

nucleus tractus solitarius: Dorsal and ventral subnuclei differences. *Neurosci Lett* 2009; 450(2): 217-20.

- 4) Okada T, Tashiro Y, Kato F, Yanagawa Y, Obata K, Kawai Y. Quantitative and immunohistochemical analysis of neuronal types in the mouse caudal nucleus tractus solitarius: focus on GABAergic neurons. *J Chem Neuroanat* 2008; 35(3): 275-284.
- 5) 河合良訓. 微小回路ダイナミクスの幾何学的・機能的構成解析. *慈恵医大誌* 2009; 124(2): 63-70.

### III. 学会発表

- 1) 根岸義勝, 河合良訓. ラット延髄孤束核における局所神経回路の空間的差異. 第125回成医学会. 東京, 10月.
- 2) 太城康良, 河合良訓. 孤束核のシナプス発達と圧受容器反射の成熟. 第10回 ORIGIN 神経科学研究会. 宮崎, 9月.
- 3) 根岸義勝, 河合良訓. 孤束核局所神経ネットワークの機能的ダイナミクス. 第10回 ORIGIN 神経科学研究会. 宮崎, 9月.
- 4) 荒川廣志, 貝瀬 満, 田尻久雄, 河合良訓. 経鼻内視鏡挿入が咽頭・舌根部に及ぼす影響についての解剖学的検討—経口内視鏡との比較検討. 第12回臨床解剖研究会. 東京, 7月.
- 5) 太城康良, 岡田知明, 河合良訓. ラット延髄孤束核における軸索細胞体型シナプスの生後発達. 第31回日本神経科学大会. 東京, 7月.
- 6) 根岸義勝, 河合良訓. ラット孤束核における自発性シナプス入力パターン. 第31回日本神経科学大会. 東京, 7月.
- 7) 河合良訓. 微小回路ダイナミクスの幾何学的・機能的構成解析. 第125回成医学会総会. 東京, 10月.

### V. その他

- 1) 河合良訓監修. 骨単: 語源から覚える解剖学単語集: 骨編. 韓国語版. 東京: エヌ・ティー・エス, 2008.

## 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

### 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の四足動物への進化は約3億7千万年前のデボン紀後期に生じた。このような大進化や新奇器官の獲得が、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は明らかでない。我々は原始的な条鰭類であるポリプテルスを用いた比較解剖学, 比較発生学, 比較ゲノムの各解析を通じて四肢動物体制の進化について調べている。ポリプテルスの大規模なゲノム情報解析は行われていないため, 基盤情報を作製するための準備を開始した。まず, ポリプテルスのゲノム BAC ライブラリーの作成を開始した。雄の成体の血液を採取し, 有核赤血球からゲノム DNA を調整した。ゲノムサイズを測定し, 2.8GB であることが明らかとなった。この実験は国立遺伝学研究所の藤山秋佐夫教授との共同研究である。さらに, 理化学研究所発生・再生科学総合研究センターの相澤慎一教授との共同研究として原腸陥入期までのポリプテルス胚の EST 解析を開始した。原腸胚期から神経胚期のポリプテルス胚の RNA を抽出し cDNA を作成後, 約 10000 クロンの塩基配列を決定した。1 クローンしか得られない遺伝子が 80.1% を占めており, さらに 10000 クローン塩基配列を決定する予定である。神経胚期以降の EST 解析に関しては国立遺伝学研究所にて行う計画で, 現在 cDNA ライブラリーを作成している。

#### II. 血管内移植された骨髄由来間葉系幹細胞の動態解析

BALB/cA<sup>CSA</sup> 系マウスは, BALB/cA 系と遺伝的背景が同じで, ミトコンドリアタンパク質である Hspa9 をアミノ酸配列が 2 残基異なった C3H/He 系マウス由来の Hspa9 variant (C3H Specific Antigen, CSA) との交配によって置換した系である。この CSA に対する抗体は, BALB/cA<sup>-CSA</sup> 系由来の細胞は陽性を示すが, BALB/cA 系由来の

