

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遺伝子解析

我々の系統維持している新規後肢運動失調マウス（先天性運動失調マウス）の原因遺伝子を特定するために遺伝子解析を行った。この運動失調マウスは常染色体劣性遺伝であり、異常遺伝子座は hak と命名されている。連鎖解析の結果から、2番染色体の2qE3にある rs13476689 (chr2:107,305,044 NCBI 37/mm9) と強く連鎖することが明らかとなっており、これを囲む 101,163,197~111,930,241 領域の遺伝子配列を調べた。その結果、多数の一塩基多形や少数塩基の挿入、欠損などの遺伝子異常が見られた。そのうち、発症マウスでホモとなっており、ヘテロ確定個体でヘテロとなっている遺伝子異常のうち、既知の異常を除いた結果、hak の表現型特異的なものとして 892 の遺伝子異常が特定された。これらの遺伝子異常はいずれもたんぱく質のコード領域にはなく、bdnf 遺伝子の近傍の 107,305,356~108,637,615 の領域に集中していた。これらのことから、hak の表現型はある型の BDNF の発現異常によることが示唆された。

II. 進行性異所性骨化症 (POH) と Gorlin 症候群 (GS) を合併した世界初例の遺伝子解析

われわれは（小児科との共同研究）、POH と GS が合併した世界初例を経験し遺伝子解析を行った。POH の責任遺伝子である GNAS（父親由来の機能欠失変異による）、および GS の責任遺伝子である PTCH1, 2, SUFU は、いずれも Hedgehog 経路に関与することが知られていたため、この経路の新規変異が原因であることを想定して全エクソン解析を行った。その結果、GNAS の機能欠失変異が 1 アレルに同定されたが、他の Hedgehog 経路に関与する遺伝子変異は同定されなかった。GNAS 変異が父母どちらのアレルに生じたかを知るためにハプロタイプ解析を行ったところ、この機能欠失変異は母親由来であった。さらにハプロタイプ解析から、父親由来アレルの LOH が認められること、母親由来

の機能欠失変異も体細胞変異であることがわかった。さらなる解析で父親アレルの LOH は 20 番染色体長腕全領域に及ぶことがわかった。母親由来の GNAS 機能欠失変異と父親由来の 20 番染色体長腕の LOH は、末梢血リンパ球、培養皮膚線維芽細胞、皮膚筋線維腫、髄芽腫で認められ、この 2 つの体細胞変異の起源は同一であることが明らかになった。髄芽腫の染色体核型解析を行ったところ 20 番染色体長腕の欠失は認められなかった。以上より、本症例は初めに母親アレルの GNAS に機能欠失体細胞変異が生じ、すぐ後に父親 20 番染色体長腕が、GNAS 変異が入った母親 20 番染色体長腕と gene conversion を生じ LOH となったことが分かった。そしてこの 2 ヒットは神経外胚葉と中胚葉が別れる前、すなわち原腸陥入以前に生じたことが明らかになった。

III. ポリプテルスの体軀側線感丘は発生を通じて表層に見られる

条鰭類の根幹に位置するポリプテルス *Polypterus senegalus* は、肉鰭類シーラカンスと同様に体表にエナメル質を含む鱗を持つことから、絶滅した条鰭類や硬骨魚の祖先を彷彿とさせる。これら絶滅種の化石記録には、鱗の表面に側線のための孔は存在しない。側線感丘は、器械あるいは化学受容器として頭部や体幹の側部に分布しており、ヒトでは内耳や味蕾と相同であると言われている。現存の硬骨魚の側線は形態的な多様性を極め、一方で四足動物では退化する傾向を示し且つ 3 回の全ゲノム重複を起こしていることから、最も原始の特徴を示す現存の条鰭類ポリプテルスの側線形成過程を、組織形態学ならびに分子生物学的に観察した。

側線感丘を構成する最初の細胞は、ブラコードや側線感丘有毛細胞の分子マーカーである *Eya1* や *Sfrp1* によって確認され始め、孵化後の幼生において表皮内を尾先へ向かって移動する様子が観察された。やがてそれは感丘原基として表皮下層に明瞭なロゼット状構造として認められるのだが、その際基底膜直下に比較的無細胞な領域が生じることが PAM 染色等によって明らかとなった。この比較的無細胞な領域の機能については不明であるが、同様に後方移動するゼブラフィッシュ側線の報告から、後方移動する感丘細胞の通り道、あるいは側線感丘から中枢神経系へ向かって伸長する神経軸索やシュワン細胞が存在している領域ではないかと考察した。この感丘は最終的には表皮内に埋没するようになる。発生を通じて表皮内に存在し、明瞭な管状構造を形

成しないことから、ポリプテルス体軀側線感丘は孔器であると考えられた。

IV. ポリプテルスをを用いた肺、鰾の起源解析

肺は呼吸に重要な器官であるがそれが進化の過程でいつ獲得されたのかは長年多くの研究者の謎であった。近年の系統学や化石学の研究では肺は鰾(ウキブクロ)より先に存在していたと考えられているがそれを直接的に示した実証拠は現在までない。そこで我々はポリプテルスに注目し研究を行なった。ポリプテルスは系統学的に肉鰭類と条鰭類が分岐した後最も早い段階で条鰭類から分岐した系統であり、他の新骨魚とは異なり腹側含気器官(肺)を持つことが知られていた。我々はポリプテルスの肺発生を詳細に解析し、この魚の肺は我々と非常に似た発生機構をもつことを明らかにした。また、肺発生に重要な遺伝子群(*Nkx2.1*, *Fgf10*, *Tbx4*, *Tbx5*)の発現パターンも肺発生と非常に似ていることを見出した。さらに、肉鰭類にのみ存在することが知られていた *Tbx4* の肺エンハンサー(LME)配列がポリプテルスのゲノム上にも存在し、保存されていたことを明らかにした。この配列はそれ以降の条鰭類では挿入・欠損などが起き最終的には消失してしまうことを確認した。さらに、この配列はニワトリ胚の肺で活性を示したことから機能的である可能性を示唆した。これらの実験結果からポリプテルスの腹側含気器官は我々の肺と相同であり、またその発生に関連した遺伝子プログラムも保存されていたことから肺発生プログラムは肉鰭類と条鰭類の共通祖先から持っていたことを世界で初めて示すことができた。これにより、肺が鰾よりも先に存在していたことを示す実証拠が得られた。

V. 続・発生中横隔膜の部位別トランスクリプトーム解析

先天性横隔膜ヘルニアは横隔膜の形成不全を引き起こす指定難病だが、その発症機序はほとんど明らかではない。横隔膜はそれが形成される位置する周囲の異なった細胞群が集まることにより形成されるが、どのような細胞がどの領域を形成するのかの詳細は実は明らかになっていない。横隔膜発生の理解は先天性横隔膜ヘルニアの発症機序を理解する上で非常に重要であり、そのためどのような細胞群から横隔膜が形成されるかを特定することは必要不可欠である。昨年度、横隔膜を6つの領域に分けてトランスクリプトーム解析を行い、その結果、トランスクリプトームの結果で領域別に発現遺伝子の違いに

左右差が存在することが明らかとなった。それら候補遺伝子について解析を行ったところ、横隔膜の領域別 cDNA を使った PCR でも遺伝子発現に差があることを見出した。さらに、それら遺伝子の *in situ* hybridization を行なったところ部位特異的な遺伝子発現があることを明らかにした。今後さらにこれら遺伝子の発現する細胞群の詳細を明らかにすることで先天性横隔膜ヘルニア発症の理解に貢献できると考えられる。

VI. ゼブラフィッシュの鰭における骨連結部の形成機構

熱帯産の小型魚類であるゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)の尾鰭には、膜内骨化により形成される鰭条骨が竿状に存在する。鰭条骨は一定の間隔をもって分節化しており、分節化した骨同士は連結部(joint)を形成している。発生過程において、この連結部の形成は *even-skipped homeobox 1 (evx1)* 遺伝子によって制御されており、*evx1* 遺伝子欠損個体では分節の無い骨が形成されることが報告されている(Schulte CJ, et al. 2011)。骨と骨の間に連結部を形成するメカニズムを探るべく、本研究では連結部形成における *evx1* 遺伝子の機能解析について、医学科ユニット「医学研究」履修学生1名とともに研究を行った。

まず国立遺伝学研究所の川上浩一博士との共同研究のなかで、*evx1* 遺伝子のエクソン領域にスプライスアクセプターと Gal4 遺伝子が挿入された遺伝子組換え系統を同定した。本系統は *evx1* 遺伝子発現細胞を green fluorescent protein (GFP) で可視化することができ、GFP 陽性細胞は連結部に凝集していた。また本系統のホモ個体は、鰭の骨に連結部が形成されなかったことから、本系統は *evx1* 遺伝子破壊系統であることが分かった。さらに学内共用機器である共焦点顕微鏡 (LSM880, Zeiss 社) を用いて細胞形態解析を行ったところ、GFP 陽性の連結部形成細胞は連結部に向けて多数の細胞突起を有していた。また基盤研究施設(分子細胞生物学)に協力いただき、透過型電子顕微鏡を用いて連結部形成細胞を観察したところ、1個の細胞から多数の細胞突起が分枝していた。以上より *evx1* 遺伝子は連結部形成細胞として細胞突起を有する特殊な細胞に分化するために必要である可能性が考えられる。今後は連結部形成細胞の細胞・組織学的性質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)、コース臨床基礎医学のユニット「症候学演習」およびユニット「研究室配属」、コース外国語Ⅲユニット「医学英語専門論文抄読」を担当した。さらに看護学科においては、看護専門基礎科目 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

解剖学講座(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。今年度は英文原著論文5報を発表した。今後も、原著論文および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

教員人事として、2014年4月1日付で長澤竜樹博士がポストドクトルフェローとして着任し、2015年3月1日付で橋本尚詞教授(特任)が教授(定員外)に昇格した。職員人事では、2016年4月15日付で大村マヤが研究補助員として着任した。また今年もTokyo Vertebrate Morphology Meetingが8月6日(土)に南講堂で終日開催された。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、今年で6回目となる。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、今年度は62名の研究者が集い、丸一日のシンポジウムとポスター発表、交流会を行った。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Nagasawa T, Kawaguchi M¹⁾, Yano T, Sano K (Josai Univ), Okabe M, Yasumasu S¹⁾ (¹Sophia Univ). Evolutionary changes in the developmental origin of hatching gland cells in basal ray-finned fishes. *Zoolog Sci* 2016; 33(3): 272-81.
- 2) Miyake T, Kumamoto M, Iwata M, Sato R, Okabe M, Koie H, Kumai N, Fujii K, Matsuzaki K, Nakamura

C, Yamauchi S, Yoshida K, Yoshimura K, Komoda A, Uyeno T, Abe Y. The pectoral fin muscles of the coelacanth *Latimeria chalumnae*: functional and evolutionary implications for the fin-to-limb transition and subsequent evolution of tetrapods. *Anat Rec (Hoboken)* 2016; 299(9): 1203-23.

- 3) Shigetani Y, Wakamatsu Y (Tohoku Univ), Tachibana T, Okabe M. Conversion of neural plate explants to pre-placodal ectoderm-like tissue in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 477(4): 807-13.
- 4) Tatsumi N, Kobayashi R, Yano T, Noda M, Fujimura K, Okada N, Okabe M. Molecular developmental mechanism in polypterid fish provides insight into the origin of vertebrate lungs. *Sci Rep* 2016; 6: 30580.
- 5) Uchiyama T, Tatsumi N, Kamejima S, Waku T, Ohkido I, Yokoyama K, Yokoo T, Okabe M. Hypermethylation of the CaSR and VDR genes in the parathyroid glands in chronic kidney disease rats with high-phosphate diet. *Hum Cell* 2016; 29(4): 155-61.

