

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23112006

研究課題名(和文) 器官・組織形成期の発生異常に基づく上皮管腔組織形成障害

研究課題名(英文) Organ malformations as results of accumulated polarity disruptions in epithelial tubular structures during organogenesis and histogenesis

研究代表者

大谷 浩(Otani, Hiroki)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20160533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 74,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮管腔組織の形態異常を評価するため、正常発生中の上皮管腔組織各部における総細胞数等の経時的な変化などの基本的情報を、組織計測的手法を含めた詳細な形態学的・数理解析により得て、遺伝子改変動物との比較を含め新知見を報告した。また全身の上皮管腔組織において細胞周期に同期した上皮細胞核の位置移動(interkinetic nuclear migration)が存在して組織幹細胞の増殖分化調節機構として働き、形態異常に関わることを明らかにした。

胚操作法である子宮外発生法を改良して研究成果を論文発表し、肉眼レベルと細胞組織レベルをつなぐ高精度かつ効率的な立体観察のための標本透明化技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：Basic morphological data on developing epithelial tubular structures were obtained applying mathematical methods as standards to evaluate abnormal development, and findings including those in Ror2 knockout mice were reported. We proved interkinetic nuclear migration (INM), a regulatory mechanism of stem cell proliferation/differentiation reported in the neural epithelium, in the developing epithelium of multiple organs of three germ-layer origins. We showed that INM is a general strategy for the regulated proliferation/differentiation of progenitor cells in the epithelial tubular structures, and also suggested a link between INM defects and malformation of organs. We improved the exo-utero development method, an experimental analysis of organ histogenesis, and published the report and review papers. We also developed a kit for producing cleared biological specimens and method for producing cleared biological specimens for fine and effective 3-D observation.

研究分野：発生生物学、先天異常学、解剖学

キーワード：上皮管腔組織 極性 器官形成 組織形成 形態学 数理解析

## 1. 研究開始当初の背景

奇形は、細胞レベルや組織レベルにおける様々な極性現象(方向性)の異常が集積して、全身の三次元体軸に対する各臓器の位置、形、大きさなどの異常を生じるものである。管腔臓器の奇形には、臓器自体の大きさに関わる無形成、低形成の他に、体軸との関連において、管腔が伸びる長さや方向に関わる臓器の位置異常や左右交叉、管腔の太さに関わる狭窄や巨大化、分岐や腔形成に関わる管腔の重複など、様々なパターンが知られている。これらの異常は、全ての臓器に必ずしも共通ではなく、臓器特異性があることも知られている。これらの奇形は、臓器が形成される過程の各段階における何らかの異常が集積した結果であると考えられるが、細胞レベルの知見と最終像としての奇形の関係について、発生機構の共通性と相違という観点から本格的に検討されたことはなかった。

研究代表者大谷は、臓器・器官の正常および異常発生について、膨大なヒト胚子・胎児からなる京都コレクション(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)に属するヒトの標本の肉眼・顕微鏡・電顕レベルにおける詳細な観察と、それに基づく仮説を踏まえマウス・カエル胚を用いた発生工学的的手法等による実験的証明を続けてきた。この過程で、胎生中後期のマウス・ラットの胚操作法である子宮外発生法を、部位・時期特異的に簡便かつ自由度高く実験条件を設定できる系として確立した。詳細な観察に基づく組織定量的解析法に加えて、様々な数理解析的手法を導入し、全身の臓器や部分の発生における関係性を俯瞰的・統合的に解析してきた。さらに、分子レベルでは、*Wnt5a/Ror2* シグナルが十二指腸の発生において細胞・組織の極性現象に関与することを報告した。

## 2. 研究の目的

上記の背景とこれまでの研究成果に基づいて、全身の上皮管腔臓器に共通の、あるいは異なる細胞レベルにおける極性制御機構の破綻による異常が、組織・臓器・個体レベルの異常・奇形につながる機構、ならびに臓器間の共通性と相違が生じる機構について、各レベルにおける形態学的特徴を明らかにし、全身の上皮管腔組織からなる臓器について数理解析を用いて比較解析することにより、統合的な理解を得ることを目的とした。

すなわち、全身の管腔臓器における発生異常・奇形のパターンを、体軸・極性との関係を含めて肉眼的レベルおよび細胞・組織レベルにおいて、詳細に形態学的に明らかにする。各臓器の肉眼的な発生異常のパターンと、それぞれの臓器において管腔構造を形成する共通および異なる機構との関係を、個体レベルにおける観察、細胞・組織レベルにおける観察・計測と実験的な解析、ならびに数理解析の手法を用いることにより、統合的・俯瞰的に分析する。これらの解析により、管腔構造

