

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790195

研究課題名(和文) ヒト胎児の三次元イメージングおよびDNA解析を用いた先天異常の原因と予防法の探索

研究課題名(英文) Analyses of human embryos using three-dimensional imaging and DNA extraction

研究代表者

山田 重人 (Shigehito, Yamada)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80432384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：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所蔵されるヒト胚子・胎児を用いて、これまで行われていなかった三次元形態学的な観察を、新しいイメージング方法(位相X線CT)を用いて行った。また、最新の高解像度MRIを用いたイメージングを胎児期初期に応用し、詳細な画像データを得ることができた。これらによって得られたデータの解析により、胚子期・胎児期早期の形態形成の詳細な理解が可能となった。疫学データのデータベース化はほぼ完了し、遺伝学的な解析についても一定量の核酸の抽出が可能となり、形態学的・疫学的・遺伝学的情報が有機的に連動した世界に例をみない胎児データベースの作成が期待される。

研究成果の概要(英文)：The human embryos samples derived from the Kyoto Collection of Human Embryos were imaged in several imaging modalities such as phase-contrast X-ray computed tomography (PXCT) and magnetic resonance microscopy (MRM). Fine images were obtained by human embryos ranging from Carnegie stage (CS) 13 to 23, and by human fetuses in early fetal period before 22 weeks of gestation. Epidemiological data associated with the human embryos and fetuses were digitized, and genetic information from old samples preserved in formalin solution for several decades were also extracted. Using these results, a new type of database was expected including morphological, epidemiological and genetic data to elucidate the mechanism of normal development and pathogenesis of congenital anomalies in humans.

研究分野：解剖学

キーワード：解剖学 発生学 画像解剖学 X線イメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒトのサンプルを用い遺伝子配列や塩基多型を明らかにする解析は、データの取り扱いや解析に対する倫理的な制約が大きく、特に胎児期の先天奇形や疾患の原因因子の探索や、正常個体を含めた大規模な疫学的解析は困難である。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では、1961年以来、ヒト初期胚および胎盤組織を多数収集しており、Kyoto Collection of Human Embryos, 「京都コレクション」と呼ばれている。現在に至るまで、主として形態学的な解析に供されてきた。サンプル数は40000例を超え、世界一の標本数を誇り、また世界で唯一利用可能なヒト初期胚のリソースとして国内外の研究室から注目を集めている。これまでに、詳細な外表の観察を行い、妊娠初期子宮内集団では外表奇形の頻度が高いことを明らかにしてきた(引用文献)。胎児標本収集時に、母体情報を同時に記録していることも特徴であるが、データベース化がなされていなかったこともあり、形態学的な異常と疫学的背景を合わせた解析はされてこなかった。また、サンプルはホルマリン及びブアン固定液中で長期保存されており、遺伝学的、分子生物学的解析は不可能であると考えられていた。

2. 研究の目的

ヒト発生が3次元的にダイナミックに変化していくものであるのに対し、組織切片を用いたヒト胚子解析は2次元的なものであり、3次元解析については、その技術的な問題から、ほとんど行われていなかった。代表者らは京都コレクションを用いて、組織切片からの3次元立体構築によるヒトの初期発生のメカニズムの解析を行ってきた(引用文献)。しかし、この方法は、2次元データの位置合わせ(Registration)に多大の労力と時間が必要であり、またかなりの熟練を必要とした。そこで、微小な胚の3次元イメージング法の開発を進めることとなった。以前の研究(課題番号:24790195)において代表者は新しいマイクロイメージング技術(EFIC法)をヒト胚子に応用して三次元可視化および定量的な観察を行い成果を上げたが、EFIC法では標本をスライスしながら撮像を行うことから、貴重なヒト胚サンプルで大量の撮像を行うには不向きであった。代表者らは従来よりMRIの技術を用いたMRマイクロコピー(MRM)を取り入れて2005年~2010年の大型プロジェクト(科学技術振興機構(JST)バイオインフォマティクス推進事業「ヒト胚の形態発生に関する三次元データベース」として1,200体の正常ヒト胚子の撮像を行い、胚子期後期の標本では十分な解像度を得て解析が可能であったが、胚子期前期~中期の微小な胚では十分な解像度が得られなかった。今回、非破壊的な新しいイメージング技術として、位相X線

