

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791734

研究課題名（和文） 直腸肛門奇形モデルマウスにおける
神経・筋発生異常の分子生物学的解析研究課題名（英文） The molecular biological study for the maldevelopment of nerve and
muscular system in model mice with anorectal malformations.

研究代表者

津田 知樹（TSUDA TOMOKI）

京都府立医科大学・医学研究科・研修員

研究者番号：40319132

研究成果の概要（和文）：直腸肛門奇形の病態発生は今なお不明であり、様々な要因が直腸肛門奇形の形態発生に起因していると考えられる。本研究は、胎生早期の後腸領域での正常の直腸肛門発生において重要な役割を果たす、PCSK5 および GDF11 の発現に注目した。一方、ビタミン A の誘導体であるレチノイン酸（ATRA）を過剰投与することにより、正常の直腸肛門発生が障害され、直腸肛門奇形が発生することを我々は報告してきた。今回の研究では、ATRA を過剰投与して得られる直腸肛門奇形モデルマウスを用いて、免疫組織学的手法により直腸肛門奇形モデルマウスの後腸領域での PCSK5 および GDF11 の発現が抑制されることを、分子生物学的に示した。我々の知る限りでは、本研究は、直腸肛門奇形モデルマウスにおける ATRA と PCSK5/GDF11 の相互作用を世界で初めて報告する成果である。このことは、直腸肛門奇形の患児における病態発生について、複雑な病態生理を解明する一助になり得るものである。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of anorectal malformations (ARM) remains poorly understood and several factors should be involved in the morphogenesis of anorectal malformations, however, this study provides the evidence that PCSK5 and GDF11 expression in early hindgut morphogenesis could be the key factors in normal anorectal development which could be disturbed by administration of overdose of ATRA. To our knowledge, this is the first to investigate the interactions between ATRA and PCSK5/GDF11 in the hindgut region of ARM mice embryos. We believe that further analysis of the cascade reaction important for hindgut morphogenesis should help understanding of the pathogenesis of ARM in human.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児外科学

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：直腸肛門奇形、レチノイン酸、神経・筋発生、モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

直腸肛門奇形は外科的治療を要する新生児消化管奇形の中で最も発生頻度の高い先天異常である。その病型の多様性により、正しい解剖学的理解および発生学的理解に基づいた診断および治療が不可欠である。特に中間位型および高位型については、術後排便機能に關与する脊髄神経および骨盤底筋群の発達が不良な症例が多く、しばしば術後排便管理に難渋し、患児ならびにその保護者のQOLに關しては、十分に満足し得ないのが現状である。さらに、泌尿器や脊椎等の合併奇形も多く、直腸肛門奇形を含めた合併奇形の治療方法や手術時期といった治療戦略を更に複雑かつ困難にしている。

治療方法の選択に影響を与える病型分類や病因に關する発生過程についてはこれまで古典的な概念のみで説明されるにとどまり、今なお不明な点が多い。

2. 研究の目的

直腸肛門奇形の病態発生解明のため、本症の原因となりうる責任遺伝子およびそのシグナル伝達経路を追求し、分子生物学的レベルにおける本症の病態発生を明らかにし、本症に対する治療および予防への可能性を探ることが最終的な目的である

3. 研究の方法

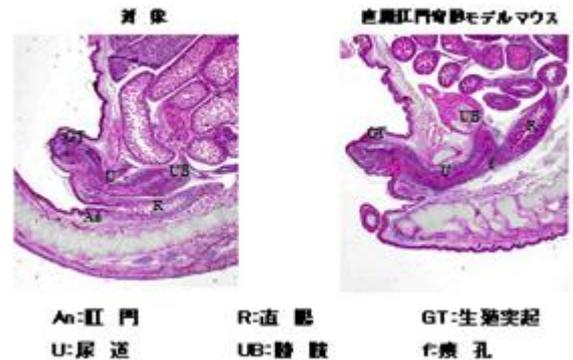
①直腸肛門奇形モデルマウスの作成

C57BL/6マウスの雌雄を約2時間交配させた後、膣栓の確認をもって妊娠0日目、0時間とする。妊娠9日目にエトレチネート(合成ビタミンA製剤)をゴマ油に浮遊させ経口投与する。この実験系によりほぼ100%の確率で、雄では直腸尿道瘻、雌では直腸総排泄腔瘻を有する高位型の直腸肛門奇形マウス胎仔を採取することができる(図1)。この実験系を用いて、各胎齢(胎生9日目~18日目)において胎仔を採取する。対照群として妊娠9日目にゴマ油のみを投与したものを用いる。(Congenital anomalies in mice induced by etretinate. Kubota Y, et al. Eur J Pediatr Surg 10(4):248-251 1999)

②直腸肛門奇形モデルマウスの後腸領域における免疫組織学的解析

直腸肛門奇形モデルマウス胎仔を、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて4℃48時間固定する。その後、20%サッカロース水溶液にて24時間浸透させた後、OCTコンパウンドを用いて包埋し凍結する。凍結後、脊髄神経および骨盤内臓器を標的とし、クリオスタットを用いて8μmの厚さに矢状断連続凍結切片を作成する。矢状断連続凍結切片を3%過酸化水素水・メタノール溶液(室温30分)を用いて、内因性ペルオキシダーゼ活性

の抑制後、以下の免疫組織学的検討を行う。



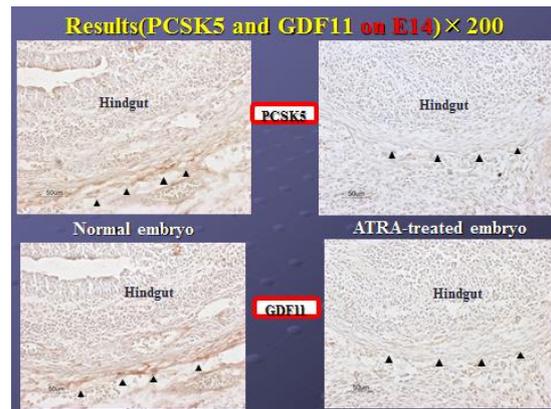
(図1)

③免疫組織学的手法を用いた直腸肛門奇形モデルマウスにおける後腸領域のPCSK5およびGDF11発現の解析

抗PCSK5抗体、抗GDF11抗体を一次抗体とし、4℃12時間インキュベートする。ヒストファインキット(ニチレイ)を用いて免疫組織化学染色を施行し発色はDAB法を用いる。胎齢ごとに、後腸領域における各形態形成因子の発現を視覚化することにより後腸、神経および筋群の発生課程を経時的・空間的に解析する。

4. 研究成果

対照マウス(正常マウス胎仔)では、後腸領域(後腸背側の間葉組織)におけるPCSK5蛋白およびGDF11蛋白の発現を認めた。一方、直腸肛門奇形マウス胎仔においては、同領域における両蛋白の発現が抑制されていた(図2)。



(図2)

この結果より、正常マウス胎仔の後腸領域において、正常の直腸肛門の形態発生過程においては、形態形成に重要な役割を果たすと考えられるPCSK5およびGDF11の発現を認めるが、ATRA過剰投与により、得られた直腸肛門奇形マウスにおいては、PCSK5蛋白および

GDF11 蛋白の発現については、抑制的な影響を及ぼすことが示唆された。このことは、ATRA 過剰投与は後腸領域の発生分化に重要な役割を果たす両蛋白の発現を抑制し、それらの標的遺伝子の発現異常をもたらし、正常な消化管発生に障害を来し、直腸肛門奇形を形成する可能性が示唆される。

この研究は、直腸肛門奇形マウスにおける ATRA と PCSK5/GDF11 の相互作用を示す、新しい報告である。今回、複雑な直腸肛門奇形の病態発生に関わる様々なシグナル伝達物質の一部ではあるが、胎生期の後腸発生において重要な因子である PCSK5/GDF11 と ATRA との相互作用が、直腸肛門奇形の病態発生に関係することを示唆する結果である。今回は、一部の形態発生に関わるシグナル伝達物質の解析ではあるが、更なる研究を進めることにより、多種多様で複雑な直腸肛門奇形の病態発生の解明における一助になるものである。これらの病態発生の解析の積み重ねが、今後の研究により、直腸肛門奇形患児の治療および予防の手がかりとなるを期待しており、本研究の最終目標である。

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 9 件)

- ① Tsuda T, Iwai N, et al, PCSK5 and GDF11 Expression in the Hindgut Region of Mouse Embryos With Anorectal Malformations, *European Journal of Pediatric Surgery*, 査読有, 2011, 238-241, DOI: [10.1055/s-0031-1273691](https://doi.org/10.1055/s-0031-1273691)
- ② Sasaki Y, Tsuda T, et al, Establishment of a rescue program for anorectal malformations induced by retinoic acid in mice. *Journal of Pediatric Surgery*, 査読有, 2011, 1396-1399, DOI: [10.1016/j.jpedsurg.2010.10.011](https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2010.10.011)
- ③ 佐々木康成、津田知樹、他、Hirschsprung 病の標準的診断法について、*小児外科*、査読無、43 巻、2011、623-626
- ④ 小野滋、津田知樹、他、腭頭部原発ユーイング肉腫の 3 歳男児の 1 例 (英語)、*京都府立医科大学雑誌*、査読有、120 巻、2011、139-144
- ⑤ 若尾純子、津田知樹、他、腹部打撲を契機に発見された腭頭部原発 Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の 1 例、*小児がん*、査読有、48 巻、2011、7-11

- ⑥ 佐々木康成、津田知樹、他、直腸肛門内圧検査、*小児外科*、査読無、42 巻、2010、756-759
- ⑦ 津田知樹、岩井直躬、他、腹会陰式直腸肛門形成術々後成人例における QOL、*小児外科*、査読無、42 巻、2010、1201-1204
- ⑧ Kimura O, Tsuda T, et al, Laparoscopic versus open abdominoperineal rectoplasty for infants with anorectal malformation. *Journal of Pediatric Surgery*, 査読有, 2010, 2390-2393 DOI: [10.1016/j.jpedsurg.2010.08.042](https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2010.08.042)
- ⑨ 岩井直躬、津田知樹、便秘なのにどうして便失禁となるの? *小児外科*、査読無、41 巻、2009、1329-1332

[学会発表] (計 9 件)

- ① 津田知樹、直腸肛門奇形の病態発生における PCSK5 および GDF11 蛋白の発現に関する検討。第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26 日-28 日、誌上発表 (震災のため)
- ② 津田知樹、小児外科領域における便秘に対する大建中湯の有効性。第 48 回日本小児外科学会学術集会、2011 年 7 月 20 日、東京
- ③ 津田知樹、便失禁の診断と治療—特にバイオフィードバック療法について—。第 47 回日本小児外科学会学術集会、2010 年 6 月 19 日、名古屋
- ④ Tomoki Tsuda, PCSK5 and GDF11 expression in the hindgut region of mouse embryos with anorectal malformations, 57th British Association of Paediatric Surgeons, 2010 年 7 月 22 日, Aberdeen, Scotland
- ⑤ 津田知樹、便失禁の診断と治療—特にバイオフィードバック療法について—。第 109 回日本外科学会定期学術集会、2010 年 11 月 23 日、浜松
- ⑥ 津田知樹、小児外科疾患における大建中湯の排便機能に及ぼす影響。第 65 回日本大腸肛門病学会学術集会、2009 年 4 月 3 日、福岡

- ⑦ 津田知樹、小児外科疾患における大建中湯の排便機能に及ぼす影響. 第 185 回 近畿外科学会、2009 年 6 月 13 日、神戸
- ⑧ 津田知樹、成人例の QOL からみた腹会陰式直腸肛門形成術の検討. 第 25 回 日本小児外科学会秋季シンポジウム、2009 年 10 月 31 日、鹿児島
- ⑨ 津田知樹、当教室における小児の慢性便秘に対する治療について. 第 40 回 日本小児消化管機能研究会、2010 年 2 月 20 日、甲府

[その他]

ホームページ等

<http://www.kpu-m.ac.jp/k/pedsurg/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 知樹 (TSUDA TOMOKI)

京都府立医科大学・医学研究科・研修員

研究者番号：40319132