形成の過程における共通および異なる極性制御機構の異常の集積が、全身の管腔臓器における共通および異なる奇形のパターンにつながることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 発生過程の形態学的データの蓄積と解析  
発生異常を解析するための形態学的な基準を得る目的で、ヒト胎児およびマウス胎仔の消化器系、泌尿器系、中枢神経系、循環器系などの上皮管腔組織を含む臓器の正常の器官形成および組織形成について、詳細なデータを取得解析する。

臓器各部の細胞の極性に基づく形態・配列、ステレオロジーによる総細胞数計測などの正確な局所的データを蓄積する。

経時的变化や部位間の関係性等について、適切な数理解析手法を導入して解析する。

全身臓器間の「調和」的な組織形成に関わる液性因子の組織、体液中における発現と機能について解析する。

### (2) 上皮管腔組織における INM の解析

神経管等外胚葉由来上皮幹細胞の増殖分化調節機構として知られる、細胞周期に同期した細胞の頂底軸に沿った核の位置移動(interkinetic nuclear migration: INM) が、全身の上皮管腔組織にも存在し、その異同がそれぞれの臓器における組織幹細胞プール形成の調節に関わるとの仮説に基づいて解析する。消化管、尿管、気管など内・中胚葉由来の上皮管腔組織について、BrdU 標識した細胞核を免疫染色して、核位置の経時的变化を計測し、経時的な核位置の分布パターンを多次元尺度構成法により数理解析し、細胞周期と核位置変化が同期しているか、また時期、臓器、部位による異同を調べる。

### (3) 遺伝子改変動物の解析

上皮管腔組織の異常発生に関する実験的解析として、細胞極性の調節と上皮管腔組織の伸長・分岐に関わる遺伝子のうち、*Wnt11* および *Wnt5a/Ror2* の遺伝子改変動物につき、免疫組織化学、電子顕微鏡観察や組織定量的手法を含めた詳細な形態学的解析を行い、上皮管腔組織などにおける形態異常とその発生機構を明らかにする。

### (4) 発生過程研究方法の活用と提供・開発

組織形成期における簡便かつ自由度が高く汎用性の高い個体レベルの解析法として確立している子宮外発生法を活用し、ホルモンなどがマウス胎仔の組織形成に与える影響を解析する。また本新学術領域内で方法論を共有するため、総括班にて購入したソフトによる技術訓練法を開発し、マニュアルを作成する。

肉眼レベルと細胞組織レベルの知見をつなぐために立体視は極めて有効であり、3次元的な標本解析の効率と精度を高めるため

の標本の透明化技術を開発する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 発生過程の形態学的データの蓄積と解析

ヒト胎児およびマウス胎仔の正確な形態計測による形態学的データを得て、定量的データに基づいた数理解析や詳細な定性的観察をすることにより、腸管、膵臓、尿管 (Motoya et al. 2016; Yamada et al. 2013; Kawamoto et al. 2011)、脳 (Hashimoto et al. 2013; 2011)、心臓 (Liang et al. 2013)、さらに絨毛間腔を管腔とする細胞極性を有する上皮組織である胎盤 (Arikawa et al. 2012)、極性を持った細胞増殖様式を示す間葉組織である骨・軟骨 (Inoue et al. 2014; Rafiq et al. 2012; Lundh et al. 2011; Zhang et al. 2011) について、全身臓器の発生異常を解析する基準となる正常な発生過程に関する形態学的な所見・新知見を得た。

数理解析により、臓器発生過程における形態の経時的变化 (Rafiq et al. 2012; Lundh et al. 2011; Zhang et al. 2011) や臓器間の「調和」的な発生 (Naito et al. 2014) についての新知見を得た。

全身臓器の組織形成の調節に関わるホルモン、成長因子として、corticotropin/ACTH (Simamura et al. 2012; Kawamoto et al. 2011)、GM-CSF (Matsumoto et al. 2011、学会発表ならびに投稿準備中) の全身組織・体液中ならびに胎盤を介した発現様式と組織形成における機能について明らかにした。

##### (2) 上皮管腔組織における INM の解析

外胚葉由来上皮組織において幹細胞増殖分化調節機構として知られ、細胞極性制御と細胞周期が連結する INM が、マウス胎仔の十二指腸 (内胚葉由来、Yamada et al. 2013)、尿管 (中胚葉由来、Motoya et al. 2016) に存在することを実証し、かつ臓器、時期により周期等の様式が変化することを明らかにした。さらに腸管全長、食道、気管について解析し、同様の結果を得た (学会発表、投稿準備中)。これにより外胚葉由来上皮組織における幹細胞増殖分化調節機構として知られている INM が、全身臓器の組織形成の基盤となる幹細胞プール形成調節機構として機能することを示した (Yamada et al. 2013, Motoya et al. 2016, Otani et al. 2016) (図 1)。したがって INM が全身の三胚葉由来の上皮管腔組織における共通の幹細胞増殖分化調節機構として、時期・部位特異的に働くことにより、臓器の位置、形、大きさ (ネフロンなど構造機能的単位の総数) の決定に極めて重要な役割を果たす可能性が示された。

