

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22132006

研究課題名（和文）内外生殖器の性差構築

研究課題名（英文）Development of sexual difference in the external-internal genitalia

研究代表者

山田 源（Yamada, Gen）

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授

研究者番号：80174712

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 134,500,000円

研究成果の概要（和文）：アンドロゲンが作用するエフェクター遺伝子として転写因子MafBを同定した（PNAS, 2014）。また性差構築制御遺伝子の下流候補遺伝子が得られた。さらに骨盤における性差形成機構（Endocrinology, 2014）や前立腺の過形成の発症機構を明らかにした（Endocrinology, 2014）。また、胎生中期でのMafB遺伝子の発現誘導について、エピジェネティックな制御が関与している事が示唆された。この事から男性ホルモンが作用する以前のクロマチンを操作する事により、MafB等の人為的な発現制御が可能になる事が推察され、今後性的な可逆性の解析について手がかりを得た。

研究成果の概要（英文）：Significant achievements about mechanisms for sexual differences in reproductive organ formation were obtained (GT). We identified Wnt signal regulating sexual differences of external genitalia and identified a regulatory gene, Mafb (PNAS, 2014). Mafb KO male GTs exhibit defective urethral formation like the cases for hypospadias. We also identified gene functions related with early WD formation (Endocrinology, 2014, D B. 2015). We further identified P63 as downstream in such epithelia (Endocrinology, 2014). We also found that Bmp (Bone morphogenic protein) as playing important roles for prostate (Endocrinology, 2014). We identified mechanisms regulating male type of muscle formation (Endocrinology, 2014). We gave symposium talk at Endocrinology meeting in U.S., Gordon Conference, European DSD. In sum, future perspectives for sexual regulation, sexual plasticity is obtained.

研究分野：生殖発生学

キーワード：性差 外生殖器 MafB 男性ホルモン アンドロゲンレセプター(AR) 生殖

### 1. 研究開始当初の背景

性差を示す内外生殖器官の発達は、性ホルモン(主にアンドロゲン)によって制御される。申請者は、生殖器官初期発生プロセスを解析し、細胞増殖因子のWnt系、Bmp(骨形成因子)系等が関与する、生殖器形成の分子基盤を明らかにした。

これまでの知見から、内外生殖器形成が性ホルモン依存的メカニズムと、それら以外の遺伝的因子に依存するメカニズムによって制御され、Wnt/カテニンが後者の因子として機能すると推測された。そこで、後者を性差制御のエフェクター分子と呼び、さらに性ホルモンとエフェクター分子間の協調的な制御機構を解明することで、内外生殖器の性差形成機構を体系的に理解出来ると考えた。

### 2. 研究の目的

性ホルモン系とエフェクター因子各々の過程とその相互作用の多くは、不明である。本研究は、それらの制御機構と、その関係を体系的に理解し、内外生殖器官の性差構築メカニズムを明らかにする。そのためにエフェクター分子の同定と機能解析を実施する。

### 3. 研究の方法

胎児外生殖器の性差が顕著になる時期直前にWhole RNASeq法等によって性差制御エフェクター遺伝子のスクリーニングを行い転写因子等を探索した。MafBのアンドロゲン応答性を検討する為に妊娠マウスへの同シグナル阻害実験等を行った。GFPをノックインしたマウスについて筑波大学、高橋博士らと外部生殖器の性差を構築する間葉細胞からFacsソーティングを行った。エフェクター遺伝子の下流分子の同定の為、ソーティングした細胞を用いてヘテロ接合体及びホモ接合体でトランスクリプトの比較を行い、MafB遺伝子の下流候補遺伝子を抽出した。MafB遺伝子の上流については抗AR抗体を用いたChIP解析により同遺伝子を制御する制御エレメントにARが結合するかを検討した。

