

令和元年6月17日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08139

研究課題名(和文)メダカ突然変異体を用いた腸管閉鎖症発症機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the medaka intestinal atresia mutant

研究代表者

小林 大介 (Kobayashi, Daisuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60376548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管閉鎖症は、胎生期に形成される小腸や結腸の管腔構造の一部が閉鎖・狭窄する先天性疾患として知られているが、モデル実験動物を用いた順遺伝学的研究は少ない。本研究では腸管閉鎖の分子機構を明らかにするために、メダカ突然変異体を用いた解析を行った。ポジショナルクローニングにより、細胞骨格系の制御に関わる遺伝子を原因遺伝子と同定した。表現型の解析から腸管閉鎖に細胞死や上皮間葉転換は関与しておらず、腸管閉鎖に先行して腸管上皮に異常なアクチンの集積が認められることが明らかとなった。またミオシンIIの特異的阻害剤により、腸管閉鎖が抑制されたことから、アクトミオシン束形成の亢進が関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管閉鎖機構の研究にはこれまでモデル実験動物を利用した順遺伝学的なアプローチがなされていなかった。順遺伝学的なアプローチはこれまでの知見にとらわれない新たなメカニズムを明らかにすることが期待でき、本研究によって腸管閉鎖というヒトの先天性疾患を新しい視点から明らかにすることが期待できる。加えて、管腔形成という生物にとって非常に基本的な形態形成の機構の一端を明らかにすることも期待できる。

研究成果の概要(英文)： Intestinal atresia (IA) is one of the congenital malformation of the intestine which causes bowel obstruction. To elucidate the molecular and genetic mechanism of intestinal atresia, I analyzed medaka mutant that shows IA during embryogenesis. By positional cloning, I identified the causal gene that encode the gene involved in cytoskeletal regulation. Histochemical analysis revealed that apoptosis and epithelial-mesenchymal-transition are not involved in IA of this mutant and abnormal accumulation of F-actin was observed in the mutant intestine. In addition, the treatment with myosin II specific inhibitor, blebbistatin, rescued IA phenotype, suggested that enhancement of actomyosin bundle formation is involved in IA in the mutant embryos.

研究分野：発生生物学

キーワード：腸管閉鎖 管腔形成 メダカ

1. 研究開始当初の背景

腸管閉鎖症は、胎生期に連続した管腔構造として形成される小腸や結腸の一部が閉鎖又は狭窄し、速やかな外科的処置なしでは致死となる先天性疾患として知られている。この疾患の原因として古くから考えられているのは、胚発生期における突発的な血流若しくは機械的な障害により、腸管の一部に壊死を来すという機構である。しかし一方で、遺伝的要因が存在することも指摘されていた。これまでに幾つかの原因遺伝子が提唱されているが、先天性の腸管閉鎖を引き起こす遺伝的要因については不明な点が多かった。また他の疾患の解析でその有用性が示されていた、モデル実験動物の誘発性誘発突然変異体を用いた順遺伝学的な解析はなされておらず、このアプローチにより腸管閉鎖症の遺伝的背景を明らかにできることが期待された。

2. 研究の目的

ENU による誘発突然変異体のスクリーニングにより単離された、腸管閉鎖を示すメダカ突然変異体(図1)を用いた順遺伝学的な解析により、腸管の閉鎖に至る責任遺伝子を明らかにし、更にこの遺伝子の変異により腸管閉鎖が引き起こされる分子機構を明らかにすることを目的とした。

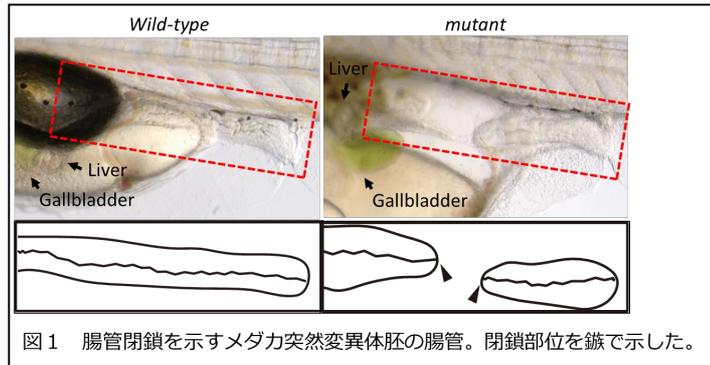


図1 腸管閉鎖を示すメダカ突然変異体胚の腸管。閉鎖部位を線で示した。

3. 研究の方法

研究の手法は1) ポジショナルクローニングによる遺伝子の同定と2) 表現型の解析、を並行して行った。表現型の解析は、初めに腸管閉鎖を生じる時期の特定を行い、その後同定された原因遺伝子の変異により引き起こされると予想される現象を中心に、分子マーカーを利用した発現パターン解析を行った。遺伝子発現のパターンは、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法(WISH)並びに免疫組織化学法(IHC)を用いて行った。また細胞骨格系の関与に関しては、阻害剤を用いた検討も行った。

