

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02474

研究課題名(和文) 外生殖器の性分化を動かす力の探索

研究課題名(英文) Exploring factors that drive sexual differentiation of external genitalia

研究代表者

宮川 信一 (MIYAGAWA, SHINICHI)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・准教授

研究者番号：30404354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホルモン環境によって制御される、外生殖器の性分化メカニズムには未だ不明な点が多い。本解析ではCTによる組織内部観察から、外生殖器のホルモン環境に依存したパラメータを見出すことに成功し、マウス外生殖器の表現型を定量的に評価することが可能となった。また、胎仔外生殖器の遺伝子発現をRNAシーケンスにより解析し、各種ホルモン投与による発現変動遺伝子を取得した。これらの研究結果は外生殖器の発生・発達の度合いや、雌雄の性分化の度合いを遺伝子レベルで正確に評価する根拠となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿道下裂の発症頻度は1/200-1/300とされ、非常に頻度の高い先天性疾患である。新生児期の外性器異常は、社会的な性の決定に関わる大きな問題であることから、正確な医学的評価と根拠を要する。本研究によって得られる知見は、生殖器系に係わる診断技術や治療などの医療行為を実践するための基本的知識を提供すると共に、これら先天性疾患の原因解明の基礎となることが期待される。本研究によって推進される性分化や疾患に対する理解は、性の多様性の理解にもつながる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of sexual differentiation of the external genitalia, which is regulated by the hormonal environment, remains unclear. In this study, we identified that several parameters that prescribe hormone-dependent development and morphology of external genitalia by computed tomography (CT) scan analysis, and were able to quantitatively evaluate the phenotype of the mouse external genitalia. In addition, gene expression in the fetal external genitalia was analyzed by RNA sequencing, and identified several differential expression genes (DEGs) which gene expression depends on hormonal environment during embryonic development. The results provide a basis for accurate evaluation of the degree of sexual differentiation between males and females at the genetic level.

研究分野：発生内分泌学

キーワード：外生殖器 アンドロゲン 性分化

1. 研究開始当初の背景

外生殖器は、胎生期のホルモン環境に大きく依存して雌雄差が形成される。これまで、外生殖器の性分化および性分化疾患 (DSD) に関連する遺伝要因の探索は、DSD 患者と健常人、あるいはマウスの雌雄での遺伝子発現の比較に留まっていた。しかしながら、DSD 患者と健常人の比較では、生殖腺分化やホルモン産生に関わる比較的少数の既知遺伝子の解析が行われてきたため、そのような遺伝子 (すなわちアンドロゲン産生に関わる遺伝子) に変異が認められない場合、外生殖器の性分化疾患に関わる遺伝的原因の同定は困難であった。また、単なる雌雄での遺伝子発現の比較では、アンドロゲンには応答するが形態形成には直接は関係しない多くの遺伝子が取得されることになり、その後の解析はやはり困難であった。したがって、アンドロゲンによって制御される、外生殖器形成の発生プログラムに関わる (外生殖器で発現する) 遺伝子の多くが未だほとんど同定されていないのが現状である。

また、ヒトとマウスの外生殖器の発生と構造の類似性あるいは相同性も問題となってくる。多くのマウスを用いた研究では、外生殖器の表現型は出生前後で行われている。これは、尿道下裂を主としたヒト外生殖器の性分化疾患の医学的な診断が出生時に行われているためである。ところが、ヒトとマウスの出生時の外生殖器の発生段階は、明らかに異なっているため、ヒトの新生児における尿道下裂の典型的な症例である尿道口の異所的な開口を、マウスの出生前後の段階における尿道板の腹側開裂が再現していると見なすには早計である。加えて、外生殖器の表現型解析は、そのほとんどが外観や組織染色による目視で観察が行われてきた。すなわち、外生殖器の表現型の評価方法はこれまで不正確な定性的評価が主とされており、これまで成獣マウスの外生殖器の形態的パラメータは未だ確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、外生殖器の表現型を形態・組織学的なパラメータをとることによって連続な表現型として定量化する。胎仔期のホルモン環境によってマウスの外生殖器が成熟後にどのような形態学的変化が起きるのか、そしてそれを定量的に解析する手法の確立を目指す。また、その表現型は胎生期のホルモン環境に依存することから、胎生期での外生殖器のトランスクリプトーム解析を行う。発生プログラムがアンドロゲンに大きく依存する外生殖器形成において、ホルモン環境に応答してどのように表現型が変化するかのパターンは、遺伝的な支配を受ける。ホルモン環境に依存する外生殖器の正常発生・分化及び性分化疾患に関連する遺伝子 (群) を同定し、その発生プログラムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、マウス胎生期の様々なホルモン環境 (内分泌要因及び外因性の化学物質等による環境要因) に依存した遺伝子発現解析を行い、主成分解析を行う。さらに、外生殖器の雄化の程度、雌化の程度、さらに外生殖器の形成異常の程度を、生後 30 日齢の外生殖器の組織学的パラメータを定量的に解析することによって決定する。

アンドロゲンが外生殖器の性分化に最も影響をもたらす臨界期 (Critical Time Window) は、オスにおいて包皮が尿道板を包み込む時期の E14.5-E15.5 とされている。そこで、E14.5 及び E15.5 に、フルタミド (Flu; AR アンタゴニスト)、プロピオン酸テストステロン (TP; 合成アンドロゲン)、17 β -エチニルエストラジオール (EE2; 合成エストロゲン)、ビスフェノール A (BPA; エストロゲン作用をもつ内分泌かく乱化学物質) のいずれかを投与した。産仔の外生殖器を 30 日齢で摘出し、CT スキャンによる三次元的形態解析を利用して、成獣マウス外生殖器のさまざまな表現型のパラメータを測定した。各処理群から得られた測定データを比較することで長さや容積といった定量的な差を示し、胎仔期のホルモン環境の変化が成熟後の外生殖器にどのような影響を及ぼすかを解析した。遺伝子発現解析についても同様に、E14.5 及び E15.5 に、ホルモンや薬剤を投与し、胎生 16.5 日の外生殖器の尿道両側間葉といわれる部分における遺伝子発現を RNA シークエンスにより網羅的に調べた。

4. 研究成果

(1) 成獣マウスの外生殖器の表現型解析

胎生期に上記条件の様々なホルモン環境においたマウスを生後 30 日齢まで飼育し、外生殖器の表現型をマイクロ CT スキャンにより詳細に解析した。計測可能なパラメータを全て取得することで、外生殖器自体と内部構造の定量的な表現型解析を試みた (図 1)。例えば、TP を暴露したメスマウスの陰核は顕著なオス様の形態を示したが、陰核のサイズは正常なオスとメスの中

間であった。また、Fluを暴露したオスマウスの陰茎の長さや内部の陰茎骨のサイズは、正常のオスマウスと比較して有意に小さくなった。雌雄共通パラメータの主成分分析をおこなった結果、正常なオスのプロット群と、正常なメスのプロット群はグラフ上で大きく離れていた(図2)。またTPを投与することでオス化が予想されたメスのプロット群が正常なメスのプロット群を逸脱してオスに近付いていること、FluやBPAを投与することでメス化が予想されたオスのプロット群が正常なメスのプロット群にやや近付いていることから、今回設定したパラメータの測定値によって、正常な雌雄差のみならず、TPやFluを含む胎仔期ホルモン投与の効果成獣においても確かに見られていることが分かった。