イメージング(Phase-contrast X-ray Computed Tomography, PXCT)を取り入れ、詳細な画像の撮像および解析を行うことを計画した。このPXCTを用いて撮像を行えば、ヒト胚子発生初期の詳細な形態学的解析が実現し、胚子期における先天異常の実態に近づくことが可能となる。

また近年、小児の発達障害の研究が進んでおり、その原因を胎児期にみる見解があるが、胎児期の脳研究はサンプル入手の難しさから、ほとんど進展がない。京都コレクションには胎児期の標本も一定数所有しており、これらを画像解析に供することができれば、神経研究に資するデータが得られると期待される。そこで、MRIによる撮像、特に拡散テンソルイメージングの可能性検討することとした。

近年の分子生物学的手法の発達により、比較的保存状態の悪いサンプルからでもDNA抽出が可能であることが報告されている。当センターにおける予備実験において、40年を経過したホルマリン保存サンプルから抽出したDNA断片において、PCRを施行しシークエンスを行うことが可能であることが示された。そこで、これらのサンプルに最適化した抽出プロトコルを確立し、塩基多型や染色体異常について網羅的な解析を行うことで、妊娠初期子宮内の遺伝子情報を得ようとすることを目標として研究を計画することとした。

以上の計画から得られる様々な形態学的情報、遺伝学的情報、さらに標本に付随する疫学的情報を統合して解析することが可能なように、データベース化することを目指し、統合データベースのプロトタイプを作成することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 疫学データベースの構築

本胎児集団のデータは、紙ベースで記録されているため、デジタル化・データベース化を行う。胎児の外表の診断データおよび母体の服薬・疾患・喫煙飲酒歴などの詳細なデータについてデジタル化を行う。オリジナルの紙情報についても、PDF化しデータベースから参照可能にする。

(2) 位相X線イメージング(Phase-contrast X-ray Computed Tomography, PXCT)のヒト胚子への応用

PXCTは、従来の撮像法に比べて感度が約1000倍高い、新しいイメージング技術である(引用文献)。2011年現在で、9 μ m/pixelという、非破壊的三次元イメージング法では世界最高の解像度を達成している。PXCTをヒト胚子に応用するにあたり、実験動物の標本を用いて試験撮像を行い、撮像条件を検討する。その後、実際にヒト胚子を用いた撮像を、100例を目標として行う。

(3) MRIを用いた胎児標本の撮像

MRI臨床機でも、胎児期という通常の撮

像対象より小さい標本の撮像が可能となっている。通常のMP-RAGE (T1強調画像に相当)やT2画像に加え、今回は拡散テンソルイメージングの可能性について検討した。

(4) 古標本からの核酸抽出法の開発

豊富で利用可能なヒト胚子サンプル群を活かし、安定してこれらのサンプルからゲノムDNAを抽出できるプロトコルの確立を目指す。これまでのプロトコルやキットは一般的な試料を対象に確立されたもので、本課題のサンプルにそのまま適応することは難しい。そこで、洗浄条件、酵素などによる組織の分解条件、精製条件(カラムなど)を検討し、より多くのゲノムDNAを安定して得られるプロトコルを確立する。

4. 研究成果

(1) 疫学データベースの構築

本胎児集団のデータは、紙ベースで記録されているため、デジタル化・データベース化を行うものである。汎用ソフトを利用した参照性の高いデータベーステンプレートを作成し、胎児の外表の診断データおよび母体の服薬・疾患・喫煙飲酒歴などの詳細なデータについてデジタル化を行った。またオリジナルの紙情報についても、PDF化しデータベースから参照可能となった。検索システムを導入し、先天異常ごとの検索などが可能となった。

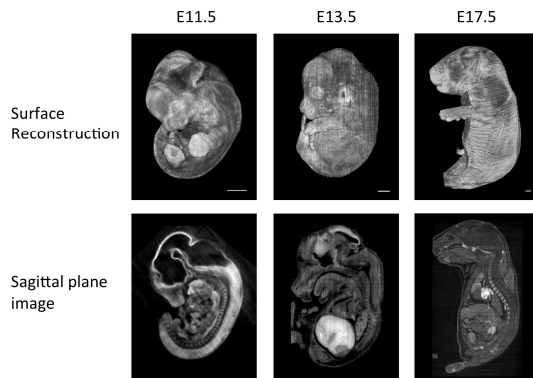
(2) 位相X線イメージング(Phase-contrast X-ray Computed Tomography, PXCT)を用いた高解像度高速撮像法の確立とその画像を用いた画像診断

共同利用研究施設である高エネルギー加速器研究機構(つくば市)で開発中の位相X線顕微鏡を用い、まず実験動物での試験撮像を行い、安定した画像を得た(図1)。得られた撮像プロトコルを元に、ヒト胚子での撮像を開始した。マシントラブルにより、平成26年度前期に撮像時間が全く得られないという事態も起こったが、3年間で97サンプルの撮像を行い、目標の100例をほぼ達成できた。解析については、解析しやすい腹部内臓(肝臓)から行っており、以前に作成したMRI画像データベースから抽出した異常疑い症例を優先してPXCT撮像を行い、画像解析を行った(図2)。肝臓サイズについて詳細な計測を行い検討したところ、外見正常と思われる症例の中に一定程度の異常症例が含まれることが明らかとなった。結果については論文投稿中である。顎顔面領域についても解析を行い、耳管に並行する口蓋帆挙筋の胎児期の位置関係について初めて三次元画像化を行うことができた(図3)。口蓋帆挙筋および支配神経についての知見を現在論文投稿中である。

以上のように、新しい撮像技術PXCTについて、発生学領域への応用を確立した。今後は症例数を増やし、さらに各臓器ごとの解

析を行うとともに、画像データベース化を行う予定である。

図1 マウス胎子のPXCT画像。上段:表



面再構成、下段:矢状断面像。各発生段階において鮮明な像が得られている。

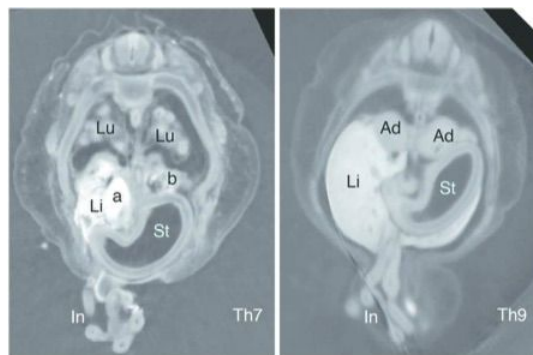
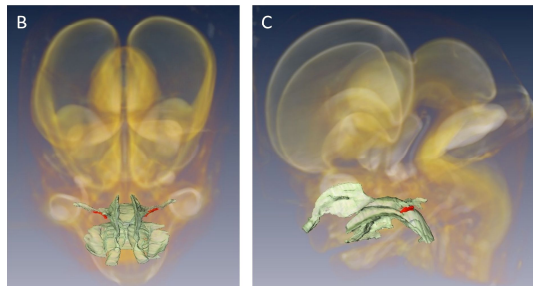


図2 妊娠8週ヒト胚子の肝臓が最大となる高さでの断面像。肝臓(Li)の大きさを見ると、左は異常に小さいことがわかる。右は



正常。図3 妊娠9週ヒト胚子のPXCT冠状断面像(A)および三次元再構成像(B、C)。矢印(A)および赤い構造物(B、C)が口蓋帆挙筋である。

(3) MRIを用いた胎児標本の撮像

本研究では、胎児期中枢神経系の画像化にも積極的に取り組んだ。3 T臨床用MRIを用いて、従来のT1・T2強調画像に加え、拡散テンソルイメージングが可能となれば、胎児期の神経線維の発達を観察可能となり、脳発達研究に資することが期待される。拡散テンソルイメージングは水分子の方向性を見ているものであり、T2が十分に取得することが必要条件である。長期ホルマリン浸漬標本でのMRI撮像は、T1強調画像で良好な像が得られるが、水分子の量の関係からT2強調画像では良好な像は得られないことは広く知られていた。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)によりホルマリンを置換する工程を加えることで、T2信号が大きく改善した画像を取得することができ、拡散テンソルイメージングの実現に大きく近づいた。今後も条件検討を加え、より鮮明な画像の取得に努める予定である。

(4) 古標本からの核酸抽出法の開発

試験試料を用いて実際の抽出プロトコルの開発を行った。当初は殆ど収量が得られなかったが、抽出方法の工夫により、少量ではあるが一定量の核酸の抽出が可能となった。遺伝子解析の可能性のあるデータが得られたため、論文作成中である。

<引用文献>

Nishimura, H., et al. *Teratology*. 1968 Aug;1(3):281-90.

Matsunaga and Shiota, *Teratology*. 1977 Dec;16(3):261-72.

Yamada et al., *Anat Rec (Hoboken)*. 2007 Mar;290(3):259-67.

Yoneyama et al., In: *Advanced Biomedical Engineering / Book 2* (Edited by: Gaetano D. Gargiulo, Co-editor: Alistair McEwan); 107-128. InTech, August, 2011

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14件)

Tsuchiya M, Yamada S. High-resolution histological 3D-imaging: Episcopic Fluorescence Image Capture (EFIC) is widely applied for experimental animals. *Cong Anom*, 2014 Nov;54(4):250-1. doi: 10.1111/cga.12057. Yoneyama A, Nambu A, Ueda K, Yamada S, Takeya S, Hyodo K, Takeda T. Phase-contrast X-ray imaging system with sub-mg/cm³ density resolution. *Journal of Physics Conference Series* 03/2013; 425(19):192007. DOI:10.1088/1742-6596/425/19/192007 Sakai T, Hirata S, Fuwa K, Sugama K, Kusunoki K, Makishima H, Eguchi T, Yamada S, Ogihara N, Takeshita H.

Fetal brain development in chimpanzees versus humans. *Current Biology* 2012 Sep 25;22(18):R791-2. Doi: 10.1016/j.cub.2012.06.062.

[学会発表](計36件)

釜谷美翔子、山本憲、宮崎玲菜、巻島美幸、岡田知久、富樫かおり、山田重人「ホルマリン保存ヒト胎児を用いたMRI撮像の試み」第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015年3月21-23日、於：神戸国際会議場

岸本英明、山田重人、勝部元紀、益岡弘、河合勝也、鈴木茂彦「口蓋帆挙筋の発生についての研究～耳管機能との関わりも含めて～」第32回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 2014年11月6-7日 於：大阪

岸本英明、山田重人、益岡弘、河合勝也、鈴木茂彦「口蓋帆挙筋の神経支配についての考察」第38回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2014年5月29-30日 於：札幌

Yamada S, Kanahashi T, Kishimoto H, Takakuwa T, Takeda T, Hyodo K. 「The first application of phase-contrast X-ray computed tomography to human embryology」*Biology and Synchrotron Radiation 2013(BSR)* 2013年9月8-11日、於：ハンブルグ

山田重人、亀田知美 「『ヒト胚子先天異常・画像データベース』の構築と応用」第64回日本産科婦人科学会 2012年4月13日～15日 於：神戸

[図書](計1件)

ten Donkelaar HJ, Yamada S, Shiota K, van der Vliet T. Chapter 1: Overview of the Development of the Human Brain and Spinal Cord. In: *Clinical Neuroembryology*, 2nd ed. Edited by ten Donkelaar/Lammens/Hori. Springer, Heidelberg-Dordrecht-London-New York. July, 2014. 659pages (pp1-52)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

URL: <http://www.cac.med.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田重人(YAMADA, Shigehito)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80432384

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

今井 宏彦 (IMAI, Hirohiko)

巻島 美幸 (MAKISHIMA, Haruyuki)

高桑 徹也 (TAKAKUWA, Tetsuya)

米山 明男 (YONEYAMA, AKio)