

内臓器官が左右非対称に形態変化する機構

白鳥秀卓

要旨

脊椎動物の内臓器官の多くは、心臓、肝臓など左右非対称である。マウスにおいても、肝臓は5つの葉から成る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。胎生 9.25 日目には、肝憩室が左右非対称性になっていた。胎生 10.5 日目では明らかに4葉に分葉し、尾状葉は以前に観察されたよりも早期である胎生 10.75 日目に確認された。さらに、胎生 9.5 日および胎生 9.75 日目の肝憩室を切片で観察した結果、肝芽細胞の配置が左右で異なっていることがわかった。このように、マウス肝臓原基は分葉する前の初期の段階ですでに左右非対称性を獲得していることが明らかになった。

キーワード：左右軸、器官形成、マウス胚、肝臓、分葉構造、

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の形成機構を解明したい。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 が重要な役割を担うことや、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。

肝臓は、左右非対称な分葉構造をとっている。マウスの肝臓は、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。尾状葉は十二指腸を挟んで尾状突起と乳状突起の2つに分岐し、それぞれ異なった大きさと形態を示す。また、外見の形態だけでなく、肝臓内部の脈管構造についても左右非対称な形態を示す。脈管の左右非対称な分岐パターンは哺乳動物間で保存されているため、ヒトの肝胆道系を研究するための実験モデルとして

も使われる [1]。

アフリカツメガエルにおける肝臓発生の研究では、左側特異的に発現する Pitx2 によって肝憩室の上皮細胞が左右で異なった形態になることが、最終的に肝臓の左右非対称性をもたらすと示唆されている [2]。しかし、Pitx2 が発達中の肝臓の形態形成を調節するメカニズムはよく分かっておらず、肝臓に近接した他の器官が肝臓の非対称性に関係しているかどうかも分かっていない。

マウスでは、胎生 8.0 日目 (7~8 体節期) までに将来の肝臓になる内胚葉部分が特定され、発達中の心臓に隣接して前腸内胚葉の腹側から突出する。突出した前腸内胚葉は、心臓からのシグナルを受けて胎生 8.5 日~9.0 日目 (10~12 体節期) までに肝芽を形成する。そして胎生 9.5 日目 (15~20 体節期) までに肝芽を囲む基底膜が失われ、肝芽細胞が索状になって横中隔間充織に侵入し、肝臓原基を形成することが分かっている [3,4]。肝臓は、器官形成中に体腔内で非対称に位置するようになり、各葉の大きさや形態も左右で異なるようになるが、その左右非対称性がいつ頃から、またどのように現れるのかは分かっていない。本研究では、マウス初期肝臓原基の形態を解析し、肝臓の左右非対称性が現れる時期を特定した。

2. 材料と方法

2.1 マウス

実験に使用したマウス胚は、ICR 系統の妊娠マウスから各ステージにあたる時期に回収して使用した。

またマウスを用いた各動物実験は、京都産業大学動物実験規定に準じて適正に行った。

2.2 Whole mount 免疫染色

回収した胚を 4%PFA で 2 時間程度固定した後、1.0% Triton in PBS (PBS-T) で 1 時間 2 回洗浄し、さらに PBS-T 内で 12 時間以上洗浄した。今回は発色酵素にペルオキシダーゼ (HRP) を用いたため、内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキングを 0.3% H_2O_2 と 0.1% NaN_3 で行った。まず、0.3% H_2O_2 で 1 時間処理した後、PBS-T で洗浄した。その後 0.1% NaN_3 を含有する skim milk (5% skim milk/0.1% NaN_3 in 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。次に、1 次抗体を 1/200 の割合で加え 36 時間以上反応させた。PBS-T で洗浄後、2 次抗体のホスト動物の血清を含む PBS 中に 2 次抗体を 1/200 の割合で加え、12 時間以上反応させた。PBS-T で洗浄後、ABC kit (Vector Laboratories) の Reagent A を 12 時間以上反応させ、PBS-T で洗浄後、Reagent B を 12 時間以上反応させた。PBS-T で 1 時間 2 回洗浄し、さらに PBS-T で 36 時間以上洗浄した。発色基質は DAB (0.6g/ml in 50mM Tris buffer pH7.5 + 0.03% H_2O_2) を用いた。組織に試薬を浸透させるために、DAB を加えた 50mM Tris buffer pH7.5 内で 10 分程度おいてから、0.03% H_2O_2 を添加した。

肝臓の可視化には、肝芽細胞に特異的な抗 Liv2 抗体 (MBL, D118-3) を用いた。二次抗体はビオチン標識 Rat IgG 抗体 (Vector Laboratories, BA-9400) を用いた。

