日 本 解 剖 学 会

第71回東北・北海道連合支部学術集会

会　期：令和７年９月20日（土），21日（日）
会　場：旭川医科大学

特別講演　脂質代謝酵素ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）に導かれて35年

山形大学医学部解剖学第二講座・後藤 薫

DGK は脂質リン酸化酵素である。基質の DG は PKC を活性化するセカンドメッセンジャーであり、DGK は PKC 活性の制御を担う重要な酵素と考えられていた。1990 年、札幌医大の坂根・加納らによって、ブタ胸腺 DGK の遺伝子クローニングが報告され、その一次構造（核酸配列）が明らかになった。私たちは、脳内における発現局在を調べるためにラット脳 DGK の遺伝子クローニングを行い、その核酸配列を決定した。この DGKα mRNA はラット脳において、情報伝達の主役であるニューロンではなく、グリア細胞に発現することが判明した。これは全く予想外のデータであったが、この知見は別種の DGK 分子の存在を強く示唆するものであり、これを機に世界中の DGK 研究グループが新しい DGK アイソザイムを探し求める「DGK 大航海時代」の幕が開かれた。その中で私たちは、いち早く DGKβのクローニングに成功し脳内線条体ニューロンに発現することを報告した。続いて DGKγ、DGKζ、DGKι の新しいアイソザイムを同定し、DGK ファミリーの cDNA をツールに、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて様々な生体臓器における DGK ファミリーの発現局在の多様性を明らかにした。その後、機能分子である各 DGK タンパクの特異抗体の作製と免疫電子顕微鏡解析、遺伝子工学を用いた変異導入 cDNA の作製と培養細胞への遺伝子導入実験、免疫沈降法と質量分析による結合タンパクの同定、KO マウスを用いた個体レベルの病態モデル解析へと続いている。DGK 研究は、DGK を介した多くの研究者との出会い、そして遺伝子工学時代の様々な研究技術に導かれてきた。

1　視床室傍核はマウスの尾側線条体において D2R-poor zone へ選択的に投射する

○角野風子[1]，苅部冬紀[1]，平井康治[1]，大城朝一[1]，藤山文乃[1]
北海道大・院医・組織細胞[1]

線条体の投射ニューロンは、ドーパミン 1 型受容体を発現する D1R ニューロンと、ドーパミン 2 型受容体を発現する D2R ニューロンに分けられる。この二種類の投射ニューロンは同程度の割合で混在しており、共通の興奮性入力を受け取ることにより協調的に働くことで適切な行動を促すと考えられている。しかし、尾側線条体に存在する D2R-poor zone（D2pz）では D1R ニューロンが 80%以上、D1R-poor zone（D1pz）では D2R ニューロンが 80%以上を占めており、これらが共通の興奮性入力を受け取るのかは十分に解明されていない。そこで本研究では、D1pz/D2pz を含む尾側線条体へのグルタミン酸作動性入力を組織学的に解析した。

先ず、グルタミン酸作動性軸索終末を蛍光免疫染色により標識し、その分布を解析した。その結果、D2pz ではその他の線条体領域と比べて小胞性グルタミン酸トランスポーター2（VGluT2）陽性軸索終末が多く、D2pz には皮質下からの興奮性入力が多いことが示唆された。この VGluT2 陽性軸索終末の投射元を明らかにするため、尾側線条体へ逆行性トレーサーを注入して、皮質下に分布する標識細胞を解析した。その結果、トレーサーの注入部位に VGluT2 高密度領域が多く含まれているほど、視床室傍核に分布する標識細胞の割合が多かった。そこで、順行性トレーサーを用いて視床室傍核の VGluT2 陽性細胞を標識したところ、その軸索は尾側線条体において D1pz を避けて D2pz へ選択的に投射していた。これは、D1pz/D2pz では視床室傍核からの興奮性入力により D1R ニューロンが優位に働く可能性を示唆する。(COI: No)

2　マウスの尾側線条体に神経支配される黒質外側部の投射様式の解析

○王靖淇[1]，苅部冬紀[1]，藤山文乃[1]
[1]北海道大学大学院 医学院 解剖学分野 組織細胞学教室

The basal ganglia receive excitatory cortical and thalamic inputs and project broadly to the thalamus, midbrain, and brainstem. Within this system, the caudal striatum (cStr), distinct from the dorsolateral striatum, primarily processes sensory information and receives aversion- and anxiety-related dopaminergic input from the substantia nigra. Our previous work demonstrated that the cStr selectively innervates the substantia nigra pars lateralis (SNpl). The present study aimed to clarify the cellular composition and projection targets of the SNpl in mice. Immunohistochemistry revealed heterogeneous expression of parvalbumin (PV), tyrosine hydroxylase, and forkhead box protein P2 (FoxP2), with little overlap between PV and FoxP2. Adeno-associated viral anterograde tracing of SNpl neurons receiving cStr input revealed widespread projections to thalamic nuclei, including the ventromedial, mediodorsal, and parafascicular nuclei, as well as to midbrain regions such as the periaqueductal grey, superior colliculus, and mesencephalic tegmental area. Basket-like GABAergic axon terminals were abundant in the superior colliculus but rare in thalamic nuclei, indicating region-specific synaptic structures. This suggests that SNpl projections may exert not only direct inhibition on projection neurons in the target areas, but also disinhibition via local inhibitory circuits.
Our findings suggest that the SNpl can serve as a critical sensory-motor integrative node, modulating sensory-guided defense behaviors through targeted inhibition of motor-related brain regions. (COI: No)

