

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 2 5 日現在

機関番号：3 2 6 2 0

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：2 4 7 9 1 8 9 2

研究課題名(和文)先天性臍帯ヘルニアの病因 - 分子機構の解明

研究課題名(英文)Investigation of Pathogenesis of Omphalocele

研究代表者

土井 崇 (Doi, Takashi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：5 0 4 3 3 7 7 7

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：カドミウムトリモデルの切片標本をヘマトキシリン-エオジン染色し、組織学的に主に体節の発生におけるカドミウム投与群と対象群との相違点を比較観察した。次にRNAを抽出し主に体節の発生に重要な標的遺伝子の発現を統計学的に解析した。また標的蛋白に対する抗体を用いて蛍光免疫染色したものを多焦点顕微鏡を用いてその分布と発現強度を二重盲検法により客観的に比較した。最後にカドミウムトリモデルにおけるN-アセチルシステインの予防投与による酸化ストレス抑制に伴うさまざまな分子機構の変化を解析した。これらの研究成果はヨーロッパ小児外科学会を中心に、様々な国際学会での発表を通して発信することができた。

研究成果の概要(英文)：We firstly observed the difference between Cd-treated chick embryo group and control group by using Hematoxylin-Eosin dying method, especially focusing on the somite development. We then extracted RNA from the chick embryo and statistically analyzed target gene expression which is strongly associated with somitogenesis. We also performed immunohistochemistry by using confocal microscope to see the distribution and intensity of target protein expression. Finally, we analyzed molecular change in the chick embryo after pre-treatment of N-acetylcysteine to reduce the oxidative stress levels. We successfully reported these results in various international meeting including Annual Meeting of European Pediatric Surgeon's Association.

研究分野：発生学

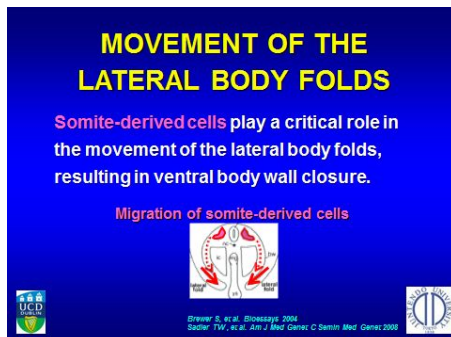
キーワード：免疫染色 多焦点顕微鏡 酸化ストレス カドミウム

## 1. 研究開始当初の背景

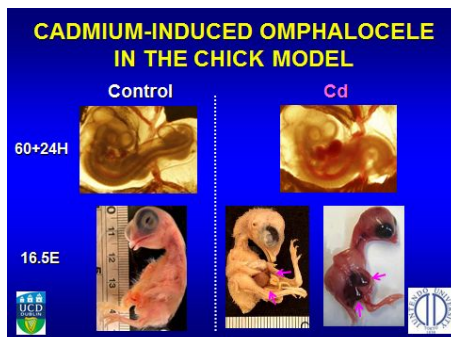
先天性の腹壁異常は2000出生に1人の割合で見られる大変頻度の高い先天異常である。そのうち臍帯ヘルニアは最も多く認められる疾患の1つで、正中線上の腹壁欠損および拡大した臍輪から突出した、羊膜からなるヘルニア嚢に覆われた腹腔内臓器を認める、胎児期の生理的臍帯ヘルニアの腹腔内への還納不全と定義されている。



その発生機序は未だに不明であるが、近年の研究による一説によると、初期の胎児期における体節の分化・発達の段階における何らかの異常が、その後の体節由来細胞の腹壁原器への侵入を妨げ、結果として腹壁の側板が腹側正中に寄って腹壁を閉鎖する機序を崩壊させてしまうのではないかとされている。

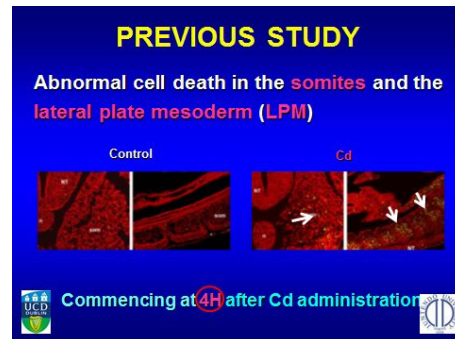


そこで今回我々はその仮説に基づき、臍帯ヘルニアの動物モデルを用いて、体節の分化・発達に関与する分子機構を追求することにした。我々の研究チームからの最近の報告で、重金属カドミウムをある一定の濃度および時期に鶏卵に投与した際に、ヒトの臍帯ヘルニアに非常に類似した先天性腹壁異常を約45～50%の非常に高い再現性をもって呈することが立証された。



