

ける献体制度「慈恵白菊会」. 第134回成医学会. 東京, 10月.

- 2) 米永健徳, 橋本 透. (口頭) 環軸関節・椎間関節・仙腸関節. 日本医学放射線学会関東地方会セミナー. 東京, 2月.
- 3) Negishi Y, Kawai Y. (Poster) Differential topographic projections of central afferents to the visceral sensory nucleus. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 東京, 3月. [第123回日本解剖学会総会・全国学術集会講演プログラム・抄録集 2018: 155]

#### IV. 著 書

- 1) 山口真紀, 橋本 透訳. 3章: 筋骨格系 V. 骨格筋. 栗原 敏監修, 大橋十也, 岡野ジェイムス洋尚, 本郷賢一, 横尾 隆監訳. イラストレイテッド統合臨床基礎医学: リッピンコットシリーズ. 東京: 丸善出版, 2018. p.132-48.
- 2) 伊藤宗成, 橋本 透, 前田和洋, 山口真紀訳. 3章: 筋骨格系 学習問題. 栗原 敏監修, 大橋十也, 岡野ジェイムス洋尚, 本郷賢一, 横尾 隆監訳. イラストレイテッド統合臨床基礎医学: リッピンコットシリーズ. 東京: 丸善出版, 2018. p.167-71.

## 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. 先天性後肢運動失調マウスの C57BL/6J 系へのコンジェニック化

我々の研究グループで開発し, 系統維持している先天性後肢運動失調マウスは元がクローズドコロニーの ICR であるため, 運動失調発症に連鎖した領域の遺伝子解析を行ったところ, SNPs やインデルという遺伝子変異が多く, どの遺伝子変異が運動失調の原因であるかを特定するのが困難であった。そこで, 運動失調発症の責任遺伝子座を特定するために, 近交系である C57BL/6J 系統にコンジェニック化を行うべく, 交配を繰り返している。仔の表現型からヘテロであることが確定された雄マウスを C57BL/6J 系統の雌マウスと交配させ, 仔の雄の遺伝子型を確認して ICR のヘテロ雌と交配させ, その仔に発症個体が確認されることで, 交雑の1代目のヘテロ雄個体であることを確定した。続いて, このヘテロ雄を用いて同様の手法で交配を繰り返し, 第10代目のヘテロ雄個体を得ることができた。この間, 交雑第7代目の雌雄を交配させて得られた運動失調発症個体を病理組織学的に検索したところ, ICR での発症個体と同様の変化が確認された。また, この経過中, 遺伝子型ではヘテロであるにも拘わらず, ヘテロ確定雌と交配しても仔に運動失調が発症しない個体が見出された。そのため, 現在は遺伝子型での選別を行わず, ヘテロ確定雌との交配で得られた仔の表現型に基づいてヘテロであるか否かの判断を行い, さらにコンジェニック化を進めている。

##### II. 小腸上皮単一細胞 RNA-seq データの再解析

近年, 一細胞ごとの転写産物を網羅的に解析する方法 (single-cell RNA-seq: scRNA-seq) が開発された。これにより, 組織における細胞の多様性が明らかになり, 新規の細胞種やそのマーカー, これまで分からなかった細胞の分子レベルでの分化過程などが明らかになってきている。こうした解析のデータは膨大な量になるため, 論文に掲載できない生データは公開が義務づけられている。こうした

データは、データベース（例えば Gene Expression Omnibus (GEO) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)）からダウンロード可能で、自由にデータを再解析することができる。

本年はこうしたビッグデータを探索するのに必要なバイオインフォマティクス技術の獲得を目的に、公開されている小腸上皮細胞の scRNA-seq データの再解析を試みた。再解析したデータは GEO データ GSE76408 である。クマスタ解析には、Grün らが開発した R プログラム RaceID3\_StemID2 ([https://github.com/dgrun/RaceID3\\_StemID2](https://github.com/dgrun/RaceID3_StemID2)) を用いた。672 個の小腸上皮細胞は 18 のクラスターに分類された。特にこのうち 6 つは消化管内分泌上皮に関与するクラスターで、ほとんどの成熟消化管内分泌上皮は複数の消化管ホルモンを産生していることがわかった。また Neurog3, Smadcd2 が発現する初期消化管内分泌上皮前駆細胞が、Nkx2.2, Neurod1 の発現から Isl1, Arx の発現を経て Ghrelin を発現する後期消化管内分泌上皮前駆細胞へと分化していくことが推測された。

### Ⅲ. ポリプテルス側線移動時における基底膜の変化

分岐系統樹上で条鰭類の最も根幹に位置するポリプテルスは、体躯に表層型感丘を持つ。そこで今回はその感丘の形成過程に着目し、後方移動時の動態について調べた。

幼生において感丘を構成することになる頭部外胚葉上の細胞集団は、水平中隔に接する表皮下層を後方へ移動する。この細胞集団は、1 つ分の感丘を構成する細胞群を表皮下層に形成しつつ後方へ移動し、これを繰り返しながら尾鰭まで達した。移動する細胞集団の近傍には比較的細胞が不在の領域が存在し、初めは基底膜の外側に観察されるのだが、次第に基底膜の内側に位置するようになった。細胞不在領域は抗神経ニューロフィラメント関連タンパク質抗体染色陽性であり、このことは当該領域の MALDI-TOF 質量分析を行った結果からも支持された。つまり感丘細胞の後方移動途中で、頭部脳神経線維束が感丘へと伸長する際に基底膜の破壊が起こり、再編成が済むと今度は基底膜下に側線神経として位置するようになると考えられた。

### Ⅳ. GONAD 法を用いた遺伝子改変マウス作製技術の検証

近年、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集が可能となり、それに伴い新たな実験手法が開発された。その中でマウス卵管内受精卵ゲノム編集法として

GONAD 法が発表され (Takahashi G, et al. Sci Rep 2015), より簡便にゲノム編集されたマウスの作製が可能になった。本研究室で GONAD 法が可能になればより安価で素早くマウスの実験を行うことが可能になる。そこで、プロトコルを参考に Fgf10 の guideRNA を用いて GONAD 法の検証を行った。その結果、論文と同様の四肢が不形成な個体を得ることが出来た。今後はさらに条件検討を重ね CRISPR/Cas9 によるノックインマウス作製を行う予定である。

### V. Dextran sulfate sodium 大腸炎マウスにおいて微小循環系の変化が腸炎発症に及ぼす影響の解析

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) は、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) に代表される再燃と寛解を繰り返す難治性の慢性炎症性疾患である。これまでの研究において、粘膜上皮障害に関して様々な研究報告はあるが、大腸粘膜内の微小循環系の変化と上皮障害との関係性を検討した報告はない。我々は、腸炎発症における微小循環系の関与を明らかにするために、UC のモデルマウスとして使用されている DSS (Dextran sulfate sodium) 腸炎誘発マウスを用いて、腸炎発症過程における粘膜内循環系と微小環境の変化を解析した。その結果、上皮障害に先行する微小血管障害が、大腸の栄養血管である上腸間膜動脈および下腸間膜動脈から遠位に位置する下行結腸を中心に出現していた。その後、筋層間神経叢の神経細胞において過剰発現により組織障害を誘発する iNOS の発現が増加していた。

これらのことより、DSS 大腸炎は血管障害による微小循環障害によって上皮障害が誘発され、その後の腸炎悪化には神経細胞由来の iNOS が関与していることが示唆された。特に、血管障害は解剖学的に血流の乏しい下行結腸から発生しており、その病態は人の虚血性腸炎の発生と類似していた。人の潰瘍性大腸炎においても粘膜微小循環系に着目することで、炎症再燃の早期発見を可能にし、新たな病態解明に役立つことが期待される。

### Ⅵ. ゼブラフィッシュをモデル生物とした骨の発生と再生機構解析

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は受精から約 5 日で摂餌を開始するほどに器官発生・形成を短期間に完了する脊椎動物である。また成魚においては器官 (鰭 (ひれ)) を人為的に欠損させると、約 14

日で元通りの形態・機能にまで再生する能力を有する。ゼブラフィッシュのこうした特性を生かし、「隣り合う軟骨内化骨と膜内化骨が同じ側板中胚葉から形成される鰭の発生機構」ならびに「鰭の膜内化骨に形成される連結部 (joint) の形成機構」について本年度は解析を行った。

軟骨内化骨形成領域と膜内化骨形成領域とを分離して発生させる機構として、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖修飾が関与している可能性を前年度までに見いだした。そこで関連シグナル因子 (hoxa13a, rspo2, prrx1a, gpc1b) の遺伝子発現状態を *in situ* hybridization 法にて解析したところ、糖鎖修飾酵素遺伝子の変異胚と野生型胚との間には明確な差異が無かった。したがって今後はヘパラン硫酸プロテオグリカンが持つ物理的な ECM の硬さと器官形成との関連性に着目して研究を継続する予定である。

また鰭の膜内化骨間に生じる連結部の形成機構を明らかにする上で、生理学研究所ならびに自治医科大学解剖学講座組織学部門の大野伸彦先生と共同研究を計画し、SBF-SEM 法による SEM 連続断面観察を行った。連結部を敷石状に覆う特殊な細胞が存在することなど、従来の SEM・TEM では確認できなかった構造物を多数見つけることができた。今後はヒトの可動関節・不動関節との相違を解析することにより、ゼブラフィッシュの医学研究利用について検討する予定である。

## 「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のユニット「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、ユニット「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のユニット「症候学演習」およびコース研究室配属、コース外国語Ⅲのユニット「医学英語専門論文抄読Ⅰ」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。コース研究室配属においては医学科3年生6名を受け入れて実習を行った。コース医学総論のユニット「医学研究」を履修する学生は、医学科3年生2名、4年生3名、5年生1名であったが、このうち、3年生の姫岩翔子、4年生の井上龍太郎、久保優芽佳、5年生の李鹿路が国内外の学会にて筆頭で発表を行った。

### 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2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、2017年7月1日付で西條広起が助教として着任した。西條助教は内科学講座 (消化器・肝臓内科) から異動した。また今年も Tokyo Vertebrate Morphology Meeting が7月14日 (金) 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7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、今年は71名の研究者が参加し、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) Noda M, Miyake T, Okabe M. Development of cranial muscles in the actinopterygian fish *Senegal bichir*, *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829. *J Morphol* 2017; 278(4): 450-63.
- 2) Hashimoto H, Kawabe T, Fukuda T, Kusakabe M. A novel ataxic mutant mouse line having sensory neuropathy shows heavy iron deposition in kidney. *Neurodegener Dis* 2017; 17(4): 181-98.

### Ⅲ. 学会発表

- 1) 亀島佐保子, 辰巳徳史, 安楽 茜, 鈴木英明, 内山威人, 大城戸一郎, 横尾 隆, 岡部正隆. 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60回日本腎臓学会学術総会. 仙台, 5月.
- 2) 山田 琢, 辰巳徳史, 安楽 茜, 鈴木英明, 亀島佐保子, 大城戸一郎, 内山威人, 岡部正隆, 横尾 隆. 成獣マウス副甲状腺における *Gcm2* 遺伝子の機能解析. 第60回日本腎臓学会学術総会. 仙台, 5月.
- 3) 築地長治, 井上 修, 辰巳徳史, 岡部正隆, 森本 充, 植田康司, 平島正則, 佐々木知幸, 白井俊光, 田村彰吾, 大竹志門, 佐藤金夫, 尾崎由基男, 井上克枝. 血小板による CLEC-2-Podoplanin シグナルを介した新たな肺胞形成メカニズム. 第39回日本血栓止血学会

- 学術集会, 名古屋, 6月. [日血栓止血会誌 2017; 28(2): 210]
- 4) 辰巳徳史, 久保優芽佳, 鈴木英明, 岡部正隆. 発生期横隔膜のトランスクリプトーム解析. 第7回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 東京, 7月.
  - 5) Kusakabe M, Kawabe T, Hashimoto H. Sequencing analysis of the novel hereditary ataxic mouse. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Chiba, July.
  - 6) 長澤竜樹, 川口眞理, 矢野十織, 安増茂樹, 岡部正隆. 真骨魚類の進化過程において孵化酵素遺伝子は intron を失いながら, 頻繁に retrotranslocation を起こした. 日本進化学会第19回大会. 京都, 8月.
  - 7) Yano T, Tamura K, Okabe M. Glycosylation-mediated skeletogenesis in zebrafish pectoral fins. 第23回小型魚類研究会. 甲府, 8月.
  - 8) Li L, Yano T, Kawakami K, Tamura K, Okabe M. Positioning of fin ray joints during fin regeneration in zebrafish. 第23回小型魚類研究会. 甲府, 8月.
  - 9) Nagasawa T, Kawaguchi M, Yano T, Yasumasu S, Okabe M. The intron-loss evolution by tetrotranslocation in Teleost -using the hatching enzyme genes as a model-. 第23回小型魚類研究会. 甲府, 8月.
  - 10) 長澤竜樹, 川口眞理, 矢野十織, 安増茂樹, 岡部正隆. 真骨魚類の進化過程において孵化酵素遺伝子が頻繁に経験した retrotranslocation と intron-loss の関係. 日本動物学会第88回富山大会. 富山, 9月.
  - 11) 井上龍太郎, 重谷安代, 岩本武夫, 岡部正隆. 原始的魚ポリプテルスの発生過程に観られる体軀側線感応の無細胞領域の MALDI-TOF 質量分析. 第134回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2017; 132(6): 141]
  - 12) 姫岩翔子, 辰巳徳史, 長澤竜樹, 矢野十織, 岡部正隆. チョウザメの浮き袋は鰾 (ウキブクロ) なのか? 第134回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2017; 132(6): 141-2]
  - 13) Yamada T, Tatsumi N, Kamejima S, Uchiyama T, Ohkido I, Okabe M, Yokoo T. Functional analysis of Gcm2 in adult Gcm2 conditional knockout mice. ASN (American Society of Nephrology) Kidney Week 2017. San Diego, Nov.
  - 14) 重谷安代, 井上龍太郎, 岡部正隆. ポリプテルスの側線移動時における基底膜の変化. 第40回日本分子生物学会年会. 神戸, 12月.
  - 15) Yano T, Li L, Saitoh S, Kawakami K, Sano H, Tamura K, Ohno N, Okabe M. Maintenance and injury-induced regeneration of joint tissues in zebrafish fins. CDB Symposium 2018: Dynamic Homeostasis: from Development to Aging. Kobe, Mar.
  - 16) 井上龍太郎, 重谷安代, 岩本武夫, 岡部正隆. MALDI-TOF を用いたポリプテルス側線感応丘形成予定表皮の網羅的分子解析. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 東京, 3月. [第123回日本解剖学会総会・全国学術集会講演プログラム・抄録集 2018; 135]
  - 17) 辰巳徳史, 久保優芽佳, 鈴木英明, 岡部正隆. (日本解剖学会シンポジウム3: 発生過程の細胞集団からみる解剖学) 横隔膜の部位別トランスクリプトーム解析からみる細胞集団の相違性. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 東京, 3月. [第123回日本解剖学会総会・全国学術集会講演プログラム・抄録集 2018; 76]
  - 18) 姫岩翔子, 辰巳徳史, 長澤竜樹, 矢野十織, 岡部正隆. チョウザメの含気器官の組織学的分子生物学的解析と鰾の起源に関する考察. 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 東京, 3月. [第123回日本解剖学会総会・全国学術集会講演プログラム・抄録集 2018; 192]
  - 19) 西條広起, 岡部正隆, 橋本尚詞. 実験的大腸炎モデルマウスにおける Vascular endothelial growth factor の影響と粘膜障害との関連性. [第123回日本解剖学会総会・全国学術集会講演プログラム・抄録集 2018; 177]

#### IV. 著 書

- 1) 橋本尚詞, 鯉淵典之 (群馬大) 編著. 解剖生理学: 新体系看護学全書: 人体の構造と機能①. 第3版. 東京: メヂカルフレンド社, 2017.