

講座，研究部および研究室の主要研究業績

〈医学科〉

講座（特設診療科を含む）

基礎医学

解剖学講座第1

教授：河合 良訓 神経解剖学

研究概要

I. 神経系の研究

中枢神経系の正常機能や疾患を理解するためには、個々の機能を実現している神経回路の構成とその作動原理を解明することが重要であるという観点に立って研究を推進している。

延髄孤束核の局所神経ネットワークの基本構成を明らかにするために、パッチクランプ法と細胞内染色法やその他の手法を用いて定量定性的ニューロンタイプ解析を行い機能との関連を解析している。これまでに以下のことを明らかにしてきた。

① 回路形成ニューロンの形態学的化学的特徴の定量定量化

神経突起の分岐や広がり、細胞サイズ、機能分子の発現プロフィールの分析結果から、孤束核を構成する神経細胞は、細胞体のサイズ（細胞体面積 $150 \mu\text{m}^2$ を境界に）によって小型と中-大型の少なくとも二つのグループから構成されることがわかった。細胞体のサイズの違いは、軸索側枝の広がりも反映していた。小型ニューロンの軸索側枝は孤束核内に広く分布し、他の孤束核ニューロンと広範にシナプスを形成することを示唆していた（平均軸索分岐数 31.5）。一方、中-大型ニューロンは、軸索側枝の発達が悪く（平均軸索分岐数 1.04）、主に孤束核外に投射する投射型グルタミン酸ニューロンであり、その細胞体は内側亜核に局在する。小型ニューロンは、さらに GABA 細胞とグルタミン酸細胞に分けられ、前者の軸索は孤束核内のみにとどまる。細胞体の局在は前者が主に交連亜核、内側亜核に偏在するのに対して、後者は核内に一様に分布し、その軸索には孤束核内に分布するもの以外に核外に投射する主軸索が存在する。

② 興奮性・抑制性シナプス入力パターンの特徴とネットワーク構成

シナプス後電流を解析すると、成熟動物の小型ニューロンと中-大型ニューロンの間では、グルタミン酸性（興奮性）シナプス後電流と GABA 性（抑制性）シナプス後電流の出現頻度の相対比率に大きな差異が認められた。すなわち、興奮性シナプス入力の比率は小型ニューロンの約 96% に対し、中-大型ニューロンでは約 31% であった。以上、形態学的電気生理学的所見を総合すると孤束核内の局所神経ネットワークの極めて特徴的な構成が明らかとなってきた。すなわち、グルタミン酸性小型ニューロンは、その軸索側枝でお互いにシナプス結合して再帰性（共鳴性）興奮回路を形成し、強い持続性の興奮性シナプス活動を維持している。これらのニューロンの投射性軸索は内臓知覚伝導路の一部を構成する。この回路で生成される興奮性シナプス活動は、GABA ニューロンを介して、反転した形で中-大型のニューロンに伝えられる。中-大型ニューロンはこのように tonic な抑制性バックグラウンドシナプス活動を有し、圧受容・化学受容反射等の末梢知覚入力を核外（腹外側延髄や視床下部等）に統合中継し、反射回路の一部を構成していることがわかった。このように、成獣の孤束核では興奮性および抑制性の局所神経回路が極めて分化した形で機能していることがわかった。

③ 局所回路の生後分化

成獣でみられる分化した局所神経ネットワークは、生後発達の過程で胎生型から成獣型に急速に変化することによって構築されてくることがわかった。すなわち、成獣ラットにおいては、自発性の興奮性（グルタミン酸性）もしくは抑制性（GABA 性）シナプス活動のうちどちらか一方の際立った優位性が、ニューロンタイプの違いに応じて観察される。一方、生直後（生後 1-3 日）の孤束核ニューロンでは、ほとんど全ての単一細胞から、ニューロンタイプの違いに関係なく、興奮性シナプス後電流と抑制性シ

ナプス後電流の双方がほぼ一定の比率(興奮性比率: 68~75%)で観察されることが確認された。すなわち、生直後の孤束核ニューロンは、その細胞の形態と関係なくシナプス結合を形成していること(未分化な局所ネットワークの存在)が示唆された。また、このような胎生型から成熟型への神経ネットワークの移行が生後6-7日に急速に起こることもわかった。この時期は、圧受容反射や化学受容反射が機能し始める時期と一致し、自律神経機能に関する反射機能の発現には、局所神経ネットワークの成熟がともなうことを示唆している。われわれは、この時期を内臓知覚系における臨界期と見なし、臨界期前後に起こる回路構成変化の様々な局面の解析を進めている。

④ 延髄孤束核において生後1週を境にして急速なシナプス結合の再編成には必要なシナプス結合の強化と不必要なシナプス結合の除去が含まれていると考えられる。そこで次の3つの観点から臨界期における回路再編成の解析を試みている。(1) 臨界期に一致した遺伝子発現調節: 生後発達に伴うシナプス関連機能分子の遺伝子発現の網羅的検索。速いGABA性シナプスに直接関与するA型GABA受容体サブユニットやNMDA受容体サブユニット等の遺伝子発現を調べた結果、臨界期に一致した発現変化は認められなかった。このことは回路再編成が遺伝プログラムによって規定されるのではなく、神経活動に依存した現象であることを示唆していた。(2) シナプス除去の電子顕微鏡学的解析。臨界期に一致した軸索細胞体型のGABA性シナプス数の減少、ニューロン細胞体近傍での孤児性GABA性ブトンの出現、アストロ細胞突起によるニューロン細胞体の被覆等の所見を得た。(3) 活動依存的シナプス再編成。今後、(3)の可能性に関して解析を進める予定である。

II. グリア系の研究

神経回路の形成や再編成には、神経細胞だけでなくグリア細胞も積極的に関与する可能性が示唆されている。われわれはその可能性を探るために、神経回路の発達形成や再編成にともなう、グリア細胞、特にアストロ細胞の突起の形態的变化に注目して研究を進めている。回路形成にともなうグリア細胞のさまざまな物質の動態変化とともにシナプス構造との関連について調べている。

III. 実習遺体や出土標本を利用した研究

実習遺体、各種作成標本、出土標本を用いて各種

計測を行い、変異の意義や計測値の時間的変遷の意義を検討している。

「点検・評価」

1. コース基礎医科学Iのユニット「細胞から個体へ」の講義・実習、コース基礎医科学IIのユニット「神経系」「生殖系」講義および「形態系実習」、症候学演習の医学科カリキュラムを分担した。また、看護学科、看護専門学校における「解剖生理学」の講義も担当している。解剖学実習では、実習時間の短縮に伴う実習指針の改定、手順の簡略化を検討し、その成果が得られつつある。

2. 講座の研究活動を活性化するために、実験室・実験機器等の大幅な整備拡張を行ってきており、ようやく実験データをまとめる段階に入ってきている。その研究成果を公表して行く時期にある。

反省: Peer-reviewを経た、国際競争力のある原著論文・研究成果を発信し続ける必要がある。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Yoshioka M, Tashiro Y, Inoue K, Kawai Y. Postnatal development of GABAergic axon terminals in the rat nucleus of tractus solitarius. *Brain Res* 2006; 1107: 111-20.
- 2) Yoshioka M, Okada T, Inoue K, Kawai Y. Pattern differentiation of excitatory and inhibitory synaptic inputs on distinct neuronal types in the rat caudal nucleus of the tractus solitarius. *Neurosci Res* 2006; 55: 300-15.
- 3) Okada T, Yoshioka Y, Inoue K, Kawai Y. Local axonal arborization patterns of distinct neuronal types in the caudal nucleus of the tractus solitarius. *Brain Res* 2006; 1083: 134-44.

III. 学会発表

- 1) 太城康良, 河合良訓. 発達期ラット孤束核の局所神経回路におけるアストロサイトの役割. 第112回日本解剖学会全国学術集会. 大阪, 3月. [解剖誌 2007; 82 (Suppl): 193]
- 2) 岡田知明, 河合良訓. 発達期ラット孤束核におけるGABA受容体サブユニットの遺伝子発現. 第112回日本解剖学会全国学術集会. 大阪, 3月. [解剖誌 2007; 82 (Suppl): 220]
- 3) Tashiro Y, Yoshioka M, Kawai Y. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat nucleus of the tractus solitarius (NTS) during postnatal development. 第29回神経科学大会, 京

都, 7月. [Neurosci Res 2006; 55(Suppl 1): S114]

V. その他

- 1) 太城安良, 河合良訓. 発達期孤束核におけるアストロサイトの発現. 第8回 ORIGIN 神経科学研究会. 松山, 9月.
- 2) 岡田知明, 河合良訓. 発達期の孤束核における膜タンパク質の遺伝子発現変化. 第8回 ORIGIN 神経科学研究会. 松山, 9月.

解剖学講座第2

教授: 石川 博	ES細胞に関する研究・新しい抗癌剤感受性試験法の開発
助教授: 橋本 尚詞	形態学・細胞生物学
講師: 立花 利公	下垂体細胞学
講師: 島田 貴 (兼任)	血液学

研究概要

I. ヒト羊膜由来細胞の各種細胞への分化誘導

臓器移植は各種疾病に対する究極の治療選択といえる。しかしドナー不足の問題は一向に解決されず、再生医療により作成された素材による細胞移植や人工臓器の研究は一層盛んになってきた。これまで我々はラット ES 細胞を作製し、肝、歯胚、臍細胞などへと分化させ各種移植実験に成功している。

本年度は、生命倫理問題が少ないヒト羊膜をインフォームドコンセントを施行した上で提供してもらい、羊膜細胞を分離して同様の方法で各種細胞への分化誘導実験を行った。

1. 肝細胞の作成と肝不全ラットへの移植によるその機能評価

ヒト初期胚羊膜の初代単層培養細胞中に出現する小型球形細胞集団から細胞株 (HEAC 細胞と命名) を分離した。HEAC 細胞は angular で adhesive な細胞と小型球形で付着性の弱い細胞から構成されている。これらの細胞に embryotrophic factors (ETFs) を作用させて胚様体を形成させ、さらに三胚葉性の胚子様モンスターに生育させた。このモンスターから実体顕微鏡下に原始肝組織 (HEAC-L) を採取し、HEAC-L 細胞株を樹立した。HEAC-L 細胞は細胞内小器官が豊富で敷石状に増殖し、接触阻害と高い2倍体性を有し、長期間安定した phenotype を示した。HEAC-L 細胞株は肝構成細胞をすべて含み、albumin や IGF-1 産生等の肝機能を有していた。CCl₄ 誘発肝不全ラットの脾臓に HEAC-L 細胞を移植したところ、control に比べ約 85% の延命効果が認められ、血中のプロトロンビン時間値、アンモニア、ビリルビン値などが改善され肝代謝機能の存在が確認された。

2. レチノイン酸添加培養によるヒト羊膜細胞の神経系細胞への分化

ヒト初期胚羊膜を分散培養し、HEA-1 細胞株を樹立した。この細胞株は単層で増殖し長紡錘形細胞