### 4. 研究成果

マウス外生殖器発生過程においてアンドロゲンの下流因子の探索を行い、転写因子であるMafB遺伝子を同定した(PNAS,2014)。MafBはアンドロゲンの下流遺伝子ある可能性が想定された。MafBが発現しない雌外生殖器においてもアンドロゲン暴露によりその発現が誘導された。さらに、雄ARノックアウトマウスにおけるMafBの発現が著しく低下していた事から、MafBが、アンドロゲンの下流遺伝子である事が示唆された。次に外生殖器形成過程における機能を検証するため、同ノックアウトマウス(MafB KOマウス)の解析を行った。雄MafB KOマウスは雄特有の尿道が形成されないことが判明し、MafBはアンドロゲンの下流の雄化エフェクター分子であることが示唆された。また、外生殖器の先天性疾患として尿道下裂が問題となっている。その発症率は増加傾向にあるが発症メカニズムはほとんどわかっていない。雄MafB KOマウスに観られる尿道形成異常は、尿道下裂症に類似していた。次世代シーケンサーによるin vivo ChIP-seqや尿道形成過程のライブイメージングなど新たな解析系を確立し、現在解析を進めている。近年、環境由来の因子群(内分泌攪乱物質等)の作用により雌雄外生殖器の形成が攪乱や阻害される事が知られている。このような因子群の作用によって胎児のエピゲノムが修飾され、外生殖器の形態異常が次世代に渡って観察される事も報告された。本研究の成果を受けてMafB等のエフェクター遺伝子の制御エレメントを介した遺伝子発現解析を行いつつある。その結果、性差構築の為にエフェクター遺伝子の発現制御が厳密に制御され、そのエピゲノムが外因子によって修飾され、これらの因子の発現が攪乱される事も現在示唆されつつある。このように性差構築過程とその異常についてさらに解析する成果を得た。

## 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 32件)

2015年

1. Tissue-specific roles of FGF signaling in external genitalia development.

Harada M, Omori A, Nakahara C, Nakagata N, Akita K, \*Yamada G.

*Dev Dyn.* Doi.24277, 2015, 査読有

2. Region-specific regulation of cell proliferation by Fgf receptor signaling during the Wolffian duct development.

Okazawa M, Murashima A, Harada M, Nakagata N, Noguchi M, Morimoto M, Kimura T, Ornitz D and \*Yamada G.

*Dev Biol*, 400(1),139-47, 2015, 査読有

3. Unique Roles of Estrogen-Dependent Pten Control in Epithelial Cell Homeostasis of Mouse Vagina.

Miyagawa S, Sato M, Sudo T, Yamada G and Iguchi T.

*Oncogene*, 34(8),1035-43, 2015, 査読有

2014年

4. Non-myocytic androgen receptor regulates the sexually dimorphic development of the embryonic bulbocavernosus muscle.

Ipulan LA, Suzuki K, Sakamoto Y, Murashima A, Imai Y, Omori A, Nakagata N, Nishinakamura R, Valasek P and \*Yamada G.

*Endocrinology*, 155(7),2467-79, 2014, 査読有

5. Sexually dimorphic expression of Mafb regulates masculinization of the embryonic urethral formation.

Suzuki K, Numata T, Suzuki H, Raga DD, Ipulana L, Yokoyama C, Matsushita S, Hamada M, Nakagata N, Nishinakamura R, Kume S, Takahashi S and \*Yamada G.

*PNAS*, 111, 16407-16412, 2014, 査読有

6. Androgens and mammalian male reproductive tract development.

Murashima A, Kishigami S, Thomson A and \*Yamada G.

*Biochimica et Biophysica Acta*, pii: S1874-9399, 00126-6, 2014, 査読有

7. Essential roles of epithelial bone morphogenetic protein signaling during prostatic development.

Omori A, Miyagawa S, Ogino Y, Harada M, Ishii K, Sugimura Y, Ogino H, Nakagata N and \*Yamada G.

*Endocrinology*, 155, 2534-2544, 2014, 査読有

8. Disruption of the Temporally Regulated Cloaca Endodermal  $\beta$ -catenin Signaling Causes Anorectal Malformations.

Miyagawa S, Harada M, Matsumaru D, Tanaka K, Inoue C, Nakahara C, Haraguchi R, Matsushita S, Suzuki K., Nakagata N, Ng RC, Akita K, Lui VC and \*Yamada G.

*Cell Death Differentiation*, 21, 990-997, 2014, 査読有

9. Dysregulation of Wnt Inhibitory Factor 1 (Wif1) expression resulted in aberrant Wnt- $\beta$ -catenin signaling and cell death of the cloaca endoderm, and anorectal malformations.

Ng RC, Matsumaru D, Ho A, Garcia-Barcelo MM, Yuan ZW, Smith D, Kodjabachian L, Tam P, Yamada G and Lui VC.

*Cell Death Differentiation*, 21, 978-989, 2014, 査読有

10. Development of the External Genitalia and its Sexual Dimorphic Regulation.

Ipulan LA, Suzuki K, Matsushita S, Suzuki H, Okazawa M, Jacinto S, Hirai S and \*Yamada G.

*Sexual Development*, 8, 297-310, 2014, 査読有

2013年

11. Midline-derived Shh regulates mesonephric tubule formation through the paraxial mesoderm.

Murashima A, Akita H, Okazawa M, Kishigami S, Nakagata N, Nishinakamura R and \*Yamada G.

*Dev Biol*, 386, 216-226, 2013, 査読有

12. Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka.

Ogino Y, Hirakawa I, Inohaya K, Sumiya E, Yamada G and Iguchi T.

*Endocrinology*, 155, 449-462, 2013, 査読有

13. Genetic analysis of the role of Alx4 in the coordination of lower body and external genitalia formation.

Matsumaru D, Haraguchi R, Anne M. Moon, Satoh Y, Nakagata N, Yamamura K, Takahashi N, Kitazawa S and \*Yamada G.

*Eur J Hum Genet*, 22, 350-357, 2013, 査読有

14. Ectopic Expression of Ptf1a Induces Spinal Defects, Urogenital Defects, and Anorectal Malformations in Danforth's Short Tail Mice.

Semba K, Araki K, Matsumoto K, Suda H, Ando T, Sei A, Mizuta H, Takagi K, Nakahara M, Muta M, Yamada G, Nakagata N, Iida A, Ikegawa S, Nakamura Y, Araki M, Abe K and Yamamura K.

*PLoS Genet*, 9, e1003204.1003204, 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003204, 査読有

15. Beta-catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation.

Villacorte M, Suzuki K, Hirasawa A, Ohkawa Y, Suyama M, Maruyama T, Aoki D, Ogino Y, Miyagawa S, Terabayashi T, Tomooka Y, Nakagata N and \*Yamada G.

*Oncogene*, 32, 3477-3482, 2013, 査読有

2012年

16. Reduced BMP signaling results in hindlimb fusion with lethal pelvic/urogenital organ aplasia: a new mouse model of sirenomelia.

Suzuki K., Adachi Y., Numata T., Nakada S., Yanagita M., Nakagata N., Evans M.S., Graf D., Economides A., Haraguchi R., Moon M.A. and \*Yamada G.

**PLoS ONE**, 7(9):e43453.0043453, 2012, 査読有

17. The Hedgehog Signal Induced Modulation of Bone Morphogenetic Protein Signaling: An Essential Signaling Relay for Urinary Tract Morphogenesis.

Haraguchi R., \*Matsumaru D., Nakagata N., Miyagawa S., Suzuki K., Kitazawa S and \*Yamada G.

**PLoS ONE**, 7(7):e42245.0042245, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042245, 査読有

18. Human chorionic gonadotropin induces human macrophages to form intracytoplasmic vacuoles mimicking Hofbauer cells in human chorionic villi.

Yamaguchi M., Ohba T., Tashiro H., Yamada G., and Katabuchi H.

**Cells Tissues Organs**, 197, 127-135, 2012, 査読有

19. Functional analysis of ectodermal -catenin during external genitalia formation.

Mazahery A., Suzuki K., Nagafuchi A., Miyajima M., Nakagata N., Behringer R and \*Yamada G.

**Congenital Anomalies**, 53, 34-41, 2012, 査読有

20. The Regulation of Endogenous Retinoic Acid Level Through CYP26B1 Is Required for Elevation of Palatal Shelves.

Okano J., Kimura W., Virginia E., Papaionnou, Miura N., Yamada G., Shiota K and Sakai Y.