これら(1)(2)で得られた成果は、本研究の目的である細胞・組織レベルの異常から器官形成・組織形成の異常への連続的解釈に必須である。これらの準備に基づき、遺伝子改変動物

への攪乱実験を進めることで、細胞・組織レベルから臓器・個体レベルへの異常の連結について実験的証明が可能となる。

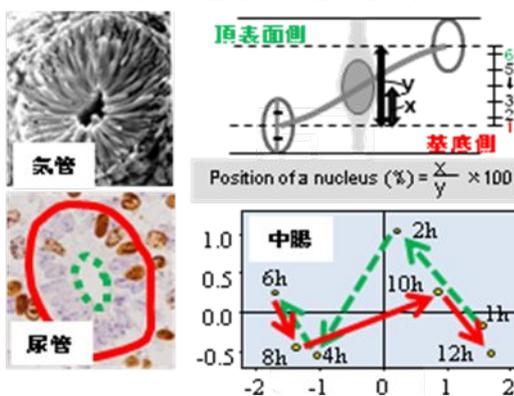


図 1 上皮管腔組織における INM の解析

全身の上皮管腔組織が従来記載されていた重層上皮ではなく偽重層上皮であり、BrdU 標識した核の位置が細胞周期に同期して経時的に移動すること (INM) を、形態計測と数理解析により示し、幹細胞増殖分化調節機構として外胚葉由来上皮で知られる INM が、全身の上皮管腔組織にも存在し、臓器により特異的な調整が行われていることが初めて明らかになった。

##### (3) 遺伝子改変動物の解析

*Wnt11*, *Wnt5a/Ror2* KO マウスの腸管等の形態形成異常に、収斂伸長機構など細胞・組織レベルにおける極性制御機構の異常が関わることを、組織定量的な形態学解析、細胞核分布の経時的变化の数理解析等により明らかにした (Nishita et al. 2014; Yamada et al. 2013)。さらに INM の異常により肉眼的形態形成異常 (奇形) が生じることなどを腸管、尿路系の例において示し、INM の調節と上皮管腔組織・臓器の形・大きさの調節が連結することを示唆した (図 2) (Motoya et al. 2016; Yamada et al. 2013)。これは、細胞レベルの極性制御・幹細胞増殖分化調節機構の破綻が、三胚葉由来の上皮管腔組織における組織・肉眼レベルの形態形成異常に、臓器共通あるいは特異的に関わる可能性を示した端緒となるものである。

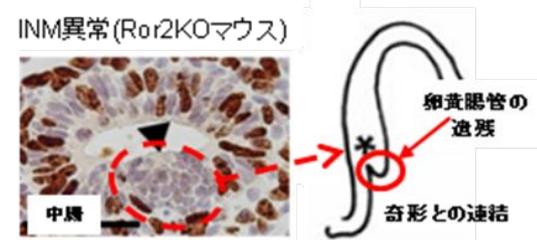


図 2 *Ror2*KO マウス中腸における INM の異常と肉眼的奇形との関連

卵黄腸管遺残という肉眼レベルの奇形と、BrdU で標識されない (INM をしていない) 上皮細胞塊が対応して存在することから、両者の因果関係が示された。

(4) 発生過程研究方法の活用と提供・開発  
子宮外発生法の応用により、ACTH 産生腫瘍細胞をマウス胎仔に移植生着させ、睪臓の内分泌・外分泌部の大きさや構成細胞の比率を変えることに成功した。骨、脳についての同様の実験とあわせて、動物個体において着目するシグナル系を攪乱させることにより組織形成に影響を与える実験系の有用性を立証した(Inoue et al. 2014; Kawamoto et al. 2011; 他 1 件学会発表し投稿準備中)。

同法に関する技術講習会を開催し、領域内で方法論を共有するための技術訓練法とあわせて、概要を大谷の教室のホームページにて公表した。さらに同法の精度、有効性を高めるため、腎臓を対象として超音波ガイド下の注入法を確立した。

肉眼レベルと細胞・組織レベルをつなぐ立体的な観察を高精度かつ効率化するための標本透明化技術を開発した(特許出願中)。

#### 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 23 件)

Otani H, Udagawa J, Naito K: Statistical analyses in trials for the comprehensive understanding of organogenesis and histogenesis in humans and mice. *J Biochem* 159:553-561, 2016 査読有  
doi: 10.1093/jb/mvw020

Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H: Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium: Possible implication for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Congenit Anom* 56:127-134, 2016 査読有  
doi: 10.1111/cga.12150

Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. *Mol Cell Biol* 34:3096-3105, 2014 査読有  
doi: 10.1128/MCB.00491-14.

Naito K, Notsu A, Udagawa J, Otani H: Statistical analysis with dilatation for development process of human fetuses. *Stat Methods Med Res*, 2014 Jul 22

査読有

doi: 10.1177/0962280214543405

Inoue T, Hashimoto R, Matsumoto A, Jahan E, Rafiq AM, Udagawa J, Hatta T, Otani H: *In vivo* analysis of Arg-Gly-Asp sequence/integrin 5 1-mediated signal involvement in embryonic enchondral ossification by *ex utero* development system. *J Bone Miner Res* 29:1554-1563, 2014 査読有

doi: 10.1002/jbmr.2166

[学会発表](計 34 件)

Otani H, Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Kaneda R, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Hatta T: Interkinetic nuclear migration in the developing endoderm- and mesoderm-origin epithelial tubular structures. 第 121 回日本解剖学会全国学術集会、2016 年 3 月 28 日~3 月 30 日 ビックパレット 福島(郡山市)

Otani H, Udagawa J, Hatta T, Minami Y: Cell polarity-associated mechanisms in normal and abnormal organogenesis and histogenesis of epithelial tubular structures. (Symposium) The Second International Meeting for Epithelial Tubulology, Aug 22-23, 2015 北海道大学医学部フラテホール(札幌市)

大谷 浩: ヒト・マウスの器官形成と組織形成における正常と異常。(招待講演) 第 50 回日本周産期・新生児医学会学術集会、2014 年 7 月 13 日~15 日 シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(浦安市)

Jahan E, Rafiq AM, 松本暁洋、平野 了、佐藤 朗、菊池 章、大谷 浩: Wnt11 ノックアウトマウスの胎仔期及び新生仔期の腸の形態学的解析。第 52 回日本先天異常学会学術集会、2012 年 7 月 6 日~8 日 東京女子医科大学(東京都)

Lundh T, Udagawa J, Hänel SE, Otani H: Cross- and triple-ratios of human body parts during development. 3rd Swedish Meeting on Mathematics in Biology, Umeå, Sweden, 14-16 December 2011. Umeå (Sweden)

大谷 浩: 知られざる先天異常 臓器の組織形成における個体差と疾病素因の関わり。(特別講演)

第34回日本小児遺伝学会学術集会、2011  
年8月11日 パシフィコ横浜（横浜市）

〔産業財産権〕  
出願状況（計3件）

名称：Kit for producing cleared biological  
specimens and method for producing  
cleared biological specimens

発明者：Toshihisa Hatta

権利者：Kanazawa Medical University

種類：特許

番号：13850135.8

出願年月日：2015年5月28日

国内外の別：国外

名称：透明化生物標本作製用キット及び透明  
化生物標本作製方法

発明者：八田稔久

権利者：学校法人金沢医科大学

種類：特許

番号：特願 2014-544550

出願年月日：2015年4月20日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://shimane-u-developmental-biolog  
y.jp/](http://shimane-u-developmental-biolog<br/>y.jp/)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大谷 浩 (OTANI, Hiroki)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20160533

##### (2) 研究分担者

八田 稔久 (HATTA, Toshihisa)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20238025

宇田川 潤 (UDAGAWA, Jun)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10284027

##### (3) 連携研究者

該当なし

##### (4) 研究協力者

橋本 龍樹 (HASHIMOTO, Ryuju)

内藤 貫太 (NAITO, Kanta)

松本 暁洋 (MATSUMOTO, Akihiro)

古屋 智英 (FURUYA, Motohide)

小川 典子 (OGAWA, Noriko)

井上 隆之 (INOUE, Takayuki)

Rafiq Ashiq Mahmood

(RAFIQ, Ashiq Mahmood)

Jahan Esrat (JAHAN, Esrat)

元矢 知志 (MOTOYA, Tomoyuki)

新田 哲哉 (NITTA, Tetsuya)

倉本 純子 (KURAMOTO, Junko)

平野 了 (HIRANO, Satoru)

Zhang Qinghua (ZHANG Qinghua)

Liang Shuai (LIANG, Shuai)

Dereje Getachew Regassa

(DEREJE, Getachew Regassa)

兼田 稜 (KANEDA, Ryo)

佐伯 祐子 (SAEKI, Yuko)

武田 裕美子 (TAKEDA, Yumiko)