細胞は染まらない。

そこで、BALB/cA<sup>CSA</sup>系マウスの大腿骨髄より間葉系幹細胞を分離・培養し、BALB/cA系マウスの大腿静脈内に移植して、経時的に屠殺し、各臓器内のCSA陽性細胞を免疫染色によって観察した。

その結果、移植直後の肺では血管内に多数のCSA陽性細胞が認められたが、それ以外の臓器では検出されなかった。移植後4日目まで、CSA陽性細胞が肺にのみ認められたが、それ以降は検出されなかった。

血管内に投与した間葉系幹細胞は、臓器内に入り込んで生着することができなかったと思われる。本実験系を用いることで、GFP遺伝子導入等の遺伝子操作を加えることなく、移植された間葉系幹細胞やiPS細胞、あるいはそれらの誘導細胞の動態を追跡することが可能であることが示された。

### III. 脊椎動物の鰓孔形成過程をモデルとした上皮組織の融合・分離メカニズムの研究

本研究は咽頭嚢の内胚葉上皮と外胚葉上皮の融合と、閉鎖板の解離に見られる上皮細胞の分離のメカニズムを微細形態学的に検討することを目的とする。ステージ8から21 (Hamburger-Hamiltonによる)のニワトリ胚子 (White Leghorn) を4%ホルムアルデヒドで固定し、20%シュクロース水溶液に浸漬後、OCTコンパウンドに包埋、クリオスタットで約10 $\mu$ mの凍結切片を作製して、基底膜関連蛋白質であるfibronectin, lamininに対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、ステージ14で基底膜の一部崩壊を光顕レベルで確認できた。今後さらに細胞間接着因子であるE-cadherinや、細胞骨格系の蛋白質であるintegrin $\alpha$ 6, tubulinに対する抗体などを用いて免疫染色を行い、細胞間接着因子や細胞内小器官の状態を光顕レベル及び電顕レベルで観察することによって、咽頭嚢の内胚葉上皮と外胚葉上皮の融合、及び上皮細胞の分離のメカニズムを微細形態学的に検討する。

### IV. 細胞種特異的エピジェネティック記憶の新規網羅的解析法

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、遺伝一環境相

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。本法ではこのH3.3に細胞種特異的にタグをノックイン可能な疾患モデルマウスを作製する。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。

本年度はH3.3-タグノックイン用ベクターを作製し、Creリコンビナーゼ発現ベクターとともに細胞に共感染させ、タグ化H3.3が期待通り機能するかを確認した。来年度にはH3.3-タグノックインマウスを作製する予定である。

### V. 脊椎動物の三叉神経プラコードと神経節形成の分子機構

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機能を果たす。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、分子の実体は明らかにされていない。そこで、既知FGF8シグナルの役割の検証と、頭部外胚葉ESTを用いた未知関連遺伝子の同定と解析を試みた。ニワトリ予定三叉神経領域の頭部外胚葉直下にFGF8タンパク質をしみ込ませたビーズを移植すると三叉神経プラコード特異的マーカーBrn3aの発現がビーズ周囲において抑制され、またFGF8経路で抑制的に働くSprouty2の優性阻害型をエレクトロポレーション法により強制発現させてもBrn3a発現が抑制された。さらにFGF8の産生源である中脳峽部の除去実験を行うとBrn3aとPax3発現が促進されたことから、FGF8シグナルが三叉神経プラコード形成に負の方向に働くことが考えられた。ESTクローン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単離されており、現在発現解析や機能解析を進めている。

### VI. 横隔膜の獲得機構の解明を目指して

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が、鳥類では胸腔と腹腔は肺横隔膜と斜隔膜 (胸腹横隔膜) の2つの膜組織によって隔てられておりこれらは哺乳類の横隔膜