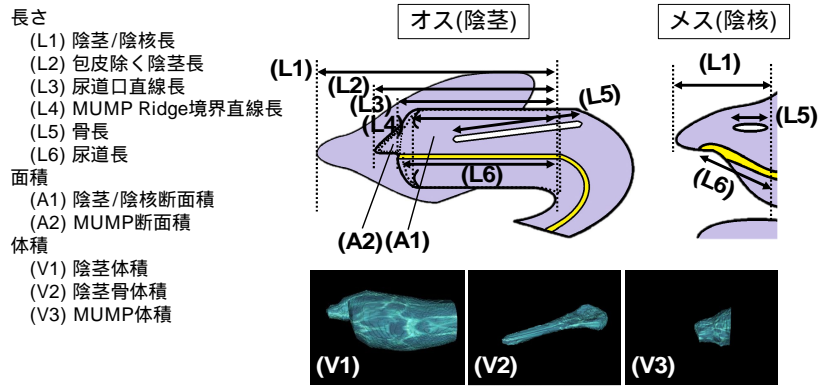


図1. CT解析において設定した外生殖器パラメータの定義

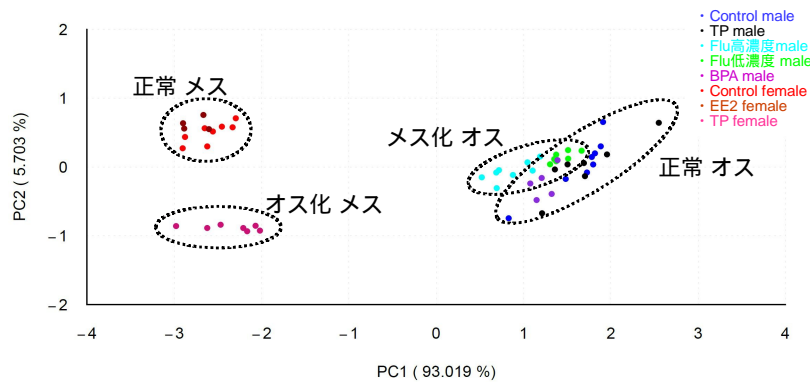


図2. 主成分分析により、各群に傾向をプロットした。正常なオスの群と正常なメスの群は大きく離れていること、オス化メス群はオスに、メス化オス群はメスに寄ることがわかる。

(2) 胎生期の遺伝子発現解析

上記の表現型は胎生期のホルモン環境に依存する。そこで胎生期にホルモン投与した胎仔外生殖器の尿道両側間葉といわれる部分における遺伝子発現をRNAシーケンスにより解析し、それぞれのホルモン投与による発現変動遺伝子を取得した。例えば、正常なオスとFluを投与したオス、正常なメスとTPを投与したメスをそれぞれ比較して136個の候補遺伝子を選出した(図3)。これらの遺伝子は今後、CRISPR/Cas9でノックアウトすることにより、機能解析していく予定である。

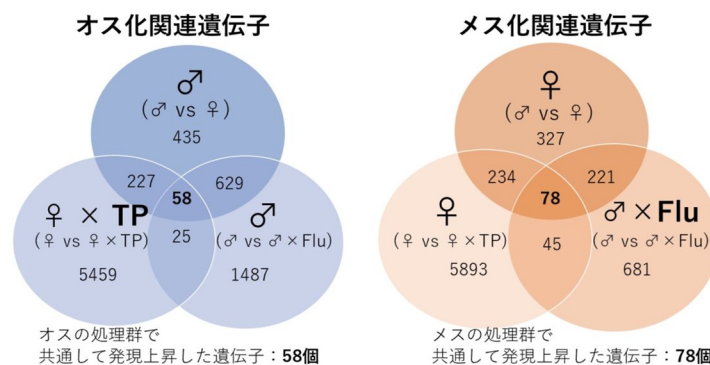


図3. RNAseq解析により、オス化関連遺伝子(発現量がコントロールオス>コントロールメス、コントロールオス>Flu投与オス、TP投与メス>コントロールメスとなる遺伝子)とメス化関連遺伝子(オス化関連遺伝子の逆の遺伝子発現パターンを示す遺伝子)を取得した。

以上のように、本研究ではCTによる組織内部観察から、新たな外生殖器のホルモン環境に依存したパラメータを見出すことに成功し、マウス外生殖器の表現型を定量的に評価することが可能となった。その結果、外生殖器形成に関わる各種パラメータに影響を与える遺伝子の特定するためのシステムが構築できた。外生殖器の性分化に寄与する遺伝子群の情報は、外生殖器の発生・発達、雌雄の性分化の度合い、性分化疾患の度合いを遺伝子レベルで正確に評価する根拠となるものとして期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyaoku Kaori, Ogino Yukiko, Lange Anke, Ono Ayaka, Kobayashi Tohru, Ihara Masaru, Tanaka Hiroaki, Toyota Kenji, Akashi Hiroshi, Yamagishi Genki, Sato Tomomi, Tyler Charles R., Iguchi Taisen, Miyagawa Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of G protein coupled estrogen receptors in Japanese medaka, <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.4130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iguchi Taisen, Sato Tomomi, Nakajima Tadaaki, Miyagawa Shinichi, Takasugi Noboru	4. 巻 118
2. 論文標題 New frontiers of developmental endocrinology opened by researchers connecting irreversible effects of sex hormones on developing organs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 4~23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2020.10.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toyota Kenji, Masuda Shoichiro, Sugita Sarina, Miyaoku Kaori, Yamagishi Genki, Akashi Hiroshi, Miyagawa Shinichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Estrogen Receptor 1 (ESR1) Agonist Induces Ovarian Differentiation and Aberrant Mullerian Duct Development in the Chinese Soft-shelled Turtle, <i>Pelodiscus sinensis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Studies	6. 最初と最後の頁 e54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6620/ZS.2020.59-54	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Parsons Aoife E., Lange Anke, Hutchinson Thomas H., Miyagawa Shinichi, Iguchi Taisen, Kudoh Tetsuhiro, Tyler Charles R.	4. 巻 225
2. 論文標題 Expression dynamics of genes in the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) cascade and their responses to 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3) highlights potential vulnerability to thyroid-disrupting chemicals in zebrafish (<i>Danio rerio</i>) embryo-larvae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 105547 ~ 105547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2020.105547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Terauchi Karin J., Miyagawa Shinichi, Iguchi Taisen, Sato Tomomi	4. 巻 381
2. 論文標題 Hedgehog signaling regulates the basement membrane remodeling during folliculogenesis in the neonatal mouse ovary	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 555 ~ 567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03222-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lange Anke, Paris Josephine R., Gharbi Karim, Cezard Timothee, Miyagawa Shinichi, Iguchi Taisen, Studholme David J., Tyler Charles R.	4. 巻 20
2. 論文標題 A newly developed genetic sex marker and its application to understanding chemically induced feminisation in roach (<i>Rutilus rutilus</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Ecology Resources	6. 最初と最後の頁 1007 ~ 1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1755-0998.13166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Acebedo Alvin R., Suzuki Kentaro, Hino Shinjiro, Alcantara Mellissa C., Sato Yuki, Haga Hisashi, Matsumoto Ken-ichi, Nakao Mitsuyoshi, Shimamura Kenji, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Miyagawa Shinichi, Nishinakamura Ryuichi, Adelstein Robert S., Yamada Gen	4. 巻 2
2. 論文標題 Mesenchymal actomyosin contractility is required for androgen-driven urethral masculinization in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0336-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hyuga Taiju, Suzuki Kentaro, Acebedo Alvin R., Hashimoto Daiki, Kajimoto Mizuki, Miyagawa Shinichi, Enmi Jun-ichiro, Yoshioka Yoshichika, Yamada Gen	4. 巻 110
2. 論文標題 Regulatory roles of epithelial-mesenchymal interaction (EMI) during early and androgen dependent external genitalia development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 29 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diff.2019.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hyuga Taiju, Alcantara Mellissa, Kajioka Daiki, Haraguchi Ryuma, Suzuki Kentaro, Miyagawa Shinichi, Kojima Yoshiyuki, Hayashi Yutaro, Yamada Gen	4. 巻 21
2. 論文標題 Hedgehog Signaling for Urogenital Organogenesis and Prostate Cancer: An Implication for the Epithelial-Mesenchyme Interaction (EMI)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 58 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kajioka Daiki, Suzuki Kentaro, Nakada Shoko, Matsushita Shoko, Miyagawa Shinichi, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Yamada Gen	4. 巻 60
2. 論文標題 Bmp4 is an essential growth factor for the initiation of genital tubercle (GT) outgrowth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 15 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐伯英敏、宮川信一、平野優、梶本みずき、山田源	4. 巻 70
2. 論文標題 マウス外生殖器におけるホルモン環境に依存した性ホルモン受容体の発現	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 和歌山医学	6. 最初と最後の頁 59 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Nariaki, Kitamura Shigeyuki, Uramaru Naoto, Miyagawa Shinichi, Iguchi Taisen	4. 巻 286
2. 論文標題 Identification of hepatic thyroid hormone-responsive genes in neonatal rats: Potential targets for thyroid hormone-disrupting chemicals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 48 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2018.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita Shoko, Suzuki Kentaro, Murashima Aki, Kajioka Daiki, Acebedo Alvin Resultay, Miyagawa Shinichi, Haraguchi Ryuma, Ogino Yukiko, Yamada Gen	4. 巻 15
2. 論文標題 Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Reviews Urology	6. 最初と最後の頁 358 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41585-018-0008-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogino Yukiko, Tohyama Saki, Kohno Satomi, Toyota Kenji, Yamada Gen, Yatsu Ryohei, Kobayashi Tohru, Tatarazako Norihisa, Sato Tomomi, Matsubara Hajime, Lange Anke, Tyler Charles R., Katsu Yoshinao, Iguchi Taisen, Miyagawa Shinichi	4. 巻 184
2. 論文標題 Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 38 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2018.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kojima Yoshiyuki, Koguchi Tomoyuki, Mizuno Kentaro, Sato Yuichi, Hoshi Seiji, Hata Junya, Nishio Hidenori, Hashimoto Daiki, Matsushita Shoko, Suzuki Kentaro, Miyagawa Shinichi, Hui Chi Chung, Tanikawa Chizu, Murakami Yoshimori, Yamada Gen, Hayashi Yutaro, Matsuda Koichi	4. 巻 201
2. 論文標題 Single Nucleotide Polymorphisms of HAAO and IRX6 Genes as Risk Factors for Hypospadias	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 386 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.juro.2018.07.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kajioka Daiki, Suzuki Kentaro, Nakada Shoko, Matsushita Shoko, Miyagawa Shinichi, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Yamada Gen	4. 巻 -
2. 論文標題 Bmp4 is an essential growth factor for the initiation of genital tubercle (GT) outgrowth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Acebedo Alvin R., Suzuki Kentaro, Hino Shinjiro, Alcantara Mellissa C., Sato Yuki, Haga Hisashi, Matsumoto Ken-ichi, Nakao Mitsuyoshi, Shimamura Kenji, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Miyagawa Shinichi, Nishinakamura Ryuichi, Adelstein Robert S., Yamada Gen	4. 巻 2
2. 論文標題 Mesenchymal actomyosin contractility is required for androgen-driven urethral masculinization in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0336-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 赤司寛志、宮川信一
2. 発表標題 温度センサータンパク質TRP及び体温調節行動における温度感受性の相関進化
3. 学会等名 生物環境イノベーション研究部門公開シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松丸大輔、村嶋亜紀、宮川信一、原田理代、山田源、中西剛
2. 発表標題 三次元イメージング技術を用いた総排泄腔分割の解析: 発生異常メカニズムの解明に向けて
3. 学会等名 フォーラム2020: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松丸大輔、村嶋亜紀、宮川信一、原田理代、山田源、中西剛
2. 発表標題 総排泄腔分割の三次元イメージング解析: 発生毒性メカニズムの解明に向けて
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮川信一
2. 発表標題 環境に依存する性と生殖の研究
3. 学会等名 日本比較内分泌学会第43回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyagawa S, Tohyama S, Ogino Y, Kobayashi T, Lange A, Tyler CR, Iguchi T
2. 発表標題 Approaches for studying endocrine disruption and estrogen receptors in medaka
3. 学会等名 日本内分泌攪乱化学物質学会第21回研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮川信一
2. 発表標題 温度環境に依存する爬虫類の性決定
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------