

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14202  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592276  
 研究課題名（和文） 直腸肛門奇形マウスを用いた器官培養による分子生物学的解析及び胎仔治療への応用  
 研究課題名（英文） Molecular biological analysis by organ culture and application to fetal treatment using mice model with anorectal malformation  
 研究代表者  
 久保田 良浩 (KUBOTA YOSHIHIRO)  
 滋賀医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：30305601

## 研究成果の概要（和文）：

ビタミン A の誘導体であるエトレチナートを妊娠マウスに経口投与することにより、ほぼ 100%の再現性をもって直腸肛門奇形マウスを作成することに成功した。この直腸肛門奇形マウスを用いて胎仔期の発生段階における直腸壁内神経伝達の異常を分子生物学的手法を用いて証明した。直腸肛門奇形マウスは生まれながらに直腸の神経伝達が正常でないことが示唆された。また、直腸肛門奇形マウスを用いた直腸肛門部の器官培養は困難であったが、成功する可能性もでてきたため、今後も継続して研究が必要と思われる。

## 研究成果の概要（英文）：

A single high dose of etretinate, a long-acting synthetic retinoid, induces ARMs in mice. Abnormal intrinsic innervation of mice embryos with anorectal malformations at later developmental stages was eliminated by molecular biological methods. Organ culture was quite difficult, but it will be possible to succeed it. It is necessary to continue to study it.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：直腸肛門奇形，器官培養，胎仔治療

## 1. 研究開始当初の背景

直腸肛門奇形は外科的治療を要する新生児疾患の中で最も頻度の高い先天異常の一つであるが、術後の排便機能は満足のものには至っていない。その原因を究明するためには、モデル動物の作成が不可欠である。様々なモデル動物が作成されているが、最適

なものを作成されていなかった。我々は、ほぼ 100%の再現性をもって直腸肛門奇形マウスの作成に成功した。これまで、モデル動物を用いて直腸肛門奇形の発生過程の研究がなされてきたが、ヘマトキシリン・エオジン染色や電子顕微鏡など形態的な解析にとどまっていた。我々は、この最適モデルマウ

スを用いて、免疫組織化学的染色等の分子生物学的手法を用いて、様々な角度からその発生過程を解析してきた。しかしながら、未だ直腸肛門奇形の発生過程の十分な解明には至っておらず、さらなる研究の継続が必要である。

## 2. 研究の目的

直腸肛門奇形マウスを用いて、直腸肛門奇形根治術後も続く便秘の原因を究明する。腸管内の神経伝達物質であるサブスタンス P, VIP および c-Kit に着目し、その解析を行う。また、発生の 4 大要因の一つである細胞移動について、Wnt5a, c-Jun および Rock2 に着目し、その解析を行う。次に直腸肛門奇形マウス胎仔および正常マウス胎仔の直腸肛門部を摘出し、器官培養を行う。培養液に神経伝達に関わる因子や肛門挙筋群の発達に関わる様々な因子を添加し、神経系や筋層の変化を解析する。さらにそれらを応用し、胎仔治療へ発展させる。

## 3. 研究の方法

(1) 妊娠 9 日目のマウスにビタミン A の誘導体であるエトレチナートを経口的に過剰投与 (60mg/kg) し、直腸肛門奇形マウスを作成する。

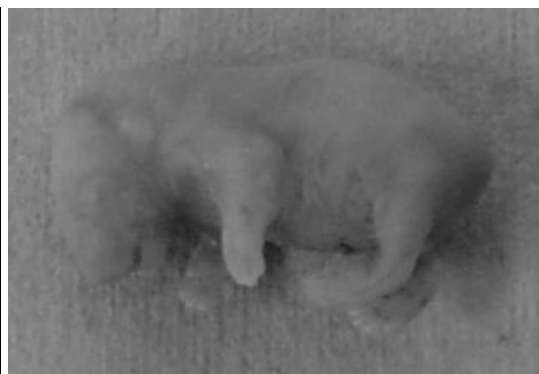
(2) 胎生 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 日目にそれぞれ正常および直腸肛門奇形マウス胎仔を取り出す。それぞれに対してパラフィン標本を作成し、切片を作成する。それぞれに対して、神経伝達物質であるサブスタンス P, VIP および c-Kit に対する抗体を用いて分子生物学的手法により免疫組織化学的染色を行い、正常と直腸肛門奇形マウス胎仔のその発生過程における相違を解析する。

(3) 胎生 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 日目にそれぞれ正常および直腸肛門奇形マウス胎仔を取り出す。それぞれに対してパラフィン標本を作成し、切片を作成する。それぞれに対して、細胞移動に関わる因子である Wnt5a, c-Jun, Rock2 に対する抗体を用いて分子生物学的手法により免疫組織化学的染色を行い、正常と直腸肛門奇形マウス胎仔のその発生過程における相違を解析する。

(4) 胎生 12 日目に、正常マウス胎仔を取り出す。クリーン・ベンチ内でマウス胎仔の直腸肛門部を取り出し、器官培養を行う。培養 1 日目, 2 日目, 3 日目に取り出し、細胞死をおこさず、維持できているかを確認する。

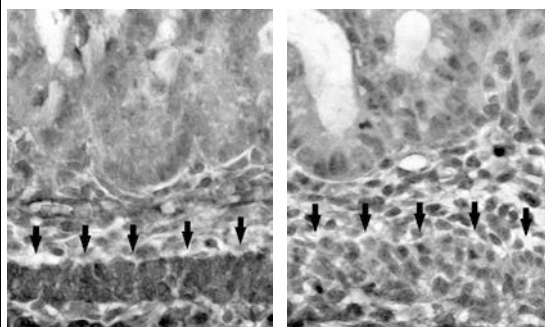
## 4. 研究成果

(1) ほぼ 100% の再現性をもって直腸肛門奇形マウスの作成に成功した。直腸肛門奇形マウスでは、尾が低形成あるいは欠損している (図 1)。

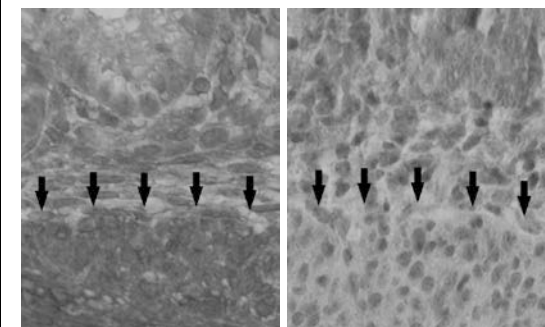


(図 1)

(2) サブスタンス P および VIP では、胎生 15 日目までは正常と直腸肛門奇形マウス胎仔において直腸筋層内での発現には差はなかったが、胎生 16 日目以降では正常に比べて直腸肛門奇形マウスでは直腸筋層内でのそれぞれの発現は明らかに低下していた (図 2, 3)。図 2, 3 いずれも左側が正常マウス胎仔の胎生 16 日目の直腸筋層の標本で、右側が直腸肛門奇形マウス胎仔の胎生 16 日目の直腸筋層の標本である。



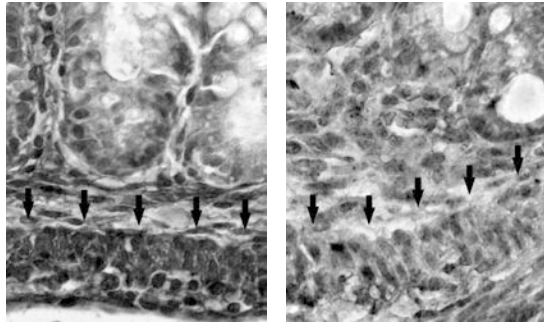
(図 2)



(図 3)

また、c-Kit の発現は、直腸肛門奇形マウス胎仔の直腸筋層内においては、胎生 16, 17 日目ではわずかに低下するのみであったが、胎生 18 日目では著明に低下していた (図 4)。図 4 の左側が正常マウス胎仔の胎生 18 日目の直腸筋層の標本で、右側が直腸肛門奇形マウス胎仔の胎生 18 日目の直腸筋層の標本である。

以上の結果より、直腸肛門奇形マウス群では、先天的に直腸の運動能が低下していることが示唆された。



(図4)

(3) Wnt5a, c-Jun, Rock2 の発現は、特に胎生 10, 11, 12, 13 日目において検索した。直腸肛門奇形マウス胎仔において、特に c-Jun の発現が、胎生 11 日目以降で正常マウス胎仔に比較するとやや低下しているように思われたが、明らかな違いは指摘できなかった。今後は、PCR 等でその発現の程度を定量的に解析する必要があると思われた。

(4) 胎生 12 日目のマウス胎仔を取り出し、直腸肛門部を摘出し、それらを器官培養したが、1 日間も壊死をおこさずに維持することは困難であった。しかしながら、その一部は 1 日であれば、壊死をおこさずに維持できたものもあり、培養液に追加するインスリンの量などが問題と思われる。今後の課題である。

今回の研究では、直腸肛門奇形マウスにおいて、先天的に直腸の運動能が低下していることが示唆された。このことは、実際の臨床において、直腸肛門奇形根治術後の患児が、長期間にわたって便秘の症状が続く原因として、手術の影響のみではなく、先天的な因子も関与している可能性があり、今後の治療において注目すべき結果と思われる。また、細胞移動に関して Wnt5a, c-Jun および Rock2 に着目して解析を行ったが、十分な結果を出すことができなかった。しかし、Wnt5a のノックアウトマウスが直腸肛門奇形を有していたとの研究論文が発表されている。このことから細胞移動に関する因子も直腸肛門奇形の発生に関与している可能性が十分ある。今後は免疫組織化学的染色や固定方法を工夫する必要があり、また、PCR 等により定量的な解析も必要になってくると思われる。

また、直腸肛門周囲の器官培養であるが、通常の培養液ではその維持が非常に困難であった。通常の培養液では、1 日間も器官内の細胞を維持することができなかった。インスリンを培養液に添加することで、一部ではあるが、1 日間壊死に至らずに維持できたものもあったが、結果は惨憺たるものであった。今後の課題としては、培養液のさらなる工夫が必要で、たとえばインスリンの投与量をさらに増加したりすることで克服することが可能と思われる。直腸肛門部の器官培養が可

能になれば、次には直腸肛門奇形マウス胎仔の直腸肛門部を取り出し、培養液に様々な因子を添加培養することで、挙肛筋群の発達を促進する因子を同定することができると思われる。さらには、その同定された因子を、たとえば胎仔の羊水中に注入すること等により、胎仔治療への可能性が開けると思われる。

#### 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 1 件)

Kubota Y, Cho H, Umeda T, Abe H, Kurumi Y, Tani T. Abnormal development of intrinsic innervation in murine embryos with anorectal malformations. *Pediatric Surgery International* 28(3): 295-298, 2012 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Kubota Y. Abnormal development of intrinsic innervation of murine embryos with anorectal malformation. *Pacific Association of Pediatric Surgeons*, 26 May, 2010. Kobe, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 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  
ホー ム ペ ー ジ :  
<http://shiga-med.ac.jp/~hqsurgel/hqsurgel/staff.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 良浩 (KUBOTA YOSHIHIRO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30305601

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：