

層構成. 解剖誌 2010 : 85 (Suppl.) : 168.

III. 学会発表

- 1) 根岸義勝, 河合良訓. 内臓知覚核における幾何学的・機能的関連性. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜 (誌上開催), 3月.
- 2) Negishi Y, Kawai Y. Geometric and functional architecture of the nucleus tractus solitarius. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience. San Diego, Nov.
- 3) 根岸義勝, 河合良訓. 内臓知覚微小回路の幾何学的・機能的構成. Neuro2010 (第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会). 神戸, 9月.
- 4) 根岸義勝, 河合良訓. 孤束核における形態的機能的層構成. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集會. 盛岡, 3月.

V. その他

- 1) 河合良訓. 全身の骨と筋肉. 学校保健ニュース 中学版 2011 : 1544 : 3-4.
- 2) 河合良訓, 岩田幸一. 第3章 : 流通路としての循環系. 遠山正彌 (大阪大学), 高辻功一 (大阪府立大学), 木山博資 (大阪市立大学) 編. 人体の解剖生理学. 京都 : 金芳堂, 2010. p.79-110.

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. ゼブラフィッシュ体表塩類細胞の獲得に関する進化発生学的研究

glial cells missing 2 (*gcm2*) は転写因子をコードする遺伝子であり, マウスやニワトリなどの羊膜類では副甲状腺に特異的に発現している。一方, 真骨魚類ゼブラフィッシュでは, *gcm2* は副甲状腺の相同器官である鰓の他に体表塩類細胞のサブタイプである H⁺-ATPase rich cells (HRCs) でも発現している。塩類細胞は, 魚類にとって体液の恒常性を保つための重要な器官である。ゼブラフィッシュの塩類細胞における *gcm2* 遺伝子の役割について発生学的, 進化学的に解析した。本研究では以下の結果を得た。①ゼブラフィッシュ *gcm2* が HRCs の発生に必須であり, また HRCs とは異なるサブタイプの塩類細胞である Na⁺-Cl⁻-cotransporter Rich Cells (NCCCs) の過剰な発生を抑制していることを明らかにした。②体表塩類細胞において *gcm2* が発現するのは, ゼブラフィッシュ, メダカ, クサフグなどの高度に進化した条鰭類, すなわち真骨魚類だけでなく, 原始的な条鰭類であるポリプテルスやチョウザメと四肢動物であるアフリカツメガエルには体表塩類細胞が存在するものの, *gcm2* 遺伝子は発現していなかった。③ゼブラフィッシュの体表塩類細胞で *gcm2* を発現させるのに必要な塩類細胞のエンハンサー領域同定した。④得られた塩類細胞エンハンサー領域を各種四肢動物の相同な領域で比較したところ, 四肢動物のゲノムには保存配列を見出せなかった。これらの結果は, *gcm2* を体表で発現させる分子発生メカニズムが真骨魚類の進化の過程で独自に獲得された可能性を示唆する。真骨魚類の進化過程で独自に生じた一部の体表塩類細胞に特異的な *gcm2* のエンハンサーが塩類細胞の種類を多様化したと考えられる。進化過程における新たなエンハンサーの獲得は新奇の細胞・器官の出現をもたらすと考えられており, 本研究の研究成果はその一例であるのかもしれない。

II. 鉄代謝異常を伴う先天性運動失調マウスの病理学的及び分子生物学的解析

本年度は、次年度に行うパラメトリック連鎖解析の準備として、ICR系の先天性運動失調ヘテロ確定個体とC57BL/6及びC3H/HeJの近交系個体とを交配させ、第2世代、第3世代で運動失調を発症した家系の各個体よりDNA解析用の試料を採取した。また、第1世代を再度近交系マウスと交配させ、同様に運動失調を発症する家系の試料採取を行った。これらの交配によって得られた運動失調マウスの症状を詳細に観察し、ICR系統で見出された運動失調と同じ症状を示すことを確認した。

運動失調、見かけ正常、野生型の腎臓の厚切り切片を作製し、鉄沈着を調べたところ、野生型は老齢でもほとんど鉄沈着を生じていないのに対し、運動失調と見かけ正常は生後50日を過ぎるころより鉄の沈着が始まり、100日目以降は重度の鉄沈着が起こっていた。鉄沈着の程度は運動失調の方が、また雄よりも雌の方が重度であり、100日目以降は加齢による変化はなかった。鉄沈着部位を電子顕微鏡で観察した結果、腎臓では近位尿細管上皮細胞のライゾーム内に鉄が局在していた。また、運動失調、見かけ正常、野生型の肝臓と腎臓における9種の鉄代謝関連遺伝子の発現について調べたところ、運動失調の肝臓でトランスフェリン受容体cの発現が増加し、腎臓ではSteap3-2の発現が低下していた。

運動失調マウスの脊髄神経、後根、脊髄神経節に見られる空胞について、各種神経マーカーを組織化学的に調べたところ、空胞部位はNF-200に陽性であり、Isolectin B4には陰性であった。また、空胞はユビキチン、CGRPにも陽性を示したが、空胞には全体が陽性に染まるものと陽性の中にさらに陰性の空胞が見られるものがあった。しかし、小脳の空胞はユビキチン以外は陰性であった。これらのことから、空胞を生じているのは筋の固有知覚を支配する感覚神経であり、固有知覚の異常によって運動失調を発症している可能性が示唆された。

III. 組織特異的なエピジェネティック記憶の新規解析法

生体マウスの細胞記憶を細胞種特異的かつ網羅的に解析する目的で、転写活性化遺伝子の転写開始点に局在することが知られているH3.3にコンディショナルにタグをノックインできるマウス樹立を目的とした研究を行った。

H3.3のC末に直接loxP配列(34塩基なのでフレームを合わせるための2塩基を追加)とHAタグを

つなぎ、さらにその下流にNeo耐性遺伝子をはさみloxP配列(上記同様)と3xFlagタグを挿入した。この結果Creリコンビナーゼ存在下ではH3.3-HAからH3.3-3xFlagの発現へとスイッチさせることができるかと期待された。このコンストラクトを用いてCMVプロモータをもつ発現ベクターを構築(CMV:H3.3-HAto3xFlag)し、293細胞を用いてCre発現ベクターとの共発現実験を行った。その結果期待通りHAタグから3xFlagへのスイッチがおこりH3.3-HA、H3.3-3xFlagともにクロマチンへの局在が観察された。

次に、心筋および骨格筋にてタグのスイッチがおこるようにするためCre発現ベクターとして、Cre上流に筋特異的クレアチンキナーゼプロモータ(第1エクソン、第1イントロン、第2エクソンの一部を含む約6.5kb)をBAC組換え法によって挿入した。このCre発現ベクターを筋芽細胞株C2C12にCMV:H3.3-HAto3xFlagと共感染させたところ、HAタグから3xFlagへのスイッチがおこりまた発現量はC2C12の分化誘導とともに増強した。

IV. 神経堤と前ブラコード外胚葉の新規培養法の開発

神経堤細胞と感覚神経ブラコードは脊椎動物特異的構造体として知られている。これらは共に神経胚期の神経板と予定外胚葉との間に存在する胚性外胚葉に由来する。私は神経堤と前ブラコード外胚葉(PPE: Pre-Placodal Ectoderm)に共通する前駆体を作製する新規培養法を確立した。この培養法で作製される前駆体は*Dlx5*遺伝子発現を特徴とし、*Dlx5*は*Slug/SOX2/3*を発現する神経堤と、*keratin19/GATA3*を発現する表皮との境界部の指定因子として報告されている。この培養法は、本来ニワトリのHamburger and Hamiltonステージ6-7の神経板を外科的に切り出し、その外植片の培養液にBMP4を添加することで神経堤を作製するものとして開発された。これにさらにFGF2を加えることによって、形態学的な扁平上皮構造を示し、かつ定量PCR法により神経板境界特異的分子マーカーの*Dlx5*発現の約10倍の増加と、PPE特異的分子マーカーの*Six1*と*Eya2*発現の若干の増加が確認された。神経板外植片に由来する細胞は、また頭部ブラコード特異的分子マーカーの*Pitx2*, *Pax6*, *Msx1/2*, *Pax3*, *Brn3a*の発現がRT-PCRおよびWhole-mount *in situ* hybridization法により確認されている。これらの結果はFGF2をFGF8に変更しても同様の作用は観察されず、かつFGF2とFGF8を

同時に添加しても神経堤細胞の産生に違いは観察されなかった。従ってこの上皮様細胞は神経堤とPPEの前駆体であると考えられた。この神経板培養法は未踏領域であるプラコード特異性の研究に有利に働くと思われる。

V. 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肉性の膜組織であり、我々の呼吸を支える大事な組織である。この横隔膜の発生機構はまだ詳しくは理解されておらず、その解明は先天性横隔膜ヘルニアの原因解明に役立つと考えられている。我々は横隔膜の筋細胞に着目し、発生期の筋細胞がどのように横隔膜に侵入して行くのかをマウス胚を用いて詳細な解析を行った。横隔膜に侵入する筋芽細胞は10.5日胚の四肢の上方部分から内側に向かって分布する様子が観察され、さらに12.5日胚では原始横隔膜に侵入する様子が観察された。14.5日胚では発生の教科書に書かれている様に横隔膜全域に筋細胞が分布している事が観察された。また筋分化は横隔膜の後方から始まって行く事が筋細胞マーカーの発現より明らかとなった。これらの結果はこれからの横隔膜研究の根幹となる重要な成果であると考えられる。

「点検・評価」

1. 教育について

解剖学講座(組織・発生)の教員は、医学科のコース「基礎医科学Ⅰ」ユニット「細胞から個体へ」の講義および実習、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」およびユニット「研究室配属」を担当した。また看護学科の解剖生理学Ⅰ、慈恵看護専門学校の解剖生理学の講義と見学解剖実習を担当した。担当する講義および実習は、4月から2月までの長期に渡り、この間、講義や実習がない月は8月のみである。その中で教育と研究を高いレベルで両立させるのは簡単ではない。士気を高めるための工夫が今後の課題である。

2. 研究について

解剖学(組織・発生)の教員は、それぞれが独自の研究計画を実施しており、毎週開催される研究報告会にて研究の進捗状況を紹介し、研究内容の客観的な評価を受け、これを参考に研究をさらに進めている。研究費の獲得、研究成果の学会報告、論文発表を通じてその成果を評価するところであるが、今年度は学会での発表、論文発表も全体として少ない。

新たな体制で運営を開始して4年が経過したが、次年度以降、早い段階で、各教員からの研究成果が期待される場所である。再度、教育と研究をいかに効率良く両立させるかが今度の課題といえる。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Murata Y¹⁾, Tamura M¹⁾, Aita Y¹⁾, Fujimura K¹⁾, Murakami Y (Ehime University), Okabe M, Okada N¹⁾, Tanaka M¹⁾ (¹Tokyo Institute of Technology). Allometric growth of the trunk leads to the rostral shift of the pelvic fin in teleost fishes. *Dev Biol* 2010; 347(1): 236-45.
- 2) Kuwahara H¹⁾, Horie T¹⁾, Ishikawa S¹⁾, Tsuda C¹⁾, Kawakami S¹⁾, Noda Y¹⁾, Kaneko T¹⁾, Tahara S¹⁾, Tachibana T, Okabe M, Melki J (Biologie Moleculaire et Cellulaire), Takano R¹⁾, Toda T¹⁾, Morikawa D¹⁾, Nojiri H¹⁾, Kurosawa H (Juntendo University), Shirasawa T¹⁾, Shimizu T¹⁾ (¹Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology). Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(9): 1252-62.

II. 総説

- 1) 岡部正隆. 蛍光顕微鏡画像におけるカラーユニバーサルデザイン. *顕微鏡* 2010; 45(3): 184-9.