4. 研究成果

1. ポジショナルクローニングによる遺伝子の同定

変異体胚を用いて1,532減数分裂を観察したところ原因遺伝子の責任領域を0.13 cMの範囲に絞り込む事ができた。この結果をメダカゲノムデータベースと照合したところ24,227bpの領域に相当し、この範囲には1つの遺伝子しか存在していなかった(図2)。そこでこの遺伝子の全 exon をシーケンスしたところ、C末を欠いた遺伝子産物を生じるナンセンス突然変異が見つかった。この遺伝子が真に表現型の原因であるかどうかを確認するために、野生型の mRNA を合成し、表現型をレスキューを試みたが、全長の mRNA を合成することができなかった。そこでCRISPR/Cas9のシステムを用いてこの遺伝子に新たな変異を持つ個体を作成した。この個体は、オリジナルの突然変異体と異なる部位の変異を持つが、オリジナルの変異体同様に腸管閉鎖を示した。このことから、この遺伝子の異常が腸管閉鎖の原因であると結論付けた。

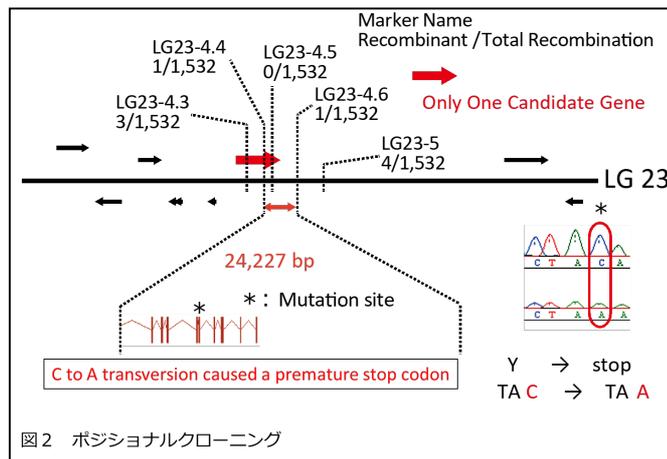


図2 ポジショナルクローニング

2. 腸管閉鎖が生じる時期の特定

腸管閉鎖に至る機構の詳細な解析を行うために、腸管閉鎖が腸管形成のどの時期に生じるのかを詳細に検討した。生きた胚を用いた実体顕微鏡下の観察では管腔形成期の腸管の観察が困難であったことから、将来腸管を形成する内胚葉から腸管形成が完了する時期を通して発現する遺伝子 foxa2 をプローブとして、WISHにより解析を行った。その結果、将来腸管となる内

胚葉の形成は正常で、野生型と変異体胚腸管の閉鎖は受精後 2 日のステージ 26 で始めて観察されることが明らかとなった。このステージは腸管の管腔形成が終了する時期にあたり、腸管の閉鎖は管腔形成のほぼ終了と同時に生じていることが明らかとなった。

### 3. 分子マーカーを用いた表現型の解析

最初に腸管閉鎖を示した個体に対し組織学的な解析を行った。腸管上皮において頂端側に強く発現するマーカーとして cytokeratin を、基底膜のマーカーとして laminin を また周辺の平滑筋のマーカーとして Smooth muscle myosin の抗体を用いて抗体染色を行った。その結果、腸管閉鎖が生じた個体においても腸管閉鎖部位以外で染色像に野生型との差は観察されなかった。そこで、ステージをさかのぼり、最も早く表現型が観察されたステージ 26 において観察を行ったところ、変異体の腸管上皮において laminin の不連続な染色像が観察され、基底膜の断片化が生じていることが示唆された。同様にステージ 26 において、細胞膜に局在する GFP を用いた解析により、変異体胚の腸管閉鎖が生じる腸管上皮の部位において、立方上皮の構造が乱れていることが明らかとなった。

### 4. 上皮の形態変化に関する検討 -細胞死と上皮間葉転換について-

変異体胚で観察された上皮の形態変化に細胞死が関与しているか否かを検討するために、TUNEL 法を用いて解析を行った。その結果、変異体胚において顕著な細胞死の亢進は観察されなかった。次に腸管上皮の形態変化に上皮間葉転換 (EMT) が関与しているか否かを検討するために、EMT の際に発現が上昇するマーカーとして Snail 並びにマトリックスペロテアーゼを用いて WISH により検討を行った。その結果、変異体胚におけるこれら EMT マーカーの顕著な上昇は観察されず、腸管閉鎖には EMT は関与していないことが示唆された。

### 5. 細胞骨格系の変化に関する検討

同定された遺伝子が細胞骨格の制御に関わることが予想されたことから、ファロイジンを用いて アクチンの染色を行った。その結果、変異体胚の腸管閉鎖が生じる部位の上皮の頂端側並びに基底膜側に、アクチンの異常な集積が認められた (図 3)。更にアクチン系系の制御に関わる myosinII の調節軽鎖 (MRLC) のリン酸化状態を調べた所、MRLC のリン酸化も亢進していることが観察された。このアクチンの異常集積が認められた部位は腸管閉鎖が生じる部位と一致することから、腸管閉鎖の原因は腸管上皮の局所的な MRLC のリン酸化の亢進が MyosinII の活性化及びアクチンの過剰な重合を引き起こし、その結果腸管閉鎖に至ると考えられた。

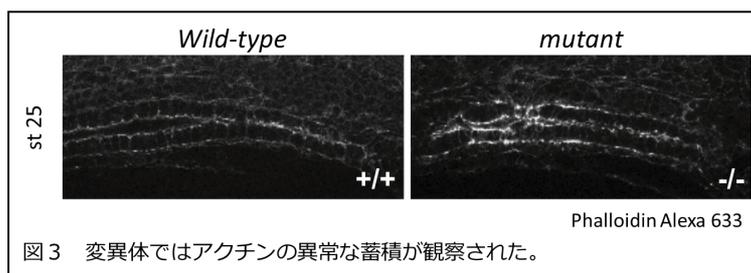


図 3 変異体ではアクチンの異常な蓄積が観察された。

そこで myosinII の特異的阻害剤である Blebbistatin で胚を処理した所、腸管閉鎖が抑制された。従って MyosinII 活性の亢進が腸管閉鎖の原因だと結論付けられた

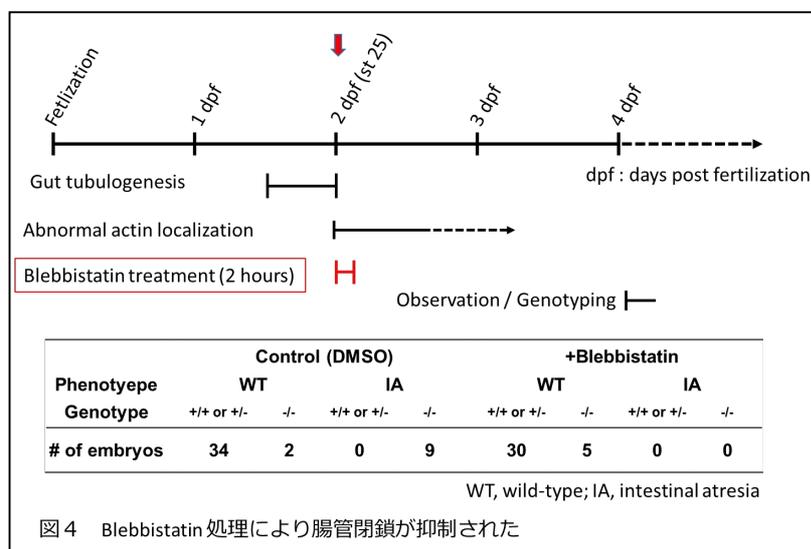


図 4 Blebbistatin 処理により腸管閉鎖が抑制された

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

小林 大介、Identification of the causal gene of intestinal atresia using medaka mutant、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015

小林 大介、Analysis of the medaka intestinal atresia mutant、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016

小林 大介、Analysis of the medaka intestinal atresia mutant II、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017

小林 大介、腸管閉鎖を示すメダカ突然変異体の解析、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。