

安保雅博, 河合良訓. 股関節屈曲・外転・外旋肢位の制限因子の検討 遺体解剖による股関節深層外旋筋群の観察. 理学療法学 2009; 36 (Suppl. 2): 1224.

- 4) 荒川廣志, 郷田憲一, 吉村 昇, 炭山和毅, 貝瀬 満, 田尻久雄, 加藤孝邦, 河合良訓, 鈴木大輔, 藤宮峯子. 下咽頭下端の解剖学的検討 内視鏡像との対比. 耳鼻展望 2009; 52(2): 112-3.
- 5) 荒川廣志, 貝瀬 満, 郷田憲一, 吉村 昇, 炭山和毅, 倉持 章, 小林 剛, 田尻久雄, 河合良訓, 鈴木大輔, 藤宮峯子, 絹笠祐介. 食道胃摘出標本における Gastroesophageal flap valve (GEFV) の解剖学的検討. Gastroenterol Endosc 2009; 51 (Suppl. 1): 906.

### Ⅲ. 学会発表

- 1) 根岸義勝, 河合良訓. 内臓知覚核における亜核領域特異的微小回路生後再編成. 第32回日本神経科学大会. 名古屋, 9月.

### V. その他

- 1) 河合良訓監修. 3D 踊る肉単. 東京: エヌ・ティー・エス, 2009.

## 解剖学講座 組織・発生

教授: 岡部 正隆	解剖学・発生学
教授: 橋本 尚詞	形態学・細胞生物学
講師: 立花 利公	解剖学・微細形態学
講師: 鈴木 英明	先天異常
講師: 重谷 安代	神経発生学・進化発生学
助教: 辰巳 徳史	発生学・分子生物学

### 教育・研究概要

#### I. ポリプテルスのゲノム基盤情報の構築

水棲脊椎動物から陸棲脊椎動物が進化した際に、その形態の違いがどのようなゲノム機能の変化によってもたらされたのかを明らかにするため、原始的な条鰭類魚類であるポリプテルスを用いた形態学的、ゲノム科学的研究を行っている。本年度は、神経胚期から孵化直後の仔魚から抽出した mRNA を用いて EST 解析を行った。cDNA ライブラリーは兵庫県立大学の餅井 真博士との共同研究、シーケンシングは国立遺伝学研究所で行った。結果として、5'EST を 52,441 リード、3'EST を 47,232 リード完了し、約 10 万のシーケンスを得た。現在、そのデータの解析を行っている。

#### II. マウス GCM1 および GCM2 タンパク質に対する特異的抗体の作成

本年度より、各種脊椎動物の棲息環境中のカルシウムに着目し、進化の過程で環境が器官の発生機構や生理機能にどのような影響を与えたのかを遺伝子ネットワークの構造の違いとして明らかにする研究を開始した。血中カルシウム濃度調節を行う多様な器官の発生とその生理機能を司る転写制御因子 GCM を中心に、マウスにおける遺伝子ネットワークを明らかにするため、本年度はマウス GCM1 および GCM2 タンパク質にそれぞれ特異的でかつクロマチン免疫沈降反応に用いることが可能なウサギの抗体を作製した。また Gcm1 および Gcm2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作製するためのターゲッティングベクターの構築を開始した。抗体の作製は本学 DNA 医学研究所分子免疫学研究部との共同で行った。

#### III. 後肢運動失調マウスにおける鉄代謝

我々の開発した常染色体劣性遺伝子による進行性

後肢運動失調マウスは、小脳髄質や脊髄における空胞変性を特徴としており、加齢に伴い症状が重篤化する。このマウスは脊髄小脳変性症の一種で、異常な Frataxin 遺伝子によるミトコンドリアの鉄代謝障害であるフリードライヒ失調症のモデルマウスではないかと疑い、検討を進めてきた。そこで、各種臓器の鉄沈着を病理組織学的に解析し、鉄代謝に関連する Frataxin と Ceruloplasmin のリアルタイム PCR 解析を行った。その結果、中枢神経系や心筋、骨格筋には鉄は沈着していなかったが、腎臓と肝臓に鉄が沈着しており、それらは加齢によって増加し、雄よりも雌の方が重度であった。腎臓の鉄沈着部位は近位尿管上皮細胞の管腔側に限局しており、ミトコンドリア内には認められなかった。肝臓と腎臓の Frataxin 発現量は、共に加齢に伴って減少したが、異常雌の肝臓では、週齢に関わらず、正常よりも有意に多かった。一方、Ceruloplasmin の発現量は腎臓は肝臓の 1/100 程度であったが、両臓器において異常雌で有意な増加が見られ、加齢に伴って腎臓では増加していた。これらのことから、本マウスは、フリードライヒ失調症のモデルではないが、新たな鉄代謝異常疾患ではないかと考えられる。

#### Ⅳ. 新しい慢性疾患の細胞腫特異的病態解析法の開発と Fabry 病モデルマウスへの応用

ヒト細胞が持つゲノム DNA はすべての細胞で共通であると考えられているが、個々の細胞はその細胞を取り巻く環境にあった遺伝子発現がおこなわれるように、エピジェネティック機構を用いて遺伝プログラムを書き換える。このことは、細胞種特異的にエピゲノム解析を行うことにより、遺伝-環境相互作用の結果生じた細胞レベルの適応状態が解析可能であることを示唆している。そこで、慢性疾患の病態をより深く理解することを目的として、慢性疾患モデルマウスを用いて細胞種特異的にエピゲノムを網羅的に解析する方法を考案した。遺伝子発現活性化領域に特異的に局在するヒストン H3 バリエーションとして、H3.3 が知られている。本研究ではこの H3.3 に細胞種特異的にタグをノックイン可能なマウスを作製し、疾患モデルマウスおよび細胞種特異的に loxP を発現するマウスと交配し、その後タグに対する特異的抗体を用い Chip-on-chip 法や Chip-seq 法により細胞種特異的に転写活性化領域を網羅的に解析する。この方法を Fabry 病の緩徐に進行する病態を解析するのに応用したいと考えている。

本年度は細胞種特異的タグ交換マウス作製のために、組換えベクターを作製した。

#### Ⅴ. 脊椎動物の三叉神経プラコードと神経節形成の分子的機構

三叉神経は顔面の知覚と顎の咀嚼運動を司り、脊椎動物全般の頭部において最も重要な働きを果たす。三叉神経の発生は、ニワトリ胚で最も良く解析されており、感覚神経プラコードと神経堤細胞によって構成されることが知られているものの、分子の実体はあまり明らかにされていない。そこで私は、1) 既知 FGF8 シグナルの胚体内外における役割の検証と、2) 神経胚頭部外胚葉由来の cDNA ライブラリーを用いた未知関連遺伝子の同定と解析を試みた。三叉神経プラコードは頭部外胚葉上に形成されるが、それに先立つ前プラコード外胚葉 (PPE) の存在が最近報告された。この PPE を誘導する新規培養法を用いて、FGF シグナルの検討を行った。既に頭部外胚葉上で FGF8 経路を促進すると三叉神経プラコード分子マーカーの *Brn3a* や *Pax3* の発現が抑制され、また一方で FGF8 の産生源である中脳峽部の除去を行うと促進されることから、頭部外胚葉上では FGF8 シグナルが三叉神経プラコード形成に負に働くことが考えられた。しかし PPE 形成時には別の機構が存在すると考えられ、またプラコード特異性も決定されなければならない。cDNA クローンには形態形成や遺伝病の原因遺伝子、その共働遺伝子などが同定されており、現在発現解析とゼブラフィッシュ胚を用いた機能スクリーニングを実施している。

#### Ⅵ. 横隔膜形成機構の解明とその獲得機構の研究

横隔膜は哺乳類が特異的に獲得した胸腔と腹腔を隔てる筋肉性の膜組織である。発生途中の異常は先天性横隔膜ヘルニア [congenital diaphragmatic hernia (CDH)] を引き起こすとされているが、その機構はまだ明らかとなっていない。そこで、我々は筋肉に分化する体節細胞で発現する *Pax3* 遺伝子を GFP で蛍光標識し、発生期からどのように筋芽細胞が移動して横隔膜に達するかの詳細な観察を行った。その結果、GFP 標識された細胞は E10.5 のから横中隔の両側縁に認められ、E14.5 までに横隔膜全体に広がることが明らかとなった。また、横隔神経の領域である 3-5 体節が上方より横隔膜領域に移動している様子が観察された。これらの結果から、横隔膜の形成に関与する筋芽細胞がいつ、どのような領域から移動してくるのかが明らかとなった。これらの機構は哺乳類が独自に進化して獲得した機構であることから、他の動物種における体節細胞の動向を調べることで、筋芽細胞の移動機構を知

