

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590235

研究課題名(和文) 体幹後部前駆細胞(プロジェクター)の同定と先天性形成異常の統合的研究

研究課題名(英文) The analysis of congenital anomalies of caudal body formation

研究代表者

鈴木 堅太郎(Suzuki, Kentaro)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：20404345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：人魚体奇形は、後肢融合に加え、膀胱、腎臓、さらに外生殖器など複数の体幹後部器官の形成異常を伴う先天性の形成異常である。これまで、臨床的な報告は数多くあるが、その発症メカニズムはわかっていない。

後肢融合を含む人魚体奇形に類似した形成異常を示すIsl1Cre;Bmp4flox/floxマウスの解析から、体幹後部形成に寄与すると思われる領域としてaPCM (anterior Peri-Cloacal Mesenchyme)を同定し、Isl1発現細胞におけるBmpシグナルがaPCMの形成に不可欠であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Mermaid syndrome is a developmental malformation of the caudal body characterized by leg fusion and associated anomalies of pelvic/urogenital organs including bladder, kidney, rectum and external genitalia. Despite the many clinical studies of mermaid syndrome in humans, little is known about the pathogenic developmental mechanisms that cause the complex array of phenotypes observed. Isl1Cre;Bmp4flox/flox conditional mutant mice displayed mermaid-like phenotypes including hindlimb fusion and pelvic/urogenital organ dysgenesis. Genetic lineage analyses indicated that Isl1-expressing cells contribute to both the aPCM (anterior Peri-Cloacal Mesenchyme) and the hindlimb bud. Furthermore, we show Bmp signaling is essential for the aPCM formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：sirenomelia 体幹後部形成 Isl1 Bmp4

1. 研究開始当初の背景

私たちの体は、さまざまな形態や機能を持った組織・器官で成り立っている。それぞれの器官は、その発生過程において固有の前駆細胞（プロジェニター）から成り立っていると考えられる。よってその前駆細胞を知るとは、その器官の発生メカニズム、先天性疾患の発症メカニズム、癌などの病態発症機序を理解する上で重要な意味がある。さらに再生医学への応用に繋がる可能性もあり、器官前駆細胞の同定は器官を知る上で極めて重要であると言える。

泌尿生殖器など体幹後部に異常が観られる先天性形成異常は、尿道下裂や鎖肛を含め多様であり、その発症率が高いにも関わらず発症メカニズムはほとんどわかっていない。ましてやその前駆細胞は何か？その実体に関しては全くわかっていない。

2. 研究の目的

後肢、泌尿生殖器含む体幹後部が欠損するヒト先天性形成異常がある。体幹後部の異常を示す先天性形成異常は、単独器官でなく複数の器官の形成異常が併発することが多い。その1つにマーメイドシンドロームがある。その名のごとく後肢が融合し、マーメイド（人魚）の容姿に似ていることからその名が付けられた。このことは、体幹後部を形成する細胞、すなわち、後肢と泌尿生殖器は前駆細胞が共通である可能性を示唆している。これまで、この前駆細胞の同定は困難であった。しかし、私は、マウス胎児体幹後部に興味深い発現を示す遺伝子として“*Isl1*”を見出した。さらに *Isl1* が発現する細胞で特異的に増殖因子の1つである *Bmp4* (骨形成因子4) を機能破壊すると、ヒト先天性体幹後部形成異常に類似した形態異常を呈することを発見した (図1、2)。本研究は、遺伝子改変マウスを駆使し、体幹後部を形成する前駆細胞の同定とその破綻が引き起こす先天性形成異常の発症メカニズムについて前駆細胞（プロジェニター）を知ることで統合的に理解することを目的としている。

3. 研究の方法

体幹後部の代表的な先天性奇形症の1つであるマーメイドシンドロームのモデルマウス“*Isl1Cre Bmp4 cKO*”を用いて以下の実験を行った。

- (1) *Isl1* 発現細胞が、体幹後部形成過程においていつから出現するのか？また、それぞれの時期に発現した *Isl1* 発現細胞がその後、体幹後部のどの器官形成に寄与しているのか？薬剤誘導型 *Isl1merCremer* マウスおよび *Cre* が発現した細胞を可視化できる *Gt(ROSA)26Sor* マウスを用い、時期特異的な *Isl1* 発現細胞の細胞系譜実験を行った。
- (2) なぜ、*Isl1Cre Bmp4 cKO* マウスは体幹後部の形成異常を起こしてしまうのか？*Bmp* シ

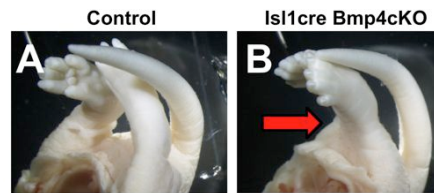


図1 *Isl1cre Bmp4 cKO* は後肢が融合する (B;赤矢印)。

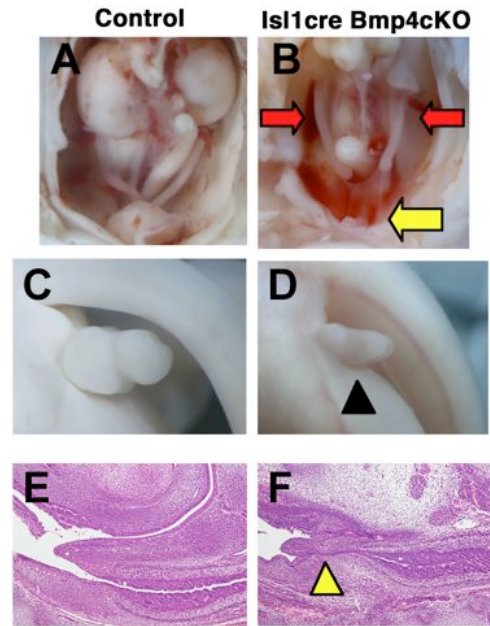


図2 *Isl1Cre Bmp4 cKO* マウスに見られる、ヒトマーメイドシンドロームに類似した症状。腎臓、膀胱の欠損 (B, 赤矢印、B, 黄矢印)、外生殖器の低形成 (D, 黒矢頭)、鎖肛 (F, 黄矢頭) を呈する。

グナルの下流で体幹後部形成に寄与するシグナルカスケードを調べるため、体幹後部前駆細胞に発現する遺伝子群の発現解析をおこなった。細胞レベルで何が起きているのか？細胞増殖、細胞増殖についてノックアウトマウスを用いて解析した。

(3)体幹後部形成過程において細胞の挙動を詳細に調べるため *Isl1cre Bmp4 cKO* マウスに *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}* マウスを掛け合わせ、*Isl1* 発現細胞のみで YFP が発光するマウスを作成し、ライブイメージング法により *Isl1* 発現細胞の挙動の可視化を検討した。

4. 研究成果

- (1) 薬剤 (タモキシフェン) 誘導型 *Isl1merCremer* マウスおよび *Gt(ROSA)26Sor* マウスを用いて *Isl1* 発現細胞を可視化し、その後、どの器官形成へ寄与するのか細胞系譜実験を行った。その結果、胎生 8.5 から胎生 10.5 日目にかけて *Isl1* を発現する細胞が後肢、膀胱、外生殖器などの泌尿生殖器へもっとも多く寄与していることがわかった。さらに、*Isl1* 発現細胞は、Peri-Cloacal

Mesenchyme (PCM) の一部に寄与していることがわかった (図 3)。

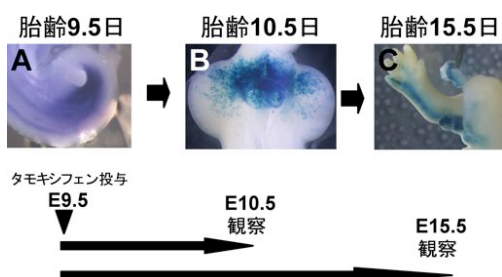


図 3 Is11merCremer/Gt (ROSA) 26Sor マウスを用いた Is11 発現細胞の系譜実験。Is11 遺伝子は、胎齢 9.5 日では体幹後部に発現している (A)。胎齢 9.5 日でタモキシフェンを投与し、胎齢 9.5 日から 10.5 の間に出現する Is11 発現細胞の細胞系譜を調べると、1 日後には、泌尿生殖器原基と後肢原基の後方部 (B)、6 日後では、後肢の後方部、外生殖器をはじめとした泌尿生殖器において観察される (C)。

(2) Is11Cre Bmp4 cKO マウスを用いて、Shh シグナルおよび PCM マーカー遺伝子の発現を調べた。これまでの研究から体幹後部形成に重要な因子としてヘッジホッグシグナルが知られている。しかし、Shh およびヘッジホッグシグナル活性化のインディケーター因子である Gli1 の発現は変化していなかった。PCM のマーカー因子である Tbx4 および Tbx5 の発現は、Is11Cre Bmp4 cKO マウスにおいて顕著に発現が低下していることがわかった。また、PCM における Bmp シグナルは、pSMADs の免疫染色の結果から低下していた。さらに、細胞増殖、細胞死を調べたが顕著な違いは見られなかった。よって、PCM の形成に Bmp シグナルが不可欠であること、また、体幹後部形成過程において細胞増殖や細胞死制御以外の新たなメカニズムの重要性が示唆され

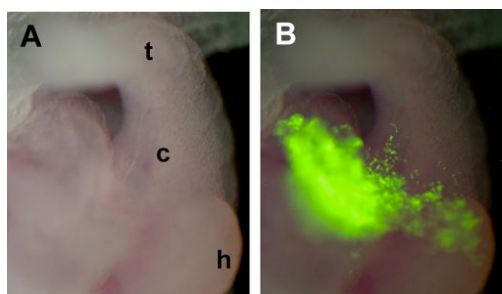


図 4 Is11merCremer Bmp4cKO/ROSA26Sor^{tm(EYFP)Cos/J} マウスを用いることにより、任意の発生時期における Is11 発現細胞を YFP で可視化することができる (B)。t:尾、c:泌尿生殖器原基、h:後肢原基

た。

(3) Bmp シグナルが低下したことにより体幹

後部の形成に関与する Is11 発現細胞の挙動への影響を調べるため、Is11cre Gt (ROSA) 26Sor^{tm1(EYFP)Cos} マウスを作成し (図 4)、ライブイメージングシステムを検討することができた。タイムラプスイメージングによる観察時間は現在の条件では数時間程度が限界であり、長時間観察可能な条件検討の必要性が残った。

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 10 件)

① Ipulan LA., Suzuki K., Sakamoto Y., Murashima A., Imai Y., Omori A., Nakagata N., Nishinakamura R., Valasek P., Yamada G. 査読有

Non-myocytic androgen receptor regulates the sexually dimorphic development of the embryonic bulbocavernosus muscle.

doi: 10.1210/en.2014-1008

Endocrinology. 155(7):2467-2479, 2014

② Miyagawa S., Harada M., Matsumaru D., Tanaka K., Inoue C., Nakahara C., Haraguchi R., Matsushita S., Suzuki K., Nakagata N., Ng RC., Akita K., Lui VC., Yamada G. 査読有

Disruption of the temporally regulated cloaca endodermal β -catenin signaling causes anorectal malformations.

doi: 10.1038/cdd.2014.21

Cell Death Differ. 21(6):990-997, 2014.

③ Kaku Y., Ohmori T., Kudo K., Fujimura S., Suzuki K., Evans SM., Kawakami Y., Nishinakamura R. 査読有

Islet1 Deletion Causes Kidney Agenesis and Hydronephrosis Resembling CAKUT.

doi: 10.1681/ASN.2012050528

J Am Soc Nephrol. 24(8):1242-1249, 2013.

④ Hojo H., Ohba S., Taniguchi K., Shirai M., Yano F., Saito T., Ikeda T., Nakajima K., Komiyama Y., Nakagata N., Suzuki K., Mishina Y., Yamada M., Konno T., Takato T., Kawaguchi H., Kambara H., Chung UI. 査読有

Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium.

doi: 10.1074/jbc.M112.409342

J Biol Chem. 288(14):9924-9932, 2013.

⑤ Mazahery AR., Suzuki K., Nagafuchi A., Miyajima M., Nakagata N., Orvis GD., Behringer RR., Yamada G. 査読有

Functional analysis of ectodermal β -catenin during external genitalia formation.

doi: 10.1111/cga.12001

Congenit Anom (Kyoto). 53(1):34-41, 2013.

⑥Nitta H., Wada Y., Kawano Y., Murakami Y., Irie A., Taniguchi K., Kikuchi K., Yamada G., Suzuki K., Honda J., Wilson-Morifuji M., Araki N., Eto M., Baba H., Imamura T. 査読有

Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a-receptor (CD88).

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1204

Clin Cancer Res. 19(8):2004-2013, 2013.

⑦Villacorte M, Suzuki K., Hirasawa A., Ohkawa Y., Suyama M., Maruyama T., Aoki D., Ogino Y., Miyagawa S., Terabayashi T., Tomooka Y., Nakagata N., Yamada G. 査読有
 β -Catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation.

doi: 10.1038/onc.2012.376

Oncogene. 32(29):3477-3482, 2013.

⑧Suzuki K., Adachi Y., Numata T., Nakada S., Yanagita M., Nakagata N., Evans SM., Graf D., Economides A., Haraguchi R., Moon AM., Yamada G. 査読有

Reduced BMP Signaling Results in Hindlimb Fusion with Lethal Pelvic/Urogenital Organ Aplasia: A New Mouse Model of Sirenomelia.

doi: 10.1371/journal.pone.0043453

PLoS One. 7(9):e43453, 2012.

⑨Haraguchi R., Matsumaru D., Nakagata N., Miyagawa S., Suzuki K., Kitazawa S., Yamada G. 査読有

The hedgehog signal induced modulation of bone morphogenetic protein signaling: an essential signaling relay for urinary tract morphogenesis.

doi: 10.1371/journal.pone.0042245

PLoS One. 7(7):e42245, 2012.

⑩Hojo H., Ohba S., Yano F., Saito T., Ikeda T., Nakajima K., Komiyama Y., Nakagata N., Suzuki K., Takato T., Kawaguchi H., Chung UI. 査読有

Glil protein participates in Hedgehog-mediated specification of osteoblast lineage during endochondral ossification.

doi: 10.1074/jbc.M112.347716

J Biol Chem. 287(21):17860-17869, 2012.

[学会発表] (計 2件)

①鈴木堅太郎、BMP シグナルは、四肢および泌尿生殖器を含む体幹後部形成に不可欠である

第 5 3 回日本先天異常学会学術集会、20130721-20130723

千里ライフサイエンスセンター

②鈴木堅太郎、アンドロゲンによる形態的性差を生み出す分子メカニズムの解明 ～マウス外生殖器発生をモデルとして～

第 4 回テストステロン研究会、2012

ホテルマロウド軽井沢

[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:

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

鈴木 堅太郎 (SUZUKI KENTARO)

和歌山県立医科大学先端医学研究所 講師

研究者番号: 20404345

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: