

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790229

研究課題名（和文）FGFシグナリングが制御する生殖器形成機構の解明：尿道下裂発症機序解明に向けて

研究課題名（英文）The role of FGF signaling in genital development: for understanding the mechanisms underlying hypospadias.

研究代表者

原田 理代（HARADA MASAYO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80555756

研究成果の概要（和文）：尿道下裂等の先天性発生異常が高頻度で起こる外生殖器について、その形態形成機構の解明を目的とした。遺伝子改変マウスを用いて、外生殖器の伸長並びに尿道形成におけるFGFシグナリングの機能を解析した。この研究により次のことを明らかにした。①外生殖器の伸長には、間葉におけるFGFシグナリングが必要である。②外胚葉性上皮におけるFGFシグナリングは尿道の管構造形成を制御している。③内胚葉性上皮におけるFGFシグナリングは尿道上皮形成を制御している。本研究は、頻発先天性疾患である尿道下裂の発症機序解明に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research is to understand the developmental mechanisms of external genitalia in which congenital malformations such as hypospadias occur at a high frequency. The roles of FGF signaling during the external genitalia outgrowth and urethral tubulogenesis were investigated using genetically modified mice. This research demonstrated that 1) mesenchymal FGF signaling is required for the GT outgrowth, 2) Ectodermal FGF signaling is required for urethral tube formation, 3) Endodermal FGF signaling contributes to stratification of urethral epithelium. These findings will contribute to the understanding of the molecular mechanisms of hypospadias.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：外生殖器、FGF、尿道、尿道下裂

1. 研究開始当初の背景

外生殖器は、生殖と排泄に関わる重要な器官であるが、先天性発生異常が高頻度で現れる器官でもある。特に、尿道下裂は、発症率が高いにもかかわらず、その発症機序に関する知見は少ない。尿道下裂の病態解明と原因追及が必要とされている。

外生殖器発生機構の解明は、生物の発生機

構を理解する上でも重要である。外生殖器は体幹部より隆起・伸長する器官であり、伸長というプロセスは、最も基本的な器官形成のプロセスの1つである。また、外生殖器は、伸長と同時進行で、その内部では、総排泄腔という1つの空洞から、将来の尿道と直腸という管構造が形作られる、特殊な形態変化を遂げる。外生殖器の伸長プログラムの理解と、空洞から管構造が構築されるプログラムの

理解は、機能を持った組織構造を作り出す将来の器官再生医療に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

生殖と排泄に必須である外生殖器の発生過程は、未解明な点が多く、どのようなメカニズムで外生殖器が隆起・伸長するのか、その後どのように尿道の管構造が形成されるのか、まだ、よく分かっていない。本研究では、外生殖器形成における FGF シグナリングの機能解析を主軸に、どのような細胞、分子メカニズムで外生殖器が形成されるのか明らかにすることを目的とした。更に、高頻度で起こる先天性発生異常である尿道下裂の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

外生殖器形成は、外生殖器の伸長と、尿道の管形成を含む形態変化が、同時進行で協調的に起こる。また、外生殖器は、間葉、外胚葉性上皮、内胚葉性上皮と 3 つの胚葉から構成されているのが大きな特徴である。外生殖器原基である生殖結節は、体幹末端の総排泄腔領域から隆起、伸長する。生殖結節の伸長に伴い、その内部では、内胚葉性上皮組織が腹側で尿道板を形成し、その後、尿道板が管状の尿道になる。本研究では、生殖結節の伸長における FGF シグナリングの役割と、尿道形成における FGF シグナリングの役割を明らかにすることを目的とした。

(1) 生殖結節伸長における FGF シグナリングの機能解析

これまでの研究では、遠位尿道上皮に発現する *Fgf8* が生殖結節の伸長を制御しているのではないかと推察されてきた。しかしながら、最近、*Fgf8* 欠損マウスは生殖結節の伸長にほとんど異常がないことが明らかになった。また、間葉組織で発現する *Fgf10* を欠損させたマウスも、生殖結節伸長に大きな異常はみられない。生殖結節の伸長に FGF シグナルは必要ないのかという疑問が生じる。これらの結果は、22 個存在する FGF 間の機能重複による補償機構によるものかもしれない。そこで、本研究では、外生殖器発生における FGF シグナリングの機能を明らかにすることを目的とし、生殖結節予定領域全体で、FGF リガンドではなく、FGF 受容体 (*Fgfr*) を欠損させたマウスを解析することにした。生殖結節では 4 つの *Fgfr* 遺伝子のうち、*Fgfr1*、*Fgfr2* の発現が報告されているので、生殖結節予定領域全体で、*Fgfr1*、*2* を欠損させたマウスを用いて、FGF シグナリングがどのような細胞、分子メカニズムで外生殖器の伸長に寄与しているのか明らかにすることを目的とした。

