

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7日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659289

研究課題名（和文） 腎・尿管の器官・組織形成異常の形成機構の解明と治療・予防法の開発

研究課題名（英文） Mechanisms of abnormal organogenesis and histogenesis of the kidney and ureter and development of the embryonic treatment

研究代表者

大谷 浩 (OTANI HIROKI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20160533

研究成果の概要（和文）：尿管の伸長および腎臓の「上昇」に尿管上皮細胞の収斂伸長など再配置が関わることを明らかにし、尿管上皮細胞の増殖中に interkinetic nuclear migration 様の核移動を観察した。発生中の胎仔に操作を加え、尿管等臓器の器官・組織形成に人工的改変を与えるための子宮外発生法を、エコーガイド導入等により精度を高めた。尿管については、同法による明確な実験結果を得るに至らなかったが、筋・骨格系における実験で改変効果を立証した。

研究成果の概要（英文）：We have clarified that cell rearrangements including convergent extension are involved in elongation of the ureter and ‘elevation’ of the kidney, and observed interkinetic nuclear migration-like nuclear movement in the proliferating epithelial cells of the ureter. The exo-utero manipulation/development system, a method to modify the organogenesis and histogenesis of organs including the ureter, has been improved by echo-guidance and other refinements for the more accurately targeted injection. Although we could not obtain conclusive results in the ureter-related experiments, we could successfully modify the histogenesis in the experiments of the musculoskeletal system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	570,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：奇形学

1. 研究開始当初の背景

腎・尿管は、胎生初期の器官形成期に形・位置が決定され、胎生後期（胎児期）に糸球体などの組織形成を経て機能を獲得する。これらの発生段階における異常により、多

様な形態的、機能的な先天異常が引き起こされる。最近の研究にも関わらず、泌尿器系の正常および異常な発生機序の多くは、未だに形態学的観察所見から推論され、従って実験的証明がない。例えば、器官形成

期中に腎臓は、腰・仙骨部における成長により、骨盤位から最終的な位置へと「上昇」とされるが、これでは、多様な位置異常や馬蹄腎が正常な骨格を持つ例に起こることを説明できない。一方ネフロン数の決定機構は、腎の組織形成における最重要事象であり、ネフロン自体の形成については、分子生物学的に詳細が解明されつつある。しかし、その総数については1腎当たり40万から120万などと報告され、腎機能、将来の高血圧、腎不全などと直結することを考えれば、あまりにも大きな個体差が存在するにも関わらず、その決定機構については不明のままである。

申請者らは、多数のヒト胚・胎児標本からなる京都コレクション（京都大学医学研究科附属先天異常標本解析センター所有、当教室が一部管理）に基づいて全身の詳細な観察と仮説立案、動物実験による実証を行い、臓器の発生機構を解明してきた。その過程で、組織学的な検索から尿管と腎の異常の相関およびネフロン数の決定機構について、予備的所見を得た。腎・尿管など左右対称性に分岐型の発生をする臓器について、当教室で確立した子宮外発生法により、自由な時間、作用物質の組み合わせにより片側に実験処理して左右比較できることから、異常発症機構の実験的解明と胎児操作による治療効果を同時に調べることが可能である。そこで同法の利点を器官形成と組織形成における異常の発症機構解明と治療・予防法開発へ向けて活用するため本研究を着想した。

2. 研究の目的

尿管の器官形成機構および尿管の奇形と腎奇形との機構的關係、ならびに腎機能の総量に直結する腎臓のネフロン数が決定される組織形成機構を、尿管上皮細胞の極性制御された再配置と増殖様式の数理解析、および子宮外発生法を用いて、母胎内のマウス胎児を直接操作して個体全体の中で解析することにより明らかにする。本研究を通して、腎臓のみならず、同様に分岐型の組織形成過程を示す実質臓器の器官形成および組織形成について、上皮細胞の再配置・移動や増殖機構との関連を示唆する。さらに子宮外発生法を、簡便かつ自由度の高い個体レベルでの解析法、ならびに治療・予防法の開発のための実験系としてより精度の高い手法として改良し、その有用性を実証する。

3. 研究の方法

尿管および腎の位置・形態異常に関して、DNA合成期に特異的に核に取り込まれるbromo-deoxyuridine (BrdU) により細胞を標識して追跡し、尿管上皮細胞の再配置・移動

の有無と様式、ならびに上皮細胞の頂底極性にそった、細胞周期と同期した核移動であるinterkinetic nuclear migration (INM)を解析し、それぞれ収斂伸長 (convergent extension: CE) など発生過程において知られている形態形成機構の関与、増殖制御機構を検討した。子宮外発生法を用いて、CE機構により管腔構造の伸長に関わる分子、上皮間葉相互作用に関わる分子、血管系の発生に関わる分子を、マウス胎児の「上昇」中の腎臓周囲に単独または組み合わせにより注入し、その効果を解析した。

ネフロン数の調節に関して、FGFファミリーなど、ネフロン数の調節に関わる分子が報告されている分子を、同様に子宮外発生法により、ネフロン形成が進行する胎生中・後期に注入し、ネフロン数の増加効果を検討し、さらに出生後の腎機能、血圧等への影響を対照群と比較検討した。

さらに、子宮外発生法の原法では注入部位が不明確である欠点を本研究中に改良するとともに、同法の他の器官・臓器系への応用・展開の実現性を立証するため、筋・骨格系における同法を用いた実験を行った。

4. 研究成果

腎の位置・形態異常に関する研究について、BrdUにより細胞を標識して追跡し、尿管上皮細胞の再配置および移動と、細胞周期に同期したINMとの関係について詳細に解析した結果、尿管の伸長には、胎生11日から12日にかけて収斂伸長機構 CE が関わることを確認した。また、それに加えて幹細胞増殖機構であるINMによる細胞数の増加および細胞の尿管中央部から近位・遠位端への移動に関わる可能性が示唆された。したがって、腎臓の骨盤位からの腹腔上部への移動およびそれに関わる奇形には、尿管上皮細胞の頂底極性および平面極性を持った再配置と細胞増殖機構が関わることを示唆された。

一方、BrdU標識された細胞の分布の変化を多次元尺度法を用いて数理解析することによりINM様の上皮の核移動の周期性を観察したが、上記のような細胞の移動が加わるなど条件が複雑なため最終確認に至っていない。しかし、これらの所見は、尿管上皮におけるINM様の核移動および細胞の再配置が、明確なINMが確認されている神経上皮や腸管上皮とは異なる機構により起こることを示唆する。

また子宮外発生法により、形態形成に関わる調節因子をマウス胎児腎臓・尿管周囲に注入し、腎臓の位置・形態変化およびネフロン数における効果を検証する実験を継続したが、期間中に明確な結果を得るに至らなかった。

その一因として、注入部位をコントロールすることが困難であったことが考えられた。そこで正確な注入により安定した結果を得る

ため、超音波ガイド下で注入するシステムを導入して、これまでにほぼ手技・条件を確立した。また、注入用のピペットについても、従来法ではピペットの先端の確認が困難であったが、先端の位置を確認できる方法を開発した。今後この系により詳細な注入実験を行い、腎臓の位置・形態およびネフロン数の増減に対する効果について明確な結論を得る予定であり、これが確立すれば治療法としての同法の有用性が高まるものと考えられる。

尿管への注入実験と並行して、子宮外発生法の有用性を例証するため、筋・骨格系の発生過程について同法を応用し、顎関節の発生における機械的ストレスの影響、肘関節における筋・骨・軟骨の組織形成に細胞外基質と integrin を介したシグナルが及ぼす影響を実験的に証明した。これらの例は、胎生期における同法を用いた介入により、器官・組織形成に治療・予防を含めた人工的改変を加えることが可能であることを実証したものと考えられる。

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 15 件)

- ① Hashimoto R, Matsumoto A, Udagawa J, Hioki K, Otani H, effect of leptin administration on myelination in *ob/ob* mouse cerebrum after birth. *Neuroreport* 24: 22-29, 2013 査読有 doi:10.1097/WNR.0b013e32835ba875
- ② Yamada M, Udagawa J, Hashimoto R, Matsumoto A, Hatta T, Otani H, Interkinetic nuclear migration during early development of midgut and ureteric epithelia. *Anat. Sci. Int.* 88:31-37, 2013 査読有 doi:10.1007/s12565-012-0156-8
- ③ Rafiq AM, Udagawa J, Lundth T, Jahan E, Matsumoto A, Sekine J, Otani H, Mathematical analysis of mandibular morphogenesis by micro-CT-based mouse and alizarin red S-stained-based human studies during development. *Anat Rec* 295: 313-327, 2012 査読有 doi: 10.1002/ar.21535.
- ④ Matsumoto A, Hatta T, Ono A, Hashimoto R, Otani H, Stage-specific changes in the levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the biological fluid and organ of mouse fetuses. *Congenit Anom* 51:183-186,

2011 査読有

doi:

10.1111/j.1741-4520.2011.00337.x.

- ⑤ Kawamoto M, Udagawa J, Hashimoto R, Matsumoto A, Yamada M, Nimura M, Otani H, Adrenocorticotrophic tumor cells transplanted into mouse embryos affect pancreatic histogenesis. *Congenit Anom* 51:62-69, 2011 査読有 doi: 10.1111/j.1741-4520.2010.00313.x.
- ⑥ Simamura E, Shimada H, Shoji H, Otani H, Hatta T, Effects of melanocortins on fetal development. *Congenit Anom* 51:47-54, 2011 査読有 doi: 10.1111/j.1741-4520.2011.00316.x.
- ⑦ Hashimoto R, Udagawa J, Kagohashi Y, Matsumoto A, Hatta T, Otani H, Direct and indirect effects of neuropeptide Y and neurotrophin 3 on myelination in the neonatal brains. *Brain Res* 1373: 55-66, 2011 査読有 doi:10.1016/j.brainres.2010.12.027
- ⑧ Otani H, Udagawa J, Hatta T, Kagohashi Y, Hashimoto R, Matsumoto A, Satow F, Nimura M, Individual variation in organ histogenesis as a causative factor in the developmental origins of health and disease: Unnoticed congenital anomalies? *Congenit Anom* 50:205-211, 2010 査読有 doi: 10.1111/j.1741-4520.2010.00295.x.
- ⑨ Jahan E, Matsumoto A, Udagawa J, Rafiq AM, Hashimoto R, Rahman OI, Habib H, Sekine J, Otani H, Effects of restriction of fetal jaw movement on prenatal development of the temporalis muscle. *Archives of Oral Biology* 55:919-927, 2010 査読有 doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.07.010.

[学会発表] (計 3 3 件)

- ① 松本暁洋、Rafiq Ashiq M、八田稔久、橋本龍樹、大谷 浩、マウス胎仔の脳組織形成における顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子の作用の解析。第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2013 年 3 月 28 日～30 日、サンポートホール高松 (高松市)
- ② 井上隆之、橋本龍樹、松本暁洋、Esrat Jahan、宇田川 潤、八田稔久、大谷 浩、子宮外発生法を用いた軟骨内骨化におけ

- る軟骨細胞増殖，分化・肥大，細胞死調節因子の *in vivo* 解析. 第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2013 年 3 月 28 日～30 日、サンポートホール高松（高松市）
- ③ Jahan E, Hashimoto R, Matsumoto A, Rafiq AM, Udagawa J, Sekine J, Otani H, Prenatal jaw movement affects molecular cascade in the mandibular condylar cartilage development. Joint Meeting of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, May 28-31, 2012, Kobe International Conference Center (Kobe, Japan)
- ④ 井上隆之、橋本龍樹、松本暁洋、宇田川潤、八田稔久、大谷 浩、子宮外発生法を用いた筋腱結合部形成過程における細胞 - 細胞外マトリクス相互作用の実験的解析. 第 117 回日本解剖学会全国学術集会、2012 年 3 月 26 日～28 日、山梨大学（甲府市）
- ⑤ Jahan E, Udagawa J, Matsumoto A, Rafiq AM, Sekine J, Otani H, Fetal jaw movement affects molecular cascade in the development of mandibular condylar cartilage. 第 117 回日本解剖学会全国学術集会、2012 年 3 月 26 日～28 日、山梨大学（甲府市）
- ⑥ 大谷 浩、知られざる先天異常 — 臓器の組織形成における個体差と疾病素因の関り —. (ランチョンセミナー・特別講演) 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会、2011 年 8 月 11 日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ⑦ 大谷 浩、臓器の組織形成と疾病の素因形成のかかわり. (特別講演) 第 21 回日本成長学会学術集会、2010 年 11 月 13 日 秋葉原ダイビル（東京）
- ⑧ 山田真紀子、和気功治、宇田川潤、八田稔久、橋本龍樹、松本暁洋、椎名浩昭、井川幹夫、大谷 浩、Epithelial cell rearrangement contributes the ureteral elongation in human and mouse embryos. 第 50 回日本先天異常学会、2010 年 7 月 8 日～10 日、淡路夢舞台国際会議場（淡路市）
- ⑨ Jahan E, Udagawa J, Matsumoto A, Rafiq AM, Sekine J, Otani H, Fetal jaw movement affects Indian hedgehog signaling in mandibular condylar cartilage development. 第 50 回日本先天異常学会、2010 年 7 月 8 日～10 日、淡路夢舞台国際会議場（淡路市）

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
大谷 浩 (OTANI HIROKI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：20160533
- (2) 研究分担者
松本 暁洋 (MATSUMOTO AKIHIRO)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：70346378