

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660246

研究課題名(和文)記憶する腸-屈曲のストーリー

研究課題名(英文)Mechanism of intestinal flexure

研究代表者

昆 泰寛 (KON, Yasuhiro)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：10178402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：消化管の屈曲・迂曲は種および個体間で部分的に共通しており、その解明は消化生理および消化管病理の理解に役立つ。そこで、マウスの十二指腸空腸曲(DJF)の形成過程を発生学的に追跡し、1)膨化期、屈曲形成期、屈曲伸長期に分類されること、2)背側腸間膜はDJFの屈曲形成に関与しないこと、3)DJFの屈曲に神経因子が何らかの関与をしていることを明らかにした。

今後は、神経の関与を詳細に検討していくことで、動物に固有の腸管構造の成り立ちを明らかにできる。

研究成果の概要(英文)：The gastrointestinal flexure is common among individuals including many animal species. Their research helps us to understand digestive physiology and gastrointestinal pathology. In the present, duodenojejunal flexure (DJF) in mice were investigated as a model, summarizing the following, 1) the formation process was divided into expansion, early flexure and late flexure periods, 2) dorsal mesentery was not associated to DJF formation, and 3) some neural elements were important for DJF formation.

The author can clarify the mechanism of gastrointestinal flexure in individual animal species by using analysis of neural elements.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：十二指腸空腸曲 発生学 マウス

1. 研究開始当初の背景

消化管の形態発生：マウスの消化管は内胚葉の前腸ポケットとして胎齢7日頃より発生し、胎齢9日には前腸、中腸および後腸の1本の連続した管が形成される。その後、消化管走行の大きな変化=「消化管の屈曲・迂曲」が起こる(近藤、走査電顕アトラス マウスの発生、2003;谷口ら監修、獣医発生学、2008)。

発生に関わる遺伝子発現：発生学に関わる重要な因子として、Hedgehog family, Fgf family, Wnt family, Tgf- β superfamily, Transcription factor family などがある。これらは種を超えて相同性を持つ点、ほぼ総ての発生過程に少なからず関連している点で最重要因子群である(Freeman & Gurdon, Ann Rev Cell Develop Biol, 2002)。内胚葉を規定する遺伝子経路として Activin, Bmp, Fgf 経路が古くから知られ、その破綻は初期胚で致死的となる(Xu et al, Mech Develop, 2011)。その後、Hox 遺伝子や Fgf シグナルなど内胚葉の前後軸に関連する遺伝子群が順に発現し、前腸・中腸・後腸が作られる(Lemaire & Kessel, Mech Develop, 1997; Dessimoz et al, Mech Develop, 2006)。さらに部位を決定する遺伝子群、例えば Sox17 は胆嚢や胆管形成に関与し(Matsui et al, J Cell Sci, 2006)、Nkx2.1 は呼吸器系形成に関与する(Kumar et al, Adv Clin Chem, 2005)。また、膵臓には Pdx-1 が、膵内分泌系には NeuroD が関与するなど、現代の発生学は形態形成を遺伝子発現で理解できる時代である。腸管の部位および組織的特徴など詳細な遺伝子発現カスケードが報告されている(Fukuda & Yasugi, Develop Growth Differ, 2005)。しかし、成体の消化生理に深く関連すると考えられる腸管の屈曲・迂曲に関わる遺伝子群の探索はなされていない。

2. 研究の目的

着想に至った経緯：消化管の屈曲・迂曲は種および個体間で部分的に共通しており、その形態形成には遺伝子発現制御が関与すると考えられる。その解明は、基礎獣医学・畜産学の分野において動物種を超えた消化生理および消化管病理の理解に役立つ。本研究では、後述する仮説に則り、左右軸決定因子群、臓器サイズ制御系因子群、神経シグナル・ニューロカイン因子群について遺伝子発現差解析を行い、関与を見出すことを当初の目的とした。

予想される結果と意義：一見無秩序に見える腸管走行に遺伝子の関与を想定している点に学術的特色を有する。予想される結果としてサイトケラチンやアクトミオシンといった細胞骨格に関連する因子群の発現差が検出されると考えられるが、本研究ではあえてそれらを含んだ網羅的解析は実施せず、より上流のシグナルあるいは関連細胞群を発見する点に独創性を有する。それらの発見は腫瘍医療および再生医療など臨床的応用が

期待されるばかりでなく、動物種特有の腸管走行(ウマの重複結腸、ウシの円盤結腸など)の形成過程を遺伝子発現で理解する上で重要である。

3. 研究の方法

① 解析部位の決定

材料として、C57BL/6 マウスの生後個体(生後0日~50日)および胎子(胎齢9.0~13.0日)を用いた。安楽殺後ピンセット等によるダメージを最小限とするため、生後個体は剥皮後に、胎子はそのまま4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、胃以下の消化管を注意深く摘出して肉眼または実体顕微鏡下でその走行を観察・スケッチ・写真撮影した。「曲がる」部位について個体毎に数値化し、総ての個体で共通する箇所を明確化した。数値化の方法として腸管内腔中点を結んだ疑似曲線解析、部位別腸管径・角度変化、腸間膜屈曲度等を数値化した。後述するが、これらの解析の結果、最も解析に都合のよい部位として十二指腸空腸曲(DJF)の存在を明らかにした。

② 一般形態解析

上述した材料を脱水後、パラフィン包埋を施した。材料があまりに小さい場合、パラフィン包埋過程で散逸する危険性が高い。その場合はあらかじめゲルに材料を埋め込んだ後にパラフィン包埋するなどの、工夫をこらした。切片作製についても、慎重に体軸ならびに腸管軸との関連を考慮しながら、最も研究遂行に都合のよいと結論づけた DJF について、集中的に連続切片を作製した。

当該切片に対して、ヘマトキシリン・エオシン染色の他、PAS 染色、各種レクチン染色、上皮接着因子群・細胞骨格系・増殖因子群の免疫染色を行った。(レクチン染色は糖鎖検出による腸管機能の活性度合いを図る目的で行う予定であったが、期間中には実施せず、今後の検討事項となった)。染色標本から陽性度を数値化し、屈曲・迂曲部と直部とで比較した。後述するが、これらの解析の結果、DJF を膨化期、屈曲形成期、屈曲伸長期に分けて検討することとした。

上述した染色は主に上皮組織をターゲットとして検討する予定で計画したが、研究の発展性を見図るため、腸管固有層・筋層および神経叢(神経細胞)を対象とした染色法も行った。固有層解析にはビメンチン、ラミニン、フィブロネクチン、s100 蛋白を用いた。筋層解析にはアクチン、ミオシン、デスミンを用いた。神経叢(神経細胞)解析にはVIP、ニューロテンシン、カテコールアミン系などの他、神経堤細胞のマーカーを解析した。

これらの解析から、屈曲部と直部とで決定的に異なる因子群を見定めた。

③ 遺伝子解析

左右軸決定因子群として Pitx2 関連の Hox

遺伝子カスケードの活性化が予想される。また、臓器サイズ制御系因子群として細胞周期促進因子 Yorkie カスケードの変動、ニューロカインとして netrin-slit 発現系の亢進が予想される。本実験系ではレチノイド経路及びヘッジホッグ経路関連遺伝子群の発現を明らかにするため、RT-PCR ならびに in situ ハイブリダイゼーション法を行った。とくに in situ ハイブリダイゼーション法については、whole-mount 標本で実施した。

④ 電子顕微鏡解析

腸管屈曲は、細胞同士の連結と細胞骨格と配置によって全体として曲がるのが考えられる。そこで、超微形態的な変化を観察するため、電子顕微鏡的な処置を施した。すなわち、屈曲形成直後である、胎齢 11.25 日の十二指腸空腸曲を採取し、グルタル・オスミウムの 2 重固定後、屈曲内外側に分けて電顕試料を作製し、主として細胞間接着装置の数と長さについて計測した。

