

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11186

研究課題名(和文) 尿道下裂の遺伝子制御機構の解明と遺伝子導入細胞シートを用いた新規手術法の開発

研究課題名(英文) The elucidation of the genetic pathway of hypospadias and development of a new surgical method using a gene transferred cell sheet

研究代表者

黒川 寛史(Kurokawa, Satoshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：50468253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：3つの研究を実施した。1) 尿道下裂モデルラットの作製：妊娠ラットに対し非ステロイドアンドロゲン剤を、日数を調節して投与することで、胎仔の尿道形成時期を特定した。2) 胎仔陰茎の遺伝子解析：尿道形成期の胎仔陰茎からtotal RNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ解析をした。尿道形成に重要な遺伝子として、新規遺伝子(Pip: Prolactin-induced protein)を同定した。3) パスウェイ解析：マイクロアレイの結果についてパスウェイ解析を行った。その結果、FGFなど上流の調節因子によりGタンパクやチロシンキナーゼ型受容体のシグナル伝達経路が亢進していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天異常の研究において、ヒトを対象とした研究を行うことには限界があり、モデル動物が必要となる。私たちの開発した尿道下裂モデルラットは「遠位型」・「中間位型」・「近位型」と分けることができ、ヒトの臨床病態と極めて類似している。これらをマイクロアレイで網羅的解析をすることにより候補遺伝子を探索し、さまざまなタイプの尿道下裂における遺伝子発現局在を確認できるため、尿道下裂の病態解明に役立つと考えられる。さらに、遺伝子導入技術を用いれば新規治療法への発展も可能である。

研究成果の概要(英文)：Three studies were conducted. 1) Preparation of hypospadias model rat: The time of fetal urethral formation was identified by administering anti-androgen drug to pregnant rats. 2) Gene analysis of fetal penis: Total RNA was extracted from the fetal penis during urethral formation and subjected to cDNA microarray analysis. A novel gene (Pip: Prolactin-induced protein) was identified as an important gene for urethral formation. 3) Pathway analysis: Pathway analysis was performed on the microarray results. As a result, it was revealed that upstream regulatory factors such as FGF enhance the signal pathways of G protein and tyrosine kinase type receptors.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿道下裂 モデル動物 遺伝子 マイクロアレイ 抗アンドロゲン剤 パスウェイ解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿道下裂は、先天的に陰茎が彎曲し尿道の形成不全を伴う先天異常で、世界的に増加傾向にある。わが国では35年前に比べ約3.5倍に増加している(WHO国際先天異常監視機構の報告, 2012年)。これは環境ホルモンなどの化学汚染物質による胎児期の曝露が大きな要因であることが、基礎研究や疫学研究により明らかにされている。

私たちはこれまでに尿道下裂モデル動物の開発に成功し、走査型電子顕微鏡により陰茎や尿道の形態形成について明らかにしてきた。また、多くの尿道下裂症例の診療経験から、より正常解剖に近い修復術を目指して様々な工夫を行ってきた。しかし、先天的に欠損した組織の修復術では新しい組織の生着が重要であり、欠損部分が大きいほど組織の補填・生着は困難になる。尿道下裂修復術は術式が複雑で難易度が高いため、より習得しやすく、生着率の高い治療法の開発が必要である。本研究では、尿道下裂モデル動物を利用した遺伝子解析の結果を活かして、シンプルで合併症の少ない新規術式を開発することを目標とする。

2. 研究の目的

尿道下裂は世界的に増加している先天異常であり、尿道下裂修復術が唯一の治療法である。外尿道口の位置や陰茎彎曲の程度によって様々なタイプに分類され、多数の術式が存在する。私たちはこれまで、尿道下裂モデル動物を開発し、基礎研究を通じて外性器の形態形成過程の解明に取り組んできた。その過程で得られた新規な遺伝子解析の結果と最近注目されている細胞シートの技術を組み合わせることにより、シンプルかつ病態に合わせた新規術式の開発に応用できると考えた。そこで、本研究では、尿道形成にかかわる候補遺伝子群を網羅的に解析し、補完すべき遺伝子群を同定する。さらにその遺伝子を導入した自家細胞シートによる再生医療技術を取り入れた次世代の尿道下裂修復術を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 尿道下裂モデルラットを用いた尿道形成期の同定

11週齢の妊娠 Sprague-Dawley ラットに対し非ステロイド性抗アンドロゲン剤 flutamide を投与することにより尿道下裂モデルラットの作成を行う。アンドロゲン依存的に外性器が形成される妊娠後期、すなわち妊娠 13~20 日に抗アンドロゲン剤を3日間連日腹腔内投与し、尿道下裂モデルラットを作成する。抗アンドロゲン剤の投与方法に関しては、私たちがこれまでに停留精巣モデルラットを作成したときと同様 flutamide 7.5mg をカルボキシルメチルセルロースに溶解し 0.5% 溶液としたのちに妊娠ラットの腹腔内に投与する。

2) 尿道形成期における胎仔陰茎の遺伝子解析

尿道下裂モデルラットとコントロールである正常ラットの双方から、尿道下裂発生の臨界期に胎仔を取り出し、実体顕微鏡下に、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)内で胎仔の性腺を確認し雌雄を識別後、雄仔から陰茎を採取する。また、生後1週間の各タイプ(遠位型・中間位型・近位型)の尿道下裂モデルラットと正常ラットの新生仔の陰茎も同様に氷冷した PBS 内で採取する。採取した陰茎から total RNA を抽出し、逆転写によって cDNA を合成する。合成された cDNA は、マイクロアレイチップにハイブリダイズさせスキャナーによる解析を行う。マイクロアレイ解析にて発現差の認められた候補遺伝子は、定量 RT-PCR 法により実際の発現に有意差があるかどうか確認する。

3) 尿道下裂に関わる遺伝子の発現局在

定量 RT-PCR 法で発現に有意差の認められた候補遺伝子の発現部位を確認するために、正常ラットと尿道下裂ラットの陰茎の免疫染色を行い、組織学的に検討する。

4) パスウェイ解析

cDNA マイクロアレイの結果についてパスウェイ解析を行った。すなわち単独遺伝子一つ一つの評価ではなく、遺伝子群として遺伝子発現プロファイルの変化を捉えることを行う。

4. 研究成果

1) 尿道下裂モデルラットを用いた尿道形成期の同定

溶解させを用いた。抗アンドロゲン剤の投与日の違いにより、正常な陰茎から様々なタイプの尿道下裂(亀頭部・陰茎部・会陰部)まで作成可能であった。

抗アンドロゲン剤投与期間の検討から、ラットの尿道形成は、妊娠 15 日目から始まり、妊娠 17 日目が最も重要な時期で、妊娠 19 日目には終了することが確認された。妊娠 15 日目と 17 日目と 19 日目に胎仔の陰茎を採取した。

2) 尿道形成期における胎仔陰茎の遺伝子解析

尿道下裂のモデルラットとコントロールである正常ラットの双方から、雄仔の陰茎を採取した。具体的には、まず正常ラットの妊娠 15、17、19 日目と尿道下裂モデルラットの尿道下裂発生の臨界期である妊娠 17 日目に、雄仔から陰茎を採取した。採取した陰茎から total RNA を抽出し、逆転写によって cDNA を合成した。合成された cDNA は、20500 遺伝子のマイクロアレイチップにハイブリダイズさせスキャナーによる解析を行った。尿道形成に重要な遺伝子として、新規遺伝子(Pip: Prolactin-induced protein)を同定した。

3) 尿道下裂に関わる遺伝子の発現局在

Pipの免疫染色による発現局在解析の結果、陰茎包皮の表皮基底層に発現を認めた。

) パスウェイ解析

マイクロアレイの結果についてパスウェイ解析を行った。すなわち単独遺伝子一つ一つの評価ではなく、遺伝子群として遺伝子発現プロファイルの変化を捉えることを行った。FGFなど上流の調節因子により G タンパクやチロシンキナーゼ型受容体のシグナル伝達経路が亢進していることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Nakane Akihiro, Kurokawa Satoshi, Kamisawa Hideyuki, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro	4. 巻 10
2. 論文標題 Can lichen sclerosus be diagnosed by preputial appearance or symptoms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Research and Reports in Urology	6. 最初と最後の頁 89-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.2147/RRU.S173184.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imagami Toru, Takayama Satoru, Hattori Taku, Matsui Ryohei, Sakamoto Masaki, Kani Hisanori, Kurokawa Satoshi, Fujiwara Tsuyoshi	4. 巻 51
2. 論文標題 Combined laparoscopic and robotic surgery for synchronous colorectal and genitourinary cancer: A case series.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 323-327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ijscr.2018.09.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imagami Toru, Takayama Satoru, Kurokawa Satoshi, Hattori Taku, Matsui Ryohei, Sakamoto Masaki, Kani Hisanori, Fujiwara Tsuyoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 A rare case of for synchronous advanced cancer of ascending colon and urinary bladder with simultaneous laparoscopic resection: A case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery Case Reports	6. 最初と最後の頁 448-451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ijscr.2018.11.056.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuno Kentaro, Nakane Akihiro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Kato Taiki, Ando Ryosuke, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro	4. 巻 17
2. 論文標題 Involvement of the bone morphogenetic protein/SMAD signaling pathway in the etiology of congenital anomalies of the kidney and urinary tract accompanied by cryptorchidism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Urology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1186/s12894-017-0300-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 黒川 覚史、水野 健太郎、西尾 英紀、安井 孝周、林 祐太郎
2. 発表標題 胎生期の尿道形成にかかわる遺伝子パスウェイと上流の制御因子
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 Lower number of germ cells and serum inhibin-B levels in bilateral cryptorchidism than in unilateral cryptorchidism
3. 学会等名 The Societies for Pediatric Urology 67th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamisawa Hideyuki, Mizuno Kentaro, Kato Taiki, Nishio Hidenori, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 Spermatogonial stem cell activity and indication for surgery of retractile testes
3. 学会等名 The Societies for Pediatric Urology 67th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakane Akihiro, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 Management and long-term follow-up of perinatally-detected grade 1/2 hydronephrosis
3. 学会等名 The Societies for Pediatric Urology 67th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakane Akihiro, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Moritoki Yoshinobu, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 Timing of termination of follow-up observation for perinatally-detected grade 2 hydronephrosis
3. 学会等名 The Societies for Pediatric Urology 67th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurokawa Satoshi, Mizuno Kentaro, Nishio Hidenori, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Sequential development of the penile shape during childhood: Statistical analyses of phimosis and penile curvature.
3. 学会等名 第105回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kurokawa Satoshi, Mizuno Kentaro, Kamisawa Hideyuki, Moritoki Yoshinobu, Nishio Hidenori, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Hayashi Yutaro, Yasui Takahiro
2. 発表標題 Treatment indication of the infant phimosis judging from a penile foreskin natural history - the analysis of 1244 boys - .
3. 学会等名 2017 (65th) Annual Meeting of The Society for Pediatric Urology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水野 健太郎 (Mizuno Kentaro) (70448710)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	
研究分担者	守時 良演 (Moritoki Yoshinobu) (50595395)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	
研究分担者	西尾 英紀 (Nishio Hidenori) (10621063)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	神沢 英幸 (Kamisawa Hideyuki) (00551277)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	
研究分担者	林 祐太郎 (Hayashi Yutaro) (40238134)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	