新生によって神経細胞の密度が正常に回復する可能性があることを示唆する。

26 マウス脳梁膨大部皮質第4層神経細胞における *HSD11β1* と *SCNNIA* の共発現について濱田 航平¹、岡 雄一郎^{2,3}、佐藤 真^{1,2,3}¹ 大阪大学大学院生命機能研究科 ² 大阪大学大学院医学系研究科 ³ 大阪大学大学院連合小児発達学研究所

糖質コルチコイド (GC) は副腎皮質から分泌される主要なステロイドホルモンで、糖代謝や抗ストレス作用に関わる。ヒトではコルチゾール、マウスではコルチコステロン (CORT) が活性型として知られている。*HSD11β1* がコードする 11β-HSD1 は、11-デオキシコルチコステロン (CORT の前駆体) を CORT に変換する酵素である。腎臓では、CORT は糖質コルチコイド受容体に結合し、*SCNNIA* によってコードされる上皮ナトリウムチャネルアルファ (α ENaC) の発現を上昇させることが報告されている。 α ENaC は電位非依存性ナトリウムチャネルで、ナトリウムイオンを細胞に取り込むことで浸透圧を制御し、血圧に影響を与えることが知られている。我々は、発達過程のマウス脳梁膨大部皮質 (retrosplenial cortex, RSC) に *HSD11β1* が持続的かつ特異的に発現することを見出している。そこで、今回 RSC における *HSD11β1* 発現の詳細とその意義を検討した。データベースを用いたシングルセル RNA 発現解析の結果、*HSD11β1* は RSC 第 4 層 (L4) にほぼ限局して発現していた。さらに、RSC L4 のほぼ全ての神経細胞において *HSD11β1* と *SCNNIA* が共発現していた。このことから、*HSD11β1* は CORT を通じ *SCNNIA* の発現を制御し、RSC L4 で特異的に細胞内のナトリウムイオン濃度を調節していると推測された。本会では、これらの結果の詳細と今後の展望について紹介する。