

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25460246

研究課題名(和文) 男性生殖系器官の発生・分化メカニズムの機能形態解析と分化マーカーの開発

研究課題名(英文) Functional morphology analysis of developmental and differentiation mechanism of male reproductive organs

研究代表者

吉永 一也 (YOSHINAGA, KAZUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・教授

研究者番号：50136719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：男性生殖系器官の発生・分化メカニズムを解明する目的で、胎生期～成熟期マウスの精巣上体及び前立腺における細胞表面糖鎖や細胞骨格分子の発現動態や局在変化を免疫組織化学的に解析した。その結果、レクチン結合部位、プロトン分泌関連分子、サイトケラチン分子等の分布・局在パターンが各器官上皮の領域、分化時期、細胞種で異なることを見いだした。また、いくつかの糖鎖構造や分子が上皮細胞の分化マーカーとして有効である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of development and differentiation of male reproductive organs, we examined the immunohistochemical expression and localization of cell surface sugar chains and cytoskeletal molecules in the epididymis and prostate during fetal and postnatal development of mice. We found that the distribution and localization patterns of lectin-binding sites, proton secretion-related molecules, and cytokeratin molecules are different depending on each epithelial region, differentiation stage or cell type. We also showed that some sugar chain structures and molecules may provide useful markers for research into cell differentiation.

研究分野：生殖医学生物学

キーワード：細胞・組織 発生・分化 男性生殖器

### 1. 研究開始当初の背景

精巣上体や前立腺は精子の運動や活性化に寄与する男性特有の器官である。両器官はまた、男性不妊症や前立腺がんなど疾患の起りやすい場所として医学的・社会的関心が寄せられており、その発生・分化メカニズムを解明するための基礎的研究が強く求められている。男性生殖器の発生・分化は男性ホルモンであるアンドロゲンに依存していることは分かっているが、その基盤となる正常の精巣上体管上皮及び前立腺管上皮の分化メカニズムはよく分かっていない。このような背景のなかで、我々は最近、ある特定の糖鎖構造や細胞骨格分子が男性生殖系器官を構成する細胞の特異マーカーとして有用であることを見いだした。そこで本計画では、こうした特異マーカーを用いて男性生殖系器官形成に特有の細胞間相互作用を担う分子の発現・局在を明らかにし、また新たな分化マーカーを見いだすことが重要であると考えに至った。

### 2. 研究の目的

本計画では、男性生殖器のうち医学的・社会的関心が寄せられている精巣上体及び前立腺を対象とした。本研究の目的は、これまでの我々の研究成果をさらに進展させるために、「男性生殖系器官形成に特有の細胞間相互作用を担う生体内分子機構の解明と細胞分化マーカーの開発」を目指して、そこで発現する細胞表面糖鎖/受容体分子や細胞骨格分子に焦点を絞り、その発現動態及び局在変化を組織細胞レベルで明らかにすることである。そのために、目的とする糖鎖や分子が器官形成のいつ、どこで、どのように発現・局在するのかについて、胎生期～幼若期～成熟期のマウスを用いて主にタンパク質レベルで解析する。

### 3. 研究の方法

(1) 精巣上体及び前立腺で発現する機能分子の免疫組織化学的局在解析：

精巣上体管上皮及び前立腺管上皮の細胞化学的特性と機能的分化を探る目的で、胎生期～成熟期マウス各器官の灌流固定・凍結またはパラフィン包埋切片を作成し、目的の分子に対する特異抗体を用いて酵素抗体法または蛍光抗体法によりその発現・局在を検索する。陽性反応を示した細胞の種類は、既知のマーカー抗体を用いて免疫多重染色法により同定する。なお、目的の抗原性が低い場合には抗原不活化処理を施して観察する。

(2) 前立腺で発現する糖鎖構造のレクチン組織化学的解析：

前立腺管上皮の細胞化学的特性と機能的分化を探る目的で、幼若期～成熟期マウスにお

ける糖鎖発現について、レクチン組織化学と免疫組織化学を組み合わせた手法を用いて解析する。灌流固定・凍結またはパラフィン包埋切片を作成し、各種標識レクチンを用いてその結合部位を検索する。レクチンの糖結合特異性は単糖添加実験により検証する。次に、レクチン組織化学とマーカー抗体とを組み合わせた蛍光多重染色を施して陽性細胞の種類を同定し、各細胞で発現する糖鎖構造を決定する。

### 4. 研究成果

(1) 精巣上体における細胞骨格分子・サイトケラチンの局在：

各種サイトケラチン(CK)分子の発現・局在は領域、上皮細胞種(主細胞・明細胞・基底細胞)、分化時期で異なることが明らかとなり、これらCKは各細胞の機能の違いを生み出す可能性が示唆された。とくにCK5/14は基底細胞の分化マーカーとして有効であることが示された。また幼若期の発現パターンから、基底細胞は未分化円柱上皮から分化し、後に背の低いドーム型と高いフラスコ型が存在することを見いだした。フラスコ型は水分吸収が盛んな精巣上体起始部に多数存在することも判明した。さらに、上皮の形態的・機能的分化は精子が精巣上体に到達する以前に完了することが示唆された。

(2) 精巣上体における液胞型プロトンポンプ(V-ATPase)の局在：

V-ATPaseは生後2週目の未分化円柱上皮で発現を開始し、明細胞の分化に伴ってその強さを増すことが明らかとなった。また、V-ATPaseは精巣上体の領域で異なる分布・局在パターンを示し、精子貯蔵の場である精巣上体遠位部や精管に多数存在していることが判明した。この結果、V-ATPaseは明細胞の分化マーカーとして有効であることが示された。

(3) 精巣上体におけるタイト結合分子・クローデインの局在：

血液-精巣上体関門のタイト結合を構成するクローデイン(CLD)分子は、精巣上体の領域や分化時期で異なる発現・局在パターンを示すことが判明した。この結果、タイト結合は複数のCLD分子で構成され、血液-精巣上体関門には複雑な制御機構が存在することが示唆された。また一部のCLD分子はタイト結合部に加え、隣接する上皮細胞同士の接触面に沿って局在することが明らかとなり、細胞間接着や細胞間相互作用に関与する可能性が示唆された。

(4) 前立腺におけるレクチン結合部位：

前立腺管上皮を構成する分泌細胞や基底細胞に多種類のレクチン結合部位が存在することを確認した。また分泌細胞はマンノース鎖、一部領域の基底細胞はN-アセチルグルコサミン鎖を発現していることが判明した。さらに幼若期のレクチン結合パターンから、前立腺管上皮の糖鎖構造は領域や細胞の機能または分化時期によって異なり、変化することが明らかとなった。数種レクチンおよびその認識糖鎖構造は、細胞の分化マーカーまたは領域マーカーとして有効であることが示唆された。

(5) 前立腺における細胞骨格分子・サイトケラチンの局在：

各種サイトケラチン(CK)分子の発現・局在は前立腺管上皮の領域、細胞種、分化時期で異なることが明らかとなった。CK5は基底細胞、CK8は分泌細胞の各分化マーカーとして有用であることが示された。また胎生期～幼若期の発現パターンから、基底細胞は胎生期の尿生殖洞上皮に由来し、幼若期の未分化前立腺上皮から分化する可能性が示唆された。こうした基底細胞は形態学的可塑性を示し、前立腺管の形態を支持する役割をもつことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

川畑遊星、吉永一也：血液 - 精巣上体関門の構造と機能、形態・機能、査読有、Vol. 12, pp. 62-67, 2018

Sakuda K, Muragishi R, and Yoshinaga K: Histochemical evaluation of postnatal lectin-binding sites in the mouse prostate. *Okajimas Folia Anat Jpn*, (査読有) 92: 61-66, 2016

Sakuda K, Yoshida A, Muragishi R, and Yoshinaga K: Lectin-binding sites in epithelial cells of the mouse prostate gland. *Okajimas Folia Anat Jpn*, (査読有) 91: 91-95, 2015

Yoshida A, Murakami K, Sakuda K, and Yoshinaga K: Cytokeratin localization and basal cell differentiation in the epididymal epithelium during postnatal development of the mouse. *Okajimas Folia Anat Jpn*, (査読有) 91: 83-89, 2015

村上加奈、吉田彩香、吉永一也：精巣上体における細胞間クロストークと酸性環境の調節、形態・機能、査読有、Vol. 12、

pp. 59-63, 2014

[学会発表](計19件)

川畑遊星、吉田彩香、吉永一也：前立腺上皮における分化マーカーの探索と形態分化に関する解析。コ・メディカル形態機能学会第16回学術集会、2017.09.02、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

川畑遊星、村岸良紀、我謝かん菜、吉永一也：マウス精巣上体におけるクローディング分子の局在。第122回日本解剖学会全国学術集会、2017.03.28-30、長崎大学(長崎県・長崎市)

村岸良紀、川畑遊星、村上加奈、吉永一也：マウス精巣上体の分化過程におけるプロトンポンプの局在。第122回日本解剖学会全国学術集会、2017.03.28-30、長崎大学(長崎県・長崎市)

