

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15403

研究課題名(和文)アンドロゲン依存性の新しい骨盤筋肉発生機構のフロンティア解析

研究課題名(英文)Analysis on androgen dependent pelvic muscle formation

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨盤部間葉細胞を培養し、男性ホルモン(DHT)添付下にBC筋肉発生の亢進を見出した。Sa111陽性の間葉細胞の筋肉再生プロセスにおける機能について検討した。マウス四肢由来試料に於いて筋肉障害と再生を誘導すると、筋細胞に加え異所的な脂肪細胞も観察された。BC筋肉系に於いては同所見を示さなかった。胎児間葉細胞の分化として脂肪細胞分化も知られている。今後この特徴的の分化の解析が必要である。同間葉細胞からのパラクライン因子としてBmp(骨形成蛋白質)信号系因子が同定された。pSmadの発現は検出されず、よって間葉細胞からの信号伝達にノンカノニカルな同信号系の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The bulbocavernosus (BC) is a sexually dimorphic muscle observed only in males. Androgen signaling plays a vital role in its development. To identify the mechanism of sexual dimorphism during BC development, AR mutation in the adjacent mesenchyme using Sa111 Cre driver mouse was performed, which resulted in defective BC formation. This study suggests that the nonmyocytic AR regulates the formation of myoblasts. Explant culture including Sa111 GFP positive cells responded to the addition of DHT. The culture system is expected to offer vital information for the functions of such mesenchyme in response to androgen.

研究分野：発生医学、生殖器形成

キーワード：アンドロゲン 筋肉発生 骨盤 男性ホルモンレセプター(AR) 生殖機能 生殖器

1. 研究開始当初の背景

骨盤部の形成は、雌雄差が顕著な発生プロセスである。雄の交接を可能とする陰茎基部の筋肉として、球海綿体筋 (BC) の存在が知られている。BC は、顕著に雄特異的な発生を示す。一般に全身の骨格筋においては筋線維の肥大化等を含めて顕著な雌雄差が知られている。しかしながら、最も顕著な雄型の筋肉形成の代表として BC の発生機構は、未解明のままである。この為に BC の発生機構を周辺の骨盤部間葉からの制御を含めて解析する事は、極めて意義深いと考えられる。

2. 研究の目的

骨盤底をモデルとして男性ホルモン依存的な筋肉発生機構と近傍に存在する胎児間葉細胞の機能を解明する。転写因子 *Sal11* 陽性の胎児骨盤部の間葉細胞が男性ホルモン依存性筋肉発生に必須であることを示した (我々の論文 *Endocrinology* 2014)。この間葉細胞を *Sal11GFP* を指標として、マウス胎児より精製し、間葉細胞から筋芽細胞に分化させる候補シグナルを検索する。このようなパラクラインシグナルの意義やアンドロゲン依存性の筋肉形成の制御機構を解明する為に、*in vitro* における器官培養系を開発する。このような細胞を利用し、アンドロゲンに応答する骨盤部筋肉の発生解析、それらの細胞系を用いた実験を計画した。

3. 研究の方法

マウス胚会陰部より転写因子 *Sal11* 陽性の細胞主体とする間葉細胞を分離し、*explant* 培養を DHT (Androgen) 存在下に於いて行い、解析する。器官培養 5 日後、*MyoD* 発現や凝集体 (Sphere) における細胞増殖を検定する。更に、筋肉系の未分化幹細胞の存在を検定する為に *Pax7* 等のマーカー解析を行い、*Sal11* 陽性間葉細胞において発現するエフェクター因子の探索為に雄と雌において *Sal11* 陽性細胞