(2) 外生殖器尿道形成における FGF シグナルの機能解析

Fgfr2b 欠損マウスは尿道の管状構造形成が阻害され尿道下裂となり、また、尿道上皮の分化が阻害されるとの報告がある。*Fgfr2b* は外生殖器の外胚葉性上皮と内胚葉性上皮の両方に発現する。そのため、外胚葉性上皮と内胚葉性上皮、各々における FGF シグナルの役割は分かっていない。そこで、本研究では、外胚葉性上皮、内胚葉性上皮特異的に *Fgfr1*、*2* を欠損させたマウスを用いて、各々の FGF シグナリングが、どのような細胞、分子メカニズムで外生殖器の尿道形成に寄与しているのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常マウスの外生殖器形成過程における FGF シグナル伝達部位の同定

遺伝子改変マウスの解析に先立ち、外生殖器形成過程における FGF シグナル伝達部位を解析した。胎齢 10.5 日から 16.5 日までの正常マウスの外生殖器について、FGF 刺激によりリン酸化される ERK に着目し、リン酸化 ERK を免疫組織化学染色で解析した。また、FGF シグナル伝達が起こると発現が上昇し、FGF シグナル伝達の指標になるとの知見が蓄積されつつある *Etv5* 遺伝子の発現を、*in situ* hybridization 法で解析した。FGF 受容体欠損マウスの表現型解析を行う際に、この基本情報を、どの時期のどの部位に着目すべきかの指標にした。

(2) 生殖結節伸長における FGF シグナルの機能解析

生殖結節伸長に関して、生殖結節予定領域全体で *Fgfr1*、*2* を欠損させ、生殖結節伸長における FGF シグナリングの役割を解析した。形態解析の他、伸長過程で重要な細胞増殖、細胞死の解析を行った。更に、FGF シグナルの下流応答因子を免疫組織化学染色、RNA *in situ* hybridization 法で解析し、外生殖器伸長における、FGF シグナルネットワークの解明を目指した。

(3) 外生殖器尿道形成における FGF シグナルの機能解析

尿道形成機構に関して、外胚葉性上皮、内胚葉性上皮特異的に *Fgfr1*、*2* を欠損させ、尿道形成において各々の FGF シグナルがどのような役割を果たしているか解析した。形態解析、細胞増殖、細胞死の解析の他、上皮形成関連分子の発現を免疫組織化学染色法で解析した。

4. 研究成果

(1) 正常マウスの外生殖器形成過程における FGF シグナル伝達部位の同定

FGF シグナル伝達の指標にしたリン酸化 ERK と *Etv5* について、外生殖器における、リン酸化 ERK の検出部位と *Etv5* の検出部位は、ほぼ同じであった。

胎齢 10.5 日では、総排泄腔周辺の腹側間葉で弱い FGF シグナルが確認された。生殖結節の隆起が明瞭となる胎齢 11.5 日では、間葉において強い FGF シグナルが検出された。特に生殖結節の先端部で強いシグナルが検出された。その後、胎齢 12.5 日では、間葉における FGF シグナルは検出されたが、胎齢 11.5 日に比べて弱かった。一方、この時期は、内胚葉性上皮と外胚葉性上皮における FGF シグナルが顕著であった。胎齢 13.5 日になると、間葉、外胚葉性上皮、内胚葉性上皮の全てで検出された。胎齢 14.5 日では、内胚葉性上皮の背側で強い FGF シグナルが検出された。胎齢 16.5 日になると、生殖結節先端部の腹側外胚葉性上皮でシグナルが検出された。

まとめると、生殖結節隆起・伸長時に、間葉において FGF シグナルが著しく活性化され、その後の尿道形成過程では、三胚葉全てにおいて FGF シグナルが活性化されていた。FGF シグナル活性化領域は、胎児期の各発生段階で著しく変化する事が明らかとなった。

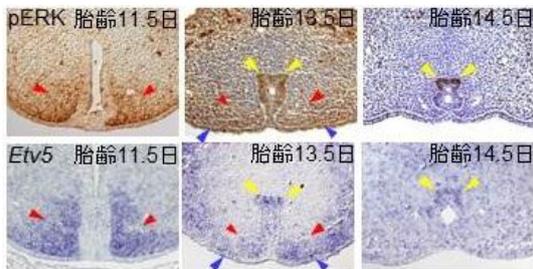


図1 正常マウス外生殖器における FGF シグナル伝達。上段;免疫染色によるリン酸化 ERK の検出、下段; RNA *in situ* hybridization による *Etv5* の検出。赤矢頭; 間葉における FGF シグナル、青矢頭; 外胚葉性上皮における FGF シグナル、黄矢頭; 内胚葉性上皮における FGF シグナル。

(2) 生殖結節伸長における FGF シグナルの機能解析

生殖結節全体で Cre 組換え酵素を発現するマウスを用いて、*Fgfr1, 2* 遺伝子の条件付き遺伝子欠損マウス胚を作製した。

Fgfr1 欠損マウス及び *Fgfr2* 欠損マウスは、生殖結節の伸長異常がほとんど認められなかったが、*Fgfr1, 2* 二重欠損マウスは、著しい生殖結節伸長不全を示した。よって、FGF シグナリングが生殖結節の伸長に必要であ

ることが明らかとなった。また、生殖結節の伸長に関して、*Fgfr1* と *Fgfr2* の機能的重複が示唆された。

生殖結節の外胚葉性上皮及び内胚葉性上皮特異的な *Fgfr1, 2* 二重欠損マウスは、どちらも外生殖器の伸長に顕著な異常は認められなかった。よって、生殖結節の伸長には、主に間葉における FGF シグナリングが貢献していると考えられた。

生殖結節伸長阻害の一因として、生殖結節における異所的細胞死が考えられた。また、WNT シグナル及び BMP シグナルの低下が観察されたことから、生殖結節伸長に関して、FGF シグナルが WNT、BMP シグナルに作用し、伸長を制御している可能性が示唆された。

正常マウス 生殖結節全体における *Fgfr1, 2* 二重欠損マウス



図2 生殖結節全体における *Fgfr1, 2* 二重欠損マウスは著しい生殖結節形成不全を示した。

(3) 外生殖器尿道形成における FGF シグナルの機能解析

①尿道形成機構に関して、主に外生殖器外胚葉性上皮で Cre 組換え酵素を発現するマウスを用いて、外胚葉性上皮特異的に *Fgfr1, 2* 遺伝子を欠損させ、外胚葉性上皮の FGF シグナルがどのような役割を果たしているか解析した。外胚葉性上皮特異的 *Fgfr1, 2* 二重欠損マウスは、外生殖器上皮の重層化不全を示し、基底細胞の数が減少していた。また、包皮形成不全と尿生殖洞直腸中隔形成不全を伴う尿道下裂様症状を示した。これらの結果から、外胚葉性上皮における FGF シグナリングは尿道の管構造形成を制御していることが明らかとなった。

正常マウス 外胚葉性上皮特異的 *Fgfr1, 2* 二重欠損マウス



図3 外胚葉性上皮特異的 *Fgfr1, 2* 二重欠損マウスは尿道下裂様症状を示した。X-gal 染色により、外胚葉性上皮由来組織が青色に染色されている。

②尿道形成機構に関して、外生殖器内胚葉性上皮で Cre 組換え酵素を発現するマウスを用

いて、内胚葉性上皮特異的に *Fgfr1, 2* 遺伝子を欠損させ、内胚葉性上皮のFGFシグナルがどのような役割を果たしているか解析した。内胚葉性上皮特異的な *Fgfr1, 2* 二重欠損マウスは、尿道上皮の重層化不全を示した。また、尿道上皮細胞の細胞接着分子の発現が低下しており、尿道上皮の細胞接着異常が推察された。更には、尿道上皮周辺の間葉細胞の増殖が低下し、尿道腔狭窄が観察された。これらの結果から、内胚葉性上皮におけるFGFシグナリングは尿道上皮形成を制御していることが明らかとなった。

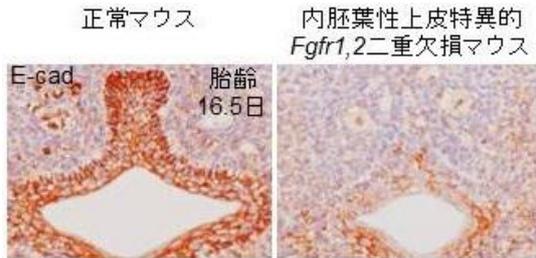


図4 内胚葉性上皮特異的 *Fgfr1, 2* 二重欠損マウスは尿道腔が狭窄し、尿道上皮細胞のE-cadherinの発現が低下していた。

以上の研究成果は、外生殖器形成機構の理解と、尿道下裂発症機序の理解に貢献すると考えられる。

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1件)

① Omori A, Harada M, Ohta S, Villacorte M, Sugimura Y, Shiraishi T, Suzuki K, Nakagata N, Ito T, Yamada G. Epithelial Bmp (Bone morphogenetic protein) signaling for bulbourethral gland development: a mouse model for congenital cystic dilation. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2011 Sep;51(3):102-109. 査読有 doi: 10.1111/j.1741-4520.2011.00318.x.

[学会発表] (計2件)

① Harada M, Murakami H, Okawa A, Okimoto N, Hiraoka S, Nakahara T, Akasaka R, Shiraishi Y, Futatsugi N, Mizutani-Koseki Y, Kuroiwa A, Shirouzu M, Yokoyama S, Taiji M, Iseki S, Ornitz DM, Koseki H, Nimura A, Yamaguchi K, Akita K. FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion to mediate joint development. *Hong Kong Society for Developmental Biology Symposium From Embryology to Disease Mechanisms*, 26-27 November 2012, Hong Kong

② Harada M, Murakami H, Okawara A, Okimoto N, Hiraoka S, Nakahara T, Akasaka R, Shiraishi Y, Futatsugi N, Kuroiwa A, Yokoyama S, Taiji M, Iseki S, Ornitz DM, Yamaguchi K, Akita K, Koseki H. FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion to mediate joint development. *Molecular Genetics*, 20-23 Sep 2011, Hinxton, Cambridge, UK

[図書] (計1件)

① 原田理代、山田源 (編集 山村研一、若菜茂晴)、中山書店、論文ができてしまう! 疾患モデルマウス表現型解析指南、2011、477

[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

原田 理代 (HARADA MASAYO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・臨床解剖学分野・助教

研究者番号: 80555756

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: