

日本解剖学会

第100回近畿支部学術集会

会 期：令和6年11月16日（土）
会 場：大阪大学吹田キャンパス

1-1 糖尿病性認知機能障害における RGMa の関連解明

宇野広樹¹⁾、糸数隆秀¹⁾²⁾、山下俊英¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

1)大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学 2)大阪大学大学院医学系研究科創薬神経科学 3)大阪大学大学院生命科学機能研究科 4)大阪大学免疫フロンティア研究センター (IFReC)

代表的な生活習慣病である糖尿病は中枢神経系の合併症として認知機能障害を引き起こす。記憶形成に重要な海馬において観察される神経新生の減少が病態形成の一因であると考えられているが、その詳細なメカニズムには不明な点が多い。我々は生理条件下の海馬神経新生を制御することが報告されている神経軸索再生阻害因子 RGMa に着目し、糖尿病性認知機能障害の病態に RGMa が関与するか検討した。

海馬神経新生の異常と認知機能障害を呈する 2 型糖尿病 db/db マウスおよび 1 型糖尿病 STZ マウスの海馬における RGMa の発現を定量的に *in situ* ハイブリダイゼーション法(RNA scope)を用いて検討した。その結果、海馬歯状回顆粒細胞層(GCL)特異的に RGMa の発現が上昇することがわかった。また、*in vitro* にて海馬由来神経株化細胞 HT-22 と神経幹細胞の共培養系を確立し、海馬神経新生に与える RGMa の関与を検討したところ、高グルコース条件で維持された HT-22 は RGMa を介して、神経幹細胞の神経分化を抑制することがわかった。さらにヒト化 RGMa 中和抗体は db/db マウスおよび STZ マウスにおける海馬神経前駆細胞の減少と認知機能障害を改善することがわかった。

これら結果より、糖尿病病態下では海馬歯状回顆粒細胞層において発現上昇した RGMa が神経幹細胞に作用し、神経分化を抑制することで海馬神経新生の異常が引き起こされる可能性があることがわかった。また RGMa の機能抑制が糖尿病性認知機能障害に対する新規治療法として有用であることを示した。

1-2 扁桃体基底外側部のニューロペプチド Y 発現ニューロンは側坐核を介して高脂肪食摂取を刺激する

山田俊児、小島和矩、田中雅樹
京都府立医科大学 解剖学教室 生体構造科学

ニューロペプチド Y (NPY) 発現ニューロンは中枢神経系に広く分布する。側坐核 (NAc) は NPY 発現ニューロンの局在部位の一つであるが、NAc には多くの NPY 陽性神経線維も見られる。そこで、NPY-Cre マウスと逆行性 AAV を用いて NAc に投与する NPY ニューロンの起始部を調べたところ、扁桃体基底外側部 (BLA) の NPY ニューロンが NAc に投射することが明らかとなった。ラットにおいて、NAc への NPY 投与が高脂肪食 (HFD) の摂取を促進することから、BLA から NAc に投射する NPY ニューロンと HFD 摂取の関係について *optogenetics* を用いて調べた。通常、HFD を与えられたマウスは非活動期の昼間でも HFD 摂取が亢進する。抑制性ロドプシンを用いて BLA から NAc に投射する NPY ニューロンを不活性化させたマウスでは 1 時間の HFD 摂取量が不活性化していないマウスに比べ有意に減少した。一方、このニューロンの活性化は逆の効果を示した。さらに、NAc へ NPY 受容体 type 1 (Y1R) の antagonist を投与すると 1 時間の HFD 摂食量が有意に減少し、逆に、Y1R の agonist を投与すると 1 時間の HFD 摂食量が有意に増加した。これらのことから、BLA から NAc に投射する NPY ニューロンは NAc の Y1R 発現細胞を介して HFD 摂取に関与する可能性が示唆された。

1-3 脳梗塞後の海馬歯状回においてミクログリアが樹状突起スパイン数変化に与える影響

岡田桃花、中澤秀真、高橋瞳、山口菜摘、中谷仁、澤野俊憲、田中秀和
立命大院・生命・薬理学

ミクログリアは神経活動依存的にシナプスを貪食することが知られている。脳梗塞後、神経活動が変化することやシナプス可塑性が高まることが報告されており、そこへのミクログリアの関与も示唆されている。我々の使用している中大脳動脈閉塞 (MCAO) マウスは、海馬歯状回 (DG) において神経活動が大幅に上昇する。そこで、脳梗塞後の DG 顆粒細胞における樹状突起スパイン数の変化とそれに対するミクログリアの関与を調べた。MCAO マウスでは、DG 顆粒細胞の樹状突起スパインの数が偽手術を行ったマウスよりも少なかったが、CSF1R 阻害剤 (PLX3397) によってミクログリアを除去すると、MCAO による樹状突起スパイン数の減少が阻害された。また MCAO マウスのミクログリアでは、リソソーム膜関連タンパク量である CD68 の体積が増加した。これらの結果より、ミクログリアが樹状突起スパインの貪食を通して、脳梗塞後の DG 顆粒細胞のスパイン数減少に関与していることが示唆された。しかし、ミクログリアと興奮性ポストシナプスマーカーである PSD95 を共染色し、ミクログリアが樹状突起スパインを取り込んだ様子を可視化したところ、MCAO 群と偽手術群で PSD95 の取り込み量に差は無かった。このことから、脳梗塞後のミクログリアは PSD95 の発現していない樹状突起スパインを貪食すると考え、検討を進めている。

1-4 脳梗塞巣に出現するミクログリア機能の検討

澤野俊憲¹⁾、孫海洋¹⁾、小川寛之²⁾、岡田桃花¹⁾、中谷仁¹⁾、稲垣忍^{3,4)}、中込隆之⁵⁾、松山知弘³⁾、田中秀和¹⁾

¹⁾ 立命大・生命・薬理学、²⁾ 獨協医大、³⁾ 阪大院・連合小児、⁴⁾ 行岡医大、⁵⁾ 兵庫医大・先端研

虚血によって形成された脳梗塞巣は壊死組織であり、活動性を失った組織であると考えられてきた。しかし、我々は脳梗塞巣内に虚血誘導性幹細胞 (ischemia-induced multipotent stem cells: iSCs) が誘導されており、その一部がミクログリア (iSCs-derived microglia: iSMG) に分化している可能性を示してきた。本会では iSCs 及び iSMG が脳梗塞巣内で果たす役割について議論させて頂きたい。トランスクリプトーム解析より、iSMG は既知のミクログリアと比べて *Vegf* 等の血管発達関連遺伝子を豊富に発現することが明らかになった。実際に脳梗塞巣では増殖性の血管内皮細胞数と血管体積が増加しており、PLX3397 (CSF1R 阻害薬) 投与による iSMG 除去は脳梗塞巣内におけるこれらの血管変化を抑制した。さらに PLX3397 投与が経時的に生じる脳梗塞巣の縮小を抑制したことから、iSMG 除去により脳梗塞巣成分の排出が阻害されているのではないかと予想した。脳梗塞巣内に蛍光標識デキストランを投与すると、それらが脳梗塞巣内の血管壁及び血管内腔に移行したことから、脳梗塞巣内の血管が脳梗塞巣成分の排出経路になっている可能性がある。すなわち、iSMG は脳梗塞巣内の血管リモデリングを誘発することで脳梗塞巣成分の排出経路を整備し、神経毒性成分を含んだ脳梗塞巣の速やかな消失を促しているのではないかと考えている。

2-1 炭水化物摂取と胃酸分泌は胃エストロゲン分泌を減少させる

伊藤隆雄¹⁾、尾崎雄一²⁾、田中篤²⁾、金井克光¹⁾
和歌山県立医科大学・医・解剖学第一講座¹⁾、
和歌山県立医科大学・医・循環器内科²⁾

胃壁細胞 (胃酸分泌細胞) は、血中のトリグリセリドおよび脂肪酸の濃度に応じてエストロゲンを分泌する。食欲、脂質合成および脂質分解を抑制させたり、脂質の貯蔵および消費を増加させることによって上昇した血中脂質濃度を減少させる。しかしながら、胃壁細胞はエストロゲン産生および胃酸分泌のためのエネルギーを脂肪酸から生成するため、食後の血中脂質濃度および酸分泌活性の変化は、胃エストロゲン産生に影響を及ぼすかもしれない。本研究では、炭水化物摂取が血中脂肪酸濃度とエストロゲン濃度を減少させ、脂質の静脈内注射により血中エストロゲン濃度が部分的に回復することを示した。単離した胃粘膜細胞において、胃酸分泌を促進させるホルモンはエストロゲン産生を減少させ、一方、制酸剤や胃酸分泌を抑制させるホルモンはエストロゲン産生を増加させ、さらに後者は、食後に減少した血中エストロゲンレベルを回復させた。インスリンや胃エストロゲンは肝臓での脂質合成を促進または抑制する。胃のエストロゲン産生は、炭水化物と脂質の摂取に基づいて適切な肝臓の脂質合成のために調節されることが示唆された。

2-2

ラット上行結腸集合リンパ小節付近に定着する細菌の日内変動およびその変動が集合リンパ小節に及ぼす影響の解析

島田晨香¹, 久保田直人^{2,3}, 森下理奈子¹, 横山俊史¹, 星信彦¹, 万谷洋平¹

¹ 神戸大院・農・形態機能, ²University of California, Riverside, School of Medicine, Division of Biomedical Sciences, ³University of California, Riverside, Center for RNA Biology and Medicine

【目的と方法】動物の消化管粘膜表面には大量の細菌が定着し、宿主にとって重要な役割を果たしている。当研究室では、定着細菌の量が日内変動を示すことをラットの食道、胃無腺部、回腸において明らかにしてきた。齧歯類の上行結腸には粘膜ヒダが存在し、その粘膜ヒダの間に多量の細菌が定着する一方、その定着細菌の日内変動やそのパターンが上行結腸組織に及ぼす影響は明らかでない。そこで本研究では、ラット上行結腸の集合リンパ小節(ALF)周辺の定着細菌量における日内変動を組織学的に解析した。加えて、抗生物質を1日間投与して細菌定着を阻害し、定着細菌が日常的に上行結腸ALFに与える影響をトランスクリプトーム解析によって探索した。【結果】組織学的解析の結果、いずれのZeitgeber time(ZT;明期/暗期の開始時刻をZT0/ZT12とする表記)においても上行結腸粘膜ヒダ間には細菌の集積する層がみられ、横断切片における細菌層の腸管外径あたりの面積はZT6よりZT18で有意に大きかった。次に、細菌定着量の増加するZT18において、上行結腸ALFを含む領域の遺伝子発現を抗生物質投与群と対照群との間で比較した結果、有意な発現低下遺伝子には、上皮細胞の発生、ゴルジ装置の組織化などに関する遺伝子群が検出された。とくに上皮細胞の発生に関連した発現低下遺伝子には、杯細胞への分化に関連する転写因子である*Atoh1*, *Bhlha15*, *Spdef*が含まれていた。また、有意な発現上昇遺伝子は、生体酸化、胆汁酸の分泌やinterferon-beta産生の促進をはじめ、様々なパスウェイに関連づけられた。【結論】上行結腸ALFにおける定着細菌が暗期の間に増加する日内変動を示すことが示唆された。加えて、この定着細菌の暗期における増加が上行結腸ALFにおいて、杯細胞の分化に関わる遺伝子を含む様々な遺伝子の発現を制御している可能性が示された。

2-3

医科大学における医学史料の管理と希少性について

高田 嘉宏・大阪大学大学院/人文学研究科
芸術学専攻/美学研究室/博士課程前期

大正時代の府立大阪医科大学の時代には、西洋解剖書から模写されて大型画面に描かれた解剖掛図(かけず)があり、これは掛け軸のように黒板に吊るされて、講義用教材として使用されていました。大阪大学医学系研究科の医学史料室収蔵庫には、現在361枚の解剖掛図が確認されています。かつての旧帝国大学には、このような掛図が数おありましたが、現在では、ほとんど破棄されているため、解剖掛図が現存していることは、たいへん貴重な第一次史料といえます。

本発表では、全国の医科大学で、現在確認されている解剖掛図を紹介しながら、大学機関の保管にかかる歴史資料を、適切に管理していただくことの重要性を主張いたします。これらの史料は、医学科が所有しているにもかかわらず、長年、見過ごされ、放置され、管理される教授もいないため、長いあいだ実態調査はできませんでした。この古い史料は、大学の草創期にあたる大学史を語る上で、貴重な医学史料であるだけでなく、現在ある基礎科学のいしずえを築いた、なによりの証拠にあたるのが、これらの学術史料です。これらの管理には費用がかかりますが、大学内の専門的職員である学芸員(curator)と、よくご相談の上、それぞれの研究機関で適切に保管・管理されることを提言いたします。

3-1

マウス脳におけるTLR2シグナル伝達経路と関連する脳部位および細胞種の特定

前川泉、村山咲希、高木翔平、宮田清司、吉村亮一
京都工芸繊維大学・応用生物学

自然免疫応答の誘導に重要な役割を持つToll様受容体(TLRs)は、さまざまな病原体分子パターン(PAMPs)を認識し、下流のシグナル伝達系を活性化する。TLRsのうち、TLR4はグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(lipopolysaccharide:LPS)を認識し、脳においては、脳室周囲器官(CVOs)のアストロサイトとタニサイトで発現する。LPSの末梢投与はCVOsのアストロサイトとタニサイトのSTAT3とNF- κ Bシグナルを活性化させ、中枢におけるTLR4シグナル伝達経路に関わる部位やグリア細胞種が明らかとなっている。一方、TLR2はTLR1またはTLR6とヘテロダイマーを形成し、グラム陽性菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸やペプチドグリカンなどの分子を認識するが、中枢におけるTLR2シグナル伝達経路については未解明な点が多い。本研究では、成体マウスのCVOsにおけるTLR2の発現、および炎症時のシグナル伝達経路に関与する脳部位や細胞種について調査した。その結果、TLR2はCVOsのIba1陽性ミクログリアと血管周囲マクロファージで発現し、GFAP陽性アストロサイトにおいて発現は見られなかった。また、クロドロン酸内包リボソームによるミクログリアとマクロファージの枯渇は、Zymosanによって誘発される低体温を減弱させることが分かった。以上より、TLR2はCVOsのミクログリアやマクロファージを介して、炎症反応としての体温調節に関与する可能性が示唆される。

3-2

LPS誘発炎症時のマウス脳におけるIL-1 β 発現細胞

榮村はる香、宮田清司、吉村亮一
京都工芸繊維大学・応用生物学

末梢で感染が生じると、免疫細胞によってサイトカインが産生される。それに応答して中枢でもIL-1 β やIL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインが誘導され、ミクログリアやアストロサイトを活性化し、発熱等の生体反応を通じて免疫系をさらに刺激する。IL-1 β は炎症における重要因子であり、過剰な産生と慢性的な暴露は敗血症や神経炎症の一因となりうる。しかし、中枢においてどの細胞がIL-1 β を産生するかについては、未だ不明な点が多い。そこで、本研究ではLPS腹腔内投与による全身性炎症モデルマウスを用いて、免疫二重染色法により、脳内のIL-1 β 発現細胞について調べた。生理食塩水を投与したコントロールマウスでは、脳室周囲器官ではIL-1 β が強く発現し、多くは血管内皮細胞マーカーCD31と共局在していたが、脳室周囲器官以外の脳領域においてIL-1 β の発現はほとんど確認されなかった。LPS投与マウスでは、IL-1 β 発現が顕著に増加し、血管内皮細胞マーカーCD31との共局在が多く確認されたが、ミクログリアマーカーIba-1との共局在は少なかった。また、最後野ではIL-1 β と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の共局在が観察された。以上より、感染発症時におけるIL-1 β の脳内発現は脳の部位ごとに異なり、血管内皮細胞や神経終末など複数の細胞で発現する可能性が示された。

3-3

脳室周囲器官および延髄中心管におけるタニサイト様上衣細胞の特徴解析

益野亮登¹、古部瑛莉子²、岡本明洋¹、宮田清司¹、吉村亮一¹

¹京都工芸繊維大学・応用生物学、²旭川医科大学・医学部・解剖学講座・機能形態

タニサイトは、視床下部の正中隆起と弓状核に存在し、細胞体から脳実質まで伸びる長い放射状突起を有する脳室上衣細胞のサブタイプである。タニサイトはその長い突起により脳室と脳実質間のトランスサイトosisに関与することが知られている。また、タニサイトは他の上衣細胞と異なり、神経幹細胞の特徴を併せ持つ。免疫組織化学的にはNestinを始めとした神経幹細胞マーカーを発現し、増殖能を有している。最近の研究で、脳室周囲器官である終板脈管器官(OVLT)、脳弓下器官(SFO)や、延髄中心管(CC)においても、タニサイトと同様の形態的特徴を有する細胞が報告され、これらの細胞もタニサイトである可能性を示唆している。そこで本研究では、OVLT、SFO、CCの脳室上衣細胞が、タニサイトとして位置づけられるかを検討した。蛍光トレーサー脳室内投与により、OVLT、SFO、CCの脳室上衣細胞が脳脊髄液から脳実質への高分子輸送を行うことを明らかにした。さらに、VimentinとConnexin43、Nestin、Glycogen synthase1、Pax6を用いた免疫組織化学、Nestin-CreERT2/CAG-CATloxP/loxP-EGFPトランスジェニックマウスおよび増殖因子依存性細胞増殖のin vivo解析により、これらの細胞が神経幹細胞であることが示唆された。以上の結果は、正中隆起と弓状核以外にも、脳室周囲器官および延髄中心管には神経幹細胞としてのタニサイトが存在する可能性を示している。

3-4

リボソーム製剤によるマウス脳ミクログリアの除去効果

吉原有美歩、平塚大士、宮田清司、吉村亮一
京都工芸繊維大学・応用生物学

クロドロン酸は、細胞内で非加水分解性ATP類似体代謝され、ミトコンドリアのADP/ATP輸送機構を阻害することで、ミクログリアやマクロファージを枯渇させる。近年では、単剤より細胞透過性と殺細胞効果が優れたクロドロン酸内包リボソームが、ミクログリアの選択的な除去に利用されている。リボソームは1965年に人工脂質小胞として開発されて以来、様々な薬物送達の理想的担体として使用され、その直径や脂質組成が、送達距離や標的細胞への取り込み効率に影響を与えると考えられている。最近、従来の直径300nmのリボソームに加えて、直径100nmの非常に小さいリボソームが開発された。さらに、これらのリボソームは、脂質組成比を改良することでミクログリアへの選択性が向上しており、マンノース受容体リガンドをリボソームに結合させた既存製品とは異なる。このリボソームにクロドロン酸を内包させた製剤は、末梢マクロファージの効果的な除去効果が報告されているが、中枢における効果は未だ明らかでない。本研究では、これらの直径の異なる二種類のクロドロン酸内包リボソームをマウスの大脳皮質に直接投与することで、脳実質のミクログリア除去効果について調べた。その結果、投与部位周辺では、有意なミクログリアの除去効果がみられた。なお、脳の損傷部位に集まるミクログリアとマクロファージを区別するために、ミクログリア特異的なG蛋白質共役型プリン受容体P2RY12に対するモルモット抗体を作製し、免疫組織化学に使用した。

4-1 グルタミン酸の興奮毒性による神経細胞死とその後の神経修復

藤居怜那¹ 南部有理¹ 小湊豊久¹ 古部瑛莉子^{1,2} 吉村亮一¹ 宮田清司¹
¹京都芸芸繊維大学・応用生物学 ²旭川医科大学・医学部・解剖学・機能形態

グルタミン酸は興奮毒性作用により神経変性疾患や虚血時の神経細胞死を引き起こすことが知られています。培養下の小脳顆粒細胞をグルタミン酸溶液に曝露すると、急速にネクロシス様神経細胞死が観察され、その後、アポトーシス様神経細胞死が観察されます。In vivo でのグルタミン酸による神経細胞死に関する報告は僅かです。今回の研究では、脳室周囲器官の高い血管透過性を利用し、成体マウスの Area Postrema(AP)において高濃度 Monosodium glutamate(MSG)皮下投与による神経細胞死とその後の回復を観察しました。MSG 投与後 2 時間で有意な Fos⁺細胞密度の上昇が見られ、さらに AP 特異的に Fos⁺HuCD/4⁺神経細胞密度が高くなりました。また、MSG 投与後の HuCD/4⁺神経細胞密度の変化は 3 日から 21 日後に約 45%減少しましたが、35 日にはコントロールレベルまで回復しました。次に、死細胞を TUNEL assay を用いて観察し、非凝集核を有する HuCD/4⁺または HuCD/4⁺の TUNEL⁺細胞密度は投与後 1 日で有意に高くなり、一方で凝集核を有する HuCD/4⁺または HuCD/4⁺の TUNEL⁺細胞密度は投与後 3,7 日で有意に高くなりました。さらに、3D 解析により Iba1⁺ミクログリアに囲まれた TUNEL⁺HuCD/4⁺神経細胞の存在が明らかになり、MSG 投与後 1,3 日でミクログリアや貪食ミクログリアの密度が増加しました。以上より、AP において MSG 興奮毒性作用によるアポトーシスあるいはネクロシスが誘発されて神経細胞が脱落し、その後神経細胞密度の完全な回復が起きることが示唆されました。

4-2 酸感受性イオンチャネルを介する亜鉛流入と神経細胞障害

井上浩一¹、Xiangping Chu², Zhigang Xiong³
¹奈良医大・解剖 1、²UMKC Sch. Med.、³Morehouse Sch. Med

脳組織への血流障害により局所的な低酸素とアシドーシスが生じる。酸性条件下で活性化される酸感受性イオンチャネル(ASIC)は、虚血性脳損傷において重要な役割を果たすが、今回、ASIC2a を含むチャネルの活性化が亜鉛の流入を誘導し、これらのチャネルを介した亜鉛の流入が細胞傷害に重要な役割を果たす可能性を示す。ASIC を導入した CHO 細胞において、通常の Na⁺に富んだ細胞外溶液(ECF)を用いた場合、ASIC チャネルを発現する細胞では、pH を 7.4 から酸性に下げると大きな内向き電流が引き起こされた。しかし、ECF を陽イオンとして亜鉛を含むものに変わると、同じ pH 低下でも、ASIC2a を含む細胞でのみ内向き電流が誘導されたが、ASIC1a の場合は誘導されなかった。亜鉛蛍光イメージングにおいて、ASIC1a ではなく ASIC2a を発現している細胞において、亜鉛を酸性にすると急激な亜鉛流入が生じた。さらに、ASIC2a を含む細胞が活性化される pH 値では、酸による神経毒性は亜鉛によって悪化した。これらのデータは、ASIC2a を含むチャネルが亜鉛の新規進入経路であり、これらのチャネルを介した亜鉛流入が亜鉛誘発神経毒性に寄与している可能性を示唆している。

4-3 細胞内輸送制御因子 Rab6 による神経細胞の極性形成メカニズムの解明

國井政孝、Zhang Yu、原田彰宏

大阪大学医学系研究科細胞生物学

神経細胞は軸索と樹状突起という高度に極性化された形態を持つ。この極性は脳の組織形成や神経伝達に必須である。細胞極性の形成や維持に重要なメカニズムの一つに、極性輸送と呼ばれる、細胞内での方向性を持った蛋白質輸送がある。極性輸送には低分子量 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が、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るが、組織・個体レベルでの機能はほとんど解明されていない。そこで我々は Rab6a/b の二重欠損 (Rab6 DKO) マウスを作製した。その結果、Rab6 DKO 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 DKO 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。さらに、Rab6 DKO マウス由来の初代培養神経細胞では軸索伸長が障害され、極性形成に異常が認められた。Rab6 DKO ニューロンの細胞体では、シナプス小胞局在蛋白質であるシナプトブインジンやシナプトタグミンがゴルジ体近傍で蓄積していることが明らかとなった。これらの結果から、Rab6 はシナプス小胞前駆体の軸索への輸送を介して神経細胞の極性形成に機能していることが示唆された。

4-4 小脳プルキンエ細胞と平行線維の直交性接続形成のメカニズム

藤島和人^{1,2}、近藤洋一¹、見学美根子²
¹大阪医科薬科大学生命科学講座解剖学教室、
²京都大学 物質・細胞統合システム拠点

小脳プルキンエ細胞の樹状突起は直交する約十数万本の平行線維(小脳顆粒細胞軸索)とシナプス結合する。その分岐は非常に複雑であるにも関わらず、単一平面上に投射する。これまでの研究でプルキンエ細胞樹状突起が接続相手である平行線維に対して直交して進展することを示した。この性質により平面が形成される可能性が高い。しかし、樹状突起が軸索束に対し直交方向に進展するメカニズムは明らかでなかった。このメカニズムを明らかにするため、平行線維とプルキンエ細胞樹状突起を可視化した培養系でタイムラプス観察を行ったところ、樹状突起が平行線維に対して牽引力を発揮することを確認した。張力より樹状突起が軸索間を最短距離で横切することで樹状突起が軸索に対し直交方向に伸展する可能性が示唆される。またこれまでに直交伸展への関与が分かっていた膜骨格 β III スペクトリンが樹状突起の力産生に寄与するかを明らかにするため、この分子とミオシン II の局在を調べた。通常時、両者は明確には共局在しないものの、薬理学的にアクトミオシンを活性化することで、細胞膜近傍で強い共局在を示す。また β III スペクトリンを発現阻害すると、アクトミオシンは収縮時に膜近傍での局在を維持できない。両者が協調して、樹状突起の張力形成を行い、突起の伸展パターンを決定する仕組みについて議論する。

5-1 ラット骨粗鬆症椎体の骨欠損における多血小板血漿と綿状人工骨による骨形成の組織学的評価

清水佑一¹、長江将輝¹、外村 仁¹、石橋秀信¹、竹浦信明¹、森田尚宏¹、阪田宗弘²、山田俊児³、高橋謙治¹、田中雅樹³

¹ 京都府立医大大学院 運動器機能再生外科学(整形外科)、² 京都第二赤十字病院 整形外科、³ 京都府立医大大学院 生体構造科学

はじめに：骨粗鬆症性椎体骨折において迅速に骨形成を促進し、骨癒合が得られる手術方法の確立が望まれている。多血小板血漿 (PRP) は多くの成長因子を含んでおり、骨形成を促進する。また、マクロファージ(M ϕ)サブタイプの分化が骨形成の過程に影響するといわれている。本研究では、骨粗鬆症性椎体骨折ラットモデルにおいて、PRP と綿状 β -tricalcium phosphate/poly(lactic-co-glycolic acid) fiber (綿状人工骨) の併用が骨形成と M ϕ の分化におよぼす経時的変化を組織学的に評価した。方法：骨粗鬆症を誘導した雌性 Sprague-Dawley ラット 72 匹の第 3 腰椎に骨欠損を形成し、綿状人工骨を充填した。これらを骨欠損のみの control 群、生理食塩水を含ませた綿状人工骨を充填した PBS 群、PRP を含ませた綿状人工骨を充填した PRP 群に分けた。各群で術後 4、8、12 週時点の骨欠損部を組織学的に評価した。結果：HE 染色では PBS 群、PRP 群とも綿状人工骨周囲に多核様細胞を認めた。それらは TRAP 染色で多くが陰性で、オステオカルシン(OC)、RUNX2 の免疫組織化学では陽性であった。陽性領域は OC では術後 12 週、RUNX2 では 8 週で PRP 群が PBS と比べ、有意に広がった。CD86 の陽性領域は各週で PBS 群が有意に広く、CD206 は PRP 群が 4 週で有意に広がった。考察：PRP は骨粗鬆症性椎体の骨欠損部で術後早期に M ϕ サブタイプの M1 から M2 への分化を促進し、炎症期から組織修復期へ移行させ、綿状人工骨との相乗効果で骨芽細胞による骨形成を促進する可能性があると考えた。

5-2 ストレプトゾトシンとビスホスホネートによるラット顎骨壊死モデル

覃 科¹、角 陽一²、仲川 雅人¹、羅 楚怡³、王 榆添¹、余 連婧¹、上村 守²、本田 義知¹
¹大阪歯大・口腔解剖、²大阪歯大・解剖、³大阪歯大・矯正

【背景】ビスホスホネート (BP) 製剤の副作用である顎骨壊死 (BRONJ) のメカニズムは未だ不明な点が多い。糖尿病は BRONJ 発症のリスク因子の一つとして重要視されているが、特に 1 型糖尿病を併発した BRONJ モデルの知見は乏しい。【目的】本研究は、ストレプトゾトシン (STZ) とビスホスホネート製剤として使用されるゾレドロン酸 (ZA) の併用により、1 型糖尿病を合併した BRONJ モデルを開発することを目的とした。【方法】3 週齢雄性 Wistar ラットを用いた。STZ および ZA を腹腔内投与し、薬剤投与の有無により、Control 群、ZA 群、STZ 群、ZA+STZ 群に分類した (動物実験承認番号：24-02017)。投与後、経時的に血糖値、体重、死亡率を記録した。6 週齢時に上顎第一臼歯を抜去した。8 週齢時に抜歯窩の骨の形態をマイクロ CT で解析した。【結果】STZ を投与した STZ 群および ZA+STZ 群では投与 3 日後から血糖値が上昇し、体重増加の抑制が認められた。また、STZ 群および ZA+STZ 群の体重が低いラットでは Control 群に比べて、死亡率が高い傾向が認められた。骨への影響に関しては、ZA 群および STZ 群では抜歯窩の骨治癒不全が認められ、ZA+STZ 群では抜歯窩周囲に広がる骨破壊が認められた。【考察】本研究では、ラットに STZ と ZA を投与することにより 1 型糖尿病を合併した BRONJ モデルラットを確立した。本研究成果は、今後の BRONJ の未知なる発症のメカニズムの解明に貢献することが期待される。

5-3

肥満2型糖尿病モデルラットにおける下顎第一臼歯舌側歯肉の形態学的研究

平山 和幸¹、角 陽一²、上村 守²

¹大阪歯大・院・解剖、²大阪歯大・解剖

肥満は2型糖尿病のリスク要因の1つで、過剰な体脂肪が心血管代謝異常やインスリン抵抗性、高血糖などを引き起こすことが指摘されている。また、糖尿病と歯周病の間に双方向性に関連が認められると報告されている。本研究では肥満 2 型糖尿病 (ODM) モデルラットにおける下顎第一臼歯舌側歯肉の粘膜上皮、上皮下結合組織、毛細血管の形態学的変化について、正常ラットと比較した。ODM 群として生後8週齢SDT fatty 雄性ラット12匹(体重: 約 309g、空腹時血糖値: 約 148mg/dL、HbA1c: 約 5.5%)、正常群として同週齢 SD 雄性ラット12匹(体重: 約 232g、空腹時血糖値: 73mg/dL、HbA1c: 約 3.7%)を用いた。各群各3匹ずつ、表面形態、上皮剥離、組織学、微細血管標本をそれぞれ作製した。下顎第一臼歯舌側歯肉において、ODM 群の粘膜上皮は大きさと形状が様々な上皮細胞が見られ、結合組織乳頭は小さく、毛細血管網の形状は近遠心方向に長軸がある楕円形様で、上縁の毛細血管は緩やかに蛇行していた。正常群の粘膜上皮は均一な大きさの亀甲様様を呈した上皮細胞が見られ、結合組織乳頭は大きく、毛細血管網の形状は上下方向に長軸がある楕円形で、上縁の毛細血管は激しく蛇行していた。ODM 群は正常群より、粘膜上皮の厚さは有意に厚く、上皮下結合組織の断面積は有意に小さく、毛細血管の直径は有意に細かった。以上のことから、ODM ラットの下の顎第一臼歯舌側歯肉において、肥満を伴う高血糖は、粘膜上皮の厚さ、および上皮下結合組織の断面積に退行性変化を、毛細血管に糖尿病性細小血管症を引き起こしていた。臨床において、ODM 患者の下顎舌側歯肉では、粘膜上皮が肥厚し、上皮下結合組織および毛細血管は萎縮性変化が引き起こされる可能性があり、注意深く観察する必要がある。

6-1

NOニューロンの特徴を有する大脳皮質 von Economoニューロンおよび fork cell 様ニューロンの存在とストレスの作用について

高橋航平 (大阪大学医学部 2 年生 神経機能形態学講座)、谷口学 (大阪大学医学系研究科 神経機能形態学講座)、佐藤真 (大阪大学医学系研究科 神経機能形態学講座)

von Economo ニューロン (VEN) は紡錘形を示し、大脳皮質軟膜に垂直に配向する。fork cell は樹状突起が典型的な錐体細胞と上下逆転し、形態は Y 字型を示す。ともに形態学的特徴により定義され大脳皮質に存在する。従来の研究ではこれらは興奮性ニューロンとされ、ヒトを含む高等動物(霊長類など)に特有であり、認知症や自閉症との関連がその疾病関連分子の局在より想定されている。しかしながら、実験動物での確認ができないことが研究上の大きな障害とされてきた。一方、我々は fork cell の特徴を有する神経細胞(fork cell 様ニューロン)が、齧歯類であるマウスの大脳皮質に存在することを新たに報告した(Taniguchi *et al.*, *PLoS One*, 2022)。今回、マウスにおいて VEN や fork cell 様の形態をとる抑制性ニューロンが大脳皮質に散在性に存在することを見出したので報告する。これら細胞群は NADPH-d(NADPH 脱水素酵素)や NOS1(NO 合成酵素のアイソザイム 1)を産生し、一酸化窒素(NO)を生成するニューロンの特徴を有していた。興味深いことに、幼少期(生後 1 日～生後 11 日)にストレスを与えたマウス群では、コントロール群と比較して NADPH-d 陽性細胞が大脳皮質において全体的に有意に減少すること、および NOS1 陽性の VEN 様ニューロンが有意に減少することを観察した。その詳細を報告する。

6-2

Sbno1 は DNA 修復関連分子の発現制御によってニューロンのゲノム安定化に寄与する

井原大 1) 成本彩乃 1) 金田勇人 1) 勝山裕 1)
1) 滋賀医科大学 解剖学講座 神経形態学部門

脳のニューロン新生は極めて限定的であり、出生時に脳を作るニューロンは個体の生涯にわたって生存し脳機能のために働く。一方でニューロンのゲノムには他の臓器を構成する細胞よりも多くの DNA 損傷が起こっていることが近年の研究で明らかにされている。

我々は、全てのニューロンで強く発現する Sbno1 ヘリカーゼの機能について研究を行っている。大脳皮質ニューロンで特異的に Sbno1 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (Sbno1 cKO) では大脳皮質の生後発達に従いニューロンの変性が起こる。また、Sbno1 cKO では大脳皮質ニューロンのアポトーシスが増加していることがわかった。次に Sbno1 欠損による遺伝子発現変化を網羅的に調べるために RNA シーケンシングおよびマイクロアレイを行った。その結果、Sbno1 cKO マウスの脳では正常な大脳皮質に比べてアポトーシスに関連する遺伝子群の発現に有意な変化が認められた。特に Yeats4 の発現が Sbno1 cKO で顕著に減少していた。Yeats4 は DNA の修復に必要な分子であることが報告されている。細胞培養系で Sbno1 をノックダウンしたニューロンに Yeats4 を過剰発現させたところ、ニューロンの DNA 損傷や細胞死関連マーカーの発現がレスキューされた。これらの結果から Sbno1 は Yeats4 の発現制御を介してニューロンのゲノム保全機構に働いていることが示唆された。

6-3

生後のオリゴデンドロサイト発達における統合失調症関連因子の機能解析

清水 尚子、石野 雄吾、遠山 正彌、宮田 信吾
近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門

統合失調症は人口の約 1 % が罹患する主要な精神疾患のひとつであるが、統合失調症発症に関する分子機構は不明である。近年、統合失調症死後脳解析によって白質の形態異常などが数多く報告されており、神経軸索に髄鞘 (ミエリン) を形成するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトの発達障害との関連性が示唆されている。統合失調症死後脳ではオリゴデンドロサイトの細胞数の減少、配置変化、ミエリンの形態異常がみられることや、オリゴデンドロサイトまたはミエリンの関連因子の発現が変化していることが報告されている。我々は、スコットランドの精神疾患多発家系から見出された統合失調症関連因子 DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia1) の結合因子として DBZ (DISC1 Binding Zinc finger protein) を同定するとともに、DBZ が生後発達期の脳梁オリゴデンドロサイトに発現し、ミエリン形成に関与することを明らかにしてきた。さらにオリゴデンドロサイト発達の詳細な分子機構を解明するため、DBZ の結合因子である微小管系モータータンパク質 Dynein の制御因子 NDE1 (Nuclear Distribution E Homolog 1) に着目し、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集マウスを用いて解析を行った。

7-1

解剖学教育における比較解剖学と One health の観点からのアプローチについて

金山 俊作・野生鳥獣研究所けものら

ワンヘルス (one health) とは、人や家畜、野生動物、植物、そしてより広い環境 (生態系を含む) の健康が密接に関連し、相互に依存していることを認識し、人、動物、生態系の健康のバランスを持続的に保ち、最適化することを目的とした統合的で統一的なアプローチとして定義され、その実現には領域横断的、学際的な協働的アプローチ (医歯薬学、保健科学、獣医学、環境科学、社会科学など多くの学問領域、あるいは、様々な行政単位、産業界、教育研究機関等の領域横断的な協働) が重要であるとされている。国際的には、ワンヘルスの概念をヒト医学のカリキュラムに (可能であれば早い段階から) 含めるべきであるというコンセンサスが高まっており、解剖学教育においては、ヒト医学と獣医学の専門家が比較解剖学的観点からインスピレーションを相互に与えあいながら、共通の知識を開発するという取組が行われている。今回我々は、野生動物の衛生管理を含めた根本的な疾病対策の必要性を感じ、ワンヘルス体制の構築を目的とした「けものら」を設立し、医学部生 20 名に対して、アライグマの解剖実習を実施した。実習の結果として、倫理観や科学的興味を醸成すること、比較解剖学の視点を通して解剖学への理解を深め、自分の興味関心が向かう領域について自覚するなど、様々な面で学習効果を確認することができた。

7-2

流出路の形態形成における心室と大血管の連結関係を規定する分子機構

八代健太・京都府立医科大学 生体機能形態科学
榊真一郎・京都府立医科大学 生体機能形態科学/東京大学医学部 小児科学

臓器錯位症候群は、臓器の左右非対称な形態形成における先天性の異常であり、多くの場合で複雑先天性心疾患を伴う。マウス胚において、脊椎動物の左右非対称な臓器形成の遺伝子プログラムの中核を担う Nodal シグナルの直接の下流で機能するビコイド型ホメオボックス転写因子 *Pitx2* は、左側の側板中胚葉に特異的に発現し、内臓の形態の左側化を担うと考えられている。*Pitx2* の発現を誘導された細胞は出生後に至るまで *Pitx2* を発現し続け、心臓では左心房全体、一部の左心室、及び一部の流出路の構造に寄与する。*Pitx2*^{ΔASE/ΔASE} 変異マウスは、*Pitx2* が左側に特異的な発現をするための必要十分なエンハンサー (ASE) を欠いており、側板中胚葉での *Pitx2* の発現を失う。その結果、心臓では両大血管右室起始と大血管転位を伴う複雑先天性心疾患を生じる。これまでに、左右心室と大血管との正しい連結関係を司る *Pitx2* の分子機構の詳細については、多くが不明のままである。この問いに答えるため私たちの研究グループでは、*Pitx2*^{ΔASE/ΔASE} 変異マウスに対し、シングルセル解析 (scRNA-seq)、3D 画像解析、及びマウス ES 細胞による *in vitro* 心筋分化系を用いた PITX2 の標的遺伝子解析 (Cut & Run アッセイ) を行った。ここで得られた独自のデータに基づいて、遺伝的な左右非対称プログラム下で、*Pitx2* がどのようにして流出路の形成を担っているのか、その分子機構についてここで議論したい。

7-3 軽量のオープンソース・ボリュームレンダリング・ソフトウェア Acto3D の開発

竹下直樹・京都府立医科大学 生体機能形態科学/小児科学
八代健太・京都府立医科大学 生体機能形態科学
家原知子・京都府立医科大学 小児科

光シート顕微鏡などの光学系と CUBIC などの組織透明化の技術的進歩により、組織・臓器片や生体全体を深部構造も含めて蛍光観察でき、かつそれらの 3 次元 (3D) 画像解析も可能となった。CT 画像による 3D 画像が臨床診療に広く利用されていることから、解剖学的構造をデジタル 3D 解析できることの有用性は明らかである。しかしながら、3D 解析には膨大な枚数の二次元画像が必要であるため、観察・処理・解析には、高性能 GPU と十分なメモリを搭載した高額な PC と、高額な商業用専用ソフト、もしくはコマンドベースのオープンソースの専用ソフトが必要で、導入には大きなハードルがある。我々はこの問題を解決するため、macOS 上にて GUI で動作する、スタンドアロンタイプのボリュームレンダリングソフトウェア Acto3D を開発したので、ここで紹介したい (Development. 151: dev202550, 2024)。