

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16086208

研究課題名（和文）

外生殖器発生を制御する泌尿生殖系構築過程の解析

研究課題名（英文）

Analysis of the developmental cascade of the mammalian external genitalia

研究代表者

山田 源（YAMADA GEN）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：80174712

研究成果の概要：

哺乳類外生殖器形成に関わる細胞増殖因子系の機能を世界で初めて明らかにした。胎児後端において総排泄腔近傍から発生する外生殖器の組織系譜を解明し、生殖器官が協調して発生するメカニズム解明を行なった。細胞増殖因子群として重要な Wnt 群の機能解析を行なった。本プロジェクトにより初めて哺乳類外生殖器の器官形成カスケードが解明され、有力国際学術雑誌に発表を行ない 世界の研究をリードした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	18,600,000	0	18,600,000
2005 年度	18,600,000	0	18,600,000
2006 年度	18,600,000	0	18,600,000
2007 年度	18,600,000	0	18,600,000
2008 年度	18,600,000	0	18,600,000
総計	93,000,000	0	93,000,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：生殖器、性分化、器官形成、細胞増殖因子、発生プログラム

1. 研究開始当初の背景

プロジェクト開始当初、世界で初めて哺乳類外生殖器に発現する細胞増殖因子 Fgf8 やソニックヘッジホッグ (Shh) 遺伝子などの発現を示した。細胞増殖因子 Fgf8 の場合、外生殖器先端上皮において、Shh の場合尿道上皮において発現する事を確認し、Fgf が外生殖器先端において機能する事、Shh が尿道形成過程に機能する事を明らかにした。それらを契機として他の細胞増殖因子群とのクロストーク、外生殖器が生殖系発生の中で如何

に協調発生するか、未踏問題を解析するプロジェクトの立ち上げに至った。

2. 研究の目的

哺乳類外生殖器の形成メカニズムの解析は他の一般器官形成プログラム解明に比べて大きく遅れていた。Fgf 系、ソニックヘッジホッグ遺伝子の哺乳類外生殖器発生プロセスでの機能解析に始まり、他の細胞増殖因子群クロストークや泌尿生殖系での外生殖器発生の位置づけ、組織系譜を解析するに至っ

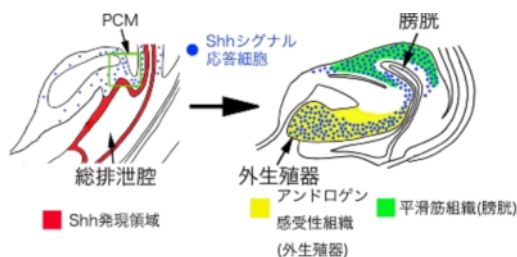
た。本研究では外生殖器の初期パターンングに関わる制御因子系を明らかにする事、それらの制御因子系のカスケードを明らかにすること、さらに総排泄腔近傍から発生する外生殖器の組織系譜や生殖器官系全体における協調発生メカニズムの解明を行なう事、さらに Wnt 等の増殖因子群の機能解明を進める事を目的とした。

3. 研究の方法

細胞増殖因子カスケードの機能解析を行なうため、外生殖器上皮（外胚葉上皮）及び内胚葉上皮（発生期尿道）や間葉でコンディショナルに遺伝子改変行なうための deleter (Cre マウスライン) を整備した。それらのマウスラインとしては外胚葉性上皮として Brn4Cre マウス、内胚葉上皮としては Shh Cre マウス、間葉の Cre マウスとしては Gli1Cre マウスを検定、用意した。また細胞増殖因子群や転写因子群の機能解析を行なうにあたり、Bmp（骨形成因子）系細胞増殖因子遺伝子改変マウス、Bmp 系のアンタゴニストである noggin ミュータント、さらに SHFM（裂手裂足症）モデルマウスである Dix5/6 ミュータント、器官形成において重要な増殖因子系である Wnt/ カテニン系のミュータントマウスを用意し、多数の複合コンパウンドミュータントを準備し、外生殖器の形成における発生制御遺伝子プログラムの解明や外生殖器と生殖系の協調発生、系譜に関する遺伝的解析を行なった。

