

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592633

研究課題名(和文)食道閉鎖モデルマウスにおける責任遺伝子発現様式の三次元的解析に関する研究

研究課題名(英文)Visualizing expression patterns of target genes in the gut of Adriamycin Mouse Model

研究代表者

佐藤 英章(SATOU, Hideaki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：70339852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：病因がまだ確立されていない先天奇形であるVACTER association(以下本症)に対し、アドリアマイシン投与マウスモデルが知られており、関与する遺伝子は約10種類以上報告されているが、その遺伝子発現様式の三次元解析を行うに至っていないのが現状である。本研究は遺伝子発現異常の原因究明ならびにその三次元構築を行うことも目的とした。その結果、アドリアマイシン投与マウスにおけるVATER症候群に関与する前腸・後腸発生異常は脊索の異常分岐による各種遺伝子の発現異常によるものと推察され、さらにその三次元的解析により形態学的発現様式の解析が行われた。

研究成果の概要(英文)：Background: Adriamycin mouse model (AMM) is a model of VACTERL anomalies. Various genes have been revealed affecting on those anomalies, but the precise reason of those is unclear. We aimed to reveal the cause of those anomalies by staining some target genes, and realization of those genes presentation as 3D using new method. Methods: Time-mated CBA/Ca mice received two intraperitoneal injections of Adriamycin on embryonic day (E) 7 and 8. Fetuses were harvested from E9 to E11, stained following whole mount in situ hybridization with labeled RNA probes to detect Shh and Fork head box F1(Foxf1) transcripts. Immunolocalization with endoderm marker Hnf3b was used to visualize morphology. Embryos were scanned by Optical Projection Tomography that enables to obtain 3D representations of expressions. Conclusion: The delamination of the developing notochord is disrupted, which may influence signaling mechanisms from the notochord to the gut resulting in abnormal patterning of the gut.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：先天性消化器疾患学 VACTER Association 食道閉鎖 直腸肛門奇形 脊索

1. 研究開始当初の背景

先天奇形である VATER association (以下本症) は新生児期に認められる気管食道瘻、鎖肛、椎骨異常、腎異形成のうち 3 要素以上を有するものであり、胎生期中胚葉系分化異常により引き起こされる。本疾患は新生児期に多段階の手術を要し、術後の成長段階においても様々な問題を有するが、本疾患の病因はいまだ確立されていない。本疾患の動物モデルはマウスのアドリアマイシン投与モデルが知られており、この研究により多数の責任遺伝子が報告されている。これら遺伝子の定性解析はこれまで二次元にとどまり、その発現様式を立体的に把握、具現化し定量解析の結果と総合的に判断することは困難であった。このためコンピューター解析により各遺伝子の発現様式を三次元構築し解析する手法が発達してきており、さまざまな方法が報告されている。しかしながら各解析方法の利点、欠点によりいまだ完全に胎児における遺伝子発現様式の三次元解析を行うに至っていないのが現状である。近年開発された遺伝子発現の三次元解析の手法のひとつである Optical Projection Tomography (OPT) は迅速かつ非侵襲的な手法で、RNA レベルからタンパク質レベルまでの様々な染色結果の三次元構築が可能であり、その結果は三次元からの立体的な発現様式の把握が容易であり他の三次元構築を行う各手法の欠点、短所を補うものである。応募者はこれまで OPT を用いた正常マウスにおける遺伝子発現パターンの解析を行い報告してきた。(Visualising expression patterns of *Shh* and *Foxf1* genes in the foregut and lung buds by Optical Projection Tomography Hideaki Sato, Paula Murphy, Shay Giles, John Bannigan, Hajime Takayasu, Prem Puri Pediatric Surgery International, 2008 Jan;24(1):3-11.) 次なる段階として本疾患のモデルマウスを用いた遺伝子異常の解明を行うものである。

2. 研究の目的

本研究の目的はこの OPT を用い本疾患モデルマウスでの各発生段階、特に中胚葉から食道・直腸形成期における責任候補遺伝子の発現パターンを三次元解析し、発現異常部位を立体的に具現化することを目的とし、最終的に本疾患の遺伝子治療への可能性を探求する。

3. 研究の方法

(1) <動物モデルの作成>

当該実験は遺伝子発現様式の詳細な研究であるため、実験対象動物種を In Bleed である CBA/Ca マウスとし、対象母体数はすでに報告されているマウスアドリアマイシン投与時における食道閉鎖、気管食道瘻発生率から、一対象遺伝子、一日齢につきアドリアマイシン投与群 5 母体、コントロール 1 母体とする。

上記 CBA/Ca マウスを当施設動物舎において飼育。一日のうち 6 時に Light on, 18 時に light Off とし、18 時 ~ 20 時に雌雄母体を同一ケージに入れ計画的に交配し、6 時に膣栓の有無を確認する。その膣栓の確認をもって妊娠 0 日とする。妊娠母体に対し妊娠 7 日、8 日に Adriamycin (Doxorubicin, EBEWE Pharma Ges.m.b.H. Nfg.KG, A-4866 Unterach, Austria) 6mg/kg を 24 時間の間隔で腹腔内投与を行う。Adriamycin は生理食塩水にて 0.3mg/ml の濃度に投与直前に調整され、これによってマウスに対する腹腔内投与量は 20ml/kg に調整される。コントロールモデルに対しては同日、生理食塩水の同量腹腔内投与を行う。

母体を妊娠 10 日 (E10)、11 日 (E11)、12 日 (E12) に頸椎脱臼により安楽死させ、直ちに開腹し子宮を摘出し冷却した PBS 内にて胎児を摘出する。胎児は 4% Paraformaldehyde にて一晩固定し、翌日 Methanol にて脱水、-20 にて保存される。

(2) <Whole Mount Immunohistochemistry>

保存してある胎児を PBT (PBS+Tween20) により復水。このとき E11 以上の胎児は体内まで抗体を十分反応させるべく、第一鰓弓の高さにて切断し、喉頭~直腸までの前・後腸のみを含む胎児モデルを作成する。

Goat Serum を用いた Blocking Solution にて一晩 Blocking ののち、一次抗体 HNF3- を最低 5 日間 4 恒温下に反応させる。洗浄ののち、cy3, 488 各二次抗体に 4 恒温下 7 日間反応させる。

洗浄ののち、遮光下に 0.15% Paraformaldehyde にて固定。

(3) <Whole Mount In Situ Hybridisation>

保存してある胎児を PBT (PBS+Tween20) により復水。このとき E11 以上の胎児は体内まで RNA プローブを十分反応させるべく、第一鰓弓の高さにて切断し、喉頭~直腸までの前・後腸のみを含む胎児モデルを作成する。

Protenase-K により胎児の組織の細胞間結合を緩める。

Hybridisation Buffer に一晩おいたのち、各 RNA Probe を追加。対象 RNA は腸管内皮細胞発生に関与する *Shh*、組織間質に発現する *Foxf1* とした。70 恒温槽にて一晩反応。

洗浄ののち Sheep Serum を用いた Blocking Solution にて Blocking を行った後抗 DIG 二次抗体に一晩以上反応させる。

NBT/BCIP 溶液により染色する。染色後、体表より解析可能な遺伝子発現パターンを記録する。

(4) <Optical Projection Tomography>

Whole Mount In Situ Hybridisation 後の胎児を 1.0% Agarose に封入し、2:1 benzyl alcohol:

benzyl benzoate solution.にて処理した後 Zoology Department ,Trinity College Dublin にある OPT scanner へと設置する。この Scanner を用いて 360 度方向からの遺伝子発現パターンを記録し、Edinburgh Mouse Atlas Project (EMAP)によるソフトウェアを用いコンピューター解析を行い、遺伝子発現パターンの 3 次元構築を行う。

4. 研究成果

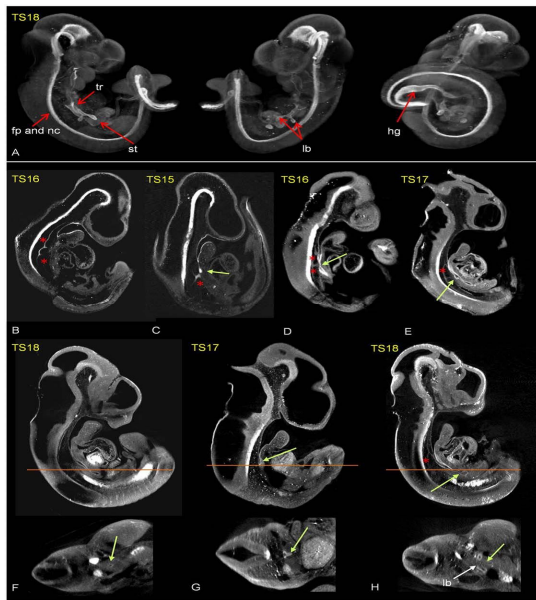
(1) アドリアマイシン投与によるマウス胎児への影響

アドリアマイシン投与群では E10:25% , E11:42% , E12:75%の胎児に外観上(鰓弓、四肢、尾)発達遅延が認められた。

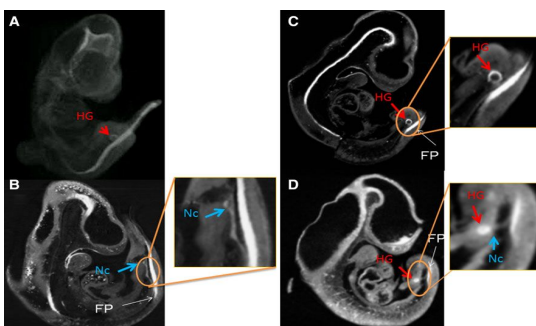
(2) アドリアマイシン投与による前腸・後腸発生への影響

上皮成分のマーカである HNF3- を用いた Whole Mount Immunohistochemistry による解析では各胎生段階において正常発達ならびにアドリアマイシン投与マウスにおいて食道閉鎖(図1)ならびに後腸の嚢胞状変化など形態異常(図2)が観察された。また、各々において遺伝子発現物質などの発生に深くかかわる脊索の前腸・後腸への異常分岐が確認され、その異常分岐点における形態異常が確認された。

(図1)



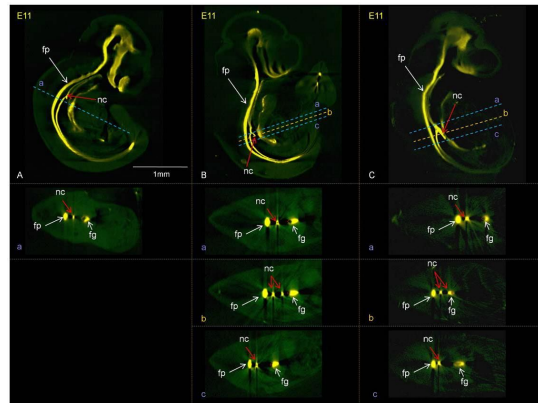
(図2)



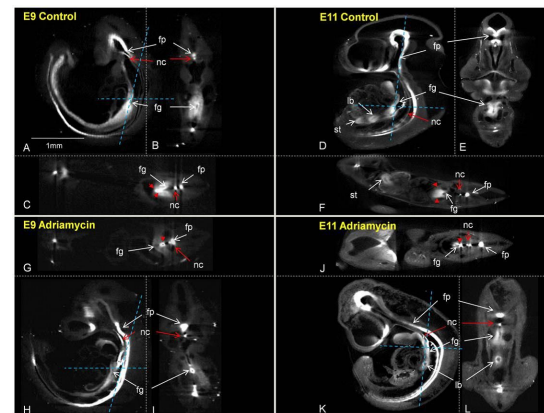
(3) アドリアマイシン投与による前腸・後腸発生にかかわる遺伝子発現への影響

腸管内皮細胞発生に関与する *Shh*、組織間質に発現する *Foxf1* の発現を Whole Mount In Situ Hybridisation により観察した。前腸では、脊索の異常分岐部位において本来前腸の腹側にもみられる *Shh* の発現が Dorso-Ventral Patterning)前腸の背側に見られ(図3)、また周囲の間質における *Foxf1* の発現は微弱なものとなっていた。(図4)

(図3)

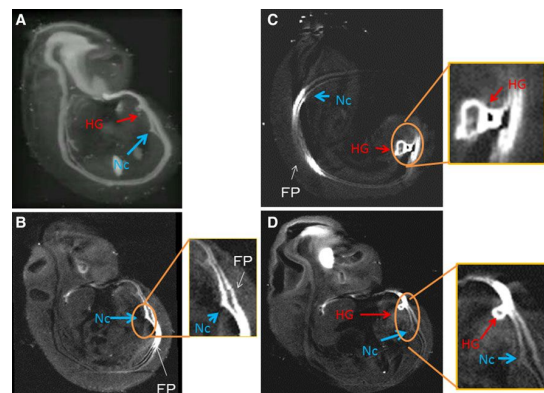


(図4)

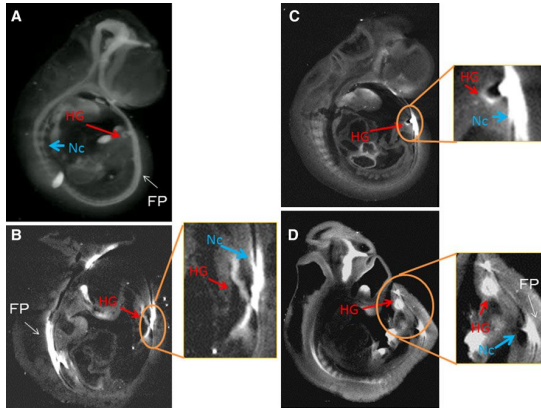


後腸においては、脊索の異常分岐部に見られる嚢胞状形態変化部に *Shh*、(図5) *Foxf1* (図6) の発現を認めた。

(図5)



(図6)



以上本研究結果により、アドリマイシン投与マウスにおける VATER 症候群に關与する前腸・後腸発生異常は脊索の異常分岐による各種遺伝子の発現異常によるものと推察され、さらにその三次元的解析により形態学的発現様式の解析が世界に先駆け行われた。

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 2 件)

Hideaki Sato, Piotr Hajduk, Shigeyuki Furuta, Munechika Wakisaka, Paula Murphy, Prem Puri, Hiroaki Kitagawa, Effect of abnormal notochord delamination on hindgut development in the Adriamycin mouse model. 査読有、Pediatr Surg Int. 2013 Nov;29(11):1209-16.doi:10.1007/s00383-013-3386-5.

Piotr Hajduk, Hideaki Sato, Prem Puri, Paula Murphy. Abnormal notochord branching is associated with foregut malformations in the adriamycin treated mouse model. 査読有 PLoS One. 2011;6(11):e27635 doi: 10.1371/journal.pone.0027635

[学会発表](計 2 件)

Hideaki Sato、Effect of Abnormal Notochord Delamination on Hindgut Development in the Adriamycin Mouse Model、第 50 回日本小児外科学会学術集会、2013 年 5 月 31 日、東京

佐藤 英章、Optical Projection Tomography - 遺伝子発現解析の新技术 -、第 29 回 関東小児外科症例検討会、2012 年 3 月 3 日、東京

[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 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

佐藤 英章 (SATO, Hideaki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70339852

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: