

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861665

研究課題名(和文)直腸肛門奇形モデルマウスを使用した肛門形成シグナルの探究

研究課題名(英文)Research of signals involved in development of the anorectum by model mice of anorectal malformations

研究代表者

中田 光政(NAKATA, Mitsuyuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90375775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5aコンディショナルノックアウトマウスを使用し、直腸肛門形成と肛門括約筋群の発生に対するWnt5aの関与を考察した。タモキシフェンは0.05g/母体gが実験解析するのに適正の投与量であった。直腸肛門奇形はE8にタモキシフェンを投与した場合のみ発症し、E9以降では、肛門は開口した。直腸肛門奇形の発生学的要因はcloacal plateが伸長しないことである。Wnt5aはcloacal plateの伸長に関与しているが、その運命決定はcloacal plateの伸長が始まる前であり、Wnt5aの発現初期段階であることが判明した。また、肛門括約筋群の発生に異常はなく、直接的関与は否定された。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of Wnt5a for anorectal malformations and development of the anal sphincter by Wnt5a conditional knock-out mouse. 0.05g/maternal weight of Tamoxifen induced necessarily the phenotype. When tamoxifen dosed at embryonal day 8, the anorectal malformation of the fetus was induced. When tamoxifen dosed after embryonal day 9, anal opening was normal. The maldevelopment of the elongation of the cloacal plate caused anorectal malformations embryologically. The induction of Wnt5a elongated the cloacal plate. It was shown that Wnt5a decided the phenotype of anorectal malformations at the early stage of the fetus. But wnt5a was not directly concerned with the pathogenesis of an anal sphincter.

研究分野：小児外科

キーワード：直腸肛門奇形 Wnt5aコンディショナルノックアウトマウス 肛門括約筋

## 1. 研究開始当初の背景

直腸肛門奇形では手術により、肛門を形成して排便ルートを確認するが、肛門括約筋の発達が未熟で術後の排便機能が改善しない症例も多くある。直腸肛門奇形は、遺伝性はないものの約半数に合併奇形が存在し、発生過程における遺伝子発現レベルの低下が疾患発症、および肛門括約筋群の未熟性の要因となっていることが考えられる。基礎医学的には原因遺伝子は同定されていなく、肛門の開口・肛門括約筋群の発達に関与する遺伝子も未だ十分解明されていない。

これまでの研究で Shh-Wnt5a の遺伝子シグナルが肛門形成に重要であることがわかっている。また、前段階の研究で Sd マウス、レチノイン酸投与マウスの2種類のモデルマウスを使用し、直腸肛門奇形は発生学的に cloacal plate の伸長が不全になっている。また、遺伝子発現解析では Wnt5a が cloacal plate の伸長関与することを同定した。

## 2. 研究の目的

直腸肛門奇形の発生学的変化とそれに伴う遺伝子発現の発現変化を解析することで肛門括約筋の未熟性の原因が判明する可能性がある。Wnt5a ノックアウトマウスは直腸肛門奇形モデルマウスであり、Wnt5a コンディショナルノックアウトマウスを使用し、肛門の開口・肛門括約筋群の発達に関与する Wnt5a の役割について時間的・空間的に検討し、Wnt5a の肛門形成・肛門括約筋への関与を解析する。

## 3. 研究の方法

直腸肛門奇形モデルとして Wnt5a-flox マウスと CRE-ERT マウスを掛け合わせ、タモキシフェン誘導による Wnt5a コンディショナルノックアウトマウスを使用した。

Wnt5a-loxp マウスと CRE-ERT マウスにおいて Wnt5a loxp/loxp, CRE+/- 雄 × Wnt5a

loxp/loxp 雌の交配で得られる胎仔に対してタモキシフェンを母体の腹腔内に投与し、CRE を発動させて Wnt5a をノックアウトさせ、表現形を得る。まず、直腸肛門領域における至適投与量至適時期を検討する必要がある。至適投与時期にタモキシフェンを投与し、経時的に直腸肛門発生を HE 染色で観察する。

- (1) 系の確立: タモキシフェンを 0.05, 0.1g/母体 g を妊娠時期により腹腔内投与し、E18 で帝王切開を施行し、胎仔毒性の評価と外観による表現型の確認を行った。外観の表現形は Wnt5a ノックアウトマウスの外観を参考に前肢・後肢の指の発生と尾の発生で判別した。
- (2) 直腸肛門奇形発生と Wnt5a の関与: 胎仔が毒性に耐え、かつ表現形が得る 0.05g/母体 g で E8-E13 の間で胎齢別に Wnt5a をノックアウトし、E18 で帝王切開を施行し、直腸肛門、肛門括約筋の発症を HE 染色で観察する。

## 4. 研究成果

### 【結果】

- (1) タモキシフェンによる胎児毒性の評価: E8 では 0.05g/母体 g 投与において胎仔 17 匹中 13 匹は E18 段階まで発育が進み、2 匹は E8 段階、2 匹は E10 段階で死亡した。0.1g/母体 g 投与においては E18 まで発育したものは 0 匹で 11 匹は E8 段階、1 匹は E9 段階、2 匹は E10 段階、2 匹が E12 段階で死亡した。E10 では 0.05g/母体 g 投与において胎仔 6 匹中 6 匹が E19 段階まで発育し、0.1g/母体 g 投与においては 7 時期中 7 匹が E18 段階まで発育し、途中死亡はなかった。他、E9, E11, E12, E13, では E10 とほぼ同様の結果となった。(図 1)

- (2) タモキシフェン誘導による外観の表現

型：外観の表現形は 0.05g/母体 g 投与において E8-E11 までのコンディショナルノックアウトにおいて発現した .E12 ,E13 では 0.1g/母体 g 投与においても外観の表現型は出現しなかった．これは Wnt5a の外観の表現型への関与が終了した発生段階であると考えられた．  
したがって，胎子が毒性に耐え，かつ表現形がでる 0.05g/母体 g が実験解析するのに適正の投与量である．( 図 2 )

(3) 直腸肛門奇形は E8 にタモキシフェンを投与した場合のみ発症し，E9 以降に投与した場合，肛門は開口した．また，肛門括約筋の発生は正常だった ( 図 3 )．

タモキシフェン投与濃度と投与時期における毒性の評価

Gestation days	inj. dose	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	計
E8	0.05g/g	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	13
	0.1g/g	11	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	16
E9	0.05g/g	-	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	12
	0.1g/g	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
E10	0.05g/g	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
	0.1g/g	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
E11	0.05g/g	-	-	-	-	0	0	1	0	0	0	0	10
	0.1g/g	-	-	-	-	0	1	0	4	0	0	0	8
E12	0.05g/g	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0	11
	0.1g/g	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	5

図 1

タモキシフェン投与濃度と投与時期における外観の表現型の出現

Gestation days	injection dose	phenotype
E8 inj	0.05g/g	+
	0.1g/g	dead
E9 inj	0.05g/g	+
	0.1g/g	+
E11 inj	0.05g/g	+
	0.1g/g	-
E13 inj	0.05g/g	-
	0.1g/g	-

図 2

タモキシフェン投与タイミングによる肛門の表現型

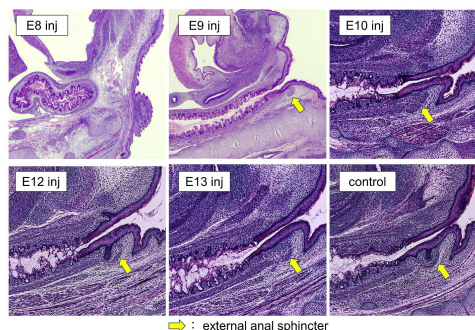


図 3

【考察】

肛門の発生は E9.5 から始まる生殖突起の腹側への伸長とともに cloacal plate が伸長し，さらに同時に尿生殖隔膜が cloaca を膀胱と直腸に腔を分けていく．E12.5 で尿生殖隔膜が腔を完全に分けた時点で cloacal plate の最も背側部分がアポトーシスを起こし，肛門が開口する．直腸肛門奇形の発生的要因は cloacal plate が伸長しないことである．Wnt5a は cloacal plate の伸長に関与している．しかし，Wnt5a コンディショナルノックアウトマウスにおいて Wnt5a を経時的に E8-E13 までノックアウトした場合，直腸肛門奇形の表現型を示したのは E8 の時のみであった．これは，cloacal plate の伸長が始まる前の段階であり，Wnt5a による直腸肛門奇形の運命決定は発現初期段階であることが判明した．また，肛門開口後にノックアウトした場合では肛門括約筋群の発生に異常はなく，Wnt5a の直接的関与は否定された．

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

中田光政

Wnt5a コンディショナルノックアウトマウスにおける直腸肛門奇形モデルの検証と肛門括約筋の発達

第 53 回日本小児外科学会総会(2016 年 5 月 24 ~ 26 日, 福岡県福岡市ヒルトン福岡シーホーク)

中田光政

直腸肛門奇形モデルマウスを用いた肛門形成シグナルの検索

第 19 回大腸肛門機能障害研究会(2013 年 9 月 8 日、東京都港区ホテルオークラ東京)

中田光政

Wnt5a コンディショナルノックアウトマウスにおける直腸肛門奇形と肛門括約筋群の発生

第 50 回日本小児外科学会学術集会(2013 年 5 月 30 日 ~ 6 月 1 日、東京都新宿区京王プラザホテル)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 光政 (NAKATA, Mitsuyuki)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90375775

(2) 研究分担者

該当なし( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

該当なし( )