

左右非対称な内臓器官の形態変化の解析

白 鳥 秀 卓*

要 旨

脊椎動物の内臓器官の多くは、心臓、胃など左右非対称に配置している。マウスにおいても、右の腎臓が左の腎臓よりも頭側に位置し、肝臓は左右非対称な分葉構造をとっている。このような左右非対称性が形成される機構を解明するために、本研究では、マウス胚発生中で腎臓と肝臓が左右非対称に形態変化する過程を詳細に観察した。その結果、腎臓原基が左右非対称に位置するより早い時期に、腎動脈が左右非対称に形成されることが分かった。腎動脈の左右非対称性は12.5～12.75日胚で確立し、12.25日胚における左右の非対称性は非常に小さいもしくは対称的であることも分かった。肝臓原基は9.75日胚では左右の葉の大きさや形に非対称性が表れていること、肝臓の尾状葉は他の葉に比べて遅く11日胚で新規に外側右葉から分葉することを確認した。

キーワード：左右軸，器官形成，腎臓，腎動脈，肝臓

1. はじめに

我々ヒトを始めとした脊椎動物は、外見上ほぼ左右対称であるが、心臓、胃、血管など内臓器官の多くは左右非対称に配置している。胚発生において、内臓器官も初めは左右対称にできるが、その後左右非対称に形が変化して完成する。私は、このような器官の左右非対称性が形成する機構を解明したい。具体的には、「どのように左右非対称な遺伝子発現が確立するのか。」その結果として、「どのように内臓器官が左右非対称に変化するのか。」を明らかにしていきたい。

内臓器官の左右非対称な形態変化において、転写因子 Pitx2 が重要な役割をすることや、下流の分子や形態変化の機構は明らかになってきた。しかし、その理解は部分的であり、Pitx2 の下流を解析するなど分子の探索・解析だけでは解決しない問題も多く、左右非対称な形態変化を詳細に観察することも必要である。

腎臓は、中間胚葉から派生してくる組織の一つである。発生過程の中で、頭側から尾側にかけて前腎・中腎・後腎の順に形成される [1]。腎臓として出生後も機能を有するのは後腎であり、その発生は、10.5日胚から尿管芽が後腎間葉に伸長することで開始し、11.5日胚以降では尿管芽を次々と分岐させることで拡大していく。間葉細胞から生じる腎臓小胞は、形を変化させ尿管芽と内壁を融合

* 京都産業大学総合生命科学部

させ、最終的にボーマン嚢・尿細管の形成に寄与する [2, 3]。このような腎臓形成過程を経て、マウスやラットにおいては最終的に右腎臓が左腎臓と比べて頭側に位置する。しかし、どのような機構で腎臓が左右非対称に位置するのか、まだほとんど理解されていない。

マウスの肝臓も、左右非対称な分葉構造をとっている。内側右葉、内側左葉、外側右葉、外側左葉、尾状葉に分かれており、外側左葉が一番大きく、内側右葉が次に大きい形になっている。尾状葉も胃と食道を挟んで左右に分かれているが、形態が異なっているため対称ではない。また、外見の形態だけでなく肝臓内部の脈管構造、胆管や門脈、神経の分岐パターンもそれぞれの葉に向かって伸びており、左右非対称なパターンを示している [4, 5]。ヒトの肝臓は肝憩室の形成が起こった後に器官の右側が左側より大きくなる。発生が進むと肝臓の右側は左側の 5～6 倍ほどの大きさになり、はっきりとした形態と複雑な分葉構造を示す [6]。最近の研究でアフリカツメガエルにおける肝臓の発生が研究され、アフリカツメガエルではヒトと同様に肝憩室の形成直後に器官の右側が左側より大きくなるのが分かり、その前の発生段階で *Pitx2* が左側のみに発現していることが関係していると明らかになった [7]。しかし、*Pitx2* が発生中の分葉形成を調節するメカニズムは分かっていない。マウスについては FGF シグナルと BMP シグナルの刺激によって肝芽の形成が 8.5 日胚の頃に起こることがわかっているが [8]、肝臓の分葉の左右非対称性がいつ頃から、またどのように表れるのかは報告されていない。

2. 材料と方法

2.1 マウス

各発生時期の ICR 系統の妊娠マウスを用いた。

マウスを用いた各実験は、京都産業大学動物実験規定に準じて適正に行った。

2.2 Ink injection

Ink injection には、30G 針と 1ml シリンジを用いるか、やや太めのガラスキャピラリーを用いた。心臓の左心室に挿入・心拍に合わせて ink を動脈内に灌流する。注射器を用いる際は心拍に合わせることは難しいため灌流する量に注意を払う。11 日胚の ink injection は直径が約 200 μ m のガラスキャピラリーを用いて前述と同じように灌流していく。また、腹部大動脈から二本の総腸骨動脈へと分岐する箇所からガラスキャピラリーを挿入し ink injection することも可能である。

2.3 Whole Mount Immunohistochemistry (IHC-Wmt)

発生時期ごとに固定時間等を変更した。

4% PFA 内で 2 時間程度固定した後、0.3% Triton in PBS (PBS-T) で 1 時間 2～3 回洗浄した。その後、内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。0.3% H₂O₂ 内で 1 時間処理し、0.1% NaN₃ を含有する skim milk (0.5% skim milk / 0.1% NaN₃ in 0.1% PBS-T) で 1 時間処理することで非特異的

な抗体反応を防いだ。抗Pecam1抗体 (Abcam:ab28364) を1/200の割合で加え2～3日間反応させた。0.3% PBS-Tで洗浄した後、二次抗体にImmPRESS (VectorLaboratories) を用いた。ABC法を用いる場合は1/50の血清を含むPBSに1/200の割合で二次抗体を添加した。0.3% PBS-Tでの洗浄後、ABC処理を行い、発色基質 (0.6g DAB in 50mM Tris buffer pH7.5 + 0.03% H₂O₂) を用いて発色・実体顕微鏡下で観察した。0.03% H₂O₂はDABの浸透を待った後に添加した。全ての作業は4℃下もしくは氷上で行った。

また、一部の胚はTissue Clearing (CUBIC) 処理を行った [9, 10]。4% PFAで約2時間固定、PBSで1時間2～3回洗浄した後、37℃下で50% CUBIC-L処理した。その後、CUBIC-Lに置換した。PBSで1時間2～3回洗浄後にIHC-Wmt法を行った。

3. 結果と考察

3.1 腎臓、腎静脈、腎動脈の左右差の確立

胚発生を遡り、マウスの腎臓、腎静脈、腎動脈の位置を観察した。腎臓については頭尾軸に沿った左右の位置の違いを観察した。腎静脈と腎動脈については、それぞれ後大静脈と腹大動脈からの分岐位置に注目して、その頭尾軸に沿った左右の位置の違いを観察した。その結果、生体でも左右非対称性が明らかな腎臓、腎静脈に加えて、腎動脈も左右非対称性に形成していることが分かった。さらに、腎臓と腎静脈は14日胚くらいから左右非対称に位置するが、腎動脈はそれよりも早い発生時期に左右非対称に位置することが明らかになった。これらの結果から、腎臓が左右非対称に配置するのは腎動脈が非対称に形成された結果であると仮説を立て、引き続き腎動脈がいつから非対称に形成されるのか、その過程を観察した。

3.2 腎動脈原基の発生と形態変化

出生後に腎臓として機能を持つことになる後腎は、発生初期には本来存在する位置よりも尾側に存在しており、発生の進行と共に位置を頭側に変化させていく。動脈へのink injectionによって血管を可視化させて観察すると、後腎は12.25日胚の時点では全ての個体で本来の位置よりも尾側に位置していた。12.75日胚では、約半数の個体で後腎が本来の位置に存在もしくはそれに近くなっていることが確認された。13.25日胚における後腎は全ての個体で左右対称ではあるが、後腎の頭側への位置変化が確認できた。

