

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06837

研究課題名(和文)性差形成過程における間葉リモデリング制御機構の解明

研究課題名(英文) Androgen-regulated ECM remodeling during sexual differentiation of external genitalia

研究代表者

鈴木 堅太郎 (Suzuki, Kentaro)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・准教授

研究者番号：20404345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-seqによる網羅的発現解析から、外生殖器の性差形成に關与する性差因子(発現に性差がある遺伝子)としてmatrix metalloproteinase(Mmp)を同定し、その基質の発現にも性差があることを見出した。組織器官培養システムを用いたMmp阻害剤による阻害実験から、MmpによるECMのリモデリングはオス特有の間葉細胞の動きを生み出すために必要であることを明らかにした。性差因子の1つであるMafbは、Mmpのオス特異的な発現に不可欠でありさらにMmpの性差発現に關わるMafbの共役因子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンドロゲンが性差形成に不可欠であることは自明である。しかし、どのような遺伝子を介してどうやって性差を形成しているのか、アンドロゲンによる性差形成機構の解明には至っていない。

これまで報告してきた細胞増殖の性差、細胞骨格の性差、細胞挙動の性差に加え、本研究からECMリモデリングがアンドロゲンによる性差形成に必要な新たなプロセスであることを明らかにした。今回同定したMmpは、外生殖器以外の器官においても発現しており、様々ながんを高発現していることが報告されている。本研究から得られた知見は、外生殖器の性差形成のみならず病態の性差形成機構を理解する上でも有用な知見である。

研究成果の概要(英文)：Androgen is a master regulator to induce sexual differences between male and female. This study identified androgen-regulated Mmp (matrix metalloproteinase) is required for establishment of external genital sex differences. This Mmp was expressed dominantly in male genital tubercle (GT), an anlage of external genitalia, and its substrate also showed male-biased expression during sex differentiation of external genitalia. Inhibitory experiment by using tissue organotypic slice culture system showed that this Mmp lead to ECM remodeling in GT mesenchyme and it was required for male-biased mesenchymal cell migration. Furthermore, its expression was regulated in a androgen-AP1 dependent manner.

研究分野：性差分子発生学

キーワード：アンドロゲン 性差 細胞外マトリックス MMP

1. 研究開始当初の背景

我々の器官には、指の長さや骨盤、生殖器官など様々な形態の性差がある。近年、器官のみならず、病態発症にも性差があることがわかってきた。性差を惹起する因子としてアンドロゲン(男性ホルモン)が同定されてから、70年以上が経過した。しかし、アンドロゲンがどのような分子を介して、どのような機序で性差を形成するのか? そのメカニズムは解明されていない。その要因として、性差形成を検証するための適した実験モデルがこれまでなかったこと、そして‘性差’の定義が曖昧である点があげられる。‘性差’とは、「雌雄の動物の性別的な差異のことである」と定義されている。何が雌雄で異なるのか? 器官形成における性差の具体的科学的定義は、未だに曖昧である。性差形成メカニズムを理解するためには、性差を科学的に定義する必要がある。

2. 研究の目的

私は、アンドロゲン依存性の性差(雌雄で異なる現象)を定義するため、顕著な性差を有するマウス外生殖器形成過程をモデルとして、細胞外マトリックス(ECM)リモデリング因子がアンドロゲンによる性差形成に寄与している可能性を見出した。本研究の目的は、組織切片培養及びライブイメージングシステム、さらに遺伝子改変マウス解析を駆使して、

発現に性差がある matrix metalloproteinase (Mmp) 及び細胞外マトリックス(ECM)を同定すること、

ECM リモデリングが性差形成の素過程であることを明らかにすること、
性差形成過程における ECM リモデリングの意義を明確にすることである。

3. 研究の方法

雌雄外生殖器形成過程において候補 Mmps の発現を組織 *in situ* 法、q-PCR、免疫染色法、ウェスタンブロットにより検討する。同様にこれら Mmps の主要な基質であるファイブロネクチン、ラミニン、エラスチン、コラーゲンの発現についても検討し、Mmps 及びその基質の発現パターン、発現量に性差があるかを検証する。発現に性差がある遺伝子に関しては、アンドロゲンレセプター(AR)の KO マウス及び *Mafb* KO マウスにおける発現解析を行い、遺伝子発現のアンドロゲン依存性について検討する。外生殖器組織切片培養を用いて Mmps 特異的阻害剤である Marimastat や GM6001 存在下で培養し、アンドロゲン依存性の尿道形成過程における Mmps の意義を検証する。

4. 研究成果

本研究は、アンドロゲンの新たな下流因子として Mmp を同定し、その基質の変化を介した細胞外マトリックス(ECM)のリモデリングが性差形成に不可欠であること、およびその分子制御メカニズムの一端を外生殖器原基組織切片培養、さらに遺伝子改変マウスの解析から明らかにした。今回の Mmp を含めこ

