

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870755

研究課題名(和文)横隔膜ヘルニアを引き起こす左右非対称発生の解析

研究課題名(英文)Analysis of asymmetric development causes diaphragmatic hernia

研究代表者

辰巳 徳史(TATSUMI, Norifumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60514528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では心外膜原基の横隔膜形成への関与を明らかにし、さらにその異常がヘルニアを引き起こす可能性について理解することを目的とした。心外膜原基由来の細胞を標識し横隔膜における分布を調べた結果、標識された細胞は先天性横隔膜ヘルニアの好発部位である後部左側に認められ、心外膜原基が横隔膜ヘルニアに重要な存在であることを明らかにした。さらに、横隔膜ヘルニアモデルマウスを用いて解析を行なった結果、ヘルニアを起こしたマウスにおいてWt1遺伝子を発現する心外膜原基由来細胞が横隔膜領域に存在しないことを明らかにした。これらの結果から心外膜原基由来細胞が横隔膜ヘルニアを引き起こす主たる細胞群であることを特定した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to reveal how the proepicardium relates to the diaphragmatic development and diaphragmatic hernia. The proepicardium cells were marked by GFP and distribution of it cells were observed. The GFP cells were located at the region of the left side of the posterior diaphragm and this position was known for major deficient region of diaphragmatic hernia. Model mouse of diaphragmatic hernia showed that expression of Wt1 gene was reduced in the defected region of the diaphragm. This study revealed that proepicardium is very important to the diaphragmatic development and also these results suggest that proepicardium cells participate in diaphragmatic hernia directly.

研究分野：発生 進化

キーワード：横隔膜発生 横隔膜ヘルニア CDH

1. 研究開始当初の背景

(1) 横隔膜は哺乳類に特異的な組織であり、その呼吸に非常に重要な役割を果たす。横隔膜形成不全による先天性横隔膜ヘルニア (congenital diaphragmatic hernia: 以後 CDH と記す) は 2000 人に 1 人の割合で起る先天性小児疾患であるが原因はまだ明らかでない。その原因解明のためには横隔膜発生の理解が必要不可欠であり、それはさらに医学、発生学のみならず「どのように哺乳類が横隔膜を獲得したのか?」という進化学的な観点からもマイナーではあるが重要な研究テーマである。国内外における研究は非常に少ないが、近年遺伝子改変マウスで CDH を示すものが報告され、その解釈のためにも詳細な横隔膜発生の解明が求められている。

(2) 現在まで明らかにされている横隔膜発生は『横中隔、心外膜原基、側板中胚葉などに由来する細胞の癒合によって原始横隔膜が形成する過程』と『原始横隔膜内へ筋芽細胞が進入する過程』の 2 つのステップで行なわれると考えられている。国内外で行なわれている CDH に関連した研究は前者の原始横隔膜の形成に関連したものではなく、後者の筋芽細胞に注目した研究が主として行われているものがほとんどである。

(3) CDH の好発部位は左側 (ボルダレック孔ヘルニアと呼ばれる) が多いことが知られている。この事実から左右非対称発生する細胞群が何らかの形で横隔膜形成に関与するのではないかと考えた。原始横隔膜の構成要素である心外膜原基は左右非対称に発生する事がすでに知られていることから横隔膜を構成する心外膜原基由来の細胞の異常が CDH の原因である可能性を考え研究の着想に至った。

2. 研究の目的

CDH の好発部位が左側で、原始横隔膜を構成する心外膜原基が右側に発生するという 2 つの事象に関連性があると考え、左右非対称発生を行なう心外膜原基の異常と左右非対称発生の機構が CDH の原因に関連するのかを明らかとすることを実験の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常マウス胚 (E8.5-E14.5 まで) を使用し心外膜原基の特異的マーカー遺伝子である Wilm's tumor 1 (Wt1) の in situ hybridization を行い、切片等を作成して心外膜原基がどのように分布していくのか詳細な観察を行う。

(2) Wt1-EGFP-CRE マウスと CAG-CAT-EGFP マウスを掛け合わせ Wt1-EGFP マウスを作成し、心外膜原基由来

の細胞が恒常的に観察できるマウスを作成し、それらを用いて心外膜原基の細胞が横隔膜内でどのように分布するのか観察を行うことで、横隔膜における心外膜原基の分布を明らかにする。

(3) 左右軸を乱すことが知られている試薬である DEAB を用いて、左右軸を乱したニワトリ胚を作製し、それらの心外膜原基細胞の移動、増殖への影響等を解析する。これにより、左右軸の乱れと横隔膜ヘルニアとの関連性を明らかにする。

(4) CDH を引き起こす薬剤であるニトロフェンをを用いて CDH マウスを作製し、その際心外膜原基由来の細胞が横隔膜形成においてどのように変化したのか観察を行なう。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚では心外膜原基が右に現れ左右非対称な発生をすることが報告されている^{1,2}が、マウスにおいてニワトリ胚の様な左右非対称な発生はないとする報告がなされていた²ことからまずは心外膜原基が左右非対称に発生するのかを確認する必要があった。そこで正常マウスの心外膜原基を Wt1 遺伝子の in situ hybridization によって確認を行なった。その結果、E9.0 では右側の方が左側より強く Wt1 が発現することが観察され、E9.5 ではほぼ正中に心外膜原基が位置することが確認できた (図 1A, 1B)。また、その後のステージでは心外膜原基は左方向に広がっていく様子が確認された (図 1C)。この結果は Schulte² らによって報告されているマウスの心外膜原基は左右非対称性に発生しないという結果と異なっており、ニワトリ胚と同様にマウスにおいても心外膜原基は非対称発生を行なっていることが明らかとなった (図 1)。

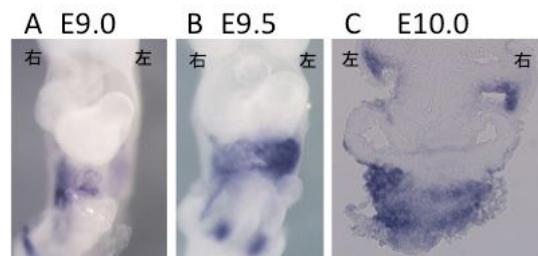


図1 心外膜原基の観察

(2) 後部左側に欠損が多い CDH (ボルダレック孔ヘルニア) の原因が心外膜原基の細胞異常に起因するのかを確認するために、まず心外膜原基由来の細胞が横隔膜のどの領域に分布するのかを明らかにする必要があると考えられた。そこで、Wt1-EGFP-CRE マウスと CAG-CAT-EGFP マウスとを掛け合わせた Wt1-EGFP マウスを作製した。このマウスは Wt1 を一度でも発現したことがある細胞が

以後恒常的に GFP 蛍光で標識されるマウスとなり、*Wt1* を発現する心外膜原基由来細胞を生後も可視化できることから本実験ではこのマウスを使用した。

まず成体の横隔膜における心外膜原基由来細胞の観察を8週令マウスで解析した結果、EGFP による蛍光を示す細胞が、後部右側に比べ後部左側で多く観察された(図2)。この領域は CDH 好発部位と類似していた。

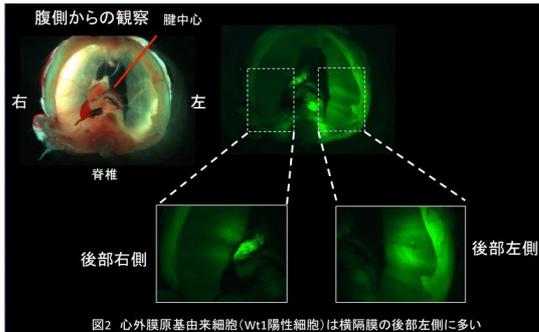


図2 心外膜原基由来細胞(*Wt1*陽性細胞)は横隔膜の後部左側に多い

次に発生期における心外膜原基由来細胞の分布を GFP プローブにて *in situ* hybridization を行なった後観察を行なった。すると E12.5 では既に左右非対称な *Wt1* 陽性細胞(心外膜原基由来細胞)の分布が確認された(図3)。

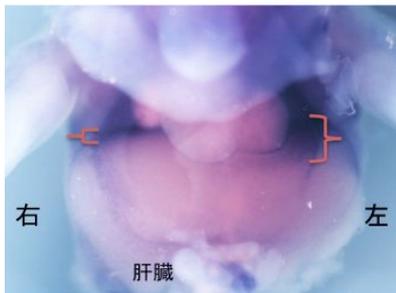


図3 E12.5の横隔膜上の*Wt1*陽性細胞の分布(左側に分布する量が右に比べ多い)

以上 と の結果より教科書等の横隔膜発生部分において心外膜原基に由来した細胞の分布領域についての記載はなく、今回の研究結果が世界で初めて横隔膜内の心外膜原基に由来した細胞の分布域を明らかにした。*Wt1* 陽性細胞(心外膜原基由来細胞)が後部左側に多く分布するのはこれまでに報告がなく、またこの領域が CDH 好発部位と一致することから、心外膜原基由来細胞の分布の異常が CDH を引き起こす可能性が強く示唆される結果が得られた(図4モデル図)。

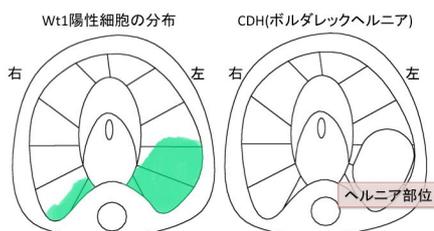


図4 *Wt1*陽性細胞とCDH好発部位との比較

(3) 左右非対称性を乱すことで横隔膜形成にどのような影響が認められるか観察するために HH8 ステージのニワトリ胚に左右軸を乱す物質 DEAB を投与し、HH13-14 ステージで観察を行なった。約 40% に心臓逆位の表現系が見られ、それに伴い心外膜原基の位置も逆側に認められた。これは、既に Schlueter らが報告³しているように左右軸に関連した BMP が心外膜原基を誘導し、またその現象は *Pitx2* 発現部位(左側)と逆側にて引き起こされるためだと思われる。この逆位において、心外膜原基の形成不全は認められなかったが、一部の胚において心外膜原基で発現する *Wt1* 遺伝子の発現量が減少する個体が存在した。全身においても腎臓で発現する *Wt1* 遺伝子の発現量の減少が認められるものが観察された。DEAB はレチノイン酸の合成阻害を引き起こす物質であり、レチノイン酸と *Wt1* 遺伝子との関連が示唆されている⁴ことから、DEAB により直接 *Wt1* 遺伝子の発現に影響が出た可能性が考えられた。

(4)

CDH を引き起こす薬剤であるニトロフェンを用いて CDH マウスを作製し、心外膜原基がどのように影響を受けるかを観察することを試みた。ラット等で投与された量を参考に 200-700mg/kg になるようオリーブオイルに溶解させて妊娠8日目のマウスにゾンデで経口投与し、14日目に胚を回収したが、これらの実験において CDH を引き起こした個体を得ることができなかった。そこで、Shue らが報告⁵している方法であるニトロフェン 15mg、ビスジアミン 10mg の組み合わせを試したところ、CDH を発症した胚を約 60% の割合で得ることができた(図5)。

E14.5マウス 腹側より観察

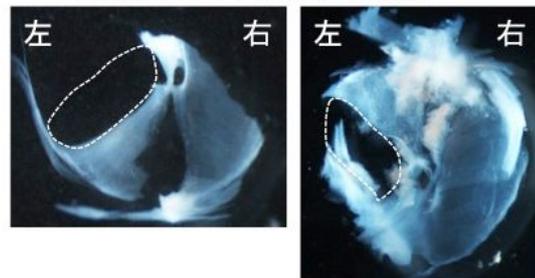


図5 CDHモデルマウスの横隔膜(白点線の部分が欠損部位)

同様の条件で *Wt1*-GFP マウスに薬剤を投与して、CDH モデルマウスの作成を行ない観察を行った。その結果、横隔膜領域に *Wt1* 陽性細胞(心外膜原基由来細胞)がほとんど観察されなかった(図6白線は欠損部位を表し、そのため肺が見える)。本来であれば横隔膜後部左側に EGFP 細胞が存在するはずだが、そのような細胞が観察できなかった

(図6 白矢印)
E14.5マウス 腹側より観察

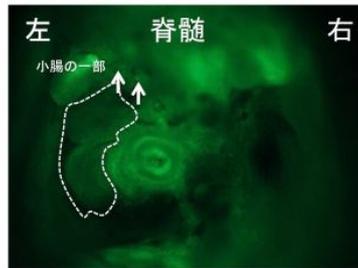


図6 CDHモデルマウスではWt1陽性細胞が横隔膜で認められない(白矢印)
(白線で囲んでいる部分は横隔膜欠損部位)

この結果はCDHを引き起こした個体において横隔膜領域に Wt1 陽性細胞 (心外膜原基由来細胞) が移動していない、もしくはアポトーシス等で細胞死を引き起こしている可能性が考えられた。正常胚における Wt1 陽性細胞の観察結果から右側においても EGFP 細胞は観察可能であるはずだが、CDH モデルマウス胚においては右側でも EGFP 細胞は観察されなかった。さらに、心臓領域における Wt1 陽性細胞の割合は正常胚に比べると明らかに増加している傾向が観察された。これらの結果を考慮すると、CDH モデルマウスにおいて心外膜原基の適切な移動が行なわれていないことが考えられた。さらに、CDH の発症原因はこの右側に非対称性に発生する心外膜原基に由来した細胞の異常が主たる原因である可能性も強く示唆される。

今後これを解明するために心外膜原基の細胞移動に関連している Snail や TGF の部位特異的な欠損個体の作成を行う事でさらにその詳細を理解することが可能であると思われる。

参考文献

1. Wessels A, Perez-Pomares JM. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.*276(1):43-57. 2004.
2. Schulte I, et al. *Dev Dyn.* 236(3):684-95. 2007.
3. Schlueter J, Brand T. *PNAS.*106(18):7485-90. 2009.
4. Guadix JA, et al. *Development.*138(6):1093-7. 2011.
5. Shue E, et al. *J Pediatr Surg.*48(6):1198-204. 2013.

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 2 件)

(Norifumi Tatsumi) Masataka Okabe

タイトル Analysis of distribution of Wt1 expression cell in diaphragm development.

47th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists

2014 5/27-30

Winc aichi (愛知県・名古屋市)

(Norifumi Tatsumi) Masataka Okabe

横隔膜発生における Wt1 陽性細胞の解析

Analysis of Wt1 positive cells in diaphragm development

第 37 回日本分子生物学会

2014 11/25-27

パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔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：
出願年月日：
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

辰巳 徳史 (TATSUMI Norifumi)
東京慈恵会医科大学 解剖学講座 助教
研究者番号：60514528

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

岡部正隆 (OKABE Masataka)