

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590194

研究課題名（和文） 非調和比を用いたヒトおよびマウス胎児骨格および臓器形態形成機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of organ morphogenesis in human and mouse embryos and fetuses by the cross-ratio.

研究代表者

宇田川 潤 (UDAGAWA JUN)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10284027

研究成果の概要（和文）：ヒト胎生期の上下肢および体幹のパーツの長さを用いた非調和比により、形態発生バランスを定量的に記述することができ、形態発生異常を客観的に評価することができた。また、メビウス変換に関連する非調和比を拡張した三重比を手足の骨格構造に適用することにより、霊長類を樹上性、半樹上性および地上性に分類することができた。したがって、メビウス変換は手足の骨格構造と機能とを結びつける関数として応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The growth balance of the upper and lower limbs, and the trunk, was represented by the developmental change in the cross-ratio. We introduced the triple-ratio, which is constant by the Möbius transformation and can deal with four consecutive structures, such as the metacarpal bone and proximal, middle, distal phalanges. The difference of the triple-ratios of the fingers among the primates corresponds to the difference of their behavior, such as arboreal, semi-arboreal, or terrestrial. The cross- and triple-ratios may be applicable for the assessments of the growth balance, and Möbius transformation may be used as a function that represents the relationship between the skeletal structure of the hand and its mechanics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：非調和比、胎児、骨格、形態形成

1. 研究開始当初の背景

成人病胎児期起原説は、胎生期の発育が生後の生活習慣病に関連していることを強く示唆している。一方、生後の臓器機能と胎生期の臓器発生との関係、および発生における各臓器の相互作用は明らかになりつつあり、胎生期の調和的臓器発生は生後の生体機能

や生活習慣病などの臓器疾患の素因を形成に重要な要素であると考えられるようになってきた。臓器の調和的な形態発生の検討には、各臓器の重量や体積だけではなく、形を定量的にあらわす指標が必要である。特に、臓器の形態に大きな変化が生じている器官形成期の胚子の形態変化を定量化するには、

形を比較するための数学的方法の導入が必要である。

形の変換には様々な方法があり、そのうちメビウス変換は、平面で交わる2曲線の角度を保つ等角写像の一つである。非調和比はメビウス変換にとって基本的な量であり、メビウス変換によって不変である。また、非調和比が不変であれば、二つの図形はメビウス変換により変換可能である。非調和比は、生体では上腕長・前腕長・手長など3つの連続した構造物の計測値から求めることができ、胚子の形態変化や各部位の大きさのバランス・空間的位置関係の変化に関し、メビウス変換を用いて記述可能かどうかを知る手がかりの一つとなる。これまでにヒトの形態形成の記述に非調和比を用いた研究はPetukhovらによるものだけであり、四肢や体幹の非調和比は胎児期から成人まで不変であると報告されていたが、我々の予備的な研究は、胎生期において体幹および上下肢の非調和比は大きく変化するが、適当な関数を用いるとその経時的変化を近似できる可能性を示していた。

この結果は、形態学的成長と非調和比との関係について、次の2つの可能性を示唆していた。

(1) 胎生期の複雑な形態成長は、非調和比の変化を調べることによって数学的に解析可能となる。また、非調和比の変化を立体的な遺伝子発現地図と対応させることにより、複雑な形態成長を遺伝子発現パターンから予測できる可能性がある。

(2) 上肢の非調和比の経時的変化は、上肢の運動機能の発達に関連していると考えられる。

そこで、本研究において、非調和比を胎生期の骨格・筋の構造や臓器形態の経時的変化の解析に適用することを試みた。

2. 研究の目的

(1) 非調和比を用いてヒトおよびマウス形態発生を記述する。

①胚子および胎児の骨格・筋・臓器の形態計測を行い、非調和比の経時的推移を求める。

②非調和比の変化のパターンを形態変化と対応させ、その変動パターンの数理解析を行う。

(2) 非調和比の生成機構の解明および非調和比による力学的モデルの構築を行う。

①マウス胎児を用いて、肢芽の発生に関連する線維芽細胞増殖因子 (FGF) などの濃度勾配の3次元的情報を取得する。また、これらの物質の発現領域について非調和比を経時的に求め、肢芽形態の非調和比と比較することによって、形態形成制御機構に関し、数学的に解析する。

②肝臓・膵臓・肺・消化管の発生についても生理活性物質の分布の非調和比を求め、これらの臓器の空間的配置について数学的に検討する。

(3) 非調和比と運動機能との関連を検討する。

(1) -①で得られた計測値を用いて上下肢の動作解析を行い、非調和比と運動機能の関連について検討する。

3. 研究の方法

(1) 非調和比を用いたヒトおよびマウス形態発生の記述

①骨格および臓器の形態計測

i) ヒト胚および胎児の標本、ヒト成人において、上肢、下肢および体幹のパーツの長さをノギスあるいはマルチン式人体測定器により計測した。また、ヒト胎児の胸部および腹部臓器、脳の重量およびサイズを計測した。

ii) 3テスラのMRIによりヒト胚子および胎児を撮影し、臓器の立体像を得た。また、ヒト胚子の骨・軟骨染色標本から骨格の形態計測値を得た。

iii) マイクロCTにより胎生12.5日から成獣まで骨格の立体再構築像を得た。またオスミウム酸や重クロム酸カリウムによりマウス胚を染色し、マイクロCTによる臓器の描出を試みた。

②形態形成における非調和比の変動パターンの解析

ヒトおよびマウス胚の上下肢および体幹の長さより非調和比を計算し、経時的な非調和比の変化について近似曲線を作成した。また、上肢において手長、前腕長あるいは上腕長の比率の変化と上肢の非調和比の変化を比較した。上肢帯、下肢、下肢帯および体幹においても同様に3つのパーツの長さの比率と非調和比を計算し、その関係性を調べた。また、顔面の高さに関する非調和比を正常胎児および無脳児の間で比較した。

③ヒトおよびマウスにおける下顎骨の発生の形態変化の定量的解析

i) ヒト胎児下顎骨の骨染色標本の側面像において8つのランドマークを設定し、経時的な下顎骨形態変化をThin plate spline (TPS) およびプロクラステス解析により検討した。また、胎生14.5日から成獣までのマウスの下顎骨をマイクロCTで撮影し、発生における下顎骨の形態変化を同様に解析した。

ii) 下顎骨の形態異常を呈するRor2ノックアウトマウス胎児と正常マウス胎児の下顎骨形態の差異をTPSおよびプロクラステス解析、さらには相対ゆがみ解析により比較した。

(2) FGF8の立体的分布の解析

アルカリフォスファターゼあるいは金コ

ロイド標識抗体を用いて、肢芽や中枢神経系の発生に重要な役割を有する FGF8 の全胚免疫染色を行い、立体的な発現分布を実体顕微鏡およびマイクロ CT により観察した。

(3) 非調和比と運動機能との関連の検討
様々な動物種の上下肢の骨の長さを測定し、前肢および後肢の非調和比を求めた。また、前後肢の機能と骨格構造の差異を多様な動物種間で比較するため、中手骨から末節骨までの4つの骨の長さを同時に扱えるよう非調和比を拡張し、三重比なるものを導き出した。さらに、三重比を用いて樹上性、半樹上性および地上性の霊長類の手足の構造を比較し、手足の機能と骨格構造との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 約30体のヒト胎児のMRI撮影を行い、画像のデータベースを作成し、肝臓、肺、腎臓の体積を計測して成長曲線を得ることができた。また、胎児撮影専用のMRIプローブを作成し、脾臓など検出が困難である胎児臓器の描出が可能となった。

(2) 重クロム酸カリウムにより、胎生14.5日のマウス胎児の臓器をマイクロCTにより描出した。重クロム酸カリウムによる染色は、四酸化オスミウムよりコントラストは低いが、毒性がより低いことに加え、胎児の収縮も軽度であるため、形態形成の定量的な解析に適していると考えられる。

(3) 生体工学的なランドマークを用いたヒト上肢の非調和比は胎児期に一定であるが、成人の非調和比と比較して有意に小さいことが明らかとなった。また、下肢や体幹の非調和比は胎児と成人で大きく異なることが明らかとなった。これらの結果は、生後の上肢や下肢の機能に関連した骨格構造の変化を非調和比の差異により記述できる可能性を示している。また、下肢および体幹の非調和比は胎生期においても変化し、等角成長を示さないが、非調和比を用いると3つの連続した部位の成長のバランスが単純な直線あるいは曲線で近似でき、形態発生バランスの評価指標として非調和比を使用できる可能性が示唆された。事実、無脳児では、頭頂点、鼻根点、鼻下点および上唇点をランドマークした顔面の非調和比が正常胎児より極端に低値となっていた。

(4) 胎生期の下顎骨の形態変化について TPS およびプロクラステス解析を用いて定量的に解析したところ、胎生14.5日から生後3日にかけて形態変化量が急速に少なくなることが定量的に示された。この結果は、正常発生における形態変化の大きさを TPS および

プロクラステス解析により定量化することが可能であることを示している。また、縫合固定により下顎に形態異常を生じたマウス胎児と対照群の胎児下顎を相対ゆがみ解析により分類することができた。さらに、胎生18.5日に下顎の形態異常を呈する Ror2 ノックアウトマウスについて、下顎形態のプロクラステス解析および相対ゆがみ解析を行ったところ、形態異常を定量的かつ鋭敏に検出できた。したがって、TPS、プロクラステスおよび相対ゆがみ解析により胎生期における下顎の形態発生異常の客観的評価が可能と考えられた。

(5) 肢芽の形成や中脳および小脳の発生に重要な成長因子である FGF8 は、アルカリフォスファターゼ標識抗体を用いた全胚免疫染色により肢芽先端や中脳後脳境界 (MHB) に強く発現していた。金コロイド標識抗体を用いて染色し、マイクロCTで観察したところ、MHB および視床下部における FGF8 の発現が立体的に観察された。一方、肢芽先端の FGF8 発現領域は非常に狭いため、解像度が $6\ \mu\text{m}$ までのマイクロCTでは描出が困難であった。今後は FGF8 や Wnt1 など MHB の確立とその後の脳の発生に関与する液性因子の立体的濃度勾配についての非調和比と、*Otx2*, *Gbx2* などの転写因子の発現を比較して、中脳および後脳の形態形成とメビウス写像との関連を探っていく予定である。

(6) 霊長類の示指から小指の4本の指において、基節骨から末節骨、あるいは中手骨から中節骨の3つの連続した骨の非調和比のクラスター分析を行ったところ、樹上性、半樹上性あるいは地上性のグループに大まかに分類することができた。さらに、中手骨から末節骨までの4つの骨の長さを同時に用いて解析するために非調和比を拡張し、三重比と名付けた。三重比は非調和比と同様にメビウス変換により不変な量である。

霊長類の手足の骨格構造に関し、示指から小指までの三重比を用いて解析したところ、樹上性、半樹上性および地上性のグループ間に有意差が認められ、クラスター分析により各グループの霊長類がほぼ生態別に分類された。

これらの結果、三重比は手足の機能と骨格構造との関連をあらわす量になり得ると考えられ、メビウス変換は様々な把握機能に適した構造の解析に応用可能と考えられた。今後はぶらさがりや精密把握など特徴的な機能を有する構造と、三重比およびメビウス変換との関連について、力学的計算など工学的手法を取り入れながら解析を進め、ロボットハンドや福祉装具の開発への応用を試みる予定である。

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 17 件)

- ① Rafiq AM, Udagawa J, Lundh T, Jahan E, Matsumoto A, Sekine J, Otani H. Mathematical analysis of mandibular morphogenesis by micro-CT-based mouse and alizarin red S-stained-based human studies during development. *Anat Rec* 295: 313-327, 2012, 査読有
DOI: 10.1002/ar.21535
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.21535/abstract>
- ② Lundh T, Udagawa J, Hänel S-V, Otani H. Cross- and triple-ratios of human body parts during development. *Anat Rec* 294:1360-1369, 2011, 査読有
DOI: 10.1002/ar.21426
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.21426/abstract>
- ③ Zhang Q, Wang H, Udagawa J, Otani H. Morphological and morphometric study on sphenoid and basioccipital ossification in normal human fetuses. *Congenit Anom* 51:138-148, 2011, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2011.00322.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2011.00322.x/full>
- ④ Hashimoto R, Udagawa J, Kagohashi Y, Matsumoto A, Hatta T, Otani H. Direct and indirect effects of neuropeptide Y and neurotrophin 3 on myelination in the neonatal brains. *Brain Res* 1373:55-66, 2011, 査読有
DOI: 10.1016/j.brainres.2010.12.027
URL:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899310026922>
- ⑤ Kawamoto M, Udagawa J, Hashimoto R, Matsumoto A, Yamada M, Nimura M, Otani H. Adrenocorticotrophic tumor cells transplanted into mouse embryos affect pancreatic histogenesis. *Congenit Anom* 51:62-69, 2011, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2010.00313.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2010.00313.x/full>
- ⑥ Matsumoto A, Hatta T, Ono A, Hashimoto R, Otani H. Stage-specific changes in the levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor in the biological fluid and organ of mouse fetuses. *Congenit Anom* 51:183-186, 2011, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2011.00337.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2011.00337.x/full>
- ⑦ Simamura E, Shimada H, Shoji H, Otani H, Hatta T. Effects of melanocortins on fetal development. *Congenit Anom* 51(2):47-54, 2011, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2011.00316.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2011.00316.x/full>
- ⑧ 井上隆之、橋本龍樹、岩本凡子、大谷 浩. ヒト関節拘縮病態の解剖学的観察、解析方法の検討 -解剖学実習体による検討-. *理学療法学* 38(3):173-179, 2011, 査読有
URL:
<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=cb3physi&vo=38&nu=3>
- ⑨ Udagawa J, Yasuda A, Naito K, Otani H: Analysis of the harmonized growth pattern of fetal organs by multidimensional scaling and hierarchical clustering. *Congenit Anom*, 50: 175-85, 2010, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2010.00284.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2010.00284.x/full>
- ⑩ Naito K, Udagawa J, Otani H: Multidimensional standard curve for the development process of human fetuses. *Stat Med*, 29: 2235-45, 2010, 査読有
DOI: 10.1002/sim.3952
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/sim.3952/asset/3952ftp.pdf?v=1&t=h3ej2x9s&s=82dd51ccd3bbb91317>

3ec980cd322a10abcbfe94

- ⑪ Yamada M, Udagawa J, Matsumoto A, Hashimoto R, Hatta T, Nishita M, Minami Y, Otani H: Ror2 is required for midgut elongation during mouse development. *Dev Dyn* 239: 941-953, 2010, 査読有
DOI: 10.1002/dvdy.22212
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.22212/full>
- ⑫ Udagawa J, Ono A, Kawamoto M, Otani H: Leptin and its intracellular signaling pathway maintain the neurosphere. *NeuroReport* 21: 1140-1145, 2010, 査読有
DOI: 10.1097/WNR.0b013e328340a74d
URL:
<http://journals.lww.com/neuroreport/pages/articleviewer.aspx?year=2010&issue=12290&article=00002&type=abstract>
- ⑬ Jahan E, Matsumoto A, Udagawa J, Rafiq AM, Hashimoto R, Rahman OIF, Habib H, Sekine J, Otani H: Effects of restriction of fetal jaw movement on prenatal development of the temporalis muscle. *Arch Oral Biol*, 55: 919-27, 2010, 査読有
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2010.07.010
URL:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996910001986>
- ⑭ Otani H, Udagawa J, Hatta T, Kagohashi Y, Hashimoto R, Matsumoto A, Satow F, Nimura M: Individual variation in organ histogenesis as a causative factor in the developmental origins of health and disease: Unnoticed congenital anomalies? *Congenit Anom*, 50: 205-211, 2010, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2010.00295.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2010.00295.x/full>
- ⑮ Mu Q, Udagawa J, Sun T, Otani H: Possible roles of leptin in the early stage of prenatal development of the mouse cerebellum. *Shimane J Med Sci* 27:1-7, 2010, 査読有
URL:

<http://ap09.lib.shimane-u.ac.jp/title.php?tid=67&vid=749&flag=j&output=table>

- ⑯ Kimura M, Umehara T, Udagawa J, Kawauchi H, Otani H: Development of olfactory epithelium in the human fetus: scanning electron microscopic observations. *Congenit Anom* 49: 102-107, 2009, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2009.00233.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2009.00233.x/full>
- ⑰ Umehara T, Udagawa J, Takamura K, Kimura M, Ishimitsu R, Kiyono H, Kawauchi H, Otani H: Role of interleukin-15 in development of the mouse olfactory nerve. *Congenit Anom* 49: 253-257, 2009, 査読有
DOI: 10.1111/j.1741-4520.2009.00246.x
URL:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-4520.2009.00246.x/full>

[学会発表] (計 60 件)

- ① 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, 2011.12.15, Umeå, Sweden.
- ② 宇田川 潤、松本暁洋、平野 了、出口友季、藤田恭久、平川正人、橋本龍樹、佐藤文夫、大谷 浩. マイクロCTによるマウス胎児四肢発生における FGF 発現部位の立体的観察. 第 51 回日本先天異常学会、2011. 7. 23、東京
- ③ Rafiq AM, Udagawa J, Lundh T, Jahan E, Matsumoto A, Sekine J, Otani H. Mathematical analysis of mandibular morphogenesis by micro-CT-based study during development. The International College of Surgeons. The 57th Annual Congress of the Japan Section, 2011.6.25, Nagoya
- ④ Rafiq AM, Udagawa J, Lundh T, Jahan E, Matsumoto A, Sekine J, Otani H. Mandibular morphogenesis by 3-D study & mathematical analysis of its fetal and neonatal development. 第 50 回日本先天異常学会、2010.7.8、淡路市、2010 年 7 月 8 日～10 日

- ⑤ Rafiq AM, Udagawa J, Lundh T, Jahan E, Sekine J, Otani H. Mathematical analysis of mandibular morphogenesis by 3-D study during prenatal development. The International College of Surgeons. The 56th Annual Congress of the Japan Section, 2010.6.12, Tokyo.
- ⑥ 宇田川 潤、Torbjörn Lundh、Pongo Laszlo、佐藤文夫、小野篤輝、大谷 浩. 非調和比による哺乳類の前足および後足の形態学差異の解析. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会、2010. 3. 29、盛岡市
- ⑦ Tapani S, Udagawa J, Plusa B, Zernicka-Goetz M, Lundh T. Three dimensional mathematical modelling of pronuclei migration for the mouse. The 10th European Congress of Stereology and Image Analysis, 2009.6.25 Milan, Italy.
- ⑧ Otani H. Histogenesis of organs as a predisposing factor to postnatal diseases. 18th Lake Shirakaba Conference, 2009.6.20, Vedbaek, Denmark.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田川 潤 (UDAGAWA JUN)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：10284027

(2) 研究分担者

大谷 浩 (OTANI HIROKI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：20160533

橋本 龍樹 (HASHIMOTO RYUJU)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：90252907

松本 暁洋 (MATSUMOTO AKIHIRO)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：70346378

(3) 連携研究者

内田 幸司 (UCHIDA KOJI)
島根大学・医学部・教務職員
研究者番号：50335569