

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461642

研究課題名(和文)三次元データを用いた器官形成期ヒト胚子の正常および異常発生の解析

研究課題名(英文)Analysis of normal and abnormal development of human embryos using 3D imaging data

研究代表者

高桑 徹也 (Takakuwa, Tetsuya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40244933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト器官形成期の正常発生、およびに同時期に発生する先天異常の解明のために、京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センターが保持しているヒト胚子から得られたMR画像、位相CT画像、連続組織切片を出発材料として、コンピュータソフトウェアを用いた立体画像の再構成、外表、内部諸器官の形態観察を行い、主要器官発生の定量可視化、胚子の個体差の検討を行った。脳神経系、感覚器(視覚器、聴覚器)、消化管、脾臓、肝臓、膝関節等で正常発生の解析を行い論文発表を行った。また、肝臓、消化管等では異常例の検出、解析を行った。得られた知見は、胎児成長の基準作成の基盤となり、異常例の発見にも有用であり大変貴重である。

研究成果の概要(英文)：Insights into the dynamic and complex processes during organogenesis will require accurate 3D morphologic data with dynamic modeling of embryonic structures to elucidate the complex anatomic remodeling that occurs during these early embryonic stages. In this aspects, morphogenesis during early human embryonic periods, has been precisely analysed using the MR image, phase contrast CT, and serial histological sections. Those embryo and materials derived from the "Kyoto Collection" which is the largest collection of human embryo specimens in the world, stored at the Congenital Anomaly Research Center. We analysed morphogenesis of several main organs during embryonic and early-fetal period, such as brain, sense organ (optic and auditory organs), digestive tracts, spleen, liver, and knee joints. The obtained data will contribute to a better understanding of morphogenesis of human embryo, and serve as a useful reference for fetal medicine and prenatal diagnosis.

研究分野：発生病理学

キーワード：ヒト胚子 形態形成 発生 3次元画像 MRI 位相CT 先天異常

1. 研究開始当初の背景

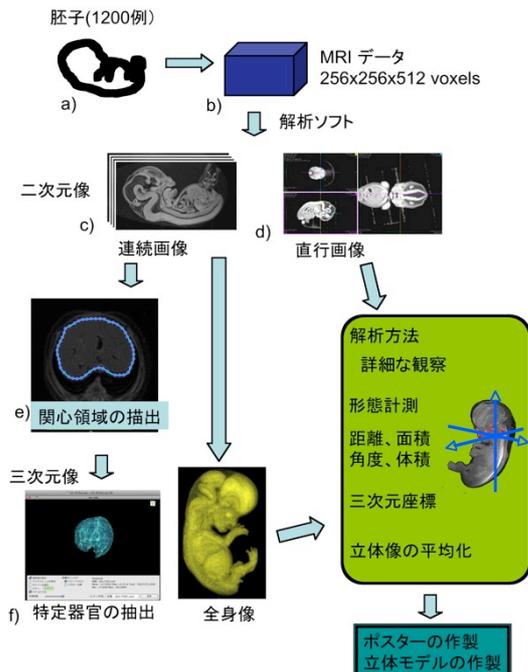
ヒトは受精後 38 週で出生し、前半の 8 週間は胚子期と呼ばれる。胚子期は外表の形態学的特徴と内部観察に基づき 23 段階に分類され、これを Carnegie Stage (CS) という。ヒト胚子期の発生学的研究は、先天異常学の基礎となる重要な分野で、ヒト胚子の収集、組織形態学的観察を基礎に 1 世紀以上におよぶ歴史を持つ。しかしながら、新生児の約 3% とされる生まれつきの障害(先天異常)のうち病理解明されたものはいまだに一部にすぎない。京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センター(代表; 共同研究者 山田)には約 4.4 万例のヒト胚子標本が所蔵され、京都コレクションと呼ばれている。同センターでは、受精後4週から8週の正常ヒト胚子材料を豊富に有し、それらを最先端の技術を駆使して高解像度の画像データを撮像し研究・教育に供している。

