

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26860196
研究課題名(和文) 遺伝学的組織操作による泌尿生殖器官発生研究：肛門直腸奇形発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Genetic and stereoscopic analyses for the pathogenic mechanisms of anorectal malformations

研究代表者
松丸 大輔 (MATSUMARU, Daisuke)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：50624152
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱と腸管は、胎児期に一過的に存在する総排泄腔が分割されることによって形成される。その分割不全は肛門直腸奇形と呼ばれ、原因メカニズムは殆ど明らかとなっていない。現在まで総排泄腔の分割に関わる研究は、組織切片を用いた2次元的な解析が中心になされてきた。本研究では、イメージング技術を用いて3次元的に総排泄腔の構造変化を解析し、かつ遺伝子改変マウス胚を用いて総排泄腔分割不全の起こるメカニズムの解析を行った。その結果、総排泄腔分割過程における総排泄腔上皮のダイナミックな構造変化を明らかにした。本研究で得られた成果は、今後、肛門直腸奇形の原因メカニズムを解析する上で基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The division of the embryonic cloaca is the most essential event for the formation of digestive and urinary tracts. The defective development of the cloaca results in anorectal malformations (ARMs). The incidence of ARMs is approximately 1 in 5,000 human births; however, the underlying pathogenic mechanisms are still unclear. Although there have been several discussions on the development of the cloaca, stereoscopic analyses are rarely utilized. In the current study, I performed three-dimensional reconstruction analyses of early staged embryos. The time-course analysis visualized the division processes of the cloaca in both wildtype and genetically engineered mice. These results suggested the presence of possible remodeling of the epithelial cells during cloacal division. I believe that the current results provide the basis for understanding both cloacal development and the ARM pathogenesis.

研究分野：発生医学

キーワード：総排泄腔 肛門直腸奇形 Shh 遺伝学的細胞標識 尿直腸中隔 3次元イメージング

1. 研究開始当初の背景

泌尿生殖器官は、胎児期に一過的に存在する総排泄腔が尿生殖洞と後腸に分割されることによって形成される。1つの管腔から複数の器官が形成されるため、総排泄腔の分割不全は隣接する器官群にわたる発生異常となる。このような先天性疾患は肛門直腸奇形 (Anorectal malformations: ARM) と呼ばれ、出生児の数千人に一人の割合で起こることが知られている。現在まで、ARM の原因因子として、Shh (Sonic Hedgehog: 細胞増殖因子ヘッジホッグ (Hh) シグナルのリガンド) 遺伝子等の異常、過剰量のレチノイン酸 (活性型ビタミン A) 暴露などが知られている。多数の知見の積み重ねがあるにも関わらず、正常な総排泄腔の分割過程に関わるメカニズム、また ARM の発症機序に関して現在まで議論が続いている状況である。ヒトにおいては顕微授精等の生殖補助技術 (Assisted Reproductive Technology) を用いることによる ARM のリスク増加が報告されており、ARM の発症メカニズムの解明は社会的にも重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肛門直腸奇形 (Anorectal malformations: ARM) の発症メカニズムの解明である。同疾患の発症メカニズムは現在まで未解明であった。本研究では特に、総排泄腔を分割する尿直腸中隔 (Urorectal septum: URS) の形成過程に注目し、マウス遺伝学的手法、またイメージング技術を駆使して1. URS 形成に関与する細胞群の挙動の解析、2. URS 形成に関わる細胞増殖因子シグナルカスケードの解析を行なった。これらの解析により、URS を形成する細胞群の起源、URS 伸長メカニズムが世界で初めて明らかとなり、ARM の発症メカニズムの解明に大きな一歩となると考えられた。

3. 研究の方法

本研究では、マウス遺伝学的手法、またイメージング技術を駆使した三次元的な形態解析を行った。遺伝子改変マウス、Cre-loxP システムによる条件付き遺伝子組換えマウス胚を採取し、組織切片からの三次元組織再構築、透明化手法を用いたイメージング解析を行なった。また、採取した遺伝子改変マウス群の胎仔組織を用いて遺伝子発現解析、免疫染色によるマーカー分子発現解析等を行なった。

