

令和元年6月8日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08436

研究課題名(和文) 膣発生を制御する新規分子Cxxc5の機能解明

研究課題名(英文) Analyses of Cxxc5 functions during vaginal development

研究代表者

原田 理代 (Harada, Masayo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80555756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：先天性膣欠損症は不妊の原因であり症例が多く報告されているが、先天性膣欠損症の病態解析や膣発生機構に関する知見は少ない。本研究は、Cxxc5欠損マウスの膣形成不全がどのようなメカニズムで発症するのかを解析することで、Cxxc5が関与する新たな膣発生機構を明らかにすることを目的とした。Cxxc5は雄性生殖管原基である中腎管と雌性生殖管原基である中腎傍管の両方で発現しているが、中腎傍管で発現するCxxc5が将来膣になる中腎傍管下端部の伸長に必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性膣欠損症の発症機序について、左右中腎傍管の伸長途中停止により左右の中腎傍管が中央で合せず膣が形成されず開口しないことを明らかにした。また、先天性膣欠損症の一因がCxxc5の機能欠失である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Congenital vaginal defects are the causes of infertility. Many cases of vaginal defects have been reported, but there is little study about the pathological analyses of congenital vaginal defects and the mechanisms of vaginal development. The present study aimed to clarify the molecular mechanisms involving Cxxc5 of vaginal development. Cxxc5 was expressed in Mullerian ducts and Wolffian ducts. The current study revealed that Cxxc5 in Mullerian ducts are necessary for the extension of the lower end of Mullerian ducts which become vagina.

研究分野：発生生物学

キーワード：膣 中腎傍管 Cxxc5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性膻欠損症は不妊の原因になる。膻は中腎傍管を胎生原基とする。膻と同様に中腎傍管から形成される子宮に関しては、その形態形成に Hox、Wnt、Lim、Pax などの分子が関与することが報告されてきた (Kobayashi and Behringer. Nature Review 2003)。しかしながら一方で、子宮の下部に形成される膻に関しては、分子メカニズムを含めた発生機構について未解明な部分が多い。

CXXC5 たんぱく質は Zinc fingers CXXC-type 遺伝子ファミリーの1つで、細胞を用いた研究により、クロマチン脱アセチル化、p53 の活性化、骨髄造血、筋細胞分化等に関与すると報告されている。また、Cxxc5 欠損マウスを用いた解析により、CXXC5 が骨芽細胞分化を負に抑制すること (Kim et al., Cell Death Differ 2015)、皮膚創傷治癒を負に制御すること (Lee et al., J Exp Med 2015) が報告されている。申請者らは、CXXC5 が中腎管と中腎傍管において強く発現していることを見だし、Cxxc5 欠損マウスを作成したところ、雄マウス、雌マウス共に不妊になることが判明した。Cxxc5 欠損雌マウスは膻が開口しないため不妊になることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では、Cxxc5 欠損雌マウスの膻が開口しない機序を解明することで、膻の発生機構を明らかにすることを目的とした。本研究により、膻欠損症の発症機序が明らかになる可能性があり、ヒト女性不妊に対する検査・治療への基盤知識を提供することを期待して取り組んだ。具体的には以下の4項目の解明を目的とした。

- (1) 膻発生過程における Cxxc5 の発現を明らかにする
- (2) Cxxc5 欠損マウスの膻形成不全発症過程を明らかにする
- (3) 組織特異的 Cxxc5 欠損マウスの解析により膻形成に関与する Cxxc5 発現組織を同定する
- (4) 膻発生過程における Cxxc5 の標的分子を明らかにする

3. 研究の方法

(1) 膻発生過程における Cxxc5 の発現解析

胎生期の正常マウス胚について、パラフィン組織切片を作成し、anti-CXXC5 抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。

(2) Cxxc5 欠損マウスの膻形成不全発症過程の解析

Cxxc5 欠損マウスの膻形成不全の病態について、生後及び胎生期で組織学的に解析した。

(3) 組織特異的 Cxxc5 欠損マウスの作成と膻表現型解析

Cxxc5 は中腎管と中腎傍管で発現しているため、中腎管特異的 Cxxc5 欠損マウスと中腎傍管特異的 Cxxc5 欠損マウスを作成し、それらの膻表現型を全身性 Cxxc5 欠損マウスと比較した。

(4) 膻発生過程における Cxxc5 の標的分子の同定

膻発生異常発症時期の Cxxc5 発現組織を採取し、RNA-シーケンスを実施後、全転写産物の定量結果を正常マウスと比較することで、CXXC5 が制御する分子を抽出した。

4. 研究成果

(1) 膻発生過程における Cxxc5 の発現解析

CXXC5 は、胎齢 13.5 日マウス胚において、中腎管と中腎傍管で強い発現が検出された。

(2) Cxxc5 欠損マウスの膻形成不全発症過程の解析

Cxxc5 欠損マウスの膻形成不全は、胎齢 13.5 日頃に、雌雄ともに中腎傍管の伸長が下端到達寸前で途中停止することに由来していた。Cxxc5 欠損雌マウスは、その後、左右の中腎傍管が融合することなく、子宮頸部以下の膻が形成されず、膻が開口しないことがわかった。

