

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790228

研究課題名（和文）胎児性上皮組織『総排泄腔』に着目した泌尿生殖系平滑筋成分の発生研究

研究課題名（英文）The analysis of urinary tract formation; a new approach focused on the developmental role of cloaca during embryogenesis

研究代表者

原口 竜摩（Haraguchi Ryuma）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00423690

研究成果の概要（和文）：泌尿生殖系臓器に内包される平滑筋組織は、高齢化社会で問題となる排尿障害、生殖不全の発症に関与することが想定される。これまでに、その領域での平滑筋の組織発生様式やそれに関与する分子作用機序についての研究が盛んに行なわれてきたが、現在、泌尿生殖系平滑筋成分の発生研究は、初期胚子形成期にまで発生段階をさかのぼり、それらの発生基盤を明らかにしようという新たな局面を迎えつつある。申請者は、初期胚子の総排泄腔と呼ばれる胎児性上皮組織が、主要な泌尿生殖器系の器官形成に必須であることを報告してきた。本研究では、さらにそれを一歩推し進め、遺伝子改変動物を用いた in vivo 細胞系譜追跡実験を軸とする解析手法により、胎児形成初期の総排泄腔の影響下において泌尿生殖系平滑筋成分が如何なる分子発生基盤のもとに構築されるのかを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Congenital diseases of the urinary tract are frequently observed in infants. Such diseases present a number of developmental anomalies such as hydroureter and hydronephrosis. Although some genetically-modified mouse models of growth factor signaling genes reproduce urinary phenotypes, the pathogenic mechanisms remain obscure. Previous studies suggest that a portion of the cells in the external genitalia and bladder are derived from peri-cloacal mesenchymal cells that receive Hedgehog (Hh) signaling in the early developmental stages. We hypothesized that defects in such progenitor cells, which give rise to urinary tract tissues, may be a cause of such diseases. Our study identified the essential embryonic stages for the pathogenesis of urinary tract phenotypes. These results suggested that Hh-responsive mesenchymal Bmp signaling maintains the population of peri-cloacal mesenchyme cells, which is essential for the development of the ureter and the upper urinary tract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：泌尿生殖器

## 1. 研究開始当初の背景

泌尿生殖系平滑筋成分の発生研究は、将来導管となる尿路上皮とその周囲に存在する未分化間葉系細胞、この2つの組織間で行なわれる上皮-間葉相互作用の分子基盤解明が重視されてきた。現在まで、上皮-間葉間を仲介する液性シグナル分子や未分化間葉細胞から平滑筋組織への分化誘導を促す転写制御因子の発見など、数多くの知見が蓄積されつつある（Kidney Int. 2000, Development. 2002, J Clin Invest. 2006）。これらの研究では、各臓器において尿路上皮及び未分化間葉系細胞の基本構造が確立する胎児形成中期以降の発生ステージでの解析が主となっていたが、近年、より初期の胎児形成過程が、泌尿生殖系平滑筋成分の発生に重要である可能性を示唆する報告がなされた。米コーネル大学の研究グループは、初期胚子末端の tailbud mesoderm と呼ばれる間葉系細胞が一部の泌尿生殖系平滑筋組織へ分布することを、鳥類胚を使った細胞運命追跡実験によって見だしている（Development. 2007）。初期胚子末端領域で泌尿生殖系の尿管平滑筋成分へと分化する能力を持った未分化間葉系細胞が存在することが実験的に証明されたことによって、より早い発生ステージに着目した泌尿生殖系臓器の発生研究が現在注目されつつある。今後は、これらの未分化間葉系細胞を泌尿生殖系平滑筋組織へと分化させる、その組織系譜を決定づける分子実体の究明が焦点となってくる。しかしながら、現在、その詳細は不明であり、初期胚子期のどの発生局面（時期）が、未分化間葉系細胞を平滑筋成分の組織系列へと決定づける際に最も重要であるかも分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

申請者は、総排泄腔領域で行なわれる液性因子（Shh）を介した組織間作用が、初期胚子における泌尿生殖系臓器平滑筋成分の重要な発生ポイントとなっ

ていることを特定しつつあった。本研究では、総排泄腔の影響下にある細胞群についての組織系譜追跡実験をおこない、総排泄腔近傍由来の細胞集団の組織分布を経時的に観察しながら、それらと泌尿生殖系平滑筋成分の組織系譜との関係を調べた。

## 3. 研究の方法

マウス Cre/lox システムを応用した総排泄腔近傍の間葉系細胞群についての組織系譜追跡実験を軸とした解析を行ない、その細胞群の分布状況についての組織学的解析を、標識時から経時的に行うことで、総排泄腔領域と平滑筋成分の組織系譜との関連性を調べた。

## 4. 研究成果

総排泄腔から Shh の直接標的分子である Gli1 遺伝子のプロモーター下流に Cre 酵素が導入された遺伝子改変マウス Gli1CreER マウスを Cre 酵素依存的にレポーター分子 LacZ を発現する Rosa-LacZ レポーターマウスを交配させることで、総排泄腔の影響下にある細胞群の標識及びそれらの組織系譜の追跡を行なった。その結果、マウス胎生 10.5 日胚で標識された細胞の大部分が泌尿生殖系臓器、特に膀胱平滑筋及び尿管平滑筋に特異的に分布することが明らかとなった。さらに、総排泄腔近傍の細胞群が、上記組織へと分化するには、SHH シグナルを経た BMP シグナルの活性化が必須であることが、Gli1CreER マウスを用いた SHH シグナル応答性細胞特異的な KO マウス解析によって明らかとなった。本研究成果は、**PLoS One**. 2012 Haraguchi et al. にて発表を行なっている。

## 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 13 件）

全て査読有り

1. Sann Sanda Khin, Riko Kitazawa, Kyaw Htet, Hla Min Htike, Than Than Yee, Myint Aung, Ryuma Haraguchi and Sohei Kitazawa. Intestinal inflammatory pseudotumor caused by taeniasis: calcareous corpuscles as a diagnostic clue. **Pathology International**, in press. 2013

2. Komoda Munenori, Riko Kitazawa, Kenji Makita, Keisuke Yoshida, Miyuki Takeji, Yoshiko Soga, Mie Kurata, Ryuma Haraguchi, Sohei Kitazawa. Pulmonary hypertension associated with diffuse deposition of pentosidine in pulmonary arterioles. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2013.

3. Natsumi Kuwahara, Riko Kitazawa, Koto Fujiishi, Yusa Nagai, Ryuma Haraguchi, Sohei Kitazawa. Gastric adenocarcinoma arising in gastritis cystica profunda presenting with selective loss of KCNE2 expression. **World Journal of Gastroenterology**, 19(8):1314-1317, 2013.

4. Miku Nakagawa, Riko Kitazawa, Natsumi Kuwahara, Keisuke Yoshida, Ryuma Haraguchi, Sohei Kitazawa. Efficient genetic analysis of microdissected samples by agarose-bead method: Alterations of  $\beta$ -catenin gene in fundic gland polyp and heterotopic gastric mucosa of duodenum. **Acta Histochem Cytochem**, 46(1), 19-24, 2013.

5. Makita K, Kitazawa R, Fujiishi K, Nakagawa M, Haraguchi R, Kitazawa S. Cdx2 expression and its promoter methylation during metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's esophagus. **World Journal of Gastroenterology**. 2013;19(4):536-41.

6. Suzuki K, Adachi Y, Numata T, Nakada S, Yanagita M, Nakagata N, Evans M. S, Daniel G, Economides A, Haraguchi R, Moon M. A,

Yamada G. Reduced BMP Signaling Results in Hindlimb Fusion with Lethal Pelvic/Urogenital Organ Aplasia: A New Mouse Model of Sirenomelia. **PLoS One**. 2012 Sep 17;7(9):e43453.

7. Haraguchi R, Matsumaru D, Nakagata N, Miyagawa S, Suzuki K, Kitazawa S, Yamada G. The hedgehog signal induced modulation of bone morphogenetic protein signaling: an essential signaling relay for urinary tract morphogenesis. **PLoS One**. 2012;7(7):e42245. Epub 2012 Jul 30.

8. Ito C, Kitazawa R, Makita K, Watanabe T, Toda A, Haraguchi R, Tanaka S and Kitazawa S. Cutaneous verruciform xanthoma on the scrotum with MCP-1 immunohistochemical study: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, 2012

9. Nagai Y, Kitazawa R, Nakagawa M, Komoda M, Kondo T, Haraguchi R and Kitazawa S. Multiple-system atrophy in long-term professional painter: a case report. **Case Reports in Pathology**, 2012, volume 2012, ID613180, 5 pages.

10. Matsumaru D, Haraguchi R, Miyagawa S, Motoyama J, Nakagata N, Meijlink F, Yamada G. Genetic analysis of Hedgehog signaling in ventral body wall development and the onset of omphalocele formation. **PLoS One**. 2011 Jan 20;6(1):e16260.

11. Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R, Motoyama J, Iguchi T, Nakagata N, Hui CC, Yamada G. The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. **Endocrinology**. 2011 Jul;152(7):2894-903.

12. Khin SS, Kitazawa R, Kondo T, Idei Y, Fujimoto M, Haraguchi R, Mori K, Kitazawa

S. Epigenetic Alteration by DNA Promoter Hypermethylation of Genes Related to Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Signaling in Cancer. *Cancers*. 3(1), 982-993, 2011

13. Mukai S, Kitazawa R, Ishii J, Kondo T, Hakozaki A, Horiuchi K, Haraguch R, Mori K, Kitazawa S. Identification and analysis of function of a novel splicing variant of mouse receptor activator of NF- $\kappa$ B. *Mol Cell Biochem*. 2011 Apr;350(1-2):29-38. Epub 2010 Dec 14.

[学会発表] (計5件)

1. 第14回国際組織細胞化学会総会・学術集会 2012年8月26日(日)～29日(水)  
Spatio-temporal expression of Tbx18 during endochondral bone formation  
Ryuma Haraguchi, Riko Kitazawa, Sohei Kitazawa

2. 第30回日本骨代謝学会総会・学術集会 2012年7月19日(木)～21日(土)  
骨形成過程における Tbx18 遺伝子の役割  
原口竜摩、北澤理子、北澤荘平

3. 第101回日本病理学会総会・学術集会 2012年4月26日(木)～28日(土)  
胎児期骨形成過程における Tbx18 遺伝子の役割  
原口竜摩、北澤理子、北澤荘平

4. 第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2011年9月24日(土)～25日(日)  
骨形成／骨成熟過程における Tbx18 遺伝子の役割  
原口竜摩、北澤理子、北澤荘平

5. 第100回日本病理学会総会・学術集会 2011年4月28日(木)～30日(土)  
新規遺伝子改変マウスを用いた平滑筋組織の機能破綻に起因する腎尿路疾患についての解析  
原口竜摩、松丸大輔、杉田敦郎、木藤克己、

阿部康人、北澤理子、山田源、北澤荘平

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/pathology1/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

原口 竜摩 (Haraguchi Ryuma)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：00423690

(2) 研究分担者 該当無し

(3) 連携研究者

北澤荘平 (Kitazawa Sohei)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90186239

北澤理子 (Kitazawa Riko)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00273780

山田源 (Yamada Gen)  
和歌山県立医科大学・教授  
研究者番号：80174712