と相同組織だと考えられている。今回我々は、横隔膜の発生、形成機構を明らかにするために横隔膜ヘルニアの原因遺伝子と考えられている4種類の遺伝子 (*Wt1*, *Gata4*, *Slit3*, *Raldh2*) を用いてマウス胚、ニワトリ胚の様々なステージにおけるこれらの遺伝子発現を *in situ* hybridization で観察を行った。その結果、マウス胚においてこれらの遺伝子はいずれも原始横隔膜原基に発現していることが明らかとなった。さらにニワトリ胚でもマウス胚に相同な組織でこれらの遺伝子が発現することが明らかとなった。このことから、胸腔と腹腔を隔てる膜組織は哺乳類と鳥類が分かれる前の太古の両生類の時代に獲得した可能性が考えられた。今後は原始横隔膜に移動する筋芽細胞に着目し、*Pax3* 遺伝子が発現する細胞 (体節) が標識されたマウスを用いた解析と、ニワトリ胚の体節を *Dil* で標識する研究を進めていく。

#### 「点検・評価」

4月1日よりDNA医学研究所遺伝子治療研究部から鈴木英明講師と熊本大学発生医学研究センターから辰巳徳史助教が着任した。鈴木講師は小児科学講座で多くの未熟児の医療の経験を有している。先天異常や人類遺伝学的視点から本講座の教育ならびに研究に貢献してくれることを期待している。辰巳助教は肝臓の発生研究を発生生物学的方法、発生遺伝学的方法で研究を進めてきた経験があり、本講座における発生学研究の発展に寄与してくれることを期待している。

本年は、基礎医科学Ⅱの形態系実習の肉眼解剖学実習と組織学実習の進行具合の歩調を合わせるようにカリキュラムを組んだ。これまで肉眼解剖学実習と組織学実習は完全に独立したものとして行われてきたが、本年は肉眼解剖学実習で各臓器を観察した後、その微細構造を組織学実習で学ぶことができるようにした。今後も、顕微鏡実習室において、プラスチック標本を観察しながら組織学実習が行えるようにするなど、学生の頭脳の中で肉眼解剖学と組織学が分離したものにならないように様々な工夫をしていきたいと考えている。

### 研究業績

#### I. 原著論文

- 1) Tanaka, K, Hashimoto H, Tachibana T, Ishikawa H, Ohki T. Apoptosis in the small intestine of neonatal rat using blue light-emitting diode devices and conventional halogen-quartz devices in

phototherapy. *Pediatr Surg Int* 2008; 24(7): 837-42.

- 2) Takeuchi M, Takahashi M, Kuratani S, Okabe M, Aizawa, S. Germ layer patterning in bichir and lamprey; An insight into its evolution in vertebrates. *Dev Biol* 2009; 332(1): 90-102.
- 3) Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, Ohashi T, Sado Y (Shigei Med Res Inst), Suzuki H, Kawamura T, Okabe M, Hosoya T. Generation of a transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2008; 85(11): 1654-58.

#### II. 総説

- 1) 橋本尚詞, 石川 博(日本歯科大), 日下部守昭(東大). 脳血管系の三次元的観察技法. *顕微鏡* 2008; 43(3): 229-33.

#### III. 学会発表

- 1) Kusakabe M<sup>1),2),3)</sup> (Matrix Cell Res Inst), Koshihara K<sup>4)</sup>, Sasaki Y<sup>4)</sup>, Noda Y<sup>4)</sup>, Ryuzaki F<sup>4)</sup>, Kawabe T<sup>4)</sup>, Zavaleta-Ahane J<sup>4)</sup> (Tokyo Coll Medico-Pharmaco Tech), Tsubone H<sup>5)</sup> (Univ Tokyo), Hokao R<sup>2)</sup> (Inst Anim Reprod), Fukuda T, Hashimoto H. A novel animal model for spinocerebellar degeneration. 第31回日本神経科学大会. 東京, 7月.
- 2) Okabe M. Transition from aquatic to terrestrial life and evolution of the vertebrate pharynx. The 8th NIBB-EMBL Joint Meeting. Okazaki, Nov.
- 3) 多田剛志, 岡部正隆. 発生中の副甲状腺に発現する受容体型チロシンキナーゼの探索. 第125回成医学会総会. 東京, 10月.
- 4) Shono T, Ogura Noda A, Okabe M. Acquisition of a novel organ involved in regulation of calcium concentration in the blood during vertebrate evolution. *Frontiers in Developmental Biology*. Giens, Sept.
- 5) 重谷安代, 板崎伸栄, 岡部正隆. 三叉神経節形成に関わる分子機構—頭部外胚葉に発現する *Wnt6* と WISE のプラコードと神経堤細胞に対する集合機能. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会. 岡山, 3月.
- 6) 岡部正隆. 生息環境中のカルシウム濃度と脊椎動物の形態進化. 2009 NIG Zebrafish Meeting 遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いた生体内イメージングと脊椎動物高次生命現象の遺伝学的研究. 三島, 3月.
- 7) Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, Kawamura K, Hosoya T, Okabe M. Differentiation of human mesenchymal stem cells into the Wolffian duct cells

using chicken embryos. American Society of Nephrology, Renal Week 2008. Philadelphia, Nov.

- 8) Shono T, Ogura Noda A, Okabe M. Acquisition of a novel organ involved in regulation of calcium concentration in the blood during vertebrate evolution. CDB Symposium "Cis Sequence Regulation And Its Evolution". Kobe, Sept.
- 9) 岡部正隆. 温故知新, 可以為師矣? 第6回先端医科学へのアプローチ研究会. 水上, 9月.
- 10) Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M. Inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into the Wolffian duct cells using chicken embryos. KIDSTEM Conference 2008. Liverpool, Sept.

## 分子生理学講座

教授: 馬詰 良樹 骨格筋生理学, 体力科学  
 准教授: 竹森 重 骨格筋生理学, 心筋生理学,  
 体力科学  
 講師: 山口 真紀 骨格筋生理学, 心筋生理学

### 教育・研究概要

#### I. 細胞内の水の状態が持つ水活量測定

MR画像の素となる細胞内の水の状態の違いが何を反映しているのかという疑問を出発点に、筋節という小さな構造の単純な繰り返しと看做せる骨格筋の中の水に着目して調べている。MR画像法の原理となる核磁気共鳴法で観測される水プロトン信号の横緩和時定数  $T_2$  によって筋細胞内の水は明確に成分分けできる。この各成分に対する組織、細胞構造からの束縛エネルギーを、直接測定により明らかにした。具体的には、NMR試料管内の湿度を調節して、気相中の水の活量との平衡を保ちながらスキンドファイバー内の水の活量を徐々に下げ、外気の水の自由エネルギーをどれだけ下げれば、各成分の水が外気に奪い取られるかを調べた。最も強く束縛されている水成分は kT オーダーのエネルギーを蓄え得ることが分かった。より束縛エネルギーの小さい水成分でも、水分子の数の多さを考えると大きなエネルギーになる。筋タンパクの収縮性相互作用における ATP 加水分解の自由エネルギーを一時預かる「熱だめ」として、筋肉内の水が大きな役割を担うという我々の仮説が裏付けられた。

#### II. 横紋筋伸展に伴うミオシン頭部の振る舞い

骨格筋・心筋は細いアクチンフィラメントの格子と太いミオシンフィラメントの格子が周期的に交互嵌合する筋節構造を持ち、低カルシウム条件のような低い活性化レベルでは、筋節の受動伸展は活性化レベルを増強して能動張力を増大させる作用 (stretch activation) がある。この作用は心筋の短い筋節長で顕著であり、Starling 自己調節能の基礎をなすものとされる。stretch activation のメカニズムとして、筋節伸展に伴う細いフィラメントと太いフィラメントの間隔 (格子間隔) の狭まりが一義的という仮説が有力視されているが、我々の測定では、心筋において収縮活性が大きく修飾される短いサルコメア長範囲では太いフィラメントと細いフィラメント間距離がさほど変化しない結果となる。そこで長さ方向のひずみがミオシン頭部の突出度合い