

機関番号：82648

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770239

研究課題名（和文）発生過程における“突出・伸長”現象の分子メカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis for developmental mechanisms of protrusion and outgrowth

研究代表者

宮川 信一（MIYAGAWA SHINICHI）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：30404354

研究成果の概要（和文）：胎児付属肢形成は、基本的な形態形成プロセスを網羅するモデルシステムであり、発生システムの重要な課題を多く含んでいる。外生殖器は胎児付属肢の一つであり、体幹末端の総排泄腔領域から突出・伸長する生殖結節を原基として発生する。本研究はこのマウス胎児外生殖器をモデルとして、突出・伸長という生命現象において、分泌性増殖因子のシグナルカスケードを同定するとともに、それらの因子の外生殖器型性後期の性的二型の分化過程における寄与についても検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Embryonic appendicular structures, including the developing external genitalia, are suitable models to analyze the developmental mechanisms of organ protrusion and outgrowth. Although several studies have evaluated individual functions of different growth factors on appendicular growth, the coordinated function of signaling cascades is poorly understood. Our results provide new insights into the integration of growth factor signaling (i.e. hedgehog, Wnt and Fgfs) in the appendicular developmental programs regulating external genitalia development. We also demonstrated the interaction of such growth factors and sex steroid hormones (androgens) during later stage of external genital development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官形成、外生殖器、シグナリングセンター、成長因子

## 1. 研究開始当初の背景

胎児付属肢形成は、基本的な形態形成プロセスを網羅するモデルシステムである。特に比較的単純な系である四肢は、肢芽形成に端を発する形態形成過程において、組織間相互作用や極性決定など、発生システムの重要な課題を多く含んでおり、最近に至るまで膨大な研究が行われている。外生殖器は四肢とおなじ胎児付属肢の一つであり、体幹末端の総排泄腔領域から突出・伸長する生殖結節を原基として発生する。この“突出・伸長”という生命現象はこれまで、やはり四肢を中心に解析が行われてきたが、その普遍的な発生メカニズム解明には至っていない。さらに外生殖器は発生後期において、性的二型を示すことが知られている。この過程においてアンドロゲンが必須であることはよく知られているが、その下流のシグナル因子や補助因子などは全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

付属肢形成の過程は様々な発生学的コンテキストを含み、多くの研究者が四肢形成を中心に解析を行っている。しかしながら四肢以外の付属肢形成の理解が遅れているため、あくまで四肢発生という狭い研究領域としてとらえられがちである。一方で外生殖器が肢芽とおなじ胎児付属肢であることはあまりよく知られていない。本研究は外生殖器の発生の理解を深めると同時に、付属肢形成という形態形成、そして“突出・伸長”という基本的な発生現象の普遍的な形成メカニズムを提唱することを目的とする。本研究では特にヘッジホッグ、Wnt、骨形成因子 (Bmp)、繊維芽細胞増殖因子 (Fgf) などの分泌性増殖因子がかかわる組織間相互作用に注目し、そのシグナルカスケードを決定する。すなわち外生殖器形成時に一過的に形成されるシグナリングセンターの分子発生的性質を明らかにする。

さらに外生殖器の初期発生過程だけでなく、胎生後期の表現型も解析する。初期の形態異常が後期外生殖器形成に及ぼす影響を検討し、胎児外生殖器の一連の発生プログラムを明らかにする。四肢と外生殖器がある程度共通して進む初期形成(突出・伸長する)段階から後期にかけて、その差異が顕在化する(尿道形成が進むなど)分子プロセスの解析につなげていく。この過程では、アンドロゲンの作用が不可欠であり、したがってステロ

イドホルモンと上記の分泌性増殖因子とのクロストークを念頭に、その相互作用を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究の特色は、マウス外生殖器形成メカニズムについて様々な遺伝子改変マウスを用いた解析を行う点である。そのためには、外生殖器の上皮や間葉など、組織特異的な Cre 活性を有するマウスが不可欠である。そこで Shh-CreER (Shh 遺伝子座にタモキシフェン誘導型 Cre 組み換え酵素をノックインしたマウス) など、Cre ドライバーマウスについては、その活性を Rosa26 レポーターマウス (Cre が作用すると永続的に beta-galactosidase を発現する) によりその活性を調べた。

また、外生殖器形成過程におけるヘッジホッグシグナルや Wnt シグナルの寄与を調べるために、様々な遺伝子改変マウス(ヘッジホッグシグナルや Wnt シグナルに対する gain-of-function 型や loss-of-function 型遺伝子改変マウス)の解析を行った。さらに外生殖器の性的二型形成に必要なアンドロゲンシグナルと、増殖因子群との相互作用を調べた。これらのマウスにおいて、遺伝子発現解析(免疫組織染色、*in situ* hybridization や定量的 RT-PCR)等の手法を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Cre ドライバーマウスの検討

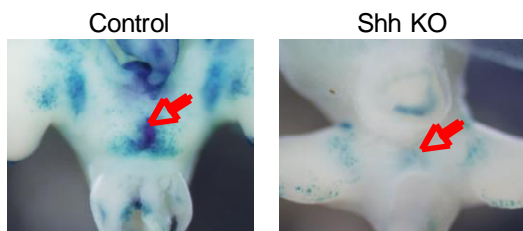
まず外生殖器初期形成過程においてマウス遺伝学的解析を可能とするための条件について検討を行った。その結果、外生殖器の内胚葉性上皮で薬剤誘導型 Cre 組み換え酵素を発現するマウス (Shh<sup>CreER</sup>) を用いることにより、詳細な研究が可能となることがわかった。具体的には、タモキシフェンを胎生 9.5 日に母獣に投与すると、初期外生殖器先端に位置する外胚葉に由来する上皮(外生殖器の突出・伸長のためのシグナリングセンターである DUE を含む領域)に Cre の活性が見られることが分かった。さらに外生殖器全体に作用する Cre ドライバーとして Isl1-Cre マウス、Hoxb3-Cre マウスが有用であることが分かった。

### (2) 初期外生殖器形成における遺伝子発現カスケードの解析

外生殖器原器が隆起し始める胎生 11 日齢頃の総排泄腔は、内胚葉性上皮(将来の尿道や直腸の上皮)と中胚葉由来の間葉、その外側を外胚葉性上皮が覆っている。このように

由来の異なる組織が複雑に相互作用しながら発生が進んでいくことが知られており、組織間クロストークのための分泌性増殖因子の作用が不可欠である。例えば内胚葉性上皮で発現するソニックヘッジホッグ (Shh) は、さらにその先端にある遠位尿道板上皮 (DUE) に限局して Fgf8 の発現が観察される。DUE は、肢芽形成時に一過的に形成される外胚葉性頂堤 (AER) と性質が似ている (AER で発現する Fgf8 を初めとする Fgf リガンドは、直下の間葉組織の維持に必須であり、肢芽の伸長に不可欠である)。Shh ノックアウト (KO) マウスの外生殖器は全く伸長しないことから、外生殖器形成における Shh の重要性は明らかであり、したがって、外胚葉で発現する Shh から DUE で発現する Fgf8 までの遺伝粗発現のカスケードの同定を試みた。

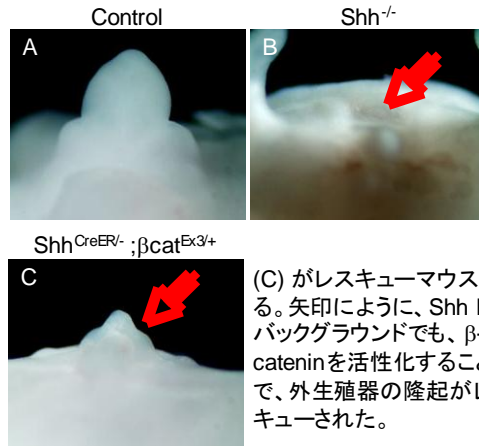
外生殖器の突出・伸長が見られる胎生 10.5 日から 11.5 日くらいの時期において、Shh は内胚葉性上皮で強く発現するが、他の増殖因子群の発現を見てみると、Wnt シグナル活性が DUE を中心とした領域に見られる (Wnt シグナルの活性は Axin2 の mRNA 発現、 $\beta$ -catenin タンパク質の発現、TopGAL レポーターマウス; Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルのインジケータートランスジェニックマウスを使って解析した)。そのような Wnt 活性は、Wnt リガンドの発現とともに、Shh KO マウスでは消失した。したがって、Shh シグナルの下流に Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが位置することが示唆された (下図)。実際、内胚葉性上皮特異的  $\beta$ -catenin コンディショナル KO マウスでは



赤矢印は DUE を示している

Fgf8 の発現も外生殖器の伸長も抑制されることから、Shh KO マウスで外生殖器が全く形成されない一因は、その下流の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが消失するためだと考えられる。さらにこの仮説を実証するために、Shh KO マウスにおいて  $\beta$ -catenin を活性化させた。すなわちこのマウスで表現型がレスキュー、すなわち外生殖器の突出・伸長するかどうかを解析した。そのために Shh KO のバックグラウンドにおいて、DUE 領域を含む内胚葉性上皮で構成的活性型  $\beta$ -catenin を発現させたところ、外生殖器の突出・伸長がみら

れ (下図)、さらに Fgf8 の発現もレスキュー

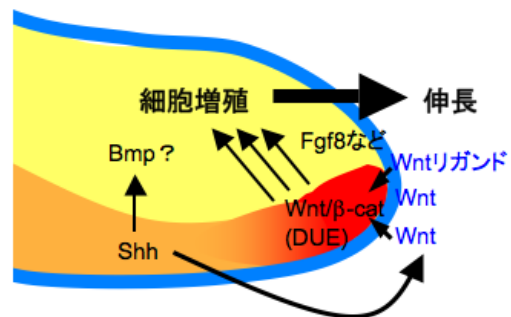


(C) がレスキューマウスである。矢印のように、Shh KO バックグラウンドでも、 $\beta$ -catenin を活性化することで、外生殖器の隆起がレスキューされた。

された。この Fgf8 発現は、ChIP アッセイやレポーター遺伝子アッセイにより、 $\beta$ -catenin が直接的に制御していることを明らかにした。

DUE における Fgf8 の役割を調べるに、器官培養系を用いて解析を行った結果、Fgf8 は外生殖器のとくに間葉の細胞増殖を刺激することが分かった。しかしながら、Fgf8 KO マウスでは外生殖器は形成される。これは Fgf8 KO マウスでは Fgf4 が異所的に発現するためであると推察された。さらに Fgf8, Fgf4 ダブル KO マウスでは、今度は Fgf3 発現が顕著に増加してくることが分かった。このような Fgf の複雑な補償性は肢芽形成時にも報告されている。したがって胎児付属肢形成時には、総量としての Fgf リガンドを検知するシステムが働いている可能性が示唆された。

このように、ヘッジホッグ、Wnt、Fgf などの細胞増殖因子がかかわる組織間相互作用に注目し、そのシグナルカスケードすなわち、生殖器の初期の隆起過程において内胚葉性上皮から分泌されるソニックヘッジホッグシグナルを最上位として、Wnt、Fgf8 と続くシグナルカスケードを同定した (下図)。



(3) 後期外生殖器形成におけるシグナル因子の作用について

伸長制御に引き続いて外生殖器形成の特徴として雌雄差の形成が挙げられる。そこで Shh の初期発生における大切な役割と後期における役割を検討した。Shh の時間的な寄与について詳細に解析するために、Shh のタモキフェン誘導型コンディショナル KO マウスによって時期特異的に Shh 遺伝子を欠失させたところ、外生殖器が伸長するためには Shh は初期の一時期に必要であることが分かった。つまりいったんある程度伸長してしまえば、後期には Shh は組織が大きくなるのに必要ないことが示唆された。しかしその一方で後期特異的 Shh コンディショナルノックアウトマウスの雄外生殖器では、包皮形成がうまくいかず、雌のような形態を呈することがわかった。さらにヘッジホッグシグナルのエフェクターである Gli2 KO マウスにおいても包皮形成に障害がみられ、尿道下裂様の症状を呈することも明らかにした。

このようにヘッジホッグシグナルが外生殖器の雄性化に関与することが示唆されたが、ヘッジホッグシグナル活性自体には性差は見られないことから、ヘッジホッグシグナルが、アンドロゲンの補助因子として作用する可能性が示唆された。

#### 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 6 件)

① Miyagawa S, Sato M, Iguchi T. Molecular mechanisms of induction of persistent changes by estrogenic chemicals on female reproductive tracts and external genitalia *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011 in press 査読有り

② Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, Matsumoto T, Kaneko T, Yoshinaga K, Yamamura KI, Kurita T, Kato S, Moon AM, Yamada G. Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology.* 2011 in press 査読有り

③ Matsumaru D, Haraguchi R, Miyagawa S, Motoyama J, Nakagata N, Meijlink F, Yamada G. Genetic analysis of hedgehog signaling in ventral body wall development and the onset of omphalocele formation. *PLoS One.* 20:e16260, 2011 査読有り

④ Miyagawa S, Katsu Y, Ohta Y, Sudo T, Lubahn DB, Iguchi T. Estrogen receptor ESR1 is indispensable for the

induction of persistent vaginal change by neonatal 5alpha-dihydrotestosterone exposure in mice. *Biol Reprod.*82:497-503, 2010 査読有り

⑤ Miyagawa S, Moon A, Haraguchi R, Inoue C, Harada M, Nakahara C, Suzuki K, Matsumaru D, Kaneko T, Matsuo, I, Yang L, Taketo MM, Iguchi T, Evans SM, Yamada G. Dosage dependent hedgehog signals integrated with Wnt/b-catenin regulate embryonic external genitalia formation as an appendicular program. *Development.* 136:3969-3978, 2009. 査読有り

⑥ Miyagawa S, Satoh Y, Haraguchi R, Suzuki K, Iguchi T, Taketo MM, Nakagata N, Matsumoto T, Takeyama K, Kato S, Yamada G. Genetic integrations of the androgen and Wnt/beta-catenin pathways for the masculinization of external genitalia. *Mol Endocrinol.* 23:871-880, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① Miyagawa S., Katsu Y., Iguchi T. Estrogen receptor a is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5a-dihydrotestosterone exposure 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2009 年 12 月 10 日

② 宮川信一、原口竜摩、井口泰泉、山田源. 外生殖器雄性化過程におけるヘッジホッグシグナルの解析第 29 回日本アンドロロジー学会学術大会 (東京) 2010 年 7 月 30 日

[その他]

ホームページ  
<http://www.nibb.ac.jp/%7Ebioenv1/index-j.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 信一 (MIYAGAWA SHINICHI)  
大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教  
研究者番号: 30404354