(3) 組織特異的 Cxxc5 欠損マウスの作成と膻表現型解析

Cxxc5 は中腎管と中腎傍管で発現しているため、中腎管特異的 Cxxc5 欠損マウスと中腎傍管特異的 Cxxc5 欠損マウスを作成した。中腎管特異的 Cxxc5 欠損雌マウスは膻が開口していた。一方、中腎傍管特異的 Cxxc5 欠損雌マウスは膻が開口しなかった。中腎傍管特異的 Cxxc5 欠損マウスは、全身性 Cxxc5 欠損マウスと同様に、雌雄ともに胎齢 13.5 日頃に中腎傍管の伸長が下端到達寸前で途中停止することがわかった。

(4) 膻発生過程における Cxxc5 の標的分子の同定

中腎傍管の下部伸長には、中腎傍管で発現している Cxxc5 が必要であることがわかったため、Cxxc5 の標的分子を検索した。胎齢 13.5 日の全身性 Cxxc5 欠損雄マウス胚、全身性 Cxxc5 欠損雌マウス胚、中腎傍管特異的 Cxxc5 欠損雄マウス胚、中腎傍管特異的 Cxxc5 欠損雌マウス胚について、中腎傍管先端部を採取し、RNA-シーケンスを実施後、全転写産物の定量結果を正常マウスと比較した。4 つ全ての遺伝子型で発現が増加している分子と低下している分子を各々複数抽出することができた。今後、RNA-シーケンスで抽出された Cxxc5 標的分子について、組織切片上で発現解析を行い、中腎傍管下部伸長に必要な Cxxc5 が関与する分子機構を更に詳細に解析する予定である。

以上の結果から、中腎傍管で発現する Cxxc5 が将来膻になる中腎傍管下端部の伸長に必要で

あることを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Muro S, Tsukada Y, Harada M, Ito M, Akita K. Spatial distribution of smooth muscle tissue in the male pelvic floor with special reference to the lateral extent of the rectourethralis muscle: Application to prostatectomy and proctectomy. Clin Anat. 2018; 31:1167-1176. doi: 10.1002/ca.23254.

Sato Y, Tsukaguchi H, Morita H, Higasa K, Tran MTN, Hamada M, Usui T, Morito N, Horita S, Hayashi T, Takagi J, Yamaguchi I, Nguyen HT, Harada M, Inui K, Maruta Y, Inoue Y, Koiwa F, Sato H, Matsuda F, Ayabe S, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Yoshimura A. A mutation in transcription factor MAFB causes Focal Segmental Glomerulosclerosis with Duane Retraction Syndrome. Kidney Int. 2018; 94: 396-407. doi: 10.1016/j.kint.2018.02.025.

Nakajima Y, Muro S, Nasu H, Harada M, Yamaguchi K, Akita K. Morphology of the region anterior to the anal canal in males: visualization of the anterior bundle of the longitudinal muscle by transanal ultrasonography. Surg Radiol Anat 2017; 39: 967-973. doi: 10.1007/s00276-017-1832-0.

〔学会発表〕(計 9 件)

Masayo Harada, Keiichi Akita. The N143T mutation in mouse Fibroblast growth factor 9 leads to wider long bones. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th. 2018

Satoru Muro, Yuichiro Tsukada, Masayo Harada, Masaaki Ito, Keiichi Akita. Muscle layer structure in anterior wall of anorectal canal in females. 35th Annual meeting of American Association of Clinical Anatomy. 2018

原田理代, 秋田恵一. マウス線維芽細胞増殖因子9のN143T変異は長管骨を太くする. 第36回日本骨代謝学会学術集会. 2018

原田理代, 秋田恵一. マウス線維芽細胞増殖因子9のN143T変異は長管骨を太くする. 第41回日本分子生物学会年会. 2018

室生暁, 塚田祐一郎, 原田理代, 伊藤雅昭, 秋田恵一. 女性の直腸肛門管前壁における筋層構造の解剖 輪走筋(内肛門括約筋)と縦走筋の収縮と前方突出. 第28回骨盤外科機能温存研究会. 2018

室生暁, 塚田祐一郎, 那須久代, 原田理代, 山口久美子, 伊藤雅昭, 秋田恵一. 直腸肛門管前方における平滑筋組織の三次元的な広がり. 第123回日本解剖学会 2018

Masayo Harada, Keiichi Akita. The spontaneous mutation (N143T) in mouse Fgf9 leads to thicker long bones. 14th International Conference on Limb Development and Regeneration 2017. 2017

室生暁, 塚田祐一郎, 那須久代, 原田理代, 秋田恵一. 男性肛門管前方領域における平滑筋組織の分布 - 直腸尿道筋とその延長構造 -. 第21回臨床解剖研究会. 2017

Satoru Muro, Phichaya Baramée, Janyaruk Suriyut, Hisayo Nasu, Masayo Harada, Kukiko Ymaguchi, Keiichi Akita. Structural analysis of the anterior and posterior regions of the external anal sphincter; the spatial relationship with the bulbospongiosus and the coccyx. 8th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy. 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/grad/fana/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。