3　mGluR1-PKCγ シグナル伝達経路依存的な登上線維シナプス強化過程

○山崎美和子[1]，宮崎太輔[2]，渡辺雅彦[1]
北海道大・院医・解剖発生[1]，北海道大・院保・リハビリテーション科学[2]

出生直後のプルキンエ細胞は複数の登上線維（CF）から同じくらいの強さの入力を受けるが、発達に伴い単一の“winner”線維のみが選択的に強化され、樹状突起へ移行する。野生型マウスでは、生後 7〜10 日（樹状突起移行期前後）に“winner”線維の応答が顕著に増大し、単一シナプス小胞応答も増強していた。また、樹状突起へ移行する“winner”線維では長期増強（LTP）が誘発され、AMPA 型グルタミン酸受容体の発現も増加していた。形態学的には、スパイン体積やシナプス後膜肥厚部（PSD）面積の増大とともに、樹状突起支配領域が拡大し、生後 15 日頃には成体と同程度に達していた。これらの構造的強化は、mGluR1 または PKCγ 欠損マウスでは著しく障害され、AMPA 受容体量、PSD 面積、樹状突起支配領域が減少していた。機能的には LTP が障害され、シナプス応答も減弱していた。以上の結果は、mGluR1–PKCγ シグナル伝達経路が従来知られているシナプス刈り込みに加え、“winner”線維シナプスの機能的・構造的成熟を推進する中核的役割を担い、その後に生じる樹状突起支配領域の拡大に重要であることを示唆する。(COI:No)

4　大脳皮質体性感覚野におけるグルタミン酸受容体 GluD1 の発現および局在解析

○今野幸太郎[1)]、高崎千尋[2)]、山崎美和子[1)]、渡辺雅彦[1)]
[1)] 北大・院医・解剖発生, [2)] 北大・院歯・小児障害

グルタミン酸受容体 GluD1 はイオンチャネル型グルタミン酸受容体に分類されるが、イオンチャネル活性はほとんどなくシナプス接着分子の一つとして機能するユニークな分子である。GluD1 は脳の広範な領域に発現し、特に感覚情報が入力する体性感覚野第Ⅳ層に豊富であるが、詳細な分子局在は不明である。本研究は、GluD1 の大脳皮質体性感覚野における発現および局在を解析した。

はじめに成熟野生型マウスの新鮮凍結切片を作製し、RNAscope を用いて蛍光 *in situ* hybridization を行った。GluD1 mRNA は体性感覚野全層に広く発現し、興奮性および抑制性ニューロンに強い発現が認められた。続いて、GluD1 タンパクの局在を興奮性シナプスおよび抑制性シナプスマーカーを用いて検討した。その結果、GluD1 は抑制性シナプスと比較して興奮性シナプスの近傍に豊富に局在することが明らかとなった。さらに Expansion microscopy 法を用いて GluD1 の局在を追及した結果、GluD1 は小胞型グルタミン酸トランスポーター2（vGluT2）陽性終末が形成するグルタミン酸作動性の興奮性シナプスに多く局在することが明らかとなった。体性感覚野第Ⅳ層に投射する視床後腹側核は VGluT2 を発現することから、GluD1 は視床後腹側核－体性感覚野第Ⅳ層における興奮性シナプス回路の構築に関与している可能性が示唆された。(COI:No)

5 ミクログリアの脂肪滴形成はβ-アミロイド取り込み能を抑制する

楊舒涵・東北大（医）器官解剖学分野

【背景】肥満はアルツハイマー病（AD）のリスク因子であるが、その分子機構は未解明である。ミクログリアはAβの貪食やプラーク圧縮を介して病態進行を抑制する。我々は APP^{NL-G-F}-KIマウスに高脂肪食を与えると、通常食群と比べて大脳皮質・海馬のAβプラークと周囲の障害神経細胞が増加し、プラーク周囲ミクログリアの貪食マーカーCD68が低下することを見いだした。本研究では、高脂肪食による脳内脂質環境の変化がミクログリア機能に与える影響を検討した。
【方法】KIおよび野生型マウスに高脂肪食または通常食を27週間与え、大脳皮質の脂質成分を解析した。さらにKIマウス脳の免疫組織化学染色を行い、MG6ミクログリアを用いて脂肪酸添加による脂肪滴形成、Aβ取り込み、RNA-seq解析を実施した。
【結果】高脂肪食群KIマウス脳ではChEが増加し、ミクログリア内脂肪滴形成が亢進していた。MG6にオレイン酸を添加すると脂肪滴・ChE量が増え、Aβ取り込みが低下した。一方、ChE合成酵素阻害剤（iACAT）処理により脂肪滴形成は抑制され、Aβ取り込み能が回復した。RNA-seqではオレイン酸処理後のMG6で *Trem2*, *Lpl*, *Apoe* など脂質代謝・貪食関連遺伝子の発現が低下していた。TREM2とLPLの低下は高脂肪食群KIマウス脳のミクログリアでも確認された。
【結論】高脂肪食によりミクログリアでChEを含む脂肪滴形成が亢進し、Aβ取り込み能が障害される可能性が示唆された。