4. 研究成果

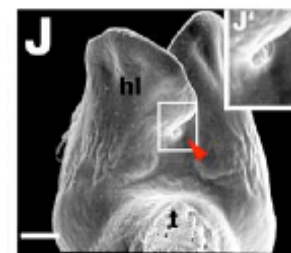
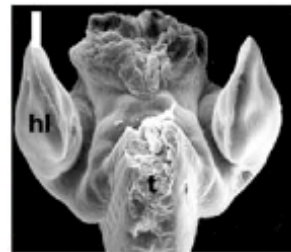
(1) 外生殖器形成において重要な働きをし、尿道に発現することが判明していた Shh 遺伝子は総排泄腔においても発現することを示した。Shh が上皮で発現するとその近傍間葉 (PCM) に作用し、PCM は同シグナル受容後、複数の異なる生殖器官間葉、即ち外生殖器上部間葉（将来亀頭、海綿体等に分化する）及び膀胱間葉（将来平滑筋組織に分化する）に分化する事が明らかとなった。（図参照；Haraguchi et. al., Development, 2007）



生殖系における遺伝的な組織系譜解析：Shh シグナルを受容して総排泄腔近傍間葉 PCM が複数の組織（黄色、緑色の箇所）に寄与する事が初めて示された。

本知見は外生殖器が生殖系全体の構築の一環として如何に形成されるかを示した。ヒト生殖系においては多くの先天性異常が見出されている。これら先天性発生異常の中には EEC（膀胱破裂、及び尿道上裂）などの複数の組織に症状を示す生殖発生症候群が含まれている。これらの複数症状を示す症候群の理解が大きく進展した。

(2) Bmp シグナルは我々の解析によって外生殖器、あるいは四肢において Fgf 系等の増殖因子系と相互作用することが判明していた。今回我々は Bmp シグナル、特にそのアンタゴニスト noggin を含めた Bmp シグナルの適正な入力（EMT（上皮間葉転換）の制御に重要である事を初めて示した。この EMT は外生殖器が形成される以前の原腸形成期の終結期に起こる。その際、尾部の VER（尾芽近傍の上皮組織）において、適切な EMT 制御が重要である事を示した。これら EMT 制御の破綻は細胞供給異常につながり、それら異常は外生殖器の発生フィールドの縮小、それに伴う後肢融合等の症状を示し、一種のマーメード症候群（後肢融合、生殖系の異常で有名）を引き起こす事を初めて示した（右図：上正常胚、下操作胚 後肢 (hl) 融合を示す）。



(3) 本プロジェクト開始当初から外生殖器先端の形成メカニズムは重要な研究テーマであった。Dix 遺伝子はショウジョウバエにおいてそのホモログは dII と称し、ショウジョウバエミュータントにおいて四肢（付属肢）の先端構造を欠損する。しかも Dix 遺伝子 5, 6 の変異を有するヒト疾患は SHFM（裂手裂足症）として知られ、指の欠損、及びパターンの変化を示す。そこで Dix5/6 ミュータントマウスを解析した結果、驚くべき事に外生殖器においては尿道異常を示す事が判明した。ヒトの SHFM 患者においても尿道異常が報告されており、このことから SHFM の一部として尿道形成異常も本疾患の症状である事が初めて判明した。さらに Dix 遺伝子の下流についても解析し、皮膚発生において重要な p63 遺伝子と Dix 遺伝子はある種共通の下流制御因子を制御している事が示された。

(4)細胞増殖因子シグナルとして極めて重要な Wnt カテニンカノニカルシグナルが知られている。このカノニカルシグナルのミュータント、及びその信号を過剰に入力したマウスを解析した結果、Wnt/ カテニンシグナルが尿道形成や外生殖器伸長に重要である事、さらに興味ある事に外生殖器の雄型雌型の分化に Wnt/ カテニンシグナルが関与している事を初めて明らかとした。これら知見は本研究プロジェクトにより初期の性差形成以前の外生殖器原基のパターン化についてカスケード解析を進め、このような外生殖器性差形成に関与する遺伝的カスケードが明らかとなりつつある状況である。

以上のように、本研究プロジェクトにおいてはミュータントマウス解析系を駆使用する事によって外生殖器形成パターンに重要な遺伝的カスケードを明らかにした。また細胞増殖因子の応答、その応答能を用いた組織系譜解析から外生殖器が生殖系全体の中で如何に形成され、起源的に共通する種々の組織系譜を明らかにする事が出来た。これらの解析結果は Development3 報以上 (共同研究を含めさらに多数) Molecular Endocrinology1 報、Endocrinology1 報、Eur J Hum Genet.1 報等を含む 39 報の英文論文として発表した。これらの解析は世界でも外生殖器発生カスケード解析の研究をリードする事となり、ゴードン会議招待講演、Mouse Molecular Genetics, CSH Meeting 招待講演などを含む多数のシンポジウム講演や国内での多くの国際会議のオーガナイズにつながり、その開催を成功させた。これら研究によって外生殖器の初期パターン化の研究が数個の遺伝子発現、断片的な知見に留まっていた状況から、外生殖器が初期パターンとして如何なるカスケードによって形成されるか明らかとなった。本領域は分子発生学のみならず発生医学、先天性異常解明、生殖・内分泌学方面にもインパクトを与えることとなった。

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49件)

1. Miyagawa,S.,and Yamada,G. (著者 11 名中 11 番目) . Genetic interactions of the Androgen and Wnt/ -catenin Pathways for the Masculinization of External Genitalia. Mol.Endocrinol., in press (査読あり)
2. Suzuki,K., and Yamada,G. (著者 13 名中 13 番目) . Embryonic hair follicle fate change by augmented -catenin through Shh and

Bmp signaling. Development, 136:367-372, 2009. (査読あり)

3. Nishida,H., and Yamada,G.(著者 10 名中 10 番目) .Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression through the interaction between Dlx and GATA-4 for testicular steroidogenesis. Endocrinology, 149:2090-7, 2008(査読あり)
4. Ohta,S., Suzuki,K., Tachibana,K., Tanaka,H. and Yamada,G. (著者 5 名中 5 番目) . Cessation of gastrulation is mediated by suppression of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) at the Ventral ectodermal ridge. Development, 134:4315-24, 2007 (査読あり)
5. Haraguchi,R., and Yamada,G. (著者 8 名中 8 番目) . Molecular analysis of coordinated bladder and urogenital organ formation by Hedgehog signaling. Development 134: 525-533, 2007 (査読あり)

[学会発表](計46件)

1. Gen Yamada (オーガナイザー) Speakers: Ahmed Mansouri, Hongkui Deng, Jacques Drouin, Seppo Vainio, Connie Eaves, 山中伸也. The 1st Kumamoto University Global COE International Symposium on Cell Fate Regulation. Kumamoto, Japan,2008
2. Gen Yamada (session chair) at The 2nd Asian Mouse Mutagenesis and Resource Association (AMMRA) Meeting. November 22-24, Nanjing, China, 2007
3. Yamada,G. External genitalia formation; a glamorous developmental model system? Reproductive Tract Biology, Gordon (ゴードン) Conference. New London, CT, USA. 2006 (招待講演)
4. Chairman: Gen Yamada (Speaker: Dr. Aris N Economides, Dr. Jeffrey W. Innis and Dr. Gen Yamada), Session 8, "Studies relevant to mouse limbs" in 9th International Conference on Limb Development and Regeneration. Awaji, Japan, 2006.7
5. Yamada,G. Molecular Analysis of External Genitalia Formation: integration of growth factors and transcription factors for the regulation of Murine Genital Tubercle (GT) Development. Mouse Molecular Genetics, CSH Meeting, Cold Spring Harbor, USA, 2004 (招待講演)

[その他]

<http://hdl.handle.net/2298/10388>

<http://hdl.handle.net/2298/10390>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 源 (Yamada Gen)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・
教授

研究者番号 : 80174712

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし