

Ⅲ. 学会発表

- 1) 橋本 透. 腹膜腔・後腹膜腔の発生と解剖. 第17回かしわ画像研究会. 柏, 6月.
- 2) Negishi Y, Kawai Y. Features of synaptic boutons distribution along axons of neurons in the caudal nucleus of tractus solitarius of medulla oblongata. 第34回日本神経科学大会. 横浜, 9月. [Neurosci Res 2011; 71 (Suppl. 1) : e217]
- 3) 根岸義勝, 河合良訓. Features of boutons distribution along axons of neurons in the caudal nucleus of tractus solitarius of the rat. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会. 甲府, 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.

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. 腓ランゲルハンス島の発生における神経堤由来細胞と α 細胞の関係性

近年、齧歯類やヒトの腓島において、交感神経終末の多くが α 細胞に投射することが示されている。これまでの研究は β 細胞を中心に解析されたものが多く、 α 細胞と神経の関係性は十分にわかっていない。これまで我々は、Wnt1-cre マウスとインジケーターマウスの交配により得られる Wnt1-cre Floxed EGFP マウスを用いて、神経堤細胞と神経堤由来神経細胞とグリア細胞の腓臓での分布を観察し、マウスの腓島周辺の各種神経系細胞は神経堤由来であることを示した。今回我々は、上記の遺伝子組換えマウスを用いて、各発生段階の腓臓における神経堤由来細胞の時間的空間的な分布を明らかにすることで、発生期における α 細胞と神経との関係性を検討した。神経堤由来細胞は胎生 9.5 日から胎生 10.5 日において腓上皮細胞の近傍に存在していた。発生が進むにつれ、神経堤由来細胞は分枝し成長する腓上皮に沿って分布し、腓上皮内から発生した腓内分泌細胞の近接でも認められた。腓島形成期において、神経堤由来細胞は、腓外分泌腺領域よりむしろ腓内分泌細胞に接近し、また β 細胞よりむしろ α 細胞の近傍に多く分布していた。神経堤由来細胞と α 細胞間における細胞間相互作用を検討するため、いくつかの細胞接着因子の発現を確認したところ、異種細胞間におけるホモフィリックな結合を媒介する CADM1 (SynCAM) が腓島形成期の神経堤由来細胞と α 細胞間の細胞膜に発現していた。このことから、生後の神経堤由来細胞と α 細胞の細胞間接着は胎生期からの SynCAM の細胞種特異的発現によってその基盤を成している可能性が示唆された。

II. 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、昨年度に引き続き ICR 系の先天性運動失調マウスと C57BL/6 系及び C3H/HeJ 系の交

雑系を作製し連鎖解析用の試料を得た。その中から C57BL/6 との交雑系の異常発症 (homo) を 34 個体, hetero 確定を 16 個体, 見かけ正常を 18 個体, C3H/HeN との交雑系からそれぞれ 15 個体, 6 個体, 7 個体の総計 96 個体について, 1,500 カ所余りの SNPs のパターン解析を行った。その結果, 第 2 染色体において C57BL/6 との交雑系では異常発症と 100%連鎖している SNP が見出された。この SNP は, SNP のパターンを A,B とした場合, homo 個体では BB, hetero 確定個体では AB, 見かけ正常個体では AA あるいは AB であった。しかし, C3H/HeJ との交雑系では全個体が BB であり, 連鎖の判定は不能であった。この SNP が異常発症と連鎖していることは Manhattan プロットによっても確認された。この SNP の前後にはどちらの交雑系においても全個体が AA のパターンを示す SNPs があり, これらを考慮すると, この付近の 10 Mbps の領域内に異常遺伝子が存在することが明らかになった。この領域には機能が既知, 未知の gene と pseudo-gene が合計 188 coding されているのが分かっている。

次に, 脳神経系における異常の有無を調べたところ, 三叉神経と三叉神経節および側頭骨内の顔面神経に脊髄神経と同様の強い変性像が認められた。さらに, 中枢神経系において, 三叉神経脊髄路と三叉神経脊髄路核においても空胞変性している神経線維や核周部が散在しているのが見出された。三叉神経の変性している神経線維や核周部は脊髄神経と同様に NF200 などの NFs 抗体に強陽性であり, さらに Parvalbumin と Calbindin にも陽性を示したが, Isolectin B4 は陰性であった。三叉神経にはこのような強い変性が認められるにもかかわらず, それによってもたらされる症候は明らかではなく, 今後の説明が俟たれている。

Ⅲ. 生体リボソームプロファイリングのための新規トランスジェニックマウスの開発

本研究は由来の異なる 3 種類の心筋細胞, すなわち一次心臓野由来, 二次心臓野由来, 前心外膜由来心筋細胞の遺伝子調節ネットワークを別々に解析し, それぞれの生理機能の違いを明らかにするために, 翻訳中の mRNA をタグを用いて精製し解析する生体リボソームプロファイリングという方法を計画した。

実験計画書に従い, はじめに Halo7 タグ化 RPL10a (Ribosomal Protein L10a) 及び 3xFlag タグ化 RPL10a をプロモーター下に発現するベクターを

作製し, タグ化蛋白の局在について検討を行った。その結果これらのタグ化タンパク質は期待通りリボソームに局在することがわかった。当初の計画では Cre-loxP システムを用いて, Cre リコンビナーゼ依存性に Neo 耐性遺伝子から Halo7-RPL10a に遺伝子発現がスイッチするシステムを構築する予定だったが 3xFlag-RPL10a から Halo7-RPL10a にスイッチするシステムに計画を変更し CMV プロモーター下にそのシステムを有するベクターを作製した。培養細胞にこのベクターと Cre 発現ベクターを共感染させると, 期待通り Halo7-RPL10a へとスイッチがおこることが確認された。

次に実験計画通り横紋筋細胞への発現を考え, Myh6 (ミオシン重鎖 6) プロモーターのクローニングを行った。Myh6 のスタートコドンから上流 5.8kB を BAC より Red/ET 組み換えシステムを用いてルシフェラーゼ発現レポーターベクターに組み込み, C2C12 細胞を用いてプロモーター活性を測定した。対数増殖をしている C2C12 細胞での発現はそれほど強くなかったが, 感染後 6 日間 0.5% 血清下培地で培養した後の活性は非常に上昇していた。そこで前述のベクターにこの Myh6 プロモーターを組み込みトランスジェニックベクターを完成させた。

さらに実際にリボソームプロファイリングを行うための実験条件を検討するため MCF7 細胞に Halo7-RPL10a を安定発現させた細胞株を樹立した。今後この細胞株を用いて, リボソーム精製法, スクレアーゼ処理法, rRNA 除去のためのサブトラクション法, 次世代シーケンサー解析のためのライブラリー作製法, 次世代シーケンサー解析とデータ処理法について検討し, トランスジェニックマウスを作成する予定である。

Ⅳ. 神経板外植片を用いた新規培養法の開発: 神経板は神経板外側の上皮に変換できる

脊椎動物に特異的な構造体として知られる神経堤と感覚性プラコードは, 共に神経板外縁より生じることが知られている。我々は神経板外植片を用いた新規培養法の開発を行い, 神経板外側に存在する上皮の前駆体と思われる細胞群を作製した。

神経堤は, 胚性外胚葉に発現する BMP4 の作用によって誘導されることは既に報告されている。そしてそれは胚体外においても神経板外植片を BMP4 存在下で培養することで神経堤細胞が誘導されることは示されていた。我々はこのたび新規培養法の開発を行い, 神経板に BMP4 と FGF2 を相加的に作