3. 結果

3.1 マウス胚肝臓の形態観察

実体顕微鏡下で胎生 8.75 日～18.5 日目の肝臓の観察を行った。胎生 9.5 日目より大きい発生ステージでは肝臓の形態を観察することができた (図 1)。胎生 9.5 日目に心臓と腸管の間に肝臓原基が出現した。胎生 9.5 日および胎生 9.75 日目では、肝臓は分葉していなかった (図 1 a, b)。胎生 9.5 日目では左右差はなかったが、胎生 9.75 日目では肝臓原基の塊の左側がやや大きく感じた。

胎生 10.5 日目になると、肝臓は将来外側の葉になる小さな 2 つの葉と内側の葉になる大きな 1 つの葉の 3 葉に分葉した。大きな葉には左右間にくびれがあった。外側の左右の葉には明らかな違いがあり、右側 (将来の外側右葉) は丸い形態を示すのに対して、左側 (将来の外側左葉) は細長い形態を示した (図 1 c)。胎生 10.75 日目では、尾状葉が外側右葉から分岐して現れた (図 1 d)。ステージが進むにつれて内側の左右間にくびれは大きくなり、尾状葉は拡大していった。胎生 11.5 日目になると、明らかに 5 つの葉に分葉していることを確認した (図 1 e)。5 つの葉に分葉してから胎生 18.5 日目 (誕生日前日、新生仔と同じ形態を示す) までの間、徐々に各葉の丸みは無くなり、大きくなっていった (図 1 f-h)。胎生 12.5 日目では、尾状葉はさらに 2 つに分岐していた (図 1 i)。

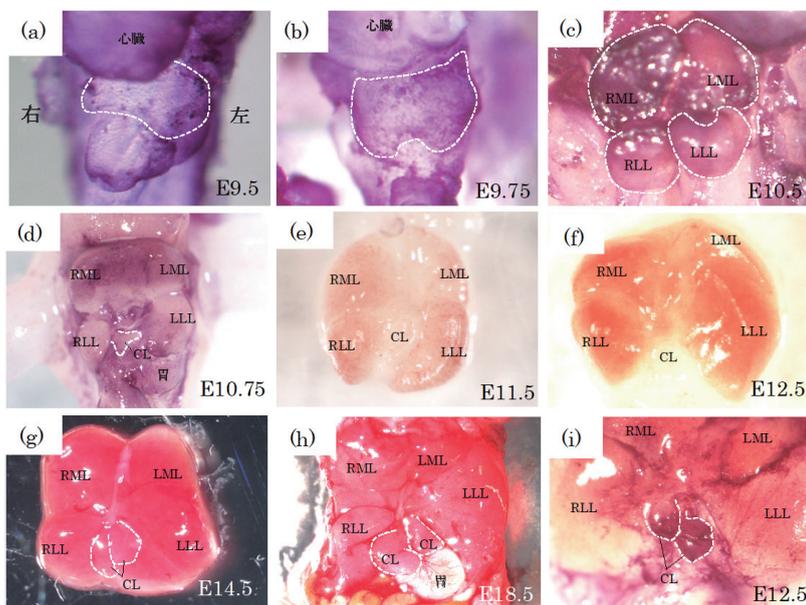


図 1. 肝臓の観察

マウス胎生 9.5 日(E9.5)～18.5 日目(E18.5)の肝臓の写真。全て腹側から観察した。(a)および(b)は吻側から観察した (点線: 肝臓原基)。(c)～(i)は内側右左葉を尾側から見えるように持ち上げて、外側右左葉を吻側から見えるようにして観察した (c の点線: 内側右左葉および外側右左葉、d,g,h,i の点線: 尾状葉)。

LLL: 外側左葉(Left lateral lobe), LML: 内側左葉(Left medial lobe),
RLL: 外側右葉(Right lateral lobe), RML: 内側右葉(Right medial lobe),
CL: 尾状葉(Caudate lobe)

3.2 免疫染色による肝臓原基の可視化

早期の肝臓原基の形態を詳細に観察するために、胎生 8.75 日～9.75 日目のマウス胚肝臓を、whole mount 免疫染色によって可視化した。肝芽細胞を標識するために、マウス肝芽細胞に特異的な Liv2 抗体を用いた。Liv2 抗体による免疫染色の結果、肝臓原基および卵黄囊静脈が特異的に染まった。

観察をした最小のステージである胎生 8.75 日目で、心臓の直下に肝臓原基と思われる Liv2 陽性細胞の塊を観察した (図 2 a)。胎生 9.25 日目まで肝臓原基は球形を保ちながら大きくなった (図 2 b)。胎生 9.25 日目では、肝臓原基がわずかに左側に偏って位置していた (図 2 b')。胎生 9.5 日目から肝臓原基は左右軸方向に楕円形に広がり (図 2 c)、胎生 9.75 日目まで肝臓原基のサイズは拡大していった (図 2 d)。