4. 研究成果

(1) 総排泄腔分割過程のイメージング解析

総排泄腔の構造的変化を解析するために、まず、Foxa2^{CreERT2} マウスと Shh^{CreERT2} マウス、そして Rosa26R (R26^{LacZ}) Cre レポーターマウスを用いた。これらの Cre ドライバーマウスはそれぞれ Forkhead box A2 (Foxa2)、Sonic hedgehog (Shh) 遺伝子座にタモキシフェン (Tamoxifen: TM) 誘導型 Cre 組換え酵素がノックインされている。R26^{LacZ/LacZ} マウスの雌を Foxa2^{CreERT2/+} マウスの雄と交配させ、TM を胎齢 8.5 日目 (Embryonic day 8.5: E8.5) の時期に妊娠母獣に投与し、E9.5 と E10.5 で解析した。また、Shh^{CreERT2/+}; R26^{LacZ/LacZ} 雄マウスと ICR 雌マウスを交配させ、E9.5 で TM を投与して、E11.5、E12.75、E14.5 で胎仔を採取した。回収した胎仔サンプルは X-gal 染色を行い、pSeeDB 法を用いて透明化した。Foxa2^{CreERT2/+}; R26^{LacZ/+} マウス胚、Shh^{CreERT2/+}; R26^{LacZ/+} マウス胚は、総排泄腔及び後腸領域が LacZ 陽性であったが、腎管 (Nephric duct: ND) は LacZ 陰性であった。側方から観察すると、矢状断の組織切片での解析と同様に総排泄腔が分割されていく様子が観察され、尿直腸中隔 (Urorectal septum: URS) と称される構造が臍帯領域から外生殖器原基の背側方向に伸長するように発生が進む様子が観察された。

総排泄腔は、E9.5 では腸管部分に比較してやや広がった管腔構造として観察された。総排泄腔と腸管の境界領域は E10.5 においてより顕著となり、この時期では正面から観察した際の左右方向の幅が総排泄腔と腸管で異なっており、総排泄腔では明らかに幅広であった。将来の尿生殖洞 (Urogenital sinus: UGS) となる領域の形成は、総排泄腔上皮の左右の小隆起として観察され始めた。このように、総排泄腔分割の最初の特徴は E10.5 周辺から観察されはじめた。引き続いて、E11.5 にかけて形態の変化は大きく進んだ。将来の UGS 領域と後腸の左右幅の差は E11.5 及びそれ以降の胎仔時期ではより顕著となり、また、UGS の将来の膀胱領域 (anterior UGS: aUGS) において、左右軸方向に幅広の形態であった。また、Shh^{CreERT2/+}; R26^{LacZ/+} マウス胚を用いて X-gal 染色サンプルの連続組織切片からアニメーションを作製することにより、URS 間葉が他の総排泄腔周辺間葉と連続的な構造であることを見出した。つまり、URS は総排泄腔を分割する独立した中隔構造ではなく、矢状断切片で観察した場合に総排泄腔周辺間葉が中隔のような状態で観察されたものである可能性が示唆された。

また、URS 間葉細胞の起源を解析するために Gli1^{CreERT2/+}; R26^{LacZ/+} マウス胚を用いて細胞

系譜解析を行った。総排泄腔の分割 (URS の形成・伸長) よりも早い時期である E9.5 において TM を投与し、E10.5 と E11.5 でマウス胚を回収して解析した結果、UGS と後腸に囲まれた URS 間葉では、E10.5 では大部分の細胞が LacZ 陽性であったが、E11.5 では腹側領域において LacZ 陰性であった。そして、むしろ E11.5 では、LacZ 陽性細胞は URS 間葉の中央領域に局限していた。この結果から、E11.5 における URS 間葉細胞の一部は、E10.5 における LacZ 陰性領域、すなわち URS 外部の間葉細胞に由来する可能性が示唆された。加えて、BrdU 投与に基づく細胞増殖の検定試験において、投与後 1 時間の標識での組織回収を行う検定では、URS 間葉でほぼ一様に BrdU 陽性細胞が観察されるが、投与後 40 分、あるいは投与後 20 分で回収する短時間標識では、UGS 上皮直下の間葉領域に BrdU 陽性細胞が偏在していた。この結果と、先述の URS が独立構造として存在しない可能性、また URS 間葉細胞が URS 外部の間葉細胞に由来する可能性から、総排泄腔の分割過程は中隔構造による"分割"ではなく、上皮構造のダイナミックな形態変化を伴う管腔構造全体の構造変化と解釈されることが示唆された。

(2) 腎管領域のイメージング解析 遺伝子改変マウスのイメージング解析

上述の実験と並行して、総排泄腔構造をコンピュータ上で解析するために、連続切片を作製し、ソフトウェア amira®を用いて 3 次元再構築した。透明化した X-gal 染色サンプルで得られた知見に加え、同方法では腎管 (ND) も可視化することができ、その総排泄腔分割に伴うダイナミクスを解析することができた。総排泄腔と腎管の結合部位は E9.5、E10.5 においては総排泄腔の側方中部に存在するが、発生が進むにつれ、尿生殖洞膀胱領域 (aUGS) の背側領域に大きく移動した。さらに、この総排泄腔-ND 結合部位の変化を観察するため、E10.5 から E11.5 までのマウス胚を 6 時間間隔で採取し、ホールマウント蛍光免疫染色の手法を用いて解析した。上皮発現性分子の E-cadherin 抗体で染色し、サンプルを透明化した後に共焦点顕微鏡を用いて解析したところ、経時的に総排泄腔-ND 結合部位が総排泄腔/aUGS において側方中部から背側上部に移動する様子が観察された。このような結合部位の経時変化を鑑みても、中隔構造による総排泄腔の分割というメカニズムの説明は不合理である可能性が推察された。

次に、肛門直腸奇形 (ARM) 様表現型を呈することが知られている β -catenin 機能獲得型変異マウス (E9.5 で TM を投与した $Shh^{CreERT2/+}$;

β -catenin^{flox(Ex3)/+}マウス胚: β -catenin GOF マウス胚) と $Shh^{-/-}$ マウス胚に関しても同様に共焦点顕微鏡を用いた解析を行った。

β -catenin GOF マウス胚において、総排泄腔/aUGS 上皮が左右方向に異常に広がって、かつ湾曲している様子が観察されたが、総排泄腔-ND 結合部位に関しては野生型マウス胚と同様に UGS 上皮の背側上部に位置していた。一方で、 $Shh^{-/-}$ マウス胚では、ND が UGS に結合せず盲端となっている様子が観察された。さらに、ND が総排泄腔に到達する前段階での異常の影響を排除するために、条件付き Shh 遺伝子改変マウス (E9.5 で TM を投与した $Shh^{CreERT2/flox}; R26^{LacZ/+}$ マウス胚) を解析した。E13.5 において、amira®を用いて連続切片から 3 次元再構築して解析したところ (同胎仔時期では組織サイズの関係から共焦点顕微鏡では十分なイメージングを行うことが難しい)、総排泄腔-ND 結合部位は低形成である総排泄腔の下側 (尾側) に観察された。これらの結果は、総排泄腔の構造は総排泄腔-ND 結合部位の位置に影響を及ぼす可能性を示唆した。

(3) 総排泄腔分割過程において観察される細胞死のイメージング解析

総排泄腔分割は、上皮と間葉の一部に細胞死を伴いながら進んでいくことが知られている。現在まで、その分布を 3 次的に解析した例は少ない。そこで、共焦点顕微鏡を用いたイメージング解析手法によってマウス胚の総排泄腔分割過程を解析した。細胞死マーカーである cleaved caspase-3 抗体で免疫染色を行い解析したところ、E9.5 においては、cleaved caspase-3 陽性細胞は総排泄腔周辺では観察されなかった。E10.5 においては、総排泄腔上皮は cleaved caspase-3 陽性であった。E11.5 では、cleaved caspase-3 陽性細胞は、aUGS 領域の背側から後腸上皮にまで幅広く分布していた。後腸側の上皮における cleaved caspase-3 陽性細胞は、主に aUGS の頭側端レベルから尾側にかけて観察された。

このような細胞死を伴う形態変化において、総排泄腔上皮はどのように上皮構造を保っているか解析するため、基底膜マーカーである Laminin 発現を解析した。一般的には、上皮構造の維持のために死滅した細胞を間葉上皮転換などのメカニズムを介して外部から補う可能性が考えられる。今回の解析においては、Laminin 発現の破綻は観察されず、細胞死を起こした上皮内における"配置替え"によって上皮構造は保たれていることが示唆された。これは、同時に解析を行った腎管共通部 (common nephric duct) においても同様であ

ると考えられた。

先述のβ-catenin GOF マウス胚と Shh^{-/-} マウス胚に関しては、イメージング解析の結果、総排泄腔上皮における表現型が三次元的に可視化された。特に、Shh^{-/-} マウス胚に関しては、aUGS 構造が低形成であり、UGS 上皮の左右小隆起が異常に尾側まで伸びていた。また、ND 上皮は異常に拡張していた。β-catenin GOF マウス胚に関しては、aUGS が低形成かつ非扁平構造であった。cleaved caspase-3 陽性細胞の分布に関しては、Shh^{-/-} マウス胚は野生型マウス胚に比較して aUGS 背側においてより広範囲に分布していた。β-catenin GOF マウス胚では、総排泄腔上皮においては cleaved caspase-3 の発現は殆ど観察されなかった。そして、総排泄腔上皮は野生型マウスに比較して肥厚していた。これらの結果から、β-catenin GOF マウス胚と Shh^{-/-} マウス胚は双方とも ARM 様表現型を呈するが、その病因メカニズムは異なっている可能性が示唆された。

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4件)

Suzuki K, Matsumaru D, Matsushita S, Murashima A, Ludwig M, Reutter H, Yamada G.

Epispadias and the associated embryopathies; genetic and developmental basis.

Clinical Genetics. 2017;91(2):247-253.

査読有

DOI: 10.1111/cge.12871.

Ipulan LA, Raga D, Suzuki K, Murashima A, Matsumaru D, Cunha G, Yamada G. Investigation of sexual dimorphisms through mouse models and hormone/hormone-disruptor treatments. Differentiation. 2016;91(4-5):78-89.

査読有

DOI: 10.1016/j.diff.2015.11.001.

Matsumaru D, Murashima A, Fukushima J, Senda S, Matsushita S, Nakagata N, Miyajima M, Yamada G.

Systematic stereoscopic analyses for cloacal development: The origin of anorectal malformations.

Scientific Reports. 2015;5:13943.

査読有

DOI: 10.1038/srep13943.

Makino S, Zhulyn O, Mo R, Puviindran V, Zhang X, Murata T, Fukumura R, Ishitsuka Y, Kotaki H, Matsumaru D, Ishii S, Hui CC, Gondo Y.

T396I mutation of mouse Sufu reduces the stability and activity of Gli3 repressor.

PLoS ONE. 2015;10(3):e0119455.

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0119455.

[図書](計1件)

松丸大輔、山田源.

ヘッジホッグシグナル.

生体の科学、66巻、pp442-443、2015年

査読無

DOI: 10.11477/mf.2425200298

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igaku/bu/160904/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松丸 大輔 (MATSUMARU, Daisuke)

和歌山県立医科大学 先端医学研究所

助教

研究者番号: 5 0 6 2 4 1 5 2