用させることで、形態学的な単層扁平上皮を呈し、かつ Dlx5 発現を特徴とする細胞群を作製した。この Dlx5 は、神経板境界指示因子として神経堤と将来の表皮の位置を決定することが知られている。我々はそこで、誘導された上皮様細胞群において神経板とその外縁に発現する Dlx5 の下流遺伝子群の発現を調べた。その結果、神経板特異的分子マーカー Sox2 の発現量が減少したのに対し、表皮特異的分子マーカーである *GATA3/keratin19* と神経堤マーカーである *Slug/Msx1* の発現量は共に増加した。前ブラコード外胚葉とは、逆 U 字型の神経板前縁に形成される予定ブラコード領域のことであり、後期神経胚から前期咽頭胚期にかけて、下垂体、鼻、レンズ、三叉神経、耳、上鰓のブラコードを形成する。前ブラコード外胚葉特異的分子マーカーであり、かつ Dlx5 の直接の下流遺伝子として知られる *Six1/Eya2*、ならびに幾つかのブラコード特異的分子マーカーの発現量を調べてみると、全てにおいて僅かな増加が認められた。さらに、Dlx5 抗体を用いて上皮様細胞群の不均一性を検証してみると、全ての細胞群が均一に発現する様子が観察された。以上のように、神経板の細胞は神経板の外側の上皮、つまり神経堤、PPE、胚性外胚葉に変換する能力を持つことを示唆しており、また新規培養法により誘導された上皮様細胞群はこれら全ての上皮の前駆体である可能性が考えられた。我々は現在、この神経板外植片培養によって誘導される上皮様細胞と胚内の神経板外縁の細分化機構について研究を進めている。

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筋肉性の膜組織であり、特に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などの原因解明に役立つと考えられている。

横隔膜の形成に関与する遺伝子群の発現を横隔膜が存在するマウスと存在しないニワトリと比較した結果、横隔膜のない（筋性分がない）ニワトリには Sim2 遺伝子が発現していないことが明らかとなった。この遺伝子は横隔膜の筋分化に関与することが知られていることから、Sim2 遺伝子の発現の違いが横隔膜を獲得するきっかけになっている可能性が示唆された。

「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、形態系実習（解剖学実習および組織学実習）、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」、さらに看護学科においては解剖生理学 I の講義と見学解剖実習を担当した。また慈恵看護専門学校においても人体の構造の講義と見学解剖実習の講義を担当した。当講座で管理する顕微鏡実習室は、組織学実習や病理学実習、寄生虫学実習など顕微鏡を用いる様々な学生実習に利用されている。今年度、老朽化した顕微鏡実習室設備を段階的に改修することを検討し、今年度は AV 機器の更新、来年度は学生実習用顕微鏡を更新することとした。これにより今年度末までにこれまでのアナログ型供覧機器をすべてデジタル化し、各実習台に 1 台設置されていたブラウン管モニターを液晶モニターのダブルディスプレイに置き換えた。さらに同実習室内で同時に 4 つの異なる実習・演習が可能となるように、実習室の前後左右に 4 台の液晶プロジェクターと映写スクリーンを設置した。これにより多様な実習形態の実現が可能となった。

2. 研究について

解剖学（組織・発生）の教員は、各自独自の研究テーマを持ち研究を実施している。毎週開催される研究報告会にて研究の進捗状況を報告し、研究内容の客観的評価を受け、これを参考にして研究を進めていく。今年度は当教室の大学院生の研究成果や、学内外の研究者との共同研究により 6 つの英文原著論文を発表することができた。今後も国内外の学会で研究成果を発表し、学内外から当教室における研究に参加する研究者・大学院生を募り、研究を活性化していきたい。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Katsu K¹, Tokumori D², Tatsumi N, Suzuki A² (² Hiroshima Univ.), Yokouchi Y¹ (¹ Kumamoto Univ.). BMP inhibition by DAN in Hensen's node is a critical step for the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo. *Dev Bio* 2012; 363(1): 15-26.
- 2) Shimada K, Tachibana T, Fujimoto K, Sasaki T, Okabe M. Temporal and spatial cellular distribution of neural crest derivatives and alpha cells during islet