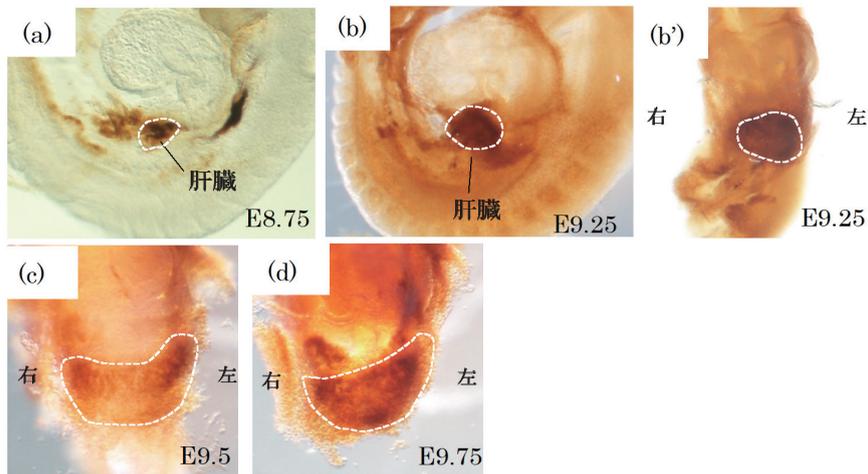


図 2. 免疫染色による肝臓の観察

Liv2(Mouse)抗体を用いて、免疫染色を行った。(a)(b)は左側から、(b')(c)(d)は右側から観察した。点線で囲まれた部分は肝臓原基を示す。

3.3 肝臓原基の組織切片解析

whole mount 免疫染色を行なったマウス胚の組織切片を作成し、Liv2 陽性の肝芽細胞がどのように肝臓原基を形作っているのか観察した。腸管の突出部分の先端に並ぶ肝芽細胞は胎生 9.5 日目で左右に楕円形に広がり、肝憩室を形成していた。肝憩室の右側に位置する肝芽細胞は層になり、左側に比べて分厚い形態を示した。一方、肝憩室の左側は右側よりも層が薄く、その代わりに肝芽細胞がより遠くまで広がっていた (図 3 a 矢印)。胎生 9.75 日目では、肝臓原基は腸管から剥離し、横中隔の中で肝芽細胞が集まって塊となっていた。この時、肝臓原基の右側が左に比べて大きくなっているように見えた。一方、肝臓原基の位置は whole mount で観察した時と同様に、体の左側に偏っているように見えた (図 3 b)。このように、組織切片でも、胎生 9.5 日および胎生 9.75 日目の肝憩室が左右軸方向に成長している様子が観察され、左右で肝芽細胞の配置が異なっていることがわかった。

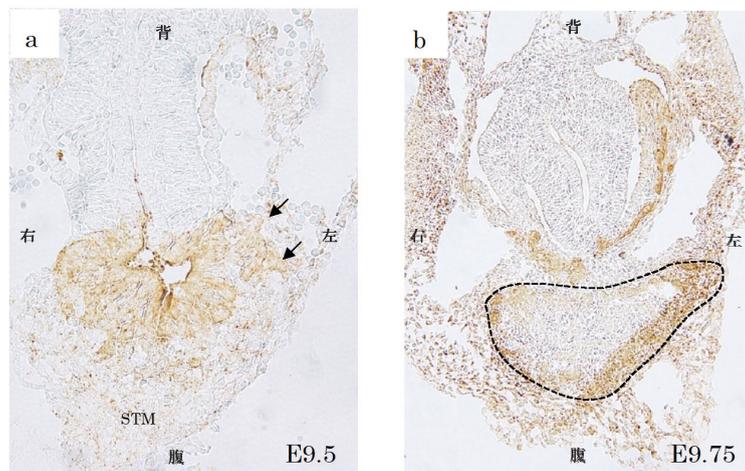


図3. 肝臓原基の切片画像

Liv2 抗体で whole mount 免疫染色をした胎生 9.5 日目 (E9.5, a) および胎生 9.75 日目 (E9.75, b) の横断切片。a の矢印は左側に広がった肝芽細胞を示す。b の点線は肝臓原基を示す。STM: 横中隔間充織 (Septum transversum mesenchyme)

E9.75 の切片画像では、肝臓原基の中心部に Liv2 陽性細胞が無いように見えるが、Whole mount 免疫染色を行なった胚を切片化したので、肝臓原基の中心部にまで抗体が浸透していなかったためだと考えている。

4. 考察

胎生 9.5 日から胎生 18.5 日目までの肝臓の形態観察の結果、胎生 9.5 日目までにマウス胚の肝臓が形作られ、同時に非対称な形態を示していた。胎生 10.5 日目では、外側右葉と外側左葉は明らかに独立しているが、内側右葉と内側左葉は一つの大きい葉として出現し、その後に左右間のくびれが成長するにつれて大きくなることによって、右葉と左葉に分葉していくようである。外側右葉と外側左葉の形態的特徴は明らかに異なり、肝臓の分葉構造の左右非対称性が胎生 10.5 日目までの間に確立されることが明らかになった。さらに、胎生 10.5 日目までには見られなかった尾状葉が胎生 10.75 日目で外側右葉から分岐するようにして現れたことから、尾状葉が他の 4 葉が発生した後に遅れて発生するということも明らかになった。

Whole mount Liv2 免疫染色による観察および組織切片による観察から、肝臓の左右非対称性は胎生 9.25 日目では確立し、胎生 9.75 日目までに肝臓原基の右側が左側に比べて大きくなることが明らかになった。このように、初期の肝臓において左側の領域が大きくなることは、マウスの成体で肝臓の外側左葉が一番大きい形態をとることの起源であるのかもしれない。また、初期の肝臓において、肝芽細胞の配置の左右差が見られたことから、肝臓原基が非対称に形成される過程には肝芽細胞の形態や細胞増殖の左右差が関与していると考えている。しかし、今回の実験では細胞レベルでの観察を十分に行うことができなかった。肝臓が肝憩室として形態を成している胎生 9.0 日～9.5 日目の肝芽細胞の左右の形態の違いや、配置の仕方をより詳細に解析することで肝臓原基の左右非対称性につい

て理解が進むと考える。

5. 今後の展開

肝臓原基の左側の領域が大きくなった原因は、左側の肝芽細胞が右側よりも遠くまで分布していたことだった。この肝芽細胞の配置が E9.5 までにどのようにして確立したのかは今回解析できなかったため、発生ステージを遡って観察することが必要である。

肝臓の分葉構造の左右非対称性については、脈管構造が関与している可能性も考えられる。肝臓に出入りする血管系として肝動脈、肝静脈、門脈があるが、特に肝臓の栄養血管として機能する肝動脈の走行を解析することは肝臓の分葉の左右非対称性を考える上で重要かもしれない。左右非対称性形成に関わる *Pitx2* の発現は肝臓の形態形成中、肝憩室を囲んでいる左側板中胚葉由来の横中隔間充織 (STM) に限定されており、本来なら左側特異的に発現している *Pitx2* を STM の左右両方に発現させると肝臓の分葉に異常が生じるという報告がある [2]。従って、肝臓の左右差を形成する原因は、血管の走行だけでなく、STM も深く関わっていると考えられ、今後は肝臓と STM の関連性も解析する必要がある。これまで明らかにされてこなかった肝臓周囲の中胚葉や将来肝臓の血管を形成する内皮細胞との関係性および肝動脈の走行を調べることは、今後の理解をさらに深めるだろう。さらに、*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。

近年の再生医学の進歩に伴い、器官を3次元に正しく構築する機構の解明の重要性は高まっており、臨床への応用面からも、はじめは左右対称にできる器官が左右非対称な形態や配置をとる機構を明らかにする必要性も一層高まっている。さらに、形態の左右差だけでなく、形態やその形成過程の違いから生まれる機能的左右差が存在する可能性を考え、機能的左右差の探索を行うことで、今後のよりよい医療へ応用していきたい。

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玉田若菜美さんに深く感謝いたします。

7. 参考文献

1. 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.
2. 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.

3. Roong Zhao R and Duncan SA, Embryonic development of the liver. *Hepatology*. 2005, 41 (5) :956-67.
4. Crawford LW., et al., Histology atlas of the developing mouse hepatobiliary system with emphasis on embryonic days 9.5-18.5. *Toxicol Pathol*. 2010, 38 (6) :872-906

Mechanism of 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 liver is asymmetrically lobulated. To know the mechanism for the generation of L-R asymmetry, we observed the morphogenetic process in the liver. The liver primordium shows L-R asymmetry at embryonic day 9.25 (E9.25) and is divided into 4 lobes at E10.5. The caudal lobe of the liver is budded from the right lateral lobe at E10.75. By histological observation of the embryo sections, it was shown that the hepatoblasts are L-R asymmetrically situated at E9.5~E9.75.

Keywords: left-right axis, organ morphogenesis, mouse embryo, liver, lobulation