

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390453

研究課題名（和文）分子機構から見た直腸肛門奇形 rescue program の確立

研究課題名（英文） Establishment of a rescue program for anorectal malformations induced by retinoic acid in mice.

研究代表者

岩井 直躬（IWA I NAOMI）

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：90128695

研究成果の概要（和文）：

小児外科領域の代表的疾患である直腸肛門奇形に関して、申請者らは従来から行ってきた妊娠マウスに催奇形性物質であるレチノイン酸（RA）を過剰投与して直腸肛門奇形マウスを作成した。正常マウスの消化管のパターン形成や、直腸肛門奇形マウスの後腸分化のうえで重要な転写因子発現の誘導を阻害する過程に着目し、RA 受容体の antagonist を投与することで約 4 割において直腸肛門奇形を rescue させた。

研究成果の概要（英文）：

In the embryos affected by all trans retinoic acid (ATRA) only, all of them had anorectal malformations (ARM). In the embryos affected by ATRA and LE135, however, about 40% of the embryos had normal rectum and anus but had short tail. Therefore, these findings indicate that RA receptor antagonist prevents disturbance of the cell signaling pathway between the epithelium and the mesenchyme layers because RA receptor antagonist inhibits RA receptor from forming heterodimers with RX receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学

## 1. 研究開始当初の背景

小児外科領域の先天性消化管奇形におい

て脊椎の異常が合併することは临床上よく経験される。直腸肛門奇形では仙・尾骨の形

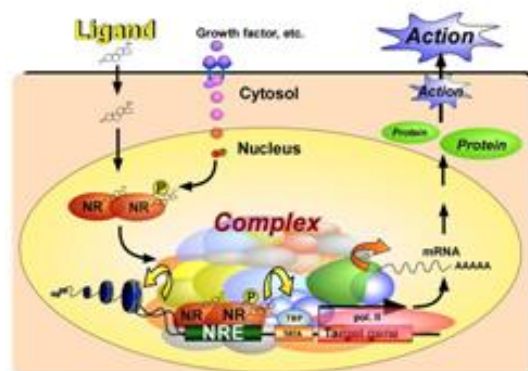
成異常をしばしば認め、食道閉鎖症では胸椎の異常をはじめ、互いの合併奇形症候群 (VACTER 症候群) などを認める場合がある。このような病態と対応する体節レベルでの形成異常の存在は、胎生早期の発生異常がこれらの疾患の病態発生と強い相関があることを示唆しており、これらの解明は小児外科領域における重要な検討課題である。一方、近年の発生生物学の急速な進歩により、分子生物学的な手法を用いて発生過程に関わる因子が次々と明らかにされ、形態形成に関与する様々な遺伝子が解明されてきた。しかし、消化管、特に直腸肛門領域の器官形成については、形態学的な面での発生過程の報告が散見されるだけで、遺伝子レベルでは未だ十分解明されていないのが現状である。また臨床的な面では、直腸肛門奇形患児の術後経過において排便障害、排尿障害や生殖器障害など QOL の観点から改善が期待できない症例もあり、直腸肛門領域の神経、筋肉、および周辺の泌尿器系、生殖器系、脊椎などについてより詳細な発生学的、解剖学的知識の解明が早急に望まれている。

## 2. 研究の目的

我々は直腸肛門奇形の発生メカニズムを解明するため、従来から催奇形物質としてレチノイン酸 (RA) を用いて 95% 以上の高率で直腸肛門奇形モデルを作成し、形態形成の要因となる細胞の局所的増殖及び細胞死について検討を行い、特に直腸肛門領域の発生過程における詳細を新たな発生生物学的な手法を用いて明らかにする必要があると考えるに至った。すなわち、正常マウスの消化管パターン形成や、RA 投与で作成した直腸肛門奇形マウスの後腸分化のうえで重要な転写因子発現の誘導を阻害する過程に対し、転写制御の分子機構からみた直腸肛門奇

形の rescue program を確立し、そのメカニズムについて分子レベルの面から解明することとした。

そこで、今回の研究では RA の分子作用メカニズムが、特異的核内受容体 RA Receptor とレチノイド核内受容体 RX Receptor を介してヘテロダイマーを形成し様々な細胞分化、形態形成、細胞死に必要な標的遺伝子の発現を制御することに着目した。さらに RA は、体節決定に極めて重大な役割を果たす Hox 遺伝子の発現に影響を及ぼし、RA のシグナル伝達系の転写制御により特異的でより複雑な形態形成を作り上げている。これまでの我々の研究で、RA 過剰投与により RA 受容体の染色性に違いが生じる事を証明し、後腸のシグナル伝達系に影響を与えた結果、上皮間葉相互作用が障害され、直腸盲端での上皮・間葉系および神経の分化が阻害され本症が発症したと考えた。そこでヘテロダイマーの作用を抑制する RA Receptor のアンタゴニストである LE135 を投与することにより直腸肛門奇形の rescue について検討する。以上より、催奇形性物質である RA の過剰投与により作成される直腸肛門奇形モデルマウスに RA の投与時期と合わせて拮抗作用のある LE135 を投与し、胎生期における直腸肛門領域の細胞学的動態を観察することは、直腸肛門奇形の発生過程を解明し、さらには発症予防戦略を講じる上で key になると考えた。



### 3. 研究の方法

従来から行ってきた妊娠9日目のマウスに催奇形性物質であるレチノイン酸 (RA) を過剰投与し直腸肛門奇形マウスを作成した。一方、妊娠8日目および妊娠9日目 RA Receptor と結合してヘテロダイマーを形成し様々な細胞分化、形態形成、細胞死に必要な標的遺伝子の発現を制御するレチノイド核内受容体 RA Receptor に対してその作用を抑制する antagonist である LE135 を投与する群を作成した。各々の群で妊娠9日目に RA を過剰投与し、16日目の胎仔において直腸肛門奇形や尾の形態異常誘導の可否につき検討する。また、発生異常を予防するための至適投与量ならびに至適投与日をそれぞれの群で検討した。

### 4. 研究成果

RAのみを投与した群(Group A)では全例直腸肛門奇形を認めた。妊娠8日目に LE135 を投与し、妊娠9日目に RA を投与した群(Group B)では、直腸肛門奇形 (ARM) の発生率は64%に減少した。また、LE135 並びに RA を妊娠9日目に投与した群(Group C)では、ARM の発生率は55%まで減少した。RA 受容体の antagonist が RA 核内受容体でのヘテロダイマー形成を阻害し RA の作用が抑制され ARM を伴わないマウスが作成された。

## Results

	No. of embryos	ARM(+)	ARM(-) Short tail(+)	Rate of rescue
Group A	35	35	0	0/35 (0%)
Group B	44	20	16	16/44 (36%)
Group C	40	22	18	18/40 (45%)

\* : P<0.01    \*\* : P<0.01

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

#### ①直腸肛門内圧検査

佐々木康成、岩井直躬、木村 修、小野 滋、津田知樹  
小児外科 42(7); 756-759, 2010

#### ②直腸肛門奇形術後の長期フォローアップ - 20歳以上 -

岩井直躬、佐々木康成、出口英一、岩田譲司、木村 修、久保田良浩、深田良一、小野 滋  
周産期医学 40(8); 1245-1249 2010

#### ③腹会陰式直腸肛門形成術術後成人例における QOL

津田知樹、岩井直躬、木村 修、小野 滋、古川泰三、佐々木康成、出口英一、久保田良浩  
小児外科 42(11); 1201-1204 2010

#### ④Congenital anomalies induced by triamcinolone acetonide in murine embryos.

Miyagi Y, Kubota Y, Tsuda T, Sasaki Y, Ono S, Kimura O, Iwai N.  
Eur J Pediatr Surg. 18(3): 164-167, 2008

#### ⑤Establishment of a rescue program for anorectal malformations induced by retinoic acid in mice.

Yasunari Sasaki, Naomi Iwai, Osamu Kimura, Shigeru Ono, Tomoki Tsuda,  
J Pediatr Surg( in press)

#### ⑥Tsuda T, Iwai N, Deguchi E, Kimura O, Ono S, Furukawa T, Sasaki Y, Fumino S,

Kubota Y. PCSK5 and GDF11 Expression in the Hindgut Region of Mouse Embryos with Anorectal Malformations.  
Eur J Pediatr Surg (in press)

[学会発表] (計 3 件)

① Establishment of a rescue program for anorectal malformations induced by retinoic acid in mice.  
Sasaki Y, Iwai N, Kimura O, Ono S, Tsuda T, Tanaka T.  
British Association of Pediatric Surgeons  
57th Annual International Congress  
Aberdeen UK 20th-24th July 2010

② PCSK5 and GDF expression in the hindgut region of mouse embryo with anorectal malformations.  
Tsuda T, Iwai N, Kimura O, Ono S, Sasaki Y, Fumino S  
British Association of Pediatric Surgeons  
57th Annual International Congress  
Aberdeen UK 20th-24th July 2010

③ Laparoscopic vs. open Abdomino perineal anorectoplasty for infants with the high type of anorectal malformation.  
Kimura O, Iwai N, Sasaki Y, Tsuda T, Deguchi E, Ono S, Furukawa T, Fumino S  
43<sup>rd</sup> Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons: Kobe, Japan; 2010

[図書] (計 1 件)

① 岩井直躬、佐々木康成、小野 滋  
消化管症候群 (下) 日本臨床 2009 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩井 直躬 (Naomi Iwai)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90128695

### (2) 研究分担者

木村 修 (Osamu Kimura)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：10315963

佐々木 康成 (Yasunari Sasaki)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：30405253