III. 学会発表

- 1) 重谷安代, 岡部正隆. 新規アプローチによる三叉神経プラコードの誘導機構に関する分子機構の解明. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月.
- 2) 庄野孝範, 三宅 力, 岡部正隆. 真骨魚の塩類細胞にけるgcm2エンハンサーの獲得による進化. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月.
- 3) 辰巳徳史, 岡部正隆. どのように哺乳類は進化の過程で横隔膜を獲得したのか. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月.
- 4) 野田真継, 小林天美, 三宅 力, 岡部正隆. 古代魚ポリプテルス・セガルスにおける骨格と筋肉の発生. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月.
- 5) 嶋田耕育, 立花利公, 佐々木敬, 岡部正隆. 胎生期臍島構造形成における神経堤由来細胞の挙動および分布. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会

- 総会・全国学術集会合同大会. 横浜 (誌上開催), 3月.
- 6) 小林天美, 野田真継, 三宅 力, 岡部正隆. ポリプテルスの Hox 遺伝子の単離と解析. 第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 横浜 (誌上開催), 3月.
- 7) Shono T, Miyake T, Okabe M. Evolution of ionocytes, rich in proton pump scattered over the skin in zebrafish. 第 33 回日本分子生物学会年会. 神戸, 12月.
- 8) 嶋田耕育, 立花利公, 佐々木敬, 岡部正隆. 膝島形成過程における神経堤細胞の挙動および分布の観察. 第 33 回日本分子生物学会年会. 神戸, 12月.
- 9) Okabe M. Transition from aquatic to terrestrial life and evolution of the vertebrate pharynx. ISAB2010. Fukushima, July.
- 10) Kidokoro H¹⁾, Tamura K (Tohoku Univ), Okabe M, Schoenwolf GC¹⁾, Saijoh Y¹⁾ (¹University of Utah). Different cellular behavior between the left and right heart rudiments controls the asymmetric heart looping (心臓の左右非対称形態形成における細胞挙動). 第 43 回日本発生生物学会年会. 京都, 6月.
- 11) 小出祐一郎¹⁾, 浦野泰照¹⁾, 花岡健二郎¹⁾, 寺井琢也¹⁾, 日下部守昭¹⁾, 大川 清, 橋本尚詞, 長野哲雄¹⁾ (¹東京大学). ローダミンを母核とした新規近赤外蛍光色素の開発と *in vivo* イメージングへの応用. 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム. 松島, 7月.
- 12) Kusakabe M (Univ of Tokyo), Tachibana T, Tanzawa M¹⁾, Wakana Y¹⁾, Kawabe T¹⁾, Zavaleta-Ahane J¹⁾ (¹Tokyo Col Medico-Pharmaco Tech), Fukuda T, Hashimoto H. Novel ataxia mouse had heavy neuropathological changes in the dorsal root ganglion neurons. 第 33 回日本神経科学大会. 神戸, 9月.
- 13) Koide Y¹⁾, Urano Y¹⁾, Hanaoka K¹⁾, Terai T¹⁾, Kusakabe M¹⁾, Ohkawa K, Hashimoto H, Nagano T¹⁾ (¹Univ of Tokyo). Development of novel NIR fluorescent dyes based on rhodamine and their application for *in vivo* tumor imaging. World Molecular Imaging Congress 2010. Kyoto, Sep.
- 14) 小出裕一郎¹⁾, 浦野泰照¹⁾, 花岡健二郎¹⁾, 寺井琢也¹⁾, 日下部守昭¹⁾, 大川 清, 橋本尚詞, 長野哲雄¹⁾ (¹東京大学). ローダミンを母核とした新規近赤外蛍光色素の開発と *in vivo* イメージングへの応用. 日本分析化学会第 59 年会. 仙台, 9月.
- 15) Koide Y¹⁾, Urano Y¹⁾, Hanaoka K¹⁾, Terai T¹⁾, Kusakabe M¹⁾, Ohkawa K, Hashimoto H, Nagano T¹⁾ (¹Univ of Tokyo). Development of novel NIR fluorescent dyes based on rhodamine and their application for *in vivo* tumor imaging. EMBO Conference Series Chemical Biology 2010. Heidelberg, Sep.
- 16) Kusakabe M (Univ of Tokyo), Okawa K, Inoue J (Matrix Cell Res Inst), Hashimoto H. Novel *in vivo* imaging of malignant tumor using an infrared fluorescent-labeled anti-tenascin-C antibody. 第 69 回日本癌学会学術総会. 大阪, 9月.