

平成 30 年 10 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04300

研究課題名(和文)新規アンドロゲン応答遺伝子同定による前立腺癌の細胞シグナル解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of new androgen responsive regulatory genes for development and cancer.

研究代表者

山田 源 (Yamada, Gen)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授

研究者番号：80174712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,100,000円

研究成果の概要(和文)：男性ホルモンとWntを含む信号系が、下流因子を介して前立腺癌と胎児生殖器の性質を制御する機構についてbZipファミリー遺伝子(MafBやATFを含む)を同定した(Nature Review、他の成果参照)。男性ホルモン応答性のエンハンサーにおける制御について前立腺癌細胞等の応答を解明した。MafB遺伝子の3'UTRエンハンサーに前立腺癌細胞株LNCapを用いて、ARとB-Catenineの相互作用は検出されなかったが、基本転写因子とARの相互作用が見出された。その転写因子群は前立腺癌におけるアンドロゲン依存性の転写制御に関与する(執筆中、Endocrinology 2016等)。

研究成果の概要(英文)：The current study suggests that the Mafb 3' untranslated region (UTR) is an essential region for its regulation by androgen. We identified 2 functional androgen response elements (AREs) in Mafb 3'UTR. Androgen receptor is bound to such AREs in 3'UTR during urethral masculinization. By using such identified UTR-enhancer, we revealed new candidate upstream gene for MafB regulation. Our ongoing study suggests such new transcription factor-AR interaction is essential for regulating MafB enhancer. CAF cells have been also suggested as playing essential role for prostate cancer. The current study gives insight for the regulation of bZip family gene function not only in embryonic mesenchyme cells but also for cancer associated fibroblast (CAF) cells.

研究分野：発生生殖医学

キーワード：アンドロゲン 男性ホルモン bZipファミリー 癌関連繊維芽細胞 MafB 生殖器間葉細胞 外生殖器  
前立腺

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、前立腺の発生組織であるマウス会陰部尿生殖洞 (UGS) と外生殖器においてアンドロゲン (男性ホルモン) 誘導性制御遺伝子 MafB を同定した (PNAS, 2014)。MafB は、オンコジーンとして同定され、転写因子である。我々は、さらに細胞増殖因子系として細胞増殖因子シグナルが前立腺組織の過形成に関わる事を見出した (Endocrinology 2014)。Wnt シグナルは、胎児において MafB 遺伝子を制御することも知られていた。このような背景から以下の点を明らかにする。MafB 遺伝子を中心として前立腺癌細胞のアンドロゲン応答性の分子基盤を解明する。前立腺細胞は、アンドロゲンシグナルのみならず重要な液性因子シグナルにも応答する。しかしながらアンドロゲンシグナルと細胞増殖因子、Wnt シグナルのクロストークは、解明されていない。下流遺伝子が如何にアンドロゲン、Wnt 等の液性因子シグナルの制御を総合的に受け前立腺癌や男性ホルモン応答性の胎児細胞の応答に至るか、その制御基盤を解明する。

### 2. 研究の目的

アンドロゲンと Wnt を含むシグナルが、下流因子を介して前立腺癌と胎児生殖器の性質を制御するか統合的に解析する。男性ホルモン応答性遺伝子のエンハンサーにおけるクロストークについて解析し、前立腺癌細胞などの応答に如何に集約されるか解明する。アンドロゲン依存性の胎児間葉細胞増殖と制御メカニズムについて局所的ホルモン測定を含む解析を行う。bZip ファミリーの MafB エンハンサー解析のために、雄生殖器の器官培養系を樹立し、エンハンサーと協調する制御領域を同定する。また DHT シグナル、MafB を介して間葉細胞や前立腺癌の動態を制御する他因子の探索を行い、転写因子等を同定する試みを行う。

### 3. 研究の方法

MafB のアンドロゲン応答性について、前立腺癌において発現制御領域解析から解析する。MafB 領域上流及び下流全長を含むレポーターコンストラクトは、アンドロゲンに反応する事を前立腺癌細胞株 (LNCap) において確認しつつある。MafB 遺伝子上流及び UTR (非翻訳) 発現制御領域を含む個別のレポーターコンストラクトを構築する。それらコンストラクトを用いて、アンドロゲンシグナルと Wnt などのシグナル各々の添付、及びその相乗効果について解析を行う。

### 4. 研究成果

アンドロゲン (男性ホルモン) と Wnt を含むシグナル系が、下流制御因子を介して前立腺癌と胎児生殖器の性質を制御する機構について解析し、それらの制御を受ける bZip ファミリー遺伝子を同定した。bZip ファミリー遺

伝子群は MafB や ATF 遺伝子を含んでいる。これらの遺伝子群が胎児生殖器間葉細胞や癌関連線維芽細胞 (CAF) の発生制御に関わる事が見出され、成果を出版し、さらに執筆中である (Nature Review in Press、他文献参照)。

男性ホルモン応答性のエンハンサーにおける制御メカニズムについて解析し、前立腺癌細胞等の応答に如何に集約されるか解明した。男性ホルモン応答性の MafB 遺伝子の 3'UTR 領域に二箇所のアンドロゲンレセプター (AR) 結合部位 ARE の存在が判明した。男性ホルモン依存性の前立腺癌細胞株 LNCap 細胞を用いて、MafB 遺伝子の 3'UTR を含む発現制御領域のレポーターコンストラクトを構築した。AR と B-Catenin の相互作用はエンハンサー上で検出されなかったが複数の基本転写因子と AR の相互作用が ARE に関して見出された。それらの転写因子群は前立腺癌におけるアンドロゲン依存性の転写制御に関わる事からも興味ある知見である (現在執筆中、Endocrinology 2016 等)。

さらに我々が発表したソノポレーション法を用いて胎児由来の男性ホルモン依存性の間葉組織も用いて同様のコンストラクトを遺伝子導入し、エンハンサー活性を胎児組織においても同定した。これら解析を通じて、MafB 遺伝子を制御し得る新規の転写因子群を同定した。それらの胎児組織並びに前立腺癌細胞における細胞増殖や分化に対する機能をさらに解析する予定である。

### 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 15 件)

1. Shoko Matsushita, Kentaro Suzuki, Aki Murashima, Daiki Kajioaka, Alvin Acebedo, Shinichi Miyagawa, Ryuma Haraguchi, Yukiko Ogino, and Yamada G.

Frontiers in the regulation of masculinization; androgen signaling in the developing external genitalia.

**Nature Reviews Urology.**

査読有、印刷中、2018 年

2. Yukiko Ogino, Saki Tohyama, Satomi Kohno, Kenji Toyota, Gen Yamada, Ryohei Yatsu, Tohru Kobayashi, Norihisa Tatarazako, Tomomi Sato, Hajime Matsubara, Anke Lange, Charles R. Tyler, Yoshinao Katsu, Taisen Iguchi, Shinichi Miyagawa.

Functional distinctions associated with the diversity of sex steroid hormone receptors ESR and AR.

**Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.**

査読有、印刷中、2018 年

3. Suzuki H, Matsushita S, Suzuki K, Yamada G.  
5 -Dihydrotestosterone negatively regulates cell proliferation of the periurethral ventral mesenchyme during urethral tube formation in the murine male genital tubercle.  
**Andrology**.  
査読有、5(1)、146-152、2017年  
doi: 10.1111/andr.12241.
4. Suzuki K, Matsumaru D, Matsushita S, Murashima A, Ludwig M, Reutter H, Yamada G.  
Epispadias and the associated embryopathies: genetic and developmental basis.  
**Clin Genet**.  
査読有、91(2)、247-253、2017年  
doi: 10.1111/cge.12871.
5. Tohyama S, Ogino Y, Lange A, Myosho T, Kobayashi T, Hirano Y, Yamada G, Sato T, Tatarazako N, Tyler CR, Iguchi T, Miyagawa S.  
Establishment of estrogen receptor 1 (ESR1)-knockout medaka: ESR1 is dispensable for sexual development and reproduction in medaka, *Oryzias latipes*.  
**Dev Growth Differ**.  
査読有、59(6)、552-561、2017年  
doi: 10.1111/dgd.12386.
6. Haraguchi R, Kitazawa R, Murashima A, Yamada G, Kitazawa S.  
Developmental Contribution of Wnt-signal-responsive Cells to Mouse Reproductive Tract Formation.  
**Acta Histochem Cytochem**.  
査読有、50(4)、127-133、2017年  
doi: 10.1267/ahc.17017.
7. Liu L, Suzuki K, Chun E, Murashima A, Sato Y, Nakagata N, Fujimori T, Yonemura S, He W, Yamada G.  
Androgen Regulates Dimorphic F-Actin Assemblies in the Genital Organogenesis.  
**Sex Dev**.  
査読有、11(4)、190-202、2017年  
doi: 10.1159/000477452.
8. Miyado M, Miyado K, Nakamura A, Fukami M, Yamada G, Oda SI.  
Expression patterns of Fgf8 and Shh in the developing external genitalia of *Suncus murinus*.  
Reproduction.  
査読有、153(2)、187-195、2017年  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Expression%20patterns%20of%20Fgf8%20and%20Shh%20in%20the%20developing%20external%20genitalia%20of%20Suncus%20murinus.\[all\]&cmd=correctspelling](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Expression%20patterns%20of%20Fgf8%20and%20Shh%20in%20the%20developing%20external%20genitalia%20of%20Suncus%20murinus.[all]&cmd=correctspelling)
9. Zhang R, Knapp M, Suzuki K, Kajioaka D, Schmidt JM, Winkler J, Yilmaz Ö, Pleschka M, Cao J, Kockum CC, Barker G, Holmdahl G, Beaman G, Keene D, Woolf AS, Cervellione RM, Cheng W, Wilkins S, Gearhart JP, Sirchia F, Di Grazia M, Ebert AK, Rösch W, Ellinder J, Jenetzky E, Zwink N, Feitz WF, Marcelis C, Schumacher J, Martínón-Torres F, Hibberd ML, Khor CC, Heilmann-Heimbach S, Barth S, Boyadjiev SA, Brusco A, Ludwig M, Newman W, Nordenskjöld A, Yamada G, Odermatt B, Reutter H.  
ISL1 is a major susceptibility gene for classic bladder exstrophy and a regulator of urinary tract development.  
**Sci Rep**.  
査読有、8;7、42170、2017年  
doi: 10.1038/srep42170.
10. Reutter H, Keppler-Noreuil K, E Keegan C, Thiele H, Yamada G, Ludwig M.  
Genetics of Bladder-Exstrophy-Epispadias Complex (BEEC): Systematic Elucidation of Mendelian and Multifactorial Phenotypes.  
**Curr Genomics**.  
査読有、17(1):4-13、2016年  
doi: 10.2174/1389202916666151014221806.
11. Ogino Y, Kuraku S, Ishibashi H, Miyakawa H, Sumiya E, Miyagawa S, Matsubara H, Yamada G, Baker ME, Iguchi T.  
Neofunctionalization of Androgen Receptor by Gain-of-Function Mutations in Teleost Fish Lineage.  
**Mol Biol Evol**.  
査読有、33(1):228-44、2016年  
doi: 10.1093/molbev/msv218.
12. Matsushita S, Suzuki K, Ogino Y, Hino S, Sato T, Suyama M, Matsumoto T, Omori A, Inoue S, Yamada G.  
Androgen Regulates Mafb Expression Through its 3'UTR During Mouse Urethral Masculinization.  
**Endocrinology**.  
査読有、157(2):844-57、2016年  
doi: 10.1210/en.2015-1586.
13. Okazawa M, Murashima A, Harada M, Nakagata N, Noguchi M, Morimoto M, Kimura T, Ornitz DM, Yamada G.  
Region-specific regulation of cell proliferation by FGF receptor signaling during the Wolffian duct