れまで外生殖器形成をモデルとした研究から明らかとなった性差形成因子は、外性器特有の遺伝子というわけではなく多器官の形成・恒常性維持に関わる遺伝子であることがわかった。つまり、外生殖器形成から明らかになる性差形成機構は、他の器官を含め多くの性差の仕組みを理解する上で有用である可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kajioka D, Suzuki K, Matsushita S, Hino S, Sato T, Takada S, Isono K, Takeo T, Kajimoto M, Nakagata N, Nakao M, Suyama M, DeFalco T, Miyagawa S, Yamada G.	4. 巻 118(23)
2. 論文標題 Sexual fate of murine external genitalia development: Conserved transcriptional competency for male-biased genes in both sexes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2024067118	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 Hashimoto D, Colet JGR, Murashima A, Fujimoto K, Ueda Y, Suzuki K, Hyuga T, Hemmi H, Kaisho T, Takahashi S, Takahama Y, Yamada G.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Radiation inducible MafB gene is required for thymic regeneration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89836-7	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 Hashimoto D, Kajimoto M, Ueda Y, Hyuga T, Fujimoto K, Inoue S, Suzuki K, Kataoka T, Kimura K, Yamada G.	4. 巻 20(2)
2. 論文標題 3D reconstruction and histopathological analyses on murine corporal body.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol.	6. 最初と最後の頁 199-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12369	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 Hashimoto D, Hirashima T, Yamamura H, Kataoka T, Fujimoto K, Hyuga T, Yoshiki A, Kimura K, Kuroki S, Tachibana M, Suzuki K, Yamamoto N, Morioka S, Sasaki T, Yamada G.	4. 巻 104(4)
2. 論文標題 Dynamic erectile responses of a novel penile organ model utilizing TPDM.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Reprod.	6. 最初と最後の頁 875-886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/iaob011	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 T, Hashimoto D, Matsumaru D, Kumegawa S, Asamura S, Suzuki K, Katayama KI, Nakamura S, Nakai H, Yamada G.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Evaluation of surgical procedures of mouse urethra by visualization and the formation of fistula.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75184-5	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 T, Suzuki K, Acebedo AR, Hashimoto D, Kajimoto M, Miyagawa S, Enmi JI, Yoshioka Y, Yamada G.	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 T, Alcantara M, Kajioka D, Haraguchi R, Suzuki K, Miyagawa S, Kojima Y, Hayashi Y, Yamada G.	4. 巻 21 (10)
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 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1-18
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 Hirano YU, Suzuki K, Iguchi T, Yamada G, Miyagawa S.	4. 巻 33(5)
2. 論文標題 The Role of Fgf Signaling on Epithelial Cell Differentiation in Mouse Vagina.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vivo.	6. 最初と最後の頁 1499-1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11630	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 AR, Suzuki K, Hino S, Alcantara MC, Sato Y, Haga H, Matsumoto KI, Nakao M, Shimamura K, Takeo T, Nakagata N, Miyagawa S, Nishinakamura R, Adelstein RS, Yamada G.	4. 巻 eCollection
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 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 eCollection
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 Kajioka D, Suzuki K, Nakada S, Matsushita S, Miyagawa S, Takeo T, Nakagata N, Yamada G.	4. 巻 60(1)
2. 論文標題 Bmp4 is an essential growth factor for the initiation of genital tubercle (GT) outgrowth.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Congenit. Anom. (Kyoto)	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 Hashimoto D, Hyuga T, Acebedo AR, Alcantara MC, Suzuki K, Yamada G.	4. 巻 59(3)
2. 論文標題 Developmental mutant mouse models for external genitalia formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenit. Anom. (Kyoto)	6. 最初と最後の頁 74-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12319	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 Kojima Y, Koguchi T, Mizuno K, Sato Y, Hoshi S, Hata J, Nishio H, Hashimoto D, Matsushita S, Suzuki K, Miyagawa S, Hui CC, Tanikawa C, Murakami Y, Yamada G, Hayashi Y, Matsuda K.	4. 巻 201(2)
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 J Urol.	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木堅太郎
2. 発表標題 アンドロゲンによる細胞骨格制御は、尿道形成に不可欠である
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木堅太郎
2. 発表標題 マウス外生殖器組織スライス器官培養系からみえてきたアンドロゲン依存性の器官形成メカニズム
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki Kentaro
2. 発表標題 Mesenchymal-derived actomyosin contractility is required for the tissue fusion during tubular urethral formation in mice
3. 学会等名 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation CLEFT2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木堅太郎
2. 発表標題 Regulation of sex-biased directional cell migration during organogenesis
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木堅太郎
2. 発表標題 アンドロゲン依存性の尿道形成モデル実験システムの構築
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第37回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木堅太郎
2. 発表標題 アンドロゲン依存性のマウス胎仔外生殖器組織培養実験システムの構築
3. 学会等名 日本毒性学会2018年度学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kentaro Suzuki
2. 発表標題 Establishment of the Embryonic External Genitalia Slice Culture System: Analysis of mechanism of androgen-induced urethral masculinization.
3. 学会等名 8th International Symposium on Vertebrate Sex Determination (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------