III. 学会発表

- 1) 重谷安代. (口頭) ポリプテルスの体躯側線感丘は発生を通じて表層に見られる. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 長崎, 3月.
- 2) 辰巳徳史, 小林律子, 西野弘嵩, 長澤竜樹, 矢野十織, 野田真継, 藤村衛至(新潟大), 岡田典弘¹⁾²⁾ (¹FAIS, ²Univ Cheng Kung), 岡部正隆. (ポスター) 肺が先, 鰓が後 ポリプテルスでわかった肺, 鰓の進化. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 長崎, 3月.
- 3) 矢野十織, 長澤竜樹, 西野弘嵩, 岡部正隆. (ポスター) 原始魚類ポリプテルスの実験動物化を目指した基盤整備. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 長崎, 3月.
- 4) 李 鹿璐, 矢野十織, 川上浩一(国立遺伝学研究所), 田村宏治(東北大), 岡部正隆. (口頭) ゼブラフィッシュのヒレにおける骨-連結部パターンの形成機構. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 長崎, 3月.
- 5) 久保優芽佳, 辰巳徳史, 鈴木英明, 岡部正隆. (口頭) 発生期横隔膜の部位別トランスクリプトーム解析. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会. 長崎, 3月.
- 6) Yamamoto-Fukuda T, Tatsumi N, Takahashi M, Akiyama N, Okabe M, Kojima H. (Poster) Neural crest cell might be origin of middle ear cholesteatoma. AOR (Association for Research in Otolaryngology) 40th Annual MidWinter Meeting. Baltimore, Feb.
- 7) 岡部正隆. (シンポジウム: 本当におモロイ生き物

- の分子生物学)脊椎動物の進化発生学研究における「古代魚」ポリプテルス. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 8) 山田 琢, 辰巳徳史, 安楽 茜, 鈴木英明, 亀島佐保子, 大城戸一郎, 横尾 隆, 岡部正隆. (ポスター) Gcm2コンディショナルノックアウトマウスを用いた, マウス成獣副甲状腺におけるGcm2遺伝子の機能解析. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 9) 辰巳徳史, 久保優芽佳, 鈴木英明, 岡部正隆. (ポスター) 発生中横隔膜のトランスクリプトーム解析. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 10) 亀島佐保子, 辰巳徳史, 安楽 茜, 鈴木英明, 大城戸一郎, 横尾 隆, 岡部正隆. (ポスター) 虚血再還流モデルを用いたマウス腎臓におけるGcm1遺伝子の機能解析. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 11) 重谷安代. (口頭) 神経板外植片培養法による神経板の前ブラコード外胚葉組織への転換. 東京慈恵会医科大学基礎教員連絡会. 東京, 11月.
- 12) 重谷安代, 若松義雄(東北大), 立花利公, 岡部正隆. (ポスター) 神経板外植片培養法による神経板の前ブラコード外胚葉組織への転換. 第133回成医会総会. 東京, 10月.
- 13) 辰巳徳史, 小林律子, 矢野十織, 野田真継, 藤村衛至(新潟大), 岡田典弘^{1),2)}(¹FAIS, ²Univ Cheng Kung), 岡部正隆. (ポスター) ポリプテルスは四足動物と共通した肺を持つ. 第6回Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 東京, 8月.
- 14) 重谷安代, 矢野十織, 岡部正隆. (ポスター) ポリプテルス側線感丘の形態形成. 第6回Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 東京, 8月.
- 15) Tsukiji N¹⁾, Inoue¹⁾, Tatsumi N, Shirai T¹⁾, Tamura S¹⁾, Sasaki T¹⁾, Sato K¹⁾, Okabe M, Ozaki Y¹⁾Suzuki-Inoue K¹⁾ (¹Univ Yamanashi). (Poster) CLEC-2 on platelets is essential for alveogenesis and respiratory function by regulating differentiation of lung mesothelial cells. JSDB (Japanese Society of Developmental Biologists) Special Symposium: Frontier of Developmental Biology Hosted by JSDB. Tokyo, June.
- 16) Shigetani Y, Yano T, Okabe M. (Poster) Morphogenesis of lateral line neuromast in the trunk of Polypterus. ISOT2016 (17th International Symposium on Olfaction and Taste). Yokohama, June.
- 17) 岡部正隆. (特別企画5: 目からウロコの基礎医学) ご先祖さまの上陸作戦. 第115回日本皮膚科学会総会. 京都, 6月.
- medical research. 東京慈恵会医科大学第21回医学生のための先端医学セミナー. 東京, 11月.

V. その他

- 1) 李 鹿璐. (Oral) Zebrafish as a tool for basic