

of spontaneous oscillatory synchrony in the vagal complex. *Front Neurosci* 2018; 12: 978.

- 2) Kawai Y. Differential ascending projections from the male rat caudal nucleus of the tractus solitarius: an interface between local microcircuits and global macrocircuits. *Front Neuroanat* 2018; 12: 63.

III. 学会発表

- 1) Negishi Y, Kawai Y. Organization of projections from the central nervous system to the visceral sensory nucleus of the rat. 第41回日本神経科学大会. 神戸, 7月.
- 2) 根岸義勝, 河合良訓. ラット尾側孤束核に投射する中枢性軸索の背腹軸に沿った層状分布. 第135回成医学会総会. 東京, 10月.

解剖学講座 組織・発生

講座担当教授:	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:	師: 重谷 安代	神経発生学, 進化発生学

教育・研究概要

I. 緩衝液組成が免疫染色性に及ぼす影響

新たな抗体を入手し、ポジティブコントロールの組織を染めようとしても陽性反応が得られないことがある。通常は4%パラフォルムアルデハイド(PFA)の0.1Mリン酸緩衝液で固定した組織を用いるが、陽性反応が出ない場合には前処理による抗体浸透性の改善や抗原賦活化を試みる。それでも反応が得られない場合には、PFAの濃度を下げたり、PFAを用いない固定液に変更したりする。今回、固定液の主成分である4%PFAと0.1%GAをそのままに、緩衝液をHEPESに変更して固定し、免疫染色時の緩衝液をリン酸緩衝液からトリス-塩酸緩衝液に変更したところ、これまで陽性反応を得られなかった抗体で明瞭な染色性を得ることができた。

HEPES緩衝の固定液で得られた画像は、リン酸緩衝液に比べて、やや硬質で鮮明であり、若干の自家蛍光の増加が認められた。緩衝液の変更によって免疫染色性が得られた抗原は、神経系のCa結合タンパク質や膜タンパク質である。HEPES緩衝液は微細形態の観察に、カコジル酸緩衝液に代わるものとして利用され始めたものである。リン酸緩衝液は組織内のCaとリン酸が結合して沈着したり、あるいはタンパク質に結合しているCaを奪ってしまってタンパク質の構造変化を起こさせてしまう可能性が指摘されている。この沈着したリン酸Caが抗体の浸透を阻害したり、タンパク質の構造変化が抗体との反応性を低下させてしまったりしていたと推測される。HEPES緩衝液はどのような抗体にも有効というわけではないが、リン酸緩衝液で反応が得られない場合は試みる価値はあるものと思われる。

II. ポリプテルスの側線後方移動時における基底膜の変化と感丘形成

分岐系統樹上で条鰭類の最も根幹から分岐したポリプテルス属は、鱗の形態的分類ではエナメル質や

象牙質を持つことから総鰭類シーラカンスを彷彿とさせる。原始的硬骨魚に近いと考えられるポリプテルスにおいて、鱗形成にもっとも関連の深い体躯側線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。

側線感丘を構成する最初の細胞はブラコードとして神経胚頭部外胚葉に現れ、これら細胞集団は幼生期に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、表皮下層に一つ分の感丘を構成する細胞群を残しロゼット様構造を形成しつつ後方へ移動し、これを何度か繰り返しながら尾鰭まで達する。このとき感丘直下にはPAM染色陽性かつSEM電子顕微鏡像として認められるような基底膜は存在せず、そして抗神経細胞間タンパク質抗体や抗GFAP抗体陽性な神経束から伸びる神経突起が感丘内部の細胞に接する様子が観察された。また感丘から離れたところではその神経束は基底膜の下側に位置しており、かつ頭部神経節に接する様子が観察されたことから、側線神経束であることが確実となった。従って側線後方移動時には、頭部神経から伸びる側線神経束は基底膜よりも外側で感丘細胞へと接し、感丘直下以外では神経束の外側に基底膜を再編成することが示唆された。

Ⅲ. マウス *Glial cell missing* (*Gcm*) ファミリー遺伝子の機能解析

転写因子 *Gcm1* は哺乳類では *Gcm1* と *Gcm2* の2種類が報告されており、それぞれ異なった領域で発現し、その発生領域で重要な働きを担うことが知られている。マウスの *Gcm1* は胎盤発生期で発現し、欠損マウスは胎盤形成不全を引き起こし胎生致死となる。*Gcm2* は副甲状腺発生領域で発現し、欠損マウスは生体内のCa調節不全で生後すぐに致死となる。*Gcm* ファミリーの欠損はいずれも致死となるため、生後の *Gcm* ファミリーの機能を明らかにするには領域、時期特異的な遺伝子欠損解析が必須となる。我々は *Gcm1* と *Gcm2* における機能解析のためにそれらのDNA結合領域をLoxP配列で挟んだマウスを作成し、領域や時期特異的Creマウスと掛け合わせ解析を行った。

1. マウス *Gcm1* は胎盤以外に腎臓での発現が指摘されており、*in situ hybridization* で確認した結果、腎臓の尿管管域に発現が認められた。そこで、我々は腎臓での *Gcm1* の機能を明らかにするために尿管管の由来元である後腎間葉で特異的に *Gcm1* を欠損したマウス (*Wt1-Cre* × *Gcm1*^{Flax/Flax}) を用いて解析を行った。その結果、*Gcm1* を欠損した腎

臓は大きさ形態、機能には特に変化が認められなかったが、虚血障害を与えると *Gcm1* を欠損した腎臓において障害回復期の細胞増殖の低下及び線維化マーカー遺伝子の発現低下が認められた。このことから、腎臓における *Gcm1* の機能は虚血障害時の回復に関与している可能性が明らかとなった。

2. *Gcm2* は生涯を通じて副甲状腺で発現し、発生期は副甲状腺の発生に関与することが明らかであるが、生後の機能は不明である。そこで、成獣のマウスを用いて *Gcm2* の副甲状腺での機能を明らかにするためにタモキシフェン誘導による時期特異的な *Gcm2* 欠損解析を行った。生後8週のマウス (*ERT-2Cre* × *Gcm2*^{Flax/Flax}) にタモキシフェンを投与し、*Gcm2* を欠損したところ、欠損1ヶ月目では副甲状腺の大きさ、関連遺伝子の発現や血中のカルシウム濃度などに変化は見られなかったが、副甲状腺に胞状の構造が観察された。*Gcm2* を欠損してから7ヶ月経過すると副甲状腺は縮小し、関連遺伝子の発現低下、カルシウム濃度の低下などが起こり、副甲状腺の機能低下障害が起きた。欠損1ヶ月目で見られた胞状の構造はさらに顕著に観察され、形態も著しく変化していた。細胞増殖、細胞死を観察すると欠損1ヶ月目より細胞増殖に低下が認められ、7ヶ月目では細胞増殖の低下、細胞死の増加が認められた。これらのことから、生涯を通じて副甲状腺で発現している *Gcm2* は生後も副甲状腺細胞の数、形態、機能のすべての維持に関与していることが明らかとなった。

Ⅳ. 鰾の起源についての解析

条鰭類がどのように鰾を獲得したのかを明らかにするために、系統的に分岐の早いチョウザメ、ガー、一般的な実験動物として使われるゼブラフィッシュらの鰾と、肺を持つ原始的な条鰭類のポリプテルスを比較解剖した結果、鰾が分岐する領域がそれぞれの魚で異なっていることが明らかとなった。ガーの鰾はポリプテルスの肺と同様に食道の入り口(哺乳類における喉頭)から分岐していた。ゼブラフィッシュの鰾は食道の中央部で分岐しており、チョウザメの鰾はそれよりも更に後方の胃の入り口から分岐していた。肺発生に関連したエンハンサーの解析では、ポリプテルスはこの領域が保存されているのに対し、ガーは一部で塩基の挿入欠損が認められ、ゼブラフィッシュではほとんど保存されておらず、チョウザメでは完全に欠損していた。これらの結果は鰾の獲得は肺から発生パターンを引き継いだガーのような鰾と肺発生パターンを失って発生領域が後

方化したゼブラフィッシュやチョウザメの鰓が存在している可能性を示唆した。これは鰓獲得に関して肺と鰓の関係をj知る上で重要な知見となった。

V. DSS 誘発マウス大腸炎モデルにおける miR-155 の機能解析

難治性疾患の潰瘍性大腸炎 (UC) は、長期間の寛解維持が QOL を向上させる。しかし、現行の治療法で長期間寛解を維持できている症例は少なく、新たな治療法が切望されている。今回、腸炎発症・再燃阻止の鍵となる分子機構を解明するために、UC のモデルマウスとして頻用される Dextran sulfate sodium (DSS) 誘発腸炎マウスを DSS に対して感受性の高い C57BL (WT) マウスと感受性の低い miR-155 ノックアウト (KO) マウスで作成し、解析を行った。その結果、DSS の投与による大腸粘膜の病理学的変化として、WT では上皮細胞の脱落、陰窩の消失、粘膜固有内に著明な炎症細胞浸潤を認めたが、miR-155 KO では、組織障害が観察されなかった。次に、WT での腸炎誘発前後における miR-155 の発現量を real time PCR 法で測定したところ、DSS 投与後に miR-155 の発現量の増加が認められた。以上より、腸炎発症・増悪に miR-155 が関与していることが示唆された。現在、WT において miR-155 の腸炎発症前後における発現部位を *in situ hybridization* 法で検証している。これらの実験から得られたデータを元に、大腸粘膜の恒常性維持機構を明確にし、miR-155 の阻害が UC における寛解維持の新規治療法となるかを検証する。

VI. ゼブラフィッシュの骨連結形態と形成機構

骨と骨の連結様式は、関節包・滑液を有した可動関節と、線維性結合組織や骨・軟骨によって結び付けられた不動関節に大別される。脊椎動物のモデル生物として用いられる熱帯産の小型魚類・ゼブラフィッシュの鰭の骨は、膜内 (膜性) 骨化によって形成される竹筒状の小骨が十数個直列に連結した構造をしており、小骨同士の連結部分は節間靭帯と呼ばれる線維性結合組織によって構成されていることが古くから知られていた。

我々は昨年度までに、この節間靭帯の領域に関節腔に似た領域が存在することを、電子顕微鏡を用いた組織学的解析により見出した。そこで本年度は鰭の骨連結部において組織染色を施し、詳細な解析を行った。

関節腔とおぼしき空所に接した骨面は、ヘマトキシリン陽性ならびにアルシアンブルー陽性であっ

た。PAS 染色では骨面のみならず骨全体が陽性となった。したがって骨連結部には中性ムチンのような細胞外マトリックスが存在する可能性が示唆された。そこで四肢動物における滑液マーカー (CD44 ならびに LUBRICIN/PRG4) に着目し、*in situ hybridization* 法を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、*prg4a* 遺伝子の発現が観察された。鰭切断後の再生組織においてはこのシグナルは観察できないことから、骨連結形成の最終分化段階において滑液の産生がおこる可能性が示唆された。鰭の骨連結部には関節軟骨が存在しないため、四肢動物における可動関節と同一の構造では無いが、今後はこのユニークな関節構造を用いた基礎医学研究を展開する。

「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 I 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 7 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 2 年生 1 名、3 年生 1 名、4 年生 3 名、5 年生 3 名、6 年生 1 名であったが、このうち、4 年生の姫岩翔子、藤田由見、5 年生の久保優芽佳、6 年生の李 鹿璐が国内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 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

今年も Tokyo Vertebrate Morphology Meeting が 2018 年 8 月 4 日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8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、今年では77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) Tsukiji N, Inoue O, Morimoto M, Tatsumi N, Nagatomo H, Ueta K, Shirai T, Sasaki T, Otake S, Tamura S, Tachibana T, Okabe M, Hirashima M, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. Platelets play an essential role in murine lung development through Clec-2/podoplanin interaction. *Blood* 2018; 132(11): 1167-79.
- 2) Hirasaki Y, Tomita T, Yanagisawa M, Ueda K, Sato K, Okabe M. Heart anatomy of *Rhinocodon typos*: three-dimensional X-ray computed tomography of plastinated specimens. *Anat Rec (Hoboken)* 2018; 301(11): 1801-8.
- 3) Suzuki H, Nishida H, Kondo H, Yoda R, Iwata T, Nakayama K, Enomoto T, Wu J, Moriya-Ito K, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Kishida T, Okabe M, Suzuki Y, Ito T, Hirota J, Nikaido M. A single pheromone receptor gene conserved across 400 My of vertebrate evolution. *Mol Biol Evol* 2018; 35(12): 2928-39.
- 4) Yamada T, Tatsumi N, Anraku A, Suzuki H, Kamejima S, Uchiyama T, Ohkido I, Yokoo T, Okabe M. *Gcm2* regulates the maintenance of parathyroid cells in adult mice. *PLoS One* 2019; 14(1): e0210662.
- 5) Nagasawa T, Kawaguchi M, Yano T, Isoyama S, Yasumasu S, Okabe M. Translocation of promoter-conserved hatching enzyme genes with intron-loss provides a new insight in the role of retrocopy during teleostean evolution. *Sci Rep* 2019; 9(1): 2448.

III. 学会発表

- 1) Yano T, Li L, Saitoh S, Kawakami K, Sano H, Tamura K, Ohno N, Okabe M. Morphological and functional joint formation in zebrafish fins. *Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB) 5th Conference*. Tavira, Apr.
- 2) Yamamoto-Fukuda T, Tatsumi N, Akiyama N, Takahashi M, Okabe M, Kojima H. Neural crest cell lineages were observed in middle ear cholesteatoma in animal model. *6th East Asian Symposium on Otolaryngology (EASO 2018)*. Seoul, May.
- 3) 岡部正隆. (シンポジウム3: 耳鼻咽喉科疾患と睡眠) 脊椎動物の呼吸器官の発生と進化. 日本睡眠学会第43回定期学術集会. 札幌, 7月.
- 4) Yano T, Li L, Saitoh S, Kawakami K, Sano H, Tamura K, Ohno N, Okabe M. Histological and molecular analyses of the joint architecture in zebrafish fins. 第24回小型魚類研究会. 名古屋, 8月.
- 5) 重谷安代, 井上龍太郎, 岡部正隆. ポリプテルス側線感丘後方移動時の基底膜の変化. 日本動物学会第89回札幌大会. 札幌, 9月.
- 6) 西條広起, 岡部正隆, 橋本尚詞. Dextran sulfate sodium 大腸炎における vascular endothelial growth factor の影響と粘膜障害との関連性. 日本解剖学会第106回関東支部学術集会. 東京, 10月.
- 7) 藤田由見, 矢野十織, 川上浩一, 岡部正隆. ゼブラフィッシュ頭蓋縫合の形成における *even-skipped homeobox 1* 遺伝子の関与 (成医会優秀発表ポスター賞). 第135会成医会総会. 東京, 10月.
- 8) 辰巳徳史, 久保優芽佳, 鈴木英明, 岡部正隆. 発生期横隔膜の初代培養を用いた左右差の解析. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 9) 李 鹿璐, 藤田由見, 矢野十織, 川上浩一, 岡部正隆. ゼブラフィッシュの骨連結部 (joint) に局在する *even-skipped homeobox 1* 遺伝子発現細胞の挙動解析. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 10) 重谷安代, Hukom FD, Iwata M, 岡部正隆. 硬骨魚の側線鱗とそれに付随する感丘の比較形態からみるプロトタイプ. 第41回日本分子生物学会. 横浜, 11月.
- 11) Yamamoto-Fukuda T, Tatsumi N, Akiyama N, Okabe M, Kojima H. Regulator of middle ear cholesteatoma formation: neural crest derived cell under KGF initiation. Association for Research in Otolaryngology (ARO) 42nd Annual MidWinter Meeting. Baltimore, Feb.
- 12) 古賀夢乃, 矢野十織, 岡部正隆. ゼブラフィッシュ尾鱗の骨長計測による成長変化の評価. 日本動物学会関東支部第71回大会. 東京, 3月.
- 13) 矢野十織, 岡部正隆. 条鰭類の鰭条骨関節の組織学的形態と分子特性. 日本動物学会関東支部第71回大会. 東京, 3月.
- 14) 藤田由見, 矢野十織, 川上浩一, 岡部正隆. ゼブラフィッシュの頭蓋縫合において *even-skipped homeobox 1* 遺伝子は骨成長制御に関与する. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 15) 矢野十織, 李 鹿璐, 齊藤 成, 川上浩一, 佐野 瞳, 田村宏治, 大野伸彦, 岡部正隆. ゼブラフィッシュの鰭における骨連結部の組織学的形態と形成機構. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 16) 古賀夢乃, 矢野十織, 岡部正隆. ゼブラフィッシュ尾鱗をモデルとした形態成長におけるプロポーシ

制御機構の解析. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.

- 17) 久保芽佳, 辰巳徳史, 鈴木英明, 岡部正隆. トランスクリプトーム解析による横隔膜の発生で発現する新たな遺伝子の探索. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 18) 姫岩翔子, 辰巳徳史, 長澤竜樹, 矢野十織, 岡部正隆. 条鰭類の鰓の起源の検討. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 19) 辰巳徳史, 岡部正隆. 発生期横隔膜の初代培養法の確立と部位別レチノイン酸応答能の比較解析. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 20) 重谷安代, 立花利公, 岡部正隆. ポリプテルスの側線感丘後方移動時の基底膜の変化. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.

IV. 著 書

- 1) 矢野十織, 阿部玄武, 岡部正隆, 田村宏治. 3. 動物の進化 脊椎動物の上陸-水面の下でつくり込まれた陸生装備. 日本動物学会編. 動物学の百科事典. 東京:丸善出版, 2018. p.162-3.
- 2) 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. 第2版. 東京:朝倉書店, 2019. p.53-61.

分子生理学講座

講座担当教授: 竹森 重 筋生理学, 体力医学
 准 教 授: 山口 眞紀 筋生理学, 体力医学
 准 教 授: 山澤徳志子 筋生理学, 薬理学, 体力医学
 講 師: 大野 哲生 筋生理学, 体力医学

教育・研究概要

I. 示唆走査熱量測定 (DSC) 法による骨格筋細胞内水の相転移の観察

骨格筋細胞内には状態の異なる少なくとも5種類の水があることが核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究で明らかになっている。この違いは水分子と周囲の相互作用で形成されることを解明したが, この水分子と周りの分子との相互作用の解釈には複数あり, 一義的にはわかっていない。

NMR も MRI もどちらも水分子プロトンのスピンをみる方法であるが, これらの方法とは異なる観点で水分子の状態をみるのが DSC 法である。この方法は温度変化に伴う比熱変化, つまり氷が水に融けるような相転移の検出に優れており, その温度変化で形成/崩壊する水分子や周りの分子との分子間相互作用変化を熱エネルギーとして検出できる。

DSC 法によるこれまでの研究により, ウシガエルの除膜筋線維 (スキンドファイバー) 内には -10°C 以下に融解ピークを持つ水が少なくとも2種類あることを解明した。これらの融解ピークは Dergers らの研究によりわかっているミオシンやアクチンの変性温度まで加熱すると, それぞれの融解ピークの大きさが特異的に変化することも明らかになった。さらにミオシンフィラメントやアクチンフィラメントを選択的に除去したスキンドファイバーでも融解ピークの大きさが変化することが分かった。

今年度は, これまで行っていた ATP のない硬直状態のスキンドファイバーの計測結果が ATP の有無に影響されるかを確かめるため, 収縮力を評価項目として ATP のある弛緩状態と ATP のない硬直状態でのスキンドファイバーの熱安定性に大きな違いがあるかを検討した。硬直, 弛緩のそれぞれの状態で 30°C , 60 分間の熱負荷を与えた場合に熱負荷の前後での収縮力低下に違いがあるかを検討すると, どちらも熱負荷前の 80% 程度まで収縮力は低下したが, 硬直状態と弛緩状態での違いは認められなかった。これより, 今まで計測してきた硬直状態の