

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：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解析

運動失調マウスの発症の原因遺伝子を確定するために、昨年度に Sureselect システムを用いて抽出・濃縮行った約 10Mbps 領域のゲノム DNA を解析した。得られたデータを C57BL のリファレンス配列にマッピングし、Wt 確定マウス（以下、Wt）は homo であり、hetero 確定マウス（ヘテロ）は hetero で、運動失調発症マウス（ホモ）は変異が homo となった変異は 1,653カ所であった。それらの変異は SNP が 1,477カ所、Insertion が 51カ所で、Deletion は 125カ所であった。しかしながら、これらの変異は既知の coding 領域ではなかった。マップしたデータを精査したところ、ホモのみで、lncRNA である Gm13912 の第 2 イントロンに 7048bps の欠損部位が見いだされた。この部位はヘテロの 4 個体では欠損と正常の hetero 状態であり、Wt では正常の homo であった。この欠損部位の両端で、欠損部位に跨る PCR の primer を設計し同時に増幅すると、Wt では欠損部両端の 2 本のバンドが、ホモでは欠損部を跨いだ 1 本のバンドが、ヘテロでは両者の増幅を示す 3 本のバンドが得られた。この欠損部位を利用した genotyping は系統維持にも有効と考えられる。また、交雑系マウスのヘテロを交配して得られた胎仔の脊髄神経節を培養し、胎仔の genotype と神経細胞や神経膠細胞の成長との関連を調べた。その結果、ホモ胎仔由来の神経細胞、神経膠細胞は Wt やヘテロ胎仔由来のものに比べて、若干成長が遅く、神経膠細胞の神経突起への付着が悪くなっていた。さらに、脊髄神経に生じた空胞変性部位を電子顕微鏡で観察した結果、NF-200 陰性の空胞は軸索と髄鞘の間に生じた間隙であることが明らかとなった。これらのことから、本運動失調マウスでは、神経細胞と神経膠細胞の相互作用に関連する因子に異常があるのではないかと推察された。

II. CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集の効率および off-target 効果の検討

本年は、新しいゲノム編集法である CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集法の編集効率および off-target 効果について検討を行った。Cornelia de Lange 症候群の責任遺伝子 HDAC8, NIPBL 上にそれぞれ 2 か所の標的部位を選び CRISPR/Cas9 ベクターを作製した。選択した 4 部位について Bowtie (short read mapping tool) を用いて off-target 効果を示す可能性の高い候補領域（標的配列に対し 3 塩基以下のミスマッチを含むゲノム候補）を合計 64 か所見出した。そのうち 32 か所についてディープシーケンシング用 multiplex primer を作製した。

それぞれの CRISPR/Cas9 ベクターを HEK293 細胞に FuGeneHD を用いてトランスフェクションし、48 時間後、細胞を回収しゲノム DNA の抽出を行った。標的領域および 32 か所の off-target 候補領域について、multiplex primer を用いて PCR を行い、次世代シーケンサー用ライブラリーを作製し、それぞれ 10^4 以上のリードが得られるように IonPGM (Life Technologies) を用いてディープシーケンシングを行った。

その結果標的部位に対するゲノム編集効率 (InDel 挿入効率) は 22.8%~48.5% であった。一方で、3 塩基以下のミスマッチを含む off-target 候補領域 32 か所の InDel 挿入効率は 0~3.1% (平均 1.2%) であった。

これらの結果から CRISPR-Cas9 System によるゲノム編集法は、低コスト・簡便・高効率であることが示された。一方で、無視できない off-target 効果があることも示された。今後実験に用いる際は off-target 効果の評価と off-target 効果を減らす工夫が必要であると考えられた。

III. 脊椎動物特異的な構造体の神経堤とプ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

既報において、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、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、デスモゾームを持つ扁平上皮を呈し、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、また陰性対象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ける表皮、神経堤、神経板境界の全てのマーカー遺伝子の発現量は、陰性対象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。

さらにこれら培養細胞の SEM 像を観察してみたところ、*BMP4* のみを用いた陽性対象細胞群では、神経堤細胞によく見られるフィロポディアやラメリポディアが細胞の周囲に多く観察されたのだが、一方で *BMP4* と *FGF2* を用いた実験対象の細胞群では、隣り合う大きく平たい上皮細胞の境界周辺部に、上皮に特徴的なデスモゾームが多く観察された。

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. 横隔膜発生に関連した細胞群の解析

横隔膜はその周囲の中胚葉組織が複合的に融合し

てできる組織であり、そのためその発生機構の詳細は明らかになっていない。我々は横隔膜の発生に関連した細胞群の観察を行うために *Wilms' tumor 1* (*Wt1*) 遺伝子が標識されたマウスを用いてその遺伝子が発現する細胞の分布の観察を開始した。現在までに我々は *Wt1* 陽性細胞が先天性横隔膜ヘルニア好発部位である左側後方に局在することを見いだした。今後は、どのようなメカニズムにより *Wt1* 陽性細胞の局在が行われるのか詳細に解析を行う予定である。

V. 脊椎動物における付属肢 (四肢・鰭) の発生・再生現象からみる形づくりのメカニズム

四足動物の四肢 (自由肢) は軟骨内化骨によって構成された骨格パターンをもつ一方で、魚類の鰭は少数の軟骨内化骨を起始とした放射状の膜内化骨によって構成されている。四肢・鰭ともに中胚葉由来の細胞から骨が発生するが、鰭では2種の骨形成メカニズムが同時進行し (発生学的視点)、また鰭から四肢への形態進化において膜内骨化メカニズムを失った (進化的視点) という特徴がある。我々はモデル生物であるゼブラフィッシュの胸鰭において、膜内化骨の形成のみに異常をきたす突然変異体を同定し、その原因遺伝子は糖鎖修飾酵素をコードすることが分かった。今後は糖鎖修飾と骨パターンの関連について解析を行っていく。

また両生類の四肢や魚類の鰭はこうした骨の種類に因らず、切断によって失われた組織を元通りの大きさ・形に再生可能である。我々はゼブラフィッシュの鰭は切断されると基部-先端部軸に沿った (位置依存的な) 幹細胞増殖活性をもつ点に着目し、異なる切断位置で生じた幹細胞における遺伝子発現の定量解析を行った。すると幹細胞増殖期よりも前 (免疫応答期など) から既に切断位置依存的な遺伝子発現量の違いが見られた。今後は位置情報の最上流因子の同定を目指しながら、発生・再生における形づくりのメカニズムの相違について明らかにしていく。

「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。

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。

3. その他

3年前より年1回本学において Tokyo Vertebrate Morphology Meeting を開催している。この研究会は本学の学外共同研究費の助成を受けて毎年開催しており、脊椎動物の解剖学、発生学、進化学、ゲノム科学、古生物学の各分野の研究者間における研究交流を図るものである。毎年50名前後の若手研究者が集い丸一日のシンポジウムと交流会を行うものである。今年度は8月10日(土)に南講堂で開催し、54人の参加があった。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Dobashi A, Imazu H, Tatsumi N, Okabe M, Ang TL (Changi General Hosp), Tajiri H. Quantitative analysis of VEGF-C mRNA of extrahepatic cholangiocarcinoma with real-time PCR using samples obtained during endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48(7): 848-55.
- 2) Mimoto R, Taira N, Takahashi H, Yamaguchi T, Okabe M, Uchida K, Miki Y (Tokyo Medical and Dental Univ), Yoshida K. DYDYLK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail. *Cancer Lett* 2013; 339(2): 214-25.
- 3) Nikaido M¹⁾, Noguchi H¹⁾²⁾, Nishihara H¹⁾, Toyoda A²⁾, Suzuki Y³⁾, Kajitani R¹⁾, Suzuki H¹⁾, Okuno M¹⁾, Aibara M¹⁾, Ngatunga BP⁴⁾, Mzighani SI⁴⁾ (⁴Tanzania Fisheries Research Institute), Kalombo HW (Regional Commissioner's Office Tanga), Masengi KW⁵⁾, Tuda J⁵⁾ (⁵Sam Ratulangi Univ), Nogami S (Nihon Univ), Maeda R (Obihiro Univ of Agriculture and Veterinary Medicine), Iwata M⁶⁾, Abe⁶⁾ (⁶Aquamarine Fukushima), Fujimura K, Okabe M, Amano T²⁾, Maeno A²⁾, Shiroishi T²⁾, Itoh T¹⁾, Sugano S³⁾ (³Univ of Tokyo), Kohara Y²⁾, Fujiyama A²⁾ (²National Institute of Genetics), Okada N¹⁾⁷⁾⁸⁾ (¹Tokyo Institute of Technology, ⁷National Cheng Kung Univ, ⁸Nagahama Institute of Bio-Science and Technology). *Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. *Genome Res* 2013; 23(10): 1740-8.*
- 4) Komoike N, Kato T, Saijo H, Arihiro S, Ito M, Hashimoto H, Okabe M, Koido S, Homma S, Tajiri H. Photodynamic diagnosis by oral administration of 5-Aminolevulinic acid for colitis-associated dysplasia in mice model. *In Vivo* 2013; 27(6): 747-53.
- 5) 岡部正隆, 佐藤正純. 【形態進化のロジックを辿る-エポデボ研究最新線[動物篇]】(Part2)脊椎動物ボディプランのさらなる多様化 脊椎動物の上陸と皮膚の進化. *遺伝: 生物の科* 2013; 67(2): 183-9.