**Dev Dyn** 241, 1744-1756, 2012, 査読有

2011年

21. Sonoporation for gene transfer into embryos.

Ohta S., Yukiko O., Suzuki K., Kamimura M., Tachibana K and \*Yamada G.

**Cold Spring Harb Protoc.**, 3, prot5581, 2011, 査読有

22. The role of Sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia.

Miyagawa S., Matsumaru D., Murashima A., Omori A., Satoh Y., Haraguchi R., Motoyama J., Iguchi T., Nakagata N., Chi-chung Hui and \*Yamada G.

**Endocrinology**, 152, 2894-903, 2011, 査読有

23. Essential functions of androgen signaling emerged through the developmental analysis of vertebrate sex characteristics.

Ogino, Y., Miyagawa, S., Katoh, H., Prins, G. S., Iguchi, T. and \*Yamada G.

**Evol. Dev.**, 13, 315-325, 2011 (review)

24. Epithelial Bmp (Bone morphogenetic protein) signaling for bulbourethral gland development: A mouse model for congenital cystic dilation.

Omori A., Harada M., Ohta S., Villacorte M., Sugimura Y., Shiraishi T., Suzuki K., Nakagata N., Ito T. and \*Yamada G.

**Congenit Anom.**, 51, 102-109, 2011 (review), 査読有

25. Retinoic acid signaling regulates Sonic hedgehog and Bone morphogenetic protein signalings during genital tubercle development.

Liu L., Suzuki K., Nakagata N., Mihara K., Matsumaru D., Ogino Y., Yashiro Y., Hamada H., Liu X., Evans S., Mendelsohn C. and \*Yamada G.

**Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, doi:10.1002 bdrb.20344, 2011, 査読有

26. Hic-5 deficiency enhances mechanosensitive apoptosis and modulates vascular remodeling.

Kim-Kaneyama JR., Takeda N., Sasai A., Miyazaki A., Sata M., Hirabayashi T., Shibamura M., Yamada G. and Nose K.

**J Mol Cell Cardiol.**, 50, 77-86, 2011, 査読有

27. Genetic Analysis of Hedgehog Signaling in Ventral Body Wall Development and the Onset of Omphalocele Formation.

Matsumaru D., Haraguchi R., Miyagawa S., Motoyama J., Nakagata N., Meijlink F. and \*Yamada G.

**PLoS ONE**, 20, e16260, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016260. 査読有

28. Essential Roles of Androgen Signaling in Wolffian Duct Stabilization and Epididymal Cell Differentiation.

Murashima A., Miyagawa S., Ogino Y., Nishida-Fukuda H., Araki K., Matsumoto T., Kaneko T., Yoshinaga K., Yamamura K., Kurita T., Kato S., Moon M.A. and \*Yamada G.

**Endocrinology**, 152, 1640-1651, 2011 (Faculty of 1000 Medicine 掲載), 査読有

2010年

29. Antagonistic crosstalk of Wnt/beta-catenin/Bmp signaling within the Apical Ectodermal Ridge (AER) regulates interdigit formation.

Villacorte M., Suzuki K., Hayashi K., Chuva de Sousa-Lopes S., Haraguchi R., Taketo MM, Nakagata N and \*Yamada G.

**Biochem Biophys Res Commun.**, 391, 1653-1657, 2010, 査読有

30. Adenoviral oncolytic suicide gene therapy for a peritoneal dissemination model of gastric cancer in mice.

Inamura Y., Ishikawa S., Sato N., Karashima R., Wiyoshi Y., Nagai Y., Koga Y., Hayashi N., Watanabe M., Yamada G. and Baba H.

**Ann Surg Oncol.**, 17, 643-652, 2010, 査読有

31. The cessation of gastrulation BMP signaling and EMT during and at the end of gastrulation.

Ohta S, Schoenwolf GC and \*Yamada G.  
Cell Adhesion and Migration, 4,1-7, 2010, 査読有

32. Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency.

Fukami M, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Takitani K and Ogata T.  
Mol Genet Metab., 100, 269-273, 2010, 査読有

〔学会発表〕(計 9件)  
主に参加した学会

2014年

1. “How to make boys/girls at organ level a unique research? Or a good model system for mouse researches?” / Gen Yamada.

BRC 国際マウスサマースクール

理研バイオリソースセンター 理化学研究所、埼玉、2014.7.28.-29. (招待講演)

2. “Assay for the novel target of androgen signaling regulating reproductive tract for masculinization” / Aki Murashima.

新学術領域研究「性差構築」若手研究者 / Young Scientist Meeting for Mechanism of Sexual Differentiation.

熱海伊豆山温泉ハートピア熱海

静岡、2014.12.9-10. (代表及び主催 山田源)

2013年

3. “Molecular Mechanisms for Masculinization of External genitalia” / Gen Yamada.

The Endocrine Society 's 95<sup>th</sup> Annual society 2013.

The Moscone Center in San Francisco California, San Francisco, USA, 2013.6.15-18. (招待講演)

4. 「形態的性差を生み出す分子メカニズムの解明～アンドロゲンシグナルの標的遺伝子の探求～」 / 鈴木堅太郎

前立腺上皮細胞分化におけるBmpシグナルの機能解析 / 大森晶子

日本アンドロロジー学会 第32回学術大会ならびに総会

大阪グランキューブ(大阪国際会議場)

大阪、2013.7.26～27. (代表及び大会長 山田源)

2012年

5. “The hunt for sexual dimorphism and coordinated caudal embryonic development” / Gen Yamada.

Seminar at MPI for Biophysical Chemistry マックスプランク研究所

Goettingen, Germany, 2012.2.20 (招待講演)

6. “Integrated Hedgehog signals in urogenital/reproductive organ formation. Hedgehog Signaling in Development

Evolution and Disease” / Gen Yamada.

国際ヘッジホッグミーティング

Auditorium, Level 2, Matrix 30, Biopolis st. Matrix

Biopolis, Singapore, 2012.3.20. (招待講演)

7. 「性差形成遺伝子とヒト疾患の関連性について」 / Gen Yamada.

Luebeck 大学 医学部

Luebeck, ドイツ 2012.02.21 (招待講演)

2010年

8. “Integrated growth factor signaling regulates urogenital/reproductive organ formation; a general hint to think about organ development” / Gen Yamada.

The 4<sup>th</sup> AFLAS Congress meeting

Taipei International Convention Center,  
Taipei, Taiwan, 2010.11.10. (招待講演)

9. “ Signaling pathways for external  
genitalia development ” / Gen Yamada.  
GRC (Gordon Research Conferences)  
Reproductive Tract Biology  
Proctor Academy, Andover, USA, 2010.8.16  
(招待講演)

〔図書〕(計 3件)

2013年

1. 「 The Masculinization Programming  
Window」  
Michelle Welsh, Hiroko Suzuki, Gen Yamada  
Endocr Dev 9;27:17-27. 2014

2011年

2. 「 Molecular Mechanisms of Androgen  
Signaling: New Insight for Sexual  
Differentiation in Organ Development、ア  
ンドロゲンシグナルの性差構築機構：器官形  
成における性差発現の新次元」  
村嶋亜紀、宮川信一、荻野由紀子、中潟直己、  
山田源  
**細胞工学**, 30, 856-862, 2011

2010年

3. Wnt, FGF の三大増殖因子の相互作用：器  
官が伸長する（大きくなる）ためにどのよう  
なりレーが必要か」  
宮川信一、原田理代、原口竜摩、鈴木堅太郎、  
中原千彰、松丸大輔、金子武人、中潟直己、  
山田源  
**細胞工学** vol.29 No.2 144, 2010

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/english/undergraduate/medicine/genetics.html>

[https://www.researchgate.net/profile/Gen\\_Yamada/](https://www.researchgate.net/profile/Gen_Yamada/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 源 (Gen Yamada)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授

研究者番号：80174712

(2)研究分担者

(3)連携研究者

鈴木 堅太郎 (Kentaro Suzuki)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：20404345