

## 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. 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、昨年度に行った連鎖解析の結果より運動失調発症と強い連鎖があると推定される約10Mbps領域の全ゲノム解析を行うための準備として、Wt 確定マウスを2個体、hetero 確定マウスを4個体、運動失調発症 (homo) マウスを4個体の全10個体よりゲノムDNAの抽出を行った。次いで、全ゲノムより対象領域のみを抽出して濃縮するために、Agilent社のSureselectシステムを設計・作製し、これを用いて対象領域の抽出・濃縮を行った。次年度にこの抽出試料についてゲノム解析を行う予定である。

C57BLとの交雑系において、発症前個体のGenotypingを行い、三叉神経、脊髄神経の解析を行ったところ、生後8日目まではGenotypeによる違いを認められなかったが、9日目になるとhomo個体では神経線維に多数の膨隆部が生じており、NF-200の蓄積が認められた。電子顕微鏡で観察したところ、膨隆した末梢突起がシュワン細胞に取り込まれているが、髄鞘が未形成のものも形成途中のものもあった。また、9日目では核周部にNF-200は蓄積されていないが、13日目には蓄積が始まっております。変性が核周部にまで及んでいると考えられた。これらのことより、症状が出現する28日目頃よりも遙かに以前の9日目から神経の変性が始まっているのが明らかとなった。

交雑系において見かけ正常をGenotypingによってWtとheteroに区別し、さらにhomo個体を用いて、4, 8, 12, 16週における肝臓と腎臓の鉄代謝関連遺伝子の発現を調べたところ、homo個体で発現の認められない遺伝子はなかったが、Fth1, Slc11a1, Cpは4週ではhomoで高く、その後はhomoで減少し、Hamp, Trfr2, Alas2-v1は全般に減少し、Tfrcはわずかに増加しているのが認められた。この遺伝子発現の変化が腎臓における鉄沈

着と関連しているか、検討中である。

#### II. 四量体形成不全をおこす2つのFructose-1,6-bisphosphatase欠損症日本人創始者変異

低血糖および乳酸アシドーシス発作を繰り返す症例で見つかったFructose-1,6-bisphosphatase (FBP1)の2つのミスセンス変異(G164S, F194S)が疾患責任変異であるかどうかについて検討した。

Flp-In system (Invitrogen社)を用いて293細胞の同一ゲノム部位に、野生型および上記2つの変異を有するFBP1発現プラスミドを挿入した細胞を樹立した。実験にはそれぞれについて3クローンの細胞株を用いた。最初にそれぞれの細胞株で発現しているFBP1 mRNA量を定量PCR法で、タンパク量をウェスタンブロッティングによる半定量法で解析した。その結果、各細胞株でmRNA量には優位な差を認めなかったが、タンパク量は野生型にくらべ2つの変異型FBP1は著明に低下していた。しかしながら、いずれの変異型についても残存蛋白が検出された。このタンパク量低下が早期分解によるものであるかを調べるためにプロテアゾーム阻害薬であるMG132存在下で培養を行いウェスタンブロッティングによる半定量を行った。その結果、MG132の量依存的にタンパク量の増加が観察され、2つの変異型タンパクは早期に分解されていることがわかった。次に残存蛋白が酵素活性を有するかを調べるために、培養細胞融解後の上清を用いてFBP1酵素活性を測定した。その結果2つの変異型タンパクはいずれも全く活性をもたないことがわかった。FBP1はホモ四量体として働くことが知られている。そこで変異型タンパクが四量体形成能を有するか非変性ポリアクリルアミド電気泳動法(native PAGE)を用いて検討した。その結果どちらの変異型FBP1も四量体形成能を有しないことがわかった。

今回検討した2つのミスセンス変異G164S, F194SはそれぞれFBP1欠損症の候補変異として、これまでに日本人患者で各1例ずつ報告されている。今回の結果は、この2つの変異が日本人FBP1欠損症の創始者変異であり、四量体形成不全により酵素活性が完全に失われることを示している。

#### III. 脊椎動物特異的な構造体の神経堤とブラコードは神経板境界から形成される：神経板外縁の前駆体と思われる上皮の培養法の開発

神経堤は神経板外側の胚性外胚葉に発現するBMP4の作用によって神経板境界領域に誘導される

ことは既に報告されており、また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誘導されることは示されていた。我々はこのたび新たに神経板に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。

まず誘導される上皮細胞群に対し、以下の領域特異的分子マーカーを用いて、またコントロールとなる培養細胞群と共にRT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) 法を行った：*GATA3*, *Keratin19* (表皮マーカー)；*Sox1*, *Sox3*, *Neurogenin1*, *NCAM* (神経板マーカー)；*Slug*, *Snail*, *Msx1*, *AP2*, *Zic1* (神経堤マーカー)；*Dlx5*, *Six1*, *Six4*, *Eya2* (神経板境界マーカー)。その結果、誘導される上皮細胞群において、表皮、神経堤、神経板境界の全てのマーカー遺伝子の発現量は、コントロール細胞群におけるものと比較して、有為に増加していることが分かった。

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。我々はそこで次に、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リアルタイムqPCR (real-time quantitative reverse transcription PCR) によって調べた。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。前プ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プ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、上鰓のプラコードを形成する。前プ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*、ならびに幾つかのプラコード特異的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。

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体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。

#### IV. 発生期の遺伝子発現の3次元モデルの作成方法の確立

発生中の遺伝子発現をより詳細に解析する方法の確立を目指して、内耳発生に関連した遺伝子群を用いた3次元モデルの構築を試みた。3次元モデルを作成するにあたり、Whole mount in situ hybridizationを行い、その試料から凍結切片を作成して、写真を取り込み、3次元再構築ソフトAmiraを用いて、3次元モデルを作成した。その結果、内耳発生に関連した遺伝子は従来論文等で記載されている発現パターンとは少し異なる発現を示す事が明らかになった。従来の論文との発現パターンの違いは、遺伝子発現の発現強度が強い部分のみを強調して観察しており、我々が構築した3次元モデルは非常に発現が弱い部分も抽出しているからだと考えられた。我々はこの事から、さらに遺伝子発現の強度別に抽出して発現遺伝子を観察する方法も開発し、これにより、遺伝子を調整する中心的な領域がどの辺にあるのかを明らかにできる可能性を示した。

#### 「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広義および実習、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、学生実習用顕微鏡120台を更新した。

##### 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3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) Moriyama Y, Kawanishi T, Nakamura R, Tsukahara T, Sumiyama K, Suster ML, Kawakami K, Toyoda A, Fujiyama A, Yasuoka Y, Nagao Y, Sawatari E, Shimizu A, Wakamatsu Y, Hibi M, Taira M, Okabe M, Naruse K, Hashimoto H, Shimada A, Takeda H. The medaka enhancer mutant for *zic1/zic4* provides molecular insights into teleost caudal fin evolution. *Curr Biol* 2012; 22(7) : 601-7.
- 2) Udagawa T, Tatsumi N, Tachibana T, Negishi Y, Saijo H, Kobayashi T, Yaguchi Y, Kojima H, Moriyama H, Okabe M. Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 is localized at the calyx endings of vestibular afferents. *Neuroscience* 2012; 215 : 209-16.
- 3) Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, Haapasalo M. High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *J Endod* 2012; 38(4) : 475-80.
- 4) Katsu K, Tatsumi N, Niki D, Yamamura K, Yokouchi Y. Multi-modal effects of BMP signaling on Nodal expression in the lateral plate mesoderm during left-right axis formation in the chick embryo. *Dev Biol* 2013; 374(1) : 71-84.

## III. 学会発表

- 1) Shigetani Y, Okabe M. The neural plate cells can be transformed to bordering epithelia. CDB Symposium 2013. Kobe, Mar.
- 2) Shigetani Y, Okabe M. The neural plate cells can be transformed to bordering epithelium of the neural plate. 23rd CDB Meeting. Kobe, Jan.
- 3) 中村紗英, 辰巳徳史, 岡部正隆. マウス, ニワトリの腎臓の発生過程における *Sim1*, *Sim2*, *Fgfr1* の発現パターン解析. 第129回成医会総会. 東京, 10月.
- 4) 小林律子, 藤村衡至, 野田真継, 辰巳徳史, 岡部正隆. ポリプテルス *Polypterus senegalus* の肺芽形成の組織学的分子生物学的解析. 第129回成医会総会. 東京, 10月.
- 5) 辰巳徳史, 岡部正隆. ニワトリ, マウスを用いた横隔膜相同組織の比較解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 高松, 3月.
- 6) 小林律子, 藤村衡至, 野田真継, 辰巳徳史, 岡部正隆. ポリプテルス *Polypterus senegalus* の肺芽形成の組織学的分子生物学的解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 高松, 3月.
- 7) 広川恵理沙, 辰巳徳史, 谷口雄一郎, 岡部正隆. 組織切片からの三次元再構築から見る内耳発生機構の解

析. 第129回成医会総会. 東京, 10月.

- 8) 宇田川友克, 辰巳徳史, 小林俊樹, 力武正浩, 谷口雄一郎, 小島博己, 森山 寛, 岡部正隆. 神経堤細胞は耳胞由来上皮に侵入する. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月.
- 9) 中村紗英, 辰巳徳史, 岡部正隆. マウス, ニワトリの腎臓の発生過程における *Sim1*, *Sim2*, *Fgfr1* の発現パターンと機能解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術大会. 高松, 3月.
- 10) Tatsumi N. The Diaphragm Between Mouse and Chick. CDB Symposium 2013. Kobe, Mar.
- 11) Tatsumi N, Hirokawa E, Yaguchi Y, Okabe M. Verification of detailed analytical methods for in situ hybridization with 3-dimensional reconstruction. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月.
- 12) Okabe M. Transition from aquatic to terrestrial life and evolution of the vertebrate respiratory organs. 第10回日本ショウジョウバエ研究会. 東京, 10月.
- 13) 広川恵理沙, 辰巳徳史, 谷口雄一郎, 岡部正隆. 組織切片からの三次元再構築から見る内耳発生機構の解析. 第129回成医会総会. 東京, 10月.
- 14) 岡部正隆. (シンポジウム2: 睡眠呼吸障害と上気道~睡眠中の上気道と呼吸調節における進歩) 呼吸器系の進化発生学. 日本睡眠学会第37回定期学術集会. 横浜, 6月.
- 15) 日下部守昭(東大), 山浦 唯, 下村海咲<sup>1)</sup>, 山口隼<sup>1)</sup>, 横藤田純子(東邦大), 立花利公, 河邊友範<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>東京医薬専), 福田隆浩, 橋本尚詞. Histopathological changes in the peripheral nervous system of the novel ataxia mouse before the onset of ataxia. 第35回日本神経科学大会. 名古屋, 9月.
- 16) 橋本尚詞, 立花利公, 日下部守昭(東大). 新規進行性後肢運動失調マウスの病理組織学的解析. 第129回成医会総会. 東京, 10月.

## IV. 著 書

- 1) 重谷安代. I. 基礎編 6. 生物の進化. 早稲田大学先進理工学部生命医科学科編. 生命科学概論: 環境・エネルギーから医療まで. 東京: 朝倉書店, 2012. p.52-60.