II. 総説

- 1) 林 真一¹⁾, 矢野十織¹⁾, 川住愛子¹⁾, 田村宏治¹⁾, 横山 仁¹⁾ (¹東北大). 【細胞の運命決定とリプログラミング iPS細胞がもたらしたビッグバン マスター因子探究と再生, 疾患リプログラミング】四肢再生における脱分化, 再分化と細胞記憶. *実験医* 2013; 31(13): 2075-82.

III. 学会発表

- 1) Yano T, Tamura K. (Poster Session) Regeneration of the caudal fin shape in zebrafish. *CDB Symposium 2014: Regeneration of Organs: Programming and Self-Organization*. Kobe, Mar.
- 2) Kobayashi R, Fujimura K, Noda M, Tatsumi N, Okabe M. (Flash Talks: FT1: Systems biology/Technology, Theoretical approach/Regulation of geneexpression/EvoDevo) A conserved molecular and cellular mechanism of lung-bud formation between tetrapod and *Polypterus senegalus*. 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biology. Matsue, May.
- 3) Shigetani Y, Okabe M. The vertebrate-specific structures the neural crest and the placode arise from the neural plate border: development of a new culture method for a possible precursor of exterior epithelium of the neural plate. 10th International Congress of Vertebrate Morphology. Barcelona, July.
- 4) 岡部正隆. (シンポジウム9: 精神疾患文化論: 色と光の織りなす世界) 赤と緑の交差点~カラーユニバーサルデザイン~. 第20回多文化間精神医学会学

術総会. 宇都宮, 6月.

- 5) Yano T, Okabe M, Tamura K. Mechanisms of position-dependent regeneration in zebrafish fins. 19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. Sendai, Sept.
- 6) 岡部正隆. 色覚の多様性とプレゼンテーションの中のユニバーサルデザイン. 第38回日本組織細胞化学会講習会. 東京, 8月.
- 7) 岡部正隆. 脊椎動物の上陸と呼吸器の進化. 第37回峠の会(形態学セミナー). 猪苗代, 8月.
- 8) 岡部正隆. (特別講演) 脊椎動物の上陸と肺の起源. 第71回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会. 福岡, 10月.
- 9) 岡部正隆. 皮膚の進化～水中から陸へ～. 日本化粧品学会第38回教育セミナー. 東京, 11月.
- 10) 岡部正隆. (ランチョンセミナー16) 副甲状腺はどこからきたか? 第58回日本透析医学会学術集会・総会. 福岡, 6月.

分子生理学講座

教授: 竹森 重 筋生理学・体力医学
 講師: 山澤徳志子 筋生理学・薬理学
 講師: 山口 眞紀 筋生理学・体力医学

教育・研究概要

I. X線回折法によるATP加水分解にともなうミオシン頭部の構造変化の測定

骨格筋収縮反応の主役であるミオシン頭部(M)はATP加水分解の自由エネルギーをいったんM・ADP・Piの形で堰き止めた後, アクチン(A)と相互作用して収縮反応に利用すると考えられている。ところがミオシン頭部がATP加水分解の自由エネルギーを堰き止める詳細を調べようとすると, アクチンとの相互作用がミオシン固有の変化をマスクしてしまう。そこでアクチンフィラメントをゲルゾリン処理で除いた除アクチン筋線維中でATP加水分解反応中間体のX線回折像の違いを高エネルギー加速器研究機構内フォトンファクトリー-BL6Aにて取得し, MATLAB(Mathworks Inc)により回折信号を解析することでミオシンがATPを加水分解する際の固有の構造変化を検出することを試みた。

ATPのミオシン頭部への結合によりミオシン構造の明らかな変化は見られなかったが, 続く加水分解によりミオシン頭部の重心がロッドに近づき, ミオシンがコンパクトな構造になったことが示された。加水分解後のリン酸の放出により(ADP結合状態)ミオシン頭部の重心は再びロッドから遠ざかり, ADP放出によっても大きな変化は起こらなかった。

II. 骨格筋線維内の水分画の相転移にともなう熱測定

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がこれまでに明らかになっている。この水成分分画は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たが, 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についてはいまだ明らかでない。これはNMR法とMRI法が, 水集団アンサンブルの振る舞いをみる方法であり, 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ことが, 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