

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670701

研究課題名(和文) 泌尿器系の器官・組織形成異常の形成機構の解明と治療・予防法の開発

研究課題名(英文) Morphological and experimental analyses of organogenesis and histogenesis of the urinary organs

研究代表者

大谷 浩(Otani, Hiroki)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：20160533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎・尿路系の正常・異常な発生過程に関して、遺伝子改変動物、子宮外発生法、組織計測と数理解析などを用いて、収斂伸張や上皮幹細胞増殖調節などによる尿管上皮の伸長など器官形成、ならびにネフロン数調節などの組織形成の機構を解析した。器官形成について、尿管の伸長に収斂伸長機構が寄与すること、尿管上皮幹細胞数の増加にinterkinetic nuclear migrationが関与すること、尿管・腎臓の発生におけるWnt5a/Ror2シグナルの役割などを明らかにした。組織形成について、子宮外発生法により胎生期にACTH産生細胞を生着させ、生後の影響について成熟期に至ったマウスの臓器標本を解析中である。

研究成果の概要(英文)：Normal and abnormal prenatal development of the urinary organs were analyzed using embryos of genetically modified mice, embryo manipulation, histomorphometric and mathematical methods, with special focus on the organogenesis including ureter elongation and the histogenesis including the total nephron number.

Regarding the organogenesis, it was elucidated that the ureter elongation involves convergent extension mechanism, that interkinetic nuclear migration plays a role in the epithelial cell proliferation, and that Wnt5a/Ror2 signaling plays roles in the development of the ureter and kidney. Regarding the histogenesis, ACTH producing pituitary tumor cell line AtT20 cells were transplanted into mouse embryos by using the exo utero development system, and the organs including the kidney of the resultant adult mice with the introduced tumor cells have been harvested and now are under histological analysis. This experimental system will be useful in the analysis of other organ system.

研究分野：発生学

キーワード：先天異常 泌尿器 器官形成 組織形成

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓と尿管にはいろいろな形や位置の異常がかなり高い頻度で起こることが知られています。また腎臓は、顕微鏡で見える大きさのろ過器(腎小体)とろ過された原尿から必要なものを再吸収する細い管(尿細管)からなる機能・構造的な単位(ネフロン)が、莫大な数集まってできています。したがって、そのネフロンの総数は腎臓の大きさに直接比例しますが、そのネフロンの総数には、2倍以上もの大きな個人差があることがわかっています。

しかし、腎臓と尿管の位置や形づくり(器官形成)のメカニズム、ならびに腎臓のネフロンの総数、したがって腎機能の(予備能を含む)総量が決定される組織形成のメカニズムは、いまだ詳しくわかっていません。出生時体重が軽い児の腎臓は小さく、それが将来の腎臓病発症の素因となることなども明らかになってきており、腎臓の形や位置のみならず、大きさについても形成機構を解明する必要があります。

また、肺や膵臓など生命を支える他の「実質臓器」についても、基本的に腎臓と同様に、位置、形に加えて大きさが決まるメカニズムについて多くの課題が残されていて、これらの臓器に共通した、あるいは個々の臓器に特徴的な形成機構を解析する方法論を開発することは、これらの研究の進展にとっても重要です。

## 2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、腎と尿路からなる泌尿器系の位置や形づくり(器官形成)のメカニズムおよび腎と尿路の奇形との関係、ならびに腎機能の(予備能を含む)総量に直結する腎臓のネフロンの総数(腎臓の大きさ)が決定される組織形成のメカニズムを、マウス胚子腎臓および尿管の組織標本の詳細な観察や、遺伝子改変マウスならびに子宮外発生法という実験的な方法(下段参照)などを用いて解析しました。また解析の結果得られた情報を、数理解析なども加えて個体全体の中で詳しく解析することにより明らかにすることを目的としました。

(2) さらに本研究を通して、泌尿器系のみならず、同様に分岐型の組織形成過程を示す肺と気管・気管支、膵臓・肝臓と導管などの臓器系の器官形成および組織形成についての簡便かつ自由度の高い個体レベルでの解析法、ならびに治療・予防法の開発のための実験と解析の系を開発することも目的としました。

## 3. 研究の方法

(1) 腎と尿管の位置・形・大きさに関する形態学・組織計測的な解析

まず腎臓が骨盤位から腹腔へ上昇するのに伴って尿管が伸長する時期に、基本となる尿管を形成する幹細胞の増殖を調節する

メカニズムについて、BrdU, あるいは EdU という核酸類似体を妊娠マウスに投与し、それを取り込んだ胚の尿管上皮の細胞核の位置が頂表面と基底面をつなぐ頂底軸に沿って変化する様子を、時間を追って調べることにより、神経管などで証明されている interkinetic nuclear migration (INM) と呼ばれるのと類似の幹細胞増殖機構が尿管で働いているか調べました。

また、実験的な研究における比較の基準となる腎臓を含む臓器の大きさの胎生期における正常な成長パターンについて数学的な手法をもちいて解析しました。

(2) 関連する分子の発現と機能の解析 Wnt ファミリーなど上皮管腔構造の伸長・分岐に関わる分子や、上記(1)の細胞増殖の調節機構との密接な関係が示唆されている一次線毛を走査型電子顕微鏡で観察し、その構成タンパクの発現を、免疫組織化学により観察しました。

(3) 遺伝子改変動物による解析

発生過程で様々な臓器の形づくりに関わることが報告されている Wnt5a とその受容体 Ror2 の、腎臓・尿管の発生過程における機能を、Ror2 ノックアウト(KO)マウス胚における尿管・腎臓の異常を野生型マウス胚と比較して、主に形態学的に解析しました。

(4) 子宮外発生法による解析

子宮外発生法は、発生過程における分子の機能を胚・胎児の個体全体の中で解析する実験手法の一つで、報告されていた原法を当教室で種々の改善を加えて、本研究に用いました。妊娠中・後期のマウス母獣を麻酔下に、子宮壁の層を切開し、胎膜に包まれた状態の胎仔に実験操作を行った後閉腹し、腹腔内(子宮外)で発生を継続させる方法です。この方法では、胎盤・臍帯などは無傷のままなので、母胎間の胎盤を介した栄養は保たれます。

マウス胎児の「上昇」中の腎臓周囲に上皮細胞の増殖等に関連する分子を単独または組み合わせにより注入し、その効果を解析しました。

組織形成メカニズムに関して、これまでに当教室で膵臓、腎臓、卵巣などの組織形成に影響を及ぼすことを報告している副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を産生・分泌する下垂体腫瘍細胞株 AtT20 細胞を、ネフロン形成が進行する胎生中・後期に注入し、ネフロン数への効果を含む組織形成への効果を検討し、さらに出生後の腎機能、血圧等への影響を対照群と比較検討しました。

## 4. 研究成果

(1) 腎臓と尿管が形作られるメカニズム 腎臓が骨盤位から「上昇する」現象は、腎臓・尿管の位置・形づくりに重要ですが、そのメカニズムはいまだに不明です。本研究により、まず尿管上皮を構成する上皮幹

細胞の総数と長さを計測して、その関係を明らかにし、さらに構成する幹細胞の増殖メカニズムとして、神経管などで証明されている INM と呼ばれる幹細胞増殖を調節する機構が、尿管でも働いていることを初めて明らかにしました。さらに尿管が伸びる際に、INM を行っている尿管上皮細胞は偽重層（実際は単層円柱上皮だが核の位置が細胞周期に同期して頂底軸に沿って周期的に位置が変わるために一見重層上皮のように見える）の形が、上皮の丈が低くなることにより尿管自体が細くなる（収縮伸長と呼ばれる現象と解釈できる）ことがわかりました。さらにこの過程で細胞死が観察されないのに、尿管を構成する総細胞数が減少することがわかり、尿管から腎臓や膀胱への細胞の移動が起こることが示唆されました。

また腎臓など対になっている臓器における左右の対称性や、臓器の間の成長パターンの類似性など、臓器が「調和して」成長する様子を、数学的手法により明らかにしました。

#### (2) 免疫組織化学

尿管、腎臓の原基となる上皮および結合（間葉）組織における Wnt5a とその受容体 Ror2 の発現パターンが明らかにしました。さらに免疫組織化学および走査型電子顕微鏡観察により上皮幹細胞の頂表面にのみ一次線毛が観察されることを確認しました。これにより、発生過程初期の尿管上皮が本質的に単層であり、上記の INM の存在と矛盾しないことが確認されました。

#### (3) 遺伝子改変動物

Wnt5a とその受容体 Ror2 を欠損した K0 マウス胚では、ヒトと同様の重複尿管・腎臓や腎無形成などの腎奇形が起こることから、腎臓の位置や形など器官形成における Wnt5a-Ror2 シグナルが役割を果たすことが明らかになりました。尿管は中腎管と呼ばれる発生過程で一時期のみ現れる管から芽が出て伸びていきますが、その過程で、後に最終的な腎臓となる結合組織（間葉）から分泌される成長因子（GDNF）が中腎管の上皮細胞の表面にある Ret（GDNF 受容体）に結合することにより生じる GDNF-Ret シグナルが重要な役割を担うことが知られていました。本研究により、時間的・空間的に制御された Wnt5a-Ror2 シグナルが発生過程での間葉の配置や GDNF の発現を制御し、腎臓の形態形成において機能することがわかりました。したがって、Wnt5a-Ror2 シグナルが、上皮細胞と間葉組織の間の相互作用をコントロールすることにより腎臓の器官形成において重要な役割を果たすことが明らかになりました。

#### (4) 子宮外発生法

腎臓の「上昇」のメカニズムについては、注入実験を分子・条件を変えて行いましたが、残念ながら現時点まで明確な結果が得られ

ていません。ただ、注入法については、超音波撮影を併用することによって、より精度の高い注入が可能となったので、引き続き条件を検討して注入実験を行っていきます。

AtT20 細胞の注入実験も、条件を種々検討し、最初妊娠 14 日に注入して出生前の妊娠 18 日に解析する系から始めて、出生後への影響を見るために、妊娠 17, 18 日に注入する系を確立しました。これにより注入して生後離乳から成熟までのマウスの腎臓はじめ多くの臓器の標本を採取しました。組織学的な解析を始めており、今後解析結果がまとまりしだい順次報告してまいります。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Naito K, Shimizu S, Udagawa J, Otani H: The LMSR method for providing a multidimensional understanding of growth standard in human fetuses. Stat Methods Med Res, 2017:1-10,2017 査読有  
DOI: 10.1177/0962280216687339

Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq AM, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H: Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium: Possible implication for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Congenit Anom 56:127-134, 2016 査読有  
DOI: 10.1111/cga.12150

Otani H, Udagawa J, Naito K: Statistical analyses in trials for the comprehensive understanding of organogenesis and histogenesis in humans and mice. J Biochem 159:553-561, 2016 査読有  
DOI: 10.1093/jb/mvw020

Jahan E, Rafiq AM, Otani H: *In utero* and *ex utero* fetal surgery on histogenesis of organs in animals. World J Surg Proced 5:198-207, 2015 査読有  
DOI: 10.5412/wjssp.v5.i2.198

Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, Iijima K, Otani H, Hartmann C, Nishinakamura R, Minami Y: Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. Mol Cell Biol, 34:3096-3105, 2014 査読有  
DOI: 10.1128/MCB.00491-14.

Naito K, Notsu A, Udagawa J, Otani H: Statistical analysis with dilatation for development process of human fetuses. Stat Methods Med Res, 2014 Jul 22 (Epub ahead of

print)  
DOI: 10.1177/0962280214543405

〔学会発表〕(計 4 件)

Otani H, Nitta T, Ogawa N, Kaneda R, Saeki Y, Rafiq AM, Jahan E, Regassa DG, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Hatta T: Interkinetic nuclear migration in the developing esophageal, tracheal, and intestinal epithelia. 第122回日本解剖学会全国学術集会、2017年3月28日~3月30日、長崎大学坂本キャンパス(長崎市)

元矢知志、新田哲哉、Rafiq A M、Jahan E、小川典子、古屋智英、松本暁洋、宇田川 潤、大谷 浩：マウス胎仔尿管の伸長過程における上皮細胞核の再配置. 日本解剖学会第70回中国・四国支部学術集会、2015年10月24日~25日、愛媛大学城北キャンパス南加記念ホール(松山市)

Otani H, Udagawa J, Hatta T, Minami Y: Cell polarity-associated mechanisms in normal and abnormal organogenesis and histogenesis of epithelial tubular structures. The Second International Meeting for Epithelial Tubulology, Sapporo, Aug 22-23, 2015, 北海道大学医学部フラテホール(札幌市)

元矢知志、新田哲哉、Rafiq A M、Jahan E、小川典子、古屋智英、松本暁洋、宇田川 潤、大谷 浩：マウス尿管の発生過程における Interkinetic nuclear migration および Convergent extension の解析. 第55回日本先天異常学会学術集会、第38回日本小児遺伝学会学術集会合同開催、2015年7月25日~7月27日、パシフィコ横浜会議センター(横浜市)

Motoya T, Ogawa N, Nitta T, Rafiq A M, Jahan E, Furuya M, Matsumoto A, Udagawa J, Otani H: Interkinetic nuclear migration in the mouse embryonic ureteric epithelium. 第120回日本解剖学会全国学術集会、第92回日本生理学会大会合同大会、2015年3月21日~3月23日、神戸国際会議場(神戸市)

新田哲哉、元矢知志、Rafiq AM、Jahan E、小川典子、古屋智英、松本暁洋、宇田川 潤、大谷 浩：尿管上皮発生における Interkinetic nuclear migration の解析. 第54回日本先天異常学会学術集会、2014年7月26日~7月27日、麻布大学(相模原市)

大谷 浩：ヒト・マウスの器官形成と組織形成における正常と異常。(招待講演) 第50回日本周産期・新生児医学会学術集会、2014年7月13日~15日、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル(浦安市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

小川 典子 (OGAWA, Noriko)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：90598111

古屋 智英 (HURUYA, Motohide)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：40457172