- development. *Acta Histochem Cytochem* 2012; 45(1): 65-75.
- 3) Richardson J, Shono T, Okabe M, Graham A. The presence of an embryonic opercular flap in amniotes. *Proc Biol Sci* 2012; 279(1727): 224-9.
 - 4) Takechi M, Takeuchi M, Ota KG, Nishimura O, Mochii M, Itomi K, Adachi N, Takahashi M, Fujimoto S, Tarui H, Okabe M, Aizawa S, Kuratani S. An overview of transcriptome profiles identified in hagfish, shark, and bichir: Current issues arising from some nonmodel vertebrate taxa. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2011; 316(7): 526-46.
 - 5) Shono T, Kurokawa D, Miyake T, Okabe M. Acquisition of glial cells missing 2 enhancers contributes to a diversity of ionocytes in zebrafish. *PLoS One* 2011; 6(8): e23746.
 - 6) Nemoto M, Hiki Y, Shimada K, Nakai N, Fujimoto K, Inoue S, Sakurada N, Kaneko H, Sugita M, Okabe M, Sasaki T. Novel hormonal delivery method using the ink-jet technology: application to pulmonary insulin therapies. *Diabetes Technol Ther* 2011; 13(5): 509-17.
 - 7) 川上未有希, 石川 博, 鈴木見奈子, 富永徳子, 立花利公, 中原 貴, 田中 彰, 又賀 泉. マウス ES 細胞を細胞源とする唾液腺の再生. *再生医療* 2011; 10: 280.
 - 8) 石川 博, 松永行子, 大山晃弘, 立花利公, 中原 貴, 石渡 勇, 竹内昌治. 再生医療を目指した ES 細胞を細胞源とする 4 層構造を持つ網膜の作成. *再生医療* 2011; 10: 150.
- ### III. 学会発表
- 1) 西條広起, 橋本尚詞, 岡部正隆, 有廣誠二, 加藤智弘, 田尻久雄. DDS 大腸炎マウスの腸炎誘発時における血管構造の変化. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 2) 大山晃弘, 井出吉昭, 田巻友一, 富永徳子, 中原 貴, 立花利公, 渡邊美隆, 栗原邦弘, 石川 博. オーダーメイドの骨再生治療法の開発—ヒト脂肪組織由来幹細胞の骨細胞への分化, 特にその骨形成について—. 平成 23 年度日本歯科大学歯学会研究推進フォーラム. 東京, 10 月.
 - 3) 鈴木見奈子, 石川 博, 川上未有希, 富永徳子, 立花利公, 中原 貴, 岡田康男, 田中 彰, 又賀 泉. 口蓋に発生した筋上皮腫の細胞株樹立と特徴. 29 回日本ヒト細胞学会学術集会. 富山, 8 月.
 - 4) 宇田川友克, 辰巳徳史, 立花利公, 西條広起, 小林俊樹, 谷口雄一郎, 小島博己, 森山 寛, 岡部正隆. マウス前庭系において内向き整流性カリウムチャネル Kir4.1 (Kcnj10) はグリア細胞だけでなく, ニューロンにも発現する. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 5) 内山威人, 辰巳徳史, 鈴木英明, 大城戸一郎, 横山啓太郎, 岡部正隆. 胎生期のミネラル環境がミネラル恒常性に与える影響の検討. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 6) 勝賢二郎¹⁾, 仁木大輔¹⁾, 辰巳徳史, 横内裕二¹⁾ (¹⁾熊本大学). 脾臓形成を制御する遺伝子ネットワークの同定とその作用機序. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 甲府, 3 月.
 - 7) Tatsumi N, Okabe M. Gene expression patterns analysis relative to congenital diaphragmatic hernia in mouse and chick embryo (マウス, ニワトリ胚を用いた先天性横隔膜ヘルニア関連遺伝子の発現パターン解析). 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 8) Tatsumi N, Okabe M. Comparative anatomy of the diaphragmatic muscle precursor cells in mouse and chick (マウス, ニワトリを用いた横隔膜を形成する筋前駆細胞の比較解剖学的解析). 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. Ginowan, May.
 - 9) 嶋田耕育, 佐々木敬, 岡部正隆. 臍島形成における神経堤由来細胞と α 細胞. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 甲府, 3 月.
 - 10) 重谷安代, 岡部正隆. 新規培養法による神経堤細胞と前ブラコード外胚葉に共通する前駆体の誘導. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 甲府, 3 月.
 - 11) Kobayashi A, Noda M, Miyake T, Okabe M. Embryonic expression and structure of Hox genes in Bichir, *Polypterus senegalus*. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 12) Shono T, Kurokawa D, Miyake T, Okabe M. Acquisition of glial cells missing 2 enhancers contributes to a diversity of ionocytes in zebrafish. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 13) Tatsumi N, Okabe M. Gene expression patterns analysis relative to congenital diaphragmatic hernia in mouse and chick embryo. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 14) 嶋田耕育, 佐々木敬, 岡部正隆. 臍島形成における神経堤由来細胞と α 細胞の関係性. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 15) 内山威人, 辰巳徳史, 鈴木英明, 大木戸一郎, 横山啓太郎, 岡部正隆. 胎生期のミネラル環境がミネラル恒常性に与える影響の検討. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜, 12 月.
 - 16) Kobayashi A, Noda M, Miyake T, Okabe M. Analysis of Hox genes in *Polypterus senegalus*, a living an-