川畑遊星、村岸良紀、吉永一也：マウス精巣上体管上皮におけるクローディング分子の分布・局在解析。コ・メディカル形態機能学会第15回学術集会、2016.09.17、京都大学(京都府・京都市)

村岸良紀、川畑遊星、吉永一也：精巣上体・プロトン分泌細胞の出現と機能分化に関する免疫組織化学的解析。コ・メディカル形態機能学会第15回学術集会、2016.09.17、京都大学(京都府・京都市)

村岸良紀、作田健太郎、吉田彩香、吉永一也：マウス精巣上体におけるサイトケラチンの局在と基底細胞の形態分化。第56回日本組織細胞化学会学術集会、2015.10.03-04、関西医科大学(大阪府・枚方市)

作田健太郎、村岸良紀、吉永一也：マウス前立腺上皮の機能分化に関するレクチン組織化学的解析。第56回日本組織細胞化学会学術集会、2015.10.03-04、関西医科大学(大阪府・枚方市)

作田健太郎、吉田彩香、吉永一也：レクチン染色に免疫染色を組み合わせた前立腺の糖鎖発現解析。第56回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、2014.12.06、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

吉田彩香、作田健太郎、吉永一也：前立腺上皮・基底細胞の形態分化に関する免疫組織化学的解析。第56回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、2014.12.06、宮崎市

民プラザ（宮崎県・宮崎市）

作田健太郎、吉田彩香、吉永一也：マウス前立腺上皮細胞のレクチン組織化学的解析。日本解剖学会第70回九州支部学術集会、2014.10.25、産業医科大学（福岡県・北九州市）

吉田彩香、作田健太郎、吉永一也：前立腺分化過程におけるサイトケラチンの分布・局在解析。日本解剖学会第70回九州支部学術集会、2014.10.25、産業医科大学（福岡県・北九州市）

吉田彩香、作田健太郎、吉永一也：マウス精巣におけるアクアポリン遺伝子の発現・機能解析。コ・メディカル形態機能学会第13回学術集会、2014.9.20、北九州国際会議場、（福岡県・北九州市）

作田健太郎、吉田彩香、吉永一也：精巣上で発現する細胞骨格分子の分布・局在解析と上皮基底細胞の形態分化。コ・メディカル形態機能学会第13回学術集会、2014.9.20、北九州国際会議場、（福岡県・北九州市）

吉田彩香、村上加奈、吉永一也：マウス前立腺・精囊における上皮細胞マーカーの免疫組織化学的探索。第55回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、2013.12.14、九州大学（福岡県・福岡市）

村上加奈、吉田彩香、吉永一也：マウス精巣上皮・基底細胞の出現と形態分化に関する免疫組織化学的解析。第55回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、2013.12.14、九州大学（福岡県・福岡市）

吉田彩香、村上加奈、吉永一也：マウス前立腺におけるサイトケラチン発現細胞の同定と発現パターンの解析。日本解剖学会第69回九州支部学術集会、2013.11.02、鹿児島大学（鹿児島県・鹿児島市）

村上加奈、吉田彩香、吉永一也：精巣上皮・プロトン分泌細胞の出現と機能分化に関する免疫組織化学的解析。日本解剖学会第69回九州支部学術集会、2013.11.02、鹿児島大学（鹿児島県・鹿児島市）

吉田彩香、村上加奈、吉永一也：精巣におけるサイトケラチンの分布・局在に関する免疫組織化学的解析。コ・メディカル形態機能学会第12回学術集会、2013.09.14、広島国際大学（広島県・呉市）

村上加奈、吉田彩香、吉永一也：精巣上皮におけるサイトケラチンの分布・局在に関する免疫組織化学的解析。コ・メディカル形態機能学会第12回学術集会、2013.09.14、広島国際大学（広島県・呉市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉永一也（YOSHINAGA, Kazuya）  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：50136719

### (2) 連携研究者

鈴木 堅太郎（SUZUKI, Kentaro）  
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・講師  
研究者番号：20404345

### (3) 研究協力者

村上 加奈（MURAKAMI, Kana）  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号：なし

吉田 彩香（YOSHIDA, Ayaka）  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号：なし

作田 健太郎（SAKUDA, Kentaro）  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号：なし

村岸 良紀（MURAGISHI, Ryoki）  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号：なし

川畑 遊星（KAWABATA, Yusei）  
熊本大学・大学院保健学教育部・大学院生  
研究者番号：なし