

## 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 4 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791711

研究課題名（和文）きわめて高頻度に直腸肛門奇形を示す、新規モデルマウスを用いた鎖肛発生過程の解明

研究課題名（英文）Analysis of mechanism of anorectal development in new anorectal malformations model mice.

研究代表者

李 光鐘（LEE KWANG-JONG）

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00467995

研究成果の概要（和文）：新規樹立直腸肛門奇形 100%発症マウス（Sd Skt/+ Skt double mutant mouse）を用いることにより、鎖肛の発生過程を解析し鎖肛発症のメカニズムを解明することをこの研究の目的とした。胎生 11.5-12.5 日の本マウスにおいて cloacal plate 背側の短縮がおきると同時に背側の間葉組織の肥厚がおきていることが分かった。また形態異常を示している部位での Skt の発現を確認できた。この結果から本マウスにおける鎖肛発生過程での形態的異常とその時期が判明した。

研究成果の概要（英文）：**BACKGROUND AND AIMS:** Danforth's short tail (Sd) mutant mice show anorectal malformations (ARMs). In our previous study, the co-presence of Skt (Gt) mutation increased the incidence of ARMs in Sd mutant to 100%. Our aims in this study are determining the Skt expression around the cloaca during the anorectal development and demonstrating the role of Skt gene in ARMs. **METHODS:** Embryos, normal controls [+Skt (Gt)/+Skt (Gt)] and ARMs models [Sd Skt (Gt)/+Skt (Gt)], from embryonic day (E) 9.5 to E12.5, were evaluated with X-gal staining. **RESULTS:** In [Sd Skt (Gt)/+Skt (Gt)] mutant embryos, the cloacal plates failed to extend proximodistally and, consequently, the dorsal part of cloacal plate was defective at E11.5. Skt expressing cells were detected in the shortened cloacal plate and in the thickened mesenchyme dorsal to it. **CONCLUSIONS:** We showed the spatial and temporal expression of Skt gene in the cloacal plate formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

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：発生・分化、解剖学

1. 研究開始当初の背景

(1) 鎖肛、その臨床的問題点

直腸肛門奇形(鎖肛)は新生児外科の治療

対象となる先天性疾患のうちで最も頻度の高い疾患であり、本邦でも毎年平均 350 例以上

が出生している。直腸盲端の位置により低位、中間位、高位と分けられることが一般的であるが、病型によりその治療・予後は様々で、直腸盲端が高位なものほど術後排便コントロールに難渋し、患児の QOL を損ねその後の社会生活に大きく影響を与えうる。

病因は多因子遺伝と云われてはいるが原因遺伝子として確定されたものは未だ無い。また発生学的研究に関しても、正常の直腸肛門形成の「ある段階」で阻害されて鎖肛となるとされるばかりで、鎖肛発生のメカニズム自体に言明したものはほとんどみられず、その発生機序に関しては不明のままである。

## (2) 従来の動物モデルについて

従来の鎖肛モデルとしては *etretinate* や *all-trans-retinoic acid* などを用いた薬剤による奇形誘発マウスと自然発症奇形として発見された *Danforth's short tail(Sd)*マウスや、筑波大学大川らが発見した鎖肛ブタが上げられる。

そのうち *Sd* マウスは 1930 年 *Danforth* により報告されたマウスで、全ての *homozygotes* と多くの *heterozygotes* は生後早期に尿路奇形により死亡する。生き残った *heterozygotes* の *Sd* マウスは概ね良好な経過を辿るのだが、尾骨欠損などの脊椎奇形を有しており脊椎奇形マウスとしてよく用いられている。加えて直腸奇形を有するものも時折みられその表現型は *caudal regression* 症候群に類似しており鎖肛モデルとしても用いられてきた。

しかしながらそのいずれの動物モデルにおいても鎖肛の発生頻度はそのうちの何割かであり 100%発症モデルは存在しない。

## (3) 本モデルについて

当院発生研センター臓器形成分野の仙波らが作製樹立した脊椎奇形モデル *Sickle tail(Skt)*マウス(*Semba K et al. Genetics* 2006) と *Sd heterozygotes* マウスとの *double mutant* マウスを作製したところ、*Sd* マウスよりも高度な脊椎奇形を来すマウスが誕生した(論文投稿中)。その多くは *Sd* マウスと同様に生後早期に尿路奇形により死亡するのだが、一方で生き残ったマウスの多くが生後 2 週前後で死亡するという二峰性の経過を辿る。その死因を調べると全例腹部膨満を来しており 100%鎖肛を合併していることが今までの実験で判明している。(因みに死亡時の両腎欠損率は 40%弱である) また、胎令 19.5 日の *Sd Skt/+ Skt double mutant* マウスを解析したところ 8 例中 8 例全例で鎖肛を有していることも今までの実験で確認している。

本モデルは薬剤誘発モデルよりも自然発症に近いモデルであると同時に 100%に鎖肛を有することから、胎生期における解析が直腸肛門奇形の発生の各段階を観察していることになる画期的かつ稀有なモデルである。