cestor model of tetrapods (ポリステルス・セネガルの Hox 遺伝子の解析 - 四肢動物の生きた祖先モデル)。44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Ginowan, May.

- 17) Tatsumi N, Okabe M. Comparative anatomy of the diaphragmatic muscle precursor cells in mouse and chick. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Ginowan, May.
- 18) Kidokoro H, Tamura K, Okabe M, Gary C. Cellular aspects of heart formation and LR asymmetric morphogenesis. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Ginowan, May.
- 19) Shigetani Y, Okabe M. Development of a new culture method for a precursor to the neural crest and pre-placodal ectoderm. 第34回日本神経科学大会. 横浜, 9月. [Neurosci Res 2011; 71(Suppl.): e124]

分子生理学講座

教授：竹森 重 筋生理学・体力医学
講師：山口 眞紀 筋生理学

教育・研究概要

I. 骨格筋線維内水分画の相転移測定

これまでの核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究により, 骨格筋線維内には少なくとも5つの水成分分画が区別されること明らかになってきた。この水成分分画が, 細胞内の水分子集団とそれを取り巻く構造タンパク質との分子間相互作用による束縛によって形成されることまでは突き止められているが, ではこの分子間相互作用が具体的にどのようなものであるかはいまだ解明されていない。これは NMR 法と MRI 法が, 水集団アンサンブルの振る舞いを見る手法であり, 同じ振る舞いが様々な分子間相互作用の結果として表れ得る事が, 各水集団の特性を分子間相互作用レベルの知見と直接結び付けることを許さないことによる。この難点を補うために, 筋組織内の水の相転移を示差走査熱量測定法 (DSC 法) を利用して調べた。一度凍らせたスキンドファイバー (細胞膜除去筋線維) が融ける過程を観察したところ, いくつかの温度で相転移によると考えられる熱放出を認めた。このことは筋組織内に複数種類の水分画が存在することに符合しており, 各相転移の温度の違いには各分画における分子間相互作用のプロフィールが反映されていることを示している。

II. 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 測定法によるミオシン周囲束縛水の定量

筋線維で観察された水分子集団と構造タンパク質との分子間相互作用をより直接的に評価する今一つの方法として, QCM 装置によるミオシンタンパク溶液の粘弾性測定を昨年より継続して行った。QCM は本来, 水晶に物質が吸着して重量が増加するとその共鳴周波数が低下することを利用してナノグラムレベルの質量変化を量ることを目的として開発された装置であるが, 水溶液中で生体高分子同士の結合を経時的に測定するアルゴリズムが開発されたことにより, その利用範囲が大きく広がった。講座ではこの装置で, 高分子吸着後の共鳴周波数のピーク値だけでなくそのピーク幅を解析することで吸着した分子の粘弾性を知り得ることに着目した。計測された質量とその粘弾性には, 吸着した高分子