

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570085

研究課題名(和文)アンドロゲンによる造血・血管発生機構の解明

研究課題名(英文)The role of androgen signaling for hemato-vascular development

研究代表者

荻野 由紀子(OGINO, Yukiko)

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：00404343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：メダカ受精卵に生理的濃度のアンドロゲンが含まれており、アンドロゲン受容体を介したシグナルが、初期胚の赤血球、卵黄静脈の分化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。アンドロゲンが作用するのは中胚葉からの血液血管内皮細胞前駆細胞分化段階であり、アンドロゲン受容細胞の細胞分化系譜解析により、アンドロゲン受容細胞が、細胞自律的に血球血管系細胞に分化することを示す先駆的知見を得た。さらに遺伝子発現解析から Wnt, Bmpシグナル経路の複数の因子がアンドロゲンの制御を受けるエフェクター因子として機能することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Androgen-androgen receptor (AR) signaling was found to be involved in the hemato-vascular development during the early embryogenesis of medaka. Using the combination of gene expression and cell lineage analyzes, we demonstrated that the differentiation of hemato-vascular progenitor cells from the lateral plate mesoderm is under the influence of androgen action. Androgen response was detected in erythroid cells and endothelial cells of yolk vein. We identified the Wnt and Bmp signaling genes as potential effector genes of androgen signaling. This study for the first time defines role of androgen-AR signaling during the early embryogenesis in medaka.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：アンドロゲン 内分泌 脊椎動物 発生 性ホルモン

1. 研究開始当初の背景

母体由来の内分泌ホルモンは、初期胚発生や胚の内分泌器官が機能開始するまでのホメオスタシス維持に貢献していると考えられている。卵生生物である鳥類や魚類の卵黄にはアンドロゲンが含まれており、初期胚発生に果たす役割が注目されている。しかし、こうした母体由来のホルモンの重要性、具体的な作用の多くは不明であった。我々は、メダカ初期胚に下流遺伝子を活性化するために十分量のアンドロゲンを検出し、モルフォリノオリゴ (MO) を用いたアンドロゲン受容体 (AR) 機能阻害実験から、アンドロゲンシグナルが初期胚の血球血管発生に重要な役割を果たすことを示唆する結果を見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、1) AR 遺伝子機能阻害により生じるメダカ個体レベルの表現型を分子レベルからアプローチする。2) トランスジェニックメダカを駆使し、アンドロゲン応答細胞の分化系譜を個体レベルで解析することで、“アンドロゲンによる生命機能に必須の発生現象”について、分子生物学的基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

AR シグナリングの血液血管内皮細胞分化への貢献を解析する新たな tool として、AR シグナリングインディケーターメダカ (アンドロゲン受容細胞を生体内で可視化できる) を作出し、GATA-GFP, Fik-GFP メダカ系統 (赤血球分化マーカーGATA1、血管内皮分化マーカーFik1 陽性細胞をそれぞれGFPでラベルできる) を用いたアンドロゲン受容細胞の細胞分化系譜解析により、アンドロゲン受容細胞が、細胞自律的に血球血管系細胞に分化するのか、あるいは血液血管内皮前駆細胞を支持する微小環境として、増殖因子などの分泌性因子の発現制御などを介して細胞非自律的に血球血管系細胞分化を促進するのか明らかにする。

AR MO 導入胚と Control MO 導入胚間のマイクロアレイ解析、遺伝子発現プロファイルを構築し、アンドロゲン標的遺伝子を同定する。

アンドロゲンシグナリングの個体内機能解析系として、私が作出したユニークなトランスジェニック系統 (HSP-WTAR GFP, HSP-DNAR GFP メダカ系統 (野生型 AR: WTAR、機能抑制型の dominant negative AR: DNAR を GFP との融合タンパク質として、それぞれヒートショックにより、時期・組織特異的に発現できる)) を用いて、中胚葉からの造血・血管系細胞分化に果たすアンドロゲンシグナリングの重要性を明らかにし、アンドロゲンシグナリングによる血球血管発生の遺伝子カスケードを解明する。

アンドロゲンシグナリングによる血球血管発生制御は、2 分子種の AR が現れた真骨魚類で新たに得られた機能であるのか、脊椎

動物で共通した機能であるのか、AR 遺伝子欠損マウスを用いた比較解析により明らかにする。

4. 研究成果

アンドロゲン応答細胞の分化系譜解析から卵黄静脈血管内皮細胞および赤血球において、アンドロゲン応答細胞を検出した。哺乳類において、血管内皮細胞や HSC に AR が発現しているとの知見があるが、その役割の詳細はわかっていない。本知見は、アンドロゲン受容細胞が、細胞自律的に血球血管系細胞に分化する可能性を示す先駆的知見である。さらに、AR 標的遺伝子の網羅的解析として、AR MO 導入胚と Control MO 導入胚間のマイクロアレイ解析を行った。AR MO 導入胚では血液血管内皮前駆細胞で発現する Fli1, Tal1、および赤血球分化マーカーGATA1、

globin の発現低下、Bmp4、Bmp7、Dkk1 の発現上昇、Wnt5a の発現低下が認められ、AR MO 導入胚では、Bmp シグナリングが活性化、Wnt シグナルが抑制されている可能性が考えられた。アンドロゲンはこうした増殖因子群の発現制御を介して初期胚期における造血・血管発生を制御していると考えられた。

AR 機能阻害胚で顕著に発現減少した Lmo2 (血液血管内皮細胞前駆細胞分化に必須の因子) mRNA をメダカ胚に導入すると、AR MO 導入胚で見られる赤血球減少・血管走行異常が、顕著に回復した。また、Dominant-negative AR (DN-AR) の発現を Heat shock 誘導するメダカを用いて、初期胚期のアンドロゲン応答期を解析した。体節形成期までの一次造血開始過程で DN-AR を発現させると、AR MO 導入胚と同様の赤血球減少・血管走行異常が誘導された。一方で、一次造血開始以降から DN-AR を発現させても異常は認められなかった。以上の結果から、メダカ初期胚中胚葉細胞からの血液血管前駆細胞分化過程にアンドロゲンが重要な役割を果たすことが明確となった。

AR 遺伝子欠損マウスを用いた造血における表現型解析として、末梢血を各血球細胞表面マーカーを用いてソートし、血球分化に偏りがみられるか解析した。少なくとも2ヶ月齢のマウスでは血液細胞の分化に顕著な異常は認められなかった。ヒトにおいて男性更年期以降のアンドロゲン産生低下は、貧血や心血管系疾患の発症に関連性があることが指摘されていることから、老齢期のマウスにおける造血・血管発生、血液幹細胞 HSC 維持機構に關与する可能性が考えられた。よって、さらに老齢化 AR 遺伝子ノックアウトマウスにおける骨髓、胸腺、脾臓における血液幹細胞画分の FACS 解析を行った。しかし、顕著な異常は認められず、少なくとも哺乳類において、アンドロゲンは造血に必須の役割を果たしていないと考えられた。

造血発生の機構には種差があり、魚類と哺乳類では大きく異なることが予想された。

一方で、ARの標的となる候補因子の探索のため、二次性徴に果たすARの役割について解析を進めた結果、Lef1, Bmp7がアンドロゲンのエフェクター因子として二次性徴発現において必須の役割を果たすことが明らかとなり、初期胚発生および二次性徴発現過程ともに、アンドロゲンの作用機序として、Wnt, Bmpシグナルが重要な仲介因子として機能していることが明らかとなった。

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件すべて査読あり)

(1) Ogino Y, Hirakawa I, Inohaya K, Sumiya E, Miyagawa S, Denslow N, Yamada G, Tatarazako N, Iguchi T
Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka. **Endocrinology** (2014) 155, 449-462.
doi: 10.1210/en.2013-1507.

(2) Oka T, Mitsui-Watanabe N, Tatarazako N, Onishi Y, Katsu Y, Miyagawa S, Ogino Y, Yatsu R, Kohno S, Takase M, Kawashima Y, Ohta Y, Aoki Y, Guillet LJ Jr, Iguchi T.
Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. **J Appl Toxicol** (2013) 33, 991-1000
doi: 10.1002/jat.2825.

(3) Brockmeier EK, Ogino Y, Iguchi T, Barber DS, Denslow ND.
Effects of 17 α -trenbolone on Eastern and Western mosquitofish (*Gambusia holbrooki* and *G. affinis*) anal fin growth and gene expression patterns. **Aquat Toxicol**. (2013) 15:128-129, 163-70.
doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.007.

(4) Hirakawa I, Miyagawa S, Katsu Y, Kagami Y, Tatarazako N, Kobayashi T, Husano T, Mizutani T, Ogino Y, Takeuchi T, Ohta Y, Iguchi T.
Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol. **Chemosphere**. (2012) 87:7, 668-74
doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.047.

(5) Lange A, Katsu Y, Miyagawa S, Ogino Y, Urushitani H, Kobayahi T, Hirai T,

Shears JA, Nagae M, Yamamoto J, Ohnishi Y, Oka T, Tatarazako N, Ohta Y, Tyler CR, Iguchi T.

Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring.

Aquat Toxicol. (2012)109, 250-8.
doi: 10.1016/j.aquatox.2011.09.004.

(6) Ogino Y, Miyagawa S, Katoh H, Prins GS, Iguchi T, Yamada G.

Essential functions of androgen signaling emerged through the developmental analysis of vertebrate sex characteristics.

Evol Dev. (2011)13:3, 315-25
doi: 10.1111/j.1525-142X.2011.00482.x.

[学会発表](計7件)

(1) Yukiko Ogino, Keiji Inohaya, Eri, Sumiya, Shinichi Miyagawa, Gen Yamada, Taisen Iguchi
Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka 第47回日本発生生物学会大会 APDBN 共催 (2014年5月29日)、ウインクあいち(愛知県)

(2) 荻野 由紀子, 角谷 絵里, 宮川 信一, 井口 泰泉
メダカにおけるアンドロゲン下流応答因子の探索
環境ホルモン学会第16回研究発表会(2013年12月12日)、東京大学(東京都)

(3) 荻野 由紀子, 井口 泰泉
アンドロゲン受容体遺伝子の進化と雄性形質発現の分子機構
日本動物学会第84回岡山大会(招待講演)
(2013年9月28日)、岡山大学(岡山県)

(4) Yukiko Ogino, Taisen Iguchi
Functional characterization of medaka AR genes and molecular mechanism androgen dependent sex characteristics development.
環境ホルモン学会第15回研究発表会(2012年12月18日)、東京大学(東京都)

(5) 荻野 由紀子, 山田 源, 井口 泰泉
脊椎動物におけるAndrogen receptor 遺伝子の進化と雄性形質発現の分子機構
日本動物学会中部支部大会(2012年11月17日)、松本市浅間温泉みやま荘(長野県)

(6) Yukiko Ogino, Gen Yamada, Taisen Iguchi
Molecular analysis of androgen dependent

sex characteristics development, western mosquitofish and medaka as model systems The 2012 Edwin W. Pauley Summer program in Marine Biology (招待講演). (2012年7月26日). Hawaii Institute of Marine Biology, Coconut Island, USA)

(7) 荻野 由紀子: アンドロゲンが司る多様な生命現象: 二次性徴発現および初期胚血球血管発生分化 日本動物学会第82回大会(招待講演). (2011年9月21日). 大雪クリスタルホール(北海道、旭川市)

〔図書〕(計 1 件)

Ohta S, Ogino Y, Suzuki K, Kamimura M, Tachibana K, Yamada G. Sonoporation for gene transfer into embryos. Cold Spring Harb Protoc.3 prot5581 (2011)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻野 由紀子 (OGINO, Yukiko)

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: 00404343

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

山田 源 (YAMADA, Gen)

和歌山医科大学・遺伝子制御学研究所・
教授

研究者番号: 80174712

坂本比呂志 (SAKAMOTO, Hiroshi)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号: 00347014