

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22591982

研究課題名（和文） 直腸肛門奇形 rescue program からみた後腸協調発生の分子生物学的解明

研究課題名（英文） Molecular biological resolution of hindgut embryogenesis with a rescue program for anorectal malformations induced by retinoic acid in mice.

研究代表者 佐々木 康成（SASAKI YASUNARI）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：30405253

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、我々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 administered ATRA only, over 95% demonstrated ARM. In the embryos administered both ATRA and LE135, however, 44% of the embryos demonstrated normal development of the rectum and anus. 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 retinoid X receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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・直腸肛門奇形・遺伝的組織系譜解析

### 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始め、互いの合併奇形症候群（VACTER 症候群）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

我々は鎖肛の発生メカニズムを解明するため、催奇形物質として RA を用いて 95% 以上の高率で ARM マウスを作成し、直腸肛門領域の発生過程における遺伝子蛋白の発現の有無について明らかにしてきた。しかしながらこれらの結果だけでは、本来の器官への分化誘導を阻害された細胞がどのような運命をたどったかは示すことができなかった。つまり、本来の細胞に分化できなかった細胞は、分化する直前の未分化細胞として生存しているのか、それとも細胞死によって除去されたのか、あるいは他の器官を形成する細胞として生存しているのかについての検討は行われていない。そこで、特に直腸肛門領域の発生過程における詳細な経過追跡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、正常マウスの正常の消化管形成や、ARM マウスの転写因子発現の誘導を阻害する過程や、rescue マウスにおいて正常な分化誘導の阻害を抑制する過程を細胞レベルでどのような経過をたどるか追跡するため、直腸肛門領域の発生過程における遺伝子蛋白、特に Shh のシグナルを受容する細胞を遺伝的にラベルする系を作成し、遺伝的組織系譜解析を行うことで上記に示したような細胞の動態変化をつきとめることとした。これにより、直腸肛門形成に必要な骨盤内臓器群が協調発生するメカニズムについて分子レベルの面から解明できると考えた。

そこで、今回の研究ではまず RA が RA Receptor とレチノイド核内受容体を介してヘテロダイマーを形成し、シグナル伝達系の転写制御により様々な細胞分化、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。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 antagonist の LE135 を投与することにより直腸肛門奇形の rescue program を確立する。さらに神経発生研究の分野で近

年開発されたマウス子宮内胎仔エレクトロポレーション法により *Cre* 遺伝子を取り込んだ細胞を挙動追跡できる点に着目した。マウス子宮内胎仔エレクトロポレーション法では、胎生期に *Cre* 遺伝子を取り込んだ *Shh* を受容した細胞がラベルされ、ラベル後はマーカー遺伝子の *LacZ* (青色) が恒常的に発現するため *Shh* 受容細胞がどういった器官に分化していくかを追跡できる。そこで遠位尿道上皮近傍の上皮に特異的に発現する *Cre* 遺伝子を取り込んだ *Shh* 受容細胞の位置を *in vivo* で追跡し、直腸肛門領域のみならず泌尿生殖器系器官も含めどのようにして細胞移動、増殖を経て性質の異なる複数の器官に分化していくかを検討する。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 ARM 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、ARM を rescue させ、胎生期におけるこれら一連の直腸肛門領域の細胞学的動態を *in vivo* で観察することは、ARM 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する。一方、妊娠 8 日目および妊娠 9 日目に、RA Receptor antagonist である LE135 を投与する。妊娠 10 日目から 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検討する。さらに骨盤内臓器群が協調発生するメカニズムについて、マウス子宮内胎仔エレクトロポレーション法を用いることにより遠位尿道上皮近傍の上皮に特異的に発現する *Cre* 遺伝子を取り込んだ *Shh* 受容細胞の位置を *in vivo* で追跡し、直腸肛門領域のみならず泌尿生殖器系器官も含めどのようにして細胞移動、増殖を経て性質の異なる複数の器官に分化していくかを検討した。

## 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 8 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  
査読なし

#### 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  
査読なし

#### 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  
査読なし

#### ④Hirschsprung 病の標準的診断法について

佐々木康成、津田知樹、古川泰三、小野 滋、木村 修、岩井直躬

小児外科 43(6); 623-626 2011

査読なし

#### ⑤直腸内に大きな便塊が形成

佐々木康成、岩井直躬、古川泰三、小野 滋、木村 修

小児外科 43(7); 781-784 2011

査読なし

#### ⑥慢性便秘

佐々木康成、岩井直躬、木村 修、小野 滋、古川泰三

小児外科 43(8); 876-877 2011

査読なし

#### ⑦Establishment 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. 46(7): 1396-1399, 2011  
査読あり

#### ⑧Tsuda 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. 21(4): 238-241, 2011  
査読あり

[学会発表] (計 5 件)

#### ①Establishment 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

④ Hirschsprung 病の術式からみた術後排便機能評価

佐々木康成、木村 修、小野 滋、古川泰三、  
文野誠久、岩井直躬  
第 48 回日本小児外科学会学術集会 東京  
2011 年 7 月 21 日

⑤ 直腸肛門奇形術後成人例における性・生殖機能の問題

佐々木康成、木村 修、小野 滋、古川泰三、  
文野誠久、岩井直躬  
第 112 回 日本外科学会定期学術集会 千葉  
2012 年 4 月 13 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐々木 康成 (SASAKI YASUNARI)  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研  
究院)・客員講師

研究者番号：30405253

##### (2) 研究分担者

小野 滋 (ONO SHIGERU)  
自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00315962

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：