## 2. 研究の目的

100%に鎖肛を発症する本モデルの鎖肛形成過程の時間的解析を行ない、鎖肛病型と骨盤底形成との関係を観察するとともに、いまだ解明されていない直腸下降停止過程ならびに直腸盲端と周囲各臓器(膀胱、尿道、子宮、膈、前庭など)との瘻孔形成過程に、アポトーシスや細胞増殖がどう関与しているかを明らかにする。

また、鎖肛発生に関与する可能性を有する分子の発現、局在を解析し直腸肛門奇形発生の分子機構を明らかにする。100%鎖肛発

症の優位性を生かすことで、それぞれの発現量や局在的变化が、たとえ軽微な差異であったとしても、正常と比して明らかにできると考える。

### 3. 研究の方法

本モデルの維持の方法は、Sd/+マウスと Skt/+マウスを交配させることにより得られる Sd Skt/+マウスと、Skt/+マウスと Skt/+マウスを交配させることにより得られる Skt/Skt マウスを両親とし、IVF(in vitro fertilization)にて受精させることによつてなされる。

胎生期各段階(9.5-13.5日)の Sd Skt/+ Skt double mutant マウス胎仔をパラフィン包埋し8 $\mu$ m連続切片を作製しHE染色にて観察する。HE染色にて鎖肛病型の観察をするとともに、総排泄腔(cloaca)と総排泄腔膜(cloacal membrane)、総排泄腔を前後に分ける尿直腸中隔(urerectal septum)、後に直腸になる肛門直腸管(anorectal canal)の各部位における TUNEL 法でのアポトーシスの時間的解析、PCNA 染色での細胞増殖の時間的解析を行なう。また X-gal 染色を用いての観察も行なう。

鎖肛発症のメカニズムに関与する分子を明らかにする目的で、当該時期、同部位周辺の組織から抽出した DNA の DNA マイクロアレイでの解析を行う。in situ hybridization 法で Hoxa13、Hoxd13、Cdx2 の発現変動を観察する。

### 4. 研究成果

胎生期各段階(9.5-13.5日)の Sd Skt/+ Skt double mutant マウス胎仔をパラフィン包埋し8 $\mu$ m連続切片を作製しHE染色にて観察した。総排泄腔(cloaca)と cloacal

plate、総排泄腔を前後に分ける尿直腸中隔(urerectal septum)の形成を時間的解析に解析したところ、胎生 11.5-12.5 日の本マウスにおいて cloacal plate 背側の短縮がおきると同時に背側の間葉組織の肥厚がおきていることが分かった。また X-gal 染色した上で観察したところ、形態異常を示している部位での Skt の発現を確認できた。この結果から、本マウスにおける、鎖肛発生過程での形態的異常とその時期が判明した。また形態異常を示している cloacal plate 背側周囲での Skt の発現は、鎖肛発生に cloacal plate 背側の短縮と間葉組織の肥厚が関与している可能性を示している。

次に、鎖肛発症のメカニズムに関与する分子を明らかにする目的で、当該時期、同部位周辺の組織から抽出した DNA を DNA マイクロアレイにて解析した結果、Hoxa13 と Hoxd13 の発現上昇と Cdx2 の発現低下がみとめられた。In situ hybridization 法では、Hoxd13 は胎生 9.5 日に後腸内胚葉背側に発現、胎生 10.5 日に生殖結節で発現上昇していた。一方 Cdx2 は胎生 9.5 日に cloacal plate 周辺組織で発現低下していた。この結果から本マウスの鎖肛発症メカニズムに Hoxa13 と Hoxd13、Cdx2 の発現変動が関与していることが示唆された。

### 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 1 件)

① Hiroko Suda, Kwang-Jong Lee (他 7 名、2 番目)、The *Skt* gene, required for anorectal development, is a candidate for a molecular marker of the cloacal plate, *Pediatric Surgery International*、査読有、

27、2011、269-273、doi:  
10.1007/s00383-010-2785-0

〔学会発表〕(計5件)

- ① Hiroko Suda, Kwang-Jong Lee, Abnormal development of the notochord in the congenital anorectal malformations (ARMs) mouse model. 第45回太平洋小児外科学会議 (PAPS 2012)、2012年6月4日、上海(中国)
- ② Hiroko Suda, Kwang-Jong Lee, The gene expression profiling to reveal molecular events of anorectal malformations (ARMs). XXIV International Symposium on Paediatric Surgical Research、2011年9月9日、Graz, Austria
- ③ 須田博子, 李光鐘, 鎖肛モデルとしたSd, Skt<sup>Gt</sup>ダブル変異マウスの検討、第48回日本小児外科学会定期学術集会、2011年7月20日、TFT東京ファッションタウンビル(東京)
- ④ Hiroko Suda, Kwang-Jong Lee, The *Skt* gene, required for anorectal development, is a candidate for a molecular marker of the cloacal plate. XXIII International Symposium on Paediatric Surgical Research、2010年9月13日、東京ガーデンパレス(東京都)
- ⑤ 須田博子, 李光鐘, 総排泄腔におけるSkt遺伝子の発現と、Skt変異が直腸肛門奇形に与える影響に関する解析、第110回日本外科学会定期学術集会、2010年4月8日、名古屋国際会議場(愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

李 光鐘 (LEE KWANG-JONG)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 00467995

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

須田 博子 (SUDA HIROKO)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 40632659