⑤ 細胞外マトリックス解析

細胞の集積、分化などは細胞外マトリックスの性状によって大きく変化することが知られている。そこで、屈曲前後における細胞外マトリックスについて、アルシアンブルー染色、ラミニン免疫染色、フィブロネクチン免疫染色、コラーゲン I 免疫染色で屈曲内外側の差を比較検討した。

⑥ 他動物における屈曲形成解析

屈曲解析をさらに他動物でも解析するため、ブタ胎子ならびに新生犢について検討した。

4. 研究成果

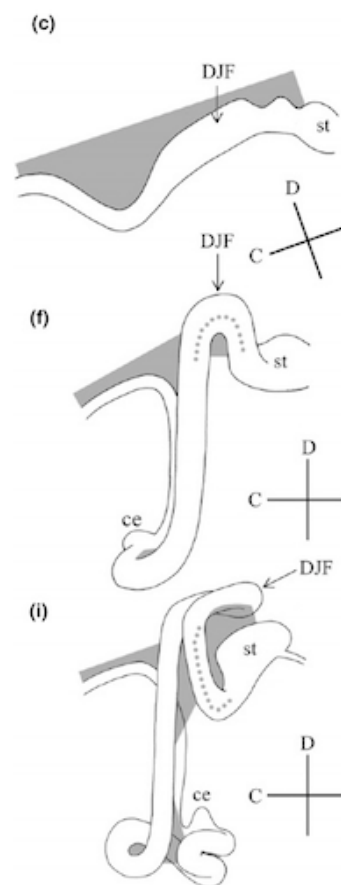
① 解析部位の決定

マウス成体ならびに胎子期における腸管屈曲をトレースし、どの齢においても共通して「曲がる」部位を特定した。その結果、生後では一定した結果を得ることができなかった。おそらく、生後の腸管屈曲は、食性の個体差が大きく関与しているものと考えられた。その中でも、とくに共通して屈曲している箇所として十二指腸空腸曲 (duodenojejunal flexure: DJF) が選択された。

次に、胎子期における DJF の共通性について検討した。DJF は、観察した総てのマウス胎子で検出されたことより、共通性の高い屈曲部位であることが明らかとなった。胎子期 DJF はその形成過程から順に膨化期、屈曲形成期、屈曲伸長期に分類された。膨化期では、腸管径が増加し屈曲は認められなかったが、腸管壁の左右領域は背腹領域よりも活発に細胞増殖を示した。屈曲形成期では、DJF は腸管前後軸に沿って 90° 半時計回りに回転していた。屈曲外側の腸壁は内側よりも細胞増殖が活発だった。屈曲伸長期の DJF は胃の

後方を包圍していた。観察期間を通じて、背側腸間膜の屈曲形成への関与は認められなかった (図 1)。

図 1



(c) 膨化期、(f) 屈曲形成期、(i) 屈曲伸長期
公表論文から転載 (Onouchi et al., J. Anat., 2013, 223, pp385-398)

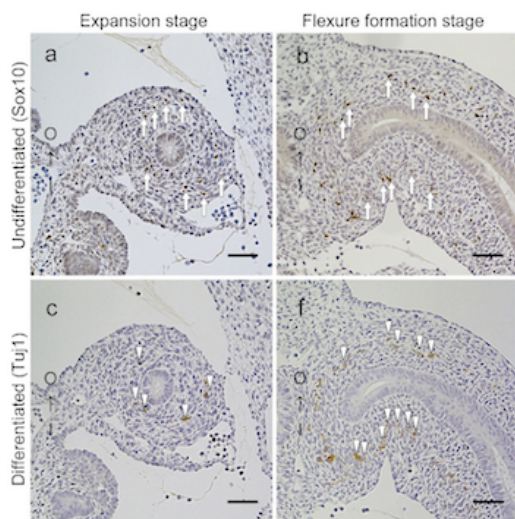
② 一般的な染色態度

ヘマトキシリン・エオシン染色標本で、膨化期における左右差について検討した。その結果、左側で細胞核の密集が見られた。BrdU をあらかじめ注入し、細胞内への取り込み状況から細胞増殖の違いを観察した。その結果、左側の間葉組織で有為な細胞増殖が観察された。屈曲形成期では、屈曲内外側の壁厚を計測した結果、内側で有為に厚かった。とくに中皮細胞は内側では立方状を呈し、外側では扁平であった。BrdU 注入実験では、外側間葉での細胞増殖が顕著だった。しかし、上皮細胞の増殖率には内外側で違いは見られなかった。以上の所見から、屈曲外側において細胞が積極的に増殖することで、DJF が「曲がる」こと、さらにそれは膨化期ですでに前兆が見られるという結果が得られた。

免疫染色で、E-cadherin は、重層立方状の上皮の細胞間に、網状の陽性反応を示した。膨化期、屈曲形成期を通じて、屈曲内外側上皮の陽性反応の差は認められなかった。α

SMA は輪筋層に陽性を示していたが、縦筋層は陰性であった。屈曲内外側で陽性度合い、陽性細胞数に著変は認められなかった。Vimentin は間葉系細胞に広く陽性を示すことが知られているが、平滑筋層を挟んで浅層ならびに深層に網状の陽性が認められたが、屈曲内外側では大きな違いは観察されなかった。Tuj1 は平滑筋層の外層にほぼ1列に陽性反応が観察されたため、いわゆる筋層間神経叢の部位に反応が認められることがわかった。同部位には Sox10 ならびに p75 も陽性を示した。驚くことに、Sox10 ならびに p75 は、屈曲内外側で陽性細胞数に違いは認められなかったが、Tuj1 は屈曲内側で多く、外側で少なかった。Sox10 ならびに p75 は神経堤細胞のマーカであるのに対し、Tuj1 はより分化した神経細胞のマーカである。このことから、腸管の屈曲形成に神経の分化が深く関連することが明らかとなった (図 2)。

図 2



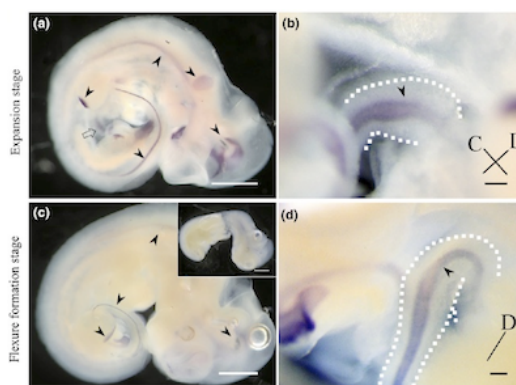
a 膨化期 Sox10 陽性細胞、b 屈曲形成期 Sox10 陽性細胞、c 膨化期 Tuj1 陽性細胞、d 屈曲形成期 Tuj1 陽性細胞. 公表論文から掲載 (Onouchi et al., Cell Tissue Res., 2015, in press)

③ 遺伝子解析

DJF の屈曲に影響を与えると考えられる 11 種の遺伝子について、屈曲内外側の発現差を解析した。その結果、複数の遺伝子で、屈曲前から顕著な差のあることがわかった。とくに興味深いレチノイド経路及びヘッジホッグ経路関連遺伝子については、whole-mount in situ hybridization 法を行った。その結果、それらが屈曲軸に沿った発現勾配を示し、両発現は DJF 形成部位に検出された (図 3)。

以上の観察から、DJF が腸管屈曲を研究するための有効な部位であることがさらに示された。

図 3



(a) (b) 膨化期、(c) (d) 屈曲形成期のソニックヘッジホッグ in situ hybridization. 公表論文から転載 (Onouchi et al., J. Anat., 2013, 223, pp385-398)

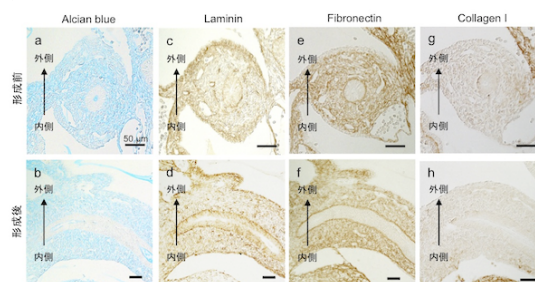
④ 電顕的観察

超微形態的観察では、とくに間葉系細胞における接着複合体の数ならびに平均長を中心に計測をおこなった。その結果、屈曲内側では外側に比較して、細胞が縦に配列し、接着複合体の数は少ないが、平均長は長いことがわかった。また、細胞間隙が外側で有為に広がっていた。

⑤ 細胞外マトリックス解析

アルシアンブルー (pH1.0) では、屈曲形成期外側で濃密に細胞外マトリックスが集積していたが、アルシアンブルー (pH2.5) では、屈曲形成前外側に集積していた。ラミニンは、屈曲形成前外側で強陽性であったが、屈曲形成後は内外側差が消失した。フィブロネクチンおよびコラーゲン I は、屈曲形成後で内側に強かった (図 4)。これらの所見は、屈曲形成に影響する細胞外マトリックスの重要性を示すものと注目している。

図 4



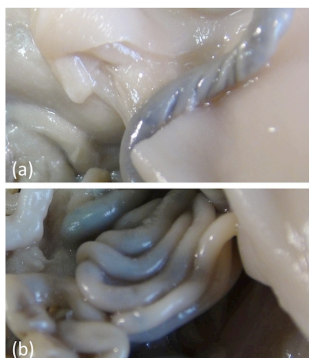
細胞外マトリックスの染色結果

⑥ 他動物における腸管屈曲解析

動物種特有の腸管走行 (ウマの重複結腸、ウシの円盤結腸など) に今回の研究成果を応用する試みとして、ブタ結腸ならびにウシ第三胃の解析を行った (図 5)。しかし、研究の実施期間中には明確な所見を得ることができなかった。マウスの研究結果から、神経堤

細胞の分布が腸管屈曲に大きく影響することが伺え、今後もその研究を続行する予定である。

図 5



ブタ胎子腸管 (a) よじれの形成、(b) 円錐結腸の形成.

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) Onouchi, S., Ichii, O., Otsuka-Kanazawa, S. and Kon, Y. 2015. Asymmetric morphology of the cells comprising the inner and outer bending sides of the murine duodenojejunal flexure. *Cell Tissue Res.*, (in press) <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00441-014-2091-6>. (査読有り)
- 2) Onouchi, S., Ichii, O., Otsuka, S., Hashimoto, Y. and Kon, Y. 2013. Analysis of duodenojejunal flexure formation in mice: implications for understanding the genetic basis for gastrointestinal morphology in mammals. *J. Anat.*, 223(4): 385-398. doi: 10.1111/joa.12093. (査読有り)

[学会発表] (計 21 件)

- 1) Onouchi, S., Ichii, O., Otsuka-Kanazawa, S. and Kon, Y. Spatiotemporal distribution of the extracellular matrix in the fetal mouse duodenojejunal flexure. The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2015. 2. 12-13. Bali (Indonesia).
- 2) 尾之内佐和、市居 修、大塚沙織、昆 泰寛 マウス十二指腸空腸曲における屈曲内一外側の形態的差異. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014 年 9 月 9 日. 北海道大学 (北海道・札幌市).
- 3) 尾之内佐和、市居 修、大塚沙織、昆 泰寛 マウスにおける十二指腸空腸曲形成機序の解析. 第 59 回日本解剖学会東北・北

海道連合支部学術集会 2013 年 9 月 14 日.
北海道大学 (北海道・札幌市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

昆 泰寛 (KON, Yasuhiro)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号: 10178402