る手がかりが得られると考えられる。

#### 「点検・評価」

昨年に引き続き医学科では、コース基礎医科学Ⅰのユニット「細胞から個体へ」の講義および実習と、コース基礎医科学Ⅱの各ユニットの講義とユニット「形態系実習」、コース臨床基礎医科学Ⅰのユニット「症候学演習」、研究室配属の教育を担当した。今年度から、医学部看護学科の解剖生理学Ⅰ、慈恵看護専門学校（西新橋）の解剖生理学、それぞれの講義と見学解剖実習のすべてを当研究室の教員が担当することとなった。

本年は、解剖学講座の研究室ならびに実習室のホルマリン対策工事を行ったが、特に当研究室では、神経病理学研究室と共同利用する組織標本作製室の立ち上げに寄与した。解剖学講座研究室1（旧組織学研究室）を大幅改装し、ホルマリン対策ならびに有機溶媒対策を施し、部屋の名称を「大学本館共用標本作製室」とした。共用標本作製室は、ホルマリン液浸標本の保管、ホルマリン浸漬固定した標本の切出し、小動物の環流固定、自動組織包埋装置による組織の脱水包埋、組織切片の脱パラフィン、組織染色後の脱水・透徹など、ホルマリンや、キシレン・クロロホルムなどの有機溶媒への暴露の恐れがある作業を安全に行うための施設であると同時に、これに密接に関連する簡単な実験が行えるようになっている。

### 研究業績

#### I. 原著論文

- Amemiya CT, Powers TP, Prohaska SJ, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Miyake T, Schoenborn MA, Myers RM, Ruddle FH, Stadler PF. Complete HOX cluster characterization of the coelacanth provides further evidence for slow evolution of its genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(8): 3622-7.
- Hiramatsu M, Iwashita M, Inagaki T, Matsudaira H, Hirano J, Odaka M, Nakanishi K, Okabe M, Morikawa T. Anomalous systemic arterial supply to separate lingular and basal segments of the lung: an anatomic consideration. *Ann Thorac Surg* 2009; 88(4): 1358-60.
- Hama T, Yuza Y, Saito Y, O-uchi J, Kondo S, Okabe M, Yamada H, Kato T, Moriyama H, Kurihara S, Urashima M. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncologist* 2009; 14(9): 900-8.
- Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. Whole-mount in situ hybridization of bichir (*Polypterus*) embryos. *Cold Spring Harb Protoc* 2009; 5: pdb. prot 5158.
- Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. The genus *Polypterus* (bichirs): a fish group diverged at the stem of ray-finned fishes (Actinopterygii). *Cold Spring Harb Protoc* 2009; 5: pdb. emo 117.
- Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M. Integration of human mesenchymal stem cells into the Wolffian duct in chicken embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385(3): 330-5.
- Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. Microinjection of bichir (*Polypterus*) embryos. *Cold Spring Harb Protoc* 2009; 5: pdb. prot 5157.

#### III. 学会発表

- 岡部正隆. 肺の進化的起源について考えてみる～進化発生学的アプローチ～. 第37回 Slee. Apneaカンファレンス. 東京, 12月.
- Okabe M. Transistion from aquatic to terrestrial life and evolution of the vertebrate pharynx. The 3rd International Symposium of the Biodiversity and Evolution Global COE Project "Adaptation to Land". Kyoto, July.
- Okabe M. Transistion from aquatic to terrestrial life and evolution of the vertebrate pharynx. The 11th Oxford Conference: On Modelling and Control of Breathing-New Frontiers in Respiratory Control. Nara, July.
- Okabe M, Agata K (Kyoto Univ.). Evolution and development. 第36回国際生理学会世界大会. 京都, 7月.
- 岡部正隆. 脊椎動物の上陸と咽頭の形態進化. 第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 大津, 9月.
- Tatsumi N, Okabe M. Comparative developmental anatomy of the diaphragm in mouse and chick embryo (マウス胚とニワトリ胚を用いた横隔膜発生と比較解析). 日本発生生物学会第42回大会. 新潟, 5月.
- Murata Y<sup>1)</sup>, Tamura M<sup>1)</sup>, Nakatani Y<sup>1)</sup>, Aita Y<sup>1)</sup>, Fujimura K<sup>1, 2)</sup>, Murakami Y (Ehime Univ.), Okabe M, Okada N<sup>1)</sup>, Tanaka M<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Inst. of Technol., <sup>2</sup>Univ. of Maryland). Allometric growth of trunk-tail leads to the rostral shift of the pelvic fin in teleost fishes (硬骨魚類の多様化戦略-変化する腹鰭の位置設定機構). 日本発生生物学会第42回大会. 新潟, 5月.
- 庄野孝範, 岡部正隆. ゼブラフィッシュにおける体表塩類細胞の進化的獲得機構. 第115回日本解剖学会

- 総会・全国学術集会. 盛岡, 3月.
- 9) Shono T, Noda A, Miyake T, Okabe M. An acquisition of a novel calcium-regulating organ of chloride cells in the skin of zebrafish during evolution. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
  - 10) Shono T, Noda A, Miyake T, Okabe M. An acquisition of a novel calcium-regulating organ of chloride cells in the skin of higher teleosts during. 16th International Society of Developmental Biologists Congress. Edinburgh, Sept.
  - 11) Shono T, Noda A, Miyake T, Okabe M. Acquisition of novel calcium regulating organ during vertebrate evolution. 第36回国際生理学会世界大会. 京都, 7月.
  - 12) Shono T, Noda A, Miyake T, Okabe. An acquisition of a novel calcium-regulating organ of chloride cells in the skin of higher teleosts during. 日本発生生物学会第42回大会. 新潟, 5月.
  - 13) 嶋田耕育, 岡部正隆, 佐々木敬, 藤島近傍 Schwann細胞の発生源の検討. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会. 盛岡, 3月.
  - 14) 重谷安代. ヘテロトピーと顎の進化発生学. 東京大学海洋研究所共同利用シンポジウム: 水棲生物の異時性に関する研究. 現状の把握と今後の展望. 東京, 11月.
  - 15) Tatsumi N, Okabe M. An approach for analysis of acquisition mechanism of diaphragm. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
  - 16) 辰巳徳史, 岡部正隆. 横隔膜発生に関連した組織群を特定するためのマーカー遺伝子解析. 第27回日本ヒト細胞学会学術集会. 東京, 8月.
  - 17) Tatsumi N, Okabe M. Comparison of diaphragm development between mouse and chicken embryo. 16th International Society of Developmental Biologists Congress. Edinburgh, Sept. [Mech Dev 2009; 126: S258]
  - 18) 橋本尚詞, 石川 博(日歯大), 日下部守昭(東大). 幹細胞移植実験のための細胞起源同定法. 第27回日本ヒト細胞学会総会. 東京, 8月.
  - 19) Kusakabe M (Univ. of Tokyo), Inoue J (Matrix Cell Res. Inst.), Ishikawa H (Nippon Dent. Univ.), Hashimoto H. The synergism of a combination therapy with anti-tenascin-C antibody and anti-cancer drugs on ovarian cancer. 第68回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.
  - 20) Kusakabe M (Univ. of Tokyo), Tachibana T, Tanzawa M<sup>1)</sup>, Wakana Y<sup>1)</sup>, Kawabe T<sup>1)</sup>, Jorge ZA<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Col. Med-Pharm. Tech.), Fukuda T, Hashimoto H. Novel ataxia mouse had heavy iron deposition in the liver and the kidney, but not in the heart and the central nervous system. 第32回日本神経科学大会. 名古屋, 9月. [Neurosci Res 2009; 65 (Suppl. 1): S128]