腎動脈と思われる血管走行については、12.25日胚で左右非対称性が確認できた個体も存在した一方で、血管の走行が左右対称な個体も存在した (図1)。12.75日胚では12.25日胚で確認した腎動脈の左右非対称性が拡大した個体が多く存在したが、非対称性が確認できない個体も存在した (図1)。13.25日胚においては左右非対称性がほぼ全ての個体で確立していた (図1)。

詳細な解析のため、ink injection法に加えて免疫組織化学染色法 (IHC-Wmt) も用いて血管の伸長を確認した。12.25日胚において左右腎動脈の頭側には副腎に伸長すると思われる血管が分岐してい

るが、非対称性が確立した後、この状態は左側で維持される一方で右側は腎動脈と副腎動脈が分岐を共有するように形成されている（図1）。IHC-Wmtした13.25日胚では副腎直下に位置している腎臓が明らかに確認でき、この発生時期において全ての個体で腎臓の位置変化が完了していることが再確認できた（図1）。12.75日胚や13.25日胚ではまだ腎臓は左右対称に位置しているが、腎動脈の非対称性は確立している個体が多く存在している。

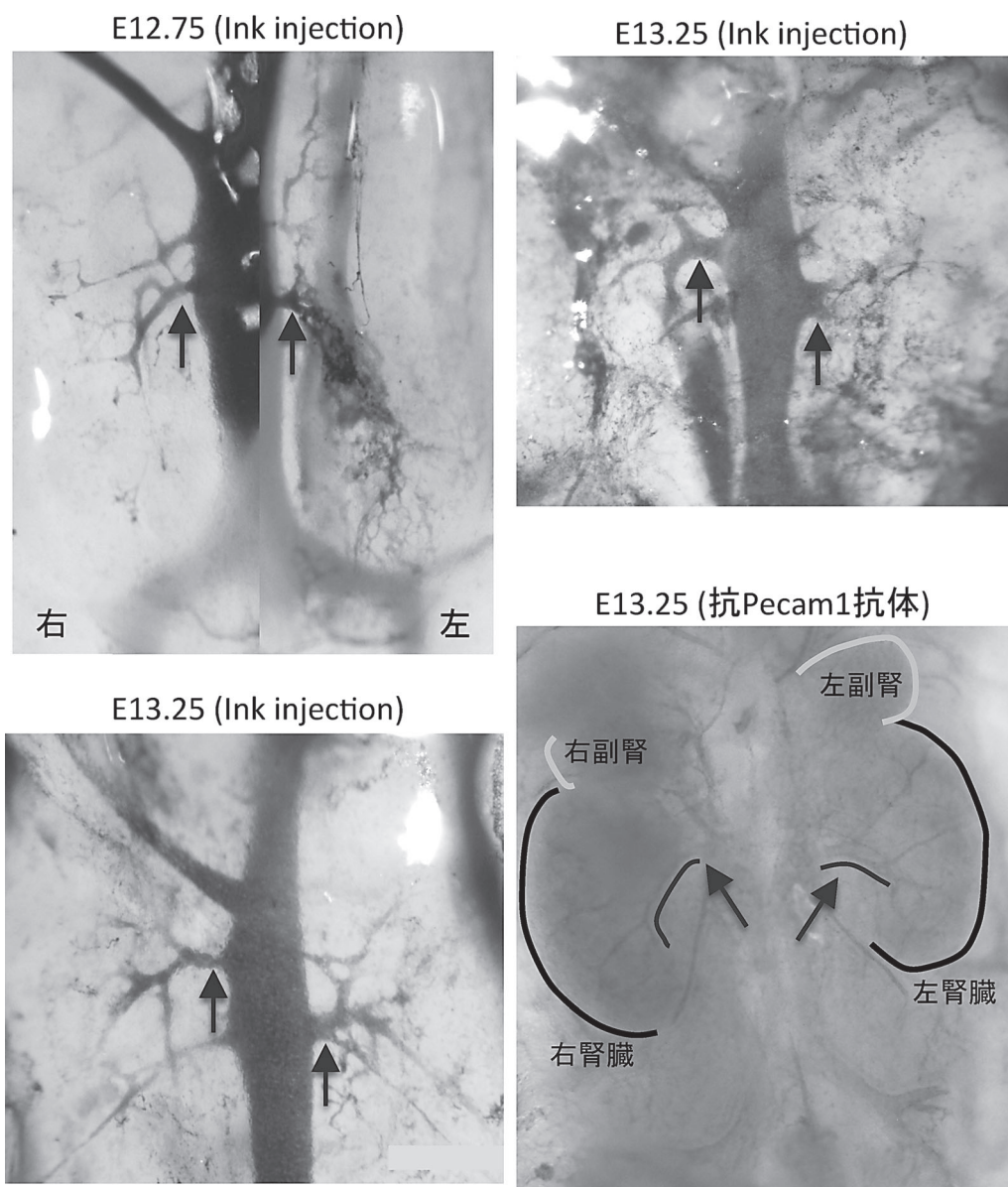


図1 腎臓・腎動脈の形態（矢印は左右の腎動脈）

腎動脈がいつから形成されるのかを探索するために、さらに発生段階の早い胚を用いて解析を行った。11 日胚の各ステージでは、これまで 12.25 日胚以降で観察されていた位置に腎動脈と思われる血管は観察することができなかった。一方で、12.25 日胚以降では観察することができなかった比較的等間隔に並ぶ左右への数本の分枝が観察された。これらの血管は、腹部大動脈から分岐してから不規則に分岐しており、中腎と思われる組織に分布していた。

3.3 肝臓原基の分葉形成

生体の肝臓の形態は外側右葉、外側左葉、内側右葉、内側左葉と尾状葉に分かれており、外側左葉が一番大きく、次に内側右葉が大きい形を示す。12.25 ～ 18.5 日胚では生体と同様の形態を示した。また、発生を遡るにつれて尾状葉が薄く小さくなっていた (図 2)。11.25 ～ 12.0 日胚の肝臓は基本的に葉の大きさの比は生体と同様で外側左葉が一番大きく、次に内側右葉が大きい形であったが、尾状葉に関して外側右葉から分岐してきたものが二方向に伸びている形をとっていた (図 2)。10.75 日胚より早いステージでは尾状葉が観察できなくなった (図 2)。各葉の大きさについては、内側左葉と内側右葉に関しては 10.75 日胚より発生時期の早い胚ではほぼ対称な大きさになっているが、外側左葉と外側右葉の大きさと形が異なっていた。外側左葉が長く大きい形を、外側右葉が丸くやや小さい形をとっていた。

