

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10647

研究課題名(和文) アンドロゲンシグナルの破綻が導く尿道下裂発症分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of androgen-induced urethral tube formation

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲンの機能破綻は、先天性形成異常の1つである尿道下裂の主要要因であると考えられる。しかし、その発症機序はほとんど分かっていない。本研究から、尿道形成過程においてアンドロゲンシグナルの下流遺伝子としてMafBを同定した。さらに、MafBの下流で機能しうる遺伝子をいくつか同定することができた。外生殖器伸長過程において、細胞増殖・細胞死制御は重要であるが、MafBノックアウトマウスの解析から尿道形成には細胞増殖・細胞死制御以外のプロセスが不可欠である可能性を見出した。今後、MafBの下流候補遺伝子の機能解析を進めることで、尿道下裂発症機序の理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Urethral tube formation of external genitalia is androgen dependent. Defects of androgen signaling cause congenital anomalies such as hypospadias. However, it is not understood the pathological mechanisms of hypospadias and even the developmental mechanism of androgen dependent urethral tube formation.

We identified MafB (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) as a new androgen target gene during urethral tube formation. Cell proliferation and cell death was not dramatically changed in MafB KO mice. Intriguingly, we identified several candidate genes under the MafB by RNA-seq and ChIP-seq analyses. Further functional analyses on such downstream genes may lead to understand the developmental mechanism of urethral tube formation as well as the pathological mechanism of hypospadias.

研究分野：発生医学

キーワード：アンドロゲン 尿道下裂 MafB

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外生殖器は、雌雄共通の原基(生殖結節)から形成される。生殖結節は、男性ホルモンであるアンドロゲン依存的に形態的性差(雄性化)を形成する。外生殖器の雄性化におけるアンドロゲンの必要性は、今から50年以上も前に報告された。しかし、その機能および標的遺伝子を含め外生殖器雄性化の分子メカニズムの理解はほとんど進んでいない。特に尿道形成過程は、アンドロゲンの作用により顕著な雌雄差を形成する。近年、アンドロゲンシグナルの異常が主因とされるヒト先天性疾患“尿道下裂”の発症頻度が増加の一途をたどっている。尿道下裂は、尿道口が異所的に開口してしまう先天性疾患で、発症率は1/250人と高頻度であるにもかかわらず、その発症メカニズムはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

外生殖器は、アンドロゲンにより顕著な形態的性差(雄性化)を有する器官である。近年、この雄性化プロセスの異常が一因とされるヒト先天性疾患“尿道下裂”の発症率が増加しているが、その発症メカニズムはおろかアンドロゲンによる雄性化の分子メカニズムもほとんどわかっていない。私は、マウス外生殖器形成過程において雄特異的に発現する遺伝子“MafB”を見出した。興味深いことに、雄のMafBノックアウトマウス(MafB KOマウス)は、尿道下裂に類似した尿道形成異常を呈することがわかった。本研究は、MafB KOマウスおよび次世代シーケンサーを用いた組織ChIP-Seq解析を駆使し、雄特異的性差発現遺伝子“MafB”の発現制御機構、さらに網羅的性差エンハンサーを同定することでこれまでわかっていなかったアンドロゲンによる外生殖器の雄性化分子メカニズム、さらに、アンドロゲンシグナルの破綻が導く尿道下裂の発症メカニズムを統合的に理解することを目的としている。

3. 研究の方法

MafBは、アンドロゲンシグナルの直接的標的遺伝子なのか? *In silico*解析により見出したARE(アンドロゲン応答配列)を介して直接制御されている可能性についてレポーターassay、AR抗体を用いたChIP-PCRにより検証した。さらにChIP-Seq解析から、新規アンドロゲン標的遺伝子群の同定を試みた。

雄特異的なMafBの発現制御にヒストン修飾によるエピジェネティック制御が関与しているのか? H3K4me1をはじめ各種ヒストン抗体を用いたChIP-seq解析によりMafB遺伝子周辺さらに、エピジェネティックステータスが雌雄間で異なる領域(性差エンハンサー)の同定を試みた。

尿道形成過程におけるMafBの機能は何か? MafB KOマウスを用いて、細胞増殖及び細胞

死の変化を調べた。MafB発現細胞をFACSで単離し、MafB KOマウスとMafBヘテロマウスの遺伝子発現プロファイルをRNA-Seqにより解析し、MafBの下流遺伝子群の同定を試みた。得られた候補因子に関してリアルタイムPCRにより評価した。

4. 研究成果

MafBの発現制御領域にARE(アンドロゲン応答配列)が複数存在していたことから、アンドロゲンはMafBの発現を直接制御している可能性が考えられた。そこで、これらのAREが実際にアンドロゲンに応答するかを検証するため、AREを含むMafBの発現制御領域を単離し、レポーターassayにより検証した。その結果、MafBの3'UTRを介してアンドロゲンは、MafBの発現を制御している可能性が見えてきた。さらAR抗体によるChIP assayを行なった結果、ARは、そのAREに直接結合することでMafBの発現を制御している可能性を見出した。

さらに、組織を用いたChIPアッセイおよび次世代シーケンサーによるChIP-Seq解析を行うためのDNAの断片化条件、固定法、ライブラリ作成法など外生殖器原基を用いたChIPの最適条件を検討し、最適条件を見出すことができた。

雄有意なMafBの発現がエピジェネティックに制御されている可能性を検証するため、エンハンサー領域をマークすることができるH3K4me1やH3K27ac、転写が抑制されている領域をマークすることができるH3K27me3などの各種ヒストン抗体を用いてChIP(免疫沈降)を行った。その後、ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーにより、アンドロゲンによりMafBの発現が誘導されるステージのエピゲノムステータスを網羅的に調べた。さらに、新規アンドロゲンの標的遺伝子を同定するためAR抗体を用いて同様の実験を行った。その結果、それぞれの性特異的にH3K27acでマークされる領域を見出し、MafBの発現制御領域においても数カ所、雄特異的に転写が活性化されている領域を見出した。この雄特異的に活性化されている領域の配列を詳しく調べると、器官形成に不可欠な制御因子の結合サイトが存在することがわかった。AR抗体を用いたChIP-Seq解析から、MafBに加え新たなアンドロゲン標的候補遺伝子を見出した。リアルタイムPCRによるバリデーションの結果、細胞周期や細胞増殖制御に関わる因子が尿道形成過程において、アンドロゲンの標的因子として機能している可能性を見出した。

MafBの尿道形成過程における機能を明らかにするため、MafB KOマウスを用いて細胞増殖はEdUの取り込み実験により、細胞死は、TUNEL法により調べたが今回の実験からは、顕著な違いを見出すことはできなかった。よってMafBの機能は、細胞増殖及び細胞死制

御ではない可能性が示唆された。*MafB* KOマウスと*MafB*ヘテロマウスにおけるRNA-Seq解析から、*MafB*の標的候補遺伝子をいくつか同定することができた。

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 9件)

Matsushita S., Suzuki K., Murashima A., Kajioka D., Acebedo A., Miyagawa S., Haraguchi R., Ogino Y., Yamada G.

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

Nature Reviews Urology, 15(6):358-368., 2018.

梶岡大暉、鈴木堅太郎、山田源

内性器と外性器の性分化機構

臨床泌尿器科 71(10): 753-758, 2017.

Zhang R., Knapp M., Suzuki K., Kajioka 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., Ellinger 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., 7:42170, 2017.

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., 91(2): 247-253., 2017.

Suzuki H., Matsushita S., Suzuki K., Yamada G.

5 α -Dihydrotestosterone negatively regulates cell proliferation of the periurethral ventral mesenchyme during urethral tube formation in the murine male genital tubercle.

Andrology, 5(1):146-152, 2017.

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. 11(4):190-202, 2017.

Ipulan LA., Raga D., Suzuki K., Murashima A., Matsumaru D., Cunha G., Yamada G.

Investigation of sexual dimorphisms through mouse models and hormone/hormone-disruptor treatments.

Differentiation, 91(4-5), 78-89, 2016.

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. 157(2):844-857, 2016.

Suzuki H., Suzuki K., Yamada G.

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

Dev Growth Differ. 57(9):639-647, 2015.

〔学会発表〕(計 8件)

Kentaro Suzuki

The role of *MafB* during the masculinization of the embryonic external genitalia

7th international symposium on vertebrate sex determination, Kona, Hawaii, 2015.4.

鈴木堅太郎

アンドロゲンシグナルの新規下流遺伝子

Mafb は雄尿道形成に必須である ~先天性疾患尿道下裂発症メカニズムの理解に向けて~ 日本先天異常学会、2015.4

鈴木堅太郎

アンドロゲンによる細胞増殖制御機構の解明 ~外生殖器形成過程においてアンドロゲンは細胞増殖を抑制する~

第34回日本アンドロロジー学会学術大会 2015

鈴木堅太郎

アンドロゲンに依存したマウス外生殖器形成メカニズム研究の新たな展開 ~内分泌かく乱化学物質と尿道下裂の接点~

シンポジウム2:「内分泌かく乱化学物質研究の新たな展開」

第18回環境ホルモン学会研究発表会 2015

鈴木堅太郎

Sexually dimorphic expression of *Mafb* regulates masculinization of the embryonic urethral formation.

第35回日本アンドロロジー学会学術大会 2016

鈴木堅太郎

マウス外生殖器形成過程における新規アンドロゲン標的遺伝子の同定

第35回日本アンドロロジー学会学術大会 2016

鈴木堅太郎

アンドロゲン依存性の尿道形成 *in vitro* 組織培養系の確立

第36回日本アンドロロジー学会学術大会 2017

鈴木堅太郎

アンドロゲンによる細胞骨格制御は、外生殖器の性差形成に不可欠である

日本農芸化学会 2018年度学会 2018

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 堅太郎 (Kentaro Suzuki)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20404345

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし