

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860143

研究課題名(和文) 雄性生殖管を基軸とする雌性生殖器官の新たな発生基盤

研究課題名(英文) New developmental mechanism of female reproductive organs

研究代表者

原口 竜摩 (Haraguchi, Ryuma)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00423690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：雌性生殖器官の発生は、雌性生殖管のミュラー管を基軸に進展するという考えが主流であるが、その一方で、雌個体では消失する雄性生殖管のウォルフ管が雌性生殖器官の発生に必須であるとの知見が存在する。これまでその作用機序の詳細は不明であったが、申請者はShhシグナルがウォルフ管と雌性生殖器官の発生を結びつける分子実体として機能することを明らかにし、ウォルフ管由来Shhシグナルを受容した細胞集団が、雌性生殖器官の組織構築に寄与することを、Genetic Lineage Tracing法による細胞系譜地図の作製等によって明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the female reproductive tract (FRT) formation, mullerian duct is a necessary for FRT derivative organs, which are the uterus and part of the vagina. On the other hand, there is also the opinion that male reproductive duct, a Wolffian duct, is required for female reproductive organs. In this research, we revealed that Shh signaling derived from Wolffian duct acts as a signaling molecule organizing FRT formation. In addition, by fate mapping studies using genetic lineage tracing method, we revealed that Shh signal responding cells directly contribute to uterus development.

研究分野：発生生物学

キーワード：雌性生殖器官 ヘッジホッグ 組織系譜 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

胎齢初期の個体は、雄性生殖管のウォルフ管と雌性生殖管のミュラー管を体内に内包する。雌個体では、雄性化シグナルの欠落によるウォルフ管の退縮により、ミュラー管が体内に残存する唯一の生殖管系となる。これまで、このミュラー管に着目した発生研究が注目を集め、ミュラー管とそれを取り巻く間葉細胞との組織間相互作用の重要性や、それを仲介する液性シグナル分子、転写制御因子の発見など、膨大な知見が蓄積されてきたが、そのような研究のあり方に一石を投じる報告が近年なされた。米テキサス大学の研究グループにより、胎齢初期の段階でウォルフ管が欠失する変異マウスでは、ミュラー管を中心に進展するとされていた雌性生殖管の発生が著しく阻害されることが明らかとなった (Kobayashi et al., 2004 Development)。この報告により、雌個体では消失するのみと考えられてきたウォルフ管の雌性生殖管の発生における重要性が初めて示されることとなるが、現在まで雄性生殖管を雌性生殖管の新たな発生基軸としてとらえた研究はほとんど進展しておらず、雄性生殖管が如何なる作用機序をもって雌性生殖管の発生に関与しているか? という問題は未解のままである。

2. 研究の目的

生殖管の多くは、初期胚子末端に存在する胎児性上皮組織(生殖管系や総排泄腔など)を起源とする。申請者は、それらの管腔上皮群に着目した解析を行ない、そこから発せられる液性シグナルが、泌尿生殖系の器官形成に必須であることを明らかにした。申請者は上記研究を進める中で、ウォルフ管が産生する液性蛋白 Shh が雌性生殖管の発生に関与する可能性を示唆するデータを最近得つつある。胎齢初期の2対の生殖管系のうち、雄性生殖管のウォルフ管のみに Shh 遺伝子および関連分子は発現するが、驚くべきことに Shh 遺伝子 KO マウスでは、ミュラー管を中心に発達するとされる雌性生殖管の構造異常が生じていた。この発見の重要なポイントは、ウォルフ管から発せら

れる Shh シグナルが、雌性生殖管の発生を制御する分子実体の一つとして機能する可能性を示唆している点にある。つまり、ウォルフ管由来のシグナル分子を受容した細胞を機能軸とする未知の形成プロセスが雌性生殖管の発生基盤の一つとして存在する可能性が考えられるが、それを実証するには、ウォルフ管からの Shh シグナルを受容した細胞集団の挙動・分子特性を追跡し、それらが発生段階の雌性生殖管の器官形成プロセスに組み込まれていることを示す必要がある。本研究課題では、Genetic Lineage Tracing 法による細胞系譜追跡実験を軸とした解析系によって、上記の問題を解決することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、ウォルフ管から分泌される Shh シグナルが雌性生殖管の発生に関与する際の作用機序を明確に示し、ミュラー管を基軸とする既知の分子メカニズムとの関連性の考察を試みた。

(実験計画1)ウォルフ管由来の Shh シグナルを受容した細胞が、雌性生殖管の組織構築に如何に寄与するかを Genetic Lineage Tracing 法により作製した細胞系譜地図をもとに精査した。

(実験計画2)雌性生殖管の組織構築に寄与したウォルフ管由来の Shh シグナル受容細胞についての遺伝子発現解析を行ない、雌性生殖管の発生に関与する既知の分子カスケードと照合する。両者での重複性、階層性、クロストークの有無を明確にし、従来の分子基盤情報との包括的理解を試みた。

4. 研究成果

Cre/loxP システムを応用した Genetic Lineage Tracing 法による細胞系譜追跡によって、雄性生殖管のウォルフ管より産生されるシグナル分子: Shh を受容した細胞群の細胞が、直接的に雌性生殖管である子宮の諸組織へと分化すること

が明らかとなった。発生段階のどのタイミングで、ヘッジホッグシグナルを受容するかによって、分化する組織に違いが見られることも明らかとなった（ヘッジホッグシグナルに対する応答性のタイムウィンドウの存在）。また、Hoxb7cre/Shh lox によるウォルフ管特異的 Shh 欠損マウスを作製したが、雌性生殖器の発生に形態的な異常は見られず、生殖可能であった。他のヘッジホッグリガンドがその機能を代償している可能性を考え、Hoxb7cre/Shh lox/Ihh lox のヘッジホッグリガンド二重欠失マウスを作製中である。

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 11 件)

1. Epigenetic regulation of *Tbx18* gene expression during endochondral bone formation.
Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S.
Cell Tissue Res, 359(2): 503-12, 2015.
(査読有)
2. Diabetic osteopenia by decreased β -catenin signaling is partly induced by epigenetic derepression of sFRP-4 gene.
Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Mori M, Hamada Y, Nishida M, Minami Y, **Haraguchi R**, Takahashi Y, Kitazawa S.
PLoS One, 9(7): e102797, 2014.
(査読有)
3. Duodenal gastric heterotopia, sporadic or fundic gland polyp-associated, frequently carries β -catenin mutation.
Nakagawa M, Kitazawa R, Kondo T, Ninomiya K, Okita M, **Haraguchi R**, Kitazawa S.
Virchows Arch, 465(3): 253-6, 2014.
(査読有)
4. Disruption of the temporally regulated cloaca endodermal β -catenin signaling causes anorectal malformations.
Miyagawa S, Harada M, Matsumaru D, Tanaka K, Inoue C, Nakahara C, **Haraguchi R**, (7 名略).
Cell Death Differ, 21(6): 990-7, 2014.
(査読有)
5. Acquisition of MYD88 L265P mutation during

treatment of diffuse large B cell lymphoma of the parotid gland.

Fujiishi K, Kitazawa R, Nagai Y, Watanabe T, Bando K, Kobayashi S, Yakushijin Y, **Haraguchi R**, Kitazawa S.

Virchows Arch, 464(1): 121-4, 2014.
(査読有)

6. Genetic analysis of the role of *Alx4* in the coordination of lower body and external genitalia formation.

Matsumaru D, **Haraguchi R** (筆頭共著者), Moon AM, Satoh Y, Nakagata N, Yamamura K, (3 名略).

Eur J Hum Genet, 22(3): 350-7, 2014.
(査読有)

7. Efficient genetic analysis of microdissected samples by agarose-bead method: Alterations of β -catenin gene in fundic gland polyp and heterotopic gastric mucosa of duodenum.

Nakagawa M, Kitazawa R, Kuwahara N, Yoshida K, **Haraguchi R**, Kitazawa S.

Acta Histochem Cytochem, 46(1), 19-24, 2013.
(査読有)

8. *Cdx2* expression and its promoter methylation during metaplasia dysplasia carcinoma sequence in Barrett's esophagus.
Makita K, Kitazawa R, Fujiishi K, Nakagawa M, **Haraguchi R**, Kitazawa S.

World Journal of Gastroenterology, 19(4):536-41, 2013. (査読有)

9. Gastric adenocarcinoma arising in gastritis cystica profunda presenting with selective loss of *KCNE2* expression.
Kuwahara N, Kitazawa R, Fujiishi K, Nagai Y, **Haraguchi R**, Kitazawa S.

World Journal of Gastroenterology, 19(8):1314-1317,2013. (査読有)

10. Pulmonary hypertension associated with diffuse deposition of pentosidine in pulmonary arterioles.
Komoda M, Kitazawa R, Makita K, Yoshida K, Takeji M, Soga Y, Kurata M, **Haraguchi R**, Kitazawa S.

Diabetes Research and Clinical Practice, on line, 2013. (査読有)

11. Intestinal inflammatory pseudotumor caused by taeniasis: calcareous corpuscles as a diagnostic clue.

Khin SS, Kitazawa R, Htet K, Htike HM, Yee

TT, Aung M, **Haraguchi R** and Kitazawa S.
Pathology International, 63(3):193-4, 2013.
(査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. **原口竜摩**、北澤理子、北澤荘平
Wntシグナル調節因子sFRP4を指標とした骨代謝研究；骨代謝疾患との関連性について
第47回日本臨床分子形態学会（招待講演）
2015年9月18日～9月19日 長崎大学医学部良順会館、ポンペ会館（長崎県長崎市）
2. **原口竜摩**、北澤理子、北澤荘平
長管骨伸長プロセスにおけるヘッジホッグシグナル経路の役割
第104回日本病理学会
2015年4月30日～5月2日 名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
3. **原口竜摩**、北澤理子、北澤荘平
長管骨伸長プロセスにおけるヘッジホッグシグナル経路の機能考察；組織系譜解析によるアプローチ
第46回日本臨床分子形態学会（招待講演）
2014年10月17日～10月18日 TKP市ヶ谷カンファレンスセンター（東京都新宿区）
4. **原口竜摩**、北澤理子、北澤荘平
マウス長管骨伸長プロセスにおけるヘッジホッグシグナル経路の役割
第55回日本組織細胞学会
2014年9月27日～9月28日 松本市中央公民館（長野県松本市）
5. **原口竜摩**、北澤理子、北澤荘平
第二次性徴期の長管骨伸長プロセスにおけるヘッジホッグシグナル経路の役割について
第32回日本骨代謝学会
2014年7月24日～7月26日 大阪国際会議場（大阪府大阪市）
6. **原口竜摩**、北澤理子、平田 務、北澤荘平
組織系譜解析から紐解く Wnt/ β -カテニンシグナルを中心とした子宮発生負けニズム
第103回日本病理学会
2014年4月24日～4月26日 広島国際会議場（広島県広島市）

〔図書〕(計0件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/pathology1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 竜摩 (Haraguchi, Ryuma)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：00423690

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

北澤 荘平 (Kitazawa, Sohei)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90186239

北澤 理子 (Kitazawa, Riko)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：00273780