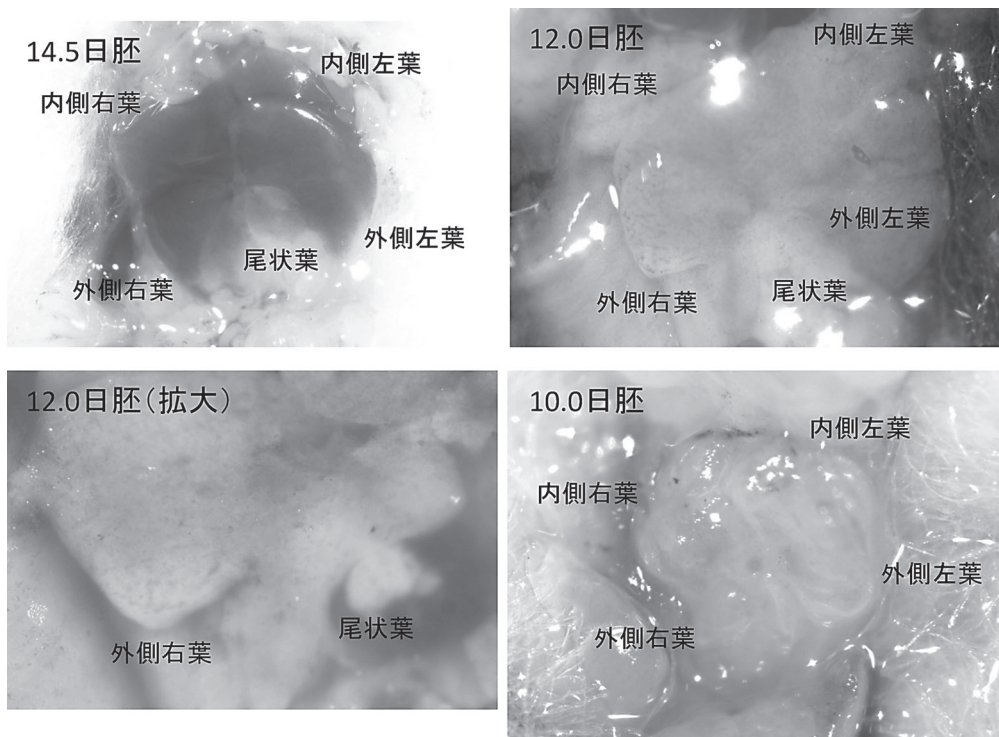


図 2 肝臓の形態

9.5 日胚の肝臓は、分葉が 9.75 日胚以降のものよりもはっきりとしておらず 4 葉に分かれているように見えるが、葉と葉の間の隙間が少なかった。また、4 葉に分かれているとしても、各葉の大きさに大きな違いが見られなかった。9.0 日胚と 8.5 日胚に関しては分葉しているように見えず、肝臓原基の小さな塊が 1 つあるのみのように見えた。

4. 考察

腎動脈と思われる血管系は、12.25 日胚において尾側に存在する後腎に対して上方から分枝することが分かった。さらに後腎に分枝する血管の分岐位置は、13 日胚や 14 日胚と比べて、あまり変化がなかった。分布する組織に最も近い血管系から血液供給されると予想していたが、腎動脈の形成過程は予想と異なっており、腹部大動脈から器官特異的に血管新生を行うメカニズムは不明のままである。

11 日胚では 12.25 日胚において腎動脈が確認された位置に血管形成が確認できなかった。ネフロン等の複雑な構造が認められない後腎間葉に尿管芽が侵入している段階であることや、腹部大動脈から後腎へと侵入する血管が認められなかったことから、11.5 日胚の時点では腎臓への完全な血管形成はできていないことが示唆された。これらより、12 日胚以降において観察された腎動脈は最も初期の腎動脈であり、11.75 ～ 12.25 日胚の間で腎動脈が形成されることが示唆された。新規に腎動脈が腹部大動脈から分岐してくるのか、あるいは元々あった分岐が腎動脈へと変化する等の形成機構が考えられる。

腎動脈の非対称形成という点においては、12.25 日胚から小さな非対称性が観察され始め、12.5 日胚以降において拡大した非対称性が多くの個体で観察されている。この理由としては、発生進行に伴う腹部大動脈の伸長が左右の腎動脈の距離を拡大させていることと、最終的な腎動脈として選択される血管が左右でずれることで非対称性が生じることの、二通りの形成機構が考えられる。また、腎動脈の非対称性が 12 日胚の比較的早期に現れ始める一方で、腎臓自体の非対称性が観察されるのは 14 日胚であり、腎動脈の非対称性が形成されてしばらく時間をおいて腎臓に非対称性が表れることとなっている。よって、元々非対称形成をプログラムされているのは腎動脈のみで、腎臓の非対称性は元々プログラムされておらず腎動脈の非対称形成に加えて他の要因（他の器官の発生等）も絡みながら非対称性が生じてくると考察した。腎静脈は、腎臓自体の非対称によって受動的に非対称性が生じていると考えられた。

5. 今後の展開

本研究により、腎動脈が左右非対称に形成される形態変化の概要をつかむことができた。今後は、左右非対称性が確立される時期の胚の観察数を増やし、腎臓原基と腎動脈の二重染色法や組織切片も利用しながら、その形態変化を詳細に解析していく。Pitx2 変異マウスなど左右軸形成に必須の遺伝子の変異マウスにおける異常な形態変化も確認し、重要な形態変化の現象を明らかにした後、左右非対称に発現する分子の探索を行っていく。

肝臓の非対称な分葉構造については、肝臓原基が発生してきてからどの時点で左右非対称な形態になるのか、尾状葉がいつ分葉してくるのか、詳細に時期を特定したい。左右非対称な形態や分葉構造を規定するのは脈管構造であると予想でき、肝動脈、肝静脈、門脈、胆管と複数ある脈管のうち、どれが一番早くに非対称な形態をとるのかを解析する必要がある。そのためには、染色等で脈管を特異的に可視化あるいは識別する必要がある、最適な観察方法を探索していかなければならない。

また、左右非対称な内臓器官の形態変化を理解するためには、Pitx2の下流の分子機構など左右非対称に発現する分子の解析も必要不可欠である。役割不明の左右非対称に発現するLR1の解析も進めており、左右非対称な内臓器官の形態変化の解析を網羅的に進めていく。

6. 謝辞

本研究の実施にあたり、本学総合生命科学部動物生命医科学科卒業生である、溝口嵩斗さん、木下玲菜さん、浅野千香さんに深く感謝いたします。

7. 参考文献

1. Mugford JW., et al., *Osrl* expression demarcates a multi-potent population of intermediate mesoderm that undergoes progressive restriction to an *Osrl*-dependent nephron progenitor compartment within the mammalian kidney. *Dev Biol.* 2008, 324 (1):88-98.
2. Costa MR., et al., Chapter1:Resident Stem Cells in Kidney Tissue. 2013
3. Nishinakamura R., et al., Murine homolog of *SALL1* is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development.* 2001, 128 (16):3105-15.
4. Higashiyama H., et al., Anatomy and development of the extrahepatic biliary system in mouse and rat: a perspective on the evolutionary loss of the gallbladder. *J Anat.* 2018, 232 (1):134-145.
5. Higashiyama H., et al., Anatomy of the Murine Hepatobiliary System: A Whole-organ-Level Analysis Using a Transparency Method. *Anat Rec (Hoboken).* 2016, 299 (2):161-72.
6. Abdel-Misih SR. and Bloomston M., Liver Anatomy. *The Surgical Clinics of North America.* 2010, 643-653
7. Womble M., et al., The left-right asymmetry of liver lobation is generated by *Pitx2c*-mediated asymmetries in the hepatic diverticulum. *Developmental Biology.* 2018, 439 (2):80-91.
8. Kamiya A. and Gonzalez FJ., *TNF- α* regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices. *Hepatology.* 2004, 40 (3):527-36.
9. Tainaka K., et al., Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization. *Cell.* 2014, 159 (4):911-24.
10. Nojima S., et al., CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Sci Rep.* 2017, 7 (1):9269.

Left-right asymmetric morphogenesis in visceral organs.

Hidetaka SHIRATORI

Abstract

Several visceral organs are left-right (L-R) asymmetrically located in vertebrates. In mouse, the kidney is situated more caudally on the right side than the left. The mouse liver is asymmetrically lobulated. I want to know the mechanism for the generation of L-R asymmetry. I observed the morphogenetic process in the kidney and liver. The renal artery is initially set L-R asymmetrically, and then the kidney and renal vein are subsequently arranged. The asymmetric location of the renal artery is established at embryonic day 12.5~12.75 (E12.5~12.75). The liver primordium shows L-R asymmetry at E9.75. The caudal lobe of the liver is budded from the right lateral lobe at E11.

Keywords : left-right axis, organ morphogenesis, kidney, renal artery, liver