development.

**Dev Biol.**

査読有、1;400(1):139-47、2015年  
doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.023.

14. Matsumaru D, Murashima A, Fukushima J, Senda S, Matsushita S, Nakagata N, Miyajima M, Yamada G.

Systematic stereoscopic analyses for cloacal development: The origin of anorectal malformations.

**Sci Rep.**

査読有、10;5:13943、2015年  
doi: 10.1038/srep13943.

15. Suzuki H, Suzuki K, Yamada G.

Systematic analyses of murine masculinization processes based on genital sex differentiation parameters.

**Dev Growth Differ.**

査読有、57(9):639-47、2015年  
doi: 10.1111/dgd.12247.

〔学会発表〕(計 8件)

1. 山田 源

Frontier of cell migration analysis; androgen development mouse genitalia formation based on the mutant model analysis.

The 25th International symposia on Morphological Sciences (ISMS 2017)、第4軍医大学、中国、2017年(招待講演、国際学会)

2. 山田 源

Molecular mechanisms of external genitalia formation; an emerging model for hormone-induced organogenesis.

Reproduction down under 2017、Mantra on Salt Beach、オーストラリア、2017年(招待講演、国際学会)

3. 山田 源

マウスミュータント系を用いた生殖器形成の解明の最前線：性差は如何に制御されるか。

第53回北陸実験動物研究会、金沢大学、日本、2016年(招待講演)

4. 山田 源

Molecular mechanisms of sexual differentiation; Genetic cascade responsible for Sexual reproductive organ formation and diseases, cancer.

Philippine Society for Cell Biology (PSCB) meeting (7th Annual and 1st International convention and Scientific meeting)、Institute of Biology、University of the

Philippines、フィリピン、2016年(招待講演、国際学会)

5. 山田 源

Androgen and local signal interaction for mouse sexual differentiation.

第39回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、日本、2016年(招待講演)

6. 山田 源

Development of the external genitalia.

1-DSD symposium、5th International DSD symposium、New Zebra、ベルギー、2015年(招待講演、国際学会)

7. 山田 源

外生殖器形成機構の最新研究。

第55回日本先天異常学会学術集会及び第38回日本小児遺伝学会学術集会、パシフィコ横浜、日本、2015年(招待講演)

8. 山田 源

Molecular mechanisms of sexual differentiation; recent mouse models.

Lerner Research Institute Seminar、Department of Biomedical Engineering、Lerner Research Institute、Cleveland Clinic、Cleveland、アメリカ、2015年(招待講演、国際学会)

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

Department of Developmental Genetics, WMU  
<http://www.wakayama-med.ac.jp/english/undergraduate/medicine/160904/index.html>

Research Gate, Gen Yamada  
[http://www.researchgate.net/profile/Gen\\_Yamada](http://www.researchgate.net/profile/Gen_Yamada)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 源 ( Gen Yamada )  
和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授  
研究者番号：80174712

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )