

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790292

研究課題名(和文)胎児後部器官群の協調的発生における細胞移動、血管・神経系組織の影響に関する研究

研究課題名(英文)The analyses for the mechanisms of the coordinated development of the lower body

研究代表者

松丸 大輔 (MATSUMARU, Daisuke)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・学内助教

研究者番号：50624152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：泌尿生殖系器官など胎児後部の器官群は、隣接する器官群が相互に関連して発生・成り立っていると考えられる。これはいくつかの先天性疾患で複数の器官群に同時に症状が現れることから推察されるが、そのメカニズムは殆ど明らかになっていなかった。本研究では、臍帯下部領域から外生殖器上部領域への細胞移動現象の存在を器官培養実験により示した。Hhシグナル関連遺伝子改変マウスでは、この過程に異常を呈する可能性を示唆した。これらの結果は、臍帯下部領域が細胞を供給することによって外生殖器や膀胱、腹壁といった広範囲の協調的器官形成に寄与し、またその破綻が先天性疾患へとつながる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Organogenesis in the posterior part of embryos includes a coordinated developmental process such that adjacent tissues and structures influence one another's morphogenesis. Several congenital diseases display syndromic abnormalities in the wide range of tissues. Despite the importance of the understanding pathogenic mechanisms for such diseases, even the mechanisms of the developmental coordination of lower body are unclear. In the current study, we suggested the presence of cellular migration from the proximal segment of the umbilical cord (infra-umbilical mesenchyme) toward the dorsal part of the genital tubercle by tissue culture experiments. Hedgehog signal-related mutants displayed the disturbance of such process. The current study may contribute to understanding the basis for such defects.

研究分野：発生医学

キーワード：泌尿生殖器 器官形成 先天性疾患 ヘッジホッグシグナル 細胞移動 遺伝学的解析 マウス

1. 研究開始当初の背景

我々の身体は、一個の細胞である受精卵から増殖・分化を繰り返し、細胞レベル、組織レベルのそれぞれで厳密に規定された発生プログラムに従って形作られ成り立っている。その際、内臓等の器官発生は、発生遺伝学的なプログラムの制御に加えて、胸腔、腹腔容積の物理的制限にも従うことになる。このように生物の発生過程は複雑な制御を受けている。発生工学や分子発生学の隆盛により、顔面、四肢形成などのモデル系において、その形成の分子メカニズムに関する知見が日々積み重ねられつつある。しかし、このような身体の協調的な発生について、つまり隣接する臓器群が器官系を形成するため連携、又は相互に協調してどのように発生するのかについて、そのメカニズムの解析は殆どなされていなかった。

胎児の身体が協調的に発生・成長していくことは、いくつかの先天疾患で、単独臓器のみならず複数の臓器系や器官系にわたって異常が観察されることから推察されてきた。前腹壁の異常が原因であるとされる先天疾患である膀胱外反症 (Bladder exstrophy, OMIM: %600057) や、臍帯ヘルニア-膀胱外反-鎖肛-脊椎奇形コンプレックス (OEIS complex, OMIM: 258040) の患者では、前腹壁・外生殖器・腹直筋・骨盤など広範囲にわたり同時に症状が現れる。(Perovic, ATLAS of congenital anomalies of the external genitalia, 1999)。

細胞増殖因子ヘッジホッグ (Hedgehog: Hh) シグナル関連因子群の遺伝子改変マウスを用いた先行研究により、Hh シグナルの異所的導入が前腹壁-骨盤の協調的発生の破綻の遺伝的要因となる可能性が示唆された (Matsumaru *et al.*, PLoS ONE, 2011)。しかし、外生殖器を含めた胎児後部領域の隣接器官群における形態形成異常はどのような細胞メカニズムによるものか明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、隣接する器官群の発生に同時に影響を及ぼす要因の候補として、発生段階における器官間の細胞移動の影響、器官群に内包される血管・神経系組織の影響を解析した。それぞれについて、Hh シグナル関連因子群の遺伝子改変マウスを用いて、その表現型あるいは他の細胞増殖因子群や転写因子群とのクロストーク、遺伝子発現の変化を解析することで、胎児後部器官群の形成にどのような影響が生じているか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、協調的発生という概念に基づき、複数の器官間に同時に影響を与えうる因子について遺伝学的アプローチを用いて解析した。複合遺伝子改変マウスの作製による表現型の検討、器官培養系を用いた細胞系譜実験、Cre-loxP システムによる条件付き遺伝子組換えを利用した Hh シグナル機能獲得型変異導入実験を行なった。採取した遺伝子改変マウス群の胎仔組織を用いて、組織切片の作製、*in situ* hybridization 法による遺伝子発現解析、免疫染色によるマーカー分子発現解析、共焦点顕微鏡を用いたイメージング解析等を行なった。

4. 研究成果

(1) *Alx4*^{lst} マウスの表現型解析

Alx4^{lst} (*Strong's luxoid: Lst^l*) マウスは、転写因子 *Alx4* (Aristaless-like homeobox 4) のホメオボックスをコードする領域に 16 塩基対の欠損を有する自然変異マウスであり、前腹壁部位に異常を呈する。*Alx4* 遺伝子は Hh シグナルに対し負の影響を与えることが示唆されている。先行研究により、Hh シグナルが異所的に導入されることが前腹壁部-骨盤の協調的器官形成の破綻につながる可能性が示唆されていた (Matsumaru *et al.*, PLoS ONE, 2011)。しかしながら、その外生殖器形成への影響については詳細な解析は行なわれていなかった。そこで、*Alx4*^{lst} マウスの外生殖器の表現型を解析し、腹壁部との関連を解析した。*Alx4* の遺伝子発現は外生殖器原基の隆起以前の胎齢 10.5 日でも観察された。胎齢 11.5 日では外生殖器背側間葉と前腹壁に発現しており、胎齢 12.5 日や 13.5 日においても発現は継続した。泌尿生殖器における *Alx4*^{lst} マウスの表現型は、胎齢 11.5 日には、臍帯下部領域と外生殖器原基背側領域の間葉の低形成として観察された。低形成領域は、*Alx4* 遺伝子の発現領域と重複していた。胎児後期の胎齢 18.5 日においても *Alx4*^{lst} マウスでは外生殖器背側が低形成であった。次に、*Alx4*^{lst} マウスにおけるマーカー遺伝子発現に関して検討した。臍帯下部から外生殖器背側にかけて発現する遺伝子で、そのノックアウトマウスが前腹壁部に異常を生じる *AP2α* (*Transcription factor AP-2 alpha*) や *Pitx1* (*Paired-like homeodomain transcription factor 1*) 遺伝子に関して検討したところ、どちらも発現が低下していた。加えて、胎齢 10.5 日、11.5 日胚において VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) 抗体を用いた免疫組織染色法によって血管走行を可視化して検討したが、解析の範囲内では有為な差は観察されなかった。

(2) 臍帯下部-外生殖器背側領域における細

胞移動の解析

胎齢 18.5 日において臍帯の挿入部位と外生殖器の間の距離を計測したところ、*Alx4st* マウスでは有為に短かった。ヒト胎児における臍帯-外生殖器間の距離は、膀胱外反症の出生前診断に有用である可能性が示唆されている。*Alx4st* マウスにおいて免疫組織染色法を用いて細胞外マトリックス (ECM) の構成要素の一つである Fibronectin の発現解析を行なったところ、胎齢 12.5 日において発現が減少していた。Fibronectin の機能として、細胞接着や細胞移動に重要であることが示唆されているので、その発現の減少は、当該領域における細胞移動に影響を及ぼしている可能性が想起された。先行研究により、臍帯下部領域を含む総排泄腔周辺の間葉細胞が外生殖器背側、膀胱間葉に広く分布することが示されている。このため、臍帯下部領域から外生殖器背側への細胞の流入が起こっている可能性を仮定して解析を進めた。まず、正常マウス胚において、臍帯下部・外生殖器を含む組織片、臍帯下部領域を除去した外生殖器のみの組織片で培養実験を行なった。その結果、臍帯下部領域を除去した外生殖器のみの組織片では、外生殖器の上部側の形態に異常が観察された。次に、蛍光色素 DiI を用いた組織標識実験を行なった。正常マウス胚では、臍帯下部から外生殖器上部側への標識細胞の移動が観察されたが、*Alx4st* マウスではその移動距離が短かった。これらの結果から、臍帯下部領域から外生殖器背側へ細胞が移動している事が示唆された。この結果は、Harvard 大のグループによっても再現された (Tschopp *et al.*, Nature. 2015)。

(3) Hh シグナルと前腹壁-外生殖器背側表現型の関連

遺伝子発現解析により *Alx4st* マウスでは、Hh リガンドである *Shh* (*Sonic hedgehog*) 遺伝子、Hh 受容体であり Hh シグナルのターゲット遺伝子の一つである *Patched1* 遺伝子の発現が増強していた。Hh シグナルが異所的に導入されることが前腹壁部-骨盤の協調的器官形成の破綻につながる可能性が先行研究により示唆されていた (Matsumaru *et al.*, PLoS ONE. 2011)。しかし、この影響による外生殖器の表現型に関しては詳細に解析されていない状況であった。そこで、Hh リガンドである *Shh* の遺伝子改変マウス、Hh シグナル転写因子であり、主として Hh シグナルを負に制御する *Gli3* (*GLI-Kruppel family member 3*) の遺伝子変異マウスと *Alx4st* マウスの複合遺伝子改変マウスを作製し、想定される Hh シグナルの強度と前腹壁-外生殖器領域の表現型の関連を解析した。その結果、想定される Hh シグナル量が相対的に高くなるほど臍帯-外生殖器間の距離は短くなり、かつ外生殖器の表現型も重篤となった。この複合遺伝子改変マウスに *Shh* 遺伝子変異がさらに導入されると、表現型はやや回復した。こ

の結果は、外生殖器背側の異常が Hh シグナルによるものであることを示唆した。*Alx4* 遺伝子や *Gli3* 遺伝子は、基本的には Hh シグナルに対し抑制的な作用を有するとされているので、それ以外の作用が存在する可能性を否定できない。このため、異所的な Hh シグナル導入を薬剤投与によって行うことのできる系を用いた解析を行なった。使用したマウスは、薬剤誘導型 Cre 組換え酵素 (CreER) を有する Cre ドライバーマウスと、Cre による遺伝子組換えにより構成的活性型 Smoothed (SmoM2: Hh リガンドの非存在下でもシグナルを細胞内に伝達し続ける) を発現するマウスである。まず、*Gli1* 遺伝子 (Hh シグナル転写因子であるが、その標的遺伝子の一つでもある。) の遺伝子座に CreER をノックインしたマウスでの検討を行った結果、Hh 受容細胞での Hh シグナルの継続的活性化は膀胱平滑筋の異常増殖を呈したが、外生殖器形成に異常は観察されなかった。次に、CAG プロモーターを使用した全身発現性 CreER トランスジェニックマウスを使用して同様の実験を行なったところ、変異体マウスは胎仔後期において外生殖器の背側低形成を示した。同マウスが前腹壁部、骨盤の異常を呈することは先行研究により示されている (Matsumaru *et al.*, PLoS ONE. 2011)。この結果から、Hh シグナルが前腹壁部-外生殖器背側にかけての異常に関連することが示された。

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4件)

Miyagawa S*, Harada M*, Matsumaru D*, Tanaka K, Inoue C, Nakahara C, Haraguchi R, Matsushita S, Suzuki K, Nakagata N, Ng RC, Akita K, Lui VC, Yamada G. (equally contributed first author) Disruption of the temporally regulated cloaca endodermal β -catenin signaling causes anorectal malformations. Cell Death Differ. 21:990-997, 2014. 査読有 DOI: 10.1038/cdd.2014.21.

Ng RC, Matsumaru D, Ho AS, Garcia-Barceló MM, Yuan ZW, Smith D, Kodjabachian L, Tam PK, Yamada G, Lui VC. Dysregulation of Wnt inhibitory factor 1 (Wif1) expression resulted in aberrant Wnt- β -catenin signaling and cell death of the cloaca endoderm, and anorectal malformations. Cell Death Differ. 21:978-989, 2014. 査読有

DOI: 10.1038/cdd.2014.20.

Matsumaru D., Haraguchi R*, Moon AM, Satoh Y, Nakagata N, Yamamura K, Takahashi N, Kitazawa S, Yamada G. (*equally contributed first author) Genetic analysis of the role of Alx4 in the coordination of lower body and external genitalia formation. Eur J Hum Genet. 22:350-357, 2014.
査読有
DOI: 10.1038/ejhg.2013.160.

Haraguchi R*, Matsumaru D., Nakagata N, Miyagawa S, Suzuki K, Kitazawa S, Yamada G. (*equally contributed first author) The hedgehog signal induced modulation of bone morphogenetic protein signaling: an essential signaling relay for urinary tract morphogenesis. PLoS One.7:e42245, 2012.
査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0042245.

〔学会発表〕(計3件)

松丸 大輔, 原口 竜摩, 山田 源.
胎児上部泌尿器系異常の発症メカニズム
研究: 総排泄腔上皮由来ヘッジホッグシ
グナルの遺伝学的機能解析
日本薬学会 第134年会
2014年3月28日 熊本市総合体育館(熊
本県 熊本市)

Matsumaru D, Haraguchi R, Miyagawa S, Satoh Y, Suzuki K, Yamada G.
Genetic Analysis of the Role of Hedgehog Signaling in the Coordination of Lower Body Formation
The 61st NIBB Conference "Cellular Community in Mammalian Embryogenesis"
2013年7月10日 Okazaki Conference Center (愛知県 岡崎市)

松丸 大輔.
ミュータントマウスシリーズのご紹介; 生殖、発生、毒性評価との接点
第30回関西生殖発生毒性フォーラム
2012年11月10日 弁天町市民学習センター(大阪府 大阪市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igaku/ubu/160904/index.html>

(1) 研究代表者

松丸 大輔 (MATSUMARU, Daisuke)
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・
学内助教
研究者番号: 50624152