このトリ臍帯ヘルニアモデルにおいて、カ

ドミウム投与後最も早期に発見された組織学的異常は「体節」における異常なアポトーシスで、この現象はカドミウム投与後4時間の時点から起こっていることが我々の研究チームから報告された。



しかしながら、この投与後4時間という非常に限定された時節の特定の時点において、こういった分子機構が影響を受け、見られる先天異常の形成に関与しているかは未だに理解されていない。例えば興味深い標的遺伝子の一つであるPAX3遺伝子は、胎児発生期に体節に発現し、体節の発生・発達を含め、特に脊椎動物の胎児の筋の発生・発達において、MRFs (Myogenic Regulatory Factors) を活性化しながら、その非常に重要な役割を果たしている。さらにPAX3遺伝子のノックアウトマウスモデルでは、先天性の腹壁の欠損を呈することが報告されている。しかしながら、臍帯ヘルニアの発生機序におけるPAX3およびMRFsの関与の詳細については、未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究を通して明らかにしたかったことは大きく2点、カドミウム投与により誘起されたトリ臍帯ヘルニアモデルにおいて、こういった遺伝子および蛋白の発現がその機序に関与しているのか。特にこの研究期間内では、胎生早期の体節の発生におけるPAX3とMRFsの役割を追求したい。トリ臍帯ヘルニアモデルにおいて、その発生に寄与している標的遺伝子・蛋白が重要な働きをしている信号伝達機構の崩壊が、どのタイミングで起こっているのか。そのタイミングをヒトの胎生に照合し、ヒトの先天性臍帯ヘルニア発生の胎児期における予防医療の可能性を探る、であった。本研究の学術的な特色・独創的であった点は、近年確立されたばかりのカドミウムトリモデルを臍帯ヘルニアの分子機構の解明目的に使用する点にある。これまで腹壁欠損の動物実験モデルのほとんどがマウスのノックアウトモデルやラットの薬剤性モデルに依存してきたが、その多様にわたる多発奇形と比較的低い再現性が問題点であった。またこれら哺乳類を用いた動物実験においては、胎生期の形態学的な経過観察が困難であるという欠点が示唆されてきていた。また、多発奇形を伴った、いわゆる症候性の

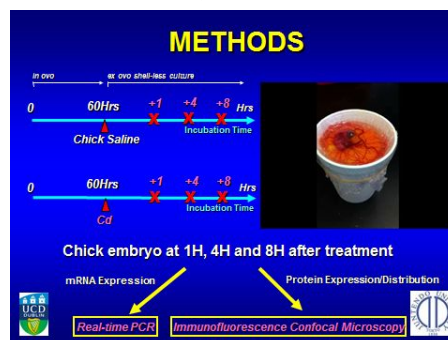
臍帯ヘルニア（例：Beckwith-Wiedmann 症候群）に関しての遺伝子学的研究は、これまで比較的散見されるものの、無症候性の臍帯ヘルニアに関する分子学的研究はほとんどなされていない。今回使用するトリ臍帯ヘルニアモデルは、比較的高い再現性をもった、最新の無症候性臍帯ヘルニアモデルとして、今回の研究代表者が第一人者として世界に発信している点で、極めて独創的であり、近年の国際学会で各分野からの注目度が上がっているのみならず、その分子機構の解明が大いに期待されている。この動物モデルで得られた分子学的な研究成果を、更に将来的には他の動物モデル（ノックアウトマウスやラットモデル）での報告との比較、およびヒトでの遺伝子研究分野での報告とともに、比較・統合することにより、ヒトでみられる先天性臍帯ヘルニアの病因解明と胎児期における予防治療に一筋の光を投じることができることが期待された。

### 3. 研究の方法

器内温度 38℃、湿度 65 - 75% に設定した孵卵器を用いて有性鶏卵（ロス種）を温めハミルトン ハンバーガー分類で 17 - 18 に達したトリ胎児を、発泡スチロール製の容器と食品用ラップにて作製した移植装置を用いて卵殻内から殻外に移植し（ex-ovo explantation technique）、50  $\mu$ M・50  $\mu$ l の CdAc をトリ胎児の直上からピペットにて直接滴下する。対象群には 50  $\mu$ l の NaAc を同様に滴下したものを使用する。その後孵卵器に再び戻し、その腹壁形成への影響が確認できる、保温開始から 24 時間後、48 時間後の時点でトリ胎児を摘出し、形態学的にその催奇形性を評価し、記録する。またホルマリン保存のトリ胎児からパラフィンブロックを作製した後、厚さ 5  $\mu$ m で体幹の下肢レベルにて切片標本を作り、ヘマトキシリン・エオジン染色にて組織学的に主に体節の発生におけるカドミウム群と対象群との相違点を観察する。

カドミウムトリモデルの体節の分化・発生において、一番早期に組織学的な変化が見られたのが保温 4 時間後以降であったことがこれまでの研究で分かっているため、その分子機構の解明のために保温から 1 時間、4 時間、8 時間後にトリ胎児を摘出し、膜を取り除いた上で、Trizol 保存（RT-PCR 用）とホルマリン保存（免疫染色用）の両方を作成する。Trizol 保存したものからは RNA を抽出し、逆転写酵素による cDNA 検体を作製した後、あらかじめ自らデザインしておいた標的遺伝子（PAX3 と MRFs: MyoD, Myf5, Myogenin, Myf6 など）に対する特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、結果を対象遺伝子の GAPDH との反応生成物の濃度を比較することにより、比較的発現度を統計的にまとめる。ホルマリン保存のトリ胎児からパラフィ

ンブロックを作製した後、マイクロトームを用いて厚さ 5  $\mu$ m で体幹の下肢レベルにて切片標本を作る。PAX3 と MRFs 蛋白に対するポリクローナル抗体を 100 倍希釈して一次抗体として用いる。一次抗体と 4℃ の冷蔵庫内で一晩寝かせた切片標本を、今度は蛍光（テキサスレッド）でラベルされた二次抗体と常温で 20 分間反応させ蛍光染色を行う。封入には核酸に対する DAPI 染色を含んだ親水性のシーリング材を用いる。最後に多焦点顕微鏡を使用し、高解像度の蛍光染色画像を記録し、その分布と発現の程度を二重盲検法により客観的に比較する。



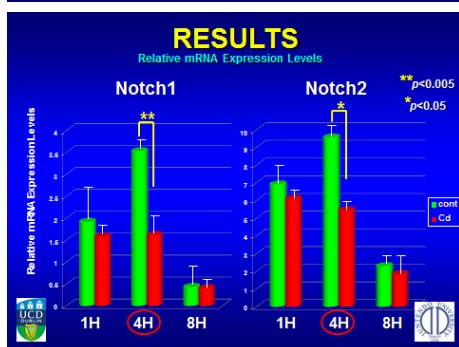
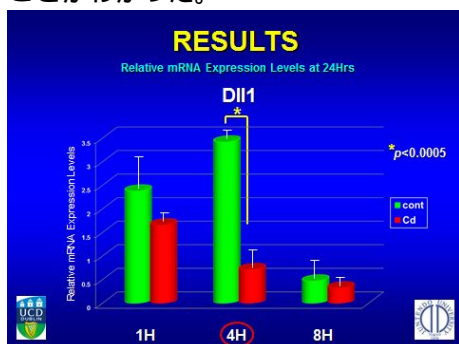
平成 24 年度～平成 25 年度の PAX3 および MRFs を標的とした分子学的研究の成果を基に、さらに他の関連遺伝子や蛋白を同じ方法で調査し比較・統合することにより、さらに総合的に、この先天性臍帯ヘルニアの病因となり得る分子シグナル機構の詳細を解明していく。

### 4. 研究成果

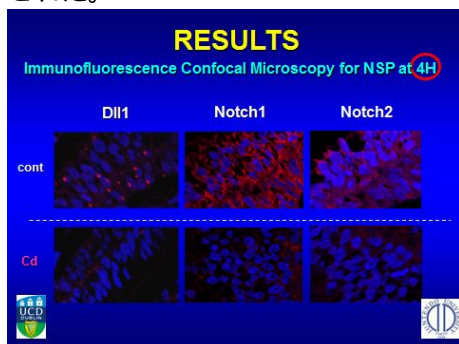
胎生早期における Cd 投与後が体節の発生異常を起こし、引いてはそれが腹壁閉鎖過程の破綻をきたすのではないかと、という仮説に基づき本研究を進めていくと、カドミウム投与後 4 時間のトリ胎児に見られるまず最初の組織学変化として体節細胞の異常細胞死が見つかった。しかしながら分子学的にどのようなシグナル経路がこの特定の胎生期に形態学的異常を引き起こすのか、そのプロセスには不明な点が多かった。これまでの今回の研究で組織学的に体節における異常な細胞死が、カドミウム投与後 4 時間で著明に起こることがわかっており、我々は Notch シグナル経路が細胞死に関わることから、まず第一にこのシグナル経路を調べることにした。Notch 受容体、そしてそれに対するリガンドの Delta-like-1(Dll1)の相互作用は特に体節の発生に重要な働きをしていることが報告されており、我々はトリカドミウム臍帯ヘルニアモデルにおいて Notch1, と Notch2, そして Dll1 の発現がカドミウム投与後 4 時間の前後で抑制されているのでは、と仮説を立てて研究に取り組んだ。リアルタイム PCR にてカドミウム誘発トリ臍帯ヘルニアモデルにおける Notch1, と Notch2, そして Dll1 の遺伝子発現がカドミウム投与後 4 時間後に統計的に有意差をもって抑制されている



ことがわかった。



また蛍光免疫染色では体節でのこれらの蛋白発現が同様に抑制されていることも確認された。



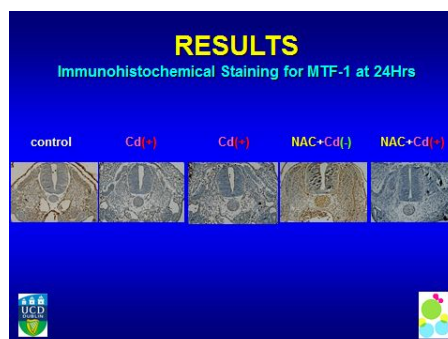
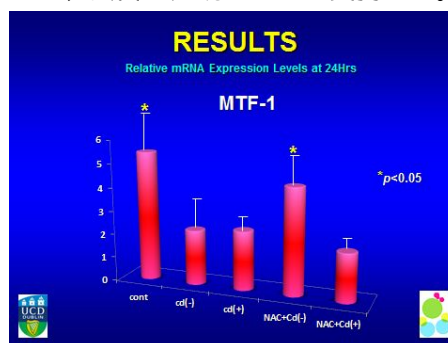
これらの結果から、Notch シグナル経路の破綻がカドミウムトリモデルにおける体節の発生を阻害し、引いては臍帯ヘルニア発生の機序に関与している可能性が示唆され、この研究成果は第 13 回欧州小児外科学会で発表する機会を得た。

次に SIX 遺伝子のうち SIX1 と SIX4 は胎生早期に体節に発現し、特にその体節からの骨格筋形成に大きく寄与していることが知られていることから、これら標的遺伝子の発現を調べることにした。リアルタイム PCR にてカドミウム誘発トリ臍帯ヘルニアモデルにおける SIX1 と SIX4 の遺伝子発現がカドミウム投与後 4 時間後に統計学的に有意差をもって抑制されていることがわかった。また蛍光免疫染色では体節でのこれらの蛋白発現が同様に抑制されていることも確認された。これらの結果から、SIX 遺伝子の発現低下がカドミウムトリモデルにおける体節からの骨格筋の発生・発達を阻害し、引いては臍帯ヘルニア発生の機序に関与している可能性が示唆された。

続いて我々は Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル経路

に着目した。Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル経路は paraxis 遺伝子を活性化することで体節の上皮化を促進することが知られている。この胎生早期における体節の上皮化こそが、骨格筋の筋原細胞の増殖と移動を促すのであり、引いては腹壁閉鎖に重要な側方から腹側への動きを司るものと考えられている。リアルタイム PCR にてカドミウム誘発トリ臍帯ヘルニアモデルにおける paraxis の遺伝子発現がカドミウム投与後 4 時間後に統計学的に有意差をもって抑制されていることがわかった。また蛍光免疫染色では体節でのこれらの蛋白発現が同様に抑制されていることも確認された。これらの結果から、paraxis 遺伝子の発現低下がカドミウムトリモデルにおける胎生早期の体節の上皮化を抑制し、骨格筋の筋原細胞の増殖と移動を妨げ、引いては腹壁閉鎖に重要な側方から腹側への動きを阻害し、臍帯ヘルニア発生の機序に関与している可能性が示唆された。

カドミウムは抗酸化酵素を抑制することが知られており、反応性酸化物質の産生をもたらす。これまでの研究により N-アセチルシステインがカドミウムトリモデルにおける酸化ストレスレベルを正常値まで引き下げる効果があることが分かっているが、その分子機構は明らかではない。そこで我々は細胞レベルでの様々なストレスの緩和に重要な役割を果たしている金属反応性転写因子 1 (MTF-1) を増幅させているのではないかとこの仮説を立て、その遺伝子発現レベルと蛋白の発現レベルを検証し、さらに N-アセチルシステインの予防投与によるその遺伝子発現に対する影響も評価した。その結果、N-アセチルシステインの予防投与群で MTF-1 遺伝子の発現が増幅されていることが確認され、蛋白の発現もこれを支持した。



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6件)  
第13回欧州小児外科学会  
第25回国際小児外科シンポジウム  
第14回欧州小児外科学会  
第4回世界小児外科学会  
第27回国際小児外科シンポジウム  
第15回欧州小児外科学会

〔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

6．研究組織  
(1)研究代表者  
土井 崇(DOI, Takashi)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：50433777

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：