

令和元年5月27日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08595

研究課題名(和文) 管腔移行を伴う協調的な泌尿器-生殖器-消化器発生過程のイメージング解析

研究課題名(英文) Analysis of the transition of tubular structure in urogenital organs

研究代表者

松丸 大輔 (MATSUMARU, Daisuke)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50624152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、雌性における肛門直腸奇形の発症メカニズムを明らかにすることを目的としている。通常の組織学的解析に加え、連続組織切片からの三次元再構築、また小動物用X線マイクロCTを用いて雌性マウスの生殖器形成過程を解析した。マイクロCT解析により、雌性生殖器が体外に開口するまでの管腔構造の変化を三次元的に示した。雌性生殖器の形成過程は内皮構造の変形を伴うが、総排泄腔の分割過程のような組織の変形に伴う多数の細胞死は観察されなかった。また、連続切片を用いた三次元再構築により、胎生中期に総排泄腔分割不全を示す雌性遺伝子改変マウスが出生前後において雌性型肛門直腸奇形を呈することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肛門直腸奇形は、軽度のものまで含めると出生児の数千人に一人の割合で起こることが知られている。近年盛んになりつつある生殖補助技術によるリスク上昇も報告されていることから、発症メカニズムの解明は社会的にも重要な課題であると考えられる。本研究の学術的意義の一つは、マウスモデルとして女性型肛門直腸奇形を三次元的手法を用いて初めて示した点にある。そして素因として総排泄腔分割異常を有することで、後に続く雌性生殖器の形成が正常であっても女性型肛門直腸奇形となることを示唆した。本研究の成果は今後さらに病因メカニズムの解析を進める上でも意義の大きいものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The anorectal malformations (ARMs) are frequently observed in both male and female neonates. Although the pathogenic mechanisms for the male-type ARMs can be explained as defective cloacal division, those of female-type ARMs are not well understood. In this study, microCT analysis revealed ductal coordination of urethra, female reproductive tract (FRT) and gut. The development of FRT proceeds with morphological alterations of epithelia. Unlike the case of cloacal division, the number of apoptotic cells are not prominent in FRT. This result suggested possible distinct cellular mechanisms between cloacal division and FRT development. Moreover, the current analysis revealed that mutants showing defective cloacal division further developed female-type ARMs. This result may suggest that fetus with cloacal division defects shows abnormal FRT-gut connection, even if FRT development is normal. These results shed light on the pathogenic mechanisms of the female-type ARMs.

研究分野：発生医学

キーワード：総排泄腔 腎管 女性生殖器 マウス 尿生殖洞 肛門直腸奇形

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の膀胱（尿道）と直腸は、胎児期に一過的に存在する構造である『総排泄腔』が分割されて形成される。従来は組織切片を用いた二次元的な解析により、総排泄腔頭側に形成される尿直腸中隔が尾側に伸長していくことで総排泄腔が分割されるとの説明がなされてきたが、研究代表者は三次元的な解析により、尿生殖洞領域と直腸領域は総排泄腔の内腔構造が変形することにより形成されることを示唆してきた (Matsumaru *et al.*, *Sci Rep.* 2015)。また、一般的に、隣接する器官の発生・成長は互いに影響を及ぼしあっているため、総排泄腔周辺器官群の発生は組織・細胞レベルで強く関連していることが示唆される。実際、総排泄腔分割過程の異常は、隣接する器官群と同時に異常を呈する肛門直腸奇形の原因となり、軽度のもので含めると出生児の数千人に一人の割合で起こることが知られている。肛門直腸奇形の発症に関しては、近年、顕微授精等の生殖補助技術によるリスク上昇が報告されていることから、その病態形成メカニズムの解明は社会的にも重要な課題であると考えられる。

ヒト肛門直腸奇形の特徴として、男児と女児では異なる病態を呈するという点が挙げられる。男児においては、直腸が膀胱や膀胱直下の尿道に開口する直腸-尿道瘻等が観られるが、女児においては、直腸が子宮や膣といった女性生殖器に開口する症状である直腸-膣瘻を呈する。子宮や膣を形成する雌性生殖器原基は左右一对のミュラー管から成り、総排泄腔分割（尿生殖洞と直腸の分離）後に体軸に沿って頭側から尾側へと形成され、総排泄腔分割によって形成された尿道-直腸間隙において尿生殖洞背側に開口する（雌性生殖器と尿生殖洞の癒合）。その後開口部が尾側へと下降し、生後に膣口として開口する（膣と尿道の再分離）。マウスモデルにおいて、総排泄腔分割不全は雌雄の性に関係なく観察され、特に雄性新生仔ではヒト肛門直腸奇形と類似の症状を呈することがわかっている。しかし、雌性新生仔においては総排泄腔の分割不全が雌性生殖器形成、すなわちその尿生殖洞への癒合や分離に及ぼす影響は現在まで明らかになっていない。雌性型肛門直腸奇形に関してはマウスモデルを用いた解析も殆ど行われていない。

