

一般演題

1. 神経興奮を調節する特殊なアストロサイトサブタイプと TRPV4 チャンネル

水野 早紀, 石崎 泰樹, 柴崎 貢志
(群馬大院・医・分子細胞生物学)

我々は温度感受性 TRP チャンネルに属する TRPV4 (活性化温度閾値: 34°C以上) が海馬に高発現しており, 脳内温度を介して海馬神経細胞の興奮性を向上させていることを見いだしている (J. Neurosci 2007). 脳組織標本を詳しく解析したところ, 神経細胞の他, アストロサイトにも TRPV4 発現を認めた. 非常に興味深いことに, アストロサイトの中に, TRPV4 陽性と陰性の二種類の細胞が存在しており, TRPV4 陽性アストロサイトは約 20% 程度のマイナーなサブタイプを構成していた. この結果は, TRPV4 の発現を指標にアストロサイトのサブクラスを分類できる可能性を示唆している. さらに, TRPV4 陽性アストロサイトは TRPV4 の活性化に伴い, グリオトランスミッターを遊離し, 周りのアストロサイトに興奮を伝播していることを突き止めた (JBC 2014). このようなアストロサイトからの情報伝達物質の遊離は, アストロサイト TRPV4 の活性化→周囲のアストロサイトの興奮→神経細胞の興奮/抑制というカスケードが存在する可能性を強く示唆しており, 神経-グリアの機能連関を調べるのに TRPV4 が非常に有用なツールであることを強く示唆している.

アストロサイトにおける TRPV4 の局在や神経活動増加に伴うアストロサイト TRPV4 のダイナミックな局在変化などの最新データも交え, アストロサイトに発現する TRPV4 の特徴を紹介し, その生理学的意義を議論したい.

2. サイトメガロウイルス角膜内皮炎の *in vitro* 感染モデルの確立と感染様式の検討

細貝 真弓,^{1,2} 井上 照基,^{1,3} 島 伸行⁴
中谷 陽子,¹ 松島 千賀,¹ 秋山 英雄²
岸 章治,² 磯村 寛樹¹

- (1 群馬大院・医・分子予防医学)
- (2 群馬大医・附属病院・眼科)
- (3 群馬大院・医・病態制御内科学)
- (4 東京大学大学院医学系研究科眼科学)

【目的と意義】 角膜内皮炎は, 角膜の透明性維持に必要な角膜内皮の炎症によって, 角膜の浮腫と混濁を生じる重症疾患である. 近年, ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) による角膜内皮炎が報告されているが, 病態の詳細は不明である. HCMV の感染様式には, ウイルス粒

子の産生が停止した潜伏感染と, ウイルス増殖に必要な遺伝子が発現しウイルス粒子が産生される溶解感染がある. そこで, 角膜内皮細胞での HCMV の感染様式を検討した. 【材料と方法】 ヒト角膜内皮細胞 (HCEC; human corneal endothelial cells) は研究用ヒト角膜から採取し培養した. ウイルス株は臨床分離株由来の TB40E を用いた. 溶解感染では最初に HCMV 前初期遺伝子が, 次にウイルス DNA 複製に必要な初期遺伝子が, 最後にウイルス粒子を構成する後期遺伝子が発現する. そこで HCEC と, HCMV が溶解感染することが知られているヒト胎児包皮繊維芽細胞 (HFF; human foreskin fibroblast) に TB40E を感染させ, 前初期, 初期, 及び後期ウイルス蛋白の発現を Western blot 法で, ウイルスゲノムの複製を real-time PCR 法で調べた. さらに, ウイルス DNA ポリメラーゼ付随因子 UL44 に対する抗体を用いて, 共焦点レーザー顕微鏡で HCMV 感染細胞核内に「ウイルス複製の場」が形成されるかどうかを観察した. 【結果】 HCEC, HFF ともに, HCMV 前初期, 初期, 及び後期蛋白の発現を認め, 前初期 IE86 と初期 UL44 蛋白は感染 2 日後の HCEC でより多く発現していた. 感染 3 日後にはウイルス複製の場の形成とウイルスゲノムの複製を認め, HCEC でより効率的であった. 【考察】 HCEC に HCMV が非常に効率よく溶解感染した. この結果より, HCMV 角膜内皮炎は角膜内皮細胞に HCMV が溶解感染することで引き起こされると考えられた.

3. 群馬大学における多光子励起レーザー顕微鏡の運用実例

高鶴 裕介,¹ 金子 涼輔,² 鯉淵 典之¹
(1 群馬大院・医・応用生理学)
(2 群馬大院・生物資源センター)

近年の光学技術の進歩により, フェムト秒パルスレーザーを発生することのできるチタンサファイアレーザーを搭載した多光子励起レーザー顕微鏡 (Multiphoton laser microscopy; MPLM) による研究が盛んになってきている. MPLM は, 生体に与えるダメージを最小限に抑えつつ, 深部の構造物を観察できるという特徴を持っている. このため特に, 遺伝子改変技術などを組み合わせた *in vivo* imaging に適しており, これまでわからなかった多くの生命現象がリアルタイムで観察できるようになってきている. 群馬大学においても昨年末にこの MPLM が共通機器として導入され, 今年度より正式運用となった. 群馬大学に導入された MPLM はオリンパス

社製の次世代機 (FVMPE-RS) と従来機 (FV1200) の複合機で、1 台のチタンサファイアレーザー (MaiTai Deep-See) を 2 台の顕微鏡で共有するシステムである。特に FVMPE-RS は、ミラーコーティングの改善などにより、従来観察が困難であった赤色蛍光色素の描出が容易に行えるなどの特徴を持っている。今回の発表では、群馬大学における MPLM の実際の運用例を紹介する。特に、遺伝子改変により赤色蛍光色素を発現するマウスの脳の *in vivo* imaging を紹介する予定である。

4. オリゴデンドロサイト前駆細胞の生存・増殖は脳微小血管内皮細胞由来のエクソソームにより促進される

倉知 正,¹ 飯島 圭哉,² 好本 裕平²

三國 雅彦,³ 石崎 泰樹¹

(1 群馬大院・医・分子細胞生物学)

(2 群馬大院・医・脳神経外科学)

(3 群馬大院・医・神経精神医学)

我々はこれまでに、ラット白質梗塞に対する脳微小血管内皮細胞 (MVECs) 移植の効果を検討し、MVECs 移植が梗塞巣の再髄鞘化を促進することを明らかにした。本研究では MVECs 移植による白質梗塞改善の分子機構を明らかにすることを目的として、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) に対する MVECs 由来エクソソーム (exosome) の効果を *in vitro* で検討した。成体 SD ラット大脳より調製した初代培養 MVECs の培養上清から、エクソソーム分離試薬を用いて MVECs 由来のエクソソームを抽出した。また、OPCs は幼若 SD ラット大脳皮質から immunopanning 法により O4 陽性細胞として分離し、PDGF 存在下に数日間培養した後に実験に用いた。MVECs 由来のエクソソームの OPCs への取り込みを確認するため、エクソソームを膜標識色素 PKH67 で標識して OPCs 培養系に添加した。添加後 2 時間以内に OPCs 内に色素標識された多数の顆粒状構造体が認められたことから、MVECs 由来のエクソソームが OPCs に容易に取り込まれることが明らかとなった。MVECs 由来エクソソームによる OPCs の生存・増殖調節を検討するため、エクソソームが OPCs の細胞死および BrdU 取り込み能に及ぼす効果を調べた。培養 3 日目において、エクソソーム存在下の OPCs の細胞死は対照群に比べて有意に抑制された。またエクソソーム存在下において多数の BrdU 陽性細胞が認められた。これらの結果は MVECs 由来のエクソソームが OPCs の生存ならびに増殖を促進している可能性を強く示唆した。MVECs 由来のエクソソームに含有される分子を解析することにより、MVECs 移植による白質梗塞改善の分子機構の詳細を明らかにすることができると考えられる。

5. 小脳のオリゴデンドロサイト分化における FGF-2 の作用

成瀬 雅衣, 柴崎 貢志, 横山 就一

倉知 正, 石崎 泰樹

(群馬大院・医・分子細胞生物学)

CD44 は細胞-細胞、細胞-細胞間基質を接着させる接着因子のひとつである。我々は、小脳に存在する LIF によってアストロサイトへ分化誘導できる前駆細胞が、CD44 を発現している事を報告した (Cai et al., 2012)。本研究では、小脳発達における CD44 陽性細胞の存在意義を検討するため、まず生後発達期のマウス小脳における CD44 の発現様式を解析した。生後発達期初期の小脳では、CD44 は GLAST 陽性である未分化なバグマングリアとアストロサイト前駆細胞に加えて、Sox2 陽性である神経幹細胞、Olig2 陽性であるオリゴデンドロサイト前駆細胞にも発現が観察された。生後 3 日齢の小脳から CD44 陽性細胞を FACS を用いて回収し neurosphere assay をおこなったところ、CD44 陽性細胞の一部が neurosphere を形成し、CD44 が神経幹/前駆細胞に発現している事が強く示唆された。次に、CD44 陽性細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を誘導する因子を探索した。その結果、FGF-2 と heparin を添加すると、CD44 陽性細胞は O4 陽性のオリゴデンドロサイトへ分化する事が明らかとなった。さらに、生後 3 日齢のマウス小脳のスライス培養に FGF-2 と heparin を添加すると、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖と分化が促進され、一方でアストロサイトの分化が遅延した。以上の結果より、FGF-2 は生後初期の小脳のオリゴデンドロサイト分化を制御する作用を持つ事が示唆され、また、小脳内に存在する CD44 陽性細胞がオリゴデンドロサイトへ分化する可能性が示された。