を採取してマイクロアレイ解析を行う。解析を行った結果有意な候補因子としてパラクライン性の殖因子シグナルを探索する。

4. 研究成果

BC を用いた器官培養系においてマウス骨盤部より間葉細胞を抽出し、男性ホルモン (DHT) 添付下において顕著な筋肉発生の亢進を見出した。対照群として、胎児四肢より調整した培養では DHT 添付により *MyoD* 陽性の筋芽細胞は亢進して出現しなかった。一方、BC 由来の培養系では DHT による *MyoD* 陽性細胞出現の亢進が顕著に見られた。*Sal11* 陽性の間葉細胞が筋肉の再生プロセスにおいて、如何に機能するかについてマウスモデルを用いて筋肉障害と再生研究を行った。マウスに於いて筋肉障害を引き起こし、再生が起こる実験系が知られている。マウス四肢に於いて筋肉再生を誘導すると、筋肉細胞に加え異所的な脂肪細胞の出現が観察された。一方 BC 筋肉系に於いてはこの様な脂肪細胞の出現が観察されなかった。一般に未分化な間葉幹細胞の分化として筋肉系に加えて、脂肪細胞に分化することが知られている。男性ホルモン誘導性の発生を示す BC 筋肉系に於いてはこの様な異所的な分化は観察されなかった。以上の所見は、男性ホルモン誘導性の筋肉発生機構について、四肢の筋肉発生との差異を示唆していると考えられた。

一方骨盤部間葉細胞から筋芽細胞に作用するパラクライン因子として *Bmp* (骨形成蛋白質) 信号系に属する因子群が同定された。同因子群は未分化な間葉細胞に機能し、骨形成に加えて未分化な他の細胞系への制御が知られている。これらの知見に従い同信号伝達の重要因子である *pSmad* の発現を調べたところ、その発現は検出されなかった。この事は間葉細胞からのシグナル伝達にノンカノニカルな *Bmp* 信号系が機能している可能性が推察された。これらの点についてはミュータン

トマウスを用いて研究を行う。

更に筋肉系の発生に連関する形で血管系形成が促進されることが判明した。会陰部においては陰茎脚を含む、勃起支持組織も知られている。しかしながらその機構は、不明点が多く、今回の結果は興味深い知見と考えられた。

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)

Suzuki K1, 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、2017 91(2)巻、2017年、247-253.

Doi: 10.1111/cge.12871.

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)巻、2017年、187-195

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)巻、2017年、146-152
Doi: 10.1111/andr.12241.

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. 査読有、8;7巻、2017年、42170

Doi: 10.1038/srep42170.

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)巻、2016年、4-13

Doi:10.2174/1389202916666151014221806.

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)巻、2016年、228-44

Doi: 10.1093/molbev/msv218.

Matsushita S, Suzuki K, Ogino Y, Hino S, Sato T, Suyama M, Matsumoto T1, Omori A,

Inoue S, Yamada G.
Androgen Regulates Mafb Expression Through
its 3'UTR During Mouse Urethral
Masculinization.

Endocrinology. 査読有、157(2)巻、2016年、
844-57

Doi: 10.1210/en.2015-1586.

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. 査読有、91(4-5)巻、2016
年、78-89

Doi: 10.1016/j.diff.2015.11.001.

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)巻、2015年、
139-47

doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.023.

[学会発表](計6件)

発表者名: 山田源

発表表題: "Androgen and local signal
interaction for mouse sexual
differentiation"

学会名: 第39回日本分子生物学会(招待講
演)

2016年11月30日-12月2日

発表場所: パシフィコ横浜

発表者名: Gen Yamada

発表表題: "Molecular mechanisms sexual
differentiation; Genetic cascade

responsible for sexual reproductive organ
formation and diseases, cancer"

学会名: Philippine society for cell
biology (PSCB) meeting (7th Annual and 1st
International convention and scientific
meeting) (招待講演)

2016年10月20日-21日

発表場所: Institute of Biology, University
of the Philippine, Diliman, フィリピン

発表者名: 山田源

発表表題: 「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」

学会名: 第53回北陸実験動物研究会(招待
講演)

2016年6月4日

発表場所: 金沢大学、金沢市

発表者名: Gen Yamada

発表表題: "Molecular mechanisms of sexual
differentiation: recent mouse models"

学会名: Lerner Research Institute Seminar
(招待講演)

2015年11月12日-13日

発表場所: Department of Biomedical
Engineering, Lerner Research Institute,
Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, USA

発表者名: 山田源

発表表題: 「外生殖器形成機構の最新研究」

学会名: 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(招
待講演)

2015年7月25日-27日

発表場所: パシフィコ横浜

発表者名: Gen Yamada

発表表題: "Development of external
genitalia"

学会名：I-DSD symposium, 5th International
DSD symposium (招待講演)
2015年6月11日-13日
発表場所：New Zebra, Ghent, Belgium

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

〔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
<http://www.wakayama-med.ac.jp/english/undergraduate/medicine/160904/index.html>
Research Gate, Gen Yamada
https://www.researchgate.net/profile/Gen_Yamada/

6 . 研究組織

(1)研究代表者