このような状況から、雌性型肛門直腸奇形の病態形成メカニズムを解明するにあたっては、器官形成期（胎生中期）に総排泄腔から尿生殖洞と直腸領域が形成される過程に加えて、性分化後（胎生後期）の雌性における尿生殖洞からの雌性生殖器の分離過程を理解する必要があると考えられる。この理解には総排泄腔周辺器官群（膀胱、尿道、膣、直腸）の協調的発生過程を三次元的に把握し、さらに時間軸に沿って解析することが必須である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、発症頻度が高く、かつ症状に雌雄差を呈する先天性疾患：肛門直腸奇形の病態形成メカニズムの解明である。特に、外生殖器原基の隆起・伸長に伴う総排泄腔周辺細胞群の挙動の時空間的解析、そして、尿生殖洞-雌性生殖器分離のメカニズムの解析を行うことで、肛門直腸奇形における総排泄腔周辺組織の協調破綻及び異所的な管腔移行のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、外生殖器、雌性生殖器の発生・形成が総排泄腔の分割過程に与える影響を解析した。研究の方法として、野生型マウスを用いた正常発生過程、遺伝子改変マウスを用いた病態形成過程に関して、連続組織切片からソフトウェアを用いての再構築、そして小動物用 X 線マイクロ CT や共焦点顕微鏡を用いた三次元組織解析、遺伝学的細胞系譜解析、遺伝学的細胞除去解析等の手法を用いた。

#### 4. 研究成果

本研究は、雌性型肛門直腸奇形の病態発症メカニズムを明らかにすることを目的としていたため、まず、正常マウスを用いた解析を行った。胎生後期である胎生 18.5 日齢、生後 1 日齢、生後 3 日齢、生後 5 日齢、生後 7 日齢の雌マウスを用いて矢状断切片を作製し、組織像を解析した。その結果、胎生 18.5 日齢から生後 1 日齢にかけての時期に雌性生殖器原基が尿生殖洞から外生殖器基部側まで移行することがわかった。胎生 18.5 日齢において尿生殖洞-雌性生殖器原基の連続切片を作製し、Amira®ソフトウェアを用いて三次元構築したところ、尿生殖洞と雌性生殖器原基の結合部分は内胚葉が 8 の字にくびれた構造を呈していた。肢芽における指間部の消失過程のように、このような形状の組織を形成するためには細胞死の寄与があることが想定された。このため、次に胎生 18.5 日齢マウス雌性胎仔を用いて体幹の冠状断切片を作製し、TUNEL 染色を行うことで細胞死の染色を試みた。その結果、8 の字状の内胚葉、そしてその周辺間葉においては細胞死はほとんど観察されなかった。また、胎生 18.5 日齢、生後 1 日齢、生後 3 日齢、生後 5 日齢、生後 7 日齢において作製した矢状断切片を用いて細胞死の検出を行ったところ、生後 1 日齢の尿生殖洞-雌性生殖器原基の分離先端部分において上皮の細胞死が起こっていた。この細胞死は、胎生 18.5 日齢においては尿生殖洞と雌性生殖器原基の境界領域において殆ど観察されなかったことから、尿生殖洞-雌性生殖器原基の分離過程における細胞死というより、雌性生殖器の体外への開口（管腔形成）のための細胞死であると推察された。この結果から、胎生中期における総排泄腔の分割過程（尿生殖洞と直腸部分の分離）と尿生殖洞と雌性生殖器原基の分離過程が異なるメカニズムによるものであることが示唆された。

続いて、マウスの胎仔、そして新生仔における泌尿生殖器官群の構造を三次元的に把握するためにいくつかの手法を用いて解析を行った。胎生 18.5 日齢、生後 1 日齢、生後 3 日齢、生後 5 日齢、生後 7 日齢の正常雌マウスの固定済み組織をリンタングステン酸溶液に浸漬し、小動物用 X 線マイクロ CT を用いて撮影することで、雌性生殖器と尿生殖洞の分離過程のイメージング解析を試みた。この解析から現在まで組織切片を用いた二次元的な解析が主であった尿生殖洞-雌性生殖器分離過程を経時的かつ立体的に可視化することができた。解析の結果、総排泄腔分割後の胎生後期において雌性生殖器が膀胱基部側に結合し、次第に体外側に移行していく管腔の移動を視覚的に明らかにすることができた。また、Shh (Sonic hedgehog) 遺伝子の発現が尿生殖洞領域に限局することを利用し、Shh 発現細胞にレポーター遺伝子 LacZ が発現するマウスを用いて連続切片を作製、そして再構築をすることにより尿生殖洞由来領域と雌性生殖器（ミューラー管）由来領域の境界を三次元的に可視化した。その結果、尿生殖洞と雌性生殖器の結合部は尿生殖洞側から双角の隆起した構造をとることを見出した。また、この解析からも尿生殖洞と雌性生殖器原基の結合部分が瓢箪状にくびれた構造であることが示された。

次に、発生過程として雌性生殖器原基よりも先に形成される腎管と尿管芽において遺伝学的組織除去実験を行うことで、総排泄腔やその派生器官である尿生殖洞、直腸、そして雌性生殖器原基形成に及ぼす影響について解析を行った。胎生 11.5 日齢、胎生 13.5 日齢および胎生 18.5 日齢の遺伝学的細胞除去マウス胚をマイクロ CT にて解析した結果、胎生 18.5 日齢において、水尿管、腎臓の無形成等の表現型を見出した。総排泄腔由来器官に関しては膀胱の形成異常・低形成を呈していた。また、個体によっては胎生 18.5 日齢において、尿生殖洞と雌性生殖器原基が途絶していた。この結果は、腎管・尿管芽の存在が胎生後期に形成される雌性生殖器原基の発生に影響を及ぼすことを示唆している。

同様の遺伝学的細胞除去系を利用して、胎仔後端領域を含む上皮組織を胎生中期頃に除去し、内胚葉組織、総排泄腔や外生殖器の形成に与える影響の解析を行った。当該マウス胚は表現型

に個体差が大きかったが、外生殖器隆起、あるいは下肢領域全体の形成に影響が生じている個体を見出した。すなわち、上皮組織は胎児後端の組織群の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。総排泄腔の分割、外生殖器の隆起等の胎生中期における解析として、薬剤誘導型遺伝子改変マウスを用いて、in utero で総排泄腔周辺の小細胞集団を標識し、その細胞の移動を解析した。2系統の薬剤誘導型 Cre マウスを用いて解析を行ったが、どの系統を用いても外生殖器原基において外生殖器原基の側方部の近位-遠位軸に沿って細胞が分布する様子が観察された。総排泄腔分割領域においては、総排泄腔の分割開始前に標識した細胞が尿生殖洞と腸管の間葉領域(尿直腸中隔と呼ばれる)には分布しなかったことから、尿直腸中隔を構成する間葉細胞は標識外の領域から流入したか、非標識細胞に由来することが推察された。一方で、BrdU 投与による細胞増殖解析実験から、尿直腸中隔間葉では直腸側に比べ尿生殖洞側間葉において細胞増殖が亢進していることを見出した。

さらに、肛門直腸奇形の症状を呈することが知られている内胚葉特異的 $\beta$ -catenin 機能獲得マウス、条件付き Shh 遺伝子改変マウス、Gli2/3 複合遺伝子改変マウスを用いて、マイクロ CT 解析および連続組織切片からの三次元解析を行った。これらマウスの解析の結果、雌性型肛門直腸奇形を三次元的に示すことができた。特に Gli2/3 複合遺伝子改変マウスにおいては、胎生 18.5 日齢の時点で雌性生殖器原基が腸管に接続している組織像が得られた。この結果から、胎生中期において高位の直腸-尿道瘻が観られる場合は、雌性生殖器原基の形成の時点で腸管側に接続している可能性が示唆され、高位と低位の総排泄腔分割不全を素因として持っている場合によって雌性型肛門直腸奇形の形成メカニズムに違いがある可能性が考えられた。

本研究期間全体での解析を通じて、雌性型肛門直腸奇形をマウスモデルを用いて三次元的に示すことができ、またそこに至るまでの管腔のダイナミズムを三次元的に可視化することができた。そして、胎生中期の排泄腔分割が出生前後の雌性生殖器形成に影響を及ぼしうることを示すことができた。これらの結果は、今後さらに雌性型の肛門直腸奇形の原因メカニズムを解明する上で重要な事柄であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Suzuki K, Matsumaru D, Matsushita S, Murashima A, Ludwig M, Reutter H, Yamada G. Epispadias and the associated embryopathies; genetic and developmental basis. *Clinical Genetics*. 2017;91(2):247-253.  
査読有  
DOI: 10.1111/cge.12871.

## 6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：山田 源

ローマ字氏名：(YAMADA, gen)

研究協力者氏名：梶本 みずき

ローマ字氏名：(KAJIMOTO, mizuki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。