

令和元年6月16日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18024

研究課題名(和文) 外生殖器性差構築過程における遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of gene regulation mechanism in sexual differentiation process of external genitalia

研究代表者

松下 祥子 (Matsushita, Shoko)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・特別研究員

研究者番号：80791441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、性ホルモンの標的の尿道形成制御因子 MAFB 及び新規外生殖器サイズ制御因子である転写因子X を軸として、MAFB及びXの下流の機能因子の同定に向けたマウス外生殖器を用いた網羅的解析、下流因子の機能解析、下流因子の遺伝子発現制御解析を行うものである。これらの解析により、外生殖器における新規の遺伝子カスケード及び機能を明らかにしつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により明らかとなった外生殖器におけるホルモン依存的な遺伝子発現制御機構は、多くのホルモン依存性の器官発生のみならず、管腔形成や器官のサイズ制御等の様々な発生医学的現象や先天性異常の普遍的なメカニズムの解明研究にも大きな知見を与えると期待される。また本研究は、発生医学、内分泌学、遺伝子発現制御、ホルモン依存性の癌細胞研究、病態学を横断する学際研究として、期待できるものである。

研究成果の概要(英文)：External genitalia are prominent organs showing hormone-dependent sexual differentiation. Androgen is an essential regulator of masculinization of external genitalia. This study aims to elucidate the regulation of gene expression for sex differentiation of external genitalia through analyzing the downstream genes of androgen. These analyzes are revealing novel gene cascades and functions under the control of androgen in the external genitalia.

研究分野：発生生物学

キーワード：アンドロゲン 性差 発生生物学 外生殖器 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

多くの生物種において、雄と雌を作り出す仕組み(性差構築)は生殖に不可欠であり、その確立は種の存続をかけた最重要課題である。ヒトを含む哺乳類の性差構築は、遺伝的支配をうけるもの(遺伝的支配による性差構築)と分化後の生殖腺より分泌されるホルモンによる支配をうけるもの(ホルモン依存的性差構築)に大別される。生殖腺の遺伝的支配による性差構築のメカニズムの解明は、遺伝子改変動物などを用いて大規模に解析されてきた結果大きく進展したが、ホルモン依存的性差構築に関しては、生殖腺の除去や組織組み換え実験などの古典的な手法による解析に留まっており、その結果として未解明なまま残されている領域が多い状況であった。

外生殖器は、ホルモン依存的性差構築を示す代表的な器官である。さまざまな種において子孫を残すため必要不可欠な生殖器官であり、雌雄においてその形態は大きく異なる。マウスの場合、外生殖器原基である生殖結節(genital tubercle; GT)は、胎生15.5日目(E15.5)以降になると精巣から分泌される性ホルモンであるアンドロゲンの作用によって、雄では尿道の外生殖器内への取り込み(雄型の尿道形成)や外生殖器サイズの増大がアンドロゲン受容体(AR)を介して誘導される。

我々は、多数の遺伝子改変マウスを駆使した遺伝学的解析により、外生殖器形成過程分子基盤を解明してきた。特に、雄型の尿道形成において、アンドロゲン受容体シグナルに加えて増殖因子による統合的制御の重要性を見いだした(Miyagawa *et al.* *Mol Endocrinol* 2009, Suzuki *et al.* *PNAS* 2014, Matsushita *et al.* *J Wakayama Med Soc* 2015, Matsushita *et al.* *Endocrinology* 2016)。しかしながら、その詳細な分子メカニズムに関する解析は、まさに今後の問題であった。これまでホルモン依存的性差構築に関する理解が大きく遅れていた一因は、アンドロゲン受容体シグナルの標的遺伝子が同定されていなかったことによる。そこで、アンドロゲン受容体シグナルの標的遺伝子を同定するため、マイクロアレイにより雌雄の外生殖器原基で発現する遺伝子を解析したところ、雄の間葉細胞に強く発現する *Mafb* 遺伝子が同定された。MAFB は bZip 型転写因子であり、血球分化に重要な機能を持つことが報告されているが、ホルモン応答性や性差構築に関与するといった報告は全くない。我々は MAFB が外生殖器性差形成時期の尿道形成において極めて重要であることを見出した。また、*Mafb* がアンドロゲン応答性の遺伝子である事を明らかにし、その3'非翻訳領域(3'UTR)内の遺伝子発現制御領域を同定した(Matsushita *et al.* *Endocrinology* 2016)。