6 chitinase 3-like 1 を介した多発性硬化症発症機序の解明

板東 良雄[1,3]，鈴木 康博[2,3]，村上 千聡[3]，木村 隆[2]，箭原 修[2]
秋田大・院医・形態解析学・器官構造学[1]，国立病院機構旭川医療センター・脳 神経内科[2]，国立病院機構旭川医療センター・臨床検査部[3]

多発性硬化症は中枢神経系における慢性炎症性脱髄疾患であるが、その発症機序については未だに不明な点が多い。そこで今回、我々は再発・寛解型多発性硬化症（RRMS）患者髄液（CSF）を用いて、2D-DIGEを用いたプロテオミクス解析を実施し、Chitinase 3 like-1 (CHI3L1)が RRMS において発現上昇しているタンパク質として同定した。また、ELISAによっても RRMS および二次進行型 MS（SPMS）患者においてステロイド治療に反応した患者群では発現レベルが低下する一方で、非反応者では高発現が維持されることを明らかにした。さらに、MS患者の脳の剖検における免疫組織化学検査では、CHI3L1の発現は主に成熟したオリゴデンドロサイトに見られた。実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルにおいて、CHI3L1は脊髄において、特にオリゴデンドロサイトで高発現が認められた。そこで、培養細胞を用いて細胞 生物学的に検討を行ったところ、リコンビナントCHI3L1（rCHI3L1）添加によってERストレスを軽減され、LPC誘発性細胞死からオリゴデンドロサイトを保護することが示唆された。また、ミクログリアではrCHI3L1添加によってLPS誘発性炎症性マーカー（IL-1β、iNOS）の発現上昇を抑制した。さらに、in vivoにおいてrCHI3L1の投与したところ、gliosisや脱髄・軸索変性を抑制することによってEAEの症状を軽減した。以上のことから、CHI3L1が 多発性硬化症における神経炎症とオリゴデンドロサイト生存の重要な調節因子として機能することが明らかとなった。 (COI:No)

7 PTH 間歇投与マウス大腿骨の各部位における骨形成機序の差異

○原口-北構 真衣, 王 昊昱, 潘 垚澄, 李 偉松, 石 硯, 崔 佳昕,
中井 悠, 松澤 樹, 巫 浩然, Yelidana Yesibulati, 劉 軒宇, 長谷川智香
北海道大学 大学院歯学研究院 硬組織微細構造学教室

【目的】近年、骨形成の機序として、骨吸収に続いて起こる remodeling-based bone formation と、骨吸収に依存しない modeling-based bone formation の二つの機序が提唱されている。骨粗鬆症治療薬として用いられる副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone: PTH）の間歇投与は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の両方を促進し、骨量増加を誘導する。本研究は、PTH 間歇投与によって誘導される骨形成機序について、骨代謝回転が異なる各部位で明らかにすることを目的とした。
【材料と方法】生後 6 週齢 C57BL/6J マウスに、溶媒（コントロール群）または hPTH[1-34]（20μg/kg/day）を、1 日 2 回（PTH BID 群）または 1 日 4 回（PTH QID 群）の頻度で、14 日間腹腔内投与した。投与後に大腿骨を摘出し、骨・軟骨移行部に近接した領域（close region）および骨・軟骨移行部からやや離れた領域（distant region）の海綿骨を組織化学的に解析した。
【結果】PTH BID/QID 群の大腿骨では、コントロール群と比較して、Alkaline Phosphatase 陽性骨芽細胞系細胞の領域が増加し、海綿骨量も有意に増加していた。また、コントロール群では、骨基質石灰化に寄与する PHOSPHO1 陽性を示す活性型骨芽細胞は主に close region に局在していたが、PTH BID/QID 群では、close/distant region 両部位に PHOSPHO1 陽性骨芽細胞が長い細胞列を形成していた。骨基質石灰化を示唆するカルセイン標識は、close region で断片的で短く、鋸歯状を示すものが多いのに対し、distant region では連続的で長く、滑らかな標識面が観察された。さらに、PTH 投与頻度依存的に distant region の標識面が伸長していた。
【結語】PTH 間歇投与は、マウス大腿骨の骨・軟骨移行部に近接した領域では remodeling-based bone formation を促進する一方、やや離れた領域では、主に modeling-based bone formation を誘導する可能性が示唆された。(COI:No)

8 翼突筋の作用を示す廃物利用平面模型

安田峯生[1]・栂嶺レイ[2]・同仁会千歳第一病院、曽我部いづみ[2]
1.東北医科薬科大・医・解剖、2.北海道千歳リハビリテーション大学

肉眼解剖学の授業時間短縮と担当教員数削減により、教育方法の一層の工夫が求められている。安田らは骨格筋の作用を示す教材として段ボール、結紮用針金、包装ひも、使い捨てプラスチック容器などの廃材を利用した平面模型を考案し、本学会で発表してきた。今回、新たに翼突筋の開口、閉口作用を示す模型を作製した。
下顎骨以外の頭蓋骨側面線描画像型紙をボール紙に貼り、これを基板（不動部）とする。別に、下顎骨側面像型紙をボール紙に貼り、輪郭に沿って切り抜き、これを可動部とする。可動部の下顎頭に割ピンを通す。基板にはこの割ピンの移動路に沿って溝を掘る。溝は側頭骨関節結節下面を模して、下に凸の曲線とする。また、基板の頬骨弓下縁から上顎歯列にかけて、長く切れ目を入れる。この切れ目に可動部の下顎骨筋突起を差し込む。外側翼突筋と内側翼突筋を示すひもの一端をそれぞれの停止部位である下顎頭、下顎角内面の翼突筋粗面に固定する。ひもの自由端は基板の起始部蝶形骨翼突板相当箇所に穴を開け、ここより模型裏面に引き出す。可動部の下顎頭が側頭骨下顎窩に収まり、口が軽く開いた状態を基準位とし、内側翼突筋を示すひもを引くと、口は閉じる。一方、外側翼突筋を示すひもを引くと、下顎頭は前方に移動し、側頭骨関節結節にかかると口は開き始める。さらにひもを引くと関節頭は関節結節を越え、口はさらに大きく開く。
翼突筋は下顎骨の内方にあり、解剖学実習でも剖出の難しい場所である。遺体での観察機会の少ない理学療法士、歯科技工士、言語聴覚士などコメディカル学生にとっては、その機能の理解は容易でない。このような模型が「骨格筋の働きは起始・停止・走行・関係する関節の形によって決まる」という原則に基づいて、学生たちがその作用を自分の頭で考える一助となることを期待する。

9 雄ラット尿道におけるダブルコルチン様キナーゼ DCLK1 陽性刷子細胞の分布および形態

○横山拓矢[1]，Sayed Sharif Abdali[2]，中牟田信明[1]，山本欣郎[1]
岩手大・獣医・獣医解剖[1]，岩手医大・医・細胞生物[2]

刷子細胞は腸や気管の粘膜上皮内に散在し、頂端面に微絨毛を有する細胞である。この細胞は管腔内に存在する病原体の代謝産物を受容することが示唆されている。免疫組織化学的に、刷子細胞はダブルコルチン様キナーゼ1（DCLK1）や、プロスタグランジン合成酵素シクロオキシゲナーゼ（Cox）により標識される。尿道上皮においても存在が示唆されているが、分布・形態の詳細は明らかでない。本研究では、DCLK1陽性反応を指標として雄ラット尿道における刷子細胞の分布および形態を解析した。
内尿道口から外尿道口に至る尿道前立腺部、尿道膜性部および尿道海綿体部の粘膜上皮内にDCLK1陽性細胞が認められた。DCLK1陽性細胞の核周囲細胞質は類円形あるいは紡錘形で、主に内腔付近の上皮内において認められた。多くのDCLK1陽性細胞は基底部に向かって細長い細胞質突起を伸ばしていた。DCLK1陽性細胞の頂端部において微絨毛形成蛋白であるVillin強陽性反応が局在していた。また、DCLK1陽性細胞の核周囲細胞質においてCox1陽性反応が認められた。一方で、細胞にCox2陽性反応は認められなかった。電子顕微鏡観察では、尿道上皮内の内腔付近に短い微絨毛を備える細胞が認められ、頂端部にはフィラメント構造が観察された。また、隣接する尿道上皮細胞に対して微小な細胞質突起を伸ばしていた。これらの微細構造は、腸や気管における刷子細胞と類似していた。以上の結果から、尿道上皮内におけるDCLK1陽性細胞は刷子細胞であることが示唆された。尿道の刷子細胞はプロスタグランジンを構成的に分泌している可能性がある。(COI:No)

10 高脂肪食負荷を与えたセクレトグラニンノックアウトマウスにおける膵β細胞の分泌顆粒微細構造解析

○天羽晶子[1]、森永涼介[1]、甲賀大輔[1]、穂坂正博[2]、渡部剛[1]
旭川医科大学解剖学講座顕微解剖学分野[1]
秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科[2]

【背景・目的】セクレトグラニンII（Sg2）およびセクレトグラニンIII（Sg3）は、グラニンタンパク質の一種であり、分泌顆粒の形成に関与することが知られている。これらは膵β細胞に発現しており、Sg3ノックアウト（Sg3KO）マウスでは高脂肪・高糖質食（HF/HSD）負荷下でグルコース負荷時のインスリン分泌増加が抑制されることが報告されている。そこで本研究では、セクレトグラニン欠損マウスにおいて分泌顆粒の形成異常が生じているかを検証するため、膵β細胞インスリン分泌顆粒の微細構造を解析した。【材料・方法】WT、Sg2KO、Sg3KO、およびSg2/3二重ノックアウト（DKO）マウスを通常食（ND）またはHF/HSDで飼育し、膵臓を摘出後に樹脂包埋を行った。80 nm厚の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。
【結果】膵β細胞内の分泌顆粒は、電子密度の高いコアとそれを取り囲むハロー構造を有する成熟顆粒が大部分を占め、一部にハローが小さく電子密度も低い未成熟顆粒が認められた。分泌顆粒の体積率および個数率は、WT、Sg2KO、Sg3KO、DKOの順に増加傾向を示したが、平均顆粒径および平均コア径に差は認められなかった。顆粒コアの面積割合に基づいて成熟顆粒と未成熟顆粒を区別したところ、HF/HSD飼育下のSg2KOおよびSg3KO群において、未成熟顆粒の体積率が増加する傾向が認められた。【考察】セクレトグラニン欠損マウスにHF/HSD負荷を与えることで未成熟顆粒の増加が観察されたことから、分泌顆粒の成熟過程においてセクレトグラニンが重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

11　光-電子相関顕微鏡法（CLEM 法）による神経節細胞の観察 ～神経節細胞種によるゴルジ装置 3D 微細構造の違い～

○三好美佑[1]、森永涼介[1]、甲賀大輔[1]
旭川医科大学解剖学講座顕微解剖分野[1]

【背景・目的】脊髄神経節には、大・中・小の 3 種類の大きさの神経細胞が存在し、それぞれ異なる機能や神経伝達物質を担っていることが知られている。しかし、こうした細胞的特徴と細胞小器官の 3D 微細構造との対応関係については、十分に解明されていない。そこで本研究では、オスミウム浸軟法を応用した光-電子相関顕微鏡法（CLEM 法）を用いて神経細胞を免疫組織化学的に同定し、ゴルジ装置に注目してその 3D 微細構造の解析を行った。【材料・方法】Wistar 系雄ラットの後根神経節から 1 μm 厚の凍結準超薄切片を作製し、免疫染色を実施した。切削後に残った同一標本ブロックをオスミウム浸軟法で処理した。免疫染色像と、走査型電子顕微鏡（SEM）像とを対応づける CLEM 法を用いて、微細構造解析を行った。【結果】免疫染色により、CGRP 陽性細胞において、ゴルジ装置が核の周囲に沿って連続性の高いネットワーク構造を形成していた。IB4 陽性細胞では、核周囲に複数の円板状構造が局在していた。一方、NF-H 陽性細胞では、小さな紐状構造が細胞質内に散在していた。SEM 像の観察では、密に小孔を有するシス槽、板状のトランス槽、および小孔の開いた板状のトランスゴルジネットワークなどの構造が確認された。中間槽に関しては、CGRP+IB4 共陽性細胞および IB4 単独陽性細胞と比較して、NF-H 陽性細胞では槽の面積が狭く、数も少ないことが明らかとなった。【考察】ペプチド性神経伝達物質を分泌する細胞は、グルタミン酸のみを用いる細胞と比較して、より多くの分泌顆粒を形成する必要があるため、それらの細胞ではゴルジ装置の槽が発達していると考えられる。

12　カルボニル還元酵素 CBR1 による EGFR のリソソーム分解制御機構

○羽田浩士[1]，植村武文[1]，和栗聡[1]
福島県立医科大学・医・解剖組織[1]

細胞膜受容体である上皮成長因子受容体（EGFR）は、細胞の増殖・分化・生存といった多様なシグナル伝達を惹起し、その細胞表面のタンパク質量は、生合成経路のみならず、エンドサイトーシス、エンドソームからのリサイクリング、およびリソソーム分解のバランスによって維持される。今回我々は質量分析と siRNA スクリーニングを用いて、EGFR と相互作用しその分布に影響を与えるタンパク質の一つとして、カルボニル還元酵素 CBR1 を見出した。CBR1 は酸化ストレスで生じる反応性アルデヒドを還元することによって、タンパク質のカルボニル化を抑える機能を持つ。ヒト網膜色素上皮由来 ARPE-19 細胞及び非小細胞肺がん由来 H1975 細胞に CBR1-GFP を安定発現させ EGFR を免疫染色したところ、細胞膜で EGFR と共局在していた。また、EGFR 抗体による免疫沈降により、CBR1 と EGFR が相互作用することを確認した。CBR1 をノックダウン(KD)した H1975 細胞では、EGFR タンパク質量は有意に減少しており、その減少はリソソーム阻害薬バフィロマイシン A1 で回復した。ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞に EGFR-mCherry を安定発現させ、カルボニル基検出プローブ 2-ヒドラジン-5-ニトロフェノールを用いて固定細胞を観察したところ、CBR1-KD 細胞ではカルボニル基のシグナルが上昇し、顆粒状構造の一部が EGFR-mCherry シグナルと共局在していた。また、抗 EGFR 抗体による免疫沈降物において、カルボニル基をジニトロフェニルヒドラジンでラベルすることにより生化学的に検出したところ、CBR1-KD 細胞は対照細胞に比してカルボニル化 EGFR 量が増加していた。これらの結果から CBR1 は EGFR のカルボニル化とリソソーム分解を抑える機能を持つことが示唆された。

13　脂肪酸結合タンパク質 5 発現の Chromograin A 小胞形成への関与

○鈴木良地[1]、　大和田祐二[2]、　板東良雄[1]

秋田大・院医・形態解析学・器官構造学[1]
東北大・院医・器官解剖学分野[2]

脂肪酸結合タンパク質ファミリー（FABP）に所属する脂肪酸結合タンパク質 FABP5 は分子量 15 kDa のタンパク質で、長鎖脂肪酸への親和性を有する。脂肪酸（FA）は疎水性であるが、FABP-FA 複合体を形成することで親水性を獲得し、細胞内コンパートメント間の FA 輸送が促進される。我々は、FABP5 の生体内での機能を明らかにするために組織学的な発現局在を検討してきた。C57BL/6 マウス小腸上皮に点在する FABP5 強陽性の紡錘形細胞はセロトニン（5-HT）との共発現、形態学的特徴から enterochromaffin cell であると考えられた。そこで、FABP5 と 5-HT 放出との関係を明らかにする目的で、large dense core vesicles （LDCVs）へのパッケージングに必要で 5-HT 放出のマーカーである Chromograin A（ChrgA）との共局在を蛍光免疫染色で検討した。FABP5 陽性の細胞内小胞は ChrgA、5-HT ともに陽性であり、ChrgA 陽性、5-HT 陰性の小胞は FABP5 陰性だったことから、5-HT と ChrgA を含むコンパートメントが互いに融合するのに FABP5 との共役が重要であることが示唆された。次に、ChrgA を含む小胞形成と FABP5 及び FA の関与を検討するため、colon26 細胞に ChrgA を DsRed 融合タンパク質と、FABP5 またはその脂肪酸結合ドメイン変異体を GFP 融合タンパク質として強制発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。GFP 単独強制発現に比較して FABP5 発現下での小胞内の ChrgA-DsRed シグナルがやや増強する傾向が観察され、FABP5 脂肪酸結合ドメイン変異体（C120A_C127A: Cys-120→Ala, Cys-127→Ala）発現下では、ChrgA-DsRed シグナル陽性であるのに、ChrgA で充填されない小胞が観察された。以上のことから、FABP5-FA 複合体による ChrgA 小胞形成調節の可能性が示唆された。（COI:No）

14　α型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損マウスでは高脂肪食負荷による脂肪肝が減弱する

芳賀　博凱[1]、中野　知之[1]、諏佐　真治[2]、後藤　薫[1]
1.山形大・医・第二解剖、2.山形大・医・看護学

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、ジアシルグリセロール (DG) をリン酸化しフォスファチジン酸 (PA) に変換する酵素である。DGK は DG や PA によるプロテインキナーゼ C の活性化を介してインスリン感受性に影響を及ぼすことが報告されているが、脂質負荷時の肝臓への影響ついては不明な点が多い。本研究では、DGKα欠損モデルを使用し、肝臓の脂質代謝への関与を解析した。野生型マウスと DGKα-KO マウスを高脂肪食 (HFD) で 180 日給餌すると、DGKα-KO マウスでは、野生型と比較して 90 日以降で体重増加が抑制された。さらに、180 日時点で肝臓の相対重量が野生型と比較して低下していた。組織学的解析では、DGKα-KO マウスの肝臓で脂質蓄積の著明な減弱を認めた。ウェスタンブロット解析では、DGKα-KO マウスにおいて Perilipin 5 の発現低下を認め、脂肪分解系酵素の発現には明らかな変化を認めなった。

本研究の結果、DGKα-KO マウスでは高脂肪食誘発性の脂肪肝が抑制されることが示唆された。Perilipin 5 は、脂肪滴へのリパーゼ作用を抑制することが報告されている。このことから、DGKα-KO マウスにおける Perilipin 5 発現低下は脂肪分解を亢進する可能性が考えられ、今後詳細な分子メカニズムを検討予定である。(COI:No)

15　DGKε欠損マウスに認められる体温産生障害とβ3 アドレナリン受容体の局在変化

○中野　知之，後藤　薫、山形大・医・第二解剖

齧歯目動物においては、褐色脂肪組織が体温産生の中心的な役割を担う。体温産生シグナルは、交感神経を介して褐色脂肪細胞に伝達され、貯蔵脂質の分解により生じる脂肪酸が、熱産生責任分子 UCP1 を活性化する。我々の研究室では、ジアシルグリセロール（DG）のリン酸化酵素である DG キナーゼ（DGK）の解析を行っており、これまでに、ε型 DGK 遺伝子欠損（DGKε-KO）マウスを高脂肪食で給餌すると、褐色脂肪の機能不全が生じる可能性を報告した。本研究では、DGKε-KO マウスを寒冷環境で飼育し、表現型変化とそのメカニズムを解析した。6℃で 2 週間飼育する寒冷モデルにおいて、DGKε-KO マウスの直腸温および褐色脂肪領域の体表温度は低下した。この時、体温調節中枢である視床下部視索前野では cFOS 陽性細胞が増加し、褐色脂肪では交感神経マーカーTyrosine Hydroxylase の発現が増強していた。交感神経シグナルを受け取るβ3 アドレナリン受容体（β3AR）の細胞内局在を解析すると、野生型マウスでは形質膜上に認められたが、DGKε-KO マウスでは細胞質内に局在が検出された。この時、DGKε-KO マウスでは血清インスリンレベルが亢進していたことから、マウスから摘出した褐色脂肪を用いて、インスリン存在下で器官培養を行った結果、DGKε欠損では、インスリンによるβ3AR の細胞質移行が促進された。本研究の結果、DGKε欠損褐色脂肪では、インスリンによるβ3AR の細胞質への取り込みが促進され、DGKε-KO マウスではさらに、寒冷に応答してインスリン分泌が増加することから、交感神経シグナルが遮断され、体温産生が妨げられることが示唆された。

16　DGKζ欠損細胞はグルコース飢餓による細胞死に対して抵抗性を示す

鈴木亜也子，中野知之，後藤　薫
山形大・医・解剖学第二

本研究ではグルコース欠乏条件下において DGKζ欠損が細胞内応答に及ぼす影響を調べた。グルコース飢餓条件で 24 時間培養すると野生型のマウス胎児線維芽細胞（MEF）においてアポトーシス様の形態的変化が観察されたのに対し、DGKζ欠損 MEF ではそのような変化は見られなかった。また、DGKζ欠損 MEF ではグルコース除去 24 時間後におけるアポトーシス誘導因子 (AIF) と切断型カスパーゼ 3 の発現が低下していた。免疫細胞化学的解析では、野生型 MEF で、核が異常に凝縮し、AIF 免疫反応が核に凝集している細胞が見られた。また、切断型カスパーゼ 3 陽性細胞は DGKζ欠損 MEF では有意に少なかった。これらの結果から、DGKζ欠損 MEF はエネルギー飢餓によるストレスに抵抗性を持つことが示唆された。このメカニズムを明らかにするために、グルコースの細胞内取り込みと、細胞内 ATP レベルの測定を行ったところ、両者ともに DGKζ欠損 MEF は野性型 MEF に比べて高値を示した。また、通常条件での NAD+レベルは DGKζ欠損 MEF で低下していた。

これらの結果から、DGKζ欠損はグルコースの取り込みと ATP 産生を促進することで細胞のエネルギー状態を高め、AIF や切断型カスパーゼ 3 などのアポトーシスを引き起こすシグナルを弱めることで、グルコース飢餓によるストレスへの抵抗性につながることが示唆された。(COI:No)

17 脂肪滴の DNA 損傷修復における意義

○大﨑雄樹[1]，酒井恒[2]，和田亘弘[1]，今井則博[3]
札幌医大・医・細胞組織学[1]，神戸大・バイオシグナル総研[2]，名古屋大・院医・消化器内科学[3]

脂肪滴は小胞体から形成され多様な生理機能と疾患に関与するオルガネラであり、中性脂質をリン脂質一重膜が覆う。一方脂肪滴は核内にも形成され、我々は以前に、肝由来細胞と非肝細胞では異なる核内脂肪滴形成機構が存在することを示した。核内脂肪滴は肝由来細胞ではリン脂質合成と小胞体ストレス軽減に、グリオーマ細胞では遺伝子発現調節に関与するが、他の機能は不明である。

DNA 鎖間架橋修復機構に関わる FANC タンパク質群の遺伝子変異は Fanconi 貧血の原因となる。我々は骨肉腫由来細胞株 U2OS において、FANCD2 が核内脂肪滴に一部集積することを見出した。本研究では脂肪滴の DNA 損傷修復への関与について解析した。細胞全体の脂肪滴形成を中性脂質合成阻害剤により抑制すると、DNA 損傷誘導剤 Cisplatin 処理時の DNA 損傷箇所が増加した。またこの時、FANCD2 の顆粒形成（活性型複合体を意味）が低下した。一方、既知の核内脂肪滴形成促進操作（小胞体分子 Seipin の発現抑制）により、上記の現象は逆転した。FANCD2 が核内 LD 集積する細胞では、DNA 損傷箇所が減少した。Fanconi 貧血罹患患者の肝細胞では核内脂肪滴が増加していることが、肝生検試料の電子顕微鏡観察により明らかとなった。これらから脂肪滴の DNA 損傷修復系への関与が示唆された。

18 神経炎病態下での KLK8 によるグリア細胞応答の調節

田中佑典、扇谷昌宏、古部瑛莉子、吉田成孝
旭川医大・医・機能形態

【背景】うつ病の患者数は年々増加傾向にあるが、その病態の解明が不十分であることが効果的な治療法の開発を妨げている。神経炎に伴う炎症性ストレスはうつ病の重要な病態基盤の一つであり、特にグリア細胞はサイトカインの産生や神経機能調節を介して、うつ病の発症・進行に関与する。近年臨床研究により、末梢血中の組織カリクレイン 8（KLK8）mRNA 発現と、うつ病の進行との関連が報告されている。KLK8 は全身の中でも特に中枢神経系に高発現するが、うつ病における脳内 KLK8 の機能的意義については不明である。我々はこれまでマウスのグリア細胞が KLK8 を発現することを明らかにしてきた。そこで本研究では、炎症性ストレス負荷を伴う神経炎病態下において、グリア細胞で発現する KLK8 がそれらの細胞機能に与える影響を解析した。【結果・考察】LPS 投与により野生型 /KLK8 ノックアウト(KO)マウスに神経炎を誘導し、脳からグリア細胞を分離し、各グリア細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現を解析した。KLK8 KO マウスのグリア細胞は野生型マウスよりも、炎症性サイトカイン遺伝子発現量が高く、抗炎症性サイトカイン遺伝子発現量が低値であった。さらに海馬を組織学的に解析したところ、KLK8 KO マウスのミクログリアは野生型マウスよりも大きいことが明らかになった。以上のことより、神経炎病態下において KLK8 はグリア細胞のサイトカイン産生能の調節、およびミクログリアの形態に影響を与えることが明らかとなった。

19 糖尿病発症初期における脳室周囲器官の血管周囲腔構造変化と免疫細胞局在の超微解析

古部瑛莉子[1]、扇谷昌宏[1]、田中佑典[1]、吉田成孝[1]
旭川医大・医・解剖・機能形態[1]

脳室周囲器官（CVOs）は血液脳関門を欠き、発達した血管周囲腔（PVS）を介して末梢からの血中シグナルを中枢神経系へ伝達する神経血管-免疫インターフェースとしての役割を担っている。本研究では、1 型糖尿病モデルを用いて、糖尿病発症初期における CVOs の一つである最後野(AP)の血管構造および免疫細胞局在の変化について蛍光免疫染色による観察および透過型電子顕微鏡を用いた超微形態学的解析を行った。糖尿病モデルは C57BL/6J 雄マウスにストレプトゾトシン（STZ）を投与し、空腹時血糖値が 250mg/dL を超えた個体を STZ 投与後 7 日目に灌流固定した。その結果、糖尿病発症初期の STZ 群ではコントロール群と比較して AP の PVS が狭小化し、さらに PVS 構造が複雑化していることが明らかとなった。一方で、血液脳関門を有する孤束核領域では、STZ 群においても血管構造に有意な変化は認められなかった。また、免疫細胞の局在パターンにも変化の兆候が認められた。これらの所見は、糖尿病発症初期段階において AP の血管周囲腔の構造変化が生じていることを示し、神経血管-免疫インターフェースの早期障害が糖尿病性神経血管合併症の初発病態として重要である可能性を示めし、糖尿病による中枢神経障害のメカニズム解明がさらに進展すると期待される。(COI:No)

20 連続切片 SEM 法を利用した脊髄神経節神経細胞におけるゴルジ装置の 3 次元再構築解析

○森永涼介[1]、久住聡[2]、甲賀大輔[1]
旭川医科大学解剖学講座顕微解剖分野[1]
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座形態科学分野[2]

【背景・目的】ゴルジ装置はタンパク質修飾や分泌顆粒への選別を担う細胞小器官であり、その形態は光学・電子顕微鏡で解析されてきた。近年、連続超薄切片を用いた電子顕微鏡観察により、成熟した哺乳類細胞ではゴルジ装置が連続した巨大構造を形成することが報告されている。一方、我々は脊髄神経節神経細胞では連続構造をとらない可能性を示唆してきた。本研究では、連続切片 SEM 法によりこれを検証した。【材料・方法】灌流固定を行ったラット後根神経節から樹脂包埋標本を作製し、60 nm 厚の連続超薄切片を作製した。反射電子（BSE）像を取得後、ゴルジ装置をセグメンテーションし三次元再構築した。【結果】神経細胞は大・中・小に分類された。BSE 像の観察では、大型細胞では細胞全体に紐状のゴルジ装置が散在し、中型では核周囲に強く弯曲した構造、小型では分岐を伴う細長い紐状構造が観察された。三次元再構築の結果、いずれのサイズでも複数の独立したゴルジ装置が存在することが明らかとなった。大型では多数の小さな紐状構造、中型では円板状構造が紐状に連結する様子、小型では分岐を伴う紐状構造が確認された。【考察】肝細胞では複数のゴルジ装置が内分泌と胆汁分泌の二経路に対応すると考えられているが、神経節細胞にはそのような機能分担は認められない。それにもかかわらず複数の独立構造を有する理由は不明であり、今後さらなる検討が必要である。