2. 研究の目的

ヒト器官形成期の正常発生を解析し先天異常の原因に新たな知見を加えるために、京都大学が保持している器官形成期のヒト胚子由来高解像度 MR 画像、位相 CT 画像、連続組織切片を用いて胚子の外表、内部諸器官の形態観察を行い、正常例について胚子の主要器官発生の立体可視化、定量を行う。また、同時に異常例の抽出、解析を行い先天異常発生の機序に迫る。

3. 研究の方法

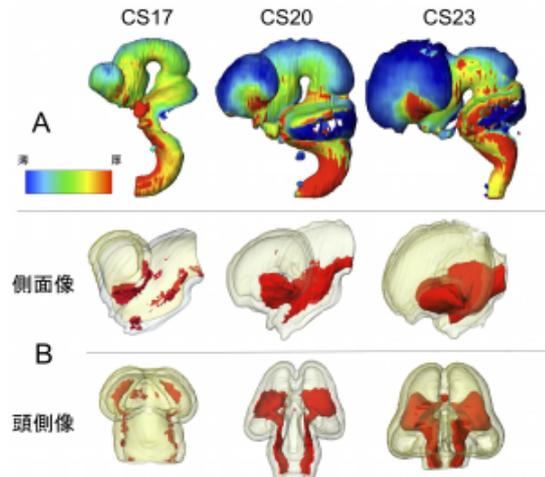
“京都コレクション”に属するヒト胚子の MR 画像、位相 CT 画像、連続組織切片等を出発材料として、主要器官についてコンピュータ上で再構成を行い、発生段階の定量化、可視化を行う。各発生段階の正常形態、計測標準値を確立するとともに、異常個体を抽出できるパラメーターの設定を行い異常個体の抽出を試みる。対象とする器官は脳神経、感覚器、消化器などの腹部器官、膝関節である。(下図参照)



4. 研究成果

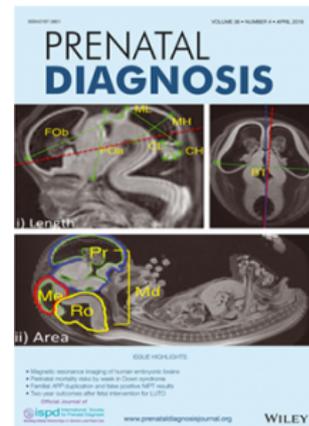
(1) 脳の形態形成

① 胚子期の脳の形態形成

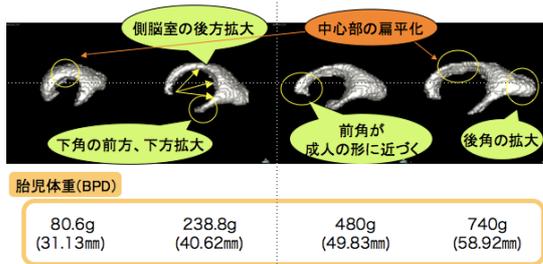


MR 顕微鏡(2.34T)で撮像された CS13-CS23 の計 101 個体のヒト胚子画像を用いて、脳実質と脳室の三次元立体化像を作成し、形態形成の観察と定量的な検討を加えた。次に CS13-23 の大脳基底核、視床の半定量的解析を行った。CS13-23 において、前脳実質は 0.26mm^3 から 110.99mm^3 、中脳実質は 0.20mm^3 から 21.86mm^3 、菱脳実質は 0.69mm^3 から 56.25mm^3 に大きく成長した。CS13-19 において前脳脳室は 0.20mm^3 から 12.77mm^3 、中脳水道は 0.08mm^3 から 4.92mm^3 、第 4 脳室は 0.66mm^3 から 17.43mm^3 と拡大しているが、CS20 以降、前脳脳室、中脳水道は大幅に拡大を続けるのに対して、第 4 脳室は縮小していき、CS23 ではそれぞれの体積は 73.51mm^3 、 7.04mm^3 、 16.69mm^3 となった。3 領域の実質体積合計と胚子体積と比較すると、胚子体積は、 12.73mm^3 から 1513.26mm^3 に成長しているが、その比率は CS14-23 間でおおよそ 10-15% の中でしか変動していなかった。また、CS16 以降には神経核などが発達し、脳の厚さが不均一になっていくことがわかった。これらの測定結果は、胚子期の脳の発生を定量化し評価する基準値になりうる可能性がある。(Shiraishi et al; 文献①)

② ヒト胚子期の脳の計測
ヒト胚子期の MRI 画像を用いて脳の発生に伴う計測値の変化、特徴を論じた。Prenatal diagnosis 36 巻の表紙に採用された。(Kobayashi et al 文献②)



③ 胎児期の脳室の形態形成

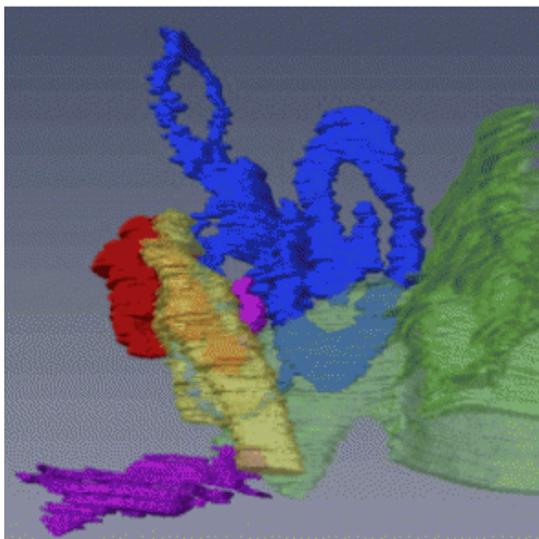


妊娠中期（16-25週）の16体のヒト胎児MRIデータを用いて側脳室の正常発生を解析した。16週の胎児では、側脳室はすでに前角、中心部、後角、下角の主要4領域が区分出来た。側脳室の形態は、近接する大脳の外方、内方への成長の影響を受け、主に伸長と狭小化を認めた。6個のパラメータ（総前後長、前後角間長、後角長、中心部の厚さ、総側脳室高、下角間長）を設定し、長さ測定を行い頭蓋横径（BPD）との関連性を simple regression analysis を用いて検討した。BPD と関連性の高い計測値は、総前後長、前後角間長、後角長、中心部の厚さで ($R^2=0.80-0.93$)、総側脳室高、下角間長は中等度 ($R^2=0.56-0.73$) であった。これら脳室の計測は、胎内での胎児脳の健全な成長と発生を評価する標準的手法を確立するのに寄与する可能性が考えられた。一方、BPD と側脳室体積とは関連性が見られなかった ($R^2=0.13$)。 (Taketani et al 文献③)

(2) 感覚器の形態形成

① 聴覚器;内耳、中耳、外耳の位置関係

背景:ヒトの聴覚器は、内耳、中耳、外耳に分けられる。その発生過程については、これまで組織切片を用いた観察が主体であり、立体像を用いた解析は膜迷路でしか行われていない。また、現在ヒト発生学での発生段階の指標として用いられている CS 分類の提唱以前に行われている



ものが多いため、CS に沿った報告が少ない。

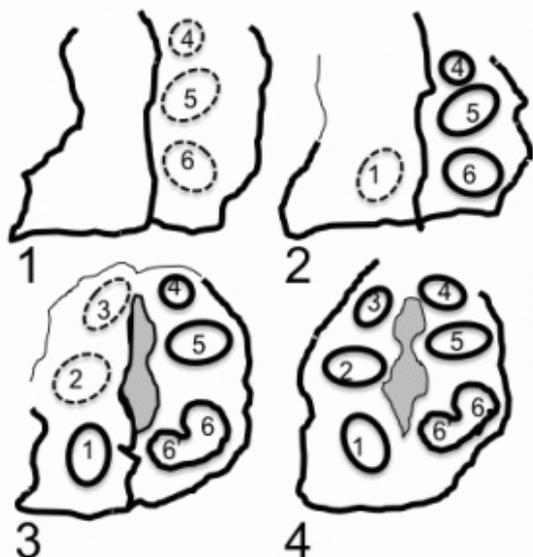
目的:ヒト胚子の連続組織切片を用いて立体像を作成し、胚子期における内耳、中耳、外耳それぞれの各 CS における形態的特徴と、相互の位置関係を明らかにする。

対象・方法: 京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センターに保存されている外表の状態から正常と判断され、かつ、保存状態が良好なヒト胚子の連続組織切片 17 個体(聴覚器 33 例)を用いて聴覚器の立体像を作成し、CS ごとに発生過程を観察した。

結果:①内耳 半規管:CS18(4 個体、聴覚器 8 例)では、3 例で半規管が全く形成されておらず、1 例で後半器官のみ、1 例で前半規管のみ、3 例で前半規管と後半規管の2つが形成されていたが、CS19 以降の個体では全例で 3 つ全ての半規管が観察された。蝸牛管:CS18 (4 個体、8 例)では、6 例で蝸牛管の回転は観察されず、2 例で回転方向(上向き)に曲がり L 字型になっていた。その後徐々に回転が進み、CS19(3 個体、6 例)の 2 例で半回転、CS20(2 個体、4 例)の全例で 1 回転、CS21 (4 個体、8 例)の 2 例と CS22 (3 個体、5 例)の全例で 1 回転半、CS23 (1 個体、2 例)の全例で 2 回転していた。卵形嚢と球形嚢:CS22 (3 個体、5 例)の 3 例と CS23 (1 個体、2 例)の全例で球形嚢と卵形嚢を明確に区別することが可能であった。②中耳 耳小骨:アブミ骨は CS18 (4 個体、8 例)の 2 例ですでに輪の形が形成されていたが、CS23 までの全例でアブミ骨底が観察されなかった。ツチ骨とキヌタ骨は、CS19 (3 個体、6 例)の 4 例で原基が観察でき、CS23 までに成人のものと同様の形態がつけられていた。また、キヌタ・ツチ間の関節面は CS19 (3 個体、6 例)の 2 例で接しており、キヌタ骨・アブミ骨間の関節面は CS21 (4 個体、8 例)の 7 例で接していた。耳管:耳管は全 CS の全例で正面から観察すると平たく、側面から観察すると、耳介へ向かって広がる裂隙状であった。③外耳 外表形態:Streeter G. L.による耳介の形態分類を参考に分類を行ったところ、時系列に沿った形態が観察されたが、左右で形態に差をもつ個体が 6 個体存在した。④相互関係 耳小骨と内耳:側面から観察した際、CS20 までは全例とも、耳小骨が蝸牛管の回転始起部付近で前後方向にずれて存在していたが、発達段階が進むにつれて徐々に近づき、CS22 以降の全例で、耳小骨が前庭付近で互いに重なり合って存在していた。CS23 では、全例でアブミ骨が球形嚢部分に接していた。耳管と外耳道:CS19 では耳管に対して低い位置に存在する外耳道が、発達段階が進むにつれて徐々に耳管に接近していた。

結論:本研究で、CS18 から CS23 までの聴覚器の立体像を作成し、各 CS のそれぞれの発生過程と相互関係が明らかになった。今回、正常個体の発生過程が明らかになったことにより、先天的な聴覚器の異常の早期発見につながる事が期待される。(Ozeki et al 文献④)

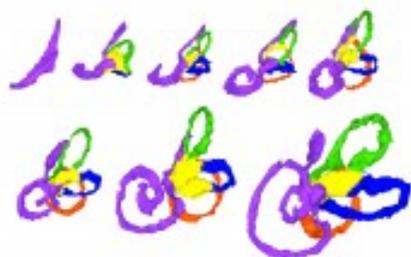
② 聴覚器； 耳介の形成



CS17-23 において各ステージの外耳耳介の形態形成について 500 例の標本観察を行いました。(Ozeki et al 文献④)

③ 聴覚器； 内耳の形成

CS17から胎児期初期の標本を用いて、内耳の形態形成、頭部における位置変化を明らかにした。(Toyoda et al 文献⑤)



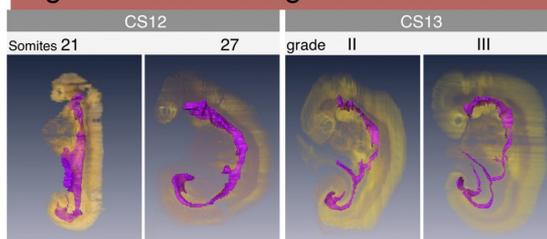
Featured dataset:
Toyoda S, Shiozaki N, Yamada S, Uwabe C, Imai H, Matsuda T, Yoneyama A, Takeda T, Takakuwa T.
3D models related to the publication: Morphogenesis of the inner ear at different stages of normal human development

(3) 腹部器官

① 消化管および消化管由来原基の発生

[背景] CS9-13 の段階は、形成された体節の数で定義されている。このうち CS12-13 は、卵黄嚢の閉鎖が進み消化管が形成され、肺・肝臓・膵臓・胆嚢など消化管由来の器官原基が発生・分化する時期である。この時期のヒト胚子については組織観察に基づく様々な症例報告がされて

Digestive tract during CS12 and CS13



いるが、複数の個体間での分化状況に関する比較検討は行われていない。本研究では、CS12-13 における消化管及びその由来原基の立体構造を明らかにするとともに、CS12-13 の期間を細分化し、同一 CS に相当する個体間で消化管と由来原基の発生・分化の時系列を比較検討した。

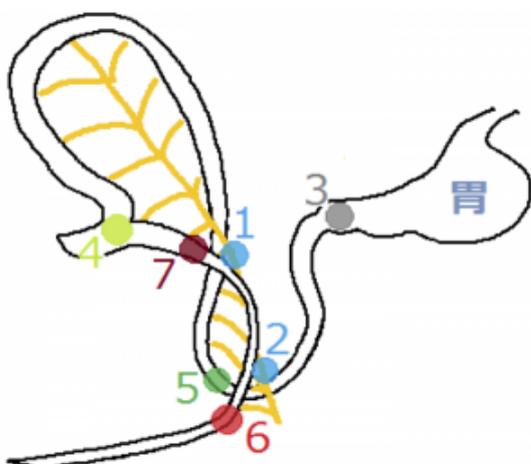
[対象と方法] CS11-13 に相当する計 42 体のヒト胚子連続組織切片を再構築して立体像を作成し、消化管内腔を描出してその形態を観察した。咽頭・肺・胃・肝臓・膵臓領域は組織観察を追加して行った。各個体の体節の数を計測し、体節番号を用いて各器官原基の頭尾方向の位置を検討した。CS12 は体節数、CS13 は眼の原基の発生を 4 段階 (grade I-IV) に細分化したものを時間的指標とし、消化管と由来原基の分化状況を解析した。外表に異常のみられる 6 個体についても同様に再構築を行い、正常個体で検討した分化時系列と比較し、消化管の異常の有無について検討した。

[結果] ①消化管と器官原基の形態変化: 消化管では、CS12の体節数 24 で網嚢の発生、CS13の grade I で 8 つの咽頭嚢の発生、grade II で胃が紡錘型に分化、中腸ループ・十二指腸ループの形成が観察された。由来原基では、CS12 の体節数 26 で肺原基の発生、体節数 27 で頭側肝芽の形成、CS13 の grade I で肺原基の分岐、背側膵芽原基の発生、grade II で胆嚢原基の発生、grade III で気管の分化、grade IV で気管の最長 2 体節分までの伸長が観察された。②器官原基の位置: 肺は第 2 体節の高さから尾側へ下降し、CS12 の体節数 26 以降は第 4 体節付近にとどまっていた。CS13 の grade III での気管分化後も、気管と食道の分岐点は第 4 体節の高さに位置しており、個体差はほぼなかった。CS12 では胃・肝臓が 4 体節ほど下降していたが、CS13 では 1 体節分の下降にとどまり、背側膵芽・胆嚢も肝臓に近接して下降していた。③異常個体の解析: 異常個体 6 例中 4 例は消化管に異常が観察されず、その特徴は作成した分化時系列と一致した。1 例は肺原基と中腸領域、もう 1 例は肝臓原基に分化時系列にあてはまらない形態異常が検出された。

[考察] 胚子の体節数及び細分化した発生段階と、消化管と由来原基の発生・分化時期とは関連性がみられた。CS12-13 の消化管の発生と分化は従来考えられていたよりも精確に進行しており、個体差が少ないと考えられる。今回正常個体の観察から得られた分化時系列を参照して、外表異常の個体において消化管の発達異常を

検出できた。この時系列解析は、消化管に関する異常の早期発見への有用性が見込まれる。(Ueno et al 文献⑥)

② 生理的な腸管の回転と臍帯ヘルニア



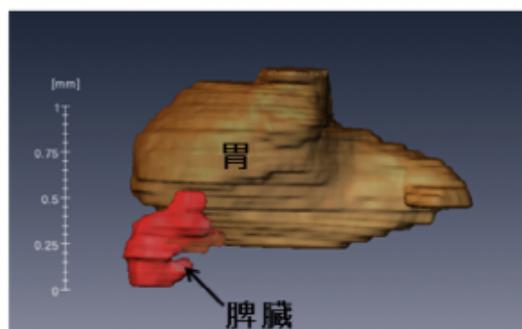
ヒト胚子期の腸ループの形成は、腸管の伸長、臍帯への生理的ヘルニア、中腸回転の3要素がある。CS14-23の44例のMRI画像を用いてこれらの3要素について立体的、定量的解析を行った。CS16までに十二指腸、結腸直腸は正中から偏位をした。CS17以降臍帯へのヘルニアはみられた。CS18ではヘアピン状で、中腸間膜動脈(SMA)がその直線部を並走した。回盲部はSMAの左側にみられた。CS19以降、小腸の急速な伸長に伴い腸は複雑な走行を示した。CS20までに腸ループの立ち上がり部は右頭側から尾側へ移動し、SMAに対しては180度回転した。腸ループの着地部はSMAの左尾側で著変を認めなかった。腸ループ回転は早い発生段階にはみられたがCS19で90度になり以降は全体が尾側へ移動した。これら腸ループの動きは分化発生で説明できる受動的なものと考えられる。(Ueda et al 文献⑦)

③ 脾臓の形成

脾臓は、左上腹部の胃の後方に位置する腹腔内の代表的な器官で、成人では、血液の濾過・不要な物質の除去と免疫系としてのリンパの産生である。ヒトにおける初期発生過程はこれまでほとんど知られていない。われわれは、脾臓の形態形成、および脾臓内外の血管の形成過程についてCSごとに記載した。(Endo et al 文献⑧)

④ 肝臓形成の異常例について

肝臓は胚子期に腹腔内最大の器官へ発達するとともに、造血や代謝等の胚子・胎児の成長にとって重要な役割を担う。ヒト胚子期における正常な肝臓の形態形成については我々の研究室が報告したが、形態形成異常についての報告はなされていない。肝臓は発生中に造血や胎児蛋白産生等の重要な機能を果たすことから、その形成不全は胚子・胎児の発育に影響を与える可能性が高く、子宮内



胎児死亡に至る可能性がある。また、多くの外表奇形が流産の原因となることが報告されている一方で、外表奇形を伴わず流産に至る原因については明らかになっていない。今回、外表奇形を伴わないヒト胚子の中から、肝臓形成不全の可能性のある個体を抽出し、肝臓、並びに周辺器官の形態形成の特徴について明らかにする為に、詳細な解析を行なった。

京都大学大学院医学研究科附属先天異常標本解析センターに保存されている外表奇形を伴わないヒト胚子から、MR顕微鏡で撮像された1156例(CS14-23)を対象とした。これらは、肝臓形態形成に異常の可能性のあるものを抽出するため以下のスクリーニング法を用いて解析を行なった。1) 肝臓体積を推定できる式を作成し、各胚子の肝臓体積推定値を算出。2) 肝臓体積推定値が各CS平均±2SDを外れる個体を抽出した後、肝臓、並びに周辺器官についてMR画像や三次元再構築像により、形態観察を行ない、抽出した個体から肝臓形態形成異常の可能性が高いものを選抜。選抜個体については、MR顕微鏡よりも高解像度の位相コントラストX線CT(PCT)により再撮像を行ない、胚子内部の詳細な解析を加えた。

肝臓体積推定値によるスクリーニングから、体積推定値が各 CS 平均+2SD 以上の個体が 41 例 (CS14-23)、各 CS 平均-2SD 以下が 12 例 (CS19-21) 得られた。計 53 例について形態観察を行ない、平均+2SD 以上の個体 41 例から Extra-large 群として 8 例 (CS17-19)、平均-2SD 以下 12 例から Extra-small 群として 7 例 (CS20-21) を選別し、PCT で再撮像し、胚子内部の解析を行なった。肝臓の形態形成異常は Extra-small 群 7 例全てで観察され、Extra-large 群では 8 例中 2 例で観察された。Extra-small 群 7 例は以下のように分類された。①肝臓無形成; 2 例、②肝臓低形成; 4 例、③右葉欠損; 1 例。また、7 例中 5 例で肝臓の他、周辺器官に形態形成異常の合併がみられた。Extra-large 群では、2 例中 1 例は肝臓のみに異常がみられ、臍帯静脈の拡張が観察された。残り 1 例は、肝臓並びに周辺器官に形態異常の合併がみられた。肝臓形態形成を認める胚子は CS18 から CS21 に限定しており、約 1.7% (9/532) の割合で出現した。本研究では、外表奇形がない胚子に肝臓の形態形成異常をもつ集団が約 1.7% 存在する事を新たに示した。同集団は、肝機能不全の結果、子宮内胎児死亡に至る可能性が高く、早期流産の原因の一つになると考えられる (Kanahashi et al 文献⑨)。

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 37 件)

- ① Shiraishi N, Yamada S, Takakuwa T, et al, Morphology and morphometry of the human embryonic brain: A three-dimensional analysis, NeuroImage, 2015, 115, 96-103, 10.1016/j.neuroimage.2015.04.044,
- ② Kobayashi A, Ishizu K, Yamada S, Uwabe C, Kose K, Takakuwa T, et al, Morphometric human embryonic brain features according to developmental stage, Prenatal Diag, 36:338-345, 2016, DOI: 10.1002/pd.4786.
- ③ Taketani K, Yamada S, Takakuwa T, et al, Morphological features and length measurements of fetal lateral ventricles at 16-25 weeks of gestation by magnetic resonance imaging, Congenit Anom (Kyoto), 2015, 55, 99-102. doi: 10.1111/cga.12076
- ④ Ozeki-Sato M, Yamada S, Takakuwa T, et al, Correlation of external ear auricle formation with staging of human embryos, Congenit Anom (Kyoto) in press.
- ⑤ Toyoda S, Yamada S, Takakuwa T, et al, Morphogenesis of the inner ear at different stages of normal human development. Anat Rec,

298:2081-2090 (2015), doi: 10.1002/ar.23268

- ⑥ Ueno S, Yamada S, Takakuwa T, et al, The digestive tract and derived primordia differentiate by following a precise timeline in human embryos between Carnegie stages 11 and 13, Anat Rec 2016, 299, 439-449, DOI: 10.1002/ar.23314
- ⑦ Ueda Y, Yamada S, Takakuwa T, et al, Intestinal rotation and physiological umbilical herniation during the embryonic period, Anat Rec 299, 197-206, 2016, DOI: 10.1002/ar.23296
- ⑧ Endo A, Yamada S, Takakuwa T, et al, Morphogenesis of the spleen during the human embryonic period, Anat Rec, 2015, 298, 820-826, doi: 10.1002/ar.23099
- ⑨ Kanahashi T, Yamada S, Takakuwa T, et al, A novel strategy to reveal the latent abnormalities in human embryonic stages from a large embryo collection, Anat Rec, 299,8-24,2016 10.1002/ar.2328
- ⑩ Takaishi R, Aoyama T, Takakuwa T, et al; Three-dimensional reconstruction of rat knee joint using episcopic fluorescence image capture, Osteoarthritis Cartilage, 2014; 22(10), 1401-1409. 10.1016/j.joca.2014.06.016
- ⑪ Ozeki-Satoh M, Yamada S, Takakuwa T, et al. Morphogenesis of the Middle Ear Ossicles and Spatial Relationships with the External and Inner Ears during the Embryonic Period, Anat Rec, in press

[学会発表] (計 67 件)

[図書] (計 3 件)

[その他]

ホームページ

京都大学医学研究科人間健康科学系専攻病理学研究室 <http://www.hs-kyoto.net/>

Kyoto Human Embryo Visualizing Project <http://bird.cac.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高桑 徹也 (TAKAKUWA Tetsuya)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 40244933

(2) 研究分担者

山田 重人 (YAMADA Shigehito)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80432384