一方で、雄外生殖器の特徴として尿道形成以外に雌に比べサイズが大きいことがあげられる。*Mafb* KO マウスの雄外生殖器に観られる表現型は、尿道形成異常であり、外生殖器のサイズには大きな異常がなく、完全な雌型を示さなかった。このことはアンドロゲンの標的遺伝子は *Mafb* 遺伝子以外にも存在することを示唆しており、器官の大きさを制御する標的遺伝子は依然として不明なままであった。申請者は、AR に対する抗体等を用いて ChIP-seq 解析を行い、*Mafb* 以外のアンドロゲンの新規標的遺伝子探索を行った。その結果、雄の間葉細胞に強く発現する転写因子 X を同定した。さらにこの転写因子 X の遺伝子改変マウスを解析したところ、外生殖器が低形成であった。以上の解析により、外生殖器の大きさを制御するアンドロゲンの候補標的遺伝子 X を初めて同定した。しかしながら、転写因子 X の発現制御機構、その標的遺伝子、外生殖器における機能は、今後の研究課題となっている状況であった。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに外生殖器における性ホルモンの標的である尿道形成制御因子 MAFB 及び新規外生殖器サイズ制御因子転写因子 X を明らかにしてきた(Matsushita *et al.* *Endocrinology* 2016, Matsushita *in preparation*)。本研究では、これまでの研究を進展させて、MAFB 及び転写因子 X を軸として、それらの下流の機能分子の同定及びその発現制御メカニズムを明らかにし、これまで未解明であったホルモン依存的性差構築過程における遺伝子発現制御機構の全容を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

MAFB 及び X の下流の機能因子の同定に向けたマウス外生殖器を用いた網羅的解析

まず、既に我々が特定した外生殖器における性ホルモンの標的の尿道形成制御因子 MAFB 及び新規外生殖器サイズ制御因子転写因子 X の下流標的因子を明らかにするために、MAFB、X の雄特異的な発現が確認される E15.5 のマウス外生殖器原基を材料とし、MAFB 及び X に対する抗体を用いて ChIP シークエンス(ChIP-seq)を行い、MAFB 及び転写因子 X の下流の標的因子を探索する。

MAFB 及び X の下流因子の機能解析

で同定した標的候補遺伝子に関して、AR KO マウス・*Mafb* KO・転写因子 X KO マウス等を用いて、申請者が得意とする発生医学的・組織学的解析を行い、遺伝子カスケード及び機能を

明らかにする。また、本研究の独創性は、外生殖器の組織スライスをを用いた器官培養系を用いる点である。この系は、尿道が陰茎内部に取り込まれる雄型の尿道形成過程を *in vitro* で再現できる、世界で初めての外生殖器器官培養系である（未発表データ）。またこの系は遺伝子導入も可能であり、すでに先行実験を行っている。この系を用いることで、より詳細にかつ迅速に、外生殖器における遺伝子の機能解析や転写制御領域を含むコンストラクトを導入した発現制御解析することが可能となる。具体的に、培養した外生殖器に標的候補遺伝子に対する siRNA や関連シグナルに対する阻害剤を導入し、尿道形成過程や器官のサイズへの影響を解析する。特に尿道形成過程は胎児期の神経管形成のような管腔形成過程と類似している点が多いと予想され、興味を持たれる。そこで管腔形成に重要な細胞増殖・細胞死・細胞移動・細胞極性に特に注目し、組織学的解析や分子マーカーを用いた解析によって詳細に調べる。以上の解析を行い、外生殖器における MAFB、転写因子 X、それらの下流因子の機能を明らかにする。

MAFB 及び X の下流因子の遺伝子発現制御解析

で同定した外生殖器における MAFB や X の標的遺伝子に関して、転写制御領域・転写制御機構について検討する。転写制御領域の抽出には、でおこなう ChIP-seq 解析や申請者が以前おこなった外生殖器サンプルをもちいた RNA-seq・ChIP-seq などの解析結果を利用する。また前述の外生殖器器官培養系に、転写制御領域を含むレポーターコンストラクトを導入する。これにより、同定した転写制御領域が実際に外生殖器で機能するかどうか、迅速に解析することができる。さらに詳細な遺伝子発現領域の探索は、培養細胞を用いて、申請者が一貫して取り組んできたレポーターアッセイなど分子生物学的解析も合わせて行い検討する。以上の解析を行い、外生殖器における MAFB や転写因子 X による下流因子に対する発現制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

まず、外生殖器における性ホルモンの標的の尿道形成制御因子 MAFB 及び新規外生殖器サイズ制御因子転写因子 X の下流標的因子を明らかにするために、MAFB と X の雄特異的な発現が確認される E15.5 のマウス外生殖器原基を材料とし、MAFB 及び X に対する抗体を用いて ChIP シークエンス(ChIP-seq)を行い、MAFB 及び転写因子 X の下流の標的因子を探索した。また外生殖器を用いた RNA-seq のデータと組み合わせて、外生殖器で実際に発現している遺伝子の特定、さらにその遺伝子の発現制御領域の予測をおこなった。

次に、外生殖器における性ホルモンの標的の尿道形成制御因子 MAFB 及び新規外生殖器サイズ制御因子転写因子 X、さらにアンドロゲンシグナル下流標的因子の KO マウスなどを用いて、申請者が得意とする発生医学的・組織学的解析を行った。さらに、外生殖器を用いた器官培養系を用いて、遺伝子導入をおこない、外生殖器における遺伝子の機能解析や転写制御領域を含むコンストラクトを導入した発現制御解析もおこなった。またこれらマウスを用いて、網羅的に遺伝子発現解析を行った。これらの解析により、外生殖器における新規の遺伝子カスケード及び機能を明らかにしつつある（投稿準備中）。本研究により外生殖器におけるホルモン依存的な遺伝子発現制御機構が明らかになれば、多くのホルモン依存性の器官発生のみならず、管腔形成や器官のサイズ制御等の様々な発生医学的現象や先天性異常の普遍的なメカニズムの解明研究にも大きな知見を与えると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1, Kajioka Daiki, Suzuki Kentaro, Nakada Shoko, Matsushita Shoko, Miyagawa Shinichi, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Yamada Gen

Bmp4 is an essential growth factor for the initiation of genital tubercle (GT) outgrowth, Congenital Anomalies, 査読有、2019年

DOI: 10.1111/cga.12326

2, Kojima Yoshiyuki, Koguchi Tomoyuki, Mizuno Kentaro, Sato Yuichi, Hoshi Seiji, Hata Junya, Nishio Hidenori, Hashimoto Daiki, Matsushita Shoko, Suzuki Kentaro, Miyagawa Shinichi, Hui ChiChung, Tanikawa Chizu, Murakami Yoshimori, Yamada Gen, Hayashi Yutarou, Matsuda Koichi

Single Nucleotide Polymorphisms of HAA0 and IRX6 Genes as Risk Factors for Hypospadias, Journal of Urology, 査読有、2019 Feb;201(2):386-392.

DOI:10.1016/j.juro.2018.07.050.

3, Matsushita Shoko, Suzuki Kentaro, Murashima Aki, Kajioka Daiki, Acebedo Alvin Resultay, Miyagawa Shinichi, Haraguchi Ryuma, Ogino Yukiko, Yamada Gen

Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development, Nature Reviews Urology、査読有、2018 Jun;15(6):358-368.
DOI: 10.1038/s41585-018-0008-y.

4 , Hiroko Suzuki, Shoko Matsushita, Kentaro Suzuki, Gen Yamada
5α-Dihydrotestosterone negatively regulates cell proliferation of the periurethral ventral mesenchyme during urethral tube formation in the murine male genital tubercle. Andrology、査読有、2017 Jan;5(1):146-152.
DOI:10.1111/andr.12241.

〔学会発表〕(計2件)

1 , Shoko Matsushita, Kentaro Suzuki, Tetsuya Sato, Shinjiro Hino, Daiki Kajioka, Alvin Acebedo, Mitsuyoshi Nakao, Mikita Suyama, Gen Yamada
Establishment of assessment system for genitalia-specific enhancer during genital tubercle development,
Joint Meeting of JSCB 70th & JSDB 51st、2018年

2 , 松下祥子、鈴木堅太郎、佐藤哲也、日野信次郎、梶岡 大暉、Alvin Acebedo、中尾光喜、須山幹太、山田源
外生殖器を用いた組織特異的性差エンハンサーの in vivo 評価系の確立、
2017年度生命科学系学会合同年次大会 (Conbio2017)、2017年

〔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
なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

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
なし

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。